

Les télomères : du normal au pathologique

Stéphane Marcand
Christine Brun
Katia Ancelin
Éric Gilson

Les extrémités d'un chromosome eucaryote sont constituées par des édifices nucléoprotéiques singuliers, les télomères. Les télomères sont indispensables à l'intégrité du génome : ils confèrent une stabilité aux extrémités, permettent la réplication complète de la molécule d'ADN constituant le chromosome, exercent des effets de position et participent à la mise en place de compartiments fonctionnels dans le noyau. Ils sont actuellement l'objet d'une attention toute particulière car des modifications de leur structure pourraient jouer un rôle déterminant dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les connaissances acquises récemment chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont facilité l'étude des télomères humains. En effet, certains constituants télomériques chez ces deux organismes présentent de grandes ressemblances fonctionnelles. Leur caractérisation permettra de mieux comprendre les fonctions télomériques, de manipuler la structure des télomères *in vivo* et d'analyser les modifications télomériques associées aux cancers et aux syndromes de vieillissement prématuré.

ADRESSE

S. Marcand, C. Brun : *chercheurs postdoctoraux*. K. Ancelin : *doctorante*. E. Gilson : *directeur de recherche au Cnrs*. Equipe biochimie et génétique des télomères, laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Cnrs UMR 49, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

TIRÉS À PART

E. Gilson.

Les télomères sont les segments (*meros*) terminaux (*telos*) des chromosomes. Ils sont indispensables pour préserver l'intégrité du matériel génétique au cours du cycle cellulaire. Ils semblent déterminer les capacités prolifératives des cellules et apparaissent impliqués dans les processus de carcinogenèse. De la levure *Saccharomyces cerevisiae* à l'homme, un ensemble d'approches combinant génétique, biochimie et immunocytochimie a permis une accumulation de connaissances offrant de nouvelles perspectives dans les relations entre télomères, oncogenèse et vieillissement.

La chromatine télomérique

Dans de nombreux phyla eucaryotes, l'ADN télomérique est formé par des répétitions en tandem d'un motif simple de 5 à 8 paires de bases riche en guanines (Tableau 1). Ces répétitions télomériques sont régulières chez les vertébrés (TTAGGG) et irrégulières chez la levure *S. cerevisiae* (TG₁₋₃). La longueur moyenne de l'ADN télomérique varie de quelques dizaines de paires de bases à plusieurs kilobases selon l'espèce. Les télomères de la drosophile sont une exception puisqu'ils sont constitués d'une combinaison mosaïque de

deux familles de rétroposons (Tableau I).

Les télomères ne peuvent pas être inversés, une caractéristique qui les distingue d'autres éléments structuraux des chromosomes tels que les centromères ou les origines de réplication. Cette unipolarité se traduit, au niveau moléculaire, par une orientation des répétitions télomériques qui place le brin riche en guanines (G) en 3' de l'extrémité des chromosomes. Ce brin se termine par une extension 3' simple-brin. *In vitro*, les guanines de cet ADN simple-brin peuvent s'associer entre elles par des liaisons hydrogènes différentes des appariements classiques de type Watson-Crick (A-T et G-C). Ces paires G-G peuvent former des repliements intramoléculaires (de type « tige et boucle ») ou des structures à quatre brins, très stables, impliquant des plateaux de quatre guanines, empilés les uns sur les autres (« quatuor de guanine ») [1].

Chez *S. cerevisiae*, les répétitions télomériques s'étendent sur quelques centaines de paires de bases, ne sont pas assemblées en nucléosomes, mais sont reconnues par la protéine Rap1p (*repressor activator protein 1*) [2]. À travers son domaine carboxy-terminal Rap1p recrute d'autres facteurs participant aux fonctions télomériques (Rif1p, Rif2p, Sir3p et Sir4p, Tableau II). Enfin, l'extension 3' simple-brin du télomère est associée à un jeu particulier de protéines (Cdc13p, Est1p et Stn1p, Tableau II). Dans les cellules de mammifère, la majorité de la chromatine télomérique semble, au contraire, être assemblée en nucléosomes. Toutefois, la distance internucléosomique y est plus courte que dans le reste du génome [3]. L'extrémité des télomères pourrait être dépourvue de nucléosomes, mais cela reste actuellement un sujet de controverse. Au moins deux protéines humaines interagissent spécifiquement avec

l'ADN télomérique *in vitro* et *in vivo* [4-6]. Ces protéines sont appelées TRF1 et TRF2 pour TTAGGG *repeat factor* 1 et 2. Les séquences de leurs domaines de fixation à l'ADN sont homologues entre elles et définissent un motif protéique appelé *telobox* qui est apparenté aux répétitions de type « Myb » [4, 7]. Le motif *telobox* est retrouvé dans la protéine Taz1p, qui interagit avec les répétitions télomériques chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* [8], ainsi que dans d'autres protéines interagissant avec des séquences d'ADN de type télomérique chez d'autres organismes [4]. Il est à noter que la séquence du domaine d'interaction à l'ADN de Rap1p n'est pas significativement homologue des séquences *telobox*. Toutefois, sa structure tridimensionnelle présente des similitudes avec celle des motifs « Myb » [9].

Fonctions des télomères

La perte d'un télomère fonctionnel à l'extrémité d'un chromosome est détectée par les systèmes de surveillance des dommages de l'ADN [10]. La réparation de cette extrémité peut s'accompagner de remaniements plus ou moins importants des chromosomes: translocations, fusions, inversions, délétions, amplifications et circularisations. L'absence de réparation peut entraîner un arrêt transitoire du cycle cellulaire et la mort des cellules. En effet, le chromosome non réparé est instable et est souvent perdu dans les cellules survivantes. Les télomères protègent donc les extrémités de chromosome contre les systèmes de dégradation, de surveillance et de réparation des cassures de la double hélice. Outre ces fonctions de protection chromosomique, les télomères forment de véritables compartiments fonctionnels dans le noyau, probablement en s'associant entre eux et/ou avec d'autres structures nucléaires, comme les enveloppes et la matrice [11]. Ces compartiments télomériques peuvent, par exemple, modifier la programmation transcriptionnelle de l'ensemble du noyau en séquestrant certains facteurs de transcription dans un volume réduit du nucléoplasme [12, 13]. Pendant la première division méiotique, le regroupement des extrémités de chromosomes à un pôle

Tableau I

EXEMPLES DE SÉQUENCES TÉLOMÉRIQUES

Organisme	Motif répété
Répétitions simples	
Vertébrés	
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG
<i>Mus musculus</i>	TTAGGG
Insectes	
<i>Bombyx mori</i>	TTAGG
Flagellés	
<i>Trypanosoma brucei</i>	TTAGGG
Plantes	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TTTAGGG
<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
Nématodes	
<i>Ascaris</i>	TTAGGC
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TTAGGC
Ciliés	
<i>Tetrahymena thermophila</i>	TTGGGG
<i>Euplotes crassus</i>	TTTTGGGG
Champignons	
<i>Neurospora</i>	TTAGGG
<i>Candida albicans</i>	ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ACGGCTTTGATTAGGTATGTGGTGT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T(G) ₂₋₃ (TG) ₁₋₆
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTAC(A)G ₂₋₅
Rétroposons	
Insectes	
<i>Drosophila melanogaster</i>	HeT-A (~ 6-kb) TART (~ 10-kb)

Tableau II
FACTEURS MODIFIANT LA TAILLE DES TÉLOMÈRES
CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET LES FACTEURS APPARENTÉS CONNUS CHEZ L'HOMME

Nom	Propriété ou fonction	Facteur humain apparenté	Références
Rap1p Cdc13p Est1p	affinité pour les séquences TG ₁₋₃ double brin affinité pour les séquences TG ₁₋₃ simple brin affinité pour l'extrémité 3' des séquences TG ₁₋₃	TRF1, TRF2 ? ?	[4-6] [18] [7, 16] ^a
Rif1p/Rif2p Sir3p/Sir4p	interaction avec Rap1p interaction avec Rap1p	? ?	[7, 16] ^a [7, 16] ^a
Stn1p Hdf1p-Hdf2p Tel1p	interaction avec Cdc13p complexe fixant les extrémités d'ADN domaine PI-kinase	? KUp70-KUp86 ATM, DNA-PK _{cs}	[19] [7] ^a [7, 16] ^a
<i>TLC1</i> Est2p Est3p Pif1p Kem1p	ARN de la télomérase sous-unité catalytique de la télomérase sous-unité de la télomérase ? hélicase nucléase spécifique des quatuors de guanine	h-TR1 h-EST2 ? ? ?	[43, 44] [17, 19] [16] ^a [45] [46]
Cdc17p Cdc44p	ADN polymérase sous-unité du facteur C de réplication	pol α hRFCp140	[47] [47]
Rad52p Hpr1p	recombinaison recombinaison	h-RAD52 ?	[23] [15]
Tel2p	fonction inconnue	?	[16] ^a

^a: les références aux articles originaux sont données dans la (ou les) revue(s).

du noyau (stade bouquet) serait impliqué dans la reconnaissance des chromosomes homologues.

Dégradation et élongation des télomères

La réplication des extrémités d'une molécule d'ADN par les mécanismes conventionnels est incomplète, entraînant une dégradation progressive des répétitions télomériques (*figure 1A*) [14]. Les répétitions télomériques pourraient, en outre, être éliminées par des échanges intra-chromatidiens (*figure 1A*) [15]. Les télomères doivent donc offrir un ou plusieurs mécanisme(s) capable(s) de compenser la dégradation des extrémités de chromosomes.

Chez la plupart des eucaryotes, la dégradation des extrémités est corrigée par une transcriptase inverse particulière, la télomérase [16]. Cette enzyme utilise une matrice ARN pour ajouter *de novo* des répétitions télomériques à l'extrémité 3' de la

molécule d'ADN (*figure 1B*). La séquence d'Est2p (*ever shorter telomere*), qui constitue probablement la sous-unité catalytique de l'enzyme, présente de fortes similitudes entre ciliés, levure et mammifères [17, 19]. Cette protéine possède également des domaines conservés avec les transcriptases inverses de rétrovirus et de rétrotransposons.

L'élongation des télomères dépend aussi d'autres protéines qui pourraient contrôler l'activité de la télomérase [20, 21]. Deux de ces facteurs, les protéines Cdc13p et Est1p de *S. cerevisiae*, sont associés à l'extension simple-brin 3' terminale de l'ADN télomérique (*Tableau II*). Il est possible que ces facteurs règlent l'activité de l'enzyme en facilitant son accès au télomère, en recrutant directement la sous-unité catalytique, ou en modifiant le déplacement de l'enzyme lors de l'élongation des répétitions télomériques.

Chez certains micro-organismes, l'absence de télomérase fonctionnelle n'a aucun effet immédiat sur la

viabilité des cellules mais provoque un raccourcissement progressif des télomères. Après quelques dizaines de générations, la plupart des cellules cessent de se diviser, un phénomène appelé sénescence [18, 22, 23]. La sénescence des cellules de micro-organismes dépend donc de la perte progressive des télomères. La longueur minimale des télomères suffisante pour éviter l'arrêt de la division cellulaire est inconnue. Elle peut correspondre à la taille moyenne des télomères des cellules qui cessent de se diviser ou bien à celle d'un seul télomère particulièrement raccourci. Curieusement, des cellules de levure dépourvues de télomérase peuvent se diviser pendant plusieurs centaines de générations et maintenir leurs télomères [23]. La survie de ces cellules dépend du gène *RAD52*, dont le produit est nécessaire à la plupart des voies de recombinaison homologue. L'élongation des séquences télomériques est donc vraisemblablement le produit d'échanges non réciproques entre répétitions télomé-

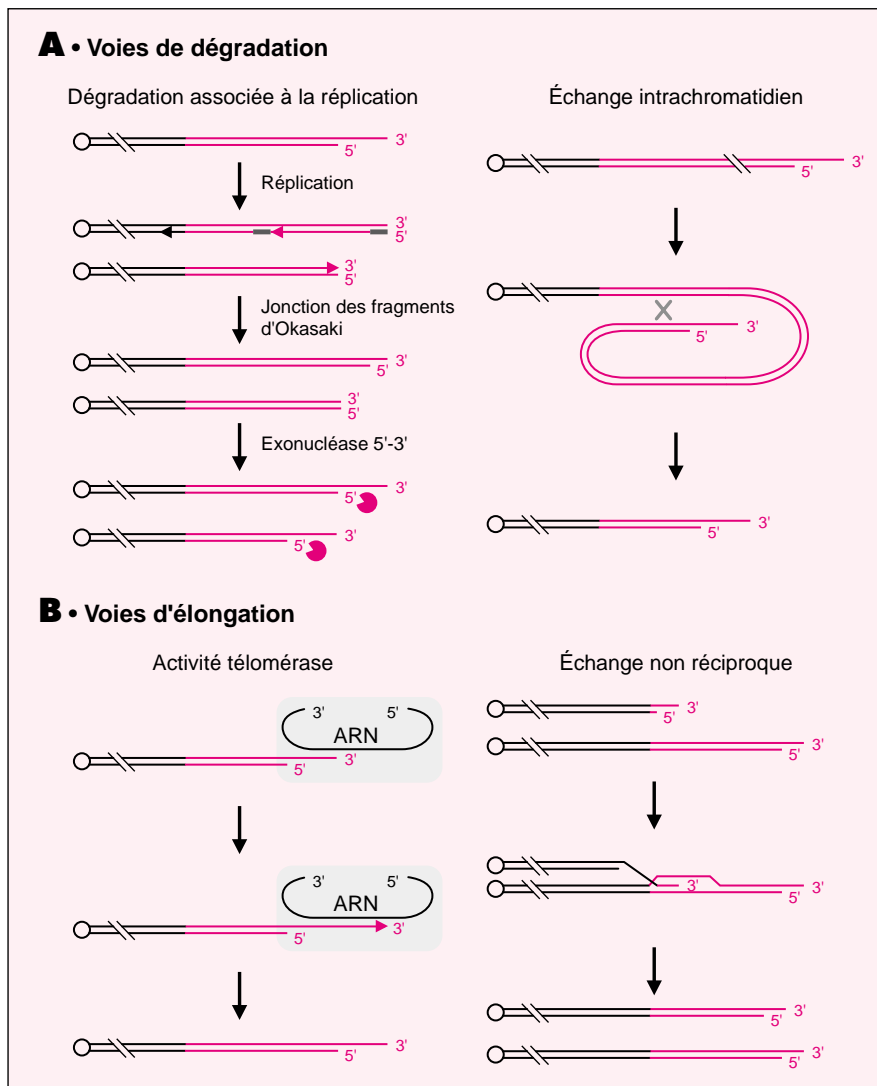


Figure 1. **Voies de dégradation et d'élongation des télomères.** Les répétitions télomériques sont représentées en rouge. **A.** La réplication conventionnelle d'une molécule d'ADN linéaire est incomplète: la synthèse du brin discontinu nécessite une amorce ARN de 8 à 12 nucléotides, dont la dégradation laisse une extension 3' simple-brin sur l'une des deux molécules filles. La formation d'une extrémité simple-brin de la même taille sur tous les télomères par une activité exonucléase 5'-3' amplifie la perte de répétitions télomériques associée à la réplication. En effet, la molécule fille répliquée par synthèse discontinue conserve la taille initiale de la molécule mère et la molécule fille répliquée par synthèse continue est plus courte de la taille de l'extension simple brin. Sur l'ensemble des télomères d'une population de cellules présentant une extension simple-brin de N nucléotides, la réplication implique donc une dégradation moyenne des extrémités de N/2 paires de base à chaque génération [14]. Enfin, un événement de recombinaison intramoléculaire entre deux répétitions télomériques peut brutalement raccourcir un télomère, indiquant que la dégradation d'un télomère n'est pas toujours progressive [15]. **B.** Deux voies d'élongation des télomères ont été mises en évidence: l'activité télomérase qui utilise un ARN comme matrice pour la synthèse de répétitions télomériques sur l'extrémité 3' d'un télomère, et la recombinaison homologue, par un échange non-réciproque entre deux télomères.

riques et/ou régions subtélomériques (figure 1B). Ainsi, la conversion apparaît être une voie alternative à l'activité télomérase pour le maintien des télomères chez la levure. On peut aussi imaginer que d'autres polymérases, comme des transcriptases inverses endogènes, puissent se substituer à la télomérase aux extrémités de chromosomes. Cette hypothèse est suggérée par la possibilité pour la transcriptase inverse du virus VIH-1 de synthétiser de manière continue des répétitions d'ADN à partir de motifs spécifiques portés par une matrice ARN ou ADN, une activité semblable à celle de la télomérase [24]. Toutefois, l'existence de cette voie alternative n'a pour l'instant pas été mise en évidence *in vivo*.

La régulation de la taille des télomères

La taille d'un télomère est hétérogène au sein d'une population de cellules. Chez *S. cerevisiae*, la taille d'un télomère varie de quelques dizaines de paires de bases autour d'une valeur moyenne constante. Cette taille moyenne résulte d'un équilibre dynamique entre élongation et dégradation et peut varier entre différentes souches d'une même espèce. Elle est sous le contrôle de nombreux gènes (Tableau II) et apparaît indépendante des conditions de croissance.

Chez la levure, la taille d'un télomère est réglée par les molécules Rap1p qui lui sont associées [25]. Récemment, il a été montré que c'est le nombre de molécules Rap1p assemblées sur un télomère qui est maintenu constant [26], suggérant une régulation de la taille des télomères par un mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par Rap1p. Un télomère fixé par un nombre seuil de molécules Rap1p serait dans un état bloquant son élongation par la télomérase (figure 2). Lorsqu'une dégradation de ce télomère provoque la perte d'un (ou plusieurs) site(s) de fixation pour Rap1p, l'état du télomère serait modifié pour permettre son élongation par la télomérase. L'élongation du télomère rétablissant le(s) site(s) Rap1p manquant(s), le télomère reprendrait son état initial réprimant l'élongation.

Une perte de fonction de Taz1p chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* [8]

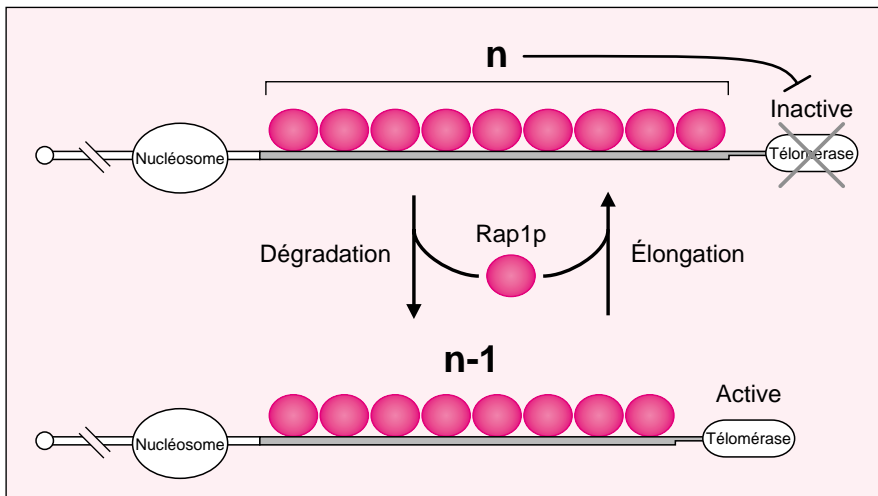


Figure 2. **Régulation de la taille des télomères chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.** Un télomère (en gris) fixé par un nombre seuil (n) de molécules Rap1p (en rouge) est dans un état bloquant son élongation par la télomérase [26]. Lorsqu'une dégradation de ce télomère provoque la perte d'un (ou plusieurs) site(s) de fixation pour Rap1p, l'état du télomère est modifié et permet alors son élongation par la télomérase. L'élongation du télomère rétablit le(s) site(s) Rap1p manquant(s) et le télomère reprend son état initial réprimant l'élongation.

et de TRF1 dans des cellules humaines [27] entraîne une augmentation de la taille des télomères. Le principe de rétrocontrôle négatif par des protéines affines de la partie double brin de l'ADN télomérique apparaît donc être préservé au cours de l'évolution, malgré l'absence de conservation des séquences primaires de Rap1p et des protéines à *telobox*.

Dynamique ontogénétique des télomères humains

Dans la plupart des cellules somatiques humaines, les répétitions télomériques sont progressivement perdues au cours des divisions cellulaires tandis qu'elles sont préservées dans les cellules germinales [28]. Cette dynamique peut s'expliquer en partie par l'absence d'activité télomérase dans la majorité des tissus somatiques et par sa présence lors des premiers stades de la gamétogenèse [29]. L'activité télomérase n'est plus détectée dans des gamètes mûres et semble être réactivée très tôt au cours de l'embryogenèse, avant le stade blastocyste. Elle est conservée au cours de la vie intra-utérine dans de nombreux tissus, à l'exception du tissu nerveux, et est massivement perdue peu après

la naissance dans la plupart des tissus somatiques.

Cependant, dans certains tissus à renouvellement cellulaire rapide, l'extinction somatique de l'activité télomérase n'apparaît pas complète. C'est notamment le cas dans les cellules de la moelle osseuse et les leucocytes circulants [30]. De manière remarquable, la présence de télomérase dans ces cellules ne semble pas compenser l'érosion des télomères au cours des divisions. Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent expliquer ce phénomène. (1) L'activité télomérase pourrait être restreinte à des cellules souches minoritaires possédant des télomères stables et proliférant sans limite. Cependant, de nombreuses observations indiquent que les cellules souches hématopoïétiques ont un potentiel réplicatif élevé mais limité [28]. (2) La structure de la chromatine télomérique de ces cellules pourrait être particulièrement permissive à l'action de nucléases et/ou réfractaire à l'élongation par la télomérase. (3) La télomérase pourrait servir à d'autres fonctions que l'élongation des télomères. (4) L'activation de l'enzyme pourrait être secondaire à un état particulier de prolifération et/ou de différenciation sans réelle justification fonctionnelle.

Les télomères, mémoire de l'histoire répliquative

In vitro, les cellules somatiques humaines mises en culture arrêtent de se diviser au bout de quelques dizaines de générations. On dit qu'elles entrent en sénescence cellulaire ou répliquative. La taille moyenne de leurs télomères a alors significativement diminué. Il est donc possible que la taille des télomères constitue une « horloge mitochondrique » limitant la capacité proliférative d'une cellule lorsque certaines fonctions télomériques sont perdues [28]. Par conséquent, l'absence de télomérase dans les cellules somatiques constituerait un système de contrôle de la prolifération cellulaire. En accord avec cette hypothèse, il existe une très bonne corrélation entre la taille des télomères de différents types de cellule primaire et leur capacité proliférative *in vitro*. Cependant, une seule étude publiée à ce jour a tenté d'établir un lien causal direct entre érosion télomérique et sénescence dans les cellules humaines [31].

L'érosion progressive des télomères au cours des divisions peut être utilisée comme un outil d'évaluation de l'histoire répliquative des cellules *in vivo*: une diminution de la taille des télomères dans une population cellulaire indiquerait une expansion clonale de ces cellules ainsi qu'une diminution de leurs capacités répliquatives. Ainsi, comme la taille des télomères des lymphocytes naïfs est significativement plus longue que celle des lymphocytes à mémoire, la différenciation des cellules mémoires pourrait s'effectuer à partir d'une prolifération des précurseurs naïfs [32]. Par ailleurs, chez des individus porteurs du virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH), la longueur des télomères des cellules T CD8⁺ diminue au cours du temps alors qu'elle est maintenue à une taille constante dans les cellules T CD4⁺, suggérant que les cellules T CD4⁺ ne se renouvellent pas de manière importante lors de l'infection, contrairement aux cellules T CD8⁺ [33]. Si la reconstitution du système immunitaire dépend des capacités répliquatives résiduelles des cellules T, l'analyse de la taille des télomères pourra permettre de

mieux orienter les traitements destinés à augmenter le nombre de cellules immunitaires chez des individus traités contre la prolifération du VIH. Enfin, les télomères des cellules endothéliales des artères iliaques sont plus courts que les télomères de cellules d'autres artères. Les capacités répliquatives de ces cellules pourraient donc être très rapidement épuisées dans les artères iliaques et cela pourrait contribuer à la formation de plaques d'athérosclérose. L'étude des télomères permettrait donc un diagnostic de l'état des artères [34].

■ Vieillesse prématurée

L'érosion télomérique dans les cellules somatiques est plus rapide que la « normale » dans des cellules de patients atteints du syndrome de Werner [35], d'ataxie-télangiectasie (*m/s n° 10, vol. 12, p. 1170*) [36] ou de trisomie 21 [26]. En accord avec l'hypothèse d'horloge mitotique (cf. § précédent), la perte rapide des télomères chez ces malades pourrait accélérer les processus de sénescence cellulaire et donc, vraisemblablement, de vieillissement des tissus. Les télomères de cellules d'individus atteints de trisomie 21 et de la progéria d'Hutchinson-Gilford atteignent d'ailleurs à des âges très précoces, une taille susceptible d'entraîner une sénescence des cellules (*figure 3A*).

Toutefois, des fibroblastes de malades atteints du syndrome de Werner arrêtent de se diviser alors que leurs télomères ont une taille supérieure à celle des télomères de fibroblastes sénescents provenant d'individus normaux (*figure 3B*) [35]. Cette observation peut suggérer que des mécanismes autres que la taille des télomères règlent l'entrée en sénescence des fibroblastes de malades atteints du syndrome de Werner. Cependant, il peut également être proposé que la taille critique des télomères provoquant l'entrée en sénescence est augmentée dans les cellules des malades. En effet, dans les cellules malades, un nombre accru de répétitions d'ADN télomérique pourrait être nécessaire pour assembler un télomère capable d'assurer une protection efficace contre l'entrée en sénescence. En accord avec cette hypothèse, le gène impliqué dans le syndrome de Werner détermine la synthèse d'une hélicase impliquée dans le métabolisme de l'ADN [37] et donc susceptible d'agir sur la structure de la chromatine télomérique.

■ Télomères et cancer

La dynamique des télomères dans les cellules somatiques humaines semble participer à l'oncogenèse de multiples façons. D'abord comme méca-

nisme antiprolifératif, en limitant le nombre de divisions des cellules (processus de sénescence, *figure 4*). Une perte de ce contrôle, et donc la persistance des divisions, entraîne une perte inexorable de l'ADN télomérique et des fonctions qui lui sont associées. Ce processus apparaît avoir deux types de conséquence pour la cellule: (1) une instabilité importante de ses chromosomes [38]; (2) une modification de l'expression génétique pouvant provenir de réarrangements génomiques mais aussi de modifications de l'architecture du noyau [13]. Comme la sénescence, ces désordres génétiques peuvent limiter la prolifération cellulaire. *In vitro*, on dit que les cellules sont en « crise » (*figure 4*). Cependant, l'accumulation de mutations et de pertes d'hétérozygotie peut également contribuer à l'augmentation du pouvoir oncogène de ces mêmes cellules. Cette prolifération postsénescence limitée avec perte télomérique (processus de préimmortalisation, *figure 4*) pourrait donc intervenir très précocement dans le développement de certains cancers. Par exemple, la régénération cellulaire massive observée lors d'hépatite chronique active ou de cirrhose, et qui peut précéder l'apparition d'hépatocarcinome, s'accompagne d'une diminution de la taille des télomères [39].

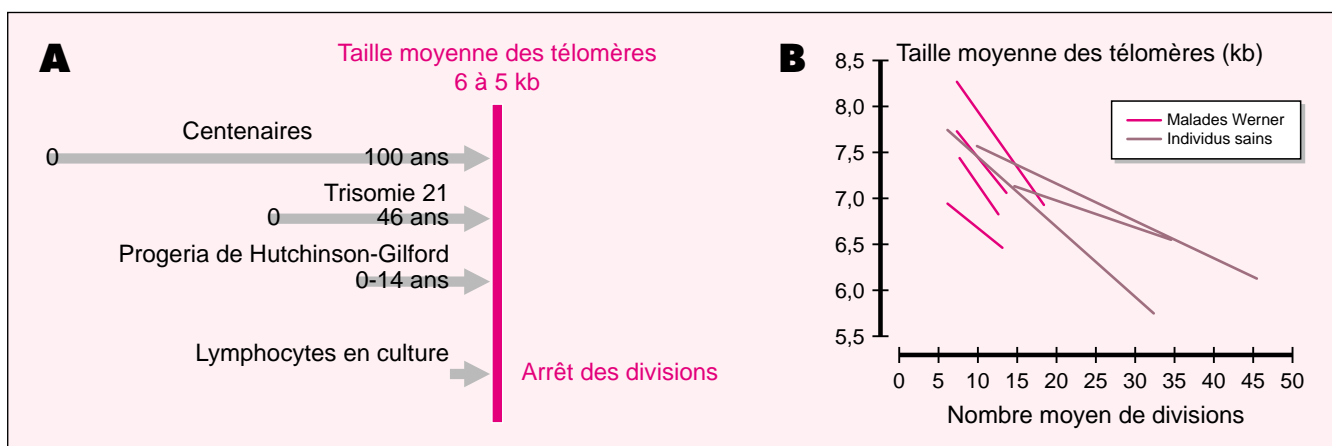


Figure 3. **Vieillesse prématurée.** **A.** Les télomères de cellules de personnes atteintes de trisomie 21 ou de progéria de Hutchinson Gilford mesurent environ 5 kb à la fin de leur vie (symbolisée par la flèche grise). Cette taille limite (barre rouge verticale) correspond à celle des télomères de personnes centenaires ainsi qu'à celle des télomères de lymphocytes en culture entrant en sénescence. **B.** Déclin de la taille des télomères au cours des divisions de fibroblastes de peau prélevés sur des malades Werner (rouge) ou des individus sains (noir) [35]. Les cellules de malades Werner voient leur potentiel répliquatif épuisé lorsque leurs télomères atteignent une taille supérieure à celle des télomères de fibroblastes normaux entrant en sénescence.

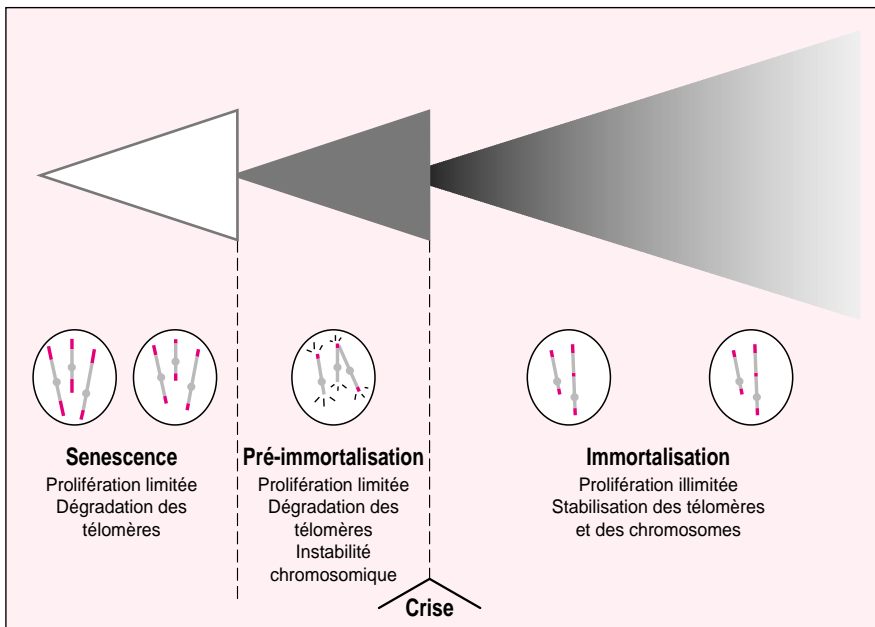


Figure 4. **Dynamique des télomères et cancer.** Cette figure présente un modèle d'expansion clonale aboutissant à des cellules en prolifération illimitée. Un exemple de trois chromosomes avec leurs télomères en rouge, est présenté en regard des différentes étapes d'expansion cellulaire. Les cellules somatiques ont un pouvoir répliatif limité (triangle blanc). Au cours des divisions, les télomères raccourcissent (figure 1A) jusqu'à atteindre une taille critique. Les cellules entrent alors en sénescence. Cependant, des cellules transformées sont capables de poursuivre leurs divisions (triangle noir). Leurs télomères continuent à raccourcir. La forte instabilité chromosomique de ces cellules préimmortelles pourrait être induite par des défauts télomériques [38]. Cette expansion cellulaire pourrait donc contribuer à la cancérogenèse en activant certains oncogènes ou en inactivant des gènes suppresseurs de tumeur. Leur capacité répliatif semble cependant limitée (la « crise »). Les cellules immortelles (triangle à dégradé de gris) dérivent de quelques cellules préimmortelles qui ont stabilisé leurs télomères par l'activation d'un processus d'élongation, généralement la télomérase. Ces cellules pourraient participer à la croissance illimitée des cancers. In vivo, les télomères des cellules tumorales sont souvent plus courts que ceux des tissus sains correspondants, suggérant qu'ils ont raccourci avant d'être stabilisés.

La prolongation de la prolifération des cellules préimmortelles semble nécessiter la sauvegarde des fonctions télomériques. Effectivement, l'immortalisation *in vitro* des cellules humaines s'accompagne, dans la plupart des cas, de l'arrêt de la diminution de la taille des télomères et de la stabilisation du caryotype [38]. Dans de nombreuses lignées cellulaires, le maintien des fonctions télomériques est associée à la réactivation de la télomérase [38]. Il est donc très intéressant que dans plus de 90 % des tumeurs, toutes origines confondues, cette enzyme soit active, alors qu'elle n'est pas détectable dans les tissus sains correspondants [29]. La réactivation de la télomérase pourrait donc contribuer à la prolifération à long terme des cellules dans les

tumeurs cancéreuses. D'ailleurs, dans certains cas, le niveau d'expression de l'enzyme est corrélé à la sévérité de la maladie [40]. Il semble que des variations d'expression de la sous-unité catalytique de l'enzyme (h-ETS2, *Tableau II*) soient principalement responsables de l'inactivation de l'enzyme dans les cellules somatiques et de sa réactivation lors de l'immortalisation cellulaire et dans les cancers [18, 19]. Cependant, il faut souligner que cette réactivation de la télomérase n'est pas systématique. Par exemple, dans certaines lignées immortalisées à longs télomères [41] et dans 50 % des rétinoblastomes [42], aucune activité télomérase n'est détectée. Des échanges non réciproques entre télomères (*figure 1B*) ou une activation

d'autres transcriptases inverses pourraient constituer des voies alternatives à la télomérase pour le maintien des télomères dans ces cellules.

Applications en oncologie clinique

De nombreux programmes sont actuellement développés afin d'utiliser les connaissances acquises sur les télomères et la télomérase en oncologie clinique. D'une part, il est proposé d'employer la détection de l'activité de l'enzyme pour des dépistages précoces, des suivis pronostiques et thérapeutiques des cancers (*m/s n° 3, vol. 12, p. 413*). D'autre part, l'utilisation de substances bloquant l'activité télomérase pourrait arrêter la progression des tumeurs.

Toutefois, l'existence d'une ou de plusieurs voie(s) alternative(s) à la télomérase suggère que des traitements antitélomérase puissent sélectionner des cellules à prolifération illimitée mais dépourvues de télomérase. De plus, un traitement favorisant la dégradation des télomères pourrait compromettre la stabilité des chromosomes et induire de nouvelles altérations génétiques, potentialisant l'agressivité de la tumeur. Enfin, l'existence d'activité télomérase dans certaines cellules somatiques saines (cf. § « dynamique ontogénétique des télomères humains ») souligne l'importance des connaissances à acquérir afin d'évaluer les risques liés à l'utilisation de substances bloquant l'activité de cette enzyme. Une meilleure connaissance des constituants télomériques, de leurs fonctions respectives et des multiples voies de maintien des télomères paraît donc indispensable au développement en oncologie clinique d'approches thérapeutiques ciblant les télomères.

Vers une vision intégrée des télomères

Chez la levure, de nombreuses protéines impliquées dans les contrôles généraux du cycle cellulaire et du métabolisme de l'ADN jouent un rôle au niveau des télomères (*Tableau II*). Il s'agit notamment des protéines de la famille Tel1p/ATM impliquées dans la régulation de la taille des télomères, la surveillance et la répa-

ration des dommages de l'ADN et du complexe Hdf/KU, impliquées dans la régulation de la taille des télomères et la réparation des cassures double-brin.

Le rôle des protéines de surveillance et de réparation de l'ADN au niveau des télomères semble paradoxal puisque les télomères devraient protéger les extrémités de chromosomes contre leurs actions. La réponse à ce paradoxe réside peut-être dans la capacité de ces protéines de modifier la chromatine télomérique tout en neutralisant localement leur fonction de contrôle de l'ADN endommagé. Les ligands de l'ADN télomérique, comme Rap1p, Cdc13p et Est1p chez la levure et TRF1 et TRF2 chez les mammifères, pourraient jouer un rôle prépondérant dans ces interactions ■

Remerciements

Nous remercions vivement V. Alvaro et A. Vincent-Salomon, ainsi que les membres de notre équipe, G. Fourel, L. Maillat, C. Boscheron et C.E. Koering, pour leurs commentaires sur ce manuscrit. Nos recherches sont soutenues par l'Association pour la Recherche contre le Cancer, l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose, la Ligue Contre le Cancer et la Région Rhône-Alpes.

RÉFÉRENCES

1. Sen D, Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 1988; 334: 364-6.
2. Gilson E, Gasser SM. Repressor Activator Protein 1 and its ligands: organising chromatin domains. *Nucleic Acids Mol Biol* 1995; 9: 308-27.
3. Lejnine S, Makarov VL, Langmore JP. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2393-7.
4. Bilaud T, Koering CE, Binet-Brasselet E, Ancelin K, Pollice A, Gasser SM, Gilson E. The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1294-303.
5. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T. A human telomeric protein. *Science* 1995; 270: 1663-7.
6. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nature Genet* 1997 (in press).
7. Brun C, Marcand S, Gilson E. Proteins that bind to double-stranded regions of telomeric DNA. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 317-24.
8. Promisel Cooper J, Nimmo E, Allshire R, Cech T. Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* 1997; 385: 744-7.
9. König P, Giraldo R, Chapman L, Rhodes D. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. *Cell* 1996; 85: 125-36.
10. Sandell LL, Zakian VA. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 1993; 75: 729-39.
11. Gilson E, Laroche T, Gasser S. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 128-34.
12. Marcand S, Buck SW, Moretti P, Gilson E, Shore D. Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap1 protein. *Genes Dev* 1996; 10: 1297-309.
13. Maillat L, Boscheron C, Gotta M, Marcand S, Gilson E, Gasser SM. Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir-protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes Dev* 1996; 10: 1796-811.
14. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; 88: 657-66.
15. Li B, Lustig AJ. A novel mechanism for telomere size control in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 1996; 10: 1310-26.
16. Lustig A. The identification of telomerase subunits: catalysing telomere research. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 299-302.
17. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lunblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997; 276: 561-7.
18. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunits homologs from fission yeast and human. *Science* 1977; 277: 955-7.
19. Meyerson M, Counter CM, Eaton EM, Ellisen LW, Steiner P, Dickinson Cadle S, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. *hEST2*, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; 90: 785-95.
20. Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 1996; 274: 249-52.
21. Grandin N, Reed SI, Charbonneau M. Stn1, a new *S. cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* 1997; 11: 512-27.
22. Yu GL, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn EH. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 1990; 344: 126-31.
23. Lundblad V, Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est-1*-senescence. *Cell* 1993; 73: 347-60.
24. Ricchetti M, Buc H. A reiterative mode of DNA synthesis adopted by HIV-1 reverse transcriptase after a misincorporation. *Biochemistry* 1996; 35: 14970-83.
25. Lustig AJ, Kurtz S, Shore D. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* 1990; 250: 549-53.
26. Marcand S, Gilson E, Shore D. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 1997; 275: 986-90.
27. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997; 385: 740-3.
28. Harley CB. Telomeres and aging. In: Blackburn EH, Greider CW, eds. *Telomeres*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
29. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific associations of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-4.
30. Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9082-6.
31. Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek A, Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *EMBO J* 1996; 15: 1734-41.
32. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11091-4.
33. Wolthers KC, Wisman CBA, Otto SA, de Roda Husman AM, Shaft N, de Wolf F, Goudsmit J, Coutinho RA, van der Zee AGJ, Meyaard L, Miedema F. T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4⁺ T cell turnover. *Science* 1996; 274: 1543-7.
34. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11190-4.
35. Schulz VP, Zakian VA, Ogburn CE, McKay J, Jarzabowicz AA, Edland SD, Martin GM. Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum Genet* 1996; 97: 750-4.
36. Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, Taylor MR. Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nature Genet* 1996; 13: 350-3.
37. Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272: 258-62.
38. Counter CM, Avilion AA, Le Feuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.

RÉFÉRENCES

39. Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 56-62.
40. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med* 1996; 1: 249-55.
41. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Redel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995; 14: 4240-8.
42. Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL, Bacchetti S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1152-7.
43. Singer MS, Gottschling DE. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 1994; 266: 404-9.
44. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.
45. Schulz VP, Zakian VA. The *Saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* 1994; 76: 145-55.
46. Liu Z, Lee A, Gilbert W. Gene disruption of a G4-DNA-dependent nuclease in yeast leads to cellular senescence and telomere shortening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6002-6.
47. Adams AK, Holm C. Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4614-20.

Summary

Telomeres, normal and pathological aspects

Telomeres, the nucleoproteic complexes at both ends of eukaryotic chromosomes, are multifunctional structures essential to genome integrity. They are required to protect the extremity from degradation and fusion and they allow the complete replication of the chromosomal DNA molecule. Modifications of their structures may be directly involved in the control of cell proliferation, and consequently could play a role in oncogenesis. From yeast to human, different experimental approaches have allowed a better understanding of telomeric components and functions, and should open up new perspectives for their use as a clinical target.

Institut Pasteur