



HAL
open science

Télomerase et destin des tumeurs neuroblastiques

Mona Samy

► **To cite this version:**

Mona Samy. Télomerase et destin des tumeurs neuroblastiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT : 2011PA11T039 . tel-00708221

HAL Id: tel-00708221

<https://theses.hal.science/tel-00708221>

Submitted on 14 Jun 2012

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

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

Université Paris XI
Faculté de Médecine Paris-Sud

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI
Spécialité: Cancérologie
par

Mona SAMY

TELOMERASE ET DESTIN DES TUMEURS NEUROBLASTIQUES

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 8 Juillet 2011 devant le jury composé de :

Professeur Christian AUCLAIR, Président du Jury
Docteur François BOUSSIN, rapporteur
Docteur Santos SUSIN, rapporteur
Docteur Jean Bénard, examinateur
Docteur Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN Directrice de Thèse

Sommaire

Liste des abréviations.....	5
Liste des illustrations	8
Avant-propos	10
Introduction	12
Chapitre I : Les télomères et la télomérase.....	12
A. Les télomères : substrats de la télomérase	12
1. Structures des télomères et protéines associées	12
1.1. L'ADN télomérique.....	12
1.2. Les protéines télomériques : le complexe shelterin	13
1.2.1. Les protéines TRF1 et TRF2	15
1.2.2. La protéine TIN2.....	16
1.2.3. La protéine hPOT1.....	16
1.2.4. La protéine RAP1.....	17
1.2.5. La protéine TPP1	17
1.3. Structure tridimensionnelle des télomères	18
1.3.1. La boucle T/boucle-D	18
1.3.2. Les G-quadruplexes	19
B. Le complexe télomérase : structure et régulation.....	19
1. Structure du complexe télomérase.....	20
1.1. La matrice hTR	20
1.2. hTERT.....	21
1.3. Protéines associées.....	23
1.3.1. Les protéines se fixant à hTERT.....	23
1.3.2. Les protéines se fixant à hTR	24
2. Régulation de l'activité télomérase	24
2.1. La régulation d'hTERT	25
2.1.1. La régulation transcriptionnelle du gène <i>hTERT</i>	25
2.1.2. La régulation épigénétique	28
a. La méthylation de l'ADN.....	28
b. Les modifications des histones.....	29
2.1.3. La régulation post-transcriptionnelle: l'épissage alternatif	31
2.1.4. Les modifications post-traductionnelles.....	32
2.2. La régulation d'hTR	34
C. Les fonctions de la télomérase.....	35
1. La fonction canonique d'élongation des télomères	35
1.1. De la sénescence répliquative à la télomérase	35
1.2. L'élongation des télomères par la télomérase.....	37
2. La fonction de protection des télomères de la télomérase	39
3. Fonction non canonique d'hTERT dans la tumorigenèse	40
3.1. L'apoptose.....	40

3.1.1	La signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose	40
a.	Voie intrinsèque	41
b.	Voie extrinsèque.....	41
3.1.2	Les membres de la famille Bcl-2	42
3.1.3	Rôle de p53 dans l'apoptose	43
3.1.4	Les autres protéines participant à l'apoptose	44
3.1.5	Exécution du « message de mort » par les caspases	44
3.1.6	L'apoptose caspase-indépendante	45
3.2.	Vers la découverte d'une fonction anti-apoptotique de la télomérase	47
3.3.	Mise en évidence du rôle anti-apoptotique d'hTERT <i>in vitro</i>	50
3.4.	Mise en évidence du rôle anti-apoptotique d'hTERT chez la souris	53
3.5.	Fonction anti-apoptotique non canonique de la télomérase : les mécanismes d'actions	54
3.5.1	TERT dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire	56
3.5.2	TERT dans la régulation épigénétique	59
3.5.3	TERT dans la voie de signalisation Wnt/Béta-caténine	59
3.5.4	TERT interagit avec des protéines de la voie de signalisation apoptose/survie	60
a.	hTERT et apoptose p53-dépendante	60
b.	hTERT et apoptose p53 indépendante.....	62
3.5.5	La localisation d'hTERT est-elle un argument en faveur de sa fonction anti-apoptotique ?	64
3.5.6	TERT dans la réponse aux dommages de l'ADN	67
a.	hTERT et les protéines de la réparation de l'ADN	68
b.	La télomérase « cicatrise » les chromosomes	68
c.	hTERT et la réponse aux dommages de l'ADN.....	69
Chapitre II : Les neuroblastomes		71
A.	Généralités	71
B.	Aspects cliniques, biologiques et cytogénétiques des neuroblastomes	72
1.	Hétérogénéité clinique et histologique	72
1.1.	Hétérogénéité clinique	72
1.1.1	Classification des neuroblastomes.	72
1.1.2	Traitements et taux de survie	74
1.2.	Hétérogénéité histologique : le spectre de différenciation des tumeurs ...	76
2.	Hétérogénéité génétique : Aspects moléculaires et génétiques	77
2.1.	Index ADN	77
2.2.	Amplification du proto-oncogène N-Myc	78
2.3.	Les gains et pertes de segments chromosomiques	81
2.3.1	Gain du 17q	81
2.3.2	Perte du 1p	81
2.3.3	Perte du 11q	83
2.3.4	Autres chromosomes	83
2.4.	Altération de l'expression génique	83
2.4.1.	Les récepteurs Tyrosine kinase aux neurotrophines.	83
2.4.2	Le CD44	85
2.4.3	Les protéines de la signalisation apoptotique.	86
a.	Caspase-8	86

b. p53	87
c. Bcl-2	88
C. Télomérase et neuroblastomes	89
1. La télomérase dans le développement des neuroblastes et dans la tumorigenèse des neuroblastomes	89
2. La télomérase comme marqueur biologique et facteur prédictif des neuroblastomes	90
2.1. La longueur des télomères dans les neuroblastomes.....	91
2.2. L'activité télomérase dans les neuroblastomes.....	92
D. Théorie de la cellule souche cancéreuse dans les neuroblastomes	94
E. Le modèle cellulaire IGR-N-91	97
Projet de recherche	99
Travaux de thèse.....	101
A. Article: L'inhibition de la télomérase influence le destin des neuroblastome via un mécanisme télomère-indépendant: Induction de la différenciation et sensibilisation à l'apoptose.....	101
B. Résultats complémentaires	130
1. L'inhibition de la télomérase influence le destin des neuroblastome via un mécanisme télomère-indépendant: Induction de la différenciation et sensibilisation à l'apoptose.....	130
1.1. Les cellules IGR-N-91 hTERT-DN présentent une diminution de l'expression des protéines TRF1, TRF2 et PARP-1	130
1.2. L'expression ectopique d'hTERT-WT ou hTERT-DN ne modifie pas la sensibilité des cellules SK-N-BE(2), SK-N-AS et SH-EP aux agents cytotoxiques	132
2. Régulation de hTERT et autres modifications en réponse à l'ATRA dans 4 lignées de neuroblastomes	135
2.1. Evaluation de la morphologie et de la prolifération cellulaire des lignées de neuroblastomes lors d'un traitement par 1µM d'ATRA.....	136
2.2. Le traitement par l'ATRA conduit à la dégradation des récepteurs nucléaires RARα et RXRα.....	138
2.3. Le traitement par l'ATRA entraîne une modulation des marqueurs phénotypiques	139
2.4. Le traitement par l'ATRA diminue la quantité de transcrits de hTERT et l'activité télomérase dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2)	141
2.5. Le traitement par l'ATRA diminue l'expression de l'oncoprotéine N-Myc	144
2.6. Le traitement par l'ATRA induit la réexpression de la caspase-8 dans deux lignées de neuroblastomes sensibles à la différenciation par les rétinoïdes	144
Discussion et perspectives.....	149
Bibliographie.....	163
Annexes	211

Liste des abréviations

Abl	<i>Abelson</i>
ADN	<i>Acide DésoxyriboNucléique</i>
ADNmt	<i>Acide DésoxyriboNucléique mitochondriale</i>
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
ALK	<i>naplastic lymphoma receptor tyrosine kinase [</i>
ALT	<i>Alternative Lenghtening of Telomeres</i>
AP1	<i>Activator Protein 1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Protéase-Activating Factor-1</i>
ARN	<i>Acide RiboNucléique</i>
AT	<i>Activité Télomérase</i>
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated gene</i>
ATP	<i>Adénosine TriPhosphate</i>
ATRA	<i>All-Trans Retinoic Acid</i>
AZT	<i>3'-AZydo-2',3'-dideoxyThymidine</i>
Bcl-2	<i>B Cell Leukemia/lymphoma 2</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BH	<i>Bcl-2-Homology domain</i>
BrdU	<i>5-BRomo-2'-DeoxyUridine</i>
CAD	<i>Caspase- Activated DNase</i>
iCAD	<i>Inhibitor of Caspase- Activated Dnase</i>
Caspase	<i>Cysteinyl ASpartate proteinASE</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CHiP	<i>CHromatin ImmunoPrecipitation</i>
CR	<i>Conserved Region</i>
DAT	<i>Dissociates Activities of Telomerase</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DKC1	<i>Dyskeratosis Congenita gene 1</i>
DM	<i>Double-Minute</i>
DNMT	<i>DNA cytosine-5 MethylTransferases</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAPDH	<i>Glyceraldéhyde 3 Phosphate DesHydrogénase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HAT	<i>Histone AcetylTransferases</i>
HDAC	<i>Histones DéACétylases</i>
HEST1A	<i>Human Ever Shorter Telomere 1, A</i>
HMEC	<i>Human Mammary Epithelial Cells</i>
hnRNP	<i>Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein</i>
hPOT1	<i>Human Protection Of Telomeres</i>
H-RAS	<i>Harvey RAt Sarcoma virus oncogene</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSR	<i>Homogeneously Staining Region</i>
hStau	<i>Human STAufen</i>
hTERT	<i>Human Telomerase REverse Transcriptase</i>
hTR	<i>Human Telomerase RNA component</i>

Liste des abréviations

IAP	<i>Inhibitors of Apoptosis Protein</i>
id2	<i>Inhibitor of Differentiation 2</i>
IDRF	<i>Image-Defined Risk Factors</i>
IGF2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
IGFBP5	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5</i>
INRG	<i>International neuroblastoma Risk Group</i>
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
ITS	<i>Interstitial Telomere Sequence</i>
kb	<i>kiloBase</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
kpb	<i>Kilo Paires de Bases</i>
L22	<i>Ribosomal Protein L22</i>
LAP	<i>Leucémie Aiguë Promyélocytaire</i>
LDH	<i>Lactate DeHydrogenase</i>
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
MAD	<i>MAX Dimerization Protein</i>
MAX	<i>Myc Associated factor X</i>
MRE11	<i>Meiotic REcombination 11 homolog</i>
Myb	<i>MYeloBlastosis viral oncogene</i>
MYC	<i>MYeloCytomatosis viral oncogen homolog (avian)</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NMA	<i>N-Myc Amplifié</i>
N-MYC	<i>Neuroblastoma-MYC</i>
NOLA	<i>Nucleolar Protein Family A</i>
NoLD	<i>Nucleolar Localisation Domain</i>
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i>
NT-3, -4, -5	<i>Neurotrophin 3,4 et 5</i>
P53	<i>Tumor Protein 53 kDa</i>
P75NTR	<i>p75 Neurotrophin Receptor</i>
Parc	<i>p53-associated Parkin-like cytoplasmique protein</i>
PARP	<i>PolyAdenosine-diphosphate-Ribose Polymerase</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHOX2B	<i>Paired-like HomeobOX 2b</i>
PKB	<i>Protein Kinase B</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PP1	<i>Protein Phosphatase 1</i>
PP2B	<i>Protein Phosphatase 2B</i>
Q-PCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAD17	<i>RADiation sensitive gene 17</i>
RASSF1A	<i>Ras ASSociation domain Family member 1</i>
Rb	<i>Rétinoblastome</i>
RMRP	<i>RNA component of Mitochondrial RNA Processing endoribonuclease</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>

Liste des abréviations

SIPS	<i>Stress-Induced Premature Senescence</i>
siRNA	<i>Short Interfering RNA</i>
SIT	<i>Site d'Initiation de la Transcription</i>
Smac/Diablo	<i>Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with LOw pI</i>
SP1	<i>Transcription Factor Sp1</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Tankyrase	<i>TRF1-Interacting ANKYrin-related ADP-Ribose polymerASE</i>
t-Bid	<i>Bid tronqué</i>
TBPs	<i>Telomere Binding Proteins</i>
TEP1	<i>TElomerase-associated Protein 1</i>
TIN2	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIN2	<i>TRF1-Interacting Nuclear factor 2</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP1	<i>Telomerase associated Protein 1</i>
TP53BP1	<i>Tumor Protein p53 Binding Protein 1</i>
TPP1	<i>TIN2 and POT1 interacting Protein</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRAP	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
TRF1	<i>Telomeric Repeat-Binding Factor 1</i>
TRF2	<i>Telomeric Repeat-Binding Factor 2</i>
Trk	<i>Tropomyosine Related Kinase (A, B et C)</i>
TSA	<i>Trichostatin A</i>
VDAC	<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>

Liste des illustrations

Figures

- Figure 1:** Représentation schématique du complexe shelterin au niveau du télomère (p14).
- Figure 2:** Photographie de télomères terminés par une boucle-T (p18).
- Figure 3:** Représentation schématique d'un quadruplexe (p19).
- Figure 4:** La structure secondaire de hTR (p21).
- Figure 5:** Représentation schématique de la structure de la protéine hTERT (p25).
- Figure 6:** Niveaux de régulation de la télomérase (p27).
- Figure 7:** La régulation transcriptionnelle d'hTERT (p26).
- Figure 8:** Les variants d'épissage de l'ARNm hTERT (p32).
- Figure 9:** Représentation schématique de l'hypothèse télomérique du vieillissement et de l'immortalisation cellulaire (p36).
- Figure 10:** Modèle de l'élongation processive des télomères par la télomérase (p38).
- Figure 11:** Schéma récapitulatif des différentes signalisations apoptotiques (p47).
- Figure 12:** Système de cancérogenèse expérimentale à partir de cellules humaines « normales » (p49).
- Figure 13:** Schéma récapitulatif des rôles extra-télomériques possibles d'hTERT dans la tumorigenèse (p55).
- Figure 14:** Localisation des neuroblastomes (p71).
- Figure 15:** Courbe de survie des enfants atteints de neuroblastomes métastatiques ayant une amplification de N-Myc (p80).
- Figure 16:** Représentation schématique de la signalisation des récepteurs tyrosine kinase aux neurotrophines dans les neuroblastomes (p85).
- Figure 17:** hTERT-DN diminue l'expression des protéines TRF1, TRF2 et PARP-1 sans modification notable des niveaux de transcrit de TRF2 et PARP-1 (p130-131).
- Figure 18:** Le traitement des cellules surexprimant hTERT-DN par un inhibiteur du protéasome ne restaure pas une accumulation des protéines TRF2 et PARP-1 (p131-132).
- Figure 19:** La surexpression d'hTERT-WT ou hTERT-DN n'influence pas la viabilité des cellules SH-EP, SK-N-AS et SK-N-BE(2) soumises à un traitement de 48h par différents agents cytotoxiques (p133-134).
- Figure 20:** Morphologie et courbes de croissance de lignées de neuroblastomes traitées ou non par 1µM d'ATRA (p137).
- Figure 21:** Expression protéique des récepteurs nucléaires RARα et RXRα, au cours d'un traitement par l'ATRA (1µM) (p139).
- Figure 22:** Expression protéique de marqueurs de la différenciation au cours d'un traitement par l'ATRA (1µM) dans les lignées de neuroblastomes (p142).
- Figure 23:** Traitement des lignées de neuroblastomes par l'ATRA 1µM: expression en ARNm de hTERT et activité télomérase (p143).
- Figure 24:** Evolution du profil de la longueur des télomères lors du traitement long par l'ATRA 1µM dans les lignées de neuroblastomes (p144-145).
- Figure 25:** Le traitement par l'ATRA (1µM) inhibe l'expression de N-Myc (p145).
- Figure 26:** L'ATRA (1µM) induit la réexpression de la caspase-8 dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2) (p146).
- Figure 27:** La réexpression de la caspase-8 en réponse à l'ATRA (1µM) n'est pas suffisante pour induire l'apoptose des IGR-N-91 par le cisplatine (p147).
- Figure 28:** Modèle proposé pour expliquer la modification du phénotype de la lignée IGR-N-91 après transduction par le mutant hTERT-DN (p159).

Tables et tableaux

Tableau 1: Tableau récapitulatif des rôles télomériques et extra-télomériques des protéines du complexe shelterin (p14).

Tableau 2: Classification des neuroblastomes selon l' « International Neuroblastoma Staging System » INSS (p73).

Tableau 3: Classification des neuroblastomes selon l' « International Neuroblastoma Risk Group » (p73).

Tableau 4: Classification des risques IRGS (International Risk Group System (p74).

Tableau 5: Corrélation entre l'amplification de N-Myc et le stade dans les neuroblastomes (p80).

Tableau 6: Caractéristiques cliniques et biologiques des quatre lignées de neuroblastomes (p129).

Avant-propos

L'intérêt de la communauté scientifique pour la télomérase n'a cessé de croître du fait de son implication dans les processus de vieillissement et de tumorigenèse (Gilson and Segal-Bendirdjian; Harley et al., 1990). Le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine a été décerné le 5 octobre 2009 à E. Blackburn, C. Greider et J. Szostak pour l'ensemble de leurs travaux sur la télomérase et les télomères.

La télomérase est une ribonucléoprotéine, constituée d'un composant ARN (hTR) qui sert de matrice à l'addition des séquences télomériques et d'un composant protéique catalytique responsable de l'activité transcriptase inverse de la télomérase (hTERT) (Blackburn, 2001; Feng et al., 1995; Meyerson et al., 1997). Contrairement aux cellules somatiques, dans lesquelles elle est quasiment indétectable, la télomérase est fortement exprimée dans les cellules tumorales et permet l'allongement de structures situées à l'extrémité des chromosomes appelées télomères. En maintenant la longueur des télomères, la télomérase permet la survie et l'immortalisation des cellules. Ce rôle canonique de la télomérase est aujourd'hui bien documenté, en revanche des travaux récents suggèrent que la réactivation de la télomérase dans les cancers pourrait intervenir dans la tumorigenèse par un mécanisme encore inconnu, indépendant de son rôle sur le maintien de la longueur des télomères.

Le neuroblastome est une tumeur solide extra-crânienne qui affecte l'enfant très jeune, généralement avant l'âge de 5 ans. Remarquable de part son hétérogénéité de présentation clinique et d'évolution, les neuroblastomes forment un spectre de tumeurs extrêmement large allant des formes les plus agressives à celles capables de se différencier ou de régresser spontanément. Cette capacité de régression et de maturation en fait une tumeur tout à fait particulière. Dans les neuroblastomes, l'augmentation du niveau d'activité télomérase est associée avec le stade avancé de la maladie et un mauvais pronostic de survie (Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Reynolds et al., 1997). Aussi, un faible niveau d'activité télomérase semble directement corrélé avec la régression ou la maturation d'un groupe de neuroblastomes de bon pronostic appelé stade 4S. Ces observations ont donc conduit à proposer la télomérase comme cible de nouvelles stratégies anticancéreuses.

Durant ma thèse, je me suis intéressée à caractériser les altérations génotypiques et phénotypiques associées à l'inhibition de l'activité télomérase engendrée par l'expression ectopique d'un mutant dominant-négatif d'hTERT (hTERT-DN) dans une lignée de neuroblastome établie à partir de métastases issues d'une tumeur agressive et chimiorésistante de stade 4. Nos résultats montrent que l'inhibition de la télomérase dans les neuroblastes immatures de la lignée IGR-N-91 : 1) entraîne l'acquisition d'un phénotype de type stromale associée à une modification de l'expression de gènes clés de la tumorigenèse (N-Myc, p53, caspase-8) 2) est une stratégie particulièrement efficace pour entraîner la mort de ces neuroblastes en réponse à des agents cytotoxiques.

Notre laboratoire s'intéresse au rôle prépondérant de la télomérase dans la tumorigenèse et la progression tumorale et en tant que cible potentielle pour des approches thérapeutiques anticancéreuses. Les généralités relatives aux télomères, à la télomérase et aux neuroblastomes feront l'objet d'une présentation synthétique bibliographique. Cette **introduction** permettra ensuite d'aborder les **objectifs** de la thèse. Enfin, les **résultats** de nos travaux, suggérant l'implication d'une fonction non canonique de télomérase dans le phénotype malin du neuroblastome, seront suivis de la **discussion** et des **perspectives**.

Introduction

Chapitre I : Les télomères et la télomérase

A. Les télomères : substrats de la télomérase

1. Structures des télomères et protéines associées

Chez la plupart des procaryotes, les chromosomes sont circulaires et ne possèdent donc pas d'extrémités libres susceptibles d'être altérées par une réplication incomplète. En revanche, chez les eucaryotes, les chromosomes sont linéaires (sous forme de bâtonnets) et possèdent des télomères à leurs extrémités. Ces télomères (du grec *telos* : la fin ; *meros* : segment) constituent des édifices nucléoprotéiques qui coiffent les extrémités naturelles des chromosomes (Blackburn, 2001; de Lange, 2002). Les télomères empêchent que les extrémités chromosomiques soient reconnues comme des cassures par les systèmes de réparation des dommages de l'ADN. Ils ont pour rôle de protéger les séquences géniques situées en amont vis-à-vis des phénomènes de dégradation et des événements de recombinaisons inappropriées empêchant ainsi la perte de l'information génétique. En plus de cette fonction de protection, ils participent également à l'organisation nucléaire et à la bonne ségrégation des chromosomes.

1.1. L'ADN télomérique

Dans les cellules humaines, les télomères sont composés de séquences répétitives d'ADN double brin (5'-TTAGGG-3') de 5 à 15kb et d'une extrémité 3' simple brin d'environ 200 à 300 bases (Makarov et al., 1997; Wright et al., 1997). Dans tous les organismes étudiés, le brin riche en guanines correspondant à l'extrémité 3' est plus long que le brin complémentaire riche en cytosines. Le motif télomérique hautement conservé au cours de l'évolution, diffère de 5 à 8 paires de nucléotides selon les espèces (Zakian, 1995). Quant au nombre des répétitions télomériques, il varie selon les espèces, selon les individus et même entre les différents chromosomes d'une même cellule.

A cause du « problème de la réplication des extrémités » décrit pour la première fois par Olovnikov en 1971, les télomères humains perdent en moyenne 30 à 150pb à chaque division cellulaire. Cette perte d'ADN télomérique s'explique en partie par le fait que l'ADN

polymérase est incapable de répliquer complètement l'extrémité des chromosomes (Olovnikov, 1973). Dans les cellules somatiques normales, cette réplication incomplète de l'extrémité de l'ADN entraîne un raccourcissement progressif des télomères jusqu'à une taille critique déclenchant *in fine* un phénomène de sénescence et/ou d'apoptose (Harley et al., 1990).

1.2. Les protéines télomériques : le complexe shelterin

Un grand nombre de protéines sont associés aux télomères. Parmi celles-ci, six protéines appartiennent au complexe shelterin qui compose « la coiffe » télomérique et possèdent un rôle crucial dans la régulation de la taille des télomères (McEachern et al., 2000; Smogorzewska and de Lange, 2004). Chez l'homme, le complexe shelterin est constitué des protéines TRF1 (*Telomeric Repeat-Binding Factor 1*), TRF2 (*Telomeric Repeat-Binding Factor 2*), TIN2 (*TRF1-Interacting Nuclear Factor 2*), POT1 (*Protection of Telomere 1*), TPP1 (*TIN2 and POT1 interacting Protein*) et RAP1 (*Repressor Activator Protein 1*), identifiées successivement au cours de ces 15 dernières années (*Figure 1*). TRF1 fut la première protéine télomérique isolée lors de la recherche de protéines capables de se lier spécifiquement au double brin d'ADN télomérique (Chong et al., 1995; Zhong et al., 1992). TRF2 a été identifiée comme une protéine paralogue de TRF1 par l'équipe de Bilaud et al et Broccoli et al en 1997 (Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997). TIN2 et RAP1 ont été découvertes par des analyses de criblage double hybride (Kim et al., 1999; Li et al., 2000). Enfin POT1 a été identifiée par son homologie de séquence avec les facteurs de liaison aux télomères chez les organismes eucaryotes unicellulaires (Baumann and Cech, 2001).

Les protéines du complexe shelterin se distinguent des autres protéines télomériques par 3 caractéristiques : elles ne s'accumulent qu'au niveau des extrémités chromosomiques, elles y sont présentes durant tout le cycle cellulaire et leur fonction est strictement limitée aux télomères. La présence de domaine de reconnaissance pour le motif TTAGGG permet au complexe shelterin de s'associer spécifiquement aux télomères. Cette spécificité pour le télomère permet au complexe shelterin d'empêcher la reconnaissance des télomères comme des cassures de l'ADN, d'assurer la structure terminale du télomère notamment dans la formation de la boucle T et de contrôler la synthèse de l'ADN télomérique par la télomérase. Certaines des protéines du complexe shelterin ont des fonctions particulières, répertoriées dans le tableau 1 et discutées un peu plus loin.

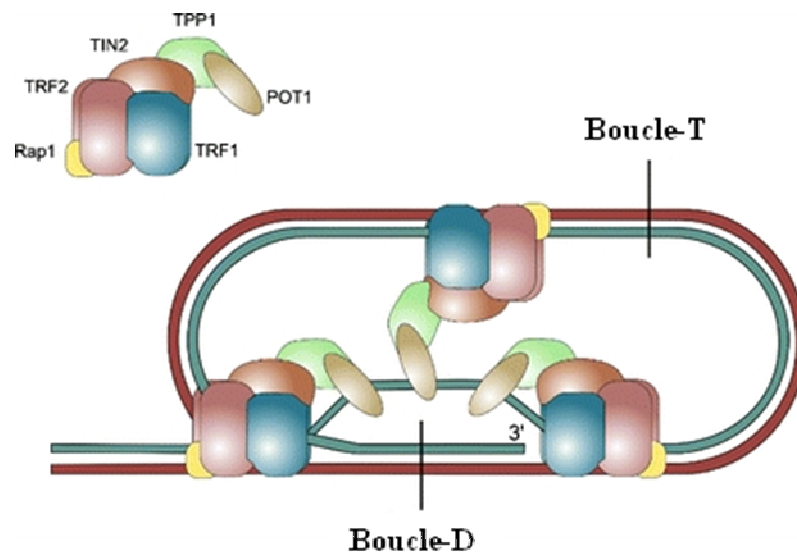


Figure 1 : Représentation schématique du complexe shelterin au niveau du télomère. Les protéines TRF1, TRF2, POT1, Rap1, TIN2, et TPP1 constituent le complexe shelterin qui coiffe le télomère. Ce complexe protéique est essentiel à la stabilité de la boucle -T (D'après Oeseburg et al., 2010)

Rôles télomériques du complexe shelterin		références
• Protection et recombinaison	TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 et RAP1	(de Lange, 2005, 2009; Martinez and Blasco, 2010)
• Protection du brin G	POT1	(Hockemeyer et al., 2006; Wu et al., 2006)
• Régulation de la taille des télomères	TRF2, TRF1, TIN2, TPP1 et RAP1	(de Lange, 2005, 2009; Martinez and Blasco, 2010)
• Inhibition de la réponse aux dommages de l'ADN	TRF2, TRF1, POT1 et RAP1	(de Lange, 2005; Martinez and Blasco, 2010; Martinez et al., 2010; Sfeir et al., 2010)
• Réplication des télomères	TRF1	(Martinez et al., 2009; Sfeir et al., 2009)
• Recrutement de la télomérase	TPP1	(Abreu et al., 2010; Tejera et al., 2010)
Rôles extra-télomériques du complexe shelterin		références
• Répression des gènes subtélomériques	RAP1	(Martinez et al., 2010)
• Régulation transcriptionnelle	RAP1	(Martinez et al., 2010; Teo et al., 2010)
• Activateur de la signalisation NF- κ B	RAP1	(Teo et al., 2010)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des rôles télomériques et extra-télomériques des protéines du complexes shelterin. D'après Martinez et Blasco, (Martinez and Blasco, 2011)

1.2.1. Les protéines TRF1 et TRF2

Les protéines TRF1 et TRF2 (Telomere Repeat binding Factor) sont des facteurs qui fixent de façon spécifique l'ADN double brin télomérique grâce à leur domaine C terminal Myb (Bianchi et al., 1999). Ces deux protéines diffèrent par leur partie N terminale (acide pour TRF1 et basique pour TRF2) et sont capables de s'homodimériser grâce à un domaine de dimérisation TRFH (TRF Homology). Ces deux protéines ont pour fonction cruciale de protéger les télomères et de réguler leur élongation *in vivo*.

En se fixant sur la partie double brin de l'ADN télomérique, TRF2 exerce un rôle important dans la stabilisation et la protection des chromosomes en favorisant notamment la formation de boucle-T (cf Chapitre I, 1.3.1) (Stansel et al., 2001). En effet, des études utilisant une forme dominante-négative de TRF2 (TRF2DN) incapable de se fixer à l'ADN télomérique ont montré que TRF2 est impliqué dans le recrutement au niveau du télomère de facteurs liés aux dommages de l'ADN tel que MRE11, TP53BP1, ATM, H2AX et RAD17 (Harrington, 2004; Takai et al., 2003; van Steensel et al., 1998). L'inactivation de TRF2 provoque des fusions télomériques, le raccourcissement de l'extrémité 3' simple brin du télomère par l'action d'endonucléase ainsi que l'apoptose ou la sénescence rapide des cellules via la signalisation p53 (Karlseder et al., 1999; Takai et al., 2003).

La protéine TRF1 se fixe elle aussi à la séquence télomérique double brin de la boucle T. TRF1 contrôle négativement la taille des télomères en inhibant l'accès de la télomérase à l'extrémité des chromosomes. La surexpression de la forme sauvage de TRF1 entraîne un raccourcissement des télomères uniquement dans les cellules télomérase positives (van Steensel and de Lange, 1997) alors que l'expression ectopique d'un dominant négatif aboutit à l'élongation du télomère par activation de la télomérase (Blasco, 2003; Shay, 1999). Plusieurs protéines sont capables d'interagir avec TRF1 pour réguler la taille des télomères. C'est le cas des protéines Poly-(ADP-ribose)-polymerase-TANK 1 (tankyrase 1) et poly-(ADP-ribose)-polymerase-TANK 2 (tankyrase 2) qui sont toutes deux des régulateurs positifs de la taille des télomères (Greider, 1999; Shay, 1999). Ces deux enzymes sont responsables de la ribosylation de TRF1, ce qui inhibe sa fixation sur l'ADN télomérique et laisse l'accès à la télomérase pour permettre l'élongation du télomère.

1.2.2. La protéine TIN2

La protéine TIN2 (TRF1 INteracting facteur 2) a été identifiée comme régulateur négatif de la longueur des télomères, télomérase-dépendant. En effet, il agit comme un facteur de régulation de l'activité de TRF1 dans le contrôle de l'activité télomérase. Il induit une compaction de l'ADN télomérique, une stabilisation de la boucle T et limite l'accès de la télomérase aux télomères (Kim et al., 1999). Des expériences de co-immunoprécipitation, de « far western » et de criblage double hybride ont montré que TIN2 interagit directement avec TRF2 et qu'il peut se fixer simultanément sur TRF1 et TRF2 pour stabiliser TRF2 au niveau du télomère. L'inhibition de TIN2 par ARN interférence diminue la présence de TRF2 et de RAP1 aux télomères. Cette connexion entre les complexes TRF1 et TRF2 est essentielle pour l'homéostasie de la taille des télomères et pour leur protection (Liu et al., 2004a; Ye et al., 2004a).

Des travaux réalisés par le groupe de T. de Lange montrent que TIN2 contrôle l'inhibition de TRF1 *via* la tankyrase (Ye and de Lange, 2004). En effet, l'inhibition de TIN2 par ARN interférence empêche la fixation de TRF1 sur l'ADN télomérique et induit l'élongation des télomères. L'utilisation d'un inhibiteur de poly(ADPribose) polymérase ou de mutant inactif de TANK1 restaure une accumulation télomérique de TRF1. TIN2 interagit sous la forme d'un complexe ternaire TANK1-TRF1-TIN2 régulant ainsi négativement la taille des télomères en fixant et protégeant TRF1 de l'inactivation par TANK1 (Chiang et al., 2004; Kim et al., 1999; Ye and de Lange, 2004; Ye et al., 2004a).

1.2.3. La protéine hPOT1

hPOT1 (human Protection Of Telomères 1) fixe spécifiquement les bases TTAGGG de la partie simple brin du télomère. Elle est susceptible d'interagir avec d'autres protéines télomériques tels que TPP1, TIN2, TRF1 et TRF2. hPOT1 interagit directement avec TPP1 qui lui-même se lie à TIN2. Chez l'homme, hPOT1 intervient dans la régulation de la longueur des télomères. En effet, la surexpression de hPOT1 induit un allongement de la taille des télomères dans les cellules télomérase négative uniquement. A contrario, dans les cellules télomérase-positives, hPOT1 empêche l'accès de la télomérase sur l'extrémité 3' du télomère ce qui inhibe son élongation (Kelleher et al., 2005). La surexpression d'un mutant inactif de hPOT1 délété de son domaine de liaison à l'ADN induit un allongement rapide du télomère (Loayza and De Lange, 2003). Des expériences récentes ont montré que POT1 interagit avec

le complexe TRF1 pour réguler la longueur des télomères. Le modèle actuel propose que TRF1 régule négativement la télomérase en permettant la fixation de POT1 sur l'extrémité 3' du télomère. L'extrémité 3' OH débordante devient alors inaccessible à la télomérase, elle ne peut donc plus allonger le télomère.

1.2.4. La protéine RAP1

Initialement identifié chez la levure, la forme humaine de RAP1 (Repressor Activator Protein 1) a été clonée à partir d'un criblage double hybride chez la levure et identifié comme partenaire de TRF2 (Li et al., 2000). Localisée au niveau des télomères par l'intermédiaire de son interaction avec TRF2 (Palm and de Lange, 2008), hRAP1 serait également capable d'interagir avec le complexe de recombinaison MRE11/RAD50/NBS1 et PARP (O'Connor et al., 2004). Des expériences d'ARN interférence ou de surexpression d'un mutant inactif de hRAP1 entraîne rapidement un rallongement des télomères, ce qui sous-entend que hRAP1 régule négativement la longueur des télomères *in vivo* (O'Connor et al., 2004). hRAP1 protège également les télomères des fusions chromosomiques en inhibant les mécanismes de réparation des cassures de l'ADN de type NHEJ (Sarthly et al., 2009). Plusieurs rôles extra-télomériques de RAP1 ont été décrits très récemment. En effet, RAP1 serait également localisé dans le cytoplasme associé avec un complexe multimérique kinase d'I- κ B (IKK). Cette interaction entraînerait la libération et l'activation de la sous unité p65 de NF- κ B et sa fixation sur les séquences consensus de nombreux gènes cibles pour activer leur transcription (Teo et al., 2010). Une étude tout aussi récente vient de montrer que RAP1 serait capable de réprimer des gènes localisés au niveau des régions sub-télomériques (Martinez et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc un rôle extra-télomérique de RAP1 notamment dans la régulation transcriptionnelle.

1.2.5. La protéine TPP1

Le criblage double hybride chez la levure a permis d'identifier la protéine TPP1 (Tripeptidyl-peptidase 1) comme partenaire de TIN2. TPP1 également appelé TINT1 (Houghtaling et al., 2004), PTOP (Liu et al., 2004b), et PIP1 (Ye et al., 2004b), assure la liaison entre TIN2 et POT1 et participe à la régulation de la localisation de POT1 au niveau des télomères (Liu et al., 2004b). L'inhibition de TPP1 par ARN interférence empêche

l'interaction de POT1 sur les télomères et entraîne une élongation inappropriée des extrémités télomériques (Liu et al., 2004b; Ye et al., 2004b). Une étude récente vient de mettre en évidence que TPP1 interagit également avec la télomérase pour réguler son accès aux télomères (Xin et al., 2007).

1.3. Structure tridimensionnelle des télomères

Afin de préserver l'intégrité des chromosomes, les télomères et leurs protéines associées forment un complexe nucléoprotéique capable d'adopter différentes conformations tel que la boucle T/boucle D ou une structure en G-quadruplexes. A l'heure actuelle l'existence de ces structures *in vivo* est encore très discutée par la communauté scientifique.

1.3.1. La boucle T/boucle-D

Le modèle de la boucle-T (Boucle Télomérique)/boucle D (boucle de Déplacement) (Greider, 1999; Griffith et al., 1999) est fondé sur l'observation des télomères en microscopie électronique (*Figure 2*). La boucle-T est formée par le repliement de l'ADN télomérique double brin dans laquelle vient s'insérer l'extrémité 3'OH débordante de l'ADN télomérique simple brin. La boucle-D correspond à la portion du brin G qui n'est plus appariée, suite à l'insertion du simple brin. La formation de cette boucle-T/boucle-D fait appel à de nombreuses protéines télomériques qui assurent la stabilisation de cette structure *in vitro* (de Lange, 2004; Stansel et al., 2001). Cette structure fermée permettrait de différencier les extrémités des chromosomes des cassures double brin de l'ADN en évitant que les télomères soient reconnus par la machinerie de réparation des cassures. La boucle T/boucle D participerait ainsi à la protection des extrémités des chromosomes contre la dégradation par les nucléases et les recombinaisons chromosomiques (de Lange, 2002).

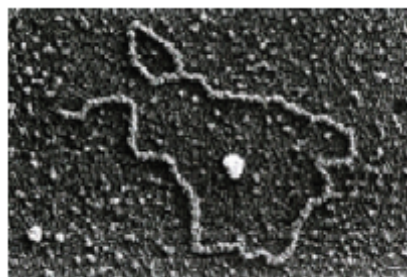


Figure 2 : Photographie de télomères terminés par une boucle-T (microscopie électronique)

1.3.2. Les G-quadruplexes

Dans les conformations de type quadruplexe, l'ADN télomérique simple brin se replie pour former une structure en "épingles à cheveux" au sein desquelles quatre guanines coplanaires peuvent s'apparier entre elles par des liaisons hydrogène de type « Hoogsteen » (Sundquist and Klug, 1989) pour former des tétrades de guanines aussi appelées G-Quartet (Henderson et al., 1987; Henderson et al., 1990). Des ions positifs, placés au cœur de la tétrade stabilise l'ensemble de la structure (Parkinson et al., 2002). L'empilement de ces tétrades de guanines forme les quadruplexes (Rhodes and Giraldo, 1995) (*Figure 3*). Même si leur existence *in vivo* chez l'homme n'a encore jamais été démontrée, il semblerait néanmoins qu'*in vitro* une séquence TTAGGG simple brin soit capable de former un quadruplexe de guanines et pourrait empêcher l'action de la télomérase ou d'autres nucléases (Zahler et al., 1991). Cependant, aucune évidence physiologique du rôle des G-quadruplexes dans l'inhibition de la télomérase n'a pu être démontrée à ce jour.

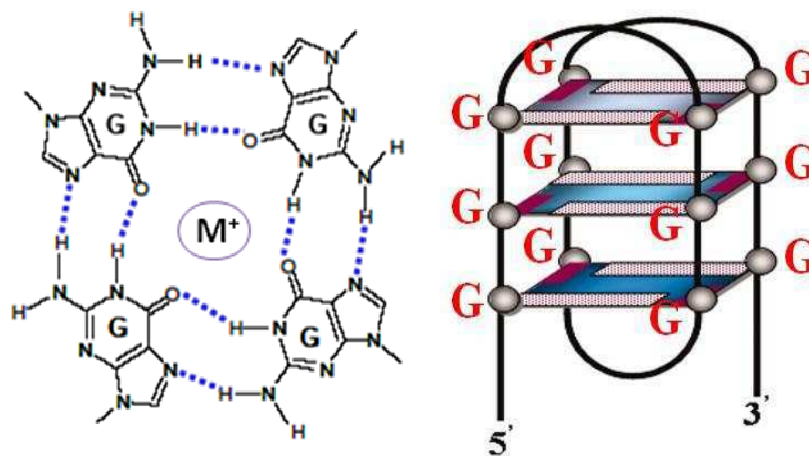


Figure 3 : Représentation schématique d'un quadruplexe: A gauche, structure d'un G-Quartet stabilisé par les liaisons Hoogsteen-Green. A droite, structure tridimensionnelle d'un quadruplexe obtenue par l'empilement de trois tétrades de guanine (G-Quartet).

B. Le complexe télomérase : structure et régulation

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique constitué d'un composant protéique à activité de transcriptase inverse, hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) et d'un composant ARN matrice, hTR (human Telomerase RNA component). Bien que ces deux

composants soient suffisants pour reconstituer *in vitro* une activité télomérase (Weinrich et al., 1997), il semblerait que l'élongation des télomères *in vivo* requiert la présence d'autres partenaires protéiques. L'ensemble de cet édifice dynamique (hTERT, hTR et protéines associées) constitue le complexe télomérase.

1. Structure du complexe télomérase

1.1. La matrice hTR

Peu de temps après la découverte de la télomérase chez le cilié *Tetrahymena*, l'équipe de E. Blackburn a montré que l'activité catalytique de la télomérase est dépendante d'un ARN. Cet ARN, cloné en 1995 (Feng et al., 1995) est appelé hTR (human Telomerase RNA). Contrairement à hTERT, hTR est exprimée de façon quasi-ubiquitaire dans les cellules qui possèdent ou non une activité télomérasique (Feng et al., 1995).

Codé par un gène situé en 3q26 (Soder et al., 1997), il est constitué d'une séquence primaire de 451 nucléotides non-polyadénylés et comprend une séquence de 11 nucléotides (5'-CUAACCCUAAC-3') complémentaire de l'extrémité 3' simple brin des télomères, servant de matrice lors de la synthèse de répétitions télomériques TTAGGG (Feng et al., 1995).

Bien que la séquence primaire de TR présente peu d'homologies entre les différentes espèces, la structure secondaire est paradoxalement bien conservée chez les vertébrés (Chen et al., 2000). L'étude prédictive de la structure secondaire de cette sous-unité ribonucléique a permis de mettre en évidence plusieurs régions conservées, CR1 à CR8 (Conserved Region). Ces motifs conservés seraient impliqués dans diverses fonctions comme sa stabilisation, son accumulation, son assemblage avec d'autres constituants ainsi que sa localisation cellulaire (*Figure 4*) (Chen et al., 2000). La région CR1, proche de l'extrémité 5', contient la séquence dite « matricielle », le domaine pseudoknot qui inclut les régions CR2-3 et le domaine CR4-5 formé d'une structure en tige et boucle qui permet une interaction avec la sous-unité catalytique hTERT. hTR possède également un domaine CR7 et un motif de type H/ACA (CR6 et CR8) qui semble être important pour son accumulation, pour l'activité catalytique *in vivo* et la processivité de la télomérase (Mitchell et al., 1999a; Mitchell and Collins, 2000). Il semblerait qu'en dehors de la séquence matrice, seuls les domaines « pseudoknot » et CR4-CR5 sont indispensables à la reconstitution d'une télomérase catalytiquement active *in vitro* (Ly et al., 2003).

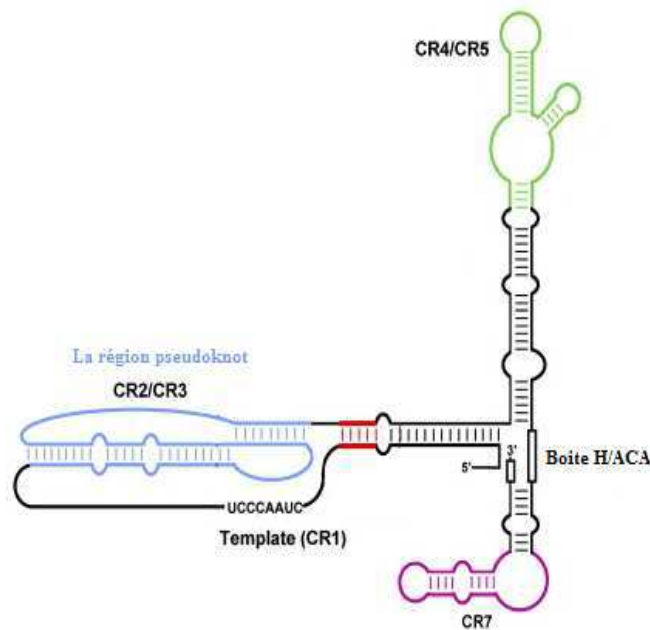


Figure 4 : La structure secondaire de hTR. La composante ARN du complexe télomérase, comporte une séquence dite séquence matrice complémentaire au simple brin de l'ADN télomérique localisé près de l'extrémité 5'. Il contient également quatre régions conservées : le domaine pseudoknot ou CR2-CR3, la région CR4-CR5, la boîte H/ACA (CR6 et CR8) et le domaine CR7. CR (conserved région), D'après Legassie et al., (Legassie and Jarstfer, 2006)

1.2. hTERT

hTERT (human TELomerase Reverse Transcriptase), une ADN polymérase appartenant à la famille des transcriptases inverses (Cech and Lingner, 1997), a été initialement clonée en 1997 sur la base de son homologie de séquence chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et un protozoaire cilié *Euplotes aediculatus* (Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997).

Le gène hTERT, localisé en 5p15.33 est constitué de 16 exons codant une protéine de 1132 acides aminés (127 kDa) (Meyerson et al., 1997; Wick et al., 1999). L'analyse *in silico* de la séquence de TERT a permis d'identifier 7 domaines très conservés (1, 2, A, B', C, D et E) caractéristiques des transcriptases inverses (Lingner et al., 1997). hTERT possède également des motifs (GQ, CP, QFP, et T) spécifiques de la télomérase (Kelleher et al., 2002) ainsi qu'une courte région C terminale (Figure 5). Des expériences de mutagenèse dirigée et de transfections ont permis d'élucider certaines fonctions de ces domaines (Armbruster et al., 2001; Banik et al., 2002; Kim et al., 2003; Rahman et al., 2005; Smith et al., 2003; Zhang et al., 2003).

- **La région aminoterminal de la protéine**, largement étudiée via des mutants de substitutions (Armbruster et al., 2001), est constituée du domaine GQ (ou domaine I), des motifs CP (II) et QFP (III) et d'une région appelée N-DAT (Dissociates Activities of Telomerase) essentielle aux fonctions biochimiques et biologiques de la protéine.

Les domaines I, II et III sont importants pour l'activité télomérase *in vivo* et *in vitro* et la mutation de ces trois domaines abolit le pouvoir immortalisant de la protéine sauvage. Le domaine GQ semble indispensable à la maintenance des télomères et à la viabilité *in vivo* (Armbruster et al., 2001; Friedman and Cech, 1999). L'interaction stable d'hTERT avec la sous-unité ribonucléique est assurée les motifs CP, QFP et T (Armbruster et al., 2001; Bachand and Autexier, 2001; Kelleher et al., 2002). La mutation du N-DAT, n'abroge pas l'activité catalytique *in vitro* mais empêche l'élongation des télomères *in vivo*. Il a donc été envisagé que le domaine N-DAT soit impliqué dans le recrutement de la télomérase aux télomères (Armbruster et al., 2001). De plus, les acides aminés 1 à 15 sont essentiels pour la localisation nucléolaire de hTERT et son assemblage avec hTR (Yang et al., 2002).

- **La partie centrale** de la protéine est constituée du motif T et des domaines de transcriptase inverse nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme. Des mutations des domaines transcriptase inverse abolissent l'activité télomérase.

- **Région C-terminale.**

L'analyse fonctionnelle de la région carboxy-terminale de TERT à l'aide de mutant de substitution a révélé 5 motifs particuliers (Banik et al., 2002). La présence d'une séquence signal d'export nucléaire NES dans le motif EI et plusieurs sites de fixation pour des exportines ou pour la protéine 14.3.3 (EII) suggère que cette région est impliquée dans la localisation nucléaire de TERT (Arai et al., 2002; Seimiya et al., 2000). L'extrémité C-terminale semble aussi être importante pour l'activité télomérase *in vitro* (motif EI à EIV), la processivité de l'enzyme (motif EI), l'oligomérisation de la protéine et la maintenance des télomères (motif C-DAT) (Banik et al., 2002; Beattie et al., 2001; Peng et al., 2001)..

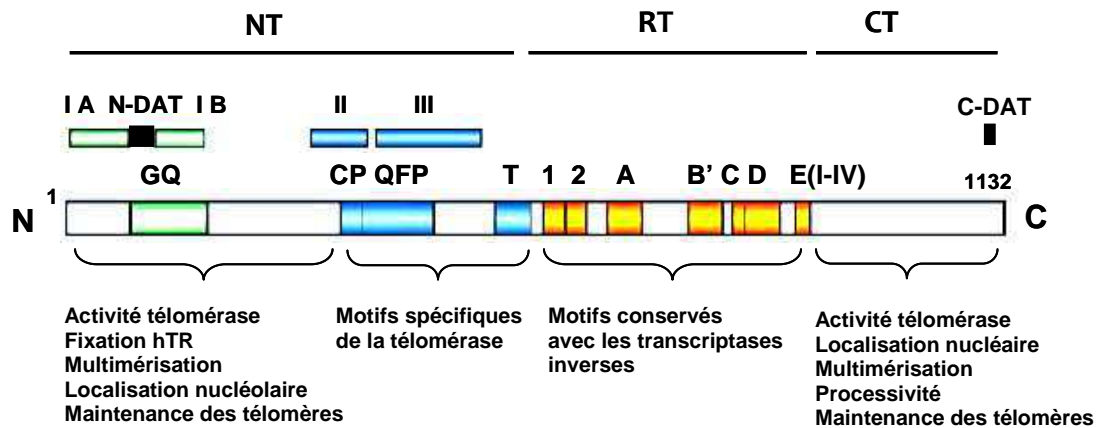


Figure 5: Représentation schématique de la structure de la protéine hTERT. NT : N-terminal, RT : Reverse Transcriptase, CT : C-terminal. 1, 2, A, B', C, D, et E (I à IV) : domaines caractéristiques des protéines à activité transcriptase inverse.

1.3. Protéines associées

Bien que la co-expression de hTERT et hTR soit suffisante pour reconstituer une activité télomérase *in vitro*, il semblerait qu'*in vivo*, des protéines s'associent à cette ribonucléoprotéine pour permettre l'élongation des télomères mais aussi l'assemblage, la conformation et la localisation nucléaire de la télomérase. Parmi les partenaires protéiques du complexe télomérase, on retrouve les protéines se fixant à hTERT et celles s'associant à hTR

1.3.1. Les protéines se fixant à hTERT

Plusieurs protéines ont été identifiées comme partenaires d'hTERT. Parmi elles, les chaperonnes HSP90, p23 et HSP70 qui interviennent dans le repliement et l'assemblage du complexe télomérase (Holt et al., 1999a). La protéine hEST1A (human Ever Shorter Telomere 1, A) serait responsable du recrutement du complexe télomérase au niveau des extrémités des chromosomes (Reichenbach et al., 2003). Son expression ectopique entraîne des fusions télomériques à l'origine de ponts anaphasiques (Reichenbach et al., 2003). Une autre protéine, TEP1, a été identifiée sur la base de son homologie avec la composante p80 du complexe télomérase de *Tetrahymena*. Bien qu'interagissant à la fois avec hTERT et hTR, sa fonction n'a toujours pas été élucidée. En effet, chez la souris, la délétion du gène codant cette protéine n'affecte ni l'activité télomérase ni la longueur des télomères (Harrington et al., 1997; Liu et al., 2000).

La fonction de tous ces partenaires protéiques n'a pas encore été élucidée. Cependant, on peut facilement imaginer qu'ils participent activement aux fonctions biologiques du complexe télomérase. D'autre part, hTERT est capable de lier des partenaires de nature non-protéique en dehors d'hTR. En effet, hTERT peut recruter un petit ARN de type nucléolaire retrouvé au niveau de la mitochondrie appelé RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease). Cette association entre hTERT et RMRP permet la synthèse d'ARN double-brins, métabolisés ensuite en petits ARN interférents capables de moduler l'expression génique (Maida et al., 2009).

1.3.2. Les protéines se fixant à hTR

Parmi les partenaires d'hTR, on retrouve des petites protéines nucléolaires comme NOLA1, 2, 3 (Dragon et al., 2000), la dyskerine (Mitchell et al., 1999b) ou encore les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes hnRNP (Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein) A1, C1/C2 et D. La dyskérine est une protéine nucléolaire codée par le gène DKC dont la mutation est à l'origine de la Dyskeratosis congenita (Heiss et al., 1998). Les patients atteints par cette pathologie ont un défaut de régénération des tissus à renouvellement rapide et présentent des télomères plus courts et une activité télomérase réduite, ce qui suggère que la dyskérine est nécessaire à la fonction télomérase (Mitchell et al., 1999b). La dyskérine s'associe avec hTR par son motif H/ACA situé en 3'OH mais aussi avec de petits ARN nucléolaires à boîtes H/ACA (Mitchell et al., 1999a). Les protéines nucléolaires tels que NOLA1, 2 et 3 sont aussi capables d'interagir avec le domaine H/ACA de hTR (Dragon et al., 2000; Pogacic et al., 2000). Enfin, d'autres partenaires protéiques tel que l'hétérodimère Ku, impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison non homologue, ainsi que TP1 (telomerase-associated protein 1) (Harrington et al., 1997), la protéine ribosomique L22 (Le et al., 2000), hSTAU (Le et al., 2000) et LA (Ford et al., 2001) ont également été décrites comme s'associant directement à hTR.

2. Régulation de l'activité télomérase

Contrairement à hTR qui est exprimée de façon constitutive, hTERT est soumise à une régulation très précise au cours de la vie cellulaire notamment durant l'embryogenèse ou

lors de la différenciation. Cette régulation peut s'exercer à différents niveaux : épigénétique, transcriptionnel et post-traductionnel, par des phénomènes d'épissage, de maturation, de localisation subcellulaire et d'assemblage sous forme de ribonucléoprotéine (Figure 6).

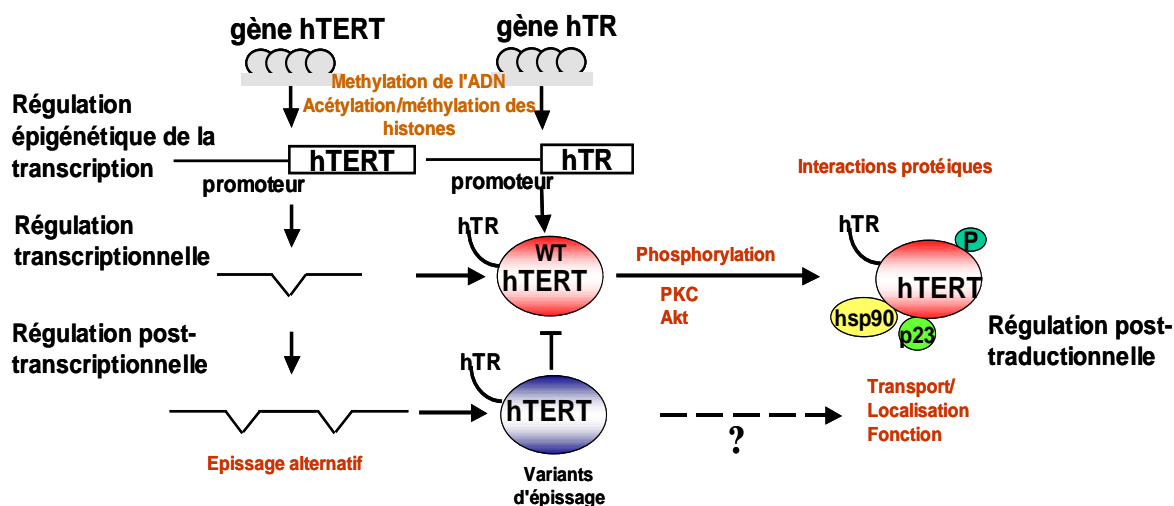


Figure 6: Niveaux de régulation de la télomérase. L'épigénétique constitue le changement de l'état de transcription des gènes en réponse à la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation et phosphorylation). La fixation de facteurs de transcription généraux et régulateurs entraîne une **régulation transcriptionnelle** des gènes. L'existence de variants d'insertion ou de délétion issu de l'épissage alternatif de *hTERT* suggère un niveau de **régulation post-transcriptionnelle** de TERT. Au niveau **traductionnel**, l'assemblage du complexe en une ribonucléoprotéine active dépend de l'état de phosphorylation de TERT. Enfin, l'accessibilité de *hTERT* au niveau des télomères ainsi que sa localisation subcellulaire constitue un niveau de régulation supplémentaire.

2.1. La régulation d'*hTERT*

2.1.1. La régulation transcriptionnelle du gène *hTERT*.

Dans un contexte physiologique, la télomérase est fortement exprimée dans les cellules germinales et les cellules souches ainsi qu'au cours de certaines étapes précoces du développement embryonnaire. A contrario, la télomérase est réprimée dans la majorité des cellules somatiques normales mais elle est réactivée dans environ 90% des cancers (Greenberg et al., 1998; Kim et al., 1994; Martin-Rivera et al., 1998; Masutomi and Hahn, 2003; Ulaner et al., 1998). Cette réactivation de la télomérase est en grande partie la conséquence de la réexpression du gène d'*hTERT*. Alors que la composante ARN *hTR* est exprimée de façon constitutive et ubiquitaire (Soder et al., 1998; Yi et al., 1999), *hTERT* semble être le facteur limitant et déterminant pour l'activité télomérase. La corrélation entre

l'ARNm de TERT et l'activité télomérase suggère une régulation transcriptionnelle du gène hTERT qui constitue le premier et principale mécanisme de régulation de l'activité télomérase (*Figure 7*)(Cong et al., 1999; Takakura et al., 1999).

Le clonage de la région 5' situé en amont du gène de TERT a permis de montrer que le promoteur de hTERT est inactif dans la plupart des cellules somatiques normales mais réactivé lors de l'immortalisation cellulaire (Cong et al., 1999). Des expériences de délétion du promoteur d'hTERT ont démontré que son activité maximale nécessite la présence d'une région particulière, située à environ 330pb en amont du site d'initiation de la traduction (Horikawa et al., 1999). Le séquençage de cette région proximale a révélé que le promoteur de TERT est dépourvu de séquences TATA ou CAAT mais qu'il possède plusieurs boîtes GC reconnues par le facteur Sp1 ainsi que 2 boîtes E sur lesquels peut se fixer c-Myc pour activer la transcription (*Figure 7*) (Takakura et al., 1999).

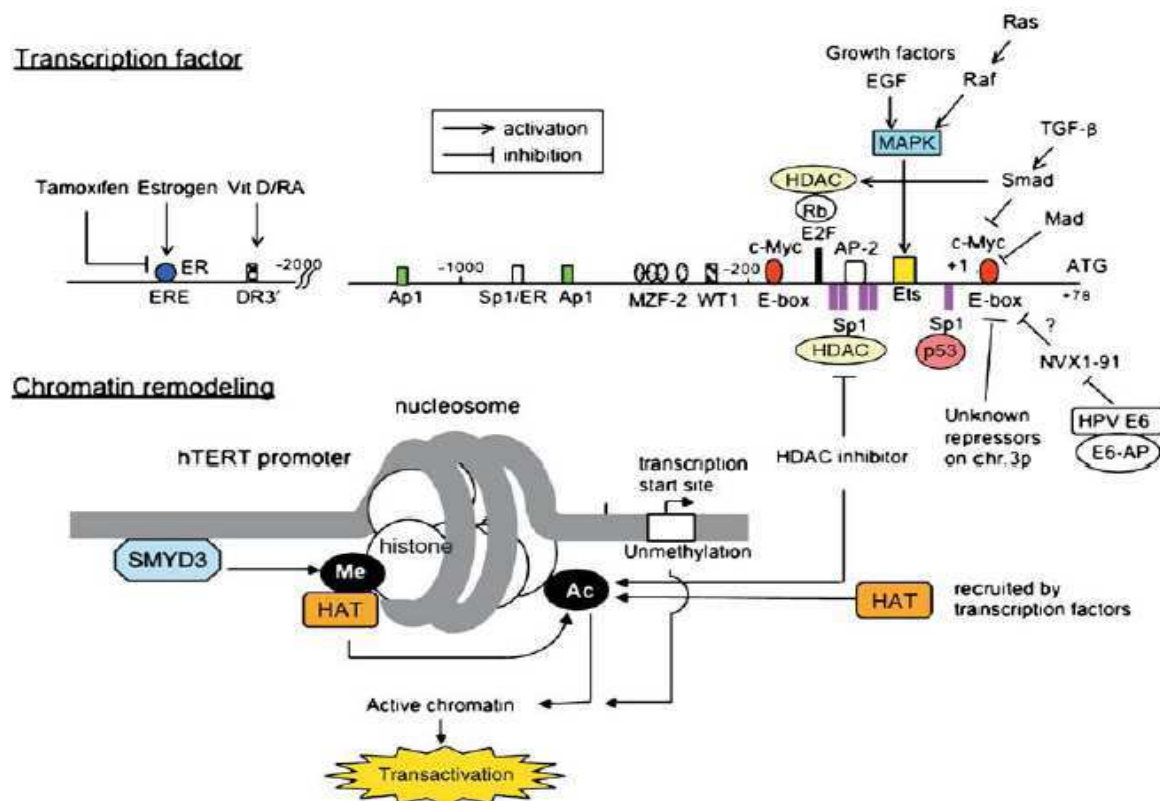


Figure 7 : La régulation transcriptionnelle d'hTERT. Représentation des différents facteurs de transcription et autres protéines impliqués dans la régulation de la transcription d'hTERT. Le site initial de transcription (+1) ainsi que le codon d'initiation de la traduction (ATG) sont indiqués. Modèle des modifications post-traductionnelles des histones dans le remodelage chromatinien impliqué dans la régulation du promoteur d'hTERT. Me, Méthylation des histones ; Ac, Acétylation des histones. D'après (Kyo et al., 2008).

- **Les facteurs activateurs/répresseur de l'expression d'hTERT**

L'analyse bioinformatique du promoteur d'hTERT a permis d'identifier des sites de fixations potentiels de facteurs de transcription. La démonstration *in vitro* de leur fixation a pu être validée pour certains d'entre-eux par essai gène rapporteur, immunoprécipitation de chromatine (Chip on Chip), criblage double-hybride chez la levure ou expériences de retard sur gel.

Parmi les protéines activatrices de l'expression de hTERT on peut citer l'oncogène c-Myc (*Myelocytomatosis viral oncogene*) (Greenberg et al., 1999), la protéine AP-2 (*Activator Protein-1*) (Deng et al., 2007), le facteur de transcription Sp1 (Kyo et al., 2000), la protéine E6 du papilloma virus humain (Klingelutz et al., 1996), les récepteurs nucléaires aux estrogènes et aux androgènes (après activation par leurs ligands respectifs) (Guo et al., 2003; Kyo et al., 1999), l'oncoprotéine de fusion EWS/ETS du sarcome d'Ewing (Takahashi et al., 2003), le facteur de survie NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa-B*) (Fujimoto et al., 2000; Yin et al., 2000) et les cytokines EGF (*Epidermal Growth Factor*) et TGF β (*Transforming Growth Factor Beta*) (Maida et al., 2002; Yang et al., 2001).

Des protéines réprimant hTERT ont également été identifiées comme les facteurs de transcription MAD1 (*MAX dimerization protein 1*) (Gunes et al., 2000), E2F-1 (Won et al., 2002), WT-1 (*Wilms Tumor*) (Oh et al., 1999), CTCF (*CCCTC binding factor protein*) (Renaud et al., 2005), SIP1 (*SMN-Interacting Protein 1*) (Lin and Elledge, 2003), MZF2 (*Myeloide specific Zinc Finger protéin 2*) (Fujimoto et al., 2000), la protéine suppresseur de tumeur p53 (Kanaya et al., 2000; Xu et al., 2000), p73 (Racek et al., 2005) et MEN1 (*Multiple Endocrine Neoplasia 1*) (Lin and Elledge, 2003).

En revanche le rôle du facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*) est encore controversé. En effet, une première équipe a montré que ce facteur peut induire la réexpression d'hTERT dans des cellules cancéreuses en se fixant directement sur son promoteur (Yatabe et al., 2004) alors que l'équipe de Koshiji propose un rôle répresseur d'HIF-1 sur la transcription d'hTERT dans les cellules de cancers du colon (Koshiji et al., 2004).

2.1.2. La régulation épigénétique

Certains facteurs de transcriptions sont capables de modifier la chromatine afin de réguler l'expression génique. Réciproquement, l'environnement épigénétique de la chromatine détermine la reconnaissance des sites de liaison des facteurs de transcription modulant là aussi l'expression des gènes. Des expériences de transfection transitoire de rapporteur luciférase contrôlé par le promoteur d'hTERT ont révélé que le niveau d'activité du gène rapporteur était similaire à la fois dans les cellules télomérase-positives que télomérase-négatives, suggérant que le contexte chromatinien peut également être impliqué dans la régulation d'hTERT (Wang and Zhu, 2003).

a. La méthylation de l'ADN

La méthylation/déméthylation de séquences régulatrices joue un rôle important dans l'expression des gènes notamment au cours de l'exécution du programme de développement chez les vertébrés mais aussi lors de la tumorigenèse. En effet, une modification du profil de méthylation de certains gènes peut être à l'origine de l'inactivation de gènes suppresseur de tumeur (ou de l'activation de proto-oncogène dans certains cas). La régulation de l'expression de TERT au cours du développement embryonnaire (Wright et al., 1997) et la présence d'un cluster d'îlots CpG dans le promoteur de TERT en amont du site d'initiation de la transcription (Horikawa et al., 1999) laissent penser que des phénomènes de méthylation/déméthylation au niveau de son promoteur pourraient être à l'origine de la réexpression du gène d'hTERT dans certaines conditions notamment dans les cancers.

Plusieurs équipes (Lopatina et al., 2003; Shin et al., 2003) ont effectivement montré que la méthylation du promoteur de hTERT entraîne la répression génique de TERT et que l'inhibition chimique de la méthylation par la 5-azacytidine permet la réexpression d'hTERT dans deux lignées télomérase négative (Dessain et al., 2000; Devereux et al., 1999). En revanche, l'analyse à grande échelle du statut de méthylation du promoteur de hTERT n'a pas apporté la preuve d'une signature du profil de méthylation associé à l'expression de hTERT négative (Dessain et al., 2000; Devereux et al., 1999) ce qui suggère que les modifications du statut de méthylation du promoteur de hTERT ne constitue pas le mécanisme majeur de régulation de l'expression du gène.

De façon surprenante, certains auteurs ont même rapporté l'existence d'une corrélation inverse entre la méthylation du promoteur de hTERT et son expression génique. Par exemple

dans notre laboratoire nous avons suggéré que l'hyperméthylation de la région distale du promoteur d'hTERT empêchant la fixation d'un facteur répresseur soit responsable de la réactivation de la télomérase (Azouz et al., 2010). D'autres études ont montré une corrélation entre l'hyper-méthylation du promoteur d'hTERT et l'activation de la télomérase dans des cellules cancéreuses (biopsies et des lignées cellulaires). Inversement, dans des cellules normales télomérase négatives l'hypo-méthylation du promoteur de TERT est associé à sa répression transcriptionnelle (Guilleret and Benhattar, 2004; Guilleret et al., 2002; Nomoto et al., 2002). Cette corrélation assez inhabituelle entre la méthylation de l'ADN et l'expression d'un gène, a créé une confusion dans la communauté scientifique mais a pu être expliquée par la présence de courte région hypo-méthylée (transcriptionnellement active) autour du site d'initiation de la transcription (SIT), malgré l'hyper-méthylation du reste du promoteur (Zinn et al., 2007). De plus, une acétylation des résidus lysine des histones au niveau du SIT en association avec l'hypo-méthylation de l'ADN de cette région et l'expression d'hTERT a également été démontré. Ce dernier résultat illustre bien le fait que des modifications épigénétiques autre que la méthylation (i.e. l'acétylation/méthylation des histones) participent activement à la régulation du gène hTERT.

b. Les modifications des histones

La transcription des cellules eucaryotes est profondément influencée par des modifications locales de la structure de la chromatine. Ce remodelage des nucléosomes d'histones dicte la transition dynamique entre un état favorable ou non à la transcription. L'acétylation des histones est un des mécanismes qui permet la décondensation locale de la chromatine, facilitant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle de base et à ses facteurs associés, au niveau du promoteur. L'hyper-acétylation des résidus lysines des histones par les histones acétyltransférases (HAT) est associée avec une activation de la transcription de hTERT. A l'inverse, les histones déacétylases (HDAC) participent au remodelage de la chromatine en catalysant l'hypo-acétylation des lysines qui est à l'origine de la répression transcriptionnelle.

Des études ont montré que le traitement par la Trichostatine A, un inhibiteur d'histones déacétylases induit l'expression de l'ARNm d'hTERT dans des fibroblastes normaux (Cong and Bacchetti, 2000; Takakura et al., 2001) mais pas dans les cellules cancéreuses. Cette répression génique de la télomérase dans les cellules normales pourrait dépendre de l'interaction de HDAC1 avec Sp1 sur le promoteur de hTERT (Doetzlhofer et al., 1999).

D'autre part, Sp1 peut interagir à la fois avec des facteurs ayant des activités HDAC ou HAT sur le promoteur de hTERT (Suzuki et al., 2000), de ce fait Sp1 peut donc réprimer ou transactiver le gène de TERT selon le contexte cellulaire.

L'activateur transcriptionnel c-Myc et le facteur répresseur Mad-1 sont également impliqués dans les modifications des histones du promoteur de hTERT. Il a été démontré que le complexe c-Myc/Max est préférentiellement associé à des HAT et à la régulation positive d'hTERT dans les cellules leucémiques HL60 non différenciées. En revanche, lors de la maturation de ces cellules, c'est le répresseur transcriptionnel Mad-1 plutôt que l'activateur c-Myc qui est induit. Mad1 s'associe alors à Max au niveau des boîtes E du promoteur de TERT ce qui conduit à la déacétylation des histones et la répression transcriptionnelle de hTERT (Cong and Bacchetti, 2000; Takakura et al., 2001; Xu et al., 2001).

Ces résultats suggèrent que, comme pour Sp1, le système Myc/Max/Mad1 est également impliqué dans le remodelage de la chromatine et donc dans la compétence du promoteur à réguler l'expression du gène hTERT.

Les extrémités N-terminales des histones peuvent également subir des phénomènes de méthylation plus stables que l'acétylation et la phosphorylation. La méthylation des histones est un processus dynamique, qui consiste en l'ajout réversible d'un, de deux ou de trois groupements méthyles sur des lysines ou des arginines par des histones méthyltransférases. Selon les résidus méthylés et le nombre de groupements ajoutés, la méthylation des histones est associée à une activation ou une répression de la transcription. La séquence promotrice d'hTERT n'échappe pas à ce modèle. En effet, il a été démontré que la triméthylation H3-K4 du promoteur de hTERT par la méthyltransférase SMYD3 (*Figure 7*) est associée à l'activation transcriptionnelle de TERT dans les cellules cancéreuses (Liu et al., 2007). L'inhibition de SMYD3 par ARNi dans des cellules cancéreuses abolit la triméthylation H3-K4 et atténue la fixation des facteurs c-Myc et Sp1 sur leurs séquences cibles ce qui entraîne une diminution de l'acétylation de certaines histones H3 dans le promoteur basal et la répression transcriptionnel d'hTERT (Liu et al., 2007). A l'inverse, la surexpression de SMYD3 active la transcription de TERT. Une étude parue récemment a montré que la déméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 du promoteur de hTERT par la LSD1 (Lysine-Specific Demethylase 1) en coopération avec HDAC est capable de réprimer la transcription d'hTERT. Les auteurs démontrent que le recrutement de la LSD1 sur le promoteur de hTERT participe à l'établissement de la répression du gène d'hTERT dans les cellules normales et dans les cellules HL60 différenciées (Zhu et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats suggère que les histones peuvent subir de nombreuses modifications pouvant s'influencer mutuellement et influencer la transcription du gène hTERT.

2.1.3. La régulation post-transcriptionnelle: l'épissage alternatif

L'épissage alternatif est un mécanisme permettant la synthèse de différents ARNm à partir d'un même gène. L'épissage alternatif de TERT donne naissance à au moins 14 variants d'épissages, classés en trois groupes: 1) le transcrit sauvage ; 2) les variants de délétion α , β et γ , qui ont subi une excision de certains motifs conservés au niveau du site des transcriptases inverses ; et 3) les variants d'insertion INS1-2-3 et 4 qui résultent de la rétention de certains introns (*Figure 8*). Les délétions ou les insertions de plusieurs paires de base peuvent donner lieu à un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop plus précoce entraînant l'expression de protéines TERT tronquées à différents endroits de la partie carboxy-terminale. La mise en évidence de l'expression différentielle de variants d'épissage de TERT, en fonction du type cellulaire et au cours de l'embryogenèse, suggère, que l'épissage alternatif de TERT peut constituer un mode de régulation de l'activité télomérase (Kilian et al., 1997; Ulaner et al., 1998; Ulaner et al., 2000). Des données de la littérature rapportent que le variant α exerce un effet dominant négatif sur la télomérase endogène entraînant un raccourcissement des télomères, un état de sénescence ou même de la mort cellulaire (Colgin et al., 2000; Yi et al., 2000). Des expériences réalisées au sein de notre laboratoire ont montré que sur 7 variants étudiés (α , β , γ ; ins1, 2, 3 et 4) seule la forme sauvage est capable de reconstituer l'activité télomérase *in vitro* (résultats non publiés). Nous confirmons également un effet dominante négative du variant α sur l'activité télomérase endogène. La fonction des autres variants, notamment dans la régulation de l'activité télomérase, reste encore à être élucidée.

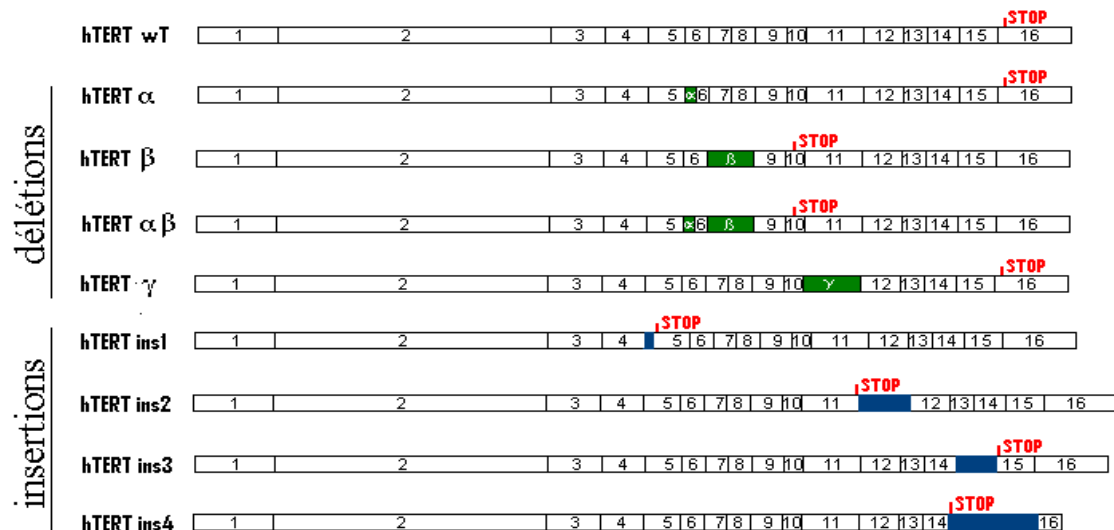


Figure 8 : les variants d'épissage de l'ARNm hTERT. La forme sauvage de l'ARNm d'hTERT (wild-Type) présente 16 exons. La localisation du codon d'arrêt de traduction (stop) est représentée en rouge. Les variants de délétions sont marquées par des rectangles verts et les variants d'insertions sont marquées par des rectangles bleus.

2.1.4. Les modifications post-traductionnelles

La régulation transcriptionnelle d'hTERT constitue le mécanisme majeur de régulation de l'activité télomérase. En outre, la présence de l'ARNm d'hTERT et d'hTR dans des cellules de tissu rénaux ou ovariens normaux, malgré une activité télomérase négative, suggère que des modifications post-transcriptionnelles de TERT peuvent affecter la régulation de l'activité télomérase (Rohde et al., 2000; Ulaner et al., 2000).

Plusieurs équipes ont démontré que des phénomènes de phosphorylations/déphosphorylation par des kinases/phosphatases sont capables de moduler la localisation, la structure et l'activité de la protéine. En effet, l'équipe de Li et al., a observé que la phosphatase 2A (à l'inverse de la PP1 ou PP2B) inhibe l'activité télomérase des cellules de cancer du sein (Li et al., 1997a). A l'inverse, la sérine/thréonine kinase PKB (ou Akt) ainsi que la PKC sont capables de phosphoryler hTERT et de stimuler son activité catalytique (Kang et al., 1999; Li et al., 1998). Cette activation enzymatique fait intervenir la phosphorylation de la sérine 824 d'hTERT par la PKB via la voie de signalisation PI-3 kinase (Kang et al., 1999). De plus, l'activité kinase de la PKB est préservée par son interaction avec la protéine chaperonne HSP90 (Sato et al., 2000). HSP90 s'associe également avec hTERT et

semble être indispensable à l'assemblage du complexe télomérase (Holt et al., 1999a). En effet, une étude réalisée en 2003 révèle que l'activité télomérase requiert la formation d'un complexe composé d'hTERT, de HSP90 et de PKB (Haendeler et al., 2003b). A l'inverse des protéines kinase B et C, la phosphorylation d'hTERT par l'oncoprotéine c-abl et son interaction avec elle, provoque l'inhibition de l'activité télomérase (Kharbanda et al., 2000).

La phosphorylation d'hTERT interviendrait également dans sa localisation subcellulaire. En effet, plusieurs équipes ont constaté dans certains cas une absence de corrélation entre le haut niveau d'activité télomérase observé et l'expression de l'ARNm de la forme sauvage ou des variants d'épissage d'hTERT (Liu et al., 1999). Dans ces travaux, il semblerait que l'activation de l'activité télomérase soit la conséquence de la phosphorylation d'hTERT et de sa translocation dans le noyau en réponse à l'activation des lymphocytes T4 *in vitro* (Liu et al., 2001) ou en réponse à la stimulation des myocytes lisses par des facteurs de croissance (Minamino and Kourembanas, 2001). Ainsi, la phosphorylation de TERT serait impliquée dans sa localisation subcellulaire et pourrait donc constituer un autre mécanisme de régulation de l'activité télomérase.

Généralement décrite comme une protéine nucléaire, hTERT peut être transloquée à travers les différents compartiments cellulaires grâce à la présence de séquences permettant son adressage de façon ciblé. Un domaine de localisation nucléolaire (NoLD) situé entre les acides aminés 326 à 620 (ainsi que d'autres régions localisées à l'extrémité N'terminale de la protéine) permettent l'adressage de TERT dans le nucléole (Etheridge et al., 2002). D'autres signaux d'adressage tels qu'un signal d'export nucléaire NES (Seimiya et al., 2000), de localisation nucléaire NLS ou de localisation mitochondriale (Santos et al., 2004) ont également été décrits.

Dans les cellules cancéreuses, hTERT et hTR sont mobilisés des corps de Cajal vers les télomères uniquement lors de la phase S du cycle cellulaire pour permettre l'élongation des extrémités télomériques (Jady et al., 2006). En dehors de la phase S, à l'inverse d'hTR, hTERT n'est plus localisée dans ces corps de Cajal (Jady et al., 2006; Tomlinson et al., 2006). Cette localisation transitoire, phase-S dépendante d'hTERT dans les corps de Cajal serait indispensable à la maturation, à l'assemblage et à l'activation transitoire du complexe télomérase avant qu'il ne s'associe aux télomères (Cristofari et al., 2007; Jady et al., 2006;

Tomlinson et al., 2006; Zhu et al., 2004). Le trafic d'hTERT au cours du cycle cellulaire pourrait donc constituer un mécanisme de régulation de l'activité télomérase.

La translocation de TERT de façon générale, fait intervenir plusieurs partenaires protéiques. La technique de criblage de double hybride chez la levure a permis d'isoler plusieurs partenaires de hTERT dont la protéine 14.3.3 (Seimiya et al., 2000). La protéine 14.3.3 interagit avec hTERT pour la séquestrer dans le noyau en dehors des conditions de stress oxydant, prévenant ainsi la fixation de l'exportine CRM1 sur le NES d'hTERT et sa translocation vers le cytoplasme (Seimiya et al., 2000). La mutation de certains résidus sérine/thréonine de la protéine 14.3.3 abolit son interaction avec hTERT et entraîne sa rétention dans le cytoplasme (Seimiya et al., 2000). D'autre part, la protéine 14.3.3 pourrait être impliquée dans la localisation mitochondriale de hTERT (Zhang et al., 2003).

Comme il a été mentionné plus haut, le stress oxydant semble avoir un rôle actif dans la localisation subcellulaire de TERT. En effet, la production de ROS induit l'exportation de la protéine hTERT du noyau vers le cytoplasme. Dans des conditions de stress oxydant, cet export serait dépendant de la phosphorylation de la tyrosine 707 d'hTERT par la kinase Src (Haendeler et al., 2003a). La translocation de TERT vers le cytoplasme peut être abolie par un inhibiteur sélectif de Src (Haendeler et al., 2003a), par une mutation de la tyrosine 707 de TERT (Haendeler et al., 2003a) ou par la déphosphorylation de ce résidu par la phosphatase nucléaire Shp-2 (Jakob et al., 2008). D'autres protéines comme la PKC, NF- κ B, ou la phosphatase PP2A (Akiyama et al., 2003; Kimura et al., 2004; Li et al., 1997a; Ram et al., 2009) pourrait également participer à la localisation subcellulaire d'hTERT. Par exemple, le traitement d'une lignée de myélome multiple par le TNF α , induit l'importation de TERT du cytoplasme au noyau via son interaction avec NF- κ B (Akiyama et al., 2003).

De récentes études ont montré que dans des conditions de stress oxydant, la télomérase peut être transloquée dans la mitochondrie (cf Chapitre I, 3.5.5).

2.2. La régulation d'hTR

Même si hTR est exprimé de façon ubiquitaire (Soder et al., 1998; Yi et al., 1999), il semblerait néanmoins que la quantité d'hTR soit augmentée dans les tumeurs en comparaison avec les tissus sains (Atkinson et al., 2005; Feng et al., 1995; Soder et al., 1998). De plus, l'augmentation de l'expression d'hTR dans des tumeurs qui surexpriment également hTERT

suggère un phénomène de coopération entre ces deux composants dans l'augmentation de l'activité télomérase (Yi et al., 1999).

Ces différences observées dans l'expression de cet ARN matrice peuvent résulter entre autre d'une amplification génique (Soder et al., 1997), de modifications transcriptionnelles (Yi et al., 1999), post-transcriptionnelles, épigénétiques et post-traductionnelles (Cairney and Keith, 2008; Mitchell et al., 1999a).

C. Les fonctions de la télomérase

1. La fonction canonique d'élongation des télomères

1.1. De la sénescence répllicative à la télomérase

Dans les cellules somatiques normales, la réplication de l'extrémité des chromosomes au cours des divisions cellulaires, entraîne inévitablement le raccourcissement progressif des télomères. Ce raccourcissement télomérique est le résultat de la réplication incomplète du brin 3' discontinu par l'ADN polymérase conventionnelle (Olovnikov, 1973; Watson, 1972). De ce fait, chez les mammifères, les cellules somatiques normales prolifèrent jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle elles arrêtent leur croissance et rentrent en sénescence répllicative. Cette limite est appelée la limite de Hayflick (Hayflick, 1965). Les télomères ayant atteint une taille critique sont à l'origine d'un signal conduisant à l'entrée des cellules en sénescence (Shay and Wright, 1989). Cette observation est à la base de l'hypothèse « télomérique » du vieillissement et postule que le raccourcissement télomérique agirait donc comme une horloge moléculaire, contrôlant la prolifération des cellules (Harley et al., 1992).

La sénescence répllicative est un processus irréversible, caractérisé par des altérations morphologiques et moléculaires particulières comme l'aplatissement cellulaire ainsi que l'augmentation de l'adhérence cellulaire et l'induction de l'activité β -galactosidase lysosomale (Campisi, 2001; Dimri et al., 1995; Sharpless, 2003). Le raccourcissement critique des télomères provoque un signal de dommages de l'ADN à l'origine de l'activation de p53 (*Figure 9*). Il s'en suit une induction des protéines p21 et p16 qui vont alors lever l'inhibition de la protéine Rb induite par les kinases dépendante des cyclines. La protéine Rb active va alors permettre l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Sharpless and DePinho,

2004). Les cellules ayant inactivé p53 ou Rb continuent de proliférer, les télomères perdent leur fonction de protection de l'ADN et les cellules entrent dans une phase appelée crise cellulaire (*Figure 9*) (Counter et al., 1992; Shay et al., 1993) caractérisée par une apoptose massive et une forte instabilité génétique (Karlseder et al., 2002; Sharpless and DePinho, 2004). Les rares cellules qui survivent à cette crise réactive un des deux mécanismes du maintien des télomères aboutissant à l'immortalisation cellulaire. Dans 85 à 90% des cas, les cellules émergentes réactivent la télomérase alors que dans 10 à 15% des cas elles activent un autre mécanisme appelé ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) (Bryan et al., 1995). Ce modèle en deux étapes (*Figure 9*) démontre également que certaines failles dans le processus de sénescence pourraient favoriser l'émergence de cancers.

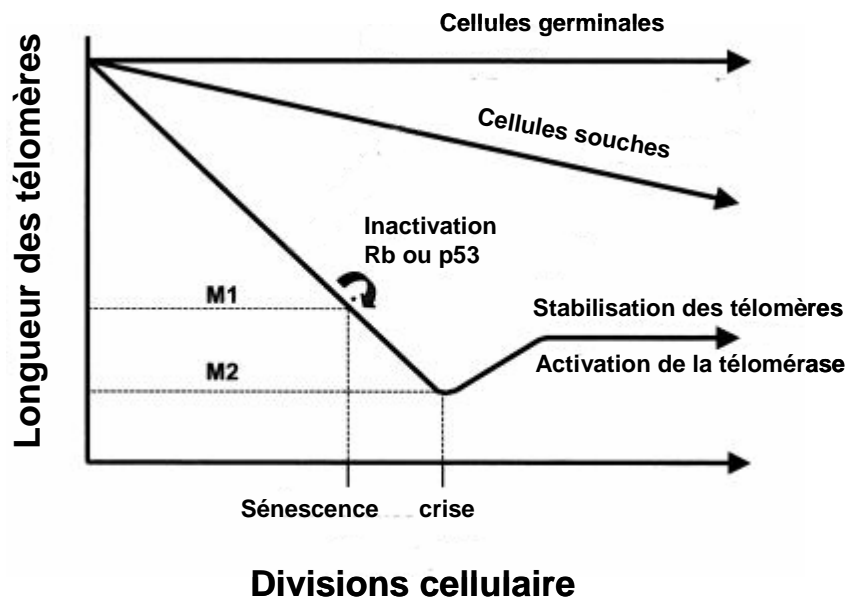


Figure 9 : représentation schématique de l'hypothèse télomérique du vieillissement et de l'immortalisation cellulaire. Dans certaines cellules souches (hématopoïétique, peau, colon...), l'expression de la télomérase serait suffisante pour ralentir le raccourcissement des télomères. La forte expression de la télomérase dans les cellules germinales permet de maintenir une taille des télomères importante (~15 kb), alors que les cellules somatiques normales dépourvues de télomérase ont des télomères qui raccourcissent progressivement jusqu'à atteindre une taille critique (~5-7 kb) où les cellules entrent en sénescence. Cette première barrière proliférative appelée "limite de Hayflick" (ou M1) peut être surmontée par quelques cellules qui ont inactivé les protéines p53 et Rb. Ces rares cellules continueraient à proliférer et leurs télomères à raccourcir jusqu'à ce que la perte de leur fonction protectrice aboutisse à une forte instabilité génomique puis à la mort cellulaire de la plupart de ces cellules. Cette deuxième barrière de prolifération appelée M2 (ou crise) pourrait là encore être spontanément outrepassée par de très rares cellules ($1/10^5$ à $1/10^7$ cellules) qui réactiveraient un mécanisme de maintien des télomères comme la réexpression de hTERT ou le mécanisme ALT.

1.2. L'élongation des télomères par la télomérase

La fonction la plus connue de la télomérase est le maintien de la longueur des télomères par ajout à leur extrémité de séquences TTAGGG répétées en tandem. En effet, historiquement la télomérase a été découverte par l'équipe d'E. Blackburn pour sa capacité à allonger les télomères (Greider and Blackburn, 1987). En effet, au cours de ces travaux, C. Greider et E. Blackburn ont montré qu'une enzyme, la télomérase, présente dans des extraits protéiques d'un protozoaire cilié (*Tetrahymena thermophila*), était capable de synthétiser des répétitions télomériques à l'extrémité 3'OH d'amorces synthétiques mimant un télomère (Greider and Blackburn, 1987). La fonction d'élongation télomérique par une enzyme jusqu'alors inconnue venait d'être démontrée.

Cette fonction d'élongation serait restreinte à la phase S (Masutomi et al., 2003; Wong et al., 2002). En effet, l'expression ectopique de hTERT marquée par la GFP a permis de localiser hTERT dans le nucléole pendant la phase G1/début S et dans le nucléoplasme en fin S/ début G2 (Wong et al., 2002). La télomérase procède à l'élongation des télomères suivant plusieurs étapes expliquées dans la figure 10. Tout d'abord, la ribonucléoparticule va se positionner sur l'extrémité simple brin du télomère par le biais de sa matrice hTR (a). Ensuite, la sous unité catalytique allonge le télomère en ajoutant des nucléotides de l'extrémité 3' vers 5' (b). Une étape de repositionnement de l'extrémité 3' du télomère permet (c) de réaliser un nouveau cycle d'addition de nucléotides (d).

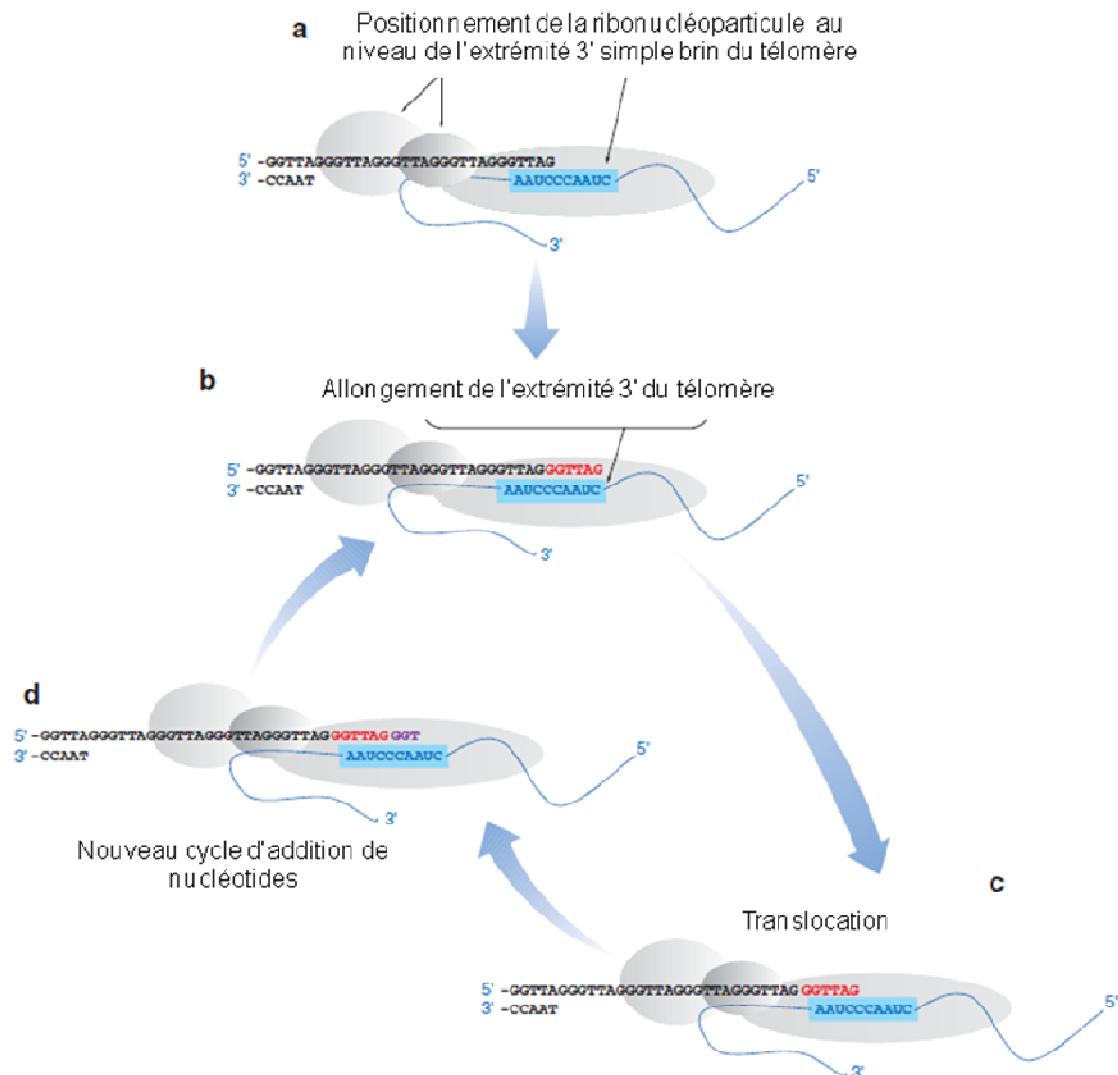


Figure 10 : Modèle de l'élongation processive des télomères par la télomérase. (D'après Autexier et Lue, 2006)

La télomérase permet de compenser le raccourcissement télomérique. Ainsi, les cellules progénitrices des tissus à renouvellement rapide ou les cellules tumorales ont besoin d'une forte activité télomérase pour maintenir la longueur de leurs télomères et ainsi satisfaire leur capacité proliférative intense. Cependant dans certains cas, les cellules télomérase négative peuvent rallonger leurs télomères par la mise en place d'un système d'élongation alternatif appelé ALT (Alternate Lengthening of Telomeres) (Bryan et al., 1995). Les mécanismes ALT sont caractérisés par des événements de recombinaison et d'échange de matériel chromosomique entre les télomères d'une même cellule (Dunham et al., 2000; Reddel, 2003). Ce système engendre des télomères de taille très hétérogènes, entre 3 et 50 kb

alors que les télomères de cellules ayant une télomérase active ne varie qu'entre 5 et 15kb (Henson et al., 2002). Même s'il est plus rare que le mécanisme de réactivation de la télomérase dans les cancers, le système ALT a une incidence plus importante dans certains types de cancers comme les sarcomes (liposarcomes, ostéosarcomes), les gliomes et les carcinomes mammaires (Costa et al., 2006; Hakin-Smith et al., 2003; Henson et al., 2005; Subhawong et al., 2009) .

2. La fonction de protection des télomères de la télomérase

Même si un grand nombre d'études montre une association entre le déclenchement de la sénescence et le raccourcissement des télomères, on peut observer dans la littérature des cas où cette corrélation n'est pas vérifiée. En effet, des auteurs ont rapporté que certaines cellules sénescents ont des télomères encore assez long (5-10 kb de moyenne) (Allsopp et al., 1995; Harley et al., 1990) et que d'autres cellules ayant des télomères très courts continuent de se diviser (Blackburn et al., 2000; Ouellette et al., 2000; Zhu et al., 1999b). De ce fait, la présence de télomères courts n'est pas incompatible avec la prolifération cellulaire. Il a donc été proposé que d'autres altérations au niveau des télomères, puissent être à l'origine de la sénescence cellulaire.

Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses ont été envisagées. Premièrement, une modification de la structure des télomères (capping) plutôt que la taille des télomères pourrait être à l'origine de sénescence répllicative (Karlseder et al., 2002; Zhu et al., 1999b).

Des expériences ont montré que dans des cellules télomérase positive, la présence de télomères courts et stables n'entraîne pas la sénescence des cellules alors qu'en absence d'une télomérase fonctionnelle, ces télomères sont déstabilisés (Blackburn, 2001; Bodnar et al., 1998; Counter et al., 1998b; Zhu et al., 1999b). La télomérase pourrait donc protéger physiquement les télomères les plus courts, indépendamment de sa fonction d'élongation. D'autres travaux, proposent que la télomérase allonge préférentiellement les télomères les plus courts afin de limiter les signaux responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (Ducray et al., 1999). Il serait également possible que la télomérase soit nécessaire au maintien de l'ADN télomérique simple brin pour préserver la fonction télomérique et que la perte de cette extrémité simple-brin soit suffisante pour déclencher la sénescence (Stewart et al., 2003).

L'ensemble de ces données suggère que la télomérase permettrait une protection physique des télomères. Des travaux complémentaires devraient permettre de mieux comprendre cette fonction relativement peu étudiée.

3. Fonction non canonique d'hTERT dans la tumorigenèse

3.1. L'apoptose

Contrairement à la nécrose définie au départ comme une mort accidentelle entraînant une réponse inflammatoire, l'apoptose est un processus de mort dit « programmé » donc actif et particulièrement régulé. La régulation de l'apoptose et de la survie sont des mécanismes cellulaires très complexes, impliquant de multiples intervenants et de nombreuses voies de signalisation. L'apoptose exerce des rôles cruciaux dans le développement, le maintien et le renouvellement tissulaire (Edinger and Thompson, 2004).

Organisé en trois étapes successives, l'apoptose comprend: une phase d'initiation correspondant à la réponse cellulaire induite par un stimulus apoptotique, une phase de décision, au cours de laquelle la cellule peut encore enclencher un programme de mort ou de survie, enfin une phase de dégradation, irréversible, qui marque le début de l'autodestruction des cellules par l'action de nucléases et de protéases. Cette phase de dégradation entraîne des stigmates mortels typiques de la cellule apoptotique qui incluent : un bourgeonnement membranaire, une condensation du noyau avec une dégradation de l'ADN et des organites, ainsi qu'un rétrécissement cellulaire conduisant inexorablement à la formation d'un corpuscule apoptotique éliminé par phagocytose.

La mitochondrie est un élément important pour l'apoptose car elle participe très souvent à ce processus. L'apoptose peut survenir à la suite d'une activation directe des caspases ou par un mécanisme indépendant de l'activation de ces enzymes.

3.1.1 La signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation, une voie dite extrinsèque induite par l'activation de récepteurs membranaires en réponse à des signaux extracellulaires; une voie dite intrinsèque qui est la conséquence de dommages internes induits en réponse à différents stimuli et mettant particulièrement en jeu la mitochondrie et les protéines de la superfamille de Bcl-2.

a. Voie intrinsèque

Les agents chimiques, les radiations ionisantes, une privation en facteurs de croissance et/ou des mutations de l'ADN, entraînent une multitude de dommages internes dans la cellule. Des molécules de la chimiothérapie conventionnelle tels que l'étoposide ou le cisplatine, exercent leur action cytotoxique en activant cette voie intrinsèque (Hickman, 1992; Segal-Bendirdjian et al., 2003). La grande famille des protéines homologues de Bcl-2 ainsi que la mitochondrie joue un rôle majeur dans la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Cette phase effectrice de l'apoptose est initiée par l'ouverture des pores de transition de perméabilité des mitochondries ce qui entraîne le relargage du cytochrome c, des pro-caspases -2, -3 et -9 et de l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) de la mitochondrie vers le cytosol. Cette phase de libération est sous le contrôle de certains membres de la famille Bcl-2. Le cytochrome c ainsi libéré va agir comme co-facteur, avec APAF-1 (*apoptosis protease activating factor-1*), pour permettre le recrutement de la pro-caspase-9 formant ainsi l'apoptosome (en présence d'ATP) (Li et al., 1997b; Zou et al., 1999). Ce complexe macromoléculaire induit l'activation de la pro-caspase-9 qui va à son tour initier l'activation de la caspase 3 mais aussi la caspase-7 (Cory et al., 2003). Ces deux protéases iront ensuite cliver de nombreux substrats cellulaires.

b. Voie extrinsèque

Les lymphocytes T et les cellules NK induisent l'apoptose des cellules tumorales soit en libérant une famille de sérines protéases (les granzymes), soit en sécrétant des ligands appartenant à la superfamille du TNF (tumor necrosis factor) (Smyth et al., 2002). Ces ligands, le TNF, FasL et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) sont des protéines transmembranaires qui agissent sous la forme d'homotrimères pour activer leurs récepteurs membranaires correspondants (Fas/CD95, TNF-R1, TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5). Ces récepteurs possèdent dans leur partie cytoplasmique un motif d'environ 80 acides aminés appelé « domaine de mort » (*ou death domaine ou DD*) qui est impliqué dans la transduction du signal (Debatin and Krammer, 2004). Ce domaine particulier permet aux récepteurs de mort de recruter des protéines adaptatrices (FADD pour le CD95, TRADD pour le récepteur de TNF) nécessaires à l'activation de la caspase-8 après engagement par leurs ligands respectifs.

La fixation des ligands sur leurs récepteurs cibles entraîne l'agrégation des trimères de récepteurs et la juxtaposition de leurs domaines de mort intracellulaire afin de recruter des protéines adaptatrices (Igney and Krammer, 2002). Ces protéines adaptatrices assurent une interaction avec les récepteurs et avec les caspases initiateuses comme la procaspase-8 *via* le domaine DED (death effector domain) de l'enzyme. Le tout forme un complexe de signalisation appelé DISC (death inducing signaling complex) comprenant le récepteur, la protéine adaptatrice et la pro-caspase-8 (Kischkel et al., 1995). Le recrutement et l'agrégation de la pro-caspase-8 au sein du DISC entraîne son autoactivation par clivage protéolytique (Chang et al., 2003). Une fois activée, la caspase-8 peut alors cliver et activer des caspases effectrices de l'apoptose comme la caspase-3.

Dans la voie extrinsèque, l'autoprotéolyse de la caspase-8 active directement la caspase-3. Cependant, dans certaines cellules, le signal apoptotique induit par la voie des récepteurs de mort est dépendant d'une phase d'amplification mitochondriale (*Figure 11*), déclenché via le clivage de Bid par la caspase-8 (Luo et al., 1998). En effet, la forme tronquée de Bid, tBid générée après clivage transloque au niveau de la mitochondrie et participe à la perméabilisation de cet organe. L'interaction de tBid avec Bax entraîne la sortie du cytochrome c de la mitochondrie permettant *in fine* l'activation allostérique la caspase-9 qui active à son tour la caspase 3. Cette phase d'amplification mitochondriale est observée dans les cellules dites de type II alors que l'activation directe de la caspase-3 par la caspase-8 est spécifique de celles de type I.

3.1.2 Les membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine d'homologie avec Bcl-2 ou « BH » (BH pour Bcl-2-homology domain) et se divisent en deux catégories :

Les protéines anti-apoptotiques ou « **suppresseurs** » de l'apoptose telles que Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva et Nrf3 qui possèdent chacune quatre domaines BH (BH 1-4). La protéine Bcl-2, la plus anciennement caractérisée (Hockenbery et al., 1990) exerce son rôle anti-apoptotique en inhibant la sortie des protéines mitochondriales inter-membranaires.

Les protéines pro-apoptotiques, réparties en deux sous groupes :

- L'un constitué de protéines dites « **activatrices** » de l'apoptose telles que Bax, Bak ou Bok (Cory et al., 2003). Les protéines de ce sous groupe possèdent trois domaines BH (Cory and Adams, 2002; Puthalakath and Strasser, 2002). Des études controversées ont proposé que les protéines Bax et Bak pourraient former un canal oligomérique ou se lier à la protéine VDAC mitochondriale pour ouvrir le pore de transition de perméabilité permettant la sortie vers le cytosol du cytochrome c et des autres protéines mitochondriales inter-membranaires (Desagher and Martinou, 2000) .
- L'autre, regroupe les protéines dites « **sensibilisatrices** » de l'apoptose. Ces protéines possèdent un seul domaine BH3 (« BH3 unique ») nécessaire et suffisant à lui seul pour conférer l'activité pro-apoptotique des protéines Bid, Bad, Bik, Blk, Hrk Bim, Bnip3, Nix, Bmf et Puma. L'activation d'une protéine à domaine « BH3 unique » va dépendre du stimulus apoptotique d'origine.

De façon générale, les suppresseurs interagissent avec les activateurs (par exemple, en les séquestrant) pour empêcher ces derniers de former des pores dans les mitochondries. Les sensibilisateurs quant à eux ont comme fonction principale i) de lier les suppresseurs pour les inhiber et ii) de potentialiser l'action des activateurs (Cory et al., 2003). La régulation de l'apoptose dépend donc d'un équilibre entre les activités pro- et anti-apoptotique de plusieurs protéines de la famille Bcl-2 (Cory et al., 2003). Cet équilibre peut être modulé par des variations de l'expression de divers homologues de Bcl-2 mais aussi par des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles (séquestration, clivage, phosphorylation etc...).

3.1.3 Rôle de p53 dans l'apoptose

En réaction à des dommages au niveau de l'ADN, l'expression de la protéine p53 est rapidement augmentée. En cas de lésions trop importantes, p53 entraîne l'arrêt de la prolifération et induit de l'apoptose en stimulant l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que Bax, Puma et NOXA ou en réprimant Bcl-2 (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003; Vousden and Lu, 2002). p53 peut également être relocalisée au niveau de la mitochondrie, pour permettre l'activation de Bax et Bak (Chipuk et al., 2004; Leu et al., 2004) et interagir avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 (Mihara et al., 2003). De plus, il n'est pas exclu que la protéine p53 soit directement impliquée dans la chute du potentiel membranaire de la mitochondrie.

3.1.4 Les autres protéines participant à l'apoptose

D'autres molécules, libérées lors de la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale, participent à la décision ou l'exécution de l'apoptose. Parmi elles, on peut citer: les IAP (*inhibitors of apoptotic proteases*) cytosoliques, dont le rôle est d'inhiber les caspases, les inhibiteurs de ces IAP, Smac/Diablo (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) et Omni (Salvesen and Duckett, 2002). Enfin, la translocation nucléaire d'un facteur activateur de nucléase appelé AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et de la nucléase endoG conduit à la fragmentation de l'ADN de la cellule cible (Li et al., 2001).

3.1.5 Exécution du « message de mort » par les caspases

Cette phase finale de l'apoptose conduit à la désorganisation structurale de la cellule et à la formation des corps apoptotiques qui seront par la suite phagocytés par les macrophages. Ce processus de « désintégration » des structures cellulaires est exécuté par des caspases (cysteinyl aspartate proteinase) une famille de protéases à cystéine très conservées cours de l'évolution.

Les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, conduisent à l'activation des caspases. Synthétisées sous forme de proenzymes inactives, les pro-caspases sont activées après clivage et assemblage sous formes de dimères ou tétramères. Le site actif de ces protéases contient un résidu cystéine présent dans une séquence pentapeptidique conservée qui leur confère une spécificité de clivage du substrat au niveau d'un résidu aspartate. Parmi les 13 caspases identifiées chez l'homme, certaines sont impliquées dans les phénomènes d'inflammation ou de différenciation et d'autres dans l'apoptose (Kroemer and Martin, 2005). Généralement réparties en deux groupes, on distingue les caspases initiatrices et les caspases exécutrices de l'apoptose. Les caspases initiatrices (caspases-8, -9, -10) possèdent un long pro-domaine N-terminal et sont activées précocement dans la cascade apoptotique. Ces dernières vont activer par clivages les caspases exécutrices (caspases-3, -6, -7) qui ont un domaine N-terminal court (Thornberry and Lazebnik, 1998). Les cibles des caspases sont multiples, on peut citer :

- **Les protéines pro-apoptotiques** : les caspases elles-mêmes, la protéine Apaf-1 (Cain et al., 2000), ICAD un inhibiteur de la désoxyribonucléase CAD et certaines protéines de la famille Bcl-2 tel que Bid, Bcl-2 ou Bcl-xl (Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998; Luo et al., 1998).
- **Les protéines de la réparation de l'ADN** comme ATM (Hottel et al., 2000), Rad 51 (Flygare et al., 1998) et PARP (polyadénosine-diphosphate-ribose polymérase) (Kaufmann et al., 1993)
- **Les protéines kinases Akt et RIP**, impliquées dans la survie cellulaire (Bachelder et al., 2001; Lin et al., 1999) et inactivées par clivage.
- **Les protéines structurales**, notamment celles participant au cytosquelette telles que les filaments d'actine (Kothakota et al., 1997) et les protéines des filaments intermédiaires comme la vimentine (Prasad et al., 1998) les kératines (Caulin et al., 1997) mais aussi les lamines nucléaires (Ruchaud et al., 2002). Le clivage de toutes ces protéines entraîne une désorganisation de la structure cellulaire conduisant au démantèlement de la cellule.

3.1.6 L'apoptose caspase-indépendante

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a montré que dans des conditions particulières certaines cellules peuvent également mourir par des mécanismes indépendants des caspases (Xiang et al., 1996). Les protéines qui participent activement à l'apoptose caspase-indépendante sont :

- **endoG**, une endonucléase impliquée dans la fragmentation internucléosomale de l'ADN en coopération avec des exonucléases et la Dnase I (Widlak et al., 2001) et **AIF** une oxydoreductase également facteur pro-apoptotique activant des nucléases responsables de la fragmentation de l'ADN (Ravagnan et al., 2001).
- **les sérines protéases** essentiellement représentées par les granzymes. Ces protéases sont capables de cliver divers substrats notamment les lamines, la fibronectine, la laminine, rho-GTPase, PARP et Bid (Beresford et al., 1999; Buzza et al., 2005; Waterhouse et al., 2005; Zhang et al., 2001). Elles peuvent également induire une

fragmentation simple brin de l'ADN par une désoxyribonucléase (NM23-H1) sans activation des caspases (Beresford et al., 2001; Fan et al., 2003).

- **les calpaïnes** sont des protéases à cystéines participant à l'induction de l'apoptose caspases-indépendante en clivant la fodrine, une protéine du cytosquelette (Waterhouse et al., 1998).
- Enfin, d'autres protéines comme la kinase **RIP** (Receptor-Interacting Protein) ou la sérine protéase **HtrA2/Omi** sont également des facteurs impliqués de l'apoptose caspase-indépendante.

Une plus grande compréhension des voies de signalisations apoptotiques (*Figure 11*) devrait permettre de découvrir de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblant le processus de mort cellulaire, dont l'unique objectif est la destruction des cellules tumorales sans affecter les cellules saines. Des essais *in vitro* et *in vivo* sur la souris ont démontré que le ligand TRAIL peut induire sélectivement l'apoptose des cellules cancéreuses sans toxicité apparente sur les tissus normaux, contrairement aux ligands Fas et au TNF α (Ashkenazi and Dixit, 1998; Walczak et al., 1999). Ainsi, TRAIL pourrait être efficace *in vivo* comme agent anticancéreux. Cependant, un certain nombre de tumeurs semblent être malgré tout résistantes à l'action de cette cytokine. La combinaison de différentes stratégies thérapeutiques associées à une meilleure compréhension de l'apoptose au niveau moléculaire devrait permettre de mieux cibler ce processus défaillant dans les cancers.

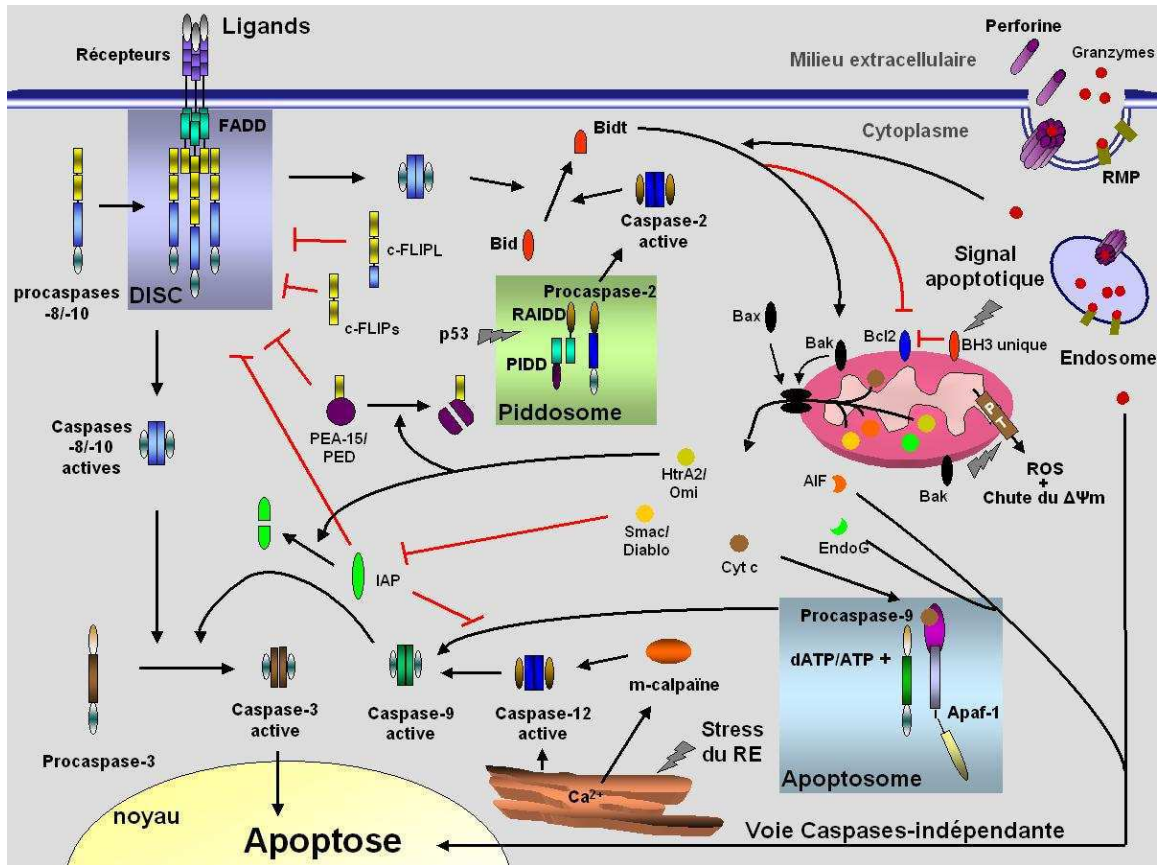


Figure 11 : Schéma récapitulatif des différentes signalisations apoptotiques.

3.2. Vers la découverte d'une fonction anti-apoptotique de la télomérase

La télomérase est une protéine indispensable pour la prolifération des cellules à long terme. Son expression constitutive dans des cellules normales permet une augmentation de leur potentiel prolifératif et leur immortalisation (Bodnar et al., 1998) alors que son inhibition dans des cellules cancéreuses provoque leur mort (Hahn et al., 1999b; Zhang et al., 1999).

Le rôle canonique d'élongation des télomères par la télomérase est aujourd'hui bien documenté, en revanche, depuis quelques années on peut voir apparaître dans la littérature des publications suggérant qu'au-delà de son rôle de maintien de la longueur des télomères, la télomérase posséderait d'autres fonctions cellulaires (non canoniques) impliquées dans la transformation néoplasique. Ces fonctions non canoniques, télomère-indépendantes ont émergé à partir des observations faite chez la souris. En effet, dès 1996 Broccoli et al., (Broccoli et al., 1996) tente de comprendre pourquoi les cellules de *mus-musculus* réactivent la télomérase au cours du développement tumoral alors qu'elles possèdent déjà des télomères

très longs (20 à 50kb en moyenne (Kipling and Cooke, 1990)). Par la suite un grand nombre d'équipe se sont intéressées aux fonctions télomère-indépendantes de la télomérase dans la tumorigénèse.

La première réelle démonstration d'un rôle anti-apoptotique de la télomérase, télomère-indépendant a été apportée par les travaux de *Stewart et al.*, en 2002. Dans cette étude, les auteurs se sont inspirés de l'expérience de cancérogenèse expérimentale décrite par *Hahn et al.*, en 1999 (Hahn et al., 1999a). Pour que leur démonstration soit convaincante (*Figure 12*), l'équipe de Stewart a utilisée la lignée GM847 de fibroblastes humains immortalisés par l'introduction de l'antigène T et t de la région précoce du virus SV40. Cette lignée est télomérase négative, néanmoins elle est capable de maintenir la taille de ses télomères par activation d'un mécanisme ALT. Dans cette étude, les auteurs partent du postulat que le système ALT aurait la capacité de se substituer à la télomérase pour maintenir la taille des télomères et suggèrent que si la télomérase n'a qu'une fonction d'élongation des télomères, le système ALT pourrait aussi compenser l'absence de la protéine hTERT pour rallonger les télomères conférant ainsi un pouvoir tumorigène aux cellules. Pour vérifier cette hypothèse, les auteurs inoculent à des souris immunodéficientes (*Figure 12*), les cellules GM847 immortalisées par l'oncogène T et t de la région précoce de SV40 et infectées avec (A) l'oncogène actif *H-ras* seul, (B) l'oncogène actif *H-ras* et la protéine hTERT, (C) l'oncogène actif *H-ras* et la protéine hTERT-HA. Cette protéine hTERT possède à son extrémité carboxy-terminal une étiquette hémagglutinine (HA) qui la rend incapable de rallonger les télomères *in vivo* malgré que l'activité télomérase soit conservée et détectée par le test TRAP (Counter et al., 1998a). L'équipe de Weinberg constate alors que l'introduction de *H-ras* dans les GM847 immortalisées n'induit pas la formation de tumeurs chez la souris. Cela signifie que le mécanisme ALT ne peut pas se substituer à l'expression de la télomérase dans la transformation néoplasique. En revanche, l'inoculation des cellules exprimant de façon ectopique la forme sauvage ou étiquetée d'hTERT, provoque l'apparition de foyers tumoraux chez les souris. Ainsi, l'équipe de Weinberg prouve que la contribution du système ALT n'est pas équivalente à celui de la télomérase dans la transformation tumorale mais surtout cette expérience démontre pour la première fois un **rôle tumorigène de hTERT indépendamment de sa fonction d'élongation des télomères** (Stewart et al., 2002).

Ainsi, la télomérase contribuerait à la tumorigénèse via deux mécanismes différents, le premier, est directement lié à sa fonction d'allongement télomérique (fonction canonique) alors que l'autre mécanisme semble être télomère-indépendant. Cette fonction non canonique reste peu connue même si aujourd'hui plusieurs rôles extra-télomérique ont été rapportés.

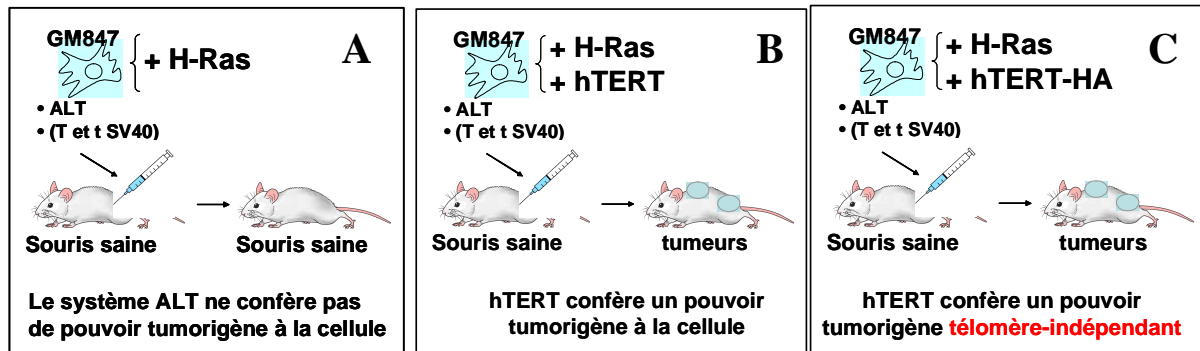


Figure 12 : Système de cancérogenèse expérimentale à partir de cellules humaines « normales » (D'après Stewart *et al.*, de 2002.) A) Les fibroblastes GM847 maintiennent la taille de leur télomères grâce au mécanisme ALT. L'expression concomitante de l'antigène T et t de la région précoce du virus SV40 ainsi que l'oncogène actif *H-ras* ne permet pas la formation de tumeurs chez la souris immunodéficentes. B) L'introduction additionnelle du gène hTERT sauvage provoque la formation de tumeurs chez la souris. C) L'expression simultanée de l'antigène T et t de SV40, de la forme activée de Ras et d'une forme mutée d'hTERT incapable d'allonger les télomères permet la formation de tumeurs chez la souris immunodéficentes. Cette expérience est la démonstration d'une fonction tumorigène de la télomérase, télomère-indépendante.

D'autres observations sont venues renforcer l'hypothèse de fonctions télomère-indépendantes de la télomérase dans les cancers. En fait, plusieurs auteurs se sont intéressés au fait que l'activité télomérase ne corrèle pas toujours avec l'élongation des télomères (Blackburn *et al.*, 2000; Liu, 2000). Par exemple, dans beaucoup de cancers humains on peut observer à la fois des télomères courts en association avec une activité télomérase significative et de l'instabilité génomique (Counter *et al.*, 1992; Hastie *et al.*, 1990). Cette observation est également vérifiée dans des lignées de kératinocytes humains, puisque l'activation de la télomérase par les oncoprotéines virales HPV16, E6 et E7 n'empêche pas le raccourcissement progressif des télomères. De façon similaire, l'expression ectopique d'hTERT induit une augmentation de l'activité télomérase et l'immortalisation de fibroblastes humains sans court-circuiter le processus de raccourcissement progressif des extrémités télomériques (Zhu *et al.*, 1999b). L'utilisation d'un mutant d'hTERT portant une étiquette hémagglutinine sur sa partie carboxy-terminal (hTERT-HA) n'ayant plus la capacité de

maintenir la taille des télomères malgré une activité télomérase conservée (Counter et al., 1998a) est capable d'immortaliser des cellules transformées sans rallongement des télomères (Stewart et al., 2002; Zhu et al., 1999b).

Il serait donc possible de découpler l'activité d'élongation des télomères, des effets extra-télomériques de la télomérase. Cette dichotomie pourrait être expliquée en partie par des interactions protéiques complexes avec hTERT.

3.3. Mise en évidence du rôle anti-apoptotique d'hTERT *in vitro*

L'utilisation de petites molécules ciblant la télomérase a permis d'élucider certaines fonctions extra-télomérique de la télomérase. Des inhibiteurs d'hTERT tels que les oligonucléotides antisens ou les petits ARNs interférence (siRNAs) sont capables de provoquer un arrêt de croissance, des changements morphologiques ou de la mort par apoptose selon le type et le contexte cellulaire. L'utilisation de ces petites molécules ciblant hTERT permet de s'affranchir du rôle d'élongation des télomères de la télomérase, puisque l'effet biologique observé par cette inhibition intervient très tôt (96h au plus tard après transfection), donc bien avant un éventuel raccourcissement des extrémités télomériques.

L'inhibition de l'activité télomérase d'élongation des télomères par l'utilisation d'un oligonucléotide antisens dirigé contre hTERT sensibilise les cellules de cancer du sein PMC42 à l'apoptose induite par la généticine dès 24h de traitement (Cao et al., 2002). A l'inverse, l'expression ectopique de la forme sauvage d'hTERT augmente la survie des cellules en réponse à ce même agent. En revanche, dans cette même étude, la surexpression d'un mutant catalytique inactif (hTERT D788N) n'induit pas de mort cellulaire malgré l'abolition de son activité reverse transcriptase (Cao et al., 2002). Cette dernière observation suggère qu'hTERT exerce une fonction anti apoptotique indépendante de son activité reverse transcriptase. De plus, dans tous les cas, les auteurs ne notent aucune modification de la taille des télomères. Par conséquent le processus apoptotique observé n'est pas la conséquence d'un raccourcissement télomérique.

L'utilisation d'oligonucléotide, d'ARN interférence ou de ribozyme dirigé contre TERT engendre une inhibition rapide de l'activité télomérase entraînant des modifications dans le destin des cellules avant que les télomères ne raccourcissent. En effet, ces petites

molécules sont capables d'induire un arrêt de prolifération avec une accumulation de cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Folini et al., 2005; Fu et al., 2005; Kraemer et al., 2003; Saretzki et al., 2001; Tao et al., 2005; Xia et al., 2005; Zhong et al., 2010). Un phénomène d'apoptose massif est également observé en moins de 48h, dans des lignées de carcinome de la prostate (Folini et al., 2005), de cancer du pancréas CAPAN-2 (Zhong et al., 2010), dans plusieurs lignées ovariennes (Saretzki et al., 2001) ainsi que dans des lignées de carcinomes mammaires (Dong et al., 2009). Néanmoins, contrairement à l'inhibition d'hTERT, l'exposition des cellules de carcinome prostatique à un oligonucléotide dirigé contre l'ARNm d'hTR ne provoque aucune diminution de la prolifération ou de la survie cellulaire (Folini et al., 2005).

Dans des cellules de rat indifférenciées PC12, l'inhibition de l'activité télomérase par un oligonucléotide TTAGGG ou par un inhibiteur des dimères de quadruplexes entraîne un dysfonctionnement mitochondrial et une sensibilisation rapide (dès 24h de traitement) des cellules PC12 à l'apoptose induite par la staurosporine, l'ABP (amyloïde β -peptide) et le Fe^{2+} (Fu et al., 1999). Ce phénomène rapide de mort peut être inhibé par l'expression ectopique de la protéine Bcl-2 (Del Bufalo et al., 2005) ou d'un inhibiteur de caspase zVAD-fmk. Ce résultat suggère de façon intéressante que la télomérase agirait de façon précoce au cours de la cascade apoptotique. Cette même équipe a montré un an plus tard que l'inhibition de l'activité télomérase par la transfection d'un oligonucléotide antisens cible de mTERT augmente la sensibilité des cellules neuronales embryonnaires de souris à l'apoptose induite par une carence en facteurs trophiques ou par la staurosporine. A contrario, la surexpression de la forme sauvage d'hTERT dans les cellules PC12 permet la survie cellulaire malgré la carence en facteurs trophiques (Fu et al., 2000) ou la présence d'ABP (Zhu et al., 2000), de camptothécine ou d'étoposide (Lu et al., 2001). La différenciation des cellules PC12 par le NGF (Nerve Growth Factor) ou l'exposition de cellules neuronales embryonnaires de souris à l'AZT un inhibiteur de transcriptases inverse, entraîne une inhibition de l'activité télomérase associée à une augmentation de l'apoptose induite par un traitement de 24h avec la staurosporine ou l'ABP (Fu et al., 1999; Zhu et al., 2000).

L'inhibition de l'activité télomérase par l'action d'un ARN interférence ou d'un oligonucléotide antisens ciblant hTERT induit une sensibilisation rapide au cisplatine dans deux lignées humaines d'hépatocarcinomes (Guo et al., 2008), dans une lignée de cancer du rein résistant au cisplatine (Park et al., 2008) ainsi que dans des cellules de leucémie myéloïde (Yuan and Mei, 2002). La co-administration d'un siRNA ciblant hTERT et d'un traitement

par le cisplatine (Guo et al., 2008) ou la doxorubicine (Dong et al., 2009) engendre une réduction du volume tumoral des cellules xéno greffées chez des souris immunodéficientes (Dong et al., 2009; Guo et al., 2008).

L'immortalisation de 4 lignées de fibroblastes humains normaux par la surexpression d'hTERT n'empêche pas l'entrée des cellules dans un phénomène de sénescence prématurée induite par le stress également appelé SIPS (Stress-Induced Premature Senescence) en réponse à 3 facteurs de stress ; l' H_2O_2 , les ultraviolets et l'irradiation- γ . De plus, aucun raccourcissement des télomères n'a été observé au moment où les cellules sont entrées en sénescence. Cependant, l'expression constitutive d'hTERT protège ces cellules de la mort induite par les ultraviolets et l'irradiation- γ (Gorbunova et al., 2002). Pour ces auteurs, la télomérase pourrait ajouter des répétitions télomériques aux niveaux des cassures des extrémités télomériques provoquées par les radiations permettant ainsi aux cellules de résister à la mort cellulaire. Même si cette dernière interprétation est purement hypothétique, l'ensemble de ces résultats suggèrent que 1) hTERT protège de la mort cellulaire et 2) le raccourcissement des télomères ne joue pas de rôle significatif dans le phénomène de SIPS contrairement aux dommages à l'ADN, puisque les cellules entrent en sénescence prématurée malgré leurs longs télomères.

L'expression ectopique d'hTERT protège des cellules de leucémie aigüe promyélocytaire résistantes à la maturation par l'ATRA (All Trans Retinoic Acid), de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort (TRAIL-R et TNF-R). De plus, un traitement par l'ATRA conduisant à la répression de la télomérase sensibilise les cellules à l'apoptose induite par TRAIL sans phénomène de maturation ni de raccourcissement des télomères (Dudognon et al., 2004).

Au cours de tous ces travaux, aucune différence significative de la taille des télomères n'a été observée avant et après l'inhibition de l'activité d'élongation des extrémités télomériques. En effet, les conséquences de l'inhibition d'hTERT sur la croissance ou la viabilité cellulaire se manifestent très tôt, généralement avant qu'une attrition des télomères ne s'enclenche. Ce phénomène d'apoptose semble donc être indépendant du raccourcissement des télomères. Ces travaux sont donc la démonstration d'une fonction anti-apoptotique de la télomérase télomère-indépendant.

Ainsi, l'inhibition de la télomérase, en ciblant soit hTERT soit hTR, engendre la mort cellulaire d'un grand nombre de cellules. Cette mort observée a souvent été attribuée au raccourcissement progressif des télomères ou à une augmentation des dommages à l'ADN déclenchée par des télomères déprotégés (« uncapped »). Néanmoins, au cours de ces dix dernières années, plusieurs travaux *in vitro* (Cao et al., 2002; Dudognon et al., 2004; Folini et al., 2005; Massard et al., 2006; Saretzki et al., 2001) ont apporté de nombreux d'arguments qui étayent la fonction anti-apoptotique non canonique de la télomérase, tout comme les modèles animaux décrits dans le chapitre.

3.4. Mise en évidence du rôle anti-apoptotique d'hTERT chez la souris

Des études réalisées par l'équipe de Blasco ont montré que l'inactivation du gène mTR (mTERC) chez des souris transgéniques $mTR^{-/-}$, entraîne une inhibition de l'activité télomérase et un raccourcissement des télomères. Les auteurs rapportent une diminution de l'incidence des cancers (carcinomes et lymphomes) après exposition à certains carcinogènes chimiques, chez les souris $mTR^{-/-}$ ayant des télomères courts (souris de cinquième génération) par rapport aux souris $mTR^{-/-}$ ayant des télomères longs (souris de première ou deuxième génération) et aux souris sauvages (Gonzalez-Suarez et al., 2003; Gonzalez-Suarez et al., 2000). De plus, les souris $mTR^{-/-}$ qui ont des télomères longs développent moins de tumeurs que les souris témoins. Ces résultats indiquent clairement que l'absence de mTR inhibe la tumorigenèse.

L'établissement de souris transgénique (K5-mTERT) permettant la surexpression de mTERT sous le contrôle du promoteur de la kératine bovine (K5) dans les kératinocytes basaux de l'épiderme, a permis de confirmer l'implication de TERT dans la tumorigenèse. L'équipe de Blasco constate d'une part que les souris transgéniques résultantes sont viables et présentent des télomères de taille identiques aux souris sauvages. Ils observent également chez les souris K5-mTERT, une augmentation de l'incidence des tumeurs cutanées après exposition ou non à des agents mutagènes (Gonzalez-Suarez et al., 2001). De plus, les souris K5-mTERT qui survivent à l'apparition de carcinomes ont en moyenne une durée de vie plus longue de 10% par rapport aux souris sauvages (Gonzalez-Suarez et al., 2005). Les auteurs remarquent également que les souris qui ont un allongement de leur durée de vie, développent moins de maladies dégénératives au cours de leur existence par rapport aux souris sauvages (Gonzalez-Suarez et al., 2005). Là aussi, l'analyse de la longueur des télomères des kératinocytes basaux des souris K5-mTERT ne montra aucune différence significative avec

ceux des souris sauvages. Il semblerait donc que TERT exerce une fonction dans la survie qui est indépendante de la longueur des télomères. D'autre part, il est intéressant de noter le rôle antagoniste de la télomérase dans la tumorigenèse et le vieillissement. En effet, dans cette étude TERT augmente à la fois l'incidence des cancers et diminue celle des maladies dégénératives liées à l'âge. On peut donc imaginer que la télomérase permet soit i) un allongement de la durée de vie dans un contexte où les cellules sont saines soit ii) l'induction de tumeurs dans le cas de cellules présentant un certain nombre d'altérations génétiques. En effet, dans un contexte pré-requis d'accumulations d'anomalies aboutissant à la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou à l'activation d'oncogènes, la télomérase pourrait conférer un pouvoir tumorigène additionnel à des cellules pré-néoplasiques entraînant une résistance accrue à la mort cellulaire et leur transformation en cellules cancéreuses.

L'expression constitutive de mTERT chez la souris, entraîne aussi une augmentation de l'activité télomérase associée au développement spontané de lésions précancéreuses et de carcinomes invasifs de la glande mammaires chez les femelles âgées (Artandi et al., 2002). De plus, dans les fibroblastes embryonnaires issus de ces souris transgéniques, la surexpression de mTERT entraîne un rallongement des télomères mais ne permet pas d'outrepasser la sénescence répliative. Ce surprenant résultat illustre le fait que l'arrêt de croissance répliatif observé dans ces fibroblastes embryonnaires de souris n'est pas le résultat d'un raccourcissement des télomères dans ce contexte d'étude.

Toutes ces études tendent à démontrer que l'expression ectopique de mTERT favorise la tumorigenèse. Cependant il faut garder en mémoire que la fonction de la télomérase d'élongation des télomères n'est pas limitante dans ce contexte puisque les souris ont des télomères longs. En revanche, il ne faut pas exclure le fait que les télomères des souris peuvent être hétérogènes et que la surexpression de la télomérase permettrait l'allongement d'un contingent de télomères plus court.

3.5. Fonction anti-apoptotique non canonique de la télomérase : les mécanismes d'actions

L'utilisation de petites molécules ciblant hTERT et les modèles animaux ont permis d'observer les fonctions non canoniques de la télomérase. La stabilisation des télomères ne peut expliquer à elle seule l'effet tumorigène de la télomérase. En effet, même si la taille des télomères semble être un élément important, les études réalisées chez la souris, où la taille des télomères n'est pas un facteur limitant et celles réalisées avec des petites molécules ciblant hTERT, apportent la preuve d'une dichotomie entre fonction télomère-dépendante et fonction tumorigène d'hTERT. En revanche, les mécanismes à l'origine de ces effets extra-télomériques sont assez mal connus, ambigus voir parfois contradictoires. Ce chapitre se veut être une synthèse des mécanismes d'actions proposés par la communauté scientifique pour expliquer ces fonctions non canoniques télomères-indépendante d'hTERT dans la tumorigenèse.

Des études récentes, ont montré que la télomérase protège les cellules de l'apoptose en agissant précocement sur certaines voies de la signalisation ou en interagissant avec des protéines pro- ou anti-apoptotique ou en régulant de façon direct ou indirect l'expression de gènes impliqués dans la survie et l'apoptose. En effet, la fonction extra-télomérique d'hTERT dans la tumorigenèse pourrait être la conséquence, d'une stimulation de la prolifération cellulaire et de la survie (Smith et al., 2003) de modulation du transcriptome (Choi et al., 2008; Perrault et al., 2005; Smith et al., 2003), de l'activation/inhibition de certaines protéines anti-/pro-apoptotique (Massard et al., 2006; Zhong et al., 2010), d'interactions complexes avec certaines voies de signalisation (Cao et al., 2002) ou d'une protection vis-à-vis des dommages de l'ADN (Masutomi et al., 2005; Sharma et al., 2003), dépendant du type cellulaire et du contexte de l'étude (*Figure 13*).

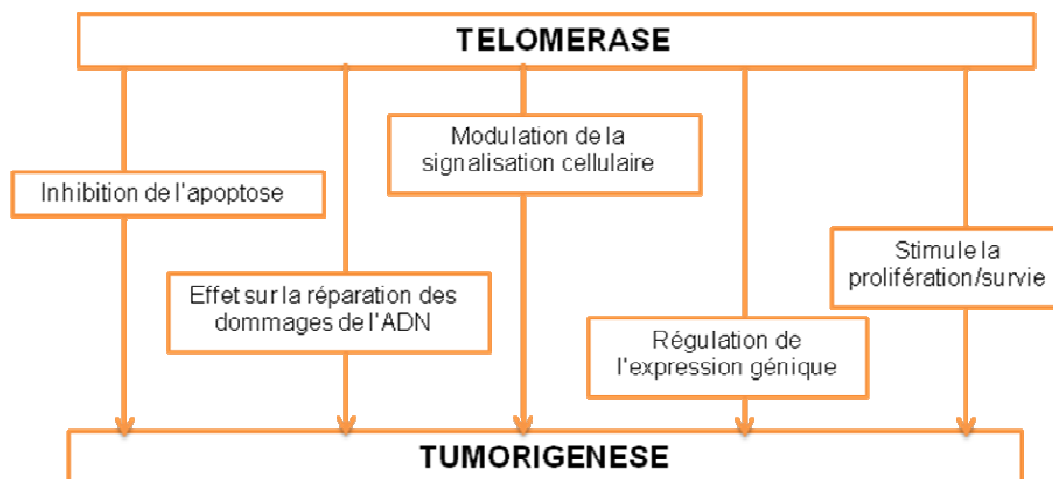


Figure 13 : Schéma récapitulatif des rôles extra-téломériques possibles de hTERT dans la tumorigenèse.

3.5.1 TERT dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire

Des études utilisant une approche de puces ont permis de démontrer la contribution de la protéine TERT dans l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. En 2003, l'équipe de Smith *et al.*, a étudié l'hyper-expression d'hTERT sur la prolifération de cellules épithéliales mammaires humaines HMECs (Human Mammary Epithelial Cells). Les auteurs observent alors que seules les cellules qui surexpriment hTERT sont capables d'outrepasser la crise télomérique et de proliférer dans un milieu de culture dépourvu de facteurs trophiques contrairement à celles qui surexpriment un mutant d'hTERT catalytique-inactif ou aux cellules témoins. Afin de déterminer si l'effet pro-prolifératif d'hTERT est dû à une modulation de l'expression de gènes particuliers, le profil d'expression génique des cellules HMECs-hTERT a été comparé avec celui des HMECs témoins, par une approche de puces à ADN. L'analyse des données de ces puces a révélé que certains gènes impliqués dans la croissance cellulaire et l'apoptose sont modulés par la surexpression d'hTERT. Les gènes codant TRAIL, un ligand activant la voie des récepteurs de mort, ainsi que certains gènes antiprolifératifs comme le récepteur à l'interleukine 1 ou l'IAP (Integrin-Associated Protein), un récepteur à la thrombospondine sont réprimés par la surexpression d'hTERT. En outre, parmi les gènes induits, on retrouve le gène codant le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) dont l'implication n'est plus à prouver dans la prolifération des cellules de la glande mammaire et les cancers du sein, le FGF (Fibroblast Growth Factor) et deux facteurs de transcription de la famille CREB/ATF (Smith *et al.*, 2003). Un autre facteur de croissance de la famille de l'EGF, l'épiréguline, a également été caractérisé dans des fibroblastes humains immortalisés par hTERT par un système de puces d'expression (Lindvall *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces résultats montre qu'hTERT induit l'expression de gènes pro-prolifératifs et stimule la croissance cellulaire. D'autres équipes ont également étudié le profil d'expression génique dans différents modèles de surexpression d'hTERT. L'analyse du profil global d'expression de cellules adrénocorticales bovines immortalisées par hTERT montre qu'environ 284 gènes sont modulés par la surexpression d'hTERT (Perrault *et al.*, 2005). Là aussi, on retrouve une hyper-expression de certains facteurs de croissance tels que les membres de la famille de l'IGF (IGF2 et IGFBP5) et du TGF- β associée à l'augmentation de

la prolifération cellulaire. hTERT est capable d'induire la cycline D1, dans les cancers de la prostate (Jagadeesh and Banerjee, 2006) ainsi que Mac-2BP, un antigène tumoral sécrété dans une large variété de cancers et impliqué dans des phénomènes d'adhésion et de dissémination métastatique (Park et al., 2007). Enfin, l'expression ectopique de hTERT entraînerait une répression de certains gènes impliqués dans des fonctions pro-apoptotiques comme la protéine de liaison à p53, TP53BP1 (Perrault et al., 2005).

La télomérase pourrait également modifier l'expression génique en interagissant directement avec certains partenaires protéiques comme des facteurs de transcription ou des cofacteurs de type co-activateurs/co-répresseurs. Plusieurs travaux illustrent cette hypothèse. Par exemple, il a été montré que le facteur nucléaire NF- κ B p65 interagit directement avec hTERT dans une lignée humaine de myélomes multiples MM1. Le complexe NF- κ B p65-hTERT peut alors être transloqué dans le noyau après induction par le TNF α (Akiyama et al., 2003) et moduler l'expression génique. En outre, même si les auteurs observent la translocation de ce complexe au niveau nucléaire, aucune évidence concernant son recrutement au niveau du promoteur de gènes cibles n'a été démontrée. Seule une étude récente a montré un effet direct de la télomérase sur le promoteur de gènes cibles (Park et al., 2009).

Des travaux réalisés en 2000 ont montré que l'expression ectopique de hTERT permet à une lignée hTERT négative de cristallin de lapin de résister à l'apoptose induite par la camptothécine, un inhibiteur de topoisomérase I. Cette survie est associée à 1) une diminution de l'expression des gènes pro-apoptotique p53, Bcl-x_s et la caspase-3 ainsi qu'à 2) l'induction des proto-oncogène c-jun et c-fos et du gène anti-apoptotique Bcl-2 (Xiang et al., 2002). Des travaux plus récents de la même équipe ont montré que l'expression constitutive d'hTERT provoque une accélération de la croissance des cellules primaires ou non de cristallin humain télomérase négative (Xiang et al., 2002). Cette hyper-prolifération cellulaire est associée avec une diminution de l'expression de p53, de p21 et de GCIP (Grap2 cyclin-D interacting protein), un inhibiteur du complexe cyclines/Cdk (Cyclin-dependent kinase). La répression des protéines p21 et GCIP aboutit à l'hyper-phosphorylation de la protéine Rb. Sous forme phosphorylée Rb permet l'activation du facteur de transcription E2F qui va alors transactiver des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et donc favoriser la progression du cycle cellulaire. Enfin, l'inhibition de hTERT par un oligonucléotide rétablit une

croissance cellulaire normale et abolit les modifications d'expressions de p53, p21 et GCIP (Xiang et al., 2002).

Il apparaît clairement que les gènes tels que p53 ou p21 sont des cibles transcriptionnelles récurrentes d'hTERT. De façon intéressante, il convient de noter que ces deux régulateurs du cycle cellulaire sont capables de réprimer la transcription d'hTERT (Kanaya et al., 2000; Xu et al., 2000) ce qui suggère qu'un des effets extra-téломérique de la télomérase pourrait inclure sa propre régulation dans un système de boucle de rétrocontrôle. Ce concept est illustré par la présence de deux sites de fixation pour le facteur de transcription p53 au niveau de la région promotrice du gène codant hTERT (Kanaya et al., 2000). Il a été démontré par des expériences de gènes rapporteurs que la surexpression de p53 et sa fixation sur le promoteur d'hTERT provoque la répression transcriptionnelle d'hTERT (Kanaya et al., 2000). Des travaux réalisés en 2007 par Lai *et al.*, confirme la thèse du rétrocontrôle d'hTERT. En effet, la répression d'hTERT dans des cellules HEK293 induit la transactivation des gènes p53 et p21 et conduit à un ralentissement de croissance des cellules. L'inhibition d'hTERT par ARN interférence dans les cellules de carcinomes mammaires MDA-MB-157 p53^{-/-}, induit une augmentation de la transcription de p21 et une diminution de la prolifération (Lai et al., 2007). En revanche, dans des lignées de carcinomes ovariens p53 et p16^{INK4a} déficientes, l'inhibition d'hTERT réprime l'expression de p21 sans altérer la croissance cellulaire. Ces travaux suggèrent qu'hTERT peut réguler des facteurs de transcription (p53 et p21) qui sont impliqués dans sa propre régulation. Ils démontrent également qu'hTERT peut réguler l'expression de p21 indépendamment de p53.

Il existe également une autre boucle de contrôle entre hTERT et son gène cible *Myc*. En effet, hTERT est une cible transcriptionnelle direct de c-Myc (Wu et al., 1999). L'expression ectopique de c-Myc dans des cellules épithéliales mammaires humaines (HMECs) et les fibroblastes primaires, active l'expression d'hTERT (Wang et al., 1998). Inversement, l'immortalisation des cellules HMECs par l'introduction d'hTERT conduit à l'augmentation de l'expression de l'oncoprotéine c-Myc (Wang et al., 2000).

Ces derniers résultats suggèrent que ces boucles de contrôles entre hTERT et ses gènes cibles, contribuent à renforcer l'hypothèse d'un effet télomères-indépendant de la télomérase dans la carcinogenèse et l'immortalisation.

3.5.2 TERT dans la régulation épigénétique

Des modifications de la chromatine peuvent avoir d'importantes répercussions sur l'expression génique. En effet, une méthylation altérée peut conduire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et à un processus de tumorigenèse comparable à celui induit par les mutations génétiques. Quelques études ont suggéré un rôle important de l'enzyme dans la régulation épigénétique et dans la modulation de l'architecture chromatinienne. Par exemple, des expériences de gènes rapporteurs ont montré qu'hTERT est capable de stimuler la transcription du gène codant pour la DNMT1 (DNA Methyl Transferase) (Young et al., 2003). Il en résulte que l'induction de l'expression de cette ADN méthyltransférase provoque la répression transcriptionnelle de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 ce qui *in fine* entraîne la transition G1/S et la progression irrémédiable du cycle cellulaire (Young et al., 2003). L'effet d'hTERT sur la méthylation a également été vérifié par d'autres auteurs. En 2005, Masutomi et al., montre que la suppression prolongée d'hTERT par ARN interférence dans des fibroblastes normaux, module le profil de méthylation et d'acétylation de certains résidus lysines des histones H3 et H4 et modifie la structure globale de la chromatine des cellules qui deviennent alors plus sensibles aux dommages à l'ADN (Masutomi et al., 2005). A l'inverse, l'expression ectopique d'hTERT dans des cellules épithéliales de prostate est associée à l'hyperméthylation du gène suppresseur de tumeurs RASSF1A (Liu et al., 2005). Ce gène code une protéine pro-apoptotique, inhibitrice de la transition G1/S du cycle cellulaire qui est fréquemment inactivée par hyperméthylation de son promoteur dans les cancers humains (Dammann et al., 2000).

Quant à hTR, sa répression dans des carcinomes du colon HCT116 entraîne une inhibition de croissance résultant d'une modification du profil d'expression génique. Parmi les gènes régulés par hTR on peut citer le gène de la prolifération cycline G2 et cdc27, l'oncogène Met et le gène codant pour l'intégrine αV , une protéine de l'adhésion nécessaire à la dissémination des métastase.

3.5.3 TERT dans la voie de signalisation Wnt/Béta-caténine

En 2009, des travaux ont démontré que la télomérase module directement l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt/beta-caténine en servant de co-facteur au complexe transcriptionnel TCF/ beta-caténine. En effet, hTERT est capable d'interagir avec BRG1, une protéine de la famille SWI/SNF impliquée dans le remodelage de la chromatine,

pour transactiver les gènes cibles de Wnt. Des expériences de ChIP ont montré que la protéine mTERT endogène se fixe sur le promoteur de gènes régulés par la voie Wnt/beta-catenine (Park et al., 2009). Les résultats de ces expériences ont permis de montrer que TERT exerce un rôle de modulateur transcriptionnelle de la voie de signalisation Wnt/beta-catenine.

Une analyse à grande échelle des gènes régulés par hTERT a été réalisée par la même équipe un an plus tôt, chez la souris au moyen de puces d'expression (Choi et al., 2008). Les auteurs ont mis en place chez la souris un système d'expression inductible d'hTERT sous le contrôle du promoteur de la kératine-5 (iK5-hTERT) permettant ainsi une expression conditionnelle de la protéine au niveau du follicule pileux. Les résultats des puces d'expression réalisées à partir de biopsies de souris hTERT-on et hTERT-off ont permis d'identifier 673 gènes différentiellement exprimés lors de la surexpression ou de la répression d'hTERT. Parmi ces gènes régulés par hTERT, on trouve des gènes de la voie Wnt/béta-caténine mais également d'autres gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que la transduction du signal, l'adhésion ou la morphogénèse. Pour mieux cerner les voies de signalisation dans lesquelles hTERT est impliquée, les auteurs ont développé un système d'algorithme permettant une analyse statistique comparative entre les gènes régulés par TERT dans leur étude et celle de la littérature. Le résultat de cette analyse à large échelle a montré que TERT exerce un contrôle transcriptionnel de certains gènes, qui sont eux même des cibles transcriptionnelles de Myc et de la voie de signalisation Wnt-béta-caténine (Choi et al., 2008).

3.5.4 TERT interagit avec des protéines de la voie de signalisation apoptose/survie

a. hTERT et apoptose p53-dépendante

De façon générale, le raccourcissement des télomères jusqu'à une taille critique entraîne une réponse de type dommage à l'ADN p53 dépendante provoquant la transactivation de p21 et l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose des cellules. Ce mécanisme télomère-dépendant, n'est pas la seule interprétation pour expliquer l'apoptose p53-dépendante.

Une étude réalisée par Rahman et al., en 2005 a montré qu'hTERT antagonise l'apoptose induite par p53 indépendamment de son activité télomérase. Dans cette étude, les auteurs ont transfecté des cellules de carcinome de colon ou de lymphome de Burkitt, p53 positive, avec des vecteurs codant soit la forme sauvage d'hTERT soit une forme mutée, hTERT-DN, dépourvue d'activité télomérase et incapable de maintenir la taille des télomères *in vivo* et *in vitro*. L'expression constitutive d'hTERT ou du mutant catalytique inactif hTERT-DN, inhibe l'apoptose induite par p53 en réponse aux dommages à l'ADN provoqués par la mitomycine C ou le 5-Fluorouracil. Dans les cellules de carcinome colique p53^{-/-}, le traitement des cellules par la mitomycine C induit une apoptose plus faible que dans les p53^{+/+} (Rahman et al., 2005). De plus, les auteurs montrent également que le traitement à la mitomycine C induit une diminution de la protéine hTERT endogène et une augmentation de p53 dans les cellules p53 sauvage (mais pas dans les cellules p53^{-/-}).

D'autres équipes ont également montré que la surexpression d'hTERT est suffisante pour bloquer l'apoptose p53 dépendante (Lee et al., 2005; Xiang et al., 2002). Dans les travaux de Lee et al., l'expression ectopique de la forme sauvage de mTERT protège les cellules embryonnaires de souris de la mort cellulaire induite par le stress oxydatif et par 2 agents génotoxiques. A l'inverse, l'hyper-expression d'un mutant catalytique inactif dans ces mêmes conditions ne permet une telle protection (contrairement aux travaux de Rahman en 2005). L'introduction de mTERT dans les cellules ES déplétées de p53 ne confère pas de résistance à l'apoptose induite par le cisplatine (Lee et al., 2005). Ces résultats indiquent que l'activité catalytique de TERT serait nécessaire pour sa fonction anti-apoptotique, en accord avec les résultats de Zhang et al., (Zhang et al., 2003) dans les cellules Hela. En revanche, Cao et al. ont démontré, dans des cellules de cancers du sein, qu'hTERT protège de l'apoptose par un mécanisme qui ne requiert pas son activité enzymatique (Cao et al., 2002). Devant ces contradictions, la présence de l'activité télomérase pour la fonction anti-apoptotique de TERT pourrait être intimement liée au type cellulaire utilisé.

L'expression ectopique de TERT dans des fibroblastes foetaux spontanément immortalisés engendre une prolifération et une diminution de l'apoptose p53 dépendante induite par la doxorubicine (Jin et al., 2010). Cette protection vis-à-vis de la mort cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN est une conséquence de l'induction de l'expression du bFGF et de l'inactivation de p53, engendrée par la surexpression de hTERT. La déplétion de TERT

par RNAi, induit une diminution de l'expression du FGFb, la phosphorylation de p53 et la transactivation de p21 et puma en réponse à l'augmentation de la sensibilité des cellules aux dommages de l'ADN provoqués par la doxorubicine. D'autre part, l'expression forcée ou la déplétion de FGFb provoque les mêmes effets cellulaires que ceux initiés par l'expression ectopique ou la déplétion d'hTERT. Enfin, il semblerait que l'expression ectopique d'un mutant catalytique inactif de TERT n'empêche pas l'induction de l'expression du FGFb, ce qui suggère que l'activité télomérase n'est pas requise pour la fonction d'hTERT dans la survie cellulaire (Jin et al., 2010). Cette étude montre donc que TERT semble exercer sa fonction anti-apoptotique indépendamment de sa fonction d'élongation des télomères via l'induction de certains facteurs de croissance tels que le FGFb et l'inactivation en aval de p53. Il est possible que l'effet anti-apoptotique du FGFb soit lié à sa capacité à induire la phosphorylation de MDM2, le principal régulateur inhibiteur de p53. La phosphorylation activatrice de MDM2 serait à l'origine de l'inactivation de p53 (Romanov et al., 2005) et de la survie des fibroblastes dans ce contexte. Ces derniers résultats ainsi que ceux d'autres études suggèrent que la fonction anti-apoptotique de la télomérase télomère-indépendante s'exercerait à un stade précoce du processus apoptotique. En effet, la contribution de la télomérase dans a été observée dans des étapes précédant l'altération de la mitochondrie et l'activation de la caspase-3 (Fu et al., 2000), avant même le relargage du cytochrome C et de la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) de la mitochondrie (Zhang et al., 2003).

b. hTERT et apoptose p53 indépendante

Plusieurs études ont démontré un « crosstalk » privilégié entre hTERT et p53 (Cao et al., 2002; Rahman et al., 2005). Néanmoins, selon le contexte, les mécanismes à l'origine de la sensibilisation des cellules à l'apoptose induit par l'inhibition d'hTERT montre que la protéine p53 n'est pas toujours requise.

L'inhibition de la télomérase par la surexpression d'un mutant ou d'un shRNA cible de hTR dans des cellules télomérase positive, entraîne un arrêt de la croissance et une apoptose des cellules sans raccourcissement des télomères (Li et al., 2004). Dans cette étude, l'apoptose induite par l'inhibition de la télomérase est indépendante de la taille des télomères et du statut de p53, puisque la mort par apoptose s'observe aussi bien dans des cellules qui ont une p53 mutée que dans celles qui possèdent une p53 active (Li et al., 2004). Des travaux réalisés par plusieurs équipes montrent que la présence d'une mutation de p53, son

inactivation transcriptionnelle par des produits chimiques ou son inactivation bi-allélique dans des carcinomes du colon HTC116 (HTC116 p53^{-/-}) n'empêche pas l'apoptose induite par la répression d'hTERT en présence ou non d'agents cytotoxiques (Folini et al., 2005; Massard et al., 2006). Selon le même schéma, la surexpression d'hTERT bloque l'apoptose induite par un inhibiteur synthétique de Bcl-2, à la fois dans les HTC116 p53^{-/-} et les HTC116 p53^{+/+} (Del Bufalo et al., 2005). Il apparaît clairement dans cette étude qu'hTERT est impliquée dans la voie mitochondriale du processus apoptotique puisque la surexpression de la forme sauvage, du mutant hTERT-HA, ou du mutant catalytique inactif hTERT-DN protège les cellules du dysfonctionnement mitochondrial observé lors de l'apoptose induite par la répression de Bcl-2 (Del Bufalo et al., 2005). Il semblerait donc que cette fonction anti-apoptotique d'hTERT 1) soit indépendante de sa fonction reverse transcriptase et du statut cellulaire de p53 et 2) qu'elle implique la signalisation apoptotique mitochondriale. Cette étude confirme les travaux précédents, suggérant qu'hTERT serait impliqué dans une étape précoce et pré-mitochondriale du processus apoptotique (Zhang et al., 2003).

Dans les travaux de Massard et al, hTERT agirait là aussi plutôt comme un inhibiteur de la voie intrinsèque que extrinsèque du processus apoptotique. En effet, le traitement des cellules HeLa par des ligands spécifiques de la voie des récepteurs de mort tels que FasL ne provoquent pas la mort dans les cellules HeLa, contrairement aux espèces réactives de l'oxygène ou aux agents induisant des lésions de l'ADN connus pour activer la voie mitochondriale. De plus, il s'avère que contrairement à p53, la protéine Bax serait impliquée dans la mort cellulaire observée puisque que l'inactivation de Bax prévient la mort cellulaire induite par la répression d'hTERT en présence d'agents chimiothérapeutiques (Massard et al., 2006). Ces résultats semblent indiquer que dans ce modèle cellulaire, hTERT inhibe la voie mitochondriale Bax-dépendant et p53 indépendant du processus apoptotique.

L'ensemble de ces résultats suggère que selon les agents inducteurs d'apoptose, le contexte d'étude et les modèles cellulaires, la télomérase exercerait sa fonction anti-apoptotique télomère- indépendante via la voie de signalisation p53 dépendante ou indépendante.

3.5.5 La localisation d'hTERT est-elle un argument en faveur de sa fonction anti-apoptotique ?

Des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules de cancers du sein PMC42, ont mis en évidence l'existence d'une interaction entre les protéines hTERT, p53 et PARP. D'après les auteurs, dans certaines conditions cette interaction protéique pourrait permettre la réparation des dommages à l'ADN et donc favoriser la survie des cellules (Cao et al., 2002). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'en réponse à des dommages de l'ADN, la production de poly(ADP-ribose) par PARP pourrait masquer le signal d'export nucléaire (NES) d'hTERT favorisant ainsi sa séquestration dans le noyau pour permettre une protection de l'ADN génomique. Des expérimentations sont nécessaires pour conforter cette hypothèse, néanmoins il apparaît de plus en plus évident que la localisation d'hTERT joue un rôle important pour ses fonctions télomérique et extra-télomérique. En effet, hTERT pourrait exercer sa fonction anti-apoptotique dans le noyau mais également au niveau de la mitochondrie.

La mitochondrie est un organe important pour la cellule puisque c'est elle qui produit une forme d'énergie utilisable par la cellule, l'ATP, issu du catabolisme oxydatif des molécules organiques. Elle est également la principale source de production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Réactives Oxygène Species) et en même temps la principale cible des dommages induits par ces ROS.

L'expression d'hTERT est finement régulée par des facteurs de transcriptions « redox-sensitifs » tels que AP1, Sp1 ou encore NF- κ B (Akiyama et al., 2003; Fujimoto et al., 2000; Kyo et al., 2000). La modulation de l'expression d'hTERT par ces facteurs transcriptionnels suggère que la télomérase serait soumise à une régulation plus ou moins directe par le métabolisme des ROS. L'activité télomérase peut également être régulée par le stress oxydatif *in vivo* et il a été démontré que le stress oxydant exerce également une régulation de la localisation subcellulaire de la télomérase ce qui pourrait avoir un impact sur certaines de ses fonctions notamment sur sa fonction anti-apoptotique. En revanche, jusqu'à aujourd'hui aucune étude n'a pu réellement démontrer de lien direct entre la localisation extra nucléaire de la télomérase et sa fonction anti-apoptotique.

Récemment plusieurs auteurs ont démontré qu'hTERT peut être transloquée en dehors du noyau, au niveau de la mitochondrie en réponse à un stress oxydatif (Ahmed et al., 2008; Haendeler et al., 2009; Haendeler et al., 2003a; Haendeler et al., 2004; Massard et al., 2006; Santos et al., 2004; Santos et al., 2006). La translocation de la protéine hTERT à travers les compartiments cellulaires est possible du fait de la présence de séquences signales de localisation/Export nucléaire (NLS/NES) et nucléolaire (NoLS). Récemment, une analyse *in silico* de la séquence peptidique d'hTERT a révélé l'existence d'une séquence spécifique de localisation à la mitochondrie, conservée uniquement chez les eucaryotes supérieurs (Santos et al., 2004). La translocation d'hTERT du noyau vers la mitochondrie a été observée dans des modèles de surexpression mais aussi avec la protéine endogène (Haendeler et al., 2004) ce qui suggère que ce phénomène de transport n'est pas un artéfact lié à l'expression ectopique d'hTERT. En revanche, le manque de spécificité d'anticorps dirigés contre hTERT et sa faible expression dans les cellules rend la localisation de la protéine endogène difficile à déterminer malgré tout.

Une étude soumise à controverse a révélé que la translocation mitochondriale d'hTERT sensibiliserait les cellules aux dommages de l'ADNmt (ADN mitochondriale) et à l'apoptose induite par le stress oxydatif (Santos et al., 2003; Santos et al., 2004). En effet, ce rôle pro-apoptotique de la télomérase proposé par Santos *et al.*, mais aussi Haendeler *et al.*, (Haendeler et al., 2004; Santos et al., 2003; Santos et al., 2004) contraste avec la majorité des études proposant que la télomérase exerce une fonction plutôt anti-apoptotique. En dehors de cette controverse, l'équipe de Santos a identifié une séquence polypeptidique conservée au niveau de la partie amino-terminale de la protéine qui lui permettrait de transloquer vers la mitochondrie. L'étude fonctionnelle en immunofluorescence de cette séquence signal par la transfection d'un vecteur codant ce polypeptide d'adressage fusionné avec la GFP a permis de valider leur approche *in silico*.

L'hyper-expression d'hTERT protège l'ADNmt des dommages induits par les UVs, le bromure d'éthidium (Haendeler et al., 2009) ainsi que par une hyperoxie ou un traitement par le peroxyde d'hydrogène (Ahmed et al., 2008). Cet effet protecteur en réponse au stress oxydatif, se produit suite à une translocation mitochondriale rapide, d'environ 80% de la télomérase cellulaire (Ahmed et al., 2008). D'après les auteurs, la quantité de télomérase nucléaire résiduelle serait insuffisante pour maintenir la longueur des télomères, ce qui expliquerait le raccourcissement télomérique observé malgré l'expression ectopique d'hTERT dans cette lignée (Ahmed et al., 2008). Le retour en condition de normoxie annulerait l'export

de la télomérase en dehors du noyau et permet le rallongement des télomères ainsi qu'une reprise de la croissance cellulaire.

Suite à la fixation d'hTERT sur l'ADNmt, les auteurs constatent une réduction de la production de ROS par la mitochondrie (Ahmed et al., 2008; Haendeler et al., 2009) alors que l'inhibition de TERT par ARN interférence, au contraire augmente la production de ROS en réponse aux dommages dans des cellules endothéliales et HEK293 (Ahmed et al., 2008; Haendeler et al., 2009). De la même façon, une mutation dans le NES d'hTERT permettant l'expression d'une protéine incapable d'être exportée en dehors du noyau, n'entraîne pas de diminution de la production de ROS ni de protection vis-à-vis des dommages de l'ADN contrairement à la protéine sauvage (Kovalenko et al., 2010a; Kovalenko et al., 2010b).

D'autre part, l'effet protecteur de hTERT semble plus efficace avec l'expression ectopique d'une forme d'hTERT adressée à la mitochondrie (mito-hTERT) qu'avec une forme sauvage (Haendeler et al., 2009). L'effet protecteur de TERT a également été confirmé chez des souris $TERT^{-/-}$. Les fibroblastes de souris $TERT^{-/-}$ sont plus sensibles aux dommages induits par les UVB et montrent une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Enfin, il semblerait que le domaine reverse transcriptase de hTERT soit requise pour l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Haendeler et al., 2009).

L'export nucléaire de la télomérase et sa translocation vers la mitochondrie pourrait constituer un mécanisme de protection vis-à-vis des dommages de l'ADNmt dans des conditions de stress oxydatif alors que dans des conditions normales, la télomérase résiderait préférentiellement dans le noyau pour exercer sa fonction télomère-dépendante. On peut donc imaginer une délocalisation de l'effet protecteur de la télomérase d'un compartiment cellulaire à un autre. De plus, la localisation extra-nucléaire d'hTERT pourrait également constituer un autre mécanisme de régulation de l'activité télomérase. En effet, on peut imaginer que la localisation cytoplasmique de TERT limiterait dans certaines conditions la quantité de télomérase fonctionnelle au niveau nucléaire. L'existence d'environ 20 à 40% de télomérase en dehors du noyau (Ahmed et al., 2008; Haendeler et al., 2009) dans des conditions basales, suggère une co-existence des fonctions nucléaires et mitochondriales de la télomérase.

La localisation de TERT apparaît donc être un argument important pour sa fonction anti-apoptotique. Une mutation dans le signal d'export nucléaire NES de TERT, entraîne une rétention nucléaire de la protéine sans altérer le niveau d'activité télomérase des cellules (Kovalenko et al., 2010a; Kovalenko et al., 2010b). En revanche, la surexpression de ce mutant dans des lignées tumorales de la peau et de la prostate, provoque un arrêt du cycle cellulaire, un changement morphologique, une apoptose en réponse au stress génotoxique (Kovalenko et al., 2010a; Kovalenko et al., 2010b) ainsi que la sénescence prématurée des fibroblastes normaux (Kovalenko et al., 2010a). Cette rétention d'hTERT dans le noyau entraîne une augmentation de la production mitochondriale de ROS ainsi que des dommages de l'ADN mt et nucléaire (Kovalenko et al., 2010a; Kovalenko et al., 2010b). Ces résultats indiquent que la rétention d'hTERT au niveau nucléaire pourrait empêcher la télomérase de protéger la mitochondrie.

Bien qu'il soit difficile de dire par quel mécanisme exact hTERT protège les cellules des dommages de l'ADNmt lors du stress oxydatif, l'ensemble des études suggèrent qu'hTERT permet une protection vis-à-vis des ROS (Ahmed et al., 2008; Del Bufalo et al., 2005; Massard et al., 2006), une activation des mécanismes de réparation de l'ADNmt, le maintien d'un haut potentiel membranaire (Ahmed et al., 2008), la fixation de TERT sur l'ADNmt au niveau des gènes ND1 et ND2 (NADH déshydrogénase 1 et 2 mitochondriale) (Haendeler et al., 2009) ou encore l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Haendeler et al., 2009). Ainsi, l'ensemble de ces travaux, montre que la fonction non canonique anti-apoptotique de la télomérase pourrait être reliée à sa localisation mitochondriale. Ces résultats soulignent également le rôle important de hTERT dans la diminution de la production des ROS intracellulaire et la protection de la mitochondrie en réponse aux stress oxydant.

3.5.6 TERT dans la réponse aux dommages de l'ADN

L'inhibition de TERT, entraîne une forte augmentation de dommages de l'ADN induit par des agents génotoxiques et provoque une mort cellulaire massive. A l'inverse, l'expression forcée d'hTERT protège les cellules de ces dommages et donc de l'apoptose induite par ces mêmes agents. Ces résultats suggèrent que la télomérase protège les cellules des lésions de l'ADN.

Plusieurs mécanismes hypothétiques ont été proposés pour expliquer la fonction anti-apoptotique de la télomérase en réponse aux dommages de l'ADN. La télomérase pourrait promouvoir la survie en supprimant les dommages ou en inhibant la signalisation induite par ces dommages (Holt et al., 1999b). Elle pourrait également accélérer la cinétique de réparation et même « réparer » certaines lésions intrachromosomiques par l'addition de courtes séquences télomérique appelées ITS (Interstitial Telomeric Sequences)

a. hTERT et les protéines de la réparation de l'ADN

L'hypothèse d'un rôle de la télomérase dans la protection de l'ADN vis-à-vis des dommages a été évoquée par plusieurs équipes. En effet, l'observation d'un lien très étroit entre hTERT, les télomères et les protéines de la réparation des dommages de l'ADN, suggère qu'hTERT serait impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN.

hTERT ainsi que les télomères sont associés aux protéines de la réparation de l'ADN, tel que le complexe MRN (MRE11/Rad50/NBS1) du mécanisme de la recombinaison homologue, les protéines Ku et DNA PKs de la Jonction d'Extrémités Non-Homologues (NHEJ) ainsi que le complexe XPC/ERCC1 du mécanisme de réparation par excision de nucléotide (de Lange, 2005; Meier et al., 2007; Sharma et al., 2003; Verdun and Karlseder, 2006). La protéine Ku70/80 interagit avec hTERT (Chai et al., 2002) et serait également une cible transcriptionnelle de hTERT (Sharma et al., 2003). L'expression d'autres protéines intervenant dans les voies de réparation de l'ADN, dont MSH6 et MLH1 du système de réparation des mésappariements, XRCC4 et 9 pour le NHEJ ou Rad51 pour la recombinaison homologue est également augmentée par l'expression ectopique d'hTERT (Sharma et al., 2003). D'autre part, hTERT serait également capable d'interagir avec la primase, une enzyme de la réplication de l'ADN (Ray et al., 2002). Enfin, il semblerait que l'expression ectopique de TERT dans les fibroblastes primaire normaux diminue le nombre des dommages chromosomiques spontanés et accélère la cinétique de réparation de l'ADN (Sharma et al., 2003; Shin et al., 2004).

b. La télomérase « cicatrise » les chromosomes

La télomérase aurait un rôle additionnel de « cicatrization chromosomique » en réponse aux cassures de l'ADN. En effet, des études réalisées chez la levure (Kramer and Haber, 1993; Stellwagen et al., 2003), ainsi que chez les mammifères (Flint et al., 1994; Sprung et al.,

1999) ont montré que les cassures intrachromosomiques (donc en dehors des télomères) sont occasionnellement réparées par l'addition d'ADN télomérique par la télomérase. Il a été démontré que l'addition de répétitions TTAGGG intrachromosomiques par la télomérase est possible même s'il existe peu de complémentarité entre la séquence de l'ARN matrice de l'enzyme et celle de l'ADN du site de cassure (Harrington and Greider, 1991). Du fait que les cassures chromosomiques sont susceptibles d'entraîner un arrêt du cycle cellulaire et même la mort des cellules, la présence dans le génome humain de plus d'une centaine de séquences télomérique intrachromosomique ou ITS (Interstitial Telomeric Sequences) pourrait donc constituer un mécanisme permettant la prolifération et la survie des cellules ayant subi des cassures de l'ADN. Néanmoins, le processus d'insertion de ces ITS par la télomérase n'a jamais été observé *in vivo*. De plus, ce phénomène de « cicatrisation » chromosomique est beaucoup moins fréquent que les autres mécanismes de réparation des cassures double-brins et pourrait même être activement réprimé. En effet, des études chez la levure ont révélé que l'inhibition de la télomérase constitue une des réponses cellulaires vis-à-vis des cassures double-brins. Afin de prévenir une réparation aberrante due à l'insertion d'ITS de façon inappropriée aux niveaux des cassures de l'ADN, la télomérase serait inhibée et ne pourrait pas interférer avec les mécanismes de réparation (Makovets and Blackburn, 2009). Enfin, la localisation transitoire de la protéine télomérique TRF2 au niveau de ces cassures (Bradshaw et al., 2005) ainsi que la présence d'un fragment de mTR rétrotranscrit et inséré en même temps que les ITS (Nergadze et al., 2007) renforce également l'hypothèse de la présence de la télomérase au niveau des cassures intrachromosomiques et de sa fonction de « cicatrisation ».

c. hTERT et la réponse aux dommages de l'ADN

Lorsque des lésions se produisent au niveau de l'ADN, l'extrémité C-terminale du variant d'histone H2AX flanquant le dommage est rapidement phosphorylée par la kinase ATM pour « signaler » la région endommagée. La présence de ces histones phosphorylées entraînerait des modifications locales de la chromatine et favoriserait l'accumulation de protéines de la réparation sur la région lésée.

Dans des fibroblastes, l'inhibition d'hTERT par ARNi ou par l'expression d'un mutant catalytique inactif de hTERT empêche la phosphorylation d'ATM et d'H2AX (mais aussi BRCA1) et inhibe l'expression de p53 en réponse à l'irradiation. Dans ces fibroblastes irradiés, la perte de hTERT bloque la signalisation des dommages de l'ADN. En revanche, la

réexpression d'hTERT sauvage ou de mutants du DAT possédant une activité télomérase partielle mais incapables d'allonger les télomères, restaure la phosphorylation de H2AX et la stabilisation de p53 en réponse aux cassures doubles brins. Au cours de ces expérimentations, aucune modification de la taille des télomères n'a été observée. Ces résultats suggèrent que hTERT régule la signalisation des dommages de l'ADN et que son rôle est indépendant de sa fonction d'élongation des télomères.

D'autre part, dans cette même étude, l'inhibition de hTERT entraîne des modifications post-traductionnelles des histones et altère la structure globale de la chromatine (Masutomi et al., 2005). Dans les travaux de Sharma, l'expression ectopique de TERT diminue la proportion de télomères attachés à la matrice nucléaire (Sharma et al., 2003). Ce détachement de la chromatine télomérique pourrait induire l'expression de gènes clés de la réparation des dommages de l'ADN (cf Chapitre I, 3.5.6.a) mais également moduler ceux impliqués dans les modifications de la chromatine. hTERT pourrait donc agir de façon indirecte pour promouvoir la réparation des zones endommagées.

L'ensemble de ces études ont démontré que la perte d'hTERT inhibe les réponses aux dommages de l'ADN et occasionne des altérations de la chromatine (Masutomi et al., 2005). A l'inverse, l'expression d'hTERT protégerait les cellules vis-à-vis de ces dommages en augmentant la cinétique de réparation des lésions, en diminuant l'apparition de dommages spontanés (Sharma et al., 2003), en favorisant la « cicatrisation » chromosomique et en stimulant l'expression des protéines de la réparation (Sharma et al., 2003). Néanmoins, aucune interaction directe entre hTERT et le promoteur de gènes cibles de la réparation n'a été observé. Ces résultats suggèrent qu'hTERT pourrait agir indirectement notamment *via* des modifications de la chromatine.

Chapitre II : Les neuroblastomes

A. Généralités

Le neuroblastome est une tumeur embryonnaire maligne se développant à partir des cellules de la crête neurale primordiale qui forment le système nerveux sympathique. La localisation clinique est extrêmement variable (*Figure 14*), puisque ces tumeurs extra-crâniennes peuvent se développer en tout point du système nerveux où existent des structures ganglionnaires sympathiques, c'est-à-dire, aussi bien dans l'abdomen (70% des cas), principalement au niveau de la glande surrénale, qu'au niveau du cou, du thorax et du pelvis (Maris and Matthay, 1999).

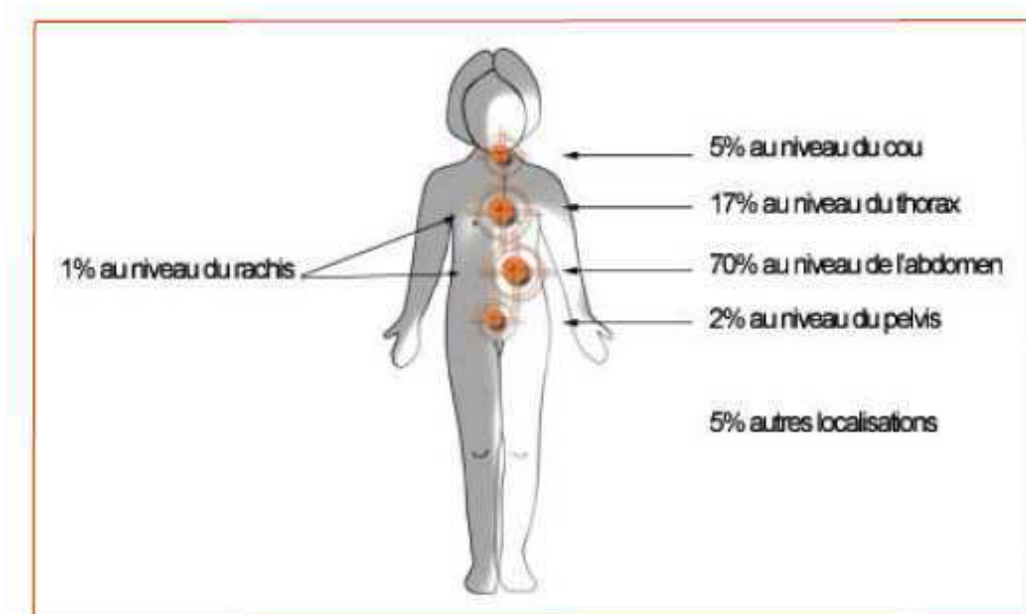


Figure 14 : Localisation des neuroblastomes.

D'un point de vue épidémiologique, le neuroblastome est la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente parmi les cancers pédiatriques (Gurney et al., 1997). Elle représente environ 10 % des affections malignes pédiatriques et serait responsable de 15% des décès par cancer chez l'enfant (Gurney et al., 1997). La prévalence est de 1 cas pour 7000 naissances. L'âge médian au moment du diagnostic est de 18 mois (London et al., 2005) et dans 90 % des cas, il est diagnostiqué avant l'âge de 5 ans. Environ 60 % des neuroblastomes sont métastatiques au moment du diagnostic et la présence de métastases dans les stades 4 est

généralement associée à une progression rapide de la maladie et à un faible de taux de survie (30% de survie à 5ans) (Maris et al., 2007) malgré des traitements extrêmement lourds.

L'étiologie des neuroblastomes n'est pas connue. Aucun facteur environnemental ne semble être impliqué dans la maladie. Cependant, des exemples de neuroblastomes familiaux ont été rapportés dans 1 à 2 % des cas (Shojaei-Brosseau et al., 2004). Dans ces rares cas, la maladie se transmet sur un mode autosomique dominant avec une pénétrance incomplète. Des analyses génétiques traditionnelles ont permis d'identifier des mutations germinales du gène *Phox2b* (*pairedlike homeobox 2B*) dans certains cas familiaux de neuroblastomes et dans des pathologies souvent associées à ces tumeurs, tel que la maladie de Hirschsprung ou le syndrome d'Ondine (Mosse et al., 2004; Trochet et al., 2004). Plus récemment, des amplifications du gène *Alk* ainsi que des mutations germinales entraînant l'apparition d'une activité tyrosine kinase constitutive de ce récepteur ont également été retrouvé dans des cas familiaux de neuroblastomes (Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008).

B. Aspects cliniques, biologiques et cytogénétiques des neuroblastomes

Les neuroblastomes sont des tumeurs très particulières par la diversité de leurs localisations mais aussi par leur grande hétérogénéité histologique et biologique. Cette hétérogénéité tumorale est à l'origine d'un spectre de potentialité évolutive clinique s'étendant de la régression spontanée ou la maturation en ganglioneurome, à la rechute malgré l'association des thérapeutiques les plus intensives.

1. Hétérogénéité clinique et histologique

1.1. Hétérogénéité clinique

1.1.1 Classification des neuroblastomes.

L'extension de la tumeur a une valeur pronostique majeure et permet d'orienter la prise en charge thérapeutique. La classification utilisée encore aujourd'hui est celle de l'International Neuroblastoma Staging System (INSS) dérivée de la classification d'Evans, (Evans et al., 1971) et décrite tableau 2. Cette classification prend en compte l'extension tumorale locorégionale et générale (métastases) et décrit 4 stades de la maladie et un stade particulier le stade 4S.

Stades	Caractéristiques anatomiques et histologiques
1	Tumeur localisée. Ablation complète
2A	Tumeur unilatérale. Ablation incomplète. Ganglion lymphatique homolatéral et controlatéral non envahi
2B	Tumeur unilatérale avec ablation complète ou incomplète. Ganglion lymphatique homolatéral envahi, ganglion controlatéral non envahi
3	Tumeur unilatérale, non extirpable, traversant la ligne médiane*. Ganglions régionaux envahis ou non. ou Tumeur unilatérale avec ganglions controlatéraux envahis ou tumeur de la ligne médiane*, non extirpable avec envahissement des ganglions des deux côtés. * <i>La ligne médiane est définie comme étant la colonne vertébrale</i>
4	Tumeur, avec métastases (à l'exception des éléments de la définition du stade 4S)
4S	Enfants de moins de 1an. Tumeur initiale localisée comme pour les stades 1 et 2, retirée totalement avec des métastases limitées au niveau du foie, de la peau et/ou la moelle osseuse (envahissement <10%) . Pas de métastases osseuses.

Tableau 2 : Classification des neuroblastomes selon l'International Neuroblastoma Staging System INSS (D'après Brodeur et al., J clin oncol 1993)

Bien que l'accord international sur la stratification des risques INSS soit toujours employé, cette classification présente l'inconvénient d'être post opératoire et donc d'être dépendante de l'approche thérapeutique de l'équipe soignante (Maris et al., 2007). Pour palier ce problème d'homogénéité, une nouvelle classification a donc été élaboré en 2008 par un consortium d'expert internationaux "l'International Neuroblastoma Risk Group » (INRG) (*Tableau 3*). Cette nouvelle classification, fait intervenir les facteurs pronostiques identifiés sur une cohorte 8800 patients européens, japonais et américains, enrôlés dans des études conduites entre 1990 et 2002. Cette classification INRG évalue la maladie au diagnostic avant tout traitement selon les critères suivant : l'extension tumorale locorégionale, la présence ou non de métastase et de facteurs de risque définis en imagerie (IDRFs) (*tableau 3*).

Stade	Description
L1	Tumeur locorégionale sans envahissement au voisinage. Pas d'IRDFs
L2	Tumeur locorégionale montrant des signes d'envahissement local et des IRDFs
M	Présence de métastases à distance. (exception du stade MS)
MS	Présence de métastases limitées à la peau, le foie, et/ou la moelle osseuse chez les enfants de moins de 18 mois. Scintigraphie MIBG négative sur le squelette.

Tableau 3 : Classification des neuroblastomes selon l' « International Neuroblastoma Risk Group »

La classification INRG permet également de définir trois groupes de patients en fonction des critères de risques, faible, intermédiaire et haut, avec respectivement 90 %, 70 à 90 % et 30 % de survie à 3 ans après le diagnostic (*Tableau 4*).

Stade INSS	Age	N-Myc	Histologie	Index ADN	Risque de récurrence
1	-	-	-	-	Faible
2A/2B	<1an	-	-	-	Faible
	>1an	Non Amp	-	NA	Faible
		NMA	Favorable	NA	Faible
		NMA	Défavorable	NA	Fort
3	<1an	Non Amp	-	-	Intermédiaire
		NMA	-	-	Fort
	>1an	Non Amp	Favorable	NA	Intermédiaire
		Non Amp	Défavorable	NA	Fort
		NMA	Tout	NA	Fort
4	<18mois	Non Amp	-	-	Intermédiaire
		NMA	-	-	Fort
	>18mois	-	-	NA	Fort
4S	<1an	Non Amp	Favorable	>1	Faible
		Non Amp	-	=1	Intermédiaire
		Non Amp	Défavorable	-	Intermédiaire
		NMA	-	-	Fort

Tableau 4 : Classification des risques IRGS (International Risk Group System).

NMA=N-Myc Amplifié ; Non Amp= pas d'amplification de N-Myc

NA=Non applicable

- = quelque soit l'âge, le statut de N-Myc, l'histologie et la ploïdie

Le pronostic clinique repose actuellement en France sur 3 critères : L'âge de l'enfant au moment du diagnostic (pronostic favorable pour les enfants de moins de 1 an y compris en présence de métastases vs enfant de plus de 1an), le stade *INSS* (le stade 4 étant le plus défavorable) et l'existence de marqueur biologique comme l'amplification de l'oncogène N-Myc.

1.1.2 Traitements et taux de survie

Le traitement des neuroblastomes associe de façon variable les différentes ressources utilisées en oncologie pédiatrique comme la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, la thérapie

cellulaire et les traitements différenciants. Le choix thérapeutique est lié à la classification des patients par groupe de risque et pondéré avec le risque toxique ou de séquelles.

- *Les neuroblastomes de pronostic très favorable*, comprennent les neuroblastomes de stade 1, 2 ou 4S sans amplification de N-Myc. Leur chance de guérison est supérieure à 80%. L'essentiel du traitement des stades localisés sans amplification de N-Myc (stade 1 et 2) repose sur le caractère opérable de la tumeur. Ces patients sont considérés comme ayant un risque faible et n'ont besoin que d'une prise en charge minimale consistant en une exérèse de la tumeur. Cependant, certaines tumeurs nécessitent une chimiothérapie après l'exérèse chirurgicale. Les neuroblastomes de stade 4S sans amplification de N-Myc ne requièrent de thérapeutique que lorsqu'il existe une progression tumorale ou une menace vitale pour le patient (Schleiermacher et al., 2003). La simple surveillance du patient permet dans la majorité des cas d'observer une régression spontanée de ces neuroblastomes 4S. Cette stratégie d'abstention thérapeutique pour ces stades 4S permet une survie globale de 86% à 5 ans (Nickerson et al., 2000).

- *Les neuroblastomes de pronostic intermédiaire*, comprennent les neuroblastomes de stade 4 de moins de 1 an et les stades 3, sans amplifications de N-Myc. Dans cette catégorie les chances de guérison sont de 60 à 80% et la stratégie thérapeutique est guidée par l'évolution clinique et anatomique. De façon générale, dans les neuroblastomes de stade 3 où la tumeur est inopérable, une chimiothérapie initiale est réalisée afin de réduire le volume tumorale pour si possible permettre l'exérèse de la tumeur. L'intensité de la chimiothérapie initiale dépend de l'âge de l'enfant et de l'existence de signes menaçants.

- *Les neuroblastomes de risque élevé*, comprennent les neuroblastomes métastatiques survenant après l'âge de 1 an quelque soient leur caractéristiques biologiques et les neuroblastomes avec amplification de l'oncogène N-Myc quelque soit le stade. En effet, l'identification d'une amplification de N-Myc dans les stades >1 conduit à traiter les patients selon un protocole de tumeur à haut risque. Ces protocoles font intervenir successivement une chimiothérapie d'induction intense pour permettre la rémission des métastases, une exérèse de la tumeur primitive associée à une radiothérapie et une consolidation par une chimiothérapie myéloablative, associée à une greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues. Enfin, un traitement différenciant de six cures d'acide rétinoïque est administré en entretien

(Matthay et al., 1999). Malgré ce traitement très lourd, le taux de survie de ces patients reste inférieur à 30% (Brodeur, 2003).

La majorité des neuroblastomes est chimiosensible et radiosensible et les taux de guérison sont relativement bons pour les formes localisées. En revanche, pour les formes de haut risque souvent chimiorésistantes, les progrès en terme de survie restent très insuffisants malgré l'indication de traitements extrêmement lourds. Il est donc essentiel de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques notamment pour ces neuroblastomes de pronostiques sombres.

1.2. Hétérogénéité histologique : le spectre de différenciation des tumeurs

Le diagnostic des neuroblastomes repose aussi sur l'analyse morphologique de la tumeur. En effet, des études récentes ont montré que les différences de comportement clinique pouvaient être liées à des caractéristiques morphologiques.

Cette analyse repose sur des critères morphologiques décrits et standardisés dans une classification INPC (International Neuroblastoma Pathologic Classification) largement inspirée des anciennes classifications de Shimada (Shimada et al., 1999). Cette classification utile au diagnostic, identifie 4 grandes catégories de tumeurs neuroblastiques, en tenant compte du spectre de différenciation ganglionnaire sympathique suivant l'importance des contingents neuroblastiques et Schwanniens.

Les 4 grandes catégories sont les suivantes :

- Les neuroblastomes : sont des tumeurs au stroma pauvre en cellules de Schwann, essentiellement composées de neuroblastes malins, avec peu ou pas de cellules de Schwann. Dans cette catégorie, des sous-types sont identifiés selon le degré de différenciation des neuroblastes.
- Les ganglioneuroblastomes mixtes : sont composés de neuroblastes différenciants organisés en multiples foyers microscopiques et d'un stroma riche en cellules de Schwann (plus de 50% de la totalité de la tumeur).
- Les ganglioneuroblastomes nodulaires qui, contrairement aux trois autres groupes, sont des tumeurs hétérogènes composées de plusieurs clones cellulaires distincts, formant des nodules uniques ou multiples de neuroblastes avec des zones à stroma riche et des zones à stroma pauvre en cellules de Schwann.

- Enfin, les ganglioneuromes sont des tumeurs où la composante neuroblastique est absente et le stroma Schwannien est largement prédominant avec quelques cellules ganglionnaires sympathiques complètement matures.

Associés à ces critères morphologiques, s'ajoutent les indices mitotiques et caryopycnotiques permettant au pathologiste d'établir un histo-pronostic.

2. Hétérogénéité génétique : Aspects moléculaires et génétiques

L'analyse moléculaire des neuroblastomes a permis, d'identifier un grand nombre de remaniements génomiques récurrents qui sous-tendent l'extrême variabilité évolutive de la maladie. Le neuroblastome est la première tumeur pour laquelle la connaissance des caractéristiques moléculaires a guidée la prise en charge thérapeutique. En effet, la découverte de l'amplification de l'oncogène *N-Myc* a conduit à traiter ces patients selon un protocole de tumeur à haut risque. D'autres altérations génétiques comme la ploïdie, les pertes/gains alléliques ou les modulations de l'expression de certains gènes ont été identifiées et permettent aujourd'hui de renseigner sur le pronostic vital, même si contrairement au statut de l'oncogène *N-Myc*, elles ne sont pas systématiquement prises en compte dans la décision thérapeutique.

2.1. Index ADN

Schématiquement, les neuroblastomes se répartissent en deux groupes en fonction de leur ploïdie. On distingue les tumeurs diploïdes/tétraploïdes (les deux niveaux de ploïdies co-existent dans la tumeur) et les tumeurs péri-ploïdes (ou hyperploïdes). L'analyse du contenu en ADN des neuroblastomes par cytométrie de flux, a montré que la fréquence des tumeurs péri-triploïdie représente 55% des neuroblastomes et semble être le résultat de gains de chromosomes entiers du fait de l'instabilité mitotique alors que dans les tumeurs diploïdes/tétraploïdes ont assiste plutôt à des réarrangements chromosomiques (délétions, gains, amplification génique).

L'hyper-ploïdie (triploïdie) est plus fréquemment observé chez les enfants de moins de un an et semble être associée à un pronostic favorable (Kaneko et al., 1987; Look et al., 1991). A l'inverse, les tumeurs diploïdes/tétraploïdes chez les patients de la même tranche

d'âge est associé à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie (Bowman et al., 1997). La ploïdie aurait donc une valeur pronostique, en revanche, elle perdrait de sa fiabilité chez les enfants de plus de 2 ans (Look et al., 1991) car au delà de cet âge il existe une augmentation de la fréquence d'une co-existence de gains chromosomique et de réarrangements.

2.2. Amplification du proto-oncogène N-Myc

L'amplification de l'oncogène N-Myc, situé sur le bras court du chromosome 2, en 2p24.1, est reconnue aujourd'hui comme le facteur pronostique majeur du neuroblastome et constitue le premier exemple d'un marqueur génique influençant directement le projet thérapeutique en oncologie pédiatrique. En effet, l'amplification de l'oncogène N-Myc est observée dans 20% à 25% des neuroblastomes (Schwab et al., 1983), sous forme de matériel génétique supplémentaire extra-chromosomique circulaire généralement très nombreux le « chromosome double-minute » (DM) ou sous forme intrachromosomique appelé HSR (Homogeneous Staining Region) (Corvi et al., 1994; Schwab et al., 1984). Les DMs et HSRs correspondent à de larges régions d'amplifications d'ADN génomique contenant jusqu'à plusieurs centaines de copies du gène (10 à 400 copies).

L'amplification de N-Myc (>10 copies/génome haploïde) est observée dans les tumeurs indifférenciées, disséminantes et très agressives (Brodeur et al., 1986; Brodeur et al., 1984; Hogarty, 2003; Nakagawara et al., 1988). Elle corrèle avec le stade avancé de la maladie (*Tableau 5*) et constitue un facteur de mauvais pronostic indépendant du stade, de l'âge et d'autres marqueurs biologiques. En effet, pour les tumeurs N-Myc amplifiées, le taux de survie sans événement à 3 ans est d'environ 10 % alors que ce même taux est au moins neuf fois supérieur pour les tumeurs simple copie (Schmidt et al., 2000) (*Figure 15*).

Plusieurs études ont permis de montrer que N-Myc est suffisant pour induire la transformation ou la progression tumorale. En effet, la surexpression de l'oncoprotéine N-Myc dans le neuroectoderme de souris transgéniques induit la formation de tumeurs neuroblastiques peu de temps après la naissance (Weiss et al., 1997) et l'utilisation in vivo d'un oligonucléotide antisens ciblant N-Myc dans des modèles murins transgénique N-Myc^{+/+} permet une réduction massive de l'incidence et du volume des tumeurs neuroblastiques (Burkhart et al., 2003). Ces études mettent donc en évidence l'implication de N-Myc dans le développement des neuroblastomes.

La protéine N-Myc est impliquée dans le développement et la progression des neuroblastomes car elle régule de nombreux processus liés à la tumorigenèse. En effet, N-Myc est un facteur de transcription qui exerce son effet oncogénique dominant en transactivant de très nombreux gènes cibles après dimérisation avec la protéine Max (MYC associated factor X) (Wenzel and Schwab, 1995). Parmi les gènes cibles de N-Myc on peut citer les gènes de la prolifération cellulaire E2F1 et p27 (Giannini et al., 2005; Woo et al., 2008), l'inhibiteur de la différenciation id2 (Lasorella et al., 2000) le gène suppresseur de tumeur p53 (Chen et al., 2010) et son régulateur négatif MDM2 (Slack et al., 2005) mais aussi hTERT (Mac et al., 2000). N-Myc favorise également l'angiogenèse et la dissémination en inhibant l'activine A et en stimulant l'expression de métalloprotéinases et de nm23H1 (Godfried et al., 2002; Noujaim et al., 2002) La conséquence est une capacité accrue des neuroblastes malins à proliférer et à disséminer.

De nombreux travaux mettent en évidence la régulation du cycle cellulaire par N-Myc. En effet, l'expression ectopique de N-Myc est capable d'induire l'entrée des cellules quiescentes en cycle, le raccourcissement de la phase G1 (Lutz et al., 1996) et un détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire. A l'inverse, son inhibition par des agents chimiques, des approches antisens ou par RNAi provoque un arrêt des cellules en phase G1 (Bell et al., 2006; Pession et al., 2004; Thiele et al., 1985; Wallick et al., 2005), une différenciation cellulaire par répression de la protéine id2 et une apoptose des cellules neuroblastiques (Bell et al., 2006; Kang et al., 2006; Nara et al., 2007; Woo et al., 2008).

L'amplification de N-Myc est un événement génétique acquis, clonal, limité à la tumeur et à ses métastases. En plus d'être associé à un pronostic défavorable (Seeger et al., 1985), N-Myc est également corrélé avec l'agressivité des tumeurs, le stade de la maladie (Brodeur et al., 1984) ainsi qu'avec la perte du bras court du chromosome 1 (LOH 1p) (Fong et al., 1989). Généralement, on observe un lien étroit entre le nombre de copies du gène N-Myc et les niveaux d'expression de la protéine correspondante (Seeger et al., 1988). En revanche, la surexpression de l'ARN ou de la protéine en l'absence d'amplification génique n'est pas clairement corrélée au pronostic de la maladie (Bordow et al., 1998; Cohn et al., 2000).

En dépit des effets de l'expression de N-Myc, les tumeurs neuroblastiques ont acquis des anomalies dans les voies de signalisations impliquant la croissance, la différenciation et la survie cellulaire ainsi que des aberrations chromosomique décrites plus loin telles que la perte en 1p, le gain en 17q et la di- ou tétraploïdie. En revanche, aujourd'hui le statut de N-Myc est le seul marqueur biologique utilisé dans la stratification du traitement des neuroblastomes.

Stade	Amplification de N-Myc	Survie à 3 ans
Ganglioneuromes	0/64 (0%)	100%
Stade 1 et 2	31/772 (4%)	90%
Stade 4S	15/190 (8%)	80%
Stade avancés (3 et 4)	612/1974 (31%)	30%
TOTAL	658/3000 (22%)	50%

Tableau 5 : Corrélation entre l'amplification de N-Myc et le stade dans les neuroblastomes. D'après Brodeur et al., (Brodeur, 2003)

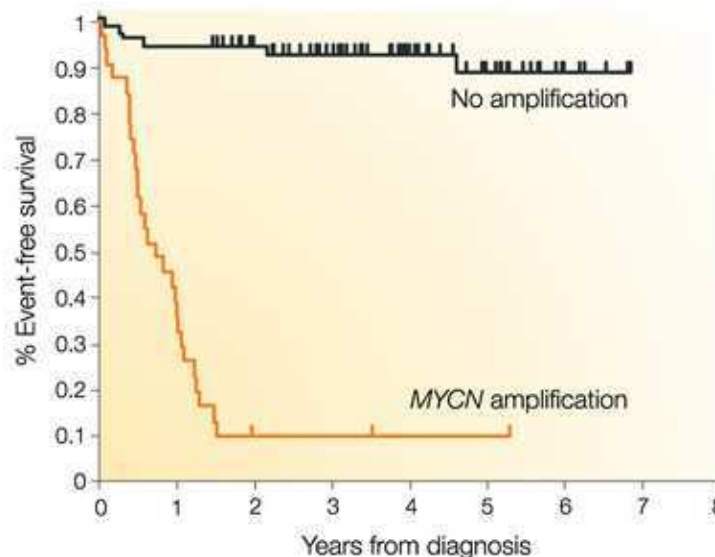


Figure 15 : Courbe de survie des enfants atteints de neuroblastomes métastatiques ayant une amplification de N-Myc versus ceux ne possédant pas d'amplifications. D'après Schmidt et al., (Schmidt et al., 2000).

2.3. Les gains et pertes de segments chromosomiques

2.3.1 Gain du 17q

Le gain d'un segment du bras long du chromosome 17 (17q) est une autre altération caryotypique fréquemment observée dans les neuroblastomes. La méthode de l'Hybridation Génomique Comparative (CGH) a permis d'observer que plus de 50% des neuroblastomes possèdent cette anomalie (Bown et al., 1999; Caron, 1995) y compris dans les tumeurs à caractère péri-triploïde. Il s'agit donc de l'altération génétique la plus fréquente dans les neuroblastomes (Plantaz et al., 1997).

Une incidence de 90% du gain du 17q est retrouvée chez les patients à haut risque (Kaneko Y, *Genes Chromosom. Cancer* 2000). En effet, un gain de 17q est plus fréquent dans les stades avancés de la maladie, dans les tumeurs des enfants de plus de un an et dans celles présentant une perte du 1p, une amplification de N-Myc et une di ou tétraploïdie (Westermann and Schwab, 2002). Les résultats d'une analyse multivariée issue de la collaboration de six centres européens ont suggéré que le gain du 17q est le marqueur pronostique vital le plus puissant devant la délétion du 1p et l'amplification de N-Myc (Bown et al., 1999). Ainsi le gain du 17q est associé aux neuroblastomes agressifs et est considéré comme un facteur pronostique défavorable indépendant.

La fréquente incidence de la translocation du 17q et son association à un mauvais pronostic suggère que cette région contient un ou plusieurs gènes important(s) pour la progression tumorale. Des études de transfert chromosomique réalisées par Bader et al., (Bader et al., 1991) ont montré que le transfert d'un chromosome 17 entier, dans la lignée de neuroblastome NGP possédant une translocation $t(6;17)(q27;q21)$ supprime la capacité de ces cellules à former des tumeurs. Plusieurs gènes candidats comme la survivine, une protéine anti-apoptotique dont le gène est localisé en 17q25 (Adida et al., 1998) ainsi que la protéine nm23-H1 (17q21-22) ont été proposées comme étant potentiellement responsables des effets du gain 17q sur la croissance tumorale.

2.3.2 Perte du 1p

L'altération du bras court du chromosome 1 (1p) constitue une anomalie fréquemment retrouvée dans les cancers. Dans les neuroblastomes, la perte du 1p est observée dans environ

35% des neuroblastomes (Fong et al., 1989; Maris et al., 2000; Takayama et al., 1992; Takita et al., 1995) et semble être plus fréquente (70 à 80%) dans le sous-type diploïde/tétraploïde que dans les péri-triploïdes (Brodeur, 1989; Brodeur and Fong, 1989). Deux grands types de délétions existent chez les patients et dans les lignées de neuroblastomes. D'une part les petites délétions distales dans une région minimale localisée en 1p36.2-1p36.3 et des délétions plus étendues avec une perte d'une région plus proximale. Les patients avec de large délétion 1p ont un plus mauvais pronostic que ceux ayant des petites délétions (Takeda et al., 1994).

D'autres études ont permis d'établir une corrélation entre la délétion du 1p avec un pronostic défavorable (Christiansen and Lampert, 1988; Hayashi et al., 1989). L'analyse du statut du 1p36 par PCR dans des neuroblastomes a montré une association de la perte d'hétérozygotie du 1p36 (LOH 1p36) avec des facteurs cliniques de mauvais pronostic (âge > 1an, stade avancé). En revanche l'analyse de la survie des patients est plus sujet à controverse (Fong et al., 1989; Fong et al., 1992; Maris et al., 1995; Martinsson et al., 1995). En effet, la LOH du 1p en combinaison avec l'amplification de N-Myc est associé avec la diminution de la survie globale alors que la LOH du 1p seule ne l'est pas (Gehring et al., 1995). Dans d'autres études en revanche la perte du 1p a été identifiée comme un puissant facteur de mauvais pronostic (Schleiermacher et al., 1996) and (Caron et al., 1996). Plus récemment, une analyse multivariée a démontré que la LOH du 1p36 est un facteur indépendant de la diminution de la survie sans événements mais pas de la survie globale. Malgré tout, seule l'amplification de N-Myc reste à ce jour le facteur pronostique le plus puissant.

Les analyses cytogénétiques dans les neuroblastomes ont permis de mettre en évidence que la délétion récurrente du 1p (1p36) engendre une perte d'un locus susceptible de contenir un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur. L'hypothèse de la perte d'un gène suppresseur de tumeur est née de l'observation que le transfert du 1p dans une lignée de neuroblastome (lignée NGP) supprime la tumorigenèse et induit la différenciation des cellules (Bader et al., 1991). Cependant, la complexité génomique du 1p rend difficile la recherche d'un gène candidat impliqué dans la cancérogenèse des neuroblastomes. Plusieurs gènes suppresseur de tumeurs potentiels localisés en 1p36 ont été proposés mais aucun d'entre eux n'est le siège de mutations inactivatrices ce qui suggère que d'autres mécanismes tels que l'épigénétique ou encore l'haplo-insuffisance pourraient être impliqués dans l'inactivation génique.

2.3.3 Perte du 11q

L'analyse des polymorphismes par CGH a permis d'identifier la perte allélique du 11q (Brinkschmidt et al., 1997; Lastowska et al., 1997) chez environ 43% des patients atteints de neuroblastomes (Guo et al., 1999). La délétion du 11q est un facteur de mauvais pronostic caractérisant les tumeurs de stade avancé sans amplification de N-Myc (Guo et al., 1999). La perte du 11q est associée avec la délétion 14q mais est inversement corrélé avec l'amplification de N-Myc et la délétion 1p. La aussi, l'introduction du chromosome 11 intact dans la lignée NGP par l'équipe de Bader et al., entraîne la différenciation des cellules (Bader et al., 1991) suggérant l'existence de gène(s) candidat(s) suppresseur de tumeurs.

2.3.4 Autres chromosomes

La délétion du bras long du chromosome 14 (14q) a été retrouvée dans environ 23% des neuroblastomes (Fong et al., 1992). Bien que cette délétion se rencontre majoritairement dans les stades avancés de la maladie, elle n'est pas corrélée avec l'amplification de N-Myc ni avec la perte du 1p (Fong et al., 1992). D'autres pertes chromosomiques ont été décrites notamment les délétions du 2q, 9p et 18q (Takita et al., 1995; Takita et al., 1997).

2.4. Altération de l'expression génique

2.4.1. Les récepteurs Tyrosine kinase aux neurotrophines.

Les récepteurs aux neurotrophines sont des récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans le développement, la survie et la réparation du système nerveux périphérique. Cette famille de récepteur comprends 4 membres: TrkA (NTRK1) dont le ligand majoritaire est le NGF (nerve growth factor), TrkB (NTRK2) capable de lier le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ou NT-4/5 (neurotrophin-4/5), TrkC (NTRK3) dont le ligand spécifique est la NT-3 (neurotrophin-3) et enfin p75NTR qui lui est capable de lier toutes les neurotrophines mais avec une moindre affinité.

Au cours du développement du système nerveux, l'expression séquentielle des récepteurs aux neurotrophines et leurs ligands, est indispensable pour la différenciation complète et la survie des neurones sympathiques (Barbacid, 1995; Fagan et al., 1996; Levi-Montalcini, 1987; Pinon et al., 1996).

Dans les neuroblastomes, la forte expression de TrkA est observée dans les tumeurs de bon pronostic. En effet, la présence de haut niveau de TrkA est corrélée à des facteurs de bon pronostic et semble être inversement associée à l'amplification de N-Myc (Nakagawara et al., 1992). De plus, l'expression de TrkA est fortement prédictive d'une évolution favorable de la maladie (Kogner et al., 1993; Nakagawara et al., 1993; Suzuki et al., 1993) alors qu'à l'inverse la perte d'expression de TrkA est associée avec un mauvais pronostic (Suzuki et al., 1993). Les neuroblastes de tumeurs primaires exprimant de fort niveau de TrkA, sont capables de se différencier *in vitro* en neurones matures en présence de NGF ou de mourir par apoptose en absence de celui-ci (Nakagawara et al., 1993) (*Figure 16*). En revanche, les tumeurs de stade avancées expriment peu ou pas TrkA et par conséquent répondent peu ou pas au NGF. L'absence de ce récepteur empêche la différenciation terminale des neuroblastes en réponse au NGF. L'ensemble de ces observations suggèrent que la voie de signalisation du NGF/TrkA, en fonction du microenvironnement tumoral, est responsable de la différenciation ou de la régression des tumeurs de bon pronostic.

TrkB et son ligand BDNF sont fortement exprimés dans les neuroblastomes agressifs et semble hautement corrélé avec l'amplification de N-Myc (Nakagawara et al., 1994). Dans ces tumeurs de mauvais pronostic, la forte expression de TrkB et du BDNF entraîne la survie des neuroblastes par un effet autocrine/paracrine et semble favoriser la formation de métastases (Acheson et al., 1995; Matsumoto et al., 1995) (*Figure 16*). Il semblerait que la forte expression de TrkB/BDNF dans ces tumeurs agressives soit associée avec la résistance aux chimiothérapies et avec l'expression de facteurs pro-angiogéniques (Eggert et al., 2002; Ho et al., 2002). En outre, il a été rapporté que des formes tronquées du récepteur TrkB sont exprimés dans des tumeurs différenciées tel que les ganglioneuroblastomes.

Tout comme TrkA, TrkC est également exprimé dans les neuroblastomes favorables et semble associé avec les tumeurs de bas grade non N-Myc amplifié (Yamashiro et al., 1996).

Ainsi, le profil d'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk est déterminant dans l'appréciation du niveau de différenciation et dans la survie des neuroblastomes.

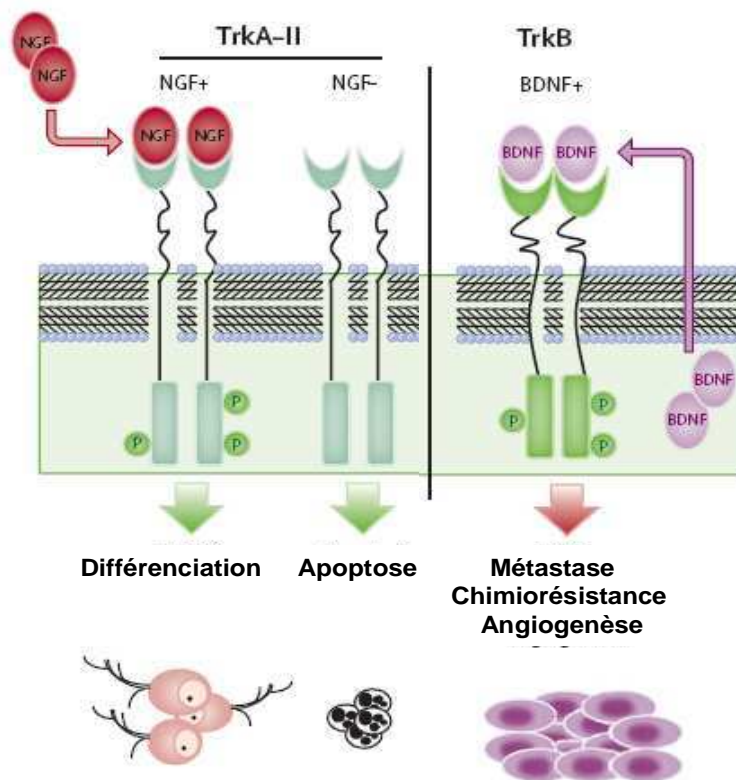


Figure 16 : Représentation schématique de la signalisation des récepteur tyrosine kinase aux neurotrophines dans les neuroblastomes (D'après Maris *et al.*, 2007). Dans les neuroblastomes de bon pronostic, l'expression de TrkA peut induire la différenciation des neuroblastes en présence de son ligand, le NGF, ou l'apoptose en son absence. Dans les neuroblastomes de mauvais pronostic, l'expression de TrkB et son ligand, le BDNF, favorisent la chimiorésistance et la formation de métastases.

2.4.2 Le CD44

La glycoprotéine membranaire CD44, impliquée dans des phénomènes d'adhésion cellulaire est peu ou pas exprimée dans les neuroblastomes à haut risque (Christiansen *et al.*, 1995; Combaret *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1997), contrairement à un grand nombre tumeurs adultes où elle est hyper-exprimée. Dans les neuroblastomes, le niveau de CD44 est inversement corrélé avec l'amplification de N-Myc et semble être augmenté dans les tumeurs différenciées et dans celles de bon pronostic. En revanche, l'expression du CD44 n'apparaît pas comme un facteur pronostic indépendant de la maladie (Christiansen *et al.*, 1995; Combaret *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1997).

2.4.3 Les protéines de la signalisation apoptotique.

Des anomalies dans la signalisation apoptotique ont été rapportées dans les neuroblastomes. En effet, certaines protéines clés du processus apoptotique, tels que la caspase-8, la protéine Bcl-2 ou encore p53 semblent altérées dans les neuroblastomes, notamment dans les tumeurs chimiorésistantes et dans celles de haut risque.

a. Caspase-8

L'apoptose est un processus de mort cellulaire extrêmement bien organisé et exécuté entre autre par la famille des caspases. Une phase de clivage protéolytique permet l'activation des caspases effectrices qui vont à leur tour cliver des substrats spécifiques pour mener la cellule vers l'apoptose. La caspase-8 est une cystéine protéase clé de la cascade apoptotique des récepteurs «à domaine de mort». Dans une large variété de cancers pédiatrique, notamment dans les neuroblastomes N-Myc amplifié, la caspase-8 est fréquemment réduit au silence par un mécanisme de délétion allélique ou par hyperméthylation de l'ADN (Teitz et al., 2000) . Cette inactivation de la caspase-8 rend la voie apoptotique des récepteurs de mort non fonctionnelle et impacte également la voie mitochondriale. Des études ont montré que la réexpression de la caspase-8 par un traitement démethylant ou par la réintroduction d'un gène ectopique, restaure la sensibilité des cellules à l'apoptose (Fulda et al., 2001; Muhlethaler-Mottet et al., 2003; Muhlethaler-Mottet et al., 2004; Teitz et al., 2000).

En revanche, même si aucune corrélation n'a été établie entre l'expression de la caspase-8 et l'amplification de N-Myc ou le caractère agressif des tumeurs (Fulda and Debatin, 2006), la perte de l'expression de cette caspase semble contribuer au phénotype métastatique et à la chimiorésistance. En effet, des travaux ont démontré que le processus de dissémination métastatique est augmenté par la perte simultanée de la caspase-8 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ empêchant la mort cellulaire intégrine-dépendante (Stupack et al., 2006; Teitz et al., 2006). En effet, l'injection dans un embryon de poulet, de neuroblastes malins n'exprimant pas la caspase-8 provoque la dissémination métastatique alors que des neuroblastes qui expriment la caspase-8 ne disséminent pas (Stupack et al., 2006). Les auteurs concluent qu'au cours du phénomène d'invasion, les cellules tumorales quittent le site de la tumeur primaire en se détachant de la matrice extracellulaire. Les intégrines ne sont alors plus engagées avec leur ligand matriciel et recrute la caspase-8 ce qui provoque alors une mort cellulaire dépendante des intégrines ou IMD (*Integrin-Mediated Death*). Il semblerait donc que la perte

de la caspase-8 au cours du processus tumoral constitue un mécanisme d'échappement à l'IMD impliqué dans la dissémination des neuroblastes. Ces résultats sont la démonstration que la caspase-8 exerce une fonction de « gène suppresseur de métastases » (Stupack et al., 2006) au cours d'un processus de mort cellulaire faisant intervenir les intégrines.

b. p53

p53 est un facteur de transcription qui joue un rôle central dans la régulation de la croissance cellulaire, l'apoptose et la tumorigenèse. En effet, son rôle principal est de contrôler la réponse cellulaire aux dommages causés à l'ADN et à différents types de stress. Le gène p53 est l'un des plus importants suppresseurs de tumeur puisqu'il est muté dans plus de la moitié des cancers humains (Caron de Fromentel and Soussi, 1992). L'inactivation de p53 par le changement d'un seul acide aminé contribue au phénotype néoplasique et confère une résistance aux traitements de chimiothérapie. En revanche les mutations de p53 sont très rares dans les neuroblastomes puisqu'elles n'affectent qu'environ 2% des cas (Imamura et al., 1993; Vogan et al., 1993). Une étude réalisée par l'équipe de Moll sur une cohorte de 46 neuroblastomes a révélé que p53 est inactivée par séquestration cytoplasmique dans les neuroblastomes indifférenciés (Moll et al., 1995) et non par mutation. Afin d'expliquer la non fonctionnalité d'une p53 sauvage hyper-exprimée dans ces tumeurs, plusieurs mécanismes ont été avancés. Dans le cytoplasme, la protéine p53 pourrait être piégée dans un complexe faisant intervenir Parc (p53-associated Parkin-like cytoplasmic protein), une protéine à activité ubiquitine ligase (Nikolaev et al., 2003). En effet, la suppression de Parc par ARN interférence, dans des lignées de neuroblastomes dans lesquels elle est fréquemment hyperexprimée, restaure la translocation nucléaire de p53 et l'apoptose des cellules. Une hyper-ubiquitination de p53 dans les tumeurs neuroblastiques pourrait donc être responsable de la rétention cytoplasmique de p53 (Becker et al., 2007). D'autre part, un export nucléaire hyperactif de la protéine via la protéine MDM2 a également été proposé (Stommel et al., 1999). Il semblerait donc que la séquestration de p53 soit à l'origine de son inactivation dans les neuroblastomes. Même si certaines études étayaient cette hypothèse (Becker et al., 2007; Moll et al., 1996), cette rétention cytoplasmique à l'origine de l'inactivation de p53 reste encore aujourd'hui très controversée. En effet, quelques auteurs ont montré dans des tumeurs et des lignées de neuroblastome que p53 est localisée principalement dans le noyau, quel que soit l'état de différenciation des tumeurs et des cellules (Chen et al., 2007) et que la réponse transcriptionnelle en aval de p53 était conservée malgré que l'apoptose soit abolie dans

certains cas (Chen et al., 2007; McKenzie et al., 1999; Tweddle et al., 2001). Pour Chen et al., cette accumulation nucléaire de p53 dans les neuroblastomes de haut risque est la conséquence de l'hyper-expression de N-Myc puisque p53 s'est révélée être la cible transcriptionnelle direct de N-Myc (Chen et al., 2010). L'utilisation d'anticorps anti-p53 donnant un marquage cytoplasmique non spécifique a été un argument pour expliquer la localisation subcellulaire contradictoire de p53 (Chen et al., 2007; Tweddle et al., 2001). Ainsi la question de la rétention cytoplasmique de p53 reste encore ouverte.

D'autres mécanismes d'inactivation de p53 ont été rapportés. En effet, une étude très récente vient d'identifier un nouvel microARN, miR-380-5p, capable de réprimer l'expression de p53 dans les neuroblastomes. Les auteurs ont montré que l'hyper-expression de miR-380-5p corrèle avec les neuroblastomes de mauvais pronostic N-Myc amplifié et que l'inhibition de ce microARN restaure l'induction de p53 et sa fonction pro-apoptotique. De plus, l'administration d'un antagoniste de miR-380-5p *in vivo*, provoque la diminution du volume tumoral des xénogreffes orthotopiques de neuroblastomes chez la souris (Swarbrick et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc que les miARNs pourraient participer à la régulation de la fonction pro-apoptotique de p53 dans les neuroblastomes.

c. Bcl-2

La protéine anti-apoptotique mitochondriale Bcl-2 a pour fonction essentielle d'empêcher le déclenchement de l'apoptose induit par le relargage du cytochrome c.

Dans les neuroblastomes, Bcl-2 est hyper-exprimé et semble associé à une diminution de l'apoptose (Ikeda et al., 1995; Ikegaki et al., 1995). Même si quelques études ont montré que l'augmentation de Bcl-2 semble être associée avec des facteurs de mauvais pronostic comme l'amplification de N-Myc et les tumeurs de haut risque (Castle et al., 1993) des résultats contradictoires ne permettent pas aujourd'hui d'établir une réelle corrélation entre une caractéristique clinique des neuroblastomes et l'expression de Bcl-2.

C. Télomérase et neuroblastomes

1. La télomérase dans le développement des neuroblastes et dans la tumorigenèse des neuroblastomes

Chez le fœtus, le nombre de neuroblastes de la glande surrénale tend à augmenter jusqu'à la 20ème semaine de développement embryonnaire. Ces neuroblastes fœtaux expriment une activité télomérase (AT) faible, uniquement au cours de la 16^{ème} à la 18ème semaine du développement alors qu'au delà de cette période et après la naissance l'AT n'est plus détectée dans ce tissu (Hiyama et al., 1995). Au cours de cette courte fenêtre d'expression, le niveau d'AT dans les neuroblastes de fœtus est similaire à celui des neuroblastomes de pronostic favorable. En revanche, les neuroblastomes de mauvais pronostic voient leur niveau d'AT augmenter au cours de la tumorigenèse. Comme une forte expression de la télomérase corrèle avec d'autres facteurs connus pour être associés aux tumeurs agressives, il semblerait que la réexpression de la télomérase dans ces tumeurs soit secondaire à des altérations comme l'amplification de N-Myc qui pourraient être à l'origine du comportement agressif de certaines tumeurs.

L'étude des neuroblastomes de type 4S représente un excellent modèle pour étudier le rôle de la télomérase dans la progression tumorale. Tous les cas de stade 4S agressifs télomérase-positifs ont également une amplification de N-Myc (Brinkschmidt et al., 1998; Hiyama et al., 1995; Poremba et al., 1999). Dans les rares cas de stades 4S agressifs qui n'ont pas d'amplification de N-Myc, la présence d'une forte expression d'hTR suggère que la télomérase (mesuré par l'expression d'hTR) semble être un facteur pronostique indépendant et que l'activation de la télomérase survient indépendamment de l'amplification de N-Myc.

Le mécanisme à l'origine de l'activation de la télomérase dans les cellules tumorales issu de tissus télomérase-négatif, reste encore inconnu. Deux hypothèses peuvent être évoquées. Premièrement, les neuroblastomes peuvent acquérir une AT à partir des neuroblastes fœtaux qui n'auraient pas réprimé la télomérase au cours du développement, deuxièmement, la réactivation de la télomérase pourrait être la conséquence d'autres

altérations génétiques. La corrélation entre le stade tumoral avec l'AT, suggère que la plupart des neuroblastomes de mauvais pronostic ne dérivent pas de cellules possédant déjà une AT mais plutôt de cellules ayant réactivé la télomérase au cours du développement tumorale et de la progression de la maladie. Le fait que la plupart de ces tumeurs agressives sont retrouvées chez des enfants de plus de 1 an est également compatible avec l'hypothèse que ce type de tumeurs auraient pu émerger suite à l'accumulation d'altérations génétiques au cours des divisions cellulaires successives.

Les neuroblastomes de bon pronostic quant à eux, semblent partager des liens avec les neuroblastes fœtaux. En effet, la plupart des tumeurs de pronostic favorable chez les enfants de moins de 1 an ont moins d'altérations génétiques. Le développement des neuroblastes requiert la présence de NGF et son récepteur NTRK1 (Raffioni et al., 1993). La majorité des tumeurs de pronostic favorable ont une expression de NTRK1 forte (Nakagawara et al., 1993) ce qui est compatible avec le fait que ces tumeurs pourraient être des vestiges des neuroblastes fœtaux.

Dans certain cas, notamment dans les stades 4S, l'absence d'activité télomérase peut être reliée à une régression de la tumeur. Dans ces neuroblastomes particuliers le niveau d'AT est insuffisant pour maintenir la longueur des télomères, la tumeur continue de proliférer, ses télomères raccourcissent et il en résulte une sénescence ou une mort cellulaire selon le contexte. Une défaillance dans le maintien des télomères pourrait donc être un mécanisme permettant à certains neuroblastomes de régresser spontanément.

Ainsi, il a été proposé que la forte AT observée dans les neuroblastomes agressifs soit la conséquence de la réactivation de la télomérase par la tumeur au cours de la progression tumorale alors que la faible AT dans les neuroblastomes de bon pronostic suggère que ces tumeurs seraient issues de neuroblastes fœtaux ayant perdu la capacité de réprimer leur activité télomérase durant le développement embryonnaire.

2. La télomérase comme marqueur biologique et facteur prédictif des neuroblastomes

Une des caractéristiques particulières des neuroblastomes est leur grande hétérogénéité clinique. C'est pourquoi, il est important de discriminer les différentes caractéristiques

biologiques de ces tumeurs grâce à des marqueurs cellulaire et moléculaire. Certains marqueurs comme le nombre de copies du gène *N-Myc* et la perte d'hétérozygotie du chromosome 1p ou 17q permettent d'identifier les neuroblastomes de mauvais pronostic. Basées sur ce principe, des études ont établi une corrélation entre la télomérase et la longueur des télomères avec le stade de la maladie et la survie. La télomérase (et les télomères) pourrait donc constituer un marqueur moléculaire pronostique efficace (Brinkschmidt et al., 1998; Hiyama et al., 1995).

2.1. La longueur des télomères dans les neuroblastomes

A l'inverse de la télomérase, l'utilisation de la longueur des télomères comme facteur pronostique dans les neuroblastomes a été relativement peu étudié.

Quelques études (Hiyama et al., 1992; Hiyama et al., 1995; Ohali et al., 2006) analysé la longueur des télomères à partir de l'ADN génomique extrait des tumeurs et l'ont comparé avec l'activité télomérase et le stade de la maladie. Ces études ont révélé que les tumeurs ayant une forte activité télomérase ont des télomères de tailles variables, alors que les neuroblastomes ayant peu ou pas d'activité télomérase détectable ont des télomères raccourcit ou de longueur inchangé en comparaison avec les télomères du tissu sains (Hiyama et al., 1992). De plus, dans certains cas, la présence de longs télomères malgré une faible AT est signe de mauvais pronostic. Il n'y a pas donc pas de corrélation entre la taille des télomères et la forte activité télomérase de certaines tumeurs (Hiyama et al., 1992). En revanche, la présence de télomères courts dans la plupart des tumeurs de stade 4S suggère que l'activité télomérase faible ou inexistante peut être associée aux raccourcissements des télomères (Hiyama et al., 1995) et donc représenter un des facteurs de la régression spontanée caractéristique de ce genre de tumeurs.

Pour Ohalie et al., la taille des télomères peut être utilisée comme un facteur pronostique. En effet, la présence de télomères longs ou inchangés est associée à un pronostic défavorable alors que les neuroblastomes ayant des télomères courts sont de meilleur pronostic. De plus, la longueur des télomères permet de discriminer les patients de « bon » ou « mauvais » pronostic dans le groupe de patients à haut risque (Ohali et al., 2006).

Même si de façon générale, la télomérase semble être à l'origine du maintien de la longueur des télomères dans les neuroblastomes, il a été rapporté que certaines de ces

tumeurs ont des télomères très long maintenus par le mécanisme ALT. Cette absence de corrélation entre l'AT et la longueur des télomères suggère que le maintien de la taille des télomères dans les neuroblastomes peut être le résultat de l'activation du mécanisme ALT ou d'une régulation par d'autres facteurs tels que les protéines associées aux télomères ou TBPs (Telomere binding protein) (Onitake et al., 2009). L'équipe d'Onitake et al., a récemment mis en évidence qu'une faible expression de l'ensemble des TBPs analysées (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, POT1, TNK1, TNK2) corrèle avec l'allongement des télomères et de leur extrémité 3'-OH (Onitake et al., 2009) et la forte activité télomérase. L'inhibition de chacune des TBPs par ARN interférence ou par l'expression d'une protéine dominante négative montre que les TBPs régulent négativement la longueur des télomères des cellules télomérase positives. Des modifications dans la biologie des télomères pourraient être intimement corrélées à l'hétérogénéité clinique et biologique des neuroblastomes.

Le maintien des télomères par l'activation de la télomérase constitue un des facteurs importants de l'agressivité des neuroblastomes. Des niveaux d'AT important et la stabilisation ou l'élongation des télomères sont des facteurs cruciaux de la progression tumorale et du potentiel invasif de ces tumeurs. De plus, le mécanisme ALT peut être activé dans certains neuroblastomes de mauvais pronostic et pourrait expliquer la résistance de ces tumeurs à la chimiothérapie. L'analyse de la longueur des télomères pourrait ainsi constituer un outil prédictif permettant de distinguer les différents comportements tumoraux, quelque soit l'âge du patient, le stade tumoral et le statut de N-Myc des neuroblastomes.

2.2. L'activité télomérase dans les neuroblastomes

L'AT dans des cohortes de patients atteints de neuroblastomes a pu être analysée par la technique du TRAP (Brinkschmidt et al., 1998; Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Poremba et al., 2000a; Poremba et al., 2000b; Poremba et al., 1999; Reynolds et al., 1997). Dans la majorité des études, la présence d'une forte AT dans les extraits de tumeurs primaire de neuroblastome est fortement corrélée avec un mauvais pronostic et une progression de la maladie. A l'inverse, une AT faible ou indétectable est associée à des tumeurs de bon pronostic et une survie favorable. D'autre part, l'analyse de l'AT est également très prédictive de la survie des neuroblastomes particuliers de stade 4S. En effet, une AT indétectable ou faible est fortement associée avec les neuroblastomes de stade 4S (Choi et al., 2000; Hiyama et al., 1995; Poremba et al., 1999). Les stades 4S sont des tumeurs de bon pronostic, capables de régresser spontanément. En revanche, dans les rares cas où une tumeur de stade 4S

présente une AT élevée, il a été observé une évolution défavorable de la maladie (Brinkschmidt et al., 1998; Hiyama et al., 1995). En effet, dans l'étude réalisée par l'équipe de Hiyama, une seule tumeur de stade 4S sur les 9 analysées présente une forte activité télomérase associé à une amplification de l'oncogène N-Myc et une chimiorésistance. De ce fait, il a donc été possible de distinguer 2 sous groupes de « bon » et « mauvais » pronostic dans le groupe des tumeurs de pronostic favorable (Poremba et al., 2000a) tel que les stades 4S (Brinkschmidt et al., 1998; Hiyama et al., 1995).

En outre, il existe parfois de grandes variations dans les niveaux de détection de l'AT par TRAP entre les différentes études. Par exemple, que ce soit dans les études menées par l'équipe de Poremba ou Choi, la télomérase n'est détectée que dans 20 à 41% des neuroblastomes analysés (Choi et al., 2000; Poremba et al., 2000b; Poremba et al., 1999) alors que l'équipe de Hiyama et al., ainsi que celle de Kim et al., détecte une AT dans 96,2% et 100% des tumeurs respectivement (Hiyama et al., 1995; Kim et al., 1994). Ces variations dans la détection de l'AT pourraient expliquer le fait qu'une minorité d'équipes comme Choi et al., ne rapporte pas de corrélation entre une forte AT et les tumeurs de haut risque. Cette variabilité inter-études peut être expliquée par la méthode de TRAP utilisée (TRAP conventionnel ou modifié), par de mauvaises manipulations ou conservations des biopsies tumorales ou par une hétérogénéité d'expression de la télomérase au sein de la tumeur.

Enfin, une analyse multivariée sur 133 neuroblastomes a rapporté que seule l'AT et le stade sont des facteurs pronostiques indépendants, à l'inverse de la LDH (Lactate déshydrogénase) sanguine, du statut de N-Myc et de l'âge du patient au moment du diagnostic (Poremba et al., 2000b).

L'analyse quantitative d'hTR réalisé sur des extraits de neuroblastomes primaires non traités, a montré qu'il existe une grande variabilité de l'expression de hTR entre les différents tumeurs primaires (Choi et al., 2000; Reynolds et al., 1997). Le niveau moyen d'expression d'hTR tend à augmenter avec le stade de la maladie et corrèle avec un mauvais pronostic vital (Reynolds et al., 1997). D'après Choi et al., une faible expression d'hTR permet de multiplier la survie globale à 5 ans par 2 en comparaison avec les tumeurs exprimant de fort niveau d'ARNm de hTR (Choi et al., 2000). L'analyse en parallèle de l'activité télomérase dans ces mêmes tumeurs à montrer que l'expression d'hTR combiné à l'AT est plus prédictif de la survie des patients notamment des stades 4S, que l'expression d'hTR ou l'AT seul (Choi et

al., 2000). En effet, la survie globale à 5 ans passe de 54% à 91% pour les patients tout stade confondu, à la fois TRAP négatif et hTR faible, en comparaison avec les neuroblastomes TRAP positif ou exprimant de fort niveau d'hTR. Ces résultats sont également valables lorsqu'on se focalise uniquement sur les neuroblastomes de type 4S (Choi et al., 2000). En effet, la survie globale augmente chez les patients atteints de stades 4S, TRAP négatif et hTR faible (100% vs 72%) (Choi et al., 2000). Même si l'utilisation combinée de l'expression d'hTR et de l'AT peut constituer un marqueur prédictif de la survie, la corrélation entre les niveaux d'hTR et d'activité télomérase est assez controversée (Avilion et al., 1996; Poremba et al., 2000b).

La régulation de l'AT par la sous unité catalytique hTERT permet d'expliquer en partie l'absence de corrélation entre l'expression d'hTR et l'AT de certaines études. Pour l'équipe de Poremba et al., (Poremba et al., 2000b) l'expression en ARNm d'hTERT est fortement corrélée à l'AT. En effet, sur les 23 neuroblastomes TRAP positif, 22 d'entre eux expriment l'ARNm d'hTERT à des niveaux équivalent en AT. Autrement dit, les tumeurs exprimant un niveau faible, intermédiaire ou fort d'hTERT présentent un niveau faible, intermédiaire ou fort en AT respectivement. En revanche, même si l'expression de TERT corrèle avec l'AT dans les neuroblastomes, aucune étude à ce jour n'a permis de démontrer que l'ARNm d'hTERT est un facteur pronostique des neuroblastomes

Ainsi, l'ensemble de ces études démontrent l'existence **d'une corrélation entre l'activité télomérase, le stade tumoral et la survie** (Choi et al., 2000; Hiyama et al., 1997; Poremba et al., 2000a; Poremba et al., 2000b; Poremba et al., 1999; Streutker et al., 2001) **et suggère que l'activité télomérase constitue un facteur de mauvais pronostic dont la détection par TRAP pourrait être intégrer aux investigations cliniques réalisées lors du diagnostic des neuroblastomes.**

D. Théorie de la cellule souche cancéreuse dans les neuroblastomes

Il est généralement admis que les neuroblastomes sont issus de la transformation des neuroblastes normaux qui dérivent eux-mêmes des cellules des crêtes neurales. Pour bien comprendre l'origine de la théorie de la cellule souche cancéreuse dans les neuroblastomes, il est nécessaire d'introduire en pré-requis certaines informations concernant les cellules des

crêtes neurales, les différents progéniteurs et cellules matures qui découlent de leur différenciation.

Les cellules de la crête neurale sont constituées d'un petit contingent de cellules embryonnaires issues du processus de la neurulation. Ces cellules forment une population transitoire qui possède des propriétés de cellules souches (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998; Morrison et al., 1997). Dotées de capacité d'autorenouvellement et de différenciation, les cellules de la crête neurale donnent naissance à des progéniteurs qui eux-mêmes sont à l'origine d'une large variété de cellules (neuronales et non-neuronales) incluant les mélanocytes, les muscles de la face, les cellules chromaffines de la glande surrénale, les cellules de Schwann et différents types de neurones (Berry, 2003; Bronner-Fraser, 1995). Les cellules chromaffines et les neurones du système nerveux sympathique dérivent de cellules progénitrices intermédiaires en cours de différenciation appelé neuroblastes. Les neuroblastes dont sont issus les neuroblastomes sont donc des intermédiaires de la différenciation des cellules de la crête neurale.

Tout comme les progéniteurs normaux des cellules de la crête neurale, certains neuroblastes malins peuvent se différencier en cellules neuronales ou en cellules de type shwannien après traitement par l'acide rétinoïque ou le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) respectivement (Ross et al., 1995). La double potentialité en terme de différenciation à conduit certains chercheurs à s'intéresser aux propriétés « souches » de ces neuroblastes malins et a proposer une théorie « de cellules souches cancéreuses » des neuroblastomes. Parallèlement, la caractérisation de lignées de neuroblastomes a permis de proposer un modèle de classification des cellules tumorales en trois groupes, selon leur morphotype. On distingue ainsi les cellules de type Neuroblastique (N), celles de type Shwannien (S) et celles de type Intermédiaire (I).

- Les cellules de type N, ont une morphologie de petits neuroblastes indifférenciés arrondi et peu réfringents. Ils présentent un ratio noyau/cytoplasme élevé et ont tendance à fortement adhérer entre-eux sous la forme de petits agrégats cellulaires et peu au substrat. Ils possèdent la capacité de former des neurites, des pseudoganglions et de se différencier dans une voie neuronale. Ils expriment également des récepteurs neuronaux (récepteurs au Nerve Growth Factor, récepteurs muscariniques, opioïdes) et ont une activité de synthèse de certains neurotransmetteurs (Ciccarone et al., 1989; Rettig et al., 1987; Ross et al., 1983; Sadee et al., 1987).

- Les cellules de type S (adhérente au substrat) ou Schwannien sont de grandes cellules plates avec un petit noyau ovale et un cytoplasme abondant. Elles ont une morphologie non-neuronale de type fibroblastique ou épithéliale. Contrairement aux cellules de type N, elles ne possèdent aucun processus neural et sont plus adhérentes au support de culture qu'entre-elles, c'est la raison pour laquelle elles sont appelées de type S (de l'anglais *Substrate adherent*) (Ciccarone et al., 1989; Rettig et al., 1987; Ross and Biedler, 1985; Slack et al., 1992). Généralement, les cellules de type S sont incapables de former des tumeurs chez la souris ce qui a valu à certains scientifiques de les ont considérés (à tort) comme des cellules normales provenant du stroma sain avoisinant la tumeur plutôt que de la tumeur elle-même. Des études ont ensuite affirmé que ces cellules de type S provenaient bien initialement de la tumeur, puisqu'elles partageaient les mêmes anomalies génétiques que les cellules tumorales du patient (Ciccarone et al., 1989; Mora et al., 2001; Valent et al., 1999) démontrant ainsi l'existence de cellules de type S issues de tumeurs neuroblastiques.
- Le troisième et dernier type cellulaire est le type I (intermédiaire). Comme leur nom l'indique, ces cellules présentent un phénotype intermédiaire entre les types N et S (Ciccarone et al., 1989). Elles ont un noyau rond assez volumineux comme les cellules de type N et un cytoplasme abondant comme les cellules de type S. Elles possèdent des propriétés d'adhésion communes aux deux types cellulaires puisqu'elles adhèrent aussi bien entre-elles qu'au support de culture et expriment à la fois des marqueurs de différenciation des cellules N et S. *In vitro*, ces cellules de type I sont capables de se différencier en cellules de type N ou S selon l'agent pharmacologique utilisé (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 2003; Ross et al., 1995). Contrairement aux deux autres types, les cellules I sont les seuls à exprimer le marqueur de cellules souches c-Kit (Walton et al., 2004) et leur capacité à exclure le colorant Hoechst (Hirschmann-Jax et al., 2004) tend à renforcer l'hypothèse du caractère souche de ce type intermédiaire. Cette capacité à exclure des marqueurs colorés mais également les agents cytotoxiques provient de l'hyper-expression de pompe à efflux. Ce caractère marginal des cellules souches permet également d'expliquer la chimiorésistance et l'importante capacité de survie de ces cellules. La forte tumorigénicité observée chez la souris ainsi que les caractéristiques particulières évoquées plus haut (autorenouvellement, différenciation vers type N ou S et chimiorésistance) suggèrent que les cellules de types I pourraient ainsi correspondre à des cellules souches

cancéreuses de la crête neurale à l'origine du processus tumorale et de la rechute. Ces résultats ont été confortés récemment par la mise en évidence de cellules souches initiateur de tumeurs dans des neuroblastomes particulièrement agressifs (Hansford et al., 2007; Vangipuram et al., 2010). Ainsi, l'ensemble de ces observations suggère que les cellules de neuroblastomes de type I représente un modèle particulièrement pertinent pour la caractérisation des cellules souches cancéreuses et leur implication dans la tumorigenèse et la progression de la maladie.

E. Le modèle cellulaire IGR-N-91

La lignée IGR-N-91 (Ferrandis et al., 1994), est une lignée de type N, établie *in vitro* dans le laboratoire du Dr Bénard (IGR, Villejuif), à partir de métastases médullaires d'un patient atteint de stade 4 dont l'évolution de la maladie a été fatale. L'inoculation sous-cutanée de cette lignée chez des souris immunodéficientes, a engendré des tumeurs primaires extrêmement hémorragiques, invasives et disséminantes. En effet, des métastases macroscopiques, issues de ce tissu hémorragique (Cappellen and Benard, 1997) ont été retrouvées dans le sang, les surrénales, le myocarde et la moelle osseuse de ces souris. Ces tumeurs secondaires ont ensuite été extraites de l'animal et établies *in vitro* (Ferrandis et al., 1994).

La lignée IGR-N-91 et ses sous lignées métastatiques, constituent un excellent modèle, mimant le neuroblastome métastatique chez le patient. Ce modèle IGR-N-91 constitue donc un outil de choix pour comprendre les événements géniques et les altérations fonctionnelles impliqués dans l'agressivité tumorale et la dissémination métastatique des neuroblastes malins.

Au niveau génétique, la lignée IGR-N-91 présente un contenu génomique relativement constant de 60 copies de *N-Myc* par génome haploïde. En revanche, les sous lignées métastatiques dérivant des xéno greffes sous-cutanées chez la souris, présentent une augmentation significative du niveau du transcrit de *N-Myc*. Cette augmentation du messageur du gène *N-Myc* a été décrite comme associée à la dissémination métastatique (Ferrandis et al., 1994). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de *N-Myc* entraîne l'activation des gènes impliqués la prolifération et la dissémination métastatique.

D'autres altérations ont également été identifiées dans la lignée IGR-N-91, notamment dans la signalisation apoptotique. En effet, il a été démontré que cette lignée exprime une forme mutée de p53 (duplication des exons 7,8,9), probablement inactive et incapable de transloquer en dehors du noyau (Goldschneider et al., 2003). La caspase-8 ainsi que la caspase-10, sont réprimées dans ces cellules et semblent être impliquées dans la résistance des cellules à l'apoptose induite par des agents cytotoxiques tel que TRAIL (Muhlethaler-Mottet et al., 2003; Muhlethaler-Mottet et al., 2004). Ces anomalies pourraient donc expliquer en partie la chimiorésistance de cette lignée agressive.

La lignée de neuroblastome métastatique IGR-N-91, a été utilisée dans ce projet car elle constitue un excellent modèle d'étude pour évaluer la contribution de la télomérase dans le phénotype agressif des neuroblastes malins et dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques.

Projet de recherche

Le rôle de la télomérase dans le développement des cancers et la progression tumorale commence à être mieux compris par les scientifiques. Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses réactivent anormalement la télomérase pour échapper aux processus de sénescence et de mort cellulaire. La réactivation de la télomérase dans 90% des cancers permet aux cellules tumorales de proliférer indéfiniment en maintenant la longueur de leurs télomères. Ce rôle canonique de la télomérase largement documenté, n'est pas le seul rôle qu'on lui connaît. En effet, des travaux récents suggèrent que la télomérase pourrait avoir d'autres fonctions indépendantes de son rôle sur le maintien de la longueur des télomères, dans diverses voies de signalisation cellulaires tel que la différenciation (Choi et al., 2008; Sarin et al., 2005), la réponse aux dommages à l'ADN (Masutomi et al., 2005) la régulation de l'expression génique (Choi et al., 2008; Smith et al., 2003), mais également dans l'apoptose. En effet, au cours de la dernière décennie, plusieurs équipes dont la nôtre ont proposé que cet enzyme puisse également posséder une fonction anti-apoptotique non canonique et télomère-indépendante, conférant aux cellules une protection contre la mort induite par certains agents cytotoxiques (Dudognon et al., 2004; Gorbunova et al., 2002; Lee et al., 2008; Santos et al., 2006).

Dans les neuroblastomes, l'augmentation du niveau d'activité télomérase est associée à un stade avancé de la maladie et à un mauvais pronostic. En effet, plusieurs études ont montré que les neuroblastomes agressifs ont un niveau élevé d'AT alors que les tumeurs de bon pronostic, ont peu ou pas d'AT (Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Reynolds et al., 1997). Ainsi de façon intéressante, un très faible niveau, voire une absence totale d'AT a été retrouvé dans un groupe particulier de neuroblastome métastatique, le stade 4S, caractérisé par un bon pronostic vital et des capacités de régression spontanée. Ces observations suggèrent que la télomérase peut jouer un rôle important dans le développement du neuroblastome et représenter un facteur pronostic dans cette pathologie. Au vu de ces observations, il nous est apparu important d'étudier si l'inactivation de la télomérase dans des cellules IGR-N-91 établies à partir de neuroblastomes chimiorésistants de stade 4, permettait d'induire une régression du phénotype malin comparable à celle observée des tumeurs de stade 4S télomérase négatives et/ou une sensibilisation aux agents thérapeutiques.

Ainsi la réactivation de la télomérase observée dans les neuroblastomes mais également dans une large variété de cancers en fait une cible de choix dans l'élaboration de chimiothérapie anticancéreuse. Dans ces conditions, l'utilisation d'une stratégie anti-télomérase permettrait d'entraîner une apoptose des cellules tumorales selon 2 mécanismes non mutuellement exclusif : soit par un raccourcissement des télomères (fonction télomère-dépendant de la télomérase) soit par une inhibition de la fonction anti-apoptotique non-canonique de la télomérase (mécanisme télomère-indépendante).

Le but de mon projet de thèse a donc été :

- 1. de caractériser comment des modulations de l'expression de hTERT ou de l'activité de la télomérase peuvent affecter le destin des cellules de neuroblastome et leur sensibilité à la chimiothérapie.**
- 2. de déterminer les voies de signalisation par lesquelles hTERT exercerait ce rôle anti-apoptotique.**

Les moyens utilisés au cours de cette thèse pour moduler l'activité télomérase dans les neuroblastomes furent: a) un traitement par l'acide rétinoïque tout trans ; b) l'expression de la forme sauvage de hTERT (WT-hTERT); c) l'expression d'une protéine hTERT dominant-négative (DN-hTERT). Ce mutant d'hTERT possède 2 mutations ponctuelles dans le domaine de transcriptase inverse générant une protéine dépourvue d'activité télomérase mais ayant des propriétés d'inhibition de l'activité télomérase endogène. Afin de mieux cerner le rôle de la télomérase dans la tumorigenèse et/ou la progression tumorale des neuroblastomes nous avons appliqué ces trois stratégies dans des lignées qui représentent un échantillon des trois catégories existantes de neuroblastomes. Pour la réalisation de ce projet nous avons utilisé, deux lignées de type Schwannien « S » (SH-EP, SK-NAS), une de type Neuroblastique « N » (IGR-N91) et une autre de type Intermédiaire « I » (SK-NBE2).

Travaux de thèse

- A. Article: L'inhibition de la télomérase influence le destin des neuroblastome via un mécanisme télomère-indépendant: Induction de la différenciation et sensibilisation à l'apoptose.

Article en cours d'écriture

TELOMERASE INHIBITION INFLUENCES NEUROBLASTOMA CELL FATE IN A TELOMERE LENGTH-INDEPENDENT MECHANISM: PROMOTION OF DIFFERENTIATION AND SENSITIZATION TO APOPTOSIS.

Mona Samy^{1,2}, Charles-Henri Gattolliat³, Frédéric Pendino^{1,2}, Josette Hillion^{1,2}, Setha Douc-Rasy³, Jean Bénard^{3,4} et Evelyne Ségal-Bendirdjian^{*1,2}

¹ INSERM UMR-S 1007

² Université Paris-Descartes, Paris, France

³ CNRS-UMR 8126, IFR54, Institut Gustave Roussy, 39, rue C. Desmoulins, Villejuif 94805 Cedex, France

⁴ Département de Pathologie Médical et Biologie, Institut Gustave Roussy, 39, rue C. Desmoulins, Villejuif 94805 Cedex, France

Une forte activité télomérase est généralement associée aux neuroblastomes agressifs et de mauvais pronostics. A l'inverse, les tumeurs localisées et celles capables de régresser spontanément (stade 4S) ont une activité télomérase faible ou inexistante (Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Reynolds et al., 1997). Ces résultats suggèrent que la télomérase pourrait être un élément clé du processus oncogénique du neuroblastome et représenter une cible anti-cancéreuse ainsi qu'un facteur pronostique intéressant dans cette pathologie. En plus de son action canonique d'élongation des télomères, la télomérase posséderait d'autres fonctions (extra-téломérique) qui pourrait expliquer la tumorigenèse du neuroblastome et sa progression. Face à l'ensemble de ces observations, nous avons voulu évaluer les conséquences de la modulation de la télomérase sur le destin des cellules de neuroblastome. Nous avons utilisé la lignée IGR-N-91 établie à partir de métastases médullaires d'un patient atteint d'un neuroblastome de stade 4, réfractaire à la chimiothérapie. Cette lignée fut transduite avec des vecteurs rétroviraux codant la forme sauvage de la télomérase (hTERT-WT) ou pour une forme catalytiquement inactive et dominante négative (hTERT-DN), qui

contient deux mutations ponctuelles dans le domaine transcriptase inverse de l'enzyme. Après avoir validé l'efficacité du dominant négatif sur l'inhibition de l'activité télomérase, par le test TRAP, nous avons ensuite procédé à des expérimentations fonctionnelles qui font l'objet d'articles à soumettre et qui montre que :

1. L'expression ectopique du mutant négatif, **hTERT-DN, inhibe l'activité télomérase et induit une modification de la morphologie** des cellules IGR-N-91 sans raccourcissement des télomères ni ralentissement de la prolifération cellulaire. L'observation de l'émergence de caractères morphologiques propre aux cellules de type S, associés à une diminution d'un marqueur de type N et à l'augmentation d'un de type S, nous conduisent à penser que cette « différenciation » des cellules surexprimant hTERT-DN s'oriente vers un phénotype de type Schwannien. L'augmentation de la NSE et la diminution du CD44 dans les neuroblastomes étant associée avec les tumeurs de haut grade et un impact négatif sur la survie (Favrot et al., 1993; Zeltzer et al., 1983), l'acquisition d'une morphologie de type S associé à la diminution de la NSE et à l'augmentation du CD44 sous-entend un processus de « **réversion** » du potentiel malin de la lignée IGR-N-91. A l'inverse, l'hyper-expression de la forme sauvage d'hTERT conduisant à une augmentation de son activité catalytique et au rallongement des télomères, n'entraîne aucun changement de la morphologie ou de la croissance. En outre, l'augmentation de l'expression de la NSE et la diminution du CD44 dans les cellules WT-hTERT suggère à l'inverse, une orientation de la cellule vers un phénotype à malignité augmenté.
2. L'expression ectopique d'**hTERT-DN conduit à la perte progressive des copies amplifiées de N-Myc** aboutissant à l'extinction de l'oncoprotéine après 170 jours de culture. A l'inverse la surexpression d'hTERT-WT augmente le nombre de copies du gène par rapport au vecteur vide. Ces derniers résultats suggèrent qu'hTERT est capable de réguler la quantité de copies du gène N-Myc dans les cellules IGR-N-91. L'amplification de N-Myc étant observée dans les neuroblastomes invasifs et de stades avancés (Brodeur et al., 1984), **hTERT pourrait donc entraîner la sélection de cellules ayant un comportement particulièrement agressif.**

3. L'inhibition de l'activité télomérase par la surexpression d'hTERT-DN suffit à **sensibiliser les cellules IGR-N-91 à l'apoptose** induite par le cisplatine, TRAIL ou la staurosporine. A contrario, l'expression ectopique d'hTERT-WT ou celle endogène les protèges de cette même mort cellulaire. Nous avons montré que cette sensibilisation à l'apoptose augmente au cours des passages cellulaires et serait télomères-indépendante **puisque aucun raccourcissement des télomères n'est observé**. Ces derniers résultats confirment que **hTERT exerce un rôle anti-apoptotique et que celui-ci est indépendamment de sa fonction sur le maintien de la longueur des télomères**.

4. La sensibilisation aux agents cytotoxiques induite par hTERT-DN semble donc être le résultat de l'absence de la **fonction anti-apoptotique de la télomérase**, ce qui a également pour conséquence de **restaurer l'expression de protéines clés du processus apoptotique**. En effet, nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité télomérase, induit **la réexpression de la caspase-8 et de la forme p53 sauvage et une diminution l'expression de la forme p53 mutée**. Inversement la surexpression de la forme sauvage d'hTERT, entraîne au contraire une augmentation de la répression de la caspase-8 en comparaison avec les cellules témoins.

L'hétérogénéité génétique et la multi-potentialité phénotypique sont des caractéristiques connues des neuroblastome, notamment pour les IGR-N-91 (Valent et al., 1999). Nous faisons l'hypothèse que l'introduction du DN-hTERT dans ces cellules a conduit à la sélection de cellules ayant perdu leur caractéristique d'agressivité et/ou à la réversion phénotypique d'une population de cellules en favorisant leur progression vers un phénotype différencié, moins agressif et plus sensible à la chimiothérapie. Ces données restent à confirmer dans des modèles murins de xéno greffes. L'ensemble de nos résultats démontre donc un rôle majeur de la télomérase, indépendamment de sa fonction canonique d'élongation des télomères, dans **l'acquisition du phénotype malin et dans la progression tumorale** des neuroblastomes.

ARTICLE EN COURS D'ECRITURE**TELOMERASE INHIBITION INFLUENCES NEUROBLASTOMA CELL FATE IN A TELOMERE LENGTH-INDEPENDENT MECHANISM: PROMOTION OF DIFFERENTIATION AND SENSITIZATION TO APOPTOSIS.**

Mona Samy^{1,2}, Charles-Henri Gattolliat³, Frédéric Pendino^{1,2}, Josette Hillion^{1,2}, Setha Douc-Rasy³, Jean Bénard^{3,4} et Evelyne Ségal-Bendirdjian^{*1,2}

¹ INSERM UMR-S 1007

² Université Paris-Descartes, Paris, France

³ CNRS-UMR 8126, IFR54, Institut Gustave Roussy, 39, rue C. Desmoulins, Villejuif 94805 Cedex, France

⁴ Département de Pathologie Médical et Biologie, Institut Gustave Roussy, 39, rue C. Desmoulins, Villejuif 94805 Cedex, France

Abstract

Telomerase is a ribonucleoprotein complex composed of at least two essential components, the reverse transcriptase catalytic subunit, hTERT, and the RNA component, hTR, which acts as a template for the synthesis of TTAGGG repeats by hTERT. Telomerase is highly active in more than 90% of all malignancies, and therefore considered as a hallmark of cancer progression because of its ability to immortalize cancer cells. Neuroblastomas are unfavourable malignant tumours due to resistance to current chemotherapy, and many studies indicate an association between a high telomerase activity to maintain telomere length and a poor clinical outcome. We used a stage 4 neuroblastoma cell line (IGR-N-91) as a model to characterized the phenotypic and genotypic alterations that are associated with telomerase activity modulation owing to the stable expression of either a wild-type hTERT (WT-hTERT) or a catalytically-inactive dominant-negative mutant of hTERT (DN-hTERT). Our results show that telomerase inhibition by DN-hTERT drives cells from N (neuronal) to S (substrate adherent) phenotype that are more sensitive to apoptosis. Therefore, telomerase expression in neuroblastoma cells could represent an important mechanism by which it determines neuroblastoma cell fate. Interestingly, this regulation is not related to telomere length modification but rather to the modulation of the expression of selected genes involved in both neuroblastoma biology and apoptosis.

Introduction

Neuroblastoma (NB), the most frequent solid tumor in children, is an embryonic malignancy that originates from sympathetic neurons (Brodeur, 2003). Most NB are undifferentiated malignant tumors derived from neuronal crest precursors that are capable of differentiating into a variety of cells. Failure of differentiation and unlimited replicative potential might be an important step in the development of NB. NB is diagnosed as a disseminated disease (stage 4) in about 60% of the cases.

Neuroblastomas are featured by cellular heterogeneity. Some are composed of neuroblastic (N-type), substrate adherent non-neuronal (S-type), or intermediate (I-type) cells that can be distinguished by morphological and biochemical features and that undergo transdifferentiation (Ciccarone et al., 1989).

The MYCN oncogene plays a pivotal role in the progression of human NB to advanced malignancy, and its amplification has been correlated with poor clinical outcome (Brodeur et al., 1987; Rosen et al., 1986).

By contrast, caspase-8, an essential mediator of death receptor-triggered apoptosis is frequently inactivated in NB cells, especially in those with MYCN amplification (Teitz et al., 2000). This inactivation has been shown to be responsible for the resistance of NB cells to death receptor-induced apoptosis. Unlike other human cancers, p53 in NB is rarely mutated in the primary tumor. However, when mutations occurred, they were found in NB tumors with drug resistance acquired over the course of chemotherapy.

Besides its cellular heterogeneity, NB show remarkable biologic heterogeneity, resulting in favourable or unfavourable outcomes. Indeed in rare instances of disseminated NB that affects infants in the first few months of life, the tumors can regress spontaneously or differentiate in a benign ganglioneuroma. This form is called stage 4S. However, a part from these particular forms of NB, the outcome of high-risk NB remains poor and poses a major therapeutic challenge in pediatric oncology demonstrating a need of new therapeutic approaches for these patients (Brodeur, 2003).

Telomerase is a ribonucleoprotein composed at least of an RNA (template human telomerase RNA (hTR)) and a catalytically active protein subunit (human telomerase reverse transcriptase (hTERT)), which catalyses the de novo synthesis and elongation of telomeric repeats at chromosomal ends (Blackburn, 1991; Feng et al., 1995b; Meyerson et al., 1997a). By maintaining telomere length, telomerase acts to control cell survival and is obligatory for continuous tumor cell proliferation. The canonical role of the telomerase is now well established, however, there is growing evidence that

telomerase has other (non-canonical) functions in several essential cell signalling pathways, including apoptosis (Dudognon et al., 2004; Gorbunova et al., 2002; Lee et al., 2008; Santos et al., 2006), differentiation (Choi et al., 2008; Sarin et al., 2005), DNA damage responses (Masutomi et al., 2005), and regulation of gene expression (Choi et al., 2008; Smith et al., 2003). Recent works suggest that these functions can be divided further into those that require telomerase activity but not telomere lengthening and those that require neither telomerase activity nor telomere shortening (Cao et al., 2002). Telomerase activity is not or poorly detected in most human somatic cells, whereas it is high in germ cells and tumor cells, including NB. In NB, increased level of telomerase activity was found to be associated with advanced stage and poor survival outcome. Indeed, aggressive NB expressed high levels of telomerase activity, whereas favourable tumors had no or low telomerase expression (Hiyama et al., 1997b; Hiyama et al., 1995a; Reynolds et al., 1997a). Therefore, low telomerase activity appears to be linked with regression or maturation of NB as it can be seen in the particular group of 4S stage neuroblastoma.

Because of its activity present in most cancer cells, telomerase is an attractive anticancer therapeutic target (Pendino et al., 2006). Many strategies have been used to target hTERT such as oligonucleotides, ribozymes, or small interfering RNA. Direct inhibition of telomerase activity using a mutant catalytic subunit (DN-hTERT) has been shown to induce telomere shortening, limits the growth of human cancer cells and decreases tumorigenicity of cancer cells *in vivo* by the induction of apoptosis or senescence depending on the cell line used (Hahn et al., 1999c; Nguyen et al., 2009; Pantic et al., 2005; Poynter et al., 2009; Preto et al., 2004; Roth et al., 2003).

The aim of our present investigation was to characterize the phenotypic and genotypic alterations that are associated with telomerase activity modulation in a stage 4 neuroblastoma cell line (IGR-N-91). We find that telomerase inhibition due to the stable expression of a dominant negative variant of hTERT induces the selection of a cell population with a more differentiated phenotype and sensitize cells to drug-induced apoptosis. Interestingly, these effects were observed in absence of any telomere shortening and results from modification in the expression of selected genes involved in both apoptosis and telomere biology.

Material and Methods

Cell cultures: The human MYCN-amplified NB IGR-N-91 cell line was established from a stage-4 NB infiltrated bone marrow of a patient after unsuccessful adriamycine-vincristine chemotherapy (Ferrandis et al., 1994) was kindly provided by Dr Bénard (IGR, Villejuif). The GM847 (SV40 immortalized human skin fibroblasts) cell line was a gift from Dr Olivia Pereira-Smith (Baylor College of Medicine, Waco, TX). The cells were cultured either in DMEM/F12 (IGR-N-91) or DMEM (GM847) supplemented 10% fetal bovine serum, penicillin (50 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml), and L-Glutamine (2 mM), (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), and incubated at 37°C at 5% CO₂ atmosphere (Binder Incubators, Nanterre, France).

Drugs: cis-platin was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), staurosporine from Roche and TRAIL from Alexis.

Vector constructions and infections: Cells were transduced with retroviral vectors which drives expression of both transgenes and green fluorescent protein (GFP) from a single bicistronic message as previously described (Pendino et al., 2001b). Mig-R1-wild type (WT) hTERT and Mig-R1-Dominant Negative (DN) form of hTERT (Mig-R1-DN-hTERT) vectors were obtained by subcloning the catalytic unit of human telomerase sequence from pBABE-puro-WT-hTERT and pBABE-puro-DN-hTERT constructs kindly provided by Dr Robert A. Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA) into the murine stem cell virus vector Mig-R1 containing encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sequence and GFP as a reporter gene (Pui, JC, 1999), so that 59 viral long terminal repeat (LTR) promoter drives its expression. DN-hTERT is a catalytically inactive dominant-negative form of hTERT obtained by substituting the aspartic acid and alanine residues at position 710 and 711 in the third reverse transcriptase motif of hTERT with valine and isoleucine, respectively (Hahn et al., 1999b). Each Mig-R1 construct and pN8 epsilon vectors containing Moloney murine leukemia virus gag pol and vesicular stomatitis virus-G sequences were transfected into the HEK293 EBNA cell line by using Exgen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Mig-R1 control vector Mig-R1-hTERT-WT and Mig-R1-hTERT-DN supernatants were harvested for further IGR-N91 cell infections, which were carried out in the

presence of 4 µg of Polybrene/ml. To avoid the possibility of selection bias associated with the isolation of clones stably expressing the various transgenes, infected neuroblastoma cells were sorted two days later for GFP fluorescence and analyzed as unselected pools of GFP-expressing population.

Reverse transcription (RT)-PCR experiments. Total cellular RNA was collected from samples using TRIzol reagent (Invitrogen, France) as described by the manufacturer. RNA yields and purity were determined spectrophotometrically at 260-280 nm. Reverse transcription (RT) reaction was carried out using “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer’s instructions with oligo(dT)₈ primers. The cDNA samples were amplified in a 25 µl reaction mixture containing 50 µM each of the four deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega, France), and 0.4 µM specific primers (Primer sequences are shown in Table 1). The cDNA samples were amplified for 30 cycles (94°C for 30s, 56°C for 30 s and 72°C for 45 s). For the internal control GAPDH, the annealing temperature was 62°C. The PCR products were separated on a 2% agarose gel. After staining with ethidium bromide, the gels were visualized under UV light and photographed.

Real-time quantitative PCR analysis of hTERT expression: cDNA samples were prepared as above. The expression of full length hTERT transcripts in leukemic cells was quantified by fluorescence real-time RT-PCR using the LightCycler® technology and the “Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green” kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences were 5'-CGGAAGAGTGCTGGAGCAA-3' for the sense primer located in exon 3 (hTERT-LCS) and 5'-CTCCCACGACGTAGTCCATG-3' for the antisense primer located in exon 4 (hTERT-LCR). hTERT level was normalized to the expression of the housekeeping gene GAPDH measured in parallel.

Real-time quantitative PCR quantification of MYCN copy number. In a copy number quantitation reaction, purified genomic DNA (20ng) is combined with (i) the Taqman® Copy Number Assay (Applied Biosystems), containing two primers and a FAM™ dye-labeled MGB probe to detect and measure copy number variation within the human genome (*MYCN*: part number 4400292), (ii) the Taqman® Copy Number Reference Assay (Applied Biosystems), containing two primers and a VIC® dye-labeled

TAMRA™ probe to detect the genomic DNA reference sequence allowing the relative quantification of copy number targets, and (iii) the FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Diagnostics, Meylan, France), containing DNA polymerase and dNTPs required for the PCR reactions. The reference gene used is RNase P, which detects the Ribonuclease P RNA component H1 (H1RNA) gene (RPPH1) on chromosome 14, cytoband 14q11.2 (RNase P: part number 4403326). Taqman® Copy Number Assays are run simultaneously with a Taqman® Copy Number Reference Assay in a duplex real-time polymerase chain reaction (PCR). The real-time PCR reaction occurs in a single well in a 20- μ l final volume, and it uses universal PCR cycling conditions (50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 60s. Reactions are run on a 96-well Real-Time StepOnePlus™ PCR System (Applied Biosystems) according to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). All reactions were run in duplicate, and amplified at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 60s. Each test sample C_T values are determined in duplicate. After amplification, data files contained the sample replicate C_T (Threshold Cycle) values for each reporter dye. The number of copies of the target sequence in each test sample is determined by relative quantification (RQ) using the comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) method (Livak and Schmittgen, 2001). We used a Human Genomic DNA (Female) provided by Promega, as calibrator. The copy number of the target is calculated to be two times the relative quantity.

Telomerase activity and telomere length assay: Telomerase activity (TA) was measured using the telomerase polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. TA was expressed as a percentage of that detected in untreated cells. Telomere lengths were determined, after isolation of genomic DNA as described previously (Segal-Bendirdjian and Jacquemin-Sablon, 1995), using a non-radioactive chemoluminescent assay developed by Roche Diagnostics (TeloTAGGG Telomere length assay). The average telomere lengths can be determined by comparing the signals relative to a molecular mass standard.

WST-1 assay for cell viability. Cell viability was measured using the WST-1 assay (Roche, Germany). IGR-N-91 cells (8×10^3 cells/well) were seeded in triplicate in 96-well plates (Costar, Cambridge, MA) and

were cultivated for 24 h, prior to drug addition. Drugs were added at the following concentration ranges: Etoposide: 0–200 μ M, Staurosporine: 0–200 nM, Cisplatin: 0–50 μ M, TRAIL: 25-200 ng/ml After 48 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air incubator. WST-1 labelling mixture was added and the cells were incubated for additional 3 h. The absorbance of the samples, against a background control (medium alone) as a blank, was measured at 550 nm with using a microliter plate (ELISA) reader (Dy nex).

Apoptosis assay: Apoptosis was assessed by the TUNEL technology using "In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red" (Roche Diagnostics, Meylan, France), which labelled free 3'-OH DNA cleavage observed during apoptosis. After 2 washes with PBS solution, 2×10^6 cells were fixed using a 4% paraformaldehyde solution in PBS pH7.4 for 30 minutes. They were washed again once and could be stored at –20°C during 5 days in 70% ethanol solution or directly permeabilized using 0.1% Triton -0.1% sodium citrate freshly prepared, for 8 minutes on ice. After 2 washes, cells were incubated in TUNEL reaction mixture (containing Terminal deoxynucleotidyl transferase which catalyses polymerization of labelled nucleotides to free 3'OH-DNA ends of DNA stand breaks, mixed to label solution 1:50) in humid atmosphere at 37°C during one hour. After 3 final washes, TMR red labelled nucleotides, incorporated in nucleotide polymers, were detected and quantified by fluorescent microscopy.

Immunoblots. Total cellular proteins were extracted with SDS lysis buffer (SDS8%, Tris 250mM pH6.8, 2.5mM NaF, 0.2mM sodium orthovanadate , PIC 1X) and 20 μ g of proteins were separated by SDS-PAGE polyacrylamide gel (10 to 15%) and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were then saturated with 5% non-fat dry milk powder and 0.5% Tween-20 in TBS 0.5%- for 1h and probed overnight with the primary antibody. Mouse monoclonal, N-Myc (Santa Cruz, NCM II 100), caspase 8 (BD Pharmingen, 551242), CD44 (Abcam, MEM-263), caspase 3 (Calbiochem, AM-20), p53 (BD Pharmingen, 554293) and NSE (Thermo Scientific, Ab-1) were used as primary antibodies at the dilution of 1/2500 for caspase 8 and CD44 detection, 1/2000 for caspase 3, and 1/1000 for p53 and NSE detection. Rabbit monoclonal hTERT (Epitomics) was use at the dilution of 1/1000. After washing, blots were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1h and then developed by enhanced chemiluminescence (ECL, Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France),

according to the manufacturer's instructions. Rabbit polyclonal GAPDH (HRP) (Abcam, Ab9385) was used at a dilution of 1/3000 for 2h as a control for equal loading.

DNA fingerprints analysis. DNA from IGR-N-91 transduced cells, expressing DN-hTERT, WT-hTERT or control vectors, were purified as previously described (Segal-Bendirdjian and Jacquemin-Sablon, 1995). These DNAs were digested with restriction enzyme (BstNI, Haell), electrophoresed through a 20-cm long 1.1% agarose gel and transferred by blotting to a Hybond-N nylon membrane (Amersham, Life Science). The membrane was dried and baked at 80°C for 30 min and the DNA was crosslinked onto the membrane by UV radiation for 3 min. Prehybridization is carried out for 1 h at 60°C with a buffer containing 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 8), 263 mM Na₂HPO₄ and 1% bovine serum albumin (fraction V). Hybridization is carried out at 60°C overnight with the addition of ³²P-labeled single-strand M13 DNA probe. After hybridization, the membrane was washed in 2 SSC (Trisodium citrate, 30 mM, NaCl, 300 mM, pH 7.0), 0.1% SDS twice at room temperature and once at 60°C, and exposed to X-ray film.

Results

DN-hTERT selected S-type phenotypic variants from IGR-N-91 neuroblastoma cells. To study the effects of long-term expression of the catalytically inactive dominant-negative (DN)-hTERT, the wild-type (WT)-hTERT, the DN-hTERT and the control vector expressing only the green fluorescent protein (GFP) were retrovirally infected into neuroblastoma IGR-N-91 cells. Transduced cells were sorted as a population on the basis of GFP expression. We first assessed the expression of the ectopic transgenes by real-time RT-PCR, telomerase activity assay, western blot and immunofluorescence analyses compared to the GFP-control cells (Figure 1A, B, C, D). Figure 1A shows that DN-hTERT and WT-hTERT were highly expressed in the transduced cells. Western blot (Figure 1C) and immunofluorescence (Figure 1D) analyses revealed a high expression of the transgenes and showed that both DN-hTERT and WT-hTERT are mainly nuclear. We then tested if the expression the DN-hTERT could have a dominant-negative effect on endogenous telomerase enzyme by measuring telomerase activity of cell extracts prepared from mock, WT-hTERT and DN-hTERT expressing cells by TRAP assay. As shown in Figure 1B, DN-hTERT expressing cells demonstrated a dramatically reduced endogenous telomerase activity (more than 80%), whereas WT-hTERT expressing cells exhibited almost a 4-fold increase level of telomerase activity compared to the control vector transduced cells. Note that although WT-hTERT transduced cells demonstrated a stable expression of hTERT mRNA and telomerase activity throughout the 180 day-treatment, DN-hTERT transduced cells displayed a decline of the expression of the transgene by day 120 leading to a re-induction of telomerase activity from 15% of the control cells by day 21 to 50% by day 160 (data not shown).

We next determined whether inhibition of telomerase activity influenced telomere length in IGR-N-91 cells. Despite the high telomerase activity inhibition, telomere length was maintained even at late population doublings (Figure 1G). As expected, cells ectopically expressing hTERT displayed increased telomere lengths. Note that telomere length of control cells slightly decreased over the course of serial passages. Decreased telomerase activity is generally associated with cell growth arrest and loss of viability. To evaluate the effect of the hTERT-DN transgene on cell proliferation, cells were counted regularly during more than 150 days. As shown in Figure 1F, the growth kinetics of IGR-N-91 cells expressing DN-hTERT

did not differ from those of cells carrying WT-hTERT or the control vector. This lack of effects on growth proliferation and viability was confirmed by clonogenic assays (Figure 1E). These data indicate that telomerase inhibition via the expression of DN-hTERT leads neither to telomere shortening nor to loss of proliferative capacity even at late passages. This observation is in marked contrast with previous descriptions reporting telomere shortening and subsequent dramatic loss of viability in cells expressing dominant-negative hTERT (Hahn et al., 1999b; Zhang et al., 1999b).

Importantly, as shown on Figure 2, hTERT-DN expressing cells showed a progressive loss of their initial morphology and developed features of substrate-adherent or S phenotype with enlarged and flattened nuclei and cytoplasm. These features were different from neuronal differentiation observed after treatment of IGR-N-91 cells with 1 μ M all-*trans* retinoic acid (ATRA) for 14 days. To determine that cell lines had not become cross-contaminated with by another cell type during viral infection, expansion, and passage, we performed DNA fingerprinting on IGR-N-91 transduced cells. As assumed the DNA fingerprint profiles were very similar (Figure 2B). This result indicate a common origin for these three sublines and confirm that they were not the result of a contaminated sublines that could have been selected throughout the cell culture.

As it is assumed that N-type cells expressed high levels neuron specific enolase (NSE), an early neuronal progenitor marker but not CD44, in contrast to S-type cells, which expressed high levels of CD44 but did not expressed NSE, we analyzed the expression of these two markers. Figure 2B shows that DN-hTERT cells expressed high levels of CD44 protein and exhibited an important reduction of NSE protein compared to the empty vector transduced cells. In contrast IGR-N-91 expressing WT-hTERT displayed an increase in NSE and a decrease in CD44 proteins. This result indicates that the level of hTERT expression can determine the phenotype of NB cells, DN-hTERT expressing cells loosing their initial neuronal phenotype and developing features of S-type cells.

IGR-N-91 is a *MYCN*-amplified NB cell line (about 60 copies) and N-MYC protein level is therefore high as shown on Figure 2C. Transduction of WT-hTERT in these cells did not modify N-Myc protein expression level. In contrast, DN-hTERT transduction led to the selection of cells with a progressive loss of N-Myc protein, which became undetectable by 170 days after DN-hTERT transduction. The genomic copy number of *MYCN* was measured by real-time PCR and compared in WT-hTERT, DN-hTERT, and control

vector expressing IGR-N-91 cells. Table 2 shows a progressive loss of MYN copy number in DN-hTERT expressing cells from about 60 to 0.5. In contrast, an increase of *MYCN* copy number was observed in WT-hTERT overexpressing cells from 60 to 80. Note that in these cells the protein level remained unchanged. *MYCN* amplification in neuroblastoma tumor is a significant marker of advanced stage tumors and risk of relapse. Moreover it has been shown that the loss of amplified sequences is correlated with a loss of malignant properties and cellular differentiation (Ambros et al., 1997). Altogether our results indicate that inhibition of telomerase activity due the expression of the DN-hTERT may select S-type differentiated IGR-N-91 cells with low MYCN copy number. Conversely, hTERT may regulate the MYCN copy number and could contribute to the selection of cells that have an aggressive behaviour.

DN-hTERT causes a progressive sensitization of IGR-N-91 cells to drug-induced apoptosis.

Previous studies have established increased sensitivity to chemotherapeutic drugs after telomerase inhibition in a variety of tumor cell lines, whereas ectopic hTERT expression has been reported to protect cells from death through its antiapoptotic function (Cerone et al., 2006; Dudognon et al., 2004; Misawa et al., 2002; Nakamura et al., 2005; Ward and Autexier, 2005). However, in most cases using the DN-hTERT in order to inhibit telomerase activity, this chemosensitization had been associated with telomere maintenance mechanism. Even though DN-hTERT transduced IGR-N-91 cells did not show a noticeable telomere shortening, they displayed a different phenotype, therefore, we wanted to determine whether this long-term expression of the DN-hTERT modify the sensitivity of cells to chemotherapeutic drugs. Therefore, we examined the ability of IGR-N-91 transduced cells to survive treatment with cisplatin, a DNA damaging agent, staurosporine, a protein kinase inhibitor, and TRAIL, a death receptor ligand. The results of the WST-1 proliferation assay performed at both 24 and 48h of treatment showed that DN-hTERT expressing cells exhibited a greater sensitivity to all tested drugs (Figure 3A). Furthermore, the inhibition of proliferation was much more striking when cells were treated after long-term expression of DN-hTERT (compare day 35 and day 135 after transduction). Note that the expected protective effect of WT-hTERT was noticeable also after a long-term expression of the transgene and that this protection was much more pronounced in TRAIL-treated cells.

To determine whether the decrease in cell viability caused by DN-hTERT expression was due to an increase in apoptosis, both floating and adherent cells were collected for analysis of apoptosis by TUNEL assay (Figure 3B). Neither GFP control- nor hTERT-transduced cells revealed significant apoptotic nuclei. In contrast, drug treatments produced significantly high levels of apoptosis in the hTERT-DN transduced cells and sensitization to apoptosis was higher at 135 days after hTERT-DN transduction confirming and extending the results obtained with the WST-1 proliferating assays.

Modulation of hTERT expression influences the expression of proteins involved in differentiation, apoptosis and/or DNA damage pathways. The above studies demonstrate a differential expression of proteins between WT-hTERT and DN-hTERT expressing cells, including NSE, CD44 and N-Myc. To investigate the mechanisms by which hTERT-DN expression sensitize cells to drug-induced apoptosis, we performed immunoblots to analyse the expression pattern of selected proteins known to have a functional role in neuroblastoma biology and participate in differentiation, apoptosis and/or DNA damage pathways, including p53, caspase-8.

IGR-N-91 cells expressed both wild-type p53 and a mutant form with an abnormal molecular weight due to the previously identified duplication of exon 7-8-9 (Goldschneider et al., 2006). This insertion of exons 7, 8, 9 in tandem was confirmed by RT-PCR spanning exons from 1 to 11 (Figure 4A). Indeed, PCR products submitted to electrophoresis showed a band of 1750 bp instead of 1432 bp. However, the mutated form of p53 was predominantly detected in control, WT-hTERT, and DN-hTERT cells up to 21 days after transductions (Figure 4A and B). Intriguingly, by 80 days after DN-hTERT transduction, the amount of the mutated form of p53 diminished in DN-hTERT cells, whereas the amount of the transcript at the expected normal molecular weight increased. Sequence analysis confirmed that the p53 detected then was the wild-type form of the protein. Western blot analysis confirmed that the continuous expression of DN-hTERT selected for a loss of mutated p53 at the benefit of the wild type p53 (Figure 4B). Note that by day 80, p53 mRNA level was significantly increased in WT-hTERT transduced cells compared to control transduced cells, although the amount of the protein was not significantly different.

Caspase 8, a key mediator of death receptor-induced apoptosis, has previously been reported to be frequently inactivated by epigenetic silencing in neuroblastoma cell lines and *MYCN* amplified tumors

(Teitz et al., 2000). The caspase 8 silencing has been shown to be responsible for the resistance of NB cells to TRAIL-mediated apoptosis (Hopkins-Donaldson et al., 2000) (Eggert et al., 2001) and to enhance the metastasis process. Caspase-8 has been also shown to play non-apoptotic roles in many tissues (Helfer et al., 2006; Kang et al., 2004). Furthermore, a recent report characterized recently a new function for caspase-8 as an orchestrator of not only apoptosis but also differentiation (Mielgo et al., 2009; Rebe et al., 2007). Figure 4C shows that vector-transduced IGR-N-91 cells, expressed moderate levels of caspase-8 mRNA and protein. DN-hTERT transduced cells expressed displayed a significant increase of the expression of this protein at both mRNA and protein levels, while WT-hTERT expressing cells demonstrated a decreased of its expression. Note that all transduced cells expressed similar levels of procaspase-3. The specific modulation of caspase 8 expression by DN-hTERT has been also observed using another neuroblastoma cell line (SK-N-BE2) suggesting that this effect is not cell line specific (data not shown). These results suggest a possible regulation of caspase 8 expression by hTERT that may contribute to determine cellular sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic agents.

Discussion

The mechanisms by which telomerase regulated NB biology, are an important open question with implications for tumorigenesis and therapeutic strategies.

Our study suggests a model in which the continuous expression of DN-hTERT in N-type neuroblastoma cells contributes to drive these cells from N to S phenotype through modifications of gene expression.

These conclusions are supported both by morphological analysis as well as modifications in the expression of genes characteristic of either of the phenotype. Indeed, NSE a common tumor antigen used as a marker for the detection and progression of neuroblastoma is lowly expressed in DN-hTERT cells whereas it remains expressed in WT-hTERT cells. In the other hand expression of CD44, a marker of S-type neuroblastoma cells is lost in WT-hTERT cells whereas it remains expressed in DN-hTERT transduced cells.

Besides we found other differences in important genes involved in neuroblastoma biology such as *MYCN* and *p53*. *MYCN* amplification in neuroblastoma tumors is a marker of advanced stage tumors and risk of relapse, moreover it has been shown that the loss of amplified sequences is correlated with loss of

malignant properties and cellular differentiation (Brien et al., 1997). We show that in IGR-N-91 cells, the continuous expression of DN-hTERT results in a dramatic loss of *MYCN* copy number leading to the disappearance of *MYCN* protein expression, whereas the overexpression of WT-hTERT induces an increase in *MYCN* copy number. Because S phenotype in neuroblastoma cell lines is considered as a phenotype that has lost malignant properties, it is assumed that this switch from an N-type into a S-type represents a processus of cell reversion. Our results are in agreement with previous studies demonstrating an inducible elimination of *MYCN* copies leading to a tumoral reversion phenotype in some restricted neuroblastoma cell lines carrying *MYCN* amplified double minute chromosomes. Therefore our observations suggest a strong link between hTERT expression and *MYCN* copy number. This relationship can be involved in the selection process of tumors with a more or less aggressive behaviour. However, in the model it is not possible to distinguish a tumoral reversion due to the long-term expression of DN-hTERT from a selection process of a cell population already present at a very low level in the initial cell population. Nevertheless, our finding strongly supports the evidence of an actively regulated process induced by telomerase, although the underlying mechanisms accounting for this selective phenomenon remains to be elucidated.

In contrast to what is observed in up to 50% of all human cancers, p53 mutations are unusual in human NB (Hosoi et al., 1994) but when they do occur, they are found in NB tumors associated with drug resistance or at relapse (Keshelava et al., 2001; Tweddle et al., 2001a). We provide evidences that long-term culture of DN-hTERT expressing IGR-N-91 cells lead to select a cell population losing progressively the mutated p53 to the benefit of the wild-type protein.

Caspase 8 is a key enzyme at the top of the apoptotic cascade, both involved in the extrinsic or death receptors pathways and in the intrinsic mitochondrial pathway induced by some cytotoxic drugs (Bozzo et al., 2006). Several studies have reported that loss of this gene expression in neuroblastoma contributes to an aggressive disease and a metastatic phenotype while spontaneous resolving tumors (including neuroblastoma type 4S) will frequently express caspase 8 (Stupack et al., 2006; Teitz et al., 2001). Resistance of neuroblastoma cells to anticancer chemotherapy has been related to absent or reduced caspase 8 expression. It has already been demonstrated that telomerase contributes to install an immortal cell phenotype by preventing apoptosis, and may play a role in cellular resistance to anticancer drugs

(Kondo et al., 1998; Fu et al., 1999, 2000; Kushner et al., 2000). We have previously shown that a telomerase might have a function on one specific apoptotic signalling, the death receptor-induced pathway (Dudognon et al. 2004). Here, we provide further evidence of a functional link between hTERT expression and apoptotic signalling pathways through the modulation of caspase-8 expression.

Changes in gene expression profile by modulation of hTERT expression have already been described in previous studies (Armstrong et al., 2005; Li et al., 2005; Smith et al., 2003). Furthermore, genetic experiments using a dominant-negative form of human telomerase demonstrated that telomerase inhibition can result in telomere shortening, followed by proliferation arrest and cell death (Delhommeau et al., 2002; Hahn et al., 1999c; Nakajima et al., 2003; Tauchi et al., 2002; Zhang et al., 1999b). In our study we provide functional evidence that gene expression modifications could account for the progressive changes in sensitivity to drug-induced apoptosis independently of telomere maintenance mechanisms.

In conclusion, our discovery of a link between telomerase expression and neuroblastoma cell fate suggests possible new therapeutic strategies for neuroblastoma in the form of telomerase inhibitors that would be predicted to induce a less aggressive tumor behaviour through the selection of S-type phenotype while sensitizing cells to apoptosis.

Legends to the figures

Figure 1: Transduction of hTERT-DN in IGR-N-91 neuroblastoma cells inhibits telomerase activity but has no effect on telomere length.. After transduction with retroviral vectors, IGR-N-91 cells were sorted on the basis of GFP expression and expanded. Transduced cells were analyzed for (A) hTERT mRNA level by real-time quantitative PCR, (B) telomerase activity (TA) by TRAP assay, (C) protein level by immunoblot and (D) immunofluorescence. GAPDH was used as a loading control. (E) DNA samples were collected at the indicated days after infection with DN-hTERT or hTERT. Size markers are indicated on the side of a representative gel. IGR-N-91, vector control cells (EV), and WT-hTERT-IGR-N-91 (WT) cells served as useful controls. (F) Proliferation of IGR-N91 cells was not inhibited by hTERT-DN expression. After retroviral transduction, cells were counted regularly during more than 150 days.

Figure 2: hTERT-DN expression promotes cell differentiation. (A) Cell morphology was analyzed after May-Grunwald Giemsa staining 63 days after transduction with WT-hTERT, DN-hTERT or control vectors. Cells transduced with DN-hTERT show a progressive loss of their initial morphology and developed features of substrate-adherent or S phenotype. These features were different from neuronal differentiation observed after treatment of IGR-N-91 cells with 1 μ M all-*trans* retinoic acid (ATRA) for 14 days. In contrast, the morphology of WT-hTERT or control cells was unchanged. (B) DNA fingerprints of IGR-N-91 transduced cell populations. ³²P-labeled single-strand M13 DNA was hybridized with Southern blot of restriction endonuclease digests of empty vector control (1, 4), WT-hTERT (2, 5) and DN-hTERT (3, 6) transduced IGR-N-91 27 days (1, 2, 3) and 160 days (4, 5, 6) after infection. Ten mg samples of DNA were digested with BstNI, HaeIII. DNA from two CML cell lines are used as unrelated DNA controls. (C) Marker proteins for N-type (NSE) and S-type (CD44) in IGR-N-91 expressing either the empty vector (EV), the WT-hTERT (WT) or DN-hTERT (DN) were analyzed at 128 days after infection by western blot. S-type cells (SH-EP) and N type cells (IGR-N-91) served as useful controls.

Figure 3: DN-hTERT sensitizes IGR-N-91 neuroblastoma cells to drug induced apoptosis. (A) IGR-N-91 cells were exposed to different concentrations of cisplatin, staurosporine or TRAIL. At the indicated

time, cell proliferation was determined by WST-1 assay. (B) Apoptotic cells were detected by TUNEL staining.

Figure 4: Molecular analysis of DN-hTERT expression in IGR-N-91 neuroblastoma cells. IGR-N-91 cells were infected with retroviruses expressing either the empty vector (EV) or WT-hTERT (WT) or DN-hTERT (DN). (A) PCR analyses of p53 and caspase 8 expression at the indicated period of culture (B) and (C) Immunoblots documenting protein levels of caspase 8 and 3, p53 and GAPDH in IGR-N-91 transduced cells.

Table 1: Sequences and characteristics of gene-specific primers used for RT-PCR.

Primer name	Sequence (5' to 3')	location	Size product (bp)	Th (°C)
Caspase 8	F: CAGCATTAGGGACAGGAATG R: CAGTTATTCACAGTGGCCAT		462	56
P53	F: GCTTTCCACGACGGTGACA R: CCCACAACAAAAACACCAGTGC		1565 1492	62
GAPDH	F: AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT R: TCA TGA GTC CTT CCA CGA TAC		445	62

Table 2: hTERT regulates the MYCN copy number in the IGR-N-91 cell line. At the indicated times after infection, genomic copy number of MYCN was measured by real-time using Taqman® Copy Number Assay (*Applied Biosystems*) as described in Materials and Methods. The MYCN copy number was determined by calculated the CT difference (Δ CT) between MYCN and RNase P sequences, and then compared these Δ CT values to a calibrator sample known to have two copies of the MYCN sequence. Upper line, MYCN copy number by haploid genome. Lower line, MYCN copy number expressed as a percentage normalized to empty vector transduced cells.

Days post-infection	27			118			160			180		
	EV	WT	DN	EV	WT	DN	EV	WT	DN	EV	WT	DN
MYCN copy number	66.7	69.8	69.3	59.6	58.7	42.3	63	85.3	4.3	62.8	81.8	0.5
% (EV)	100	104	103	100	98	71	100	135	0.6	100	130	0.7

References

- Ambros IM, Rumpler S, Luegmayr A, Hattinger CM, Strehl S, et al. 1997. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary MYCN gene copies by micronucleus formation--sign of tumour cell reversion? *Eur J Cancer* 33:2043-9
- Armstrong L, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, et al. 2005. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 23:516-29
- Blackburn EH. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-73.
- Bozzo C, Sabbatini M, Tiberio R, Piffanelli V, Santoro C, Cannas M. 2006. Activation of caspase-8 triggers anoikis in human neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 56:145-53
- Brien TP, Kallakury BV, Lowry CV, Ambros RA, Muraca PJ, et al. 1997. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res* 57:2760-4.
- Brodeur GM. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203-16
- Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, Casper JT, Wasson J, et al. 1987. Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* 47:4248-53
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611-22
- Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. 2002. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21:3130-8
- Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Autexier C. 2006. Telomerase inhibition enhances the response to anticancer drug treatment in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5:1669-75
- Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, et al. 2008. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 4:e10
- Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. 1989. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* 49:219-25
- Delhommeau F, Thierry A, Feneux D, Lauret E, Leclercq E, et al. 2002. Telomere dysfunction and telomerase reactivation in human leukemia cell lines after telomerase inhibition by the expression of a dominant-negative hTERT mutant. *Oncogene* 21:8262-71
- Dudognon C, Pendino F, Hillion J, Saumet A, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. 2004. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene* 23:7469-74
- Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, et al. 2001. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 61:1314-9

- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, et al. 1995. The RNA component of human telomerase. *Science* 269:1236-41.
- Ferrandis E, Da Silva J, Riou G, Benard I. 1994. Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer Res* 54:2256-61
- Goldschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, Guillaud-Bataille M, Million K, et al. 2006. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 34:5603-12
- Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. 2002. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 277:38540-9
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. 1999a. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464-8.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, et al. 1999b. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5:1164-70.
- Helfer B, Boswell BC, Finlay D, Cipres A, Vuori K, et al. 2006. Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. *Cancer Res* 66:4273-8
- Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, et al. 1997. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 33:1932-6.
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. 1995. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1:249-55.
- Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Boursaud KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. 2000. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 60:4315-9
- Hosoi G, Hara J, Okamura T, Osugi Y, Ishihara S, et al. 1994. Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* 73:3087-93
- Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yorgev N, et al. 2004. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* 173:2976-84
- Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, et al. 2001. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 61:6185-93
- Lee J, Sung YH, Cheong C, Choi YS, Jeon HK, et al. 2008. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene* 27:3754-60
- Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. 2005. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *J Biol Chem* 280:23709-17
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8
- Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, et al. 2005. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8222-7

- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, et al. 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-95.
- Mielgo A, Torres VA, Schmid MC, Graf R, Zeitlin SG, et al. 2009. The death effector domains of caspase-8 induce terminal differentiation. *PLoS One* 4:e7879
- Misawa M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Abe K, et al. 2002. Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int J Oncol* 21:1087-92
- Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, Sumi M, Abe K, et al. 2003. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy. *Leukemia* 17:560-7
- Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, et al. 2005. Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. *Hum Gene Ther* 16:859-68
- Nguyen BN, Elmore LW, Holt SE. 2009. Mechanism of dominant-negative telomerase function. *Cell Cycle* 8:3227-33
- Pantic M, Zimmermann S, Waller CF, Martens UM. 2005. The level of telomere dysfunction determines the efficacy of telomerase-based therapeutics in a lung cancer cell line. *Int J Oncol* 26:1227-32
- Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, Buet D, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. 2001. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6662-7.
- Pendino F, Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Lanotte M, et al. 2006. Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? *Curr Cancer Drug Targets* 6:147-80
- Poynter KR, Sachs PC, Bright AT, Breed MS, Nguyen BN, et al. 2009. Genetic inhibition of telomerase results in sensitization and recovery of breast tumor cells. *Mol Cancer Ther*
- Preto A, Singhrao SK, Houghton MF, Kipling D, Wynford-Thomas D, Jones CJ. 2004. Telomere erosion triggers growth arrest but not cell death in human cancer cells retaining wild-type p53: implications for antitelomerase therapy. *Oncogene* 23:4136-45
- Rebe C, Cathelin S, Launay S, Filomenko R, Prevotat L, et al. 2007. Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* 109:1442-50
- Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, Wang H, Lukens JN, et al. 1997. Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 33:1929-31.
- Rosen N, Reynolds CP, Thiele CJ, Biedler JL, Israel MA. 1986. Increased N-myc expression following progressive growth of human neuroblastoma. *Cancer Res* 46:4139-42
- Roth A, Vercauteren S, Sutherland HJ, Lansdorp PM. 2003. Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 17:2410-7
- Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. 2006. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet* 15:1757-68
- Sarin KY, Cheung P, Gilison D, Lee E, Tennen RI, et al. 2005. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 436:1048-52

Segal-Bendirdjian E, Jacquemin-Sablon A. 1995. Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process. *Exp Cell Res* 218:201-12

Smith LL, Collier HA, Roberts JM. 2003. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 5:474-9

Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, et al. 2006. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439:95-9

Tauchi T, Nakajima A, Sashida G, Shimamoto T, Ohyashiki JH, et al. 2002. Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, imatinib, in BCR-ABL-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 8:3341-7

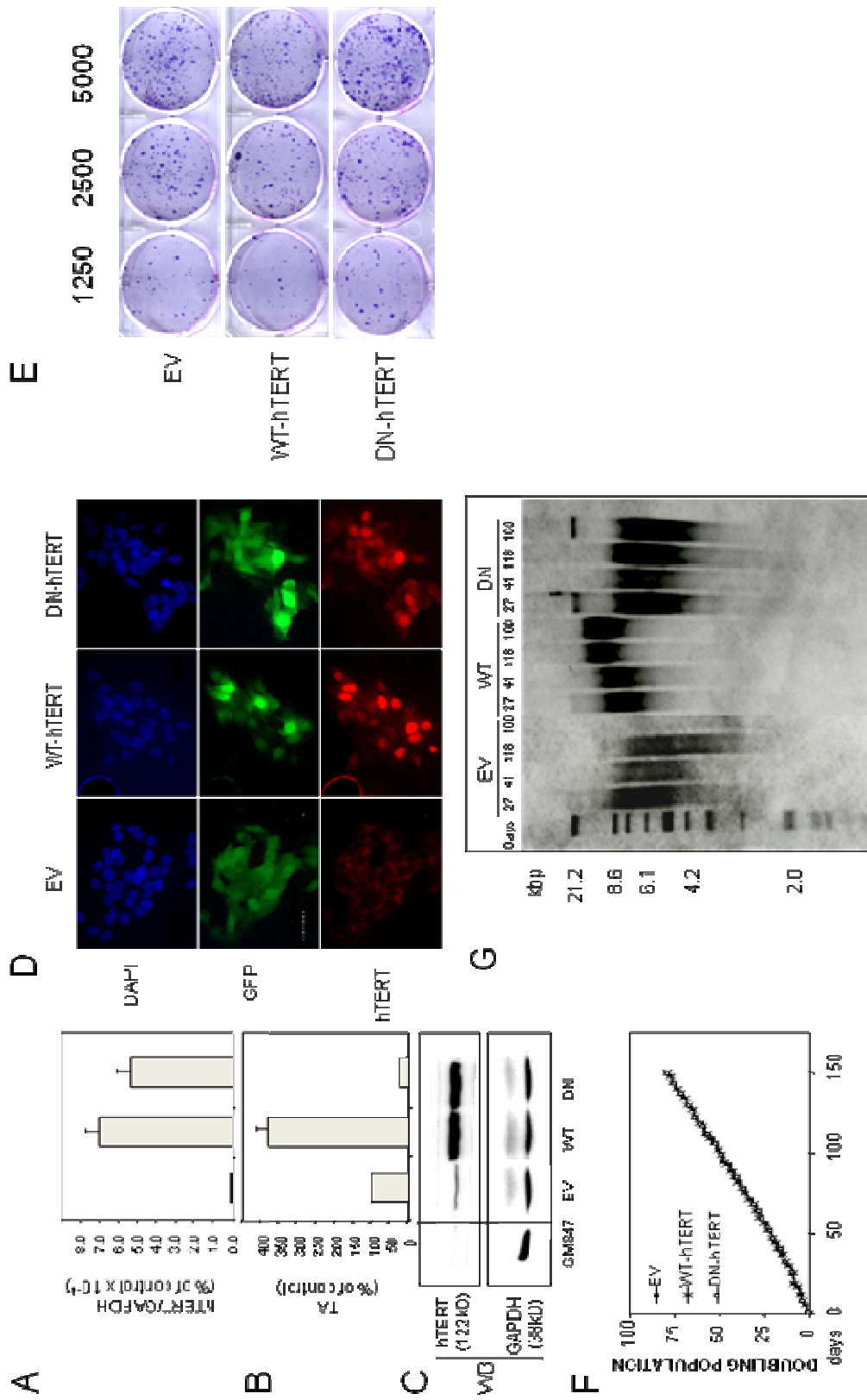
Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ. 2001. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* 79:428-36

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, et al. 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6:529-35

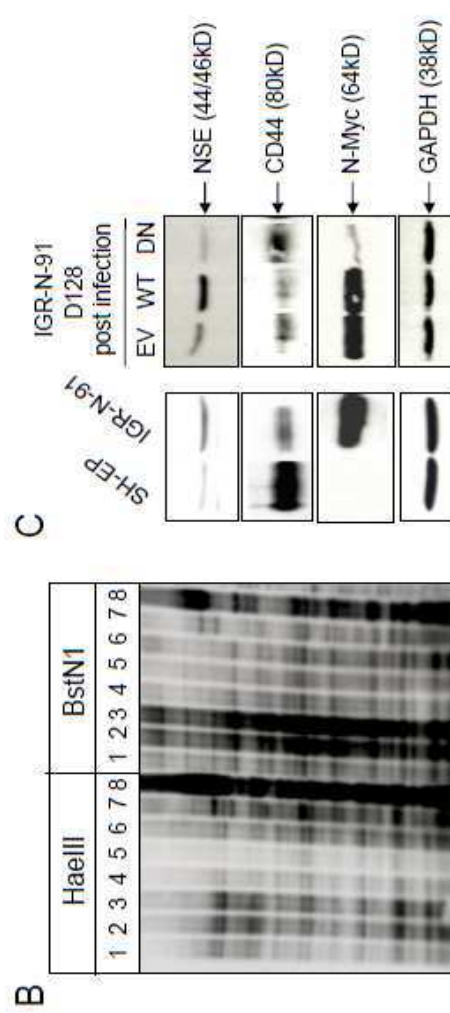
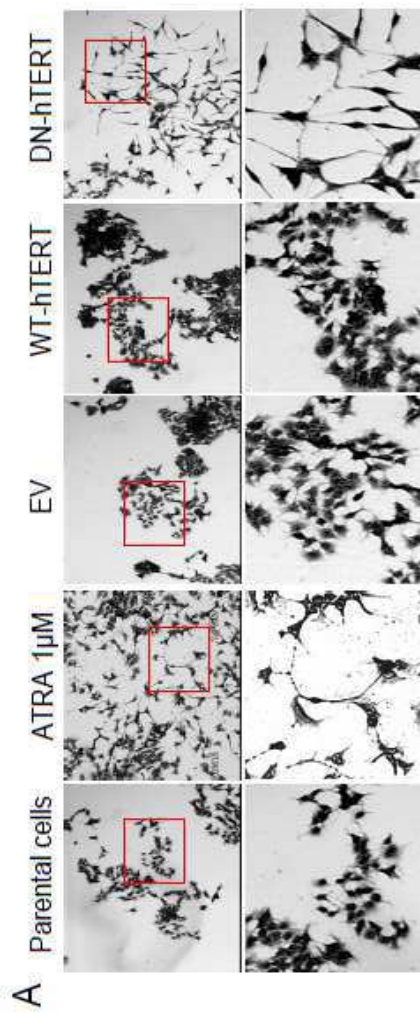
Tweddle DA, Malcolm AJ, Bown N, Pearson AD, Lunec J. 2001. Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 61:8-13

Ward RJ, Autexier C. 2005. Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. *Mol Pharmacol* 68:779-86

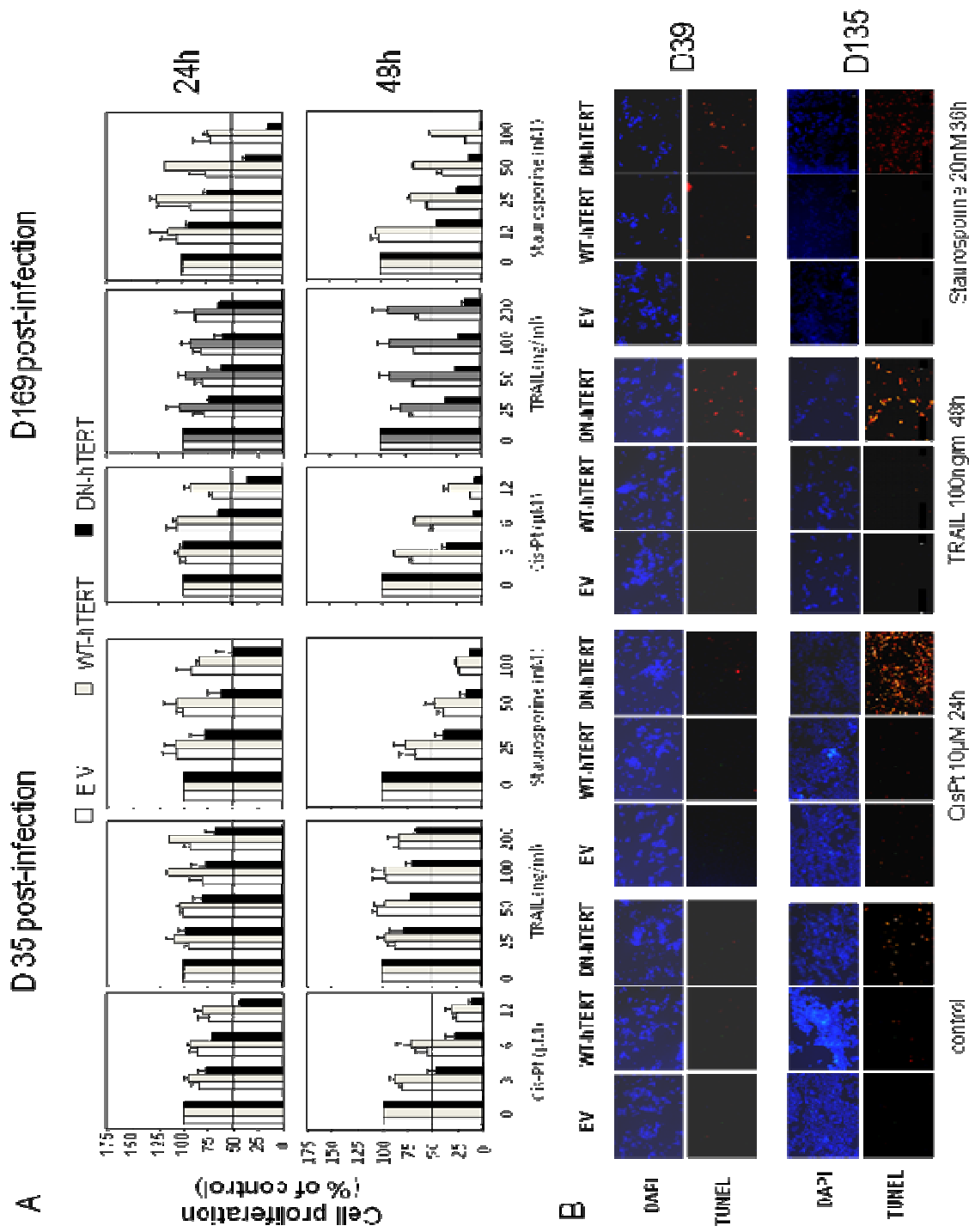
Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. 1999. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 13:2388-99.

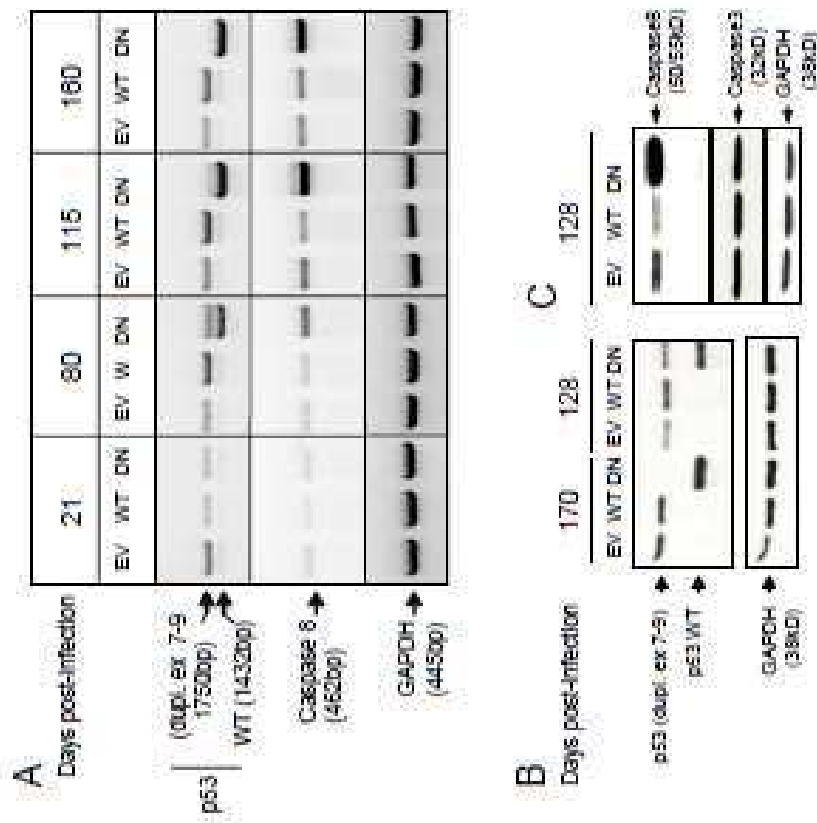


Samy et al Figure 1



Samy et al Figure 2





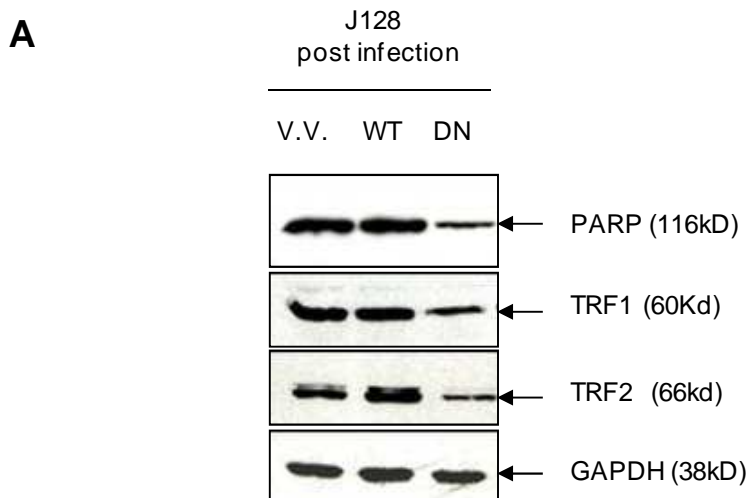
Samy et al Figure 4

B. Résultats complémentaires

1. L'inhibition de la télomérase influence le destin des neuroblastome via un mécanisme télomère-indépendant: Induction de la différenciation et sensibilisation à l'apoptose.

1.1. Les cellules IGR-N-91 hTERT-DN présentent une diminution de l'expression des protéines TRF1, TRF2 et PARP-1

Les résultats présentés dans l'article précédent montrent que la télomérase est capable de moduler l'expression de certaines protéines notamment celles impliquées dans la signalisation apoptotique. En complément de cette étude, nous avons voulu déterminer si des variations des niveaux de la télomérase affecteraient l'expression des protéines télomériques TRF1 et TRF2, toutes deux impliquées dans l'intégrité et à la protection des télomères. Les résultats présentés *figure 17A* montrent que l'expression des protéines TRF1 et TRF2 mais également celle de la protéine PARP-1 qui est impliquée dans la reconnaissance des dommages à l'ADN sont diminuées dans les cellules hTERT-DN. La diminution de la quantité de ces deux protéines dans ces cellules pourrait engendrer une "déprotection" des télomères contribuant à la sensibilisation à l'apoptose induite par les agents pharmacologiques utilisés dans notre étude. Ceci interviendrait en l'absence de modifications significatives de la longueur des télomères.



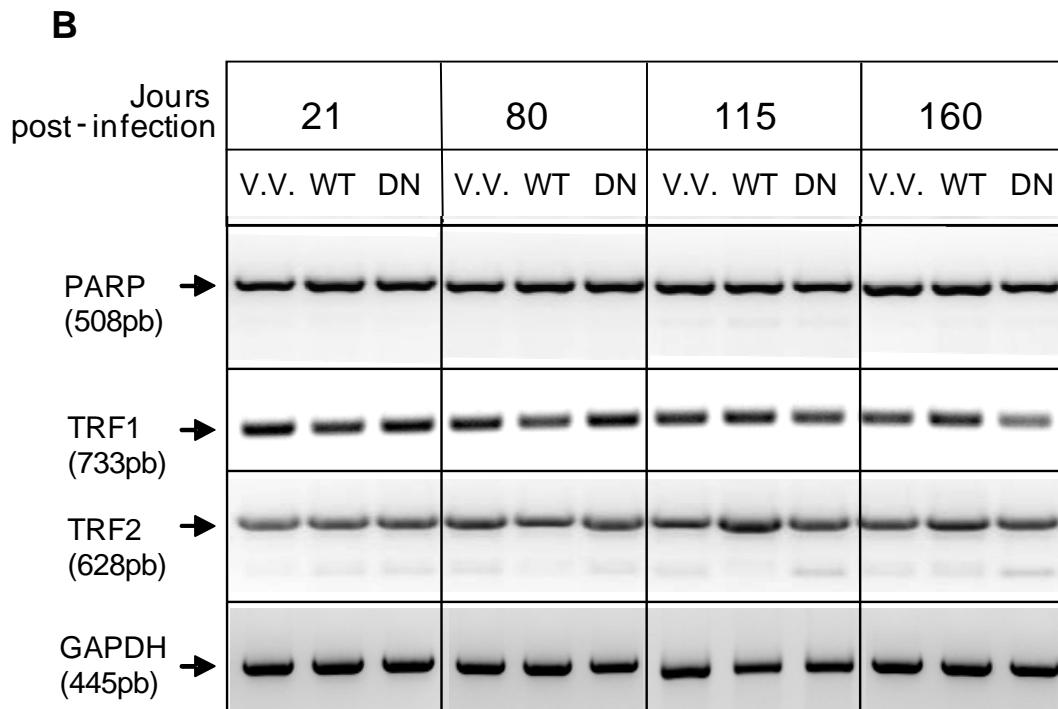


Figure 17: hTERT-DN diminue l'expression des protéines TRF1, TRF2 et PARP-1 sans modification notable des niveaux de transcrits de TRF2 et PARP-1. A. Les extraits protéiques sont préparés à partir des cellules IGR-N-91 cultivées 128 jours après transduction et sont analysés par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués. **B.** L'expression en ARNm des protéines correspondantes est évaluée par RT-PCR classique. V.V.= vecteur vide, WT=hTERT-WT, DN=hTERT-DN

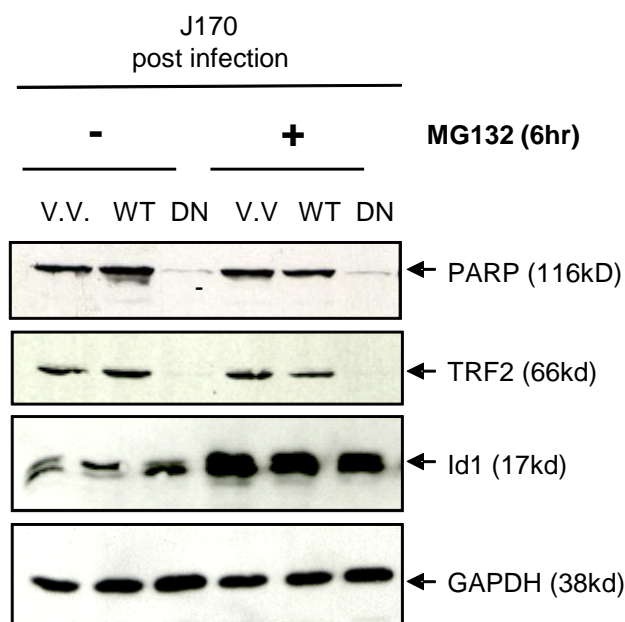


Figure 18 : Le traitement des cellules surexprimant hTERT-DN par un inhibiteur du protéasome ne restaure pas une accumulation des protéines TRF2 et PARP-1. Les extraits protéiques sont préparés à partir des cellules traitées durant 6h avec 2,5µM de l'inhibiteur du protéasome MG132 et sont analysés par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués. La protéine Id1 (inhibitor of DNA binding 1) est utilisée comme contrôle de l'efficacité du MG132 et la glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogenase (GAPDH) comme contrôle de charge. V.V.= vecteur vide, WT=hTERT-WT, DN=hTERT-DN

Contrairement à TRF1, la diminution de la quantité de protéines TRF2 et PARP-1 ne serait pas le résultat d'une régulation transcriptionnelle. En effet, la quantité de chacun des transcrits mesurée par RT-PCR (*Figure 17B*) ne semble pas être significativement modifiée. Ces observations nous ont donc conduit à envisager l'hypothèse d'une régulation post-traductionnelle faisant intervenir la voie du protéasome (Herbst et al., 2004; Sears, 2004). Cependant l'ajout d'un inhibiteur du protéasome (MG132) à la culture cellulaire ne modifie pas le profil d'expression des protéines TRF2 et PARP-1 (*Figure 18*). En revanche, nous observons une accumulation de la protéine Id1 à la fois dans les cellules témoins et les hTERT-WT et -DN ce qui témoigne de l'efficacité du MG132 dans l'inhibition de la dégradation de cette protéine par le protéasome. **Ainsi, ces résultats suggèrent que la diminution des protéines TRF2 et PARP-1 dans les IGR-N-91 surexprimant hTERT-DN n'est pas le résultat d'une augmentation de la dégradation spécifique par la voie du protéasome et laisse à penser que d'autres mécanismes de régulation pourraient intervenir dans ces cellules.**

1.2. L'expression ectopique d'hTERT-WT ou hTERT-DN ne modifie pas la sensibilité des cellules SK-N-BE(2), SK-N-AS et SH-EP aux agents cytotoxiques

Nous avons également cherché à évaluer la réponse apoptotique au cisplatine, à la staurosporine et l'étoposide ainsi qu'à TRAIL dans d'autres lignées de neuroblastome plus ou moins sensibles aux agents chimiothérapeutiques, dont les caractéristiques sont présentées *tableau 6*. Contrairement à ce que nous avons observé dans les IGR-N-91, la modulation du niveau d'activité télomérase par l'expression ectopique d'hTERT-WT ou hTERT-DN ne semble pas modifier la sensibilité des cellules SK-N-BE(2), SK-N-AS et SH-EP à l'apoptose induite par la staurosporine, le cisplatine, l'étoposide, TRAIL et par la combinaison cycloheximide+TRAIL (*Figure 18*). Néanmoins, ces expériences ont été réalisées peu de temps après l'infection rétrovirale et il n'est pas exclu que la sensibilisation à l'apoptose

induite par ces mêmes agents n'est pas eu le temps de se mettre en place dans les cellules hTERT-DN. De plus dans les SK-N-BE(2), nous avons remarqué une perte de l'expression des vecteurs en quelques semaines, visible par de la décroissance de la fluorescence émise par la GFP. Cette perte d'efficacité des transgènes nous a contraint à interrompre nos expérimentations dans cette lignée. D'autre part, les cellules SH-EP semblent être au départ particulièrement sensibles à l'ensemble des agents cytotoxiques testés, ce qui rend peut être plus complexe l'observation d'un effet du mutant d'hTERT sur la chimiosensibilisation de la lignée SH-EP hTERT-DN. Enfin, il n'est pas exclu que l'inhibition de l'activité télomérase ne soit pas suffisante pour restaurer une sensibilisation dans les trois autres lignées.

	SHEP	SK-N-AS	IGR-N-91	SK-N-BE2
Stade	4	4 (chimiorésistant)	4 (chimiorésistant)	4 (chimiorésistant)
Caract.	Issu de 2 sous clonage de la SK N-SH (patiente de 4 ans)	Patiente 8mois Métastase MO	Patient 8mois Métastase MO Après chimio ADR+VCR	Patient 22 mois Métastase MO Résistante à thérapie antérieure RT, ADR, VCR,Cycloph,actino
Type	S Non neuronal (Schwann/glia/melan.)		N Neuroblaste immature	I mixte
N-MYC	1 copie	1 copie	Amplifié (HSRs+DMs)	Amplifié (HSR)
Del 1p	?	Oui	Oui	Oui + t(1)p
t(17)	?	Non	Non	Oui
Statut p53	WT	Muté	Muté	Muté
Caspase 8	positive	positive	négative	négative
Caspase 10	?	positive	négative	négative

Tableau 6 : Caractéristiques cliniques et biologiques des quatre lignées de neuroblastomes.

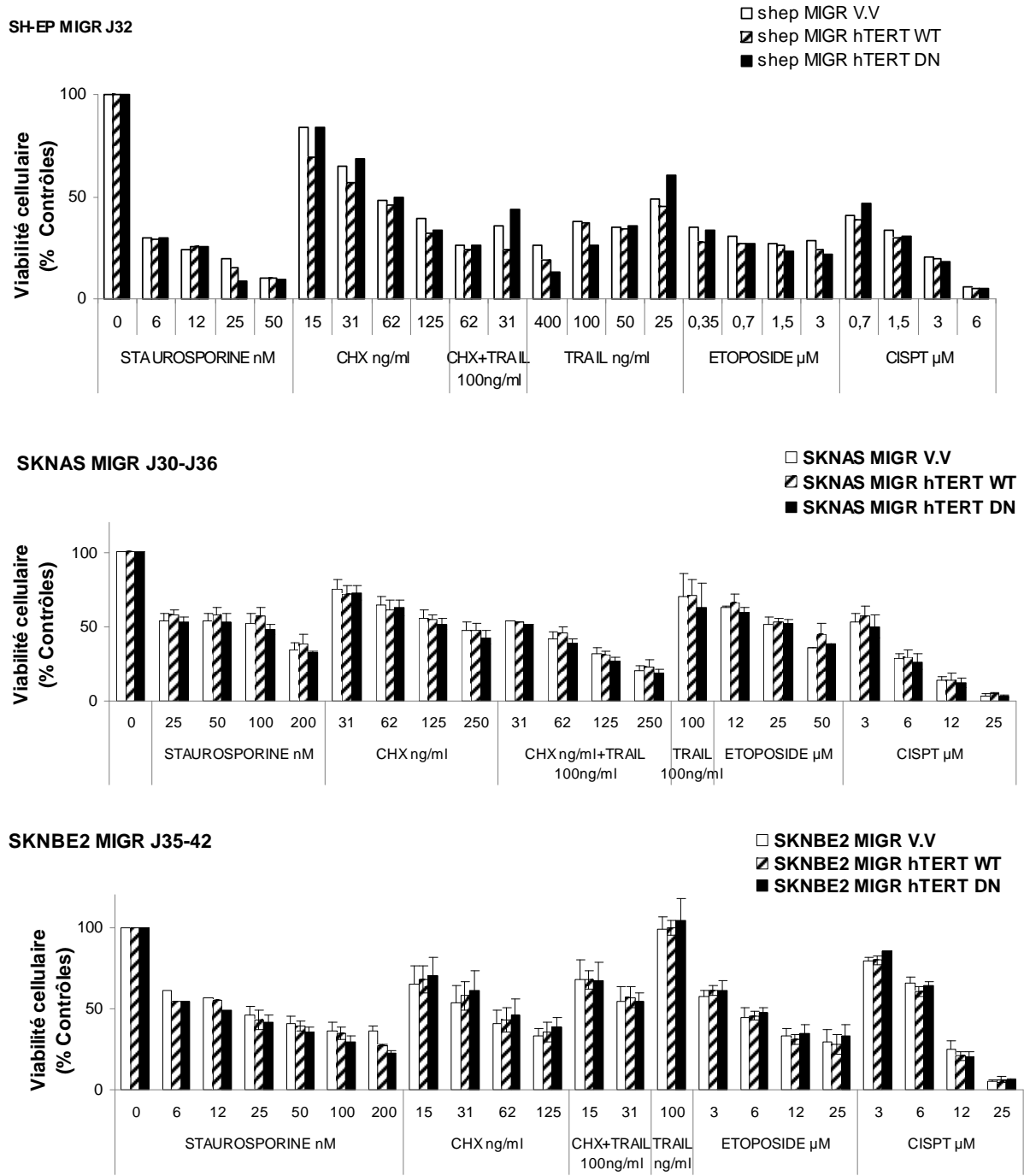


Figure 19 : la surexpression d’hTERT-WT ou hTERT-DN n’influence pas la viabilité des cellules soumises à un traitement de 48h par différents agents cytotoxiques. La viabilité des cellules SH-EP, SK-N-AS, et SK-N-BE(2) est évaluée par un test WST-1 après deux jours d'exposition à des concentrations variables de staurosporine, cisplatine, TRAIL, cycloheximide (CHX) et d'étoposide. Elle est exprimée en pourcentage de densité optique par rapport aux cellules témoins.

2. Régulation de hTERT et autres modifications en réponse à l'ATRA dans 4 lignées de neuroblastomes

Les neuroblastomes sont des tumeurs qui présentent la caractéristique particulière de régresser spontanément (Knudson and Meadows, 1980). En dehors de tout traitement, certains neuroblastomes, même s'ils présentent des métastases, sont capables de complètement régresser ou de se différencier spontanément en une tumeur bénigne appelée le ganglioneurome (Cushing and Wolbach, 1927). L'observation de cette différenciation tumorale spontanée chez les patients a conduit les chercheurs à étudier ce mécanisme *in vitro*, en utilisant des agents différenciants comme l'acide rétinoïque tout trans (ATRA).

Les réponses observées au cours des études *in vitro* et la faible toxicité de cet agent constaté lors des études de phase I, ont conduit à tester l'acide rétinoïque *in vivo*. Des études randomisées ont montré que l'acide 13 cis rétinoïque administré en traitement d'entretien chez des patients atteints de neuroblastomes de haut risque (stade 4 ou tumeur avec une amplification de N-Myc) présente un intérêt clinique puisque ces patients ont une probabilité de survie supérieure de 15 % environ par rapport au groupe témoin (Matthay et al., 1999). Les résultats de cette étude ont conduit à une modification des protocoles thérapeutiques et à l'introduction d'un traitement d'entretien par l'acide rétinoïque chez les patients atteints de neuroblastomes à risque de récurrence élevé.

Dans études menées sur le modèle de Leucémie Aiguë Promyélocytaire (LAP) dans notre laboratoire ont montré que l'ATRA inhibe la transcription de hTERT et que cette répression peut être associée à la différenciation cellulaire mais aussi en être dissocié (Pendino et al., 2001). Le neuroblastome comme la LAP résulte d'un blocage dans le processus normal de différenciation et répond en partie à l'ATRA. Les cellules de neuroblastome peuvent exprimer de multiples phénotypes (N, S ou I). Ces possibilités de maturation et de régression spontanée font du neuroblastome une tumeur tout à fait particulière. **Ainsi, nous avons voulu déterminer si la régulation de la télomérase par l'ATRA est corrélée à la différenciation cellulaire ou peut en être dissociée comme dans le modèle de LAP et comprendre les mécanismes de cette régulation.**

2.1. Evaluation de la morphologie et de la prolifération cellulaire des lignées de neuroblastomes lors d'un traitement par 1 μ M d'ATRA

Le neuroblastome est issu de la transformation maligne de neuroblastes dérivés des crêtes neurales primordiales. A l'instar des neuroblastes normaux, les neuroblastes tumoraux peuvent se différencier en cellules neuronales après un traitement à l'acide rétinoïque (Brown et al., 2005; Chu et al., 2003; Hahn et al., 2008; Sidell, 1982).

In vitro, l'ATRA induit une différenciation neuronale des cellules neuroblastiques qui se traduit au niveau morphologique par un phénomène de croissance neuritique et d'agrégats cellulaires de type pseudoganglions. Au niveau moléculaire, cette différenciation est caractérisée par l'augmentation de l'expression de certains marqueurs neuronaux. L'acide rétinoïque induit également une diminution de l'expression de l'oncogène N-Myc (Thiele et al., 1985) et un ralentissement de la croissance cellulaire.

Nous nous sommes ainsi intéressés à caractériser la réponse à l'ATRA dans 4 lignées de neuroblastomes qui diffèrent dans leurs caractéristiques phénotypiques et génotypiques. Nous avons utilisé, deux lignées de type « S » ou Schwannien (SH-EP et SK-N-AS), une lignée de type « N » ou Neuroblastique (IGR-N-91) et une autre de type « I » ou Intermédiaire (SK-N-BE(2)).

Les cellules de type N (neuroblastique) présentent une morphologie de neuroblastes immatures (petites cellules arrondies) et sont capables de processus neuronaux. Les cellules de type S (schwannien) contrairement aux cellules de type N, sont de nature non-neuronale (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 1983) et ont une morphologie plutôt allongée dite « fibroblastic-like ». Les cellules de type I, quant à elles, présentent un phénotype intermédiaire qui leur donne la possibilité de se différencier en cellules de type N ou S (Ross et al., 2003; Ross et al., 1995) et sont considérées par certains comme cellules des souches cancéreuses de la crête neurale (Ross et al., 2003; Ross et al., 1995; Walton et al., 2004).

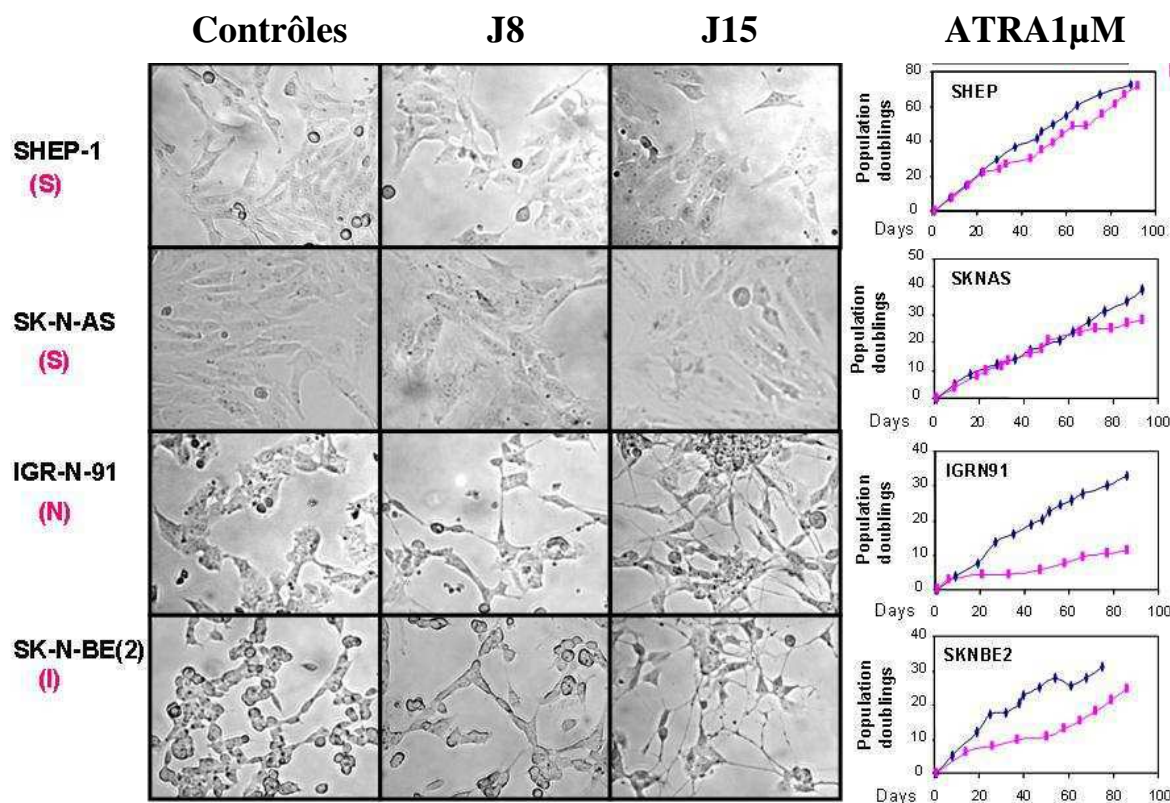


Figure 20 : Morphologie et courbes de croissance de lignées de neuroblastomes traitées ou non par 1µM d'ATRA. Micrographies en contraste de phase des lignées de neuroblastomes. A gauche, les cellules contrôle non traitées ; à droite les cellules traitées par 1µM d'ATRA (8 et 15 jours de traitement). La prolifération cellulaire est exprimée en doublements de population. Courbes bleues = Cellules non traitées ; Courbes rouges = cellules traitées par 1µM d'ATRA

Nos résultats présentés dans la *figure 20* montrent que le traitement à l'acide rétinoïque *tout trans* (ATRA) à dose pharmacologique (1µM), induit un changement morphologique des lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2), qui se traduit par un allongement des cellules, la formation d'excroissances de type neurites caractéristique de la différenciation neuroblastique et l'agrégation des cellules sous la forme de pseudoganglions (SK-N-BE(2) seulement). Après une semaine de traitement, l'ensemble des cellules de ces deux lignées commencent à acquérir un aspect différencié qui s'intensifie à 15 jours de traitement (*Figure 19*). En effet, à ce stade les neurites se sont allongées et on peut apercevoir une sorte de « réseau neuritique » qui s'établit entre les cellules.

De plus, l'induction de ce processus de différenciation est associée à un ralentissement de la croissance cellulaire. En revanche, le traitement par l'ATRA n'entraîne ni ralentissement de la croissance ni de différenciation neuritique dans les 2 lignées de type « S » (SH-EP et SK-N-AS).

2.2. Le traitement par l'ATRA conduit à la dégradation des récepteurs nucléaires RAR α et RXR α

Les rétinoïdes, qu'ils soient naturels ou de synthèse, sont capables de réguler un grand nombre de fonctions cellulaires. L'activité de ces dérivés de la vitamine A est assurée par les facteurs nucléaires RAR et RXR. L'ATRA active préférentiellement les récepteurs RAR. En revanche, il peut être métabolisé en 9-cis RA qui se lie à la fois à RAR et à RXR. Il semblerait que la signalisation ATRA et l'inhibition de croissance observée dans les neuroblastomes s'exercent en réalité par une action des récepteurs sous la forme hétérodimérique RAR/RXR (Giannini et al., 1997).

Nous avons donc vérifié par immunodétection, que les cellules exprimaient bien les récepteurs de l'acide rétinoïque notamment RAR α et RXR α (*Figure 21*). Il est décrit que les récepteurs nucléaires sont dégradés par la voie du protéasome après leur activation transcriptionnelle par leurs ligands naturels (Zhu et al., 1999a). Afin de vérifier que ces récepteurs étaient bien activés par l'ATRA, nous avons analysé l'expression protéique des récepteurs RAR α et RXR α après traitement par cet agent (*Figure 20*). D'après la *figure 20*, chacune des lignées de neuroblastome exprime les récepteurs RAR α et RXR α . Nous avons également observé une diminution des bandes correspondant à RAR α et RXR α lors du traitement prolongé par l'ATRA 1 μ M dans toutes les lignées de neuroblastomes à l'exception des cellules SK-N-BE(2). La dégradation des récepteurs RXR α mais aussi celle de RAR α semble être maximale dans la lignée IGR-N-91 sensible à la différenciation par l'ATRA. L'absence de dégradation de ces 2 récepteurs dans la lignée SK-N-BE(2) peut être interprétée comme une conséquence de la résistance à l'acide rétinoïque qui semble s'opérer au delà du premier mois de traitement. D'autres études visant à caractériser l'émergence de la résistance à l'ATRA dans la lignée SK-N-BE(2) au-delà du premier mois de traitement sont nécessaires pour étayer cette hypothèse. Ainsi, l'absence de réponse à l'ATRA dans les lignées de type « S » ne peut pas être attribuée à une absence de récepteurs à l'ATRA.

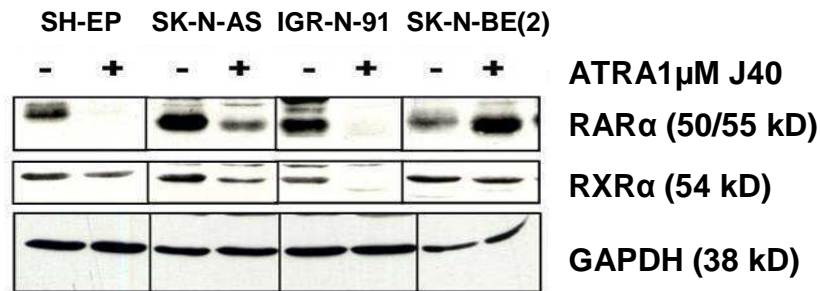


Figure 21: Expression protéique des récepteurs nucléaires RAR α et RXR α , au cours d'un traitement par l'ATRA (1 μ M). Les extraits protéiques sont préparés après quarante jours de traitement par l'ATRA (1 μ M) et sont analysés par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués.

2.3. Le traitement par l'ATRA entraîne une modulation des marqueurs phénotypiques

Afin de mieux caractériser cette différenciation sur un plan moléculaire nous avons tout d'abord entrepris de rechercher des marqueurs protéiques spécifiques permettant de discriminer les phénotypes « N » de ceux de type « S ». Nous avons alors évalué l'expression de marqueur du type « N » et de type « S » dans les lignées de neuroblastomes en dehors de tout traitement puis en réponse à l'ATRA.

Parmi les marqueurs neuroblastiques connus, nous avons testé l'expression de l'énolase spécifique des neurones. Nous avons également caractérisé ceux de type « S » comme la vimentine, le filament intermédiaire du cytosquelette (Mergui et al.; Walton et al., 2004), le récepteur membranaire CD44 et l'alpha-actinine, une protéine impliqué dans la réticulation des filaments d'actine (Walton et al., 2004).

Nous avons testé différents anticorps et avons constaté que beaucoup des marqueurs décrits dans la littérature ne sont finalement pas exclusif du phénotype « N » ou « S ». En revanche, se sont plutôt les niveaux de ces marqueurs protéiques (faible ou important) et la combinaison de plusieurs de ces marqueurs qui permet de renseigner sur la nature du type cellulaire. Contrairement à ceux que nous attendions, ni l'expression de la vimentine ni celle de l'alpha-actinine ne permet de discriminer les quatre lignées en un profil de type « N » ou « S ». En effet, en dehors de tout traitement, on retrouve des niveaux protéiques assez comparables dans ces quatre lignées. En revanche, on peut constater que le CD44 est hyper-exprimé dans les lignées de type « S » SH-EP et SK-N-AS en comparaison avec les deux

autres lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2), de type « N » et « I » respectivement. En accord avec la littérature, la NSE semble être plus exprimée dans la lignée de type « N » IGR-N-91 que dans les autres lignées non neuroblastiques (*Figure 22*). Ainsi, le CD44 et la NSE pourraient donc être de « bons marqueurs » pour discriminer les lignées de type « N » (CD44 faible et NSE forte) de celle de type « S » (CD44 fort et NSE faible) mais aussi pour caractériser une différenciation vers un lignage de type neuroblastique ou schwannien selon l'agent différenciant utilisé.

Au vu de ces premiers résultats, nous avons donc cherché à caractériser la différenciation induite par l'ATRA. En effet, l'observation microscopique de neurites et de pseudoganglions dans les cellules IGR-N-91 et SK-N-BE(2) en réponse à l'ATRA, laisse présager une différenciation de type neuronale. D'après la *figure 21*, on peut voir que l'ATRA entraîne une augmentation de l'expression de l'actine, uniquement dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2), sensibles à la différenciation induite par l'ATRA. Cette augmentation de la quantité d'actine au cours du processus de différenciation pourrait être le reflet du remodelage dynamique du cytosquelette au cours de la croissance neuritique induit par l'ATRA (Ulloa et Avila, 1996). Cette variation de la quantité d'actine au cours du traitement différenciant nous a conduit à choisir la GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) comme contrôle de charge puisqu'après vérifications elle n'apparaît pas être soumise à régulation dans notre modèle d'étude.

On peut également observer une augmentation plus ou moins forte de l'expression du marqueur neuroblastique NSE ainsi qu'une diminution du CD44 dans les cellules IGR-N-91 et SK-N-BE(2) en réponse à l'ATRA, alors que dans les cellules de type « S » l'expression de ces deux protéines ne semblent pas être affectée par ce traitement (*Figure 21*). Ce dernier résultat signifie que la différenciation induite par l'acide rétinoïque dans les cellules IGR-N-91 et SK-N-BE(2) tend bien vers un lignage de type neuronal puisque les marqueurs de type « N » semblent être induit et ceux de type « S » diminués.

Il est intéressant de noter que dans les IGR-N-91, les SK-N-BE(2) et les SK-N-AS, le traitement par l'ATRA entraîne l'apparition de bandes supplémentaires reconnues par l'anticorps dirigé contre la vimentine (*Figure 21*). Ce résultat laisse supposer que ces bandes correspondent à des fragments de vimentine. La signification de ce résultat doit être évaluée par des expériences complémentaires.

Les résultats que nous avons obtenus de l'étude de la modulation des marqueurs protéiques sélectionnés nous ont permis de valider l'analyse visuelle de la morphologie cellulaire. Ainsi, les différentes lignées de neuroblastomes sélectionnées nous permettent d'analyser l'expression de hTERT en fonction de la réponse au traitement par l'ATRA.

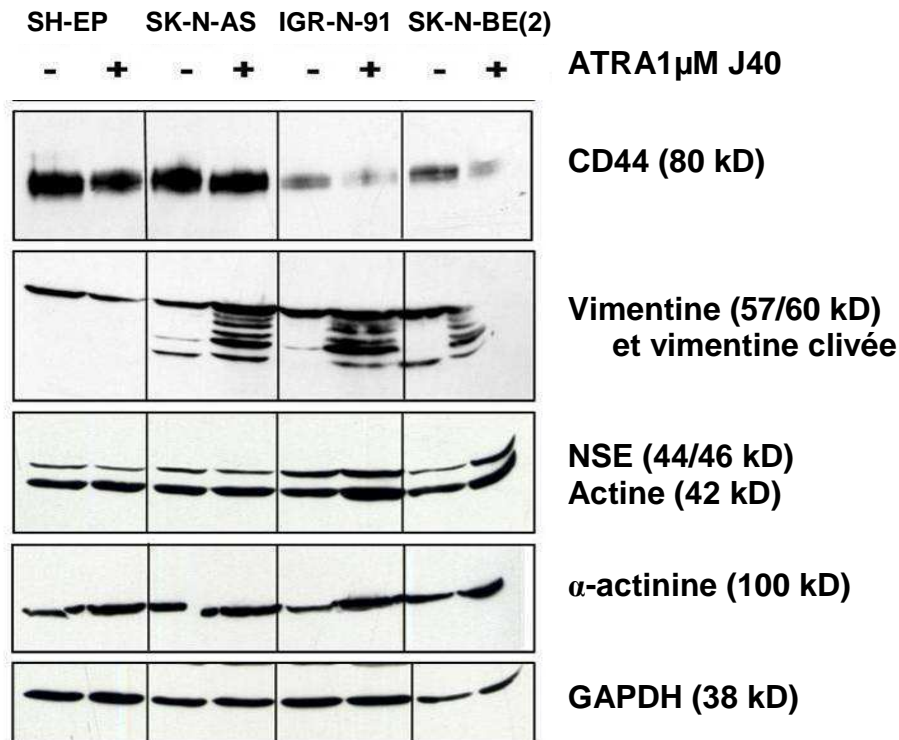


Figure 22: Expression protéique de marqueurs de la différenciation au cours d'un traitement par l'ATRA (1 μ M) dans les lignées de neuroblastomes. Les extraits protéiques sont préparés après quarante jours de traitement par l'ATRA (1 μ M) et sont analysés par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués.

2.4. Le traitement par l'ATRA diminue la quantité de transcrits de hTERT et l'activité télomérase dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2)

Des études antérieures réalisées au sein du laboratoire sur des lignées établies à partir d'un patient atteint de leucémie aiguë promyélocytaire, ont montré que les rétinoïdes exercent une régulation négative de hTERT qui peut être associée au processus de maturation ou en être dissocié. Nous avons donc voulu savoir si un traitement à des doses pharmacologique d'ATRA (1 μ M) pouvait aussi réprimer l'expression de hTERT dans les lignées de neuroblastomes et si cette modulation de la télomérase était corrélée à un

phénomène de différenciation. Pour cela les quatre lignées de neuroblastomes ont été traitées en présence ou non d'1 μ M d'ATRA puis l'expression d'hTERT ainsi que l'activité télomérase ont été évalués.

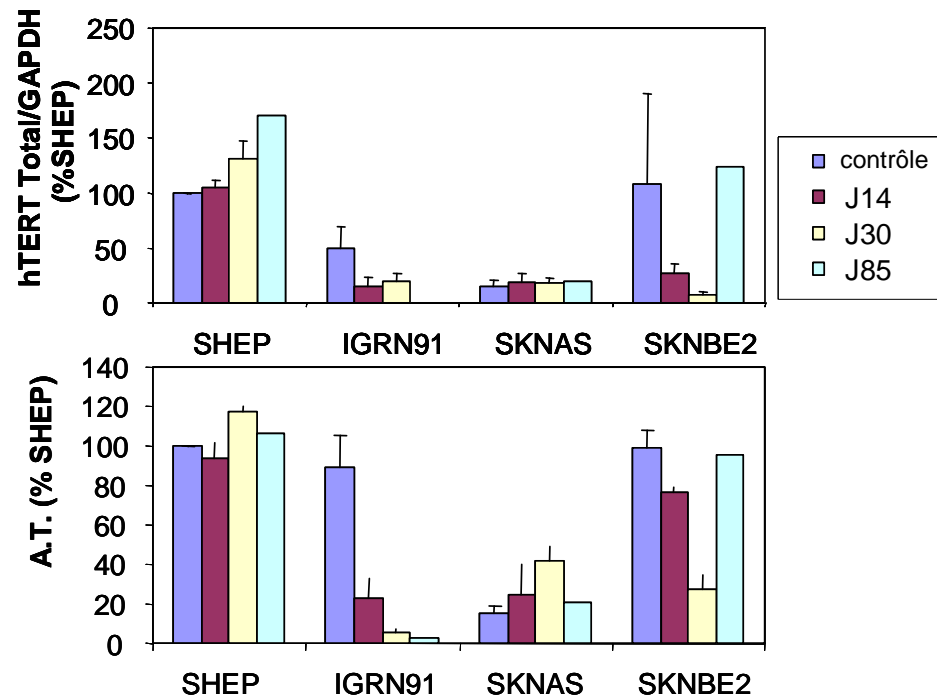


Figure 23: Traitement des lignées de neuroblastomes par l'ATRA 1 μ M: expression en ARNm de hTERT et activité télomérase. Les lignées de neuroblastomes sont traitées par l'ATRA 1 μ M. Aux temps indiqués, l'expression en ARNm de hTERT a été quantifiée par RT-QPCR à l'aide du kit "Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green" (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les taux d'hTERT ont été normalisés à l'expression du gène de référence glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogenase (GAPDH). Aux temps indiqués, des extraits protéiques ont été préparés et l'activité télomérase (AT) a été mesurée selon les instructions du kit «Telomerase Polymerase Chain Reaction (PCR) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)» (Roche Diagnostics, Meylan, France). L'activité télomérase est exprimée en pourcentage de celle détectée dans les cellules SH-EP non traitées.

Les lignées étudiées présentent une expression endogène de hTERT différente qui résulte en des niveaux d'activité télomérase variables. D'après la *figure 23*, le traitement des cellules par l'ATRA 1 μ M induit une inhibition de l'activité télomérase résultant de la diminution du taux de transcrite de hTERT uniquement dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2). En effet, ni l'activité télomérase ni l'expression de ce même messager ne semblent varier dans les lignées de type «S» SH-EP et SK-N-AS (*Figure 22*). Cette diminution de l'activité télomérase reflète une forte répression transcriptionnelle de la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT (*Figure 22*). Annoter qu'au delà du premier mois de traitement on

assiste à une réactivation de la télomérase dans les SK-N-BE(2) qui se traduit par une réapparition de l'activité télomérase basale et de l'expression de l'ARNm d'hTERT. De façon surprenante, cette réactivation de la télomérase dans les cellules SK-N-BE(2) aboutit à un rallongement des télomères (*Figure 24*). Deux explications peuvent être envisagées. La lignée SK-N-BE(2) étant particulièrement hétérogène, il est possible que l'acide rétinoïque lors du traitement prolongé ait entraîné la sélection de cellules ayant une forte activité télomérase et des télomères plus longs (les cellules ayant des télomères les plus courts auraient alors été éliminées au cours du traitement). La réactivation de la télomérase dans les cellules ayant initialement réprimé hTERT, pourrait également expliquer ce phénomène. Enfin, dans les lignées SH-EP et SK-N-AS, la taille des télomères reste globalement inchangée puisque dans ces cellules l'activité télomérase n'est pas régulée par l'ATRA. En revanche, dans les IGR-N-91 les télomères restent stables, malgré le très faible niveau d'activité télomérase atteint en réponse à l'ATRA (*Figure 22 et 23*). Cette absence de raccourcissement télomérique dans les IGR-N-91 peut être expliquée par l'inhibition de croissance induite par l'ATRA observé au cours de la différenciation.

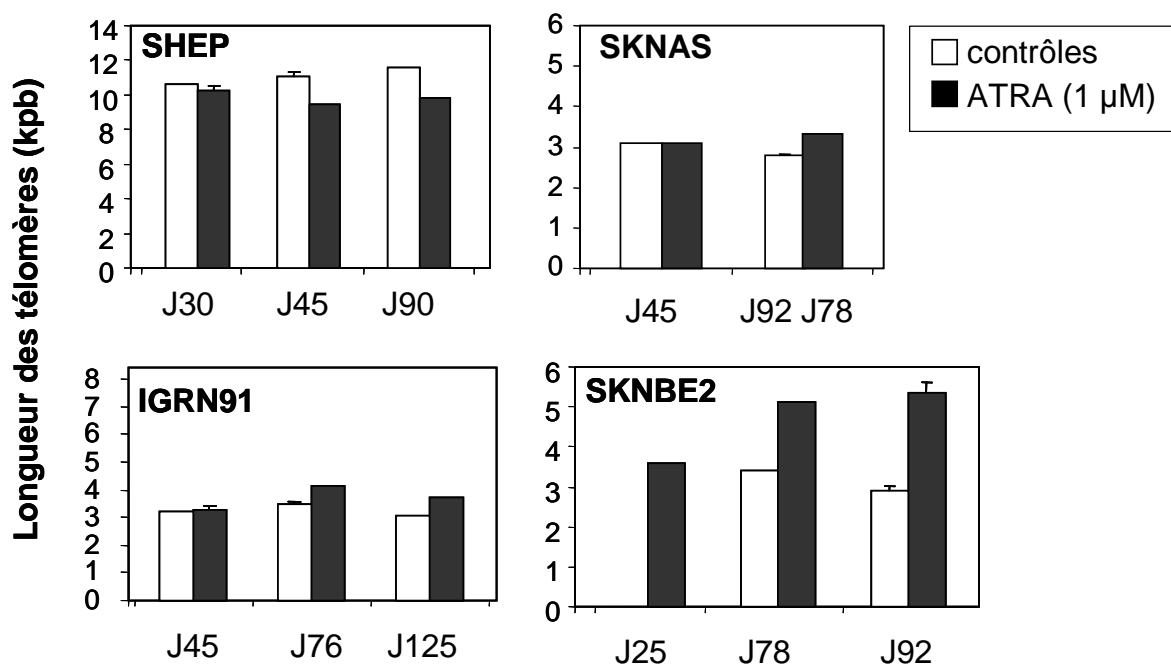


Figure 24: Evolution du profil de la longueur des télomères lors du traitement long par l'ATRA 1µM dans les lignées de neuroblastomes. Les lignées de neuroblastomes sont traitées par l'ATRA 1µM. Aux temps indiqués, les ADN des cellules de neuroblastome traitées au long cours par l'ATRA 1µM ont été extraits. La mesure de la longueur des télomères a été réalisée à partir par la technique utilisant une sonde froide chimioluminescente du kit « TeloTAGGG Telomere length » commercialisé par Roche Diagnostics (Meylan, France). La taille moyenne des télomères était déterminée en comparant le signal au marqueur de masse moléculaire. La longueur des télomères est exprimée en kilo-paire de base (kpb)

2.5. Le traitement par l'ATRA diminue l'expression de l'oncoprotéine N-Myc

L'ATRA est un agent pharmacologique connu pour diminuer l'expression de N-Myc dans les neuroblastomes (Matsuo and Thiele, 1998). Il a également été rapporté que l'inhibition de N-Myc par l'acide rétinoïque pourrait permettre la déséquestration d'un inhibiteur du cycle cellulaire, p27, et ainsi entraîner un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Matsuo and Thiele, 1998).

Dans notre étude, l'analyse de l'oncoprotéine N-Myc par immunoblot (*Figure 24*) montre que les deux lignées N-Myc amplifiées IGR-N-91 et SK-N-BE(2) expriment une quantité importante de protéine N-Myc par rapport aux lignées SH-EP et SK-N-AS qui ne possèdent qu'une seule copie du gène. En effet, dans les lignées SH-EP et SK-N-AS, l'expression de la protéine est trop faible pour être immunodétectée. Comme attendu, nous avons pu observer une disparition de la bande correspondant à N-Myc en réponse à un traitement long par 1 μ M d'ATRA dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2). Nous avons également pu observer un ralentissement de la prolifération uniquement dans ces deux types cellulaires (*Figure 24*). Nos résultats suggèrent donc que l'ATRA diminue l'expression de N-Myc et que cette inhibition semble être couplée avec un ralentissement de la croissance cellulaire.

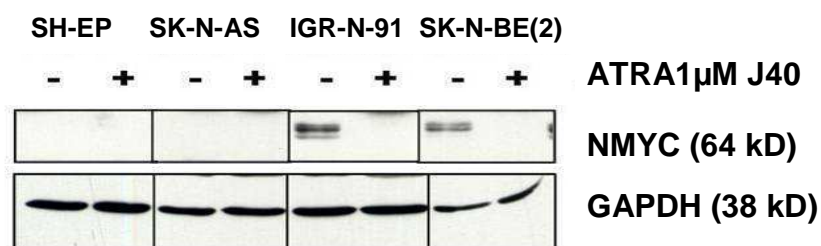


Figure 25: Le traitement par l'ATRA (1 μ M) inhibe l'expression de N-MYC. Les extraits protéiques sont préparés après quarante jours de traitement par l'ATRA (1 μ M) et sont analysés par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués.

2.6. Le traitement par l'ATRA induit la réexpression de la caspase-8 dans deux lignées de neuroblastomes sensibles à la différenciation par les rétinoïdes

Dans une large variété de cancers pédiatrique, notamment dans les neuroblastomes N-Myc amplifié, la caspase-8 est fréquemment inactivée par un mécanisme de délétion allélique ou par hyperméthylation de l'ADN (Teitz et al., 2000). Des études réalisées *in vitro* et dans des modèles animaux, ont montré que la perte de l'expression de la caspase-8 est impliquée dans la formation de métastases et la résistance aux thérapies médicamenteuses (Muhlethaler-Mottet et al., 2003; Muhlethaler-Mottet et al., 2004; Stupack et al., 2006; Teitz et al., 2006). Le traitement de neuroblastomes chimiorésistants par l'IFN- γ , par le fenrétinide, par des agents déméthylants ou par l'expression de vecteur rétroviraux codant la caspase-8 permet de re-sensibiliser les cellules à certains agents cytotoxiques (Fulda and Debatin, 2006; Fulda et al., 2001; Muhlethaler-Mottet et al., 2003; Muhlethaler-Mottet et al., 2004; Raguenez et al., 2009).

La fonction importante de la caspase-8 dans les neuroblastomes, nous a conduit à examiner le rôle de l'ATRA sur l'expression de cette protéine. Contrairement aux cellules SH-EP et SK-N-AS, les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2) expriment de très faible quantité de caspase-8 au niveau basal, comme le montre *la figure 26 A et B*. Un traitement par l'ATRA permet la réexpression de la caspase-8 via une induction de sa transcription (*Figure 25*) dans ces deux lignées. Dans les cellules de type « S », l'ATRA ne semble pas modifier le niveau de la protéine, déjà important en dehors de tout traitement. Des études récentes rapportent que la restauration de l'expression de la caspase-8 dans les cellules IGR-N-91, par un traitement avec un rétinoïde de synthèse, le fenrétinide ou par réintroduction stable de la protéine, est suffisante pour restaurer le processus apoptotique initialement déficient dans cette lignée (Muhlethaler-Mottet et al., 2003; Muhlethaler-Mottet et al., 2004; Raguenez et al., 2009). Au vu de nos résultats et en concordance avec cette observation nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle la réexpression de la caspase-8 dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2) en réponse à l'ATRA pourrait sensibiliser ces cellules à l'apoptose. Nous avons donc pré-traité les cellules IGR-N-91 par l'ATRA afin d'induire la réexpression de la caspase-8 puis ajouté au milieu de culture 10 μ M de cisplatine durant 48h. Les résultats présentés dans *la figure 27* montrent que la réexpression de la caspase-8 dans la lignée IGR-N-91 par l'ATRA ne suffit pas à sensibiliser les cellules à l'apoptose par le cisplatine. Contrairement à l'ATRA, le fenrétinide est plus efficace pour induire un processus apoptotique que la différenciation des neuroblastome et semble être plus efficace pour induire la mort cellulaire des neuroblastomes résistant à l'acide rétinoïque. Cette différence de réponse à l'apoptose dans les IGR-N-91 peut donc être expliqué par l'efficacité relative du fenrétinide par rapport à l'ATRA pour induire la mort des cellules (Ponzoni et al., 1995; Reynolds, 2000) ou par le fait

que le niveau de réexpression de la caspase-8 induit par l'ATRA est peut être insuffisant pour permettre l'initiation de la cascade apoptotique. Il serait également intéressant de tester d'autres molécules cytotoxiques, notamment les ligands des récepteurs de mort comme TRAIL ou le TNF α .

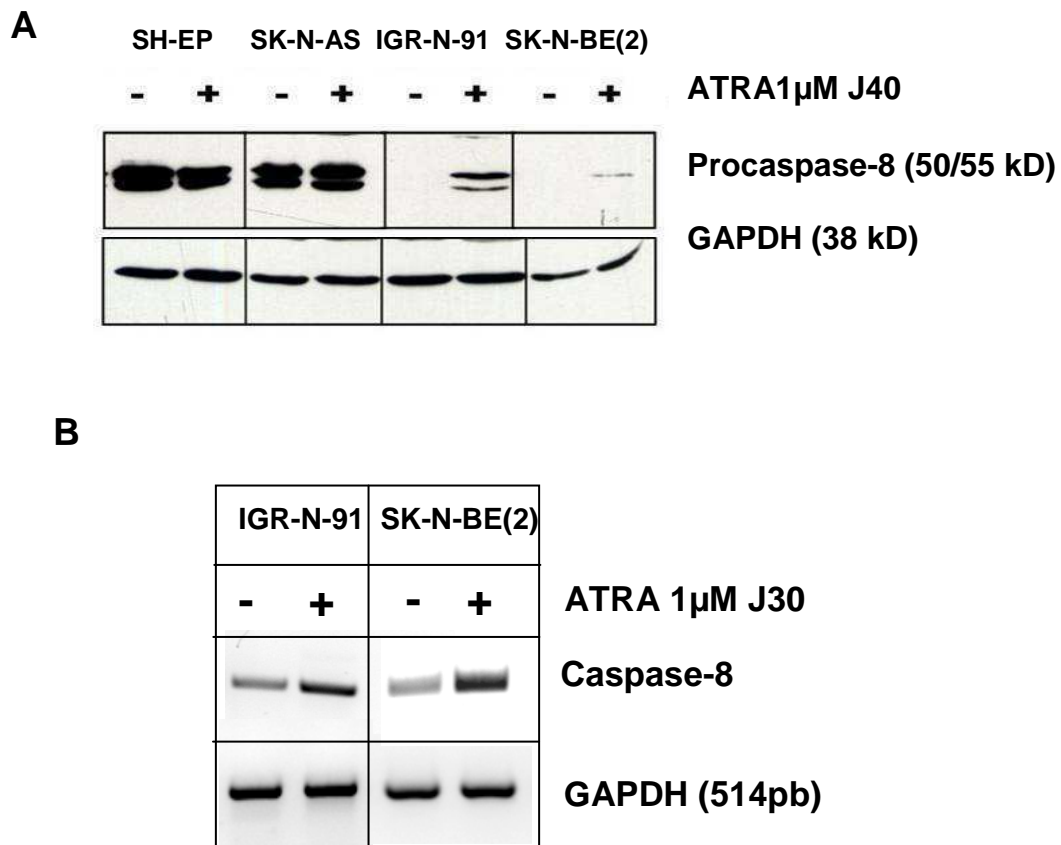


Figure 26: l'ATRA (1 μ M) induit la ré-expression de la caspase-8 dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2). **A.** Les extraits protéiques des lignées de neuroblastomes sont préparés après quarante jours de traitement par l'ATRA (1 μ M) et sont analysés par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués. **B.** L'expression en ARNm de la caspase-8 et du gène de référence glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase (GAPDH) après un traitement de 30 jours par l'ATRA, sont analysés par PCR classiques (voir conditions de PCR et séquences des primers utilisés page x).

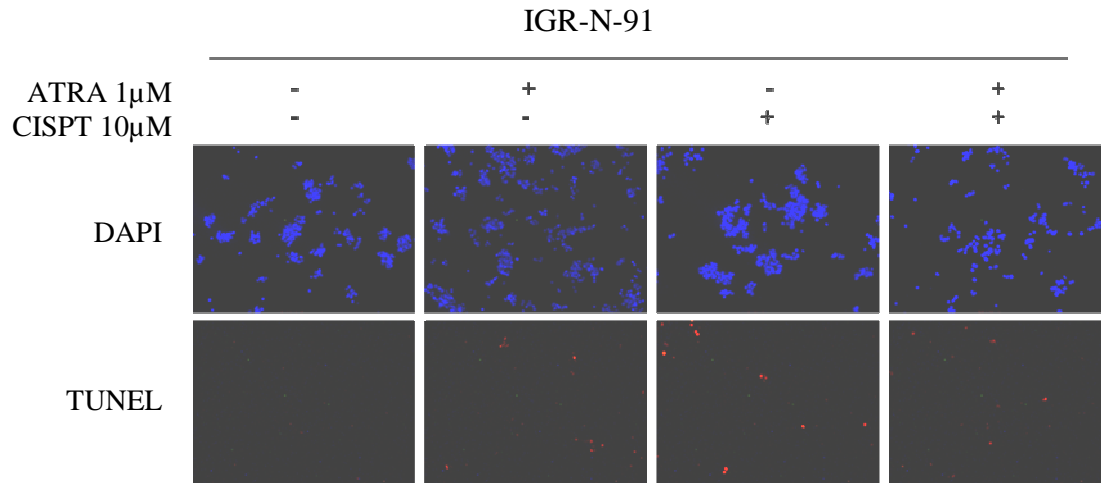


Figure 27: La ré-expression de la caspase-8 en réponse à l'ATRA (1 μ M) n'est pas suffisante pour induire l'apoptose des IGR-N-91 par le cisplatine. Les cellules IGR-N-91 sont pré-traitées ou non durant 14 jours avec 1 μ M d'ATRA puis incubées avec 10 μ M de cisplatine ou du PBS durant 48h. L'ensemble des cellules est ensuite récupéré et fixé puis l'apoptose est mesurée par le test TUNEL à l'aide du kit "In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red" (Roche Diagnostics, Meylan, France).

En conclusion de cette deuxième partie, l'ensemble de nos résultats suggère que :

- 1. L'acide rétinoïque entraîne une différenciation neuronale** caractéristique, uniquement dans les lignées de type « N » ou « I ».
- 2. Nous avons montré que la modulation de marqueur neuroblastique ou schwannien permet de renseigner sur le phénotype mais également sur la nature de la différenciation.**
- 3. Il existe une signalisation par les rétinoïdes qui conduit à la répression de la télomérase dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2) mais pas dans les deux lignées de type « S ».** Cette inhibition de la télomérase intervenant uniquement dans les lignées à potentialité neuronale semble être associée à la diminution de la croissance cellulaire mais surtout au processus de différenciation neural. Ainsi **la régulation de la télomérase par l'ATRA semble être corrélée avec la différenciation neuronale.**

4. On remarque une **réactivation de la télomérase dans la lignée SK-N-BE(2)**, qui se maintient même en présence d'ATRA. Cette réactivation semble être associée à la reprise de la croissance et à un rallongement des télomères.
5. **Les quatre lignées de neuroblastomes expriment les récepteurs RAR α et RXR α** et la stimulation de ces récepteurs par l'ATRA induit leur dégradation (sauf dans le cas particulier de la SK-N-BE(2)).
6. **L'ATRA induit la répression de la protéine N-Myc et la réexpression de la caspase-8 dans les lignées N-Myc amplifiées IGR-N-91 et SK-N-BE(2)**. En revanche, elle ne module pas l'expression de ces 2 protéines dans les lignées de type « S » SH-EP et SK-N-AS.
7. **La réactivation de la caspase-8 dans la lignée IGR-N-91 n'est pas suffisante pour induire la mort des cellules par le cisplatine.**

Discussion et perspectives

Les extrémités des chromosomes eucaryotes sont protégées de la dégradation et de la fusion par des structures spécialisées, les télomères qui raccourcissent progressivement au cours des cycles successifs de division. Dans les cellules somatiques, ce raccourcissement aboutit à une instabilité chromosomique et à la sénescence. La perte des séquences télomériques est compensée par une enzyme, la télomérase, qui est réactivée dans près de 85% des cancers alors que son expression est faible ou absente dans la majorité des cellules somatiques humaines à l'exception des cellules souches et des cellules germinales. Ces observations ont donc conduit à proposer la télomérase comme cible de nouvelles stratégies anticancéreuses.

En maintenant la longueur des télomères, la télomérase permet la survie des cellules tumorales. Ce rôle canonique de la télomérase est aujourd'hui bien documenté. Cependant des travaux récents, dont les nôtres, suggèrent que la télomérase pourrait avoir d'autres fonctions indépendantes de son rôle sur le maintien de la longueur des télomères dans diverses voies de signalisation cellulaires dont l'apoptose (Dudognon et al., 2004; Gorbunova et al., 2002; Lee et al., 2008; Santos et al., 2006), la différenciation (Choi et al., 2008; Sarin et al., 2005), la réponse aux dommages à l'ADN (Masutomi et al., 2005) et la régulation de l'expression génique (Choi et al., 2008; Smith et al., 2003).

Dans les neuroblastomes, l'augmentation du niveau d'activité télomérase est associée à un stade avancé de la maladie et à un mauvais pronostic. En effet, plusieurs études ont montré que les neuroblastomes agressifs ont un niveau élevé d'activité télomérase alors que les tumeurs de bon pronostic, en ont peu ou pas (Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Reynolds et al., 1997). Ainsi de façon intéressante un très faible niveau d'activité télomérase a été retrouvé dans un groupe particulier de neuroblastome, le stade 4S, caractérisé par un très bon pronostic vital et des capacités de régression et/ou de maturation spontanée chez des patients de moins de 1 an. Ces observations suggèrent que la télomérase joue un rôle important dans le développement du neuroblastome et peut représenter un facteur pronostique dans cette pathologie.

Sur la base de cette hypothèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la télomérase dans la tumorigenèse et la progression tumorale des neuroblastomes ainsi que dans la résistance de

ces tumeurs à la chimiothérapie. Pour répondre à ces interrogations, nous avons évalué l'effet de deux stratégies anti-téломérase distinctes sur le destin des neuroblastomes (tumorigénicité, différenciation, prolifération) et leur résistance à différents agents cytotoxiques. Ces deux stratégies sont: le traitement par l'acide rétinoïque et l'expression d'une protéine mutée dominante négative de hTERT (hTERT-DN). Nous avons utilisé quatre lignées de neuroblastomes de différents phénotypes (S, N et I) plus ou moins agressives et ayant des capacités de différenciation et des sensibilités aux agents pharmacologiques relativement différentes. Les conditions expérimentales et le temps consacré à ces expérimentations nous ont contraint à nous focaliser sur une seule de ces lignées, les cellules IGR-N-91 afin d'approfondir nos résultats.

Nos résultats montrent que l'expression du mutant catalytique inactif hTERT-DN dans la lignée IGR-N-91 induit une différenciation cellulaire de type stromale et une sensibilisation à l'apoptose en réponse à trois agents cytotoxiques (cisplatine, staurosporine, TRAIL). Cette chimiosensibilisation n'est pas la conséquence d'un raccourcissement des télomères mais probablement celui d'une modulation de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse apoptotique (ré-expression de la caspase 8 et de p53 sauvage), suggérant une fonction non canonique de la télomérase. De plus, nous avons montré qu'hTERT régule activement l'expression de N-Myc. En effet, l'expression ectopique du mutant inactif entraîne une perte des copies surnuméraires de N-Myc conduisant à l'extinction de l'expression de la protéine alors que la surexpression d'hTERT sauvage augmente au contraire le nombre de copies du gène. Cette élimination de la protéine N-Myc pourrait être le signe d'une perte du caractère agressif des cellules tumorales comme en témoigne la diminution de l'expression de la NSE (marqueur de mauvais pronostic des neuroblastomes) et l'induction du CD44 dans les cellules hTERT-DN.

D'autre part, nous avons montré que l'ATRA permet une répression d'hTERT dans deux lignées N et I. Nos résultats montrent également que cette inhibition de la télomérase corrèle avec une différenciation neuronale, un ralentissement de la croissance cellulaire et la modulation de gènes importants dans la biologie des neuroblastomes tels que N-Myc, la caspase-8 mais aussi la NSE et le CD44. Nous discuterons de la stratégie anti-téломérase par l'ATRA dans les neuroblastomes dans le paragraphe suivant.

1. Régulation de hTERT et autres modifications en réponse à l'ATRA dans 4 lignées de neuroblastomes.

Les neuroblastomes comme la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) résultent de la prolifération de cellules immatures bloquées dans leur processus de maturation. Dans la LAP, l'acide rétinoïque permet une rémission complète de la maladie en restaurant la différenciation granulocytaire des blastes (Huang et al., 1988). Dans les neuroblastomes, l'acide rétinoïque est utilisée en clinique comme traitement d'entretien des neuroblastomes à haut risque en relais de la chimiothérapie à hautes doses. Son action pro-différenciante et antiproliférative sur les neuroblastes malins apporte un bénéfice puisqu'il permet d'améliorer la survie de ces patients de 15% (Matthay et al., 1999).

Les travaux précédents du laboratoire ont montré que certains rétinoïdes exercent un contrôle négatif de la télomérase dans des cellules de LAP via la diminution du taux de transcrits d'hTERT (Pendino et al., 2003; Pendino et al., 2001). Cette répression peut-être associée à la différenciation ou bien être dissociée de celle-ci, comme cela a été démontré au cours du traitement à long terme d'une lignée résistante à la maturation induite par l'ATRA. Ces résultats démontrent que la télomérase est une cible importante des rétinoïdes.

Dans mon travail de thèse, nous avons montré que le traitement par l'ATRA de 4 lignées de neuroblastomes de type N, S ou I entraîne des réponses variables selon le type cellulaire. En effet, un traitement prolongé par 1 μ M d'ATRA induit une différenciation neuronale caractérisée par la formation de neurites allongées et de pseudoganglions, uniquement dans les cellules de type N et dans celles de type I (IGR-N-91 et SK-N-BE(2) respectivement). Les cellules qui se différencient dans une voie neuronale montrent une augmentation de l'expression de la NSE (marqueur de type N) et perdent l'expression du CD44 (marqueur de type S). Nous avons également montré que dans les cellules de type S, la NSE n'était pas augmentée. Associé au phénomène de différenciation neuronale, l'ATRA entraîne un ralentissement de la prolifération cellulaire des cellules IGR-N-91 et SK-N-BE(2) contrairement aux cellules de types S pour lesquelles la croissance reste inchangée.

Nous avons également montré que la signalisation par les rétinoïdes conduit à la répression de la télomérase uniquement dans les lignées à potentiel neuronal, IGR-N-91 et SK-N-BE(2). Il semblerait donc dans notre modèle que la répression de la télomérase par l'ATRA soit corrélée avec la différenciation neuronale. On peut également émettre

l'hypothèse que les cellules de type S soient insensibles à l'action de l'ATRA. Plusieurs études ont montré que la répression de la télomérase par les rétinoïdes semble être attribuée à l'action pro-différenciatrice et non à une régulation spécifique de hTERT par ces agents. En effet, la différenciation terminale a été associée à la répression rapide de l'activité télomérase dans de nombreux systèmes cellulaires (Albanell et al., 1996; Reichman et al., 1997; Sharma et al., 1995; Xu et al., 1996). En revanche, des études ultérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré que la répression d'hTERT par l'ATRA peut s'opérer indépendamment de la différenciation (Pendino et al., 2001). Cela suggère donc que selon les modèles et le contexte d'étude, la régulation de la télomérase peut être associée à la différenciation ou en être dissociée. En revanche, la répression de la télomérase dans les lignées IGR-N-91 et SK-N-BE(2) n'entraîne pas de raccourcissement des télomères. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation : 1) l'activité télomérase résiduelle est suffisante pour maintenir une taille de télomères stable. 2) Les télomères ne raccourcissent pas car les cellules ne se divisent plus du fait de l'inhibition de croissance induit par l'ATRA. Nous avons également assisté à un phénomène d'échappement dans la lignée SK-N-BE(2), qui se traduit par une reprise de la croissance cellulaire, par la réactivation de la télomérase et l'allongement des télomères.

Dans les deux lignées N-Myc amplifiées IGR-N-91 et SK-N-BE(2), le traitement prolongé par l'ATRA induit une diminution de la quantité de la protéine N-Myc et la réexpression de la caspase-8. En revanche, dans les cellules de type S, SH-EP et SK-N-AS, l'expression de ces deux protéines reste inchangée. Une telle action de l'ATRA sur l'oncoprotéine N-Myc dans les neuroblastomes est déjà connue (Abemayor and Sidell, 1989) en revanche aucune étude à ce jour n'a rapporté une induction de la caspase-8 en réponse à l'ATRA. Néanmoins, ces modifications ne sont pas suffisantes pour restaurer une chimiosensibilisation des cellules IGR-N-91 au cisplatine et à TRAIL, contrairement aux résultats du laboratoire rapportés dans le modèle de LAP (Dudognon et al., 2004).

2. Rôle extra-téломérique de la télomérase dans le phénotype malin et la résistance à la chimiothérapie de la lignée de neuroblastome métastatique IGR-N-91.

Plusieurs équipes ont supposé que les neuroblastomes ayant une faible activité télomérase seraient issus de neuroblastes fœtaux qui n'auraient pas complètement réprimé cette activité enzymatique au cours du développement embryonnaire alors qu'à l'inverse, les

neuroblastomes ayant une forte activité télomérase résulteraient d'un processus d'immortalisation acquis par une cellule unique (Brinkschmidt et al., 1998; Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Reynolds et al., 1997). Cette hypothèse aurait ainsi des répercussions cliniques. En effet, les neuroblastomes agressifs (stade 4) ont un niveau élevé d'activité télomérase alors que les stades 4S, caractérisées par des capacités de régression spontanée et tumeurs localisées ont peu ou pas d'activité télomérase et sont des très bon pronostique (Hiyama et al., 1997; Hiyama et al., 1995; Reynolds et al., 1997).

Afin d'étudier l'implication de la télomérase dans le développement des neuroblastomes, nous avons surexprimé dans une lignée métastatique de neuroblastome, particulièrement agressive et résistante à de nombreux agents pharmacologiques, une forme catalytiquement inactive d'hTERT (hTERT-DN), possédant deux mutations dans le domaine transcriptase inverse. Cette forme inactive d'hTERT est décrite comme exerçant une fonction dominante négative sur la protéine sauvage hTERT (Nguyen et al., 2009) conduisant à une inhibition de l'activité enzymatique de la télomérase. Le mécanisme d'action du mutant hTERT-DN est toujours sujet à débats. Il pourrait fixer sur la plus part des composants du complexe télomérase (hTR, chaperonnes...) et être en compétition avec la forme sauvage endogène pour fixer les télomères et assurer leur allongement. Plusieurs équipes (Beattie et al., 2001; Wenz et al., 2001) ont suggéré que pour être active et rallonger les télomères, la télomérase doit être assemblée sous forme de dimères. La dimérisation d'une molécule d'hTERT sauvage avec un mutant inactif hTERT-DN pourrait alors créer un dimère de télomérase non fonctionnel (Nguyen et al., 2009). A ce jour, seule une étude propose un mécanisme d'action du mutant hTERT-DN sur la forme sauvage d'hTERT. Dans cette étude Nguyen et al., montre que l'expression ectopique de la forme hTERT-DN serait capable d'entraîner l'export vers le cytoplasme de la forme hTERT sauvage couplée à la GFP pour être dégradée par le protéasome. hTERT-DN pourrait donc exercer sa fonction dominant-négatif en stimulant la dégradation de la forme endogène de hTERT (Nguyen et al., 2009). En revanche dans ces travaux, aucune interaction entre le mutant et la forme sauvage n'a été démontrée, pas plus que l'inhibition de l'activité télomérase par l'expression forcée d'hTERT-DN. De ce fait la preuve de l'existence d'une dimérisation entre hTERT sauvage endogène et hTERT-DN reste encore à prouver.

En plus de l'expression ectopique d'hTERT-DN, nous avons également surexprimé la forme sauvage active (hTERT-WT) dans cette même lignée. Au cours de la culture cellulaire nous avons observé une transformation de la morphologie uniquement dans les cellules IGR-

N-91 qui exprimaient hTERT-DN. Les petites cellules immatures et initialement trapézoïdes ont acquis une morphologie allongée « fibroblastic-like » (caractéristique des cellules de type S) et ont perdu leur capacité à former des petits agrégats cellulaires. Ces modifications morphologiques sont associées à la diminution de la NSE, un marqueur des cellules de type N considéré en clinique comme un facteur de mauvais pronostic des neuroblastomes, ainsi qu'à l'augmentation du CD44, un marqueur de type S et des neuroblastomes de bon pronostic. Ces résultats semblent indiquer que les cellules hTERT-DN initialement de type N ont acquis un phénotype de cellules de type S. Parce que les cellules de morphotype S sont considérées comme des cellules stromales « non-malignes » (Ross et al., 2003), ce dernier résultat suggère que les cellules hTERT-DN tendent à perdre leur potentiel malin. A ce jour aucune étude n'a mis en évidence une différenciation d'un type N vers un type S dans les neuroblastomes consécutivement à l'inhibition de l'activité télomérase. En revanche des études ont montré que l'inhibition de la télomérase par différentes stratégies, entraîne une différenciation terminale des mélanocytes (Bagheri et al., 2006) et un changement de la morphologie des gliomes après plusieurs semaines de cultures (Kondo et al., 1998). La surexpression de hTERT aurait pour effet contraire de bloquer la différenciation de différents types cellulaires (Cerezo et al., 2003; Wang et al., 2005) dont des cellules neuronales (Richardson et al., 2007). Cependant, le rôle de la télomérase dans ce processus est encore très controversé, puisque dans certains modèles l'expression ectopique d'hTERT potentialise la différenciation de différents types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques (Armstrong et al., 2005; Zimmermann et al., 2004) ou semble n'avoir aucun effet sur ce processus. De ce fait, le rôle de la télomérase dans le processus de différenciation cellulaire semble être dépendant du type cellulaire et des conditions de culture. L'étude de l'expression de gènes de la différenciation potentiellement modulés par hTERT devrait permettre de faire la lumière sur son mécanisme d'action.

D'après les données de la littérature, la transformation morphologique de neuroblastes initialement agressifs vers un morphotype S pourrait correspondre à une perte des caractères « malins » (Ambros et al., 1997), signature d'une réversion du phénotype tumoral au profit d'une « normalisation » des cellules. Si tel était le cas, cette modification phénotypique des cellules induite par l'inhibition de l'activité télomérase dans la lignée métastatique IGR-N-91 pourrait expliquer pourquoi les neuroblastomes 4S caractérisés par une absence d'activité

téломérase ont la capacité de régresser spontanément ou de se différencier et son généralement de très bon pronostic (80-90% de survie à 5ans) (Maris, 2010).

Plusieurs auteurs rapportent que la réversion des lignées neuroblastiques N-Myc amplifiées de type N en type S s'accompagne d'une perte des copies surnuméraires de N-Myc (Ambros et al., 1997; Valent et al., 2001). Cette élimination des séquences N-Myc amplifiées est également un processus qui s'observe dans les neuroblastomes *in vivo* mais aussi dans d'autres cellules cancéreuses (HL60, carcinome du colon) et serait à l'origine d'une perte de la tumorigénicité et de la différenciation cellulaire (Ambros et al., 1997; Bonatti et al., 1989; Eckhardt et al., 1994; Shimizu et al., 1994; Valent et al., 2001; Von Hoff et al., 1992). Afin d'établir une corrélation entre le phénotype S observé et la perte du caractère agressif de la lignée dans les IGR-N-91 transduite avec hTERT-DN, nous avons analysé le nombre de copies du gène N-Myc. Nos résultats montrent clairement une élimination totale et progressive du nombre de copies du gène (de 60 copies à 1 copie) aboutissant à l'extinction de l'oncoprotéine alors que dans les cellules surexprimant la forme sauvage d'hTERT, le nombre de copies tend au contraire à augmenter (de 60 à 80 copies) par rapport aux cellules témoins.

Nos résultats sont donc particulièrement importants puisqu'ils suggèrent que l'inhibition de la téломérase, par l'expression ectopique d'un mutant hTERT-DN permet une élimination des séquences amplifiées de N-Myc et de la protéine. La surexpression de N-Myc et/ou son amplification constitue un critère de mauvais pronostic et d'agressivité du neuroblastome. La perte de l'oncoprotéine N-Myc dans la lignée IGR-N-91 laisse fortement présager une perte du phénotype malin de la lignée IGR-N-91. L'augmentation du nombre de copies de N-Myc dans les cellules hTERT-WT par rapport aux cellules témoins démontre que la régulation du nombre de copies de N-Myc dans cette lignée est bien exercée par la téломérase.

Cette régulation de la quantité de copies de N-Myc par la téломérase n'a jusqu'à présent jamais été décrite. En revanche, il est bien connu que Myc est capable de réguler l'expression d'hTERT de façon ubiquitaire (Kyo et al., 2000; Oh et al., 2000; Wu et al., 1999; Xu et al., 2001). Cette observation renforce l'hypothèse d'une boucle de contrôle entre Myc et hTERT déjà suggérée par plusieurs auteurs.

L'élimination des copies surnuméraires de l'oncogène N-Myc est un phénomène très étonnant mais qui a déjà été décrit par plusieurs équipes. En effet, selon les auteurs les copies surnuméraires de Myc qui sont organisées sous la forme de chromosome double-minute peuvent être éliminées au cours de la formation des petites structures « nuclear-like » appelées micronoyaux (Ambros et al., 1997; Valent et al., 2001; Von Hoff et al., 1992). Le mécanisme qui accompagne ce phénomène est assez obscur mais il semblerait que les chromosomes double-minutes soient « englobés » dans ces micronoyaux au cours de la phase S ou après la mitose (Shimizu et al., 1994) puis expulsés en dehors du compartiment nucléaire pour être enfin éliminés par la cellule. Ce phénomène existerait *in vitro* mais également *in vivo* (Valent et al., 2001) et s'effectuerait parfois spontanément ou en réponse à divers agents pharmacologiques (Ambros et al., 1997; Von Hoff et al., 1992).

Il serait donc intéressant de vérifier si dans notre modèle, la perte des séquences amplifiées de N-Myc pourrait être la conséquence d'une stimulation de la formation de ces micronoyaux. Si tel était le cas, l'inhibition de l'activité télomérase pourrait donc constituer un signal induisant la formation de ces petites structures à l'origine de la perte des copies de N-Myc et de l'extinction de la protéine. Cela signifierait également que l'augmentation de l'expression d'hTERT au contraire freinerait la formation de micronoyaux ce qui entraînerait l'augmentation du nombre de copies de N-Myc. Il est également possible d'envisager que le phénotype observé et ses modifications soient le résultat d'un processus de sélection par la télomérase sauvage et son mutant inactif, de cellules présentent initialement au sein de la population parentale ayant soit une amplification de N-Myc ou au contraire une seule copie. Un tel mécanisme de sélection sera discuté plus loin. Néanmoins, nos résultats démontrent un processus activement régulé par la télomérase.

Nos résultats démontrent que l'inhibition de la télomérase dans les IGR-N-91 est suffisante pour restaurer un phénotype plus différencié et moins agressif. Nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène qui tend vers une « normalisation » des cellules pouvait donner lieu à une chimiosensibilisation des cellules hTERT-DN. Pour répondre à cette interrogation nous avons traitées les cellules avec plusieurs agents cytotoxiques. Les résultats de cette expérience démontrent clairement que les cellules qui surexpriment hTERT-DN sont devenues particulièrement sensibles à l'apoptose induite par ces agents alors que les cellules hTERT-WT et les cellules témoins ne le sont pas. Nous montrons également, que cette sensibilisation à l'apoptose n'est pas la conséquence d'un raccourcissement des télomères

dans les cellules hTERT-DN. Une activité télomérase résiduelle même faible dans les cellules hTERT-DN pourrait être suffisante pour maintenir une taille des télomères constantes.

Dans le but de caractériser les effecteurs potentiels responsables de la sensibilisation du mutant hTERT-DN à l'apoptose induite par des agents cytotoxiques, l'expression de protéines connues pour participer à l'apoptose et /ou aux voies de signalisations des dommages à l'ADN ont été analysées. Initialement, la lignée IGR-N-91 exprime un niveau très faible de caspase-8 et de p53 sauvage, ce qui pourrait expliquer en partie la chimiorésistance des cellules. En effet, dans les neuroblastomes N-Myc amplifiés, la caspase-8 est fréquemment réprimée par un mécanisme de délétion allélique ou par hyperméthylation de l'ADN (Teitz et al., 2000) et cette perte de l'expression de la caspase-8 serait impliquée dans la résistance à l'apoptose et la formation de métastases (Raguenez et al., 2009; Stupack et al., 2006; Teitz et al., 2006). A l'inverse les neuroblastomes de stade 4S ayant tendance à régresser, expriment la caspase-8 (Stupack et al., 2006). A l'instar de la caspase-8, la protéine p53 est une protéine essentielle pour le processus apoptotique. Dans les neuroblastomes p53 est rarement mutée, contrairement à la majorité des cancers (Vogan et al., 1993). En revanche, dans de rares cas, cette mutation est souvent associée à une résistance aux chimiothérapies et à un risque de récurrence élevé (Keshelava et al., 2001; Tweddle et al., 2001). En effet, p53 est retrouvée plus fréquemment mutée après la chimiothérapie (Tweddle et al., 2001). Dans notre modèle, nous montrons que l'inhibition de l'activité télomérase, induit une réexpression de la caspase-8 et de la forme p53 sauvage (et une diminution de l'expression de la forme p53 mutée). Inversement la surexpression de la forme sauvage d'hTERT, entraîne au contraire une augmentation de l'expression de la p53 mutée et la répression de la caspase-8, en comparaison avec les cellules témoins. La encore ces observations peuvent être le résultat d'une sélection par hTERT-DN et -WT, de cellules initialement présentes dans la population générale ou la conséquence d'une modification de l'expression des gènes régulés par hTERT. En effet, des changements dans le profil d'expression génique induit par hTERT ont déjà été décrits dans plusieurs études (*cf chapitre I, 3.5.1*) (Armstrong et al., 2005; Park et al., 2007; Perrault et al., 2005; Smith et al., 2003). De plus, certaines études ont rapporté une modulation de l'expression de protéines de la signalisation apoptotique, notamment p53, par la télomérase (Lai et al., 2007; Xiang et al., 2002). Il serait donc également envisageable que les modifications cellulaires provoquées par la surexpression de hTERT-DN ne soient pas uniquement celles engendrées par l'inhibition de l'activité télomérase. En effet, les modifications observées peuvent être la conséquence d'une fonction « propre » de la protéine

mutante, indépendante de l'inhibition de l'activité télomérase. Dans tout les cas, l'absence de raccourcissement des télomères dans les cellules hTERT-DN suggère un phénomène télomère-indépendant de la télomérase.

Enfin, lors de la culture à long terme, nous avons pu assister à une ré-augmentation de l'activité télomérase dans les cellules hTERT-DN (50% de l'activité basale). Cette réapparition de l'activité télomérase n'a pas modifié l'expression des protéines initialement modulées par le mutant ni entraîné la réapparition du phénotype de départ ou la résistance aux agents pharmacologiques.

Au vu de l'ensemble de nos résultats, nous émettons l'hypothèse que l'inhibition de la télomérase entraînant une modification du phénotype (différenciation de type S), du génotype (perte de N-Myc, réexpression de la caspase-8 et de p53 sauvage...) et la chimiosensibilisation des cellules soit le résultat :

i) d'un phénomène de « réversion » des cellules transduites par hTERT-DN. Ce processus de réversion, pourrait alors être défini comme une « différenciation » des neuroblastes tumoraux indifférenciés en cellules « normales » de type stromale.

ou ii) d'une sélection par ce mutant de cellules présentent initialement au sein de la population parentale. En effet, la lignée IGR-N-91 est constituée d'une population cellulaire non homogène (Valent et al., 1999). On pourrait donc envisager que l'expression d'hTERT-DN conduit à sélectionner des cellules de type S chimiosensibles (N-Myc=1 copie, caspase-8 et p53 sauvage positive) et que la surexpression d'hTERT-WT sélectionne à l'inverse des neuroblastes de type N, particulièrement agressifs et chimiorésistants (N-Myc >60 copies, caspase-8 négatif et p53 mutée) (*Figure 28*). Il est tout à fait plausible que le mécanisme à l'origine de la transformation du phénotype de la lignée de IGR-N-91 soit en réalité une combinaison des deux mécanismes c'est à dire à la fois un phénomène de sélection associé à des modifications induite par la surexpression d'hTERT-DN. Néanmoins dans notre modèle, il est particulièrement difficile de distinguer l'un ou l'autre mécanisme. Dans tous les cas, une telle régulation par la télomérase n'a jamais été décrite à ce jour et illustre un nouvel aspect des effets extra-télomériques de la télomérase. Ces résultats sont particulièrement importants d'un point de vue clinique puisqu'ils démontrent l'intérêt d'une stratégie anti-télomérase pour traiter les neuroblastomes à risque de récurrence élevé notamment ceux chimiorésistants.

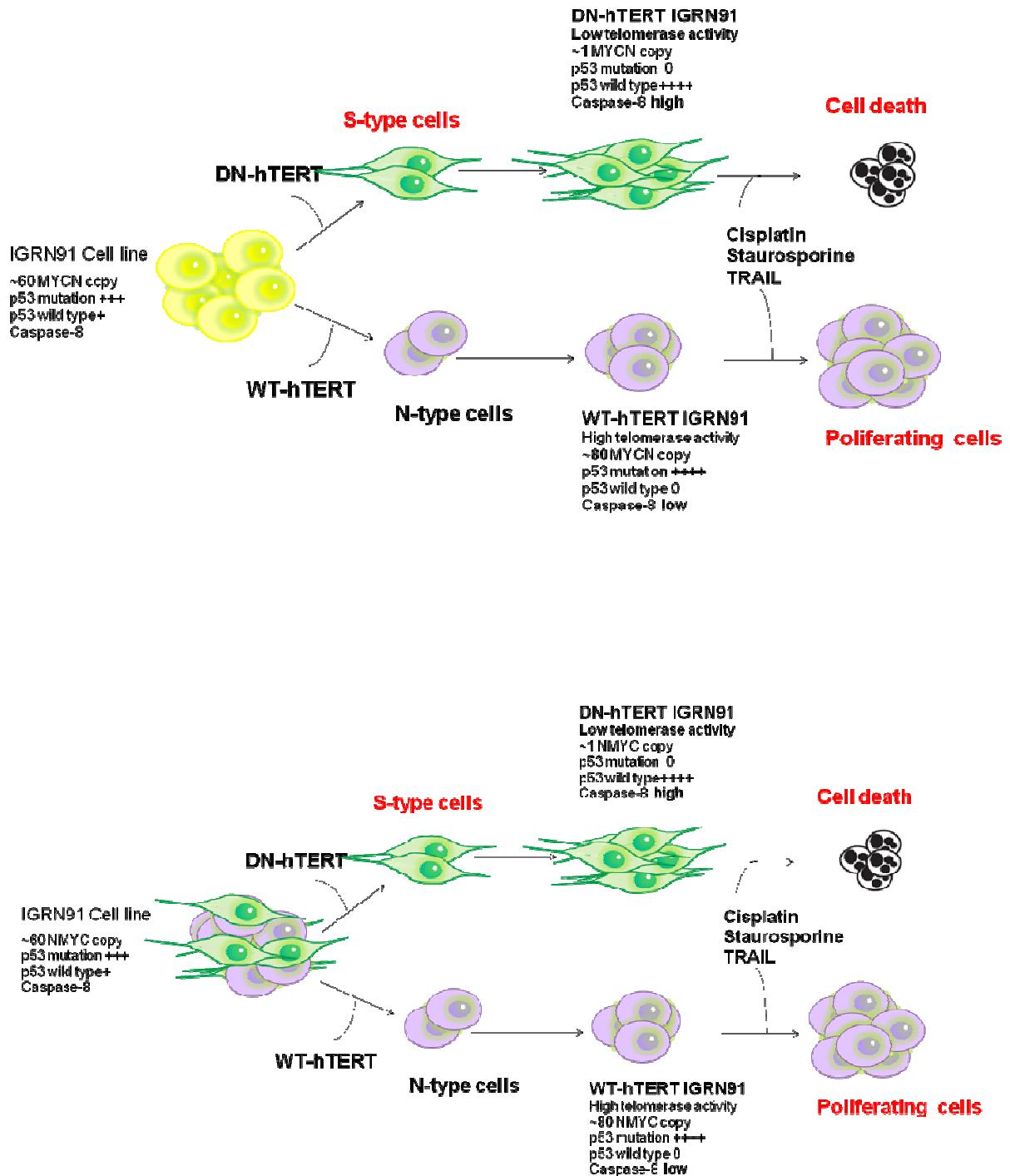


Figure 28: Modèle proposé pour expliquer la modification du phénotype de la lignée IGR-N-91 après transduction par le mutant hTERT-DN. En haut, hypothèse de la « différenciation » (ou « réversion »). Les cellules au départ ont un phénotype homogène et l'introduction du mutant catalytique inactif hTERT-DN induit une différenciation morphologique, une sensibilisation à l'apoptose et une perte de certains marqueurs tumoraux. A l'inverse, la forme endogène d'hTERT ou la surexpression de la forme sauvage maintient un phénotype indifférencié, plus agressif et chimiorésistant.

En bas, hypothèse de la **sélection** par hTERT-DN (ou par hTERT-WT) d'un très faible contingent de cellules pré-existantes au départ dans la population totale phénotypiquement hétérogène. Les cellules minoritaires ainsi sélectionnées posséderaient initialement ces caractéristiques génétiques et phénotypiques.

Durant ma thèse, nous avons produit un ensemble de résultats suggérant une nouvelle fonction extra-téломérique de la télomérase directement impliquée dans le développement tumoral des neuroblastomes métastatiques. Nos résultats ont permis de démontrer que la télomérase participe activement au processus oncogénique ainsi qu'à la chimiorésistance de ces neuroblastomes et que son inhibition conduit à une modification du phénotype et du génotype des cellules ainsi qu'à leur sensibilisation aux agents chimiothérapeutiques. Nous proposons donc que la télomérase pourrait activement participer à l'émergence de neuroblastes malins via un rôle extra-téломérique. Notre hypothèse est appuyée par les travaux de l'équipe de Stewart et al., qui montre qu'indépendamment de sa fonction d'élongation des télomères, la télomérase est effectivement capable de conférer un pouvoir tumorigène à des cellules normales (Stewart et al., 2002).

La priorité maintenant est d'évaluer la tumorigénicité des cellules hTERT-DN dans des modèles de xénogreffes *in vivo*. La capacité des cellules hTERT-DN à former des tumeurs chez des souris immunodéficientes sera évaluée. L'absence de tumeurs ou une diminution de la taille de ces tumeurs en comparaison avec les cellules témoins renforcera les conclusions formulées. Dans le cas où les cellules injectées seraient capables de former des tumeurs, les modèles animaux alors mis en place constitueraient des outils particulièrement intéressants pour i) évaluer *in vivo* la sensibilité des cellules hTERT-DN aux agents utilisés précédemment (évaluation de la régression tumorale) et ii) développer et évaluer l'efficacité de nouvelles drogues contre ces cellules modifiées.

A coté de cet aspect, il serait également intéressant d'approfondir l'étude du mécanisme qui régit les modifications (phénotype, sensibilisation, modulation de l'expression génique) de la lignée IGR-N-91 par hTERT-DN, afin de déterminer s'il s'agit d'un processus de réversion phénotypique des cellules à part entière ou d'une sélection. Afin de répondre à cette interrogation, un clonage de la population IGR-N-91 et une analyse du morphotype et du contenu génétique de plusieurs clones est en cours afin de déterminer si ces mêmes cellules de type N et S existent initialement dans la population parentale. Malgré tout, l'existence au départ de ces deux types cellulaires ne pourrait pas totalement exclure un phénomène de transformation additionnel.

La télomérase comme cible de la thérapie anticancéreuse ?

D'un point de vue clinique, nos résultats *in vitro* concernant les effets de l'ATRA dans le traitement des neuroblastomes métastatiques montre qu'un tel traitement permet une diminution de l'activité télomérase, la différenciation des neuroblastes immatures et le ralentissement de leur prolifération mais n'est pas suffisant pour entraîner la mort de ces neuroblastes (seul ou en réponse à des agents cytotoxiques). Nous montrons également dans notre modèle que des phénomènes de résistance à l'ATRA caractérisés par une reprise de la croissance cellulaire et la réactivation de la télomérase (dans la lignée SK-N-BE(2)) peuvent survenir *in vitro* ce qui pourrait donner lieu chez le patient à un phénomène d'échappement thérapeutique. De telles rechutes ont été rapportées chez 1/3 des patients atteints de LAP et traités par l'ATRA. L'utilisation de l'acide rétinoïque en traitement d'entretien des neuroblastomes de haut risque a permis d'allonger la survie de 15%. Néanmoins, malgré ce bénéfice incontestable, le sort de ces patients reste particulièrement sombre, d'où la nécessité de trouver de nouveaux traitements plus efficaces pour permettre la « différenciation » des tumeurs et leur régression. C'est pourquoi à côté du traitement par les rétinoïdes nous préconisons une stratégie anti-télomérase.

Bien que les mécanismes exacts restent à élucider, la mise en évidence d'une nouvelle fonction non canonique de la télomérase présente de nouvelles perspectives quant au traitement du neuroblastome. En effet, nous montrons que la télomérase maintient un phénotype particulièrement immatures et agressif, un nombre de copies de N-Myc élevé et l'inactivation de protéines pro-apoptotique (Caspase-8 et p53). L'ensemble de ces altérations contribue à l'établissement du phénotype tumoral, à sa persistance et à la résistance aux chimiothérapies. Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu montrer que l'inhibition de la télomérase est une stratégie particulièrement efficace pour conduire à la réversion du phénotype malin initial d'une lignée de neuroblastome métastatique chimiorésistante et entraîner la mort des cellules en réponse à des agents cytotoxiques. En 1999, l'équipe de *Hahn et al.*, a démontré le potentiel thérapeutique d'un vecteur plasmidique hTERT-DN dans des cellules cancéreuses ovariennes xénotreffées chez des souris immunodéficientes (Hahn et al., 1999b). Plusieurs études ont également montré que la surexpression d'un mutant dominant négatif d'hTERT potentialise l'effet d'agents cytotoxiques comme le cisplatine, le docetaxel, l'étoposide, le témozolomide et l'imatinib (Biroccio et al., 2003; Misawa et al., 2002; Tauchi et al., 2003). Nous proposons donc la télomérase comme cible thérapeutique des neuroblastomes, en particulier dans ceux de haut risque particulièrement incurable. Utilisé en

Discussion et perspectives

combinaison avec les thérapies actuellement utilisé en clinique, nos résultats montrent que cette stratégie pourrait s'avérer être efficace puisqu'elle permettrait de cibler, non seulement l'élongation télomérique par la télomérase, mais aussi les autres fonctions tumorigène de hTERT. Même si les applications cliniques de molécules ciblant spécifiquement hTERT sont encore relativement difficiles à mettre en œuvre et les résultats de tests cliniques pas toujours encourageants, un effort soutenu doit être maintenu dans cet axe de recherche et dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses ciblant cette protéine.

Bibliographie

Abemayor, E., and Sidell, N. (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the *in vitro* study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environmental health perspectives* 80, 3-15.

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*. *Molecular and cellular biology* 30, 2971-2982.

Acheson, A., Conover, J.C., Fandl, J.P., DeChiara, T.M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S.P., Yancopoulos, G.D., and Lindsay, R.M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450-453.

Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M., and Altieri, D.C. (1998). Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 351, 882-883.

Ahmed, S., Passos, J.F., Birket, M.J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., Birch-Machin, M.A., von Zglinicki, T., and Saretzki, G. (2008). Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *Journal of cell science* 121, 1046-1053.

Akiyama, M., Hideshima, T., Hayashi, T., Tai, Y.T., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Chauhan, D., Richardson, P., Munshi, N.C., and Anderson, K.C. (2003). Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer research* 63, 18-21.

Albanell, J., Han, W., Mellado, B., Gunawardane, R., Scher, H.I., Dmitrovsky, E., and Moore, M.A. (1996). Telomerase activity is repressed during differentiation of maturation-sensitive but not resistant human tumor cell lines. *Cancer research* 56, 1503-1508.

Allsopp, R.C., Chang, E., Kashefi-Azam, M., Rogaev, E.I., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., and Harley, C.B. (1995). Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*. *Experimental cell research* 220, 194-200.

Ambros, I.M., Rumpler, S., Luegmayr, A., Hattinger, C.M., Strehl, S., Kovar, H., Gadner, H., and Ambros, P.F. (1997). Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary MYCN gene copies by micronucleus formation--sign of tumour cell revertance? *Eur J Cancer* 33, 2043-2049.

Arai, K., Masutomi, K., Khurts, S., Kaneko, S., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002). Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. *The Journal of biological chemistry* 277, 8538-8544.

Armbruster, B.N., Banik, S.S., Guo, C., Smith, A.C., and Counter, C.M. (2001). N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. *Molecular and cellular biology* 21, 7775-7786.

Armstrong, L., Saretzki, G., Peters, H., Wappler, I., Evans, J., Hole, N., von Zglinicki, T., and Lako, M. (2005). Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 23, 516-529.

Artandi, S.E., Alson, S., Tietze, M.K., Sharpless, N.E., Ye, S., Greenberg, R.A., Castrillon, D.H., Horner, J.W., Weiler, S.R., Carrasco, R.D., *et al.* (2002). Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8191-8196.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, NY)* 281, 1305-1308.

Atkinson, S.P., Hoare, S.F., Glasspool, R.M., and Keith, W.N. (2005). Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. *Cancer research* 65, 7585-7590.

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

Azouz, A., Wu, Y.L., Hillion, J., Tarkanyi, I., Karniguian, A., Aradi, J., Lanotte, M., Chen, G.Q., Chehna, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2010). Epigenetic plasticity of hTERT gene promoter determines retinoid capacity to repress telomerase in maturation-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia* 24, 613-622.

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

Bachelder, R.E., Wendt, M.A., Fujita, N., Tsuruo, T., and Mercurio, A.M. (2001). The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 34702-34707.

Bader, S.A., Fasching, C., Brodeur, G.M., and Stanbridge, E.J. (1991). Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 2, 245-255.

Bagheri, S., Nosrati, M., Li, S., Fong, S., Torabian, S., Rangel, J., Moore, D.H., Federman, S., Laposa, R.R., Baehner, F.L., *et al.* (2006). Genes and pathways downstream of telomerase in melanoma metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11306-11311.

Bibliographie

Banik, S.S., Guo, C., Smith, A.C., Margolis, S.S., Richardson, D.A., Tirado, C.A., and Counter, C.M. (2002). C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity. *Molecular and cellular biology* 22, 6234-6246.

Barbacid, M. (1995). Neurotrophic factors and their receptors. *Current opinion in cell biology* 7, 148-155.

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

Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., and Harrington, L. (2001). Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Molecular and cellular biology* 21, 6151-6160.

Becker, K., Marchenko, N.D., Maurice, M., and Moll, U.M. (2007). Hyperubiquitylation of wild-type p53 contributes to cytoplasmic sequestration in neuroblastoma. *Cell death and differentiation* 14, 1350-1360.

Bell, E., Premkumar, R., Carr, J., Lu, X., Lovat, P.E., Kees, U.R., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2006). The role of MYCN in the failure of MYCN amplified neuroblastoma cell lines to G1 arrest after DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5, 2639-2647.

Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10, 585-594.

Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., Russo, M.L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *The Journal of biological chemistry* 276, 43285-43293.

Berry, C. (2003). The new mapping. *QJM* 96, 459-460.

Bianchi, A., Stansel, R.M., Fairall, L., Griffith, J.D., Rhodes, D., and de Lange, T. (1999). TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *The EMBO journal* 18, 5735-5744.

Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C.E., Laroche, T., and Gilson, E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nature genetics* 17, 236-239.

Biroccio, A., Gabellini, C., Amodei, S., Benassi, B., Del Bufalo, D., Elli, R., Antonelli, A., D'Incalci, M., and Zupi, G. (2003). Telomere dysfunction increases cisplatin and ecteinascidin-743 sensitivity of melanoma cells. *Molecular pharmacology* 63, 632-638.

Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661-673.

Blackburn, E.H., Chan, S., Chang, J., Fulton, T.B., Krauskopf, A., McEachern, M., Prescott, J., Roy, J., Smith, C., and Wang, H. (2000). Molecular manifestations and molecular determinants of telomere capping. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 253-263.

Blasco, M.A. (2003). Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *European journal of cell biology* 82, 441-446.

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

Bonatti, S., Miele, M., Menichini, P., Ottaggio, L., and Abbondandolo, A. (1989). Preferential loss of chromosomes containing amplified DNA regions in cultured cells. *Progress in clinical and biological research* 318, 271-276.

Bordow, S.B., Norris, M.D., Haber, P.S., Marshall, G.M., and Haber, M. (1998). Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol* 16, 3286-3294.

Bowman, L.C., Castleberry, R.P., Cantor, A., Joshi, V., Cohn, S.L., Smith, E.I., Yu, A., Brodeur, G.M., Hayes, F.A., and Look, A.T. (1997). Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a Pediatric Oncology Group study. *Journal of the National Cancer Institute* 89, 373-380.

Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A.D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., *et al.* (1999). Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 340, 1954-1961.

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

Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Terpe, H.J., Simon, R., Boecker, W., Lampert, F., and Stoerkel, S. (1997). Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas--an important methodological approach in paediatric tumour pathology. *The Journal of pathology* 181, 394-400.

Brinkschmidt, C., Poremba, C., Christiansen, H., Simon, R., Schafer, K.L., Terpe, H.J., Lampert, F., Boecker, W., and Dockhorn-Dworniczak, B. (1998). Comparative genomic hybridization and telomerase activity analysis identify two biologically different groups of 4s neuroblastomas. *British journal of cancer* 77, 2223-2229.

- Broccoli, D., Godley, L.A., Donehower, L.A., Varmus, H.E., and de Lange, T. (1996). Telomerase activation in mouse mammary tumors: lack of detectable telomere shortening and evidence for regulation of telomerase RNA with cell proliferation. *Molecular and cellular biology* *16*, 3765-3772.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature genetics* *17*, 231-235.
- Brodeur, G.M. (1989). Clinical significance of genetic rearrangements in human neuroblastomas. *Clinical chemistry* *35*, B38-42.
- Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews* *3*, 203-216.
- Brodeur, G.M., and Fong, C.T. (1989). Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer genetics and cytogenetics* *41*, 153-174.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., and Hammond, D. (1986). Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer* *58*, 541-545.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science (New York, NY)* *224*, 1121-1124.
- Bronner-Fraser, M. (1995). Origins and developmental potential of the neural crest. *Experimental cell research* *218*, 405-417.
- Brown, A.M., Riddoch, F.C., Robson, A., Redfern, C.P., and Cheek, T.R. (2005). Mechanistic and functional changes in Ca²⁺ entry after retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *The Biochemical journal* *388*, 941-948.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *The EMBO journal* *14*, 4240-4248.
- Burkhardt, C.A., Cheng, A.J., Madafiglio, J., Kavallaris, M., Mili, M., Marshall, G.M., Weiss, W.A., Khachigian, L.M., Norris, M.D., and Haber, M. (2003). Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* *95*, 1394-1403.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* *55*, 611-622.

Buzza, M.S., Zamurs, L., Sun, J., Bird, C.H., Smith, A.I., Trapani, J.A., Froelich, C.J., Nice, E.C., and Bird, P.I. (2005). Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *The Journal of biological chemistry* 280, 23549-23558.

Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *The Journal of biological chemistry* 275, 6067-6070.

Cairney, C.J., and Keith, W.N. (2008). Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 90, 13-23.

Campisi, J. (2001). From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Experimental gerontology* 36, 607-618.

Cao, Y., Li, H., Deb, S., and Liu, J.P. (2002). TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21, 3130-3138.

Cappellen, D., and Benard, J. (1997). Pleiotropic over-expression of multidrug-resistance-related genes is correlated to MYCN and max mRNA accumulation during tumour progression in the IGR-N-91 human neuroblastoma model. *International journal of cancer* 70, 430-436.

Caron de Fromental, C., and Soussi, T. (1992). TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes, chromosomes & cancer* 4, 1-15.

Caron, H. (1995). Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Medical and pediatric oncology* 24, 215-221.

Caron, H., van Sluis, P., de Kraker, J., Bokkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater, R., Westerveld, A., Voute, P.A., and Versteeg, R. (1996). Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 334, 225-230.

Castle, V.P., Heidelberger, K.P., Bromberg, J., Ou, X., Dole, M., and Nunez, G. (1993). Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *The American journal of pathology* 143, 1543-1550.

Caulin, C., Salvesen, G.S., and Oshima, R.G. (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology* 138, 1379-1394.

Cech, T.R., and Lingner, J. (1997). Telomerase and the chromosome end replication problem. *Ciba Foundation symposium 211*, 20-28; discussion 28-34.

Cerezo, A., Stark, H.J., Moshir, S., and Boukamp, P. (2003). Constitutive overexpression of human telomerase reverse transcriptase but not c-myc blocks terminal differentiation in human HaCaT skin keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology 121*, 110-119.

Chai, W., Ford, L.P., Lenertz, L., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *The Journal of biological chemistry 277*, 47242-47247.

Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E., and Yang, X. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *The EMBO journal 22*, 4132-4142.

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

Chen, L., Iraci, N., Gherardi, S., Gamble, L.D., Wood, K.M., Perini, G., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2010). p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer research 70*, 1377-1388.

Chen, L., Malcolm, A.J., Wood, K.M., Cole, M., Variend, S., Cullinane, C., Pearson, A.D., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2007). p53 is nuclear and functional in both undifferentiated and differentiated neuroblastoma. *Cell cycle (Georgetown, Tex 6)*, 2685-2696.

Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science (New York, NY 278)*, 1966-1968.

Chiang, Y.J., Kim, S.H., Tessarollo, L., Campisi, J., and Hodes, R.J. (2004). Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Molecular and cellular biology 24*, 6631-6634.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, NY 303)*, 1010-1014.

Choi, J., Southworth, L.K., Sarin, K.Y., Venteicher, A.S., Ma, W., Chang, W., Cheung, P., Jun, S., Artandi, M.K., Shah, N., *et al.* (2008). TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS genetics 4*, e10.

Choi, L.M., Kim, N.W., Zuo, J.J., Gerbing, R., Stram, D., Lukens, J.N., Matthay, K.K., Seeger, R.C., and Reynolds, C.P. (2000). Telomerase activity by TRAP assay and

telomerase RNA (hTR) expression are predictive of outcome in neuroblastoma. *Medical and pediatric oncology* 35, 647-650.

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science (New York, NY)* 270, 1663-1667.

Christiansen, H., and Lampert, F. (1988). Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *British journal of cancer* 57, 121-126.

Christiansen, H., Sahin, K., Berthold, F., Hero, B., Terpe, H.J., and Lampert, F. (1995). Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A, 541-544.

Chu, P.W., Cheung, W.M., and Kwong, Y.L. (2003). Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acids on the neuronal differentiation of human neuroblastoma cells. *Neuroreport* 14, 1935-1939.

Ciccarone, V., Spengler, B.A., Meyers, M.B., Biedler, J.L., and Ross, R.A. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer research* 49, 219-225.

Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veluona, M.A., *et al.* (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 554-559.

Cohn, S.L., London, W.B., Huang, D., Katzenstein, H.M., Salwen, H.R., Reinhart, T., Madafiglio, J., Marshall, G.M., Norris, M.D., and Haber, M. (2000). MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol* 18, 3604-3613.

Colgin, L.M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M.O., and Reddel, R.R. (2000). The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia (New York, NY)* 2, 426-432.

Combaret, V., Gross, N., Lasset, C., Frappaz, D., Beretta-Brognara, C., Philip, T., Beck, D., and Favrot, M.C. (1997). Clinical relevance of CD44 cell surface expression and MYCN gene amplification in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33, 2101-2105.

Cong, Y.S., and Bacchetti, S. (2000). Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 35665-35668.

Cong, Y.S., Wen, J., and Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human molecular genetics* 8, 137-142.

Corvi, R., Amler, L.C., Savelyeva, L., Gehring, M., and Schwab, M. (1994). MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5523-5527.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews* 2, 647-656.

Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Costa, A., Daidone, M.G., Daprai, L., Villa, R., Cantu, S., Pilotti, S., Mariani, L., Gronchi, A., Henson, J.D., Reddel, R.R., *et al.* (2006). Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. *Cancer research* 66, 8918-8924.

Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal* 11, 1921-1929.

Counter, C.M., Hahn, W.C., Wei, W., Caddle, S.D., Beijersbergen, R.L., Lansdorp, P.M., Sedivy, J.M., and Weinberg, R.A. (1998a). Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14723-14728.

Counter, C.M., Meyerson, M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Caddle, S.D., Haber, D.A., and Weinberg, R.A. (1998b). Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16, 1217-1222.

Cristofari, G., Adolf, E., Reichenbach, P., Sikora, K., Terns, R.M., Terns, M.P., and Lingner, J. (2007). Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Molecular cell* 27, 882-889.

Cushing, H., and Wolbach, S.B. (1927). The Transformation of a Malignant Paravertebral Sympathicoblastoma into a Benign Ganglioneuroma. *The American journal of pathology* 3, 203-216 207.

Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S., and Pfeifer, G.P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature genetics* 25, 315-319.

- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.
- de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 323-329.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 19, 2100-2110.
- de Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science (New York, NY)* 326, 948-952.
- Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23, 2950-2966.
- Del Bufalo, D., Rizzo, A., Trisciuglio, D., Cardinali, G., Torrisi, M.R., Zangemeister-Wittke, U., Zupi, G., and Biroccio, A. (2005). Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell death and differentiation* 12, 1429-1438.
- 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-2beta in human lung cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 26460-26470.
- Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology* 10, 369-377.
- Dessain, S.K., Yu, H., Reddel, R.R., Beijersbergen, R.L., and Weinberg, R.A. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer research* 60, 537-541.
- 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 research* 59, 6087-6090.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9363-9367.
- Doetzelhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E., and Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and cellular biology* 19, 5504-5511.
- Dong, X., Liu, A., Zer, C., Feng, J., Zhen, Z., Yang, M., and Zhong, L. (2009). siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells. *BMC cancer* 9, 133.

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

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

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

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

Eckhardt, S.G., Dai, A., Davidson, K.K., Forseth, B.J., Wahl, G.M., and Von Hoff, D.D. (1994). Induction of differentiation in HL60 cells by the reduction of extrachromosomally amplified c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 6674-6678.

Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology* *16*, 663-669.

Eggert, A., Grotzer, M.A., Ikegaki, N., Liu, X.G., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. (2002). Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer research* *62*, 1802-1808.

Etheridge, K.T., Banik, S.S., 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. *The Journal of biological chemistry* *277*, 24764-24770.

Evans, A.E., D'Angio, G.J., and Randolph, J. (1971). A proposed staging for children with neuroblastoma. *Children's cancer study group A. Cancer* *27*, 374-378.

Fagan, A.M., Zhang, H., Landis, S., Smeyne, R.J., Silos-Santiago, I., and Barbacid, M. (1996). TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo. *J Neurosci* *16*, 6208-6218.

Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* *112*, 659-672.

Favrot, M.C., Combaret, V., and Lasset, C. (1993). CD44--a new prognostic marker for neuroblastoma. *N Engl J Med* *329*, 1965.

Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., *et al.* (1995). The RNA component of human telomerase. *Science (New York, NY)* *269*, 1236-1241.

Ferrandis, E., Da Silva, J., Riou, G., and Benard, I. (1994). Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer research* *54*, 2256-2261.

Flint, J., Craddock, C.F., Villegas, A., Bentley, D.P., Williams, H.J., Galanello, R., Cao, A., Wood, W.G., Ayyub, H., and Higgs, D.R. (1994). Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *American journal of human genetics* *55*, 505-512.

Flygare, J., Armstrong, R.C., Wennborg, A., Orsan, S., and Hellgren, D. (1998). Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS letters* *427*, 247-251.

Folini, M., Brambilla, C., Villa, R., Gandellini, P., Vignati, S., Paduano, F., Daidone, M.G., and Zaffaroni, N. (2005). Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer* *41*, 624-634.

Fong, C.T., Dracopoli, N.C., White, P.S., Merrill, P.T., Griffith, R.C., Housman, D.E., and Brodeur, G.M. (1989). Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 3753-3757.

Fong, C.T., White, P.S., Peterson, K., Sapienza, C., Cavenee, W.K., Kern, S.E., Vogelstein, B., Cantor, A.B., Look, A.T., and Brodeur, G.M. (1992). Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer research* *52*, 1780-1785.

Ford, L.P., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA (New York, NY)* *7*, 1068-1075.

Friedman, K.L., and Cech, T.R. (1999). Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes & development* *13*, 2863-2874.

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

Fu, W., Killen, M., Culmsee, C., Dhar, S., Pandita, T.K., and Mattson, M.P. (2000). The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *J Mol Neurosci* *14*, 3-15.

Fu, X.H., Zhang, J.S., Zhang, N., and Zhang, Y.D. (2005). Combination of telomerase antisense oligonucleotides simultaneously targeting hTR and hTERT produces synergism of inhibition of telomerase activity and growth in human colon cancer cell line. *World J Gastroenterol* 11, 785-790.

Fujimoto, K., Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Kitagawa, Y., Itoh, H., Takahashi, M., and Inoue, M. (2000). Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic acids research* 28, 2557-2562.

Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006). 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene* 25, 5125-5133.

Fulda, S., Kufer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K.M. (2001). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20, 5865-5877.

Gehring, M., Berthold, F., Edler, L., Schwab, M., and Amler, L.C. (1995). The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer research* 55, 5366-5369.

Giannini, G., Cerignoli, F., Mellone, M., Massimi, I., Ambrosi, C., Rinaldi, C., and Gulino, A. (2005). Molecular mechanism of HMGA1 deregulation in human neuroblastoma. *Cancer Lett* 228, 97-104.

Giannini, G., Dawson, M.I., Zhang, X., and Thiele, C.J. (1997). Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 26693-26701.

Gilson, E., and Segal-Bendirdjian, E. The telomere story or the triumph of an open-minded research. *Biochimie* 92, 321-326.

Godfried, M.B., Veenstra, M., v Sluis, P., Boon, K., v Asperen, R., Hermus, M.C., v Schaik, B.D., Voute, T.P., Schwab, M., Versteeg, R., *et al.* (2002). The N-myc and c-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2. *Oncogene* 21, 2097-2101.

Goldschneider, D., Blanc, E., Raguenez, G., Haddada, H., Benard, J., and Douc-Rasy, S. (2003). When p53 needs p73 to be functional - forced p73 expression induces nuclear accumulation of endogenous p53 protein. *Cancer letters* 197, 99-103.

Gonzalez-Suarez, E., Geserick, C., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2005). Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice. *Oncogene* 24, 2256-2270.

Gonzalez-Suarez, E., Goytisolo, F.A., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2003). Telomere dysfunction results in enhanced organismal sensitivity to the alkylating agent N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer research* 63, 7047-7050.

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

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

Gorbunova, V., Seluanov, A., and Pereira-Smith, O.M. (2002). Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 38540-38549.

Greenberg, R.A., Allsopp, R.C., Chin, L., Morin, G.B., and DePinho, R.A. (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16, 1723-1730.

Greenberg, R.A., O'Hagan, R.C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S.R., Adams, R.R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G.B., and DePinho, R.A. (1999). Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18, 1219-1226.

Greider, C.W. (1999). Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97, 419-422.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.

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.

Guilleret, I., and Benhattar, J. (2004). Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 325, 1037-1043.

Guilleret, I., Yan, P., Grange, F., Braunschweig, R., Bosman, F.T., and Benhattar, J. (2002). Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *International journal of cancer* 101, 335-341.

Gunes, C., 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 research* 60, 2116-2121.

Guo, C., Armbruster, B.N., Price, D.T., and Counter, C.M. (2003). In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *The Journal of urology* 170, 615-618.

Guo, C., White, P.S., Weiss, M.J., Hogarty, M.D., Thompson, P.M., Stram, D.O., Gerbing, R., Matthay, K.K., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., *et al.* (1999). Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 18, 4948-4957.

Guo, X., Wang, W., Zhou, F., Lu, Z., Fang, R., Jia, F., Bu, X., Li, R., Zhang, B., Wu, M., *et al.* (2008). siRNA-mediated inhibition of hTERT enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *Cancer biology & therapy* 7, 1555-1560.

Gurney, J.G., Ross, J.A., Wall, D.A., Bleyer, W.A., Severson, R.K., and Robison, L.L. (1997). Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 19, 428-432.

Haendeler, J., Drose, S., Buchner, 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 929-935.

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. *Molecular and cellular biology* 23, 4598-4610.

Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J.F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2004). Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circulation research* 94, 768-775.

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 letters* 536, 180-186.

Hahn, C.K., Ross, K.N., Warrington, I.M., Mazitschek, R., Kanegai, C.M., Wright, R.D., Kung, A.L., Golub, T.R., and Stegmaier, K. (2008). Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9751-9756.

Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999a). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-468.

Hahn, W.C., Stewart, S.A., Brooks, M.W., York, S.G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.L., Knoll, J.H., Meyerson, M., and Weinberg, R.A. (1999b). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature medicine* **5**, 1164-1170.

Hakin-Smith, V., Jellinek, D.A., Levy, D., Carroll, T., Teo, M., Timperley, W.R., McKay, M.J., Reddel, R.R., and Royds, J.A. (2003). Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet* **361**, 836-838.

Hansford, L.M., McKee, A.E., Zhang, L., George, R.E., Gerstle, J.T., Thorner, P.S., Smith, K.M., Look, A.T., Yeger, H., Miller, F.D., *et al.* (2007). Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer research* **67**, 11234-11243.

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.

Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M., and Allsopp, R.C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental gerontology* **27**, 375-382.

Harrington, L. (2004). Those dam-aged telomeres! *Curr Opin Genet Dev* **14**, 22-28.

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 (New York, NY)* **275**, 973-977.

Harrington, L.A., and Greider, C.W. (1991). Telomerase primer specificity and chromosome healing. *Nature* **353**, 451-454.

Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., and Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**, 866-868.

Hayashi, Y., Kanda, N., Inaba, T., Hanada, R., Nagahara, N., Muchi, H., and Yamamoto, K. (1989). Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer* **63**, 126-132.

Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research* **37**, 614-636.

Heiss, N.S., Knight, S.W., Vulliamy, T.J., Klauck, S.M., Wiemann, S., Mason, P.J., Poustka, A., and Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by

mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nature genetics* *19*, 32-38.

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

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

Henson, J.D., Hannay, J.A., McCarthy, S.W., Royds, J.A., Yeager, T.R., Robinson, R.A., Wharton, S.B., Jellinek, D.A., Arbuckle, S.M., Yoo, J., *et al.* (2005). A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res* *11*, 217-225.

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

Herbst, A., Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (2004). Multiple cell-type-specific elements regulate Myc protein stability. *Oncogene* *23*, 3863-3871.

Hickman, J.A. (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer metastasis reviews* *11*, 121-139.

Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A., and Brenner, M.K. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14228-14233.

Hiyama, E., Hiyama, K., Ohtsu, K., Yamaoka, H., Ichikawa, T., Shay, J.W., and Yokoyama, T. (1997). Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* *33*, 1932-1936.

Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Ichikawa, T., and Matsuura, Y. (1992). Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* *83*, 159-164.

Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M.A., and Shay, J.W. (1995). Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature medicine* *1*, 249-255.

Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J.E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A.M., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer research* *62*, 6462-6466.

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

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.

Hogarty, M.D. (2003). The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. *Cancer letters* 197, 173-179.

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.* (1999a). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes & development* 13, 817-826.

Holt, S.E., Glinsky, V.V., Ivanova, A.B., and Glinsky, G.V. (1999b). Resistance to apoptosis in human cells conferred by telomerase function and telomere stability. *Molecular carcinogenesis* 25, 241-248.

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

Hosoi, G., Hara, J., Okamura, T., Osugi, Y., Ishihara, S., Fukuzawa, M., Okada, A., Okada, S., and Tawa, A. (1994). Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* 73, 3087-3093.

Hotti, A., Jarvinen, K., Siivola, P., and Holtta, E. (2000). Caspases and mitochondria in c-Myc-induced apoptosis: identification of ATM as a new target of caspases. *Oncogene* 19, 2354-2362.

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

Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J., and Wang, Z.Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567-572.

Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews* 2, 277-288.

Ikeda, H., Hirato, J., Akami, M., Matsuyama, S., Suzuki, N., Takahashi, A., and Kuroiwa, M. (1995). Bcl-2 oncoprotein expression and apoptosis in neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery* 30, 805-808.

Ikegaki, N., Katsumata, M., Tsujimoto, Y., Nakagawara, A., and Brodeur, G.M. (1995). Relationship between bcl-2 and myc gene expression in human neuroblastoma. *Cancer letters* 91, 161-168.

Imamura, J., Bartram, C.R., Berthold, F., Harms, D., Nakamura, H., and Koeffler, H.P. (1993). Mutation of the p53 gene in neuroblastoma and its relationship with N-myc amplification. *Cancer research* 53, 4053-4058.

Jady, B.E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Molecular biology of the cell* 17, 944-954.

Jagadeesh, S., and Banerjee, P.P. (2006). Telomerase reverse transcriptase regulates the expression of a key cell cycle regulator, cyclin D1. *Biochemical and biophysical research communications* 347, 774-780.

Jakob, S., Schroeder, P., Lukosz, M., Buchner, N., Spyridopoulos, I., Altschmied, J., and Haendeler, J. (2008). Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase. *The Journal of biological chemistry* 283, 33155-33161.

Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugieres, L., Ribeiro, A., de Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., *et al.* (2008). Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455, 967-970.

Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., *et al.* (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer cell* 4, 321-328.

Jin, X., Beck, S., Sohn, Y.W., Kim, J.K., Kim, S.H., Yin, J., Pian, X., Kim, S.C., Choi, Y.J., and Kim, H. (2010). Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor. *Experimental & molecular medicine* 42, 574-582.

Kanaya, T., Kyo, S., Hamada, K., Takakura, M., Kitagawa, Y., Harada, H., and Inoue, M. (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 6, 1239-1247.

Kaneko, Y., Kanda, N., Maseki, N., Sakurai, M., Tsuchida, Y., Takeda, T., Okabe, I., and Sakurai, M. (1987). Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer research* 47, 311-318.

Kang, J.H., Rychahou, P.G., Ishola, T.A., Qiao, J., Evers, B.M., and Chung, D.H. (2006). MYCN silencing induces differentiation and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 192-197.

- 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. *The Journal of biological chemistry* 274, 13085-13090.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science (New York, NY)* 283, 1321-1325.
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science (New York, NY)* 295, 2446-2449.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., and Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research* 53, 3976-3985.
- Kelleher, C., Kurth, I., and Lingner, J. (2005). Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Molecular and cellular biology* 25, 808-818.
- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., and Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends in biochemical sciences* 27, 572-579.
- Keshelava, N., Zuo, J.J., Chen, P., Waidyaratne, S.N., Luna, M.C., Gomer, C.J., Triche, T.J., and Reynolds, C.P. (2001). Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer research* 61, 6185-6193.
- Kharbanda, S., Kumar, V., Dhar, S., Pandey, P., Chen, C., Majumder, P., Yuan, Z.M., Whang, Y., Strauss, W., Pandita, T.K., *et al.* (2000). Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr Biol* 10, 568-575.
- 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. *Human molecular genetics* 6, 2011-2019.
- Kim, M., Xu, L., and Blackburn, E.H. (2003). Catalytically active human telomerase mutants with allele-specific biological properties. *Experimental cell research* 288, 277-287.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, NY)* 266, 2011-2015.

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

Kimura, A., Ohmichi, M., Kawagoe, J., Kyo, S., Mabuchi, S., Takahashi, T., Ohshima, C., Arimoto-Ishida, E., Nishio, Y., Inoue, M., et al. (2004). Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene* 23, 4505-4515.

Kipling, D., and Cooke, H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347, 400-402.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 14, 5579-5588.

Klingelhutz, A.J., Foster, S.A., and McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.

Knudson, A.G., Jr., and Meadows, A.T. (1980). Sounding board. Regression of neuroblastoma IV-S: a genetic hypothesis. *The New England journal of medicine* 302, 1254-1256.

Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M.A., Raschella, G., and Persson, H. (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer research* 53, 2044-2050.

Kondo, S., Tanaka, Y., Kondo, Y., Hitomi, M., Barnett, G.H., Ishizaka, Y., Liu, J., Haqqi, T., Nishiyama, A., Villeponteau, B., et al. (1998). Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *Faseb J* 12, 801-811.

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. *The EMBO journal* 23, 1949-1956.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., et al. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science (New York, NY)* 278, 294-298.

Kovalenko, O.A., Caron, M.J., Ulema, P., Medrano, C., Thomas, A.P., Kimura, M., Bonini, M.G., Herbig, U., and Santos, J.H. (2010a). A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging cell* 9, 203-219.

Kovalenko, O.A., Kaplunov, J., Herbig, U., Detolledo, S., Azzam, E.I., and Santos, J.H. (2010b). Expression of (NES)-hTERT in cancer cells delays cell cycle progression and increases sensitivity to genotoxic stress. *PLoS one* 5, e10812.

Kraemer, K., Fuessel, S., Schmidt, U., Kotzsch, M., Schwenzer, B., Wirth, M.P., and Meye, A. (2003). Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 3794-3800.

Kramer, K., Cheung, N.K., Gerald, W.L., LaQuaglia, M., Kushner, B.H., LeClerc, J.M., LeSauter, L., and Saragovi, H.U. (1997). Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33, 2098-2100.

Kramer, K.M., and Haber, J.E. (1993). New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset of TG1-3 repeats. *Genes & development* 7, 2345-2356.

Kroemer, G., and Martin, S.J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nature medicine* 11, 725-730.

Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Orimo, A., and Inoue, M. (1999). Estrogen activates telomerase. *Cancer research* 59, 5917-5921.

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 research* 28, 669-677.

LaBonne, C., and Bronner-Fraser, M. (1998). Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiol* 36, 175-189.

Lai, S.R., Cunningham, A.P., Huynh, V.Q., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2007). Evidence of extra-telomeric effects of hTERT and its regulation involving a feedback loop. *Experimental cell research* 313, 322-330.

Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y., and Iavarone, A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407, 592-598.

Lastowska, M., Nacheva, E., McGuckin, A., Curtis, A., Grace, C., Pearson, A., and Bown, N. (1997). Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Genes, chromosomes & cancer* 18, 162-169.

Le, S., Sternglanz, R., and Greider, C.W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular biology of the cell* 11, 999-1010.

Bibliographie

Lee, J., Sung, Y.H., Cheong, C., Choi, Y.S., Jeon, H.K., Sun, W., Hahn, W.C., Ishikawa, F., and Lee, H.W. (2008). TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene* 27, 3754-3760.

Lee, M.K., Hande, M.P., and Sabapathy, K. (2005). Ectopic mTERT expression in mouse embryonic stem cells does not affect differentiation but confers resistance to differentiation- and stress-induced p53-dependent apoptosis. *Journal of cell science* 118, 819-829.

Legassie, J.D., and Jarstfer, M.B. (2006). The unmasking of telomerase. *Structure* 14, 1603-1609.

Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology* 6, 443-450.

Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science (New York, NY)* 237, 1154-1162.

Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-483.

Li, H., Zhao, L., Yang, Z., Funder, J.W., and Liu, J.P. (1998). Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 33436-33442.

Li, H., Zhao, L.L., Funder, J.W., and Liu, J.P. (1997a). Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 16729-16732.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997b). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Li, S., Rosenberg, J.E., Donjacour, A.A., Botchkina, I.L., Hom, Y.K., Cunha, G.R., and Blackburn, E.H. (2004). Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer research* 64, 4833-4840.

Lin, S.Y., and Elledge, S.J. (2003). Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113, 881-889.

Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., and Liu, Z.G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development* *13*, 2514-2526.

Lindvall, C., Hou, M., Komurasaki, T., Zheng, C., Henriksson, M., Sedivy, J.M., Bjorkholm, M., Teh, B.T., Nordenskjold, M., and Xu, D. (2003). Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epiregulin gene. *Cancer research* *63*, 1743-1747.

Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science (New York, NY)* *276*, 561-567.

Liu, C., Fang, X., Ge, Z., Jalink, M., Kyo, S., Bjorkholm, M., Gruber, A., Sjoberg, J., and Xu, D. (2007). The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer research* *67*, 2626-2631.

Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J., and Songyang, Z. (2004a). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *The Journal of biological chemistry* *279*, 51338-51342.

Liu, D., Safari, A., O'Connor, M.S., Chan, D.W., Laegerler, A., Qin, J., and Songyang, Z. (2004b). POT1 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nature cell biology* *6*, 673-680.

Liu, J.P. (2000). Telomerase: not just black and white, but shades of gray. *Mol Cell Biol Res Commun* *3*, 129-135.

Liu, K., Hodes, R.J., and Weng, N. (2001). Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J Immunol* *166*, 4826-4830.

Liu, K., Schoonmaker, M.M., Levine, B.L., June, C.H., Hodes, R.J., and Weng, N.P. (1999). Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 5147-5152.

Liu, L., Zhang, J., Bates, S., Li, J.J., Peehl, D.M., Rhim, J.S., and Pfeifer, G.P. (2005). A methylation profile of in vitro immortalized human cell lines. *International journal of oncology* *26*, 275-285.

Liu, Y., Snow, B.E., Hande, M.P., Baerlocher, G., Kickhoefer, V.A., Yeung, D., Wakeham, A., Itie, A., Siderovski, D.P., Lansdorp, P.M., *et al.* (2000). Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Molecular and cellular biology* *20*, 8178-8184.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Loayza, D., and De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-1018.

London, W.B., Castleberry, R.P., Matthay, K.K., Look, A.T., Seeger, R.C., Shimada, H., Thorner, P., Brodeur, G., Maris, J.M., Reynolds, C.P., *et al.* (2005). Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 23, 6459-6465.

Look, A.T., Hayes, F.A., Shuster, J.J., Douglass, E.C., Castleberry, R.P., Bowman, L.C., Smith, E.I., and Brodeur, G.M. (1991). Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 9, 581-591.

Lopatina, N.G., Poole, J.C., Saldanha, S.N., Hansen, N.J., Key, J.S., Pita, M.A., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2003). Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 306, 650-659.

Lu, C., Fu, W., and Mattson, M.P. (2001). Telomerase protects developing neurons against DNA damage-induced cell death. *Brain research* 131, 167-171.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Lutz, W., Stohr, M., Schurmann, J., Wenzel, A., Lohr, A., and Schwab, M. (1996). Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 13, 803-812.

Ly, H., Blackburn, E.H., and Parslow, T.G. (2003). Comprehensive structure-function analysis of the core domain of human telomerase RNA. *Molecular and cellular biology* 23, 6849-6856.

Mac, S.M., D'Cunha, C.A., and Farnham, P.J. (2000). Direct recruitment of N-myc to target gene promoters. *Molecular carcinogenesis* 29, 76-86.

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 TERT and the RMRP RNA. *Nature* 461, 230-235.

Makarov, V.L., Hirose, Y., and Langmore, J.P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.

Makovets, S., and Blackburn, E.H. (2009). DNA damage signalling prevents deleterious telomere addition at DNA breaks. *Nature cell biology* 11, 1383-1386.

Maris, J.M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 362, 2202-2211.

Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R., and Cohn, S.L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet* 369, 2106-2120.

Maris, J.M., and Matthay, K.K. (1999). Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17, 2264-2279.

Maris, J.M., Weiss, M.J., Guo, C., Gerbing, R.B., Stram, D.O., White, P.S., Hogarty, M.D., Sulman, E.P., Thompson, P.M., Lukens, J.N., *et al.* (2000). Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 18, 1888-1899.

Maris, J.M., White, P.S., Beltinger, C.P., Sulman, E.P., Castleberry, R.P., Shuster, J.J., Look, A.T., and Brodeur, G.M. (1995). Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer research* 55, 4664-4669.

Martin-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J.P., and Blasco, M.A. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10471-10476.

Martinez, P., and Blasco, M.A. (2010). Role of shelterin in cancer and aging. *Aging cell* 9, 653-666.

Martinez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews* 11, 161-176.

Martinez, P., Thanasoula, M., Carlos, A.R., Gomez-Lopez, G., Tejera, A.M., Schoeftner, S., Dominguez, O., Pisano, D.G., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2010). Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nature cell biology* 12, 768-780.

Martinez, P., Thanasoula, M., Munoz, P., Liao, C., Tejera, A., McNees, C., Flores, J.M., Fernandez-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 & development* 23, 2060-2075.

Martinsson, T., Sjoberg, R.M., Hedborg, F., and Kogner, P. (1995). Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer research* 55, 5681-5686.

Massard, C., Zermati, Y., Pauleau, A.L., Larochette, N., Metivier, D., Sabatier, L., Kroemer, G., and Soria, J.C. (2006). hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 25, 4505-4514.

Masutomi, K., and Hahn, W.C. (2003). Telomerase and tumorigenesis. *Cancer letters* 194, 163-172.

Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J.M., Currier, J.L., Tothova, Z., Manola, J.B., Ganesan, S., Lansdorp, P.M., Collins, K., and Hahn, W.C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8222-8227.

Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., *et al.* (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241-253.

Matsumoto, K., Wada, R.K., Yamashiro, J.M., Kaplan, D.R., and Thiele, C.J. (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer research* 55, 1798-1806.

Matsuo, T., and Thiele, C.J. (1998). p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 16, 3337-3343.

Matthay, K.K., Villablanca, J.G., Seeger, R.C., Stram, D.O., Harris, R.E., Ramsay, N.K., Swift, P., Shimada, H., Black, C.T., Brodeur, G.M., *et al.* (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *The New England journal of medicine* 341, 1165-1173.

McEachern, M.J., Krauskopf, A., and Blackburn, E.H. (2000). Telomeres and their control. *Annual review of genetics* 34, 331-358.

McKenzie, P.P., Guichard, S.M., Middlemas, D.S., Ashmun, R.A., Danks, M.K., and Harris, L.C. (1999). Wild-type p53 can induce p21 and apoptosis in neuroblastoma cells

but the DNA damage-induced G1 checkpoint function is attenuated. *Clin Cancer Res* 5, 4199-4207.

Meier, A., Fiegler, H., Munoz, P., Ellis, P., Rigler, D., Langford, C., Blasco, M.A., Carter, N., and Jackson, S.P. (2007). Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by ChIP-chip at damaged telomeres. *The EMBO journal* 26, 2707-2718.

Mergui, X., Puiffe, M.L., Valteau-Couanet, D., Lipinski, M., Benard, J., and Amor-Gueret, M. p21Waf1 expression is regulated by nuclear intermediate filament vimentin in neuroblastoma. *BMC cancer* 10, 473.

Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* 11, 577-590.

Minamino, T., and Kourembanas, S. (2001). Mechanisms of telomerase induction during vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation research* 89, 237-243.

Misawa, M., Tauchi, T., Sashida, G., Nakajima, A., Abe, K., Ohyashiki, J.H., and Ohyashiki, K. (2002). Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *International journal of oncology* 21, 1087-1092.

Mitchell, J.R., Cheng, J., and Collins, K. (1999a). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Molecular and cellular biology* 19, 567-576.

Mitchell, J.R., and Collins, K. (2000). Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Molecular cell* 6, 361-371.

Mitchell, J.R., Wood, E., and Collins, K. (1999b). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551-555.

Moll, U.M., LaQuaglia, M., Benard, J., and Riou, G. (1995). Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4407-4411.

Moll, U.M., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M., and Zambetti, G. (1996). Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Molecular and cellular biology* 16, 1126-1137.

Mora, J., Cheung, N.K., and Gerald, W.L. (2001). Genetic heterogeneity and clonal evolution in neuroblastoma. *British journal of cancer* 85, 182-189.

Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.

Mosse, Y.P., Laudenslager, M., Khazi, D., Carlisle, A.J., Winter, C.L., Rappaport, E., and Maris, J.M. (2004). Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *American journal of human genetics* 75, 727-730.

Mosse, Y.P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K.A., Wood, A., Attiyeh, E.F., Laquaglia, M.J., Sennett, R., Lynch, J.E., Perri, P., *et al.* (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455, 930-935.

Muhlethaler-Mottet, A., Balmas, K., Auderset, K., Joseph, J.M., and Gross, N. (2003). Restoration of TRAIL-induced apoptosis in a caspase-8-deficient neuroblastoma cell line by stable re-expression of caspase-8. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1010, 195-199.

Muhlethaler-Mottet, A., Bourlout, K.B., Auderset, K., Joseph, J.M., and Gross, N. (2004). Drug-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in caspase-8-complemented neuroblastoma cells proceeds via activation of intrinsic and extrinsic pathways and caspase-dependent cleavage of XIAP, Bcl-xL and RIP. *Oncogene* 23, 5415-5425.

Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1994). Clinical significance of expression of neurotrophic factors and their receptors in neuroblastoma. *Progress in clinical and biological research* 385, 155-161.

Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N.J., Azar, C.G., Cantor, A.B., and Brodeur, G.M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 328, 847-854.

Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J., and Brodeur, G.M. (1992). Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer research* 52, 1364-1368.

Nakagawara, A., Ikeda, K., Tsuda, T., and Higashi, K. (1988). Biological characteristics of N-myc amplified neuroblastoma in patients over one year of age. *Progress in clinical and biological research* 271, 31-39.

- Nara, K., Kusafuka, T., Yoneda, A., Oue, T., Sangkhathat, S., and Fukuzawa, M. (2007). Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity and cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification. *International journal of oncology* 30, 1189-1196.
- Nergadze, S.G., Santagostino, M.A., Salzano, A., Mondello, C., and Giulotto, E. (2007). Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biol* 8, R260.
- Nguyen, B.N., Elmore, L.W., and Holt, S.E. (2009). Mechanism of dominant-negative telomerase function. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8, 3227-3233.
- Nickerson, H.J., Matthay, K.K., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Shimada, H., Perez, C., Atkinson, J.B., Selch, M., Gerbing, R.B., Stram, D.O., *et al.* (2000). Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 18, 477-486.
- Nikolaev, A.Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J., and Gu, W. (2003). Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29-40.
- Nomoto, K., Maekawa, M., Sugano, K., Ushiyama, M., Fukayama, N., Fujita, S., and Kakizoe, T. (2002). Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. *Japanese journal of clinical oncology* 32, 3-8.
- Noujaim, D., van Golen, C.M., van Golen, K.L., Grauman, A., and Feldman, E.L. (2002). N-Myc and Bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 21, 4549-4557.
- O'Connor, M.S., Safari, A., Liu, D., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *The Journal of biological chemistry* 279, 28585-28591.
- Oh, S., Song, Y., Yim, J., and Kim, T.K. (1999). The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *The Journal of biological chemistry* 274, 37473-37478.
- Oh, S., Song, Y.H., Yim, J., and Kim, T.K. (2000). Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* 19, 1485-1490.
- Ohali, A., Avigad, S., Ash, S., Goshen, Y., Luria, D., Feinmesser, M., Zaizov, R., and Yaniv, I. (2006). Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 107, 1391-1399.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology* 41, 181-190.

Onitake, Y., Hiyama, E., Kamei, N., Yamaoka, H., Sueda, T., and Hiyama, K. (2009). Telomere biology in neuroblastoma: telomere binding proteins and alternative strengthening of telomeres. *Journal of pediatric surgery* 44, 2258-2266.

Ouellette, M.M., Liao, M., Herbert, B.S., Johnson, M., Holt, S.E., Liss, H.S., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *The Journal of biological chemistry* 275, 10072-10076.

Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics* 42, 301-334.

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.

Park, Y.P., Choi, S.C., Kim, J.H., Song, E.Y., Kim, J.W., Yoon, D.Y., Yeom, Y.I., Lim, J.S., Kim, J.W., Paik, S.G., *et al.* (2007). Up-regulation of Mac-2 binding protein by hTERT in gastric cancer. *International journal of cancer* 120, 813-820.

Park, Y.P., Kim, K.D., Kang, S.H., Yoon do, Y., Park, J.W., Kim, J.W., and Lee, H.G. (2008). Human telomerase reverse transcriptase (hTERT): a target molecule for the treatment of cisplatin-resistant tumors. *The Korean journal of laboratory medicine* 28, 430-437.

Parkinson, G.N., Lee, M.P., and Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 417, 876-880.

Pendino, F., Dudognon, C., Delhommeau, F., Sahraoui, T., Flexor, M., Bennaceur-Griscelli, A., Lanotte, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2003). Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 22, 9142-9150.

Pendino, F., Flexor, M., Delhommeau, F., Buet, D., Lanotte, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2001). Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6662-6667.

Peng, Y., Mian, I.S., and Lue, N.F. (2001). Analysis of telomerase processivity: mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance. *Molecular cell* 7, 1201-1211.

Perrault, S.D., Hornsby, P.J., and Betts, D.H. (2005). Global gene expression response to telomerase in bovine adrenocortical cells. *Biochemical and biophysical research communications* 335, 925-936.

Pession, A., Tonelli, R., Fronza, R., Sciamanna, E., Corradini, R., Sforza, S., Tedeschi, T., Marchelli, R., Montanaro, L., Camerin, C., *et al.* (2004). Targeted inhibition of NMYC by peptide nucleic acid in N-myc amplified human neuroblastoma cells: cell-cycle inhibition with induction of neuronal cell differentiation and apoptosis. *International journal of oncology* 24, 265-272.

Pinon, L.G., Minichiello, L., Klein, R., and Davies, A.M. (1996). Timing of neuronal death in *trkA*, *trkB* and *trkC* mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signalling. *Development (Cambridge, England)* 122, 3255-3261.

Plantaz, D., Mohapatra, G., Matthay, K.K., Pellarin, M., Seeger, R.C., and Feuerstein, B.G. (1997). Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *The American journal of pathology* 150, 81-89.

Pogacic, V., Dragon, F., and Filipowicz, W. (2000). Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Molecular and cellular biology* 20, 9028-9040.

Ponzoni, M., Bocca, P., Chiesa, V., Decensi, A., Pistoia, V., Raffaghello, L., Rozzo, C., and Montaldo, P.G. (1995). Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer research* 55, 853-861.

Poremba, C., Hero, B., Heine, B., Scheel, C., Schaefer, K.L., Christiansen, H., Berthold, F., Kneif, S., Stein, H., Juergens, H., *et al.* (2000a). Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas. *Medical and pediatric oncology* 35, 651-655.

Poremba, C., Scheel, C., Hero, B., Christiansen, H., Schaefer, K.L., Nakayama, J., Berthold, F., Juergens, H., Boecker, W., and Dockhorn-Dworniczak, B. (2000b). Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastoma: a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh-frozen and paraffin-embedded tissues. *J Clin Oncol* 18, 2582-2592.

Poremba, C., Willenbring, H., Hero, B., Christiansen, H., Schafer, K.L., Brinkschmidt, C., Jurgens, H., Bocker, W., and Dockhorn-Dworniczak, B. (1999). Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* 10, 715-721.

Prasad, S.C., Thraves, P.J., Kuettel, M.R., Srinivasarao, G.Y., Dritschilo, A., and Soldatenkov, V.A. (1998). Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human

prostate epithelial tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 249, 332-338.

Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell death and differentiation* 9, 505-512.

Racek, T., Mise, N., Li, Z., Stoll, A., and Putzer, B.M. (2005). C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. *The Journal of biological chemistry* 280, 40402-40405.

Raffioni, S., Bradshaw, R.A., and Buxser, S.E. (1993). The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Annual review of biochemistry* 62, 823-850.

Raguenez, G., Muhlethaler-Mottet, A., Meier, R., Duros, C., Benard, J., and Gross, N. (2009). Fenretinide-induced caspase-8 activation and apoptosis in an established model of metastatic neuroblastoma. *BMC cancer* 9, 97.

Rahman, R., Latonen, L., and Wiman, K.G. (2005). hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene* 24, 1320-1327.

Ram, R., Uziel, O., Eldan, O., Fenig, E., Beery, E., Lichtenberg, S., Nordenberg, Y., and Lahav, M. (2009). Ionizing radiation up-regulates telomerase activity in cancer cell lines by post-translational mechanism via ras/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Clin Cancer Res* 15, 914-923.

Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., *et al.* (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature cell biology* 3, 839-843.

Ray, S., Karamysheva, Z., Wang, L., Shippen, D.E., and Price, C.M. (2002). Interactions between telomerase and primase physically link the telomere and chromosome replication machinery. *Molecular and cellular biology* 22, 5859-5868.

Reddel, R.R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer letters* 194, 155-162.

Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P., and Lingner, J. (2003). A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* 13, 568-574.

Reichman, T.W., Albanell, J., Wang, X., Moore, M.A., and Studzinski, G.P. (1997). Downregulation of telomerase activity in HL60 cells by differentiating agents is accompanied by increased expression of telomerase-associated protein. *Journal of cellular biochemistry* 67, 13-23.

Bibliographie

Renaud, S., Loukinov, D., Bosman, F.T., Lobanenkova, V., and Benhattar, J. (2005). CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic acids research* 33, 6850-6860.

Rettig, W.J., Spengler, B.A., Chesa, P.G., Old, L.J., and Biedler, J.L. (1987). Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. *Cancer research* 47, 1383-1389.

Reynolds, C.P. (2000). Differentiating agents in pediatric malignancies: retinoids in neuroblastoma. *Current oncology reports* 2, 511-518.

Reynolds, C.P., Zuo, J.J., Kim, N.W., Wang, H., Lukens, J.N., Matthay, K.K., and Seeger, R.C. (1997). Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 33, 1929-1931.

Rhodes, D., and Giraldo, R. (1995). Telomere structure and function. *Current opinion in structural biology* 5, 311-322.

Richardson, R.M., Nguyen, B., Holt, S.E., Broaddus, W.C., and Fillmore, H.L. (2007). Ectopic telomerase expression inhibits neuronal differentiation of NT2 neural progenitor cells. *Neurosci Lett* 421, 168-172.

Rohde, V., Sattler, H.P., Bund, T., Bonkhoff, H., Fixemer, T., Bachmann, C., Lensch, R., Unteregger, G., Stoeckle, M., and Wullich, B. (2000). Expression of the human telomerase reverse transcriptase is not related to telomerase activity in normal and malignant renal tissue. *Clin Cancer Res* 6, 4803-4809.

Romanov, V.V., James, C.H., Sherrington, P.D., and Pettitt, A.R. (2005). Basic fibroblast growth factor suppresses p53 activation in the neoplastic cells of a proportion of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 24, 6855-6860.

Ross, R.A., and Biedler, J.L. (1985). Expression of a melanocyte phenotype in human neuroblastoma cells in vitro. *Progress in clinical and biological research* 175, 249-259.

Ross, R.A., Biedler, J.L., and Spengler, B.A. (2003). A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer letters* 197, 35-39.

Ross, R.A., Spengler, B.A., and Biedler, J.L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 71, 741-747.

Ross, R.A., Spengler, B.A., Domenech, C., Porubcin, M., Rettig, W.J., and Biedler, J.L. (1995). Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ* 6, 449-456.

Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2002). Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *The EMBO journal* 21, 1967-1977.

Sadee, W., Yu, V.C., Richards, M.L., Preis, P.N., Schwab, M.R., Brodsky, F.M., and Biedler, J.L. (1987). Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer research* 47, 5207-5212.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.

Santos, J.H., Hunakova, L., Chen, Y., Bortner, C., and Van Houten, B. (2003). Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *The Journal of biological chemistry* 278, 1728-1734.

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.

Santos, J.H., Meyer, J.N., and Van Houten, B. (2006). Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Human molecular genetics* 15, 1757-1768.

Saretzki, G., Ludwig, A., von Zglinicki, T., and Runnebaum, I.B. (2001). Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells. *Cancer gene therapy* 8, 827-834.

Sarin, K.Y., Cheung, P., Gilson, D., Lee, E., Tennen, R.I., Wang, E., Artandi, M.K., Oro, A.E., and Artandi, S.E. (2005). Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 436, 1048-1052.

Sarthy, J., Bae, N.S., Scrafford, J., and Baumann, P. (2009). Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *The EMBO journal* 28, 3390-3399.

Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10832-10837.

Schleiermacher, G., Delattre, O., Peter, M., Mosseri, V., Delonlay, P., Vielh, P., Thomas, G., Zucker, J.M., Magdelenat, H., and Michon, J. (1996). Clinical relevance of loss heterozygosity of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma: a single-institution study. *International journal of cancer* 69, 73-78.

Schleiermacher, G., Rubie, H., Hartmann, O., Bergeron, C., Chastagner, P., Mechinaud, F., and Michon, J. (2003). Treatment of stage 4s neuroblastoma--report of 10 years'

experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP). *British journal of cancer* 89, 470-476.

Schmidt, M.L., Lukens, J.N., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Shimada, H., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Perez, C., Haase, G.M., and Matthay, K.K. (2000). Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 18, 1260-1268.

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., and Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305, 245-248.

Schwab, M., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Grzeschik, K.H., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Brodeur, G., and Trent, J. (1984). Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308, 288-291.

Sears, R.C. (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3, 1133-1137.

Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y., and Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine* 313, 1111-1116.

Seeger, R.C., Wada, R., Brodeur, G.M., Moss, T.J., Bjork, R.L., Sousa, L., and Slamon, D.J. (1988). Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Progress in clinical and biological research* 271, 41-49.

Segal-Bendirdjian, E., Hillion, J., and Belmokhtar, C.A. (2003). [Current concepts on apoptotic signalling pathways: new targets for anticancer strategies]. *Bulletin du cancer* 90, 9-17.

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. *The EMBO journal* 19, 2652-2661.

Sfeir, A., Kabir, S., van Overbeek, M., Celli, G.B., and de Lange, T. (2010). Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science (New York, NY)* 327, 1657-1661.

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90-103.

Sharma, G.G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., Iliakis, G., Shay, J.W., Young, C.S., and Pandita, T.K. (2003). hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 22, 131-146.

Sharma, H.W., Sokoloski, J.A., Perez, J.R., Maltese, J.Y., Sartorelli, A.C., Stein, C.A., Nichols, G., Khaled, Z., Telang, N.T., and Narayanan, R. (1995). Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12343-12346.

Sharpless, N.E. (2003). The persistence of senescence. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003, PE24.

Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *The Journal of clinical investigation* 113, 160-168.

Shay, J.W. (1999). At the end of the millennium, a view of the end. *Nature genetics* 23, 382-383.

Shay, J.W., Van Der Haegen, B.A., Ying, Y., and Wright, W.E. (1993). The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Experimental cell research* 209, 45-52.

Shay, J.W., and Wright, W.E. (1989). Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Experimental cell research* 184, 109-118.

Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N., Matthay, K.K., *et al.* (1999). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86, 364-372.

Shimizu, N., Nakamura, H., Kadota, T., Kitajima, K., Oda, T., Hirano, T., and Utiyama, H. (1994). Loss of amplified c-myc genes in the spontaneously differentiated HL-60 cells. *Cancer research* 54, 3561-3567.

Shin, K.H., Kang, M.K., Dicterow, E., Kameta, A., Baluda, M.A., and Park, N.H. (2004). Introduction of human telomerase reverse transcriptase to normal human fibroblasts enhances DNA repair capacity. *Clin Cancer Res* 10, 2551-2560.

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. *British journal of cancer* 89, 1473-1478.

Shojaei-Brosseau, T., Chompret, A., Abel, A., de Vathaire, F., Raquin, M.A., Brugieres, L., Feunteun, J., Hartmann, O., and Bonaiti-Pellie, C. (2004). Genetic epidemiology of

neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatric blood & cancer* 42, 99-105.

Sidell, N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *Journal of the National Cancer Institute* 68, 589-596.

Slack, A., Chen, Z., Tonelli, R., Pule, M., Hunt, L., Pession, A., and Shohet, J.M. (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 731-736.

Slack, R., Lach, B., Gregor, A., al-Mazidi, H., and Proulx, P. (1992). Retinoic acid- and staurosporine-induced bidirectional differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Experimental cell research* 202, 17-27.

Smith, L.L., Collier, H.A., and Roberts, J.M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature cell biology* 5, 474-479.

Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual review of biochemistry* 73, 177-208.

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature reviews* 2, 850-861.

Soder, A.I., Going, J.J., Kaye, S.B., and Keith, W.N. (1998). Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization. *Oncogene* 16, 979-983.

Soder, A.I., Hoare, S.F., Muir, S., Going, J.J., Parkinson, E.K., and Keith, W.N. (1997). Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 14, 1013-1021.

Sprung, C.N., Reynolds, G.E., Jasin, M., and Murnane, J.P. (1999). Chromosome healing in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6781-6786.

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. *The EMBO journal* 20, 5532-5540.

Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R., and Gottschling, D.E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes & development* 17, 2384-2395.

Stewart, S.A., Ben-Porath, I., Carey, V.J., O'Connor, B.F., Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2003). Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature genetics* 33, 492-496.

Stewart, S.A., Hahn, W.C., O'Connor, B.F., Banner, E.N., Lundberg, A.S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M.W., Fleming, M., Zimonjic, D.B., *et al.* (2002). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12606-12611.

Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO journal* 18, 1660-1672.

Streutker, C.J., Thorner, P., Fabricius, N., Weitzman, S., and Zielenska, M. (2001). Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas. *Pediatr Dev Pathol* 4, 62-67.

Stupack, D.G., Teitz, T., Potter, M.D., Mikolon, D., Houghton, P.J., Kidd, V.J., Lahti, J.M., and Cheresch, D.A. (2006). Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439, 95-99.

Subhawong, A.P., Heaphy, C.M., Argani, P., Konishi, Y., Kouprina, N., Nassar, H., Vang, R., and Meeker, A.K. (2009). The alternative lengthening of telomeres phenotype in breast carcinoma is associated with HER-2 overexpression. *Mod Pathol* 22, 1423-1431.

Sundquist, W.I., and Klug, A. (1989). Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342, 825-829.

Suzuki, K., Kashimura, H., Ohkawa, J., Itabashi, M., Watanabe, T., Sawahata, T., Nakahara, A., Muto, H., and Tanaka, N. (2000). Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 744-751.

Suzuki, T., Bogenmann, E., Shimada, H., Stram, D., and Seeger, R.C. (1993). Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* 85, 377-384.

Swarbrick, A., Woods, S.L., Shaw, A., Balakrishnan, A., Phua, Y., Nguyen, A., Chantry, Y., Lim, L., Ashton, L.J., Judson, R.L., *et al.* (2010). miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma. *Nature medicine* 16, 1134-1140.

Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kyo, S., Ohno, T., Taira, T., Ariga, H., Nakajima, K., *et al.* (2003). EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer research* 63, 8338-8344.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.

Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M., and Inoue, M. (1999). Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer research* 59, 551-557.

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 research* 29, 3006-3011.

Takayama, H., Suzuki, T., Mugishima, H., Fujisawa, T., Ookuni, M., Schwab, M., Gehring, M., Nakamura, Y., Sugimura, T., Terada, M., *et al.* (1992). Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene* 7, 1185-1189.

Takeda, O., Homma, C., Maseki, N., Sakurai, M., Kanda, N., Schwab, M., Nakamura, Y., and Kaneko, Y. (1994). There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer* 10, 30-39.

Takita, J., Hayashi, Y., Kohno, T., Shiseki, M., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K., and Yokota, J. (1995). Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene* 11, 1829-1834.

Takita, J., Hayashi, Y., Kohno, T., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K., and Yokota, J. (1997). Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer research* 57, 907-912.

Tao, Z., Chen, S., Wu, Z., Xiao, B., Liu, J., and Hou, W. (2005). Targeted therapy of human laryngeal squamous cell carcinoma in vitro by antisense oligonucleotides directed against telomerase reverse transcriptase mRNA. *The Journal of laryngology and otology* 119, 92-96.

Tauchi, T., Shin-Ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Nakajima, A., Shimamoto, T., Ohyashiki, J.H., and Ohyashiki, K. (2003). Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* 22, 5338-5347.

Teitz, T., Stupack, D.G., and Lahti, J.M. (2006). Halting neuroblastoma metastasis by controlling integrin-mediated death. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5, 681-685.

Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., and Kidd, V.J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nature medicine* 6, 529-535.

Tejera, A.M., Stagno d'Alcontres, M., 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, 775-789.

Teo, H., Ghosh, S., Luesch, H., Ghosh, A., Wong, E.T., Malik, N., Orth, A., de Jesus, P., Perry, A.S., Oliver, J.D., *et al.* (2010). Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature cell biology* 12, 758-767.

Thiele, C.J., Reynolds, C.P., and Israel, M.A. (1985). Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-406.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science (New York, NY)* 281, 1312-1316.

Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Molecular biology of the cell* 17, 955-965.

Trochet, D., Bourdeaut, F., Janoueix-Lerosey, I., Deville, A., de Pontual, L., Schleiermacher, G., Coze, C., Philip, N., Frebourg, T., Munnich, A., *et al.* (2004). Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *American journal of human genetics* 74, 761-764.

Tweddle, D.A., Malcolm, A.J., Cole, M., Pearson, A.D., and Lunec, J. (2001). p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *The American journal of pathology* 158, 2067-2077.

Ulaner, G.A., Hu, J.F., Vu, T.H., Giudice, L.C., and Hoffman, A.R. (1998). Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer research* 58, 4168-4172.

Ulaner, G.A., Hu, J.F., Vu, T.H., Oruganti, H., Giudice, L.C., and Hoffman, A.R. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *International journal of cancer* 85, 330-335.

Valent, A., Benard, J., Clause, B., Barrois, M., Valteau-Couanet, D., Terrier-Lacombe, M.J., Spengler, B., and Bernheim, A. (2001). In vivo elimination of acentric double minutes containing amplified MYCN from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. *The American journal of pathology* 158, 1579-1584.

Valent, A., Benard, J., Venuat, A.M., Silva, J., Duverger, A., Duarte, N., Hartmann, O., Spengler, B.A., and Bernheim, A. (1999). Phenotypic and genotypic diversity of human

neuroblastoma studied in three IGR cell line models derived from bone marrow metastases. *Cancer genetics and cytogenetics* 112, 124-129.

van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.

van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.

Vangipuram, S.D., Wang, Z.J., and Lyman, W.D. (2010). Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents. *Pediatric blood & cancer* 54, 361-368.

Verdun, R.E., and Karlseder, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127, 709-720.

Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science (New York, NY)* 302, 1036-1038.

Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J.M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G.M., Pelletier, J., and Gros, P. (1993). Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer research* 53, 5269-5273.

Von Hoff, D.D., McGill, J.R., Forseth, B.J., Davidson, K.K., Bradley, T.P., Van Devanter, D.R., and Wahl, G.M. (1992). Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8165-8169.

Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews* 2, 594-604.

Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., *et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine* 5, 157-163.

Wallick, C.J., Gamper, I., Thorne, M., Feith, D.J., Takasaki, K.Y., Wilson, S.M., Seki, J.A., Pegg, A.E., Byus, C.V., and Bachmann, A.S. (2005). Key role for p27Kip1, retinoblastoma protein Rb, and MYCN in polyamine inhibitor-induced G1 cell cycle arrest in MYCN-amplified human neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 5606-5618.

Walton, J.D., Kattan, D.R., Thomas, S.K., Spengler, B.A., Guo, H.F., Biedler, J.L., Cheung, N.K., and Ross, R.A. (2004). Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia (New York, NY)* 6, 838-845.

Wang, J., Feng, H., Huang, X.Q., Xiang, H., Mao, Y.W., Liu, J.P., Yan, Q., Liu, W.B., Liu, Y., Deng, M., *et al.* (2005). Human telomerase reverse transcriptase immortalizes bovine lens epithelial cells and suppresses differentiation through regulation of the ERK signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 280, 22776-22787.

Wang, J., Hannon, G.J., and Beach, D.H. (2000). Risky immortalization by telomerase. *Nature* 405, 755-756.

Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G.J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes & development* 12, 1769-1774.

Wang, S., and Zhu, J. (2003). Evidence for a relief of repression mechanism for activation of the human telomerase reverse transcriptase promoter. *The Journal of biological chemistry* 278, 18842-18850.

Waterhouse, N.J., Finucane, D.M., Green, D.R., Elce, J.S., Kumar, S., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K., Lavin, M.F., and Watters, D.J. (1998). Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 5, 1051-1061.

Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Browne, K.A., Wowk, M.E., Newbold, A., Sutton, V.R., Clarke, C.J., Oliaro, J., Lindemann, R.K., Bird, P.I., *et al.* (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 4476-4482.

Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New biology* 239, 197-201.

Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature genetics* 17, 498-502.

Weiss, W.A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B.G., and Bishop, J.M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *The EMBO journal* 16, 2985-2995.

Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K., and Lingner, J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *The EMBO journal* 20, 3526-3534.

Wenzel, A., and Schwab, M. (1995). The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review. *Eur J Cancer* 31A, 516-519.

Westermann, F., and Schwab, M. (2002). Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer letters* 184, 127-147.

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.

Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X., and Garrard, W.T. (2001). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *The Journal of biological chemistry* 276, 48404-48409.

Won, J., Yim, J., and Kim, T.K. (2002). Opposing regulatory roles of E2F in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in human tumor and normal somatic cells. *Faseb J* 16, 1943-1945.

Wong, J.M., Kusdra, L., and Collins, K. (2002). Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nature cell biology* 4, 731-736.

Woo, C.W., Tan, F., Cassano, H., Lee, J., Lee, K.C., and Thiele, C.J. (2008). Use of RNA interference to elucidate the effect of MYCN on cell cycle in neuroblastoma. *Pediatric blood & cancer* 50, 208-212.

Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., and Shay, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & development* 11, 2801-2809.

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. *Nature genetics* 21, 220-224.

Wu, L., Multani, A.S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J.M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S.M., *et al.* (2006). Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126, 49-62.

Xia, Y., Lin, R.X., Zheng, S.J., Yang, Y., Bo, X.C., Zhu, D.Y., and Wang, S.Q. (2005). Effective siRNA targets screening for human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol* 11, 2497-2501.

Xiang, H., Wang, J., Mao, Y., Liu, M., Reddy, V.N., and Li, D.W. (2002). Human telomerase accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of the genes mediating RB/E2F pathway. *Oncogene* 21, 3784-3791.

Xiang, J., Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14559-14563.

Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., and Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* *445*, 559-562.

Xu, D., Gruber, A., Peterson, C., and Pisa, P. (1996). Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia* *10*, 1354-1357.

Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A.R., and Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 3826-3831.

Xu, D., Wang, Q., Gruber, A., Bjorkholm, M., Chen, Z., Zaid, A., Selivanova, G., Peterson, C., Wiman, K.G., and Pisa, P. (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* *19*, 5123-5133.

Yamashiro, D.J., Nakagawara, A., Ikegaki, N., Liu, X.G., and Brodeur, G.M. (1996). Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene* *12*, 37-41.

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* *12*, 119-127.

Yang, Y., Chen, Y., Zhang, C., Huang, H., and Weissman, S.M. (2002). Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Experimental cell research* *277*, 201-209.

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.

Ye, J.Z., and de Lange, T. (2004). TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nature genetics* *36*, 618-623.

Ye, J.Z., Donigian, J.R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004a). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *The Journal of biological chemistry* *279*, 47264-47271.

Ye, J.Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A.N., Loayza, D., Hooper, S.M., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004b). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes & development* *18*, 1649-1654.

Yi, X., Tesmer, V.M., Savre-Train, I., Shay, J.W., and Wright, W.E. (1999). Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Molecular and cellular biology* 19, 3989-3997.

Yi, X., White, D.M., Aisner, D.L., Baur, J.A., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2000). An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia* (New York, NY) 2, 433-440.

Yin, L., Hubbard, A.K., and Giardina, C. (2000). NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry* 275, 36671-36675.

Young, J.I., Sedivy, J.M., and Smith, J.R. (2003). Telomerase expression in normal human fibroblasts stabilizes DNA 5-methylcytosine transferase I. *The Journal of biological chemistry* 278, 19904-19908.

Yuan, Z., and Mei, H.D. (2002). Inhibition of telomerase activity with hTERT antisense increases the effect of CDDP-induced apoptosis in myeloid leukemia. *Hematol J* 3, 201-205.

Zahler, A.M., Williamson, J.R., Cech, T.R., and Prescott, D.M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* 350, 718-720.

Zakian, V.A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* (New York, NY) 270, 1601-1607.

Zeltzer, P.M., Marangos, P.J., Parma, A.M., Sather, H., Dalton, A., Hammond, D., Siegel, S.E., and Seeger, R.C. (1983). Raised neuron-specific enolase in serum of children with metastatic neuroblastoma. A report from the Children's Cancer Study Group. *Lancet* 2, 361-363.

Zhang, D., Beresford, P.J., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5746-5751.

Zhang, P., Chan, S.L., Fu, W., Mendoza, M., and Mattson, M.P. (2003). TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability. *FASEB J* 17, 767-769.

Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M.O. (1999). Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes & development* 13, 2388-2399.

Zhong, Y.Q., Xia, Z.S., Fu, Y.R., and Zhu, Z.H. (2010). Knockdown of hTERT by SiRNA suppresses growth of Capan-2 human pancreatic cancer cell via the inhibition of expressions of Bcl-2 and COX-2. *Journal of digestive diseases* 11, 176-184.

Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S., and de Lange, T. (1992). A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Molecular and cellular biology* 12, 4834-4843.

Zhu, H., Fu, W., and Mattson, M.P. (2000). The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis. *Journal of neurochemistry* 75, 117-124.

Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C., and de The, H. (1999a). Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14807-14812.

Zhu, J., Wang, H., Bishop, J.M., and Blackburn, E.H. (1999b). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3723-3728.

Zhu, Q., Liu, C., Ge, Z., Fang, X., Zhang, X., Straat, K., Bjorkholm, M., and Xu, D. (2008). Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is required for the transcriptional repression of the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *PloS one* 3, e1446.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Molecular biology of the cell* 15, 81-90.

Zimmermann, S., Glaser, S., Ketteler, R., Waller, C.F., Klingmuller, U., and Martens, U.M. (2004). Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 22, 741-749.

Zinn, R.L., Pruitt, K., Eguchi, S., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2007). hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer research* 67, 194-201.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* 274, 11549-11556.

Bibliographie

Annexes

Article

hTERT PROMOTES IMATINIB RESISTANCE IN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA CELLS: THERAPEUTICAL IMPLICATIONS

Laure Deville^{1,2,‡}, Josette Hillion^{1,2‡}, Frédéric Pendino^{1,2}, **Mona Samy**^{1,2}, Eric Nguyen^{1,2}, Evelyne Ségal-Bendirdjian^{1,2*}

¹INSERM UMR-S 1007, Paris, France,

²Université Paris-Descartes, Paris, France,

‡ These authors contributed equally to the work

*Corresponding author: Evelyne Ségal-Bendirdjian, INSERM UMR-S 1007, Université Paris-Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. Tel: 33 1 42 86 22 46; Email: evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr

L'imatinib a démontré une efficacité remarquable dans le traitement des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Cependant, en dépit d'une bonne réponse hématologique et cytogénétique, le traitement par l'imatinib peut favoriser l'apparition de résistance conduisant à la rechute des patients. Dans cette étude nous avons étudié la participation de la télomérase dans le développement de la résistance à l'imatinib. Nous avons montré que la sensibilité à l'imatinib peut être en partie restaurée dans des cellules résistantes à l'imatinib en ciblant l'expression de télomérase, soit par l'introduction d'une forme dominant-négative de la sous-unité catalytique de protéine du telomerase (hTERT), soit par le traitement avec l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA), un agent pharmacologique déjà utilisé en clinique humaine. Nous avons également montré que la surexpression de hTERT favorise le développement de la résistance à l'imatinib de par ses fonctions anti-apoptotiques et de maintien de l'intégrité des télomères. Ainsi, la combinaison de stratégies d'anti-telomerase au traitement par l'imatinib en début de traitement devrait permettre de réduire le risque de développement de résistance à l'imatinib et ainsi augmenter la possibilité d'éradiquer la maladie chez les patients.

hTERT Promotes Imatinib Resistance in Chronic Myeloid Leukemia Cells: Therapeutic Implications

Laure Deville^{1,2}, Josette Hillion^{1,2}, Frédéric Pendino^{1,2}, Mona Samy^{1,2}, Eric Nguyen^{1,2}, and Evelyne Ségal-Bendirdjian^{1,2}

Abstract

Imatinib mesylate has shown remarkable efficacy in the treatment of patients in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. However, despite an overall significant hematological and cytogenetic response, imatinib therapy may favor the emergence of drug-resistant clones, ultimately leading to relapse. Some imatinib resistance mechanisms had not been fully elucidated yet. In this study we used sensitive and resistant sublines from a Bcr-Abl positive cell line to investigate the putative involvement of telomerase in the promotion of imatinib resistance. We showed that sensitivity to imatinib can be partly restored in imatinib-resistant cells by targeting telomerase expression, either by the introduction of a dominant-negative form of the catalytic protein subunit of the telomerase (hTERT) or by the treatment with all-*trans*-retinoic acid, a clinically used drug. Furthermore, we showed that hTERT overexpression favors the development of imatinib resistance through both its antiapoptotic and telomere maintenance functions. Therefore, combining anti-telomerase strategies to imatinib treatment at the beginning of the treatment should be promoted to reduce the risk of imatinib resistance development and increase the probability of eradicating the disease. *Mol Cancer Ther*; 10(5); 711–19. ©2011 AACR.

Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder characterized by *t*(9;22) chromosomal translocation, which results in the generation of p210^{Bcr-Abl}, a chimeric protein endowed with constitutive active tyrosine kinase activity (1). This activity is essential for the induction of *in vitro* cellular transformation and *in vivo* leukemogenesis. The disease usually progresses in 3 phases: a relatively stable chronic phase, followed first by an accelerated phase and then by a blastic phase with acute leukemia characteristics, including genetic instability and acquisition of additional cytogenetic abnormalities. Imatinib mesylate, a competitive inhibitor of the ATP-binding site of the Bcr-Abl enzyme, has revolutionized the treatment of this particular type of leukemia (2). *In vitro* studies have shown that imatinib induces apoptosis in Bcr-Abl positive cell lines (3). However, despite an overall significant hematologic and cytogenetic

response, 15% to 20% of the patients, especially in the advanced phase of the disease, develop resistance to imatinib and ultimately relapse (4–8). About half of these resistances are Bcr-Abl-dependent and are due to the reactivation of Bcr-Abl kinase activity by either gene amplification of *Bcr-Abl* or point mutations in the Abl kinase domain (9). The other half, requiring signaling pathways involved in cell proliferation and/or immortalization, remain to be characterized to propose additional therapies to either eradicate these Bcr-Abl positive imatinib-resistant clones or prevent the emergence of such resistances. This led us to consider telomerase as possibly involved in these resistances.

Telomerase is a ribonucleoprotein complex that is responsible for the maintenance of telomeres (10,11). The catalytic protein component of the telomerase complex, human telomerase reverse transcriptase (hTERT) plays a fundamental role in cellular immortalization. Furthermore, it has been established that telomerase is endowed with additional functions that are independent of the telomere elongating activity (12–14). Its activity is undetectable or low in normal somatic cells, while it is highly expressed in approximately 85% of common cancers, supporting the notion that telomerase is a relevant target in anticancer therapy. Telomerase activity is regulated at various molecular levels, including transcription, splicing, mRNA maturation and posttranslational modifications of hTERT. It has been reported that imatinib decreases telomerase activity in both Bcr-Abl positive and negative cells (15) and conversely that telomerase inhibition could enhance imatinib-induced apoptosis in

Authors' Affiliations: ¹INSERM UMR-S 1007; and ²Université Paris-Descartes, Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Therapeutics online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

L. Deville and J. Hillion contributed equally to the work.

Corresponding Author: Evelyne Ségal-Bendirdjian, INSERM UMR-S 1007, Université Paris-Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. Phone: 33-1-42-86-22-46; Fax: 33-1-42-86-21-62. E-mail: evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr

doi: 10.1158/1535-7183.MCT-10-0979

©2011 American Association for Cancer Research.

K562 Bcr-Abl positive cells (16). Furthermore, it has been recently hypothesized that long-term treatment with imatinib, through the sustained suppression of Bcr-Abl activity, could induce alternative telomerase-dependent signaling pathways, thus leading to the restoration of an abnormal proliferation of leukemic cells (17). However, no clear demonstration of this hypothesis has been provided yet. Whether telomerase could be involved in the biological effect of imatinib and whether it could contribute to the development of imatinib resistance are 2 unanswered questions so far.

We therefore evaluated the consequences of imatinib treatment on telomerase expression and activity using a pair of Bcr-Abl positive, sensitive and resistant cells and investigated the putative involvement of hTERT in the establishment of imatinib resistance. We showed that imatinib sensitivity can be restored in resistant cells by antitelomerase strategies and showed that overexpression of hTERT, first, protected sensitive cells from apoptosis induced by low concentration of imatinib and second, facilitated the establishment of imatinib resistance. These observations show that telomerase is an additional factor in the mechanisms of imatinib resistance and also suggest that antitelomerase strategies could prevent or at least delay the onset of such resistance.

Materials and Methods

Cell cultures

LAMA84-S, a CML imatinib-sensitive cell line derived from a patient in the blast crisis stage of CML and its imatinib-resistant subline (LAMA84-R), were both kindly provided by Prof. F. X. Mahon (Université Victor Ségalen Bordeaux 2, France; ref. 18). Cells were immediately expanded, frozen on receipt and resuscitated every 4 months, using the original frozen stock. The cells were checked for the expression of the characteristic the p210^{Bcr-Abl} chimeric protein by immunoblot. LAMA84-R cells are resistant to imatinib because of the amplification of the *Bcr-Abl* gene (18). p210^{Bcr-Abl} protein expression and imatinib sensitivity were regularly tested all through the study by immunoblot and apoptosis assay (see below), respectively. Otherwise, no additional authentication was done in our laboratory. Both cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (PAA Laboratories) supplemented with 10% FBS, penicillin (50 IU/mL), streptomycin (50 µg/mL), and L-glutamine (2 mmol/L; PAA Laboratories), and incubated at 37°C at 5% CO₂ atmosphere (Binder Incubators). Every 2 days, cell density was determined using a Coulter counter and proliferation was represented in population doublings (PD) or total cell number. Cellular morphology was evaluated using May-Grünwald-Giemsa staining on cytospin preparations. Importantly, to maintain the resistant phenotype, LAMA84-R cells were continuously cultured with imatinib (1 µmol/L) even during the experiments. Indeed, these cells experienced a significant loss of viability and reduction of proliferation as early as 3 days

after imatinib withdrawal from the medium as previously reported (19). The parental sensitive LAMA84-S cells were always maintained in parallel culture without imatinib.

Vector constructions and infections

Mig-R1-hTERT and Mig-R1-dominant negative (DN) form of hTERT (Mig-R1-DN-hTERT) vectors were obtained by subcloning the catalytic unit of human telomerase sequence from pBABE-puro-hTERT and pBABE-puro-DN-hTERT constructs (20) into the murine stem cell virus vector Mig-R1, containing encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sequence and green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene (21), so that 59 viral long terminal repeat promoter drives its expression as previously described (22). The Mig-R1 constructs were transfected into Phoenix retroviral packaging cell line (derived from HEK293) by using Eugene HD (Roche Diagnostics), to produce (VSV-G pseudotyped) viral supernatants that were harvested 2 days posttransfections. Mig-R1 control vector Mig-R1-hTERT and Mig-R1-DN-hTERT supernatants were harvested for further LAMA84 cell infections, which were carried out in the presence of 4 µg of Proteamine sulfate/mL (Sigma). Infected LAMA84 cells were sorted several days later for GFP fluorescence.

Drugs

Imatinib mesylate was kindly provided by Novartis Pharmaceuticals Corporation. All-*trans* retinoic acid (ATRA) was purchased from Sigma. Chemical structures are shown in Supplementary Fig. 1S.

Quantitative real-time PCR analysis of hTERT expression

Total cellular RNA was collected from samples using TRIzol reagent (Invitrogen) as described by the manufacturer. RNA yields and purity were determined spectrophotometrically at 260 to 280 nm. Reverse transcription reaction was carried out using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions with oligo(dT)₈ primers. The expression of hTERT transcripts in leukemic cells was quantified by fluorescence real-time PCR using the LightCycler technology and the LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences were 5'-CGGAAGAGTGCTGGAGCAA-3' for the sense primer located in exon 3 (hTERT-LCS) and 5'-CTCCACGACGTAGTCCATG-3' for the antisense primer located in exon 4 (hTERT-LCR). hTERT level was normalized to the expression of the housekeeping gene glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) measured in parallel.

Telomerase activity and telomere length assay

Telomerase activity was measured using the telomerase PCR ELISA kit (Roche Diagnostics) according to the

manufacturer's instructions. Telomerase activity was expressed as a percentage of that detected in untreated cells. Telomere lengths were determined, after isolation of genomic DNA as described previously (23), using a nonradioactive chemiluminescent TeloTAGGG Telomere Length Assay developed by Roche Diagnostics. The average telomere lengths could be determined by comparing the signals relative to a molecular mass standard.

Apoptosis assay

Apoptosis was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technology using In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche Diagnostics), which labeled free 3'-OH DNA cleavage observed during apoptosis. After 3 washes with PBS solution, 2×10^6 cells were fixed using a 4% paraformaldehyde solution in PBS pH 7.4 for 30 min. They were washed again once and could be stored at -20°C during 5 days in 70% ethanol solution or directly permeabilized using 0.1% Triton - 0.1% sodium citrate freshly prepared, for 2 min on ice. After 2 washes, cells were incubated in TUNEL reaction mixture (containing Terminal deoxynucleotidyl transferase which catalyses polymerization of labeled nucleotides to free 3'-OH-DNA ends of DNA stand breaks, mixed to label solution 1:50) in humid atmosphere at 37°C during 1 hour. After 3 final washes, TMR red labeled nucleotides, incorporated in nucleotide polymers, were detected and quantified by flow cytometry.

Clonogenic assay

LAMA84-S and LAMA84-R cells were seeded in MethoCult TM H4230 (StemCell Technologies Inc.) at a concentration of 60 and 250 cells/cm², respectively. This semi-solid medium contains methylcellulose (1%), FBS (30%), bovine serum albumin (1%), L-glutamine (2 mmol/L), and 2-mercaptoethanol (10^{-4} M). The clonogenic assay was done by adding the cell suspension directly to methylcellulose medium in a 1:10 (v/v) ratio. Finally, the methylcellulose cell suspension was seeded in the dishes and the cultures incubated at 37°C in 5% CO₂ for 20 days. For LAMA84-R cells, imatinib (1 $\mu\text{mol/L}$) was added to the methylcellulose medium.

Results and Discussion

Imatinib induces a transcriptional repression of hTERT in imatinib-sensitive, not in imatinib-resistant CML cells

To find new targets and effective strategies for imatinib-resistant cells, we investigated whether telomerase could be involved in the biological effect of imatinib and therefore used a pair of sensitive and resistant blast crisis CML cells.

We first treated the imatinib-sensitive Bcr-Abl positive LAMA84-S cells with increasing concentrations of imatinib (from 0.125 to 1.0 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours. For each dose tested, we determined hTERT mRNA levels by real-

time quantitative PCR, telomerase activity by TRAP assay, and apoptosis by TUNEL assay. Figure 1A shows that treatment with imatinib resulted in a dose-dependent apoptotic response with ED50 between 0.250 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$. hTERT mRNA level and telomerase activity were not significantly modified by imatinib treatment at low doses (0.125–0.25 $\mu\text{mol/L}$), whereas they were significantly decreased in cells treated at high doses (0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$).

We then did a kinetic analysis to evaluate whether the effects of imatinib at high concentrations on hTERT expression could result from apoptosis induction (Fig. 1B). LAMA84-S cells showed a clear transcriptional repression of hTERT as early as 4 hours after treatment while no significant apoptosis was detected at this time. This effect is clearly not a mere consequence of apoptosis that was clearly detected only after 36 hours of imatinib treatment as telomerase activity decreased.

Imatinib-resistant LAMA84-R cells, maintained continuously under the selective pressure of 1 $\mu\text{mol/L}$ imatinib, showed similar hTERT mRNA levels and telomerase activity (data not shown) as LAMA84-S cells cultured in absence of the drug, even though they displayed shorter telomeres (see below). In contrast to their sensitive counterparts, LAMA84-R cells remained resistant to imatinib-induced repression of hTERT, even at imatinib doses of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 1C). These results support a relationship between regulation of hTERT and imatinib sensitivity.

Imatinib is able to induce apoptosis in imatinib-sensitive LAMA84-S cells through both telomerase-dependent and telomerase-independent mechanisms

To clarify further whether telomerase was involved or not in imatinib-induced apoptosis, LAMA84-S cells were transduced with hTERT (hTERT-LAMA84-S) and were then sorted on the basis of GFP expression. The expression of the transgene was confirmed both by hTERT mRNA expression and telomerase activity analysis compared to the GFP-control cells (see below). Apoptosis induction by imatinib was then compared in hTERT overexpressing and in mock transduced cells. Figure 2 shows that hTERT overexpression was able to significantly protect LAMA84-S cells from apoptosis induced by 0.250 $\mu\text{mol/L}$ imatinib. In contrast, it did not protect them from the strong and rapid apoptotic effect induced by higher concentrations of this drug. This result indicates that even though imatinib at high concentrations is able to downregulate hTERT expression and activity, apoptosis is likely not the result of this downregulation. Note that the ectopic expression of hTERT and telomerase activity remained unaltered by imatinib treatment (data not shown).

Altogether, these data suggest that imatinib could induce apoptosis through both telomerase-dependent and telomerase-independent mechanisms.

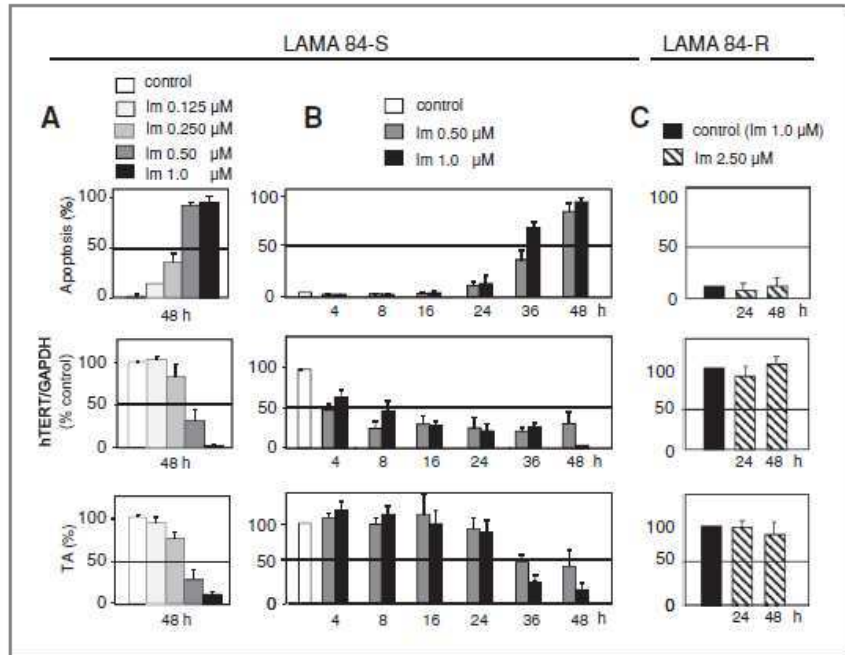


Figure 1. Effect of imatinib treatment of sensitive LAMA84-S and resistant LAMA84-R cells on telomerase expression, activity, and apoptosis. LAMA84-S, a cell line derived from a patient in the accelerated stage of CML, and its imatinib-resistant LAMA84-R subline were kindly provided by Prof. F. X. Mahon (18). A, LAMA84-S cells were cultured for 48 hours with various concentrations of imatinib (Im). B, LAMA84-S cells were treated with high concentrations of imatinib (0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$). C, imatinib-resistant LAMA84-R cells maintained continuously under the selective pressure of 1 $\mu\text{mol/L}$ imatinib were treated with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ imatinib. At the indicated time, apoptosis was measured (upper panel) using TUNEL technology using In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche Diagnostics). At the indicated time, hTERT mRNA expression was quantified by fluorescence real-time PCR (middle panel). The hTERT level was normalized to the expression of the housekeeping gene glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) and expressed as a percentage of that detected in control cells. At the indicated time, protein extracts were prepared and telomerase activity (TA) was measured using the telomerase PCR enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Roche Diagnostics; lower panel). Telomerase activity was expressed as a percentage of that detected in untreated cells.

Long-term ATRA treatment decreases telomerase activity and slows down proliferation of imatinib-resistant LAMA84 cells

Because LAMA84-R cells resist to imatinib-induced apoptosis, we wondered whether targeting hTERT expression could be a means to overcome imatinib resistance. We have previously shown that, in myeloid leukemic cells isolated from patients, ATRA may exert its antiproliferative action independently of differentiation through down-regulation of telomerase activity, which develops slowly during long-term treatment and leads to telomere shortening and subsequent cell death (24). Hence, LAMA84-R cells were incubated in the presence of 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA for a long-term treatment. As shown on Fig. 3A, hTERT mRNA levels measured by quantitative RT-PCR decreased as early as after 3 days of ATRA treatment and remained at 60% of control expression as early as day 7. This decrease was associated with a clear reduction of telomerase activity and a slowdown of proliferation. As a consequence of the decrease of telomerase activity, a small but significant reduction of the mean length of telomeres could be noticed throughout ATRA treatment of the LAMA84-R cells

(Fig. 3B). However this decrease of hTERT expression was not associated with increased apoptosis (data not shown). This observation is in agreement with the notion of a threshold determined by the level of enzyme activity, which has to be reached to induce sufficient shortening of telomeres and cell death, as previously reported (25). Importantly, in contrast to LAMA84-R cells, the sensitive LAMA84-S counterpart cells were neither responsive to the antiproliferative effect of ATRA (Fig. 3C) nor to its action on hTERT expression and activity (data not shown). This observation reinforces the notion that hTERT represents an important actor in imatinib resistance.

The dominant-negative form of hTERT overcomes imatinib resistance in LAMA84-R cells

Even though ATRA treatment slowed cellular proliferation of imatinib-resistant cells, it failed to restore fully imatinib sensitivity, especially as regards cell death induction, because of a limited inhibition of telomerase activity. The fact that ectopic expression of a DN-hTERT variant is able to sensitize K562 CML cells to imatinib-induced cell death has already been established (16,26). Therefore, we

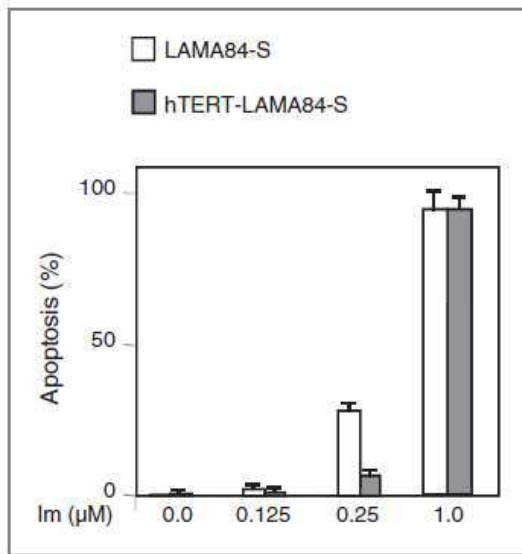


Figure 2. hTERT overexpression rescues LAMA84-S cells from apoptosis induced by low concentrations of imatinib. Imatinib-sensitive LAMA84-S cells transfected with either hTERT or GFP-vector construct were cultured in the absence or in the presence of imatinib for 48 hours. Apoptosis was quantified using the TUNEL assay as described in Fig. 1.

wondered whether this strategy could be more efficient than ATRA treatment to overcome imatinib resistance in LAMA84-R cells. Both the LAMA84-R and the sensitive LAMA84-S counterpart cells were then transduced with DN-hTERT, WT-hTERT and the control vector. DN-hTERT and WT-hTERT expressions were confirmed by real-time quantitative PCR (Fig. 4, first panel). TRAP assay showed that telomerase activity was dramatically reduced in DN-hTERT transduced cells (Fig. 4, second panel) compared to control LAMA84 cells (vect LAMA84-S and vect LAMA84-R), indicating that the expression of the DN-hTERT results in the disruption of telomerase activity in these cells. The extinction of telomerase activity was equivalent in both sensitive and resistant LAMA84 cell lines.

We next determined whether inhibition of telomerase activity by DN-hTERT expression influenced telomere lengths in the transduced cells. We assessed telomere lengths in LAMA84-S and LAMA84-R cells expressing either DN-hTERT or WT-hTERT or control vector (Fig. 4, third panel). Telomere length analysis revealed shorter telomere lengths in DN-hTERT-LAMA84-R compared to the control vector. Note that although telomerase activity was similarly reduced in both DN-hTERT-LAMA84-R and DN-hTERT-LAMA84-S cells, telomeres remained significantly longer in DN-hTERT-LAMA84-S (~3.2 kb) than in DN-hTERT-LAMA84-R (~2.0 kb). As expected from their higher telomerase activity, telomere lengths of WT-hTERT-LAMA84-S and WT-hTERT-LAMA84-R cells were significantly longer than those of their respective controls.

We then characterized the growth properties of LAMA84-S and LAMA84-R cells expressing either DN-hTERT or WT-hTERT or the control vector. The DN-hTERT transduced LAMA84-R cells exhibited a reduced clonogenic proliferation compared to the control vector or WT-hTERT-transduced cells (Fig. 4, fourth panel). This decrease in proliferation was associated with the induction of apoptosis (data not shown). Altogether, these results show that the repression of telomerase activity by the expression of a dominant-negative form of hTERT was able to restore imatinib sensitivity in an imatinib-resistant cell line. No effect on cell proliferation was observed in DN-hTERT-LAMA84-S cells. It can be speculated that this differential effect of imatinib results from the difference observed in the telomere lengths between the 2 cell lines.

It can be noticed that the antitelomerase strategy through the expression of DN-hTERT was more efficient than ATRA treatment at restoring imatinib sensitivity. As previously pointed out, this can be explained by a higher inhibition of telomerase activity by DN-hTERT than by ATRA, leading to a sufficient telomere shortening and consequently an efficient induction of cell death. This observation supports the notion that telomere length could represent an important parameter to measure in CML patients, especially to evaluate the efficiency of such antitelomerase treatment.

Altogether, these results indicate that the extinction of hTERT expression or activity could alter specifically the viability of imatinib-resistant cells. However, it is important to keep in mind that although LAMA84-R cells were resistant to the toxic action of imatinib, their viability relies on the continuous presence of this drug (as already mentioned, see Materials and Methods). Therefore, it cannot be excluded that the specific action of antitelomerase strategies on imatinib-resistant cells requires cooperation with imatinib signaling pathways.

hTERT overexpression facilitates imatinib-resistance establishment

Altogether, the above results indicate that the extinction of hTERT expression or activity could modulate specifically imatinib sensitivity of CML cells and they point to a possible involvement of hTERT in the emergence of imatinib resistance. To check this hypothesis we investigated whether the ectopic expression of WT-hTERT in the LAMA84-S cells could facilitate the development of imatinib resistant clones compared to non-transduced LAMA84-S cells. For this purpose we proceeded as already described for the generation of the imatinib-resistant LAMA84-R cells (18). hTERT-LAMA84-S and their nontransduced LAMA84-S counterpart cells were exposed to successive dose escalations, from 0.125 µmol/L imatinib (first dose-step) to 0.250 µmol/L about 2 weeks later, when cells stopped dying (second dose-step). Proliferation curves (Fig. 5A), cytospin slides (Fig. 5B) stained with May-Grünwald Giemsa

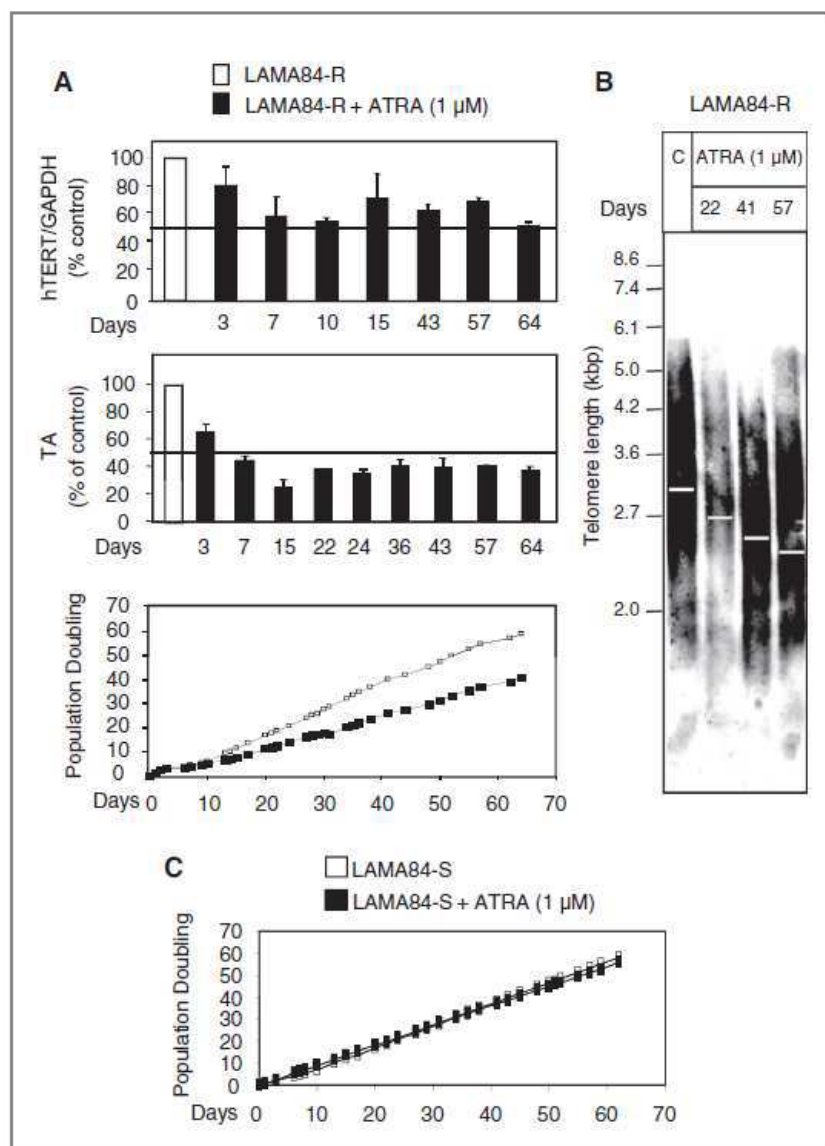


Figure 3. Long-term ATRA treatment decreases telomerase activity and slows down proliferation of imatinib-resistant LAMA84-R cells. A, LAMA84-R cells were cultured in medium supplemented with imatinib (1 μmol/L) in the absence or in the continuous presence of ATRA (1 μmol/L). Cell proliferation was assessed as population doublings. At the indicated time, hTERT mRNA expression, telomerase activity (TA), and apoptosis were measured as described in Fig. 1. B, telomere length of LAMA84-R cells was measured during a long-term treatment with ATRA (1 μmol/L). C, the parental LAMA-S cells were cultured in the absence or in the presence of ATRA (1 μmol/L). Cell proliferation was assessed as population doublings.

and clonogenic assays (Fig. 5C) clearly showed that hTERT-LAMA84-S cells recovered more rapidly from imatinib-induced cell death than the nontransduced LAMA84-S cells did, allowing a more rapid emergence of resistant clones. Out of the many attempts to generate imatinib-resistant clones, resistant cells emerged reproducibly faster from WT-hTERT-LAMA84-S than from LAMA84-S cells. These observations indicate that hTERT expression is able to give cells a growth advantage during the establishment of imatinib-resistance. The median telomere length of imatinib treated cells shortened during

the establishment of the resistance over an expansion time of 15 weeks. In contrast, hTERT expression stabilized telomere length in the hTERT-LAMA84-S cells suggesting that the telomere maintenance function of hTERT is likely to participate in the emergence of resistant cells.

Concluding remarks

Imatinib discovery represents a major breakthrough in the therapy of CML. However, despite satisfactory remission rates, resistance to this drug is an important issue for

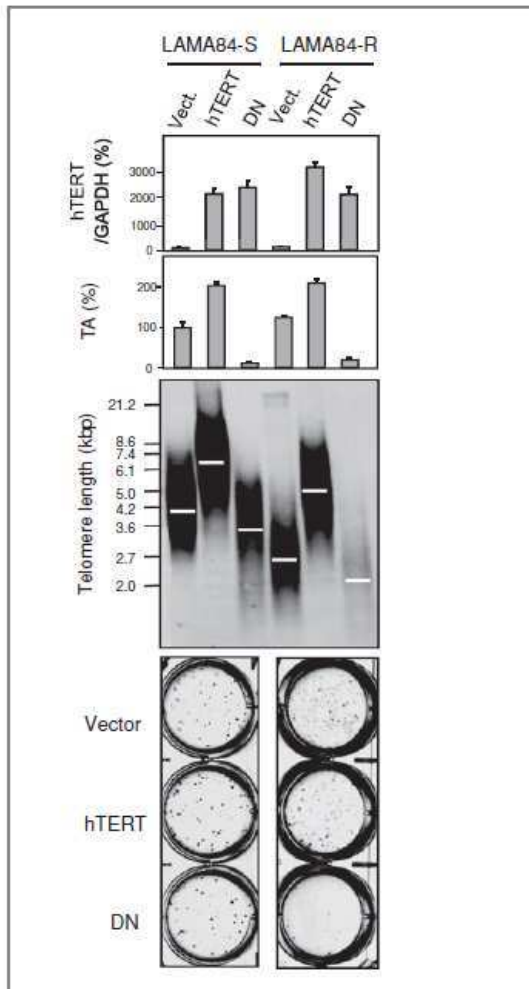


Figure 4. The dominant-negative form of hTERT (DN-hTERT) overcomes imatinib resistance in LAMA84-R cells. After transduction with hTERT, DN-hTERT (DN), or GFP-control (vect.) retroviral vectors, LAMA84-S and LAMA84-R cells were sorted on the basis of GFP expression and expanded. All the experiments were done between 20 and 30 days after infections. Transduced cells were analyzed for hTERT mRNA level by real-time quantitative PCR and telomerase activity (TA) by TRAP assay as in Fig. 1 (first and second panels). The hTERT expression and telomerase activity are expressed as a percentage of that detected in vector transduced LAMA84-S cells. Telomere lengths of transduced LAMA84-S and LAMA84-R cells were measured (third panel). The clonogenic assay was done in methylcellulose medium in (lower panel). Note that imatinib resistant LAMA84 cells (LAMA84-R) were continuously cultured with imatinib (1 $\mu\text{mol/L}$) to maintain the resistant phenotype, thus imatinib (1 $\mu\text{mol/L}$) was also added to the methyl cellulose medium.

therapy, because it is now clear that a significant proportion of patients in advanced disease phases display reduction of imatinib sensitivity over time and undergo relapse. Activation or upregulation of telomerase is believed to play an important role in the progression

of most human malignancies. While implication of telomerase in the development of imatinib resistance has already been suggested (27,28), no direct obvious demonstration has been given. Furthermore, some contradictory studies can be found in the literature.

Our results show, first, that imatinib could induce apoptosis in imatinib sensitive cells through both telomerase-dependent and -independent mechanisms; second, that imatinib induces a transcriptional repression of hTERT associated with the induction of apoptosis only in imatinib-sensitive cells and not in their imatinib-resistant counterparts. These observations suggest that telomerase represents an additional factor in imatinib resistance in blast crisis CML cells. This hypothesis has been validated by showing that the emergence of resistance occurred faster in cells overexpressing hTERT compared to control cells. It has been shown that telomerase contributes to installing an immortal cell phenotype by preventing apoptosis, and thus plays a role in cellular resistance to anticancer drugs (12,13,29–31). In keeping with this notion, we showed that hTERT overexpression significantly protects these cells from apoptosis induced by 0.250 $\mu\text{mol/L}$ imatinib. Therefore the emergence of imatinib-resistant cells could result from both the antiapoptotic and telomere-maintenance functions of hTERT.

Hence, targeting this enzyme could be beneficial for the elimination of resistant clones. We therefore submitted imatinib-resistant LAMA84-R cells to 2 antitelomerase strategies known to use different mechanisms: the expression of a dominant-negative form of hTERT and ATRA treatment leading to a transcriptional repression of hTERT. These 2 antitelomerase strategies resulted in either cell death (DN-hTERT transduction) or antiproliferative effects (ATRA treatment). Intriguingly, although constitutive hTERT expression and activity and Bcr-Abl expression did not differ between imatinib-resistant LAMA84-R and imatinib sensitive LAMA84-S cells, these effects were observed only in the imatinib-resistant and not in the imatinib-sensitive cells. It can be speculated that this specific effect on LAMA84-R cells could be partly explained by the fact that telomeres in these cells are shorter than those in the sensitive parental ones and therefore more prone to reach the telomere length threshold ultimately leading to cell death induction. If so, telomere length measurement in newly diagnosed CML patients might have a predictive value for the evaluation of the efficiency of antitelomerase treatments. Alternatively, because LAMA84-R cells need to be maintained in the continuous presence of imatinib it cannot also be excluded that this specific effect of antitelomerase strategies on imatinib-resistant cells requires cooperation with imatinib signaling pathways.

The complexity of telomerase regulation, which can differ between various cell lines as well as between patient cells, makes it obvious that our treatment protocol, done on a single cell line, could not be effective in all cases. In keeping with this notion, a recent study

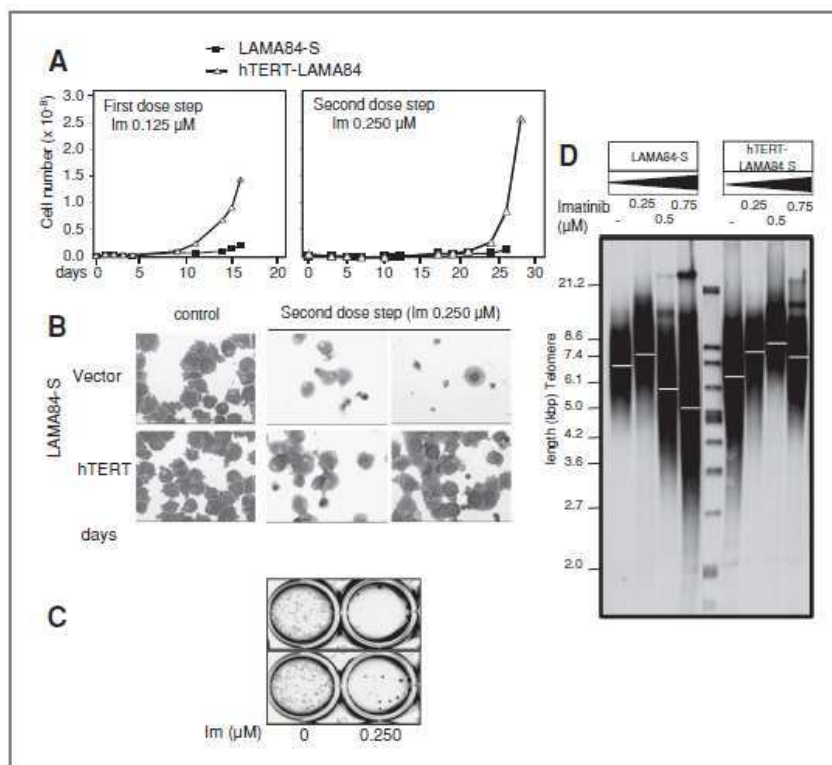


Figure 5. hTERT overexpression facilitates imatinib-resistance establishment. **A**, imatinib-sensitive LAMA84-S cells transfected with either hTERT or GFP-vector construct were cultured in the absence or in the presence of imatinib. Cell number was determined during the generation of imatinib-resistant cells by stepwise culture with increasing concentrations of imatinib. The 2 first steps of dose escalation corresponding to 0.125 and 0.250 $\mu\text{mol/L}$ imatinib, respectively, are shown. **B**, morphology analyses of LAMA84-S and hTERT-LAMA84-S cells during the establishment of imatinib resistance. Cytospin slides were stained by May-Grunwald Giemsa. Days are counted from the beginning of the second dose escalation. **C**, hTERT-LAMA84-S and vector transduced LAMA84-S cells were cultured in the absence or in the presence of imatinib. Clonogenic assays were done after a 72 hours exposure of the cells to imatinib. **D**, telomere lengths were measured at each step of dose escalation in both control LAMA84-S and hTERT-LAMA84-S cells.

reports that the success of antitelomerase strategies could depend on the presence of a functional p53 pathway (32). Nevertheless, our strategy, i.e., combining antitelomerase agents to imatinib at the beginning of the therapy, should be considered as an attractive approach to be integrated into extended trials to reduce the risk of imatinib resistance development and ultimately increase the probability to eradicate the disease.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. R. Weinberg (Massachusetts Institute of Technology, USA) for provision of the pBABE-puro-WT-hTERT and pBABE-puro-DN-hTERT constructs, Prof. F-X Mahon (Université Victor Ségalen Bordeaux 2, France) for the gift of LAMA84 cells and to Novartis

Pharmaceuticals Corporation for providing imatinib for research purposes. We thank Prof. J. Lillehaug (Department of Molecular Biology, University of Bergen, Bergen, Norway) for providing us access to the cell culture room of his laboratory to do all retroviral cell transductions and Dr. S. Bombard (INSERM UMR-S 1007) for her comments on the manuscript.

Grant Support

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association pour la Recherche contre le Cancer (E. Ségat-Bendirdjian), the Fondation de France (E. Ségat-Bendirdjian), Cent pour Sang la Vie and Capucine (E. Ségat-Bendirdjian), the Ligue Nationale Contre le Cancer (M. Samy). L. Deville received the financial support of INSERM.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 28, 2010; revised January 25, 2011; accepted February 21, 2011; published OnlineFirst March 1, 2011.

References

- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079-82.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561-6.
- Gambacorti-Passerini C, Le Coutre P, Moligni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 1997;23:380-94.
- Kantarjian H SC, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, et al. International ST1571 CML Study

- Group.: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346:645-52.
5. Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000;95:3498-505.
 6. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876-80.
 7. von Bubnoff N, Peschel C, Duester J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* 2003;17:829-38.
 8. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosée P, Lahaye T, Berger U, et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 2001;293:2163.
 9. Milojkovic D, Apperley J. Mechanisms of resistance to imatinib and second-generation tyrosine inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15:7519-29.
 10. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405-13.
 11. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987;51:887-98.
 12. Dudoignon C, Pendino F, Hillion J, Saumet A, Lanotte M, Ségal-Bendirdjian E. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene* 2004;23:7469-74.
 13. Fu W, Begley JG, Killen MW, Mattson MP. Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1999;274:7264-71.
 14. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12606-11.
 15. Uziel O, Fenig E, Nordenberg J, Beery E, Reshef H, Sandbank J, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. *Br J Cancer* 2005;92:1881-91.
 16. Tauchi T, Nakajima A, Sashida G, Shimamoto T, Ohyashiki JH, Abe K, et al. Inhibition of human telomerase enhances the effect of the tyrosine kinase inhibitor, imatinib, in BCR-ABL-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3341-7.
 17. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Kubo T, Fujii M, Ishikawa M, et al. Antisense inhibition of Bcr-Abl/c-Abl synthesis promotes telomerase activity and upregulates tankyrase in human leukemia cells. *FEBS Lett* 2004;564:73-84.
 18. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000;96:1070-9.
 19. Tipping AJ, Mahon FX, Lagarde V, Goldman JM, Melo JV. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 2001;98:3864-7.
 20. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-8.
 21. Pui JC, Alman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999;11:299-308.
 22. Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, Buet D, Lanotte M, Ségal-Bendirdjian E. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6662-7.
 23. Ségal-Bendirdjian E, Jacquemin-Sablon A. Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process. *Exp Cell Res* 1995;218:201-12.
 24. Pendino F, Hillion J, Dudoignon C, Delaunay J, Mourah S, Podgomiak MP, et al. Telomerase targeting by retinoids in cells from patients with myeloid leukemias of various subtypes, not only APL. *Leukemia* 2006;20:599-603.
 25. Tarkanyi I, Dudoignon C, Hillion J, Pendino F, Lanotte M, Aradi J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death. *Leukemia* 2005;19:1806-11.
 26. Roth A, Vercauteren S, Sutherland HJ, Lansdorp PM. Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2003;17:2410-7.
 27. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y. Cross-talk between Bcr-Abl tyrosine kinase, protein kinase C and telomerase-a potential reason for resistance to Glivec in chronic myelogenous leukaemia. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1879-84.
 28. Yamada O, Kawachi K, Akiyama M, Ozaki K, Motoji T, Adachi T, et al. Leukemic cells with increased telomerase activity exhibit resistance to imatinib. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1168-77.
 29. Fu W, Killen M, Culmsee C, Dhar S, Pandita TK, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *J Mol Neurosci* 2000;14:3-15.
 30. Kondo S, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK. Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* 1998;16:3323-30.
 31. Kushner DM, Paranjape JM, Bandyopadhyay B, Cramer H, Leaman DW, Kennedy AW, et al. 2-5A antisense directed against telomerase RNA produces apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2000;76:183-92.
 32. Brassat U, Balabanov S, Ball D, Dierlamm J, Braig M, Hartmann U, et al. Functional p53 is required for effective execution of telomerase inhibition in BCR-ABL-positive CML cells. *Exp Hematol* 2011;39:66-76.

Revue

TELOMERES, TELOMERASE AND SENESCENCE

Abdulkader Azouz^{1,2}, **Mona Samy**¹, Laure Deville¹, Josette Hillion¹, Fawaz Chehna², Evelyne Ségal-Bendirdjian^{1*}. Molecular Biology in Cancer: Toward New Therapies, Chapter 38, 2007

¹INSERM UMR-S 1007, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006, Paris, France.

²Université d'Alep, Faculté de Pharmacie, Alep, Syrie.

Author for correspondence (email: evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr)

Introduction

Cell senescence is the consequence of the limited ability of primary human cells to divide when cultured *in vitro*. As cells are the fundamental structure composing our bodies, there are good theoretical reasons for thinking that cellular decline contributes to human aging and age-related diseases. However, it is still under debate whether findings from studies on cell senescence *in vitro* could be related to organism aging. The absence of telomerase in human cultured cells and the shortening of telomeres at each population doubling have suggested that telomere length could act as a molecular clock that counts the number of times a cell has to divide.

In this review, we discuss the pathways that signal cell senescence, the role of cell senescence in human and whether cellular senescence relates to human aging. The potential involvement of telomeres and telomerase in human aging and cancer will be also debated.

Role of telomeres and telomerase in cell senescence control

1. Replicative senescence

In the earlier 1900, the work of Alexis Carrel, a Nobel prize-winning surgeon, led to the idea that vertebrate cells can divide indefinitely in culture and are "immortal". This led to the conclusion, shown latter to be incorrect, that aging is a characteristic of the multicellular body as a whole (Carrel and Ebeling, 1921). In 1961 this concept was challenged and changed by Leonard Hayflick and Paul Moorhead who discovered that normal human diploid fibroblasts can only divide a finite number of times in culture, known now as the Hayflick's limit (Hayflick and Moorhead, 1961). These cells undergo 60-80 population doublings, after which they slow their rate of division, stop dividing and develop a senescence phenotype, referred now to as replicative senescence (Fig. 1-a). These observations led to the hypothesis of a "biological clock" or a "replication counter" that counts biological time in numbers of cell divisions.

Replicative senescence has been found in many adult cell types (keratinocytes, endothelial cells, chondrocytes, vascular smooth cells, etc...), and is observed in cells derived from embryonic tissues, and in cells taken from many animals. Most stem cells demonstrate also replicative senescence, but do so with a much extended cellular life span. In contrast, cell lines derived from embryonic germ cells or from tumors never reach replicative senescence.

The phenotype of replicative senescence in human diploid fibroblasts is characterized by a series of features (reviewed in (Campisi, 1999)). The most obvious is growth arrest in the transition from phase G1 to phase S of the cell cycle. In contrast to reversibly arrested quiescent cells, this growth arrest is irreversible since mitogens cannot stimulate senescent cells to divide even though

they remain metabolically active for long periods of time. Another important feature is cellular morphology. Senescent cells adopt a large and flat morphology with an increased granularity and a vacuole-rich cytoplasm. Most senescent cells express a specific type of beta-galactosidase called senescence-associated beta-galactosidase (SA beta-gal), which has an optimal pH of 6.0. SA beta-gal can be detected by histochemistry and is used as a marker for the senescent phenotype (Dimri et al., 1995) although the specificity of this assay has been recently challenged (Going et al., 2002). Senescent cells also display changes in the expression or regulation of cell-type specific genes, including osteonectin, fibronectin, apolipoprotein J, type II-procollagen, interleukin-1 α , p53, p21 and p16INK4a proteins whose expression increases. Lastly, senescent cells were also shown to display an increased activity of metalloproteinases and collagenase, which degrade the extracellular matrix and could account for some features of aging tissues (reviewed in (Campisi, 2005; Cristofalo et al., 1998; Toussaint et al., 2002)).

The cell cycle arrest imposed to senescent cells is maintained by signals that activate the tumor suppressors, p53 and retinoblastoma (pRB) (Shay et al., 1991). Critical mutations or expression of tumour viruses that inactivate key components of either p53 and/or pRb pathways abrogate the senescence-associated cell cycle arrest and then cells continue to proliferate beyond their normal life-span (reviewed in (Lundberg et al., 2000)). However, these cells cannot divide indefinitely. Following 20-30 additional population doublings, they enter a state termed "crisis" (Fig. 1-b). At crisis, the cells continue to proliferate but show high rates of apoptosis triggered by severe chromosomal abnormalities (due to end-to-end chromosome fusions and breakage-fusion-bridges cycles). A few cells, however, emerge from crisis and become immortal (Fig. 1-c).

If the Hayflick's limit is referred to a "biological clock" that times replicative senescence, what is this cellular "clock" and what is the relationship between cell senescence, aging and disease-related aging in the organism?

2. The telomere hypothesis of senescence

Early studies by Hermann Muller and Barbara McClintock showed that the ends of chromosomes are capped by specialized structures called telomeres which prevent chromosome fusions (McClintock, 1941; Muller, 1938). In humans, telomeres consist of 15-20 kb array of duplex DNA repeats of TTAGGG that end in a 100-200 nucleotide 3' single-stranded G-rich overhang (Moyzis et al., 1988). Without telomeres, chromosome ends are indistinguishable from DNA double-strand breaks and are subject to degradation and/or fusion. James Watson implicated telomeres in replicative senescence for the first time in 1971 (Watson, 1972). Indeed, at that time, it became clear that, owing to the biochemistry of DNA replication, it is not possible to replicate the extreme ends of DNA molecules and each round of DNA replication leaves 50-200 bp at each 3' end of linear duplex DNA unreplicated. This was referred to as the "end-replication problem" (Fig. 2). At about the same time, while waiting in a Moscow subway station, Alexey Olovnikov saw in Watson's problem an analogy between the track representing the DNA and the train representing the DNA polymerase. He then

proposed that the “end-replication problem” would result in telomere shortening with each round of replication (200 base pairs of DNA are lost from chromosomal ends at each division) and that this mechanism could be the cause of replicative senescence and might explain Hayflick’s limit (Olovnikov, 1971, 1973). Telomere shortening is now considered as to the main causal mechanism of replicative senescence and, telomere length, the "molecular clock" that counts the number of times a cell has to divide providing a measure of its proliferative history (reviewed in (Wright and Shay, 2001)). Whether the “end-replication problem” alone is responsible for telomere shortening has become recently a center of debate. Indeed, telomeres seem to control replicative senescence through mechanisms more complex than the mere maintenance of telomere length (see below).

Germ line cell precursors, early embryonic cells, and most cancer cells avoid the “end-replication problem” and are identified as "immortal". Most of them do so by activating mechanisms for telomere stabilization (mainly by re-activation of a ribonucleoprotein enzyme terminal transferase called telomerase) (Fig. 1-c).

3. Telomerase, a determinant to "immortality"

How do cells, identified as “immortal” (as germinal and most cancer cells), avoid telomere shortening that would lead to their loss of replicative capacity? The answer to this critical question originated in studies by Greider and Blackburn (1985), who discovered that telomeres are synthesized de novo by a ribonucleoprotein enzyme, called telomerase (Greider and Blackburn, 1985). Telomerase is a reverse transcriptase enzyme that elongates the 3' end of telomeres and thus corrects the normal telomere erosion. This enzyme consists of at least two components: an RNA template (hTR for human Telomerase RNA) (Feng et al., 1995a) and a catalytic reverse transcriptase subunit (hTERT for human TELOmerase Reverse Transcriptase) (Nakamura et al., 1997) for the synthesis of telomeric sequences. With a sequence complementary to telomeric DNA, hTR binds to the 3' overhang of telomeric DNA, providing a template for reverse transcription of new telomere repeats (Fig. 3). Most somatic mammalian cells do not express telomerase, or express it transiently, resulting in the progressive telomere shortening responsible for replicative senescence. In contrast, telomerase activity was shown to be high in embryonic cells, adult germ cells and in 85-90% of cancer cells (Counter et al., 1992a). Thus, these cells proliferate indefinitely without telomere loss or replicative senescence (Kim et al., 1994a; Wright et al., 1996). Today, the presence of high telomerase activity in cancer cells is the most reliable property that distinguishes them from human normal cells. However, the expression of telomerase has also been found in a number of normal human cell types or tissues. These include fetal tissue, normal bone marrow stem cells, testes, peripheral blood lymphocytes, skin epidermis and intestinal crypt cells. All these cells have high turnover rates or are in a continuously replicating pool of differentiating cells. However, it is important to note that the level of telomerase activity found in these normal cell populations is significantly less than that found in cancer cell populations and is not always sufficient to maintain telomere length. In these cases, telomeres shorten slowly and senescence can occur although delayed (Chiu and Harley, 1997).

That expression of hTERT in human normal cells avoids replicative senescence and induces lengthening of telomeres without signs of transformation provides the direct evidence demonstrating the role of telomere shortening in cell senescence, and the requirement for telomerase expression in most immortal cells (Bodnar et al., 1998b; Jiang et al., 1999; Morales et al., 1999). Even expression of hTERT in old human diploid fibroblasts appears to reverse the loss of function characteristic of senescent cells (Funk et al., 2000). Furthermore, it then appears that ectopic hTERT expression alone is sufficient to restore telomerase activity in human cells (Counter et al., 1998b).

Telomerase is reactivated in the majority of human cancers. This activation is thought to provide the tumour with an unlimited growth potential. Interestingly, telomerase activity was also found to be upregulated during mouse tumorigenesis, even though mice have long telomeres. This suggests that telomere length independent tumour promoting actions of telomerase, different from its established role in telomere elongation, are involved in tumorigenesis (Blasco, 2002). Indeed, it has been found that hTERT expression can regulate the transcription of several genes implicated in cell proliferation (Geserick et al., 2006; Smith et al., 2003; Xiang et al., 2002). Telomerase has been also shown to promote cell survival by protecting cells from apoptosis (Dudognon et al., 2004; Smith et al., 2003). These telomere elongation independent mechanisms are likely to account for the positive impact of increased telomerase levels on aging. Thus, although telomerase-induced inhibition of apoptosis may favour tumour growth, it might also have beneficial effect on tissue integrity. This antagonistic dual effect of telomerase is illustrated in Figure 5.

Telomerase is not the only mechanism capable of elongating the telomeres. Some cancer cells maintain telomeres by telomerase-independent mechanisms (Bryan et al., 1995b). Although the exact mechanisms behind what is called Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) remain unknown, recombination processes seem involved (Bryan et al., 1995b; Dunham et al., 2000a) (reviewed in (Muntoni and Reddel, 2005)).

4. Telomere dysfunctions, cellular senescence and cancer promotion

Telomeres are not linear structures, but instead appear to fold into a structure termed the "T-loop" in which the 3' single-stranded overhang invades a duplex region of the telomere to sequester the overhang, forming a single-stranded displacement loop (D-loop) (Griffith et al., 1999) (Fig. 4). The telomeric T-loop is bound and stabilized by several telomere-specific binding proteins that form a complex called the telosome (Liu et al., 2004a) or shelterin (de Lange, 2005). This complex is composed of six core components: three shelterin subunits, the duplex telomere-binding proteins TRF1 and TRF2, and the single-stranded TTAGGG-repeat binding protein POT1, interconnected by three additional shelterin proteins, TIN2, TPP1, and Rap1. TRF1 is a negative regulator of telomere length (van Steensel and de Lange, 1997b) and TRF2 is essential for telomere end protection and promotion of the T-loop formation (van Steensel et al., 1998b). The current hypothesis is that the telomeric conformation stabilizes or caps the telomeres. Capping may protect them from being recognized as double-strand breaks that would otherwise activate DNA damage checkpoint responses

or participate in aberrant recombination events (reviewed in (d'Adda di Fagagna et al., 2004)). When cumulative loss of telomeres results in critical shortening (to 2-6kb), the capping function of telomeres is compromised and cells undergo a senescent arrest. Recent findings suggest that telomere capping, not just telomere length, is crucial to avoid telomere dysfunction and to prevent apoptosis and senescence (Blackburn, 2000; de Lange, 2001; Karlseder et al., 1999; Karlseder et al., 2002). For example, expression of a dominant negative form of TRF2 disrupts the normal structure and result in the rapid onset of either senescence or apoptosis depending on the cell type. Results showing that telomerase disruption can slow proliferation and alter the 3' single-stranded telomeric overhang without telomere shortening support this view (Masutomi et al., 2003).

It has become clear that many proteins involved in the DNA-damage response play key roles in telomere maintenance (reviewed (von Zglinicki et al., 2005)). Thus, the signalling pathway connecting telomere uncapping and replicative senescence appears to be the same as the one activated by DNA damages. Indeed, uncapped telomeres activate signalling cascades involving proteins linked to DNA repair as ATM (for "ataxia telangiectasia"), ATR (for "ataxia telangiectasia and Rad3 related") and DNA-PK. Furthermore, phosphorylation of histone H2A.X facilitates the formation of DNA damage foci around uncapped telomeres, and this in turn activates downstream checkpoint kinase 1 (Chk1) and Chk2 and eventually p53. Thus, cellular senescence can be regarded as a permanently maintained DNA damage state.

Direct evidence that altered telomere length or function has consequences for multicellular organisms in vivo comes from experiments carried out in various species in which telomerase activity is eliminated by inactivation of telomerase genes. Telomere dysfunction in *S. cerevisiae* due to mutations in telomerase leads to senescence (Lowell and Pillus, 1998; Lundblad and Szostak, 1989). In *C. elegans*, telomerase defects appear to result in sterility after a certain number of generations (Ahmed and Hodgkin, 2000), but a role of telomeres in its aging process have not been established yet. Due to the extremely long telomeres of the laboratory mouse, telomerase-deficient mice are normal up to four generations but then show a number of abnormalities similar to some aspects of premature aging associated to telomere shortening (Blasco et al., 1997; Rudolph et al., 1999).

Although dysfunctional telomeres initiate checkpoint signals that provoke senescence or apoptosis, they are also highly recombinogenic, leading to chromosomal breakage-fusion-bridge cycles that are potentially cancer promoting. This dual effect of dysfunctional telomeres is illustrated in Figure 5. It appears now that many human precancerous lesions progress through a phase of genomic instability likely to be generated in part by dysfunctional telomeres (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). In addition to this genomic instability, activation of telomere-maintenance mechanisms (achieved either by telomerase reactivation or ALT mechanism development) is crucial for tumor progression.

5. Stress-induced senescence

Dysfunctions of telomeres are not the only cause for cellular senescence. Some cell types that express telomerase and maintain telomere length in culture still can acquire a senescent

phenotype. For example, human keratinocytes and mammary epithelial cells are not immortalized by telomerase expression alone (Kiyono et al., 1998). Similarly, rodent cells express telomerase and maintain very long telomeres, yet senesce in culture. This observation indicates that there are additional, telomere-independent mechanisms that limit the proliferative lifespan of certain cell types.

Many normal cells arrest growth with a senescent phenotype, independently of their replicative history, when they experience DNA damage or inappropriate conditions of culture (low serum or growth factor concentrations) (Chen et al., 1995; Toussaint et al., 2002). The level of damage determines whether cell death or senescence happens. Finally, normal cells senesce when they experience strong mitogenic signals, such as those delivered by certain oncogenes or overexpressing signal transducing proteins, like activated forms of Ras or Raf (Ferbeyre et al., 2002; Serrano et al., 1997).

The term “stress-induced premature senescence” (SIPS) has been used to design these stress-dependent and telomere-independent senescent-like phenotypes (Brack et al., 2000). It has been proposed that telomere-independent mechanisms that limit replicative lifespan seen in some human epithelial cells and rodent cells are a form of SIPS triggered by the cumulative trauma of culturing cells in vitro (Sherr and DePinho, 2000; Wright and Shay, 2000).

The SIPS phenotype appears indistinguishable from that shown by cells that have reached the Hayflick’s limit and enter replicative senescence. However, in contrast to replicative senescence, which is bypassed by ectopic expression of hTERT, overexpression of hTERT has no detectable effect on stress-induced senescence. These observations indicate that replicative senescence and stress-induced senescence are distinct biological processes, although both processes show many similar characteristic (phenotypic markers or expression of senescence-associated genes). In both cases senescence response converges on a central network governed by p53 and Rb. The downstream cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16INK4a are two primary effectors involved in the induction and maintenance of this response.

6. Cellular senescence as a tumour-protection mechanism

In human somatic cells, which do not express telomerase, the proliferation required for a tumour to develop is sufficient to trigger replicative senescence. Thus replicative senescence, limiting the number of cell divisions, may function to prevent malignant cells from being able to continue to proliferate and acquire additional mutations resulting in tumorigenesis. As such this mechanism acts to protect against cancer. This concept has been recently supported in by two recent studies (Cosme-Blanco et al., 2007; Feldser and Greider, 2007). In the first one, using mTR(-/-) mice crossed with Emu-myc transgenic mice, an established model of Burkitt’s lymphoma, D. Feldser and C. Greider provide evidence that short telomeres suppressed tumorigenesis in Emu-myc transgenic animals by inducing senescence when apoptotic mechanisms were inhibited. Furthermore, the loss of p53 in these mice restored lymphoma formation. Using the same mTR(-/-)

mice with short telomeres, the second study shows that suppression of tumorigenesis by dysfunctional telomeres requires the activation of the p53-dependent cellular senescence pathway.

As mentioned above, both p53 and pRB pathways are crucial for establishment and maintaining the senescent phenotype. Inactivation of these pathways abrogates the senescence response. If cells bypass this checkpoint by telomerase activation or telomere stabilization tumour development can then proceed. Thus, cellular senescence is likely a powerful tumor suppressive mechanism, which can ensure longevity by suppressing the development of cancer. However, this tumour protection mechanism of senescence was challenged by the observation that late generation of telomerase knockout mice had an increased frequency of tumour development compared with wild-type or early generation animals although tumors did not progress. Thus, in these mice telomere shortening was increasing the frequency of cancer rather than protecting against it (Rudolph et al., 1999). This apparent contradiction can be explained by the dual effect due to telomere shortening as already discussed (see Fig. 5). The fact that knockout mice have a higher incidence of tumours shows that chromosomal instability leading to the rapid accumulation of deleterious mutations balance any protective advantage of a proliferative checkpoint. For now it is not clear whether the results obtained in mice could apply to humans and the telomere balance in human cells remains unknown. In addition, as it will be detailed below, recent evidence supports the idea that senescent stromal fibroblasts may be able to create a tissue environment that could promote the development of age-related epithelial cancers.

Cell senescence, human aging and cancer

Aging of organisms is characterized by a gradual functional decline of all organ systems. Cells derived from most multicellular organisms have a finite replicative potential in culture, thus it is reasonable to assume that human aging has a cellular basis and that the progressive accumulation of senescent cells contributes to some pathologies that develop in the aging process. However, the question whether aging is the result of a cellular program that is governed by a “biological clock” (telomere length) or is the result of the slow accumulation of damages leading to cellular decline is still under debate. Important findings stressing the differences between the replicative fate of cells in culture and in the organism had cast doubt on the validity of the relation between senescence of cells in culture and lifespan of the organism (reviewed in (Rubin, 2002)). One example is the wide distribution of replicative potential of cells in any population cultured from humans and animals. It is clear from these studies that although the use of cell culture had led important findings in biochemistry and molecular and cellular biology, the cellular models and the methods used to study them have a series of flaws. Thus, extrapolations from results obtained in in vitro studies of cells (in an abnormal environment) could dangerously lead to false conclusions about what actually happens in the whole organism. Therefore, although replicative senescence and SIPS may reflect certain pathological changes observed in aging, they are not accurate representations of human aging. However, although a connection between cell aging and normal aging in humans has still to be established, there are

substantial indications that a) senescent cells accumulate with advancing age (Dimri et al., 1995), b) telomere shortening occurs in multiple cell lineages during normal human aging, and c) accelerated shortening can occur in specific cell types derived from individuals with premature aging syndromes (reviewed in (Faragher, 2000; Mohaghegh and Hickson, 2001)). Although senescence has been proposed as a barrier to cancer progression in human, it has been hypothesized that senescent cells accumulate with normal aging and contribute to age-related pathologies by inhibiting tissue regenerative capacities and to cancer resulting from telomere dysfunction (Krtolica and Campisi, 2002). For example, SA-beta-gal-positive senescent cells have been identified in aged liver, atherosclerotic plaques, and skin (Dimri et al., 1995). Much research is ongoing to find out how telomere shortening contributes to the process of aging and the development of age-related diseases. Shortened telomeres have been found in a variety of human tissues, including peripheral white blood cells, aging skin, skeletal muscle, endothelial cells, and central nervous system tissue (Farazi et al., 2003; O'Sullivan et al., 2002; Rudolph et al., 2001; Wiemann et al., 2002). A correlation between shortened telomeres in peripheral blood mononuclear cells and increased risk of death has been found in subgroups of patients (Cawthon et al., 2003). Whether this shortening relates to the development of disease is still being examined. Some research has shown that people over 60 years old with the shortest telomeres in blood cells are the ones with the most age-related deterioration (Cawthon et al., 2003; Chang and Harley, 1995; Epel et al., 2006). In a group of more than 1500 patients, a correlation between telomere length and risk of developing coronary heart disease has also been reported (Vasa-Nicotera et al., 2005). This could provide the idea that telomere length can be a predictive factor to identify individual patients at risk for coronary events. However, although intriguing, these observations do not directly demonstrate that telomere length is a direct determinant of survival and telomere shortening the cause of aging. Indeed, there is considerable variability of telomere length between individuals that prevents such firm cause-and-effect conclusions. Furthermore, genetic events and environmental factors may affect survival and, in parallel, telomere length, so that telomere attrition can be only considered as an epiphenomenon.

The most convincing evidence for the existence of a causal relationship between telomere shortening and disease-or age-related changes in humans is the inherited bone marrow failure syndrome, dyskeratosis congenita (DKC). The autosomal dominant variant of DKC is caused by a mutation in the telomerase RNA template gene, whereas the X-linked variant is caused by mutations in the telomere-associated protein, Dyskerin (Vulliamy et al., 2005). The phenotype of this aging disorder closely reproduces that of the telomerase knockout mice. DKC is marked by abnormally short telomeres, defects in organs with a high cell turnover, including those involved in haematopoiesis and skin functions. Bone marrow failure is primarily responsible for early death (reviewed in (Dokal, 2001)). A recent study shows that transduction of hTERT and hTR in autosomal DKC cells resulted in extension of telomeres and lifespan. Interestingly, these effects were already noticed, although to a less extent, after hTERT transduction alone (Westin et al., 2007). Altogether, these findings suggest that telomere length or telomerase activity can affect human health.

Another evidence of the relationship between telomere shortening and aging is observed in patients with Werner's syndrome (WS) who show greatly elevated frequencies of age-related diseases

such atherosclerosis and cancer together with impaired wound healing likened to that seen in elderly individuals. Fibroblast cultures derived from Werner patients exhibit a profound reduction of in vitro proliferative ability and enter replicative senescence prematurely (Faragher et al., 1993). At the molecular level, the syndrome results from a mutation in the gene encoding WRN, a member of the RecQ DNA-helicase family, which can interact with telomere binding proteins (Yu et al., 1996). WRN appears to play a major role in genome stability, particularly during DNA replication and repair and telomere metabolism. Much of the pathophysiology associated with WS, can be attributed to a defect in telomere maintenance. Recent genetic evidence from *mTR(-)/Wrn(-)* mice demonstrates that mice with critically shortened telomeres display aging phenotypes reminiscent of human WS, further reinforcing the notion that telomere dysfunction is required for the manifestation of aging pathophysiology in the setting of WRN deficiency. The observation that premature senescence characteristic of WS cells can be rescued by ectopic expression of telomerase supports the role for telomere integrity in the pathogenesis of WS (Crabbe et al., 2007; Wyllie et al., 2000). However, sensitive single telomere length analyses reveal that there are circumstances when telomeres in WS cells erode at rates similar to those of normal controls. This suggests that accelerated global telomere attrition is not necessarily a mechanism that generates dysfunctional telomeres in WS cells (Baird et al., 2004). Rather, WS cells may be particularly sensitive to the presence of a few dysfunctional telomeres that arise owing to the loss of WRN functions at telomeres. Although some clear features of human aging can be reproduced in diseases associated with telomere maintenance deficiencies, it does not prove that telomere erosion is in normal physiology the primary causal force that drives human aging.

As the incidence of cancer increases with age, thus, it has been speculated that growth arrest associated with cellular senescence will initially benefit young organism by suppressing early onset cancers, but in contrast will be deleterious to old organism by contributing to aging and age-related cancers. As with age the number of cells approaches the end of their replicative lifespan, it has been proposed that the resultant telomere shortening might increase genetic instability. Another possibility is that their accumulation may create a permissive pro-oncogenic tissue environment for the development of malignant tumors by the secretion of factors (including growth factors, matrix-degrading enzymes, and inflammatory cytokines) that synergizes with oncogenic mutations and induce the rise in cancer incidence with age (Campisi, 2001b; Krtolica and Campisi, 2003). The idea that senescent fibroblasts can promote the expression of malignant phenotype by preneoplastic epithelial cells has been recently tested (Krtolica et al., 2001).

Implications for therapy: targeting senescence pathways

Cancer therapeutics are primarily thought to work by inducing apoptosis in tumour cells. Various tumour suppressors and oncogenes have been shown to regulate senescence in normal cells, and senescence bypass appears to be an important step in the development of cancer. However, genetic events that abrogate oncogene-induced senescence may not necessarily co-disrupt the possibility of drug-induced senescence and tumor cells may still retain the capacity to senesce.

Consequently induction of senescence along with apoptosis is an antiproliferative process that can be exploited as a basis for cancer therapy. Senescence is already induced by existing anticancer agents (mostly DNA damaging agents) (Chang et al., 1999; Elmore et al., 2002). Since the drug amounts required for induction senescence are much lower than those necessitated for induction of cell death, forcing cancer cells to undergo senescence may represent a less aggressive approach to control tumor progression and may reduce chances of drug resistance development. Furthermore, the identification of senescence-associated proteins will allow the development of agents, which specifically promote this process. As escape from cellular senescence by activating telomerase or ALT mechanisms to maintain telomeres are required for the ongoing proliferation of most human tumours, this makes telomere/telomerase biology a target for the development of novel anticancer strategies. Besides, the fact that short telomeres contribute to different pathologies associated with aging, indicates that strategies based on temporary telomerase re-activation may have also utility both in tissue engineering and anti-aging therapy (Figure 6).

1. "Anti-telomerase" strategies as an anticancer therapy

The close correlation between telomerase activation and cancer cell immortalisation has placed telomerase as an important target for malignancy diagnostic and therapeutic applications (Table 1). By specifically targeting telomerase or induction of telomere dysfunctions, it is proposed to restore telomere attrition toward a critical length that will trigger cellular senescence and apoptosis. However, if cellular senescence indeed contributes to age-related rise of cancers, there are needs for further investigations to evaluate the safety of these approaches.

Therapeutic strategies for inhibition of telomerase have included targeting components of the telomerase complex (hTERT, hTR or telomere-associated proteins) or directly targeting telomere DNA structures (including G-quadruplex-interacting) agents (reviewed in (Pendino et al., 2006)). Numerous strategies exist like antisense strategies or ribozymes against hTR and hTERT, introduction of dominant negative form of hTERT, and reverse transcriptase inhibitors. Molecules targeting hTERT expression such as antiestrogens, progesterone and retinoids (natural or synthetic derivatives of vitamin A) are also interesting approaches. Indeed, these latter classes of molecules are already clinically relevant as there are widely used as anticancer agents for some tumors, including endometrial cancers and haematological malignancies. It is not excluded that some of the clinical benefit of these agents result from their action on telomerase expression and/or induction of senescence. In fact, retinoids, which regulate cell growth and differentiation are able to induce a transcriptional repression of hTERT independently of differentiation associated or not with the induction of a senescence program (Chen et al., 2006; Dokmanovic et al., 2002; Pendino et al., 2003; Pendino et al., 2001b; Pendino et al., 2006; Roninson and Dokmanovic, 2003). The identification of genes that mediate retinoid-induced senescence should help in developing new therapeutic strategies aimed at inducing senescence (reviewed in (Roninson and Dokmanovic, 2003)).

Promising strategies were also designed to target specifically telomerase-positive cells as telomerase immunotherapy and telomere promoter driven gene therapy (Keith et al., 2004; Vonderheide et al., 2004). However, despite efforts, few of these strategies are to date exploitable in

clinic for reasons of low effectiveness or toxicity *in vivo*. Presently, telomerase immunotherapy is the first strategy to undergo clinical trials. It is also becoming clear that focusing solely on a relative inhibition of telomerase activity may misjudge the therapeutic efficacy of some telomerase inhibitors. Indeed, it has been reported in some case that a very high inhibition of telomerase activity or expression is needed to be efficient in terms of telomere shortening and cell viability (Tarkanyi et al., 2005). This requirement is not always fulfilled. This feature has to be taken into account for the development of telomerase inhibitors.

2. "Telomerase restoration" strategies as anti-aging therapies

The role of telomeres in replicative senescence had led to suggestions that telomerase can be used as an anti-aging therapy and for related technologies such as tissue engineering (Blasco, 2005; Fossel, 2002; Shay and Wright, 2000). The most accessible approaches at present appear to be those in which specific human cells would be manipulated *ex vivo*, by telomerase gene transduction to express telomerase, maintain or increase telomere length, and therefore to extend capacity for cell division. This can offer the possibility of replacing tissues and organs damaged during aging. After expansion, the cells would be reintroduced into the body to restore tissue and/or organ function or to allow expansion of specific cells such as stem cells. However, as mentioned above, the relationship between replicative senescence and organismal aging remains unproven and telomerase alone will not solve the aging problem. Whether telomere shortening plays a role in human aging is still debatable. No connection exists between mean telomere length and rate of aging in mammalian species. Of all studied primates, humans appear to have relatively short telomeres and a longer lifespan (Steinert et al., 2002). Although mice are short lived compared to human, they have longer telomeres and higher telomerase activity in many organs (Prowse and Greider, 1995). Furthermore, safety of telomerase-based anti-aging therapies has to be more accurately evaluated and further studies are needed to determine whether telomerase can favour tumorigenesis and whether telomerase-based therapies may promote cancer.

Conclusion

Although the role of cell senescence in tumor suppression has received much support since its original description, its role in organismic aging remains unclear. Aging is a stochastic and heterogeneous process that involves cooperation of both extrinsic and intrinsic factors. In humans and complex animals the study of aging is not as simple as in single cell organisms in which aging of the whole body reflects aging of its unique cell.

With the discovery of the first molecular counting mechanism to the finding how immortal cancer cells escape replicative senescence, it becomes clear that research areas on aging and cancer are now converging. Thus, these two fields of research are taken advantage from each other's advances giving the opportunity to targeted therapeutic intervention for the benefit of healthcare. In that, senescence machinery manipulations may become a therapeutic option both for tissue

engineering in the treatment of age-related diseases and for inhibition of cancer development. However, because of the antagonistic pleiotropic effect of such a manipulation, further studies will be required to determine the role played by senescence in tumorigenesis as well as the mechanisms of senescence before using routinely these strategies in clinic. Finally, if telomere/telomerase biology and cellular senescence are important tools to study cancer and develop antitumor strategies, it is not known yet whether they can actually help in understanding human aging.

Table 1: Anticancer strategies based on telomerase and telomere biology

Target	Therapeutic approach		References
Targeting hTERT	Nucleoside inhibitors	AZT (3-azido-2',3'-dideoxythymidine) ddG (dideoxyguanosine)	(Fletcher et al., 2001) (Strahl and Blackburn, 1996a)
	Non-nucleosidic inhibitors	TMPyP derivatives FJ5002 BIBR1532	(Dixon et al., 2005) (Naasani et al., 1999) (Damm et al., 2001a; El-Daly et al., 2005)
	Antisense technology		(Kraemer et al., 2003)
	Ribozymes		(Yokoyama et al., 2000)
	Dominant negative hTERT		(Hahn et al., 1999c) Hahn et al., 1999)
Targeting hTR	Antisense oligonucleotides and siRNA	GRN163 2'-5' oligoadenylate antisense anti-hTR	(Asai et al., 2003) (Mukai et al., 2000) (Fu et al., 2005; Tarkanyi et al., 2005c; Wang et al., 2004a)
	Ribozymes		Yeo et al., 2005)
Targeting regulatory mechanisms of telomerase	Demethylating agents Histone deacetylase inhibitors Hormones PKC and AKT inhibitors	5-Azacytidine Trichostatin A, FR901228 Estrogens Progesterone retinoids	(Kitagawa et al., 2000) (Tsurutani et al., 2003) (Aldous et al., 1999a) (Wang et al., 2000) (Pendino et al., 2003; Pendino et al., 2001b; Pendino et al., 2006b; Tarkanyi et al., 2005b) (Kang et al., 1999b; Ku et al., 1997b)
Targeting the telomeres and associated proteins	G-quadruplex DNA-interactive compounds	BRACO 19 Telomestatin Quindoline derivatives	(Burger et al., 2005) (Kim et al., 2002; Sumi et al., 2004) (Liu et al., 2007b; Zhou et al., 2006)
	Conventional	Cisplatin	(Furuta et al., 2003;

	cytotoxic compounds		Mese et al., 2001; Wang et al., 1998b)
	Targeting telomere-associated proteins	Geldanamycin derivatives (targeting hsp90)	(Holt et al., 1999)
Targeting telomerase positive cells	Tumor specific immunotherapy	Vaccines targeting telomerase (hTERT-derived peptides)	(Vonderheide et al., 2004)
	Telomerase-mediated tumor specific gene therapy	Use of the hTERT promoter to drive proapoptotic genes (Bax, caspase-6 and -8, FADD, TRAIL) Suicide genes	(Keith et al., 2004b)

References

1. Carrel A, Ebeling AH. Age and multiplication of fibroblasts. *J Exp Med* 1921, 34:599-606.
2. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961, 25:585-621.
3. Campisi J. Replicative senescence and immortalization. In *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley-Liss, New York edition. Edited by Stein GS, Baserga, A., Giordano, A. and Denhardt, D. T.; 1999: 348-373
4. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:9363-9367.
5. Going JJ, Stuart RC, Downie M, Fletcher-Monaghan AJ, Keith WN. 'Senescence-associated' beta-galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *J Pathol* 2002, 196:394-400.
6. Cristofalo VJ, Volker C, Francis MK, Tresini M. Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998, 8:43-80.
7. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005, 120:513-522.
8. Toussaint O, Remale J, Dierick JF, et al. Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of in vivo occurrence. *Biogerontology* 2002, 3:13-17.
9. Shay JW, Pereira-Smith O, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991, 196:33-39.
10. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12:705-709.
11. McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941, 26:234-282.
12. Muller HJ. The remaking of chromosomes. *Collect Net* 1938, 13:181-195.
13. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:6622-6626.
14. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972, 239:197-201.

15. Olovnikov AM. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. Dokl Akad Nauk SSSR 1971, 201:1496-1499.
16. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J Theor Biol 1973, 41:181-190.
17. Wright WE, Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. Curr Opin Genet Dev 2001, 11:98-103.
18. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 1985, 43:405-413.
19. Feng J, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. Science 1995, 269:1236-1241.
20. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 1997, 277:955-959.
21. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. Embo J 1992, 11:1921-1929.
22. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994, 266:2011-2015.
23. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Dev Genet 1996, 18:173-179.
24. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. Proc Soc Exp Biol Med 1997, 214:99-106.
25. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998, 279:349-352.
26. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. Nat Genet 1999, 21:111-114.
27. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, et al. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. Nat Genet 1999, 21:115-118.
28. Funk WD, Wang CK, Shelton DN, et al. Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model. Exp Cell Res 2000, 258:270-278.
29. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. Oncogene 1998, 16:1217-1222.
30. Blasco MA. Telomerase beyond telomeres. Nat Rev Cancer 2002, 2:627-633.
31. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. Nat Cell Biol 2003, 5:474-479.
32. Xiang H, Wang J, Mao Y, et al. Human telomerase accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of the genes mediating RB/E2F pathway. Oncogene 2002, 21:3784-3791.
33. Geserick C, Tejera A, Gonzalez-Suarez E, Klatt P, Blasco MA. Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase to transforming growth factor-beta signaling. Oncogene 2006, 25:4310-4319.
34. Dudognon C, Pendino F, Hillion J, et al. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. Oncogene 2004, 23:7469-7474.
35. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. Embo J 1995, 14:4240-4248.
36. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. Nat Genet 2000, 26:447-450.

37. Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* 2005, 14 Spec No. 2:R191-196.
38. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999, 97:503-514.
39. Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem* 2004, 279:51338-51342.
40. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005, 19:2100-2110.
41. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997, 385:740-743.
42. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998, 92:401-413.
43. d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 2004, 18:1781-1799.
44. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000, 408:53-56.
45. de Lange T. Cell biology. Telomere capping--one strand fits all. *Science* 2001, 292:1075-1076.
46. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999, 283:1321-1325.
47. Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 2002, 295:2446-2449.
48. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003, 114:241-253.
49. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 2005, 126:111-117.
50. Lowell JE, Pillus L. Telomere tales: chromatin, telomerase and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci* 1998, 54:32-49.
51. Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 1989, 57:633-643.
52. Ahmed S, Hodgkin J. MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature* 2000, 403:159-164.
53. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997, 91:25-34.
54. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* 1999, 96:701-712.
55. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005, 434:864-870.
56. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005, 434:907-913.
57. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998, 396:84-88.
58. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:4337-4341.
59. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997, 88:593-602.
60. Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, et al. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 2002, 22:3497-3508.

61. Brack C, Lithgow G, Osiewacz H, Toussaint O. EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *Embo J* 2000, 19:1929-1934.
62. Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med* 2000, 6:849-851.
63. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000, 102:407-410.
64. Feldser DM, Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* 2007, 11:461-469.
65. Cosme-Blanco W, Shen MF, Lazar AJ, et al. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep* 2007, 8:497-503.
66. Campisi J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* 2001, 36:607-618.
67. Rubin H. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 2002, 20:675-681.
68. Faragher RG. Cell senescence and human aging: where's the link? *Biochem Soc Trans* 2000, 28:221-226.
69. Mohaghegh P, Hickson ID. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Hum Mol Genet* 2001, 10:741-746.
70. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34:1401-1414.
71. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 2001, 28:155-159.
72. Farazi PA, Glickman J, Jiang S, et al. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003, 63:5021-5027.
73. O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 2002, 32:280-284.
74. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *Faseb J* 2002, 16:935-942.
75. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003, 361:393-395.
76. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:11190-11194.
77. Epel ES, Lin J, Wilhelm FH, et al. Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology* 2006, 31:277-287.
78. Vasa-Nicotera M, Brouillette S, Mangino M, et al. Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am J Hum Genet* 2005, 76:147-151.
79. Vulliamy TJ, Walne A, Baskaradas A, et al. Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. *Blood Cells Mol Dis* 2005, 34:257-263.
80. Dokal I. Dyskeratosis congenita. A disease of premature ageing. *Lancet* 2001, 358 Suppl:S27.
81. Westin ER, Chavez E, Lee KM, et al. Telomere restoration and extension of proliferative lifespan in dyskeratosis congenita fibroblasts. *Aging Cell* 2007, 6:383-394.
82. Faragher RG, Kill IR, Hunter JA, et al. The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division "counting" gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:12030-12034.
83. Yu CE, Oshima J, Fu YH, et al. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996, 272:258-262.

84. Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, et al. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat Genet* 2000, 24:16-17.
85. Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:2205-2210.
86. Baird DM, Davis T, Rowson J, Jones CJ, Kipling D. Normal telomere erosion rates at the single cell level in Werner syndrome fibroblast cells. *Hum Mol Genet* 2004, 13:1515-1524.
87. Krtolica A, Campisi J. Integrating epithelial cancer, aging stroma and cellular senescence. *Adv Gerontol* 2003, 11:109-116.
88. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:121072-112077.
89. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999, 59:3761-3767.
90. Elmore LW, Rehder CW, Di X, et al. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem* 2002, 277:35509-35515.
91. Pendino F, Tarkanyi I, Dudognon C, et al. Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? *Curr Cancer Drug Targets* 2006, 6:147-180.
92. Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, et al. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:6662-6667.
93. Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F, et al. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 2003, 22:9142-9150.
94. Roninson IB, Dokmanovic M. Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids. *J Cell Biochem* 2003, 88:83-94.
95. Dokmanovic M, Chang BD, Fang J, Roninson IB. Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes. *Cancer Biol Ther* 2002, 1:24-27.
96. Chen Y, Dokmanovic M, Stein WD, Ardecky RJ, Roninson IB. Agonist and Antagonist of Retinoic Acid Receptors Cause Similar Changes in Gene Expression and Induce Senescence-like Growth Arrest in MCF-7 Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2006, 66:8749-8761.
97. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, et al. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004, 10:828-839.
98. Keith WN, Bilsland A, Hardie M, Evans TRJ. Drug insight: cancer cell immortality-telomerase as a target for novel cancer gene therapies. *Nature Clinical Practice* 2004, 1:88-96.
99. Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death. *Leukemia* 2005, 19:1806-1811.
100. Fossel M. Cell senescence in human aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 959:14-23.
101. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005, 6:611-622.
102. Shay JW, Wright WE. The use of telomerized cells for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2000, 18:22-23.
103. Steinert S, White DM, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells. *Exp Cell Res* 2002, 272:146-152.

104. Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:4818-4822.
105. Fletcher TM, Cathers BE, Ravikumar KS, Mamiya BM, Kerwin SM. Inhibition of Human Telomerase by 7-Deaza-2'-deoxyguanosine Nucleoside Triphosphate Analogs: Potent Inhibition by 6-Thio-7-deaza-2'- deoxyguanosine 5'-Triphosphate. *Bioorg Chem* 2001, 29:36-55.
106. Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* 1996, 16:53-65.
107. Dixon IM, Lopez F, Esteve JP, et al. Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *Chembiochem* 2005, 6:123-132.
108. Naasani I, Seimiya H, Yamori T, Tsuruo T. FJ5002: a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis. *Cancer Res* 1999, 59:4004-4011.
109. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *Embo J* 2001, 20:6958-6968.
110. El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, et al. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood* 2005, 105:1742-1749.
111. Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, et al. Antisense-mediated hTERT Inhibition Specifically Reduces the Growth of Human Bladder Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2003, 9:3794-3800.
112. Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, et al. The 5'-end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 273:316-321.
113. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999, 5:1164-1170.
114. Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res* 2003, 63:3931-3939.
115. Mukai S, Kondo Y, Koga S, et al. 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas. *Cancer Res* 2000, 60:4461-4467.
116. Wang ES, Wu K, Chin AC, et al. Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: in vitro and in vivo studies in multiple myeloma and lymphoma. *Blood* 2004, 103:258-266.
117. Tarkanyi I, Horvath A, Szatmari I, et al. Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide. *FEBS Lett* 2005, 579:1411-1416.
118. Fu XH, Zhang JS, Zhang N, Zhang YD. Combination of telomerase antisense oligonucleotides simultaneously targeting hTR and hTERT produces synergism of inhibition of telomerase activity and growth in human colon cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2005, 11:785-790.
119. Yeo M, Rha SY, Jeung HC, et al. Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozyme targeting human telomerase RNA induces growth retardation and apoptosis in human breast tumor cells. *Int J Cancer* 2005, 114:484-489.
120. Kitagawa Y, Kyo S, Takakura M, et al. Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT. *Clin Cancer Res* 2000, 6:2868-2875.
121. Tsurutani J, Soda H, Oka M, et al. Antiproliferative effects of the histone deacetylase inhibitor FR901228 on small-cell lung cancer lines and drug-resistant sublines. *Int J Cancer* 2003, 104:238-242.
122. Aldous WK, Marean AJ, DeHart MJ, Matej LA, Moore KH. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines. *Cancer* 1999, 85:1523-1529.

123. Wang Z, Kyo S, Takakura M, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 2000, 60:5376-5381.
124. Pendino F, Hillion J, Dudognon C, et al. Telomerase targeting by retinoids in cells from patients with myeloid leukemias of various subtypes, not only APL. *Leukemia* 2006, 20:599-603.
125. Ku WC, Cheng AJ, Wang TC. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 241:730-736.
126. Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 1999, 274:13085-13090.
127. Burger AM, Dai F, Schultes CM, et al. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* 2005, 65:1489-1496.
128. Kim MY, Vankayalapati H, Shin-Ya K, Wierzbka K, Hurley LH. Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J Am Chem Soc* 2002, 124:2098-2099.
129. Sumi M, Tauchi T, Sashida G, et al. A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *Int J Oncol* 2004, 24:1481-1487.
130. Zhou JM, Zhu XF, Lu YJ, et al. Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. *Oncogene* 2006, 25:503-511.
131. Liu JN, Deng R, Guo JF, et al. Inhibition of myc promoter and telomerase activity and induction of delayed apoptosis by SYUIQ-5, a novel G-quadruplex interactive agent in leukemia cells. *Leukemia* 2007, 21:1300-1302.
132. Wang X, Wong SC, Pan J, et al. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res* 1998, 58:5019-5022.
133. Mese H, Ueyama Y, Suzuki A, et al. Inhibition of telomerase activity as a measure of tumor cell killing by cisplatin in squamous cell carcinoma cell line. *Chemotherapy* 2001, 47:136-142.
134. Furuta M, Nozawa K, Takemura M, et al. A novel platinum compound inhibits telomerase activity in vitro and reduces telomere length in a human hepatoma cell line. *Int J Cancer* 2003, 104:709-715.
135. Holt SE, Aisner DL, Baur J, et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 1999, 13:817-826.

Legends to figures:

Figure 1: The telomere hypothesis of senescence. (a) After 60-80 population doublings in culture, cells stop dividing and develop a senescent phenotype. Telomere shortening is considered as the main causal mechanism of replicative senescence. (b) Abrogation of the retinoblastoma (pRB) and p53 tumor-suppressor pathways overcome senescence and subsequent cell death allowing continued division until they enter a state termed "crisis". (c) Rare cells emerge from crisis by activating mechanisms for telomere stabilization (telomerase expression, ALT).

Figure 2: The “end-replication problem”. DNA polymerase requires an RNA primer to initiate synthesis in the 5'-3' direction. DNA polymerase synthesizes the leading strand as a continuous molecule until the end of the chromosome. In the lagging strand, however, DNA polymerase synthesis is based on a series of fragments, called Okazaki fragments, each requiring new RNA primers. They are then ligated by the DNA ligase to make a continuous strand. However, the replication machinery is unable to synthesize the sequence complementary to the final end of the chromosome, as there is no DNA beyond the end for a priming event. This incomplete replication results in telomere shortening at each round of cell division. This is called the "end-replication problem".

Figure 3: Mechanism of telomere extension by telomerase. Telomerase consists of a protein subunit (hTERT) with reverse transcriptase activity and an integral RNA component (hTR) that serves as a template for addition of nucleotides to the telomeres. (a) The template region of hTR binds to the telomeric end. (b) Telomerase acts as a reverse transcriptase catalyzing the extension of the G-rich telomeric strand by adding the TTAGGG sequence until the end of the template region of the RNA molecule. (c) The enzyme complex translocates along the newly synthesized strand to start a new elongation step. The process continues with subsequent translocation-extension steps resulting in the elongation of the telomere in the 5'-to-3' direction. (d) The complementary (C-rich) strand is synthesized by extension of an RNA primer by a conventional DNA polymerase.

Figure 4: A putative structure of the telomere. Duplex structure of telomeres ends in a 3' single-strand overhang. The telomere folds back on itself to form a large telomere loop (T)-loop. The 3' G-strand overhang invades the double-stranded telomere repeat sequence of the 5' end strand, forming a displacement loop (D-loop). Two main protein complexes are bound to telomeres, the telomere repeat binding factor 1 and 2 complexes, TRF1 and TRF2 complexes including TRF1 and TRF2 proteins associated with various other proteins.

Figure 5: Antagonistic effects of telomere shortening and telomerase activation. Depending on the genetic context, telomere shortening might either promote or inhibit tumor formation. In the same way, high levels of telomerase exert either growth-promoting effects enhancing tumor formation or have a positive impact on longevity by preventing age-related degenerative lesions.

Figure 6: Targeting senescence pathway. Diverse factors can promote irreversible proliferative arrest known as senescence (either replicative or stress-induced senescence). Depending on the cell specificity, on the genetic context or on the intensity of the damage, the same stimulus can induce either senescence or apoptosis. Thus, both senescence and apoptosis pathways can be exploited as a basis for cancer therapy. On one hand, therapeutic strategies can be used to force fully transformed cancer cells to re-enter the senescence program, on the other hand, the role of telomere and telomerase biology in the induction of senescence suggests that telomerase can be used as an anti-aging therapy.

Questions for self-evaluation

1. The problem of replicating the lagging strand of DNA requires which of the following statements?
 - A) RNA primers
 - B) DNA ligase
 - C) Okazaki fragments
 - D) A and B only
 - E) A, B, and C

2. With each replication of the DNA molecule, the DNA molecule becomes shorter.
 - A) This is true only if the organism has been exposed to excessive of DNA damages.
 - B) This is best explained by the fact that DNA polymerase can only add nucleotides to a 3' end.
 - C) This problem is not resolved by telomerase because it extends the DNA at 5' end of the DNA.
 - D) This is not a problem because the telomere is a nonessential repeating unit.

3. Which of the following cellular alterations can abrogate replicative senescence in human diploid fibroblasts?
 - A) Defects in both p53 and pRB pathways.
 - B) Defects in both Ras and Raf
 - C) Reactivation of telomerase
 - D) Telomere maintenance by "ALT" mechanisms.
 - E) A, B and C
 - F) A, C and D

4. Which of the following statements is true?
 - A) Telomeres are non coding DNA sequences which prevent chromosome fusions
 - B) Telomeres encode proteins essential for cell survival
 - C) Telomerase reactivation is the only mechanism responsible for telomere maintenance in tumours
 - D) Shortening telomeres are the only mechanism capable of inducing senescence.

Answers

1. E) see legend to Figure 2
2. B) see legend to Figure 2 and text "the telomere hypothesis of senescence".
3. F) see Figure 1 and text "Telomerase, a determinant to immortality".
4. A) see text "the telomere hypothesis of senescence", "Telomerase, a determinant to immortality". And "stress-induced senescence".

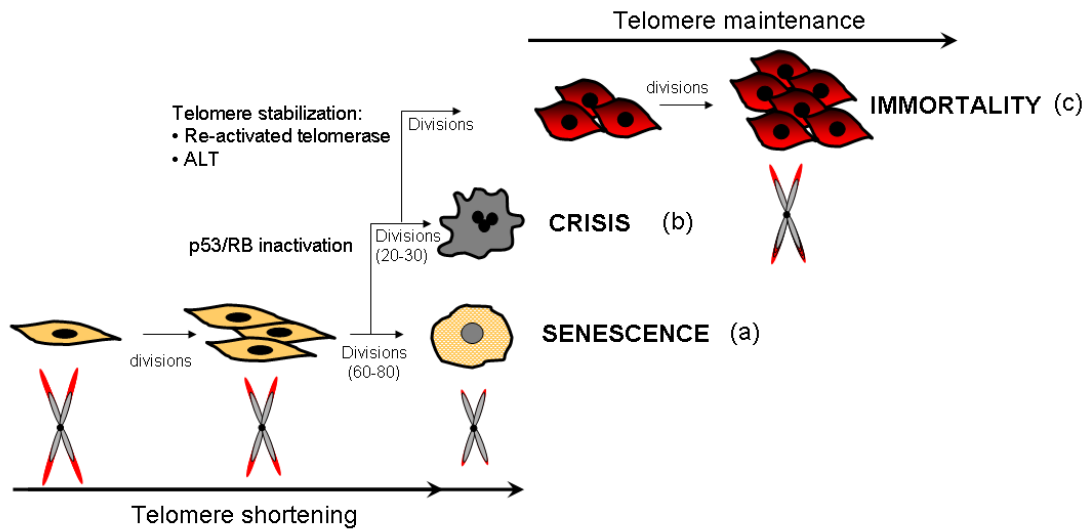


Figure 1

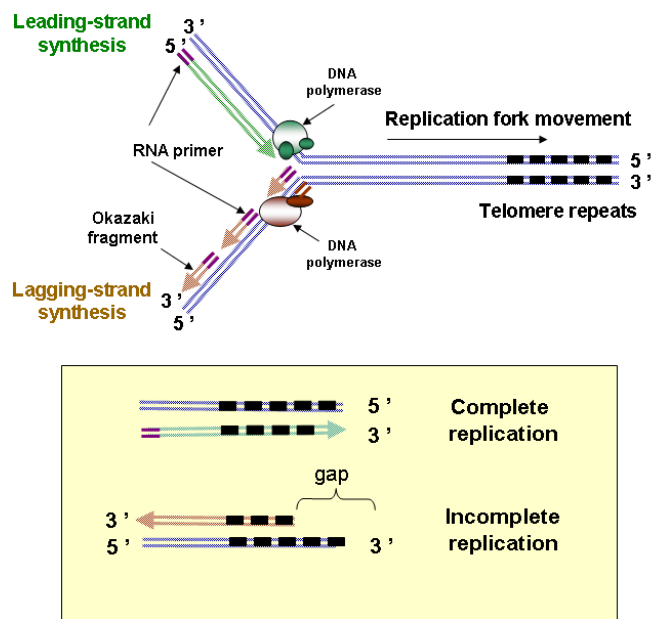


Figure 2

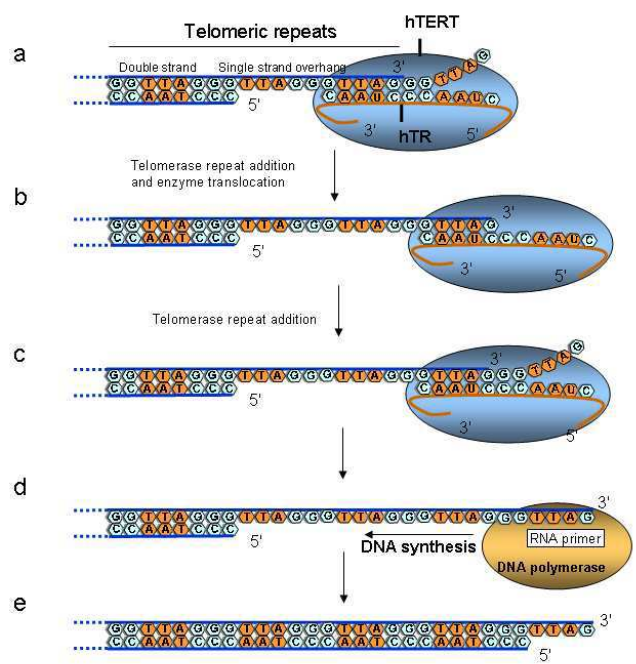


Figure 3

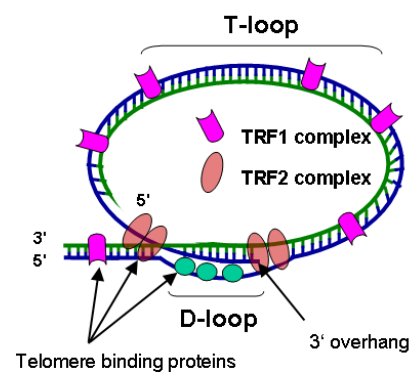


Figure 4

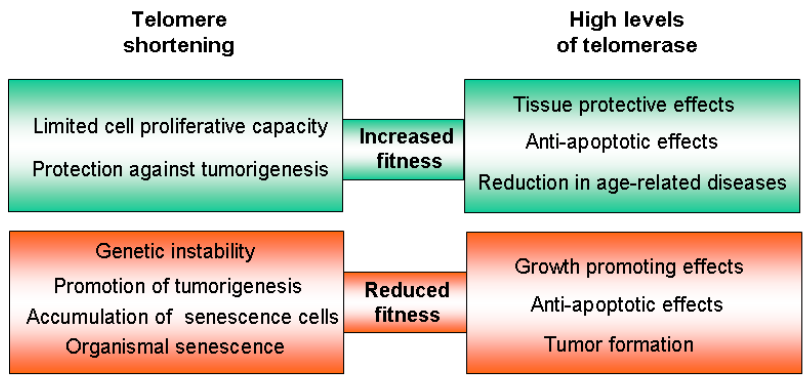


Figure 5

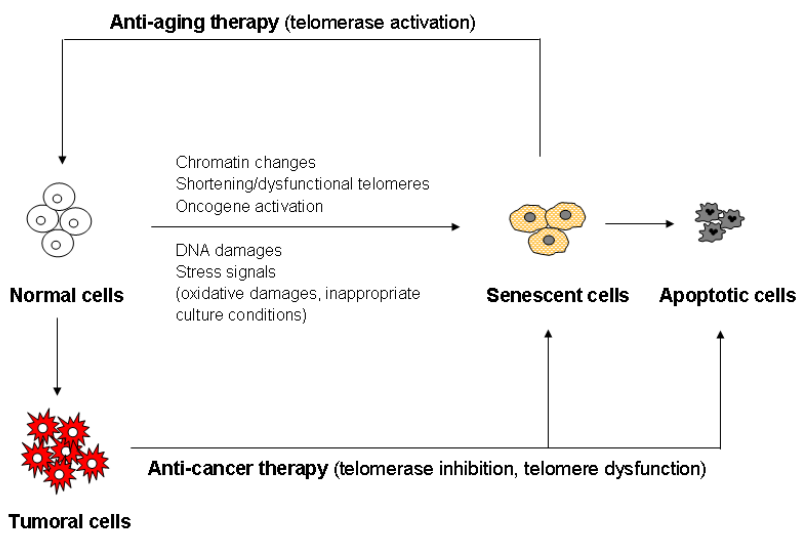


Figure 6