



Identification et caractérisation de ligands des quadruplexes de guanines: cibler les télomères et/ou la télomérase?

Anne de Cian

► To cite this version:

Anne de Cian. Identification et caractérisation de ligands des quadruplexes de guanines: cibler les télomères et/ou la télomérase?. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT: . tel-00440832

HAL Id: tel-00440832

<https://theses.hal.science/tel-00440832>

Submitted on 11 Dec 2009

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS VI
U.F.R. DES SCIENCES DE LA VIE
ÉCOLE DOCTORALE INTER///BIO
Spécialité : Biochimie et Biophysique moléculaire

Présentée par

Anne DE CIAN

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

**Identification et caractérisation de ligands
des quadruplexes de guanines :
Cibler les télomères et/ou la télomérase ?**

Thèse dirigée par le Dr. Jean-Louis MERGNY
Soutenue le 13 décembre 2007 devant le jury composé de :

Pr. Solange Lavielle	Université Pierre et Marie Curie, Paris	Présidente
Dr. Geneviève Pratviel	CNRS, Toulouse	Rapporteur
Dr. Marie-Josèphe Giraud-Panis	École Normale Supérieure, Lyon	Rapporteur
Pr. Stephen Neidle	School of Pharmacy, Londres	Examineur
Dr. Marie-Paule Teulade-Fichou	Institut Curie, Orsay	Examineur
Dr. Jean-Louis Mergny	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier vivement les Docteurs Geneviève Pratviel et Marie-Josèphe Giraud-Panis d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Docteur Marie-Paule Teulade-Fichou et les Professeurs Stephen Neidle et Solange Lavielle d'avoir accepté d'être membres du jury et d'évaluer ce travail.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'Ecole Doctorale INTER///BIO, le CIES Jussieu, le consortium "Mol. Cancer Med.", mes parents et la bourse Nicolas Schmitt d'avoir financé cette thèse.

Je remercie le Docteur Carine Giovannangeli, le Professeur Jian-Sheng Sun et le Docteur Jean-Louis Mergny pour m'avoir donné la chance de travailler dans leur unité.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement au Docteur Jean-Louis Mergny pour avoir dirigé et encadré ce travail de thèse. Merci très sincèrement pour ta disponibilité, tes conseils, ton écoute et ton soutien, pour la liberté d'action (et d'expression !) et la confiance que tu m'as accordées, et pour les opportunités qui m'ont été données au cours de ces quatre années de thèse et DEA...je n'aurais pu espérer mieux !

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans les chimistes qui ont synthétisé et mis à disposition les molécules présentées dans ce manuscrit. Je tiens à adresser toute ma gratitude au Docteur Marie-Paule Teulade-Fichou et à toute son équipe, les Docteurs Markus Kaiser et Candide Hounsou, Mademoiselle Hélène Bertrand et le Docteur David Monchaud que je tiens à remercier plus spécifiquement pour sa disponibilité et les discussions scientifiques et moins scientifiques que nous avons pu partager. Je remercie également le Professeur Kazuo Shin-ya pour nous avoir permis d'accéder au composé présenté comme référence dans ce manuscrit, la télomestatine. Je tiens à remercier vivement le Docteur Joachim Lingner de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Lausanne et de m'avoir permis d'accéder à son matériel, dans le cadre du consortium européen "Mol. Cancer Med.". Je souhaite adresser toute ma reconnaissance au Docteur Gaël Cristofari et à Patrick Reichenbach pour leur accueil et leur contribution à ce travail. Je remercie également le Professeur Philippe Grellier, et particulièrement Elisabeth Mouray dans son équipe, sans qui la partie concernant Plasmodium falciparum n'aurait été possible.

Ce travail n'aurait pu être réalisé dans d'aussi bonnes conditions sans le soutien, les conseils et l'attention que m'ont portés les membres de notre équipe présents et passés : je remercie chaleureusement le Docteur Laurent Lacroix pour sa disponibilité, sa précision et son esprit très critique ; le Docteur Patrizia Alberti, pour sa générosité, son enthousiasme, son délicieux accent, ses talents culinaires (j'attends encore les Pizzoccheri !), son soutien et j'en oublie certainement... ; le Docteur Lionel Guittat, pour m'avoir initié au "laboratoire" et aux télomères et sans qui ce travail n'aurait certainement pas pu être réalisé ; le récent Docteur Samir Amrane pour sa sérénité et sa gentillesse au sein de notre immuable "Insectarium" ; Monsieur (très futur Docteur) Julien Gros pour avoir partagé avec moi un bureau et un bout de cette aventure avec ses hauts et ses bas, pour ses tocs et ses coups de gueule, pour son écoute et sa gentillesse...Les membres plus récents de cette équipe qui m'auront supporté et conseillé au cours de la rédaction de ce manuscrit : le Professeur Jean-François Riou, le Docteur Sébastien

Lyonnais et Mademoiselle Aurore Guédin, à qui j'espère avoir réussi à transmettre quelques éléments de survie dans le monde merveilleux des G-quadruplexes ! Enfin, une mention très spéciale pour le Docteur Erika Brunet, presque membre actif de l'équipe (de par son statut d'Insecte !) pour ces bons moments passés ensemble, au labo et ailleurs, et qui m'a bien manqué ces deux dernières années tant pour son esprit scientifique et son dynamisme que pour les bibines partagées le vendredi soir...(ou le jeudi...ou...) !

Je remercie sincèrement tous les membres du laboratoire pour leur aide, leur contribution (directe ou indirecte) à ce travail, leur bonne humeur et leurs talents culinaires : un merci tout particulier au très futur Docteur Kahina Oussedik-Ferhi pour son optimisme, sa joie de vivre, ses petites visites dans l'Insectarium et ses macroutes...(j'attends avec impatience le couscous du mois de mai !) ; au Docteur Paola Arimondo pour ses conseils, sa motivation (un exemple à suivre sans aucun doute !), sa recette des pâtes au pesto et ses bons plans ; à ses disciples Pierre Vekhoff et Alexandre Ceccaldi pour avoir mis un peu de "piquant" à notre vie de labo ; au Docteur Loïc Ponger pour ses délires expérimentaux et culinaires ; aux Docteurs Jean-Christophe François, Danièle Praseuth et Anne-Laure Guieysse-Peugeot pour leur enthousiasme durant la fête de la science ; au Professeur Tula Saison-Behmoaras pour m'avoir "boosté" avant mon oral d'Inter///Bio et pour ses si bons loukoums ; au Docteur Christophe Escudé en particulier pour ses succulentes tartes et sa glace à l'avocat ; au Professeur Sacha Boutorine notre photographe officiel ; à Loïc Perrouault (notre Maniatis) pour ses "petits trucs" à lui ; au Docteur Philippe Simon pour avoir cogité sur mes questions de chimie de dernière minute ; à Ludovic Halby pour son bon goût ; à Marion Velten, nouvelle venue, pour son enthousiasme communicatif ; à Gildas Mouta Cardoso pour ses taquineries et ses accras ; au binome Catherine Sénamaud-Beaufort et Géraldine Toutirais pour avoir su apprécier le crémant d'Alsace à sa juste valeur ; à notre très efficace secrétariat (même à la veille des fêtes !) Cathy, Fara et Patricia ; à notre Super bricoleur Bernard Tarrou. Une petite dédicace à nos amis de la Photobio ; merci au Docteur Christine Vever-Bizet pour les fou-rires partagés et au Docteur Stéphanie Bonneau pour ses conseils très "pros", sa bonne humeur et sa gentillesse. Merci aux ex-thésards que j'ai eu la chance de cotoyer durant ces quatre années : Les Michaël, Bénédicte, Maria, Nadia, Carole et Sabrina, et aux thésards et étudiants à qui il reste quelques années à (sur)vivre dans ce labo : Elodie, Fabio, Fatima, Naima, Tiphane, Christine, Sabine, et autres M2 qui auront décidé de rester... bon courage ! Enfin merci à TOUS (membres du labo et "invités") pour les bons moments passés et les réveils difficiles en salle café.

Enfin je remercie très affectueusement toute ma famille et mes amis pour m'avoir soutenu et supporté durant ces quatre années. Merci à JP, Anne, Andréas et Max pour m'avoir supporté et changé les idées jusqu'à très tard le vendredi soir... ; à mes copines de Chimie Paris Steph, Véro, Lise et Sixt pour ne pas m'avoir oublié malgré une communication quelque peu distraite... ; à mes tantes, mon cousin, Christian et Christa d'avoir bravé la foule parisienne pour venir m'écouter. Enfin et surtout je tiens à remercier du fond du cœur mon amie de presque toujours Elodie qui sait pourquoi ; mon chéri pour m'avoir soutenu au jour le jour en partageant les bons et les moins bons moments et pour avoir participé activement au traitement des données de dichroïsme circulaire ; ma sœur pour m'avoir comme toujours montré la voie à suivre et mes parents pour avoir toujours cru en moi et tellement plus. Je leur dédie cette thèse.

Table des matières

<i>Table des matières</i>	2
<i>Table des matières détaillée</i>	4
<i>Table des Illustrations</i>	8
<i>Abréviations</i>	12
 <i>Chapitre I. Introduction</i>	 16
1 <i>Les Quadruplexes de Guanines</i>	16
2 <i>Les Télomères : Rôle, Structure et Maintenance</i>	42
3 <i>Ligands de G-quadruplexes, télomères, télomérase et prolifération cellulaire</i>	64
4 <i>Objectifs de ce travail</i>	79
 <i>Chapitre II. Identification et caractérisation de nouveaux ligands de G-quadruplexes</i>	 84
1 <i>Vers de nouveaux ligands...</i>	84
2 <i>Mesure de l'affinité et de la sélectivité des ligands (Article 1)</i>	85
3 <i>Cibler différents G-quadruplexes par interaction avec les boucles ? (Article 2)</i>	90
4 <i>Mieux s'adapter aux G-quartets... (Article 3)</i>	93
5 <i>Discussion : Chapitre II</i>	100
 <i>Chapitre III. Étude du mécanisme de stabilisation des ligands</i>	 106
1 <i>Introduction</i>	106
2 <i>Cinétiques de G-quadruplexes tétramoléculaires</i>	107
3 <i>Article 4 : "Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation". Nucleic Acids Res. 35 (2007) : 2483-2493.</i>	110
4 <i>Données complémentaires</i>	112
5 <i>Discussion : Chapitre III</i>	114
 <i>Chapitre IV. Inhibition de la télomérase par des ligands de G-quadruplexes</i>	 116
1 <i>Introduction</i>	116
2 <i>Article 5 : "Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanism of action". Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2007) :17347-52.</i>	117
3 <i>Données complémentaires</i>	118
4 <i>Discussion : Chapitre IV</i>	120

Chapitre V. Cibler les télomères du parasite <i>P.falciparum</i> avec des ligands de G-quadruplexes	124
1 Introduction	124
2 Article 6 : “ <i>Plasmodium telomeric sequences : structure, stability and targeting by small compounds</i> ”.	130
3 Données complémentaires	132
4 Discussion : Chapitre V	138
 Chapitre VI. Discussion, conclusions et perspectives	 142
1 Vers de nouveaux ligands des (d’un) G-quadruplexe(s) ...	142
2 ...pour quelles cibles ?	148
3 Paradoxe des ligands de G-quadruplexes comme agents thérapeutiques ?	154
4 Des quadruplexes et des ligands pour d’autres applications ?	154
 Chapitre VII. Matériel et Méthodes	 160
1 Produits	160
2 Spectroscopies	163
3 La dialyse à l’équilibre	177
4 Analyse et purification des acides nucléiques	181
5 Tests d’activité télomérase	185
6 Analyse d’ADN génomique	191
 Liste des publications scientifiques co-signées	 200
Annexe I	202
Article : “ <i>Kinetics of tetramolecular quadruplexes</i> ”. <i>Nucleic Acid Res.</i> 33 (2005) 81-94.	202
Annexe II	204
1 Titration <i>n</i> sites équivalents : Concentration en ligand fixé = C_0	204
2 Titration <i>n</i> sites équivalents : Concentration de molécule possédant <i>n</i> sites fixée = C_0	206
 Bibliographie	 212

Table des matières détaillée

<i>Table des matières</i>	2
<i>Table des matières détaillée</i>	4
<i>Table des Illustrations</i>	8
<i>Abréviations</i>	12
 <i>Chapitre I. Introduction</i>	 16
1 Les Quadruplexes de Guanines	16
1.1 Assemblages moléculaires autour des nucléobases de l'ADN	16
1.2 Caractéristiques des G-quadruplexes	18
1.2.1 Les G-Quartets	18
1.2.2 Structures intra- ou intermoléculaires en G-quadruplexes	18
1.2.3 Méthodes d'étude des G-quadruplexes	21
1.3 Rôles biologiques : arguments en faveur de l'existence des G-quadruplexes in vivo	22
1.3.1 Les séquences riches en blocs de G du génome	23
1.3.2 Protéines reconnaissant les G-quadruplexes	30
1.3.3 Effets cellulaires de courtes séquences riches en blocs de G	36
1.4 Applications pour les nanotechnologies	38
2 Les Télomères : Rôle, Structure et Maintenance	42
2.1 Historique et fonction biologique	42
2.2 Structure	43
2.2.1 ADN télomérique	43
2.2.2 Protéines télomériques	49
3 Ligands de G-quadruplexes, télomères, télomérase et prolifération cellulaire	64
3.1 L'hypothèse télomérique du cancer	64
3.2 Télomérase et G-quadruplexes	65
3.3 Des ligands de G-quadruplexes : affinité et sélectivité	66
3.3.1 Ligands basés sur des interactions d'empilement π - π :	66
3.3.2 Ligands des sillons de G-quadruplexe	74
3.4 Effets cellulaires, conséquences du ciblage de la télomérase et/ou des télomères	75
4 Objectifs de ce travail	79
 <i>Chapitre II. Identification et caractérisation de nouveaux ligands de G-quadruplexes</i>	 84
1 Vers de nouveaux ligands...	84
2 Mesure de l'affinité et de la sélectivité des ligands (Article 1)	85
2.1 Introduction	85
2.2 Article 1 : "Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands". Methods 42 (2007) 183-195.	86

2.3	Données complémentaires : effet de la nature du cation sur la sélectivité de divers ligands de G-quadruplexes vis-à-vis d'un duplexe d'ADN	88
3	<i>Cibler différents G-quadruplexes par interaction avec les boucles ? (Article 2)</i>	90
3.1	Démarche	90
3.2	Article 2 : "Neomycin-capped aromatic platforms : quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition". Org. Biomol. Chem. 4 (2006) : 1049-1057.	91
3.3	Informations complémentaires	92
4	<i>Mieux s'adapter aux G-quartets... (Article 3)</i>	93
4.1	Article 3 : "Highly Efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds". J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) : 1856-1857.	93
4.2	Commentaires sur les informations supplémentaires disponibles en ligne, et résultats complémentaires	94
4.2.1	Compétition par [TG5T] ₄ (Supp. Info S9)	94
4.2.2	Test FRET en présence de K ⁺	96
4.2.3	Titration de 22AG par 2a en présence de K ⁺ (Suppl. Info S8)	96
5	<i>Discussion : Chapitre II</i>	100
 <i>Chapitre III. Étude du mécanisme de stabilisation des ligands</i>		106
1	<i>Introduction</i>	106
2	<i>Cinétiques de G-quadruplexes tétramoléculaires</i>	107
2.1	Association de G-quadruplexes tétramoléculaires	107
2.2	Dissociation de G-quadruplexes tétramoléculaires	108
3	Article 4 : "Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation". Nucleic Acids Res. 35 (2007) : 2483-2493.	110
4	Données complémentaires	112
5	<i>Discussion : Chapitre III</i>	114
 <i>Chapitre IV. Inhibition de la télomérase par des ligands de G-quadruplexes</i>		116
1	<i>Introduction</i>	116
2	Article 5 : "Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanism of action". Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2007) : 17347-52.	117
3	Données complémentaires	118
3.1	Inhibition de la télomérase déterminée par "Telospot"	118
3.2	Inhibition de la télomérase par les dérivés macrocycliques de néomycine	120
4	<i>Discussion : Chapitre IV</i>	120
 <i>Chapitre V. Cibler les télomères du parasite P.falciparum avec des ligands de G-quadruplexes</i>		124
1	<i>Introduction</i>	124
1.1	La Malaria	124
1.2	Les télomères et la télomérase de Plasmodium falciparum	125

1.2.1	ADN télomérique	125
1.2.2	Régions sub-télomériques	125
1.2.3	Protéines télomériques	126
1.3	Notre démarche	128
2	<i>Article 6 : “Plasmodium telomeric sequences : structure, stability and targeting by small compounds”.</i>	130
3	<i>Données complémentaires</i>	132
3.1	Activité télomérase et effet des ligands dans le test Pf-TRAP	132
3.2	Effet du traitement des parasites par la télomestatine	134
3.2.1	Effet au niveau des télomères	134
3.3	Extrémités télomériques chez le parasite <i>P.falciparum</i>	136
3.3.1	Existence d’une extrémité 5’ sortante chez le parasite <i>P.falciparum</i> ?	136
3.3.2	Effet du stade érythrocytaire du parasite sur la longueur des extrémités	137
3.3.3	Discussion sur l’existence d’un 5’ “overhang”	137
4	<i>Discussion : Chapitre V</i>	138
 <i>Chapitre VI. Discussion, conclusions et perspectives</i>		142
1	<i>Vers de nouveaux ligands des (d’un) G-quadruplexe(s) ...</i>	142
1.1	Affinité versus Sélectivité	142
1.1.1	Adapter la partie aromatique plane au G-quartet	142
1.1.2	Cibler les boucles des G-quadruplexes	144
1.1.3	Cibler les sillons des G-quadruplexes	146
1.2	Induction et/ou stabilisation des structures en G-quadruplexe	146
2	<i>...pour quelles cibles ?</i>	148
2.1	La télomérase	148
2.2	Structure et protection des télomères	150
2.3	Réplication des télomères et des régions pouvant former des G-quadruplexes	152
2.4	Effets sur les autres régions pouvant former des G-quadruplexes	152
3	<i>Paradoxe des ligands de G-quadruplexes comme agents thérapeutiques ?</i>	154
4	<i>Des quadruplexes et des ligands pour d’autres applications ?</i>	154
 <i>Chapitre VII. Matériel et Méthodes</i>		160
1	<i>Produits</i>	160
1.1	Les tampons	160
1.2	Les oligonucléotides	160
1.3	Les ligands	162
2	<i>Spectroscopies</i>	163
2.1	Absorbance	163
2.2	Dichroïsme Circulaire	168
2.3	Fluorescence	172
3	<i>La dialyse à l’équilibre</i>	177
3.1	Principe	178

3.2	Protocole expérimental	178
4	Analyse et purification des acides nucléiques	181
4.1	Radiomarquage des acides nucléiques	181
4.2	Électrophorèse gels de polyacrylamide	182
4.3	Purification d'oligonucléotides sur gels de polyacrylamide	184
5	Tests d'activité télomérase	185
5.1	Le TRAP : "Telomeric Repeat Amplification Protocol"	185
5.2	"Direct-Assay" : Test d'extension d'amorce par la télomérase	189
5.3	"Telospot" : Test d'extension d'amorce par la télomérase et hybridation des produits d'élongation	190
6	Analyse d'ADN génomique	191
6.1	Extraction d'ADN génomique	191
6.2	Restriction des fragments télomériques (TRF) : mesure de la longueur moyenne totale des télomères	193
6.3	Étude de l'extrémité 3' télomérique	194
	Liste des publications scientifiques co-signées	200
	Annexe I	202
	Article : "Kinetics of tetramolecular quadruplexes". <i>Nucleic Acid Res.</i> 33 (2005) 81-94.	202
	Annexe II	204
1	Titration n sites équivalents : Concentration en ligand fixé $=C_0$	204
2	Titration n sites équivalents : Concentration de molécule possédant n sites fixée $=C_0$	206
	Bibliographie	212

Table des Illustrations

Table des Figures

<i>Figure 1 : Nucléobases, appariements canoniques et non canoniques :</i>	<i>15</i>
<i>Figure 2 : Comparaison ADN-B / G-quadruplexe :</i>	<i>17</i>
<i>Figure 3 : Les boucles des G-quadruplexes</i>	<i>19</i>
<i>Figure 4 : Polymorphisme des G-quadruplexes.</i>	<i>19</i>
<i>Figure 5 : Formation de boucles-G formées co-transcriptionnellement à partir de séquences répétées des CSR (Sμ ou Sγ3) ou du motif télomérique humain (d'après [37]).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 6: Structures en G-quadruplexe intramoléculaire de promoteurs résolues par RMN:</i>	<i>27</i>
<i>Figure 7 : Formules chimiques des ligands du G-quadruplexe de c-myc :</i>	<i>27</i>
<i>Figure 8 : Schéma d'une machine moléculaire basée sur l'ouverture et la fermeture d'un G-quadruplexe (d'après [142])</i>	<i>39</i>
<i>Figure 9 : Hybridation in situ en fluorescence des télomères (en rouge) à l'extrémité des chromosomes de fibroblastes primaires : D'après [145].</i>	<i>41</i>
<i>Figure 10 : Le problème de réplication terminale :.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 11 : Motifs télomériques chez les eucaryotes : Arbre phylogénique permettant de voir la conservation des motifs télomériques chez les eucaryotes et leur richesse en blocs de G (d'après [156]).....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 12: Topologie des G-quadruplexes télomériques humains intramoléculaires déterminées par RMN ou cristallographie et diffraction de rayons X (RX):.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 13 : Conformations hypothétiques de l'extrémité télomérique 3' sortante humaine.</i>	<i>47</i>
<i>Figure 14 : Formation de la T-loop au télomères :</i>	<i>47</i>
<i>Figure 15 : Le télosome ou complexe "Shelterin" :</i>	<i>49</i>
<i>Figure 16 : Structure de hTERT (A) et hTR (B) :</i>	<i>53</i>
<i>Figure 17 : Modèle de l'élongation processive par la télomérase humaine :.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 18 : Modèles alternatifs d'allongement des télomères :</i>	<i>58</i>
<i>Figure 19 : Modèle de progression de fourche de réplication au travers des extrémités des chromosomes de mammifères [169] :</i>	<i>60</i>
<i>Figure 20 : Raccourcissement des télomères, sénescence, télomérase et cancer : (d'après [251])</i>	<i>63</i>
<i>Figure 21 : Les six altérations essentielles dictant la croissance tumorale : (d'après [252])</i>	<i>63</i>
<i>Figure 22 : Exemples de ligands de G-quadruplexes protonnés par N-méthylation.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 23 : Exemples de ligands de G-quadruplexes protonnés in situ.</i>	<i>69</i>
<i>Figure 24 : Exemples de ligands de G-quadruplexes métallo-organiques.</i>	<i>71</i>

Figure 25 : Exemples de ligands de G-quadruplexes neutres ou anioniques.....	72
Figure 26 : Exemples de ligands interagissant potentiellement avec les sillons des G-quadruplexes	75
Figure 27 : Modèle d'action des ligands de G-quadruplexes au télomères.....	78
Figure 28 : Effet de la nature du cation monovalent sur la stabilisation et la sélectivité de divers ligands de G-quadruplexes	88
Figure 29 : Stabilisation du G-quadruplexe télomérique humain en conditions K^+ par les composés bisquinolinium :.....	95
Figure 30 : Effets de quelques ligands sur la conformation du G-quadruplexe en présence de potassium.	97
Figure 31 : Stabilisations du G-quadruplexe F21T par des ligands aux structures chimiques variées :.....	99
Figure 32 : Structure des dérivés d'acridone synthétisés par Francisco Cuenca dans le groupe de S. Neidle.	102
Figure 33 : Induction du G-quadruplexe tétramoléculaire $[TG3T]_4$ par le dérivée bisquinolinium phénanthroline dicarboxamide 2a :	112
Figure 34 : Induction d'un G-quadruplexe intramoléculaire à partir d'un oligonucléotide non structuré.....	113
Figure 35 : Inhibition de l'activité télomérase par divers ligands de G-quadruplexes :.....	118
Figure 36 : Inhibition de la télomérase par les composés 11 et 9 de la série des macrocycles couplés à la néomycine :.....	119
Figure 37 : Relation entre la stabilisation du G-quadruplexe télomérique en test FRET et les CI_{50} observées en Telospot sur l'amorce Telo3R	122
Figure 38 : Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i> (d'après [331])	123
Figure 39 : Structure du télomère, des régions sub-télomériques et modèle de la régulation de l'expression des gènes var subtélomériques	127
Figure 40 : Test Pf-TRAP en présence de ligands de G-quadruplexes.....	132
Figure 41 : Effet du traitement par la télomestatine sur les télomères du parasite :	133
Figure 42 : T-ola avec le brin G (complémentaire d'un éventuel 5' "overhang") (A) et effet du stade érythrocytaire du parasite sur la longueur des produits de ligation estimée en T-ola (B). 135	
Figure 43 : Structures chimiques de la méfloquine, de la chloroquine et de la Pyriméthamine..	138
Figure 44 : Quinoléine et G-quadruplexes :.....	143
Figure 45 : Hypothèses de conformations de l'extrémité 3' télomérique induites par des ligands (d'après [255])	147
Figure 46 : Multiples effets potentiels des ligands de G-quadruplexes	151
Figure 47 : Structure chimique du composé BMVC.....	155
Figure 48 : Diagramme de Jablonski simplifié :	164
Figure 49 : Exemples de spectres CD pour différents types de structures en G-quadruplexe ou simple-brin.	170
Figure 50 : Diagrammes de Jablonski modifié : Transfert d'énergie d'excitation par résonance	174

<i>Figure 51 : Schéma pour la dénaturation thermique de G-quadruplexe suivie par “FRET”</i>	<i>177</i>
<i>Figure 52 : Principe et exemple de TRAP</i>	<i>187</i>
<i>Figure 53 : Schéma des techniques utilisant l’hybridation du simple brin télomérique.</i>	<i>197</i>

Index des Tables

<i>Table 1 : Quelques promoteurs de gènes formant des G-quadruplexes :</i>	<i>26</i>
<i>Table 2 : Protéines fixant différents types de quadruplexes :</i>	<i>31</i>
<i>Table 3 : Protéines ayant une activité biologique sur les G-quadruplexes : nucléase, “résolvase” ou “chaperone” (induisant une structure G4) :</i>	<i>33</i>
<i>Table 4 : Existence et longueur de l’extrémité télomérique 3’ sortante de quelques organismes.</i>	<i>44</i>
<i>Table 5 : Etudes structurales menées sur des G-quadruplexes en présence de ligands</i>	<i>74</i>
<i>Table 6 : Résultats d’expériences de dénaturation thermique suivies en FRET obtenus dans nos conditions (colonnes 3-5) et par le groupe de S. Neidle (colonnes 6 et 7)</i>	<i>102</i>
<i>Table 7 : Liste des oligonucléotides utilisés dans ce manuscrit (excepté ceux utilisés uniquement dans la Dialyse à l’équilibre (cf. : § VII.3).</i>	<i>161</i>
<i>Table 8 : Valeur des coefficients d’extinction molaire à 260 nm ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) des monomères et dimères de déoxyribonucléosides-5’-monophosphates [363].</i>	<i>162</i>
<i>Table 9 : Table des oligonucléotides utilisés dans la dialyse à l’équilibre [365].</i>	<i>179</i>

Abréviations

5'ETS :	Espaceur transcrit externe en 5' du gène codant pour l'ARNr 18S
ADN :	Acide déoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
CD :	"Circular Dichroism" ou Dichroïsme Circulaire
ChIP :	"Chromatin Immuno-Precipitation" ou Immunoprécipitation de Chromatine
CSR :	"Class switch recombination"
DDR :	"DNA damage response" ou réponse aux dommages de l'ADN
DSB :	Cassure double-brin ou "Double Strand Break"
FRET :	"Fluorescence Resonance Energy Transfert" ou Transfert d'énergie d'excitation de fluorescence par résonance
FWMH :	"Full Width at Half Maximum" : cette valeur représente, pour les pics d'émissions et d'excitation, la largeur du pic (en nm) à la moitié de sa hauteur.
G4, G4-DNA ou G-quadruplexe :	quadruplexe de guanines
G4P :	Potentiel de formation de G-quadruplexe
GFP :	"Green Fluorescent Protein"
HR :	Recombinaison Homologue
Ig :	Immunoglobuline
IRES :	"Internal Ribosome Entry Site"
MPD :	2-méthyl-2,4-pentanediol
NEMO :	NF- κ B Essential Modulator
NHEJ :	"Non-homologous End joining" ou réparation par liaison d'ADN non homologues
PCR :	"Polymerase Chain Reaction" ou Réaction de polymérase en chaîne
PEG :	Polyéthylèneglycol
PPT :	"PolyPurine Tract"
PQS :	"Putative G-Quadruplex sequence"
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RT :	"Reverse transcriptase" ou transcriptase inverse
RX :	Rayons X
SSB :	"Single-strand binding" (protéines liant les simple-brins)
TARE :	Eléments répétés associés aux télomères "Telomere-Associated Repetitive Elements"
TAS :	Séquences associées aux télomères ou "telomere-associated sequences"
TIF :	"Dysfunctional Telomere-induced foci" ou foyers induit par un télomère dysfonctionnel
T_m :	"Melting Temperature" ou Température de demi-dissociation
TRAP :	"Telomere Repeat Amplification Protocol"

Introduction Générale

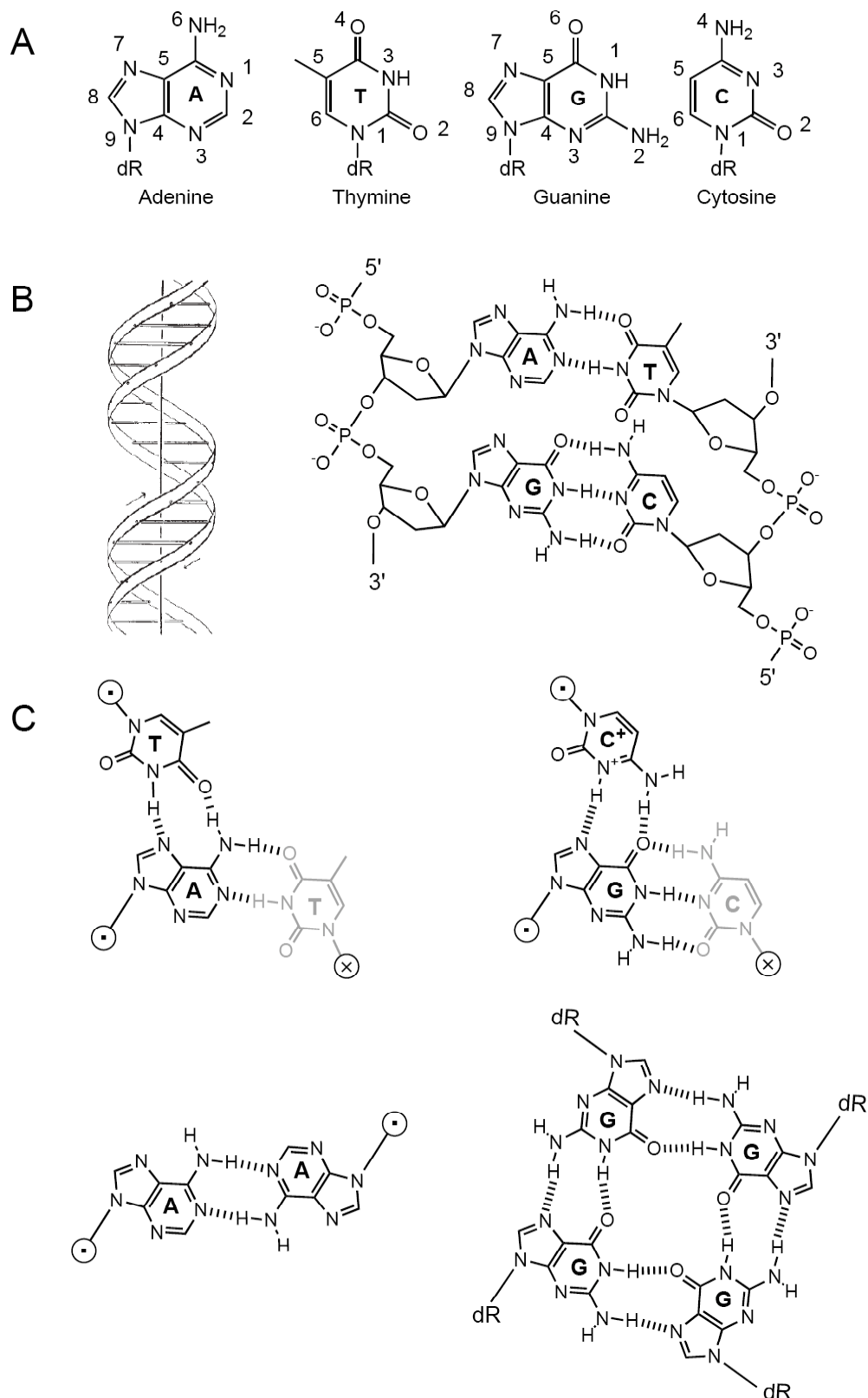


Figure 1 : Nucléobases, appariements canoniques et non canoniques :

(A) Formule chimique des 4 bases constituant l'ADN. (B) Schéma de double hélice d'ADN [1] et appariement de type Watson-Crick entre $A \leftrightarrow T$ et $G \leftrightarrow C$. (C) En noir, exemple d'appariement de type Hoogsteen entre $A \times T$, $G \times C^+$, permettant la formation de triples hélices d'ADN (haut). Autres appariements non canoniques entre $A \times A$ et $G \times G \times G \times G$, représentant un quartet de guanines. L'orientation des brins est symbolisée ainsi : $5' \otimes \rightarrow 3' \odot$.

Chapitre I. Introduction

1 Les Quadruplexes de Guanines

1.1 *Assemblages moléculaires autour des nucléobases de l'ADN*

La structure de l'ADN proposée par James Watson et Francis Crick en 1953 [1-3] est une hélice droite formée par 2 brins anti-parallèles, appariés par des liaisons Hydrogène entre les bases $A \leftrightarrow T$ et $G \leftrightarrow C$ (Figure 1A et B). Cette structure hélicoïdale est stabilisée par d'importantes interactions d'empilement de type π entre les bases. Nommée ADN de forme B, elle correspond à la forme canonique retrouvée majoritairement dans la cellule.

Le type d'appariement entre les bases nucléotidiques dans la forme B (appariement dits Watson-Crick), n'est pourtant pas la seule conformation pouvant être adoptée géométriquement par les bases nucléotidiques [4]. En effet, chaque nucléobase possède de multiples sites accepteurs et donneurs de liaisons Hydrogène. Ainsi, quatre ans seulement après la découverte de la structure de la double hélice d'ADN, G. Felsenfeld, D. Davis et A. Rich décrivaient une structure à 3 brins contenant 1 poly(rA) et 2 poly(rU) [5]. La formation d'une paire non canonique, entre la 1-méthylthymine et la 9-méthyladenine pouvant expliquer la formation de ce triplexe, fut démontrée par diffraction de rayons X en 1959 par Karst Hoogsteen [6, 7] (Figure 1C). Les appariements dits "Hoogsteen" seront ensuite attribués, par analogie, aux liaisons s'effectuant sur le côté non "Watson-Crick" de la nucléobase (en noir Figure 1C).

Un certain nombre de structures particulières d'acides nucléiques seront découvertes par la suite. On peut citer par exemple l'association de polynucléotides d(A) mettant en jeu des appariements $A \leftrightarrow A$ [8] (Figure 1C), ou encore la formation de gels en présence de guanosines 5'-monophosphates. Ces gels sont générés par des structures en hélice droite formées par l'empilement de quatre guanines 5'-monophosphates associées entre elles [9](Figure 1C). Ce motif particulier que l'on nomma ensuite tétrade, quartet de guanine, ou G-quartet, est à l'origine de ce travail de thèse.

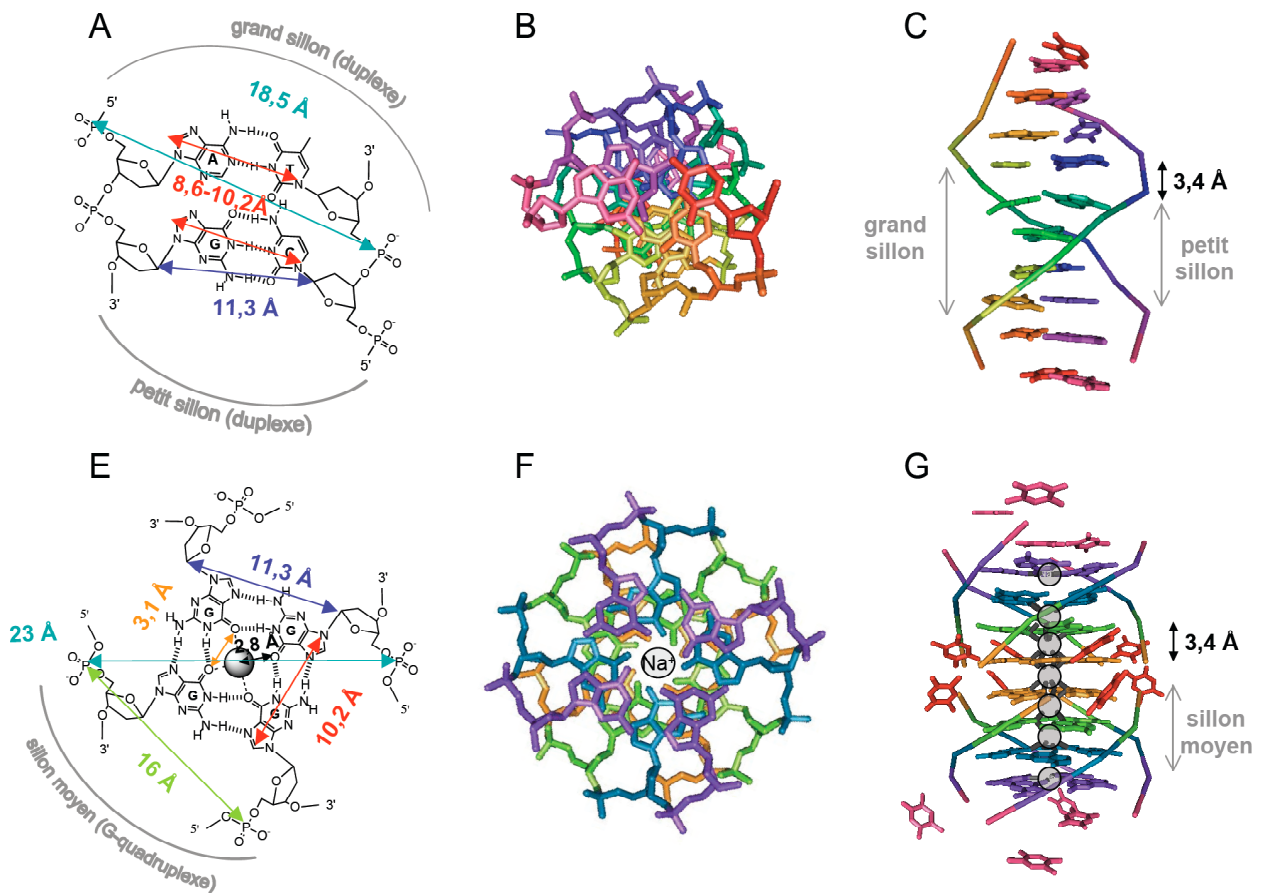


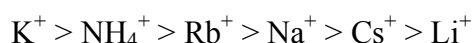
Figure 2 : Comparaison ADN-B / G-quadruplexe :

(A-C) Formation du duplexe d'ADN-B par la séquence *d*(CCGCTAGCGG). (E-F) Formation d'un quadruplexe de guanines par la séquence *d*(TGGGGT). (A et E) Quelques distances sur des paires Watson-Crick et un G-quartet chélatant un cation central. (B-C et F-G) Représentations des structures cristallographiques du duplexe $[d(\text{CCGCTAGCGG})]_2$ et du G-quadruplexe $[d(\text{TGGGGT})]_4$, en présence d'ion Na^+ (cercle gris), vue du dessus (B et F) ou de côté (C et G)). Code couleur et orientation rouge (5') -> rose (3'). (G) on observe une dimérisation du G-quadruplexe avec une interaction tête-à-tête en 5'. (PDB : 1ZFM (duplexe) [10] et 2O4F (G4) [11]).

1.2 Caractéristiques des G-quadruplexes

1.2.1 Les G-Quartets

Le G-quartet est formé par l'auto-association de 4 guanines entre-elles. Un réseau de 8 liaisons Hydrogène relie les guanines voisines par leurs côtés Watson-Crick en N(1)H et N(2)H et Hoogsteen en N(7) et O(6) (Figure 1C, Figure 2E). Dans des conditions de pH neutre ou faiblement basique, les associations entre guanines induisent la formation d'agrégats ordonnés et solubles de 5'-GMP. Pinnavaia *et al.* ont montré que la formation de ces agrégats est favorisée par des cations alcalins comme Na^+ , K^+ et Rb^+ . Ceux-ci sont chélatés par les 4 oxygènes des fonctions carbonyles des guanines lorsque les quartets sont empilés [12] (Figure 2). Cette coordination limite les répulsions des fonctions carbonyles entre-elles pour favoriser l'empilement des guanines. Au contraire, les cations Li^+ et Cs^+ ne présentent qu'une capacité limitée à induire la formation de ces agrégats, suggérant que celle-ci est dépendante de la taille et du coût énergétique de désolvatation de l'ion central. Wong et Wu ont défini l'ordre des cations suivant, selon leur capacité d'induction et de stabilisation de structures à partir de 5'-GMP [13]:



Il est intéressant de noter que, même non reliées par un squelette phosphaté, les guanosines sont capables de former des structures hélicoïdales pouvant atteindre 30 nm de long [14]. Ceci souligne la très forte coopérativité entre la formation de liaisons Hydrogène, les interactions dipôle - ion et les interactions d'empilement π - π , inhérente à ces assemblages moléculaires en G-quartets.

1.2.2 Structures intra- ou intermoléculaires en G-quadruplexes

Alors que les mises en évidence de structures secondaires pour la guanosine monophosphate [9] ou pour de courts oligonucléotides contenant 3 déoxyguanosines [15] datent du début des années 1960, il faut attendre 1975, et le développement de la synthèse chimique d'oligonucléotides poly(dG) plus longs, pour que Davies et ses collaborateurs démontrent la formation de structures correspondant à 4 brins associés par des G-quartets empilés pour former une hélice droite (études de diffraction de rayons X sur une fibre de poly(dG) [16]). La structure décrite est appelée quadruplexe ou tétraplexe de guanines ; elle est couramment abrégée sous les termes de G-quadruplexe, G4-DNA ou G4. Le G-quadruplexe formé par la séquence d(TG₄T) comparée à celle d'un duplexe d'ADN-B est représentée Figure 2.

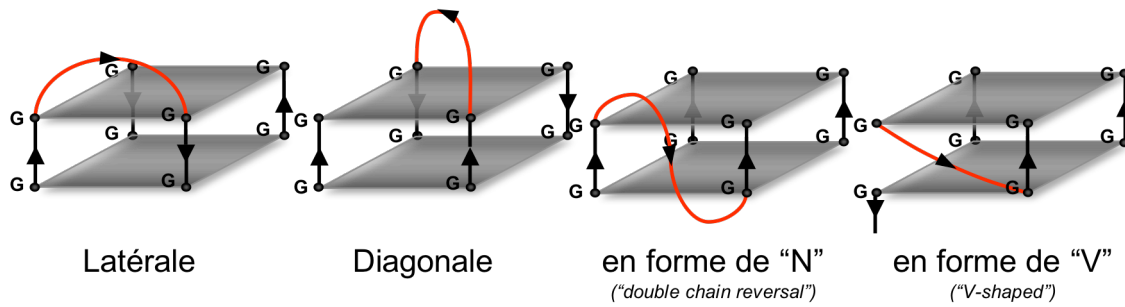


Figure 3 : Les boucles des G-quadruplexes

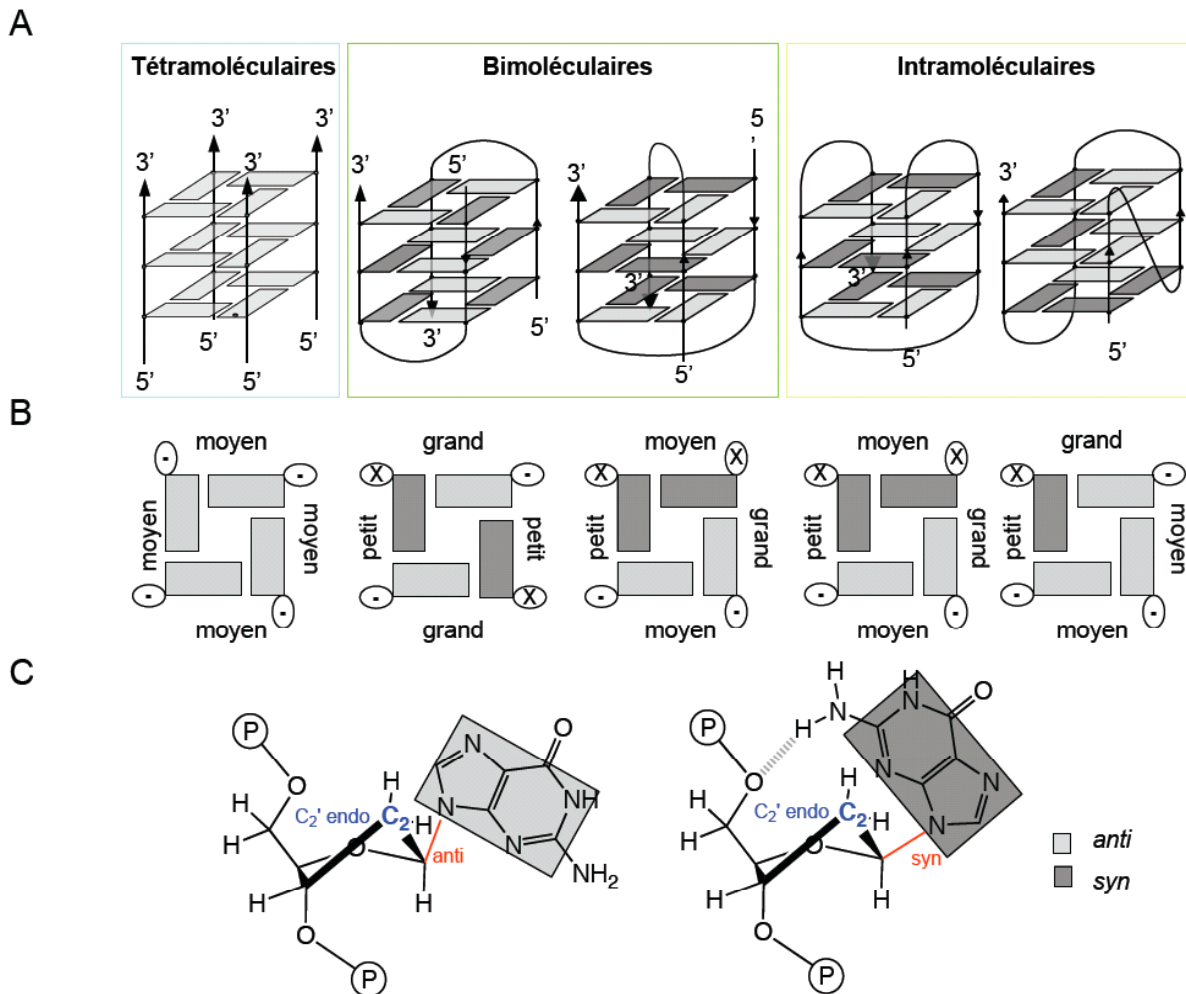


Figure 4 : Polymorphisme des G-quadruplexes.

Polymorphisme engendré par (A) des molarités, des orientations de brins, des arrangements de boucles et des quartets variés. (B) Structure des quartets présentés en (A) : la conformation des liaisons glycosidiques en anti (C, gauche) ou syn (C, droite) et leur succession au sein du quartet, induit la formation de sillons de tailles différentes. Les sucres sont symbolisés par des ovales et l'orientation des brins de 5' (x) → 3' (•). (C) Malgré l'encombrement stérique, la conformation syn peut exister dans le cas des guanines, en raison de l'interaction stabilisante entre le phosphate et le N(2)H.

Depuis la fin des années 80, ces structures font l'objet d'un intérêt tout particulier car elles pourraient jouer des rôles biologiques essentiels, que nous aborderons plus loin dans ce chapitre.

En théorie, la formation G-quadruplexes à partir d'un fragment d'ADN ou d'ARN est possible à partir d'une séquence possédant un minimum de deux guanines consécutives. Les brins d'acides nucléiques peuvent alors s'associer en différentes structures selon la longueur et / ou l'enchaînement de plusieurs blocs de guanines : il est ainsi possible de former des structures intermoléculaires (tétra- ou bimoléculaires) ou intramoléculaires, pour des séquences présentant un minimum de 4 blocs successifs de guanines (Figure 4A).

Les structures bi- ou intramoléculaires font apparaître des boucles, constituées des nucléotides présents entre les blocs de guanines. Elles peuvent adopter des conformations diverses - latérale, diagonale, "en forme de N" ("double chain reversal"), ou en "forme de V" ("V-shaped") (Figure 3)- en fonction de l'orientation des brins formant le quartet. Cette variabilité dans la polarité des brins est liée à un changement dans l'enchaînement base - sucre qui peut conduire à la présence de guanines avec des conformations glycosidiques *anti* ou *syn* (Figure 4C). L'enchaînement des bases en *syn* et / ou *anti* au sein d'un quartet conduit à des tailles de sillons variables (Figure 4B, Figure 2 pour comparaison d'un G4 composé de G-quartet tout *anti* et d'un duplexe d'ADN B). La molécularité, l'orientation des brins et l'arrangement varié des boucles conduisent les structures en G-quadruplexe à présenter un important polymorphisme.

Si ce polymorphisme peut conduire une séquence à présenter, en solution, un mélange des diverses structures possibles, en réalité, la nature du (ou des) cation(s) présent(s) favorise certains types de repliements. En effet, les G-quadruplexes interagissent avec les cations de deux manières différentes : (i) par coordination spécifique de l'ion central qui est spécifiquement inséré entre les quartets et (ii) par interaction avec les ions externes qui contribuent à l'écrantage partiel des charges négatives du squelette phosphaté du quadruplexe. Le premier type d'interaction est en particulier démontré par les données cristallographiques [17, 18], qui mettent en évidence des cations déshydratés octacoordinnés par les fonctions carbonyles des G-quartets supérieurs et inférieurs selon l'axe central (Figure 2G). D'autre part, la stabilité de la structure formée est dépendante de la nature du cation. Venczel et Sen ont défini l'ordre suivant : $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+ = Cs^+$ pour les cations alcalins, et ont également établi l'ordre suivant pour les cations alcalinoterreux : $Sr^{2+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ [19]. L'ordre établi peut être corrélé de façon relativement satisfaisante au rayon ionique des cations. Néanmoins, un autre critère important à prendre en compte est le coût énergétique pour la déshydratation du cation. Sans cela, avec des rayons ioniques de 0,95 Å pour Na^+ et de 1,33 Å pour K^+ [20], on devrait observer des potentiels de stabilisation selon l'ordre suivant : $Na^+ > K^+$.

1.2.3 Méthodes d'étude des G-quadruplexes

De nombreuses techniques ont été utilisées pour identifier et caractériser ces structures (pour revue voir [21]), la RMN et la cristallographie étant certainement les plus puissantes. La cristallographie a permis d'accéder à des données précieuses sur les distances et l'emplacement des ions au sein du quadruplexe. Ces données (et les cristaux !) sont malheureusement assez rares (un peu plus d'une vingtaine de structures disponibles dont 3 séquences sur-représentées : 5'-dTG₄T-3', 5'-rUG₄U-3' et 5'-G₄T₄G₄-3') et l'utilisation d'agents d'encombrement, comme le polyéthylène glycol (PEG) et le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD), ou de ligands [22] pour aider à la cristallisation, peut induire des repliements différents de ceux obtenus en solution. On peut néanmoins s'interroger sur la pertinence d'une structure définie en solution diluée, plutôt que dans un milieu plus dense, étant donné le fort encombrement qui doit exister au sein du noyau cellulaire [23].

Quoi qu'il en soit, la RMN constitue aujourd'hui la technique la plus adaptée pour identifier formellement la structure d'une séquence donnée en solution. Cependant, en raison du polymorphisme de ces structures et de l'augmentation de complexité en fonction du nombre de blocs de G consécutifs, il peut être nécessaire de sélectionner des fragments de la séquence d'intérêt, ou de muter des bases "stratégiques" pour stabiliser une forme particulière et obtenir un spectre RMN exploitable. Ceci peut évidemment conduire à un biais sur l'identification de la structure réelle de la séquence native, puisque seules les formes exploitables sont caractérisées. La présence de bases adjacentes au cœur du G-quadruplexe peut également avoir une influence déterminante. En effet, celles-ci peuvent avoir des effets stabilisants importants par formation de triplets ou paires de bases interagissant par empilement de part et d'autre des quartets terminaux [24, 25].

En raison du débit limité et des contraintes de séquence inhérentes aux deux méthodes précédentes, d'autres techniques complémentaires comme les spectroscopies d'absorption et de fluorescence (dénaturations thermiques), le dichroïsme circulaire, la spectrométrie de masse à ionisation par "electrospray" (ESI-MS), la calorimétrie, la spectroscopie Raman, et la mobilité électrophorétique permettent d'acquérir de précieuses informations sur la molécularité, la stabilité (en fonction du cation notamment) et le type de conformation. Certaines de ces méthodes permettent en outre d'accéder à des paramètres thermodynamiques et cinétiques essentiels pour la caractérisation de ces structures. Parallèlement, les empreintes au diméthylsulfate (DMS) (protection des guanines impliquées dans un quartet de la méthylation en N7 par le DMS), la sensibilité aux nucléases et les arrêts d'ADN polymérases en fonction du cation sur des substrats pouvant former des G-quadruplexes ont également été utilisés intensivement. Elles permettent d'acquérir des informations supplémentaires sur les guanines impliquées dans les quartets ou

l'emplacement du G-quadruplexe sur une séquence longue. Si certains groupes s'y sont essayés, il paraît cependant difficile d'attribuer spécifiquement ces effets à des G-quadruplexes intra- ou intermoléculaires ou de déterminer une structure en utilisant uniquement ces 3 méthodes.

1.3 Rôles biologiques : arguments en faveur de l'existence des G-quadruplexes in vivo

Les concentrations ioniques typiquement présentes dans les cellules de vertébrés et d'invertébrés sont de : 140 mM K^+ , 5-15 mM Na^+ , 0,5 mM Mg^{2+} libre, 0,1 μM Ca^{2+} libre, 0,07 μM H^+ (pH =7,2) pour les cations. Les anions sont représentés par 5-15 mM Cl^- , et ~140 mM X^- correspondant à HCO_3^- , PO_4^{3-} et à l'ensemble des protéines, acides nucléiques, métabolites possédant des groupements (carboxyles, phosphates, etc.) chargés négativement à pH neutre [26].

Dans des conditions de sels et de pH proches de ces conditions physiologiques, 100 mM K^+ , 10 mM Na^+ , pH 7,0, des températures de demi-dissociation (T_m) de 50 et 63 °C sont observées pour les G-quadruplexes intramoléculaires contenant 2 et 3 G-quartets, formés par les séquences d(GGTTGGTGTGGTTGG) et d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) respectivement [27]. Une analyse de van't Hoff des courbes de dénaturation thermique obtenues dans ces conditions permet de déduire qu'à 37°C, les ΔG_{310K}° pour la formation de ces deux structures sont de -1,5 et -4,6 kcal/mol, correspondant à des constantes de formation K_{310K} de 12 et 1750 respectivement [27]. Dans des conditions physiologiques, et pour des séquences d'acides nucléiques riches en blocs d'au moins 2-3 guanines, des structures en G-quadruplexes ont donc une forte probabilité de se former spontanément. La formation de telles structures nécessite néanmoins la présence de régions simple-brins ou l'ouverture du duplexe Watson-Crick. En effet, il a été montré que, dans des conditions proches de ces conditions physiologiques, le duplexe Watson-Crick sur la séquence en tandem d(AGGG(TTAGGG)₃)/ d((CCCTAA)₃CCCT) est la forme prédominante [28]. Il est toutefois envisageable que d'autres facteurs puissent déplacer cet équilibre, comme des protéines ou des petites molécules liant les duplexes ou les simple-brins, ou encore l'encombrement moléculaire qui semble stabiliser les structures en G-quadruplexe et favoriser l'ouverture du duplexe de séquence correspondante [29, 30].

Si l'existence de ces structures dans le noyau de cellules humaines n'a pas encore été formellement démontrée, de plus en plus de travaux montrent que de telles structures semblent jouer des rôles au niveau cellulaire tant au niveau de la régulation de l'expression de gènes que de la réplication, de la recombinaison ou de la division des cellules. Nous avons répertorié un certain nombre d'entre eux dans les paragraphes ci-dessous.

1.3.1 Les séquences riches en blocs de G du génome

Nous n'aborderons pas ici la présence de structures en G-quadruplexes et leur implication éventuelle au niveau des télomères. Cet aspect ayant été plus particulièrement étudié au cours de cette thèse, il sera développé dans la deuxième partie de ce chapitre introductif.

Analyses génomiques: Les récentes études bioinformatiques sur le génome humain ont permis de mettre en évidence un grand nombre de séquences pouvant former des G-quadruplexes, et d'étudier leur distribution au sein du génome.

L'algorithme "*Quadparser*" [31], recherchant les séquences du type $d(G_3+N_{1-7}G_3+N_{1-7}G_3+N_{1-7}G_3+)$ a permis d'identifier près de 380000 séquences non chevauchantes pouvant former des G-quadruplexes intramoléculaires (PQS). En limitant le nombre de G successifs à 5 nucléotides, Alan Todd et ses collaborateurs trouvent un résultat sensiblement identique [32]. La limitation dans la longueur des boucles à 7 nucléotides, pour réduire la complexité du traitement de données laisse supposer que de telles séquences sont encore davantage répandues, dans la mesure où des G-quadruplexes stables peuvent être formés avec des boucles longues [33]. La définition du potentiel de formation de G-quadruplexes (G4P), par Nancy Maizels, repose sur une description plus qualitative [34] : il s'agit des séquences présentant au moins 4 blocs de 3 guanines et plus dans une fenêtre de 100 nucléotides, et un intervalle de glissement de 20 nucléotides. Le G4P est défini comme le pourcentage de "touches" par rapport au nombre total de fenêtres analysées.

Julian Huppert a montré par ces analyses que la densité de PQS était plus importante dans les promoteurs à proximité des sites d'initiation de la transcription (TSS). La densité de PQS et le G4P sont assez logiquement corrélés au contenu en GC du génome. En revanche, il est important de noter qu'ils ne sont pas corrélés à l'enrichissement en sites CpG, celui-ci nécessitant une alternance des bases G et C, plutôt qu'une asymétrie des G sur un brin, et des C sur l'autre. Par ailleurs, la densité de PQS est également corrélée à la présence de sites hypersensibles à la DNase I (NHS). Ces sites sont caractéristiques des régions qui subissent une transition (ouverture de l'ADN-B, changement conformationnel), requise dans les promoteurs pour l'activation de la transcription. Les structures en G-quadruplexes pourraient avoir un rôle d'élément de régulation agissant *in cis* pour 40% des gènes du génome humain [35].

D'autre part, l'étude menée par l'équipe de Nancy Maizels a permis de mettre en évidence une corrélation entre le G4P et la fonction des gènes. Certaines fonctions comme les récepteurs couplés à la protéine G, la perception sensorielle, l'assemblage des nucléosomes, la fixation sur les acides nucléiques, le cycle de l'ubiquitine, l'adhésion ou encore la division cellulaire, sont caractérisées par de faibles G4P. Par ailleurs, un fort G4P est associé à des fonctions comme le

développement, la réponse immunitaire, l'activité des facteurs de transcriptions, la signalisation cellulaire, la contraction des muscles, les facteurs de croissance et les cytokines. Il est également intéressant de constater que les gènes suppresseurs de tumeurs sont caractérisés par un faible G4P, par opposition aux proto-oncogènes possédant un fort G4P [34].

Ces études suggèrent que les G-quadruplexes pourraient jouer des rôles dynamiques au sein de la cellule. Il est néanmoins important de noter que ces algorithmes permettent uniquement d'établir un "potentiel" de formation de ces conformations, puisque l'ADN génomique est majoritairement sous la forme d'un duplexe Watson-Crick, dans lequel l'appariement G-C, très stable, doit limiter le repliement en G-quadruplexes. La formation de ces structures nécessite donc la dénaturation du duplexe, qui se produit au cours de la réplication, de la transcription ou de la recombinaison. La particularité des télomères dont l'extrémité est un simple brin en fait une cible pour la formation de ces structures d'autant plus pertinente puisqu'il n'est pas nécessaire de dissocier un brin complémentaire. Nous développerons plus en détail la structure des télomères et des G-quadruplexes télomériques dans la deuxième partie de ce chapitre.

Depuis la fin des années 80, la formation de G-quadruplexes intra- ou intermoléculaires a été démontrée ou proposée pour certaines de ces régions-clés du génome. Ce point sera développé dans la suite de ce chapitre.

Régions de commutation de classe des immunoglobulines: Les gènes codant pour la chaîne lourde de la région des immunoglobulines subissent des recombinaisons de commutation de classe dites "class switch recombinations" ou CSR, qui permettent d'amener les différentes régions constantes proches des régions variables réarrangées pendant la différenciation des lymphocytes B. Ces régions sont constituées de répétitions dégénérées riches en G, dont la longueur totale varie entre 1 et 10 kb. À la fin des années 80, Sen et Gilbert furent les premiers à montrer que des oligonucléotides dérivés des séquences de ces régions CSR pouvaient former des G-quadruplexes intermoléculaires *in vitro* [36]. Par cette découverte, ils renouvelèrent l'intérêt pour ces structures, leur attribuant une fonction possible *in vivo*. Certaines de ces séquences portent les motifs suivant : S μ d(GCTGAGCTGGGGTGAGCTGA) ; S γ 3 d(CTGGGCAGCTCTGGGGAGCTGGGG-TAGGTTGGGAGTGTGGGGACCAGG) ; S γ 2B d(CCTAGCAGCTGTGGGGAGCTGGGG-AAGGTGGGAGTGTGAGGGACCAGA). La transcription de ces régions a été étudiée *in vitro* et *in vivo* (*E.coli*) par Maizels et ses collaborateurs. Ils ont montré que des boucles-G ("G-loop") étaient formées co-transcriptionnellement. Elles contiendraient des G-quadruplexes sur le brin non transcrit et un hétéroduplexe ARN/ADN sur l'autre brin, possédant des appariements rG / dC particulièrement stables (Figure 5) [37]. Ces données suggèrent également la formation de G-quadruplexes intramoléculaires à partir de ces séquences répétées.

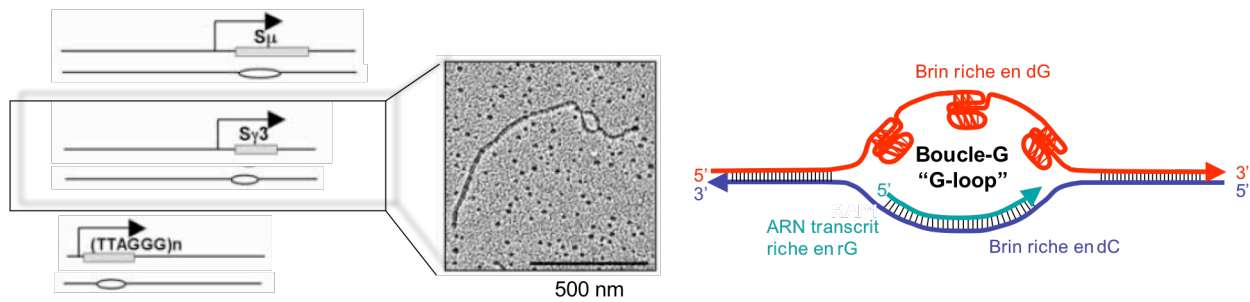


Figure 5 : Formation de boucles-G formées co-transcriptionnellement à partir de séquences répétées des CSR ($S\mu$ ou $S\gamma 3$) ou du motif télomérique humain (d'après [37])

ADN ribosomique : Dans tous les organismes eucaryotes, l'ADN ribosomique ou ADNr est très riche en blocs d'au moins 3 guanines consécutives. La formation d'un G-quadruplexe intermoléculaire à partir d'un oligonucléotide issu de la région 5'ETS (eSpaceur Transcrit Externe en 5') de l'ADNr humain, de séquence d(TCTCTCGGTGGCCGGGGCTCGTCGGGGTTTTGGGTCCGTCC) a été démontrée par empreinte après méthylation au DMS et retard de migration électrophorétique. La transcription et la maturation de l'ADNr a lieu dans un sous-compartiment particulier, le nucléole. L'ADNr est transcrit par l'ARN polymérase I, et dans les cellules se divisant rapidement, il est transcrit activement grâce à un nombre important de Pol I par gène (jusqu'à 1 Pol I/41 nt) [38]. Il est intéressant de voir que comme pour les régions sujettes au CSR, le brin riche en G n'est pas transcrit (Figure 5) [39]. Les auteurs suggèrent que la nucléoline, une des protéines les plus abondantes des nucléoles (cf. : § I.1.3.2), permettrait la stimulation de la transcription par reconnaissance des G-quadruplexes sur le brin d'ADN non transcrit. Cette interaction G4-protéine empêcherait la renaturation du duplexe et permettrait ainsi au brin matrice d'être transcrit de nombreuses fois.

Minisatellites : Les minisatellites sont des séquences de 5 à 100 nucléotides répétées à l'intérieur du génome (sur 0,4 à 30 kb), connus comme étant des points d'hypermutabilité et d'instabilité génomique (pour revue voir [40]). Parmi eux, certains possèdent des séquences répétées riches en guanines susceptibles de former des G-quadruplexes intramoléculaires : le minisatellite de souris Pc-1 (locus Ms6-hm) d'unité de répétition d(CAGGG)⁽¹⁾, le minisatellite au locus D4S43 (humain) d'unité de répétition d(GGGGAGGGGGAAGA), la région polymorphique associée au gène de l'insuline, ILPR d'unité de répétition d(ACAGGGGTGTGGGG), dont le repliement en G-quadruplexe induit l'arrêt d'une ADN polymérase *in vitro*. Kennedy et ses collaborateurs ont également montré que la formation de quadruplexe pourrait affecter la transcription du gène de l'insuline en modulant la fixation du facteur de transcription Pur1 [41, 42]. La formation de G-

⁽¹⁾ Notons que, pour des unités de répétitions inférieures à 5 nucléotides, on parle plutôt de microsatellites.

quadruplexes dans les minisatellites humains MS1 (locus D1S7), dont l'unité de répétition est d(AGGGTGGAG) et ou CEB1 (locus D2S90) dont une des unités de répétition de 26 pb est d(GGAGGGAGGGAGGGAGGGTGGCCTGCCGAGG-TCCCTGGGCTGA), n'a pas été formellement démontrée *in vivo*. Elle est néanmoins envisageable et pourrait expliquer la forte instabilité génomique constatée sur ces régions [43] (résultats du laboratoire non publiés sur CEB1 obtenus en collaboration avec l'équipe de P. Nicolas à l'Institut Curie).

Promoteurs de gènes : Les promoteurs de gènes sont souvent caractérisés par une plus grande richesse en guanines et une sensibilité aux nucléases (S1 et DNase I), suggérant une ouverture possible de l'ADN B dans ces régions. Ils présentent fréquemment des blocs de plusieurs polypurines / polypyrimidines qui sont adjacents ou se superposent à des sites de fixation de facteurs de transcription comme Sp1 ou Egr-1. La formation de G-quadruplexes a été caractérisée plus précisément dans les promoteurs des gènes présentés Table 1.

Promoteur	Séquences	Méthodes	Références
<i>β-globine</i> poulet	d (<u>G₁₆C</u> <u>GGGTGGTGG</u>) -175 à -200pb du TSS	- Arrêt ADN polymérase - Empreinte DMS	[44, 45]
<i>HIF1-α</i>	d (<u>GGGGA</u> <u>GGGAGAGGGGGC</u> <u>GGGA</u>) -65 à -86pb du TSS	- Empreinte DMS - CD (+) 260 nm - Arrêt ADN polymérase	[46]
<i>VEGF</i>	d (<u>GGGGC</u> <u>GGGCC</u> <u>GGGGGC</u> <u>GGGGTCCC</u> <u>GGC</u> – <u>GGGGC</u> <u>GGAG</u>) - 53 à – 88 pb du TSS	- Empreinte DNase I et nucléase S1 - CD (+) 260 nm - Arrêt ADN polymérase	[47]
<i>KRAS</i> humain et murin	d (<u>GGGC</u> <u>GGTGT</u> <u>GGGAAGAGGGAAGAGGGGGAG</u>) (humain) - 129 à - 159 pb du TSS d (<u>GGGA</u> <u>GGGA</u> <u>GGGAAGGAGGGAGGGAG</u>) (murin) - 239 à - 267 pb du TSS	- CD (+) 260 nm - Arrêt ADN polymérase (séquence murine) - Empreinte DMS	[48]
<i>c-kit</i>	d (<u>AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG</u>) (<i>c-kit87up</i>) - 13 à – 34 pb du TSS d (<u>CGGGC</u> <u>GGGCGCGAGGGAGGGG</u>) (<i>c-kit21</i>) -64 à – 84 pb du TSS	- RMN (Figure 6A pour <i>c-kit87up</i>) - CD (+) 260 nm - Dénaturation thermique	[49-51]
<i>bcl2</i>	d (<u>AGGGGC</u> <u>GGGCGC</u> <u>GGGAGGAAGGGGGC</u> <u>GGGAGCG</u> <u>G</u> <u>GGGCTG</u>) -737 à -775 pb du TSS (séquence sauvage) (voir légende Figure 6B pour les séquences utilisées en RMN)	- RMN (Figure 6B) - CD (+) 295 nm et (+) 260 nm - Empreinte DMS - Arrêt ADN polymérase	[25, 52, 53]
<i>c-myc</i>	d (<u>TGGGGA</u> <u>GGGT</u> <u>GGGAGGGT</u> <u>GGGGAAGG</u>) (séquence sauvage) -116 à -142 pb du TSS (voir légende Figure 6C pour les séquences utilisées en RMN)	- RMN (Figure 6C) - CD (+) 260 nm - Empreinte DMS - Arrêt ADN polymérase	[54, 55] [53, 56]

Table 1 : Quelques promoteurs de gènes formant des G-quadruplexes :

En italique les blocs de guanines et soulignées, les guanines impliquées dans un quartet (d'après la RMN ou les empreintes). La distance au TSS ("Transcription Start Site" ou site d'initiation de la transcription) est déterminée par BLAST sur les bases de données des transcrits de ENSEMBL ; des différences peuvent être observées par rapport aux données publiées. Lorsque l'organisme n'est pas renseigné, il s'agit du génome humain. Pour les caractéristiques des signaux CD voir chapitre Matériel et Méthodes.

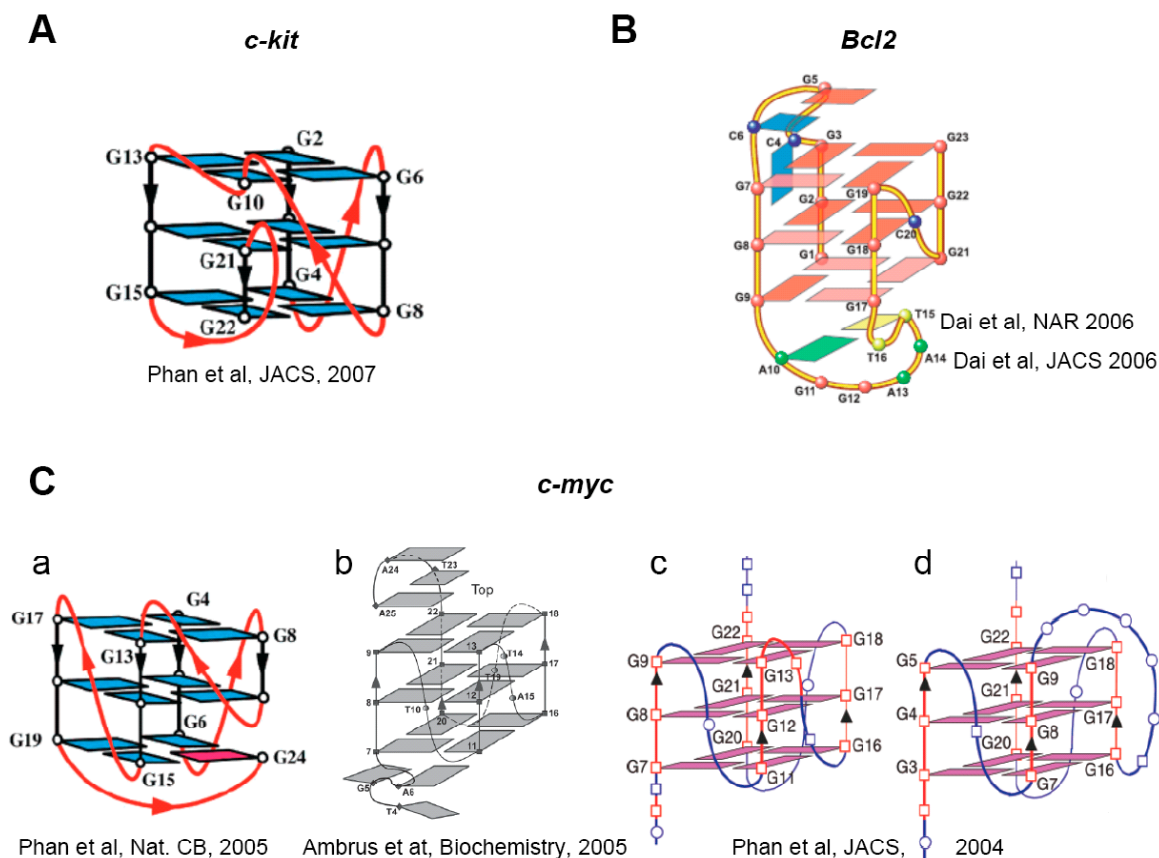


Figure 6: Structures en G-quadruplexe intramoléculaire de promoteurs résolues par RMN:

(A-C) Séquences de promoteurs d'oncogènes en présence de K^+ : (A) Promoteur de *c-kit* : 5'-AG₃AG₂CGCTG₃AG₂AG₃-3'[49] ; (B) Promoteur de *BCL2* : 5'-G₂CGCG₃AGGA₂T₂G₃CG₃-3'[25, 52] ; (C) Promoteur de *c-myc* : (a) 5'-TGAG₃TG₂IGAG₃TG₃GA₂GG-3'[54] ; (b) 5'-TGAG₃TG₃TAG₃TG₃TA₂-3'[55] ; (c) 5'-TGAG₃TG₃GAG₃TG₃GA₂-3' ; (d) 5'-TGG₃AG₃T₅AG₃TG₃GA₂-3'[56].

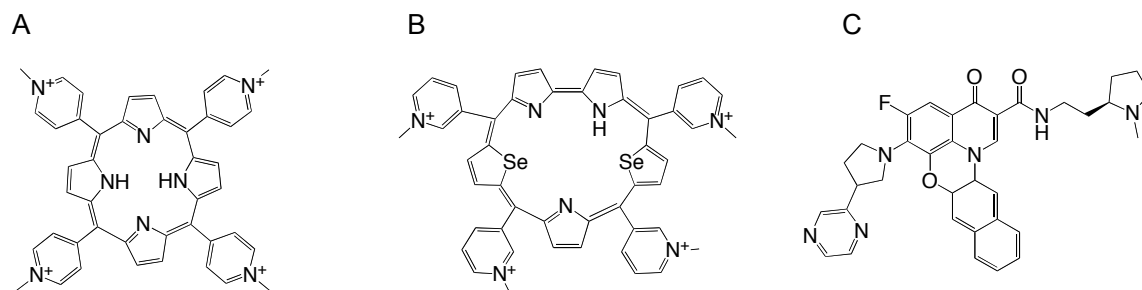


Figure 7 : Formules chimiques des ligands du G-quadruplexe de *c-myc* :

(A) la porphyrine cationique TMPyP4 [57, 58], (B) la diselenasapphyrine Se2SAP [59], et (C) la fluoroquinolone breveté par Cyline Pharmaceuticals nommée Quarfloxin (CX-3543) (brevet US 07141565)

Le promoteur le plus étudié dans le cadre de la formation de structures en G-quadruplexe est celui du gène *c-myc* (Figure 6C). Celui-ci code pour une phosphoprotéine nucléaire régulatrice de la prolifération et de la croissance cellulaire. Sa surexpression aberrante est fréquemment corrélée à une progression tumorale. La séquence la plus étudiée formant des G-quadruplexes intramoléculaires est présente dans l'élément hypersensible aux nucléases (NHE) III₁ du promoteur, qui contrôle jusqu'à 90% de la transcription du gène [60]. L. Hurley et ses collaborateurs ont beaucoup étudié ce promoteur en développant notamment des ligands pouvant se lier avec une plus ou moins grande spécificité aux G-quadruplexes intramoléculaires formés par cette séquence. Les structures des ligands développés sont présentées Figure 7.

L'analyse des ARNm, de cellules HeLa ou MiaPaCa traitées avec **TMPyP4**, à la concentration très élevée de 100 µM, pendant 12 à 48 h montre une répression de la transcription de *c-myc* et une diminution de son expression de 40% dans les cellules MiaPaCa, dès 12 h de traitement [58]. Le même traitement sur deux lignées différentes de lymphome de Burkitt possédant ou non le NHE III₁ du promoteur montre une diminution du transcrit uniquement dans les cellules possédant la région formant des G-quadruplexes [61]. Une répression de la transcription du gène *c-myc* par la formation du G-quadruplexe dans le promoteur du gène est proposée comme hypothèse. Une nouvelle stratégie anticancéreuse basée sur le développement de ligands ciblant spécifiquement la région promotrice de *c-myc* a donc été entreprise par L. Hurley en collaboration avec Cylene Pharmaceuticals. La **Quarflorin** (Figure 7C) a été développée en raison de sa sélectivité pour lier le G-quadruplexe de *c-myc*. Cette molécule est entrée en juin 2007 en phase II de développement clinique avec des effets *in vivo* intéressants sur un grand nombre de tumeurs, de bonnes propriétés pharmacocinétiques et une faible toxicité sur le cœur, la moelle osseuse, les reins et le foie. Cependant, cette molécule n'est plus présentée comme un ligand du quadruplexe du promoteur de *c-myc*, mais comme un inhibiteur de la biogenèse de l'ARN ribosomique. Cette molécule interagirait avec les régions G-riches de l'ADNr et inhiberait leur fixation à la nucléoline (cf. : § I.1.3.2). Cet exemple illustre la complexité de l'approche "ligand de G-quadruplexe". En effet, compte tenu du grand nombre de séquences potentielles, il n'est pas simple de corrélérer un effet biologique avec une cible particulière.

Séquences transcrites - quadruplexes d'ARN : Le repliement en G-quadruplexes de séquences d'ARN (ARNm et ARN non traduits) contenant plusieurs blocs de guanines est également possible. Il a d'ailleurs été montré que certains G-quadruplexes d'ARN possèdent une stabilité remarquable [62-64]. De plus, la formation de G-quadruplexes d'ARN paraît d'autant plus pertinente que l'ARN est simple-brin. De telles structures pourraient ainsi jouer des rôles

essentiels dans leur régulation et leur traduction. Nous détaillons ci-dessous quelques travaux suggérant l'implication des G-quadruplexes d'ARN dans ce type de processus.

Le syndrome de l'X fragile est la première cause de retard mental héréditaire. Il est causé par la perte de fonction (capacité à lier l'ARN) de la protéine FMRP et / ou la répression du gène de FMR1 codant pour la protéine. La sélection *in vitro* d'ARN liés par FMRP a montré que la protéine liait des séquences formant des G-quadruplexes [65]. Une analyse bioinformatique a ensuite montré qu'un grand nombre des transcrits reconnus par la protéine possédait des séquences capables de former des G-quadruplexes intramoléculaires [65]. Certains des ARNm pouvant former des G-quadruplexes codent pour des protéines impliquées dans la biologie du développement neuronal et synaptique [65, 66]. En particulier, la formation de guanines impliquées dans des G-quartets a été montrée par ¹H RMN (1D) pour l'ARNm de Map1B r(GGUCGCGGCGCUGGGAGAGGGCGGAGGGGGAGGCGGCGCGCGG) et par ¹H RMN (1D), arrêt de transcriptase inverse et par protection au DMS pour le propre transcrit de la protéine, FMR1 r(GAGACGGACGGCGGCGUGGAGGGGGAGGAAGAGGACAAGG-AGGAAGAGGACGUGGAGGAGGCUUCAAGGAAAC) [67, 68].

La présence d'un G-quadruplexe a également été démontrée dans la partie 3'-UTR des ARNm de IGF-II (humain et rat) r(GGAGGGGUGGGUGGGGGGCAGU-GGGGGCUGGG(C/U)GGGGGGA), en constatant un arrêt de transcriptase inverse dépendant de la présence de K⁺, et par des empreintes enzymatiques. Les auteurs suggèrent que cette structure serait impliquée dans le processus endonucléolytique permettant la maturation des ARNm de IGF-II [69].

Par ailleurs, de nombreuses études montrent que des motifs riches en blocs de guanines présents dans les introns jouent un rôle au niveau de l'épissage des ARNm [70-72]. Une récente analyse génomique des séquences pouvant former des G-quadruplexes sur les régions transcrites a permis la construction d'une base de données (GRSDB) contenant près de 54000 (sur 380000) PQS se situant à proximité (120 nt) des sites de "processing" des pré-ARNm [73]. Le rôle de la formation de G-quadruplexes dans l'épissage des transcrits reste encore à démontrer, néanmoins la présence de plusieurs PQS dans l'intron 6 du gène de hTERT (cf. § I.2.2.2.1 La télomérase), et l'effet d'un ligand de G-quadruplexe sur l'augmentation de l'épissage de cet intron suggère un rôle potentiel de ces structures dans la maturation des ARN [74].

Les séquences pouvant former des G-quadruplexes semblent également pouvoir jouer un rôle au niveau de la traduction des ARNm. L'IRES (site interne d'entrée du ribosome) du facteur de croissance FGF-2 contient une séquence susceptible de se structurer en quadruplexe intramoléculaire r(GCAGGAGGGAGGAGAACUGGGGGCGCGGAGGGCUGGUGGGUG-UCGGGGGUGGA) et qui contribuerait à l'activité traductionnelle [75]. Récemment, la formation

d'un G-quadruplexe d'ARN intramoléculaire r(UGUGGGAGGGGCGGGUCUGGG) dans le 5'UTR du proto-oncogène NRAS (après la coiffe en 5' et en amont du site d'initiation de la traduction) a été démontrée par l'équipe de Shankar Balasubramanian. La présence de la séquence pouvant former un G-quadruplexe réprime la traduction du gène rapporteur luciférase [63]. M. Wieland et J. Hartig ont également suggéré que la formation de G-quadruplexes d'ARN pouvait moduler l'expression d'un gène rapporteur dans *E. coli*. En particulier, l'effet répressif d'un G-quadruplexe en amont du gène de la GFP serait lié à la stabilité de la structure ARN. Les G-quadruplexes seraient ainsi capables d'agir comme des thermo-commutateurs artificiels, modulant l'expression des gènes en fonction de la température de croissance des bactéries. Il reste néanmoins à démontrer que la répression de l'expression n'est pas médiée par un effet sur la transcription dans les cellules [76].

Encore assez peu étudiés à ce jour, les G-quadruplexes d'ARN pourraient donc jouer des rôles essentiels au niveau cellulaire (maturation des ARN, reconnaissance ARN-protéines, traduction). Cependant, malgré la stabilité de ces G-quadruplexes, il est possible que d'autres types d'appariements (G-C et G-U) puissent entraver l'association des guanines entre elles. L'étude de la formation de G-quadruplexes dans un contexte complet (totalité de séquence), ou en présence d'autres séquences interagissant en compétition semble donc essentielle pour valider l'implication de ces structures dans de telles régulations. L'interaction avec des protéines reconnaissant de régions consensus riches en blocs de G pourrait également entrer en compétition avec leur repliement en G-quadruplexe.

1.3.2 Protéines reconnaissant les G-quadruplexes

C'est l'identification de protéines interagissant de manière privilégiée avec ce type de structures qui constitue certainement l'une des preuves indirectes la plus probante de l'existence des G-quadruplexes *in vivo* (pour revue récente voir :[77]).

On remarquera que la formation de G-quadruplexes intramoléculaires, sans doute plus pertinents biologiquement chez l'Homme, est difficile à mettre en évidence sans ambiguïté par mobilité en gels d'électrophorèse, d'autant plus que les marqueurs "simple-brin" oligothymidylates régulièrement utilisés ne sont pas appropriés [78]. Pour identifier des protéines interagissant avec les G-quadruplexes par retard de migration électrophorétique, l'utilisation de structures bi- ou tétramoléculaires est donc généralement employée. La caractérisation structurale de ces G-quadruplexes reste néanmoins assez sommaire la plupart du temps. Nous avons répertorié quelques-unes de ces protéines dans les Table 2 et Table 3, en précisant le substrat utilisé pour l'étude d'interaction, et le type (le plus probable) de G-quadruplexe formé.

Nom	Organisme	Mw ^a	Kd ^b	G4 reconnu	Références
LR1 : Nucléoline	<i>H. sapiens</i>	76 ^c	0,25 0,4 ~1	région “switch” de Ig (Sγ2B) région “switch” de Ig (Sγ2B) ADNr (ETS-1) (cf. § I.1.3.1)	[39, 79]
+		+	nd	d (ACTGTCGTACT ₂ GATAT ₄ <u>G₄</u> T ₄ <u>G₄</u>) (télomère <i>Oxytricha nova</i>) <i>G4 tétra- ou bimoléculaire</i>	
hn RNP D		45	0,5		
FMRP	<i>H. sapiens</i>	71	<50	ARN (cf. § I.1.3.1) <i>G4 intramoléculaire ?</i>	[65, 68]
Topo I	<i>H. sapiens</i>	90	nd	d (TTTTCTTTT <u>GGGGGT</u>) (PPT du VIH) <i>G4 tétramoléculaire</i> d (<u>GGG</u> (TTAG <u>GGG</u>) ₃) (télomère humain) <i>G4 intramoléculaire</i>	[80]
MutSα	<i>H. sapiens</i>	116	~1	région “switch” de Ig (Sγ2B) (cf. § I.1.3.1) <i>G4 tétra- ou bimoléculaire</i>	[81]
MyoD	<i>H. sapiens</i>	34,5	nd 1,7 nd	d (ACTGTCGTACT ₂ GATAT ₄ <u>G₄</u> T ₄ <u>G₄</u>) (télomère <i>Oxytricha nova</i>) d (CAT <u>G₅</u> C <u>G₃</u> AG <u>G₃</u> C <u>G₃</u> GTGT) (Intégrine 26) d (CTGAG <u>G₂</u> AG ₄ CT <u>G₂</u> AG ₃ ACCAC) (sMtCK) <i>G4 bimoléculaire (d'après les auteurs !)</i>	[82-84]
Thrombine	<i>H. sapiens</i>	70	25	d (<u>GGTTGGTGTGGTTGG</u>) (aptamère) <i>G4 intramoléculaire</i>	[85]
QUAD	<i>O. cuniculus</i> (lapin)	58	2,5-7	d (TACAGGGGAGCTGGGGTAGA) (région “switch” Ig) <i>G4 bimoléculaire ?</i>	[86, 87]
TEBP	<i>O. nova</i> α + β (N-terminal)	56 (α) 28 (β)	nd	d (TTTTGGGGTTTTGGGG) (télomère <i>Oxytricha nova</i>) <i>G4 bimoléculaire</i>	[88]
Sty3	<i>S. lemnae</i>	nd	0,125 171	d (TTTTGGGGT) <i>G4 tétramoléculaire “parallèle”</i> d (GGGG (TTTTGGGG) ₃) <i>G4 intramoléculaire “antiparallèle”</i>	[89]
Sty49	<i>S. lemnae</i>	nd	3 5	d (TTTTGGGGT) <i>G4 tétramoléculaire “parallèle”</i> d (GGGG (TTTTGGGG) ₃) <i>G4 intramoléculaire “antiparallèle”</i>	[89]
G4p1	<i>S. cerevisiae</i>	42	2	d (TATG ₂ AGCTG ₄ AAGGTG ₃ ATTT) <i>G4 tétramoléculaire</i>	[90]
G4p2		32	4,4		[91]
g5p	bactériophage filamenteux Ff	9,7	nd	Aptamères ADN <i>G4 intramoléculaires ?</i> d (GTTTTTGGGGCTTTTC) r (GUUUUUGGGGCUUUUC) <i>G4 tétramoléculaires</i>	[92] [93]
NCp	VIH	69	~8	d (TTGGGGGTACAGTGCA) (ADN flap central de HIV) <i>G4 tétramoléculaires</i>	[94]

Table 2 : Protéines fixant différents types de quadruplexes :

^a Mw : poids moléculaire en kDa. ^b Kd : constante de dissociation exprimée nM. nd : non déterminé. ^c 106 kDa sur SDS-PAGE.

L'action de certaines de ces protéines est détaillée ci-dessous :

La nucléoline : La nucléoline est une protéine très abondante dans les nucléoles des cellules de vertébrés, où ont lieu la transcription, la réplication et la recombinaison de l'ADNr, ainsi que la maturation de l'ARNr. La nucléoline a également été identifiée comme étant le deuxième polypeptide composant le facteur LR1, spécifique aux cellules B et liant les duplexes des régions de commutation de classe des Ig [95]. Nancy Maizels et ses collaborateurs ont montré que la nucléoline reconnaît des G-quadruplexes tétramoléculaires (issus des CSR des Ig, de l'ADNr ou des télomères d'*Oxytricha nova*) *in vitro* avec un Kd de l'ordre ou inférieur au nanomolaire [39, 79]. Par ailleurs, Duquette *et al.* ont montré que la nucléoline se lie aux boucles-G formées co-transcriptionnellement pour des ADN riches en blocs de guanines (CSR des Ig, ADNr, séquence télomérique humaine), suggérant également une liaison à des G-quadruplexes intramoléculaires (cf. : § I.1.3.1) [37]. Ces résultats laissent penser que la nucléoline, en liant des séquences riches en G formant des G-quadruplexes, pourrait faciliter la transcription de l'ADNr et des CSR et permettrait ainsi la recombinaison dans ces régions.

Bien que cette protéine soit mieux connue pour son rôle dans la biogenèse du ribosome, la nucléoline peut aussi bien être présente dans le noyau, dans le cytoplasme ou à la surface des cellules et possède de multiples fonctions (pour revue : [96]). En particulier, son inactivation par siRNA bloque la division cellulaire [97], et elle serait également surexprimée dans les cellules proliférant rapidement comme les cellules cancéreuses [98].

Ainsi, l'équipe de Paula Bates a montré que l'effet antiprolifératif d'oligonucléotides riches en guanines (GROs), formant des G-quadruplexes (cf. : § I.1.3.3) était corrélé à leur interaction spécifique avec la nucléoline [99]. D'autre part, le ligand du G-quadruplexe du NHE III₁ de *c-myc*, **CX-3543**, développé par Cylene Pharmaceuticals, pourrait également avoir comme cible indirecte la nucléoline.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent un rôle essentiel *in vivo* de la nucléoline au niveau des régions riches en G du génome, médié par son interaction avec des structures en G-quadruplexes.

Une fois formés, les G-quadruplexes sont des structures qui peuvent s'avérer d'une très grande stabilité. Il est donc raisonnable de penser que les cellules ont mis en place des mécanismes permettant de s'affranchir de ces appariements pour répliquer sans encombre leur ADN. Différentes équipes ont mis en évidence la capacité de certaines protéines à couper ou à défaire ces structures.

Nom	Organisme	Mw ^a	Activité sur les G-quadruplexes	Références
Topo I	<i>H. sapiens</i>	90	Induction G4 tétramoléculaire d (TTTCTTTGGGGGT) (PPT de HIV)	[80]
RAP1	<i>S. cerevisiae</i>	92,5	Induction G4 intermoléculaire d (AATTCT (GGGTGTGT) ₃ GGGTGTGG) (télomère levure)	[100, 101]
TEBP β	<i>O. nova</i>	41	Induction de G4 tétra- et bimoléculaires d (24 nt – TTTTGGGGTTTGGGG) d (24 nt – TTGGGGTTGGGG)	[102, 103]
TEBP β + α	<i>S. lemnae</i>	56+41	Induction G4 “antiparallèle” <i>in vivo</i> (cf. : Anticorps Sty49)	[104]
Topo II	<i>H. sapiens</i>	175	Clivage en 5' G4 tétramoléculaire Dérivé région “switch” de Ig (Sγ2B)	[105]
GQN1	<i>H. sapiens</i>	nd	Nucléase en 5' G4 tétramoléculaire région “switch” des Ig (Sγ2B)	[106]
KEM1 (XRN1/SEP1)	<i>S. cerevisiae</i>	175	Nucléase en 5' G4 tétramoléculaires région “switch” des Ig (Sγ2B)	[107-109]
UP1 (N-term de hnRNP A1)	<i>H. sapiens</i>	24	Déstabilisation de G4 intramoléculaires d (GGCA ₈) (Minisatellite Pcl (souris)) d (TTAGGG ₄) (télomère humain)	[110]
hPOT1	<i>H. sapiens</i>	71	Déstabilisation de G4 intramoléculaire d (GGG(TTAGGG) ₃) (télomère humain)	[111]
hRPA	<i>H. sapiens</i>	70 +32 +14	Déstabilisation de G4 intramoléculaire d (GGG(TTAGGG) ₃) (télomère humain)	[112]
Résolvase (DHX36p)	<i>H. sapiens</i>	120	Résout un G4 intermoléculaire d (A ₃ GTGATG ₂ TG ₂ TG ₅ A ₂ G ₂ AT ₂ CGA ₂ C ₂ T)	[113, 114]
Famille RecQ:			Activité RecQ hélicase	
BLM	<i>H. sapiens</i>	159		[115, 116]
WRN	<i>H. sapiens</i>	159	Sur G4 intermoléculaire d (21 nt – G ₅ AGCTG ₄ AAG ₂ TG ₃ – 7 nt) (région “switch” des Ig (Sγ2B))	[117, 118]
Sgs1	<i>S. cerevisiae</i>	164	d (16 nt – T ₄ G ₄ T ₄ G ₄ – 7 nt) (télomère Oxytricha nova)	[119]
RecQ	<i>E. coli</i>	68		[120]

Table 3 : Protéines ayant une activité biologique sur les G-quadruplexes : nucléase, “résolvase” ou “chaperone” (induisant une structure G4) :

^a Mw : poids moléculaire en kDa. ^b Kd : constante de dissociation exprimée en nM. nd : non déterminé.

G4-nucléases : La topoisomérase II peut cliver un G-quadruplexe tétramoléculaire issu des régions CSR des Ig (S γ 2B), à la jonction entre le simple brin et le G-quadruplexe, alors qu'elle ne coupe pas le simple-brin de séquence correspondante [105]. Plus récemment, une nucléase spécifique d'ADN G-quadruplexe appelée GQN1 a été purifiée à partir d'extraits de cellules B (Raji) et de cellules HeLa (plus faible activité). Cette nucléase coupe le G-quadruplexe tétramoléculaire issu des CSR des Ig (S γ 2B et S μ) en 5' du G4, mais aussi les G4 (tétra et bimoléculaires) formés par une séquence dérivée du télomère d'*Oxytricha nova*, démontrant davantage une spécificité de structure qu'une spécificité de séquence. La GQN1 ne clive pas les simple-brins et duplexes correspondants (S γ 2B oligonucléotide), ni le G4 ARN formé par cette même séquence, pas plus qu'une structure en jonction de Holliday [106]. Comparé à une nucléase de G-quadruplexes identifiée précédemment dans *S. cerevisiae*, Kem1p (aussi connue sous le nom de Sep1/Xrn1/Dst2/Rar5) [108], qui est en réalité une exonucléase active sur des ARNs (voir revue [121]), la GQN1 est bien distincte et se révèle être spécifique de l'ADN G4. Son utilisation a, par ailleurs, permis de mettre en évidence la présence de structure en G-quadruplexes dans les boucles G formées au cours de la transcription des régions de commutation de classe des Ig, suggérant également son activité sur des G-quadruplexes intramoléculaires [37].

G4-résolvases ou hélicases : Il a été montré que les hélicases ATP-dépendantes de type RecQ, en particulier les hélicases humaines BLM et WRN, déficientes dans les syndromes de Bloom (BS) et de Werner (WS), pouvaient résoudre des G-quadruplexes tétramoléculaires très stables [117], et faciliter la polymérisation de l'ADN Polymérase δ au travers de régions contenant les répétitions de trinuécléotides d(CGG) [122]. L'interaction aux G-quadruplexes serait médiée par un domaine conservé dans les hélicases de type RecQ, le domaine RQC [115] (Table 3). La présence de BLM au niveau des boucles G suggère également que ces hélicases sont actives sur des G-quadruplexes intramoléculaires [115].

La caractéristique partagée par ces deux syndromes (BS et WS), est une instabilité génomique menant à l'apparition prématurée de cancers. Ces protéines sont plus particulièrement essentielles à la stabilité et la fonction des régions riches en guanines, comme les télomères [123, 124] (cf. : § I.2.2.2.2) et l'ADNr [125], suggérant à nouveau l'existence d'un rôle des G-quadruplexes dans ces régions. Des ligands de G-quadruplexes ont été testés pour leur capacité à inhiber l'activité hélicase des protéines de la famille RecQ [118, 120, 126]. Il a été montré qu'une acridine tri-substituée (**BRACO19**, cf. : § I.3.3.1.2) inhibe efficacement l'activité de WRN et BLM sur un substrat formant des G-quadruplexes tétramoléculaires. Malheureusement, une inhibition dans les mêmes gammes de concentrations est observée sur d'autres substrats (jonction de Holliday, fourche, substrat double-brin). Celle-ci est probablement due à un manque de spécificité de ce

ligand pour la structure G4. En accord avec cette hypothèse, la porphyrine **NMM** (cf. : § I.3.3.1.4), plus sélective des structures G4, se révèle également plus sélective vis-à-vis de l'inhibition des hélicases RecQ, Sgs1 et BLM en fonction de leur substrat [120, 126].

Outres ces hélicases, d'autres protéines semblent interagir avec des G-quadruplexes intramoléculaires afin de déstabiliser la structure. Il est probable que des protéines, se liant avec une forte affinité aux simple-brins d'ADN comme UP1 [110], POT1 [111] ou RPA [112], déplacent simplement l'équilibre vers l'ouverture du G-quadruplexe. POT1 faciliterait ainsi l'accès de la télomérase à l'extrémité 3' de son substrat quand celui-ci peut se replier en G-quadruplexe intramoléculaire [111].

Induction et régulation de la formation de G-quadruplexes: Inversement, certaines protéines induisent la formation de structures en G-quadruplexe. C'est en particulier le cas de la Topoisomérase I qui à 0,4 nM permet la formation de près de 0,1 μ M de G-quadruplexe intermoléculaire en quelques heures, alors que la formation de la même quantité de celui-ci sans la protéine nécessiterait des concentrations d'oligonucléotide de l'ordre du millimolaire [80].

Un autre exemple en faveur de l'existence de structures en G-quadruplexe *in vivo*, notamment au niveau des télomères, est l'induction de G-quadruplexes par les "Telomere Binding Proteins" (TEBP), en particulier la sous-unité β des ciliés *Oxytricha nova* et *Stylonicchia lemnae*. En effet, les ciliés sont des organismes particulièrement intéressants pour l'étude des télomères car ceux-ci possèdent dans leur macronoyau de très nombreux minichromosomes (jusqu'à 10^8) dont chaque extrémité est un télomère. Chaque télomère d'*O. nova* et *S. lemnae* possède une extrémité 3' de 16 nt de séquence d(T₄G₄T₄G₄) (cf. : § I.2.2.1). Les anticorps spécifiques Sty3 et Sty49 (cf. : Table 2), dirigés contre les G-quadruplexes de forme "parallèles" et "antiparallèles" pouvant être formés par les séquences télomériques de *Stylonicchia lemnae*, ont été générés par "ribosome display". Leur utilisation en microscopie de fluorescence a permis de montrer l'existence de G-quadruplexes "antiparallèles" dans les ciliés, ainsi que leur résolution au cours de la réplication ; celle-ci étant caractérisée par une absence de marquage de la bande de réplication des ciliés par l'anticorps Sty49 [89]. Récemment, Rhodes, Lipps et leurs collaborateurs ont utilisé des expériences d'ARN interférence sur TEBP α et TEBP β dans *S.lemnae*, et les anticorps précédemment développés. Ils ont montré que TEBP α se lie à l'extrémité simple brin et permet l'ancrage des télomères à la structure subnucléaire, recrutant ensuite TEBP β pour induire la formation de G-quadruplexes "antiparallèles" [104]. Ceci est en accord avec des résultats obtenu précédemment par l'équipe de Thomas Cech dans *Oxytricha nova*, montrant un rôle de TEBP β dans l'induction de structures en G-quadruplexe [102, 103]. Par ailleurs, Rhodes *et coll.*, montrent que cette activité d'induction est régulée par la phosphorylation de TEBP β en phase S.

L'inhibition de cette phosphorylation empêche l'association de TEBP β avec le complexe entre le simple-brin télomérique et TEBP α ainsi que la résolution des G-quadruplexes au niveau de la bande de réplication.

Ces travaux constituent la preuve la plus directe de systèmes protéiques interagissant *in vivo* avec les G-quadruplexes pour réguler leur formation durant la réplication. Il est regrettable, mais compréhensible au vu du nombre beaucoup plus réduit de cibles, qu'une telle démonstration n'ait pu être réalisée dans des cellules humaines.

1.3.3 Effets cellulaires de courtes séquences riches en blocs de G

Aptamères : Les aptamères sont des acides nucléiques relativement courts qui se lient aux protéines et à d'autres composants cellulaires. À partir d'un ensemble aléatoire des séquences, ils sont sélectionnés par affinité pour la cible et amplifiés par PCR. Plusieurs cycles de sélection sont nécessaires pour permettre l'identification de quelques dizaines d'aptamères (approche SELEX). Plusieurs aptamères forment des G-quadruplexes *in vitro*. L'exemple le plus connu est l'aptamère se liant à la thrombine d(GGTTGGTGTGGTTGG) [127]. En interagissant spécifiquement avec la thrombine (en dehors de son site actif), il diminue l'agrégation des plaquettes et empêche l'interaction de la thrombine avec le fibrinogène, lui conférant des propriétés anticoagulantes et anti-thrombotiques [128].

Un autre aptamère possédant des blocs de G et des propriétés intéressantes contre l'intégrase de VIH a également été identifié : d(GGGGTGGGAGGAGGGT). Sa structure a été récemment résolue par RMN ; cet aptamère se structure en un dimère de G-quadruplexes, possédant en tout 6 G-quartets. Du "docking" moléculaire a été réalisé à partir de la structure de cet aptamère et a permis de proposer un site de fixation de cet ADN dans l'intégrase du VIH [129].

GROs : De nouveaux agents possédant des effets antiprolifératifs, indépendamment d'une activité antisens, ont émergé récemment. Il s'agit des GROs, pour Oligonucléotides Riches en Guanines (pour revue : [130]). La formation de G-quadruplexes par ces oligonucléotides a été montrée comme étant un caractère essentiel pour l'activité antitumorale. Néanmoins certains oligonucléotides formant des G-quadruplexes ne possèdent pas d'activité [131]. L'effet antiprolifératif est induit par un arrêt des cellules en phase S [132], et comme mentionné précédemment (cf. : § I.1.3.2), il est médié par une interaction directe avec la nucléoline [99]. Une étude plus récente montre qu'un autre partenaire, NEMO, est co-précipité par la nucléoline dans les cellules traitées avec ce type d'oligonucléotide. Celui-ci contribuerait à l'effet antiprolifératif par inhibition des voies de signalisation de NF- κ B [133]. Une propriété particulièrement

intéressante de ces GROs est que leur modification chimique n'est pas nécessaire pour les protéger de la dégradation par les nucléases, car la formation de G-quadruplexes les protège de ces processus enzymatiques. Ils semblent par ailleurs entrer "seuls" dans les cellules, probablement par interaction avec la nucléoline (ou un fragment de celle-ci) présente à la surface des cellules. Notons que la nucléoline serait exprimée spécifiquement à la surface des cellules cancéreuses, ce qui permettrait d'expliquer la faible toxicité de ces GROs vis-à-vis des cellules normales [133, 134].

Le GRO AS1411 (connu aussi sous le nom AGRO100), de séquence d(GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG), a été testé en phase I d'essais cliniques en 2005 par le "Brown Cancer Center" de Louisville (KY, USA) [135, 136] et s'est révélé très efficace, avec une très bonne tolérance, sur des cancers rénaux et plus récemment sur les leucémies (AML). L'entreprise Antisoma a initié une phase II d'essais cliniques en juin 2007 pour le traitement de leucémie (AML) avec cet agent en association avec la cytarabine (Ara-C), et la phase II devrait prochainement commencer pour le traitement de cancers rénaux. Ceci souligne le potentiel thérapeutique des structures en G-quadruplexe comme agent ciblant une protéine multifonctionnelle comme la nucléoline [134].

Oligonucléotides mimant les télomères : Des oligonucléotides courts (11 à 22 nt) appelé T-oligos, mimant la séquence de l'extrémité 3' des télomères (motif d(TTAGGG), cf. : § I.2.2.1 ADN télomérique), peuvent induire l'apoptose, la sénescence, l'autophagie et/ou la différenciation dans différents types de cellules cancéreuses, avec des toxicités faibles sur des cellules normales (pour revue récente : [137]). Les auteurs suggèrent que cette activité antiproliférative est liée à la reconnaissance de l'extrémité 3' exposée des télomères, mimée dans leur cas, par ces oligonucléotides, comme un dommage activant les voies de réparation. La relation existant entre la formation de G-quadruplexes et l'activité anti-tumorale de ces séquences d'ADN n'est pas démontrée formellement, d'autant plus que des résultats récents montrent que la formation de G-quadruplexe sur un modèle oligomérique d'extrémité 3' sortante inhibe le recrutement de protéines de signalisation des dommages de l'ADN dépendant de DNA-PK [138]. Il est par ailleurs difficile de dissocier un effet de séquence dû à la présence du motif télomérique, de la formation de G-quadruplexe.

1.4 Applications pour les nanotechnologies

Outre les implications biologiques de ces structures, les propriétés d'auto-assemblage des G-quadruplexes, leur stabilité et leur rigidité s'avèrent particulièrement intéressantes dans une perspective de développement liée aux nanotechnologies. Quelques exemples d'applications potentielles concernant la fabrication de nanofils pour l'électronique moléculaire (approche "bottom up"), de machines moléculaires ou de nanopores.

Certaines séquences d'ADN contenant des blocs de guanines sont non seulement capables de former des G-quadruplexes, mais par des appariements décalés, peuvent conduire à la formation de structures supramoléculaires en fils, appelées "G-wires". La séquence télomérique du cilié *Tetrahymena thermophila* d(G₄T₂G₄) peut s'assembler en "G-wires" mesurant jusqu'à 1 µm de long et 2,5 nm de diamètre, en accord avec le diamètre d'un G-quadruplexe. Une fois formés ces complexes sont extrêmement stables et peuvent résister à des conditions dénaturantes classiques (40-50% formamide / 7-8 M urée, 100°C) [139]. Récemment, Sugimoto et ses collaborateurs ont conçu une séquence d'ADN contenant 2 blocs de 4 guanines reliés par des espaceurs éthylène glycols et une bipyridine centrale. La bipyridine permet la chélation d'un cation divalent, dans ce cas Ni²⁺, et sa présence induit rapidement la transition entre une G-quadruplexe bimoléculaire et la formation de "G-wires" "artificiels". L'ajout d'EDTA permet par chélation du Ni²⁺, une réversibilité du système. La taille des structures ainsi obtenues peut atteindre près de 200 nm. Néanmoins la rigidité de ces fils reste assez décevante ; ceci est probablement dû à un manque de rigidité des espaceurs éthylène glycols introduits [140].

Les structures en G-quadruplexes, et plus particulièrement les "G-wires" peuvent constituer des approches séduisantes pour la construction de fils moléculaires, pour des applications en microélectronique. En effet, il est possible que la présence de cations centraux coordonnés par les fonctions carbonyles des G-quartets, permette un transport électronique et donc une bonne conductivité de ces structures. D. Porath et ses collaborateurs ont montré que des ADN G-quadruplexes formés par des poly-dG en présence de potassium étaient polarisables par microscopie de force électrostatique, alors que des ADN double-brins adsorbés sur du mica ne le sont pas. Ceci peut s'expliquer par une plus grande rigidité et une plus grande résistance aux forces de surfaces des structures G-quadruplexes [141]. Ceci suggère effectivement que l'ADN G4 pourrait être un meilleur conducteur et candidat que de l'ADN duplexe pour la fabrication de fils moléculaires appliqués à la microélectronique. Néanmoins la production, la fonctionnalisation et le contrôle de la création de nano-constructions à partir de G-quadruplexe pourraient s'avérer plus complexes qu'avec un duplexe classique d'ADN.

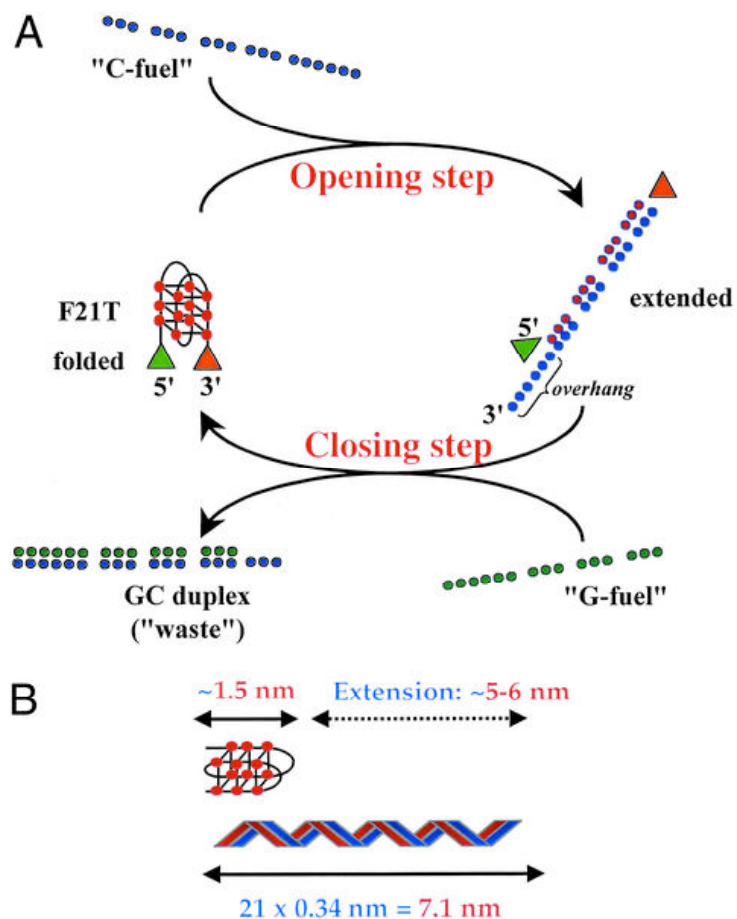


Figure 8 : Schéma d'une machine moléculaire basée sur l'ouverture et la fermeture d'un G-quadruplexe (d'après [142])

(A) Cycle d'ouverture et de fermeture de la machine (B) Extension générée par l'ouverture du G-quadruplexe.

L'ouverture et fermeture d'un G-quadruplexe intramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine, a également permis de créer une nanomachine moléculaire. En effet, un mouvement d'extension peut être induit par l'ajout d'un brin complémentaire à la séquence ("C-fuel"), et peut être inversé par l'ajout d'un oligonucléotide ("G-fuel") formant un duplexe plus stable avec le "C-fuel". En théorie, ceci peut conduire à un mouvement d'extension/ contraction sur une distance de 5,5 nm ; de 1,5 nm (G4) à 7 nm (duplexe) entre les extrémités 5' et 3' [142, 143] (Figure 8).

Enfin, Jeffery Davies et ses collaborateurs ont étudié l'association des guanosines monophosphate et de leurs modifications chimiques en G-quartets (ou G-multiplets) pour former des empilements en G-quadruplexes lipophiles. Ils ont montré qu'en utilisant des nucléosides modifiés en 5' par un groupement permettant de lier de façon covalente les guanosines empilées (réaction de métathèse oléfinique), ils formaient une structure lipophile permettant de transporter des ions Na^+ au travers d'une bicouche lipidique mimant une membrane [144].

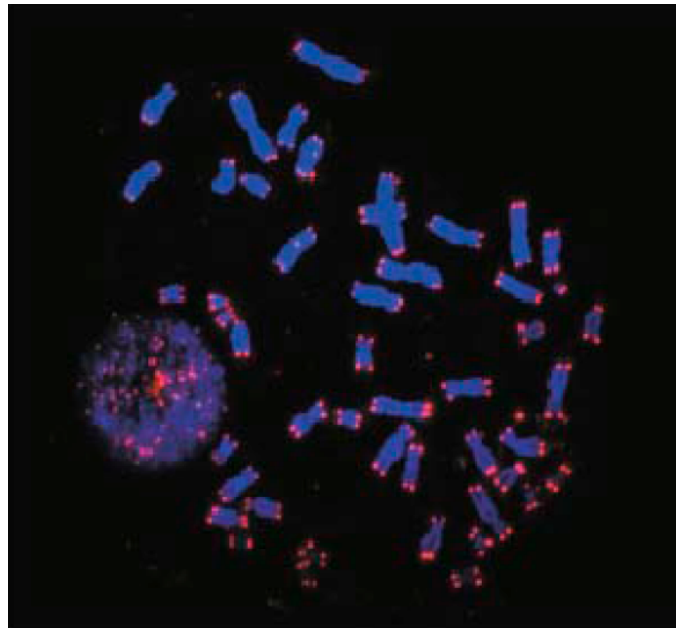


Figure 9 : Hybridation *in situ* en fluorescence des télomères (en rouge) à l'extrémité des chromosomes de fibroblastes primaires : D'après [145].

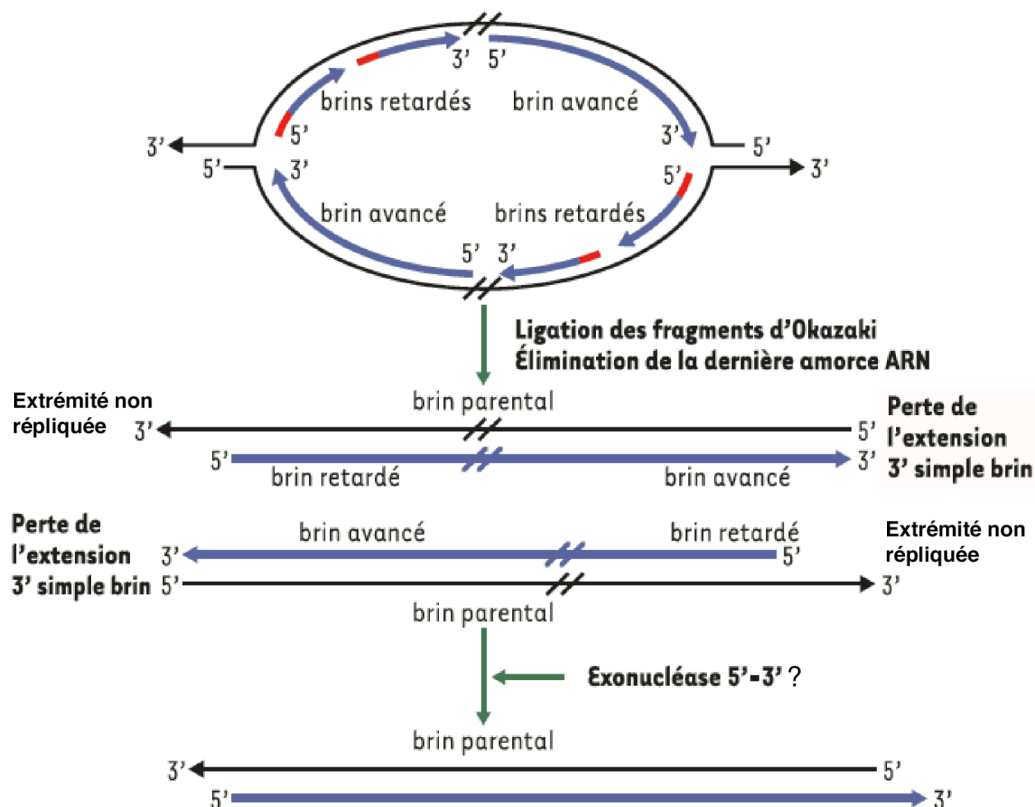


Figure 10 : Le problème de réplication terminale :

Cette figure, d'après [146], illustre le problème de la réplication terminale au niveau du brin retardé* ("lagging strand"), aussi appelé brin discontinu. L'élimination de la dernière amorce ARN en 5' (qui n'est pas remplacée) conduit ainsi à un raccourcissement progressif des télomères au cours des divisions cellulaires, en absence d'une machinerie spécifique. Ceci génère une extrémité 3' sortante. Par ailleurs une activité exonucléase 5'-3' pourrait expliquer la génération d'extrémités 3' sortantes au niveau du brin continu, ou avancé* ("leading strand"). *en québécois dans le texte.

2 Les Télomères : Rôle, Structure et Maintenance

2.1 Historique et fonction biologique

En 1938, H.J. Muller observa que des délétions ou des inversions induites par irradiation aux rayons X de l'ensemble du génome étaient quasiment indétectables dans les régions terminales des chromosomes de drosophile [147]. Il en conclut que les extrémités des chromosomes, qu'il nomma télomères, devaient posséder une structure particulière capable de stabiliser les chromosomes (Figure 9). À la même époque, B. McClintock démontrait que des chromosomes du maïs ayant subi des cassures double-brins étaient capables de fusionner entre eux, contrairement à leurs extrémités naturelles qui demeuraient stables [148].

Une vingtaine d'années plus tard, en 1961, Leonard Hayflick montrait que des cellules humaines issues de tissus embryonnaires avaient, en culture, un potentiel de réplication limité, d'environ 50 divisions (limite de Hayflick) [149]. Au début des années 1970, suite à la découverte du mécanisme de réplication de l'ADN, Alexander Olovnikov proposa un mécanisme expliquant la réplication limitée des cellules par érosion des télomères à chaque division cellulaire (Figure 10) [150]. En 1990, C. Harley montra effectivement que la taille moyenne des télomères diminue avec le nombre de divisions cellulaires dans des fibroblastes humains [151]. Il relia ainsi les télomères au vieillissement cellulaire et parla notamment d'horloge mitotique, même si le terme de compteur mitotique aurait été certainement plus adapté [152].

Les télomères jouent donc des rôles essentiels dans la protection du matériel génétique notamment vis-à-vis des cassures double-brins et de l'érosion due aux divisions cellulaires (en jouant le rôle de "zone tampon"), mais ils protègent également de la dégradation par les nucléases et des phénomènes de recombinaison. Les premiers résultats de B. McClintock montrent que leur structure doit permettre la reconnaissance des extrémités de chromosomes par la cellule, pour éviter les fusions chromosomiques dues à des réparations intempestives. Ainsi, le complexe nucléoprotéique constitué par l'ADN télomérique et des nombreuses protéines associées est souvent décrit comme étant une structure "coiffante" ("capping structure").

Outre ce rôle dans la protection du génome, les télomères pourraient également avoir des rôles dans l'ancrage à la membrane nucléaire, et dans la ségrégation des chromosomes au moment de la mitose et de la méiose (pour revue voir [153]). Un rôle dans la répression de l'expression de gènes dans les régions subtélomériques a également été montré (pour revue voir [154]).

2.2 Structure

2.2.1 ADN télomérique

2.2.1.1 Les séquences d'ADN télomériques

Le premier motif télomérique a été caractérisé chez le cilié *Tetrahymena thermophila* par Elisabeth Blackburn [155]. Comme mentionné précédemment, les ciliés ont l'avantage de présenter un nombre très important de chromosomes dans leur macronoyau. Blackburn a montré que l'extrémité des chromosomes de ce cilié était constituée du motif hautement répété d(GGGGTT/AACCCC). Ce type de répétitions présentant une asymétrie des guanines et des cytosines sur les deux brins, est largement conservé au cours de l'évolution (Figure 11). Chez tous les vertébrés, et donc chez l'homme, le motif télomérique est constitué par la séquence d(GGGTTA/TAACCC).

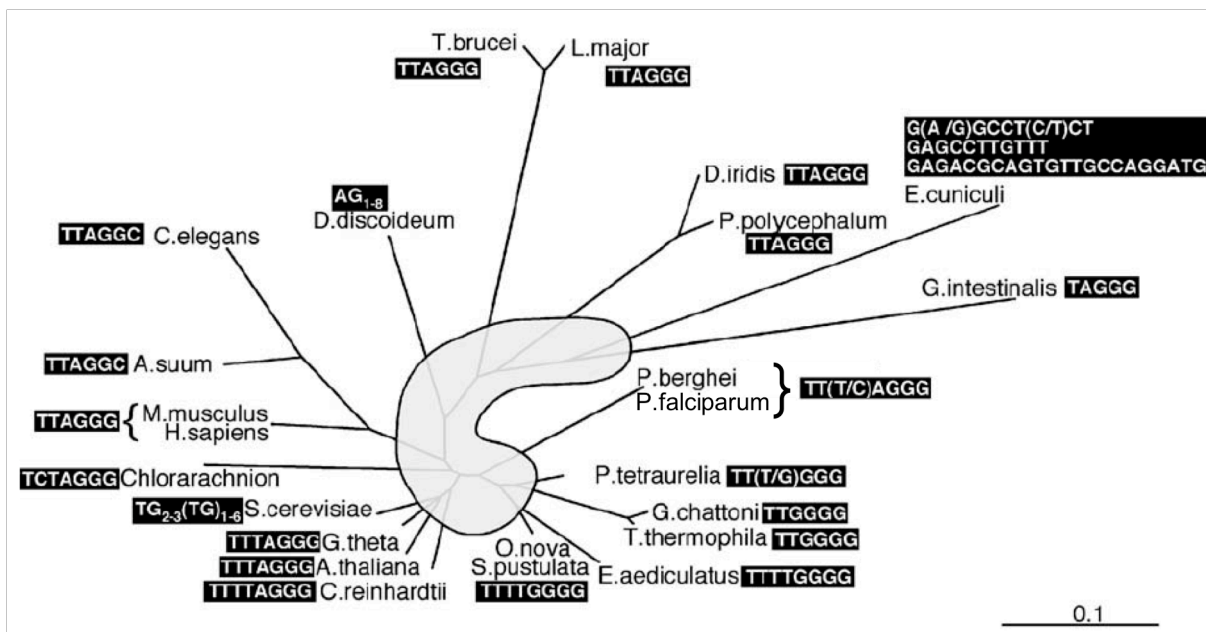


Figure 11 : Motifs télomériques chez les eucaryotes : Arbre phylogénique permettant de voir la conservation des motifs télomériques chez les eucaryotes et leur richesse en blocs de G (d'après [156])

La taille moyenne des télomères varie considérablement d'une espèce à l'autre : de 50 à 150 kb chez la souris *Mus musculus*, de 5 à 15 kb chez l'homme, de 1 à 2 kb chez *Plasmodium falciparum*, et inférieure à 50 bp sur les minichromosomes de ciliés. Mais le nombre de répétitions des motifs télomériques varie également au sein d'une espèce et même entre les différents chromosomes d'une même cellule. Chez l'homme, les télomères sont plus long dans les cellules germinales que dans les tissus somatiques, et reflètent certainement des différences dans leur maintenance.

En raison de la dégradation du fragment d'Okasaki lors de la réplication terminale des chromosomes linéaires sur le brin retardé (Figure 10), le brin riche en guanines, correspondant à l'extrémité 3', doit être plus long que le brin riche en cytosines. Une extrémité 3' simple-brin sortante ou "overhang" est donc générée. Celle-ci a été démontrée chez plusieurs organismes présentés dans la table ci-dessous :

Organismes	Taille (nt)	Motif télomérique	Référence
Ciliés :			
<i>Tetrahymena thermophila</i>	14-15 ou 20-21	d(TT <u>GGGG</u>)	[157]
<i>Oxytricha nova</i>	16	d(TTTT <u>GGGG</u>)	[158]
<i>Stylonicchia pustulata</i>	16		
<i>Euplotes aediculatus</i>	14		
Levure :			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>30 (en phase S)	d(T <u>G</u> ₂₋₃ (TG) ₁₋₆)	[159]
Plantes :			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	> 20-30	d(TTTA <u>GGG</u>)	[160]
<i>Silene latifolia</i>			
Kinetoplastidés :			
<i>Trypanosoma brucei</i>	<30 ou ~ 100	d(TTA <u>GGG</u>)	[161, 162]
Mammifères :			
<i>Mus musculus</i>	> 20	d(TTA <u>GGG</u>)	[163]
<i>Homo sapiens</i>	100-200 en moyenne		[164, 165]

Table 4 : Existence et longueur de l'extrémité télomérique 3' sortante de quelques organismes.

Les travaux de Markov *et al* ont suggéré que dans les cellules humaines, un mécanisme supplémentaire de dégradation du brin C aux extrémités serait à l'origine de cette extrémité 3' sortante [166]. En effet, sans ce mécanisme, seul le brin discontinu devrait être raccourci à chaque cycle de division cellulaire (Figure 10). Cette hypothèse est supportée par les travaux de Wright et Shay qui ont montré récemment que les extrémités 3' sortantes issus du brin discontinu étaient plus longues que celles générées sur le brin continu [167]. De plus, l'étude des séquences terminant les chromosomes a montré que le brin C se termine principalement par le motif 5'-CTAACC [168]. La prédominance de ce motif suggère également l'existence d'un mécanisme enzymatique permettant de cliver le brin C à un nucléotide précis. (Pour revue récente sur la réplication des télomères voir référence : [169] [170]).

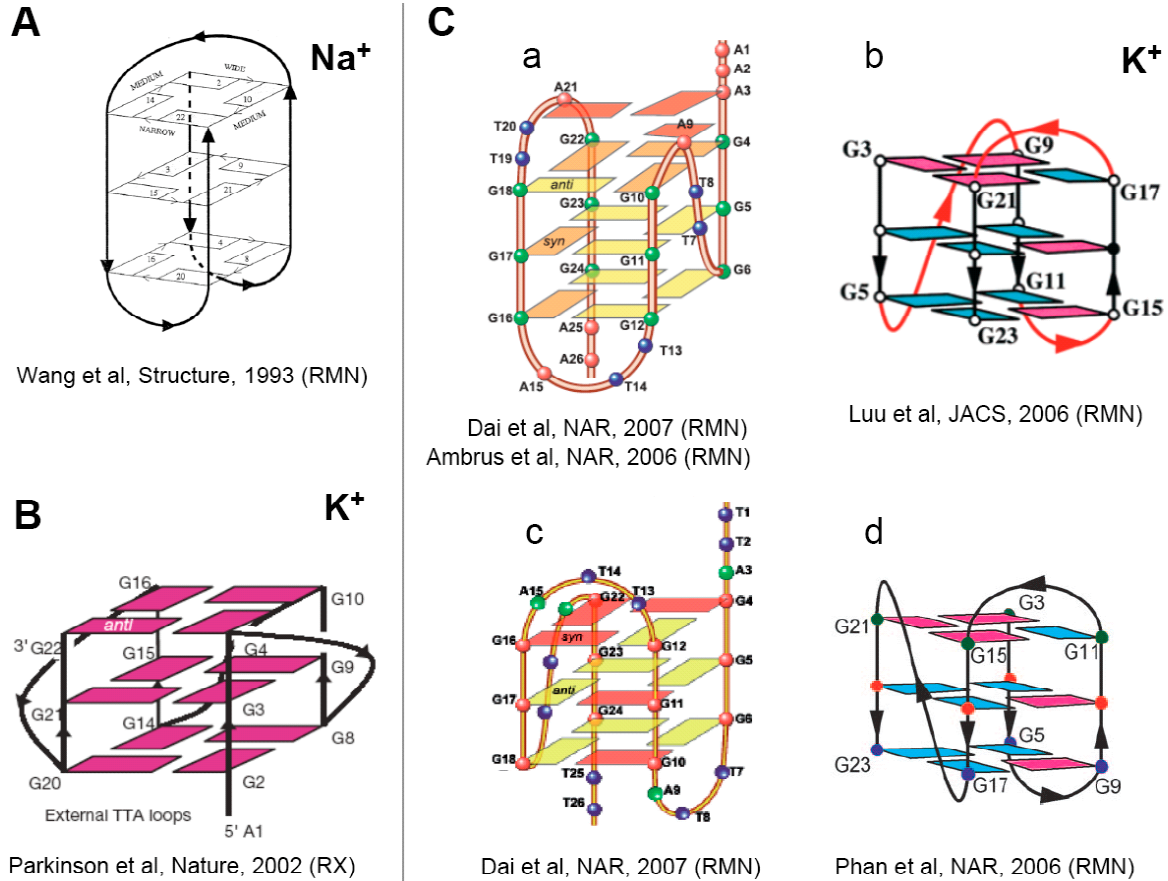


Figure 12: Topologie des G-quadruplexes télomériques humains intramoléculaires déterminées par RMN ou cristallographie et diffraction de rayons X (RX):

(A) Structure dite de type “basket”, souvent appelée “forme antiparallèle” (cf. : spectres de dichroïsme circulaire) résolue par RMN en présence de Na⁺ : 5'-AG₃(T₂AG₃)₃-3' [171]; (B) Structure dite de type “propeller”, souvent appelée “forme parallèle” (cf. : spectres de dichroïsme circulaire) résolue par cristallographie en présence de K⁺ : 5'-AG₃(T₂AG₃)₃-3' [172] (C) Structures résolues par RMN en présence de K⁺ : (a-b) Forme “Hybride 1” (a) 5'-A₃G₃(T₂AG₃)₃A₂-3' [24, 173] ; (b) 5'-T₂G₃(T₂AG₃)₃A-3' [174]; (c-d) Forme “Hybride 2” (c) 5'-T₂AG₃(T₂AG₃)₃T₂-3' [175]; (d) 5'-TAG₃(T₂AG₃)₃T₂-3' [176].

Récemment la 5' exonucléase Apollo, qui est présente aux télomères, a été proposée pour remplir cette fonction et permettre de protéger le télomère en phase S du cycle cellulaire [177, 178]. Néanmoins la démonstration de son rôle au niveau du clivage du brin C n'a pas été établie. Comme nous le verrons plus loin, la présence de cette extrémité 3' sortante semble déterminante pour permettre au télomère de remplir sa fonction de protection du chromosome. Elle joue vraisemblablement un rôle essentiel dans la structure du télomère.

La suite de cette partie introductive sur les télomères portera essentiellement sur les télomères humains. Nous aborderons plus particulièrement en introduction du 4^{ème} chapitre de ce manuscrit les télomères du parasite *P.falciparum* et ce qui est actuellement connu de leur maintenance.

2.2.1.2 Les G-quadruplexes télomériques

Lorsque Sen et Gilbert identifient en 1988 la formation de G-quadruplexes au sein des CSR des immunoglobulines, ils leur attribuent également un rôle potentiel au niveau des télomères, et notamment lors de la méiose [36]. En effet, la présence de motifs répétés riches en blocs de guanines et d'une extrémité 3' sortante correspondant au brin riche en guanines, font, en théorie, des télomères des régions privilégiées pour la formation de quadruplexes de guanines.

La formation de G-quadruplexes bimoléculaires à partir des courtes extrémités 3' sortantes (16 nucléotides) des télomères de ciliés *O.nova* ou *S.lemnae* a été montrée par cristallographie [172] et RMN [179]. Leur structure présente des brins en orientation anti-parallèle 2 à 2 avec des boucles diagonales (Figure 4A, milieu). La formation de ces structures est en accord avec les résultats *in vivo* obtenus grâce aux anticorps développés contre ce type de G-quadruplexes (cf. : § I.1.3.2) [89, 104]. Ceci suggère donc un rôle des G-quadruplexes dans l'appariement les minichromosomes 2 à 2 avec les sous-unités α et β de TEBP, et dans la protection ou la structure des télomères de ciliés.

Chez l'Homme, la présence d'extrémités mesurant 100 à 200 nucléotides de long et leur éloignement en interphase rend moins probable la formation de G-quadruplexe intermoléculaires. La formation de G-quadruplexes intramoléculaires à partir de la séquence télomérique humaine a donc été davantage étudiée. La première structure d'un G-quadruplexe intramoléculaire pour la séquence télomérique humaine a été résolue par RMN par Wang et Patel en présence d'ions sodium (Figure 12A). La structure G-quadruplexe de la même séquence en potassium, plus pertinent du point de vue de la composition du milieu intracellulaire, a été plus difficile à identifier en raison de l'important polymorphisme des G-quadruplexes formés par cette séquence.

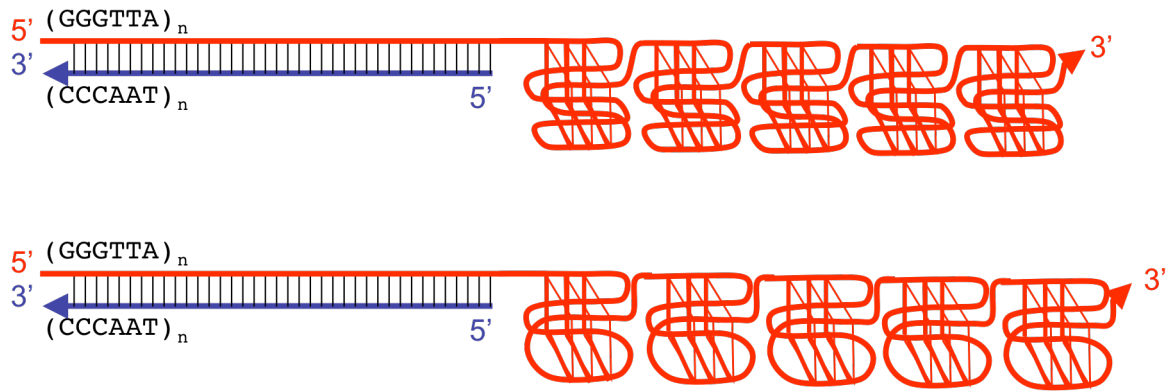
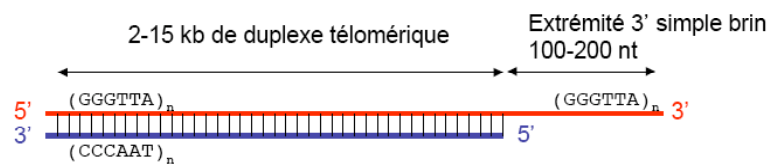


Figure 13 : Conformations hypothétiques de l'extrémité télomérique 3' sortante humaine.

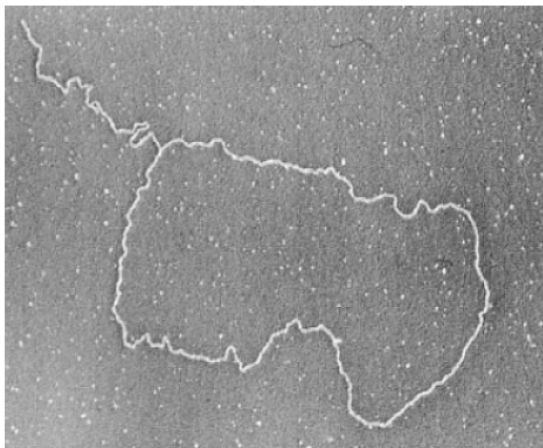
(haut) empilement de G-quadruplexes "parallèles" ou (bas) empilement de G-quadruplexes "mixtes" ou "hybrides".

A

ADN
Télomérique
Humain



B



C

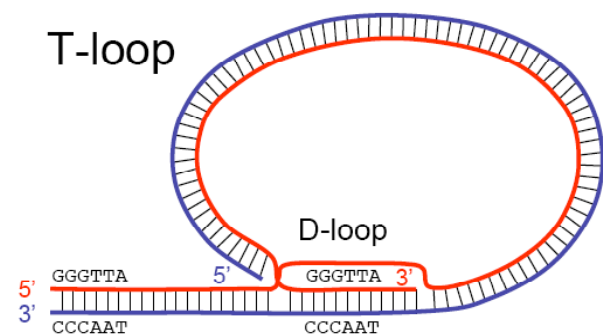


Figure 14 : Formation de la T-loop au télomères :

(A) Schéma de l'ADN télomérique humain (B) Image en microscopie électronique : large boucle formé par de l'ADN télomérique extrait de cellules HeLa (noyaux traités au psoralène et irradiation UV) [180] . (C) Modèle proposé pour la formation de ces boucles consistant en une invasion de l'extrémité 3' riche en guanines dans le duplexe télomérique (D-loop pour boucle de déplacement).

En 2002, Gary Parkinson parvient pourtant à cristalliser et à résoudre la structure en G-quadruplexe formée par cette séquence. Celle-ci présente une orientation parallèle des brins, reliés par des boucles en “forme de N”. Cette structure s’avère cependant assez controversée, notamment en raison des conditions de cristallisation qui semblent influencer sur le repliement du G-quadruplexe (Figure 12B). En modifiant légèrement les extrémités de la séquence, A.T. Phan et D. Yang identifient presque simultanément par RMN des nouvelles structures en G-quadruplexe à partir de la séquence télomérique humaine. Celles-ci présentent des conformations “hybrides” avec 3 brins parallèles et 1 brin anti-parallèle, liés par 2 boucles latérales et une boucle en forme de N (Figure 12C).

Les conformations “hybrides” et “parallèles” permettent notamment d’imaginer l’empilement de plusieurs G-quadruplexes tout au long de l’extrémité 3’ sortante comme le propose la Figure 13. Néanmoins l’existence de ces structures hybrides ou de toute autre structure G-quadruplexe au niveau des télomères reste encore à démontrer. En effet, bien que l’existence de G-quadruplexes soit bien argumentée chez les ciliés, leur existence au sein de cellules humaines reste plus évasive. L’équipe de François Boussin, avec qui nous avons collaboré, a contribué à lever le voile sur cette question en utilisant un ligand spécifique des G-quadruplexes radiomarké au tritium (**360A**, cf. § I.3.3.1.1). Les expériences cellulaires réalisées ont montré une accumulation préférentielle du ligand au niveau des extrémités des chromosomes de cellules normales et tumorales, suggérant la présence ou l’induction de G-quadruplexes au niveau des télomères dans des cellules humaines [181].

2.2.1.3 La “T-loop”

La T-loop, pour boucle télomérique (“telomeric-loop”) constitue depuis 1999 le modèle de référence pour décrire la structure du télomère humain. Ces boucles ont été mises en évidence *in vivo* par pontage au psoralène de cellules humaines (normales et tumorales) et de souris, et visualisation par microscopie électronique de leur ADN télomérique [180] (Figure 14). De manière comparable aux premières étapes de la recombinaison homologue, cette large boucle résulterait de l’invasion de l’extrémité 3’ sortante riche en guanines dans le duplexe télomérique. Une telle conformation a également été mise en évidence dans *Trypanosoma brucei* [162], le petit pois [182], aux l’extrémités de chromosomes polytènes de ciliés [183] et dans un contexte chromatinien dans des cellules de poulet et de souris [184]. La T-loop permettrait de masquer les extrémités télomériques simple-brins par association avec les protéines télomériques (cf. : § I.2.2.2), et contribuerait ainsi à la fonction de protection du télomère. *In vitro*, sa formation est médiée par la protéine TRF2 (cf. : § suivant) [185, 186].

2.2.2 Protéines télomériques

2.2.2.1 Les protéines spécifiques des télomères et de leur maintenance

2.2.2.1.1 LES PROTEINES DU “TELOSOME” OU COMPLEXE “SHELTERIN”

Les protéines qui protègent les extrémités des chromosomes ont été identifiées graduellement au cours des 10 dernières années. Parmi elles, un large complexe d'environ 1 MDa composé de 6 protéines peut être isolé par tamisage moléculaire à partir d'extraits nucléaires. Ce complexe a été nommé télosome [187] ou complexe “Shelterin” (protection) [188]. Trois des protéines du complexe se lient directement à l'ADN télomérique : TRF1, TRF2 et POT1. (Figure 15). TRF1 et TRF2 possèdent un domaine de liaison à l'ADN double brin de type Myb, reconnaissant la séquence (5'-YTAGGGTTTR-3'/5'-YAACCCTAR), tandis que POT1 possède 2 domaines de liaison de repliement oligonucléotide / oligosaccharide (OB), et montre une forte préférence pour le simple brin télomérique et la séquence (5'-TTAGGGTTAG-3'). Les trois autres protéines sont TIN2 (qui lie TRF1, TRF2 et TPP1), TPP1 (appelée précédemment TINT1, PTOP ou PIP1, et qui lie TIN2 et POT1), et RAP1 (qui lie TRF2). Ce complexe protéique spécifique des télomères semble faire la connexion entre le duplexe télomérique et l'extrémité 3' simple brin. Il a été montré que l'interférence fonctionnelle de chacune de ces protéines par ARNi ou expression d'un dominant négatif affectait la taille ou la protection des télomères, démontrant leur rôle dans la maintenance des télomères [188].

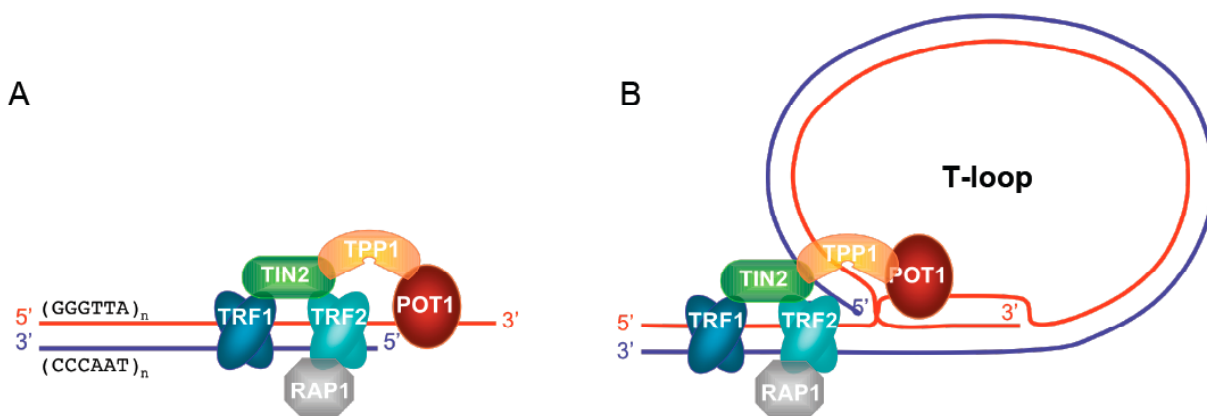


Figure 15 : Le télosome ou complexe “Shelterin” :

TRF1 et TRF2 sont liées directement à l'ADN double brin alors que POT1 se lie au simple brin. TPP1 et TIN2 permettent de faire la jonction entre TRF1/TRF2 et POT1. RAP1 est liée à TRF2. Deux modèles sont représentés : (A) télomères “ouverts”, avec une extrémité 3' sortante liée par POT1, et (B) le télomère “fermé” replié en T-loop. POT1 se lie au brin G déplacé par l'invasion de l'extrémité 3'.

Titia de Lange a proposé un modèle de régulation de la longueur et la protection du télomère en fonction de l'état du complexe "shelterin" avec l'ADN télomérique. L'existence de ce complexe dans deux ou trois états peut être envisagée [188] :

- un état fermé ou "capuchonné" (Figure 15B) dans lequel l'extrémité 3' sortante n'est pas accessible aux réactions enzymatiques de dégradation, de réparation ou d'élongation par la télomérase (cf. : § suivant : La télomérase)
- un état "ouvert" (Figure 15A) dans lequel les protéines du télosome sont présentes et protègent le télomère mais laissent l'extrémité 3' accessible à la télomérase, durant les étapes d'élongation et de réplication du télomère notamment.
- un état "décapuchonné", dans lequel certaines protéines du complexe sont altérées, ce qui conduit à une dysfonction du télomère, entraînant une réponse aux dommages de l'ADN liée à la reconnaissance de cassures double-brin et la formation de "dysfunctional Telomere-Induced Foci" (TIFs).

A l'origine de ce modèle de protection et de régulation de la longueur des télomères, on peut citer les premiers travaux sur la surexpression de TRF1 et TRF2 régulant négativement la longueur des télomères [189, 190], et l'inhibition de TRF2 par un effet dominant négatif induisant des fusions chromosomiques et une perte de l'extrémité 3' télomérique, sans perte majeure de duplexe télomérique [191]. Ce dernier résultat a permis de mettre en évidence le fait que la longueur du duplexe télomérique n'est pas seule responsable de la protection des chromosomes. L'augmentation d'abondance des deux protéines avec la longueur des télomères laisse supposer que TRF1 et TRF2 ne sont pas uniquement localisées à la jonction entre le simple-brin et le duplexe télomérique [190].

TRF2 a été intensivement étudiée en particulier pour le rôle essentiel qu'elle semble jouer au sein du complexe "shelterin". En effet, il a été montré que sa présence était (i) suffisante pour reconstituer *in vitro* la structure en T-loop [180, 185], et (ii) nécessaire dans des extraits nucléaires pour permettre l'invasion d'un brin télomérique riche en guanines dans un plasmide contenant des répétitions télomériques [192]. En outre, des travaux récents montrent qu'elle agirait sur la topologie de l'ADN pour permettre l'invasion de brin [186]. Son rôle pourrait également consister à inhiber la recombinaison homologue au niveau de la T-loop (résolution de la D-loop). Cette hypothèse a notamment été suggérée par l'expression d'un mutant du domaine basique de TRF2 dans des cellules télomérase positives, qui induit la formation de cercles télomériques et un raccourcissement stochastique des télomères [193]. Par ailleurs, le complexe qu'elle forme avec

RAP1 serait à l'origine de l'inhibition de la réparation par NHEJ ("Non-homologous End Joining") aux télomères [194].

POT1 a également été largement étudiée, en particulier car elle fixe le simple-brin télomérique et parce qu'il est légitime de penser que son rôle dans la protection de celui-ci est important (d'où son nom "Protection of Telomere 1"). Identifiée par homologie avec la sous-unité α de la protéine des ciliés TEBP [195], l'inhibition de son expression par ARN interférant dans des cellules humaines HT1080 a conduit à des dysfonctions télomériques caractérisées par des fusions chromosomiques, des ponts entre anaphases, une augmentation de la taille des télomères et une entrée en sénescence des cellules [196]. D'autres travaux ont montré que l'inhibition de POT1 par ARNi avait également pour conséquences un recrutement transitoire en phase G1 des facteurs de réponse aux dommages (γ H2AX et 53BP1) aux télomères, et une réduction de la longueur de l'overhang télomérique [197]. L'induction de fusions chromosomiques reste néanmoins modérée (x2-4/cellules contrôles), surtout comparée aux conséquences de l'inhibition de TRF2 par un effet dominant négatif [196, 197] (x180/cellules contrôles soit 3,2 fusions/métaphase). En revanche, la protéine aurait un effet sur la nature de la séquence terminant l'extrémité 5' des chromosomes (brin C), suggérant son rôle dans le recrutement ou l'activation d'une nucléase pour générer une extrémité 3' supplémentaire [197]. Dans des cellules télomérase-positives, l'expression d'un mutant de POT1, dépourvu de son domaine de repliement OB conduit à une augmentation de la taille des télomères, suggérant un rôle de régulateur négatif de la télomérase par son domaine de liaison au simple brin télomérique. Notons que cette délétion ne l'empêche pas d'interagir avec les protéines du complexe "shelterin" (TIN2 / TRF1 / TPP1), suggérant une localisation de POT1 sur tout le télomère *via* son interaction avec les autres protéines du télosome [198, 199]. Cette protéine semble donc intimement liée à la régulation de l'activité télomérase. L'équipe de T. Cech a montré qu'en fonction de la localisation de POT1 sur le simple brin télomérique, et de l'accessibilité de l'extrémité 3' résultante, elle permettrait soit l'inhibition de la télomérase, soit son activation [200]. Elle résoudrait également des structures en G-quadruplexe et faciliterait ainsi l'accès de la télomérase à son substrat [111].

Récemment, les données cristallographiques de TPP1 ont montré l'existence d'un domaine de liaison de repliement OB possédant des similarités structurales à celui de la sous-unité β de TEBP chez les ciliés. Il a également été montré *in vitro* que TPP1 et POT1 interagiraient de manière coopérative comme leurs homologues de ciliés. Par ailleurs, le domaine de liaison OB de TPP1 co-immunoprécipite avec une activité télomérase [201], et des expériences d'extension d'amorce par la télomérase ont montré que l'interaction entre POT1 et TPP1 augmente l'activité et la processivité de celle-ci [202]. Ces résultats récents suggèrent un rôle crucial de TPP1 dans le recrutement de la télomérase aux télomères, et dans la régulation de son activité avec POT1 [203].

2.2.2.1.2 LA TELOMERASE

Comme décrit précédemment, en l'absence d'une machinerie prenant le relais de la machinerie classique de réplication, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire. Quand les télomères deviennent particulièrement courts, les cellules cessent de se diviser et entrent en sénescence répliative.

Dans certaines cellules, un mécanisme de maintenance spécifique, permettant d'allonger les télomères au cours du cycle cellulaire, a été mis en place. Il utilise une transcriptase inverse spécialisée appelée télomérase. Une telle machinerie a été identifiée pour la première fois en 1985 dans le cilié *Tetrahymena thermophila* par Elisabeth Blackburn et Carol Greider [204].

Cette enzyme permet d'ajouter les répétitions télomériques à l'extrémité 3' sortante, par l'intermédiaire d'un ARN matrice qui est rétro-transcrit. Depuis, l'existence d'un tel mécanisme a été mise en évidence dans un certain nombre d'organismes allant des ciliés aux humains en passant par les levures et les plantes (pour revue voir [205]).

Structure : Chez l'homme, le motif télomérique ajouté est 5'-GGTTAG-3'. La sous-unité catalytique hTERT est une protéine de 1132 acides aminés (127 kDa) et l'ARN matrice hTR un ARN non traduit de 451 nucléotides (Figure 16).

- **hTERT :** La sous-unité catalytique de la télomérase possède les 7 domaines caractéristiques des transcriptases inverses (RT) situés au centre de la protéine (en orange sur la Figure 16A). Un domaine de liaison à l'ARN de forte affinité (RID2) est situé en N-terminal à proximité des motifs de RT, et un deuxième de plus faible affinité, proche de l'extrémité N-terminale nommé RID1 (TEN ou DAT), a été impliqué dans la liaison au substrat ADN [206]. Le domaine C-terminal est essentiel à la fonction de hTERT, et semble jouer un rôle dans la polymérisation processive de la télomérase [207].
- **hTR :** Elle présente une homologie de séquence limitée entre les différentes espèces, par contre sa structure secondaire est relativement bien conservée. Chen *et al.* ont proposé un modèle de sa structure secondaire chez les vertébrés basé sur une analyse phylogénétique comparative [208]. Un certain nombre de domaines conservés ont été identifiés :
 - i. La matrice ARN (CR1) servant de modèle pour l'ajout des répétitions télomériques a pour séquence (5'-CUAACCCU(AAC)-3'). Cette région est accessible à des agents chimiques coupant dans les régions simple-brins [209]. La présence d'une région conservée, l'hélice P1, en 5' de cette région aurait pour fonction de limiter la taille du motif rétro-transcrit.
 - ii. le pseudonœud (CR2-CR3) qui est essentiel à son assemblage avec hTERT et dont la structure est déterminante pour l'activité catalytique. Des résultats récents montrent

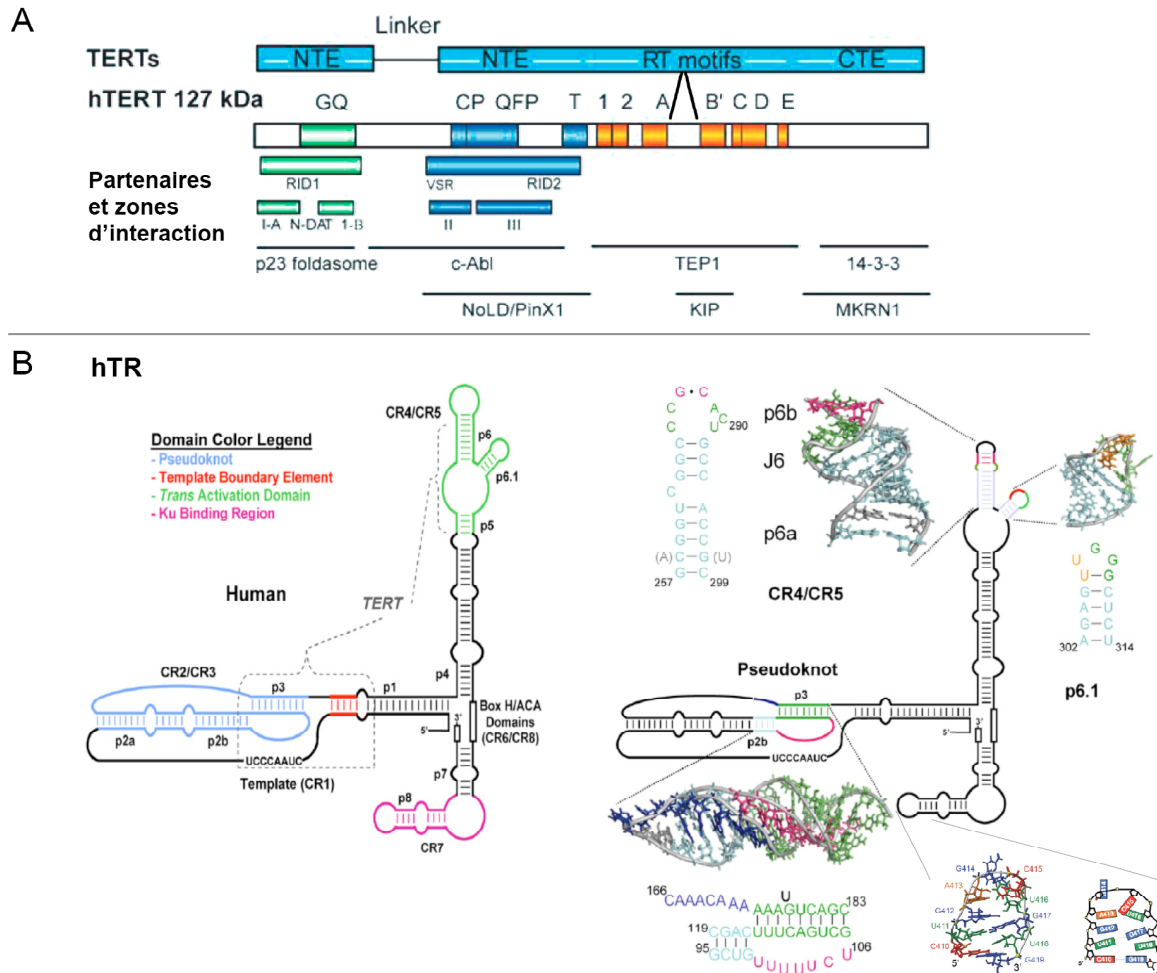


Figure 16 : Structure de hTERT (A) et hTR (B) :

(A) D'après [205] : Les sous-unités catalytiques TERTs de différents organismes (ciliés, levure, homme) possèdent les motifs de transcription inverse (1, 2, A, B', C, D, et E) que l'on peut également retrouver chez la RT du VIH-1. Elles possèdent également des motifs spécifiques à la télomérase (T, GQ, CP, QFP) et des extensions N- et C-terminales (NTE, CTE). Les domaines RID1 et RID2 sont des domaines de liaison à l'ARN, de faible (vert) et de forte affinité (bleu) respectivement. Certaines régions de hTERT impliquées dans des interactions avec d'autres protéines sont représentées. (B) D'après [210] et [211] : Structure secondaire de hTR avec en couleur les domaines conservés chez le cilié *Tetrahymena* et/ou la levure (gauche), et les structures en solutions résolues pour certains domaines (droite).

- que des triplets de bases pourraient être impliqués dans sa structure tertiaire [212] (Figure 16B, droite).
- iii. Le domaine CR4-CR5 qui, ajouté au domaine du pseudonœud et à hTERT, permet de reconstituer une activité catalytique *in vitro*, suggérant que ces 2 domaines sont les seuls réellement requis pour l'activité catalytique [213]. Les structures en solution de 2 parties de ce domaine ont été résolues (Figure 16B, droite) [214, 215].
 - iv. La boîte H/ACA (CR6-CR8) formant une structure similaire à celle trouvée dans la famille des petits ARN nucléolaires à boîtes H/ACA (snoRNAs) [216]. Elle aurait un rôle dans la maturation de l'extrémité 3' de hTR, et dans son accumulation cellulaire (nucléoles et "Cajal Bodies" [217]).
 - v. Le domaine CR7 qui interagit avec Ku 70/86 [218]. Ce domaine est supprimé avec une partie de la boîte H/ACA dans une forme autosomique dominante de la dyskératose congénitale. Ce domaine interagit avec la dyskérine (cf. : § suivant) [219]. La boucle terminale contient une boîte CAB (ugAG) nécessaire pour l'accumulation de hTR dans les "Cajal Bodies" [211], qui faciliterait le recrutement de la télomérase aux télomères et leur élongation, suggérant un rôle de ces compartiments subnucléaires dans l'assemblage d'une télomérase catalytiquement active *in vivo* [220].

L'assemblage de hTR et de hTERT est suffisant pour reconstituer *in vitro* une activité télomérase. En plus de hTR et hTERT, plus de 30 protéines ont été identifiées comme interagissant avec le complexe enzymatique télomérase (voir table S1 dans [221]). Dans une très belle étude, Reddel et ses collaborateurs ont récemment démontré que le complexe actif dans des cellules HeLa, est constitué par une troisième unité protéique : la dyskérine. Ils ont également montré que ce complexe contenait chacune des 3 composantes, hTERT, hTR et la dyskérine, en 2 copies [221] (pour revue : [222])

- **La dyskérine** : La dyskérine (NAP57 chez le rat) est une protéine de 514 acides aminés qui est hautement conservée chez les mammifères, les bactéries et les levures. Elle interagit avec les petits ARN nucléolaires (snoRNAs) à domaine H/ACA pour former des particules ribonucléoprotéiques (RNPs), et catalyse la pseudouridylation des ARN et la biogenèse du ribosome [223]. Des mutations de cette protéine ont été impliquées dans la forme liée au chromosome X de la Dyskératose Congénitale (DC), un syndrome rare conduisant à une défaillance de la moelle osseuse. La physiopathologie de DC est principalement liée à une

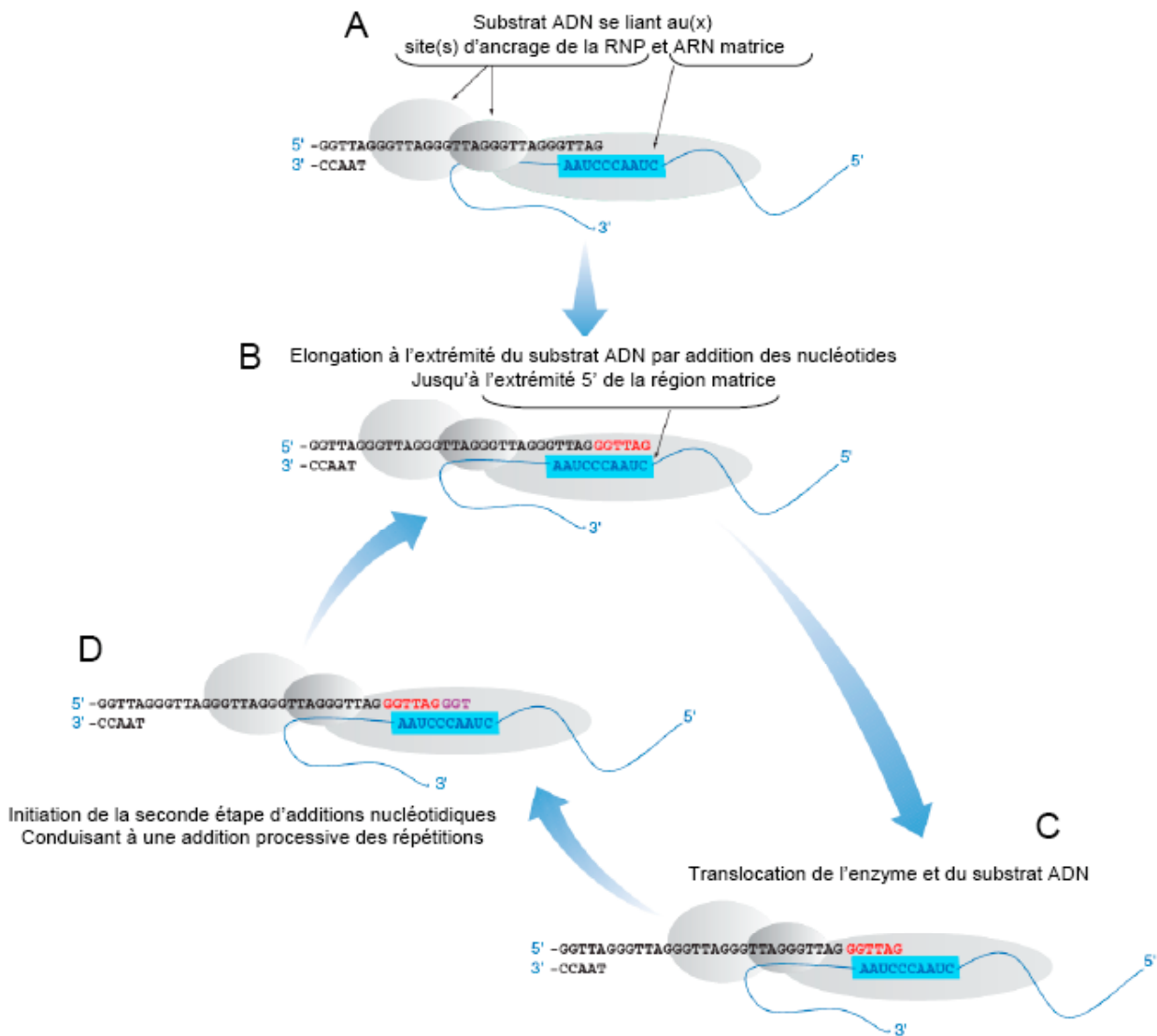


Figure 17 : Modèle de l'élongation processive par la télomérase humaine :

D'après [205] : (A) fixation au substrat ADN par ancrage de la ribonucléoprotéine et hybridation de la matrice ARN, puis (B) élongation par ajout des nucléotides jusqu'à la limite de la matrice (arrêt après le premier G du motif télomérique), (C) translocation de l'enzyme et du substrat ADN, réhybridation de la matrice ARN sur 4 nucléotides puis (D) ajout des nucléotides...

dysfonction de la maintenance télomérique (pour revue voir [224]). La récente découverte de la présence de la dyskérine au sein du complexe actif de la télomérase pourrait expliquer les symptômes de cette maladie.

Activité : Une activité télomérase a été détectée pour la première fois dans des cellules humaines, en 1989 par Gregg Morin [225]. Il a utilisé pour cela un test d'extension d'une amorce contenant 2-4 répétitions télomériques et des extraits nucléaires de cellules cancéreuses HeLa. La télomérase humaine ajoute les répétitions télomériques 5'-GGTTAG-3' de façon processive, par des étapes de translocations et d'élongations successives, selon le modèle présenté Figure 17.

Le développement d'un nouveau test plus sensible utilisant une étape d'amplification par PCR, le TRAP ("Telomere Repeat Amplification Protocol") (cf. : Chapitre : Matériel et Méthodes), a permis de tester l'activité télomérase dans divers tissus humains, cancéreux et normaux. Les cellules germinales, les cellules immortalisées et la majorité des cellules de tumeurs primaires testées (90/101) ont montré une activité télomérase significative alors que les tissus adjacents aux tumeurs ou les cellules normales somatiques étaient négatives [226]. Une activité télomérase a ensuite également été détectée dans les étapes précoces de l'embryogenèse des cellules somatiques [227] et dans des cellules souches dont la prolifération est stimulée (pour revue [228]). Ces résultats corroborent l'existence d'une relation entre le pouvoir réplicatif des cellules et l'activité télomérase.

Pourtant, plus récemment, la présence d'une activité télomérase a tout de même été mise en évidence dans des cellules humaines normales par immunoprécipitation de hTERT. L'activité y est néanmoins faible, suggérant que dans ces cellules, son rôle n'est pas d'allonger significativement les télomères à chaque division cellulaire comme dans les cellules cancéreuses ou germinales. L'inhibition par ARN interférant de hTERT a montré que son rôle dans les cellules normales semblerait davantage lié à la maintenance de l'extrémité 3' sortante et donc à l'intégrité des télomères [229].

Dans les cellules où la télomérase possède une activité importante, la taille des télomères est maintenue globalement constante. On parle d'homéostasie de la longueur des télomères. On remarquera que pour les cellules cancéreuses, la taille moyenne maintenue est relativement courte, de 2-10 kb. Pour parvenir à ce maintien de longueur, la structure du télomère et l'accès de la télomérase à son substrat doivent être finement régulés. Le modèle de complexe "shelterin" et de T-loop ouverte ou fermée permet d'expliquer en partie cette régulation. Néanmoins celle-ci reste encore assez mal connue. L'identification d'une interaction entre TPP1 et la télomérase devrait ouvrir de nouvelles voies de recherche dans ce sens [201-203].

Récemment, Gaël Cristofari du laboratoire de Joachim Lingner a montré que cette homéostasie nécessitait des niveaux d'expression de la télomérase (hTR et hTERT) limitants. En effet, en surexprimant stablement hTR et hTERT dans des cellules HeLa, il a montré par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) que davantage de télomérase était associée aux télomères, et observé une augmentation constante de la taille des télomères au cours des divisions cellulaires de 0,8 kb par doublement de population. Ainsi, les télomères de cellules HeLa étaient amenés à mesurer près de 50 kb, après 56 doublements de populations [230]. On notera que la surexpression transitoire de hTR et hTERT permet d'enrichir très largement les extraits cellulaires en activité télomérase. Ceci permet notamment de réaliser un essai d'extension d'amorce sans amplification par PCR (voir chapitre Matériel et Méthodes) [231]. Nous avons utilisé la propriété de ces extraits dans le chapitre IV de ce manuscrit.

2.2.2.1.3 LES PROTEINES DU MECANISME ALT ("ALTERNATIVE LENGTHENING OF TELOMERES")

D'autres mécanismes de maintenance de la longueur des télomères non basés sur la télomérase ont été mis en place par les cellules ayant besoin de se répliquer indéfiniment, et dans certaines cellules eucaryotes (moustique, levures survivant à la suppression de la télomérase). Il s'agit du mécanisme ALT (pour "Alternative Lengthening of Telomeres"). Ce type de maintenance est présent dans les 10 à 15 % des cellules cancéreuses et dans certaines cellules immortalisées où la télomérase est absente [232]. La longueur de certains télomères dans ces cellules est plus importante (elle peut atteindre 50 kb !) et la distribution de tailles plus hétérogène que dans les cellules télomérase-positives. Le maintien de la longueur des télomères serait permis par des événements de recombinaison entre ou au sein des télomères, mais le mécanisme exact est encore mal connu [233]. Cesare et Griffith ont montré par microscopie électronique que des cercles télomériques extra-chromosomiques (de 0,7 à 57 kb) étaient fréquemment générés dans ces cellules, ainsi que des T-loops des tailles variées (0.5 à 70 kb) [234]. La formation de ces cercles télomériques de la taille des T-loops a également été observée dans des cellules télomérase-positives exprimant un mutant de TRF2 (délétion du domaine basique, TRF2 Δ B) [193]. Dans les cellules ALT et télomérase-positives (TRF2 Δ B), la formation de ces cercles est dépendante de 2 protéines impliquées dans la recombinaison homologue NBS1 et XRCC3 (résolution de jonctions de Holliday). Ceci suggère que ces cercles télomériques seraient générés par recombinaison de la T-loop. La formation de la T-loop ou l'utilisation de ces cercles télomériques pourraient également constituer un mécanisme d'allongement des télomères (Figure 18). Néanmoins, l'inhibition de la formation de ces cercles télomériques n'est pas létale pour les cellules ALT, suggérant qu'ils ne sont pas essentiels à leur survie [235].

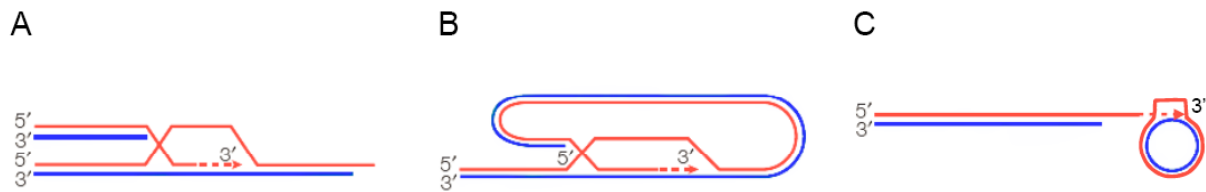


Figure 18 : Modèles alternatifs d'allongement des télomères :

(A) Par recombinaison homologue inter-télomérique, (B) par synthèse sur la T-loop, et (C) par synthèse sur les cercles télomériques. (d'après [236]).

Dans les cellules ALT, les séquences télomériques et les protéines télomériques (comme TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1) co-localisent avec les protéines PML (protéine de la Leucémie ProMyélocytaire) dans des corps nucléaires caractéristiques connus sous le nom de APBs (“ALT-associated PML bodies”) [237]. La suppression de ces protéines par ARN interférant empêche la formation des APBs. La formation de ces corps nucléaires semble également être dépendante des facteurs de réparation et de recombinaison comme le complexe MRN (contenant MRE11, RAD50 et NBS1), RAD51 et RAD52 [238]. Un autre complexe co-localisant et permettant la formation des APBs a été récemment identifié, il s'agit de SMC5/6. Une composante de ce complexe MMS21 (activité SUMO ligase) permettrait de recruter les protéines télomériques (TRF1, TRF2, RAP1 et TIN2) au niveau des APBs, par SUMOylation. L'activité de ce complexe est par ailleurs nécessaire à la maintenance et à la régulation de la longueur des télomères dans les cellules ALT [239].

2.2.2.2 Autres protéines interagissant avec les télomères

En plus du complexe “Shelterin” et de la télomérase, les télomères interagissent avec un certain nombre d'autres facteurs pouvant influencer l'intégrité des extrémités des chromosomes et leur dynamique. Quelques-unes de ces protéines sont brièvement présentées ci-dessous.

2.2.2.2.1 PROTEINES REGULANT TRF1 ET TRF2

Des protéines à domaine catalytique PARP (Poly(ADP-Ribose) polymérase) permettant la modification post-traductionnelle des protéines du complexe “shelterin”, TRF1 et TRF2, ont été identifiées. Il s'agit des tankyrases TANK-1 et TANK-2 pour TRF1, et des PARP-1 et PARP-2 pour TRF2. Ces protéines interagissent avec TRF1 ou TRF2, et ADP-ribosylent leur protéines respectives ce qui induit l'inhibition de la fixation des protéines à l'ADN télomérique [240-242].

Il a été montré en particulier que la surexpression de TANK1 régule positivement l'élongation des télomères par son interaction avec TRF1 et par un mécanisme dépendant de la

télomérase [240]. D'autre part, son inhibition par ARN interférant dans des cellules HeLa conduit à un arrêt en phase G2/M et une défaillance de la ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase au niveau de la résolution de l'association des chromatides sœur aux télomères [243].

2.2.2.2.2 PROTEINES PRESENTES AU COURS DE LA REPLICATION

La réplication des télomères est encore assez mal décrite, mais elle a fait l'objet de nombreuses études récentes (pour revue récente voir référence [169]). En particulier, Ramiro Verdun, de l'équipe de Jan Karlseder, a montré récemment par des cinétiques suivies par ChIP dans des fibroblastes primaires IMR90 synchronisés, que des facteurs de la réplication (PCNA, polymérase α , FEN1) étaient spécifiquement recrutés aux télomères en fin de phase S et en phase G2 du cycle cellulaire, 8-10h après la synchronisation. En outre, le passage d'une polymérase de haute fidélité (polymérase α) à une polymérase de basse fidélité (polymérase β , stimulée par le recrutement du complexe 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad-1)) indiquerait l'existence d'un blocage de la fourche de réplication, qui pourrait correspondre à l'ouverture de la T-loop [192].

La protéine WRN (cf. : § I.1.3.2) semble également jouer un rôle clé dans la réplication des télomères. Comme nous l'avons déjà mentionné, le syndrome de Werner est caractérisé en partie par un vieillissement prématuré et des dysfonctions télomériques au niveau cellulaire. Par exemple, les chromosomes des cellules exprimant une protéine WRN déficiente en activité hélicase montrent des pertes de télomères sur une des chromatides sœurs. WRN est localisée aux télomères en phase S du cycle cellulaire dans les cellules ALT (co-localisation avec les APBs et ChIP) [244] ou dans des cellules primaires fibroblastiques (ChIP) [124]. Cette localisation semble moins évidente aux télomères de cellules HeLa télomérase-positives [244]. En outre, il a été montré que des cellules HeLa exprimant un dominant négatif de WRN présentaient une déficience de la synthèse du brin discontinu aux télomères, lorsque la télomérase est inhibée. Ces résultats indiquent un rôle essentiel de WRN dans la maintenance des régions riches en G au court de la réplication du télomère, impliquant probablement la résolution de G-quadruplexes (cf. : § I.1.3.2), et suggèrent également que la télomérase permet de secourir les chromosomes possédant les très courts télomères induits par la dysfonction de WRN [124]. Par ailleurs, WRN interagit avec des protéines du complexe "shelterin" comme TRF2 et POT1 [245, 246]. Des résultats *in vitro* sur un modèle de D-loop (seulement en partie télomérique), suggèrent que les activités hélicase et exonucléase de WRN pourraient être impliquées avec TRF1 et TRF2 dans la résolution de telles structures aux télomères [244].

Eric Gilson et Vincent Geli ont proposé le modèle suivant (Figure 19) de progression de la fourche de réplication à l'extrémité des chromosomes de cellules de mammifères :

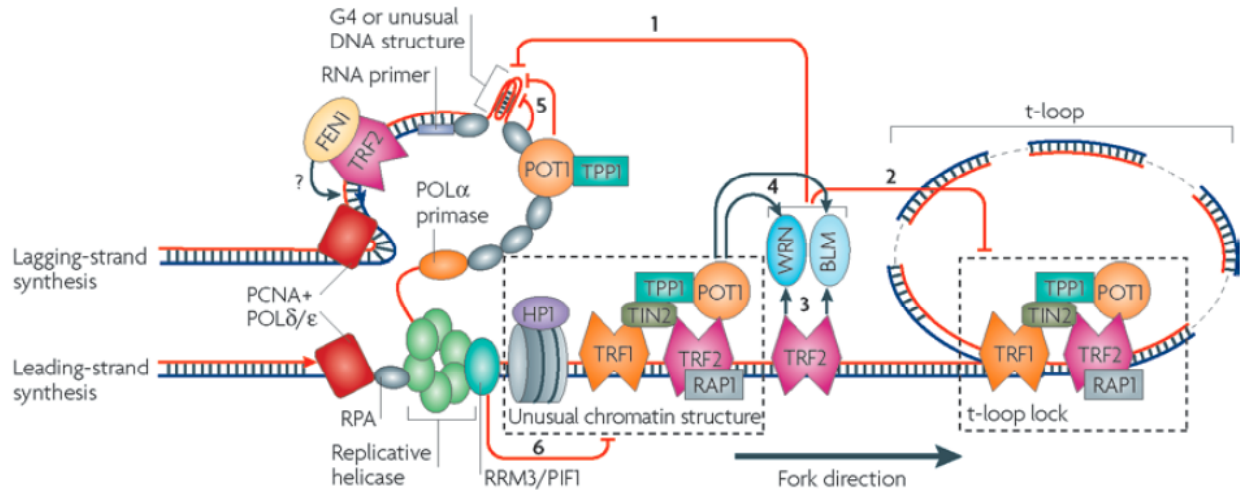


Figure 19 : Modèle de progression de fourche de réplication au travers des extrémités des chromosomes de mammifères [169] :

Ce modèle décrit le rôle des différentes activités permettant de se débarrasser des structures secondaires pouvant se former durant la réplication du télomère, particulièrement au niveau du brin discontinu riche en guanines. On y observe les rôles de WRN et BLM pour dissocier activement de telles structures (G-quadruplexe (flèche 1) / T-loop (flèche 2)), et leur stimulation par TRF2 et POT1 (flèches 3 et 4). POT1 et RPA ("Replication Protein A") sont également susceptibles d'inhiber la formation de ces structures par leur liaison à l'ADN simple-brin (flèche 5). Enfin, d'après des données obtenues sur les levures, les hélicases RRM3 et PIF1 permettraient de faciliter la progression de la fourche de réplication au travers de complexes nucléoprotéiques inhabituels [247]. Ces hélicases pourraient être associée à la fourche de réplication.

HP1 : hétérochromatine protéine-1 ; PCNA : "Proliferating cell nuclear antigen" ; POLδ/ε ; ADN polymérase -δ/ε ; FEN1 : "5' flap endonuclease-1" (dégradation des fragments d'Okasaki).

2.2.2.2.3 LES PROTEINES DE SIGNALISATION DES DOMMAGES ET DE LA REPARATION

Des télomères dysfonctionnels et déprotégés sont reconnus comme des cassures double-brins (DSB) et évoluent assez logiquement en fusions chromosomiques. Ainsi, des protéines de signalisation des dommages comme l'histone phosphorylé γ H2AX, 53BP1, MRE11, RAD17 et ATM sont recrutées à des télomères dysfonctionnels induits par l'expression du dominant négatif de TRF2. Ceux-ci co-localisent partiellement avec TRF1 et forment ce que l'on nomme des foyers induits par une dysfonction du télomère ou TIF. L'inhibition des kinases ATM et ATR réduit la formation des TIFs et indique que les télomères dysfonctionnels sont détectés par ces 2 voies [248]. Des cellules sénescents possédant des télomères courts induisent une réponse cellulaire tout à fait similaire, également caractéristique des cassures double-brins [249].

Il a également été montré que les fusions chromosomiques induites par l'expression du dominant négatif de TRF2 dans des cellules de souris MEF sont dépendantes de la présence de la ligase IV/XRCC4 [250], suggérant une réparation des télomères exposés par la voie NHEJ ("Non-homologous End Joining").

Si les facteurs de réponses aux dommages et les effecteurs de la réparation sont recrutés à des télomères dysfonctionnels, certains sont également recrutés à des télomères fonctionnels, ce qui peut paraître assez paradoxal. Ainsi, dans la suite de son travail par ChIP sur cellules synchronisées, Ramiro Verdun et Jan Karlseder ont montré que des facteurs comme ATR, RAD17 phosphorylé, ATM et MRE11 étaient également recrutés aux télomères à la fin de la phase S et en phase G2 du cycle cellulaire. Le recrutement de ces facteurs serait une première étape permettant la reprotection du télomère après l'ouverture de la T-loop et sa réplication [192, 251]. En outre, l'inhibition d'un certain nombre d'entre eux induit une dysfonction télomérique, suggérant bien que ces facteurs sont également essentiels à la fonction télomérique. De la même façon, des protéines impliquées dans le NHEJ, comme DNA-PK et Ku70/86, sont présentes à des télomères fonctionnels de cellules humaines et semblent jouer un rôle dans la maintenance de ceux-ci. Par exemple, l'inactivation de Ku dans des cellules de souris induit des fusions chromosomiques et une réduction de la longueur des télomères [252].

Verdun et Karlseder ont également localisé aux télomères des protéines de la réparation par recombinaison homologue (RH) en fin de phase G2, comme RAD51/52 (invasion de brin) et XRCC3 (résolution de jonctions de Holliday). Ces protéines seraient nécessaires à la reconstitution de la T-loop après la réplication [192]. Des résultats récents suggèrent qu'en association avec TRF2, la présence de facteurs du NHEJ comme Ku70 aux télomères empêcherait la recombinaison homologue entre télomères [253].

Enfin, on peut également citer un rôle potentiel de la protéine WRN dans la répression des recombinaisons inter-télomériques. En effet, la déficience en télomérase et WRN dans un modèle murin induit de nombreux échanges par recombinaisons entre chromatides sœurs, conduisant à l'immortalisation des cellules et l'engagement dans un mécanisme de maintenance ALT. Ces recombinaisons sont abolies par le rétablissement d'une protéine WRN pourvue de son activité hélicase, suggérant son rôle dans la répression des échanges télomériques entre chromatides sœurs [254].

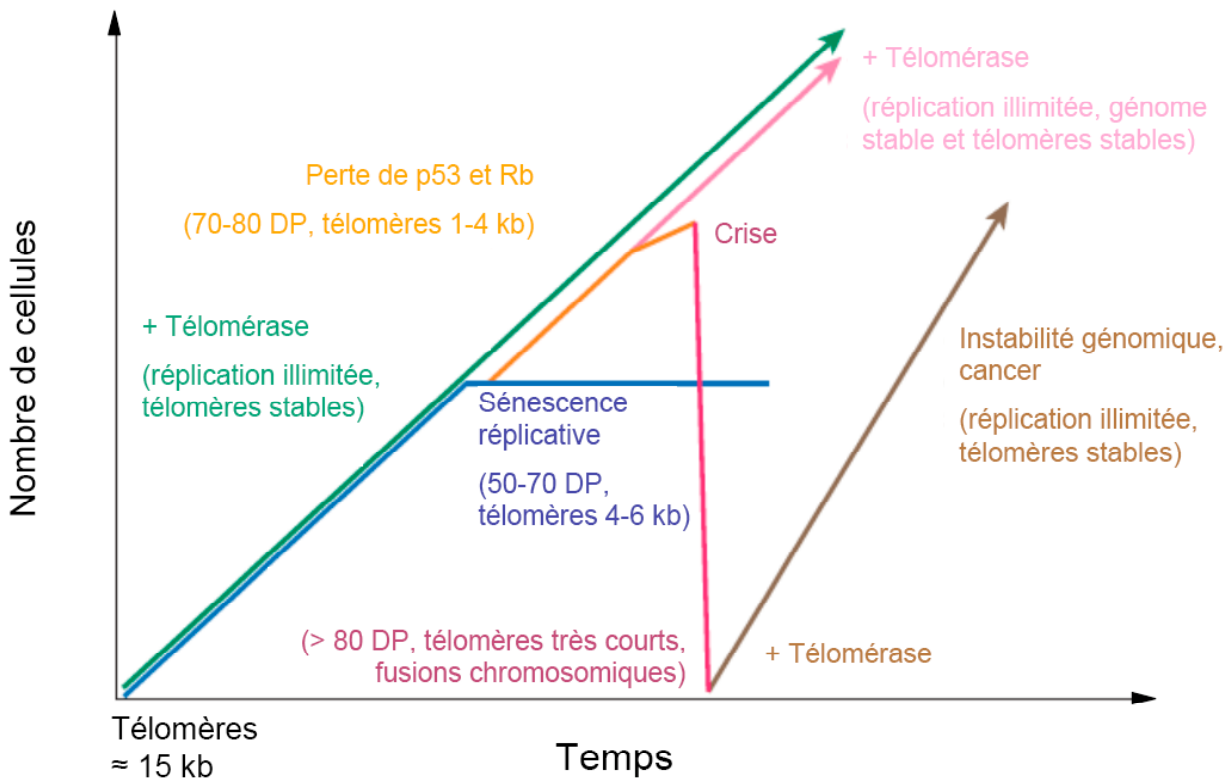


Figure 20 : Raccourcissement des télomères, sénescence, télomérase et cancer : (d'après [170])

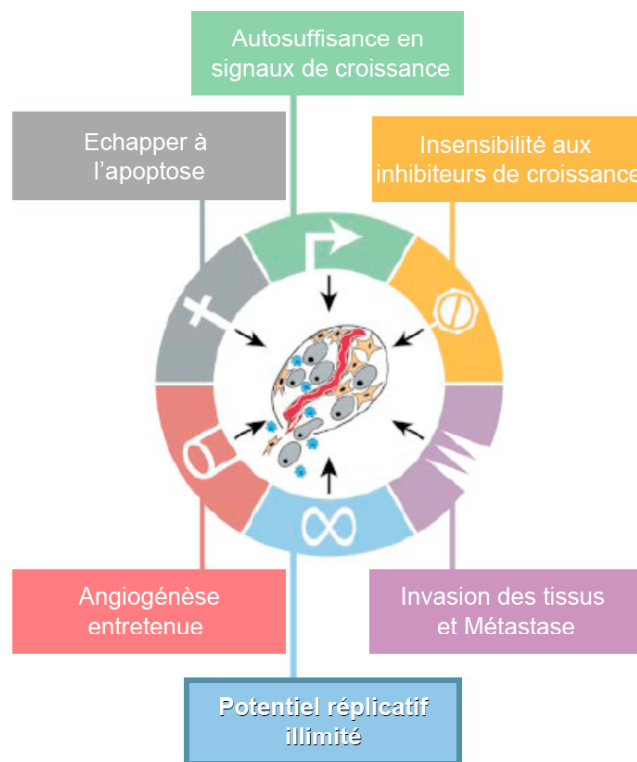


Figure 21 : Les six altérations essentielles dictant la croissance tumorale : (d'après [255])

3 Ligands de G-quadruplexes, télomères, télomérase et prolifération cellulaire

3.1 L'hypothèse télomérique du cancer

En absence de maintenance de la longueur des télomères, ceux-ci raccourcissent au fil des divisions cellulaires. Il a été suggéré que lorsque les télomères (ou un des télomères) atteignent une longueur minimale, un programme déclenchant la sénescence répllicative est activé [151] (en bleu sur la Figure 20). La surexpression de hTERT dans des cellules sénescents est suffisante pour leur permettre de proliférer à nouveau. Cela constitue d'ailleurs un moyen d'immortaliser les cellules normales (en rose clair Figure 20). Les cellules peuvent contourner le phénomène de sénescence et cette première barrière de prolifération en inactivant p53 et RB (en orange sur la Figure 20). Les télomères continuent alors de raccourcir ce qui entraîne l'atteinte d'une seconde barrière appelée "crise". Celle-ci est notamment caractérisée par une apoptose massive due à des fusions chromosomiques (en rose foncé sur la Figure 20). Cependant un faible pourcentage de ces cellules parvient à survivre en mettant en place un mécanisme de maintenance de la longueur de leurs télomères. Dans 85 à 90 % des cas émergents, cette maintenance est permise par une surexpression de la télomérase, dans les cas restants il s'agit d'un mécanisme ALT (en brun sur la Figure 20).

Hanahan et Weinberg ont décrit six altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance tumorale : l'autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, le contournement de la mort cellulaire programmée (apoptose), l'invasion des tissus, l'angiogenèse entretenue et enfin un potentiel réplcatif illimité [255] (Figure 21). La télomérase et la tumorigénèse sont, en effet, intimement liées, celle-ci étant très active dans 85-90% des cellules cancéreuses. Il a été montré, dès 1999, que l'expression stable du dominant négatif de hTERT (DN-hTERT) dans plusieurs lignées cancéreuses télomérase-positives annihile toute activité télomérase, causant la suppression de toute tumorigénicité après injection dans la souris nude, l'induction d'un arrêt de prolifération et une mort cellulaire liée à un déclin télomérique progressif [256]. Cette étude démontre que la télomérase peut constituer une cible d'intérêt en thérapie anti-cancéreuse.

Durant les 10 dernières années, de nombreuses stratégies ont été développées dans ce but, ciblant les principales composantes de l'enzyme, hTR et/ou hTERT ou leur assemblage, en utilisant par exemple des antisens, des ribozymes, des ARN interférant, ou des inhibiteurs catalytiques (pour revue [257] et [258]).

Il est néanmoins nécessaire de souligner les limites de ces stratégies. D'une part, celles-ci reposent sur la surexpression de la télomérase dans 85-90% des cellules cancéreuses. Elles ne s'appliquent donc pas à toutes les tumeurs, 10 à 15% d'entre-elles maintenant leurs télomères *via* un mécanisme ALT. D'autres part, concernant la sélectivité, les cellules germinales et les cellules souches expriment également des niveaux significatifs de télomérase. Toutefois, la longueur initiale des télomères de ces cellules étant plus importante, une fenêtre thérapeutique peut être envisagée. Par contre, elle suppose que l'atteinte aux cellules normales est faible puisque la télomérase y est faiblement exprimée. Or la découverte récente (mais controversée) de la localisation de hTERT aux télomères dans les cellules normales et son rôle dans la protection du télomère pourrait remettre en cause cette hypothèse de départ. On peut penser que des inhibiteurs visant hTERT pourraient également avoir des effets immédiats de déprotection du télomère sur les cellules normales. Enfin le but est de limiter la croissance des cellules cancéreuses par érosion progressive des télomères au cours des divisions cellulaires. Les effets antiprolifératifs de tels agents sont donc dépendants de la taille initiale des télomères et les bienfaits thérapeutiques peuvent ainsi être particulièrement retardés par rapport au début du traitement. Ceci constitue actuellement un frein au développement de ces inhibiteurs, et l'utilisation de ceux-ci en combinaison avec d'autres chimiothérapies permettant de limiter la taille des tumeurs est davantage envisagée.

La stratégie sur laquelle est initialement basée ce travail de thèse et que nous allons développer dans le paragraphe suivant consiste en une inhibition indirecte de la télomérase par limitation de l'accessibilité à son substrat. Elle s'avère assez différente de la stratégie basée sur l'inhibition directe de la télomérase et comporte certains avantages par rapport à celle-ci, et d'autres inconvénients.

3.2 Télomérase et G-quadruplexes

En 1991, quelques années après l'identification des séquences télomériques et des télomérases humaines et de ciliés, Alan Zahler montre que la télomérase d'*Oxytricha nova* est inhibée par la formation de structures secondaires stables en accord avec la formation de G-

quadruplexes intramoléculaires. En effet une importante inhibition de l'activité télomérase en test d'élongation d'amorce est obtenu en présence de potassium et à partir d'un substrat de séquence d(TTTTGGGG)_{n=4,5 ou 8}. Ces résultats suggèrent fortement que la télomérase a besoin d'une extrémité 3' non structurée et accessible pour que son ARN matrice puisse s'hybrider convenablement [259].

Une stratégie visant à stabiliser les structures en G-quadruplexe au niveau des télomères a donc émergé dans le but premier d'inhiber l'activité d'élongation de la télomérase et de limiter ainsi le pouvoir réplcatif des cellules cancéreuses. Dès 1997, des ligands agissant sur la télomérase par stabilisation des G-quadruplexes sont identifiés par des groupes américains (Laurence Hurley) et anglais (Stephen Neidle) [260]. Notre équipe, sous la direction de Jean-Louis Mergny, a également contribué à l'identification de nouvelles molécules se liant à ces structures avec une plus ou moins bonne sélectivité vis-à-vis des duplexes d'ADN. Les premiers résultats d'effets cellulaires de ces composés émergent à partir de 2001 et posent un certain nombre d'interrogations sur leur réel mode d'action, et sur la conséquence d'une inhibition indirecte de la télomérase par ciblage de l'ADN télomérique.

Dans les paragraphes suivants, nous présenterons certaines familles de composés ayant été développées pour leur capacité à lier et à stabiliser les G-quadruplexes d'ADN. Nous discuterons également leur sélectivité vis-à-vis des ADN duplexes, leurs effets cellulaires et leurs possibles interactions avec les télomères dans le cadre d'une structure dynamique impliquant la T-loop et les protéines associées.

3.3 Des ligands de G-quadruplexes : affinité et sélectivité

3.3.1 Ligands basés sur des interactions d'empilement π - π :

La large surface hydrophobe constituée par un quartet de guanines, en fait un site privilégié pour la fixation de molécules polyaromatiques planes, et par conséquent de nombreux ligands ont été développés en ce sens. Une difficulté de taille réside dans la conciliation d'une importante aromaticité avec une bonne solubilité. Ceci est souvent permis par l'ajout de charges à la molécule. L'ADN, en particulier sous sa forme G-quadruplexe, étant une macromolécule chargée négativement, le choix d'une protonation des ligands paraît raisonnable. A ce jour, ceci a été réalisé de différentes façons : (i) par N-méthylation, (ii) par ajout de chaînes latérales qui sont protonnées *in situ*, (iii) par chélation de cations métalliques tels que le nickel, le manganèse ou le cuivre.

De façon assez prévisible, la première molécule identifiée comme pouvant se lier aux G-quadruplexes, fut le bromure d'éthidium (BET), un intercalant de l'ADN [261]. Ce résultat illustre

immédiatement le deuxième défi à relever pour la conception de ligands des G-quadruplexes : une sélectivité accrue pour le G-quadruplexes par rapport aux formes majoritaires d'ADN dans les cellules, les duplexes d'ADN-B et dans une moindre mesure les simple-brins d'ADN. Un équilibre entre l'aromaticité, la forme de la molécule et le nombre de charges positives doit être trouvé pour conférer à la molécule une bonne affinité pour les G-quadruplexes tout en limitant les interactions non spécifiques avec l'ADN simple-brin ou avec des duplexes, en particulier l'intercalation entre les paires de bases.

3.3.1.1 Ligands N-méthylés

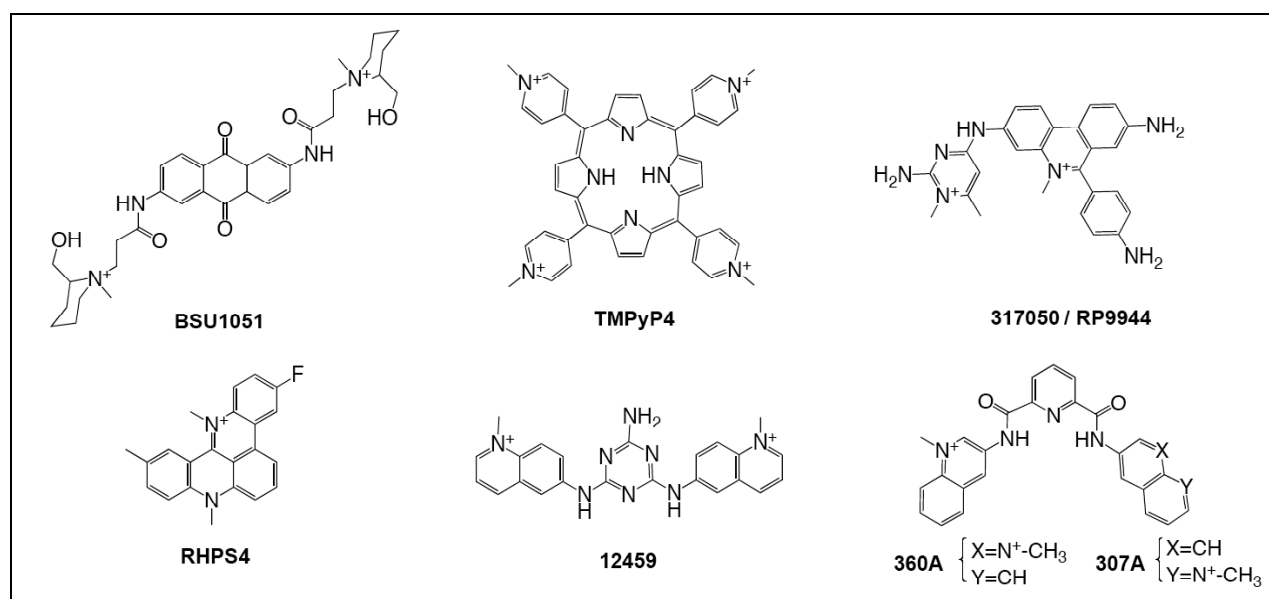


Figure 22 : Exemples de ligands de G-quadruplexes protonnés par N-méthylation.

Les groupes de Laurence Hurley et Stephen Neidle montrent dès 1997 par RMN¹H 1D, que la 2,6 diamido dianthraquinone **BSU1051** (Figure 22), stabilise le G-quadruplexe tétramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine d(TTAGGGT), le signal des protons iminos étant maintenu jusqu'à 65°C, alors qu'il disparaît à 45°C sur le quadruplexe seul. Cet article montre aussi pour la première fois qu'un ligand stabilisant un G-quadruplexe est capable d'inhiber l'activité télomérase dans un test d'extension à partir de l'amorce télomérique d(TTAGGG)₃. Néanmoins, avec une CI₅₀ de 23 μM, les auteurs suggèrent tout de même un effet non spécifique à fortes concentrations. Ces premiers travaux ouvrent néanmoins la voie au développement de ces ligands [260].

La porphyrine tétra-cationique **TMPyP4** (Figure 22), est également parmi les premiers composés ayant été identifiés comme ligands de G-quadruplexe pouvant inhiber la télomérase. Il est vrai que la forme de symétrie C₄ et la taille de la molécule semblent s'adapter particulièrement bien à l'empilement sur un G-quartet. Hurley et ses collaborateurs montrent que ce composé interagit avec des G-quadruplexes tétramoléculaires par titrations en spectroscopie UV ou RMN, induit un arrêt d'ADN polymérase par formation d'un G-quadruplexe intramoléculaire et inhibe la télomérase avec une CI_{50} d'environ 7 μ M [262]. Ces premiers travaux ne discutent pas la spécificité d'action du ligand. Pourtant celui-ci a précédemment été décrit comme un intercalant de l'ADN duplexe [263], et sera également exploité comme ligand du motif-i (quadruplexe formé par des séquences riches en cytosines et faisant intervenir des paires de cytosines hémiprotonnées) [264]. Malgré sa faible sélectivité [265], ce ligand reste régulièrement utilisé comme ligand de G-quadruplexe (en particulier celui du promoteur de *c-myc*), certainement en raison de sa disponibilité commerciale en tant qu'"inhibiteur de la télomérase" (Calbiochem). La récente structure cristalline du composé avec un G-quadruplexe bimoléculaire formé par la séquence télomérique humaine montre pourtant que le ligand n'interagit pas directement avec les tétrades, mais s'empile sur les bases TTA au niveau des boucles, confirmant le manque de spécificité de ce ligand [266].

Le dérivé d'éthidium **317050** (brevet WO 0212194), également appelé **RP9944** (Figure 22) a également été décrit comme ligand de G-quadruplexe avec une bien meilleure affinité que le BET et un facteur de sélectivité duplexe / G4 appréciable, jusqu'à $\times 5$ en dialyse à l'équilibre (voir Matériel et Méthodes). En particulier, cette molécule stabilise le G-quadruplexe intramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine en test de dénaturation thermique suivi par FRET (voir chapitre Matériel et Méthodes) de 14°C, pour 1 μ M en ligand. Il présente, en outre, l'avantage d'avoir un rendement quantique intéressant lorsqu'il est lié à l'ADN-G4 (1/5 de celui du BET lié à un duplexe d'ADN), ce qui est un fait plutôt rare parmi les différents ligands développés [267, 268].

L'acridine pentacyclique **RHPS4** (Figure 22) a été identifiée par le groupe de Malcom Stevens comme ligand de G-quadruplexe, et fait parti des rares composés dont une structure en complexe avec un G-quadruplexe a été résolue par RMN. Le ligand s'empile sur les quartets terminaux du quadruplexe parallèle télomérique [d(TTAGGGT)]₄ avec une stoechiométrie 2 : 1 [269]. Il inhibe également la production de produits télomérique en test TRAP avec une CI_{50} de 330 nM [270].

La bisquinolinium triazine **12459** (Figure 22) a été développée dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire, Jean-François Riou et Sanofi-Aventis. Cette molécule stabilise le G-quadruplexe intramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine en test de dénaturation thermique suivi par FRET de 8°C (1 μ M en ligand), ce qui en fait un ligand d'affinité modérée, équivalente à celle du dérivé d'éthidium **317050**. En revanche, au niveau de la sélectivité, des expériences de dialyse à l'équilibre ont montré qu'il se fixe préférentiellement sur les G-quadruplexes, par rapport aux duplexes d'ADN (sélectivité $\times 5$) [271].

Toujours développé au sein du laboratoire, en collaboration avec le groupe pharmaceutique Sanofi-Aventis, les bisquinolinium pyridodicarboxamides **360A** et **307A** (Figure 22) montrent un très fort effet stabilisateur sur le G-quadruplexe intramoléculaire télomérique humain en test FRET, avec une $\Delta T_{1/2, 1\mu M}$ de 23°C [272]. Les molécules présentent d'autre part une forte affinité (K_d de quelque nM) pour le G-quadruplexe d(AGGG(TTAGGG)₃) lors d'expériences de titration en fluorescence (B. Saccà et JL. Mergny, résultats non publiés). Ce sont également des ligands très sélectif, comme le montrent les expériences de dialyse à l'équilibre que nous avons réalisées avec le composé **360A** (radiomarké au tritium ou non) (sélectivité $\times 10$ -20) [181, 271] et la conservation de la stabilisation en test FRET en présence d'un large excès de compétiteur double-brin [271, 273] (voir chapitre Matériel et Méthodes). Ces composés inhibent l'activité TRAP avec une CI_{50} d'environ 0,3 μ M sur les produits télomériques. Ils n'inhibent pas le contrôle interne de PCR du test à des concentrations de l'ordre de 10 μ M, ce qui révèle à nouveau leur très intéressante spécificité vis-à-vis des séquences télomériques [271].

3.3.1.2 Ligands à chaînes latérales protonnées *in situ*

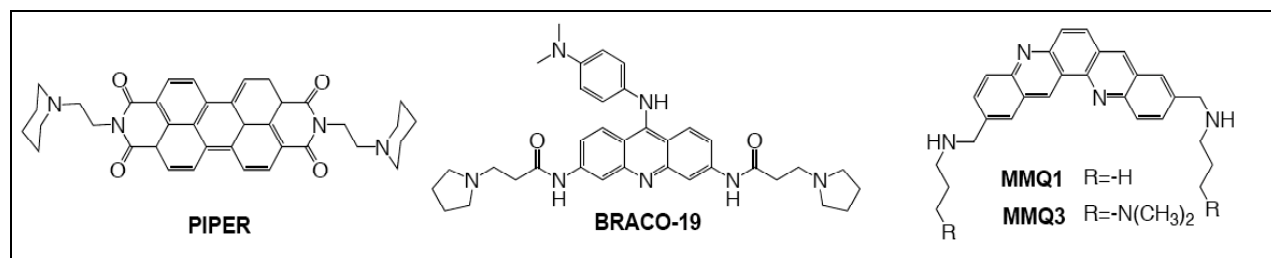


Figure 23 : Exemples de ligands de G-quadruplexes protonnés *in situ*.

Identifié peu après **BSU1051** et **TMPyP4** par L.Hurley et ses collaborateurs, le pérylène diimide **PIPER** (Figure 23) est une molécule très aromatique et condensée. Cette molécule a d'ailleurs tendance à s'agréger à pH 7. Des modèles basés sur une analyse RMN de G-quadruplexes tétramoléculaires suggèrent que **PIPER** est empilé sur un des quartets terminaux en

3', et peut être pris en "sandwich" entre les quartets de 2 quadruplexes différents induisant des dimérisations dans le cas du G-quadruplexe [d(TTAGGG)]₄. Ce ligand inhibe la télomérase dans un test d'extension d'amorce avec une CI₅₀ d'environ 20 µM et induit un arrêt de la Taq polymérase au niveau d'un G-quadruplexe intramoléculaire [274]. Ce ligand favorise également la multimérisation de séquences contenant 2 blocs de 3 guanines [275].

Dès 1999, le groupe de Stephen Neidle décrit la synthèse d'acridines 3,6-disubstituées en tant que ligands de G-quadruplexes. Il propose une approche de "drug-design" et modélisation moléculaire à partir de la structure résolue par Wang et Patel notamment, pour optimiser l'activité du ligand [276, 277]. Celle-ci est basée sur des tests d'inhibition de TRAP, et de la Taq polymérase, ainsi que des effets cytotoxiques sur cellules cancéreuses. Nous remarquerons qu'il est le premier à avoir utilisé un test d'activité télomérase basé sur une amplification par PCR pour tester la capacité des ligands de G-quadruplexe à inhiber la télomérase. Nous discuterons cette utilisation dans le 3^{ème} partie de résultats (Chapitre IV) de ce manuscrit. Read et ses collaborateurs ont montré par modélisation moléculaire et mesure des constantes de dissociation par résonance plasmonique de surface (SPR), que l'ajout d'une troisième substitution en position 9 de l'acridine augmentait la sélectivité du ligand au niveau de l'empilement sur le quartet, par une interaction dans le sillon du G-quadruplexe. En tête de file, le ligand **BRACO19** (Figure 23) présente un K_d de 62,5 nM pour le G-quadruplexe télomérique humain avec un site de fixation de forte affinité au G-quadruplexe (et un autre plus faible), à comparer avec un K_d de 2,5 µM seulement pour un duplexe [278]. **BRACO19** présente également une CI₅₀ de 115 ± 18 nM en test d'inhibition TRAP [279]. Plus récemment, il a été montré en dénaturation thermique suivie par FRET, que ce ligand stabilisait le G-quadruplexe télomérique humain de +27,5°C, à comparer avec la stabilisation d'un duplexe de +14,5 °C, suggérant un facteur de sélectivité pouvant être encore optimisé (test FRET en présence d'ions K⁺). En 2002, ce composé sert à la cristallisation de la forme parallèle du G-quadruplexe télomérique humaine en conditions potassium [22]. Le ligand n'apparaît néanmoins pas sur la structure. Toutefois, une acridine disubstituée de structure similaire a été co-cristallisée avec le G-quadruplexe bimoléculaire formé par la séquence télomérique de *O. nova*. Le ligand se fixe sur un G-quartet terminal avec une stoechiométrie 1 :1 [280].

Une série de dérivés pentacycliques d'acridine en forme de croissants, appelés mono-méta-quinacridines, ont été synthétisés par le laboratoire de M-P. Teulade-Fichou et caractérisés en collaboration avec notre laboratoire comme ligands des G-quadruplexes. Pour tous les composés de cette série, une étroite corrélation entre la stabilisation des G-quadruplexes en test FRET et

l'inhibition de l'activité TRAP peut être constatée. Le composé le plus stabilisant en test FRET, **MMQ3** (Figure 23) ($\Delta T_{1/2} = +19,5^\circ\text{C}$) montre une CI_{50} en test TRAP de 28 nM. Néanmoins, son affinité vis-à-vis du G-quadruplexe est contrebalancée par une moindre sélectivité vis-à-vis des duplexes d'ADN, pouvant s'expliquer par l'augmentation du nombre de charges positives sur les chaînes latérales [271, 273]. Récemment, une structure RMN sur un G-quadruplexe tétramoléculaire formé par d(TTAGGGT) a été déterminée avec le composé **MMQ1**. Celle-ci montre la fixation des ligands sur les quartets terminaux du G-quadruplexe avec une stœchiométrie 2 : 1, ainsi que l'interaction des chaînes latérales du ligand avec les sillons du G-quadruplexe, en accord avec la structure du complexe obtenu en présence de l'acridine disubstituée [281].

3.3.1.3 Ligands métallo-organiques

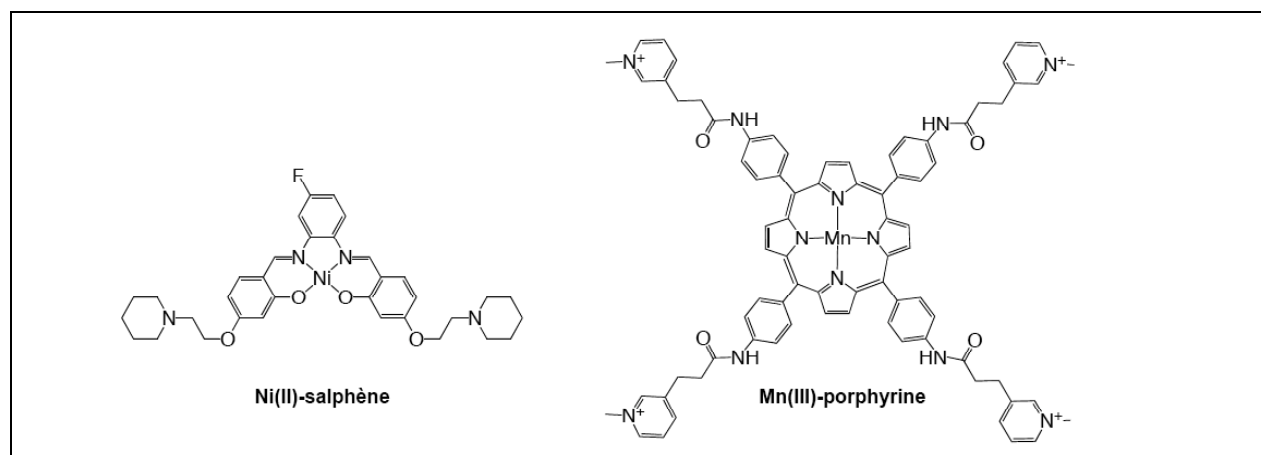


Figure 24 : Exemples de ligands de G-quadruplexes métallo-organiques.

Le développement de composés métallo-organiques pour lier les structures en G-quadruplexes est beaucoup plus récent. L'efficacité de cette approche est basée sur l'hypothèse selon laquelle le métal central peut être idéalement situé au-dessus du canal ionique formé par le G-quadruplexe, devant ainsi permettre une optimisation des interactions π - π d'empilement des ligands chélatant le métal avec les guanines des quartets terminaux. Leur caractère cationique et hautement polarisable est également à prendre en considération étant donnée la charge négative de la macromolécule d'ADN structurée en G-quadruplexe.

Parmi les exemples les plus probants de ce type de composés, le **Ni(II)-salphène**, développé par l'équipe de S. Neidle présente une très forte affinité pour le G-quadruplexe télomérique avec une stabilisation en test FRET de $+33^\circ\text{C}$. De plus sa sélectivité est remarquable puisqu'il ne stabilise pas un duplexe, alors que dans ces mêmes conditions **BRACO19** montre une

stabilisation de 17,5°C. Le test TRAP montre une CI_{50} de 0,12 μ M, et une sélectivité de 50 fois par rapport à l'inhibition de la Taq polymérase ($CI_{50} \sim 5\mu$ M) [282].

La **Mn(III)-porphyrine** évaluée par SPR par l'équipe de Geneviève Pratviel semble également posséder une importante affinité pour le G-quadruplexe de la séquence télomérique humaine : il se fixe à deux sites de liaisons d'affinités différentes possédant des K_d de 5,3 nM et 220 nM respectivement. Malgré ses nombreuses charges positives, les auteurs annoncent une sélectivité de 10000 pour le G-quadruplexe par rapport aux duplexes riches en GC ou AT présentant des K_d de 40 et 83 μ M respectivement. L'encombrement dû aux chaînes latérales pourrait expliquer cette sélectivité, en empêchant l'intercalation du composé dans un duplexe d'ADN. Son activité en TRAP reste néanmoins un peu décevante étant donné l'affinité nanomolaire de la molécule, avec une CI_{50} de 580 nM [283].

3.3.1.4 Ligands neutres ou anioniques

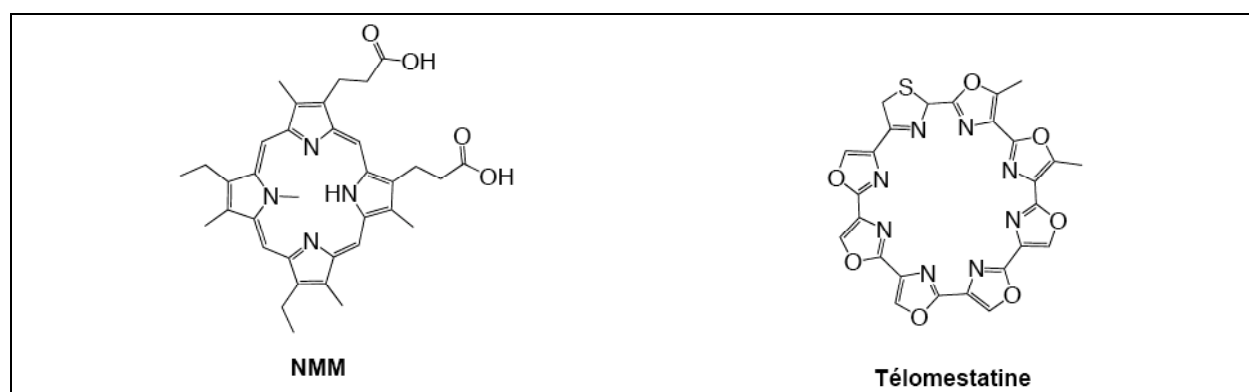


Figure 25 : Exemples de ligands de G-quadruplexes neutres ou anioniques

Étonnamment, certains des ligands identifiés possèdent une bonne affinité pour les G-quadruplexes sans être chargés positivement. Ce type d'interaction est donc principalement guidé par recouvrement du quartet de guanine par le ligand et des interactions de type π .

Ainsi, la porphyrine **NMM** (Figure 25) se lie à différents G-quadruplexes malgré ses 2 charges négatives à pH physiologique. Sa fluorescence est d'ailleurs exaltée lorsqu'elle est liée aux G-quadruplexes [284]. Son affinité est plus faible qu'une porphyrine cationique comme **TMPyP4**, mais sa sélectivité s'en trouve particulièrement augmentée avec une très faible voire inexistante fixation sur d'autres structures, comme l'indiquent des expériences de dialyse à l'équilibre [265]. L'effet de **NMM** sur l'activité TRAP ou sur la télomérase n'a pas été étudiée à ma connaissance. Néanmoins, il a été montré que ce composé permet d'inhiber les hélicases RecQ de *E.coli*, Sgs1p et BLM sur des substrats G-quadruplexes tétramoléculaires, alors que son action

sur des substrats double-brin, et jonction de Holliday est faible, avec des K_{i-G4} de 1,7 μM (RecQ), 1 μM (Sgs1p) et 0,8 μM (BLM) [120, 126].

Enfin, la **télomestatine** est un des ligands de G-quadruplexes les plus étudiés à ce jour. Il s'agit d'un produit naturel isolé de la bactérie *Streptomyces annulatus*, caractérisé en 2001 par le groupe de Kazuo Shin-ya comme inhibiteur de la télomérase, avec une CI_{50} de 5 nM en test TRAP [285]. L'équipe de Hurley a montré par la suite que ce ligand induisait la formation et / ou stabilisait le G-quadruplexe intramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine (accélération de migration sur gel natif). Des calculs de modélisation moléculaires ont également suggéré que la **télomestatine** se fixe avec une stœchiométrie 2 :1 sur ce G-quadruplexe [286]. À ce jour, aucune structure en présence de **télomestatine** n'a été résolue. Étant donné ses propriétés spectroscopiques limitées, peu de données d'affinité, vis-à-vis du G-quadruplexe ou du duplexe, sont disponibles pour ce composé. Les données sont par ailleurs assez peu reproductibles, certainement en raison de la faible solubilité du composé. Néanmoins, la **télomestatine** stabilise le G-quadruplexe télomérique humain, et l'ajout d'un excès de duplexe d'ADN n'a pas d'effet déstabilisant, démontrant la haute spécificité de ce ligand pour les structures G-quadruplexes [287]. Elle limite également l'hybridation du brin télomérique complémentaire [287] et induit un arrêt de polymérase par formation de G-quadruplexe *in vitro* [288]. Enfin, elle induit un repliement de la séquence télomérique humaine de type "antiparallèle" en dichroïsme circulaire (voir chapitre Matériel et Méthodes), que ce soit en l'absence ion, en présence de Na^+ ou de K^+ , suggérant une affinité particulière pour cette forme de G-quadruplexes [289].

3.3.1.5 Mode d'interaction de ces ligands

Quelques études structurales de G-quadruplexes en présence de ligands ont été réalisées par cristallographie ou RMN (Table 5).

Chaque structure, à part peut-être celle de **TMPyP4** sur un G-quadruplexe bimoléculaire formé par la séquence télomérique humaine, est caractérisée par un empilement des ligands par des interactions de type π sur les quartets terminaux du G-quadruplexe, semblant exclure une intercalation des ligands entre les quartets. Ce mode d'interaction d'empilement terminal est donc généralement supposé pour des ligands présentant un cœur aromatique plan.

Ligand	Séquence	Méthode	Mode d'interaction	Stœchiométrie (L : G4)	Référence
RHPS4	[d(TTA <u>GGGT</u>)] ₄	RMN et modélisation (PDB : 1NZM)	Empilement	2 : 1	[269, 290]
Acridine disubstituée (BSU6039)	[d(<u>G</u> ₄ T ₄ <u>G</u> ₄)] ₂	RX (PDB : 1L1H)	Empilement	1 : 1	[280]
PIPER	[d(TA <u>GGGT</u> TA)] ₄	RMN et modélisation	Empilement	1 : 1	[274]
Distamycine	[d(TTA <u>GGG</u>)] ₄	RMN et modélisation	Empilement	1 : 2	[274]
Distamycine	[d(TA <u>GGGT</u> TA)] ₄	RMN et modélisation	Empilement	4 : 1 ?	[291]
Daunomycine	[d(T <u>GGGGT</u>)] ₄	RX (PDB : 1O0K)	Empilement	3 : 1	[292]
Fluoroquino- benzoxazine	[d(TTA <u>GGGT</u>)] ₄	RMN REDOR et modélisation	Empilement	1 : 1	[293]
MMQ1	[d(TTA <u>GGGT</u>)] ₄	RMN et modélisation	Empilement	2 : 1	[281]
TMPyP4	[d(TA <u>GGGT</u> TA <u>GGG</u>)] ₂	RX (PDB : 2HRI)	Interaction T1-A8 + T6-T7	2 : 1	[266]
TMPyP4	d(TGA <u>G</u> ₃ T <u>G</u> ₂ I <u>G</u> A <u>G</u> ₃ T <u>G</u> ₄ A ₂ <u>G</u> ₂)	RMN (PDB : 2A5R)	Empilement	1 : 1	[54]

Table 5 : Etudes structurales menées sur des G-quadruplexes en présence de ligands

3.3.2 Ligands des sillons de G-quadruplexe

Les quatre sillons des G-quadruplexes présentent également des caractéristiques attractives pour le développement de ligands. Leur géométrie est non seulement différente de ceux présents dans les duplexes d'ADN, mais elle varie également en fonction de l'enchaînement des guanines en *syn* ou *anti* au sein du quartet (Figure 4). Il semble alors possible de cibler spécifiquement les G-quadruplexes par rapport aux duplexes, mais également un G-quadruplexe en particulier, en fonction de la géométrie de ses sillons respectifs. Ceci présente un intérêt particulier puisqu'il est alors éventuellement possible de discriminer certains types de G-quadruplexe, ce qui paraît peu envisageable avec des composés interagissant uniquement par empilement sur les quartets. Bien que ce mode d'interaction n'ait pas été caractérisé précisément par RMN ou cristallographie, des études en dichroïsme circulaire suggèrent la fixation de certains composés dans les sillons (cf. paragraphe suivant).

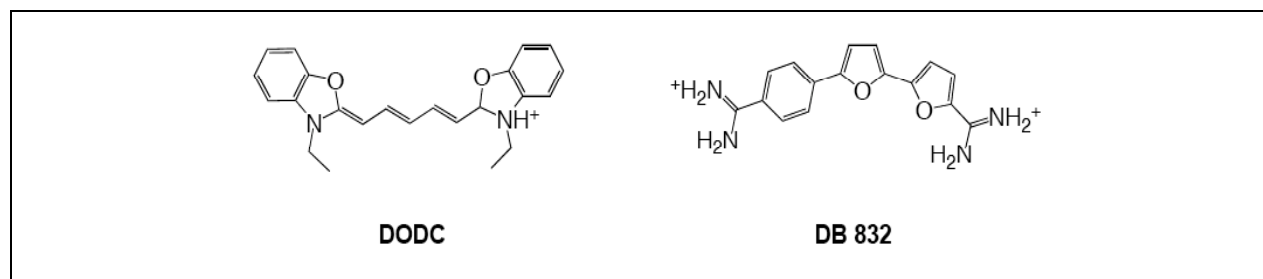


Figure 26 : Exemples de ligands interagissant potentiellement avec les sillons des G-quadruplexes

Ainsi, la carbocyanine **DODC** (Figure 26) a été identifié comme ligand du G-quadruplexe bimoléculaire $[d(G_4T_4G_4)]_2$, avec un K_d de 110 nM et une stœchiométrie 1 :1. Ce ligand possède la particularité d'exalter un signal de fluorescence lorsqu'il est lié au G-quadruplexe, et d'induire un signal de dichroïsme circulaire, positif et négatif ("splitting" d'excitons), autour de sa longueur d'onde d'absorption. Un tel signal n'est pas induit en présence d'un duplexe d'ADN [294]. D. Wilson *et coll.*, ont récemment confirmé ce signal CD induit par **DODC** sur le quadruplexe intramoléculaire formé par la séquence télomérique humaine [295]. Ce type de signal semble caractéristique d'une dimérisation / agrégation du ligand dans les sillons du G-quadruplexe. Notons cependant que **DODC** serait plutôt un ligand spécifique des triplexes [296].

De façon similaire à **DODC**, le bifuryl **DB 832** (Figure 26) montre un signal induit au voisinage de sa longueur d'onde d'absorption, lorsqu'il est titré par un quadruplexe formé par la séquence télomérique humaine. En revanche un tel signal n'est pas induit en présence de duplexes ou du G-quadruplexe formé par le promoteur de *c-myc*. Ces observations suggèrent que ce ligand interagirait dans les sillons du G-quadruplexe et qu'une sélectivité vis-à-vis du duplexe et une discrimination entre G-quadruplexes serait possible par ce type d'interaction. Ces résultats prometteurs restent cependant à confirmer par d'autres méthodes [295].

3.4 Effets cellulaires, conséquences du ciblage de la télomérase et/ou des télomères

Parmi les ligands dont les effets cellulaires télomériques ont été étudiés plus précisément, on trouve : **RHPS4**, **BRACO19**, **12549**, **360A/307A**, et la **télomestatine**.

En accord avec une inhibition indirecte de la télomérase, certaines de ces molécules induisent un arrêt de prolifération accompagné de sénescence et un raccourcissement progressif des télomères dans divers cellules cancéreuses traitées à des doses subcytotoxiques : c'est le cas de **BRACO19** [297], de **12459** [298], de la **télomestatine** dans diverses études sur cellules

humaines [299-302] et sur des cellules d'*Arabidopsis thaliana* ou de riz [303], et récemment de **RHPS4** dans des xénogreffes de cellules UXF1138L [304]. Dans certains cas, le raccourcissement des télomères observé est rapide (moins de 14 jours). On peut alors penser que l'inhibition de l'activité d'élongation de la télomérase n'est pas seule responsable des effets cellulaires observés. Un raccourcissement en rapport avec une réplication incomplète des télomères en présence des ligands pourrait également être envisagée.

D'autre part, d'autres conséquences cellulaires à plus court terme ont également été constatées, pour ces mêmes ligands [305], et pour les ligands **307A/360A** [272]. Ces effets sont caractérisés par une instabilité télomérique avec des fusions chromosomiques et des ponts entre chromosomes anaphasiques, et par le déclenchement des programmes d'apoptose et/ou de sénescence, en fonction notamment de la concentration de composés [306, 307]. Ils ne sont pas toujours accompagnés d'un raccourcissement significatif de la longueur des télomères. Les effets de certains ligands sur la taille de l'extrémité 3' sortante et la délocalisation éventuelle de protéines télomériques ont également été étudiés. Il a été montré que les ligands **12459** [307] et la **télomestatine** [287, 308] induisent une diminution de l'hybridation de l'extrémité 3' sortante par une sonde complémentaire dans des cellules tumorales ou immortalisées traitées, suggérant un raccourcissement de celle-ci. Il a également été observé que le traitement de cellules tumorales par la **télomestatine** et **BRACO19** induit la délocalisation partielle ou totale de la protéine hPOT (étiquetée par la GFP) aux télomères [309, 310] ainsi que celle de TRF2 [308, 311] dans le cas de la **télomestatine**. Ces données suggèrent fortement que la présence des ligands joue aussi un rôle au niveau de la structure du télomère, en induisant des dysfonctions et une déprotection télomériques qui mènent à la mort ou l'arrêt de prolifération cellulaire.

Étonnamment, dans certaines des cellules traitées, une inhibition de l'expression de hTERT ou de l'activité télomérase cellulaire est également observée. Celle-ci peut s'accompagner [297-299] ou non [270, 279, 306] d'un raccourcissement des télomères. Cette conséquence du traitement ne peut être facilement expliquée par un mécanisme uniquement basé sur une interaction des ligands avec l'ADN télomérique. L'équipe de Jean-François Riou a montré dans le cas du ligand **12459** que cette répression était liée à un épissage alternatif de l'ARNm de hTERT, qui pourrait, en outre, être induit par la présence d'une séquence formant un G-quadruplexe dans l'intron 6 du transcrit [74]. D'autre part, dans le cas de **RHPS4**, une inhibition dose dépendante de *c-myc* est également observée parallèlement à l'inhibition de l'activité télomérase dans les cellules traitées. La présence d'un G-quadruplexe dans son promoteur et le rôle de *c-myc* dans la régulation de hTERT pourraient donc également expliquer ce phénomène.

Des effets d'inhibition de croissance sur des xénogreffes ont été mesurés pour les ligands **RHPS4** [312], **BRACO19** [279] [297] et la **télomestatine** [313]. Les traitements par **BRACO19**

sur les xénogreffes de cellules A431 et **RHPS4** sur xénogreffes de cellules UXF1138L montrent une légère diminution de la croissance des tumeurs xénogreffées. Néanmoins les effets antiprolifératifs sont nettement potentialisés par un poison de la polymérisation des microtubules comme le taxol ou le paclitaxel. L'effet de **BRACO19** seul sur des stades précoces de xénogreffes de cellules UXF1138L est plus intéressant, avec une inhibition de croissance de 96% par rapport aux contrôles et une régression partielle des tumeurs [297]. L'administration de **télomestatine** sur des xénogreffes de cellules U937 dans un modèle murin conduit à de l'apoptose et une baisse de l'expression de la télomérase dans les tumeurs, conduisant à une réduction significative du volume des tumeurs par rapport aux tumeurs non traitées. De plus, aucune toxicité importante n'est observée sur des souris traitées [313].

Ces résultats concernant la faible toxicité de certains de ces ligands sur des cellules normales peuvent paraître étonnants. En effet, le principal défaut d'une stratégie ciblant les télomères plutôt que la télomérase, est que celle-ci ne permet pas *a priori* de différencier les cellules cancéreuses, des cellules normales, puisque toutes possèdent des télomères. En contrepartie, le fait de cibler les télomères doit permettre de toucher également des cellules cancéreuses qui ne sont pas télomérase-positives (ALT). Qu'en est-il réellement ? On observe généralement des cytotoxicités à court terme (<7j) de ces ligands bien plus faibles sur les cellules normales que sur les cellules cancéreuses [272, 310]. L'effet à plus long terme de ces ligands est plus difficile à mettre en évidence, en raison du plus faible potentiel de prolifération de ces cellules. Il semble néanmoins que la **télomestatine** n'ai pas d'effet antiprolifératif pendant 50 jours de traitement à 2 et 5 μ M sur des cellules fibroblastique normales BJ et IMR90 [313]. Dans le cas de la **télomestatine**, la toxicité sur des cellules de moelle osseuse CD34+ sur 14 jours est également bien plus faible que sur les cellules cancéreuses [299].

Concernant l'inhibition de croissance de cellules ALT, si aucun effet antiprolifératif du traitement par la **télomestatine** [313] ou par **12459** [271] n'a été constaté sur des cellules ALT GM847 pendant 40 à 50 jours, une importante inhibition de la croissance a été observée sur ces même cellules après 15 jours de traitement avec le composé **RHPS4** [270]. Les travaux de thèse de Thibaut Lemarteleur (Université de Reims, France) montrent également un arrêt de prolifération de cellules ALT MRC5V1 et WI38-VA13 induit par la **télomestatine**. D'autre part, un effet anti-prolifératif conséquent dans des cellules ALT de glioblastomes a également été montré pour le composé **307A** ; cet effet serait médié par de l'apoptose [272]. Ces composés sont donc susceptibles d'avoir des effets antiprolifératifs importants indépendamment de la présence d'une activité télomérase dans les cellules.

Les divers résultats obtenus sur cellules normales, ALT et télomérase-positives suggèrent donc que la structure du télomère pourrait être différente dans les cellules cancéreuses télomérase-

positives, ALT et dans des cellules normales ou germinales. Il est envisageable que les télomères soient moins protégés dans les cellules cancéreuses et que la nécessité d'une ouverture du télomère pour l'extension par la télomérase augmente l'accessibilité du télomère et donc l'accessibilité du simple-brin télomérique à des ligands stabilisant les G-quadruplexes. On peut également proposer que les réponses cellulaires à une fixation sur les télomères soient différentes entre cellules normales et cancéreuses. Néanmoins les études sur cellules normales et ALT restent sommaires et doivent être approfondies.

On peut proposer le modèle simplifié suivant pour le mécanisme d'action des ligands de G-quadruplexes aux télomères :

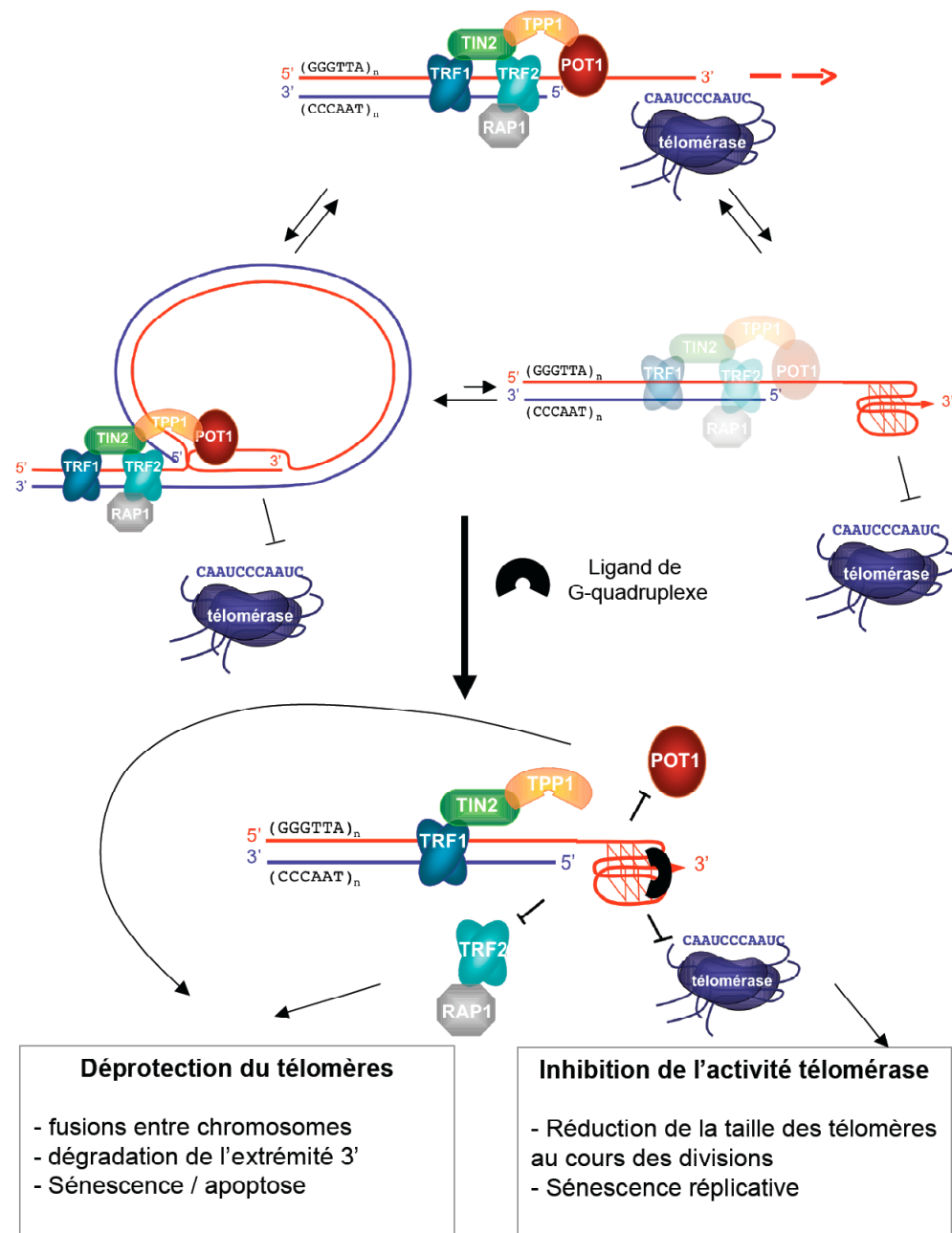


Figure 27 : Modèle d'action des ligands de G-quadruplexes au télomères

4 Objectifs de ce travail

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, les structures en G-quadruplexe sont susceptibles d'avoir des rôles essentiels au niveau cellulaire. L'opportunité de l'existence d'une extrémité simple-brin au niveau des télomères, fait de l'ADN télomérique une région privilégiée pour la formation de ces structures. De nombreux ligands de G-quadruplexes ont déjà été développés dans le but d'inhiber l'accès de la télomérase à son substrat. Les activités antiprolifératives de certaines de ces molécules sur des cellules cancéreuses sont particulièrement prometteuses puisque contrairement à des inhibiteurs classiques de la télomérase, elles induisent également des effets antiprolifératifs à plus court terme tout en conservant une toxicité qui semble limitée pour des cellules normales. Néanmoins, les mécanismes d'action de ces composés au niveau moléculaire ne sont pas encore complètement élucidés. D'autre part, la sélectivité de certains de ces ligands vis-à-vis d'autres structures d'ADN, notamment des duplexes d'ADN, est quelquefois discutable. Le développement de nouvelles molécules plus affines et plus sélectives est donc toujours d'actualité.

Dans la première partie des résultats de ce manuscrit, intitulée "Identification et caractérisation de nouveaux ligands de G-quadruplexes", nous avons développé une méthode permettant le test à moyen-haut débit de molécules stabilisant les structures en G-quadruplexe. Ce test a permis, en collaboration avec des chimistes du Collège de France et de l'Institut Curie, d'identifier rapidement de nouveaux ligands affins et sélectifs de ces structures, par rapport notamment à de l'ADN duplexe. Nous exposerons la caractérisation de certains d'entre eux plus en détail. Nous avons tenté de répondre en particulier à la question suivante : est-il possible d'identifier des ligands qui permettent de différencier des G-quadruplexes en fonction de leurs boucles ?

Nous nous sommes ensuite attachés à mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces ligands stabilisent les structures en G-quadruplexe. Sont-ils capables d'accélérer la formation d'une structure en G-quadruplexe à partir d'un ADN non structuré, ou agissent-ils en déplaçant l'équilibre par stabilisation de structures préformée ? L'utilisation d'un modèle de G-quadruplexe tétramoléculaire pour cette étude présente certains avantages que nous introduirons.

Ces ligands ont été développés afin d'inhiber la télomérase. Cependant les résultats cellulaires obtenus pour un bon nombre de ces ligands ne semblent pas être en accord avec leur unique effet sur la télomérase. Dans la troisième partie des résultats, nous avons souhaité étudier plus en profondeur les effets de ces ligands sur la télomérase ; sur son activité mais également sur sa processivité en fonction du substrat de départ. Le test TRAP, intensivement utilisé pour évaluer ces ligands vis-à-vis de leur cible n'est pas adapté à l'étude de la processivité de l'enzyme. Nous utiliserons pour cela un test d'extension de substrats oligonucléotidiques par la télomérase : le "direct assay".

Enfin la cible directe de ces ligands n'étant pas la télomérase mais bien l'ADN G-quadruplexe, nous avons envisagé l'utilisation de ces ligands dans d'autres types cellulaires que les cellules cancéreuses humaines. En effet, étant donné leurs effets antiprolifératifs, ces ligands devraient également pouvoir agir sur un organisme pathogène hautement prolifératif comme l'agent responsable de la Malaria : *Plasmodium falciparum*. Après un bref état de l'art sur les télomères et la télomérase du parasite, nous nous sommes interrogés sur l'existence d'une extrémité télomérique 3' simple-brin. Celle-ci est-elle susceptible de se structurer en G-quadruplexe dans des conditions physiologiques ? Est-il possible de reconnaître spécifiquement les G-quadruplexes formés par la séquence télomérique de *P. falciparum* avec des ligands de G-quadruplexes connus ? Quel est l'effet de ces ligands sur la prolifération du parasite ? Nous discuterons également des résultats préliminaires obtenus sur les effets télomériques du traitement du parasite par la **télomestatine**.

Résultats

Chapitre II. Identification et caractérisation de nouveaux ligands de G-quadruplexes

1 Vers de nouveaux ligands...

Nous avons montré dans l'introduction générale de ce manuscrit que la majorité des ligands de G-quadruplexes ayant été développés à ce jour, ont été conçus pour s'empiler sur les quartets terminaux des G-quadruplexes. La forme aromatique plane et la charge souvent positive de ces ligands ont pour conséquence une possible interaction de ces molécules avec des duplexes d'ADN. Par ailleurs, les ligands s'empilant sur les G-quartets terminaux ne permettent pas *a priori* de fixer préférentiellement un type de G-quadruplexe particulier. Comme nous l'avons suggéré avec le paragraphe introductif sur les ligands de G-quadruplexes, les sillons constituent des sites de fixation privilégiés qui permettraient en théorie une telle discrimination. Une autre voie possible, qui n'a pas été très explorée, est l'interaction des ligands avec les boucles des G-quadruplexes. Celles-ci pouvant varier en taille et en séquence, il semble possible de cibler préférentiellement certains G-quadruplexes en utilisant certains motifs bien choisis.

En collaboration avec Markus Kaiser dans le laboratoire de Marie-Paule Teulade-Fichou, nous avons exploré cette nouvelle voie de développement de ligands de G-quadruplexe, en couplant des surfaces aromatiques planes, dont certaines présentent de bonnes affinités pour les G-quadruplexes, à un "capuchon chargé" en forme de dôme pouvant interagir avec les boucles : la néomycine. Nous présenterons les résultats obtenus sur une famille de 4 molécules dans l'**article 2**. Par ailleurs, deux des molécules développées ont été utilisées pour illustrer la méthode de FRET que nous avons employée pour tester l'affinité et la sélectivité des ligands nouvellement développés, et qui sera présenté dans l'**article 1**.

En parallèle et dans la continuité du développement de ligands s'empilant sur les quartets terminaux des G-quadruplexes, il a été envisagé d'augmenter l'affinité et la sélectivité de ligands précédemment développés en collaboration avec Sanofi-Aventis dans la famille des 2,6 pyridodicarboxamide bisquinolinium, en élargissant la surface aromatique plane recouvrant le G-quartet. La caractérisation des molécules synthétisées par Elsa De Lemos dans le laboratoire du Dr. Teulade-Fichou est présentée dans l'**article 3**.

2 Mesure de l'affinité et de la sélectivité des ligands (Article 1)

2.1 Introduction

Les ligands déjà développés possèdent des affinités variées pour les G-quadruplexes et d'autres structures comme les duplexes d'ADN, qu'il n'est pas toujours aisé de quantifier. Parmi les méthodes communément utilisées pour quantifier l'affinité de molécules pour différentes structures, on peut citer, la résonance plasmonique de surface (SPR), la dialyse à l'équilibre, la spectrométrie de masse à ionisation par "electrospray" (ESI-MS) et les titrations en spectroscopies de fluorescence et d'absorbance. Ces techniques permettent en théorie d'accéder aux nombre de sites de fixation des molécules et à leurs valeurs de constantes d'affinité. Néanmoins elles possèdent quelques inconvénients majeurs :

- un débit limité
- la nécessité de propriétés spectrales exploitables des molécules (titrations et dialyse à l'équilibre) (cf. : Chapitre Matériel et Méthodes)
- de possibles interactions des molécules avec la surface de la puce en SPR et les difficultés souvent rencontrées avec cette technique lorsque les molécules sont solubilisées dans des solvants organiques comme le DMSO.
- Des contraintes de tampon pour l'ESI-MS (NH_4^+)

Or l'utilisation d'une méthode à moyen-haut débit est nécessaire pour identifier rapidement de nouvelles molécules liant les G-quadruplexes, et de tester leur sélectivité vis-à-vis d'autres structures d'ADN. Mergny *et al.* ont décrit une méthode basée sur la dénaturation thermique d'un oligonucléotide mimant la séquence télomérique humaine liée de façon covalente à des fluorophores. Un phénomène de transfert d'énergie d'excitation en fluorescence (FRET) permet de visualiser en fluorescence la transition G-quadruplexe/simple-brin [314]. En présence de composés liant les G-quadruplexes, la structure est stabilisée et la dénaturation thermique se fait à plus haute température (voir chapitre Matériel et Méthodes et **article 1**). La stabilisation obtenue (ΔT_m) permet donc d'accéder à une mesure semi-quantitative de l'affinité de la molécule pour le G-quadruplexe télomérique. D'autre part la sélectivité peut également être évaluée par cette technique, en utilisant un oligonucléotide compétiteur, structuré en duplexe par exemple. Celui-ci peut piéger des ligands peu sélectifs pour le G-quadruplexe fluorescent et limiter ainsi la stabilisation observée [273]. Initialement développée sur un fluorimètre classique, utilisant des cuves d'une contenance de 600 μL , l'emploi détourné de machines à PCR quantitatives a récemment émergé pour cette utilisation [315, 316].

Nous détaillerons dans l'**article 1** l'utilisation d'une telle machine pour tester la stabilisation et la sélectivité des ligands de G-quadruplexes. Nous discuterons en particulier de :

- l'effet du choix des couples donneurs et accepteurs pour l'oligonucléotide fluorescent
- des méthodes de détermination des demi-transitions observées (dérivée, $T_{1/2}$, et T_m) et de la stabilisation du ligand
- des conditions de sels (Na^+ , K^+) et de leurs effets sur la stabilisation par les ligands
- du choix possible des compétiteurs pour évaluer la sélectivité des ligands.

Nous avons tenu à illustrer ces divers points autour de l'utilisation de deux ligands qui seront présentés dans l'**article 2**, et de la **méridine**, un composé naturel stabilisant modérément les G-quadruplexes, qui a été caractérisé au sein du laboratoire par Lionel Guittat. Il s'agit du premier composé dont nous ayons évalué la stabilisation sur le G-quadruplexe télomérique par utilisation de la machine à PCR quantitative [317].

2.2 Article 1 : “Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands”. *Methods* 42 (2007) 183-195.

A. De Cian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Saccà, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M-P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J-L Mergny.

Résumé en français :

L'extrémité télomérique 3' sortante peut adopter *in vitro* une structure en G-quadruplexe intramoléculaire, qui a été démontrée comme inhibant indirectement l'activité télomérase. La réactivation de cette enzyme dans les cellules immortalisées et dans la majorité des cellules cancéreuses suggère que les télomères et la télomérase sont des cibles pertinentes en oncologie. Des ligands des télomères et des inhibiteurs de télomérase ont été proposés comme de nouveaux agents potentiellement anticancéreux. Dans cet article, nous avons analysé la méthode FRET utilisée pour mesurer la stabilisation et la sélectivité des ligands de G-quadruplexes envers le G-quadruplexe formé par la séquence télomérique humaine. La valeur de stabilisation dépend de la nature des fluorophores liés de manière covalente à la séquence, de la nature du tampon d'incubation et de la méthode choisie pour le calcul de la T_m , ce qui complique une comparaison directe des résultats obtenus par les différents laboratoires.

Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands

Anne De Cian^a, Lionel Guittat^{a,1}, Markus Kaiser^{b,2}, Barbara Saccà^{a,3}, Samir Amrane^a,
Anne Bourdoncle^a, Patrizia Alberti^a, Marie-Paule Teulade-Fichou^b,
Laurent Lacroix^a, Jean-Louis Mergny^{a,*}

^a *Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM 503, INSERM UR 565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France*

^b *Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France, CNRS UPR 285, 11, place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France*

Accepted 5 October 2006

Abstract

The telomeric G-rich single-stranded DNA can adopt *in vitro* an intramolecular quadruplex structure, which has been shown to directly inhibit telomerase activity. The reactivation of this enzyme in immortalized and most cancer cells suggests that telomeres and telomerase are relevant targets in oncology, and telomere ligands and telomerase inhibitors have been proposed as new potential anticancer agents. In this paper, we have analysed the FRET method used to measure the stabilization and selectivity of quadruplex ligands towards the human telomeric G-quadruplex. The stabilization value depends on the nature of the fluorescent tags, the incubation buffer, and the method chosen for T_m calculation, complicating a direct comparison of the results obtained by different laboratories.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: FRET; Telomeres; Telomerase inhibitor; G-quadruplex; G-quartet; DNA ligands

1. Introduction

G-quadruplexes are a family of secondary DNA structures which form in the presence of monovalent cations and consist of four-stranded motifs stabilized by G-quartets (Fig. 1A) [1,2]. Researchers demonstrate a renewed interest for G-quadruplex structures due to their putative biological regulatory function at telomeres. Telomeres protect chromosomal ends from fusion events and provide means for complete replication of the chromosome. Telomere repeats are added by a specialized enzyme, telomerase, which is

overexpressed in most tumour cells. In contrast, most normal cells exert a low level of telomerase activity [3]. The 3'-terminal region of the G-rich strand of human telomeres is single-stranded and may adopt a G-quadruplex conformation [4,5]. This structure has been shown to directly inhibit telomerase elongation *in vitro* [6]. Therefore, ligands that selectively bind to G-quadruplex motifs may interfere with telomere structure, telomere elongation/replication, and proliferation of cancer cells [7,8]. These compounds may be of natural origin (such as cryptolepine [9], berberine [10], and telomestatin [11,12]) or synthetic (such as RHPS4 [13], pyridine dicarboxamides [14] or bi- and trisubstituted acridines [15,16]). Several reviews concerning telomerase inhibitors in general or quadruplex telomere ligands have been published in the last few years [17–25].

The synthesis or screening of large chemical libraries of potential quadruplex ligands needs an inexpensive, reproducible, and fast assay to test quadruplex binding. One way to semi-quantify the interaction between a ligand and a quadruplex structure is to measure the increase in the

* Corresponding author. Fax: +33 1 40 79 37 05.

E-mail address: faucon@mnhn.fr (J.-L. Mergny).

¹ Washington University, Department of Cell Biology and Physiology, 660 S. Euclid Avenue, Box 8228, St. Louis, MO 63110-1093, USA.

² Chemical Genomics Centre, Otto-Hahn-Str. 15, D-44227 Dortmund, Germany.

³ Fachbereich Chemie, Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik, Universität Dortmund, Otto-Hahn-Str. 6, D-44227 Dortmund, Germany.

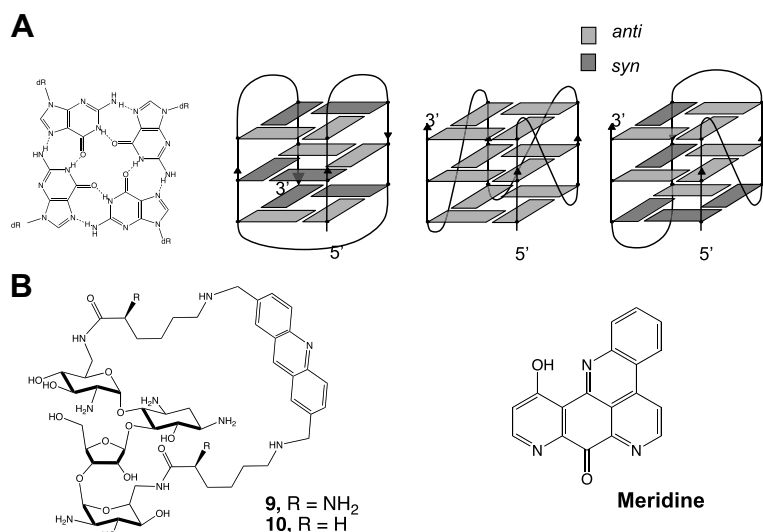


Fig. 1. (A) A G-quartet (left) and schematic drawing of intramolecular G-quadruplexes involving three quartets (right). (B) Formula of the compounds used for FRET melting experiments: neomycin-capped acridines (left), meridine (right).

melting temperature of a quadruplex induced by the presence of the ligand. In principle, absorbance or circular dichroism may be used to evidence this stabilization, provided a proper wavelength is chosen [26,27]. However, only few compounds have been tested by these methods [28]. One explanation is that absorbance and CD require relatively high DNA and ligand concentrations. As a result, one may encounter precipitation/aggregation problems. Furthermore, many ligands have a significant absorbance in the region where DNA absorbs light, which may interfere with the signal resulting from quadruplex dissociation (L. Guittat and J.L. Mergny, unpublished observations).

Since the original reports demonstrating that FRET could be used to study G- [29] and C- [30] quadruplexes, FRET systems became very popular, due to a large difference between the fluorescence properties of the folded and unfolded forms [31,32] (for a recent review: [33]). Most quadruplexes studied by fluorescence are intramolecular, but reports of tetramolecular systems have been made [34]. We will restrict our analysis to the study of quadruplex–ligand interactions. Nevertheless, it should be noted that such fluorescent quadruplex probes may find a number of different applications such as the study of duplex–quadruplex equilibria [35], conformational heterogeneity [36], quadruplex kinetics [37], and protein–DNA interactions [38,39]. They can also be used as potassium sensors [40,41], aptamers, nanodevices [42–44] (for a review: [45]) or molecular beacons [46]. In this article, we will present a single application of FRET–G4 oligonucleotides, *i.e.*, the identification and semi-quantitative analysis of quadruplex ligands.

2. Choice of the oligonucleotide, experimental conditions

2.1. The fluorescent oligonucleotide

Fluorescence spectroscopy can be used to probe the secondary structure of guanine-rich oligonucleotides, provided

that a fluorescein/FAM molecule (fluorescent donor for FRET studies) and a dabcyI (quencher) or tetramethylrhodamine (TAMRA, acceptor for FRET) are attached to the 5' and 3' ends of the oligonucleotide, respectively [31,33]. Most data presented below refer to a sequence that mimics 3.5 repeats of the guanine-rich strand of vertebrate telomeres. This corresponds to a 21-base-long oligomer: only the guanine track is repeated four times, allowing intramolecular folding into a quadruplex. The sequence is 5'-d-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG3'. The FAM-TAMRA and FAM-DabcyI dual-labelled oligomers are called “F21T” and “F21D”, respectively. Other groups have chosen identical or different FRET pairs [41,47–50], such as for example fluorescein–Cy3, Cy3–Cy5, or pairs of chemically modified fluorescein and rhodamine dyes (*i.e.*, Texas Red or ROX; for a recent review on FRET pairs, see [51]). These doubly labelled oligonucleotides may be easily purchased from a number of companies; the results presented here were obtained with oligomers synthesised and purified by Eurogentec (Belgium). All concentrations are expressed in strand molarity, using the nearest-neighbour approximation for the absorption coefficients of the unfolded species [52] and adding the contribution of the dyes at 260 nm. We recommend to purify these oligomers, check their UV-absorbance spectra, and verify their concentration. A mass spectrometry analysis may also be useful.

In most cases, we found that following the emission of the “donor” (in our case, fluorescein or FAM) gives more reproducible results than the sensitized emission of the acceptor (TAMRA). At least three reasons may explain this observation: (i) other mechanisms than FRET may account for donor quenching at low temperature; in that case, no sensitized emission of the acceptor is obtained; (ii) fluorescein gives a significant contribution to the fluorescence signal in the acceptor emission range; (iii) finally, most

real-time PCR machines are not equipped to measure TAMRA emission with an excitation around 490 nm (*i.e.*, corresponding to fluorescein absorbance maximum).

Upon fluorescein excitation around 490 nm (470 nm with the SpexFluoromax 3), one should observe a 5-fold or higher increase in emission around 520 nm between the low temperature (folded/quenched) and the high temperature form (unfolded/brightly fluorescent). This signal ratio may in principle be optimized to reach levels approaching classical molecular beacons (a >100-fold increase in fluorescence may be observed upon binding of the complementary probe [53,54]). For our applications, this consideration is not critical, and we did not try to use different donor/acceptor pairs to improve this difference.

2.2. Buffer: choice of the monocation

In order to measure a T_m variation upon ligand binding, one obviously needs an accurate value for the melting temperature of the oligonucleotide alone (*i.e.*, in the absence of a ligand). Taking into account the fact that most real-time PCR (RT-PCR) machines work in a temperature range between 25 and 95 °C, one needs a F21T or F21D quadruplex with a melting temperature between 45 and 55 °C. A lower T_m will lead to incomplete folding at low temperature while a higher T_m will prevent the analysis of extremely potent ligands. Initial experiments were performed in a 0.1 M lithium chloride, 10 mM sodium cacodylate, pH 7.2 buffer [32] (*i.e.*, with 10 mM Na^+ ions).

For the human telomeric motif, taking into account the fact that folding is intramolecular (meaning that the T_m is concentration-independent) and that the stability of a quadruplex depends on the nature and concentration of the cation, we selected three different buffer conditions that give satisfactory melting temperature values. We will define $T_{1/2}$ as the temperature for which the emission intensity is mid-value between the minimal (at low temperature) and maximal (at high temperature) emission of fluorescein. Most emission *vs* temperature plots are normalized between 0 and 1; in that case $T_{1/2}$ is the temperature corresponding to a normalized emission of 0.5. As this crude determination does not take into account baseline drifts, it may somewhat differ from a true temperature of half-melting (T_m). We decided to keep the total monocation concentration around 110 mM. LiCl is added in order to approach physiological ionic strength without stabilizing the quadruplex (lithium is a monocation which does not interact with G-quartets). Each solution contains 10 mM lithium cacodylate, pH 7.2 buffer. For F21D (which is more stable than F21T) we added:

- (i) 50 mM sodium chloride + 50 mM lithium chloride (under these conditions, F21D has a $T_{1/2}$ of 54 °C)
- (ii) 5 mM potassium chloride + 95 mM lithium chloride ($T_{1/2}$ = 55 °C)
- (iii) 50 mM ammonium chloride + 50 mM lithium chloride ($T_{1/2}$ = 50 °C)

These buffer conditions are often referred to as “ Na^+ ”, “ K^+ ”, and “ NH_4^+ ” respectively.

For F21T we chose:

- (i) 100 mM sodium chloride (under these conditions, F21T has a $T_{1/2}$ = 50 °C)
- (ii) 10 mM potassium chloride + 90 mM lithium chloride ($T_{1/2}$ = 53.5 °C)
- (iii) 100 mM ammonium chloride ($T_{1/2}$ = 46 °C)

These buffer conditions are often referred to as “ Na^+ ”, “ K^+ ”, and “ NH_4^+ ” respectively.

Concerning the effect of pH, one should note that the properties of the fluorescein-conjugated oligonucleotide are pH-dependent: an important quenching may be observed below pH 7.0 [29,30].

2.3. Experimental settings

Initial measurements were performed on a Spex Fluoromax 3 instrument with 600 μL of solution containing 0.2 μM of tagged oligonucleotide. In most recent experiments, a real-time PCR apparatus (MX3000P, Stratagene; or Roche Light Cycler or DNA engine Opticon, MJ Research) is used, allowing the simultaneous recording of 32–96 independent samples as first proposed by S. Neidle and co-workers. The typical concentration of fluorescent oligonucleotide is 0.2 μM (strand concentration), but acceptable curves may be obtained with concentrations in the 0.2–0.5 μM range depending on the volume (from 20 to 100 μL), the gain and the type of detection of the quantitative PCR apparatus used. We will present the setting of the MX3000P instrument in more details. All experiments are performed onto 96 wells. Each condition is tested at least in duplicate, in a volume of 25 μL for each sample. The FAM tag is excited at 492 nm, with a 9 nm full width at half maximum (FWHM) filter, and the emission is collected at 516 nm (10 nm FWHM filter) with a 8-fold gain. This allows the signal for 0.2 μM of unfolded oligonucleotide to be under the 35,000 value recommended by the manufacturer; the saturating level of the apparatus being at 65,536.

Most real-time PCR machines do not incorporate fluorescent melting temperature measurements as standard protocols. In order to study quadruplex (or other molecular beacons) denaturation, one needs to create a short protocol. The protocol used for our experiments is the following: a first step of equilibration at the lowest temperature (5 min at 25 °C) and a stepwise increase of 1 °C every minute for 71 cycles to reach 95 °C. The recording is performed after 1 min stabilization. We avoid heating first the oligonucleotide with the compound as this could cause its partial degradation. Nevertheless, a first annealing of the oligonucleotide in the buffer can be performed just before adding the compound. The chosen heating rate allows the recording of the 96 wells in 75 min and is slow enough to ensure the reversibility of the denaturation curve of the oligonucleotide alone. Much faster temperature ramps may be selected with a real-time PCR

apparatus, but this may lead to a hysteresis phenomenon [34,55–57]. Smaller steps with shorter stabilization (ex: 0.5 °C/30 s) can also be performed if the maximum number of cycles allowed by the machine is sufficient.

2.4. Determination of the T_m

Real-time PCR machines generate a lot of data, if one follows the stabilization of several compounds at different concentrations and ionic conditions. Manual baseline determination, which is normally required for true T_m determination [58], is actually impractical when facing several 96-well experiments per day. Only two feasible automatable alternatives are possible: (i) $T_{1/2}$ determination and (ii) first derivative analysis. Although both methods provide a less rigorous analysis, they are much faster to implement, and values are obtained in a user-independent way. We will briefly present these two methods. Although we tend to favour the first one (i), both methods are usually valid.

- (i) $T_{1/2}$ determination. The emission of fluorescein is normalized between 0 and 1, and the $T_{1/2}$ is defined as the temperature for which the normalized emission is 0.5. Such a mathematical treatment may be performed by Excel in a simple way. In order to apply this method, the oligonucleotide must be (quasi)completely folded at the lowest recording temperature, otherwise the $T_{1/2}$ will be overestimated.
- (ii) First derivative analysis. The $T_{\max}$ is defined as the maximum of the first derivative of the fluorescence *vs.* temperature curve. Such a mathematical transformation may also be performed by Excel in a simple way. Smoothing the derivative before $T_{\max}$ determination is often required.

2.5. Ligand concentration

One may (and should!) test the stabilization of the quadruplex at various ligand concentrations, as initially proposed by Neidle and co-workers [48]. The lowest ligand concentration should be higher than the oligonucleotide concentration (0.2 μ M in our tests). The highest ligand concentration should not lead to a too-high stabilization (a T_m above 80 °C is experimentally difficult to determine) and/or precipitation of the oligonucleotide (evidenced by a flat emission *vs.* temperature curve). As a rule of thumb, “poor” ligands may be tested in the 1–10 μ M concentration range, whereas strong quadruplex ligands may be tested in the 0.2–2 μ M range. Comparison of the profiles obtained at different concentrations generates a ΔT_m *vs.* concentration curve [48,59]. One can then determine, for example, the concentration required for a ΔT_m of 20 °C [48,50]. We also believe that the *shape* of this ΔT_m *vs.* concentration curve is informative; efforts are currently undertaken to understand important differences between various ligands (ADC, unpublished observations).

2.6. Competitors

Each compound may be tested alone or in the presence of a competitor. Each competitor, which is susceptible to “trap” a drug, may lower the stabilization of the quadruplex. Basically, one may test a number of different nucleic acids, provided that the following conditions are fulfilled:

- (i) In the absence of a quadruplex-interacting drug, this competitor must have no effect on the melting temperature of the F21T or F21D quadruplex. A typically inappropriate competitor is a sequence complementary, at least in part, to the fluorescent quadruplex.
- (ii) The stability of the competitor structure (duplex, triplex, and quadruplex) must be significantly higher than that of the fluorescent quadruplex. Otherwise, at the temperature for which the F21T/F21D unfolds, the competitor will be single-stranded, thus losing its binding capability. We initially underestimated the importance of this condition, and chose competitors with moderate stability: in that case, a lower-than expected effect was observed.

The “reference” competitor we chose is a self-complementary, 26 base-long oligodeoxynucleotide “ds26” (sequence 5'-d-CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG-3'). Its melting temperature is around 70.5 °C, *i.e.*, significantly higher than the T_m of F21D/F21T (which is around 50 °C in our experimental conditions). This double-stranded competitor may in principle be tested at different concentrations: however, particularly, for “highly specific” quadruplex ligands, the competitor should be added in excess as compared to the fluorescent quadruplex and ligand concentration in order to assess weak binding to double-stranded DNA. The upper limit for competitor concentration is delimited by solubility/crowding effects: in other words, one may test a very high molar excess of an unlabelled sequence (1000 $\times$ or more). The competitor may be DNA or RNA, an oligonucleotide of defined length or a polynucleotide, or even a mixture of sequences. Double-stranded sequences with various GC content may also be tested.

As for equilibrium dialysis experiments, one may discuss the relevance of comparing oligonucleotide concentrations or “motif” (base pair, quartet) concentrations. In general, we tested ds26 at 3 and 10 μ M, and compared with single-stranded competitors, such as dT26 (a 26-base-long single-stranded oligonucleotide which is composed of thymidines only) at the same oligonucleotide concentration. Double-stranded DNA was generally a stronger competitor than single-stranded DNA.

2.7. Controls, limitations, and possible artefacts

The method described here is relatively simple. As many experiments may be performed in parallel, reproducibility

may—and should—be tested. Differences of more than 2 °C between duplicate measurements are often the sign of a technical problem. Of importance is the control of the F21T/F21D oligonucleotide alone as an internal reference, which should be performed for each 96-well plate.

However, besides technical artefacts, there are two situations in which the assay will fail:

- (i) The ligand molecule is highly fluorescent (high extinction coefficient around 490 nm, and strong emission in the 520–580 nm range). In that case, the “donor” fluorescence will be polluted by a significant contribution from the tested molecule. Fortunately, with the notable exception of RHPS4, this situation is exceptionally rare (LG, ADC, unpublished results).
- (ii) The ligand molecule may interfere with fluorescein and/or TAMRA rather than with the quadruplex. In that case, an increase in melting temperature reflects an interaction with the fluorescent dye, not with the target structure, generating false positives. We have encountered this situation several times (ADC, SA, unpublished data). To exclude this possibility, it is essential to confirm quadruplex recognition with a non-tagged oligonucleotide, using independent techniques such as CD, absorbance, equilibrium dialysis, gel electrophoresis, DSC, ITC, SPR, etc. One may also try a competition experiment with a very stable but unlabelled quadruplex: if the ligand has a significant affinity for G4 DNA, this oligonucleotide should be an excellent competitor, lowering F21T/F21D stabilization. One may also encounter intermediate cases, in which the affinity for F21T/F21D is different than that for the unlabelled oligonucleotide: the presence of the fluorescent tags may modulate the accessibility of the ligand. So far, we have not found any false negatives (molecules that bind to quadruplexes but do not stabilize F21T/F21D as their binding site is masked by the fluorescent tags).

On the basis of stabilization data only, one cannot directly determine the affinity of a ligand towards a quadruplex, because, besides the artefacts mentioned above, another parameter plays a crucial role in ligand–quadruplex stabilization: the binding stoichiometry. In fact, we suspect that the T_m of the ligand–quadruplex complex also strongly depends on the number of ligand-binding sites per quadruplex, and it is difficult to extract this contribution from the whole enhancement of quadruplex stability. Another parameter that will complicate the analysis is the affinity of the molecule for the single-stranded form. In principle, a molecule that has a higher affinity for the unfolded over the folded form of the fluorescent oligonucleotide should lower its melting temperature. Up to now, we screened several thousands of compounds with this method but we never observed this phenomenon.

3. Interpretation of the melting results

3.1. Examples of quadruplex ligands

To illustrate the FRET method, we have chosen to present compounds that we recently designed for specific quadruplex recognition [60]. A series of aminoglycoside-capped macrocyclic structures were prepared using intramolecular bis tethering of neomycin on three aromatic platforms (phenanthroline, acridine, and quinacridine). We speculated that an appropriate derivatization of aminoglycosides with an intercalator system could lead to high-affinity ligands through simultaneous targeting of the G-quartet surface and of the loop phosphates or residues. We assembled the two motifs in a cyclic scaffold in the hope to compromise duplex binding. Hence, capping of various aromatic platforms with a neomycin moiety was investigated as an approach to design cyclic dome-shaped scaffolds suitable for adapting the topology of loop-containing quadruplexes.

FRET melting stabilization measurements showed that the series display moderate to high affinity for the G4-conformation of human telomeric repeats [60]. In addition, a FRET competition assay evidenced the poor binding ability of all macrocycles to duplex DNA compared to quadruplex DNA [60]. In the next paragraphs, we will present a detailed study on two molecules from this family, numbered **9** and **10**, whose formula are shown in Fig. 1B.

We first monitored by fluorescence the melting temperature of a fluorescent-tagged G-quadruplex (F21T) in the presence of various concentrations (0.5–8 μ M) of **9** and **10**. Raw curves are shown in Fig. 2A (for **9**) and D (for **10**), whereas normalized data are shown in Fig. 2B and E. Finally, first derivative plots are presented in Fig. 2C and F. The black curves represent the melting of F21T alone. When increasing the ligand concentration from 0.5 to 8 μ M, the melting curves are shifted toward higher temperatures, showing the concentration effect of the ligands on the G-quadruplex stabilization. Each melting profile is fairly reproducible, as shown by a fair superimposition between duplicates, apart from a few differences in the amplitude mainly due to pipetting errors. These discrepancies can be totally abolished by normalizing the curves between 0 and 1 (for example, see the black curves: F21T without ligand in Fig. 2B). The $T_{1/2}$ can be then determined accurately by taking the temperature at which the normalized fluorescence is 0.5 (Fig. 2B and E). Nevertheless, problems can still be encountered (see below). Finally, T_m can also be approximated by taking the maximum of the first derivative or its main peaks, depending on the shape of the transition. From our experience the raw derivative is often too noisy to determine with a good accuracy the maximum of the peak. That is why we perform a slight smoothing on three values ($i-1$, i , $i+1$) of the derivative. For some curves (blue and red in Fig. 2C or dark green and blue in Fig. 2F) the reproducibility is fair and the determination is unambiguous. However, in some cases, the curve may be noisy (even after

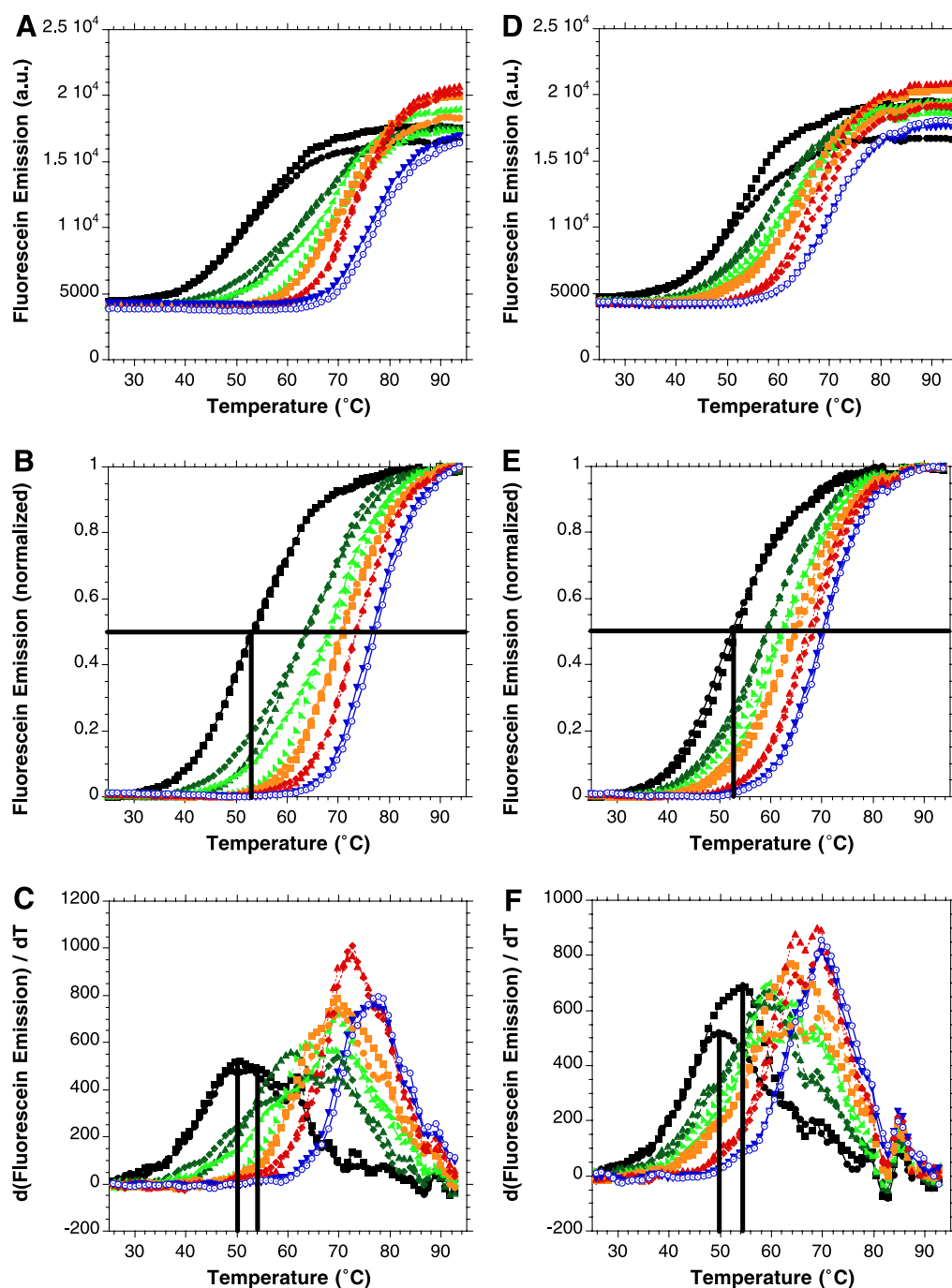


Fig. 2. Stabilization of F21T in the presence of various concentrations of **9** (panels A–C) or **10** (panels D–F). The thermal denaturation profile of F21T in K^+ conditions (Li cacodylate 10 mM, pH 7.2, KCl 10 mM, and LiCl 90 mM) is recorded alone (black symbols) or in the presence of various concentrations of quadruplex ligands, **9** or **10** (green, 0.5 μ M; light green, 1 μ M; orange, 2 μ M; red, 4 μ M; blue, 8 μ M). Panels A, D, raw data; panels B, E, normalized melting curves; panels C, F, first derivative of the melting curves. Stabilization is more pronounced with **9** (compare left and right panels). All experiments were performed in duplicate; both curves are shown to illustrate reproducibility. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

smoothing) or bimodal and the determination of the maximum is more questionable (black curve in Fig. 2C and F, green curves in Fig. 2C and light green, orange and red curves in Fig. 2F). In these cases, duplicates are not superimposable.

Concentration effects are displayed in Fig. 3 (panels A and B for compounds **9** and **10**, respectively). In our

hands, the best G4 ligands stabilize F21T or F21D by 20 °C or more at 1 μ M. The data shown in Fig. 3 suggest that **9** is a better quadruplex ligand than **10** under all conditions tested. In order to obtain a stabilization of ≈ 20 °C, one needs to add approx. 3 μ M of compound **9** (Fig. 3A) or more than 10 μ M of compound **10** (Fig. 3B). We call this concentration $C_{20^\circ C}$. The exact concentration

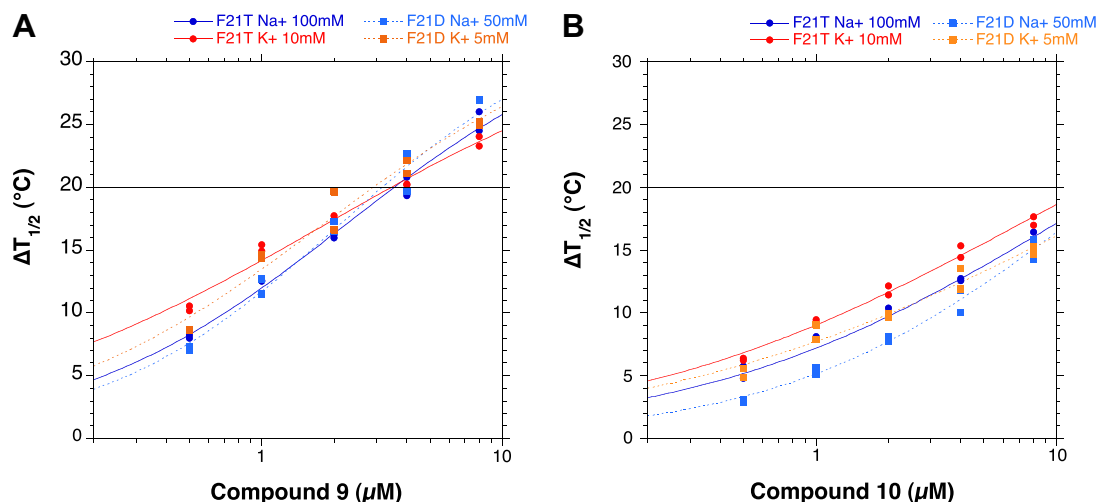


Fig. 3. Concentration dependency of the $\Delta T_{1/2}$: effect of oligomer and salt conditions. The stabilization ($\Delta T_{1/2}$) induced by **9** (A) or **10** (B) is presented for F21T (full line) or F21D (dotted line) in a sodium (in blue) or potassium (in red) buffer. Each concentration (0.5–8 μM) was tested in duplicate. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

required depends on the buffer (lower concentrations are required in potassium) and on the choice of the fluorescent oligonucleotide. For compounds **9** and **10** $C_{20^\circ\text{C}}$ is not very sensitive to experimental conditions, even if at 1 μM their $\Delta T_{1/2}$ can vary in a 5 $^\circ\text{C}$ range. For most compounds, lower concentrations are required in potassium and for the F21T oligomer. In an extreme case, we found $C_{20^\circ\text{C}}$ between 1.6 and 8 μM for the same molecule (ADC, unpublished data)! It is also worth pointing out that we try to keep constant the ionic force to 110 mM in all our experiments. A drop in salt concentration may also cause an increase in non-specific electrostatic interactions between the tagged DNA structure and the ligands. This illustrates the importance of comparing results obtained under identical conditions.

3.2. What is a selective ligand?

The stabilization observed in potassium for a 2 μM solution of compound **9** was challenged by the addition of a single-stranded or double-stranded competitor (Fig. 4A). Addition of a large excess of ds26, a self-complementary 26-base-long oligonucleotide of mixed base content, had little effect on the $\Delta T_{1/2}$ of the fluorescent oligo. A stabilization of +10.1 $^\circ\text{C}$ was obtained for the F21T–**9** complex in presence of 10 μM ds26 competitor (which corresponds to 130 μM in base pairs, or to a 200-fold molar excess of base pairs over base quartets). This $\Delta T_{1/2}$ value is relatively close to the +12.5 $^\circ\text{C}$ stabilization observed in absence of a competitor, showing that **9** is weakly binding to double-stranded DNA. For compound **10**, which is a weaker stabilizer (Fig. 3B), addition of 10 μM ds26 led to a relatively similar effect (data not shown).

Fig. 4B presents a quantitative analysis of the variation of the thermal stability of the F21T–**9** complex (1 μM) upon

addition of different competitors both in sodium (black bars) or potassium (light bars) buffer. In the absence of a competitor, the stabilization of the complex (in respect to the F21T alone) is similar in both conditions. Addition of increasing amounts of a single-stranded (dT26) or double-stranded (ds26) competitor leads to a slight decrease in $\Delta T_{1/2}$ (i.e., to destabilization of the complex). This decrease is more pronounced in sodium than in potassium, suggesting that the ligand has a better selectivity for the quadruplex motif in potassium solution. This may indicate a preference of **9** for the parallel or mixed parallel (potassium) rather than the antiparallel (sodium) form of G-quadruplex (see below, Section 3.2). In contrast, two intramolecular quadruplexes are excellent competitors. Addition of 3 μM 27NHEG (sequence 5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG) or 30AG (5'-A(G₅T₂A)₃G₅) leads to a dramatic decrease in $\Delta T_{1/2}$. This decrease is observed both in sodium and potassium. These competition experiments indicate that **9** and **10** have a preference for quadruplexes over duplexes or single strands, but do not discriminate between various intramolecular quadruplexes.

We recently reported similar observations for another family of ligands, ascididemin and meridine (Fig. 1B) [61]. The oligonucleotide used for these experiments was F21D. In the concentration range tested (1–10 μM), meridine was always more potent than ascididemin towards quadruplex stabilization. In sodium, the G-quadruplex is only slightly stabilized by ascididemin (+1.2 $^\circ\text{C}$ at the highest concentration: 10 μM) and a weak stabilization ($T_{1/2}$ = +3.6 $^\circ\text{C}$ at 10 μM) is also visible with meridine. By replacing sodium with potassium the stabilization induced by ascididemin and meridine was more pronounced. At 10 μM , ascididemin and meridine stabilized the quadruplex by 5.7 and 11.4 $^\circ\text{C}$, respectively. These data indicate that these dyes prefer to bind to the fluorescent F21D oligonucleotide in potassium rather than in sodium. Based on our experience, these two

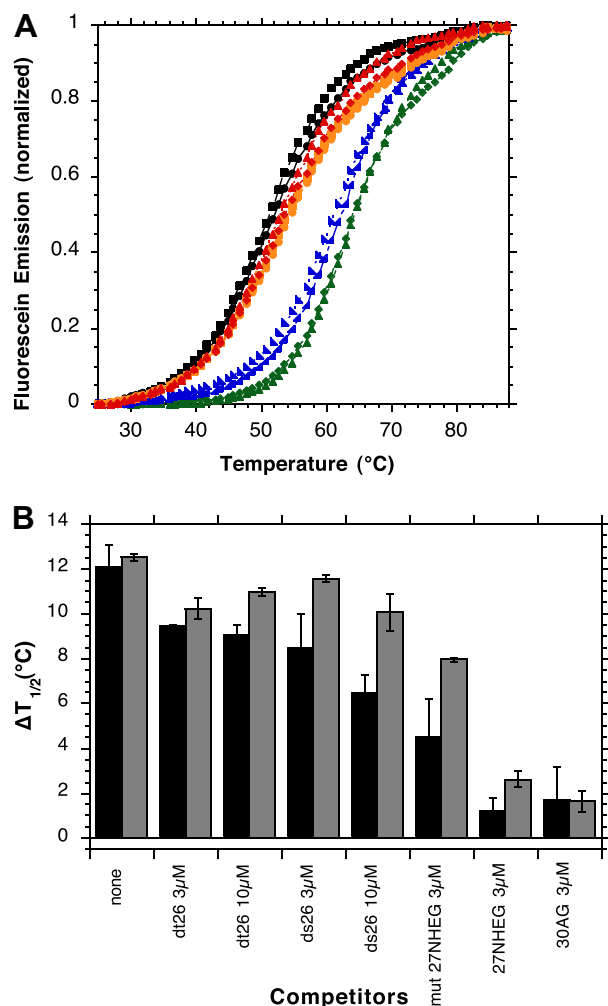


Fig. 4. Competition experiments. (A) Example of a competition curve. Normalized melting profiles of F21T alone (black symbols), in presence of 1 μM **9** in a potassium buffer without any competitor (green), with 10 μM ds26 (blue symbols), 3 μM 27NHEG (orange symbols) or 3 μM 30AG (red symbols) competitors. All experiments were performed in duplicate; both curves are shown to illustrate reproducibility. (B) Quantitative analysis of the competition experiments. The stabilization in sodium (black bars) and potassium (grey bars) is indicated for compound **9** (1 μM) in the absence ("none") or presence of various single-stranded (dT26, mut27NHEG: 5'-d-TGAGTAGCGTGAGCAGAGTGCCTAACG-3'), double-stranded (ds26), and quadruple-stranded (27NHEG, 30AG) competitors at 3 or 10 μM . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

molecules cannot be considered as strong quadruplex ligands.

We also used the F21T oligomer to perform these experiments. As shown in Fig. 5 for meridine at 5 μM in K^+ conditions, there is a significant difference in T_m and in the shape of the curves when using F21T (Fig. 5A–C) or F21D (Fig. 5B–D). This experiment illustrates again the importance of comparing results obtained under similar conditions, but also of analyzing the shape of the curves and not only the stabilization values (see Section 3.3). We can also discuss here the best method to determine the T_m of such a transition. The normalization and the $T_{1/2}$ determination

will give a biased T_m that does not reflect any of the two transitions, but somewhat "averages" them. On the other hand, the first derivative will give a better idea of the biphasic transition with the evidence of two main peaks (Fig. 5C–D). The reason for this biphasic behaviour remains an enigma. Several explanations may be proposed. For example, one could envision that distinct quadruplex conformations are differently stabilized by the ligand. As this behaviour depends on the nature of the fluorescent tags, this implies that the equilibria between quadruplex species may be shifted by these labels (a reasonable but unverified assumption). The risk of such a determination is to notify only the stabilization values of the second transition. This can result in an overestimation of the stabilizing effect of the ligand.

3.3. How can the differences among different cationic conditions be interpreted?

Quadruplexes are very polymorphic and, for a given sequence, several foldamers may coexist. Recent data demonstrated that the crystal [5] and solution structure [62,63] of the human telomeric quadruplex in potassium may be different from the structure in sodium [4]. Even if high-resolution structures have been determined in Na^+ and K^+ , some precautions should be taken: for the crystal structure determination, a G-quadruplex ligand was used during crystallization and for solution structure, sequence variants were used to overcome the conformational heterogeneity. Wild-type telomeric sequences do form G-quadruplexes, but fail to produce good crystal or NMR data, probably because of the existence of multiple foldamers. Furthermore, fluorescent labelling of the oligonucleotide may also alter the folding or the foldamer population distribution.

One may propose that most ligands (illustrated here by ascididemin and meridine) have a preference for the mixed parallel (potassium form) over antiparallel basket (sodium form) quadruplexes. This preference for the K^+ over the Na^+ form seems to be a general rule (ADC, unpublished observations). This trend is in line with the higher accessibility of the terminal tetrads in the K^+ form(s) as seen in the solid-state structure and in the solution conformation (hybrid form). This is probably an oversimplification: one would probably need to consider ligand binding to a population of quadruplexes rather than to a single quadruplex structure. One can envision that complex melting curves (biphasic) could result from this structural heterogeneity.

4. Variations and conclusion

4.1. Extension to other sequence motifs

4.1.1. Non-telomeric G-quadruplexes

Several groups are interested in the design of quadruplex ligands that recognize non-telomeric motifs, such as those found in the promoters of oncogenes [64–67]. One may in principle design a fluorescent oligonucleotide corresponding

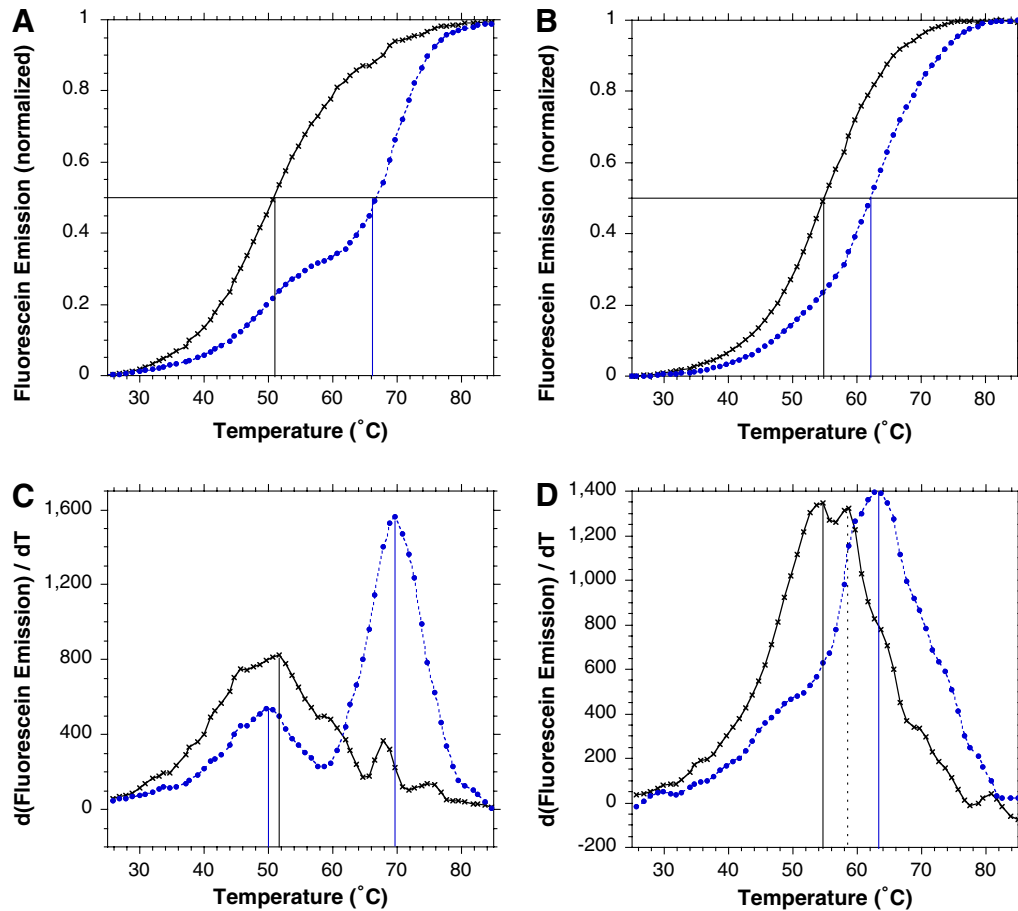


Fig. 5. Examples of F21T (panels A, C)/F21D (panels B, D) transitions. The thermal denaturing profile of F21T/F21D is recorded alone (black crosses) or in the presence of 5 μ M of meridine (blue symbols) in potassium conditions. Panels A, B, normalized melting curves; panels C, D first derivative of the melting curves. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

to the sequence of interest and test quadruplex formation by FRET [29]. Juskowiak and Takenaka recently reviewed the different sequences studied by FRET [33]. It is also possible to identify ligands that bind to non-vertebrate telomeric motifs with this method, provided that suitable tagged oligonucleotides are designed (De Cian et al., unpublished observations).

4.1.2. Trinucleotide repeats

Recent molecular genetic studies have revealed a correlation between spontaneous expansion of several DNA trinucleotide repeats ((CXG)_n with X = A; T; G; C) and a variety of debilitating human diseases first characterized in Fragile-X syndrome [68]. In all these diseases, DNA secondary structures formed by the trinucleotide repeat tracts may be considered as a common and causative factor for their own expansion during replication, recombination, and/or repair processes [69,70].

We have recently shown that short (CGG)_n trinucleotide repeats, exhibiting less than 12 repeats, fold into a simple hairpin structure rather than an intramolecular G-quadruplex [71]. Beyond this threshold, trinucleotide repeats may actually fold into a more complex structure we call “Broken-Hairpin”. This intramolecular structure presents two

bulges and two stems involving G–G mismatches. Interestingly, these elements may represent important features to discriminate trinucleotide repeats against canonical B-DNA for targeting by small trinucleotide repeat-specific ligands.

Even if no therapeutic approach is currently available to prevent or revert repeat expansion, *in vitro* studies suggest that repeat deletion could be induced by various chemotherapeutic agents [72,73], thus opening a new field of study aimed at the research of trinucleotide repeat-specific ligands. In our hands, preliminary results suggest that selective recognition of trinucleotide repeat structures is possible and that molecules of the acridine family also bind to the trinucleotide repeats with a quite good affinity and specificity. These molecules were identified using a variation of the FRET assay with a fluorescent oligonucleotide bearing eight trinucleotide repeats (S. Amrane, unpublished results).

4.2. Isothermal assays

Although the method presented above has a relatively high throughput, allowing the daily analysis of hundreds of melting profiles with a relatively inexpensive RT-PCR

instrument, it is not easily transformed into high-throughput screening (HTS) format. An isothermal assay would be required.

4.2.1. Hybridization assay

A good basis for such an assay is a hybridization test: a complementary C-rich strand is added to a quadruplex-forming oligonucleotide. In the presence of a quadruplex ligand, the folded conformation is locked and hybridization is impaired or delayed. Duplex formation may then be followed by FRET using a double-labelled sequence such as F21D or F21T [74]. This approach has to be used with caution. A strong delay in duplex formation has been observed in the presence of ligands not significantly increasing the $T_{1/2}$ of the quadruplex (P.A. unpublished observations). Indeed, certain ligands may interact with the fluorescein tag and quench its fluorescence emission, resulting in an apparent delay of duplex formation. In order to avoid false positives, *i.e.*, to discriminate between a real and an apparent delay, it should be better to label the 3' (or 5') end of the G-rich sequence with the donor and the 5' (or 3') end of the C-rich sequence with the acceptor or quencher. This alternative approach should permit to verify if the donor emission is quenched by the ligand, prior to the addition of the complementary C-rich strand. Isothermal assays can be performed on standard plate readers. In principle it could be possible to test up to 384 and 1536 samples in a single reading. It could also be envisaged to set up a multiplexed assay permitting to test a ligand on different quadruplex-forming sequences in the same well. Each quadruplex sequence could be discriminated at a specific emission wavelength using a specific FRET couple. Moreover, in contrast with thermal melting experiments, an isothermal hybridization assay allows, in principle, performing competition experiments using competitor structures as stable as the quadruplex to be tested, or even less stable. It is sufficient to work at a temperature low enough to ensure the folding of both structures (quadruplex and competitor).

4.2.2. Quenching efficiency

Isothermal assays become useful when the difference in melting temperatures between the fluorescent oligonucleotide alone (F21T for example) and its ligand-bound form is too high to allow a complete visualization of the melting curve. Another situation in which an alternative method may be useful occurs when several ligands show a similar stabilization effect on the fluorescent oligonucleotide and the difference in melting temperatures is not evident. One possible alternative is to measure the FRET efficiency at a given temperature (usually around 25 °C) by recording the emission spectra of the free and ligand-bound form in the same conditions. Surprisingly, stabilization of the dual-labelled oligonucleotide (F21T) by the ligand very often results in a further decrease in emission (B. Saccà, unpublished observations). Furthermore, we observed that the extent of quenching is related to the affinity of the ligand for the oligonucleotide tested (all precautions must be

taken to avoid measurements of false positives, such as use of the same experimental conditions in absence and presence of ligand, control assay with a labelled non-quadruplex motif to test the possibility of non-specific interactions of the ligand with the oligonucleotide and/or fluorophore, and assessment of the quadruplex conformation of the F21T at the chosen temperature). Normalization allows for comparison of different ligands. Even small variations in ligand-binding affinity may be visualized as a decrease in the fluorescence emission of the donor. The rapidity of the method represents its main advantage although the isothermal conditions preclude the possibility of a thermodynamic analysis of the binding reaction.

The usefulness of this method is illustrated by the following experiment recently performed in our group. We analysed a series of paromomycin–quinacridine derivatives (Fig. 6) to test their binding affinity towards the G-quadruplex motif. Recent studies have demonstrated the binding capabilities of these aminoglycoside–quinacridine systems to the stem–loop motif of the P6.1 element, which is critically involved in telomerase assembly [59]. However, their binding properties towards telomeric G-quadruplex structures have not yet been elucidated. For this reason, we investigated their effect on the stabilization of F21T, both in 100 mM sodium or 100 mM potassium in 10 mM cacodylate buffer at pH 7.0. As the melting temperatures recorded by FRET experiments were too high to be accurately determined (even in LiCl buffer), we performed an isothermal FRET measurement of a 0.2 μ M solution of F21T in absence and presence of 1 μ M of different paromomycin conjugates. Upon excitation at 470 nm, emission spectra were recorded in the 480–650 nm range at 20 °C after 12 h equilibration at 4 °C. The FRET efficiencies for all the F21T–ligand pairs, both in sodium and potassium buffer, are shown in Fig. 7 and are directly proportional to the binding affinities of the ligand towards the G-quadruplex motif. It appears evident that in sodium buffer (Fig. 7, grey bars) all the ligands show a strong binding affinity towards the F21T quadruplex according to the following order: PM1 $\geq$ PD2 $\approx$ PD1 > PM3 > PD3. The same ranking of binding affinity was obtained in potassium buffer (Fig. 7, black bars), although in this case the binding conditions seem to be more stringent. Only PM1 sufficiently binds to F21T, resulting in a quenching efficiency of more than 50% (while in sodium buffer all the ligands led to more than 70% of quenching). In particular, in potassium buffer the weakly binding PD3 ligand shows almost no binding affinity. This demonstrates that for weakly binding ligands the choice of the buffer conditions may be determinant. Additionally, we could easily and rapidly determine the effect of linker length and number of aminoglycoside moieties on the binding affinities of different paromomycin derivatives to the G-quadruplex motif. Though speculations may be drawn to fully explain these results, a clear tendency is however defined: the binding is favoured by shorter linker lengths and monosubstituted quinacridine platforms (PM1 and PM3). The isothermal FRET

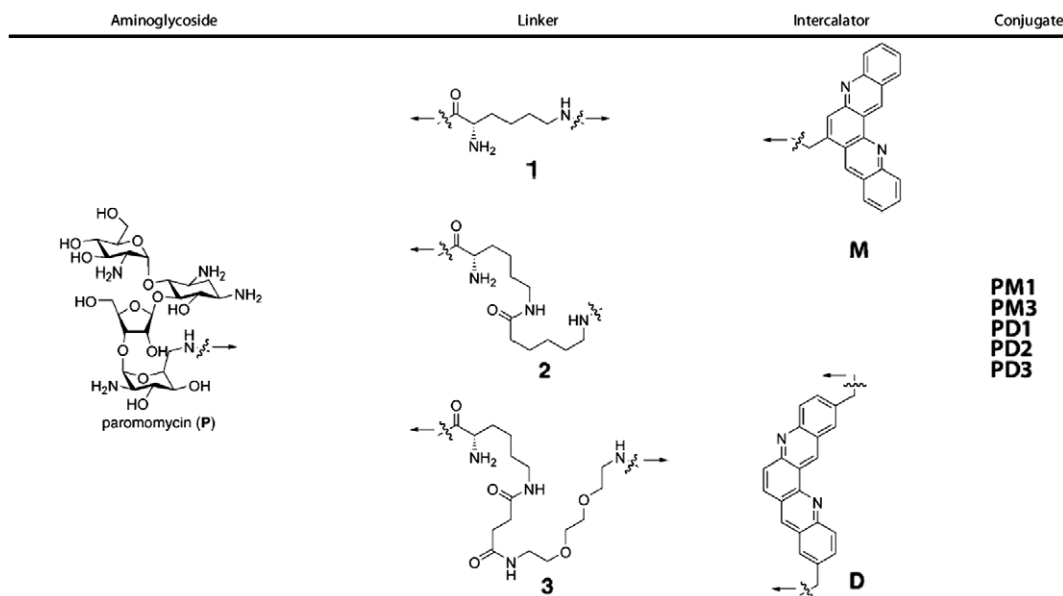


Fig. 6. Paromomycin–quinacridine derivatives used for isothermal FRET experiments. Combination of the aminoglycoside moiety (paromomycin, **P**) with three different linker chains (**1–3**) and a mono- or dicarboxaldehyde (**M** and **D**, respectively) leads to formation of five different conjugates (PM1, PM3, PD1, PD2, and PD3).

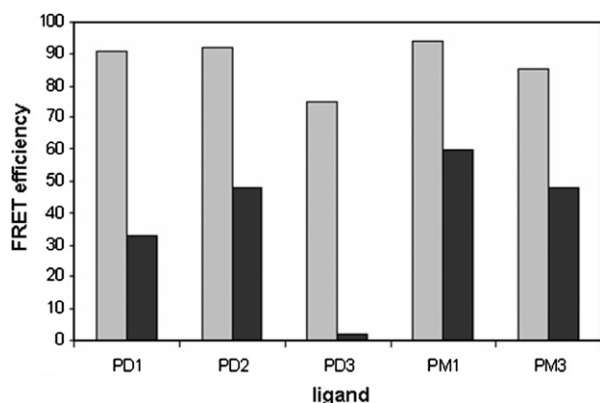


Fig. 7. Relative binding affinities of the paromomycin derivatives for the F21T oligo. The efficiency of energy transfer between the fluorescein and TAMRA of the quadruplex-forming F21T oligo (0.2 μ M) was measured in presence of different paromomycin–quinacridine conjugates at 1 μ M concentration (for the nomenclature, see Fig. 6) in 10 mM sodium cacodylate buffer at pH 7.0, either in 100 mM NaCl (grey bars) or in 100 mM KCl (black bars). The extent of energy transfer is proportional to the binding affinity of the ligand for the G-quadruplex motif.

approach may also be suitable for competition assays, once all the necessary precautions described above are taken into consideration.

In conclusion, although the method allows only semi-quantitative analysis of ligand-binding affinities, it may be used to rapidly identify the most promising candidates among many compounds in order to direct synthetic and/or analytical efforts towards the best direction. As a final caution note, one should consider that this method may generate false positives (quenching of donor by the ligand) and false negatives (folding with the ligand in such configuration that the distance/orientation prevents quenching/FRET).

4.3. Concluding remarks

The number of G4 ligands has grown rapidly over a few years: a range of molecules has been shown to recognize the telomeric quadruplex [7,12,13,15,32,75–88]. One molecule, telomestatin, is exceptionally potent with an IC_{50} of 5 nM in the TRAP assay [11]. The success in the generation of large libraries argues for analytical methods that allow a rapid, simple, inexpensive, and semi-quantitative evaluation of binding “strength”. The G4 FRET assay presented here is well suited for this purpose, especially in 96-well format. Contrary to other methods, it allows a variety of ionic conditions. Each molecule may be tested at various concentrations, and in the presence of a large excess of competitors. Hence, the G4 FRET not only monitors affinity, but also specificity towards quadruplexes, a critical issue for many ligands [89,90].

Acknowledgments

We thank Patrick Mailliet and Eliane Mandine (Sanofi-Aventis, Vitry, France) and Jean-François Riou (Université de Reims) for helpful discussions. This work was supported in part by an ARC grant (No. 365), an EU FP6 “MolCancerMed” grant (LSHC-CT-2004-502943 to J.-L.M.) and a Fondation Jérôme Lejeune Ph.D. fellowship (to S.A.).

References

- [1] J.R. Williamson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23 (1994) 703–730.
- [2] J.T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 668–698.
- [3] K. Masutomi, E.Y. Yu, S. Khurts, I. BenPorath, J.L. Currier, G.B. Metz, M.W. Brooks, S. Kaneko, S. Murakami, J.A. DeCaprio, R.A. Weinberg, S.A. Stewart, W.C. Hahn, *Cell* 114 (2003) 241–253.

- [4] Y. Wang, D.J. Patel, *Structure* 1 (1993) 263–282.
- [5] G.N. Parkinson, M.P.H. Lee, S. Neidle, *Nature* 417 (2002) 876–880.
- [6] A.M. Zahler, J.R. Williamson, T.R. Cech, D.M. Prescott, *Nature* 350 (1991) 718–720.
- [7] D. Sun, B. Thompson, B.E. Cathers, M. Salazar, S.M. Kerwin, J.O. Trent, T.C. Jenkins, S. Neidle, L.H. Hurley, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 2113–2116.
- [8] J.L. Mergny, C. Hélène, *Nat. Med.* 4 (1998) 1366–1367.
- [9] L. Guittat, P. Alberti, F. Rosu, S. Van Miert, E. Thetiot, L. Pieters, V. Gabelica, E. De Pauw, A. Ottaviani, J.F. Riou, J.-L. Mergny, *Biochimie* 85 (2003) 535–547.
- [10] M. Franceschin, L. Rossetti, A. Dambrosio, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, C. Schultes, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 1707–1711.
- [11] K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1262–1263.
- [12] M.Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-ya, K. Wierzba, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2098–2099.
- [13] S. Gowan, R. Heald, M. Stevens, L. Kelland, *Mol. Pharmacol.* 60 (2001) 981–988.
- [14] G. Pennarun, C. Granotier, L.R. Gauthier, D. Gomez, F. Hoffschir, E. Mandine, J.F. Riou, J.L. Mergny, P. Mailliet, F.D. Boussin, *Oncogene* 24 (2005) 2917–2928.
- [15] R.J. Harrison, J. Cuesta, G. Chessari, M.A. Read, S.K. Basra, A.P. Reszka, J. Morrell, S.M. Gowan, C.M. Incles, F.A. Tanious, W.D. Wilson, L.R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 4463–4476.
- [16] A.M. Burger, F.P. Dai, C.M. Schultes, A.P. Reszka, M.J. Moore, J.A. Double, S. Neidle, *Cancer Res.* 65 (2005) 1489–1496.
- [17] J.L. Mergny, J.F. Riou, P. Mailliet, M.P. Teulade-Fichou, E. Gilson, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 839–865.
- [18] G. Saretzki, *Cancer Lett.* 194 (2003) 209–219.
- [19] E.M. Rezler, D.J. Bearss, L.H. Hurley, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43 (2003) 359–379.
- [20] J. Cuesta, M. Read, S. Neidle, *Mini Rev. Med. Chem.* 3 (2003) 11–21.
- [21] L.K. White, W.E. Wright, J.W. Shay, *Trends Biotechnol.* 19 (2001) 114–120.
- [22] P.T. Rowley, *Expert. Opin. Ther. Patents* 11 (2001) 1815–1823.
- [23] S.M. Kerwin, *Curr. Pharm. Des.* 6 (2000) 441–471.
- [24] L. Guittat, P. Alberti, D. Gomez, A. de Cian, G. Pennarun, T. Lemarteleur, C. Belmokhtar, R. Paterski, H. Morjani, C. Trentesaux, E. Mandine, F. Boussin, P. Mailliet, L. Lacroix, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Cytotechnology* 45 (2004) 75–90.
- [25] J.W. Shay, W.E. Wright, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 577–584.
- [26] J.L. Mergny, A.T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.* 435 (1998) 74–78.
- [27] C.C. Chang, J.Y. Wu, C.W. Chien, W.S. Wu, H. Liu, C.C. Kang, L.J. Yu, T.C. Chang, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6177–6183.
- [28] G.S. Minhas, D.S. Pilch, J.E. Kerrigan, E.J. Lavoie, J.E. Rice, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 3891–3895.
- [29] T. Simonsson, R. Sjöback, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17379–17383.
- [30] J.L. Mergny, *Biochemistry* 38 (1999) 1573–1581.
- [31] J.L. Mergny, J.C. Maurizot, *ChemBioChem* 2 (2001) 124–132.
- [32] J.L. Mergny, L. Lacroix, M.P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P.B. Arimondo, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, J.F. Riou, T. Garestier, C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3062–3067.
- [33] B. Juskowiak, S. Takenaka, *Methods Mol. Biol.* 335 (2006) 311–341.
- [34] E.E. Merkina, K.R. Fox, *Biophys. J.* 89 (2005) 365–373.
- [35] N. Kumar, S. Maiti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 759–767.
- [36] J.Y. Lee, B. Okumus, D.S. Kim, T.J. Ha, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 18938–18943.
- [37] J.J. Green, L.M. Ying, D. Klenerman, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3763–3767.
- [38] S. Lyonais, R.J. Gorelick, J.L. Mergny, E. LeCam, G. Mirambeau, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5754–5763.
- [39] T. Romero-Salas, I. Petrusseva, O. Lavrik, A. Bourdoncle, J.-L. Mergny, A. Favre, C. Saintome, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 4857–4865.
- [40] F. He, Y.L. Tang, S. Wang, Y.L. Li, D.B. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12343–12346.
- [41] B. Juskowiak, E. Galezowska, A. Zawadzka, A. Gluszynska, S. Take-naka, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 64 (2006) 835–843.
- [42] J.J. Li, W. Tan, *Nano Letters* 2 (2002) 315–318.
- [43] P. Alberti, J.L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 1569–1573.
- [44] P. Alberti, J.L. Mergny, *Cell. Mol. Biol.* 50 (2004) 241–253.
- [45] P. Alberti, A. Bourdoncle, B. Saccà, L. Lacroix, J.L. Mergny, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 3383–3391.
- [46] A. Bourdoncle, A. Estévez Torres, C. Gosse, L. Lacroix, P. Vekhoff, T. Le Saux, L. Jullien, J.L. Mergny, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 11094–11105.
- [47] R. Darby, M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, N. Brown, C. Barton, T. Brown, K. Fox, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e39.
- [48] C.M. Schultes, W. Guyen, J. Cuesta, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4347–4351.
- [49] D. Gomez, R. Paterski, T. Lemarteleur, K. Shinya, J.L. Mergny, J.F. Riou, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 41487–41494.
- [50] M.J.B. Moore, C.M. Schultes, J. Cuesta, F. Cuenca, M. Gunaratnam, F.A. Tanious, W.D. Wilson, S. Neidle, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 582–599.
- [51] K.E. Sapsford, L. Berti, I.L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45 (2006) 4562–4589.
- [52] C.R. Cantor, M.M. Warshaw, H. Shapiro, *Biopolymers* 9 (1970) 1059–1077.
- [53] S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 303–308.
- [54] S. Tyagi, D.P. Bratu, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 49–53.
- [55] A. Risitano, K.R. Fox, *Biochemistry* 42 (2003) 6507–6513.
- [56] A. Risitano, K.R. Fox, *Org. Biomol. Chem.* 1 (2003) 1852–1855.
- [57] A. Risitano, K.R. Fox, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 2598–2606.
- [58] J.L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* 13 (2003) 515–537.
- [59] M. Kaiser, M. Sainlos, J.M. Lehn, S. Bombard, M.P. Teulade-Fichou, *ChemBioChem* 7 (2006) 321–329.
- [60] M. Kaiser, A. De Cian, M. Sainlos, C. Renner, J.L. Mergny, M.P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 1049–1057.
- [61] L. Guittat, A. DeCian, F. Rosu, V. Gabelica, E. DePauw, E. Delfourne, J.L. Mergny, *Bioch. Biophys. Acta Gen. Subjects* 1724 (2005) 375–384.
- [62] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 2723–2735.
- [63] K.N. Luu, A.T. Phan, V. Kuryavyy, L. Lacroix, D.J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 9963–9970.
- [64] A. Rangan, O.Y. Fedoroff, L.H. Hurley, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4640–4646.
- [65] C.L. Grand, H.Y. Han, R.M. Munoz, S. Weitman, D.D. VonHoff, L.H. Hurley, D.J. Bearss, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 565–573.
- [66] A.T. Phan, V. Kuryavyy, H.Y. Gaw, D.J. Patel, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 167–173.
- [67] E.M. Rezler, J. Seenisamy, S. Bashyam, M.Y. Kim, E. White, W.D. Wilson, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 9439–9447.
- [68] I. Oberle, F. Rousseau, D. Heitz, C. Kretz, D. Devys, A. Hanauer, J. Boue, M. Bertheas, J. Mandel, *Science* 252 (1991) 1097–1102.
- [69] C.T. McMurray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 1823–1825.
- [70] J.D. Cleary, C.E. Pearson, *Trends Genet.* 21 (2005) 272–280.
- [71] S. Amrane, J.L. Mergny, *Biochimie* 88 (2006) 4857–4865.
- [72] V.I. Hashem, R.R. Sinden, *Mutat. Res.* 508 (2002) 107–119.
- [73] V.I. Hashem, M.J. Pytlos, E.A. Klysik, K. Tsuji, M. Khajav, T. Ashizawa, R.R. Sinden, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 6334–6346.
- [74] P. Alberti, J. Ren, M.P. Teulade-Fichou, L. Guittat, J.F. Riou, J.B. Chaires, C. Hélène, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, J.L. Mergny, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19 (2001) 505–513.
- [75] R.T. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F.X. Han, L.H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3261–3262.
- [76] O.Y. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V.V. Chemeris, S.M. Kerwin, L.H. Hurley, *Biochemistry* 37 (1998) 12367–12374.
- [77] P.J. Perry, M.A. Read, R.T. Davies, S.M. Gowan, A.P. Reszka, A.A. Wood, L.R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2679–2684.

- [78] R.J. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 2463–2468.
- [79] S. Neidle, R.J. Harrison, A.P. Reszka, M.A. Read, *Pharmacol. Ther.* 85 (2000) 133–139.
- [80] V. Caprio, B. Guyen, Y. Opoku-Boahen, J. Mann, S.M. Gowan, L.M. Kelland, M.A. Read, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 2063–2066.
- [81] F. Koepfel, J.F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P.B. Arimondo, D. Labit, O. Petigenet, C. Hélène, J.L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 1087–1096.
- [82] P. Alberti, P. Schmidt, C.H. Nguyen, M. Hoarau, D. Grierson, J.L. Mergny, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 1071–1074.
- [83] D.F. Shi, R.T. Wheelhouse, D.Y. Sun, L.H. Hurley, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4509–4523.
- [84] R.A. Heald, C. Modi, J.C. Cookson, I. Hutchinson, C.A. Laughton, S.M. Gowan, L.R. Kelland, M.F.G. Stevens, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 590–597.
- [85] S.M. Gowan, J.R. Harrison, L. Patterson, M. Valenti, M.A. Read, S. Neidle, L.R. Kelland, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1154–1162.
- [86] L. Rossetti, M. Franceschin, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 2527–2533.
- [87] M. Read, R.J. Harrison, B. Romagnoli, F.A. Tanious, S.H. Gowan, A.P. Reszka, W.D. Wilson, L.R. Kelland, S. Neidle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 4844–4849.
- [88] A. Maraval, S. Franco, C. Vialas, G. Pratviel, M.A. Blasco, B. Meunier, *Org. Biomol. Chem.* 1 (2003) 921–927.
- [89] P. Alberti, M. Hoarau, L. Guittat, M. Takasugi, P.B. Arimondo, L. Lacroix, M. Mills, M.P. Teulade-Fichou, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, P. Mailliet, J.L. Mergny, in: C. Bailly, M. Demeunynck, D. Wilson (Eds.), *Small molecule DNA and RNA binders: from synthesis to nucleic acid complexes*, Wiley VCH, 2002, pp. 315–336.
- [90] P. Alberti, L. Lacroix, L. Guittat, C. Hélène, J.L. Mergny, *Mini Rev. Med. Chem.* 3 (2003) 23–36.

2.3 Données complémentaires : effet de la nature du cation sur la sélectivité de divers ligands de G-quadruplexes vis-à-vis d'un duplexe d'ADN

Nous avons utilisé cette méthode pour tester un certain nombre de ligands de G-quadruplexe de “référence” développés entre autres par les équipes de L. Hurley et S. Neidle, et que nous avons précédemment présenté dans l'introduction générale de ce manuscrit.

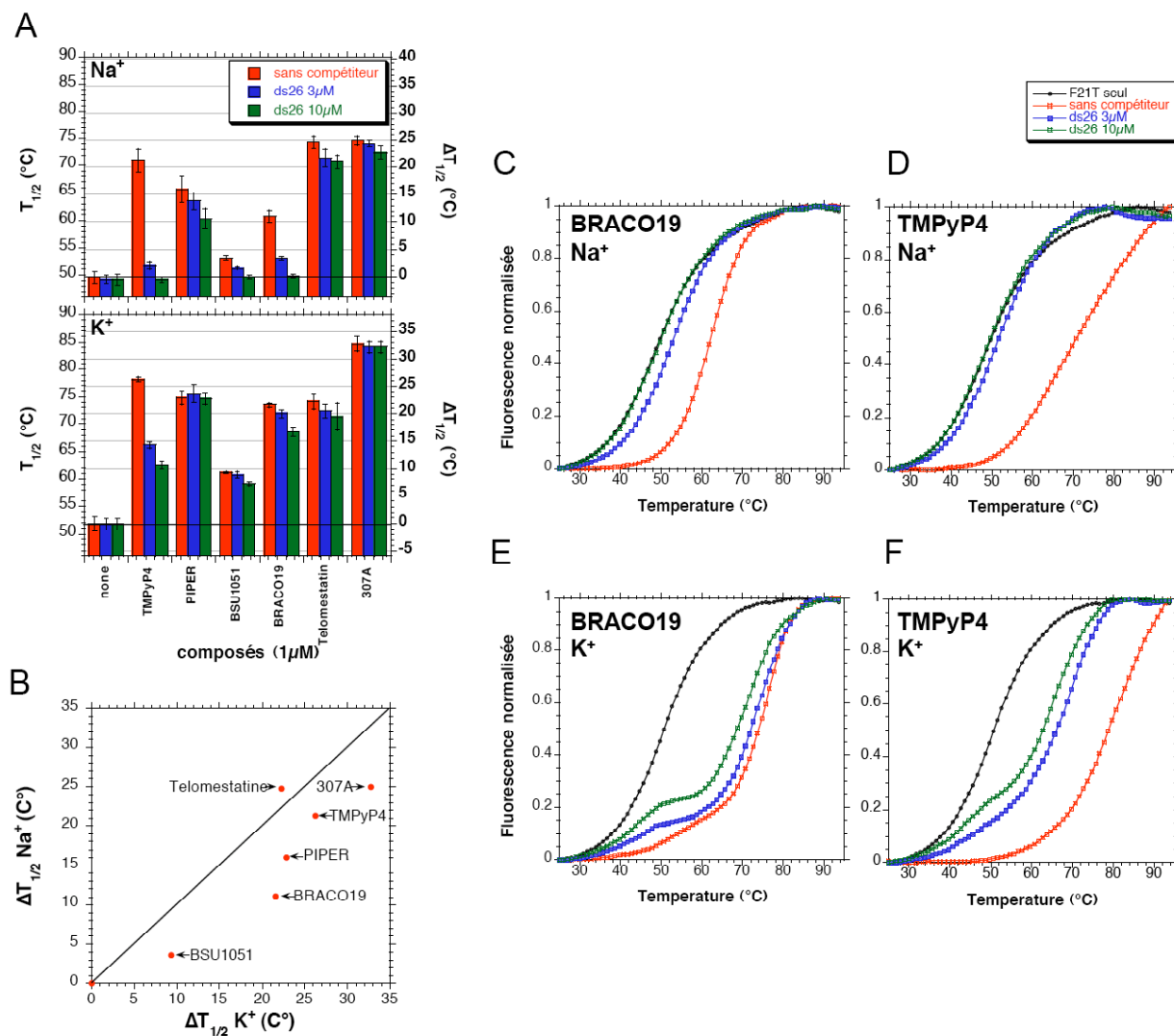


Figure 28 : Effet de la nature du cation monovalent sur la stabilisation et la sélectivité de divers ligands de G-quadruplexes

(A) : Valeur de $T_{1/2}$ (axe de gauche) ou $\Delta T_{1/2}$ ($T_{1/2}$ (1 μM ligand) - $T_{1/2}$ (F21T seul)) (axe de droite) en présence ou absence de 1 μM de ligands et 0, 3 ou 10 μM de compétiteur double-brin ds26 en présence de Na⁺ ou K⁺
 (B) Comparaison de $\Delta T_{1/2}$ en présence de 1 μM de ligand dans les 2 conditions
 (C-F) Exemples de courbes de dénaturation thermiques normalisées entre 0 et 1 en présence ou absence de 1 μM des composés BRACO19 (C,E) ou TMPPyP4 (D,F), et de 0, 3 ou 10 μM de ds26. Conditions Na⁺ : 10 mM lithium cacodylate pH 7,2, NaCl 100 mM ; conditions K⁺ : 10 mM lithium cacodylate pH 7,2, LiCl 90 mM, KCl 10 mM.

Les résultats présentés Figure 28 confirment les observations que nous avons faites dans l'**article 1**. En effet, les différences de stabilisation en conditions Na^+ et K^+ peuvent être importantes. Pour la plupart des ligands testés, les stabilisations observées en Na^+ sont plus faibles ou égales à celles observées en présence de K^+ . Ce phénomène pourrait s'expliquer par une préférence de ces ligands pour certains repliements, et en particulier la forme "parallèle" [22] ou "hybride" [173, 174] que l'on trouve en présence d'ions potassium. Cette préférence pour certains repliements, permettrait également d'expliquer les transitions souvent plus complexes obtenues en présence d'ion potassium (transitions biphasiques cf. Figure 28E)

D'autre part, ce gain en affinité en présence d'ions potassium s'accompagne également d'un gain en sélectivité vis-à-vis de duplexe d'ADN, particulièrement importants pour certains ligands comme **BRACO19** ou **TMPyP4**. Ce gain en sélectivité permet notamment de mieux appréhender les effets cellulaires caractéristiques d'une action aux télomères de **BRACO19** [297, 310].

Cette différence d'affinité et de sélectivité est intéressante et c'est pourquoi nous testerons la plupart des ligands sélectionnés dans les 2 conditions. Nous choisirons néanmoins comme conditions standard de criblage les conditions sodium pour plusieurs raisons :

- Les ligands précédemment développés par notre équipe étaient testés dans ces conditions. Il nous est nécessaire pour comparer les stabilisations des divers ligands de rester dans des conditions identiques.
- Les stabilisations étant habituellement plus faibles en sodium, la fenêtre de stabilisation est plus importante ; et il est donc plus facile d'établir une classification entre divers ligands sans atteindre la saturation ($T_{1/2} > 80^\circ\text{C}$).
- Les transitions obtenues en conditions sodium sont souvent plus simples à analyser.
- La sélectivité étant généralement plus faible en conditions sodium, ces conditions semblent plus drastiques et permettent de sélectionner des composés plus sélectifs. Ce point peut néanmoins être discuté. En effet, le seul contre-exemple vraisemblable serait une molécule ayant une bien meilleure affinité en présence de sodium qu'en présence de potassium. Par conséquent, sa sélectivité serait également plus importante en sodium. En théorie, ce type de molécule devrait être moins intéressant dans des conditions physiologiques. Nous remarquerons néanmoins qu'un des composés qui ne présente pas de meilleure stabilisation en conditions potassium par rapport aux conditions sodium n'est autre que la **télomestatine**, un des composés les plus actifs dans les cellules.

- La nécessité de réduire la concentration en K^+ à 10 mM pour pouvoir observer une transition de l'oligonucléotide seul autour de 50-55°C, ne permet pas réellement de conclure que les ligands sont plus affins en conditions physiologiques, même si la force ionique totale est maintenue par l'addition de LiCl.

Notons que le groupe de S. Neidle teste généralement ses composés en présence d'ions potassium, à une force ionique de 50 mM, et détermine la stabilisation par la méthode de la dérivée. Ceci permet d'expliquer les plus fortes stabilisations généralement observée en test FRET pour les ligands développés par son groupe (par exemple + 27,5°C pour **BRACO19** [282] au lieu des +12 °C observés dans notre cas en présence d'ions Na^+ ou +22°C en K^+). La plus faible force ionique (50 mM au lieu de 110 mM) peut notamment contribuer à ce phénomène, car dans de telles conditions, les charges négatives du squelette phosphaté sont moins écrantées, et les interactions électrostatiques sont renforcées.

3 Cibler différents G-quadruplexes par interaction avec les boucles ? **(Article 2)**

3.1 Démarche

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce chapitre, il est souhaitable que les nouveaux ligands développés puissent cibler spécifiquement les G-quadruplexes (par rapport aux duplexes notamment), et dans l'idéal, qu'ils puissent cibler un G-quadruplexe en particulier.

En fonctionnalisant des plateformes aromatiques, qui peuvent interagir par empilement sur les quartets terminaux des G-quadruplexes, avec une aminoglycoside pouvant interagir avec les boucles, nous souhaitons limiter ainsi l'intercalation des composés aromatiques dans les duplexes d'ADN, et augmenter également l'affinité des ligands pour les G-quadruplexes possédant des boucles.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le test de dénaturation thermique suivi en fluorescence pour évaluer l'affinité de la série des composés synthétisés par Markus Kaiser. L'utilisation de compétiteurs double-brin (ds26), G-quadruplexes intramoléculaire avec des boucles (30AG) ou tétramoléculaire (TG₅T)₄ nous a permis d'évaluer la sélectivité de ces composés pour chacune des structures en test de dénaturation thermique suivie par FRET.

Enfin nous avons testé ces composés en test TRAP. L'interprétation de ces résultats à la lumière des données complémentaires que nous avons obtenues depuis la publication de l'**article 2** sera discutée dans le Chapitre IV de ce manuscrit.

3.2 Article 2 : “Neomycin-capped aromatic platforms : quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition”. *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) : 1049-1057.

M. Kaiser, A. De Cian, M. Sainlos, C. Renner, J-L Mergny, M-P. Teulade-Fichou.

Résumé en français :

Une série de structures macrocycliques “capuchonnées” par une aminoglycoside (composés **9-12**), a été préparée en utilisant la bifonctionnalisation intramoléculaire de la néomycine sur trois plateformes aromatiques (phénanthroline, acridine, méta-quinacridine). À partir d’études RMN et de modélisation, il a été montré que les composés macrocycliques adoptaient une structure hautement flexible, sans restriction conformationnelle de la partie aminoglycoside. Des mesures de dénaturations thermiques suivies en fluorescence ont montré que ces composés possédaient une affinité modérée à importante pour le G-quadruplexe formé par la séquence télomérique humaine, cet effet étant corrélé à la taille de la partie aromatique. De plus, des compétitions en test FRET ont mis en évidence une moindre capacité de ces composés à lier les duplexes d’ADN, et une préférence notoire pour un G-quadruplexe intramoléculaire possédant des boucles comparés à un G-quadruplexe tétramoléculaire parallèle. Enfin, les expériences de TRAP ont montré que le ligand le plus afffin (la méta-quinacridine **11**) est également un inhibiteur sélectif de télomérase avec une CI_{50} en dessous du micromolaire (200 nM).

Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition

Markus Kaiser,^{†a} Anne De Cian,^b Matthieu Sainlos,^a Christian Renner,^c Jean-Louis Mergny^b and Marie-Paule Teulade-Fichou^{*a}

Received 17th November 2005, Accepted 4th January 2006

First published as an Advance Article on the web 25th January 2006

DOI: 10.1039/b516378a

A series of aminoglycoside-capped macrocyclic structures **9–12** has been prepared using intramolecular bis-tethering of neomycin on three aromatic platforms (phenanthroline, acridine, quinacridine). Based on NMR and calculations studies, it was found that the cyclic compounds adopt a highly flexible structure without conformational restriction of the aminoglycoside moiety. FRET-melting stabilization measurements showed that the series displays moderate to high affinity for the G4-conformation of human telomeric repeats, this effect being correlated with the size of the aromatic moiety. In addition, a FRET competition assay evidenced the poor binding ability of all macrocycles for duplex DNA and a clear binding preference for loop-containing intramolecular G4 structures compared to tetramolecular parallel G4 DNA. Finally, TRAP experiments demonstrated that the best G4-binder (quinacridine **11**) is also a potent and selective telomerase inhibitor with an IC₅₀ in the submicromolar range (200 nM).

Introduction

Inhibition of telomerase or alteration of the telomere state are both valuable concepts for inducing senescence and apoptosis in cancer cells.¹ A simultaneous targeting of telomeres and the nucleoenzyme telomerase was recently demonstrated as a promising approach for limiting cancer cell proliferation.² The two processes are intimately connected: modulation of the telomeric structure impairs telomerase binding, resulting in inactivation of both the catalytic and the maintenance activities of the enzyme.³ Thus, compounds able to disrupt the telomeric structure are particularly interesting as potential telomere function modulators and telomerase inhibitors.⁴ Structural perturbation of the telomeres can be reached by inducing a folding of the G-rich telomeric 3' overhang into a quadruplex conformation, which can be achieved by binding of a highly selective G-quadruplex ligand.^{4,5} Therefore, a reasonable strategy for identifying novel anticancer drugs relies on the discovery of strong and selective G4 ligands with consequent telomerase inhibition.⁶ In the past decade, thousands of compounds were screened according to this approach and three main classes of ligands could be established: i) fused polycyclic intercalators,⁷ ii) macrocyclic compounds of either natural or synthetic origin,⁸ and iii) polyaromatic unfused systems.^{6a,9} However, structural data on the molecular interactions between the ligands and their G4-DNA target are still scarce and no general concept for the design of highly selective binders is

available. In spite of several structural studies which provided valuable information about the interactions of small molecules with loops,^{10a–f} a deeper understanding is still needed, and in particular little is known about groove occupancy.^{10g,h} Additionally, folded quadruplexes show a highly dynamic and polymorphic structure,¹¹ further complicating the drug design. As a consequence, the search for G4-binders of high specificity has been proved difficult and remains a challenging task.

In the course of our studies on the design of G4-binders, we developed the pentacyclic crescent-shaped quinacridine motif that shows a high affinity for quadruplex DNA mainly due to strong stacking interactions with G-quartets.^{7c,d} Moreover, a dimeric macrocyclic bisquinacridine was shown to elicit a high preference for quadruplex over duplex DNA.^{8b} Macrocyclic scaffolds are particularly attractive for designing G4 ligands, as they show a preferential binding to “non-standard” DNA conformations, due to their sterically difficult intercalation between the base pairs of “standard” B-DNA.¹² In contrast, the external G-quartets of quadruplexes constitute accessible planar sites of large area which can accommodate large-sized molecules. This is remarkably illustrated by the exquisite G4-binding specificity of the natural compound telomestatin which is composed of seven oxazole rings and a dihydro-thiazole moiety combined in a cyclic scaffold.^{8a,13}

Aminoglycosides are natural antibiotics which have been widely used to achieve selective recognition of various loop or bulge-containing RNA structures.¹⁴ Despite exhibiting a low affinity towards G4-quadruplex structures *per se*,¹⁵ aminoglycosides possess several ammonium centers able to establish multiple salt bridges and H-bonding contacts with nucleic acids. In particular neomycin has been shown to exhibit a high selectivity for DNA triplexes.¹⁶ In addition, the 1,3-hydroxylamine motif commonly found in aminoglycosides has been identified as a recognition motif for the complexation of phosphate groups and of the Hoogsteen face of guanine *via* a bidentate H-bonding/electrostatic interaction.¹⁷ Altogether, and in view of the presence of short loops in intramolecular G4 structures, we speculated that an

^aLaboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France, CNRS UPR 285, 11, place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France. E-mail: mp.teulade-fichou@college-de-france.fr; Fax: ++33 (0) 1 44 27 13 56

^bLaboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle USM 503, INSERM U 565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75005 Paris, France

^cSchool of Biomedical and Natural Sciences, Nottingham Trent University, Clifton Lane, Nottingham, United Kingdom NG11 8NS

[†]Current address: Chemical Genomics Centre, Otto-Hahn-Str. 15, 44227 Dortmund, Germany.

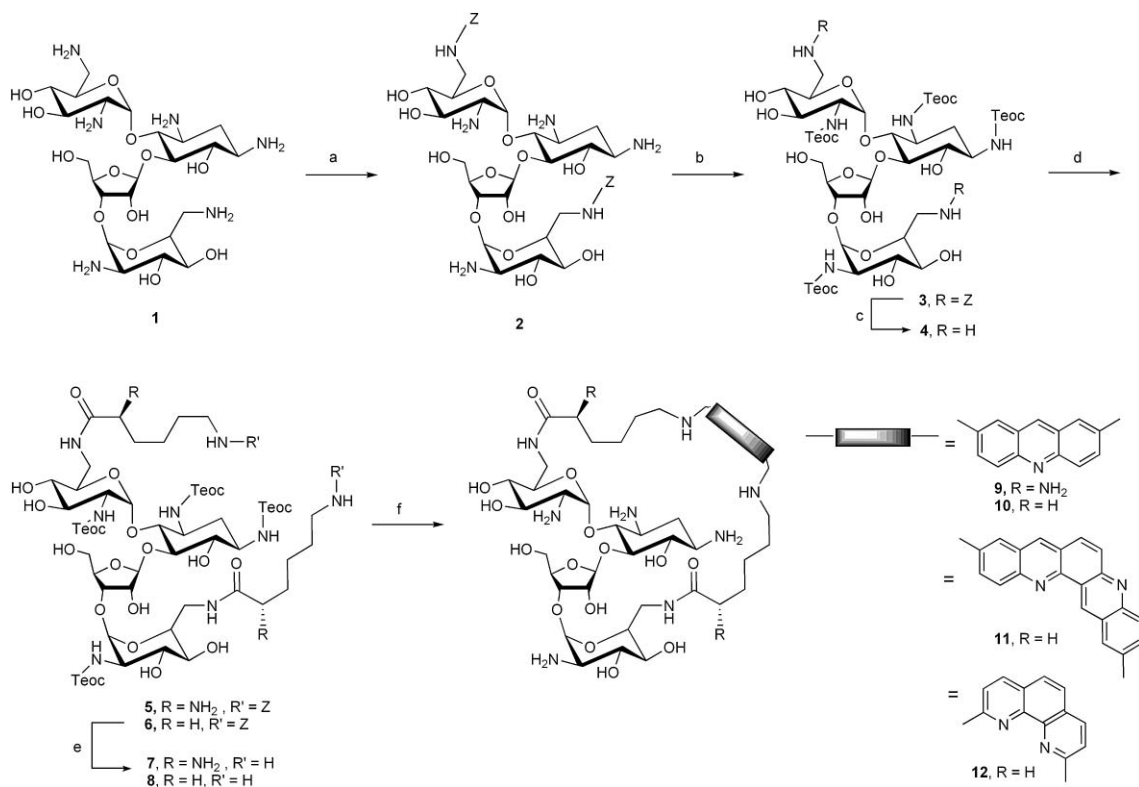
appropriate derivatization of aminoglycosides with an intercalator system could lead to high-affinity ligands through simultaneous targeting of the G-quartet surface and of the loops phosphate or residues. Along this line, we decided to assemble the two motifs in a cyclic scaffold in the hope of compromising the duplex binding. Hence, capping of various aromatic platforms with a neomycin moiety has been investigated as an approach to the design of cyclic “dome-shaped” scaffolds suitable for adapting the topology of loop-containing quadruplexes.

Results and discussion

Synthesis

Condensation of a dialdehyde with a diamine is a well-known strategy for constructing macrocyclic structures.¹⁸ This approach has proven to be very high-yielding if performed under moderate to high dilution conditions for minimising unwanted polymerisation. The aminoglycoside neomycin features two reactive primary amino groups linked to a methylene carbon whereas its other amines are directly linked to sugar units and are thus sterically less accessible for derivatization. Based on this structural peculiarity, regioselective protection of the amino groups of neomycin can

be achieved *via* a benzoylation–Teoc-protection–hydrogenation sequence (Scheme 1).¹⁹ Derivatization of the neomycin intermediate **4** with a Boc-protected lysine or aminocaproic acid building block, led after deprotection to elongated neomycin diamine derivatives **7** and **8**, respectively. These were then condensed with three different dicarboxaldehyde aromatic platforms (acridine, quinacridine, phenanthroline) by reductive amination, yielding the four macrocycles **9–12**. Although Schiff base macrocyclisation can lead to the formation of either [1 + 1] or [2 + 2] coupling products,²⁰ in our case the predominance of a [1 + 1] condensation of the partners was evidenced by HPLC analysis, and appears independent of the size of the aromatic system. A reasonable explanation for the predominance of the intramolecular cyclisation is that pre-organization of the derivatized neomycin moiety occurs, to a certain extent, during tethering. Although the aminoglycoside scaffold is flexible, it is prone to adopt defined conformations upon limitation of the rotation of the sugar units. Therefore, it can be hypothesized that the aminoglycoside moiety, after the first amination, adopts a conformation placing the reactive groups favourably for internal ring closure. Hence, entropic contribution due to optimal spatial fitting of the amino and aldehyde functions, along with high dilution conditions, could both participate to the predominance of the [1 + 1] coupling.



Scheme 1 Reagents and conditions: (a) *N*-(*Z*)-5-norbornene-2,3-dicarboximide, TEA, DMSO–H₂O (10 : 1), rt, 12 h, 51%; (b) Teoc-*p*-nitrophenyl carbonate, TEA, dioxane–H₂O (3 : 1), 55 °C, 48 h, 87%; (c) H₂, Pd/C (10%), MeOH–H₂O (9 : 1), rt, 2 h, 81%; (d) EDCI/HOAt, TEA, DMF and *N*-(Boc)-Lys(*Z*)-OH or *N*-(*Z*)-capronic acid, rt, 12 h, 92% for **5**, 86% for **6**; (e) H₂, Pd/C (10%), MeOH–H₂O (9 : 1), rt, 2 h, 92% for **7**, 94% for **8**; (f) i) TEA, DCM–MeOH (1 : 1) and 2,5-bis(dicarboxaldehyde)acridine or dibenzo[*b,j*][1,7]phenanthroline-2,10-dicarboxaldehyde or 2,9-bis(dicarboxaldehyde)-1,10-phenanthroline, rt, 4 d; ii) NaBH₄, DCM–MeOH (1 : 1), rt, 2 h; iii) TFA–DCM (1 : 1), rt, 1 h, 29% for **9**, 42% for **10**, 37% for **11**, 12% for **12**.

NMR studies and calculations

In order to gain insight into the conformational flexibility of the final capped macrocycles, the acridine derivative **9** was studied by NMR. Two relatively well-defined conformers are found for the pucker and relative orientations of the sugar rings (Fig. 1). In one conformation the overall shape of the tetrasaccharide resembles that of an “L” in which sugars B, C and D are extended and form the long stem of the “L”. In the other conformation rings A, B and C are arranged in a helix-like manner leading to a V-shaped appearance. The aliphatic chain of Lys-1 packs in both cases against sugar A, but the aromatic moiety and Lys-2 exhibit variable orientations and seem quite flexible. The fact that only one set of NMR resonances was observed indicates fast conformational averaging on the NMR time-scale of milliseconds. The two distinct conformations were detected in the initial structure calculations with all NMR-derived distance constraints. Because each conformation showed systematic and characteristic violation of a few NMR distances, subsets of the NMR constraints could be derived that corresponded exactly to the two conformers. All NMR structures are quite compact with the aromatic moiety fairly close to the sugar rings. In solution, however, the molecules might also partly exist in more open forms that cannot be detected by NMR due to the bias of the Overhauser effect towards short distances and, therefore, compact structures.

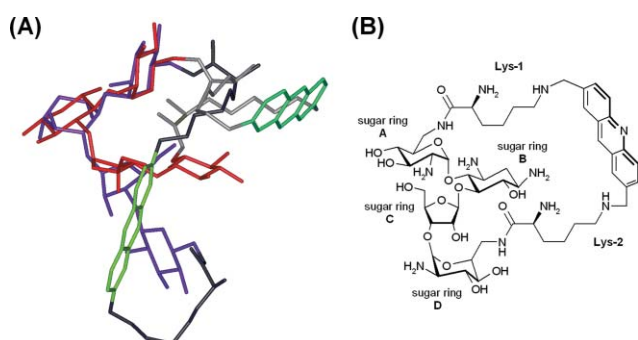


Fig. 1 (A) Superimposition of the two solvent conformations of **9** as derived from NMR analysis (acridine system: light and dark green, lysine linker: light and dark grey, neomycin moiety: blue, L shaped and red, V-shaped). (B) Nomenclature of the structural elements of **9**.

In conclusion, although the incorporation of aromatic systems could have been expected to cause rigidity, rotation of the sugar moieties in the final macrocycle seems not to be restrained by the double tethering. This is likely attributable to the length and flexibility of the lysine linkers. Thereby, compound **9** appears to be a highly adaptable structure, and it is reasonable to assume that macrocycles **10–12** adopt identical conformational behaviours.

FRET-melting stabilization assay

The interaction of the macrocycles with quadruplex DNA has been investigated by a high-throughput FRET assay using a real-time PCR apparatus and the doubly labelled F21T oligonucleotide which mimics the human telomeric single-strand overhang.²¹ $\Delta T_{1/2}$ values were concentration dependent; as shown in Fig. 2. Moderate to high stabilizations of F21T were observed in the presence of macrocycles **9–12** at 0.2–5 μM (Fig. 2). Interestingly, this effect is correlated with the size of the aromatic moiety

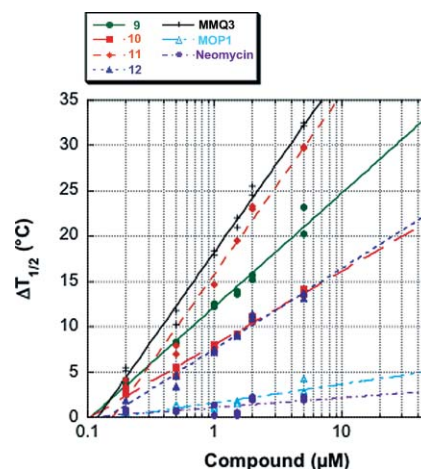


Fig. 2 Concentration dependency of F21T stabilization ($\Delta T_{1/2}$ values, in $^{\circ}\text{C}$). Data is presented on a semi-log scale for **MMQ3** (crosses), **11** (orange diamonds), **9** (green circles), **10** (red squares), **12** (blue triangles), **MOP1** (light blue triangles) and neomycin (purple circles).

since the most active compound is the quinacridine derivative **11** ($\Delta T_{1/2} = 14.1 \pm 1.1$ $^{\circ}\text{C}$ at 1 μM), whereas the acridine and phenanthroline derivatives **10** and **12** show a much lower activity ($\Delta T_{1/2} = 6.3$ and 6.0 $^{\circ}\text{C}$ at 1 μM , respectively). Even at submicromolar concentrations (0.2–0.5 μM), a significant stabilization is found with compounds **9** and **11** (Fig. 2). As the three ligands **10–12** exhibit the same cationic charge, this result evidences the strong π -stacking contribution to the binding since extension of the surface area in contact is known to increase the attraction between aromatic systems.²² The importance of electrostatics in the stabilization of the G4 conformation is illustrated by the higher effect of the acridine derivative **9** which bears two more cationic amino groups than its analogue **10** [$\Delta(\Delta T_{1/2})_{9-10} = +4.8$ $^{\circ}\text{C}$]. Importantly, free neomycin has little or no effect on the melting of F21T ($\Delta T_{1/2} = 2.1$ $^{\circ}\text{C}$ at the highest drug concentration tested, 5 μM), which reveals that the high cationic charge (4^{+} – 6^{+}) of the free aminoglycoside²³ is not sufficient to ensure an efficient binding of the G4 structure. In addition, the acyclic tetraamino phenanthroline derivative **MOP1** (Fig. 3) has a very limited effect on the melting ($\Delta T_{1/2} = 1.4$ and 3.5 $^{\circ}\text{C}$ at 1 and 5 μM , respectively) and the diamino acridine **MonoA** was previously found to be completely ineffective ($\Delta T_{1/2} = 0$ $^{\circ}\text{C}$ at 1 μM).²⁴

Taken together, these data demonstrate that a synergistic effect is obtained in combining the aromatic and aminoglycoside motifs in the same scaffold, at least in the phenanthroline and acridine series. Indeed, the additivity of the aromatic and electrostatic contributions is not so obvious in the quinacridine series as the acyclic control **MMQ3** and ligand **11** display similar $\Delta T_{1/2}$ values at all concentrations (Fig. 2). This might indicate that strong π -stacking of the quinacridine moiety masks the other effects, or that the relative weights of the various energetic contributions differ for the two ligands.

Competitive FRET-melting assay

A high binding selectivity is an essential criterion for the use of G4-binders in complex environments. Hence the G4-selectivities of our macrocycles were evaluated using a competitive FRET-melting

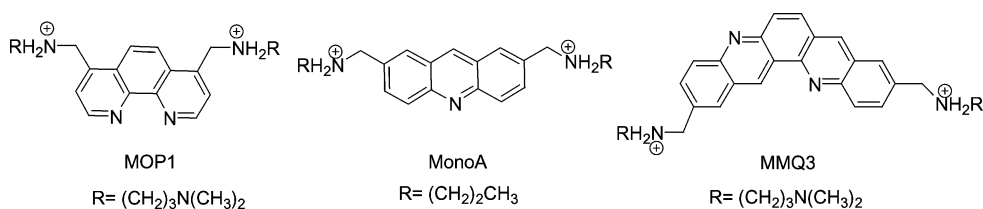


Fig. 3 Structures of the acyclic control compounds.

assay. To this end melting of F21T is performed in the presence of various DNA competitors: a 26bp duplex (ds26) as described previously,^{7c} and two quadruplexes containing 5 guanine quartets: a four-stranded parallel quadruplex [TG₅T]₄ and an intramolecular quadruplex (30AG) (Fig. 4).

As shown in Fig. 4A, the four macrocycles display a good selectivity for the quadruplex over the control duplex, since stabilization of F21T is only moderately affected at the highest concentration of the duplex (10 μM). It is worth pointing out that this is a stringent competition in terms of electrostatics and

quartet vs. base-pair binding, since ds26 is added in large excess to F21T (respectively 15 and 50 molar eq.). On the other hand, **MMQ3** is displaced more easily from F21T, as seen from the strong drop in $\Delta T_{1/2}$ observed even at the lowest concentration of the duplex competitor (3 μM), reflecting likely intercalation of the acyclic compound into the duplex DNA. In turn, the ability of the macrocyclic series to distinguish between the quadruplex and the duplex might be attributed to a poor insertion into double-stranded DNA, supporting our initial design to achieve quadruplex vs. duplex selectivity by cyclisation.

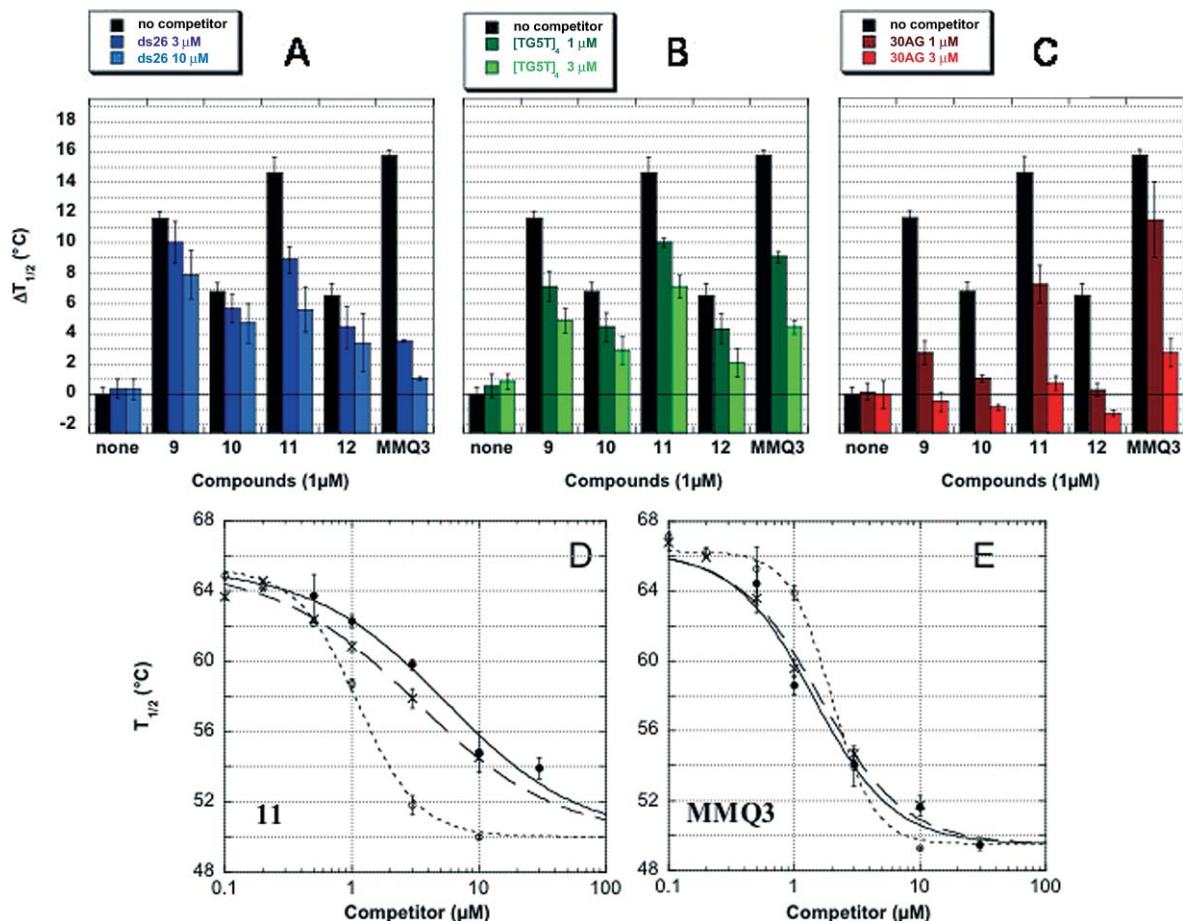


Fig. 4 Selectivity in FRET assay. Thermal denaturation of F21T was performed in the presence of the various compounds (1 μM) and in the presence of various competitors: (A) double-stranded DNA ds26, (B) parallel tetramolecular G-quadruplex [TG₅T]₄, (C) intramolecular G-quadruplex 30AG. The stabilization ($\Delta T_{1/2}$) is reported in $^{\circ}\text{C}$ for each compound and the following concentrations of competitors: no competitor; ds26 3 μM (dark blue), 10 μM (light blue); [TG₅T]₄ 1 μM (dark green), 3 μM (light green); 30AG 1 μM (dark red), 3 μM (light red). (D) Apparent melting temperature ($T_{1/2}$) of F21T in the presence of 1 μM of compound **11** with various concentrations of competitors (ds26 duplex: filled circles; 30AG: open circles and [TG₅T]₄: crosses). (E) Apparent melting temperature ($T_{1/2}$) of F21T in the presence of 1 μM of compound **MMQ3** with various concentrations of competitors (ds26 duplex: filled circles; 30AG: open circles and [TG₅T]₄: crosses).

In order to evaluate the possible interaction of the macrocyclic compounds with the TTA loops of the G-quadruplexes, we compared the decrease of $\Delta T_{1/2}$ obtained with the ds26 duplex and the two types of G4 structure: the tetramolecular $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ quadruplex, which does not contain any loop, and the intramolecular G4 formed by 30AG. When pre-formed in favourable conditions, $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ cannot be denaturated in the conditions of the FRET assay²⁵ whereas ds26 and 30AG have a T_m of 70.5 °C and 74 °C, respectively, under identical conditions (Na cacodylate 10 mM pH 7.2, NaCl 100 mM) (data not shown). Melting of the 30AG is dependent on the cation and the signature of the thermal difference spectrum is consistent with a G-quadruplex.²⁶ Despite the lack of data on the exact structure or on the loop conformation, it is likely that this oligonucleotide adopts a structure close to that of F21T. Note that it is important to select competitors which are thermally more stable than the F21T quadruplex; otherwise they would be unfolded in the temperature range chosen for the melting studies, and would therefore act as single-stranded rather than double-stranded or quadruple-stranded competitors.

When the competition assay is carried out in the presence of 1 and 3 μM of the oligonucleotides forming quadruplex structures (respectively 5 and 15 molar equivalents compared to F21T but only 1 and 3 molar equivalents compared to the ligand), (Fig. 4B,C) the drop in $\Delta T_{1/2}$ for the macrocyclic series is more pronounced than for the duplex competitor. The comparison of the destabilization obtained when adding 3 μM of each competitor results in a decrease of 14 to 40% with ds26, of 53 to 73% with $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ and the stabilization is fully abolished with 30AG. Interestingly, the results are somewhat different for **MMQ3** as the addition of 3 μM of ds26 results in a decrease in $\Delta T_{1/2}$ of 12.2 °C (80%), whereas the addition of the same amount of G4 structure $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ leads to a decrease of only 11 °C (72%). This is again quite consistent with the role of the neomycin capping in the preference of the macrocyclic series for quadruplex over duplex DNA.

For $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ at least 30% of the stabilization of F21T is maintained in all cases, at the two concentrations of competitor used. This result suggests that all the ligands tested exhibit a higher affinity for the intramolecular quadruplex conformation of F21T compared to the tetramolecular form of $[\text{TG}_5\text{T}]_4$. In contrast, when adding the intramolecular G4 30AG, the competition pattern shows a strong decrease in $\Delta T_{1/2}$ for all compounds and even a complete loss of stabilization when 30AG is used at 3 μM concentration (3 molar equivalent compared to ligand) (Fig. 4C). The comparison with the competitor $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ suggests that these ligands are more easily displaced from F21T when the competitor G4-DNA contains loops. Interestingly, **MMQ3** seems to be slightly less sensitive than **11** to the G4 competitor with loops, mostly at 1 μM , and as emphasized earlier, it has more affinity for the tetramolecular quadruplex than **11**. It is worth noting that the complex with the compound **11** is clearly less affected by the tetramolecular G4 or the ds26 duplex (Fig. 4D) than the complexes with the control **MMQ3** (Fig. 4E).

All together these data demonstrate that the neomycin-capped macrocycles and in particular macrocycle **11** are able to discriminate between loop-containing and tetramolecular parallel quadruplexes, strongly suggesting a possible interaction of the small-molecule binders with the loops. The presence of loops may

contribute to the binding *via* direct contacts with the ligands or indirectly *via* conformational constraint of the target. Quadruplex/duplex selectivity has been estimated using two independent methods:

- $\Delta T_{1/2}$ values in the presence of increasing concentrations of duplexes or quadruplexes unambiguously indicate that an intramolecular quadruplex (30AG) is a much better competitor than a self-complementary duplex (ds26) or a parallel quadruplex $[\text{TG}_5\text{T}]_4$ (Fig. 4D). The addition of 1.1 μM 30AG leads to a 50% decrease in $\Delta T_{1/2}$, whereas >5 μM ds26 is required to obtain the same $\Delta T_{1/2}$. These two-strand concentrations correspond to 5.5 μM quartets and 71 μM base pairs, respectively, demonstrating that a much larger molar excess of base pairs is required to abolish half of the ligand-induced stabilization of F21T. Even at 30 μM , ds26 does not totally abolish stabilization by compound **11**, in contrast with 30AG, for which stabilization is completely lost at 10 μM .

- An equilibrium dialysis experiment using a limited set of compounds confirms a preference for 30AG over duplexes and parallel quadruplexes (data not shown).

In other words, both methods confirm that **11** has a preference for intramolecular quadruplexes over tetramolecular quadruplexes and duplexes, in contrast with **MMQ3** which exhibits little, if any, selectivity (Fig. 4E).

Telomerase inhibition

Finally the compounds were examined for their ability to inhibit human telomerase activity *in vitro*. Inhibition of telomerase was measured by the TRAP assay with an internal standard to ensure the validity of the test.²⁷ The assay was performed at increasing ligand concentrations; analysis by denaturing gel electrophoresis is shown in Fig. 5A and quantitative analysis is provided in Fig. 5B. As shown on the gel, the IC_{50} values of the macrocycles rank in the low micromolar to submicromolar range, the most potent effect being observed for compound **11** with an IC_{50} of 0.2 μM (Fig. 5C). In all cases, the internal control (ITAS) is only affected at significantly higher concentrations compared to the IC_{50} , in agreement with the selective binding of the compounds. Finally, it is worth noting that the IC_{50} values correlate well with the G4-stabilization effects ($\Delta T_{1/2}$) determined by the FRET-melting assay, again supporting the validity of the inhibition strategy based on the conformational modification of the substrate DNA.

Conclusion

The macrocyclic series described in the present study exhibits a good to high affinity for intramolecular quadruplexes and a good selectivity for DNA quadruplexes *vs.* duplexes. Given the poor affinity and selectivity of the acyclic controls, the G4 preferential binding of the macrocycles could be mediated by their particular cyclic conformation. Moreover, the synergistic effects obtained in the acridine and phenanthroline series strongly suggest that the neomycin motif is likely to play a role in establishing specific contacts with the G4-DNA target.

In addition, the competition assay with a parallel tetramolecular quadruplex established that our compounds preferentially interact

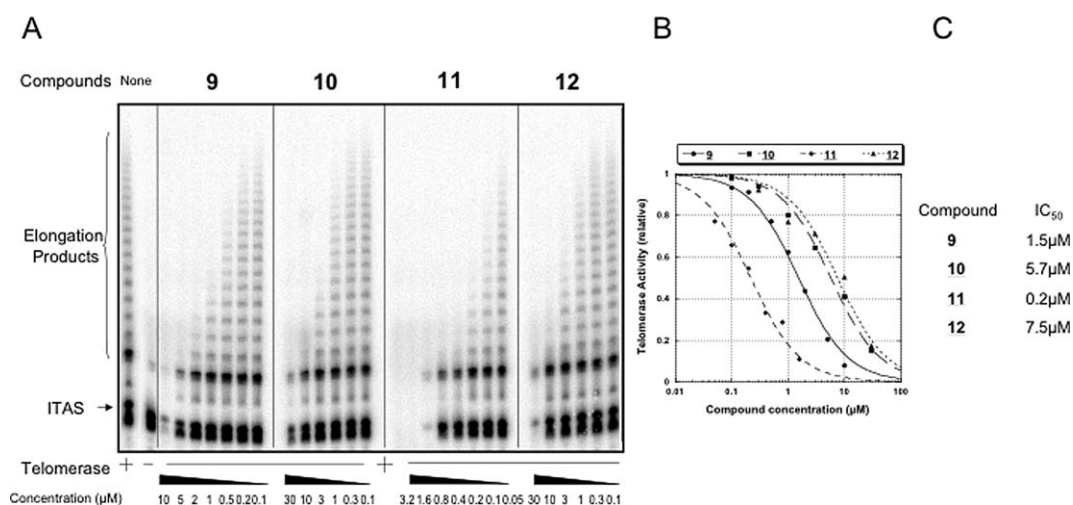


Fig. 5 Telomerase inhibition by compounds **9–12** in a TRAP assay. (A) Increasing concentrations of compounds were added to the TRAP mixture in the presence of an internal control (ITAS) and analysed by gel electrophoresis. TRAP activity was determined with 200 ng of a CHAPS extract of the A431 cell line. IC₅₀s were determined by comparison with the telomerase activity with no compound. They are given with a 20% precision. (B) Quantitative analysis of telomerase activity as a function of drug concentration. (C) IC₅₀ values against telomerase found for the different compounds.

with loop-containing quadruplexes. This suggests the involvement of loop motifs in the binding of the macrocycles, confirming the structural importance of the loop for G4-DNA recognition. Macrocycles **9–12** display sterically hindered conformations but elicit a high plasticity, therefore, it would be of great interest to further investigate their binding mode for understanding how they adapt to the compact structure of G-quadruplex DNA, and whether they are able to recognize the conformational diversity of intramolecular quadruplexes.^{11g}

Finally the TRAP assay demonstrated that macrocycle **11** inhibits telomerase *in vitro* in the submicromolar range, and thus could serve as a lead for the design of a new series able to act as telomere maintenance modulators. In addition, the concept of G4 sequestration of telomeric DNA by small molecules holds promise for interfering with other telomere binding proteins such as POT1, which actively participates in the prevention of the unfolding of the 3'-overhang and was recently shown to disrupt G4-quadruplexes.²⁸

In conclusion, our neomycin-capped macrocycles display two interesting features (*i.e.* quadruplex recognition and telomerase inhibition) making them attractive structural scaffolds for further developments aiming at the discovery of new and more selective anticancer agents.

Experimental

General methods

All commercially available chemicals were reagent grade and were used without further purification. Flash chromatography employed Merck silica gel [Kieselgel 60 (0.040–0.063 mm)]. Analytical TLC was performed with 0.2 mm silica-coated aluminium sheets, visualization by UV light or by spraying either a solution of ninhydrin (0.3% in weight in *n*-butanol containing 3% acetic acid in volume) or an iodine solution (0.1 M in 10% sulfuric acid aqueous solution). Preparative reversed-phase HPLC was carried out on an Abimed-Gilson chromatograph using a Nucleodur 100 C18 ED 5μ (250 × 10 mm) (Macherey & Nagel, Düren, Germany)

and gradients from 0.1% aqueous TFA to CH₃CN containing 0.1% TFA (flow rate: 3 mL min⁻¹).

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance300 spectrometer. For ¹H and ¹³C, chemical shifts are reported in ppm (δ) downfield of tetramethylsilane (TMS) used as internal standard.

LC HR MS measurements were performed on an Agilent 1100 series HPLC with an XTerra MS C8 3.5 μm column (2.1 × 100 mm column dimension) coupled to a Bruker Daltonik microTOF mass spectrometer (electrospray ionisation). The following gradient was used: 5% aq. acetonitrile (0.05% trifluoroacetic acid) to 90% aq. acetonitrile (0.05% trifluoroacetic acid) in 15 min at a flow of 250 μL min⁻¹.

The three aromatic dialdehyde building blocks have already been described²⁹ and the synthesis of compounds **2–8** will be reported elsewhere.

Neomycin bis-lysine acridine macrocycle (9). 2,5-Bis(dicarboxaldehyde)acridine (1.9 mg, 8 μmol) was dissolved in DCM–MeOH (1 : 1, 150 mL) and a solution of the neomycin building block **7** (13.2 mg, 8 μmol) and TEA (3.4 μL, 2.4 mg, 24 μmol) in DCM–MeOH (1 : 1, 25 mL) was slowly added. The resulting solution was stirred for 4 d, filtrated through a celite pad and evaporated to dryness. The residue was redissolved in DCM–MeOH (1 : 1, 10 mL) and NaBH₄ (1.8 mg, 48 μmol) was added. After stirring at rt for 2 h, the reaction mixture was evaporated, redissolved in CH₂Cl₂ and washed with 5% aq. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The residue of the conjugation–reduction procedure was dissolved in TFA–CH₂Cl₂ (1 : 1, 2 mL) and stirred for 1 h. The reaction mixture was evaporated and the residue was purified by reverse phase HPLC (buffer A: 0.05% TFA in H₂O, buffer B: 0.05% TFA in CH₃CN; 0 min: 10% B, 10 min: 10% B, 15 min: 20% B, 65 min: 65% B). Product-containing fractions were pooled and lyophilized to yield **9** as a slightly yellow powder (4.6 mg, 29%); HPLC (analytical) *t*_R: 2.6 min. ¹H NMR (300 MHz, D₂O–CD₃OD (10 : 1)) δ: 9.77 (s, 1H, Ar), 8.46 (s, 2H, Ar), 8.28 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz, Ar), 8.18 (d, 2H,

$J = 9.6$ Hz, Ar), 5.70 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, H-1'), 5.24 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, H-1''), 5.00 (s, 1H, H-1'''), 4.44 (bs, 4H, CH_2Ar), 4.12–2.86 (m, 31H), 2.35–2.30 (m, 1H, H-2_a), 1.81–1.55 (m, 9H), 1.35–1.20 (m, 4H). ES HR MS: (M + H)[±]: 1074.5834, found: 1074.5820.

Neomycin bis-capronic acid acridine macrocycle (10). The title compound was prepared in a manner analogous to the synthesis of **9**, employing neomycin building block **8** (11.3 mg, 8 μmol). After HPLC purification in the same conditions as described above, **10** (5.8 mg, 42%) was obtained as a slightly yellow powder. HPLC (analytical) t_R : 4.6 min. ¹H NMR (300 MHz, D₂O–CD₃OD (10 : 1)) δ : 9.82 (s, 1H, Ar), 8.47 (s, 2H, Ar), 8.29 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar), 8.19 (d, 2H, $J = 9.3$ Hz, Ar), 5.64 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz, H-1'), 5.20 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H-1''), 4.97 (s, 1H, H-1'''), 4.44 (bs, 4H, CH_2Ar), 4.14–2.84 (m, 29H), 2.33–2.29 (m, 1H, H-2_a), 2.09–2.01 (m, 4H, NHCOCCH_2), 1.71–1.66 (m, 1H, H-2_c), 1.63–1.53 (m, 4H), 1.41–1.35 (m, 4H), 1.21–1.14 (m, 4H). ES HR MS: (M + H)[±]: 1044.5616, found: 1044.5647.

Neomycin bis-capronic acid quinacridine macrocycle (11). The title compound was prepared under similar conditions as for the synthesis of **9**, employing neomycin building block **8** (11.3 mg, 8 μmol) and dibenzo[*b,j*][1,7]phenanthroline-2,10-dicarboxaldehyde (2.7 mg, 8 μmol). After HPLC purification in the same conditions as described above, **11** (3.5 mg, 25%) was obtained as a yellow powder. HPLC (analytical) t_R : 8.02 min. ¹H NMR (300 MHz, D₂O–CD₃OD (10 : 1)) δ : 10.44 (s, 1H, Ar), 9.03 (s, 1H, Ar), 8.51 (s, 1H, Ar), 8.38 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 8.29–8.26 (m, 2H, Ar), 8.06 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 7.96–7.91 (m, 2H, Ar), 5.60 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1'), 5.21 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, H-1''), 4.96 (s, 1H, H-1'''), 4.46 (d_{app}, 4H, $J = 13.2$ Hz, CH_2Ar), 4.09–2.84 (m, 29H), 2.33–2.29 (m, 1H, H-2_a), 2.07–1.99 (m, 4H, NHCOCCH_2), 1.73–1.46 (m, 5H), 1.41–1.26 (m, 4H), 1.20–1.08 (m, 4H). ES HR MS: (M + H)[±]: 1145.5883, found: 1145.5859.

Neomycin bis-capronic acid phenanthroline macrocycle (12). The title compound was prepared analogous to the synthesis of **9**, employing neomycin building block **8** (11.3 mg, 8 μmol) and 2,9-bis(dicarboxaldehyde)-1,10-phenanthroline (1.9 mg, 8 μmol). After HPLC purification in the same conditions as described above, **12** (5.1 mg, 37%) was obtained as a slightly pink powder. HPLC (analytical) t_R : 7.0 min. ¹H NMR (300 MHz, D₂O–CD₃OD (10 : 1)) δ : 8.61 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar), 8.06 (s, 2H, Ar), 7.87 (dd, 2H, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, Ar), 5.93 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, H-1'), 5.21 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, H-1''), 4.96 (s, 1H, H-1'''), 4.46 (d_{app}, 4H, $J = 13.2$ Hz, CH_2Ar), 4.09–2.84 (m, 29H), 2.33–2.29 (m, 1H, H-2_a), 2.07–1.99 (m, 4H, NHCOCCH_2), 1.96–1.81 (m, 5H), 1.72–1.61 (m, 4H), 1.54–1.41 (m, 4H). ES HR MS: (M + H)[±]: 1045.5569, found: 1045.5570.

NMR analysis

NMR spectra were recorded at 10 °C on a Bruker DRX 500 and an AV900 spectrometer equipped with pulsed-field-gradient (PFG) accessories and a cryoprobe in the case of the 900 MHz spectrometer. The sample was dissolved in a 9 : 1 H₂O–D₂O (v/v) mixture or in >99.9% D₂O at 5 mM concentrations resulting in an (uncorrected) pH of 4. Resonance assignments were performed according to the method of Wüthrich.³⁰ The 2D TOCSY was recorded with a spin-lock period of 70 ms using the MLEV-17 sequence for isotropic mixing.³¹ The 49 experimental distance

constraints were extracted from 2D NOESY³² and ROESY³³ experiments with mixing times of 200 ms. Water suppression was achieved with the WATERGATE scheme³⁴ for samples containing 90% H₂O and *via* presaturation in the case of D₂O.

Structure calculation

Structure calculations and evaluations were performed with the INSIGHT II 2000 software package (Accelrys, San Diego, CA) on Silicon Graphics O2 R5000 computers (SGI, Mountain View, CA). A hundred structures were generated from the distance-bound matrices. Triangle-bound smoothing was used. The NOE intensities were converted into interproton distance constraints using the following classification: very strong (vs) 1.7–2.3 Å, strong (s) 2.2–2.8 Å, medium (m) 2.6–3.4 Å, weak (w) 3.0–4.0 Å, very weak (vw) 3.2–4.8 Å, and the distances of the pseudo atoms were corrected as described by Wüthrich.²⁷ The structures were generated in four dimensions, then reduced to three dimensions with the EMBED algorithm and optimized with a simulated annealing step according to the standard protocol of the DG II package of INSIGHT II. All hundred structures were refined with a short MD-SA protocol: after an initial minimisation, 5 ps at 300 K were simulated followed by exponential cooling to ~0 K during 10 ps. A time step of 1 fs was used with the CVFF force-field while simulating the solvent H₂O with a dielectric constant of 80.0. The experimental distance constraints were applied at every stage of the calculation with 50 kcal mol⁻¹ Å⁻².

After simulated annealing with DISCOVER the structures were sorted according to their final energies and the structures with the lowest energies were analyzed. In the first calculations with all 49 NMR-derived distance constraints two conformational families were obtained, both with four characteristic violations. Two subsets of NMR constraints were constructed by removing once the four constraints that were persistently violated in the first conformational family and once the other four constraints that could not be fulfilled by the second conformational family. All low-energy structures that resulted from calculations with one of the subsets belonged to the corresponding conformational family and exhibited no significant violations of distance constraints.

Oligonucleotides

All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Belgium). The parallel quadruplex (TGGGGGT)₄ was obtained after incubation of the monomer at 500 μM in a 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 buffer containing 100 mM NaCl for at least one night at 4 °C. Further dilutions were made in the same buffer.

FRET-melting assay

Denaturation of the oligonucleotide F21T (fluorescein-3'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-5'-TAMRA) to probe the interaction of a ligand with G-quadruplex DNA was described elsewhere.^{21a} In the experiments presented here, a real-time PCR apparatus (Mx3000P, Stratagene) was used, allowing the simultaneous recording of 96 samples. Fluorescence measurements with the F21T oligonucleotide (0.2 μM) were studied in 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 buffer containing 100 mM NaCl. The melting of the G-quadruplex was monitored alone or in the presence of 1 μM of compound, by measuring the fluorescence

of fluorescein. To test the binding selectivity of the compound to the quadruplex structure, we added various concentrations of competitors: double-stranded DNA (self-complementary oligonucleotide ds26: 5'-GTTAGCCTAGCTTAAGCTAGGCTAAC-3'), tetramolecular G-quadruplex [TG₄T]₄ or intramolecular G-quadruplex (30AG: 5'-AGGGGGTTAGGGGGTTAGGGGGTTAGGGGG-3'). Emission of fluorescein was normalized between 0 and 1, and $T_{1/2}$ was defined as the temperature for which the normalized emission is 0.5. $T_{1/2}$ and $\Delta T_{1/2}$ are the mean of at least 2–4 values $\pm$ standard deviation.

TRAP assay

The TRAP reaction was performed in a 20 mM Tris HCl pH 8.3 buffer containing 63 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.005% Tween 20, 0.1 mg ml⁻¹ BSA, 50 μ M dTTP, dGTP and dATP, 5 μ M dCTP, and the oligonucleotides TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') (0.4 μ M), ACX (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAAC-3') (0.4 μ M), NT (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTT-3') (0.4 μ M) and TSNT (5'-ATTCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3') (20 nM), 2 units of Taq polymerase, 0.02 mCi mL⁻¹ of [α^{32} P]-dCTP and 200 ng of A431 CHAPS extracts. After telomerase elongation for 15 minutes at 30 °C, 30 cycles of PCR were performed (94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; and 72 °C for 90 s). Telomerase extension products were then analysed on a denaturing 6% polyacrylamide, 7 M urea 1X Tris Borate EDTA (TBE) vertical gel. Extension products were quantitated using a Phosphorimager apparatus; telomerase relative activity was plotted against each compound concentration.

Acknowledgements

M. K. thanks the European Union for a postdoctoral Marie Curie Intra-European Fellowship. This study has been supported by L'Association pour la Recherche contre le Cancer (grant #3482 to MPTF and #3365 to JLM) and an EU FP6 "MolCancerMed" grant to JLM. The help of E. Weyher-Stingl (MPI of Biochemistry, Martinsried, Germany) for the LC HR MS measurements is greatly acknowledged. David Monchaud (Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, College de France) is greatly acknowledged for his help with the graphics.

References

- (a) S. A. Stewart, I. Ben-Porath, V. J. Carey, B. F. O'Connor, W. C. Hahn and R. A. Weinberg, *Nat. Genet.*, 2003, **33**, 492; (b) J. Karlseder, A. Smogorzewska and T. de Lange, *Science*, 2002, **295**, 2446; (c) X. Zhang, V. Mar, W. Zhou, L. Harrington and M. O. Robinson, *Genes Dev.*, 1999, **13**, 2388; (d) S. Neidle and D. E. Thurston, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 285.
- (a) Y. Mo, Y. Gan, S. Song, J. Johnston, X. Xiao, M. G. Wientjes and J. L.-S. Au, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 579; (b) M. A. Shammash, R. J. S. Reis, C. Li, H. Koley, L. H. Hurley, K. C. Anderson and N. C. Munshi, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 770.
- (a) T. R. Cech, *Cell*, 2004, **116**, 273; (b) J. W. Shay, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 3513.
- (a) E. M. Rezler, D. J. Bearss and L. H. Hurley, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, **43**, 359; (b) S. Neidle and G. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2002, **1**, 383.
- (a) S. Neidle and G. N. Parkinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, **13**, 275; (b) L. H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 188; (c) T. Simonsson, *Biol. Chem.*, 2001, **382**, 621; (d) R. H. Shafer and I.

- Smirnov, *Biopolymers*, 2001, **56**, 209; (e) J.-L. Mergny, P. Mailliet, F. Lavelle, J.-F. Riou, A. Laoui and C. Hélène, *Anti-Cancer Drug Des.*, 1999, **14**, 327.
- (a) G. Pennarun, C. Granotier, L. R. Gauthier, D. Gomez, F. Hoffschir, E. Mandine, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, P. Mailliet and F. D. Boussin, *Oncogene*, 2005, **24**, 1; (b) D. Gomez, R. Paterski, T. Lemarteleur, K. Shin-ya, J.-L. Mergny and J.-F. Riou, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 41487; (c) M. Sumi, T. Tauchi, G. Sashida, A. Nakajima, A. Gotoh, K. Shin-ya, J. H. Ohyashiki and K. Ohyashiki, *Int. J. Oncol.*, 2004, **24**, 1481; (d) A. M. Burger, F. Dai, C. M. Schultes, A. P. Reszka, M. J. Moore, J. A. Double and S. Neidle, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 1489; (e) C. Leonetti, S. Amodei, C. D'Angelo, A. Rizzo, B. Benassi, A. Antonelli, R. Elli, M. F. G. Stevens, M. D'Incalci, G. Zupi and A. Biroccio, *Mol. Pharmacol.*, 2004, **66**, 1138.
- (a) M. Read, R. J. Harrison, B. Romagnoli, F. A. Tanious, S. H. Gowan, A. P. Reska, W. D. Wilson, L. R. Kelland and S. Neidle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 4844; (b) P. J. Perry, A. P. Reska, A. A. Wood, M. A. Read, S. M. Gowan, H. S. Dosanjh, J. O. Trent, T. C. Jenkins, L. R. Kelland and S. Neidle, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 4873; (c) J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P. B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier and C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 3062; (d) M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, J.-L. Mergny, P. Alberti, C. Carrasco, C. Bailly, J.-M. Lehn and W. D. Wilson, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2003, **22**, 1483; (e) F. Koeppl, J.-F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P. B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Hélène and J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 1087; (f) R. A. Heald, C. Modi, J. C. Cookson, I. Hutchinson, C. A. Loughton, S. M. Gowan, L. R. Kelland and M. F. G. Stevens, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 590; (g) O. Y. Feodoroff, M. Salazar, H. Han, V. V. Chemeris, S. M. Kerwin and L. H. Hurley, *Biochemistry*, 1998, **37**, 12367.
- (a) M.-Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-ya, K. Wierzbka and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 2098; (b) M.-P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.-L. Mergny, A. David, J.-M. Lehn and W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4732; (c) E. M. Rezler, J. Seenisamy, S. Bashyam, M.-Y. Kim, E. White, W. D. Wilson and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 9439.
- (a) J.-F. Riou, L. Guittat, P. Mailliet, A. Laoui, E. Renou, O. Petitgenet, F. Mégnin-Chanet, C. Hélène and J.-L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 2672; (b) J. A. Shouten, S. Ladame, S. J. Mason, M. A. Cooper and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 5594; (c) P. M. Murphy, V. A. Phillips, S. A. Jennings, N. C. Garbett, J. B. Chaires, T. C. Jenkins and R. T. Wheelhouse, *Chem. Commun.*, 2003, 1160; (d) C. Granotier, G. Pennarun, L. Riou, F. Hoffschir, L. R. Gauthier, A. De Cian, D. Gomez, E. Mandine, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, P. Mailliet, B. Dutrillaux and F. D. Boussin, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 4182.
- (a) S. M. Haider, G. N. Parkinson and S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, 2003, **326**, 117; (b) E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. G. Stevens and M. S. Searle, *J. Mol. Biol.*, 2003, **334**, 25; (c) Q. Chen, I. Kuntz and R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 2635; (d) J. A. Schouten, S. Ladame, S. J. Mason, M. A. Cooper and S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 5594; (e) I. M. Dixon, F. Lopez, J.-P. Estève, A. M. Tejera, M. A. Blasco, G. Pratviel and B. Meunier, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 123; (f) A. T. Phan, V. Kuryavyi, H. Y. Gaw and D. Patel, *Nat. Chem. Biol.*, 2005, **1**, 167; (g) M. A. Read and S. Neidle, *Biochemistry*, 2000, **39**, 13422; (h) R. J. Harrison, J. Cuesta, G. Chessari, M. A. Read, S. K. Basra, A. P. Reszka, J. Morrell, S. M. Gowan, C. M. Incles, F. A. Tanious, W. D. Wilson, L. R. Kelland and S. Neidle, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 4463.
- (a) Y. Wang and D. J. Patel, *Structure*, 1993, **1**, 263; (b) G. N. Parkinson, M. P. Lee and S. Neidle, *Nature*, 2002, **417**, 876; (c) L. Ying, J. J. Green, H. Li, D. Klennerman and S. Balasubramanian, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 14629; (d) S. Redon, S. Bombard, M.-A. Elizondo-Riojas and J. C. Chottard, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 1605; (e) A. T. Phan and D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 15021; (f) J. Qi and R. H. Shafer, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 3185 and references cited therein; (g) J. Li, J. J. Correia, L. Wang, J. O. Trent and J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 4649; (h) M. Vorlickova, J. Chladkova, I. Kejnovska, M. Fialova and J. Kypr, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 5851; (i) J. Qi and R. H. Shafer, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 3185; (j) D. Miyoshi, H. Karimata and N. Sugimoto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 3740.

- 12 (a) M.-P. Teulade-Fichou and J.-P. Vigneron, in *Small molecule DNA and RNA binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes*, ed. M. Demeunynck, C. Bailly and W. D. Wilson, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, vol. 1, ch. 11, pp. 278–311 and references cited therein; (b) J. Seenisamy, S. Bashyam, V. Gokhale, H. Vankayalapati, D. Sun, A. Siddiqui-Jain, N. Streiner, K. Shin-ya, E. White, W. D. Wilson and L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **127**, 2944.
- 13 F. Rosu, V. Gabelica, K. Shin-Ya and E. De Pauwn, *Chem. Commun.*, 2003, 2702.
- 14 (a) Y. Tor, *ChemBioChem*, 2003, **4**, 998; (b) F. Walter, Q. Vicens and E. Westhof, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 694; (c) M. Zacharias, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **2**, 161.
- 15 J.-L. Mergny, *et al.*, unpublished work.
- 16 (a) D. P. Arya, R. L. Coffee, B. Willis and A. L. Abramovitch, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 5385; (b) D. P. Arya, L. Micovic, I. Charles, R. L. Coffee, B. Willis and L. Xue, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3733.
- 17 (a) M. Hendrix, P. B. Alper, E. S. Priestley and C.-H. Wong, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1997, **36**, 95; (b) D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard and J. D. Puglisi, *Science*, 1996, **274**, 1367.
- 18 (a) S. M. Nelson, *Pure Appl. Chem.*, 1980, **52**, 2461; (b) D. Chen and A. E. Martell, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 6895; (c) J. Jazwinski, J.-M. Lehn, R. Méric, J.-P. Vigneron, M. Cesario, J. Guilhem and C. Pascard, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 3489.
- 19 M. Sainlos, P. Belmont, J.-P. Vigneron, P. Lehn and J.-M. Lehn, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 2764.
- 20 J. L. Sessler and A. K. Burrell, in *Macrocycles, Topics in Current Chemistry*, ed. E. Weber and F. Vögtle, Springer-Verlag, Berlin, 1992, vol. 161, p. 179.
- 21 (a) J.-L. Mergny and J.-C. Maurizot, *ChemBioChem*, 2001, **2**, 124; (b) F. Rosu, E. De Pauwn, L. Guittat, P. Alberti, L. Lacroix, P. Mailliet, J.-F. Riou and J.-L. Mergny, *Biochemistry*, 2003, **42**, 10361.
- 22 (a) J. M. Sanders and C. Hunter, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 5525; (b) E. A. Meyer, R. K. Castellano and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1210.
- 23 pK_a 's of the free neomycin are: 5.7, 7.6, 7.6, 8.1 (NH_2 attached to the sugar rings); 8.6, 8.7 (NH_2 attached to the two primary carbons).^{16a} Thus, the free neomycin has a global charge of 4⁺–6⁺ depending on the experimental pH (7.2 for FRET-melting, 8.3 for TRAP). In the macrocyclic series, the two benzylic nitrogens have pK_a 's of around 7–8, and the ring nitrogens of the three aromatics are not protonated, neither are the two basic NH_2 residues of neomycin engaged in the amide bond. Hence, the global charge of the macrocycles at experimental pH (7.2) is estimated to be around 4⁺ (amino caproic linker) and 6⁺ (lysine linker).
- 24 P. Alberti, J. Ren, M.-P. Teulade-Fichou, L. Guittat, J.-F. Riou, J. B. Chaires, C. Hélène, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn and J.-L. Mergny, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2001, **19**, 505.
- 25 J.-L. Mergny, A. De Cian, A. Ghelab, B. Saccà and L. Lacroix, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 81.
- 26 J.-L. Mergny, J. Li, L. Lacroix, S. Amrane and J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, e138.
- 27 D. Gomez, J.-L. Mergny and J.-F. Riou, *Cancer Res.*, 2002, **62**, 3365.
- 28 A. J. Zaug, E. R. Podell and T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 10864.
- 29 (a) M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron and J.-M. Lehn, *J. Supramol. Chem.*, 1995, **5**, 139; (b) O. Baudoin, M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron and J.-M. Lehn, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 5454; (c) C. J. Chandler, L. W. Deady and J. A. Reiss, *J. Heterocycl. Chem.*, 1981, **18**, 599.
- 30 K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley, New York, 1986.
- 31 A. Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, 1985, **65**, 355.
- 32 J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachman and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1979, **71**, 4546.
- 33 A. Bax and D. G. Davis, *J. Magn. Reson.*, 1985, **63**, 207.
- 34 V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik and V. Saudek, *J. Magn. Reson.*, 1993, **102**, 241.

3.3 Informations complémentaires

Il aurait été intéressant de pouvoir confirmer cette préférence pour les G-quadruplexes et particulièrement ceux qui possèdent des boucles par d'autres méthodes. Nous avons, en effet, tenté d'évaluer la sélectivité de ces molécules par d'autres techniques spectroscopiques et biochimiques. Malheureusement aucune de ces techniques ne s'est révélée concluante :

- les sensogrammes que nous avons obtenus en résonance plasmonique de surface étaient inexploitable en raison d'une interaction vraisemblable de la molécule avec la surface de la puce.
- Nous avons également réalisé de nombreuses titrations en fluorescence de la molécule **11** par de l'ADN G-quadruplexe avec des boucles ou sans boucle. Néanmoins les courbes obtenues étaient probablement faussées par une adsorption de la molécule sur les parois de la cuve, conduisant au nombre peu probable de sites de fixation de 8 molécules par structure d'ADN (cf. Annexe II : Titrations avec *n* sites équivalents).
- Enfin, la quantité de molécule **11** disponible ne nous a permis de réaliser qu'une seule expérience de dialyse à l'équilibre. Celle-ci n'a pas permis d'attribuer avec certitude une sélectivité pour les G-quadruplexes en raison de possibles pertes ou précipitation de l'ADN avec la molécule au cours de l'équilibration, ou d'une possible interaction de la molécule avec les membranes de dialyse.

Les composés **9** et **10** ont également été testés en conditions potassium dans l'**article 1**. Pour ces composés, comme pour les composés de référence présentés dans la Figure 28, la stabilisation est légèrement plus importante en conditions potassium, et la sélectivité vis-à-vis du duplexe semble également augmentée. En revanche, dans les deux conditions la compétition avec des G-quadruplexes intramoléculaires comme 30AG ou 27NHEG (promoteur de *c-myc*) supprime quasi totalement la stabilisation de l'oligonucléotide fluorescent formé par la séquence télomérique humaine. Notons tout de même une légère affinité pour la séquence mutée mut27NHEG ne pouvant pas former de G-quadruplexes. Elle pourrait être expliquée par une interaction possible de la partie néomycine avec les simple-brins présentant des guanines.

Pour cette famille de composés, on peut effectivement s'interroger sur la nature de la structure compétitrice la plus "dangereuse". En effet, alors que les ligands s'empilant sur les quartets sont généralement propices à l'intercalation dans un duplexe d'ADN, ils présentent souvent des affinités modérées pour les simples brins. En revanche, les aminoglycosides présentent des affinités importantes pour des hélices de type A d'acides nucléiques et en particulier pour les ARNs. Il aurait donc été intéressant de vérifier la sélectivité de cette famille de

molécules en diversifiant les compétiteurs simples brins choisis. Dans l'idéal, l'utilisation de compétiteurs ARN aurait été souhaitable, néanmoins pour des raisons de coût, elle est difficilement envisageable.

4 Mieux s'adapter aux G-quartets... (Article 3)

4.1 Article 3 : “Highly Efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds”. J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) : 1856-1857.

A. De Cian, E. De Lemos, J-L Mergny, M-P. Teulade-Fichou, D. Monchaud.

Synthèse:

L'interaction avec les G-quadruplexes et les activités antiprolifératives des molécules **12459** et **360A/307A**, développées en collaboration avec Sanofi-Aventis, nous ont amené à constater l'importance des deux fonctions N-méthylbisquinolinium pour l'affinité et la sélectivité de ces composés. Il est intéressant de constater que les composés de la série 2,6 – pyridodicarboxamide sont capables de s'organiser en forme de V grâce à des liaisons Hydrogène entre les H des fonctions amides et l'azote de la pyridine centrale. En inversant la fonction amide, nous avons montré que le ligand ne permettait plus de stabiliser le G-quadruplexe formé par la séquence télomérique humaine en test FRET (“Supporting Information S7”). Il semble donc que le maintien de la forme en croissant par ces liaisons Hydrogène soit essentiel à l'affinité de la molécule pour les G-quadruplexes. Partant de cette hypothèse, nous avons supposé que l'étendue de la structure aromatique centrale sans perturbation de ce réseau de liaisons Hydrogène ou modification des chaînes latérales devait augmenter leurs propriétés de reconnaissance pour les G-quadruplexes.

En étendant la 2,6-pyridine centrale par une 1,10-phénanthroline 2,9-disubstituée, nous avons montré par dénaturation thermique suivie en fluorescence que l'affinité de la molécule pour le G-quadruplexe télomérique humain était augmentée sans diminuer sa sélectivité par rapport au duplexe ds26. En revanche, le remplacement par une 2,2'-bipyridine 6,6'-disubstituée diminuait la stabilisation et la sélectivité suggérant une planéité amoindrie de la molécule, par possible rotation autour de la liaison entre les 2 pyridines, induisant un plus faible potentiel d'empilement sur les quartets terminaux. Une titration en dichroïsme circulaire sur la séquence télomérique humaine d(AGGG(TTAGGG)₃) a montré que le composé **2a** se fixe au G-quadruplexe en conditions Na⁺, avec une stoechiométrie 2 : 1 suggérant un empilement du ligand sur les quartets externes du G-quadruplexe. On remarquera, en outre, que la taille de la molécule est particulièrement bien adaptée aux dimensions du quartet supérieur de la structure cristalline du G-quadruplexe télomérique humain.

Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds

Anne De Cian,[†] Elsa DeLemos,[†] Jean-Louis Mergny,[‡] Marie-Paule Teulade-Fichou,^{*,†} and David Monchaud[†]Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France, CNRS UPR285, 75005 Paris, France, and
Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM503, INSERM U565 CNRS UMR 5153,
75005 Paris, France

Received October 13, 2006; E-mail: mp.teulade-fichou@college-de-france.fr

Trying to control and regulate the expression of genes is emerging as a very appealing anticancer strategy. Indeed, chemotherapy aiming at designing molecules able to interact with unusual structures of nucleic acids is currently subjected to a close examination.¹ In that sense, quadruplex–DNA is a particularly attractive high-order structure since it appears to be putatively present in pivotal genomic regions such as telomeres,² promoters of oncogenes, and most growth control genes.³ Convincing reports on the efficiency of quadruplex interacting molecules as therapeutically active agents are beginning to appear in the literature.⁴

Thus, intensive investigations are currently oriented toward the design and development of new G-quadruplex ligands. Of particular interest are molecules with high quadruplex affinity that exhibit the ability to discriminate quadruplex–DNA from nucleus predominant duplex–DNA. Up to now, the leading G-quadruplex binder has been the natural product telomestatin.⁵ Nevertheless, its total synthesis was achieved only very recently, and the complexity of the process renders its convenient exploitation difficult.⁶ Recently, some of us reported on bisquinolinium compounds that exhibit exceptional affinity and selectivity for quadruplex-forming oligonucleotides.^{4c,7} The anti-proliferative activity of these compounds has been demonstrated, as well as their preferential binding to telomeric regions of human chromosomes,^{7b} thus providing new insights on quadruplex existence in vivo. These exciting results prompted us to develop the bisquinolinium family of compounds which was furthermore facilitated by a convenient and rapid synthetic access.

In the initial series, the two quinolinium moieties are connected through a 2,6-pyridodicarboxamide unit.^{4c,7} This motif, well-known to adopt an internally organized H-bonded *syn–syn* conformation (Figure 1A),⁸ was shown to be critical for quadruplex binding. Indeed, inversion of the amide connectivity leads to a loss of affinity (Supporting Information).^{4c} This suggests that the central pyridodicarboxamide unit locks the ligand in a crescent-shaped conformation highly favorable for G-quartet overlap. On this basis, we reasoned that expanding the aromaticity of the central core without disrupting either the H-bonds network or modifying the cationic side-arm nature could result in improved recognition properties.

To this end, 6,6'-disubstituted-2,2'-bipyridine and 2,9-disubstituted-1,10-phenanthroline units that are also susceptible to be conformationally locked via H-bonding were considered as good candidates for replacing the pyridine central core. Ligands **1a/b** and **2a/b** (Figure 1B) were synthesized via straightforward three- and four-step procedures respectively, from inexpensive commercially available material (Supporting Information).

The ligand's ability to stabilize a quadruplex structure was evaluated by FRET experiments using the quadruplex-forming engineered oligonucleotide F21T (FAM-G₃[T₂AG₃]₃-Tamra), which

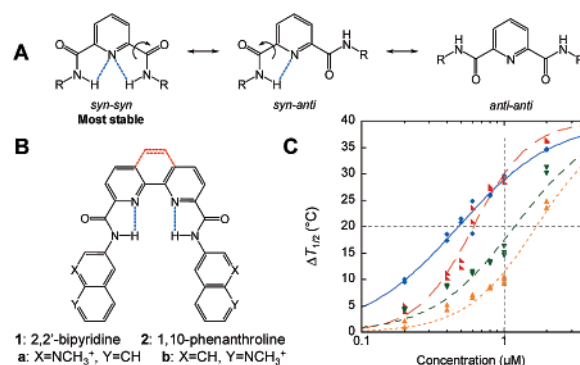


Figure 1. (A) Alternative conformations of pyridodicarboxamide unit (H-bonds appear as dotted lines). (B) Structure of **1a/b** and **2a/b** (with triflate as counterions). (C) Dose–response curves for FRET results ($\Delta T_{1/2}$) in function of ligand concentration for **1a** (green), **1b** (orange), **2a** (blue), and **2b** (red). The baseline ($\Delta T_{1/2} = 0$ °C) was set at the melting temperature of the structure without ligand (48 °C).

mimics the human telomeric repeat (Supporting Information).⁹ As shown in Figure 1C, compounds **2a/b** (blue/red curves) appear as remarkably strong quadruplex stabilizers, while more modest effects are obtained with **1a/b** (green/orange curves). Indeed, $\Delta T_{1/2}$ values at 1 μ M dose of ligand (vertical gray line, Figure 1C) are significantly higher with **2a/b** ($\Delta T_{1/2(1\mu M)} = 29.7$ and 28.5 °C, respectively) than with **1a/b** ($\Delta T_{1/2(1\mu M)} = 15.2$ and 9.6 °C, respectively). Accordingly, the concentration required to achieve a $\Delta T_{1/2}$ value of 20 °C (horizontal gray line, Figure 1C) is also significantly lower with **2a/b** ($[\text{conc}]_{(\Delta T_{1/2}=20^\circ\text{C})} = 0.48$ and 0.61 μ M, respectively) than with **1a/b** ($[\text{conc}]_{(\Delta T_{1/2}=20^\circ\text{C})} = 1.19$ and 1.69 μ M, respectively).¹⁰ Altogether, these data reflect a very high level of quadruplex stabilization for ligands **2** and represent a significant improvement as compared to the pyridine series. Interestingly, these results make this new series fully competitive with the high-affinity G-quadruplex binders such as telomestatin, extended acridines, and organometallic complexes all exhibiting $\Delta T_{1/2(1\mu M)} > 20$ °C.¹⁰ Most important, the differences between the two series highlight that structural rigidity is a key parameter for quadruplex recognition, the free rotation around the biaryl axis of ligands **1** being responsible for the lower performance of this series.

To gain further insights into the intrinsic qualities of these ligands, competitive FRET experiments were performed in the presence of various amounts of 26 bp duplex–DNA (ds26, from 0 to 10 μ M, Supporting Information).¹¹ Remarkably, the thermal stabilization induced by **2a/b** is only poorly affected (~10% loss) by the presence of 10 molar equiv of ds26 (Figure 2A,B). This indicates that ligands **2** exhibit an exquisite quadruplex versus duplex selectivity, thus behaving similarly to telomestatin in the same conditions (Supporting Information).¹² Again, bipyridine derivatives **1** appear less competent since they are more sensitive

[†] Collège de France.[‡] Muséum National d'Histoire Naturelle.

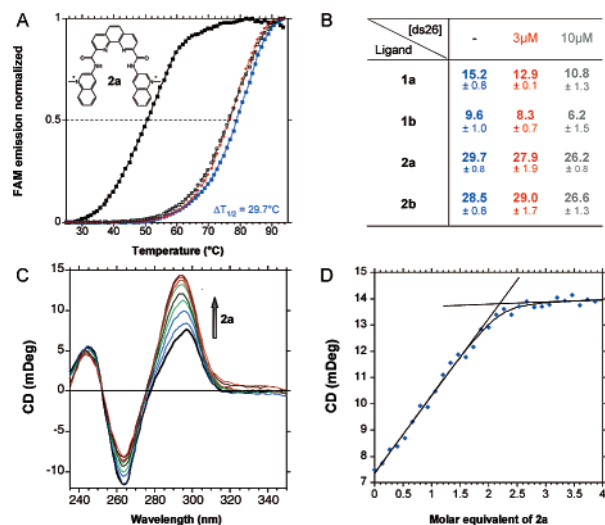


Figure 2. (A) FRET experiments carried out with **2a** and F21T without ligand (black) and with 1 μ M **2a** in absence (blue) or presence of competitive duplex (ds26, 3 equiv (red) or 10 equiv (gray)). (B) FRET results ($\Delta T_{1/2}$, °C) for **1a/b** and **2a/b** (1 μ M) in absence (blue) or presence of competitive ds26 (3 equiv (red) or 10 equiv (gray)). (C and D) CD titration of 22AG (3 μ M in 10 mM lithium cacodylate, pH 7.2, 100 mM NaCl buffer) by increasing amounts of **2a**: (C) some CD spectra at 296 nm from the titration experiment; the arrow indicates the increasing amounts of ligand from black to red curves: 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.7, 5.9, 7.1, 8.2, 9.4, and 10.9 μ M; (D) CD signal as a function of **2a** molar equivalents (0.4 μ M increments).

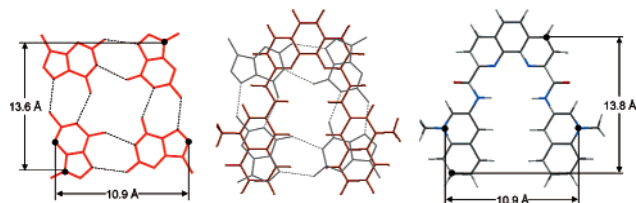


Figure 3. Selected dimensions of a G-quartet (left, determined from X-ray structure) and of **2a** (right, after molecular mechanics (MM2) calculations (Chem3D Ultra 8.0, CambridgeSoft Corp., MA)).

to the duplex competition (29 and 35% loss in stabilization for **1a/b**, respectively (Figure 2B)).

To determine the stoichiometry of association of **2a** and G-quadruplexes, CD titrations were carried out using the 22AG sequence (AG₃[T₂AG₃]₃, in Na⁺ buffer, Figure 2C and Supporting Information).¹³ Analysis of the data indicates that the curve inflection occurs at ~2:1 ligand/quadruplex ratio (Figure 2D). This 2:1 stoichiometry is consistent with a binding mode based on the stacking of the ligand onto the two external G-quartets of the quadruplex (Supporting Information).

A close examination of the crystal structure of 22AG (1KF1, RCSB Protein Data Bank)¹⁴ shows that a G-quartet can be considered as a square aromatic surface whose dimensions are closely related to that of **2a** (Figure 3 and Supporting Information). The strong stabilization properties of ligands **2** could thus originate in this accurate geometrical complementarity. Subsequently, the molecular size may be unfavorable for interaction with a classical base pair in duplex DNA,¹ resulting in the high preference for the quadruplex. Consequently, the molecular organization of the central core (internal H-bonds) and electronic/electrostatic properties (two quinolinium side arms) make phenanthroline bisquinolinium derivatives **2** perfectly fitted for the recognition of the quadruplex target.

Finally, the inhibitory properties of these ligands were evaluated via a classical TRAP assay (Supporting Information). However,

preliminary data were obtained which suggest that inhibition measured by TRAP does not actually reflect telomerase inhibition but may result from an inhibition of the PCR amplification on quadruplex-prone motifs even though the internal PCR control (ITAS) is not affected (Supporting Information). Detailed explanations will be reported elsewhere. Nevertheless, the obtained results, among the best reported to date, represent a ~20-fold improvement as compared to the parent pyridine series^{4c,7} and may reflect somehow the very good affinity of those ligands for quadruplex-prone motifs, confirming FRET melting results.

In conclusion, the present paper describes the quadruplex-binding properties of new members of the bisquinolinium family. Their easy synthetic access combined with exceptional quadruplex affinities and selectivities place these ligands among the most potent ones reported so far. Further in vitro evaluations are currently underway.

Acknowledgment. This work was supported by ARC (#3365) and E.U. FP6 “MolCancerMed” (LSHC-CT-2004-502943) grants. The authors gratefully thank Dr. P. Mailliet for helpful discussions.

Supporting Information Available: Synthesis and characterization of **1a–2b**; experimental procedures and additional FRET and CD data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Wheelhouse, R. T.; Jennings, S. A.; Phillips, V. A.; Pletsas, D.; Murphy, P. M.; Garbett, N. C.; Chaires, J. B.; Jenkins, T. C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5187.
- (2) Neidle, S.; Parkinson, G. N. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 275.
- (3) (a) Cogoi, S. C.; Xodo, L. E. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2536. (b) Dexheimer, T. S.; Sun, D.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5404. (c) Dai, J.; Dexheimer, T. S.; Chen, D.; Carver, M.; Ambrus, A.; Jones, R. A.; Yang, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1096. (d) Xu, Y.; Sugiyama, H. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 949. (e) De Armond, R.; Wood, S.; Sun, D.; Hurley, L. H.; Ebbinghaus, S. W. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16341. (f) Phan, A. T.; Kuryavyy, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 167. (g) Sun, D.; Guo, K.; Rusche, J. J.; Hurley, L. H. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6070. (h) Rankin, S.; Reszka, A. P.; Huppert, J.; Zloh, M.; Parkinson, G. N.; Todd, A. K.; Ladame, S.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10584.
- (4) (a) Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J. B.; Double, J. A.; Neidle, S. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1489. (b) Kim, M. Y.; Vankayalapati, H.; Shin-Ya, K.; Wierzbka, K.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2098. (c) Pennarun, G.; Granotier, C.; Gauthier, L. R.; Gomez, D.; Hoffschir, F.; Mandine, E.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L.; Mailliet, P.; Boussin, F. *Oncogene* **2005**, *24*, 2917.
- (5) (a) Shin-ya, K.; Wierzbka, K.; Matsuo, K.-I.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1262. (b) Tahara, H.; Shin-ya, K.; Seimiya, H.; Yamada, H.; Tsuruo, T.; Ide, T. *Oncogene* **2006**, *25*, 1955. (c) Gomez, D.; O'Donohue, M. F.; Wenner, T.; Douarre, C.; Macadre, J.; Koebel, P.; Giraud-Panis, M. J.; Kaplan, H.; Kolkes, A.; Shin-ya, K.; Riou, J.-F. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6908.
- (6) Doi, T.; Yoshida, M.; Shin-ya, K.; Takahashi, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4165.
- (7) (a) Lemarteleur, T.; Gomez, D.; Paterski, R.; Mandine, E.; Mailliet, P.; Riou, J.-F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 802. (b) Granotier, C.; Pennarun, G.; Riou, L.; Hoffschir, F.; Gauthier, L. R.; De Cian, A.; Gomez, D.; Mandine, E.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L.; Mailliet, P.; Dutrillaux, B.; Boussin, F. D. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4182.
- (8) Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Krische, M. J.; Lehn, J.-M. *Nature* **2000**, *407*, 720.
- (9) Mergny, J.-L.; Maurizot, J.-C. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 124.
- (10) (a) Schultes, C. M.; Guyen, B.; Cuesta, J.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4347. (b) Moore, M. J. B.; Schultes, C. M.; Cuesta, J.; Cuenca, F.; Gunaratnam, M.; Taniou, F. A.; Wilson, W. D.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 582. (c) Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992.
- (11) Mergny, J.-L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J. P.; Lehn, J.-M.; Riou, J.-F.; Garestier, T.; Hélène, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 3062.
- (12) De Cian, A.; Guittat, L.; Shin-ya, K.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 235.
- (13) Allain, C.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11890.
- (14) Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. *Nature* **2002**, *417*, 876.

JA067352B

Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds.

Anne De Cian,[‡] Elsa DeLemos,[†] Jean-Louis Mergny,[‡] Marie-Paule Teulade-Fichou,^{*,†} and David Monchaud,[†]

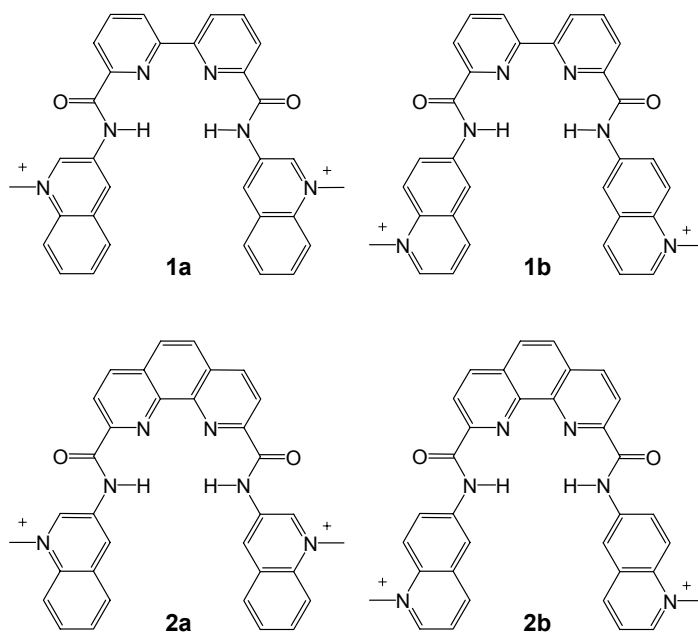
Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France, CNRS UPR285 & Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM503, INSERM U565 CNRS-UMR 5153, 75005 Paris France.

Email : mp.teulade-fichou@college-de-france.fr

Supporting informations :

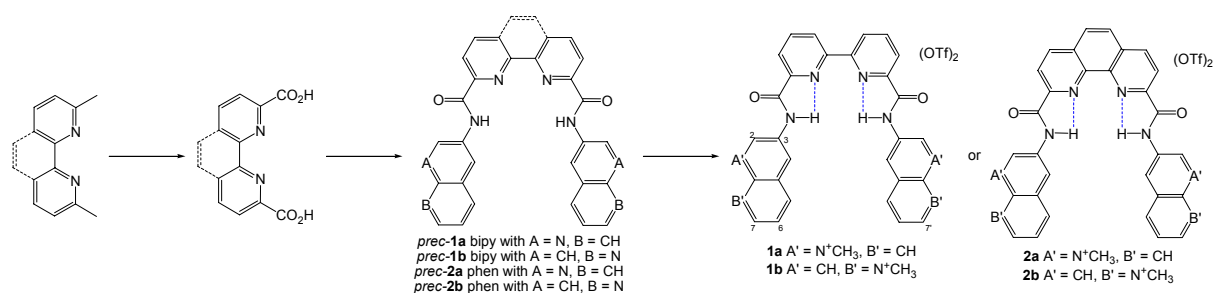
S1- Structures	<i>p1</i>
S2- Synthesis of 1a-2b	<i>p2</i>
S3- Characterisations of 1a-2b	<i>p3</i>
S4- FRET results with 1a-2b	<i>p4</i>
S5- FRET Protocol	<i>p5</i>
S6- FRET results with telomestatin	<i>p5</i>
S7- Inversion of amide connectivity	<i>p6</i>
S8- CD-titrations	<i>p7</i>
S9- Binding mode investigations	<i>p9</i>
S10- UV-vis analysis of Bisquinolinium in solution	<i>p9</i>
S11- TRAP results	<i>p10</i>
S12- Dimension & estimated overlap with quartet	<i>p13</i>

S1- Structures:



NB : For all compounds, the two counter-ions are CF_3SO_3^- .

S2- Synthesis of 1a-2b:



Reagents and conditions: (i) for bipyridine: KMnO₄, H₂O, 100°C, 2hrs, 40%; for phenanthroline: SeO₂, dioxane, 100°C, 2hrs, 61% then HNO₃ (70%), 100°C, 3hrs, 76%; (ii) EDCI, HOAt, DMF, 23°C, 16hrs, 75-89%; (iii) MeOTf, DCE, 60°C, 16hrs, 50-86%. The internal N-H...N H-bonds are represented in blue. Carbon numbering for aminoquinoline is indicated on **1**; 'prec-' stands for 'precursor of'.

Experimental part: the example of **2a**:

Step i-a: Selenium dioxide (4.0g, 36.0mmol, 5.0equiv.) is added to a solution of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline (1.5g, 7.2mmol, 1.0equiv.) in dioxane (100mL) at room temperature. The reaction mixture is then heated to reflux under strong stirring for 2hours, and then allowed to cool to room temperature. The formed precipitated is collected and dried by several Et₂O washings. After removal of the solvent under reduced pressure, the crude material (1,10-phenanthroline-2,9-dicarbaldehyde) is obtained as a yellow powder (972mg, 61% chemical yield). ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.34 (s, 2H); 8.77 (d, *J*=8.1Hz, 2H); 8.28 (d, *J*=8.1Hz, 2H); 8.27 (s, 2H); ¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 194.1; 152.6; 145.7; 138.9; 131.9; 129.7; 120.6; **M.p.** 230°C; **IR** (KBr) cm⁻¹: 2361 (C-H ald.); 2342 (C-H ald.); 1702 (C=O ald.).

Step ii-b: 1,10-phenanthroline-2,9-dicarbaldehyde (500mg, 2.1mmol, 1.0equiv.) is then stirred in a solution of HNO₃ (70%, 10mL) under reflux for 2 hours. After cooling to 0°C, slow addition of water (50mL) leads to the formation of a precipitate, which is collected and dried by several Et₂O washings. After removal of the solvent under reduced pressure, the crude material obtained was crystallised from methanol to give the 1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid as a pale yellow powder (430mg, 76 %). ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.74 (d, *J*=8.1Hz, 2H); 8.42 (d, *J*=8.4Hz, 2H); 8.22 (s, 2H); ¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 166.7; 148.6; 145.1; 138.7; 130.9; 128.8; 124.3; **M.p.** 239°C; **IR** (KBr) cm⁻¹: 3500 (O-H acid); 1718 (C=O acid); 1384 (O-H acid); 1292 (C-O acid).

Step iii: EDCI (150mg, 0.78mmol, 2.0equiv.) and HOAt (10mg, 0.074mmol, 0.2equiv.) are successively added to a solution of 1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (100mg, 0.37mmol, 1.0equiv.) and 3-aminoquinoline (113mg, 0.78mmol, 2.1equiv.) in DMF (10mL). The reaction mixture is then stirred at room temperature for 1 hour; the formed precipitated is collected, washed with a solution of NaHCO₃ (1%) and dried by several Et₂O washings. *Prec-2a* is obtained as a pale yellow solid (173mg, 89% chemical yield). ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.46 (s, 2H); 9.07 (s, 2H); 8.77-8.66 (m, 4H); 8.20 (s, 2H); 7.99 (m, 4H); 7.61 (m, 4H); **M.p.** <260°C; **ESI-MS** (CH₂Cl₂/MeOH): *m/z* = 521 (100%; [*prec-2a*+H⁺]);

Step iv: A solution of *prec-2a* (50mg, 0.096mmol, 1.0equiv.) in 1,2-dichloroethane (30mL) is heated to reflux under inert atmosphere. An excess of methyl trifluoromethanesulfonate is added (0.3mL, 2.65mmol, 27equiv.) and the reaction mixture is stirred overnight at reflux temperature. After cooling to room temperature, the formed precipitate is collected and dried by several Et₂O washings. **2a** is obtained as a pale yellow solid (40mg, 50% chemical yield).

S3- Characterisations of 1a-2b:

Ligand 2a:

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.2 (s, 2H); 10.3 (s, 2H); 9.93 (s, 2H); 8.99 (d, J = 8.4Hz, 2H); 8.78 (d, J = 8.4Hz, 2H); 8.56 (dd, J = 9.0, 3.6Hz, 2H); 8.40 (s, 2H); 8.26 (t, J = 7.8Hz, 2H); 8.09 (t, J = 7.8Hz, 2H); 4.68 (s, 6H);

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 164.0; 148.8; 146.2; 140.1; 136.0; 135.2; 134.3; 133.0; 131.2; 130.8; 130.6; 129.5; 123.3; 122.6; 119.7; 114.6; 46.5;

M.p. >260°C ;

ESI-MS (MeOH): m/z = 275.1 (100%; [2a]/2);

HR-MS (MeOH): 550.2128 (C₃₄H₂₆N₆O₂, calc. 550.2117).

Ligand 2b:

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.1 (s, 2H); 9.45-9.31 (m, 4H); 9.12 (s, 2H); 8.92 (m, 4H); 8.70 (m, 4H); 8.33 (m, 2H); 8.19 (m, 2H); 4.72 (s, 6H);

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.9; 149.4; 144.1; 139.8; 139.5; 135.9; 134.3; 130.8; 130.4; 129.1; 123.6; 122.8; 122.3; 120.8; 119.0; 117.6; 45.8;

M.p. >260°C ;

ESI-MS (MeOH): m/z = 275.1 (100%; [2b]/2);

HR-MS (MeOH): 550.2070 (C₃₄H₂₆N₆O₂, calc. 550.2117).

Ligand 1a:

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.6 (s, 2H); 10.1 (d, J = 2.1Hz, 2H); 9.66 (s, 2H); 9.38 (dd, J = 6.1, 2.1Hz, 2H); 8.55-8.41 (m, 6H); 8.24 (t, J = 7.5Hz, 2H); 8.10 (t, J = 7.8Hz, 2H); 4.75 (s, 6H);

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.9; 154.1; 148.8; 146.0; 140.2; 136.1; 135.9; 132.8; 130.6; 130.4; 129.6; 126.2; 124.4; 123.6; 119.6; 46.4;

M.p. >260°C ;

ESI-MS (MeOH): m/z = 263.1 (100%; [1a]/2);

HR-MS (MeOH): 526.2092 (C₃₂H₂₆N₆O₂, calc. 526.2117).

Ligand 1b:

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.3 (s, 2H); 9.44-9.30 (m, 6H); 9.15 (s, 2H); 8.77-8.60 (m, 4H); 8.44-8.39 (m, 4H); 8.16 (dd, J = 8.4, 6.0Hz, 2H); 4.66 (s, 6H);

¹³C-NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.9; 154.0; 149.4; 149.1; 146.9; 140.0; 139.5; 135.9; 131.7; 130.5; 125.8; 124.1; 122.9; 120.3; 118.5; 46.1;

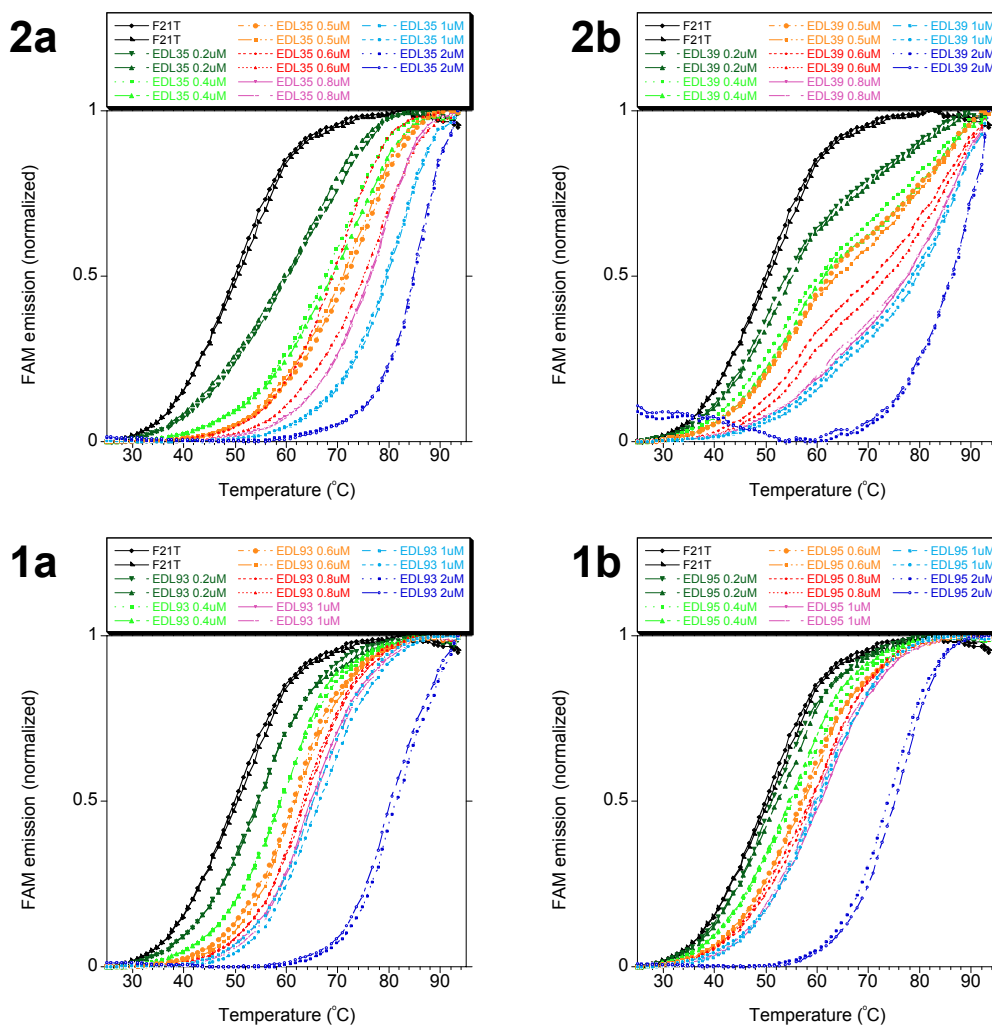
M.p. >260°C ;

ESI-MS (MeOH): m/z = 263.1 (100%; [1b]/2);

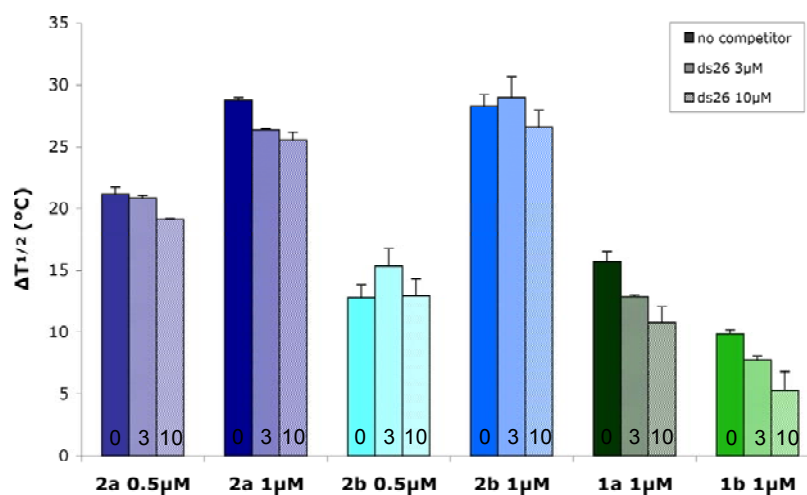
HR-MS (MeOH): 526.2088 (C₃₂H₂₆N₆O₂, calc. 526.2117).

S4- FRET results with 1a-2b:

Ligand **2a** (internal reference: **EDL35**), **2b** (internal reference: **EDL39**), **1a** (internal reference: **EDL93**), **1b** (internal reference: **EDL95**); Duplicates at the same concentration are presented with the identical colour.



Competitive FRET with 0.5 or 1 μM of compounds **1a-2b** and 0, 3 μM and 10 μM of duplex competitor ds26.



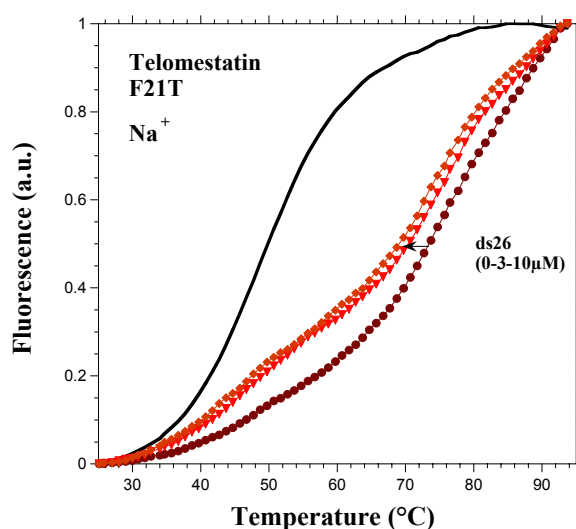
S5- FRET Protocol:

Labelled oligonucleotide is purchased from Eurogentec (Belgium); after an initial dilution at 100 μ M concentration in purified water, further dilutions are carried out in the relevant buffer.

FRET assay is performed as a high-throughput screen in a 96-well format, with F21T (FAM-G₃[T₂AG₃]₃-Tamra, with FAM: 6-carboxyfluorescein and Tamra: 6-carboxytetramethylrhodamine). Fluorescence melting curves were determined with a Stratagene Mx3000P real-time PCR machine, using a total reaction volume of 25 μ L, with 0.2 μ M of tagged oligonucleotide in a buffer containing 10mM lithium cacodylate pH 7.2 and 100mM NaCl. After a first equilibration step at 25°C during 5 minutes, a stepwise increase of 1°C every minute for 71 cycles to reach 95°C was performed and measurements were made after each “cycle” with excitation at 492nm and detection at 516nm. The melting of the G-quadruplex was monitored alone or in the presence of various concentrations of compounds and/or of double-stranded competitor ds26 (5'-CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG-3').

Final analysis of the data was carried out using Excel and Kaleida graph software. Emission of FAM was normalized between 0 and 1, and $T_{1/2}$ was defined as the temperature for which the normalized emission is 0.5. $\Delta T_{1/2}$ values are mean of 2 to 4 experiments $\pm$ standard deviation.

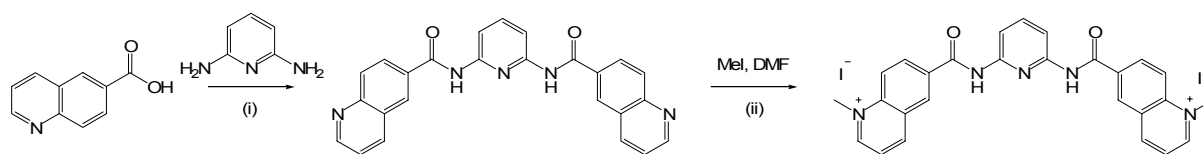
S6- FRET results with telomestatin:



Competitive FRET with 1 μ M of telomestatin without (brown curve) or with 3 (red curve) or 10 μ M (orange curve) of duplex competitor ds26; these experiments are carried out in a sodium buffer. The stabilization obtained is the following: 23.6 $\pm$ 0.3, 21.6 $\pm$ 0.4 and 21.4 $\pm$ 1.5°C for experiments with 0, 3 and 10 μ M of ds26.

The data and the full experimental details are reported in: De Cian, A.; Guittat, L.; Shin-ya, K.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Symp. Series* **2005**, 49, 235.

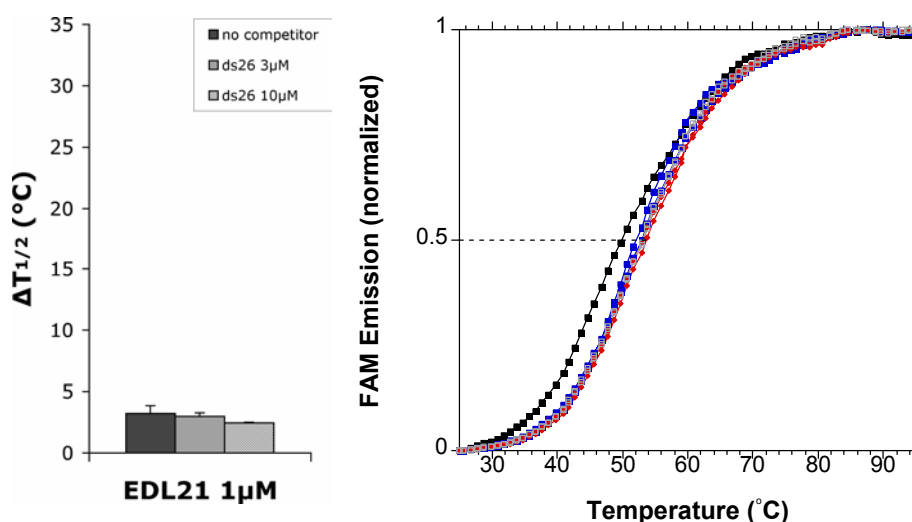
S7- Inversion of amide connectivity (Internal reference **EDL21**):



Step i: EDCI (972mg, 4.7mmol, 3.1equiv.) and HOAt (100mg, 0.72mmol, 0.47equiv.) are successively added to a solution of 6-quinolinecarboxylic acid (956mg, 5.52mmol, 3.1equiv.) and 2,6-diaminopyridine (200mg, 1.8mmol, 1.0equiv.) in DMF (40mL). The reaction mixture is then stirred at room temperature for 16hours. After removal of the solvent under reduced pressure, the residue is triturated in water and washed with Et₂O. After purification by column chromatography (silica gel, from DCM to 10% MeOH/DCM), neutral bisquinoline derivative is obtained as a pale yellow solid (43mg, 10% chemical yield). **R_f** (DCM/MeOH 9:1) = 0.7; **¹H-NMR** (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.9 (s, 2H); 10.8 (s, 2H); 9.03 (d, J = 2.7Hz, 2H); 8.73 (d, J = 9.0Hz, 2H); 8.30 (dd, J = 1.8, 8.4Hz, 2H); 8.14 (d, J = 8.7Hz, 2H); 7.97 (s, 3H); 7.66 (dd, J = 4.2, 8.4Hz, 2H); **¹³C-NMR** (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 166.0; 152.9; 151.0; 149.4; 140.5; 137.8; 132.3; 129.6; 129.5; 128.5; 127.5; 122.8; 111.7; **M.p.** >260°C.

Step ii: A solution of the previously prepared bisquinoline derivative (40mg, 0.095mmol, 1.0equiv.) in DMF (1mL) and MeI (5mL) is heated to reflux under inert atmosphere for 16 hours. After cooling to room temperature, the formed precipitate is collected and dried by several Et₂O washings. The amide-inversed bisquinolinium compound (**EDL21**) is obtained as an orange solid (48mg, 71% chemical yield). **¹H-NMR** (300MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.2 (s, 2H); 9.59 (d, J = 6.0Hz, 2H); 9.38 (d, J = 8.1Hz, 2H); 9.09 (s, 2H); 8.76-8.63 (m, 4H); 8.27 (d, J = 5.7Hz, 2H); 8.00 (m, 3H); 4.68 (s, 6H); **¹³C-NMR** (75MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 164.6; 154.9; 151.9; 150.7; 148.5; 140.0; 135.5; 134.2; 131.1; 129.0; 125.2; 120.2; 46.1; **M.p.** >260°C ; **EI-MS** (MeOH): m/z = 224.5 (100%; [**EDL21**]/2).

FRET results:



S8 - CD titrations:

Circular dichroism may be used to evidence the binding of **2a** to the human telomeric quadruplex in sodium (left) or potassium (right). Increasing amounts of **2a** lead to a progressive change in the spectra. Intensities at selected wavelengths vs. ligand concentration are shown in the central panels. A more dramatic change in the shape of the CD spectra is observed in K^+ . This could be the result of a ligand-induced conformational change of the quadruplex: several quadruplex topologies have been reported for the human telomeric repeat in potassium, and the ligand may have different affinities for the various forms and shift the equilibrium towards a specific conformation. This conformational change may be kinetically forbidden (panel F): annealing the quadruplex in the presence of **2a** leads to a different spectra than adding the compound to the preformed quadruplex. Hence, the titration shown in panel B (and quantitated in panel D) does not reflect a thermodynamic equilibrium (binding of **2a** to the preformed quadruplex is fast, but the conversion into a different quadruplex conformation is very slow). Hence, the 4:1 binding stoichiometry deduced from the titration in panel D must be taken with caution. No such effect is obtained in sodium (panel E), in agreement with a simpler binding mode / single quadruplex conformation.

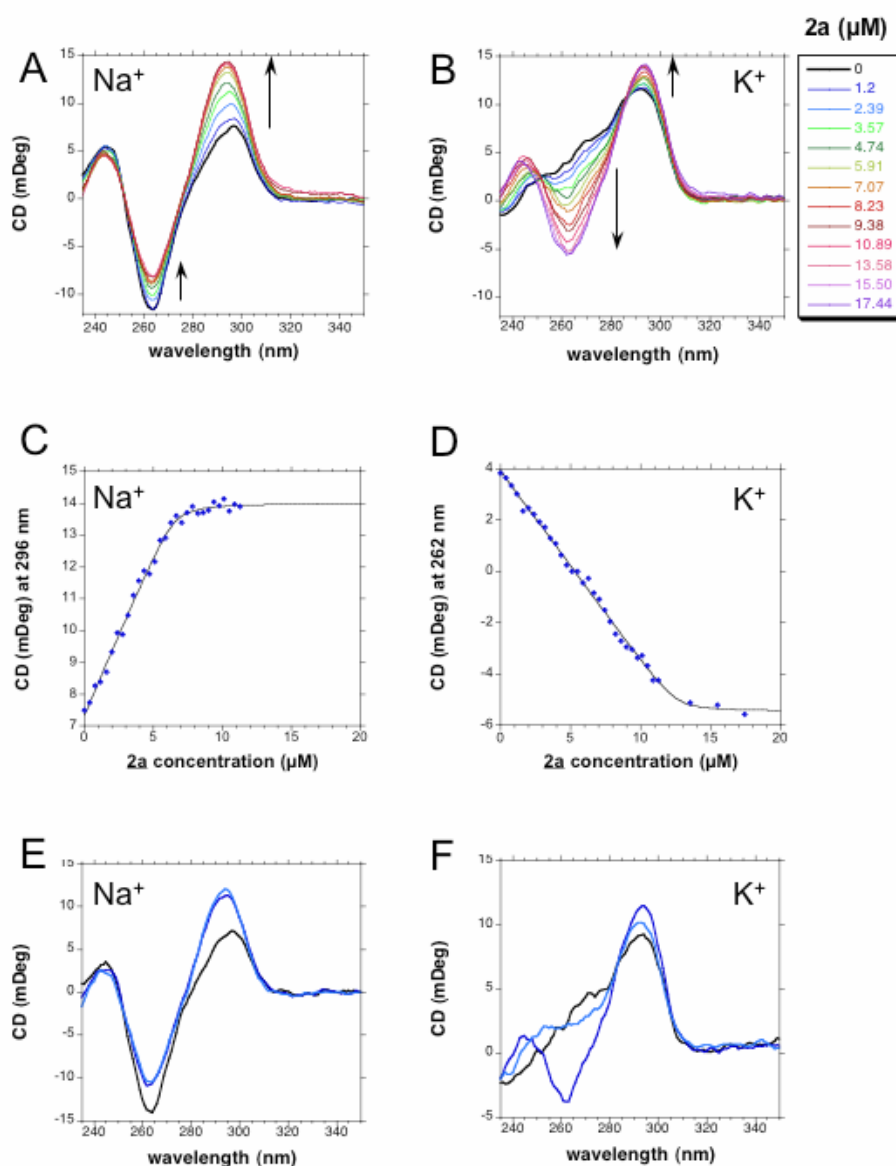


Figure Legend:

A-D: CD Titration : CD spectra of 22AG (3 μ M in 10 mM Lithium cacodylate pH 7.2, 100 mM NaCl (A) or KCl (B)) with increasing concentrations of **2a** (colour code shown on the right). The black curve stands for the oligonucleotide 22AG alone in both salt conditions. Arrows indicate the effects of increasing amounts of ligand on the CD signal. **C-D:** CD signal of 22AG complex with **2a** at 296nm in Na⁺ buffer (C) or at 262 nm in K⁺ buffer (D) as a function of **2a** concentration.

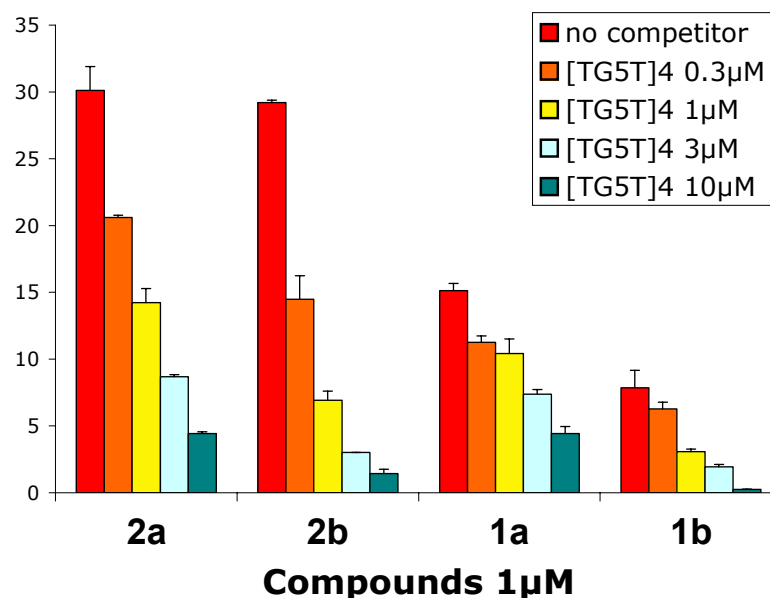
E-F: CD spectra of 22AG (3 μ M in 10 mM Lithium cacodylate pH 7.2, 100 mM NaCl (E) or KCl (F)) alone (black curves) or with 6 μ M of **2a** (blue curves) when the compound is added on the pre-annealed oligonucleotide (dark blue) or when the annealing is done in presence of the compound (light blue). Scans are performed in the same conditions than for CD titration.

Experimental procedure:

CD spectra were recorded on a JASCO-810 spectropolarimeter using 1 cm pathlength quartz cuvetts in a reaction volume of 3ml. 22AG ([5'-AG₃(T₂AG₃)₃-3']) was prepared as a 3 μ M solution in 10mM lithium cacodylate pH 7.2, 100mM NaCl or KCl buffer and annealed by heating to 90°C for 2min, followed by a thermostated cooling to 20°C (at 10°C/min rate). Aliquots of 3 μ l of **2a** at 400 μ M (0.4 μ M increments) (in 10mM lithium cacodylate pH 7.2, 100mM NaCl or KCl buffer, 20% DMSO) were added to the 3ml of 22AG solution. Scans were performed at 20°C over a wavelength range of 235-350nm with a scanning speed of 200nm/min, a response time of 1s, 1nm pitch and 1nm bandwidth. A blank sample containing only buffer was subtracted from the collected data. The CD spectra represent an average of two scans without any zero correction. Final analysis of the data was carried out using Excel and Kaleidagraph 3.6.2 software.

S9- Binding mode investigations:

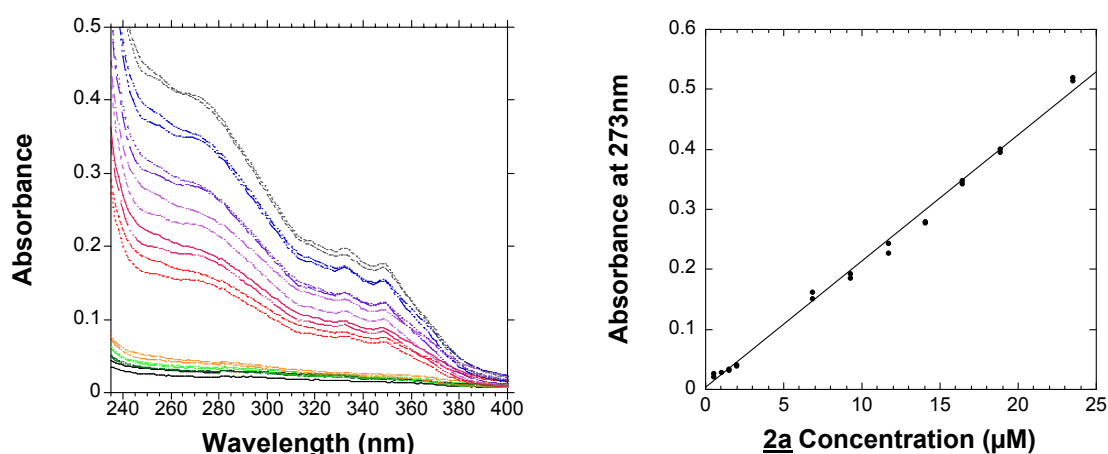
To investigate the binding mode of **1a-2b**, competitive melting experiments have been performed using a non-loop containing tetramolecular G-quadruplex $[d(TG_5T)]_4$ as competitor.



Competitive FRET with 1µM of **1a-2b** without (red) or with 0.3 (orange), 1 (yellow), 3 (blue) or 10µM (green bar) of tetramolecular quadruplex competitor $[d(TG_5T)]_4$.

In these conditions, a strong decrease in stabilization of 22AG was observed for the four ligands indicating that the ligands are easily displaced from the loop-containing quadruplex to the non-loop containing quadruplex. This demonstrates a strong binding of ligands **1** and **2** to the non loop containing G-quadruplex thus supporting that the binding mode is mainly based on stacking interaction with tetrads.

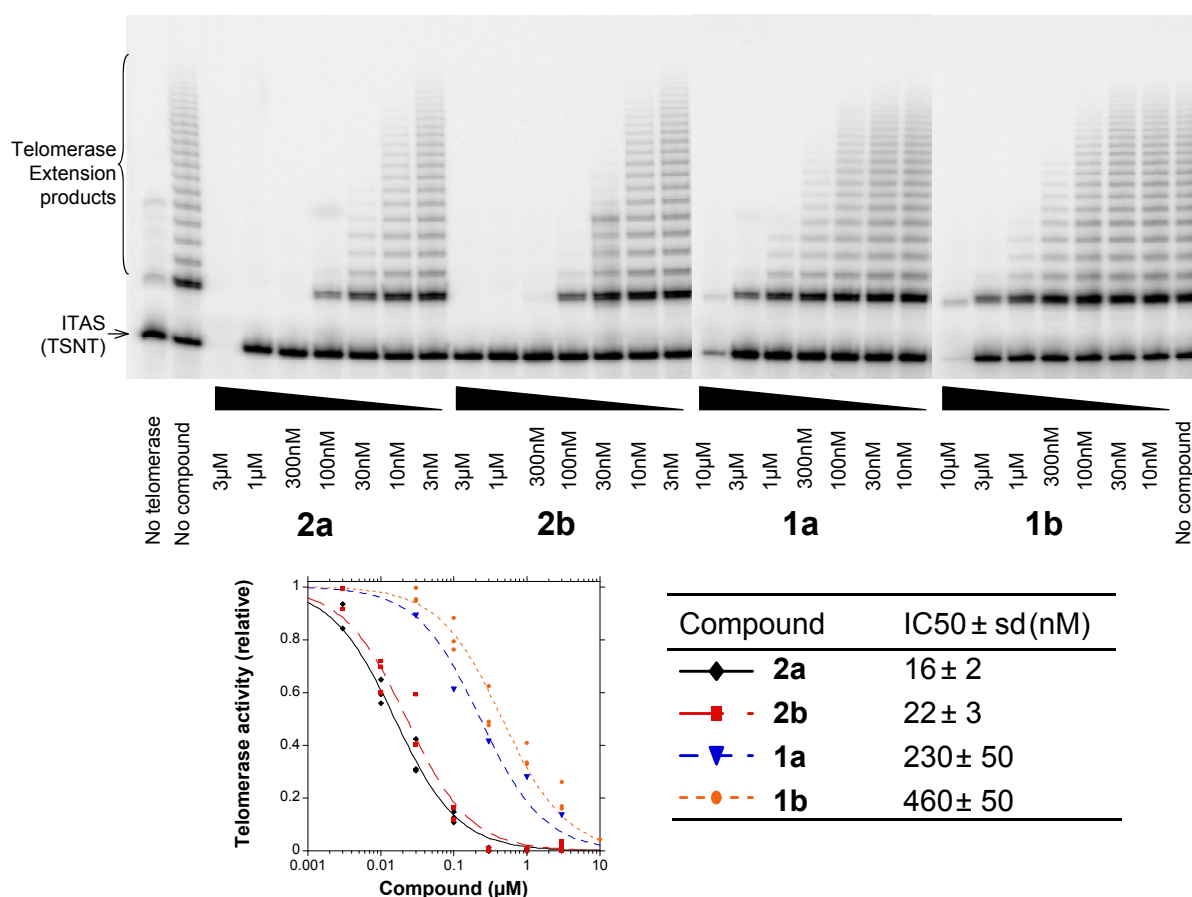
S10- UV-vis analysis of Bisquinolinium in solution:



Concentration dependant UV-vis absorbance of compound **2a** has been recorded and shows that the variation follows the Beer-Lambert law. It is thus unlikely that the ligands do dimerize or self associate in absence of quadruplex.

S11- TRAP results:

Telomerase inhibition is classically evaluated in a TRAP assay. This assay involves a two-step procedure. A short oligonucleotide sequence is first extended by telomerase (from a crude human cell extract). Extension products are then amplified by PCR and revealed on a gel. Telomerase adds a 6 base-long motif, leading to a typical ladder. Various concentrations of drugs are tested in each lane. An internal control (ITAS) is provided to exclude non specific PCR inhibition.



Top: Image of the gel, showing the typical extension ladder obtained after telomerase extension and PCR amplification. Increasing concentrations of compounds lead to a progressive decrease in extension products intensity, while leaving the internal control (ITAS) unaffected, except at very high concentrations.

Bottom: Quantitation of the gel. The relative TRAP activity decreases with increasing ligand concentration. The deduced IC₅₀ are shown on the right.

TRAP assay protocol:

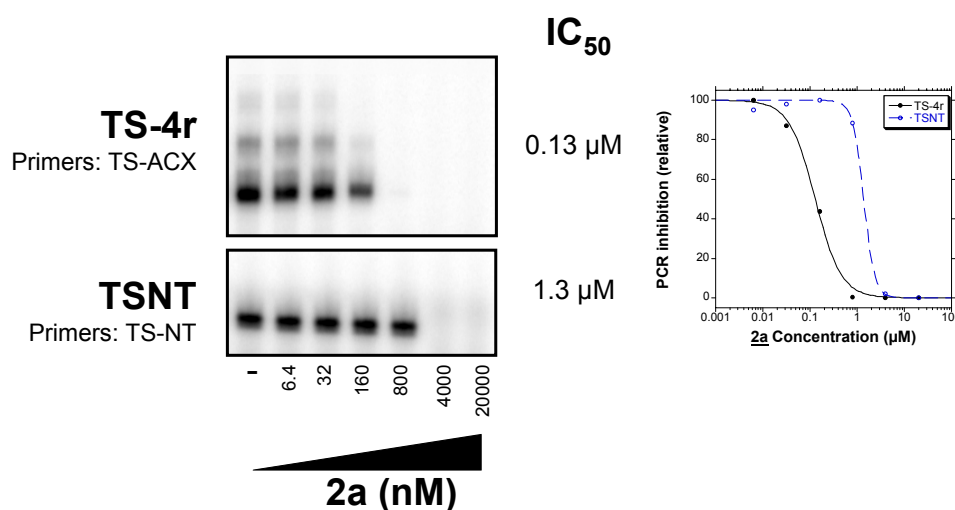
The TRAP reaction was performed in a 20 mM Tris HCl pH 8.3 buffer containing 63 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.005% Tween 20, 0.1mg/ml BSA, 50 μM dTTP, dGTP and dATP, 5 μM dCTP, and the oligonucleotides TS (5'- AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') (0.4 μM), ACX (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3') (0.4 μM), NT (5'-ATCGTTCTCGGCCTTT-3') (0.4 μM) and TSNT (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3') (20 fM), 2 units of Taq polymerase, 0.02 mCi/mL of [α^{32} P]-dCTP, 200 ng of A431 CHAPS extracts. After telomerase elongation for 15 minutes at 30°C, 28 cycles of PCR were performed (94°C

30 sec., 50°C 30 sec. and 72°C for 90 sec.). Telomerase extension products were then analysed on a denaturing 7.5 % polyacrylamide, 7M urea 1X Tris Borate EDTA (TBE) vertical gel and exposed to a phosphorimager screen. Extension products were quantified using ImageQuant 5.2 software and normalized to the signal of the extension products without compound.

PCR inhibition on a G4-prone motif:

The PCR control included in a TRAP assay (the so-called ITAS band) is very often used for quadruplex ligands. It demonstrates that the compounds do not interfere with the amplification of a control sequence that is unrelated to the human telomeric motif. However, the observation that the TRAP band is unaffected does **NOT** demonstrate that the disappearance of the telomeric ladder is the result of a *bona fide* telomerase inhibition. This effect could simply be the result of an inhibition of the amplification of a quadruplex-prone sequence. Binding of a molecule to a quadruplex sequence could well inhibit PCR, as previously shown by Lemarteleur et al. (BBRC, 2004). In order to deconvolute a true telomerase inhibition from a telomeric amplification inhibition, we performed a PCR assay. In this test, we designed the TS-4r sequence, that mimics a telomerase product containing 4 telomeric motif. No telomerase / cellular extract is added, and we simply compare the PCR amplification of the traditional ITAS (TSNT) sequence with the amplification of this G4-prone sequence.

As shown in the next figure, the TS-4r band disappears at a ≈ 10 -fold lower concentration, demonstrating that the PCR amplification of the telomeric motif is selectively affected by compound 2a, with an IC_{50} relatively close to the IC_{50} found in the TRAP assay (especially when comparing the first band of telomerase extension products which corresponds to the addition of 2-4 repeats).



Left: Analysis of PCR products on a gel in the presence of increasing concentrations of compound 2a. *Upper part:* Amplification of a sequence mimicking four repeats of the human telomeric sequence (TS-4r). *Lower part:* Amplification of the TSNT control sequence. The TS-4r sequence is quadruplex-prone, while the TSNT oligonucleotide is unable to form a quadruplex.

Right: Quantitation of the PCR products. The TS-4r band (black) disappears at a lower drug concentration than the TSNT band (in blue).

PCR protocol:

The PCR was performed in the same conditions than TRAP reaction (20 mM Tris HCl pH 8.3 buffer containing 63 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.005% Tween 20, 0.1mg/ml BSA, 50 μ M dTTP, dGTP and dATP, 5 μ M dCTP, the forward primer TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') (0.4 μ M), and the reverse primers ACX (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3') (0.4 μ M) or NT (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3') (0.4 μ M), 2 units of Taq polymerase and 0.02 mCi/mL of [α ³²P]-dCTP. The DNA template was either TS-4r (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3') (20 fM) or TSNT (5'-ATTCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3') (20 fM). 28 cycles of PCR were performed (94°C 30 sec., 50°C 30 sec. and 72°C for 90 sec.) in the presence of increasing concentrations of compound **2a**. PCR products were then analysed on a denaturing 7.5 % polyacrylamide, 7M urea 1X Tris Borate EDTA (TBE) vertical gel and exposed to a phosphorimager screen. Extension products were quantified using ImageQuant 5.2 software and normalized to the signal of the PCR products without compound.

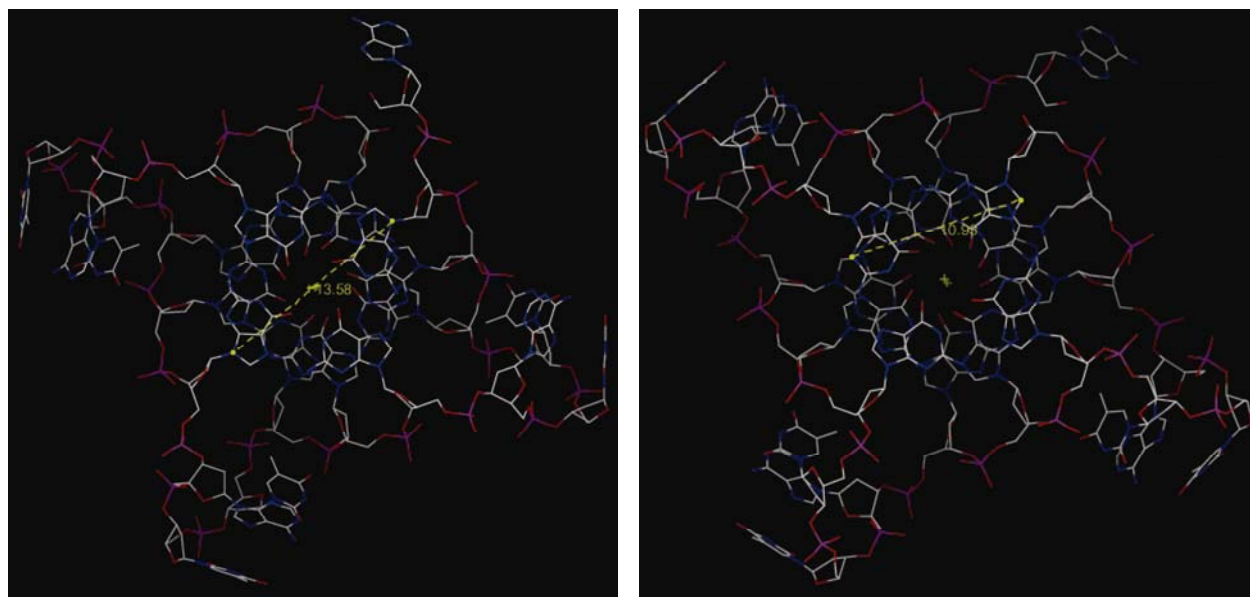
S12- Dimension & Estimated overlap with quartet:

Data collected form **RCSB Protein Data Bank**

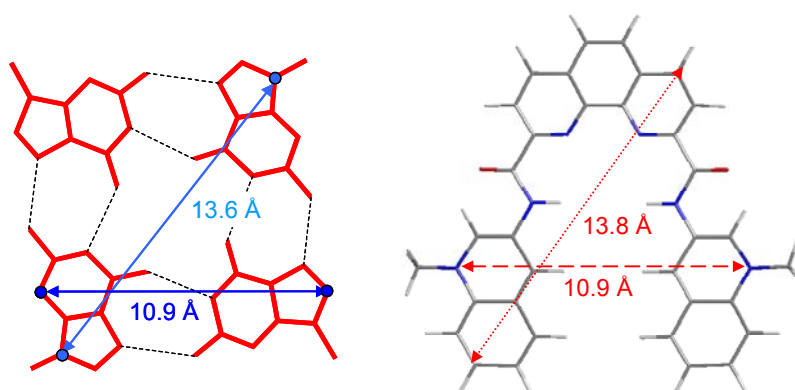
From Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. *Nature*, **2002**, *417*, 876.

Available free of charge at: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1KF1>

ID: **1KF1** (intramolecular quadruplex ('22-mer'): (d[AG₃(T₂AG₃)₃])) - distances evaluated with *WebMol Viewer*



Dimensions & comparison with **2a**:



Molecular lengths evaluated after molecular mechanics calculations (MM2, with *Chem3D Ultra 8.0*, CambridgeSoft Corp., MA, USA)

4.2 Commentaires sur les informations supplémentaires disponibles en ligne, et résultats complémentaires

4.2.1 Compétition par [TG₅T]₄ (Supp. Info S9)

La stœchiométrie 2 : 1 que nous avons montrée en titration sur le composé **2a**, suggère un empilement sur les G-quartets terminaux du G-quadruplexe formé par la séquence 22AG. Afin de soutenir cette hypothèse nous avons réalisé une compétition en test de dénaturation thermique suivie en fluorescence avec le G-quadruplexe tétramoléculaire parallèle [TG₅T]₄.

On constate que la compétition avec le G-quadruplexe est très efficace comparée à celle qui a été réalisée avec le compétiteur double brin confirmant une forte affinité pour les structures en G-quadruplexe, et une possible interaction par empilement avec les quartets terminaux comme suggérée par les calculs de modélisation et la titration. La compétition semble également plus efficace que pour les ligands macrocycliques capuchonnés par une aminoglycoside avec une baisse de stabilisation pouvant atteindre -76% à 1 μ M en [TG₅T]₄ pour le ligand **2b**, contre un maximum de -40% pour le composé **9** de la série des dérivés de néomycine.

Les résultats suggèrent néanmoins des petites différences de comportements entre les différents ligands. En particulier les ligands **2a** et **1a** semblent moins sensibles à la compétition avec le quadruplexe tétramoléculaire parallèle. Au regard des résultats obtenus en dichroïsme circulaire pour le composé **2a**, certes un empilement sur les quartets terminaux est probable, néanmoins, une stabilisation du complexe par interaction du ligand avec des bases présentes dans les boucles peut aussi être envisagée.

Nous avons également essayé de tester l'interaction du composé **2b** sur le G-quadruplexes télomérique en dichroïsme circulaire, mais nous n'avons pas observé de signal CD induit. L'absence d'interaction entre ce ligand et le G-quadruplexe semble peu probable étant donné les stabilisations observées. L'absence de signal CD induit dans le visible/proche-UV semble davantage en accord avec une interaction d'empilement sur les quartets. En effet, ce type d'interaction n'est pas toujours accompagné d'un signal CD induit d'amplitude importante, contrairement à une interaction dans les sillons [295]. La compétition importante observée avec le G-quadruplexe tétramoléculaire semble confirmer cette hypothèse.

Il est donc envisageable que le déplacement des N-méthyles dans les groupements quinolinium (séries **a** et **b**) puisse moduler finement les interactions avec le G-quadruplexe, probablement par encombrement stérique ou interaction de type π - π au niveau des bases présentes dans les boucles. On notera en particulier que le composé **2b** présente des transitions plus complexes en dénaturation thermique qui pourraient être la conséquence de ces légères différences dans le mode

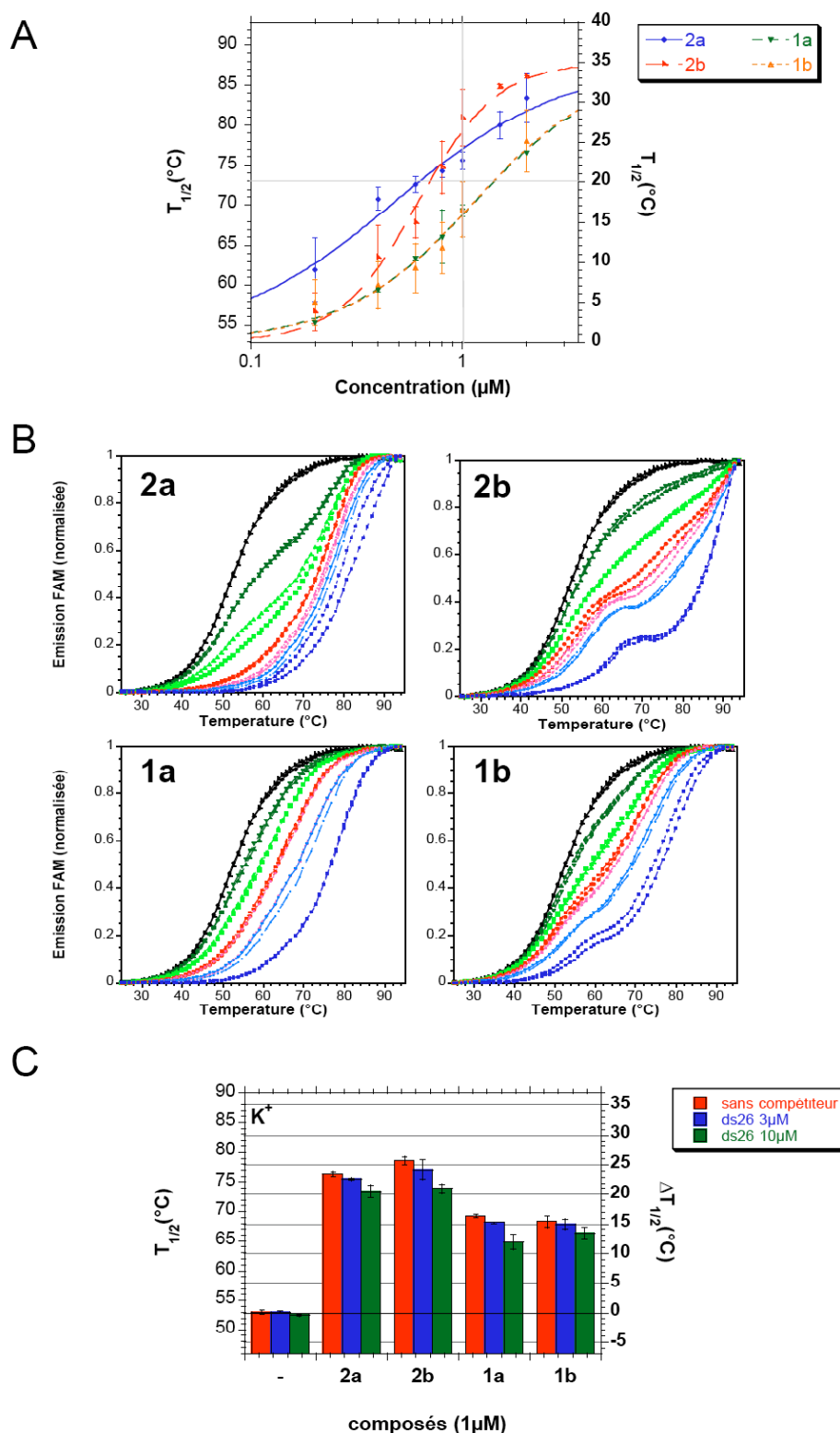


Figure 29 : Stabilisation du G-quadruplexe télomérique humain en conditions K^+ par les composés bisquinolinium :

(A) Effet de la concentration de composés sur la stabilisation (axe gauche $T_{1/2}$, axe de droite $\Delta T_{1/2}$) et (B) courbes normalisées correspondantes (noir : sans composé, vert foncé : 0,2 μM , vert clair : 0,4 μM , rouge : 0,6 μM , rose : 0,8 μM , bleu clair : 1 μM , bleu foncé : 1,5 μM (2a et 2b) ou 2 μM (1a et 1b)). (C) Effet de l'ajout du compétiteur double-brin (ds26) à 3 et 10 μM sur la stabilisation obtenue par ajout de 1 μM de composé en conditions K^+ (10 mM Lithium cacodylate pH 7,2, KCl 10 mM, LiCl 90 mM, F21T 0,2 μM).

d'interaction. Il serait intéressant de pouvoir confirmer ces observations par des techniques plus résolutive comme la RMN ou la cristallographie.

4.2.2 Test FRET en présence de K⁺

Nous avons complété l'étude réalisée en conditions Na⁺ (100 mM), dans l'**article 3**, en testant les stabilisations obtenues dans les conditions K⁺ (KCl 10 mM, LiCl 90 mM), en test de dénaturation thermique suivie en fluorescence. Les résultats de stabilisation en fonction de la concentration et de sélectivité par rapport au duplexe ds26 sont présentés dans la Figure 29.

Les stabilisations obtenues sont légèrement inférieures mais restent assez proches de celles que nous avons mesurées en conditions Na⁺, avec des concentrations permettant d'atteindre un $\Delta T_{1/2}$ de +20°C de 0,6 μ M pour **2a**, 0,7 μ M pour **2b**, et 1,4 μ M pour **1a** et **1b** (Figure 29A). La sélectivité est également conservée (Figure 29C). Ces données confirment l'affinité et la remarquable sélectivité de ces ligands indépendamment des conditions employées.

4.2.3 Titration de 22AG par 2a en présence de K⁺ (Suppl. Info S8)

Nous avons également réalisé la titration par **2a** du G-quadruplexe formé par la séquence télomérique humaine en présence de potassium. Il est intéressant de constater que l'ajout progressif de **2a** au repliement obtenu en K⁺ induit ce qui ressemble à un changement de conformation. On constate une diminution du signal à 262 nm et une augmentation du signal à 295 nm correspondant à un repliement du G-quadruplexe dit de type "antiparallèle". Néanmoins, la saturation n'est pas atteinte même après avoir ajouté plus de 5 équivalents de ligand. De plus le chauffage et le refroidissement de l'échantillon ne permettent pas d'obtenir la même conformation. Ces résultats suggèrent que la conformation induite par le ligand ne correspond pas à la conformation obtenue à l'équilibre thermodynamique. Une interprétation quantitative de la courbe de titration est donc inenvisageable.

De tels changements de conformation ont par ailleurs été constatés avec d'autres ligands. Certains induisent de façon similaire une conformation dite "antiparallèle", c'est le cas de la **télomestatine** [289], d'un dérivé de porphyrazine **3,4-TMPyPz** [318] et récemment de macrocycles oligoamides [319]. D'autres ligands induisent une augmentation de signal à 260 nm, davantage caractéristique d'une forme dite "parallèle" : c'est le cas du carbazole **BMVC** [320], d'un diéthylènetriamine anthracène [321] et d'une phtalocyanine de zinc [322]. Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux présentés dans la littérature, nous avons également mené cette expérience avec d'autres ligands que nous avons à notre disposition : la **télomestatine** (comme

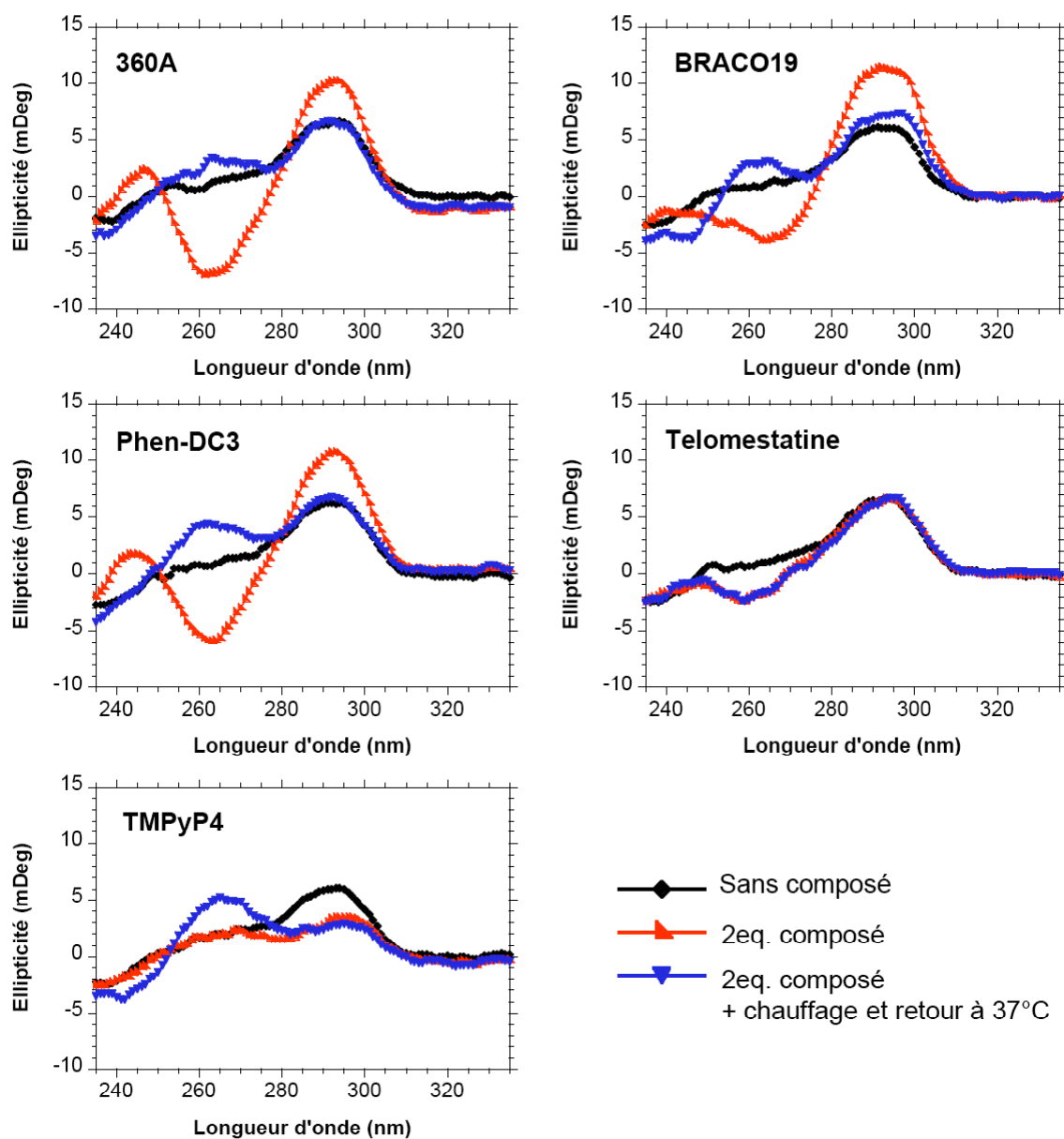


Figure 30 : Effets de quelques ligands sur la conformation du G-quadruplexe en présence de potassium.

Effet des ligands 360A, BRACO19, Phen-DC3, Télomestatine et TMPyP4. Les spectres de dichroïsme circulaire de l'oligonucléotide 22AG (3 μ M) sont mesurés à 37°C dans des cuves de 1 cm de parcours optique, après dénaturation de l'oligonucléotide pendant 5 minutes à 90°C dans le tampon Li Cacodylate 10 mM, pH 7,2 KCl 100 mM, en absence (courbes noires) ou présence de 6 μ M de ligand (courbes rouges et bleues). Les courbes bleues sont mesurées après une nouvelle étape de dénaturation à 90°C (5 minutes) et renaturation à 37°C en présence de 2 équivalents de composé.

référence), **360A**, **BRACO19**, **TMPyP4** et le composé **2a** (que nous appellerons aussi **Phen-DC3**). Les résultats sont présentés Figure 30. La courbe noire présente la forme caractéristique obtenue en présence de potassium correspondant probablement à un mélange de structures (“parallèle”, “antiparallèle”, et “hybride”) (cf. : VII.2.2.3) [173, 289]. Comme pour **Phen-DC3**, l’ajout des ligands, **360A** et **BRACO19** a pour conséquence une augmentation du signal CD à 295 nm et une diminution à 262 nm, qui correspondrait à l’apparition préférentielle d’une forme de type “antiparallèle”. Ceci suggère, en outre, une préférence de ces ligands pour cette conformation, qui pourrait être expliquée par des interactions avec les bases présentes dans les boucles, ou des affinités différentes pour des quartets formés par des enchaînements différents de guanines en *syn* et/ou *anti*. Les comportements de la **télomestatine** et de **TMPyP4** sont légèrement différents, n’affectant que les signaux à 260 ou 295 nm respectivement. La forme des spectres obtenus avec la **télomestatine** serait également en accord avec l’enrichissement en forme “antiparallèle” du G-quadruplexe comme décrite précédemment [289]. Celle-ci s’effectue néanmoins de façon moins prononcée que pour les ligands **360A**, **BRACO19** ou **Phen-DC3**.

Il est néanmoins difficile à partir des seules données de dichroïsme circulaire de déduire les conformations de G-quadruplexe effectivement fixées préférentiellement par ces ligands. En outre, la forme du spectre CD, que nous nommons abusivement “antiparallèle”, “parallèle” ou “mixte” ne permet pas de conclure sur l’orientation des boucles ou l’arrangement *syn/anti* des guanines au sein du quartet. De plus, le fait que la plupart des courbes obtenues après dénaturation en présence des ligands (courbes bleues) ne soit pas superposable aux spectres mesurées avant chauffage (courbes rouges), suggère qu’un blocage cinétique existe entre les formes induites dans ces conditions et les conformations obtenues à l’équilibre thermodynamique. Dans un contexte biologique, il sera donc difficile de conclure quant à la forme préférentiellement induite ou fixée, d’autant plus que l’encombrement nucléaire est susceptible de modifier significativement la conformation du G-quadruplexe [323].

D’autre part, ces résultats sont assez surprenants compte tenu des stabilisations en test FRET qui ont été observées pour ces ligands en présence de potassium, et qui sont généralement plus importantes (Figure 28). Ces données suggéraient notamment une préférence pour la forme “hybride” ou “parallèle”. Une hypothèse permettant d’expliquer ces différences consiste en des conformations significativement différentes de 22AG et de l’oligonucléotide fluorescent F21T qui modulent également les affinités respectives des ligands.

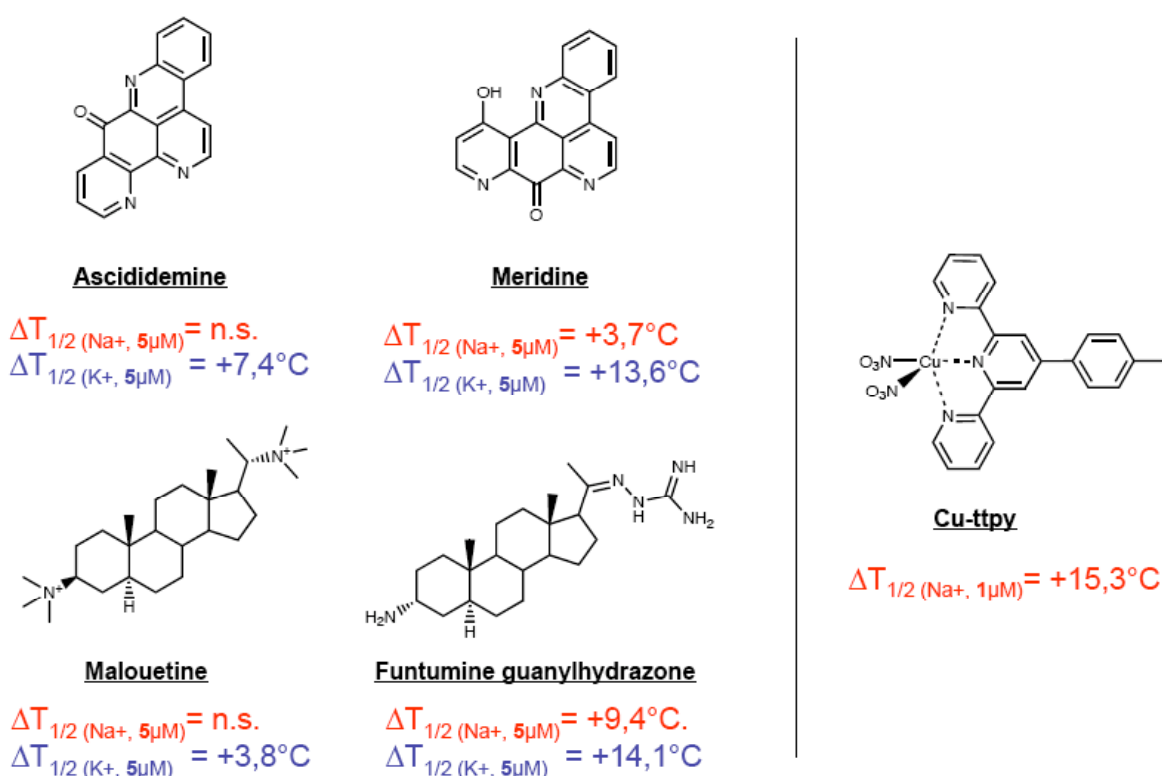


Figure 31 : Stabilisations du G-quadruplexe F21T par des ligands aux structures chimiques variées :

Les $\Delta T_{1/2}$ ont été obtenus dans les conditions Na^+ (Li cacodylate 10 mM, pH 7,2, NaCl 100 mM) en rouge ou K^+ (Li cacodylate 10 mM, pH 7,2, KCl 10 mM, LiCl 90 mM) en présence de 1 ou 5 μM de composés. L'ascididémine et la méridine ont été caractérisés dans l'article [317], la malouétine et la funtumine guanylylhydrazone dans l'article [324] et le composé métallique Cu-tppy dans l'article [325]. Notons que les données présentées dans l'article [317] ont été obtenues avec l'oligonucléotide F21D (fluorophores FAM et DABCYL) ; par soucis de comparaison nous présentons ici les valeurs obtenues avec F21T (fluorophores FAM et TAMRA). Des concentrations plus importantes en ligand sont nécessaires pour observer des stabilisations satisfaisantes avec les composés présentés sur la gauche de la figure, démontrant leur plus faible affinité pour les G-quadruplexes. On remarquera également que les stabilisations en conditions, potassium sont à nouveau bien plus importantes qu'en présence de sodium. n.s. signifie non stabilisant ($\Delta T_{1/2} \approx 0^\circ\text{C}$).

5 Discussion : Chapitre II

Le développement d'une méthode simple et économique permettant de tester des composés et des conditions variés en parallèle, nous a permis de mettre en évidence plusieurs nouvelles familles de composés liant les G-quadruplexes, dont deux séries sont présentées dans ce chapitre.

Les autres familles de composés identifiées par cette méthode possèdent des affinités plus modérées, mais sont également intéressantes en raison de leurs structures chimiques très variées. Parmi ces composés, on trouve des composés naturels, pentacycliques aromatiques proches de la structure du composé synthétique **RHPS4** (cf. : § I.3.3.1.1), comme la **méridine** et l'**ascididémine** [317], mais également des dérivés de stéroïdes comme la **malouétine** ou la **funtumine guanylhyazone (FG)** [324](Figure 31). Ce dernier composé, dont la structure est pourtant *a priori* peu propice à interagir avec les G-quadruplexes, en tout cas par empilement de type π sur les G-quartets terminaux, présente des effets cellulaires associés à un phénotype télomérique particulièrement intéressants. En effet, le composé **FG** induit un raccourcissement des télomères des cellules HT1080 après 8 jours de traitement à 0,7 μ M ou 20 jours de traitement à 0,3 μ M. Celui-ci est accompagné d'un arrêt de prolifération, d'une entrée en sénescence des cellules caractérisée par une activité β -galactosidase associée à la sénescence, d'une réduction du signal d'hybridation sur l'extrémité 3' télomérique et la présence en anaphase de ponts entre chromosomes. Toutes ces caractéristiques montrent que ce composé est actif au niveau des télomères, malgré une affinité qui reste modérée pour les G-quadruplexes, comparée à d'autres composés connus, comme la **télomestatine**. Une hypothèse permettant d'expliquer l'écart important existant entre les activités cellulaires et l'affinité *in vitro* de ces composés, consiste en une meilleure pénétration et/ou distribution cellulaire, en raison de la nature stéroïdienne de ces molécules. Une étude approfondie sur le type d'interactions de ces composés avec les G-quadruplexes devrait permettre de rationaliser le développement de nouveaux ligands stéroïdiens de G-quadruplexes. En effet, une nouvelle approche par dérivatisation de cette structure inhabituelle de ligand semble prometteuse, puisqu'il paraît possible d'améliorer les propriétés d'affinité *in vitro* pour les G-quadruplexes et l'activité aux télomères de ces composés tout en exploitant les propriétés pharmacologiques de ces stéroïdes.

Un autre composé identifié par la méthode de dénaturation suivie en FRET est le dérivé organométallique **Cu-ttpp** (Figure 31, droite) [325]. Ce ligand présente une bien meilleure affinité pour le G-quadruplexe formé par la séquence télomérique humaine que les composés naturels

présentés précédemment. En outre, sa sélectivité vis-à-vis d'un duplexe d'ADN est importante, et peut être expliquée par la structure cristallographique du composé, qui comporte une face plane pouvant s'empiler sur un G-quartet terminal, et un ligand nitrate du cuivre apical, qui doit limiter l'intercalation du composé terpyridine dans un duplexe d'ADN. La charge positive apportée par le métal permet d'augmenter la charge du ligand, tout en limitant les interactions électrostatiques qui diminueraient la sélectivité du composé vis-à-vis du G-quadruplexe. D'autres études pour caractériser l'affinité et le mode de fixation de ce composé sont à mener mais, la facilité de synthèse chimique et la sélectivité de ce type de composés organométalliques semblent prometteuses. En outre, nous n'avons pas eu l'occasion de tester ce ligand en présence de potassium. Il serait intéressant de voir si le ligand nitrate du cuivre se situant hors du plan formé par la terpyridine peut interagir avec les boucles du G-quadruplexe, et si la nature des conditions ioniques modifie l'affinité de la molécule pour le G-quadruplexe, comme nous avons pu le constater jusqu'à présent.

Cette méthode est également utilisée par d'autres groupes, comme celui de Stephen Neidle ou de Shankar Balasubramanian. Comme nous l'avons mis en évidence dans l'**article 1** et dans les résultats complémentaires obtenus sur des ligands connus (Figure 28), les stabilisations obtenues peuvent être extrêmement dépendantes des conditions ioniques du test, de la méthode de détermination, de la nature et de la concentration de l'oligonucléotide fluorescent et peut-être même de la machine servant à la mesure (hypothèse que nous n'avons néanmoins pas testée). Ces variations inter-laboratoires ne permettent pas de comparer facilement les résultats obtenus par les différents groupes, et l'utilisation d'un ligand de référence s'impose pour évaluer les affinités respectives des divers ligands. De plus, l'estimation de la sélectivité n'est pas effectuée de la même façon dans les différents groupes, compliquant encore davantage les comparaisons. En effet, nous avons choisi d'effectuer des compétitions avec d'autres structures en gardant l'oligonucléotide fluorescent F21T, ce qui nous permet de rester dans des conditions ioniques identiques et de tester diverses structures d'ADN (simple-brin, duplexe, quadruplexe intra ou intermoléculaire) possédant des stabilités suffisantes ($T_m > 70^\circ\text{C}$). Une autre possibilité consiste en l'utilisation d'un oligonucléotide fluorescent, et l'étude de la stabilisation de ces structures en présence de ligand. Néanmoins les différences de stabilisation que nous avons pu observer en changeant simplement les fluorophores sur une même séquence, indiquent qu'il est nécessaire de rester prudent quant à la comparaison des valeurs de stabilisation lorsque l'oligonucléotide fluorescent est modifié. Nous avons toutefois eu l'occasion de tester en compétition avec ds26 des composés du groupe de Stephen Neidle (Figure 32) dont la sélectivité avait été évaluée par stabilisation d'un duplexe fluorescent.

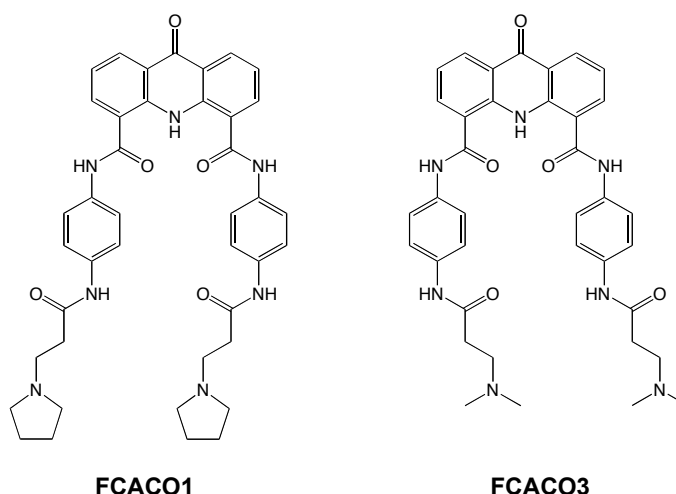


Figure 32 : Structure des dérivés d'acridone synthétisés par Francisco Cuenca dans le groupe de S. Neidle.

Composé	Conditions ioniques	$C_{\Delta T=20^{\circ}\text{C}} \text{ G4}$ (μM)	$\Delta T_{1/2(1\mu\text{M})} \text{ G4}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta T_{1/2(1\mu\text{M})} \text{ G4} + \text{ds26 } 10\mu\text{M}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta T_{1/2(1\mu\text{M})} \text{ G4}^*$ ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta T_{1/2(1\mu\text{M})} \text{ dx}^*$ ($^{\circ}\text{C}$)
FCACO1	Na^+	2,2	14,0	14,0	-	-
	K^+	2,2	12,9	12,0	34	2,5
FCACO3	Na^+	1,8	15,4	14,0	-	-
	K^+	2,1	12,7	11,5	32	2,5

Table 6 : Résultats d'expériences de dénaturation thermique suivies en FRET obtenus dans nos conditions (colonnes 3-5) et par le groupe de S. Neidle (colonnes 6 et 7)

Conditions Na^+ : 100 mM NaCl, 10 mM Li Cacodylate pH 7,2.

Conditions K^+ : 10 mM KCl, 90 mM LiCl, 10 mM Li Cacodylate pH 7,2. *Conditions ioniques : 50 mM K Cacodylate pH 7,4. G4 : Fam-d(GGG(TTAGGG)₃)-Tamra ; dx : 3'-Fam-d(TATAGCTATA-HEG-TATAGCTATA)-Tamra-5' ; ds26 : d(CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG). (HEG : Hexéthylène glycol)

De façon rassurante, les résultats obtenus par les deux méthodes sont en très bon accord : une faible stabilisation du duplexe fluorescent (colonne 7, Table 6) et une très faible diminution de la stabilisation du G-quadruplexe F21T en présence de 10 μM de ds26 sont observées (colonnes 4 et 5, Table 6). En revanche, on remarque à nouveau d'importantes différences de stabilisations entre nos conditions ioniques et celles employées dans le groupe de S. Neidle, confirmant que les données de stabilisation obtenues par ce test ne sont pas comparables entre les différents groupes étudiant les ligands de G-quadruplexes.

Concernant les molécules présentées plus en détail dans ce chapitre, les tests FRET effectués sur les composés macrocycliques capuchonnés par une aminoglycoside (**article 2**) sont en très bon accord avec l'hypothèse de départ qui consistait en une interaction de la partie néomycine avec les boucles de G-quadruplexes. De plus, comparé à un ligand de même structure ne comportant pas cette partie néomycine, la sélectivité vis-à-vis d'un duplexe d'ADN est nettement améliorée. Néanmoins, confrontés aux résultats de sélectivité et d'affinité obtenus avec les composés bisquinolinium (**article 3**), des améliorations doivent encore être apportées à ces molécules. Elles induisent en particulier une inhibition du contrôle interne en test TRAP à des concentrations seulement 3 fois supérieures à l'inhibition des produits d'élongation par la télomérase. En comparaison, les composés **2a** et **2b**, qu'on appellera également dans la suite de ce manuscrit **Phen-DC3** et **Phen-DC6**, montrent une sélectivité environ 100 fois supérieure sur les produits pouvant former des G-quadruplexes par rapport au contrôle interne non-télomérique. Ce manque de sélectivité peut en partie être expliqué par la charge importante de la partie sucrée capuchonnant ces composés. En effet, les fonctions amines de la partie aminoglycoside possèdent des pKa compris entre 5,7 et 8,1, conduisant la molécule **11** à posséder une charge globale d'environ + 4 à pH physiologique. Le potentiel électrostatique de cette partie de la molécule peut donc contribuer à l'interaction du ligand avec d'autres acides nucléiques, simple-brin en particulier (amorces de PCR, matrice TSNT). De plus, une interaction de la molécule avec la Taq polymérase peut également être envisagée.

Au sujet des composés bisquinolinium phénanthrolines et bipyridines, le remplacement de la pyridine centrale sur les composés initiaux dicarboxamides comme **360A**, laissait présager d'intéressantes perspectives. En effet, les molécules 1,10-phénanthrolines et 2,2'-bipyridines, sont connues pour leur capacité à lier le cuivre (I) et à induire des coupures dans l'ADN double-brin par un mécanisme d'oxydation de l'ADN [326]. Ainsi, la découverte de molécules très affines et sélectives pour les G-quadruplexes possédant potentiellement de telles propriétés, laissait entrevoir la possibilité de développer des molécules jouant le rôle de nucléases artificielles spécifiques des G-quadruplexes, dont l'action au niveau des télomères aurait été d'autant plus efficace. Nous avons donc mené des expériences sur des oligonucléotides formant des G-quadruplexes en présence de Cu(II) dans un milieu réducteur en présence de cette famille de composés. Malheureusement, contrairement à la **1,10-phénanthroline** libre, aucune coupure particulière d'ADN n'a pu être mise en évidence avec ces composés. Il est vraisemblable que l'encombrement engendré par les 2 groupements N-méthylquinolinium latéraux limite le potentiel de chélation du cuivre par la phénanthroline (ou par la bipyridine), altérant ainsi leurs propriétés de coupure. Nous n'avons pas eu l'occasion de tester le composé **Cu-ttpty** dans ce test de coupure,

mais la présence du cuivre déjà chélaté par le ligand pourrait permettre une meilleure activité de coupure de l'ADN.

Enfin, en raison des faibles quantités de composé dont nous disposions, nous n'avons pas pu étudier la cytotoxicité des dérivés de néomycine sur des cellules humaines cancéreuses. En revanche des essais préliminaires ont été réalisés sur des cellules HeLa avec le composé **Phen-DC3**. Leur survie à court terme (72h) en présence de concentrations variées de composés a montré que le ligand était faiblement cytotoxique à court terme avec une CE_{50} supérieure à 5 μ M sur ces cellules. Des tests de prolifération à plus long terme, à des concentrations subcytotoxiques de l'ordre de 1-5 μ M, doivent désormais être entrepris, avec une analyse en parallèle de l'effet du traitement sur l'hybridation du simple brin télomérique, la longueur des télomères, l'entrée éventuelle des cellules en sénescence et la présence de cellules en division présentant des ponts chromosomiques entre anaphases.

Chapitre III. Étude du mécanisme de stabilisation des ligands

1 Introduction

Nous avons mentionné dans l'introduction générale de ce manuscrit que, même si l'existence de séquences pouvant former des G-quadruplexes à des sites-clés du génome semble soutenir leur rôle dynamique au sein de la cellule, l'existence de G-quadruplexes *in vivo* n'a pas été formellement démontrée dans les cellules humaines. Il est pourtant difficile d'ignorer les effets cellulaires, télomériques en particulier, de certains ligands sélectifs de ces structures. Une question légitime est de savoir si ces ligands sont susceptibles d'induire activement ces structures d'un point de vue cinétique, ou s'ils se contentent de lier des structures préformées, existant déjà dans la cellule. Le mécanisme de stabilisation des ligands pourrait donc avoir des implications pour leurs effets *in vivo*.

Il est difficile de répondre sans ambiguïté à cette question sur un G-quadruplexe intramoléculaire. En effet, les cinétiques d'association et de dissociation sont rapides, et même avec de systèmes de type "stopped flow", l'accès aux constantes cinétiques est difficile, dans la mesure où les processus d'ouverture et de fermeture sont complexes et ne conduisent pas à des cinétiques monoexponentielles [33]. La stabilisation observée en courbes de dénaturation thermique peut donc résulter de la diminution de la dissociation du G-quadruplexe par le ligand (stabilisation de structures préformées), ou de l'augmentation de la réassociation en G-quadruplexe (accélération de la formation de la structure).

Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle plus facilement exploitable pour l'étude cinétique : il s'agit des G-quadruplexes tétramoléculaires parallèles formés par de courtes séquences d'ADN, du type d(TG_nT). L'inertie de ces structures permet l'étude séparée de l'association et de la dissociation, que nous détaillerons dans le paragraphe suivant.

Nous avons donc utilisé ces structures pour étudier en gels d'électrophorèse l'induction de structures tétramoléculaires par divers ligands introduits précédemment, et en particulier le ligand pyridodicarboxamide **360A**.

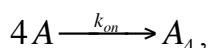
2 **Cinétiques de G-quadruplexes tétramoléculaires**

Les G-quadruplexes tétramoléculaires parallèles sont des structures particulièrement inertes du point de vue cinétique. Une fois formées, elles peuvent être extrêmement difficiles à dissocier. L'ajout d'hydroxydes est d'ailleurs quelques fois nécessaire pour rompre le complexe ; c'est en particulier le cas pour des séquences présentant des blocs de 6 guanines consécutives [80, 327]. D'autre part la formation de ces structures à partir de simple-brins est très dépendante de la concentration.

En 1996, Wyatt *et al* ont étudié par chromatographie d'exclusion les cinétiques d'association et de dissociation du G-quadruplexe tétramoléculaire (phosphorothioate ou phosphodiester) formé par la séquence d(TTGGGGTT). Ils ont montré que la cinétique d'association était d'ordre 4 en simple brin, et que la cinétique de dissociation du G-quadruplexe suivait un ordre 1 [328]. En 2005, nous avons réalisé l'étude cinétique d'un grand nombre de courtes séquences d'acides nucléiques en utilisant la spectroscopie d'absorbance ([329] et annexe I). En effet, l'inertie cinétique de ces structures permet d'étudier l'association et la dissociation de façon indépendante, et de déterminer ainsi les constantes cinétiques d'association et de dissociation k_{on} et k_{off} .

2.1 **Association de G-quadruplexes tétramoléculaires**

Généralement, en se plaçant à forte concentration et basse température, une fois formés la demi-vie des complexes est suffisamment importante pour pouvoir négliger la dissociation pendant la durée de l'expérience. Il est alors possible d'étudier la réaction "irréversible" :



où A correspond à la forme simple brin et A_4 à la forme en G-quadruplexe et k_{on} , la constante cinétique d'association.

La vitesse de la réaction v_{on} est alors définie par l'équation :

$$v_{on} = k_{on}[A]^n = -\frac{d[A]}{dt} \quad (2),$$

avec n , l'ordre cinétique de la réaction, $[A]$ la concentration en simple-brin libre et t le temps. L'ordre de la réaction ne reflète pas obligatoirement la moléularité de la réaction. Dans le cas des G-quadruplexes tétramoléculaires, le modèle permettant de s'adapter aux mieux aux courbes expérimentales présente un ordre n généralement égal à 4, mais il peut être légèrement inférieur [329].

⁽²⁾ Notons que les vitesses ainsi décrites correspondent en réalité aux réactions $A \rightarrow \frac{1}{4}A_4$ et $\frac{1}{4}A_4 \rightarrow A$. Nous avons choisi cette définition par cohérence avec les résultats publiés par Wyatt *et al* [328].

En définissant la fraction d'oligonucléotide non appariée $\alpha(t)$ au cours du temps :

$$\alpha(t) = \frac{[A](t)}{C_0}$$

avec C_0 , la concentration initiale en simple-brin, l'équation de vitesse s'écrit :

$$\frac{d\alpha(t)}{(\alpha(t))^n} = -k_{on} C_0^{n-1} dt$$

La résolution de l'équation différentielle permet de décrire l'évolution de $\alpha(t)$:

$$\alpha(t) = \sqrt[n]{1 + C_0^{(n-1)}(n-1)k_{on}t} \quad (A)$$

d'où

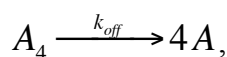
$$k_{on} = \frac{(\alpha(t))^{1-n} - 1}{C_0^{n-1}(n-1)t}$$

Pour un ordre 4, le k_{on} est défini en $M^{-3}.s^{-1}$ ⁽³⁾. En pratique, l'ensemble des points expérimentaux d'une expérience de cinétique isotherme sera ajusté par une courbe selon l'équation (A). Dans la plupart des cas, on considère que l'ordre de la réaction est de 4 et que k_{on} est flottant.

2.2 Dissociation de G-quadruplexes tétramoléculaires

D'autre part, dans des conditions diluées (de l'ordre du μM en brin) et à des températures plus élevées, pendant une expérience de dénaturation thermique par exemple, la demi-vie de réassociation du complexe est suffisamment longue pour pouvoir négliger la réassociation au cours de l'expérience. Il est nécessaire de souligner que la courbe de dénaturation thermique que l'on obtient à partir de G-quadruplexes tétramoléculaire n'est pas représentative des espèces présentes à l'équilibre thermodynamique : on parlera donc de $T_{1/2}$ et non de T_m . Ceci peut être démontré par une indépendance de la température de demi-dissociation avec la concentration, ce qui n'est pas le cas habituellement pour une réaction intermoléculaire.

Il est donc possible d'étudier la réaction "irréversible"



où A correspond à la forme simple brin et A_4 à la forme en G-quadruplexe et k_{off} , la constante cinétique de dissociation.

La vitesse de la réaction v_{off} est alors définie par l'équation :

$$v_{off} = k_{off}[A_4] = -4 \frac{d[A_4]}{dt} \quad (2),$$

⁽³⁾ Notons que les valeurs numériques obtenues ne peuvent être comparées à des constantes de vitesse d'association de duplexes exprimées en $M^{-1}.s^{-1}$

avec $[A_4]$ la concentration en G-quadruplexe et t le temps. L'ordre de la réaction est 1.

En exprimant $[A_4](t)$ en fonction de la fraction d'oligonucléotide non appariée $\alpha(t)$ on obtient:

$$\frac{d\alpha(t)}{dt} = k_{off} \frac{1 - \alpha(t)}{4}$$

En résolvant l'équation différentielle, on obtient l'évolution exponentielle de la fraction $\alpha(t)$ en fonction du k_{off} et du temps. Le k_{off} d'ordre 1 est exprimé en s^{-1} .

Mais la fraction d'oligonucléotide non appariée $\alpha(T)$ peut également être déterminée à partir des courbes de dénaturations thermiques, en traçant les lignes de bases comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes et dans la référence [330]. Il est alors possible de déterminer le k_{off} à chaque température de la transition par l'équation :

$$k_{off}(T) = \frac{4}{1 - \alpha(T)} \cdot \frac{\partial \alpha(T)}{\partial T} \cdot \frac{\partial T}{\partial t},$$

avec $\frac{\partial T}{\partial t}$ le gradient de température ayant servi à réaliser la dénaturation thermique, expérimentalement compris entre 0,2 et 0,5 °C/min.

Pour réaliser une expérience de dénaturation thermique il est donc nécessaire de partir d'une structure préformée à haute concentration, et qui sera par la suite diluée pour l'expérience. On remarquera également que l'expression de α est bien indépendante de la concentration C_0 , comme démontré expérimentalement à partir des courbes de dénaturation thermique.

3 Article 4 : “Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation”. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) : 2483-2493.

A. De Cian, J-L Mergny.

Résumé en français:

Les G-quadruplexes sont une famille de structures d'ADN à 4 brins, stabilisées par des G-quartets, qui se forment en présence de cations monovalents. Actuellement de nombreux travaux tentent d'identifier de nouveaux ligands qui se lient sélectivement aux motifs en G-quadruplexes, car ces composés pourraient perturber la structure des télomères, les processus d'élongation et de réplifications aux télomères ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses. Les cinétiques d'interaction des quadruplexes avec les ligands sont peu comprises : il est difficile de savoir si les ligands de G-quadruplexes se lient et stabilisent des structures préformées (c'est-à-dire augmente la durée de vie de la structure en diminuant sa constante de dissociation k_{off}), or si ces molécules induisent activement la formation des complexes en agissant comme des chaperonnes de quadruplexes par augmentation de leurs constante d'association k_{on} . Nous avons étudié l'effet d'un ligand sélectif des G-quadruplexes, une bisquinolinium pyridine dicarboxamide appelée **360A**, afin de distinguer ces deux possibilités. Nous avons montré que, en plus d'une interaction et de la stabilisation de structure préformés, cette molécule est capable d'agir comme une chaperonne pour la formation de G-quadruplexes tétramoléculaires en augmentant leur k_{on} . Cette observation a des implications pour des applications des G-quadruplexes *in vitro* et *in vivo* et devrait être prise en considération pour l'évaluation des réponses cellulaires à ces agents.

Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation

Anne De Cian and Jean-Louis Mergny*

Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle USM 503, INSERM UR 565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France

Received December 22, 2006; Revised and Accepted February 3, 2007

ABSTRACT

G-quadruplexes are a family of four-stranded DNA structures, stabilized by G-quartets, that form in the presence of monovalent cations. Efforts are currently being made to identify ligands that selectively bind to G-quadruplex motifs as these compounds may interfere with the telomere structure, telomere elongation/replication and proliferation of cancer cells. The kinetics of quadruplex–ligands interactions are poorly understood: it is not clear whether quadruplex ligands lock into the preformed structure (i.e. increase the lifetime of the structure by lowering the dissociation constant, k_{off}) or whether ligands actively promote the formation of the complex and act as quadruplex chaperones by increasing the association constant, k_{on} . We studied the effect of a selective quadruplex ligand, a bisquinolinium pyridine dicarboxamide compound called 360A, to distinguish these two possibilities. We demonstrated that, in addition to binding to and locking into preformed quadruplexes, this molecule acted as a chaperone for tetramolecular complexes by acting on k_{on} . This observation has implications for *in vitro* and *in vivo* applications of quadruplexes and should be taken into account when evaluating the cellular responses to these agents.

INTRODUCTION

G-quadruplexes are a family of secondary nucleic acids structures stabilized by G-quartets that form in the presence of monovalent cations (1,2). The level of interest in these structures has recently increased due to hypotheses that G-quadruplex structures play roles in key biological processes (3–9) and recent demonstrations of their existence *in vivo* (10–12). G-quadruplexes may have applications in areas ranging from supramolecular

chemistry and bio- and nanotechnology (13–15) to medicinal chemistry [for recent reviews: (2,16,17)]. Efforts have been made to identify ligands that selectively bind to G-quadruplex motifs, as they may interfere with telomere structure, elongation and replication, oncogene expression and proliferation of cancer cells (18,19). These compounds may be of natural origin [such as cryptolepine (20), berberine (21) and telomestatin (22,23)] or synthetic [such as BSU1051 (18), RHPS4 (24), TMPyP4 (25), pyridine or phenanthroline dicarboxamides (26,27), triazines (28), PIPER (29,30) or bi- and trisubstituted acridines (31,32)]. It is important to understand the rules that govern the formation of G-quadruplexes and determine the stability and folding kinetics of the structures. Unfortunately, with a few notable exceptions (29), little is known concerning these parameters. Han *et al.* presented the first example of a small ligand (a perylene derivative, PIPER) that drives the assembly of bimolecular G-quadruplex structures (29). The presence of 10 μM PIPER accelerates the assembly of varied dimeric G-quadruplexes an estimated 100-fold (29). However, the analysis of the results was complicated by the existence of a number of different G-quadruplex structures, including dimeric and tetrameric species. Furthermore, the end product structure and molecularity were different in the presence and in the absence of the ligand, indicating that the molecule favors some conformers over the others and displaces the thermodynamic equilibria.

Parallel-stranded, tetramolecular quadruplexes (Figure 1A) offer a unique opportunity to study kinetic effects for several reasons. First, our understanding of their kinetic properties increased, thanks to the seminal work by Wyatt *et al.* that described the properties of simple short segments such as $\text{T}_2\text{G}_4\text{T}_2$ (33). More recently, we (34,35) and others (36) analyzed the kinetics of quadruplex formation with short sequences. From a kinetic point of view, the association reaction strongly depends on strand concentration with an experimentally determined order approaching four (33,34,36); an exception being the four-stranded structures formed by the

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 40 79 36 89; Fax: +33 1 40 79 37 05; Email: mergny@mnhn.fr

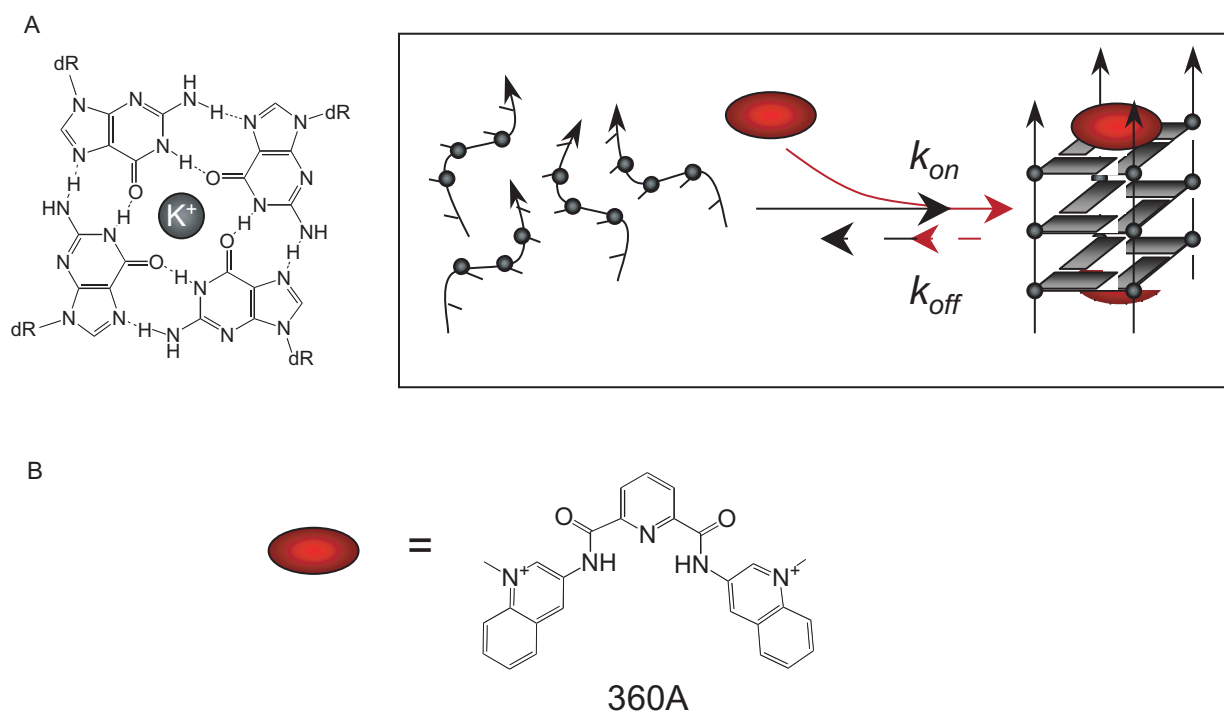


Figure 1. Quadruplexes and quadruplex ligands. **(A)** Schematic of a quadruplex (left) and tetramolecular G-quadruplex formation/dissociation (right). This scheme simply presents the initial and final states of the reaction studied here, and assumes terminal stacking of the ligand; it does not claim to reflect the pathway of association. Are quadruplex ligands (red ovals) simply able to lock the preformed structure (i.e. increase the lifetime of the structure by lowering its dissociation constant k_{off}), or do ligands actively promote the formation of the complex and act as quadruplex chaperones by increasing its association constant k_{on} ? **(B)** Formula of the quadruplex ligand 360A.

sugar-modified oligonucleotides known as locked nucleic acids (37). Second, the kinetic inertia of these complexes, rather than being a hindrance, facilitates the study of the uncoupling of the folding and unfolding phenomenon. One may deconvolute the effect of a parameter and determine whether this factor mainly affects association or dissociation—or both. We and others successfully used this property to analyze the effects of temperature, sequence, ionic strength, introduction of a modified backbone or modified quartet on the kinetics of G-quadruplex formation. Third, in contrast to structures adopted by bi- and intramolecular quadruplexes, which are highly polymorphic, tetramolecular complexes are structurally well defined. They are formed by short oligodeoxynucleotides bearing a block of three or more guanines. In this configuration (also called G4-DNA), all strands are parallel and all guanines are in the *anti* conformation (Figure 1A). Although direct evidence for the formation of tetramolecular structures *in vivo* is currently lacking, these quadruplexes have been proposed to play a role during meiosis (38,39).

In this report, we unambiguously demonstrate that a well-characterized quadruplex ligand is able to accelerate the association of single strands into quadruplexes. Therefore, this molecule acts as a molecular chaperone for the formation of tetramolecular quadruplexes. This observation has implications for *in vitro* and *in vivo* applications of quadruplexes and should be taken into account when interpreting the cellular responses to these agents.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Oligonucleotides and compounds

Oligonucleotides were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Concentrations of all oligodeoxynucleotides were estimated using published sequence-dependent extinction coefficients (40). Compounds 360A, 307A, BRACO19, BSU1051 and 12459 were kind gifts from P. Mailliet (Sanofi-Aventis, Vitry/Seine, France). These compounds were stored at 1 or 2 mM in DMSO, further dilution being made in ddH₂O. TMPyP4 and PIPER were purchased from Calbiochem and solubilized in ddH₂O and dilute acetic acid, respectively. Telomestatin was a kind gift of Dr K. Shin-ya; its isolation and purification was previously described (22). Telomestatin was stored at 1 mM at -20°C in the dark in 50% DMSO/50% MeOH; fresh dilutions were made for each series of experiments. The formulae of all tested ligands are shown in Supplementary Figure S1; some of their properties are shown in Supplementary Table S1.

Gel electrophoresis

Non-denaturing gel electrophoresis allows separation of single-stranded oligonucleotides from tetramolecular G-quadruplex structures (34,35). The oligonucleotides (5–200 μM final strand concentrations) were heat denatured in a buffer containing 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2) and 110 mM KCl (or NaCl for the oligonucleotide T₂G₅T₂). Immediately after denaturation,

oligonucleotides were mixed with the compounds ($5 \times$ concentrate solutions) to reach the indicated final concentrations, in a volume of 10–20 μ l, and incubated at 4°C for times varying from 2 min to several days.

For the association of these short oligonucleotides, at concentrations ranging from 50 to 500 μ M, UV shadow at 254 nm was a convenient method to quantify with fair precision the amount of single-strand versus G-quadruplex. The use of dyes, like methylene blue, SYBR green I or gold (Molecular Probes) and acridine orange, are often misleading as stainings and quantum yields may vary when bound to single-strands versus G-quadruplexes (not shown). About 1 nmol of oligonucleotide was loaded with 10% final sucrose concentration on a non-denaturing gel containing 20% acrylamide-bisacrylamide (19:1), 20 mM KCl and $1 \times$ TBE. About the same amount (1 nmol) of oligothymidylate markers (dT₆, dT₁₂ or dT₂₄) were also loaded on the gel. The TG₃T sample incubated without any potassium and heat denatured just before loading was used as a control for single-strand migration. One should note that the migration of the oligothymidylate markers (short ⁵dT_n oligonucleotides) does not necessarily correspond to single-strands (41): these oligonucleotides were chosen here to provide an internal migration standard, not to identify single-stranded or higher-order structures. The gel was electrophoresed at 4°C in 20 mM KCl, $1 \times$ TBE. Bands were detected by UV-shadow at 254 nm using a fluorescent silica screen (Whatman).

When using the UV-shadow approach to quantitate, one must assume that the extinction coefficients of the oligonucleotide in single-stranded and quadruplex forms are identical. Absorbance spectroscopy confirmed that these two coefficients were indeed very close. Unfortunately, compound 360A also absorbs light in the same wavelength range, and its molar extinction coefficient at 260 nm ($40\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) cannot be neglected as compared to TG₃T ($47\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). 360A binding may lead to an overestimation of the fraction of oligonucleotide in the G-quadruplex structure. Nevertheless, when the same amounts were loaded on a gel, we did not observe huge variations of band intensity from induced G-quadruplex with or without any compound. Moreover, we confirmed and quantified the induction of G-quadruplex by 360A using radioactivity.

For induction of G-quadruplexes at low oligonucleotide concentrations, 20 pmol of TG₃T was radiolabeled in the 5' position using 10 μ Ci of γ -³²P-ATP and 5 units of T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) in a buffer containing 70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂ and 5 mM DTT for 40 min at 37°C. The short radiolabeled oligonucleotide was gel-purified using standard protocols and precipitated by 2.5 M ammonium acetate and a large excess of ethanol. Finally, ammonium acetate was removed by lyophilization to avoid a possible effect of NH₄⁺ on the oligonucleotide association kinetics. The purified, labeled ³²P-TG₃T was then mixed with unlabeled phosphorylated oligonucleotide to reach a final strand concentration of 5–200 μ M. The amount of radiolabeled oligonucleotide was negligible compared to the quantities of unlabeled oligonucleotide added.

Complex was separated from single-strand using non-denaturing gel electrophoresis (acrylamide:bis, 19:1; 20% in $1 \times$ TBE, 20 mM KCl at 4°C) and the radioactive signal was detected after overnight exposure to a phosphorimager screen (Molecular Dynamics) at –20°C and scanning with a Typhoon apparatus (Amersham Bioscience). Under certain conditions, two retarded bands are observed in the presence of a ligand. These two species correspond to the migration of the tetramolecular quadruplex without ligand, and to the quadruplex + ligand, respectively (the latter being more retarded than the former). This behavior may be found when using sub-saturating amounts of ligand.

Absorbance measurements

Comparison of the absorbance spectra of the oligonucleotide under conditions where it should be totally unfolded (at $t=0$) and completely folded allowed us to generate an isothermal differential absorbance spectrum. The shape of this curve is specific for quadruplexes (Supplementary Figure S3) (42). Isothermal and melting experiments were recorded as previously described (34). For isothermal experiments, starting from completely unfolded strands, absorbance was recorded at regular time intervals (150 s) at 245 (or 240), 295 and 488 nm. Oligonucleotide strand concentration was 100 μ M for TG₃T and 300 μ M for PO₄-TG₃T in a buffer containing 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2) and 110 mM KCl. After overnight association, a UV-melting experiment was performed on the same samples with a heating gradient of 0.5°C/min, recording the absorbance at 240, 295 and 490 nm. This melting temperature depends on the heating rate (34,43).

Analysis of quadruplex formation

Kinetic experiments followed by UV-absorbance or gel electrophoresis allowed determination of the fraction of quadruplex formed as a function of time. In the absence of ligand, experimental points were fitted to a kinetic model using Kaleidagraph 3.6.4 according to published procedures (34,35) and assuming an experimental order of four. However, in the presence of non-saturating amounts of G4 ligand, kinetic curves could not be fitted with this model, as a concomitant decrease in free-ligand concentration leads to a more complex profile. Therefore, a comparison of the k_{on} values (in $\text{M}^{-3}\text{ s}^{-1}$) in the absence or presence of the ligands was not possible except when the ligand was present in large excess. In that case, the free ligand concentration was considered to be invariant during the time course of the kinetics experiment. However, one may always compare the experimental time required for 50% quadruplex formation ($t_{1/2}$) under a given set of conditions.

RESULTS

Presentation of the system

All oligonucleotides studied here contain a single short block of three to five guanines and may form a

tetramolecular complex. We chose TG₃T as a model sequence. Several other sequences, such as T₂G₅T₂ and the human telomeric oligonucleotides TTAG₃ and TTAG₃T, were also tested. Formation of these quadruplexes is slow, even in potassium (34); therefore, ligands that increase the kinetics of association are relatively easy to identify.

Comparison of various DNA ligands

Formation of a tetrameric quadruplex may be evidenced by non-denaturing gel electrophoresis. In the absence of ligand and potassium, no quadruplex is formed, and a single band is obtained on the gel, corresponding to the migration of a single-stranded species (Figure 2, lane 1). When 110 mM K⁺ is present, a partial conversion of the single-strand to the quadruplex was observed (Figure 2, lane 2). Increasing the concentration of ethidium bromide, a ligand that has a high affinity for duplexes, but a weak affinity for quadruplexes (44–46) had no effect on the quadruplex: single-strand ratio, even at 100 μM (Figure 2, lanes 15–18). On the other hand, increasing concentrations of a variety of known G-quadruplex ligands had rather diverse effects: BSU1051 (Figure 2, lanes 32–35) and 12459 (Figure 2, lanes 28–31) had limited (if any) effect on the relative amounts of single-strands over G-quadruplex species; telomestatin (Figure 2, lanes 7–10) and TMPyP4 (Figure 2, lanes 11–14), altered slightly the relative

intensities of the bands. BRACO19 (Figure 2, lanes 19–22) induced the formation of a tetramolecular quadruplex, whereas PIPER (lanes 36–39) led to the formation of a higher molecular weight species with very low mobility; however, significant amounts of single-strands were present even at the highest ligand concentration. In contrast, in the presence of the pyridine dicarboxamide derivatives, 360A or 307A, known for their high affinity and selectivity for quadruplexes (26,47,48), only quadruplex was observed (Figure 2, lanes 3–6 and 23–26). The 360A (or 307A)/quadruplex complex was slightly retarded compared to the quadruplex formed in the absence of any ligand (Figure 2, lane 2), and a similar phenomenon was observed for telomestatin (lanes 8–10), BRACO19 (lanes 20–22) and 12459 (lanes 28–31). This slightly altered migration is probably due to the molecular weight/charge contribution of the ligand to the complex, which suggests that the quadruplex–ligand complex is maintained during electrophoresis (this may not be the case for BSU1051, ethidium bromide or TMPyP4). For PIPER, the migration is drastically modified and, although we cannot exclude that this simply results from PIPER binding to the tetramolecular quadruplex, it is more likely that higher molecular weight species are induced in the presence of this compound as already reported (29).

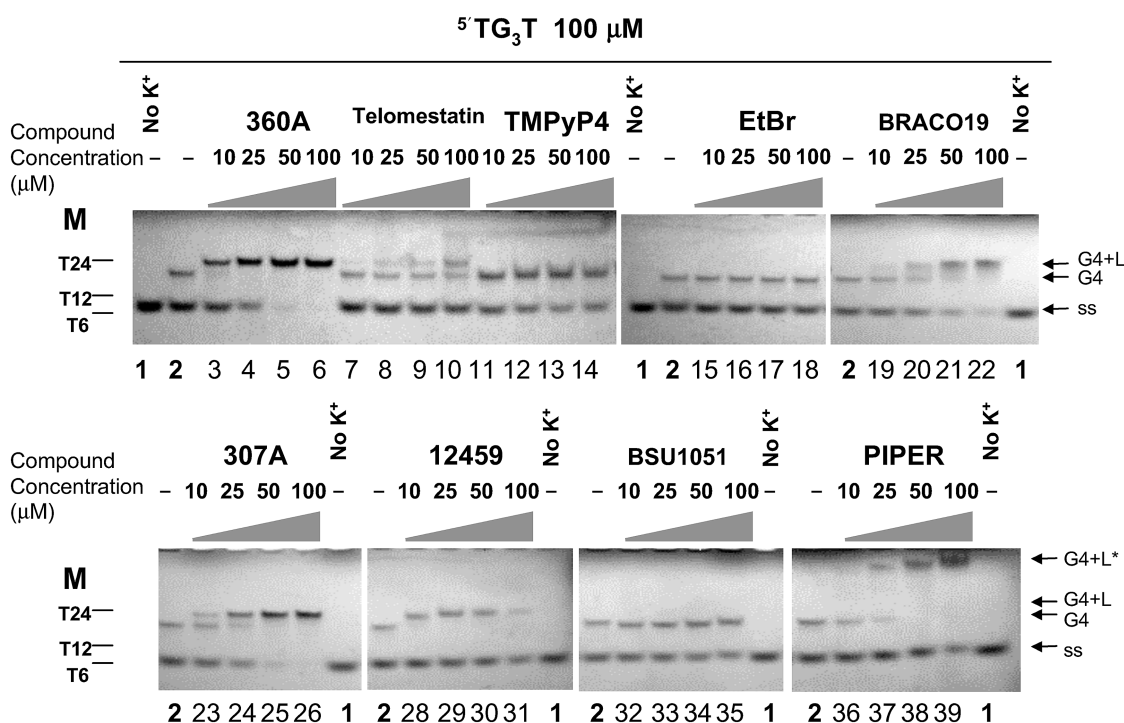


Figure 2. Effects of various compounds on the association of a tetramolecular G-quadruplex from the oligonucleotide TG₃T. These molecules are known to bind to G-quadruplexes (360A, telomestatin, TMPyP4, BRACO19, BSU1051, 307A, PIPER and 12459, formulae shown as Supplementary Figure S1) or duplexes (ethidium bromide (EtBr)). The oligonucleotide TG₃T was heat denatured before incubation at 100 μM (strand concentration) in 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2), 110 mM KCl buffer (at 4°C for 4.5 h) with or without any compound at the indicated concentrations. Samples (1 nmol of oligonucleotide loaded) were loaded on a 20% non-denaturing acrylamide gel containing 20 mM KCl and 1× TBE, and detection was performed using UV-shadow at 254 nm. Oligonucleotide markers (M) were short ⁵dT_n sequences. A sample incubated without any potassium and heat denatured just before loading was used as a control for single-strand migration (ss) on the gel (lanes 1), whereas incubation without any compound indicated position of the migration of the tetramolecular G-quadruplex (G4) (lanes 2). Some gel-shifts can be observed depending on the ligand used (G4 + L). G4 + L* stands for the very slow mobility product formed with PIPER.

Kinetics of quadruplex formation in the presence of 360A

In the experiment presented in Figure 3A, solutions of TG₃T were incubated for various amounts of time, between 5 min and 9 days, before separation of single-strand from quadruplex on a non-denaturing gel. In the absence of the ligand, a significant but still incomplete conversion into quadruplex was observed after 9 days; half conversion required approximately 1 day at 100 μ M strand concentration. In contrast, addition of various concentrations of 360A had a dramatic effect on the association kinetics. In the presence of 50 μ M 360A, half conversion required only 5 min, and the single-stranded species completely disappeared after a few days (Figure 3B). The effects of intermediate concentrations, 10 and 25 μ M 360A, are shown in Figure 3, panels C and D, respectively. The relative amount of the single-stranded species was determined from a quantitative analysis of the band intensities; the unfolded fraction is plotted versus time in Figure 3E. Starting from a completely unfolded oligonucleotide in each case, the differences between curves at 0, 10, 25, and 100 μ M are striking, especially for short incubation times.

Influence of a 5' phosphate on quadruplex association and dissociation

The single strands and complexes in the gels presented in Figures 2 and 3 were revealed by a relatively insensitive technique, UV-shadowing. In order to study quadruplex formation at lower strand and ligand concentrations, a more sensitive approach was required. We visualized the oligonucleotides on some of the gels by methylene blue staining or by the use of fluorescent dyes such as SYBR or acridine orange. Unfortunately, the former

technique is not sensitive enough, whereas the fluorescent dyes have different quantum yields and/or affinity for quadruplex and single-strands, complicating a quantitative analysis (data not shown). For these reasons, we followed quadruplex formation using a 5'-radiolabeled oligonucleotide. Our initial experiments were done by mixing a 5' phosphate radiolabeled oligonucleotide, mixed with a large excess of unlabeled, non-phosphorylated oligonucleotide. We noticed that the amount of quadruplex formed as determined by the radioactive-labeling method leads to an underestimation of the total quadruplex, indicating that the radiolabeled strand was underrepresented in the complex as a result of the extra 5' phosphate group (data not shown). In agreement with the results of Uddin *et al.* (49), it appeared that the presence of one or two extra negative charges per strand affected the stability of the complex and/or association rate of the quadruplex formation. Figure 4 and Supplementary Figure S4 present a comparison of the kinetics of association and dissociation of the G-quadruplexes formed by 5'-OH and 5'-phosphate TG₃T oligonucleotide at various salt concentrations. As shown in Figure 4A and B, quadruplex formation was hampered by the presence of the phosphate group. Higher strand concentrations were required to form a quadruplex overnight and, at 110 mM ionic strength, the corresponding association rate constant was 29 times lower for the oligonucleotide bearing a terminal phosphate [$k_{on} = 67 \times 10^6$ and $2.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for TG₃T and PO₄-TG₃T, respectively; for a discussion and comparison of these absolute values, see (34,35)]. However, the difference of k_{on} values between the 5'-phosphate and the 5' OH oligonucleotides was slightly decreasing when working at higher salt concentrations (Supplementary Figure S4B), confirming

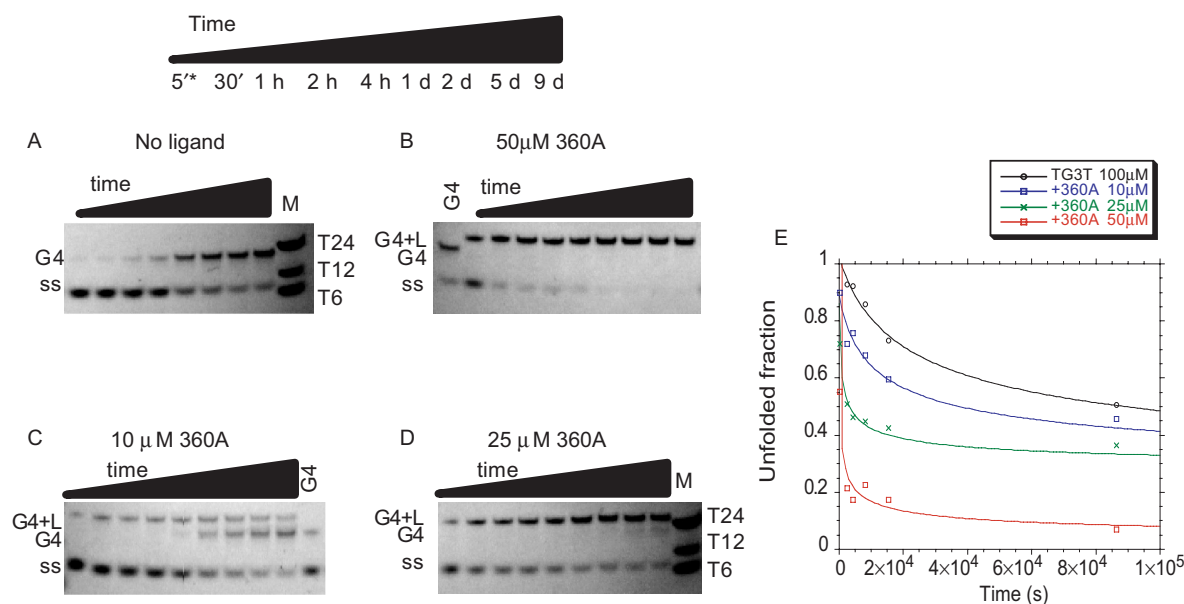


Figure 3. Association kinetics of TG₃T with various concentrations of 360A ligand. (A–D) Non-denaturing gel electrophoresis was used to separate single strand from quadruplex, and species were detected by UV-shadow at 254 nm. Incubations were carried out in 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2), 110 mM KCl at 4°C for the indicated time at a 100 μ M strand concentration with or without 360A at the indicated concentration. Time is given in days (d), hours (h), and minutes ('). * no time point at 5' for panel A. (E) Quantification of the single-stranded fraction using ImageQuant software. Black triangles: without compound; blue squares: with 10 μ M 360A; green crosses: with 25 μ M 360A; red squares: with 50 μ M 360A.

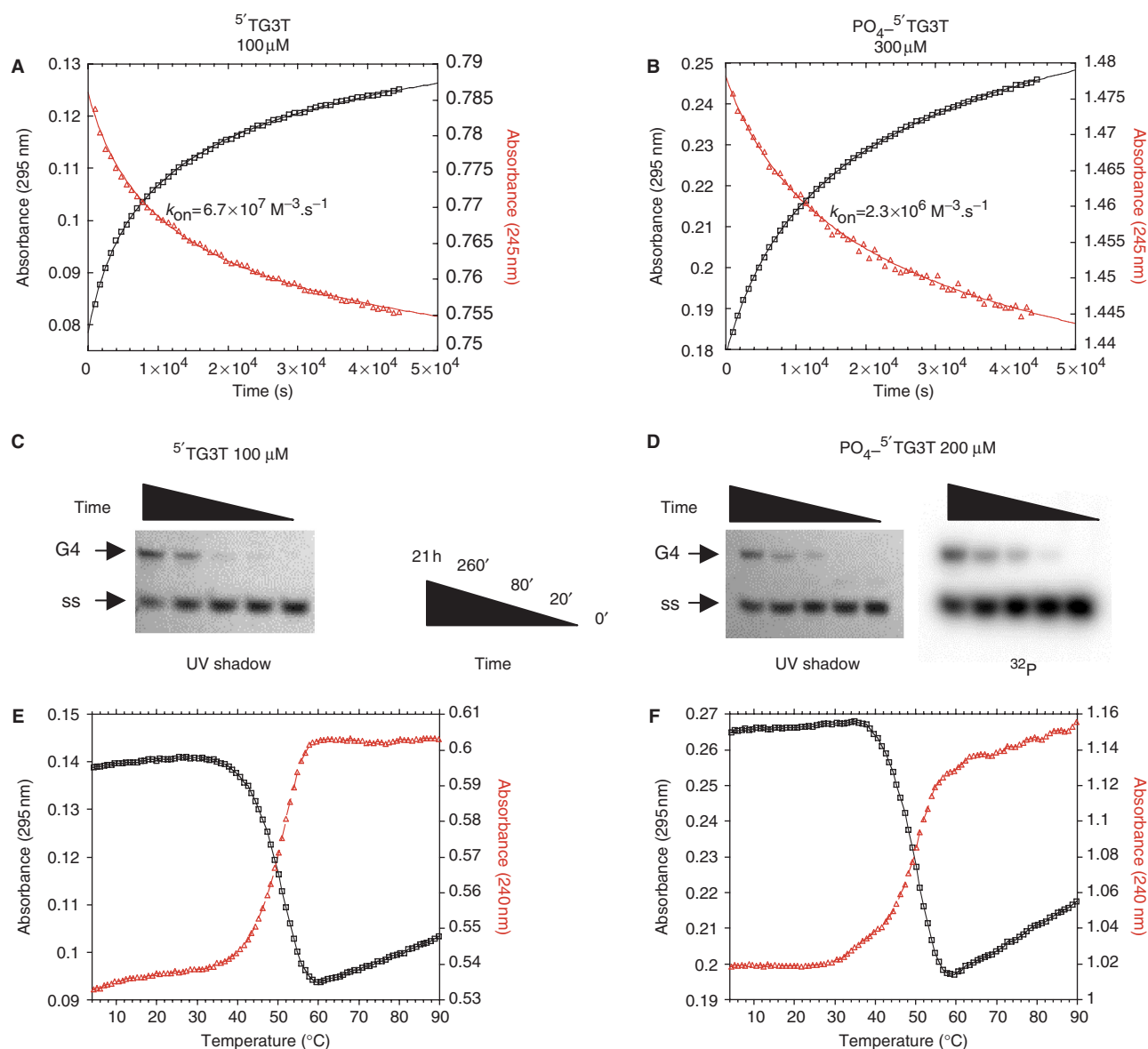


Figure 4. Effect of a terminal phosphate on G-quadruplex association and dissociation. Results obtained with TG₃T and PO₄-TG₃T are shown in the left and right parts of the figure, respectively. All experiments were performed in 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2), KCl 110 mM at 4°C. (A and B) Association kinetics of G-quadruplex formation followed by absorbance at 295 nm (black squares) and 245 nm (red triangles) for (A) TG₃T and (B) PO₄-TG₃T at 100 μ M and 300 μ M strand concentration, respectively; k_{on} values were calculated using the fourth-order model (34,35). (C and D): Association kinetics of G-quadruplex formation followed by non-denaturing gel electrophoresis (20% acrylamide in 1× TBE, 20 mM KCl at 4°C) at the time points indicated for (C) TG₃T at 100 μ M strand concentration and (D) PO₄- $5'$ TG₃T at 200 μ M total strand concentration (mixture of ^{32}P -TG₃T labeled at the 5' end by ^{32}P - γ -ATP and non-radioactive PO₄-TG₃T). Migration of the associated (G4) and dissociated (ss) forms are indicated; species were revealed using UV-shadowing at 254 nm for non-radioactive species or by detection of the radioactive signal. (E and F) Thermal denaturation of preformed (E) [TG₃T]₄ and (F) [PO₄-TG₃T]₄ G-quadruplexes (strand concentrations as in panels A and B respectively) followed by absorbance at 295 nm (black squares) and 240 nm (red triangles) at a heating gradient of 0.5°C/min.

that an electrostatics phenomenon is taking part in this unfavorable effect. This effect was also confirmed by non-denaturing gel electrophoresis, as higher strand concentrations were required to form similar amounts of quadruplexes for the phosphorylated oligonucleotide compared to the non-phosphorylated (Figure 4C and 4D), as revealed by UV-shadow analysis. For oligonucleotides bearing a 5' phosphate, this analysis was also performed by radioactivity, using a ^{32}P -radiolabeled oligonucleotide mixed with the 5'phosphate oligonucleotide.

A quantitative analysis of the gel experiments (revealed by radioactivity or UV-shadow) is presented in Supplementary Figure S4A. Similar results were obtained when amounts were quantitated using UV-shadow or radioactivity, arguing that the fraction of radiolabeled oligonucleotides involved accurately reflects the total amount of quadruplex formed. The association constants for PO₄-TG₃T ($k_{on} = 2 \times 10^6$ and $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$ calculated using values from UV-shadow and radioactivity, respectively) are in excellent agreement with the

Table 1. Association constants found

Oligonucleotide sequence ^a	5'end	360A ^c	k_{on} ^d ($M^{-3}s^{-1}$)	$T_{1/2}$ ^e ($^{\circ}C$)	Method	Reference
TGGGT	OH	–	5.2×10^7	48	UV-absorbance	(34)
TGGGT	OH	–	6.7×10^7	50	UV-absorbance	This study
TGGGT	OH	–	4.0×10^7	n/a	Gel; UV shadow	This study
TGGGT	P ^b	–	2.3×10^6	49.5	UV-absorbance	This study
TGGGT	P ^b	–	2.0×10^6	n/a	Gel; UV shadow	This study
TGGGT	P ^b	–	1.4×10^6	n/a	Gel; radioactivity	This study
TGGGT	P ^b	50 μ M	3.4×10^{12}	n/a	Gel; radioactivity	This study
TGGGT	P ^b	100 μ M	1.4×10^{13}	n/a	Gel; radioactivity	This study
TTAGGG	OH	–	1.8×10^7	50	UV-absorbance	(34) ^f
TTAGGGT	OH	–	2.1×10^6	55	UV-absorbance	(34) ^f
TTGGGGGTT	OH	–	6.1×10^7	>90	UV-absorbance	(34) ^f

^a5' to 3' direction. ^bP for 5'-phosphate group. ^cConcentration of Quadruplex ligand (360A) added.—: no ligand. ^din 110 mM KCl (or NaCl for T₂G₅T₂), 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 buffer. Values with $\pm 30\%$ accuracy. ^ein 110 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 buffer, with a temperature gradient of 0.5 $^{\circ}C/min$. ^fAlso see Supplementary Figure S6. NA: not applicable (this apparent melting temperature cannot be determined in a gel).

absorbance spectroscopy results ($k_{on} = 2.3 \times 10^6 M^{-3}s^{-1}$) and confirm that the kinetics of association are negatively affected by the presence of a terminal phosphate. The association rate constant of the 5'-OH oligonucleotide determined using radioactively labeled oligonucleotide was calculated to be $4 \times 10^7 M^{-3}s^{-1}$, which is also in good agreement with the value found by absorbance spectroscopy (considering 30% precision is given on these values). Association constant values are summarized in Table 1.

Although there were minor differences, both methods indicate that the presence of a 5' terminal phosphate has a negative impact on the kinetics of association of a tetramolecular quadruplex. In contrast, the presence of a phosphate group had a limited effect on the thermal stability of the quadruplex. As shown in Figures 4E and 4F, the mid-point of the thermal melting transition ($T_{1/2}$) was 50 for the 5'-OH oligonucleotide and 49.5 $^{\circ}C$ for the 5'-PO₄-TG₃T oligonucleotide. Even if, at lower salt concentrations (Supplementary Figure S4C), a more significant 2 $^{\circ}C$ difference was recorded, suggesting again a role of the negative charges in the destabilization of the structure, these results indicate that the presence of a terminal phosphate significantly affects the association kinetics, but has rather little effect on the thermal stability or dissociation kinetics of the quadruplex.

Kinetics of 5'-PO₄-TG₃T quadruplex formation in the presence of 360A

The addition of a terminal phosphate slows, but does not prevent, quadruplex formation. It is, therefore, possible to follow quadruplex formation with oligonucleotides radioactively labeled at the 5' terminus with ³²P and to determine whether a ligand affects association kinetics. In the gel presented in Figure 5A, no significant quadruplex formation was observed after 21 h at 20 μ M strand concentration in the absence of a ligand. At this concentration, 50% quadruplex formation ($t_{1/2}$) would take years, and the reverse reaction would not be negligible. A 10 fold-higher strand concentration leads to partial quadruplex formation, see Figure 4D). Addition of 360A leads to faster association (Figure 5A, right lanes), confirming UV-shadow analysis at higher strand

and ligand concentrations. The rate acceleration is quantified in Figure 5B: 0, 22, 42 and 76% quadruplex formation was obtained after 21 h in the presence of 0, 5, 10 and 20 μ M 360A, respectively. At the highest ligand concentration tested, $t_{1/2}$ was 80 min.

Kinetics of quadruplex formation in the presence of a large molar excess of 360A

Quantitative analysis of the previous gel suggested that the presence of a quadruplex ligand lead to an initial increase in the apparent association rate. However, the effects were less pronounced at longer times: the quantitative difference between 4.3 h and 21 h incubations was relatively small (Figure 5B). We reasoned that, as more and more quadruplexes were formed, the ligand, which was not in huge molar excess, would be progressively titrated out. In order to simplify the modeling of ligand action, one must work under experimental conditions for which the free ligand concentration can be considered invariant during the reaction. To approach this condition, we chose to lower the oligonucleotide strand concentration to 5 μ M and to increase the ligand concentration to 50 or 100 μ M (Figure 6). Assuming a maximum of 2 binding sites per quadruplex (Supplementary Figure S5), complete quadruplex formation would decrease free ligand concentration by no more than 2.5 μ M, a negligible amount relative to the ligand concentration. Figure 6A demonstrates that, unsurprisingly, no quadruplex formation was obtained after one week at 5 μ M strand concentration in the absence of 360A. In contrast, 50 or 100 μ M ligand lead to near-complete quadruplex formation over the same period. Results were quantitated and are presented in Figure 6B. At 100 μ M ligand, $t_{1/2}$ was 140 min. It was possible to fit these curves using the same mathematical model we and others used for tetramolecular quadruplex formation (34). Apparent k_{on} values of $3.4 \times 10^{12} M^{-3}s^{-1}$ and $1.4 \times 10^{13} M^{-3}s^{-1}$ were found for 50 and 100 μ M ligand concentrations, respectively. The association rate constant determined in the absence of any ligand for the same 5' phosphate oligonucleotide at a much higher strand concentration (200 or 300 μ M) was $1.4\text{--}2.3 \times 10^6 M^{-3}s^{-1}$; at 5 μ M, in the absence of ligand, no quadruplex formation was observed. The comparison

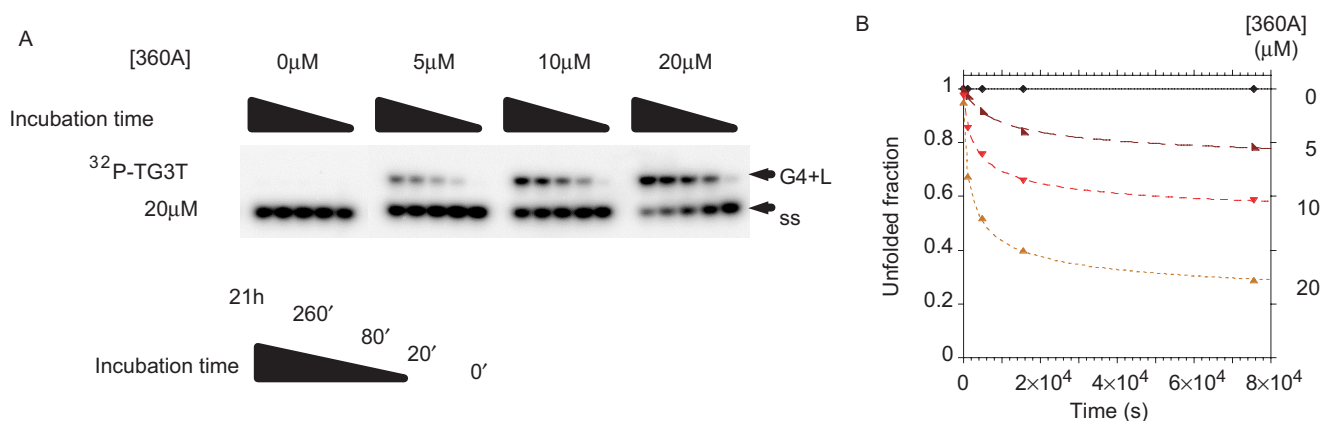


Figure 5. Compound 360A promotes formation of tetramolecular G-quadruplex $[PO_4-TG_3T]_4$ at $20\mu M$ strand concentration. **(A)** Association kinetics of the G-quadruplex formed by PO_4-TG_3T at $20\mu M$ total strand concentration (mixture of $^{32}P-TG_3T$ and non-radioactive PO_4-TG_3T) alone or in presence of $5\text{--}20\mu M$ 360A in 10mM lithium cacodylate ($pH\ 7.2$), 110mM KCl at $4^\circ C$, followed by non-denaturing gel electrophoresis (20% in $1\times TBE$, 20mM KCl at $4^\circ C$) at the time points indicated. Position of migration of the quadruplex (G4+L) and single-stranded (ss) forms are shown. **(B)** Quantification of the single-stranded fraction (black diamonds: PO_4-TG_3T alone; dark red triangles: $+5\mu M$ 360A; red triangles: $+10\mu M$ 360A; and orange triangles: $+20\mu M$ 360A). Data cannot be fitted by the classical fourth-order model (34).

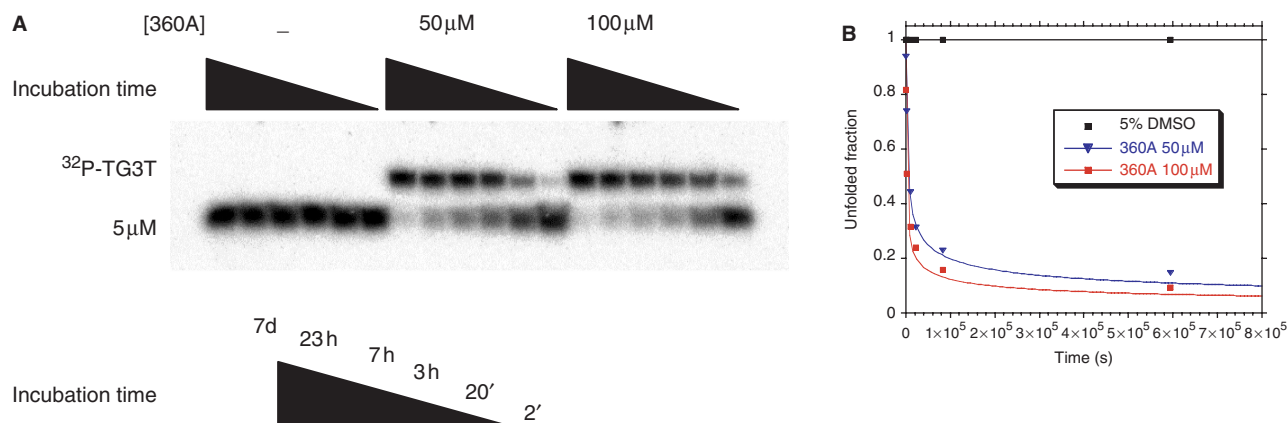


Figure 6. Induction of the tetramolecular G-quadruplex $[PO_4-TG_3T]_4$ by a large excess of 360A. **(A)** Association kinetics of PO_4-TG_3T incubated at $4^\circ C$ at a final strand concentration of $5\mu M$ in absence or presence of 360A at 50 and $100\mu M$; incubations are performed in 10mM lithium cacodylate ($pH\ 7.2$), 110mM KCl. Products were resolved on a 20% acrylamide gel; electrophoresis was performed at $4^\circ C$ in buffer containing $1\times TBE$ and 20mM KCl. **(B)** Quantification of the fraction of $^{32}P-TG_3T$ single-strand (black squares: without ligand; blue triangles: $+360A\ 50\mu M$; red squares: $+360A\ 100\mu M$). The fourth-order model for tetramolecular G-quadruplexes association was applied and k_{on} values calculated for complex formation in the presence of large excess of ligand are given (34).

of these rate constants allows us to conclude that the presence of 50 or $100\mu M$ ligand increases the rate constant 2 or 21 million-fold, respectively. Due to the order of 4 chosen for the fits, this impressive—but somehow misleading—difference corresponds to a $125\text{--}275$ -fold apparent increase in strand concentration.

360A affects the kinetics of other quadruplexes

We analyzed in detail the effect of 360A on a single sequence, TG_3T . To prove that the effect of this ligand was not restricted to this peculiar sequence, we analyzed its impact on the association kinetics of three other sequences, T_2AG_3 , T_2AG_3T and $T_2G_5T_2$ (Supplementary Figure S6). In all cases, a significant increase in the amount of quadruplex formed was observed in the presence of 360A compared to the same conditions for oligonucleotide alone, as revealed by UV-shadow. This

indicates that this ligand was able to increase the kinetics of association of various tetramolecular quadruplexes.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The number of identified G4 ligands has grown rapidly over the past few years. A range of molecules recognize the telomeric quadruplex ($18,23,24,31,45,50\text{--}63$). The compound 360A belongs to a family of pyridine dicarboxamide compounds that exhibit high selectivity toward quadruplex DNA relative to other DNA structures ($26,47,48$). Thanks to the relatively slow kinetics of tetramolecular quadruplex formation and dissociation, it was possible to perform fluorescence titration experiments with the same oligonucleotide in quadruplex or single-stranded form (Supplementary Figure S5). Little or no variation of 360A fluorescence emission was found

when an excess of the single-strand was added, whereas a near-complete quenching was obtained in the presence of the tetrameric quadruplex. These results were not unexpected, considering the equilibrium dialysis profile previously found for this molecule (48).

It is a general assumption that small molecules bind to preformed nucleic acid structures. In this article, we demonstrate that 360A may actively induce the formation of a tetramolecular quadruplex, acting as a chaperone for the association of the four strands. Furthermore, this effect was not restricted to a unique sequence; quadruplex formation by several different sequences was accelerated by the compound. The presence of a 3' terminal guanine or a TpG was not required, as evidenced by data generated on the TTAGGG sequence. During this study, we also demonstrated that introduction of a 5'-terminal phosphate through radioactive labeling affected the kinetics, presumably due to the additional negative charges. The 5' phosphate group slowed the association rate with little effect on thermal stability (Table 1). In principle, the presence of these extra charges could also influence the binding affinity of the ligand; however, 360A bound to both 5'-OH and 5'-phosphate quadruplexes, and affected favorably the kinetics of both quadruplexes.

Under the conditions of our studies, 360A did not exert a catalytic effect: one 360A molecule accelerates the formation of a single quadruplex complex and remains bound. The ligand remains attached to the newly formed quadruplex, due to its high affinity. This conclusion was reached using a molar quadruplex:ligand ratio above one (Figure 3C). Another interesting bit of information is that, contrary to the case of bimolecular quadruplexes, a single complex is formed; this is supported by the fact that (i) we observed a single band on the gel, (ii) the CD $T_{1/2}$ values (Supplementary Figure S2B) and (iii) the isothermal difference spectra (Supplementary Figure S3B) are similar. Furthermore, the overall architecture of the quadruplex induced by the presence of the ligand is probably similar to the structure of the quadruplex formed alone, as the CD signatures of both quadruplexes were similar (Supplementary Figure S2A) and the migration of quadruplexes were not very different (with the exception of PIPER, and taking into account the fact that the ligand somewhat retards the complex due to its positive charges and molecular weight) (Supplementary Figure S6).

Of course, the observation that a ligand increases the association rate constant does not imply that this molecule has no effect on the dissociation rate constant. In fact, 360A did affect the apparent melting temperature of the quadruplex (Supplementary Figure S2B), indicating that 360A also leads to a decrease in k_{off} (i.e. an increase in the lifetime and thermal stability of the complex). This is in agreement with other studies demonstrating that a quadruplex ligand affects the dissociation of a quadruplex (64,65). Several questions remain unanswered, and two main questions are the purpose of our ongoing studies: (i) Do these observations hold for different ligands? The gels shown in Figure 2 suggest that other molecules such as a trisubstituted acridine also affect the association process, although to a lesser extent than the

bis quinolinium pyridine dicarboxamide derivatives 360A and 307A. We will determine how general this process is and to which parameters it could be related (charge, shape, affinity). (ii) Are other types of quadruplexes also affected, such as bi- and intramolecular complexes? These complexes, which might be more biologically relevant than the parallel-stranded, tetramolecular complexes studied here, will be more complicated to analyze because of their faster and more complicated kinetics of association and dissociation.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Patrick Mailliet and Eliane Mandine (Sanofi-Aventis, Vitry, France), Jean-François Riou (Université de Reims), Laurent Lacroix, Barbara Saccà, Patrizia Alberti, Anne Bourdoncle, Julien Gros and Samir Amrane (Museum, Paris) for helpful discussions. Telomestatin was a kind gift from Prof. K. Shin-ya (U. Tokyo). This work was supported in part by an ARC grant (n°3365) and an EU FP6 'MolCancerMed' grant (LSHC-CT-2004-502943 to J.-L.M.). Funding to pay the Open Access publication charges was provided by INSERM.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Williamson, J.R. (1994) G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 703–730.
- Davis, J.T. (2004) G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 668–698.
- 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.
- Oka, Y. and Thomas, C.A.Jr. (1987) The cohering telomeres of Oxytricha. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8877–8898.
- Sundquist, W.I. and Klug, A. (1989) Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature*, **342**, 825–829.
- Williamson, J.R., Raghuraman, M.K. and Cech, T.R. (1989) Monovalent cation induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*, **59**, 871–880.
- 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.
- Siddiqui-Jain, A., Grand, C.L., Bearss, D.J. and Hurley, L.H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11593–11598.
- Grand, C.L., Powell, T.J., Nagle, R.B., Bearss, D.J., Tye, D., Gleason-Guzman, M. and Hurley, L.H. (2004) Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6140–6145.
- Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H.J. and Plückthun, A. (2001) In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8572–8577.

11. Duquette, M.L., Handa, P., Vincent, J.A., Taylor, A.F. and Maizels, N. (2004) Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev.*, **18**, 1618–1629.
12. Paeschke, K., Simonsson, T., Postberg, J., Rhodes, D. and Lipps, H. (2005) Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 847–854.
13. Li, J.J. and Tan, W. (2002) A single DNA molecule nanomotor. *Nano Lett.*, **2**, 315–318.
14. Alberti, P. and Mergny, J.L. (2003) DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1569–1573.
15. Bourdoncle, A., Estévez Torres, A., Gosse, C., Lacroix, L., Vekhoff, P., Le Saux, T., Jullien, L. and Mergny, J.L. (2006) Quadruplex-based molecular beacons as tunable DNA probes. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 11094–11105.
16. Maizels, N. (2006) Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1055–1059.
17. Oganessian, L. and Bryan, T.M. (2007) Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. *Bioessays*, **29**, 155–165.
18. Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Hurley, L.H. (1997) Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.*, **40**, 2113–2116.
19. Mergny, J.L. and Hélène, C. (1998) G-quadruplex DNA: A target for drug design. *Nature Med.*, **4**, 1366–1367.
20. Guittat, L., Alberti, P., Rosu, F., Van Miert, S., Thetiot, E., Pieters, L., Gabelica, V., De Pauw, E., Ottaviani, A. et al. (2003) Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. *Biochimie*, **85**, 535–547.
21. Franceschin, M., Rossetti, L., Dambrosio, A., Schirripa, S., Bianco, A., Ortaggi, G., Savino, M., Schultes, C. and Neidle, S. (2006) Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.*, **16**, 1707–1711.
22. Shin-ya, K., Wierzbicka, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. (2001) Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1262–1263.
23. Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-ya, K., Wierzbicka, K. and Hurley, L.H. (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2098–2099.
24. Gowan, S., Heald, R., Stevens, M. and Kelland, L. (2001) Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol. Pharmacol.*, **60**, 981–988.
25. Han, F.X.G., Wheelhouse, R.T. and Hurley, L.H. (1999) Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with quadruplex DNA. Structural basis for the differential effects on telomerase inhibition. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3561–3570.
26. Pennarun, G., Granotier, C., Gauthier, L.R., Gomez, D., Hoffschir, F., Mandine, E., Riou, J.F., Mergny, J.L., Mailliet, P. et al. (2005) Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene*, **24**, 2917–2928.
27. De Cian, A., DeLemos, E., Mergny, J.L., Teulade-Fichou, M.P. and Monchaud, D. (2007) Highly efficient G-Quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1856–1857.
28. Riou, J.F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Petigenet, O., Megnin-Chanet, F., Hélène, C. and Mergny, J.L. (2002) Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2672–2677.
29. Han, H.Y., Cliff, C.L. and Hurley, L.H. (1999) Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule. *Biochemistry*, **38**, 6981–6986.
30. Kern, J.T. and Kerwin, S.M. (2002) The aggregation and G-quadruplex DNA selectivity of charged 3,4,9,10-perylene-tetracarboxylic acid diimides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3395–3398.
31. Harrison, R.J., Cuesta, J., Chessari, G., Read, M.A., Basra, S.K., Reszka, A.P., Morrell, J., Gowan, S.M., Incles, C.M. et al. (2003) Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **46**, 4463–4476.
32. Burger, A.M., Dai, F.P., Schultes, C.M., Reszka, A.P., Moore, M.J., Double, J.A. and Neidle, S. (2005) The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res.*, **65**, 1489–1496.
33. Wyatt, J.R., Davis, P.W. and Freier, S.M. (1996) Kinetics of G-quartet-mediated tetramer formation. *Biochemistry*, **35**, 8002–8008.
34. Mergny, J.L., De Cian, A., Ghelab, A., Saccà, B. and Lacroix, L. (2005) Kinetics of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 81–94.
35. Mergny, J.L., De Cian, A., Amrane, S. and Webba da Silva, M. (2006) Kinetics of double-chain reversals bridging contiguous quartets in tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2386–2397.
36. Petraccone, L., Pagano, B., Esposito, V., Randazzo, A., Piccialli, G., Barone, G., Mattia, C.A. and Giancola, C. (2005) Thermodynamics and kinetics of PNA-DNA quadruplex-forming chimeras. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16215–16223.
37. Petraccone, L., Erra, E., Randazzo, A. and Giancola, C. (2006) Energetic aspects of locked nucleic acids quadruplex association and dissociation. *Biopolymers*, **83**, 584–594.
38. Sen, D. and Gilbert, W. (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its applications for meiosis. *Nature*, **334**, 364–366.
39. Sen, D. and Gilbert, W. (1990) A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature*, **344**, 410–414.
40. Cantor, C.R., Warshaw, M.M. and Shapiro, H. (1970) Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers*, **9**, 1059–1077.
41. Kejnovska, I., Kypr, J. and Vorlickova, M. (2007) Oligo(dT) is not a correct native PAGE marker for single-stranded DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 776–779.
42. Mergny, J.L., Phan, A.T. and Lacroix, L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **435**, 74–78.
43. Petraccone, L., Erra, E., Esposito, V., Randazzo, A., Galeone, A., Barone, G. and Giancola, C. (2005) Biophysical properties of quadruple helices of modified human telomeric DNA. *Biopolymers*, **77**, 75–85.
44. Guo, Q., Lu, M., Marky, L.A. and Kallenbach, N.R. (1992) Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats. *Biochemistry*, **31**, 2451–2455.
45. Koepfel, F., Riou, J.F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P.B., Labit, D., Petigenet, O., Hélène, C. and Mergny, J.L. (2001) Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1087–1096.
46. Rosu, F., Pauw, E.D., Guittat, L., Alberti, P., Lacroix, L., Mailliet, P., Riou, J.-F. and Mergny, J.-L. (2003) Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes. *Biochemistry*, **42**, 10361–10371.
47. Lemarteleur, T., Gomez, D., Paterski, R., Mandine, E., Mailliet, P. and Riou, J.-F. (2004) Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 802–808.
48. Granotier, C., Pennarun, G., Riou, L., Hoffschir, F., Gauthier, L.R., DeCian, A., Gomez, D., Mandine, E., Riou, J.F. et al. (2005) Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucl. Acid Res.*, **33**, 4182–4190.
49. Uddin, M.K., Kato, Y., Takagi, Y., Mikuma, T. and Taira, K. (2004) Phosphorylation at 5' end of guanosine stretches inhibits dimerization of G-quadruplexes and formation of a G-quadruplex interferes with the enzymatic activities of DNA enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4618–4629.
50. Wheelhouse, R.T., Sun, D., Han, H., Han, F.X. and Hurley, L.H. (1998) Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra (N-methyl-4-pyridyl) porphyrin with quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3261–3262.
51. Fedoroff, O.Y., Salazar, M., Han, H., Chemeris, V.V., Kerwin, S.M. and Hurley, L.H. (1998) NMR-based model of a telomerase

- inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry*, **37**, 12367–12374.
52. Perry, P.J., Read, M.A., Davies, R.T., Gowan, S.M., Reszka, A.P., Wood, A.A., Kelland, L.R. and Neidle, S. (1999) 2,7-disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase. *J. Med. Chem.*, **42**, 2679–2684.
 53. Harrison, R.J., Gowan, S.M., Kelland, L.R. and Neidle, S. (1999) Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2463–2468.
 54. Neidle, S., Harrison, R.J., Reszka, A.P. and Read, M.A. (2000) Structure-activity relationships among guanine-quadruplex telomerase inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, **85**, 133–139.
 55. Caprio, V., Guyen, B., Opoku-Boahen, Y., Mann, J., Gowan, S.M., Kelland, L.M., Read, M.A. and Neidle, S. (2000) A novel inhibitor of human telomerase derived from 10H-indolo[3,2-b]quinoline. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2063–2066.
 56. Mergny, J.L., Lacroix, L., Teulade-Fichou, M.P., Hounsou, C., Guittat, L., Hoarau, M., Arimondo, P.B., Vigneron, J.P., Lehn, J.M. *et al.* (2001) Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescent assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3062–3067.
 57. Alberti, P., Schmidt, P., Nguyen, C.H., Hoarau, M., Grierson, D. and Mergny, J.L. (2002) Benzoindoloquinolines interact with DNA quadruplexes and inhibit telomerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1071–1074.
 58. Shi, D.F., Wheelhouse, R.T., Sun, D.Y. and Hurley, L.H. (2001) Quadruplex-interactive agents as telomerase inhibitors: Synthesis of porphyrins and structure-activity relationship for the inhibition of telomerase. *J. Med. Chem.*, **44**, 4509–4523.
 59. Heald, R.A., Modi, C., Cookson, J.C., Hutchinson, I., Laughton, C.A., Gowan, S.M., Kelland, L.R. and Stevens, M.F.G. (2002) Antitumor polycyclic acridines. 8. Synthesis and telomerase-inhibitory activity of methylated pentacyclic acridinium salts. *J. Med. Chem.*, **45**, 590–597.
 60. Gowan, S.M., Harrison, J.R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M.A., Neidle, S. and Kelland, L.R. (2002) A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1154–1162.
 61. Rossetti, L., Franceschin, M., Bianco, A., Ortaggi, G. and Savino, M. (2002) Perylene diimides with different side chains are selective in inducing different G-quadruplex DNA structures and in inhibiting telomerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2527–2533.
 62. Read, M., Harrison, R.J., Romagnoli, B., Tanious, F.A., Gowan, S.H., Reszka, A.P., Wilson, W.D., Kelland, L.R. and Neidle, S. (2001) Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4844–4849.
 63. Maraval, A., Franco, S., Vialas, C., Pratiel, G., Blasco, M.A. and Meunier, B. (2003) Porphyrin-aminoquinoline conjugates as telomerase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 921–927.
 64. Rosu, F., Gabelica, V., Shin-ya, K. and DePauw, E. (2003) Telomestatin induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry. *Chem. Commun.*, **34**, 2702–2703.
 65. Green, J.J., Ladame, S., Ying, L., Klenerman, D. and Balasubramanian, S. (2006) Investigating a quadruplex-ligand interaction by unfolding kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9809–9812.

Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation

Anne De Cian¹ & Jean-Louis Mergny^{1*}

Supplementary Material

February 3, 2007

SUPPLEMENTARY METHODS

Circular dichroism

Formation of a parallel quadruplex was confirmed by circular dichroism (**Supplementary Figure S1A**) on a Jasco J-810 CD spectrophotometer, thermostated with Peltier effects. For thermal denaturation, CD scans (1 accumulation from 320 to 235 nm at 200 nm/min, in a 1 cm path length cell, with a data pitch of 1 nm and a response of 1 s) were recorded at regular time/temperature intervals, every 120s for a heating rate of 0.5°C/min (increase of 1°C every 2 min, scanning after 1min30 for temperature stabilization), and plots of ellipticity vs. temperature were generated for 260nm. Most melting curves recorded by heating a preformed quadruplex do not correspond to equilibrium melting curves (hysteresis phenomenon) and the "T_m" deduced from these experiments depends on the heating rate. In order to distinguish it from the true thermodynamic T_m, we will call this value T_{1/2}. The heating rate applied for CD melting experiments may be a little high for accurate temperature stabilization during the scans, but it was chosen in order to be in agreement with the T_{1/2} found using absorbance

(without any ligand); this may explain the 1-2°C difference between the $T_{1/2}$ values obtained by CD and absorbance experiments.

Fluorescence titrations

Fluorescence spectra were recorded at 4°C in 3ml quartz cuvetts containing 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 and 110mM KCl. The emission of 0.6μM ligand 360A (excitation at 320 nm) was measured after successive additions of G-quadruplex [PO₄-TG₃T]₄ (preformed at higher concentration (1440 μM) in the same buffer), or of single-stranded PO₄-TG₃T (in ddH₂O and freshly heat denaturated). Considering our study and the weak concentration of ligand used for the titration we assumed that the induction of tetramolecular species from the single-stranded oligonucleotide was negligible during the time course of the experiment.

Supplementary Table 1 : Properties of the DNA ligands tested:

Compound	MW ^a	Charge	ΔT_m (K ⁺) ^b	ΔT_m (Na ⁺) ^b	K _d (M) ^c	n ^d	References ^e
360A	449.5	+2	30 °C	25.1 °C	6.4 x 10 ⁻⁸	2	(1-3)
Telomestatin	582.5	0	22.8 °C	23.6 °C	nd	2	(4-6)
TMPyP4	678.8	+4	27.4 °C	21 °C	1.4 x 10 ⁻⁵	2-4	(6-10)
Ethidium	314.4	+1	0.7 °C	1.1 °C	6.7 x 10 ^{-6*}	1-2	(11-13)
307A	449.5	+2	32°C	25°C	9.0 x 10 ⁻⁹	2	(1-3)
12459	410.5	+2	26.5°C	15.6°C	nd	2	(14)
BRACO19	595.8	+2	22°C	11°C	6.3 x 10 ⁻⁸	2	(15)
BSU1051	608.8	+2	9°C	3.5°C	nd		(16)
PIPER	614.7	(+2)	23°C	16°C	nd	1-2	(17-19)

^a : Not taking into account possible counterions.

^b : Experimental conditions as in De Cian *et al.* (20) with the intramolecular G-quadruplex FAM-GGG(TTAGGG)₃-TAMRA for 1μM of ligand. Values are given with a precision of 1°C.

^c : K_d Dissociation constant of the ligand for 22AG quadruplexe except when notified by * (Ethidium – T₄G₄). Note that the experimental conditions used may vary.

^d : Stoichiometry (number of binding sites per quadruplex) found (by Mass spectrometry or titrations) or predicted (by molecular modeling).

^e : Examples of articles where the interaction of this molecule has been tested on quadruplex DNA; this list is not exhaustive.

Supplementary Figure S1: Formulae of the duplex/G-quadruplex ligands used in this study.

Supplementary Figure S2: Interaction of 360A and [PO₄-TG₃T]₄: CD spectra and melting experiment

A: CD spectra of PO₄-TG₃T at 25°C in 10mM lithium cacodylate pH 7.2, 110mM KCl for various conditions: black line: PO₄-TG₃T 20μM (G-quadruplex preformed at 1440 μM in 10mM Lithium Cacodylate pH 7.2, 110mM KCl at 4°C over a week); green triangles: PO₄-TG₃T 20μM (Preformed G-quadruplex) + 360A 5μM ; Light blue triangles: PO₄-TG₃T 20μM incubated overnight at 4°C with 5μM 360A; dark blue circles: PO₄-TG₃T 20 μM incubated 2 days at 4°C with 10 μM 360A ; red triangles : PO₄-TG₃T 20μM single-stranded.

B: Thermal denaturation of PO₄-TG₃T preformed G-quadruplex alone or induced G-quadruplex at 20 μM (strand concentration) by 360A after O/N incubation with 5 or 10μM 360A. CD signal is recorded at 260nm and normalized between 0 and 1: PO₄-TG₃T 20μM alone (preformed at higher concentration)(black diamonds) or induced with 5μM (light blue triangles) or 10 μM (dark blue triangles) 360A.

C: CD spectra as a function of temperature for the Phosphorylated TG₃T oligonucleotide alone (left) or in the presence of 10 μM 360A (right). The arrows show the direction of temperature increase.

Supplementary Figure S3: Isothermal differential spectra

A: Normalized isothermal difference (initial unfolded state minus final, associated state) for

the TG₃T oligonucleotide 5'OH (black circles) or 5'phosphate (red triangles). Experimental conditions : spectra of TG₃T (100 μ M) and PO₄-TG₃T (300 μ M) in 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2), KCl 110 mM buffer are recorded at 4°C immediately after heat denaturation (*unfolded* state) and after overnight kinetics at 4°C (*associated* state).

B: Normalized isothermal difference (initial unfolded state minus final, associated state) for the TG₃T oligonucleotide alone (black circles) or in the presence of various concentrations of ligand (blue curves). Note the positive signal in the visible region, showing that the absorbance properties of the dyes are affected when bound to the quadruplex. Contribution of ligand binding in the UV region modifies the amplitude of the main peaks without changing their characteristic wavelengths. The overall architecture is likely to be a G-quadruplex as also suggested by circular dichroism spectra. Experimental conditions: spectra of TG₃T at 100 μ M when alone, or at 10 μ M in presence of 360A at 2.5, 5 and 10 μ M are recorded at 4°C, in 10 mM lithium cacodylate (pH 7.2), KCl 110 mM buffer, immediately after heat denaturation (*unfolded* state) and after overnight kinetics at 4°C (*associated* state).

Supplementary Figure S4: Comparison of [TG₃T]₄ and [PO₄-TG₃T]₄ association and dissociation

A: Gel quantification of the single-stranded fraction using UV-shadow (red triangles: TG₃T (**Fig. 3E** and **Fig. 2**) ; grey squares: PO₄-TG₃T) or radioactive detection (black diamonds: PO₄-TG₃T) ; k_{on} values are calculated using a fourth order model (21).

B: Effect of KCl concentration on association rate of 5'-OH (red circle) and 5' phosphate (black diamonds) oligonucleotides.

C: Effect of KCl concentration on thermal stability ($T_{1/2}$ value) of 5'-OH (red circle) and 5' phosphate (black diamonds) G-quadruplexes. G-quadruplexes were preformed at high

concentration (800 μ M) over night in Lithium cacodylate 10 mM pH 7.2 and 110 mM (for 30 mM, 50 mM and 110 mM experiments), 300 mM or 500 mM KCl. The corresponding buffer was then added to reach the convenient KCl final concentration and about 20 μ M in DNA (strand concentration).

Supplementary Figure S5: Interaction of 360A with [PO₄-TG₃T]₄: fluorescence quenching.

Fluorescence titration of 360A by [PO₄-TG₃T]₄ or PO₄-TG₃T at 4°C in Lithium Cacodylate pH 7.2, KCl 110mM. Left panel: 360A (0.6 μ M) fluorescence spectra for excitation at 320nm in presence of increasing amounts of [PO₄-TG₃T]₄ (G-quadruplex preformed at high concentration in the same buffer); central panel: 360A (0.5 μ M) fluorescence spectra for excitation at 320nm in presence of increasing amounts of single stranded PO₄-TG₃T; right panel: integrated fluorescence normalized to the fluorescence of 360A alone as a function of PO₄-TG₃T molar equivalent (lower X-axis ; blue circles) or [PO₄-TG₃T]₄ molar equivalent (upper X-axis ; black triangles).

Supplementary Figure S6: Effect of 360A on other sequences.

A: Association kinetics of [T₂AG₃]₄ incubated at 4°C at a strand concentration of 200 μ M or 100 μ M in absence or presence of 360A at 10 and 25 μ M.

B: Association kinetics of [T₂AG₃T]₄ incubated at 4°C at a strand concentration of 100 μ M in absence or presence of 360A at 10, 25 and 50 μ M.

Both kinetics are performed in 10 mM Lithium Cacodylate pH 7.2, 110 mM KCl buffer. Products are resolved by a 20% native acrylamide gel electrophoresis performed at 4°C

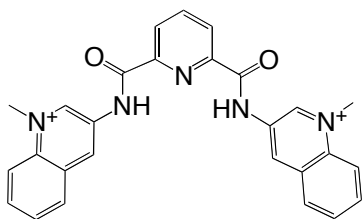
containing 1X TBE and 20 mM KCl, and detected by UV shadow at 254 nm.

C: lane 1-5: Association of $[T_2G_5T_2]_4$ at 100 μ M strand concentration in 10mM Lithium cacodylate pH 7.2, 110 mM NaCl buffer after 1hour of incubation at 4°C in presence of various concentration of 360A. Lane 6-10: preformed G-quadruplex $[T_2G_5T_2]_4$ in absence or presence of various concentrations of 360A. The gel-shift of the G-quadruplex induced by the ligand 360A (lanes 2-5) is nearly identical to the one of the preformed G-quadruplex bound to 360A (lane 7-10).

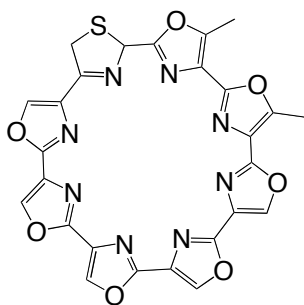
References:

1. Lemarteleur, T., Gomez, D., Paterski, R., Mandine, E., Mailliet, P. and Riou, J.-F. (2004) Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **323**, 802-808.
2. Pennarun, G., Granotier, C., Gauthier, L.R., Gomez, D., Hoffschir, F., Mandine, E., Riou, J.F., Mergny, J.L., Mailliet, P. and Boussin, F.D. (2005) Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene*, **24**, 2917-2928.
3. Granotier, C., Pennarun, G., Riou, L., Hoffschir, F., Gauthier, L.R., DeCian, A., Gomez, D., Mandine, E., Riou, J.F., Mergny, J.L. *et al.* (2005) Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucl Acid Res*, **33**, 4182-4190.
4. Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. (2001) Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1262-1263.
5. Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-ya, K., Wierzba, K. and Hurley, L.H. (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2098-2099.
6. Kim, M.Y., Gleason Guzman, M., Izbecka, E., Nishioka, D. and Hurley, L.H. (2003) The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer Res.*, **63**, 3247-3256.
7. Izbecka, E., Wheelhouse, R.T., Raymond, E., Davidson, K.K., Lawrence, R.A., Sun, D.Y., Windle, B.E., Hurley, L.H. and VonHoff, D.D. (1999) Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res.*, **59**, 639-644.
8. Han, F.X.G., Wheelhouse, R.T. and Hurley, L.H. (1999) Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with quadruplex DNA. Structural basis for the differential effects on telomerase inhibition. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 3561-3570.
9. Han, H., Langley, D.R., Rangan, A. and Hurley, L.H. (2001) Selective Interactions of Cationic Porphyrins with G-Quadruplex Structures. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8902-8913.

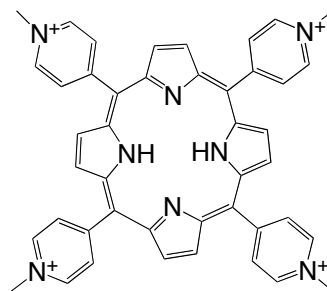
10. Wei, C., Jia, G., Yuan, J., Feng, Z. and Li, C. (2006) A spectroscopic study on the interactions of porphyrin with G-quadruplex DNAs. *Biochemistry*, **45**, 6681-6691.
11. Guo, Q., Lu, M., Marky, L.A. and Kallenbach, N.R. (1992) Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats. *Biochemistry*, **31**, 2451-2455.
12. Koeppel, F., Riou, J.F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P.B., Labit, D., Petigenet, O., Hélène, C. and Mergny, J.L. (2001) Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1087-1096.
13. Rosu, F., Pauw, E.D., Guittat, L., Alberti, P., Lacroix, L., Mailliet, P., Riou, J.-F. and Mergny, J.-L. (2003) Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes. *Biochemistry*, **42**, 10361-10371.
14. Riou, J.F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Petigenet, O., Megnin-Chanet, F., Hélène, C. and Mergny, J.L. (2002) Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2672-2677.
15. Read, M., Harrison, R.J., Romagnoli, B., Tanious, F.A., Gowan, S.H., Reszka, A.P., Wilson, W.D., Kelland, L.R. and Neidle, S. (2001) Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4844-4849.
16. Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Hurley, L.H. (1997) Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.*, **40**, 2113-2116.
17. Han, H.Y., Cliff, C.L. and Hurley, L.H. (1999) Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule. *Biochemistry*, **38**, 6981-6986.
18. Kern, J.T., Thomas, P.W. and Kerwin, S.M. (2002) The relationship between ligand aggregation and G-quadruplex DNA selectivity in a series of 3,4,9,10-perylenetetra-carboxylic acid diimides. *Biochemistry*, **41**, 11379-11389.
19. Kerwin, S.M., Chen, G., Kern, J.T. and Thomas, P.W. (2002) Perylene diimide G-quadruplex DNA binding selectivity is mediated by ligand aggregation. *Bioorg Medicinal Chem Letter*, **12**, 447-450.
20. De Cian, A., Guittat, L., Kaiser, M., Saccà, B., Amrane, S., Bourdoncle, A., Alberti, P., Teulade-Fichou, M.P., Lacroix, L. and Mergny, J.L. (2007) Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods*, **in press**.
21. Mergny, J.L., De Cian, A., Ghelab, A., Saccà, B. and Lacroix, L. (2005) Kinetics of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 81-94.



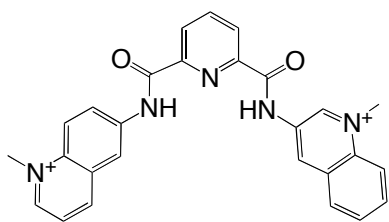
360A



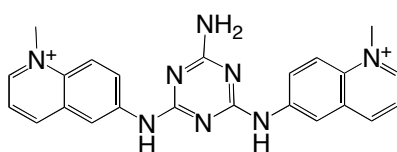
Telomestatin



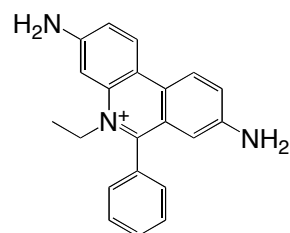
TMPyP4



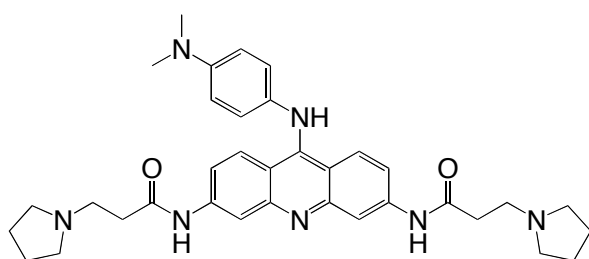
307A



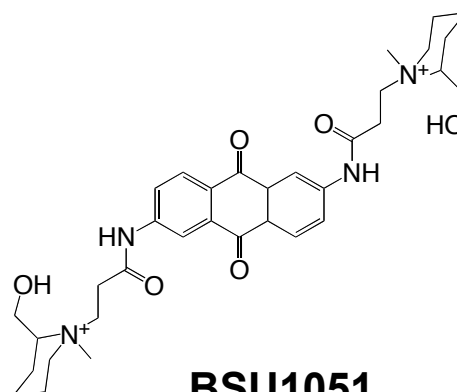
12459



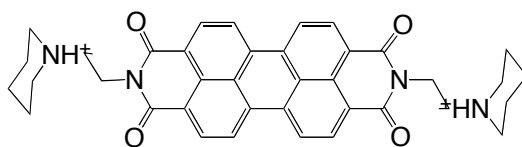
EtBr



BRACO19

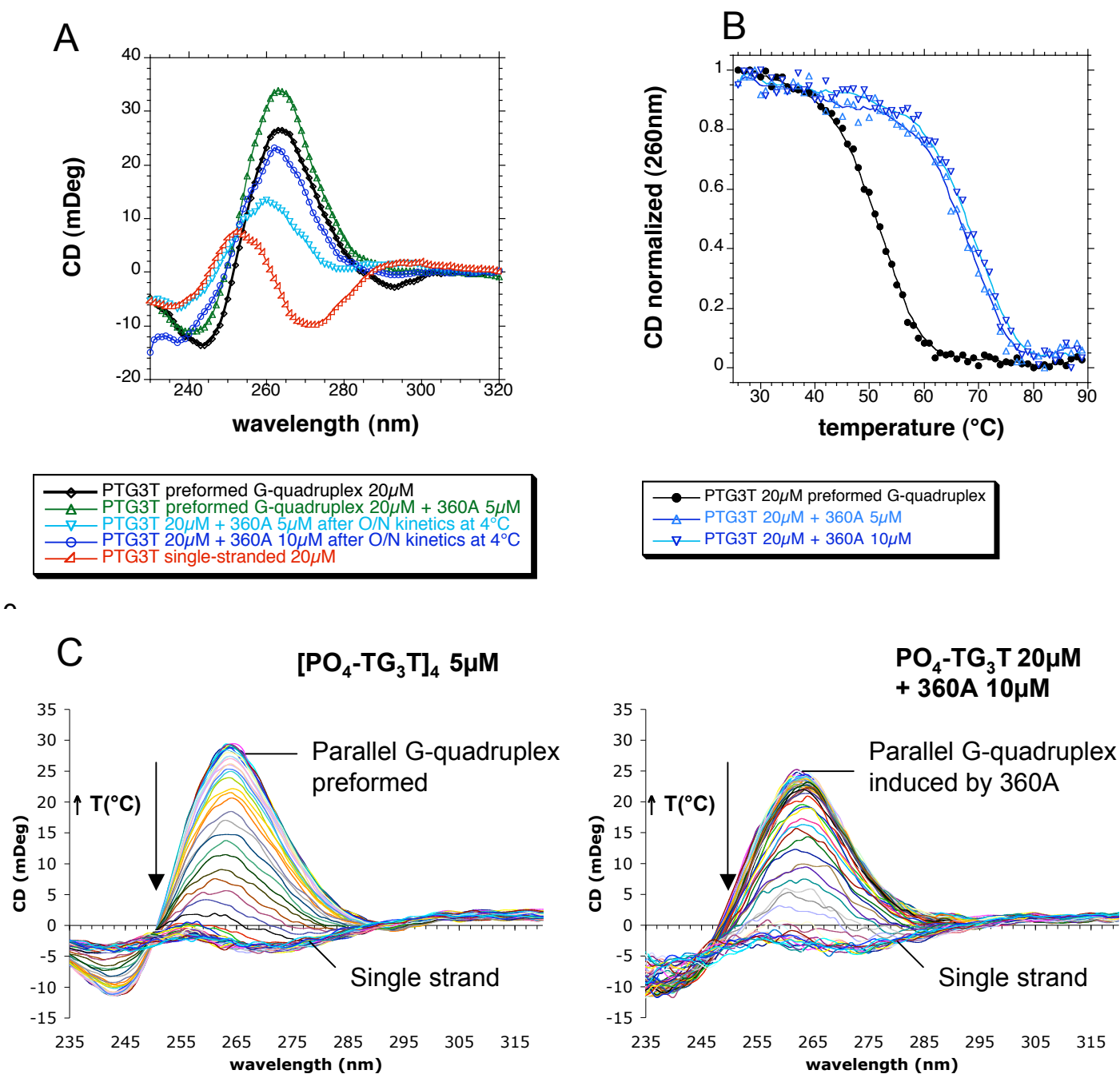


BSU1051



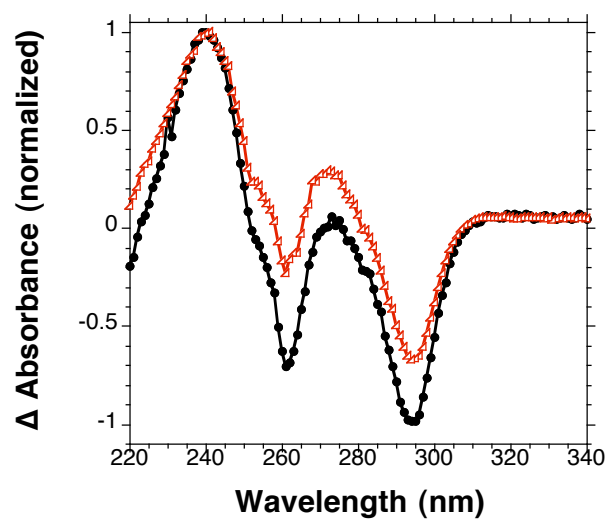
PIPER

Supplementary Figure S1

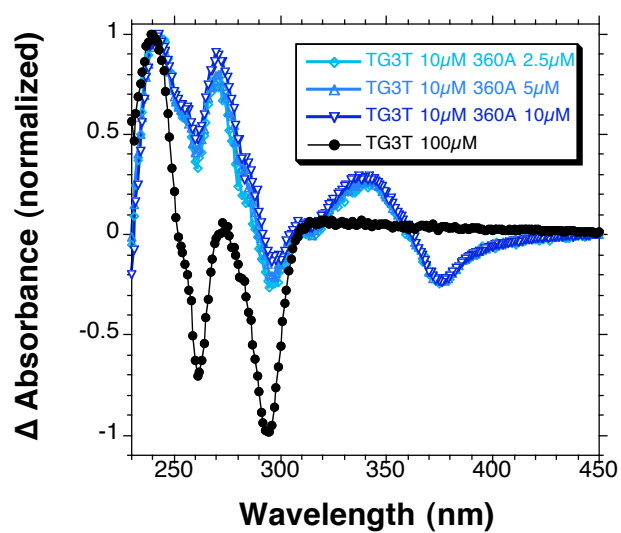


Supplementary Figure S2

A

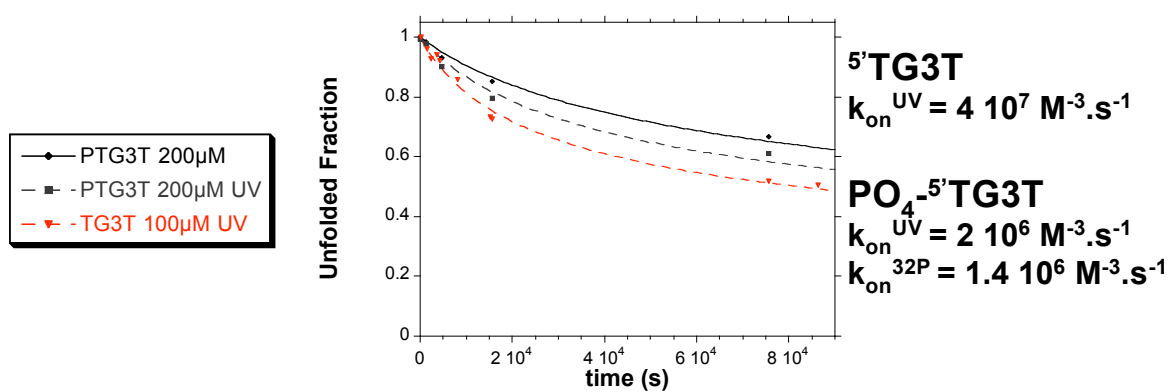


B

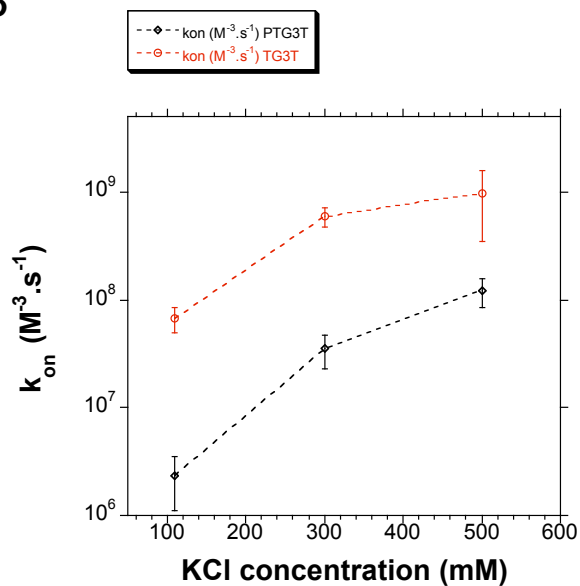


Supplementary Figure S3

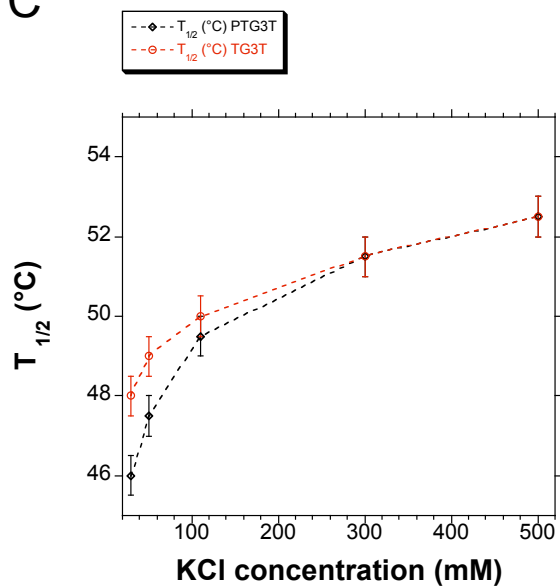
A



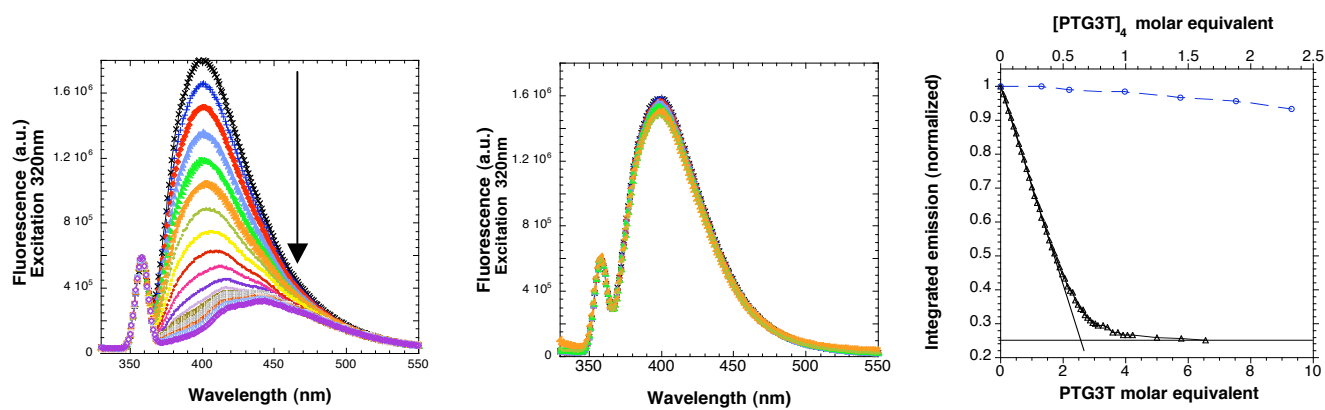
B



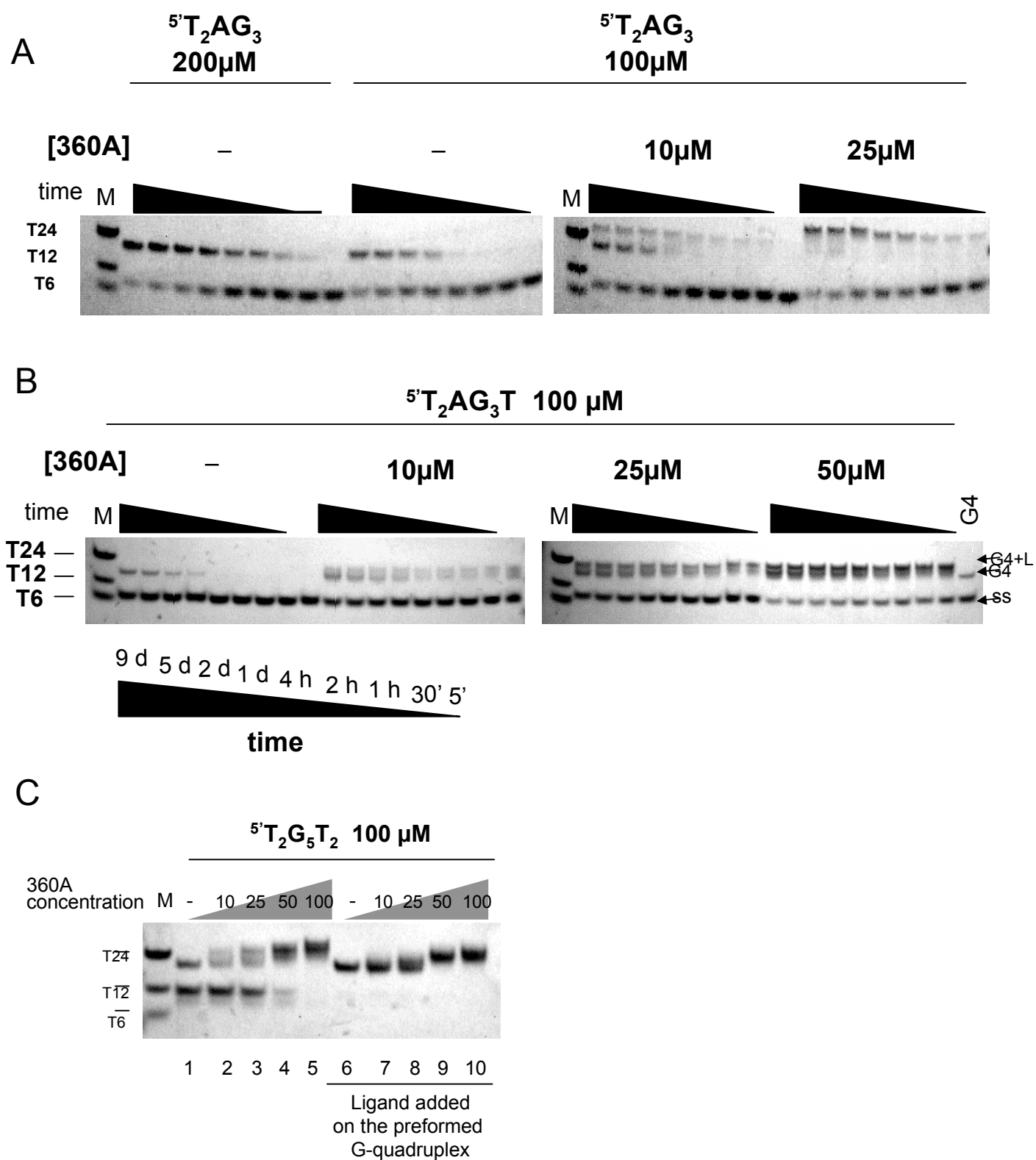
C



Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S5



Supplementary Figure S6

4 Données complémentaires

Au cours de cette étude, nous avons identifié les dérivés N-méthylbisquinolinium comme des ligands très affins des G-quadruplexes. Étant donné leur similarité structurale avec les ligands bisquinolinium pyridodicarboxamides **307A** et **360A**, nous avons supposé que leurs effets vis-à-vis de l'induction de G-quadruplexe tétramoléculaires pouvaient être identiques voire même supérieurs.

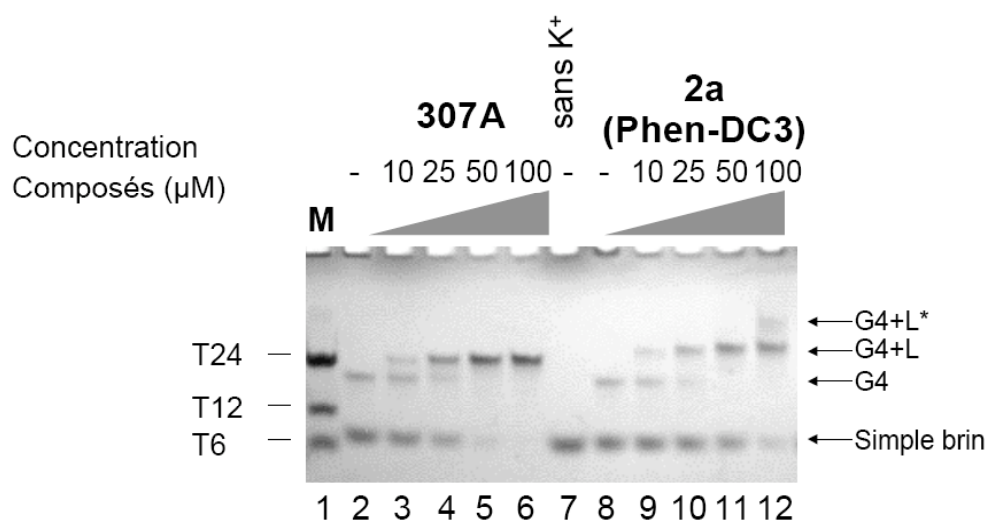


Figure 33 : Induction du G-quadruplexe tétramoléculaire $[TG_3T]_4$ par le dérivé bisquinolinium phénanthroline dicarboxamide **2a :**

L'oligonucléotide TG_3T est dénaturé à 90°C pendant 5 minutes avant incubation à 100 μM en brin dans le tampon Li Cacodylate 10 mM (pH 7,2), 110 mM KCl pendant 4h30 à 4°C, en absence (ligne 2 et 8) ou présence des différentes concentrations en composés **307A** (lignes 3-6) ou **2a** (lignes 9-12). Les échantillons sont résolus sur un gel natif de polyacrylamide 20% et visualisés par "UV shadow" à 254 nm. Ligne 1 : M : marqueurs de taille ${}^5'dT_6$, ${}^5'dT_{12}$, ${}^5'dT_{24}$. Ligne 7 : incubation en absence de potassium et de composé.

Comme le montre la Figure 33, le composé **2a** (ou **Phen-DC3**) présente, certes, un effet inductif à la plus haute concentration, mais celui-ci reste inférieur à celui observé pour les dérivés pyridine. De plus, à 100 μM , une deuxième bande retardée apparaît. Il est difficile de savoir si celle-ci correspond à une dimérisation du G-quadruplexe, à la formation d'un autre type de complexe à forte concentration en ligand ou au retard résultant de l'apparition du complexe 2 : 1. La dernière hypothèse paraît moins probable étant donné que celui-ci devrait pouvoir être visualisé dès que la stoechiométrie 2 : 1 est atteinte (ligne 11, Figure 33).

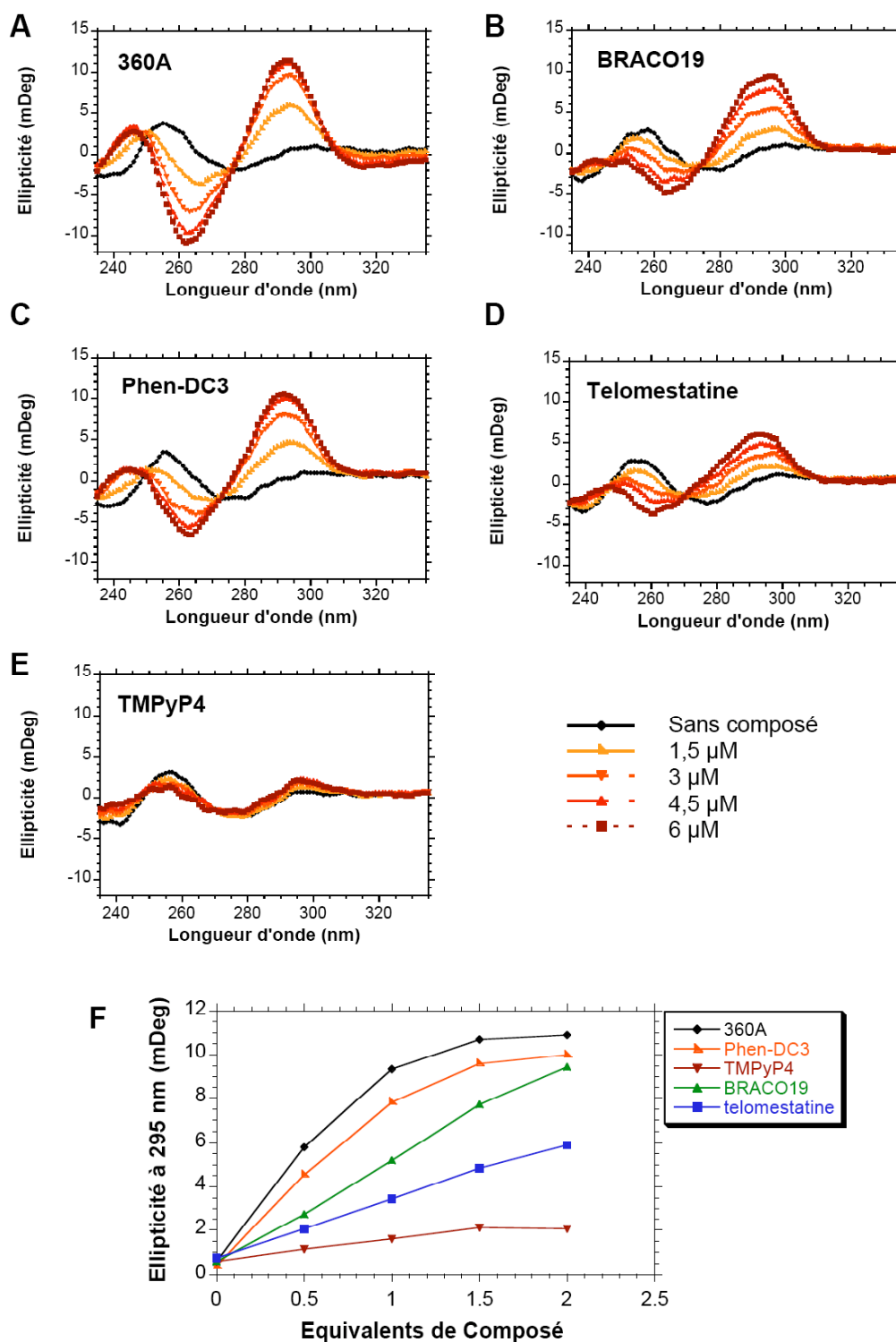


Figure 34 : Induction d'un G-quadruplexe intramoléculaire à partir d'un oligonucléotide non structuré

Effet des ligands 360A (A), BRACO19 (B), Phen-DC3 (C), télomestatine (D) et TMPyP4 (E). Les spectres de dichroïsme circulaire de l'oligonucléotide 22AG (3 μM) sont mesurés dans des cuves de 1 cm de parcours optique, dans le tampon Li Cacodylate 10 mM, pH 7,2 à 37°C, en absence (courbe noire) ou présence de 1,5 – 3 – 4,5 et 6 μM de ligand. (F) Augmentation de l'ellipticité à 295 nm en présence des différents ligands. Notons que dans ce tampon, à température ambiante, un signal CD positif à 295 nm est observé, suggérant une légère structuration de l'oligonucléotide en présence de Li^+ (9 mM).

5 Discussion : Chapitre III

En comparant ces résultats à ceux obtenus dans l'**article 3** pour l'autre dérivé bisquinolinium, le composé **12459**, il semble donc que la présence de ces chaînes latérales chargées ne permette pas d'expliquer l'effet inductif considérable observé avec **307A** et **360A**. Le cœur pyridodicarboxamide semble donc jouer un rôle essentiel dans l'augmentation du k_{on} . Une étude approfondie par RMN sur le mode d'interaction au cours de l'induction et sur des G-quadruplexes préformés pourrait apporter des réponses à ce sujet. En outre, une meilleure compréhension de ce type de mécanisme pourrait également permettre d'ouvrir de nouvelles voies pour le développement de ligands de G-quadruplexes encore plus actifs. Inversement, si l'on souhaite disposer d'une sonde structurale capable de révéler la présence de G-quadruplexes, il serait préférable de ne pas utiliser une molécule capable d'induire rapidement ces structures.

Parmi les ligands testés, seul quelques-uns semblent accélérer significativement l'association d'un G-quadruplexe tétramoléculaire, indiquant que les effets stabilisants des ligands peuvent différer notablement, et que certains sont susceptibles d'agir sur l'association et/ou sur la dissociation du G-quadruplexe. Ces données sont néanmoins à prendre avec une certaine réserve puisque l'affinité pour la forme tétramoléculaire du G-quadruplexe peut différer d'un ligand à l'autre. Ainsi, si la plupart des ligands montrent des stabilisations du G-quadruplexe F21T en test FRET de près de +20°C chacun (cf. **article 4** Suppl. Table 1 et Figure 28), il est envisageable que certains composés aient des affinités plus modérées pour un G-quadruplexe tétramoléculaire. On peut en particulier s'interroger sur le cas de la **télomestatine**. En effet, Rezler *et al.* ont montré que la **télomestatine** pouvait induire un repliement en G-quadruplexe possédant des signaux caractéristiques du type "antiparallèle" en dichroïsme circulaire, à partir d'un oligonucléotide non structurés (sans cation) [289]. Cet effet inducteur peut-il être relié à un effet sur l'association et/ou la dissociation du G-quadruplexe ? En réalité, les étapes d'association et de dissociation du G-quadruplexe n'étant pas traitées séparément, il n'est pas possible de conclure. En revanche, nous avons réalisé cette expérience sur d'autres ligands pour voir si ceux qui présentaient des effets importants sur le k_{on} pouvaient également permettre cette induction de repliement en G-quadruplexe intramoléculaire à partir d'un oligonucléotide non structuré (Figure 34). Dans des conditions où l'oligonucléotide 22AG n'est pas structuré en G-quadruplexe (37°C, dans la tampon Li Cacodylate pH 7,2), l'ajout des ligands **360A**, **Phen-DC3**, **BRACO19** et la **télomestatine** induisent un repliement qui semble caractéristique d'un G-quadruplexe de type "antiparallèle". Seul **TMPyP4** semble incapable d'induire significativement de forme G-quadruplexe dans ces mêmes conditions. Un classement des ligands en fonction du signal induit à 295 nm peut être établi : **360A** > **Phen-DC3** > **BRACO19** > **télomestatine** > **TMPyP4**. De façon surprenante, un classement identique pourrait également être établi à partir de la formation de G-quadruplexe

tétramoléculaire en fonction de la concentration en ligand présenté figure 2 dans l'**article 4**, et Figure 33. L'effet d'accélération de l'association en G-quadruplexe par le ligand pourrait donc être à l'origine de l'induction d'une forme de G-quadruplexe intramoléculaire à partir d'un oligonucléotide initialement non structuré dans ces conditions expérimentales. Ceci reste néanmoins une hypothèse, puisque cette expérience sur un G-quadruplexe intramoléculaire ne nous permet pas d'accéder aux informations cinétiques de formation et dissociation de la structure. En revanche elle peut être indicatrice de l'affinité importante de ces ligands dans de telles conditions puisqu'ils sont capable de déplacer l'équilibre vers la formation de G-quadruplexes. La pertinence d'une étude d'interaction ADN / ligand dans des conditions de force ionique si faible est toutefois discutable. En effet, il est envisageable que les interactions électrostatiques non spécifiques soient exacerbées dans de telles conditions, pouvant conduire à des conclusions quelque peu hâtives sur l'affinité de ces ligands pour les G-quadruplexes. De façon remarquable, la conformation de G-quadruplexe induite en spectre CD en l'absence de sels est proche de celle que nous avons observée en présence d'ion potassium dans le chapitre précédent (cf. : § II. 4.2.3). Par contre nous n'avons pas encore vérifié si les conformations induites en présence de ligand et absence de sel correspondaient aux formes les plus stables (superposition des courbes à celles obtenues après dénaturation / renaturation).

Chapitre IV. Inhibition de la télomérase par des ligands de G-quadruplexes

1 Introduction

La découverte de l'inhibition de la télomérase par un composé pouvant stabiliser les structures en G-quadruplexe, en 1997 [260], a donné lieu au développement de nombreux ligands. Bien que les premiers ligands comme **BSU1051**, **TMPyP4** et **PIPER** aient été testés en test direct d'élongation par la télomérase, l'utilisation d'un test plus sensible et facile à mettre en œuvre, le test TRAP, s'est rapidement imposée pour évaluer la capacité des composés à inhiber l'activité d'élongation de l'enzyme. Or, ce test fait intervenir une étape d'amplification des produits télomériques par PCR. Alors que Lemarteleur *et al* [331], Patel *et al* [332] ou encore certaines expériences préliminaires sur le composé **Phen-DC3** (Suppl. Fig. 11, **article 3**) ont montré que l'amplification par PCR sur des séquences pouvant former des G-quadruplexes était inhibée en présence de ligand, on peut s'interroger sur la réelle contribution des ligands à l'inhibition de la télomérase détectée dans un test TRAP.

Afin de clarifier ce point auprès de la communauté scientifique étudiant les G-quadruplexes et les propriétés des ligands se liant à ces structures, nous avons étudié plus en détail l'effet de certains ligands sur l'activité d'élongation par la télomérase, dans un test direct d'extension d'amorce. Une collaboration et un court séjour dans le laboratoire de Joachim Lingner, à l'ISREC en Suisse, m'ont permis de réaliser une série d'expérience avec des extraits enrichis en télomérase, par surexpression transitoire de hTERT et hTR dans des cellules HEK 293T. La production de ces extraits "supertélomérase", initiée par Gaël Cristofari, permet en effet de visualiser directement l'élongation d'une amorce par la télomérase, en absence d'étape supplémentaire d'amplification par PCR, ou de purification supplémentaire de la télomérase à partir d'extraits cellulaires CHAPS. Nous avons, en outre, pu analyser avec précision l'effet des ligands sur la processivité de l'enzyme.

2 Article 5 : “Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanism of action”. Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (2007) :17347-52.

A. De Cian, G. Cristofari, P.Reichenbach, E. De Lemos, D. Monchaud, M-P. Teulade-Fichou, K. Shin-ya, L. Lacroix, J. Lingner, J-L Mergny,.

Résumé en français :

Les ligands de G-quadruplexes sont souvent considérés comme des inhibiteurs de télomérase. Étant donné l’entrée en phase d’essais cliniques de certaines de ces molécules, il est important d’établir la validité de cette assertion. Afin d’analyser les effets de ces composés, nous avons utilisé un test direct d’élongation d’amorce en utilisant des extraits enrichis en activité télomérase. La comparaison de l’effet de ligands de diverses familles chimiques a montré d’importantes différences en termes d’effets sur l’initiation de la télomérase et sur sa processivité. Certes la plupart des ligands doivent effectivement stabiliser les séquences pouvant former des G-quadruplexes en des structures inhibant l’initiation de l’élongation par la télomérase. Néanmoins, l’analyse des étapes successives de l’élongation a montré que seules quelques molécules avaient la capacité d’interférer avec la processivité de la télomérase, c’est-à-dire, inhiber l’élongation une fois qu’une ou plusieurs répétitions ont été ajoutées. La démonstration que ces molécules sont en réalité de meilleurs inhibiteurs de l’*amplification* de l’ADN télomérique que de l’*extension* par la télomérase, renforce l’idée que les ligands de G-quadruplexes ne sont pas de simples inhibiteurs de télomérase, mais constituent davantage une classe différente de molécules biologiquement actives. Nous avons également montré que le très populaire test TRAP est totalement inapproprié pour la détermination de l’inhibition de la télomérase par des ligands de G-quadruplexes, même lorsque des contrôles de PCR sont inclus. En conséquence, l’effet inhibiteur de la télomérase de nombreux ligands de G-quadruplexes a été largement surestimé.

Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action

Anne De Cian^{*†‡}, Gael Cristofari^{§¶}, Patrick Reichenbach[§], Elsa De Lemos^{||}, David Monchaud^{||}, Marie-Paule Teulade-Fichou^{||}, Kazuo Shin-ya^{**}, Laurent Lacroix^{*†‡}, Joachim Lingner[§], and Jean-Louis Mergny^{*†‡††}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U565, F-75231 Paris Cedex 05, France; [†]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5153, F-75231 Paris Cedex 05, France; [‡]Régulation et Dynamique des Génomes, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM 503, 43 Rue Cuvier, CP26, F-75231 Paris Cedex 05, France; [§]Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC) and National Center of Competence in Research "Frontiers in Genetics," Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Chemin des Boveresses 155, CH-1066 Epalinges s/Lausanne Switzerland; ^{||}Institut Curie, Section Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 176, Centre Universitaire Paris XI, Bât. 110, 91405 Orsay, France; and ^{**}Chemical Biology Team, Biological Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo Waterfront Bio-IT Research Building 2-42 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan

Edited by Thomas R. Cech, Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD, and approved September 10, 2007 (received for review August 7, 2007)

Quadruplex ligands are often considered as telomerase inhibitors. Given the fact that some of these molecules are present in the clinical setting, it is important to establish the validity of this assertion. To analyze the effects of these compounds, we used a direct assay with telomerase-enriched extracts. The comparison of potent ligands from various chemical families revealed important differences in terms of effects on telomerase initiation and processivity. Although most quadruplex ligands may lock a quadruplex-prone sequence into a quadruplex structure that inhibits the initiation of elongation by telomerase, the analysis of telomerase-elongation steps revealed that only a few molecules interfered with the processivity of telomerase (i.e., inhibit elongation once one or more repeats have been incorporated). The demonstration that these molecules are actually more effective inhibitors of telomeric DNA amplification than extension by telomerase contributes to the already growing suspicion that quadruplex ligands are not simple telomerase inhibitors but, rather, constitute a different class of biologically active molecules. We also demonstrate that the popular telomeric repeat amplification protocol is completely inappropriate for the determination of telomerase inhibition by quadruplex ligands, even when PCR controls are included. As a consequence, the inhibitory effect of many quadruplex ligands has been overestimated.

G-quadruplex | telomere | telomeric repeat amplification protocol assay | direct assay

The unlimited proliferative potential of cancer cells depends on telomere maintenance (1). As a consequence, several classes of telomerase inhibitors have been developed for anticancer purposes. Optimal telomerase activity requires an unfolded single-stranded telomeric overhang (2–4). This overhang may adopt an unusual DNA structure called a G-quadruplex, composed of G-quartets and formed in the presence of cations (5). Therefore, ligands that selectively bind to and stabilize telomeric G-quadruplex structures could act as indirect telomerase inhibitors (Fig. 1A) (6). The number of identified G-quadruplex ligands has grown rapidly over the past few years (for a recent review, see ref. 7); some of these molecules exhibit potent *in vivo* antitumor activity, and clinical trials started recently.

Although various methods are available to measure telomerase activity, the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) is most widely used (8). With a few notable exceptions (6, 9–12), TRAP [or a variant called TRAP-G4 (13)] has been the standard method to measure telomerase inhibition by G-quadruplex ligands (reviewed in ref. 7). The original method was improved by the use of an internal control (often called ITAS for internal telomerase assay standard) that coamplifies with the telomerase products and allows the detection of nonspecific *Taq* polymerase inhibitors. Notably, the ITAS product does not contain any telomeric sequence and therefore is not able to form a G-quadruplex (5, 14). We demonstrate here that TRAP is inappropriate for the determina-

tion of telomerase inhibition by quadruplex ligands, because these molecules interfere with the PCR of a sequence able to form a G-quadruplex but leave the internal control unaffected. As a consequence, the use of a direct, also called a primer extension, assay is required to measure telomerase inhibition. In contrast to TRAP, this approach not only provided information on the total activity, but also allowed us to analyze specific steps of the telomerase reaction, such as elongation and initiation.

Results

Telomerase Inhibition by G-Quadruplex Ligands Cannot Be Determined by TRAP. TRAP is a two-step assay. In the first step, telomerase is allowed to elongate an oligonucleotide substrate. In the second step, PCR is used to amplify the elongation product. We hypothesized that G-quadruplex ligands might inhibit the PCR step rather than the telomerase-elongation step. We compared inhibition profiles when compound was added before the elongation reaction or just before PCR [full protocols are provided in [supporting information \(SI\) Text](#)]. Fig. 2 shows the result of this experiment carried out with known G-quadruplex ligands (structures shown in Fig. 1B). The IC₅₀s for compound addition before step 1 or before step 2 are reported in Table 1. Strikingly, for all of the compounds tested, inhibition occurred whether the ligand was added before or after telomerase extension. This observation was independent of the nature of the cellular extracts used; data using A431 CHAPS extracts are given in [SI Fig. 7](#). These experiments unambiguously demonstrate that inhibition determined by TRAP in the presence of G-quadruplex ligands was not due to telomerase inhibition. For ligands such as telomestatin (15), Phen-DC3 (16), and 360A (17), the amplification of telomeric products was inhibited but amplification of the internal control that does not form a quadruplex was not.

Telomerase Inhibition by G-Quadruplex Ligands by Using the Telomeric Substrate (TAGGG)₃. We then directly evaluated telomerase activity using highly active CHAPS extracts from HEK293T cells

Author contributions: G.C., J.L., and J.-L.M. designed research; A.D.C., G.C., and P.R. performed research; E.D.L., D.M., M.P.T.-F., K.S.-y., and J.L. contributed new reagents/analytic tools; A.D.C., G.C., L.L., and J.L. analyzed data; and A.D.C. and J.-L.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: ITAS, internal telomerase assay standard; TRAP, telomere repeat amplification protocol.

[†]Present address: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, F-69364 Lyon, France.

^{††}To whom correspondence should be addressed. E-mail: mergny@mnhn.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0707365104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

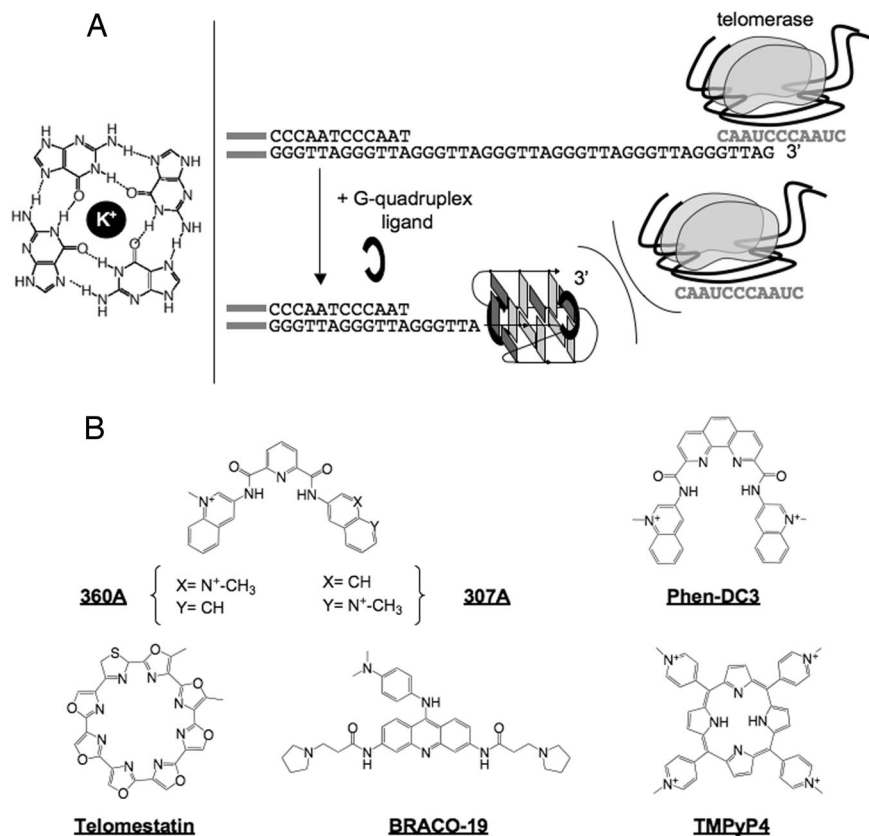


Fig. 1. Telomerase inhibition by G-quadruplex ligands. (A) Schematic drawing of a G-quartet (*Left*) and illustration of indirect telomerase inhibition by G-quadruplex stabilizing agents at telomeres (*Right*). (B) Structure of G-quadruplex ligands used in this study.

that transiently overexpress hTR and hTERT (18). Telomerase activity was directly visualized upon extension of an oligonucleotide, Telo3R, containing three telomeric repeats 5'-

(TTAGGG)_{3-3'} in the presence of [α -³²P]dGTP. Data for various G-quadruplex ligands are shown in Fig. 3, and IC₅₀ values are reported in Table 1. For all ligands studied, the IC₅₀ values ranged

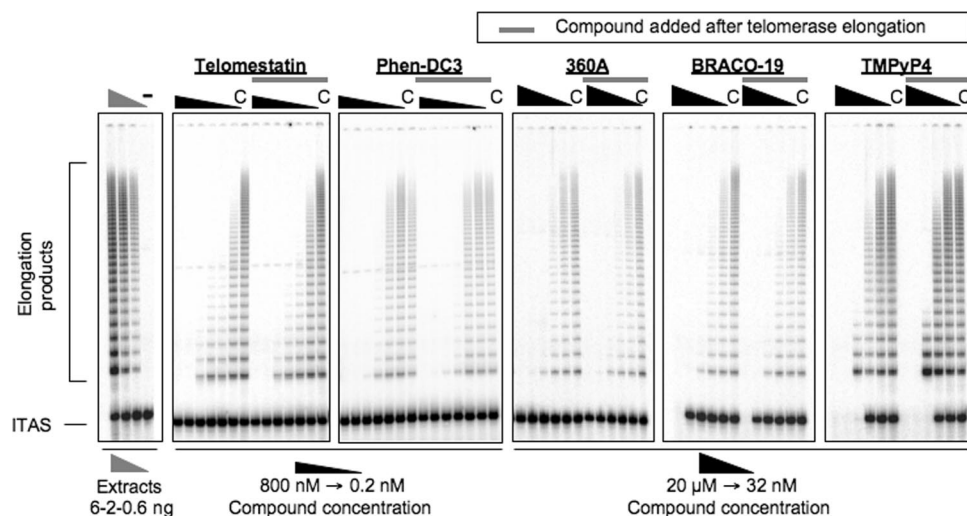


Fig. 2. Inhibition of TRAP by G-quadruplex ligands. Telomerase activity was evaluated by TRAP in 6, 2, 0.6, and 0 ng of CHAPS extracts (gray slope) from HEK 293T cells that transiently express hTR and hTERT by using incorporation of [α - 32 P]dCTP. TRAP was then carried out with 2 ng of extract and various concentrations of compound: the black slope corresponds to serial 5-fold dilutions of compound starting from 800 nM to 0.2 nM for telomestatin and ligand Phen-DC3 and from 20 μ M to 32 nM for 360A, BRACO-19, and TMPyP4. C, the final concentration of the solvent used for the dilutions. Ligand was either added during or after (indicated by thick gray bars) the telomerase elongation step (for 15 min at 30°C) to investigate the ligand effect on the PCR amplification of telomeric G-quadruplex-prone sequences. Products were resolved on a 7.5% denaturing PAGE. The control (ITAS) was PCR amplification of the 36-nt TSNT oligonucleotide. TMPyP4 likely inhibited PCR amplification because amplification of ITAS was inhibited, even at concentrations lower than required for the total disappearance of telomeric products.

Table 1. IC₅₀s determined by TRAP and direct assay for telomestatin, Phen-DC3, 360A, BRACO-19, and TMPyP4

Compound	IC ₅₀ TRAP, nM*		IC ₅₀ Direct assay, nM*		
	Compound added before [†]	Compound added after [‡]	Primer (T ₂ AG ₃) ₃	Primer TS	Primer (T ₂ AG ₃) ₄
Telomestatin	0.64 [0.1–1.2]	0.7 [0.2–1.2]	900 ± 500	1,150 [1,040–1,260]	58 ± 17
Phen-DC3	1.5 [0.4–2.6]	2.2 [1.8–2.5]	790 ± 10	1,500 [1,360–1,590]	63 [55–72]
360A	52 [28–75]	63 [9–117]	5,600 ± 1,300	8,400	45 [39–52]
BRACO-19	45 [30–60]	65 [33–98]	830	ND	ND
TMPyP4	550 [103–1,030]	740 [566–913]	710	ND	ND

ND, not done.

*IC₅₀ values are usually the mean of three independent experiments and are given $\pm$ SD. When only two independent experiments were done, mean IC₅₀ values are given, and independent values are given in brackets.

[†]Compound added before the telomerase elongation step.

[‡]Compound added after the telomerase elongation step and prior to PCR amplification.

from 0.7 to 5.6 μM ; 360A was the least potent. However, as already noted by Hurley and coworkers (19), the IC_{50}s derived from this type of direct assay depend on the assay conditions and primer concentration. We chose here a Telo3R concentration only slightly above the apparent K_m of telomerase in these extracts. In particular, the IC_{50} value found for TMPyP4, the only drug herein that was previously tested in direct assays, was ≈ 10 -fold lower than the one found by Wheelhouse and coworkers (10), who used 1 μM primer. Under all conditions, the IC_{50} values found in the direct assay were higher than those measured by TRAP using the same CHAPS extracts (differences were up to 500- to 1,000-fold with telomestatin and Phen-DC3).

G-Quadruplex Ligands Inhibit Telomerase by Several Different Mechanisms. In addition to allowing determination of whether agents directly inhibit telomerase, the direct assay has another important advantage over TRAP: It provides information on length and the amounts of products generated. The PCR step may well lead to a variation in the number of repeats as a result of misalignment of the ACX primer. G-quadruplex formation is expected to block telomerase binding to its substrate (Fig. 1A); however, it is unclear whether compounds that induce G-quadruplex formation also

affect telomerase during processive primer extension. To address this possibility, we quantified the elongation products generated with the direct assay carried out with primer Telo3R. The quantifications of experiments with four different compounds are shown in Fig. 4. SI Fig. 8.4 shows generated products and G-quadruplex forming possibilities and the results of a “classical” processivity determination are shown in SI Fig. 9. Forcing a line to fit these data resulted in a somewhat lower processivity as concentrations of Phen-DC3 or 360A increased. However, as discussed in the experimental section, this method of determining processivity assumes a constant probability of dissociation at each repeat, which is obviously not the case. We thus plotted the probability of elongation of a product P_n (Fig. 4) as a function of repeat number n . Without compound, the probability P_n ranged from 0.6 to 0.8, depending on the number of added repeats; the probability was lower for the three first additions than later additions. BRACO-19 or TMPyP4 did not alter significantly the probability profile in the concentration range studied, whereas telomestatin slightly increased the relative amounts of longer products. In contrast, Phen-DC3 and 360A induced a significant decrease in the probability of elongation at repeat numbers 2 and 3 (four to five stretches of GGG) and 6 and 7 (eight to nine stretches of GGG), consistent with the formation

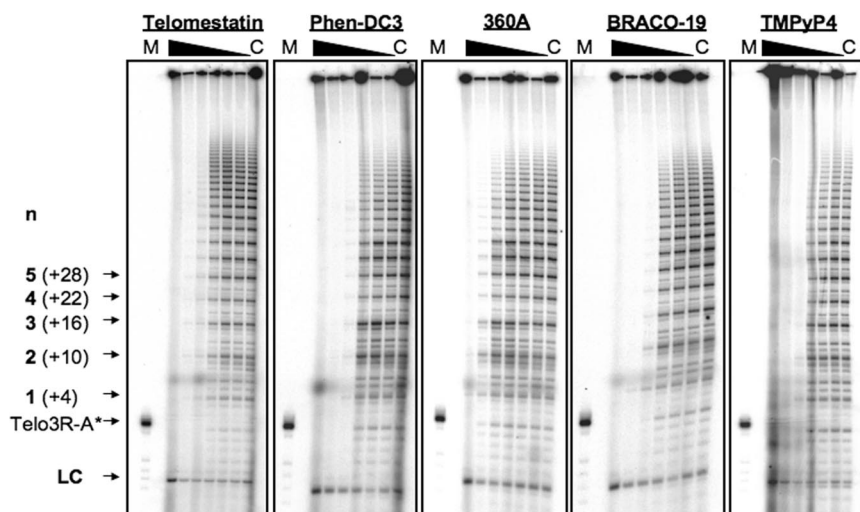
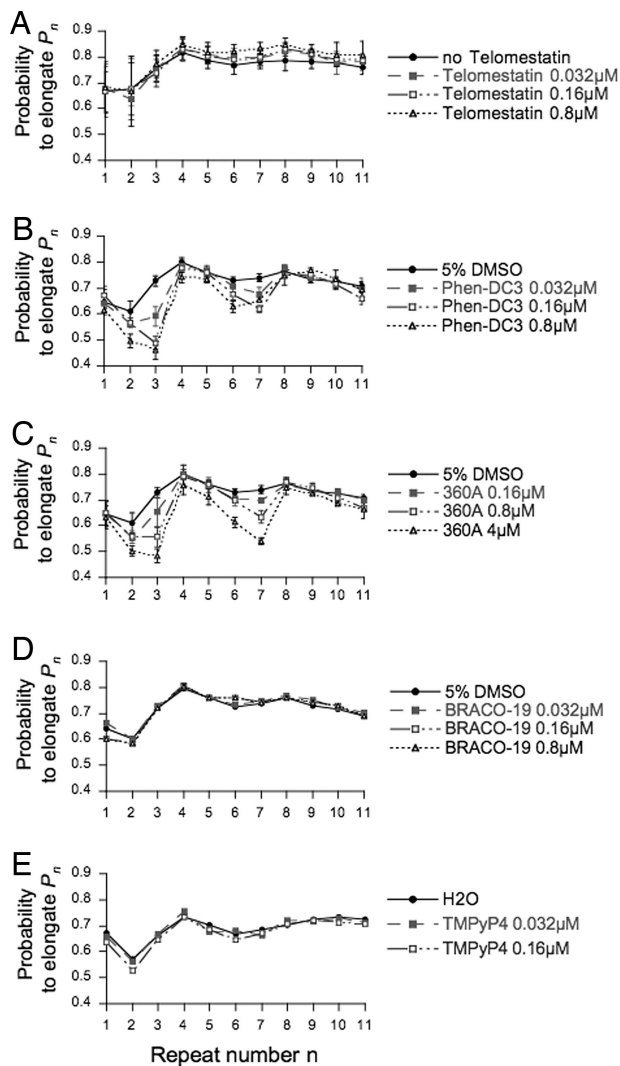


Fig. 3. Inhibition of telomerase elongation activity by G-quadruplex ligands. Direct assay for telomerase present in 2 μ g of CHAPS extracts from HEK 293T cells that transiently express hTR and hTERT were carried out with 35 nM primer Telo3R for 45 min at 30°C; incorporation of [α - 32 P]dGTP was measured in the presence of 5-fold serial dilutions of ligand from 100 μ M to 32 nM. C, the final concentration of the solvent used for the dilutions; M, size marker of the Telo3R primer radiolabeled at the 3' position with [α - 32 P]ddATP; LC, radiolabeled loading control (5'-dT₁₂-3') added before purification of the elongation products. Samples were resolved on 12% denaturing PAGE. *n* is the number of added repeats, corresponding to the addition of GGTTAG except on the first addition, when only TTAG is added. For primer Telo3R, *n* = 1 corresponds to a 22-nt product; products from additional elongation steps yield [22 + 6 (*n* - 1)] nt (SI Fig. 8A). The total activity corresponding to the elongation products was quantified and normalized to the activity in the control solvent indicated as C.



of one and two G-quadruplexes, respectively (SI Fig. 8.4). The tight binding of the G-quadruplex ligands, telomestatin, BRACO-19, and TMPyP4, did not reduce telomerase processivity but might affect initial primer binding. On the other hand, bisquinolinium derivatives 360A and Phen-DC3 reduced telomerase processivity, indicating that these ligands promote telomerase dissociation from its product during elongation.

Telomerase Inhibition by G-Quadruplex Ligands Depends on the Primer Substrate. We next addressed whether the inhibition by G-quadruplex-interacting compounds was truly related to G-quadruplex stabilization. The Telo3R primer can theoretically fold into an intramolecular G-quadruplex after the addition of a fourth run of G₃ (SI Fig. 8A). This may occur only after the second translocation of telomerase for Telo3R (i.e., at $n = 2$). Although shorter products may form intermolecular complexes (tetra- or bimolecular as shown in SI Fig. 8A), we assume that G-quadruplexes occurred only intramolecularly. A G-quadruplex-specific ligand should not have any effect before the two first

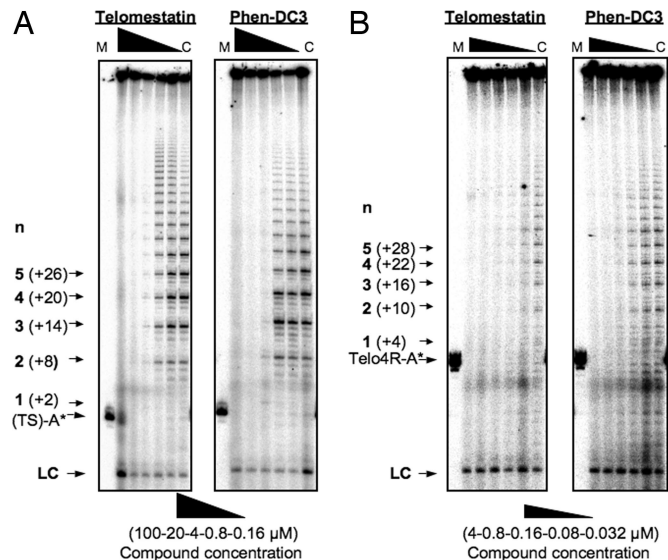


Fig. 5. Inhibition of the elongation activity of telomerase by G-quadruplex ligands on other primers. Direct assays for telomerase were carried out as described in the legend for Fig. 3 by using 35 nM primer TS (18 nt) (A) or G-quadruplex primer Telo4R (24 nt) (B) in the presence of serial dilutions of ligand from 100 μ M to 160 nM (A) and from 4 μ M to 32 nM (B). C, the final concentration of the solvent used for the dilutions; M, size marker for primer TS (A) or primer Telo4R (B) radiolabeled at the 3' position with [α - 32 P]ddATP; LC, a radiolabeled loading control (5'-dT $_{12}$ -3') added before purification of the elongation products. Samples were resolved on 12% denaturing PAGE. n is the number of added repeats, which corresponds to the addition of GGTTAG, except for the first addition, when only AG was added for primer TS or only TTAG was added for primer Telo4R. For primer TS, $n = 1$ corresponds to a 20-nt product that is not visible on this gel because it would result from a mismatched hybridization between the telomerase template and the substrate TS. The first visible band is thus a 26-nt product corresponding to the hybridization of telomerase to the three last nucleotides of TS (-GTT-3') and subsequent products are [20 + 6($n - 1$)] nt (SI Fig. 8B). For primer Telo4R, $n = 1$ corresponds to a 28-nt product and subsequent products are [28 + 6($n - 1$)] nt (SI Fig. 8C).

translocations. This was not the case with any of the ligands studied (Fig. 4). However, when using the Telo3R primer, we could not exclude the possibility that intermolecular structure formation stabilized by ligands prevented telomerase from elongation. Therefore, we evaluated elongation of a nontelomeric substrate (oligonucleotide TS, which is the substrate used in the TRAP) that cannot form inter- or intramolecular G-quadruplexes (Fig. 5A, Table 1, and SI Fig. 8B). The G-quadruplex ligands inhibited accumulation of the first elongation products despite the inability of this primer to form G-quadruplexes. These results suggest that the IC_{50} values obtained on Telo3R or TS primers do not solely reflect a G-quadruplex-stabilizing mechanism. We quantified the probability of elongation of TS at moderate concentrations (0.16–0.8 μ M) of telomestatin and Phen-DC3 (SI Fig. 10). As for the Telo3R primer, very different results were found for both ligands. Telomestatin increased the processivity compared with the control solvent with a 10–15% increased probability to elongate from repeat $n = 4$, whereas Phen-DC3 induced stops at repeat numbers $n = 3$ and $n = 4$.

see ref. 7). These molecules preferentially localize and act at telomeres. They inhibit the activity of canonical DNA polymerases (24) and helicases (25, 26) on telomeric substrates and delocalize telomeric proteins from telomeres (27), which, together with their effects on telomerase activity, participate to their selective cytotoxicity toward cancer cells and their efficiency as anticancer drugs. Telomerase is one of the enzymes that must be evaluated in the design and development of new G-quadruplex ligands, and we provide here an approach to validate carefully such candidates. Other assays, such as *in vitro* inhibition of D-loop or T-loop formation (28) in crude nuclear extract, remain to be developed to improve the validation of G-quadruplex ligands.

Materials and Methods

Full protocols are presented in *SI Text*. Compounds 360A, 307A (counterion I^-), and BRACO-19 (29) were kind gifts from P. Mailliet (Sanofi-Aventis, Vitry/Seine, France). The synthesis of Phen-DC3 (counterion $CF_3SO_3^-$) was described (16). The isolation and purification of telomestatin was described (30).

Telomeric Repeat Amplification Protocol. The TRAP reaction was carried out in two steps (elongation and amplification) as previously described. Telomerase extension products were then analyzed by denaturing PAGE.

Direct Assay. Reactions were carried out at 30°C for 45 min in final volume of 20 μ L, containing 2 μ g of CHAPS extract from HEK 293T cells transiently expressing hTR and hTERT (18). Products were analyzed by denaturing PAGE. Extension products were quantified by using ImageQuant 5.2 software and normalized to the signal of the extension products in control solvent.

Quantification of Telomerase Ability to Elongate. By analogy to processivity of other polymerases, telomerase processivity can be measured by the number of telomeric repeats synthesized before half of the enzyme dissociates (31, 32). This definition suggests that elongation is independent on the number of repeats previously added. The signal A_n of each elongation product n ($1 \leq n \leq N$) was quantified and normalized to the total number of guanines incorporated, thus giving the quantity of product having n repeats. The quantification of a direct assay is more robust and is not subject to the distortions observed in the TRAP assay, which may result from (i) the possible misalignment of the reverse primer to the G-rich strand at every PCR cycle during the hybridization step and (ii)

possible unequal amplification of products with different size, especially because the amount of TS may be limiting). Summing these amounts for each added repeat n gives the total amount of generated product. One can then calculate the proportion R_n of product containing n repeats compared with the total amount of generated products (the $3(n-1) + 1$ denominator corresponds to the number of guanines incorporated in each product):

$$R_n = \frac{A_n}{3(n-1) + 1} \cdot \sum_{n=1}^N \frac{A_n}{3(n-1) + 1} \quad [1]$$

These ratios are plotted on a $\log_{10}$ scale and the average telomerase processivity X is deduced by fitting the curves with the geometric progression

$$R_n = R_1 e^{-(n-1)k} = R_1 e^{(n-1) \frac{-\ln 2}{2.303 X}}, \quad [2]$$

which is usually deduced from the slope k of the linear fit in the $\log_{10}$ representation. However, in the presence of some G-quadruplex ligands, it was difficult to fit the curve with this geometric progression, meaning that the ability of telomerase to elongate depended on the number of repeats already synthesized. We therefore chose another representation and determined the probability P_n that telomerase will elongate a product containing n repeats (i.e., the sum of products having $n+1$ repeats divided by the sum of products having n repeats):

$$P_n = \frac{\sum_{n+1}^N R_n}{\sum_n^N R_n} \quad [3]$$

We thank Patrick Mailliet and Eliane Mandine (Sanofi-Aventis, Vitry, France); Jean-François Riou (University of Reims, Reims, France); and Patrizia Alberti, Julien Gros, Aurore Guédin, and Samir Amrane (Museum National d'Histoire Naturelle) for helpful discussions. This work was supported, in part, by Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 3365 and European Union FP6 "MolCancerMed" Grant LSHC-CT-2004-502943 (to J.-L.M. and J.L.).

- Hanahan D, Weinberg RA (2000) *Cell* 100:57–70.
- Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM (1991) *Nature* 350:718–720.
- Oganesian L, Moon IK, Bryan TM, Jarstfer MB (2006) *EMBO J* 25:1148–1159.
- Zaug AJ, Podell ER, Cech TR (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10864–10869.
- Neidle S, Balasubramanian S (2006) *Quadruplex Nucleic Acids* (RSC Biomolecular Sciences, Cambridge, UK).
- Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH (1997) *J Med Chem* 40:2113–2116.
- De Cian A, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou JF, Mergny JL (2007) *Biochimie* 89, 10.1016/j.biochi. 2007.1007.1011.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) *Science* 266:2011–2015.
- Fedoroff OY, Salazar M, Han H, Chemeris VV, Kerwin SM, Hurley LH (1998) *Biochemistry* 37:12367–12374.
- Wheelhouse RT, Sun D, Han H, Han FX, Hurley LH (1998) *J Am Chem Soc* 120:3261–3262.
- Shi DF, Wheelhouse RT, Sun DY, Hurley LH (2001) *J Med Chem* 44:4509–4523.
- Duan WH, Rangan A, Vankayalapati H, Kim MY, Zeng QP, Sun DK, Han HY, Fedoroff OY, Nishioka D, Rha SY, et al. (2001) *Mol Cancer Ther* 1:103–120.
- Gomez D, Mergny JL, Riou JF (2002) *Cancer Res* 62:3365–3368.
- Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S (2006) *Nucleic Acids Res* 34:5402–5415.
- Kim MY, Vankayalapati H, Shin-ya K, Wierzbka K, Hurley LH (2002) *J Am Chem Soc* 124:2098–2099.
- De Cian A, DeLemos E, Mergny JL, Teulade-Fichou MP, Monchaud D (2007) *J Am Chem Soc* 129:1856–1857.
- Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, Riou JF, Mergny JL, Mailliet P, Boussin FD (2005) *Oncogene* 24:2917–2928.
- Cristofari G, Lingner J (2006) *EMBO J* 25:565–574.
- Cathers BE, Sun D, Hurley LH (1999) *Anti Cancer Drug Des* 14:367–372.
- Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou J-F (2004) *Biochem Biophys Res Commun* 323:802–808.
- Patel SD, Isalan M, Gavory G, Ladame S, Choo Y, Balasubramanian S (2004) *Biochemistry* 43:13452–13458.
- Rossetti L, Franceschini M, Bianco A, Ortaggi G, Savino M (2002) *Bioorg Med Chem Lett* 12:2527–2533.
- Sun DY, Hurley LH, VonHoff DD (1998) *BioTechniques* 25:1046–1051.
- Han HY, Hurley LH, Salazar M (1999) *Nucleic Acids Res* 27:537–542.
- Han HY, Bennett RJ, Hurley LH (2000) *Biochemistry* 39:9311–9316.
- Li J-L, Harrison RJ, Reszka AP, Brosh RM, Jr, Bohr VA, Neidle S, Hickson ID (2001) *Biochemistry* 40:15194–15202.
- Gomez D, Wenner T, Brassart B, Douarre C, O'Donohue MF, El Khoury V, Shin-ya K, Morjani H, Trentesaux C, Riou JF (2006) *J Biol Chem* 281:38721–38729.
- Verdun RE, Karlseder J (2006) *Cell* 127:709–720.
- Gowan SM, Harrison JR, Patterson L, Valenti M, Read MA, Neidle S, Kelland LR (2002) *Mol Pharmacol* 61:1154–1162.
- Shin-ya K, Wierzbka K, Matsuo K, Ohtani T, Yamada Y, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H (2001) *J Am Chem Soc* 123:1262–1263.
- Chen JL, Greider CW (2003) *EMBO J* 22:304–314.
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciú P, Cech TR, Lei M (2007) *Nature* 445:506–510.

Supporting Information

De Cian et al 10.1073/pnas.0707365104XXYYYYY103.

Oligonucleotides and Compounds. The oligonucleotides pu27Myc (5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3'), ACX (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC-3'), NT (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3'), TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), Telo3R (5'-(TTAGGG)3-3'), Telo4R (5'-(TTAGGG)4-3'), and TSNT (5'-ATTCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3') were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). TS, Telo3R, and Telo4R were gel purified following standard protocols. Compounds 360A, 307A (counterion I⁻), and BRACO-19 (1) were kind gifts from P. Mailliet (Sanofi-Aventis, Vitry/Seine, France). The synthesis of Phen-DC3 (counterion CF₃SO₃⁻) was previously described (2). These compounds were stored at 2 mM in DMSO and diluted in 50% DMSO. TMPyP4 (counterion pCH₃(C₆H₄)SO₃⁻, Calbiochem, San Diego, CA) was solubilized and diluted in bidistilled water. The isolation and purification of telomestatin was described (3). Telomestatin was stored at 5 or 1 mM at -20°C in the dark in 50% DMSO/50% MeOH, and further dilutions were done in either 10% MeOH/10% DMSO (for TRAP experiments) or 50% DMSO/50% MeOH (for direct assay experiments). For all compounds, dilutions were made immediately before a series of experiments. The structure of all tested ligands are shown in Fig. 1B.

Telomeric Repeat Amplification Protocol. The TRAP reaction was carried out in two steps. (i) Elongation: the oligonucleotide TS (0.4 mM) was elongated by telomerase present in 2 ng of CHAPS extract from HEK 293T cells that transiently overexpress human telomerase RNA (hTR) and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (4). The buffer contained 20 mM Tris·HCl (pH 8.3), 63 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.005% Tween 20, and 0.1 mg/ml BSA, supplemented with 50 mM dTTP, dGTP, and dATP, 5 mM dCTP, and 0.02 mCi/ml (1 Ci = 37 GBq) of 32P-α-dCTP. The solution was mixed on ice with G-quadruplex ligand, control diluent, or water (for samples without ligand during elongation). The elongation was carried out for 15 min at 30°C in a final volume of 40 μl. Reaction was stopped by heating samples for 2 min at 90°C and snap-cooling on ice. (ii) Amplification: Mixture for the amplification step was done on ice by adding to all samples 5 μl of 10' PCR mix containing oligonucleotides ACX (4 mM), NT (4 mM), and TSNT (200 fM), and 0.2 units/ml Taq polymerase in 2' TRAP buffer containing 40 mM Tris·HCl (pH 8.3), 126 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, and 0.01% Tween 20. In samples where elongation took place in the presence of ligand, an additional 1 μl of 10' solution was added, and samples were supplemented with water to reach a final volume of 50 μl. In samples without ligand during elongation, 5 μl of 10' ligand solution were added just before PCR. For amplification, 28 cycles of PCR were performed (94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, and 72°C for 90 sec). Telomerase extension products were then analyzed by denaturing 7.5% PAGE in 7 M urea and 1' TBE. Gels were dried under vacuum, exposed to a PhosphorImager screen, and scanned with a Typhoon apparatus (Amersham Pharmacia Biosciences, Piscataway, NJ). Extension products were quantified by using ImageQuant 5.2 software and normalized to the signal of the extension products in control solvent.

Direct Assay. Reactions were carried out at 30°C for 45 min in a final volume of 20 µl, containing 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM spermidine, 35 nM (or 2 mM) oligonucleotide Telo3R, Telo4R, or TS, 20 mCi of ³²P-α-dGTP (3,000 Ci/mmol), 2 mM dGTP (equivalent to 20 mCi of [³²P]α-dGTP at 750 Ci/mmol), 40 mM dATP, 80 mM dTTP, and 2 mg of CHAPS extract from HEK 293T cells transiently expressing hTR and hTERT (4). Samples were prepared on ice in the presence of 2 µl of 10' ligand solution or 10' corresponding solvent for control. After the incubation at 30°C, samples were snap-cooled on ice and DNA was directly precipitated by mixing 10 µl of a solution containing 7.5 M ammonium acetate, 20 mg glycogen (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.2 pmol of radiolabeled dT12 oligonucleotide (as a loading control for precipitation), and 120 µl of absolute ethanol. Pellets were washed once with 70% ethanol, and after air-drying, 1 µl at 200 mM of the G-quadruplex-forming oligonucleotide pu27Myc was added to compete with G-quadruplex ligands for binding to telomeric repeat additions; this was especially critical for telomestatin and TMPyP4 (5). Finally, 10 µl of 90% formamide, 0.02% xylene cyanol, and 0.02% bromophenol blue were added, and after heating for 2 min at 90°C, 5 µl were loaded on a 12% denaturing PAGE (TBE 1', 7 M urea). Gels were fixed in 10% acetic acid for 5 min to decrease background, vacuum dried, exposed to a PhosphorImager screen, and scanned by using a Typhoon apparatus. The total activity of the extension products in presence of ligand was quantified by using ImageQuant 5.2 software and normalized to the signal of the extension products with the control solvent.

1. Gowan SM, Harrison JR, Patterson L, Valenti M, Read MA, Neidle S, Kelland LR (2002) *Mol Pharmacol* 61:1154-1162.
2. De Cian A, DeLemos E, Mergny JL, Teulade-Fichou MP, Monchaud D (2007) *J Am Chem Soc* 129:1856-1857.
3. Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K, Ohtani T, Yamada Y, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H (2001) *J Am Chem Soc* 123:1262-1263.
4. Cristofari G, Lingner J (2006) *EMBO J* 25:565-574.
5. Gomez D, O'Donohue MF, Wenner T, Douarre C, Macadre J, Koebel P, Giraud-Panis MJ, Kaplan H, Kolkes, A., Shin-ya K, et al. (2006) *Cancer Res* 66:6908-6912.
6. Chen JL, Greider CW (2003) *EMBO J* 22:304-314.
7. Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciú P, Cech TR, Lei M (2007) *Nature* 445:506-510.

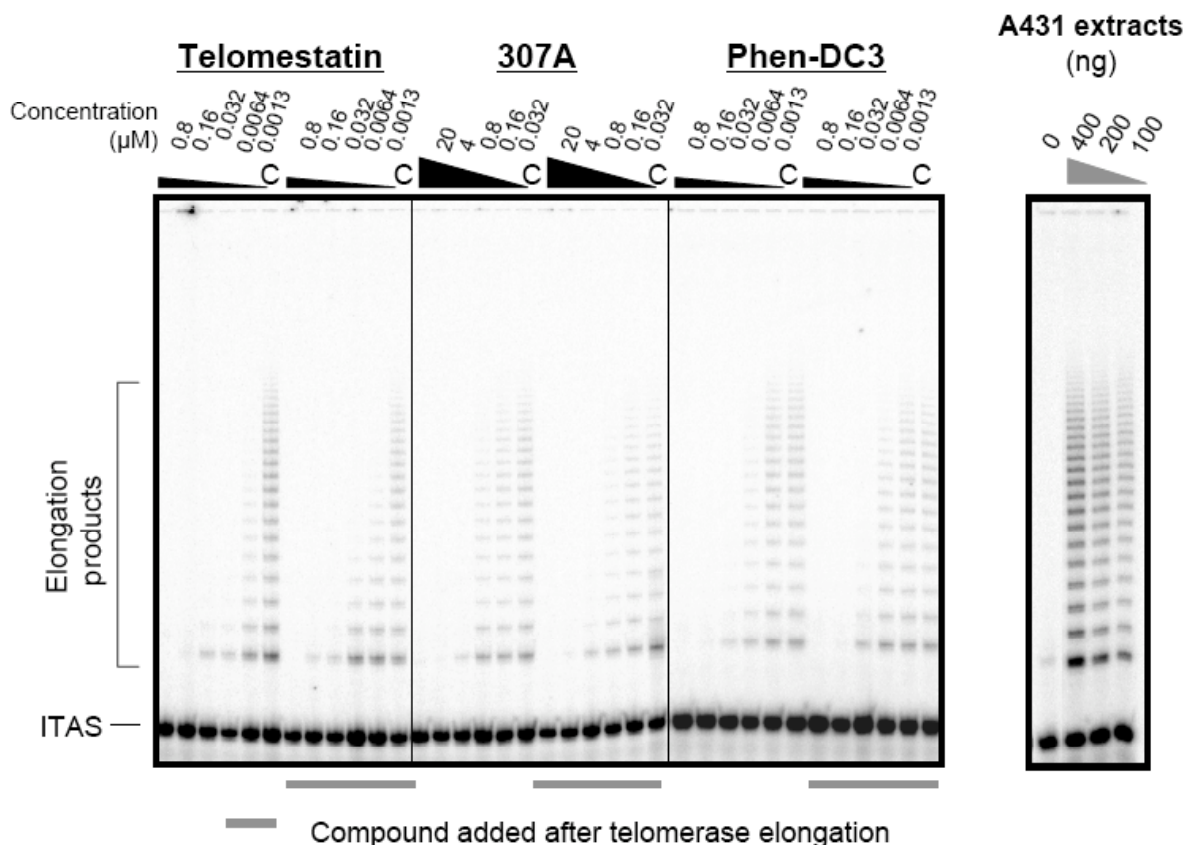


Fig. 7. Inhibition of telomeric repeat amplification protocol by G quadruplex ligands on A431 cell extracts. (Right) telomerase activity of 400, 200, 100, and 0 ng of A431 CHAPS cell extracts by using incorporation of $[^{32}\text{P}]\text{a-dCTP}$ in TRAP assay. (Left) TRAP assay was carried out with 200 ng of extracts and various concentrations of compound : () corresponds to serial 5-fold dilutions of compound starting from 800 nM to 1.3 nM for telomestatin and ligand Phen-DC3 and from 20 mM to 32 nM for 307A. Serial dilutions of ligand stock solutions were made in 50% DMSO for PhenDC3, 307A and in 10% methanol :10% DMSO for telomestatin; C, the final concentrations of the solvent used for the dilutions, starting from 10' stock solutions. Ligand was either added during or () after the telomerase elongation step (for 30 min at 30°C) to investigate the ligand effect on the PCR amplification (30 s at 90°C, 30 s at 50°C, and 90 s at 72°C, 28 cycles) of telomeric G-quadruplex-prone sequences. Products were resolved on a 7.5% denaturing PAGE. ITAS corresponds to TSNT (36 mer) PCR amplification.

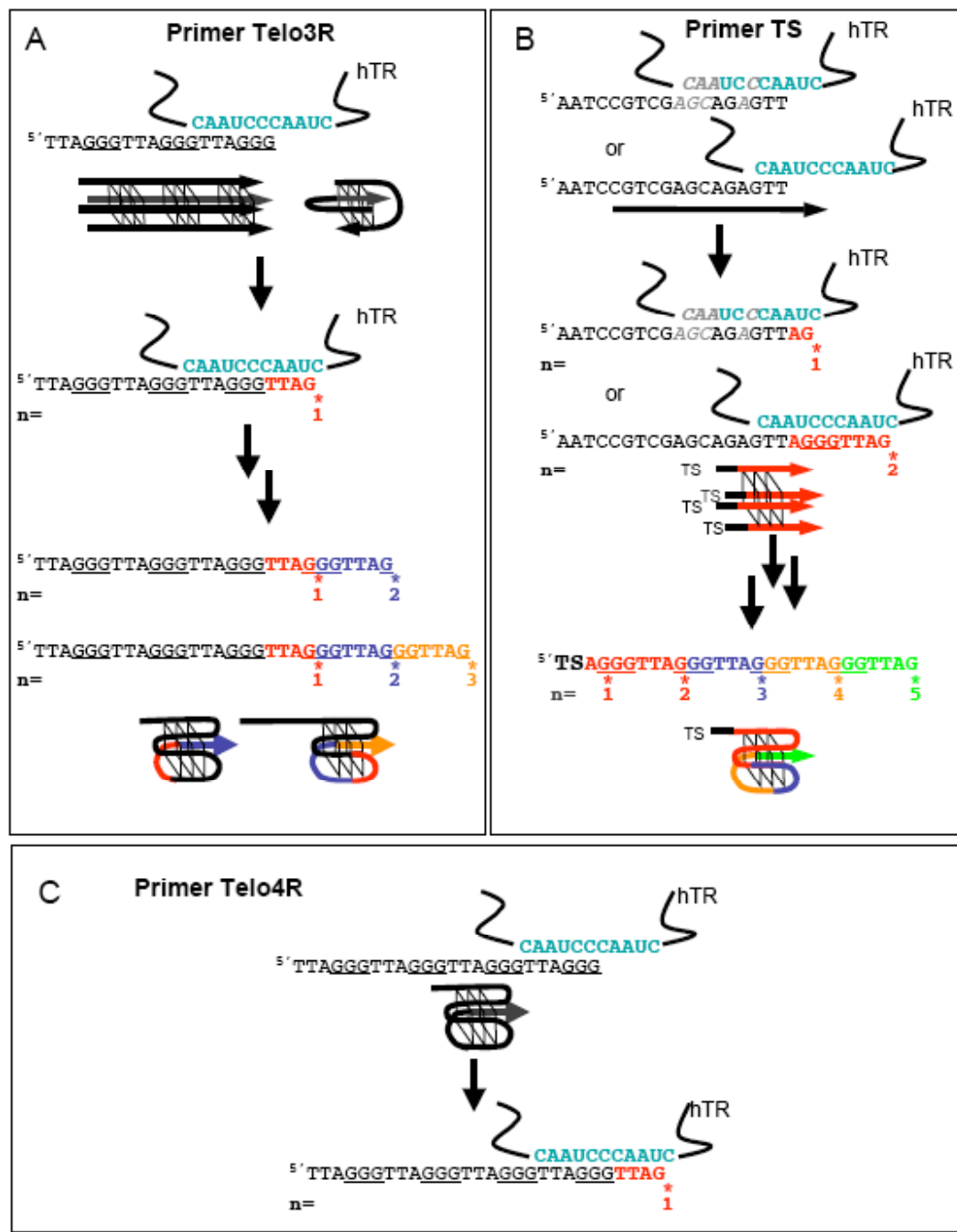


Fig. 8. Schemes for primer extension of Telo3R, TS, and Telo4R and G-quadruplex formation possibilities. (A) Telo3R primer containing three blocks of G is, in theory, able to form an intermolecular structure (bi- or tetramolecular) before telomerase elongation. After two translocations, formation of the first intramolecular G-quadruplex is possible. (B) TS primer is unable to form any G-quadruplex before telomerase elongation. After addition of AGGGTTAG, the presence of a first block of G can allow the formation of tetramolecular G-quadruplexes. Further additions will lead to a variety of G-quadruplex folding possibilities, which could be induced by the presence of a ligand. The first intramolecular G-quadruplex is likely to occur only at repeat number $n = 5$. (C) Telo4R folding into intramolecular G-quadruplex is possible before any elongation by telomerase. Other structures can also be found, but usually at these concentrations, the intramolecular folding is preferred. However, in the presence of a ligand, these structure might be stabilized.

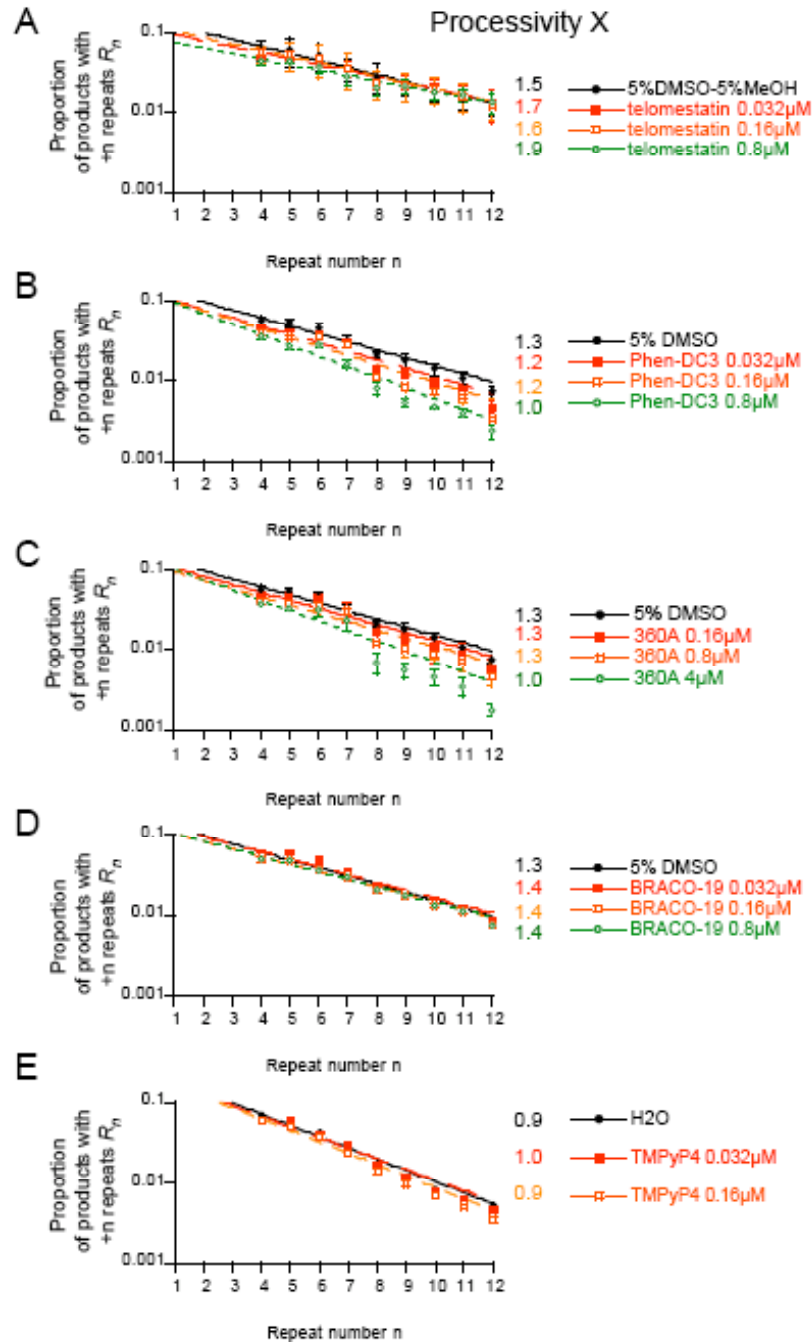


Fig. 9. Effect of ligand on telomerase processivity. Quantifications of the direct assay experiments using Telo3R primer shown on Fig. 3, plus two other independent experiments for telomestatin, Phen-DC3, and 360A. The activity of each elongation product n , stopping after the first G, was quantified and normalized to the total number of G incorporated, thus giving the quantity of product having n repeats. Summing these amounts for each added repeat n , gives the total amount of generated products. The ratios R_n of product containing n repeats compared to the total amount of generated products are plotted on a log10 scale, respectively, for Telomestatin (A), Phen-DC3 (B), 360A (C), BRACO19 (D), and TMPyP4 (E). For $n > 3$, data were fit with the model: (see experimental procedures), which allowed us to determine the average processivity X , for each ligand concentration.

TS primer

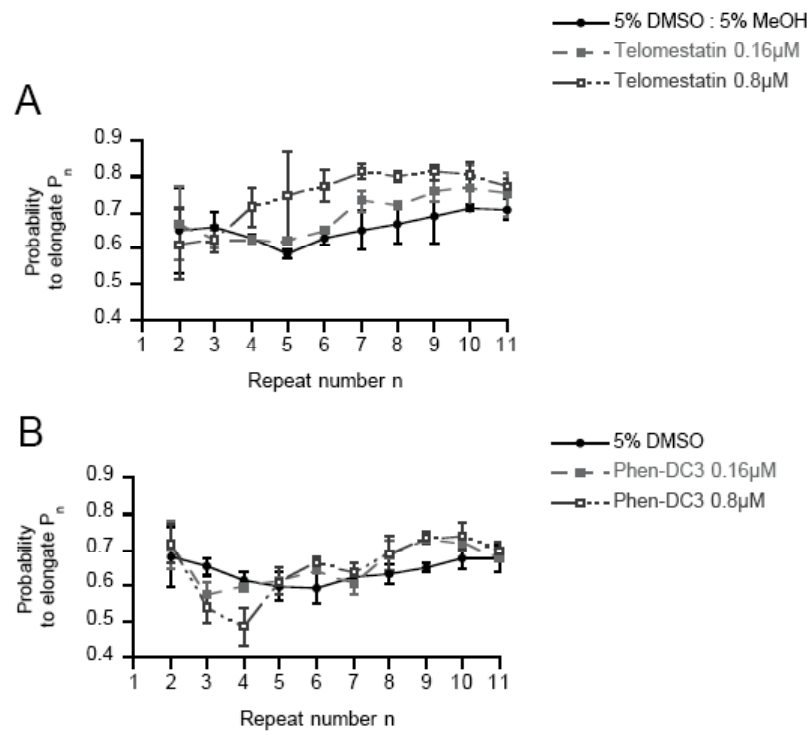


Fig. 10. Effect of ligand on telomerase probability to elongate TS primer. The ability of telomerase to elongate after having added n repeats, P_n , was deduced from quantifications of direct assay with TS primer by plotting the ratio corresponding to the sum of products having $n + 1$ repeats divided by the sum of products having n repeats, for Telomestatin (A), Phen-DC3 (B). Error bars correspond to standard deviation of two independent experiments.

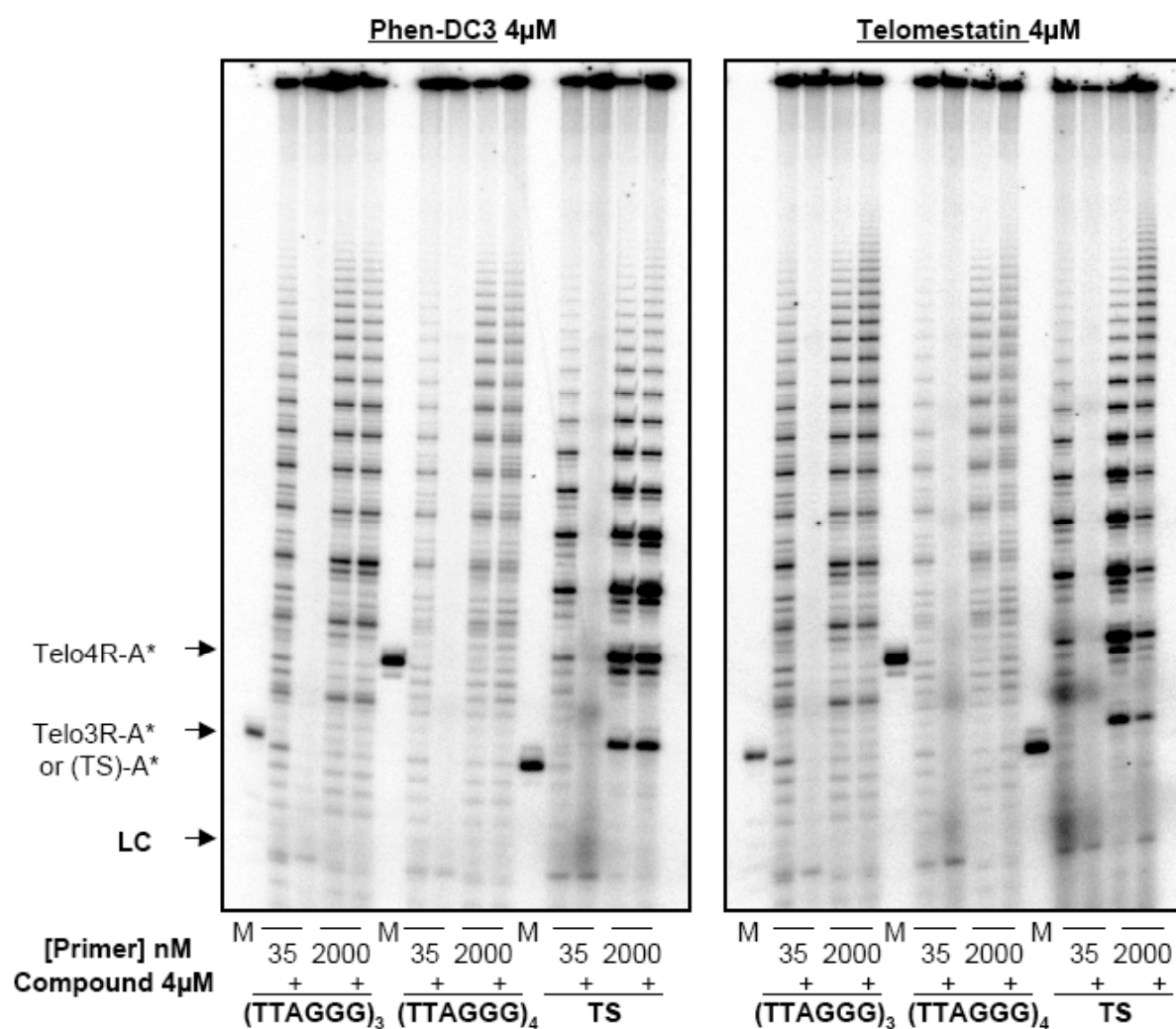


Fig. 11. Effect of primer concentration on telomerase inhibition. Direct assays for telomerase were carried out with 35 nM or 2 mM of primers Telo3R, Telo4R or TS, in the presence or absence of 4 mM of telomestatin or Phen-DC3(+). M, size marker of the primers Telo3R, Telo4R, or TS 3' radiolabeled with [32P]α-ddATP; LC, radiolabeled loading control (5'-dT12-3') added before purification of the elongation products. Samples were resolved on 12% denaturing PAGE.

3 Données complémentaires

3.1 Inhibition de la télomérase déterminée par “Telosspot”

Toujours grâce aux extraits dits “supertélomérase”, la technique du “Telosspot”, mise au point par Gaël Cristofari et Patrick Reichenbach au sein du laboratoire de Joachim Lingner, permet d’effectuer la réaction d’élongation en absence de nucléotides radiomarqués (cf. : Matériel et Méthodes pp.190). Quelques microlitres de la réaction en présence ou absence de composé sont déposés sur une membrane de nylon et l’hybridation des produits télomériques avec une sonde complémentaire radiomarquée est effectuée. La méthode est facile à mettre en œuvre, et la détection ainsi réalisée utilise une quantité bien plus raisonnable de radioéléments. Une étape de dénaturation à pH basique, avant hybridation, permet d’éliminer *a priori* les composés interagissant fortement avec les répétitions télomériques, et de dénaturer d’éventuelles structures limitant l’hybridation de la sonde complémentaire. La quantification des signaux par rapport au point de contrôle sans composé et au signal de bruit de fond de la membrane permet la détermination d’une inhibition de 50 % de l’activité d’élongation de la télomérase. La possibilité d’automatisation des réactions et de leur dépôt sur membrane pour le test à haut débit d’inhibiteurs de télomérase a été validée en collaboration avec l’Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) [231].

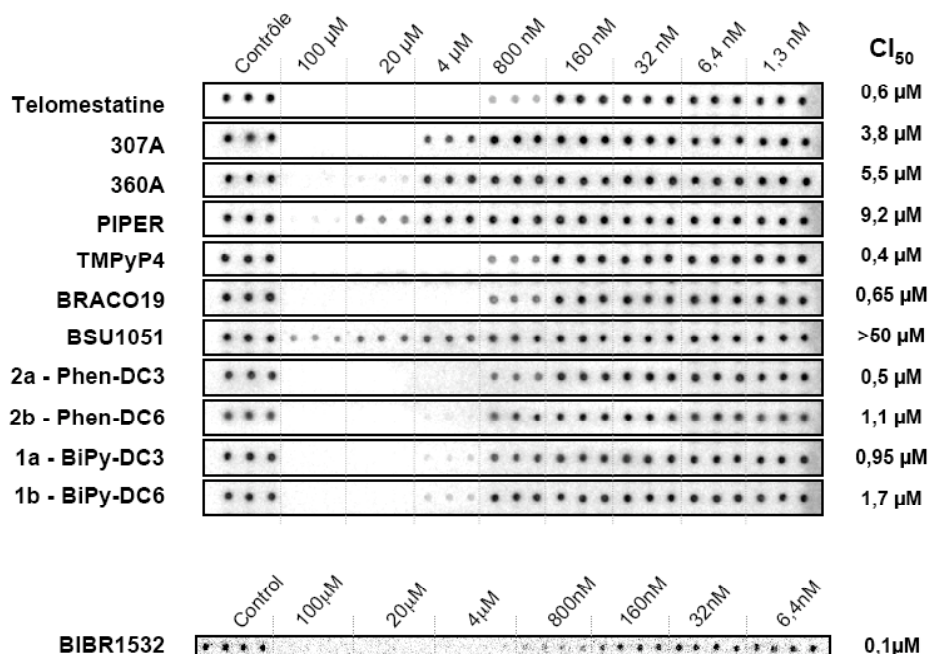


Figure 35 : Inhibition de l’activité télomérase par divers ligands de G-quadruplexes :

Test d’élongation de l’amorce Telo3R en présence de ligand et d’extraits “supertélomérase”, dépôt en triplicata sur membrane et hybridation par une sonde télomérique radiomarquée (“Telosspot”). BIBR1532 est un inhibiteur catalytique de la télomérase fourni gracieusement par K. Damm (Boehringer-Ingelheim) [333].

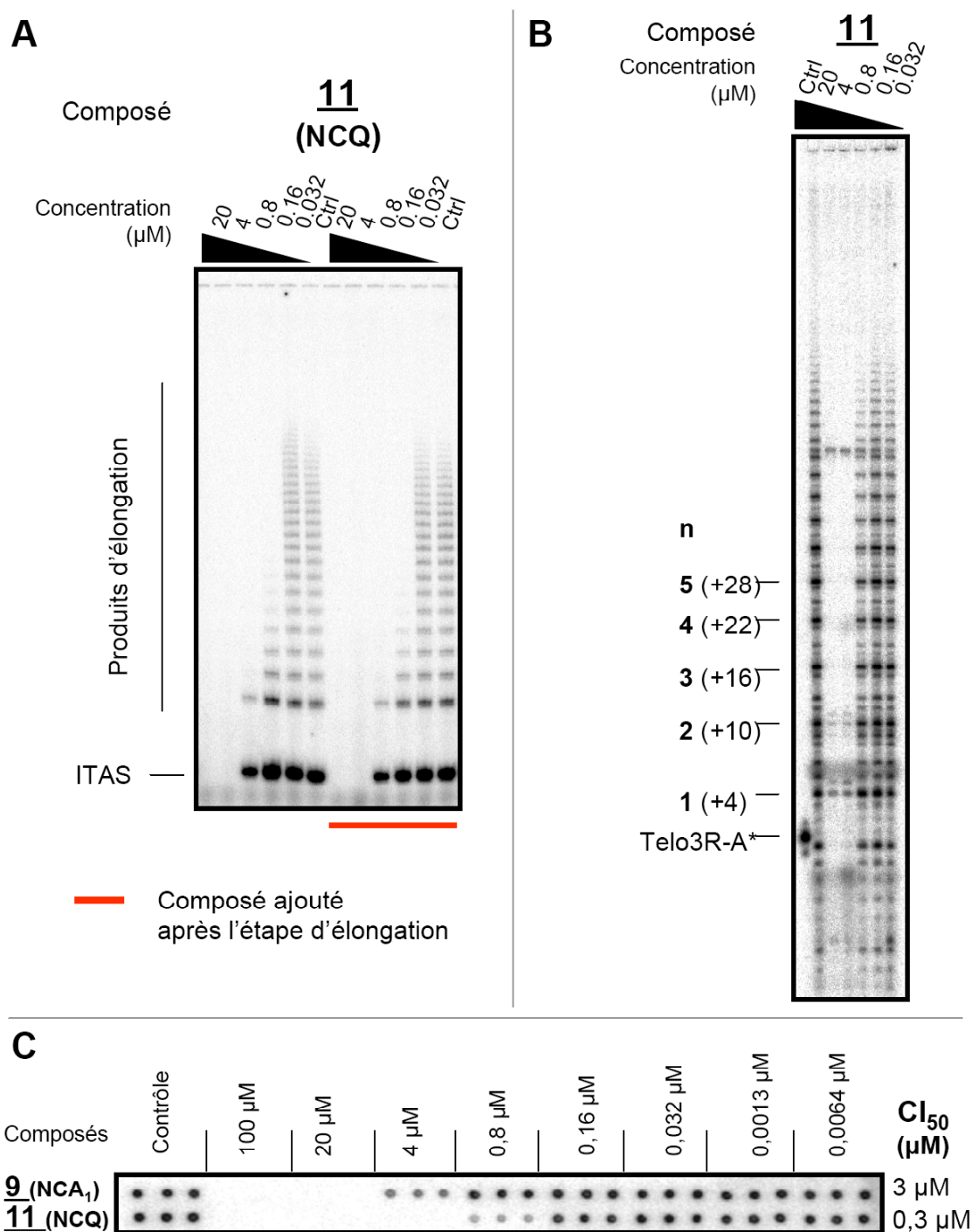


Figure 36 : Inhibition de la télomérase par les composés 11 et 9 de la série des macrocycles couplés à la néomycine :

(A) Test TRAP à partir d'extraits de cellules A431 : effet de l'ajout du ligand pendant l'élongation ou après celle-ci, uniquement pendant l'étape d'amplification par PCR. (B-C) Inhibition de l'élongation par la télomérase d'extraits "supertélomérase" en présence des ligands **11** et **9**, en test direct d'élongation de l'amorce Telo3R. (B) Par incorporation de ^{32}P - α -dGTP. (C) Par dépôt sur membrane et hybridation des produits d'élongation par une sonde télomérique radiomarquée ("Telospot").

Cette méthode pourrait donc s'avérer être une alternative intéressante au test TRAP, pour évaluer l'inhibition de l'activité télomérase par des ligands de G-quadruplexes. L'inhibition de l'activité d'élongation par la télomérase par quelques ligands de G-quadruplexes a donc été évaluée par "Telospot" (Figure 35). On observe, en effet, un très bon accord entre les valeurs de CI_{50} , pour les composés testés en "direct assay" sur le substrat Telo3R (Table 1, **article 5**) et les valeurs obtenues en "Telospot" (Figure 35). Nous montrons également ici que les autres dérivés de N-méthylbisquinolinium identifiés dans l'**article 3** sont également capables d'inhiber la télomérase dans ce test.

3.2 Inhibition de la télomérase par les dérivés macrocycliques de néomycine

À la lumière des résultats présentés dans ce chapitre, l'expérience de TRAP réalisée dans l'**article 2**, ne nous permettait pas de savoir si ces ligands avaient réellement un effet sur l'activité de la télomérase. En effet, le test TRAP réalisé en présence/absence du ligand **11** (aussi appelé **NCQ**) pendant l'étape d'élongation (Figure 36A), montre des CI_{50} sur les produits télomériques quasiment identiques dans les 2 cas. Ceci confirme que le test TRAP est, d'une façon générale, inadapté pour estimer l'inhibition de la télomérase par des ligands de G-quadruplexes. Nous avons donc testé les dérivés macrocycliques de néomycine **11** et **9** (aussi appelé **NCA₁**) en test direct d'élongation par la télomérase et/ou en "Telospot" (Figure 36B et C). Nous montrons ici, que ces deux composés sont bien capables d'inhiber l'activité de la télomérase avec une CI_{50} de l'ordre de 0,3-0,5 μ M pour **11** et de l'ordre de 3 μ M pour le composé **9**. Le cas du composé **11** fait figure d'exception comparé aux composés comme la **télomestatine** ou **Phen-DC3**, qui possèdent de bien plus faibles CI_{50} en TRAP qu'en "Telospot". On remarque, en effet, que les valeurs obtenues en TRAP et en "Telospot" en présence du dérivé **11** sont très similaires. Ceci dénote certainement des différences de comportements entre les différents ligands. Une non-spécificité plus importante des dérivés de néomycine avec le substrat simple-brin (cf. inhibition de l'ITAS du TRAP), ou une interaction avec l'ARN matrice de la télomérase, pourrait expliquer ces différences de comportement. Néanmoins de telles hypothèses restent encore à démontrer, et les quantités limitées de composé dont nous disposions ne nous ont pas permis d'approfondir cette étude.

4 Discussion : Chapitre IV

Nous avons montré dans ce chapitre que l'utilisation du test TRAP, sans élimination du ligand entre les étapes d'élongation et d'amplification par PCR, ne permet pas, d'une façon générale, de déterminer l'effet des ligands de G-quadruplexes vis-à-vis de l'activité télomérase.

L'utilisation d'un test direct d'élongation d'amorce a montré que les ligands étudiée ici inhibent effectivement l'activité télomérase, avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire sur un substrat comportant 3 répétitions télomériques. Le test "Telospot", plus facile à mettre en œuvre que le "direct assay" pourrait, en outre, permettre de remplacer le test TRAP pour évaluer l'activité inhibitrice des ligands. Néanmoins, comme nous l'avons montré dans l'**article 5**, il serait certainement plus pertinent, pour tester l'action spécifique des ligands, d'effectuer le test en utilisant un substrat pouvant originellement former un G-quadruplexe intramoléculaire. Les CI_{50} en ligands pourraient ainsi être diminuées et davantage liée à une mécanisme faisant intervenir un G-quadruplexe. Comme nous l'avons suggéré dans l'**article 5**, un tel mécanisme est, en effet, loin d'être évident lorsqu'une amorce comportant seulement 3 répétitions télomériques ou une amorce non-télomérique sont utilisées, puisque les premiers produits d'élongation, incapables de former de G-quadruplexes intramoléculaires, sont également inhibés aux fortes concentrations. Les CI_{50} déterminées dans de telles conditions ne reflètent donc pas uniquement l'inhibition liée à la formation de G-quadruplexes, et pourraient être le résultat d'une interaction non spécifique du ligand avec l'amorce simple brin, ou avec une des composantes de la télomérase. Le "Telospot" devrait donc, dans le cas particulier des ligands de G-quadruplexes, être effectué sur un substrat contenant déjà 4 ou 5 répétitions télomériques. Une optimisation des conditions de réaction devra certainement être envisagée pour augmenter l'activité de la télomérase, celle-ci étant déjà partiellement inhibée par la formation de G-quadruplexe au niveau de son substrat (cf. Figure 5B, **article 5**) [259].

En observant la corrélation existant entre les données de stabilisation obtenues en test FRET et les données de CI_{50} en Telospot sur l'amorce Telo3R (Figure 37), on s'aperçoit que certains ligands ayant de fortes stabilisations ont des CI_{50} élevées, comme **360A**, et inversement, dans le cas du ligand **NCQ**⁽⁴⁾. Il est probable qu'une meilleure corrélation puisse être obtenue si le "Telospot" est réalisé à partir d'un substrat formant déjà un G-quadruplexe intramoléculaire avant extension. En particulier, **360A** présente une CI_{50} de l'ordre de 50 nM en test direct d'élongation sur l'oligonucléotide Telo4R (Table 1, **article 5**), comme la **télomestatine** et **Phen-DC3**, ce qui est en bien meilleur accord avec les données de $\Delta T_{1/2}$.

⁽⁴⁾ données de $\Delta T_{1/2}$ uniquement disponible en présence de Na^+

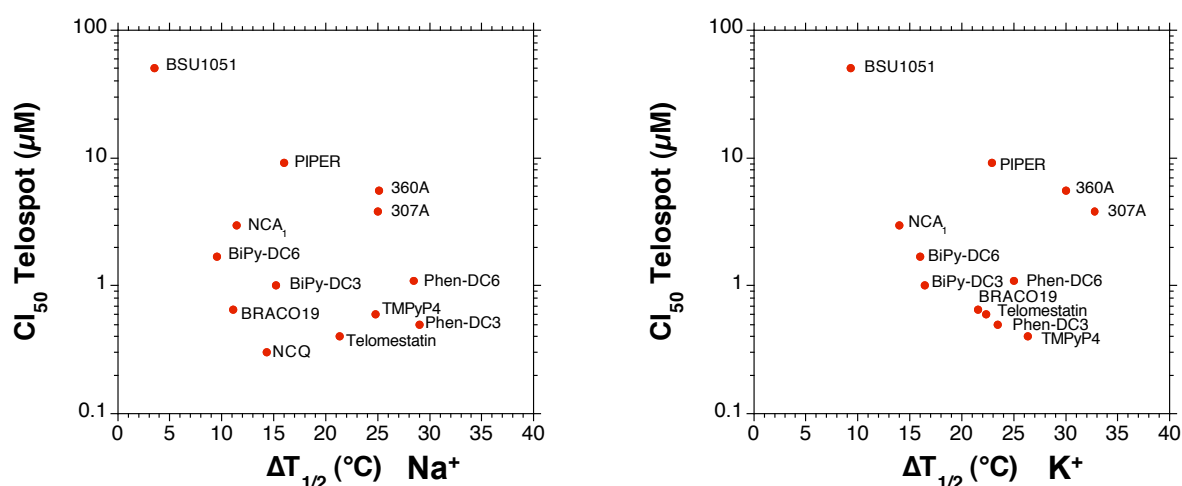


Figure 37 : Relation entre la stabilisation du G-quadruplexe télomérique en test FRET et les CI_{50} observées en Telospot sur l'amorce Telo3R

(gauche) $\Delta T_{1/2}$ en conditions Na^+ (Li Cacodylate 10 mM pH 7,2, NaCl 100 mM) ; (droite) $\Delta T_{1/2}$ en conditions K^+ (Li Cacodylate 10 mM pH 7,2, KCl 10 mM, LiCl 90 mM)

Il est également important de souligner que, comme seule l'information d'inhibition de la télomérase est évaluée dans ce type d'expérience, d'autres tests seront nécessaires pour établir la spécificité d'action des composés. En effet, malgré les défauts soulignés ici du test TRAP, celui-ci permettait, de façon détournée, d'évaluer l'effet des ligands sur l'amplification d'une région non télomérique (ITAS). Ainsi, si avec une CI_{50} de 0,4 μM en "Telospot", le composé **TMPyP4** peut paraître particulièrement intéressant, l'inhibition du contrôle interne (ITAS) observé en test TRAP (Figure 2, **article 5**) montre que le ligand a bien d'autres effets à cette concentration. On peut envisager d'effectuer des tests d'inhibition de polymérisation sur des séquences télomériques et non télomériques dans des conditions ioniques et de concentration en amorce similaires, en parallèle du "Telospot".

D'une façon générale, nous soulignons une fois encore dans cette partie, les multiples facettes des ligands de quadruplexes de guanines. S'ils sont effectivement capables d'inhiber l'accès de la télomérase à son substrat, de nombreuses autres protéines ont une action au niveau de l'ADN télomérique, et sont donc des cibles potentielles de l'action de ces ligands. Des tests biochimiques permettant d'évaluer l'effet des ligands sur d'autres systèmes comme la formation ou la déstabilisation d'une structure modèle en T-loop, l'inhibition d'hélicases de type RecQ, ou l'inhibition de la polymérisation d'ADN, devraient être élaborés en addition des tests d'activité télomérase, pour mieux appréhender les effets cellulaires de ces ligands.

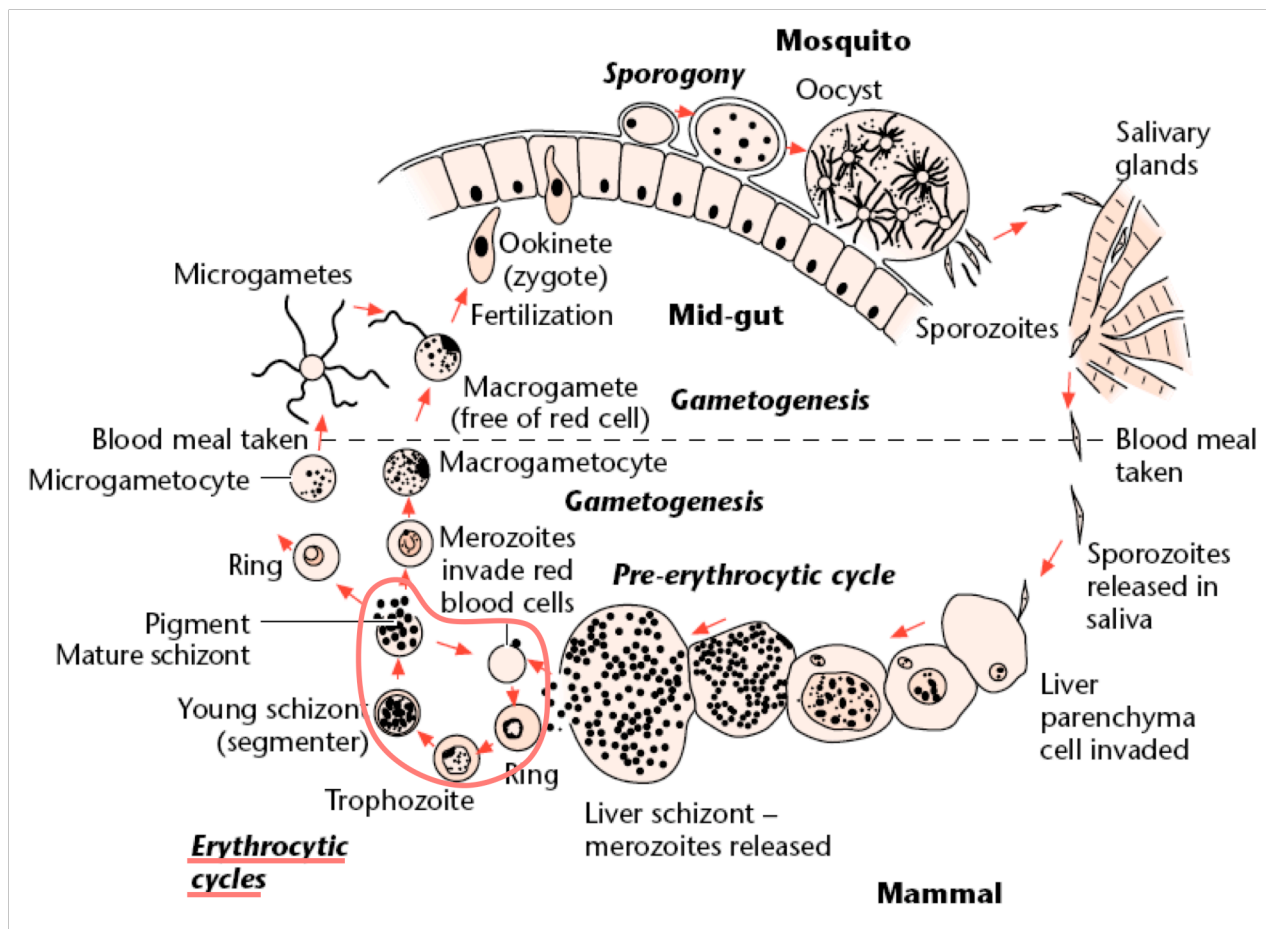


Figure 38 : Cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum* (d'après [334])

Il commence lorsqu'un anophèle femelle infectieux se gorge du sang d'un individu. Les sporozoïtes, formes parasitaires mobiles d'environ 10 μm de long sur 1 μm de large qui se concentrent dans les glandes salivaires, sont émis au site de piqûre lorsque le moustique envoie sa salive avant et pendant le repas sanguin. Une fois injectés à l'homme, les sporozoïtes atteignent le foie, ou ils pénètrent dans les hépatocytes. Après plusieurs jours d'incubation, la cellule hépatique distendue, gonflée éclate déchargeant ainsi des mérozoïtes dans la circulation sanguine. Après leur libération dans la circulation, les **mérozoïtes** hépatiques vont rapidement envahir les érythrocytes et initier le stade sanguin (48h chez *P.falciparum*). Une fois entré, le mérozoïte va se transformer en **anneau** ($t=0-18\text{h}$ chez Pf), caractérisé par un cytoplasme très fin entourant la vacuole parasitophore. Ensuite, le cytoplasme s'épaissit et le parasite augmente de taille. À ce stade, appelé **trophozoïte** ($t=18-36\text{h}$ chez Pf), apparaissent des grains de pigment dans le cytoplasme, qui résultent de la dégradation de l'hémoglobine en hémoglobine. Ce trophozoïte entame une série de mitoses (phase S chez Pf : $t=28\text{h}-31\text{h}$ après invasion) jusqu'à formation d'un **schizonte** mature (rosace) ($t=36-48\text{h}$ chez Pf) qui éclate en rompant la membrane du globule rouge pour libérer 32 mérozoïtes pour *P.falciparum*. Ces derniers peuvent ensuite envahir d'autres érythrocytes. Quelques parasites vont avoir un développement différent (gamétocytogenèse) aboutissant aux gamétocytes, formes sexuées du parasite chez l'homme infectant le moustique.

Chapitre V. Cibler les télomères du parasite *P.falciparum* avec des ligands de G-quadruplexes

1 Introduction

1.1 *La Malaria*

La Malaria, ou paludisme, connaît actuellement une résurgence, et apparaît comme l'une des maladies les plus mortelles dans le monde. Infectant de 300 à 500 millions de personnes dans le monde par an, elle est responsable de 1 à 3 millions de décès chaque année [335]. Elle est principalement causée par l'infection des cellules sanguines par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium*, dont 4 espèces sont pathogènes pour les hommes : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. La forme la plus grave de la maladie résulte de l'infection par l'espèce *P. falciparum*. Le vecteur permettant la transmission de la maladie est le moustique anophèle (*Anopheles gambiae*). Dans le cycle parasitaire (décrit dans la Figure 38), le cycle érythrocytaire, de 48 heures pour *P. falciparum* au sein de l'hôte humain, est seul responsable de la maladie. En particulier, la libération des mérozoïtes dans le sang toutes les 48 h est responsable des fièvres cycliques (accès palustres) caractéristiques de la maladie.

L'ouverture du canal de Panama en 1914 a initié les premiers efforts pour éradiquer cette maladie. Une vaste campagne ciblant le vecteur responsable de sa transmission, l'anophèle, a été menée entre les années 50 et 60 avec l'utilisation intensive du dichlorodiphényltrichloroéthane, DDT, dans toutes les zones à risque. En parallèle, l'administration préventive et curative de chloroquine, un dérivé synthétique de quinine découvert en 1940, a mené progressivement à l'apparition de souches résistantes dès 1950 en Thaïlande et en Colombie. Aujourd'hui, des souches résistant à la chloroquine sont présentes dans toutes les régions à risque.

Au cours des 25 dernières années, relativement peu de nouvelles molécules ont été développées contre la Malaria et un nombre très limité d'entre elles est actuellement en phase d'essais cliniques. Parmi les classes de principes actifs actuellement sur le marché, on trouve des analogues d'artémisinine, des dérivés de quinoléine, des antibiotiques, des analogues d'ubiquinone et des antifolates. Ces principes actifs sont généralement délivrés en association pour limiter l'émergence de nouvelles résistances [336].

1.2 Les télomères et la télomérase de *Plasmodium falciparum*

P. falciparum est une espèce haploïde possédant un génome d'environ 30 Mb, extrêmement riche en AT (supérieur à 80%) et organisé en 14 chromosomes linéaires dont la taille varie entre 0,7 et 3,4 Mb. Le génome entier de la souche 3D7 a été publié en 2002 [337]. Il est disponible sur les bases de données GeneDB⁽⁵⁾ et PlasmoDB⁽⁶⁾.

1.2.1 ADN télomérique

La séquence télomérique d'une des espèces de *Plasmodium* infectant la souris, *P. bergeri*, a été identifiée dès 1985 et présente le motif dégénéré GGGTT(T/C)A [338]. Cette séquence télomérique est conservée chez toutes les espèces du genre *Plasmodium* [339, 340]. La taille moyenne des télomères peut varier assez significativement selon les espèces de *Plasmodium* (0,85kb - 6,7kb), mais elle est relativement conservée au sein de différentes souches de *P.falciparum*, avec une taille de 1,2-1,3 kb en moyenne [341].

Des analyses de gels d'électrophorèse en 2 dimensions ont pourtant montré que, dans certains cas, au sein d'une même souche de *P.falciparum* (voire pour un même chromosome), les télomères pouvaient également être très hétérogènes, pouvant atteindre 6 kb à l'extrémité de certains chromosomes. L'analyse de ces plus longs télomères a montré que ceux-ci avaient initialement été tronqués de 50-120 kb d'ADN terminal, contenant les télomères initiaux et des régions subtélomériques appelée TAS ("Telomere-Associated Sequences") (voir paragraphe suivant). Ces longs télomères résulteraient de la réparation de cassures par la télomérase du parasite [341].

Aucune donnée concernant la présence, la longueur ou la structure d'une extrémité 3' simple brin chez *Plasmodium* n'est disponible dans la littérature.

1.2.2 Régions sub-télomériques

À l'extrémité de chaque chromosome, le télomère est suivi d'une région subtélomérique non codante d'environ 15-30 kb, appelée Séquences Associées aux Télomères ou TAS. De façon surprenante, ces régions sont riches à 70% en (A+T) comme des régions codantes, alors que la plupart des régions non codantes sont (A+T)-riches à plus de 90%. L'organisation des TAS est très conservée entre les espèces et consiste en 6 différents blocs de répétitions nommées "Telomere-Associated Repetitive Elements" (TAREs 1-6). Les TAREs 1-5 sont les plus proches

⁽⁵⁾ <http://www.genedb.org/genedb/malaria/>

⁽⁶⁾ <http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp>

des télomères et s'étendent sur 10 à 12 kb (Figure 39). TARE 6, décrit initialement sous le nom de rep20, est une région plus étendue (6 à 23 kb) constituée de répétitions d'un motif dégénérés de 21 pb [342]. Les séquences de ces TAREs sont spécifiques à chaque espèce de *Plasmodium*, puisque aucune hybridation croisée n'est observée en "dotblot" à partir de l'ADN génomique d'autres espèces de *Plasmodium*. Seules les séquences télomériques sont conservées entre les différentes espèces [343]. Figueiredo *et al.* ont montré que ces régions subtélomériques ont un rôle dans la régulation de la longueur des télomères et dans la transcription des gènes en amont de ces régions. En effet, nous avons mentionné précédemment que de longs télomères étaient présents aux extrémités de chromosomes ayant subi des cassures en amont de ces régions. De plus, la comparaison de la transcription d'un gène en amont de la cassure dans des chromosomes normaux et tronqués a montré qu'une répression était observée dans le cas de télomères normaux alors qu'elle ne l'était pas dans le cas chromosomes tronqués [341]. Il a également été montré que les télomères de *P.falciparum* forment 4 à 7 "clusters" (ou bouquets) à la périphérie du noyau du parasite [344]. Si l'absence des TAS n'empêche pas la localisation de l'extrémité du chromosome à la périphérie du noyau, une localisation en-dehors des "clusters" télomériques est observée. Ceci suggère que ces régions subtélomériques sont nécessaires à formation des bouquets de chromosomes, et que les télomères permettaient l'ancrage à la membrane nucléaire [341]. Ces bouquets auraient par ailleurs un rôle essentiel dans l'alignement physique des extrémités chromosomiques hétérologues, permettant la diversité génétique et le fort taux de recombinaison dans les régions de variation antigéniques (gènes *var* en amont des TAS (Figure 39)), permettant au parasite d'échapper aux attaques immunes de son hôte [344].

1.2.3 Protéines télomériques

Une activité télomérase a été détectée par une adaptation du test TRAP, dans des extraits cellulaires du parasite *P.falciparum* par l'équipe d'Artur Scherf [345]. *In vitro*, la télomérase ajoute majoritairement les répétitions TTTAGGG (55%) et TTCAGGG (20%), ce qui est en bon accord avec les répétitions les plus fréquentes observées dans des télomères de chromosomes intacts ou "réparés" après cassure (TTTAGGG (42-47%) et TTCAGGG (30-35%)). Il a également été montré que l'activité télomérase était la plus importante dans les stades schizonte et trophozoïte du cycle érythrocytaire, correspondant aux phases de prolifération du parasite [346]. Plus récemment, une analyse bioinformatique a permis d'identifier la sous-unité catalytique de la télomérase de *P.falciparum*, PfTERT [347]. La taille de la protéine identifiée est particulièrement importante, environ 280 kDa, soit presque 3 fois plus importante que la sous-unité catalytique de *S. cerevisiae*. Des anticorps contre PfTERT ont été développés et ont permis de détecter la

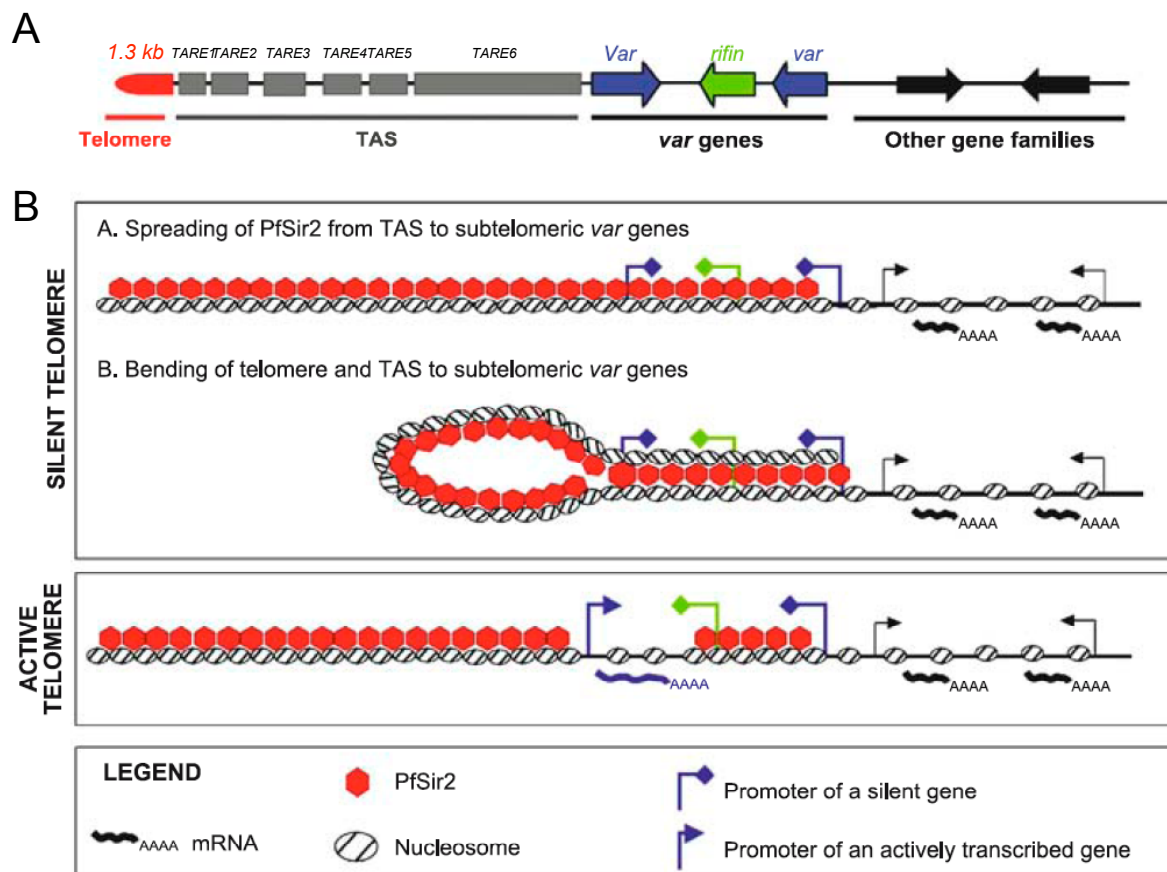


Figure 39 : Structure du télomère, des régions sub-télomériques et modèle de la régulation de l'expression des gènes *var* subtelomériques

D'après [348]. (A) Structure du télomère et des régions subtelomériques en amont des gènes de variation antigéniques *var*. (B) Modèle de régulation épigénétique des gènes de variation antigénique par la protéine PfSir2 au niveau des régions télomériques et subtelomériques.

protéine dans les stades trophozoïte et schizontes du parasite, ce qui est en accord avec l'activité télomérase précédemment détectée dans ces stades [346]. Il semble que la protéine soit principalement localisée dans un compartiment subnucléolaire, et non à la périphérie du noyau comme les bouquets télomériques. Ceci suggère soit qu'une fraction du complexe actif télomérase, non détectable par immunofluorescence, migre hors du nucléole durant la mitose, soit que les bouquets formés par les télomères migrent près du nucléole durant la mitose pour permettre la synthèse télomérique. À ce jour, la séquence de l'ARN matrice de la télomérase d'aucune espèce de *Plasmodium* n'a encore été identifiée.

La protéine homologue de Sir2 ("silent information regulator") chez la levure a été identifiée chez *P.falciparum* par l'équipe de A. Scherf. Chez la levure, cette protéine est une histone déacétylase, impliquée dans les modifications de la chromatine et la répression des gènes. Il a été montré par immunofluorescence que la protéine PfSir2 co-localisait avec les bouquets télomériques et serait également associée au nucléole. Par ailleurs, PfSir2 et les extrémités chromosomiques sont localisées à la périphérie du noyau dans des régions denses, correspondant à de l'hétérochromatine. Des expériences de ChIP ont démontré que des anticorps dirigés contre PfSir2 immunoprécipitaient de l'ADN télomérique et des régions TAS, alors que ces régions n'étaient pas associées à des histones H4 acétylés, caractéristiques d'une chromatine active. Des ChIPs contre PfSir2 et H4 acétylé sur les gènes *var* ont montré que l'interaction avec PfSir2 et la déacétylation des histones au niveau des promoteurs contrôlaient mutuellement la répression des gènes subtélomériques *var* [349]. De plus, la délétion de PfSir2 dans les parasites induit l'activation des gènes de cette famille et une modification de la structure chromatinienne dans ces régions, démontrant le rôle de la protéine dans le "silencing" réversible de ces gènes [350]. Les auteurs suggèrent le modèle présenté dans la Figure 39.

En dehors de la protéine PfSir2 et de PfTERT, d'autres protéines associées aux télomères, orthologues à *S. cerevisiae* ou *S. pombe* ont également été détectées dans les bases de données du génome de *P.falciparum* : Rap1, le complexe Ku, Rif1, Sir 3-4, le complexe Mlp ou encore Taz1 [351]. Cependant aucune caractérisation de ces protéines chez le parasite n'a encore été publiée.

1.3 Notre démarche

Peu de données sont actuellement disponibles sur les télomères et leur maintenance chez les espèces de *Plasmodium*. Il semble pourtant que les télomères et les régions subtélomériques aient des rôles essentiels tant au niveau de la prolifération des organismes, avec l'existence d'un mécanisme de maintenance de la longueur des télomères médié par la télomérase, que de

l'ancrage à la membrane nucléaire ou de la répression des gènes de variation antigénique en amont des régions subtélomériques, régions responsables notamment de la virulence du parasite.

On ignore en particulier la structure des télomères dans ces organismes : possèdent-ils effectivement une extrémité télomérique 3' simple-brin riche en guanines ? Quelle est sa longueur ? Peut-elle se structurer en T-loop comme cela a été démontré chez *Trypanosoma brucei*, ou forment-ils des quadruplexes permettant l'ancrage à la membrane nucléaire comme cela semble être le cas des minichromosomes de ciliés ? Quelles sont les autres protéines télomériques et leur rôle dans la survie du parasite ? Quelle est la séquence de l'ARN matrice de la télomérase.

La découverte, en 1998, d'une activité télomérase dans ces organismes a laissé entrevoir la possibilité de limiter la prolifération des parasites avec des inhibiteurs de télomérase. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a permis de conclure au potentiel antiparasitaire de ces agents - des analogues de nucléosides notamment. Il semble que le délai d'action de tels inhibiteurs, avant que les télomères n'atteignent une taille suffisamment courte, soit trop important pour être intéressant d'un point de vue thérapeutique.

Notre but n'est donc pas de trouver des inhibiteurs de télomérase chez *P.falciparum*. Comme nous avons tenté de le souligner tout au long de ce manuscrit, les ligands de G-quadruplexes inhibent certes la télomérase (même si, comme nous l'avons montré dans le Chapitre IV, leur action vis-à-vis de l'enzyme a longtemps été surestimée avec l'utilisation du test TRAP), mais constituent davantage une classe différente d'agents thérapeutiques, avec une activité au niveau de la structure du télomère, et des autres protéines télomériques comme TRF2 et POT1 chez l'homme.

Ainsi, le ciblage de l'ADN télomérique d'un parasite hautement prolifératif comme *P.falciparum* avec des ligands de G-quadruplexes, pourrait permettre d'accéder à une nouvelle classe d'agents thérapeutiques antiparasitaires, perturbant la structure des télomères, leur ancrage à la membrane nucléaire, et limitant l'action de sa télomérase. Le manque de sélectivité des ligands déjà développés étant souvent dû à une préférence pour les duplexes riches en G+C, le fort pourcentage en A/T du génome de *P.falciparum* (>80%), devrait constituer un avantage pour cibler préférentiellement les télomères. D'autre part, le fort potentiel de prolifération de ces parasites devrait permettre d'obtenir une sélectivité d'action des ligands par rapport aux cellules normales.

Les résultats présentés dans cette partie restent préliminaires. Nous nous sommes principalement intéressés aux interactions moléculaires *in vitro* des composés, dont nous disposons, avec les séquences télomériques de *P.falciparum*. Nous avons également mis en évidence la structuration en G-quadruplexe de ces séquences télomériques et l'existence d'une

extrémité 3' sortante riche en guanine à partir d'extraits d'ADN génomique de *P.falciparum* cultivés par Philippe Grellier et Elisabeth Mouray au Muséum National d'Histoire Naturelle (USM 504). Des tests de cytotoxicité sur le parasite ont également été menés par P.Grellier, et des résultats préliminaires ont été obtenus sur la croissance du parasite en présence de **télomestatine**. Nous discuterons également des premiers résultats obtenus sur les effets télomériques d'un traitement du parasite par la **télomestatine**.

2 Article 6 : “*Plasmodium* telomeric sequences : structure, stability and targeting by small compounds”.

A. De Cian, P. Grellier, E. Mouray, D. Depoix, H. Bertrand, D. Monchaud, M-P. Teulade-Fichou, J-L. Mergny, P. Alberti

Résumé en français :

Les résistances développées par les espèces de *Plasmodium* contre les médicaments antipaludéens les plus couramment utilisés rendent indispensable l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les télomères du parasite pourraient constituer une cible intéressante puisqu'ils sont composés de répétitions d'un motif différent du motif humain. Dans cette perspective, nous nous sommes posés les questions suivantes : (i) Les télomères de *P.falciparum* se terminent-ils par une extrémité 3' sortante riche en guanines ? (ii) Le motif dégénéré du brin télomérique riche en guanines de *Plasmodium* est-il capable de se structurer en un G-quadruplexe stable dans des conditions physiologiques ? (iii) Des petites molécules sont-elles susceptibles de stabiliser ces structures ? (iv) Ces ligands pourraient-ils discriminer les quadruplexes formés aux télomères du parasite de ceux formés aux télomères de son hôte humain ? (v) Ces composés ont-ils une activité antiproliférative sur un modèle cellulaire ?

***Plasmodium* telomeric sequences: structure, stability and quadruplex targeting by small compounds.**

Anne De Cian^{1,2,3}, Philippe Grellier⁴, Elisabeth Mouray⁴, Delphine Depoix⁴,
Hélène Bertrand⁵, David Monchaud⁵, Marie-Paule Teulade-Fichou⁵, Jean-Louis
Mergny^{1,2,3*} & Patrizia Alberti^{1,2,3*}

October 30, 2007

1: INSERM, U565, Paris Cedex 05, F-75231 (France).

2: CNRS, UMR5153, Paris Cedex 05, F-75231 (France).

3: Muséum National d'Histoire Naturelle, USM 503, Régulation et dynamique des génomes,
43 rue Cuvier, CP26, Paris Cedex 05, F-75231 (France).

4: Muséum National d'Histoire Naturelle, USM 504-EA3335, Biologie fonctionnelle des
protozoaires, 61 rue Buffon, CP52, Paris Cedex 05, F-75231 (France).

5: Institut Curie, Section Recherche, CNRS UMR 176, Centre Universitaire Paris XI, Bât.
110, 91405 Orsay (France).

* Authors to whom correspondence may be addressed at alberti@mnhn.fr or
mergny@mnhn.fr; Tel +33-1 40 79 37 27; Fax +33-1 40 79 37 05.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum increasing resistance to the most commonly used antimalarial drugs makes it necessary to identify new therapeutic targets. The telomeres of the parasite may constitute attractive targets as they are composed of repetitions of a degenerate motif, different from the human one. We therefore addressed the following questions: (i) Do *P. falciparum* telomeres end with a 3' G-overhang? (ii) Can the degenerate motif of the *Plasmodium* telomeric G-strand fold into stable G-quadruplex structures? (iii) Is it possible to stabilise these structures with small compounds? (iv) Can a G-quadruplex ligand discriminate between quadruplexes at the telomeres of the parasite and quadruplexes at the telomeres of its human host? (v) Do these compounds exhibit antiproliferative effects in cellular models?

Keywords: *Plasmodium*; telomeres; telomerase; G-quadruplex

INTRODUCTION

Telomeres are specialised nucleoprotein complexes that cap and protect the extremities of eukaryote chromosomes. In most eukaryotes, the 3'-ending strand of telomeric DNA consists of tandem repeats of a short motif bearing two to four consecutive guanines (1,2). This strand is longer than the 5'-ending strand, resulting in a 3' G-rich overhang. A 3' G-overhang has been detected in many organisms, including ciliates (3,4), vertebrates (5-7), yeasts (8), plants (9) and the parasite *Trypanosoma brucei* (10), and appears to be a conserved feature of eukaryotic telomeres (11). The inability of DNA polymerases to completely replicate linear chromosomes results in telomere shortening at each cellular division. Telomere erosion over the course of DNA replications can be compensated by telomerase, a specialised reverse transcriptase able to add telomeric repeats to the 3'-end of telomeres. Telomerase was first identified in ciliates (12). In human, a strong telomerase activity is detected in rapidly proliferating cells, in particular in cancer cells (13).

In human, the 150-250 nucleotide long 3' G-overhang (5-7) is involved, in a complex with telomeric proteins, in the formation of a capping structure (14). However, its sequence (5'GGGTTA3' repeats) makes it prone to fold into stable G-quadruplexes (**Fig. 1**) under physiological conditions (15). G-quadruplex stabilisation was shown to inhibit telomerase elongation *in vitro* (16); therefore, G-quadruplex stabilising ligands were initially considered as potential telomerase inhibitors (17). In addition to effects on telomere length, G-quadruplex ligands have also been shown to induce short-term responses in human cells as a result of their ability to disrupt telomere structure (for a recent review, (18)). G-quadruplex ligands have been investigated as inhibitors of cancer cell proliferation. Here we evaluate the possibility of using such ligands to interfere with human protozoan parasite infections.

Plasmodium falciparum is the protozoan parasite that causes the most severe form of human malaria. It is estimated that several hundred million cases of clinical malaria occur per year worldwide (19). *Plasmodium* is transmitted by the bite of an infected *Anopheles* female mosquito. The parasite (sporozoite) enters bloodstream and invades hepatocytes. In infected hepatocytes, the parasite reproduces asexually, producing thousands merozoites from a single parasite. Hepatocytic merozoites are released into the bloodstream initiating the 48-hour asexual intraerythrocytic cycle that causes the malaria disease. During the blood cycle, the parasite undergoes development from the ring stage (0-20 h) to the trophozoite stage (20-36 h) and, after entering into the S phase, to the schizont stage (36-48 h) where several mitotic

divisions occur, producing 16-32 new merozoites. At the end of a cycle, the infected erythrocyte bursts and the released parasites invade other red blood cells.

P. falciparum resistance to the most commonly used antimalarial drugs makes it necessary to identify new therapeutic targets and new drugs (20). The 23 Mb haploid nuclear genome of *P. falciparum* is the most (A, T)-rich genome (>80%) sequenced to date (21). It is organised into 14 chromosomes. Its telomeres have a 1.2 kb mean length (22) and are composed of repeats of a degenerate motif, with 5'GGGTTYA3' (where Y is T or C) being the most abundant (≈80%) (23). This repeat appears to be common to all *Plasmodium* species (24). *P. falciparum* telomeres also appear to play a role in the regulation of sub-telomeric gene families that encode important virulence factors (25,26). A telomerase activity has been detected during the *P. falciparum* erythrocytic stage and in gametocytes (23,27) and we detected a telomerase activity in other *Plasmodium* species (the rodent parasites *P. yoelii yoelii* and *P. berghei*) (P.A. and D.D., unpublished results). A putative gene for the catalytic subunit of telomerase has been identified (28). Reverse transcriptase inhibitors, such as nucleoside analogs, inhibit telomerase activity in *P. falciparum* extracts (23). Nevertheless these drugs kill the parasite (in *in vitro* cultures) only after 3-5 blood stage cycles and at relatively high (micromolar) concentrations (reported in (28)). Compared to reverse transcriptase inhibitors, G-quadruplex ligands not only have the ability to inhibit telomerase, but also to disrupt telomere structure in human cells. In principle, G-quadruplex ligands at telomeres might alter the telomere nucleoprotein structure by several mechanisms of action: by impairing a correct processing of the 3' G-overhang, by impairing refolding of telomeres in a capping structure, by perturbing the interaction with telomere-associated proteins or by interfering with telomere replication. To our knowledge, such molecules have not yet been tested as potential drugs against *P. falciparum* proliferation.

In order to investigate the possibility of targeting *Plasmodium* telomeres with G-quadruplex ligands, we addressed the following questions: (i) Do *P. falciparum* telomeres end with a 3' G-overhang? (ii) Can the degenerate motif of the *Plasmodium* telomeric G-strand fold into stable G-quadruplex structures? (ii) Is it possible to stabilise these structures with small compounds? (iv) Can a G-quadruplex ligand discriminate between quadruplexes at the telomeres of the parasite and quadruplexes at the telomeres of its human host? (v) Do these compounds exhibit antiproliferative effects in cellular models?

To answer to these questions, we first carried out solution hybridisation assays in order to detect a telomeric 3' G-overhang in *P. falciparum* genomic DNA. We then undertook an UV-spectroscopy investigation of the eight possible sequences consisting of 3.5 repetitions of the *Plasmodium* degenerate telomeric motif 5'GGGTTYA3' (sequences Pf1-Pf8, reported in **Table 1**). Using a competitive FRET-melting assay, we then studied the interaction of several G-quadruplex ligands with the *Plasmodium* telomeric sequences. Different families of compounds were tested (**Fig. 2**): quinacridine derivatives (29,30), neomycin-capped macrocyclic compounds (31), bisquinolinium compounds (32), a metal-terpyridine complex (33) and an ethidium derivative (34,35). Four well-studied G-quadruplex ligands were also tested: the cationic porphyrin TMPyP4 (36), the perylene derivative PIPER (37), the trisubstituted acridine BRACO-19 (38,39) and the natural compound telomestatin (40,41). Finally, the effect of these compounds on *P. falciparum* proliferation was determined in parasite blood cultures.

MATERIAL AND METHODS

Oligonucleotides and compounds

All the oligonucleotides and their fluorescent conjugates were purchased from Eurogentec (Belgium) and were dissolved in bidistilled water at a concentration of about 300 μ M, stored at -20°C, and used without further purification. Concentrations were determined by UV-absorption using extinction coefficients determined according the nearest-neighbour model (42).

The cationic porphyrin TMPyP4 (counterion $p\text{CH}_3(\text{C}_6\text{H}_4)\text{SO}_3^-$) (36) and the perylene derivative PIPER (37) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). The trisubstituted acridine BRACO-19 (38) and the ethidium derivative 317050 (WO 0212194) (34,35) were a kind gift from P. Mailliet (Sanofi-Aventis, Vitry/Seine, France). Telomestatin (40) was a kind gift from K. Shin-ya (U. Tokyo). The synthesis of bisquinolinium derivatives (Phen-DC3, Phen-DC6, Bipy-DC3, and Bipy-DC6 with counterion CF_3SO_3^-) (32), neomycin-capped macrocycles (NCA1, NCA2, NCQ, and NCphen) (31), copper terpyridine Cu-ttpy (33) and metaquinacridines (MMQ1, MMQ3 and MMQ10) (29,30) were previously described. Telomestatin was dissolved in DMSO:MeOH (1:1) at 1 mM concentration; TMPyP4 and the neomycin-capped derivatives were dissolved in bidistilled water at 2 mM and 1 mM, respectively; PIPER was dissolved in diluted acetic acid (10%) at 2 mM; all the other compounds were dissolved in DMSO at 2 mM. All the compounds were stored at -20°C. Further dilutions were made in bidistilled water.

P. falciparum cultures and parasite preparations

Plasmodium falciparum strains (FCB1/Colombia, K1/Thailand, F32/Tanzania) were maintained *in vitro* in human erythrocytes in RPMI 1640 medium supplemented by 8% (v/v) heat-inactivated human serum at 37°C under an atmosphere of 3% CO_2 , 6% O_2 , 91% N_2 (43). Synchronized cultures were obtained by sequential combination of gelatin flotation method (44) and sorbitol treatment (45). Briefly, mature schizont-infected red blood cells were isolated and concentrated to 60-80% parasitaemia by means of Plasmion (Fresenius Kabi, Sèvres, France). The schizonts were then put back in culture and diluted with fresh erythrocytes to 10% parasitaemia. After 6 h, the reinvasion was stopped by lysing the remaining schizonts with 5% sorbitol (w/v in distilled water). Such a procedure yields parasite cultures synchronized in a 6 h window.

For DNA preparation, infected red blood cells were washed twice in cold PBS and incubated 5 min, on ice, in cold 0.2% (w/v) saponine in PBS in order to lyse the infected erythrocyte membrane without disrupting the parasite plasma membrane. Free parasites were then washed three times in cold PBS and kept at -80°C until used.

To evaluate the telomestatin effect on the parasite growth, synchronized cultures (FCB1 strain) at the ring stage (10 h post invasion) were maintained in culture in the presence of 1 or 5 μ M of drug or the equivalent amount of DMSO (as a control). Parasitaemia and parasite growth were followed on Giemsa-stained smears 24 h and 48 h after drug addition. Parasite morphology was defined according to the following criteria: ring stage, when parasites exhibited a peripheral cytoplasm stained by Giemsa and an unstained intraparasitic vacuole; trophozoite stage, when parasites showed a fully stained cytoplasm, haemozoin crystals and one nucleus; schizont stage, when parasites filled the erythrocyte cytoplasm and presented several distinctive nuclei. Parasitaemias were determined by counting at least 3,000 cells for each sample. Parasite growth inhibition was determined by comparison of the level of parasitaemia in treated cultures with that in untreated cultures processed in the same way as the treated cultures. Experiments were performed in duplicate and repeated twice.

***In vitro* antiplasmodial activity**

In vitro drug susceptibility assays were performed using a modification of the semi-automated microdilution technique of Desjardins *et al.* (46). Stock solutions of test compounds were serially diluted two-fold with 100 μ L culture medium in 96-well plates. Asynchronous parasite cultures (100 μ L, 1% parasitaemia and 1% final hematocrite) were then added to each well and incubated for 24 h at 37°C prior to the addition of 0.5 μ Ci of [3 H]-hypoxanthine (GE Healthcare, France, 1 to 5 Ci·mmol/mL) per well. After a further incubation of 24 h, plates were frozen and thawed. Cell lysates were then collected onto glass-fiber filters and counted in a liquid scintillation spectrometer. The growth inhibition for each drug concentration was determined by comparison of the radioactivity incorporated in the treated culture with that in the control culture (having the same final % of solvent) maintained on the same plate. The concentration causing 50% growth inhibition (IC₅₀) was obtained from the drug concentration-response curve and the results were expressed as the mean values $\pm$ standard deviations determined from several independent experiments.

***P. falciparum* genomic DNA extraction and exonuclease treatments**

Parasites (10^8 , from erythrocytic cultures of FCB1 strain) in a volume of 100 μ L were diluted with 10 volumes of an extraction solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM EDTA, 0.5% SDS and 20 μ g/mL RNase A (Sigma, France). The RNase A solution was previously heated at 95°C for 15 min to inactivate DNAases. After 1 h stirring at 37°C, 20 μ g/mL of RNase A were added and digestion was continued for another hour at 37°C. Proteins and RNase A were then digested by 100 μ g/mL Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 2 h and 30 min at 50°C. DNA was purified by a phenol/chloroform extraction and precipitated by adding 0.2 volumes of 7.5 M ammonium acetate and 2.5 volumes of absolute ethanol. The pellet was washed with 70% ethanol, air dried and dissolved in 1 volume of TE buffer overnight at 4°C. After determination of the DNA concentration by UV absorbance at 260 nm, aliquots of the genomic DNA solution were stored at -20°C.

T7 Exonuclease (NEB, Ipswich, MA) digestion of 4.5 μ g genomic DNA was carried out for 90 s at 25°C in 50 μ L of a solution containing 7.5 enzyme units, 20 mM Tris acetate (pH 7.9), 50 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT. Exonuclease I (NEB, Ipswich, MA) digestion of 4.5 μ g genomic DNA was carried out for 30 min at 37°C in 50 μ L of a solution containing 30 enzyme units, 67 mM glycine-KOH (pH 9.5), 6.7 mM $MgCl_2$, 10 mM β -mercaptoethanol. The reactions were stopped by addition of 25 mM EDTA. The exonuclease-treated DNA samples were precipitated with ethanol and dissolved in 10 μ L bidistilled water. Samples were incubated for 30 min at 37°C before using them for the T-OLA.

Hybridisation assay with undigested DNA

The C-probe (d(TGAACCC)₃) and the G-probe (d(GGGTTTA)₃) were 5' radiolabelled using [$\gamma^{32}P$]ATP and T4 Polynucleotide Kinase (NEB) and purified on a Spin 6 column (Bio-Rad, Hercules, CA). The choice of probes bearing only three telomeric repeats was made to avoid folding of the G-probe into an intramolecular G-quadruplex; such a folding could impair hybridisation to the target DNA. The C- and G-probe sequences were designed in order to minimise destabilisation upon hybridisation to the degenerate sequence of *Plasmodium* telomeres (a G/T mismatch should be less destabilising than an A/C mismatch).

Genomic DNA (3 μ g) was incubated overnight at 37°C or 50°C (in a sealed tube to avoid evaporation) with 0.6 pmol radiolabelled G- or C-probe in 20 μ L of 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT. The samples were then loaded in a 0.8% agarose gel in 1X TBE buffer containing ethidium bromide. After migration, ethidium-stained

DNA was revealed by UV transillumination at 254 nm. The gel was then vacuum-dried between two nylon membranes (Hybond N+, Amersham) and Whatman 3MM papers for 15 min without heating and for 30 min at 42°C. The gel, sandwiched between the nylon membranes, was exposed to a Phosphorimager Screen, scanned with a Typhoon 9410 (Amersham).

TRF assay

Telomere restriction fragment (TRF) assay was carried out as previously reported (22), with minor modifications. Briefly, genomic DNA (3 µg) was digested overnight at 37°C using a cocktail of four restriction enzymes (5 units of each) that do not digest *Plasmodium* telomeric DNA: Alu I, Rsa I, Dde I, and Mbo II (all purchased from NEB). The reaction was carried out in 30 µL of 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 1 mM DTT. For the TRF assay, the digested sample was loaded in a 0.8% agarose gel in 1X TBE buffer. After electrophoresis, analysis was performed by Southern blot with the radiolabelled C-probe according to standard protocols. In a native TRF assay, 0.6 pmol of the radiolabelled G- or C-probe was added during the overnight digestion at 37°C. The samples were then loaded on a 0.8% agarose gel in 1X TBE buffer containing ethidium bromide. After migration, ethidium fluorescence and radioactivity were imaged as described above. Radiolabelled and unlabelled 1 kb plus DNA ladders (Invitrogen) were loaded in the gels as size markers for radioactive and ethidium fluorescence detection, respectively.

T-OLA

Telomeric-oligonucleotide ligation assay (T-OLA) was carried out as previously described (47). C-probe (20 pmol) was 5' radiolabelled using [γ ³²P]ATP (80 µCi) and 10 units of T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK, NEB) for 40 min at 37°C in a total volume of 20 µL. An additional phosphorylation step, to allow oligonucleotide ligation, was then carried out by adding 1 µL 0.1 M ATP and 10 units of T4 PNK for 10 min at 37°C. The modified radiolabelled probe was purified on a Spin 6 column (Bio-Rad).

Genomic DNA (3 µg, treated or not with ExoI or T7Exo) was incubated overnight at 50°C (in a sealed tube to avoid evaporation) with 0.6 pmol modified radiolabelled probe in 20 µL of a Taq ligase buffer (NEB) containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 25 mM KCH₃COO, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 10 mM DTT, 1 mM NAD, 0.1% Triton 100X. The hybridisation step was followed by a ligation step of 5 h at 50°C in the presence of 20 units of Taq DNA ligase (NEB). Samples were then precipitated by adding 80 µL NaCl 0.625 M and

200 μ L of absolute ethanol and centrifuged for 15 min at 14,000 g. Pellets were washed once with 70% ethanol, air dried and incubated in 10 μ L bidistilled water for 30 min at 50°C. Samples (2 μ L) were loaded on an 0.8% agarose gel in 0.5X TBE buffer containing ethidium bromide. After migration, ethidium fluorescence and radioactivity were imaged as described above. The ligated probes (7 μ L of samples) were separated in a 5% denaturing polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide, 19:1, in 1X TBE, 7 M urea).

UV-measurements

UV-absorbance spectra and UV-melting curves were acquired on a Kontron Uvikon 940 spectrophotometer (Switzerland). In the UV-melting experiments the temperature was varied with a circulating water bath from 90°C to 2°C and from 2°C to 90°C at a rate of 0.2°C/min. Evaporation at high temperatures was reduced by a layer of mineral oil and condensation at low temperatures was minimised by dry air flow in the sample compartment. *Thermal difference spectra* (TDS) (48) were obtained by subtracting the absorbance spectrum at 2°C from the one at 90°C; the spectrum at 2°C was recorded after annealing of the sample from 90°C to 2°C at a rate of 0.2°C/min. *Circular dichroism* (CD) spectra were recorded on a Jasco J-810 spectropolarimeter (UK) at 20°C, after annealing from 90°C at a rate of 1°C/min. Two spectra were accumulated at a scan speed of 200 nm/min and the contribution of the buffer and quartz cell was subtracted. All experiments (melting, TDS, and CD) were carried out at 3 μ M or 30 μ M oligonucleotide concentration in a 10 mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100 mM KCl or NaCl or LiCl, using 1 cm or 0.2 cm path-length cells.

FRET-melting experiments

FRET-melting experiments were carried out as described previously (49,50) using double-labelled *Plasmodium* repeats and comparing the results with the human F21GT sequence (5'-FAM-(GGGTTA)₃GGG-TAMRA^{3'}). The FAM emission at 520 nm of double-labelled telomeric sequences (FAM and TAMRA at 5' and 3' ends, respectively) in the absence and in the presence of a single compound was recorded as a function of temperature on a Stratagene MX3000P (La Jolla, CA) in 96-well microplates. To investigate the *quadruplex* vs. *duplex* selectivity of each compound, a 26-base self-complementary competitor was added (ds26 5'-dCAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG^{3'}). The temperature was varied from 25°C to 95°C at a rate of 1°C/min (the temperature range of the MX3000P thermal block). The FAM emission vs. temperature plots were normalised between 0 and 1 and the temperature of half-dissociation ($T_{1/2}$) corresponding to an emission value of

0.5 was determined (49). The (quasi)complete folding of the labelled telomeric sequences at 25°C, under our experimental conditions, was verified by performing FRET-melting experiments between 0°C and 80°C on a SPEX Fluorolog (data not shown).

All the experiments were carried out in duplicate at 0.2 μ M oligonucleotide, 1 μ M compound and increasing concentrations of ds26 (0, 3 and 10 μ M), in a 10 mM cacodylic acid buffer (pH 7.2. adjusted with LiOH) containing 100 mM NaCl in a total volume of 25 μ L. For each compound, two or three independent experiments were performed.

RESULTS

Evidence for a 3' G-overhang at *P. falciparum* telomeres

In order to determine whether the *P. falciparum* chromosomes (schizont stage) have a telomeric 3' G-overhang, solution hybridisation assays under non-denaturing conditions were carried out. In a first assay, genomic DNA was incubated at 37°C with a radiolabelled probe complementary either to the telomeric G-rich strand (*C-probe: d(TGAACCC)₃, ³²P at 5'-end) or to the telomeric C-rich strand (*G-probe: d(GGGTTTA)₃, ³²P at 5'-end). After migration on an agarose gel, radioactivity detection revealed that, compared to the *G-probe, the *C-probe strongly hybridised to the genomic DNA (**Fig. 3A, top**). Furthermore, in contrast to that of the *G-probe, the hybridisation signal of the *C-probe did not decrease upon incubation at a higher temperature (50°C), suggesting a sequence specific hybridisation of the *C-probe to genomic DNA (**Fig. 3A, top**). DNA detection by ethidium bromide fluorescence verified that the same amount of DNA was loaded in each gel lane (**Fig. 3A, bottom**).

In a native telomere restriction fragment (TRF) assay, genomic DNA was digested by enzymes that do not cut *Plasmodium* telomeric sequences. Upon incubation at 37°C with digested genomic DNA, the *C-probe, unlike the *G-probe, strongly hybridised to fragments of about 1-1.5 kb and 3 kb (**Fig. 3B, centre**). These fragments corresponded to telomeric fragments as revealed by a denaturing TRF assay (*i.e.* a Southern blot of the digested genomic DNA with the *C-probe) (**Fig. 3B, right**). Note that 1.2 kb is the reported mean length of *P. falciparum* telomeres. Nevertheless, telomere mean length varies among *P. falciparum* strains; in particular, a two peak hybridisation pattern was previously observed in certain strains (22). In the denaturing TRF, the probe hybridises along the whole telomere length, whereas in the native TRF it hybridises only to the G-overhang. This can explain why the ratio between the intensities of the 3 kb and the 1-1.5 kb signals was higher in the denaturing TRF than in the native TRF (assuming that the G-overhang mean length was not significantly different at short and long telomeres). Alternatively, the 3 kb fragments might arise from non-digested sub-telomeric regions. In this case the increased relative intensity of the 3 kb signal in the denaturing TRF compared to the native TRF implies non-specific hybridisation of the probe along the sub-telomeric regions. Detection of ethidium bromide fluorescence verified that genomic DNA was digested and that the same amount of DNA was loaded in both the *G- and *C-probe lanes (**Fig. 3B, left**).

Finally, in a telomeric-oligonucleotide ligation assay (T-OLA) (47), genomic DNA (treated or not with exonucleases) was incubated with the *C-probe (modified for ligation) at 50°C. The ligation step ligated consecutively hybridised probes. The *C-probe hybridised to genomic DNA (**Fig. 3C**, ³²P agarose gel) and long concatenated *C-probes were detected in the solution (**Fig. 3C**, T-OLA). Treating genomic DNA with exonucleases before incubation with the *C-probe verified that the detected signals arose from hybridisation to a 3'-overhang. Indeed, when genomic DNA was treated with ExoI (which degrades single-stranded DNA in the 3' to 5' direction), the hybridisation signal was strongly reduced; whereas, when treated with T7Exo (which removes nucleotides from 5' ends in double-stranded DNA), the hybridisation signal was strongly amplified. Loading of the same amount of DNA was verified by ethidium bromide fluorescence (**Fig. 3C**, EtBr agarose gel). The same T-OLA pattern was obtained with genomic DNA from parasites at the ring stage, a parasite stage where DNA does not undergo replication (data not shown).

Taken together, these data strongly support the existence of a telomeric 3' G-overhang in *P. falciparum* genomic DNA.

G-quadruplex folding and stability of *Plasmodium* telomeric sequences

Having demonstrated the presence of a telomeric 3' G-overhang in *P. falciparum* cells, we then investigated whether sequences mimicking this overhang formed a quadruplex structure. We undertook UV-spectroscopy investigation of the eight possible sequences mimicking 3.5 repetitions of the *Plasmodium* degenerate telomeric motif 5'GGGTTYA^{3'}, where Y is T or C (sequences Pf1-Pf8, **Table 1**). These oligonucleotides bear four runs of consecutive guanines, the minimum required for formation of intramolecular G-quadruplexes.

Thermal difference spectra. The thermal difference spectrum (TDS) of a nucleic acid in solution is defined as the difference between the absorbance spectrum at high temperature (unfolded form) and the one at low temperature (folded form). The global shape of a TDS provides information about the structure adopted by a nucleic acid sequence (48). For all the eight *Plasmodium* telomeric sequences (Pf1 to Pf8), the TDS signatures were characteristic of G-quadruplex structures with two positive peaks around 240 nm and 270 nm and a negative peak at 295 nm (**Fig. 4A** and **4B**). The thermal difference spectra in NaCl (**Fig. 4A**) slightly differed from the ones in KCl (**Fig. 4B**) in the ratio between the peak at 240 nm and the peak at 273 nm (0.64±0.09 and 0.93±0.07, respectively). This difference in NaCl and KCl TDS shapes has been observed for many other G-quadruplex forming sequences (48,51).

UV-melting experiments. TDS not only provides structural information, but also allows determination of the optimal wavelengths to follow structural changes as a function of temperature. Under our experimental conditions, the melting profiles (recorded at 245, 260, 273 and 295 nm) were reversible, as shown in **Fig. 4C** (NaCl) and **4D** (NaCl). Melting temperature values were graphically determined (52) with a precision of $\pm 1^\circ\text{C}$ (depending on the choice of the baselines) and are reported in **Table 1**.

In the presence of a given monocation, the eight *Plasmodium* telomeric sequences displayed similar thermal stabilities: the mean value of their T_m s in LiCl, NaCl and KCl was $27 (\pm 1)^\circ\text{C}$, $55 (\pm 2)^\circ\text{C}$ and $64 (\pm 1)^\circ\text{C}$, respectively (**Table 1**). This dependence of the stability upon the nature of the monocation is characteristic of G-quadruplex structures and is a further argument, along with the TDS signatures, supporting the formation of G-quadruplex structures by the eight *Plasmodium* telomeric sequences. The Na^+ and K^+ melting profiles did not change upon a 10-fold increase of the oligonucleotide concentration (30 μM) (data not shown), indicating an intramolecular folding in this range of concentrations.

The mean values of the T_m s of the eight Pf sequences were 4°C and 3°C lower in sodium and potassium, respectively, than those of the telomeric human sequence 21G. The sequence Pf1 (bearing all TTTA loops) appeared to be the most stable (with a T_m approaching the T_m of the human sequence 21G), whereas the sequence Pf8 (bearing all TTCA loops) was the least stable. A van't Hoff analysis of the melting curves (52) indicated that these differences in thermal stability corresponded to differences in thermodynamic stability. In NaCl, the Gibbs free energy ΔG° extrapolated at 37°C varied from -3.6 kcal/mol for Pf1 and 21G to -2.1 kcal/mol for Pf8. The other Pf sequences (from Pf2 to Pf7) were characterized by a ΔG° at 37°C of about -2.7 kcal/mol. These experiments demonstrate that a stable quadruplex was formed at physiological temperature by sequences containing the degenerate *Plasmodium* telomeric motifs.

Circular dichroism spectra. In order to obtain further insight into the folding topology of *Plasmodium* telomeric sequences, we performed CD measurements. CD bands should mainly reflect G-quartet stacking patterns (stacking of G-quartets with opposite or same orientation, **Fig.1**) (53), which, in turn, are strictly related to folding topologies. CD spectra were recorded at 20°C ; at this temperature and under our experimental conditions, the equilibrium was strongly shifted towards the folded form, as shown by the thermal melting

profiles (**Fig. 4C** and **4D**). The CD signatures of the eight Pf sequences were similar to the ones of the human telomeric sequence 21G (**Fig. 4E** and **4F**).

In NaCl, the spectra exhibited two positive bands near 245 and 295 nm and a negative band near 265 nm (**Fig. 4E**). This signature is reminiscent of G-quadruplexes such as the structure adopted by the human telomeric sequence in sodium (54) (**Fig. 1B**), the structure of the thrombin-binding aptamer (55) and the bimolecular quadruplex formed by the *Oxytricha* telomeric repeat $[d(G_4T_4G_4)]_2$ (56).

In KCl, the spectra exhibited a positive band at 290 nm and a shoulder at lower wavelengths (**Fig. 4F**). A negative band near 245 nm and a positive band near 265 nm is generally indicative of G-quadruplexes like the tetramolecular $[d(TG_4T)]_4$ (57). The CD signature we obtained in KCl suggests the presence of a mixture of G-quadruplex structures (58) or/and the presence of hybrid-type G-quadruplex conformations like the ones observed for human telomeric sequences in K^+ solution (59-63) (**Fig. 1D**) or for the four-repeat *Tetrahymena* telomeric sequence $d(TTGGGG)_4$ in Na^+ solution (64).

Interaction of G-quadruplex ligands with *Plasmodium* telomeric G-quadruplexes and competition with duplex DNA

Having established that the *Plasmodium* G-rich telomeric sequences are prone to quadruplex formation, we next investigated whether these quadruplexes were recognized by G-quadruplex ligands. Using a FRET-melting assay (49), we studied the interaction of several G-quadruplex ligands (**Fig. 2**) with the *Plasmodium* telomeric sequences and compared the results with those obtained with the human telomeric sequence. Three double-labelled oligonucleotides FPf1T, FPf8T and F21GT were used; these correspond to the Pf1 (all TTTA loops), Pf8 (all TTCA loops) and human 21G sequences coupled to FAM (F) and TAMRA (T). Upon G-quadruplex unfolding, the distance between FAM and TAMRA increase, leading to a decrease in FRET efficiency and, as a consequence, to an increase in FAM emission. Monitoring the FAM emission as a function of temperature allows determination of the temperature of half-dissociation ($T_{1/2}$) as described in *Material and Methods*. **Fig. 5A** and **5B** show two examples of FRET-melting experiments with FPf1T and FPf8T, respectively. The difference between the $T_{1/2}$ temperatures in the absence and in the presence of a given compound ($\Delta T_{1/2}$) provides a measure of the quadruplex thermal stabilisation induced by the compound (**Fig. 5**, colored and black curves). The *quadruplex vs. duplex* selectivity of a compound was then investigated by adding the duplex competitor ds26 (**Fig. 5**, grey curves).

For each compound, the selectivity (S) was defined as the ratio between the $\Delta T_{1/2}$ values in the presence and in the absence of the duplex competitor: $S = \Delta T_{1/2}(+ds26) / \Delta T_{1/2}(-ds26)$. For a given G-quadruplex and a given duplex competitor, S reflects the preferential binding of a compound to the quadruplex ($S \rightarrow 1$) or to the duplex ($S \rightarrow 0$).

All the $\Delta T_{1/2}$ values with their standard deviations are reported in Supplementary Materials (**Fig. 1S**). Within the uncertainty of the experimental data, each compound stabilised the three telomeric quadruplexes to roughly the same extent at the chosen concentration of 1 μ M. This is easily seen in the plots of the $\Delta T_{1/2}$ induced on FPF1T or FPF8T vs. the $\Delta T_{1/2}$ induced on F21GT (**Fig. 6A and 6B**): a linear correlation with a slope of about 1 was found (0.99 for FPF1T, with $R=0.88$, and 1.08 for FPF8T, with $R=0.90$) and for most of the compounds, the distance from this straight line fell within the standard deviations (not shown). An exception was the Cu-ttpy compound, which appeared to stabilise the human telomeric quadruplex ($\Delta T_{1/2} \approx 14^\circ\text{C}$) to a significant greater extent than the *Plasmodium* ones ($\Delta T_{1/2} \approx 6\text{--}7^\circ\text{C}$). Unsurprisingly, for all the tested compounds, the *quadruplex vs. duplex* selectivity values obtained for the *Plasmodium* telomeric sequences were similar to those obtained for the human one (**Fig. 6C**).

For all the three telomeric quadruplexes, the two bisquinolinium compounds Phen-DC3 and Phen-DC6 induced the strongest thermal stabilisation, followed by telomestatin, the porphyrin TMPyP4 and the quinacridine derivative MMQ10 ($\Delta T_{1/2} > 20^\circ\text{C}$). TMPyP4 and MMQ10 displayed poor selectivity ($S \approx 0$ and $S \approx 0.2$, respectively), whereas Phen-DC3, Phen-DC6 and telomestatin were among the most selective compounds ($S \approx 0.8$). Despite a lower thermal stabilisation capability, other compounds displayed a strong selectivity: the two bisquinolinium BiPy-DC3 and BiPy-DC6 ($S \approx 0.8$), the two neomycin-capped acridines NCA1 and NCA2 ($S \approx 0.7$) and the copper-terpyridine complex Cu-ttpy ($S \approx 1$). All these S values refer to a 10 μ M concentration of duplex competitor.

All the data reported in **Fig. 6** were obtained in the presence of NaCl. Ligand/G-quadruplex interactions may depend on G-quadruplex structure, which may be affected by cations. Since the folding topology of the *Plasmodium* telomeric quadruplexes may depend on the nature of the cation (see discussion of CD spectra), we carried out FRET-melting experiments in the presence of KCl (**Fig. 2S**). The extent of thermal stabilisation was different in KCl than in NaCl, as already reported (49). Nevertheless, in KCl, all the tested compounds

stabilised the two *Plasmodium* telomeric quadruplexes and the human one to roughly the same extent (**Fig. 2S**), as observed in NaCl. Finally, we point out that the stabilisation and selectivity profiles we obtained for the human telomeric sequence F21GT were consistent with the ones reported in the literature (31-33).

From this data we conclude that *Plasmodium* telomeric quadruplexes are recognized by a variety of ligands; many ligands exhibit a strong selectivity for quadruplex structures relative to duplexes, but show little discrimination between the human and *Plasmodium* sequences.

***In vitro* inhibition of parasite proliferation by G-quadruplex ligands**

The antiplasmodial activity of the compounds displaying the strongest selectivity for G-quadruplexes relative to duplexes was determined for three *P. falciparum* strains (F32, FCB1 and K1) with different degrees of resistance to the antimalarial drugs chloroquine, mefloquine and pyrimethamine. Drug activity was evaluated by measuring the incorporation of the purine precursor [³H]-hypoxanthine into the parasite DNA. Since the red blood cells are anucleated, the radioactivity incorporated into the parasite DNA correlates to parasite proliferation (46). Except for the neomycin-capped compounds, all the other G-quadruplex ligands showed significant *in vitro* antiplasmodial activities in the range of concentrations tested, with IC₅₀ values from around 0.1 to 2 μ M (**Table 2**). There were significant differences in IC₅₀ values (up to 5 fold) between the three parasite strains for the bisquinoliums Phen-DC3, Phen-DC6, and BiPy-DC3. In contrast, the perylene derivative PIPER, the bisquinolium BiPy-DC6 and the natural product telomestatin showed similar antiplasmodial activities on the three strains tested. PIPER was the most active with IC₅₀ values ranging from 88 to 158 nM.

We investigated further the effect of telomestatin, a well-studied G-quadruplex ligand, on the parasite development. Synchronized cultures of parasites at the ring stage (FCB1 strain, 10 h-post invasion aged population) were maintained in the presence of 1 μ M and 5 μ M telomestatin; these concentrations were approximately the IC₅₀ and the IC₉₀ (the concentration that caused 90% of inhibition of parasite growth), respectively, as measured by [³H]-hypoxanthine incorporation. Parasitaemia and parasite growth into trophozoite and schizont stages were evaluated on Giemsa-stained blood smears after 24 h and 48 h of incubation. Reduction of parasitaemia was observed after 24 h of incubation in 5 μ M telomestatin (33% inhibition) and was particularly marked after 48 h of incubation in 1 μ M

(63% inhibition) and 5 μ M (98% inhibition) telomestatin (**Fig. 7A**), confirming the parasite growth inhibition measured by [3 H]-hypoxanthine incorporation.

In control cultures (DMSO added rather than drug), parasites grew from the ring to the trophozoite and the schizont stages and invasion of new red blood cells by merozoites occurred (**Fig. 8a-c**). The parasite population was mainly constituted of schizonts (dividing form) after 24 h of incubation (**Fig. 7B**) and of new ring forms, corresponding to the second intraerythrocytic cycle, after 48 h (**Fig. 8c**). In contrast, a delay in parasite development was observed in the presence of 1 μ M telomestatin with a parasite population mainly constituted of trophozoites, rather than schizonts, after 24 h of incubation (**Fig. 7B**). After 48 h, new rings were observed (**Fig. 8e**), as well as abnormal schizont forms (**Fig. 8f**). The delay in parasite development was particularly marked in the presence of 5 μ M telomestatin. After 24 h of incubation, almost none of the parasites reached the trophozoite and schizont stages (**Fig. 7B** and **Fig. 8g**) and after 48 h, except for rare new rings, all the parasites were dying (pycnotic forms, **Fig. 8h**) or showed abnormal trophozoite forms (**Fig. 8i**).

DISCUSSION

Telomere protection and maintenance appear to be essential for the proliferation of all eukaryotic cells. Thus, use of drugs that impair telomeric functions in rapidly proliferating protozoan parasites might be a potential strategy to stop progress of the infection. The aim of this study was to investigate the possibility of targeting *P. falciparum* telomeres with G-quadruplex ligands.

To this purpose, we first investigated the existence of a 3' G-overhang at *P. falciparum* telomeres. In solution hybridisation assays under non-denaturing conditions, we detected hybridisation signals on *P. falciparum* genomic DNA that strongly supported the existence of such an overhang. In particular, a T-OLA revealed the existence of long hybridisation products, suggesting long G-overhangs.

We then investigated the structure and the stability of the eight sequences Pf1-Pf8 corresponding to about four repetitions of the *Plasmodium* degenerate telomeric motif 5'GGGTTYA3'. Three lines of experimental evidence showed the formation of G-quadruplex structures by all the eight sequences: (i) the shape of their thermal difference spectra, (ii) their CD signatures and (iii) the dependence of their melting temperatures upon the nature of the monocation present in the solution ($T_m(K^+) > T_m(Na^+) > T_m(Li^+)$).

CD spectra provided some insight into the folding topology of Pf sequences. As for the human telomeric sequence 21G, the eight Pf sequences displayed different signatures in NaCl and KCl, indicating different folding topologies according to the nature of the monocation present in solution. NMR studies will be necessary to discriminate between the presence of a predominantly hybrid-type conformation and the presence of multiple conformations.

UV-melting allowed investigation of the stability of the eight potential Pf G-quadruplexes. All the Pf sequences displayed roughly the same thermal stability: Pf1 (all TTTA loops) appeared to be the most stable whereas Pf8 (all TTCA loops) was the least stable. Finally, compared to the human telomeric sequence 21G (TTA loops), the T_m s of the Pf sequences were an average of a few degrees lower. The same trend was found when analysing thermodynamic stability by a van't Hoff analysis. A decrease in stability with increasing loop length was reported for similar sequences bearing T_n loops (65).

We then studied the interaction of several known G-quadruplex ligands with the *Plasmodium* telomeric sequences using a competitive FRET-melting assay. The stabilisation was quantified in terms of induced $\Delta T_{1/2}$. All the tested compounds displayed roughly the same stabilisation and *quadruplex vs. duplex* selectivity profiles for the two *Plasmodium* telomeric sequences FPf1T, FPf8T and the human one F21GT. The stabilisation and selectivity profiles we obtained suggest that each of the tested compounds has roughly the same affinity for each of the three different quadruplexes. This means that the compounds we tested could not discriminate between *Plasmodium* and human telomeric quadruplexes, despite the differences in loop length and loop sequences. This result is not unexpected, since all the tested ligands present aromatic surfaces, suitable for π - π interactions with a G-quartet surface; likely, they stabilise G-quadruplex structures by stacking onto the terminal G-quartet(s). For an antimalarial approach based on targeting *P. falciparum* telomeres, discrimination between G-quadruplexes at parasite telomeres and G-quadruplexes at the telomeres of its human host could reduce toxicity. Discrimination may be attained through ligands that strongly interact with the “variable” structural features of G-quadruplexes, in particular with loops. In this respect, a more thorough analysis of the data obtained with the neomycin-capped compounds reveals interesting features. The dome-shaped structure of these compounds was designed to target loop-containing G-quadruplexes *via* simultaneous interaction with the terminal G-quartet surface and the loop residues. The most stabilising compound of the family was NCQ ($\Delta T_{1/2} \approx 15^\circ\text{C}$), bearing the largest planar aromatic moiety (quinacridine). As expected, substituting this moiety with phenanthroline (NCPhen compound) decreased the stabilisation capability, but to a greater extent for F21GT (-9°C) than for FPf1T or FPf8T (-6°C). Despite similar stabilisation properties, the two neomycin-capped acridines NCA1 and NCA2 displayed a stronger *quadruplex vs. duplex* selectivity for FPf1T and FPf8T than for F21GT (≈ 0.7 , ≈ 0.8 , and ≈ 0.5 , respectively, in the presence of $10\ \mu\text{M}$ ds26). It is tempting to speculate that these features result from a more favourable interaction of the neomycin moiety with the loops of the *Plasmodium* quadruplexes than with the loops of the human quadruplex. A similar hypothesis may explain the stronger interaction in NaCl of Cu-ttpy with F21GT compared to FPf1T and FPf8T ($\Delta T_{1/2} \approx 14^\circ\text{C}$ vs. $\Delta T_{1/2} \approx 6-7^\circ\text{C}$). The pseudo-square pyramidal structure of the Cu-ttpy complex might lead, upon stacking onto the terminal G-quartet(s), to a more favourable (or less unfavourable) interaction with the loop(s) in the F21GT than in the FPf1T or FPf8T Na^+ quadruplex structures. High-resolution structural studies of Pf sequences will be helpful for a rational design of ligands able to discriminate between the *Plasmodium* and the human telomeric G-quadruplexes.

G-quadruplex ligands have been studied as potential inhibitors of telomerase activity. In the framework of our study, we also investigated the effect of G-quadruplex ligands on *in vitro* *P. falciparum* telomerase activity. However, as reported by other teams (23), we failed to detect a telomerase activity in a direct primer extension assay with *P. falciparum* cellular extracts. Hence we carried out TRAP experiments with appropriate primers to amplify *Plasmodium* telomeric repeats (23). Among the tested ligands, telomestatin induced a decrease in telomeric product intensities in a concentration-dependent manner without affecting the amplification of the non-telomeric internal control. An IC₅₀ value in the submicromolar range was estimated from these experiments (data not shown). Nevertheless, a decrease in telomeric product intensities in the TRAP assay with a G-quadruplex ligand does not necessarily reflect an inhibition of telomerase activity, since G-quadruplex ligands can inhibit telomerase elongation product amplification (66). Thus inhibition of *P. falciparum* telomerase activity by G-quadruplex ligands could not be demonstrated. However, the decrease in telomeric products observed by TRAP suggests that these ligands may affect other processes, like DNA polymerisation on G-quadruplex prone regions such as telomeres.

In the range of concentrations tested, the G-quadruplex ligands, except for the neomycin-capped compounds, showed significant *in vitro* antiparasmodial activities with IC₅₀ values ranging from 0.1 to 2 μ M (**Table 2**). The differences in levels of inhibition observed among the ligands (submicromolar to micromolar IC₅₀s) may be explained by their structural diversity and physico-chemical properties, which influence their ability to cross membranes. Indeed, *Plasmodium*-infected erythrocytes are incapable of endocytosis and drugs must cross three membranes (the erythrocyte, parasitophorous and parasite membranes) to reach the parasite cytoplasm. Three compounds, the perylene derivative PIPER, the bisquinolium BiPy-DC6 and the natural product telomestatin show interesting antimalarial activity; these compounds inhibited growth of each of three strains with different levels of resistance to the antimalarial drugs chloroquine, mefloquine and pyrimethamine. PIPER was as efficient as chloroquine in inhibition of the chloroquine-resistant strains FCB1 and K1. Significant differences of activity were observed on the three parasite strains for the bisquinoliums Phen-DC3, Phen-DC6 and BiPy-DC3 suggesting a possible resistance to this series of molecules.

CONCLUSIONS

Inducing or stabilising G-quadruplex structures at telomeres with small ligands might rapidly compromise telomeric functions and proliferation not only in human cancer cells, but also in unicellular eukaryotic pathogens like *P. falciparum*. In this study, we investigated the possibility of targeting *P. falciparum* telomeric G-strand with G-quadruplex ligands. The extremely high (A, T) content of *P. falciparum* genome should prove an asset for specifically targeting G-rich regions such as telomeres with small ligands. We first investigated the existence of a 3' G-overhang at *P. falciparum* telomeres. We then proved that *Plasmodium* degenerate telomeric G-rich sequences can fold into G-quadruplex structures nearly as stable as the human telomeric G-quadruplex. Furthermore, we showed that some of the most selective G-quadruplex ligands inhibit parasite growth during the erythrocytic cycle at submicromolar concentrations. Preliminary investigations using telomestatin, a well-studied G-quadruplex ligand, showed a concentration-dependent delay in parasite development leading to parasite death. A more dedicated study will be required to demonstrate the interaction of the tested ligands with *P. falciparum* telomeric DNA and to elucidate the mechanisms(s) of action of these compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Patrick Mailliet and Eliane Mandine (Sanofi-Aventis, Vitry, France); Kazuo Shin-ya (U. Tokyo); Elsa De Lemos, Markus Kaiser and Candide Hounsou (Institut Curie, Orsay); Jean-François Riou, Julien Gros, Aurore Guédin and Samir Amrane (Museum, Paris) for helpful discussions. This work was supported in part by an EU FP6 "MolCancerMed" grant (LSHC-CT-2004-502943 to J.-L.M.), DGA (Program "Stress and transcriptome of *P. falciparum*"), and the National Museum of Natural History (BQR 2007-2008).

REFERENCES

1. Wellinger, R.J. and Sen, D. (1997) The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer*, **33**, 735-749.
2. Teixeira, M.T. and Gilson, E. (2005) Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. *Chromosome Res*, **13**, 535-548.
3. Klobutcher, L.A., Swanton, M.T., Donini, P. and Prescott, D.M. (1981) All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3015-3019.
4. Jacob, N.K., Skopp, R. and Price, C.M. (2001) G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres. *EMBO J*, **20**, 4299-4308.
5. 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.
6. McElligott, R. and Wellinger, R.J. (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J*, **16**, 3705-3714.
7. 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 Dev*, **11**, 2801-2809.
8. Wellinger, R.J., Wolf, A.J. and Zakian, V.A. (1993) Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell*, **72**, 51-60.
9. Riha, K., McKnight, T.D., Fajkus, J., Vyskot, B. and Shippen, D.E. (2000) Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures. *Plant J*, **23**, 633-641.
10. Munoz-Jordan, J.L., Cross, G.A., de Lange, T. and Griffith, J.D. (2001) t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J*, **20**, 579-588.
11. Henderson, E.R. and Blackburn, E.H. (1989) An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol*, **9**, 345-348.
12. 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.
13. 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*, **266**, 2011-2015.

14. 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.
15. Phan, A.T. and Mergny, J.L. (2002) Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4618-4625.
16. 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.
17. Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Hurley, L.H. (1997) Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex interactive compound. *J Med Chem*, **40**, 2113-2116.
18. De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Riou, J.F. and Mergny, J.L. (2007) Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie*, in press.
19. Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y. and Hay, S.I. (2005) The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **434**, 214-217.
20. Ridley, R.G. (2002) Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, **415**, 686-693.
21. Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S. *et al.* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**, 498-511.
22. Figueiredo, L.M., Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Olivo-Marin, J.C. and Scherf, A. (2002) A central role for *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation. *EMBO J*, **21**, 815-824.
23. Bottius, E., Bakhsis, N. and Scherf, A. (1998) *Plasmodium falciparum* telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing. *Mol Cell Biol*, **18**, 919-925.
24. Dore, E., Pace, T., Ponzi, M., Scotti, R. and Frontali, C. (1986) Homologous telomeric sequences are present in different species of the genus *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*, **21**, 121-127.
25. Duraisingh, M.T., Voss, T.S., Marty, A.J., Duffy, M.F., Good, R.T., Thompson, J.K., Freitas-Junior, L.H., Scherf, A., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2005) Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, **121**, 13-24.
26. Freitas-Junior, L.H., Hernandez-Rivas, R., Ralph, S.A., Montiel-Condado, D., Ruvalcaba-Salazar, O.K., Rojas-Meza, A.P., Mancio-Silva, L., Leal-Silvestre, R.J., Gontijo, A.M., Shorte, S. *et al.* (2005) Telomeric heterochromatin propagation and

- histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell*, **121**, 25-36.
27. Raj, D.K., Das, B.R., Dash, A.P. and Supakar, P.C. (2003) Identification of telomerase activity in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun*, **309**, 685-688.
 28. Figueiredo, L.M., Rocha, E.P., Mancio-Silva, L., Prevost, C., Hernandez-Verdun, D. and Scherf, A. (2005) The unusually large *Plasmodium* telomerase reverse-transcriptase localizes in a discrete compartment associated with the nucleolus. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1111-1122.
 29. Mergny, J.L., Lacroix, L., Teulade-Fichou, M.P., Hounsou, C., Guittat, L., Hoarau, M., Arimondo, P.B., Vigneron, J.P., Lehn, J.M., Riou, J.F. *et al.* (2001) Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3062-3067.
 30. Hounsou, C., Guittat, L., Monchaud, D., Jourdan, M., Saettel, N., Mergny, J.L. and Teulade-Fichou, M.P. (2007) G-Quadruplex Recognition by Quinacridines: a SAR, NMR, and Biological Study. *ChemMedChem*, **2**, 655-666.
 31. Kaiser, M., De Cian, A., Sainlos, M., Renner, C., Mergny, J.L. and Teulade-Fichou, M.P. (2006) Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition. *Org Biomol Chem*, **4**, 1049-1057.
 32. De Cian, A., Delemos, E., Mergny, J.L., Teulade-Fichou, M.P. and Monchaud, D. (2007) Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. *J Am Chem Soc*, **129**, 1856-1857.
 33. Bertrand, H., Monchaud, D., De Cian, A., Guillot, R., Mergny, J.L. and Teulade-Fichou, M.P. (2007) The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org Biomol Chem*, **5**, 2555-2559.
 34. Koepfel, F., Riou, J.F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P.B., Labit, D., Petitgenet, O., Helene, C. and Mergny, J.L. (2001) Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1087-1096.
 35. Rosu, F., De Pauw, E., Guittat, L., Alberti, P., Lacroix, L., Mailliet, P., Riou, J.F. and Mergny, J.L. (2003) Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis. *Biochemistry*, **42**, 10361-10371.

36. Wheelhouse, R.T., Sun, D., Han, H., Han, F.X. and Hurley, L.H. (1998) Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *J Am Chem Soc*, **120**, 3261-3262.
37. Fedoroff, O.Y., Salazar, M., Han, H., Chemeris, V.V., Kerwin, S.M. and Hurley, L.H. (1998) NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry*, **37**, 12367-12374.
38. Read, M., Harrison, R., Romagnoli, B., Tanious, F., Gowan, S., Reszka, A., Wilson, W., Kelland, L. and Neidle, S. (2001) Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4844-4849.
39. Gowan, S.M., Harrison, J.R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M.A., Neidle, S. and Kelland, L.R. (2002) A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol Pharmacol*, **61**, 1154-1162.
40. Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y. and Seto, H. (2001) Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc*, **123**, 1262-1263.
41. Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K. and Hurley, L.H. (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J Am Chem Soc*, **124**, 2098-2099.
42. Cantor, C.R., Warshaw, M.M. and Shapiro, H. (1970) Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleolides. *Biopolymers*, **9**, 1059-1077.
43. Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**, 673-675.
44. Jensen, J.B. (1978) Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, **27**, 1274-1276.
45. Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, **65**, 418-420.
46. Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, **16**, 710-718.
47. Cimino-Reale, G., Pascale, E., Battiloro, E., Starace, G., Verna, R. and D'Ambrosio, E. (2001) The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Res*, **29**, E35.

48. Mergny, J.L., Li, J., Lacroix, L., Amrane, S. and Chaires, J.B. (2005) Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res*, **33**, E138.
49. De Cian, A., Guittat, L., Kaiser, M., Sacca, B., Amrane, S., Bourdoncle, A., Alberti, P., Teulade-Fichou, M.P., Lacroix, L. and Mergny, J.L. (2007) Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods*, **42**, 183-195.
50. Mergny, J.L. and Maurizot, J.C. (2001) Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *Chembiochem*, **2**, 124-132.
51. Mergny, J.L., Phan, A.T. and Lacroix, L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett*, **435**, 74-78.
52. Mergny, J.L. and Lacroix, L. (2003) Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, **13**, 515-537.
53. Gray, D.M., Wen, J.D., Gray, C.W., Repges, R., Repges, C., Raabe, G. and Fleischhauer, J. (2007) Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality*.
54. Wang, Y. and Patel, D.J. (1993) Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure*, **1**, 263-282.
55. Macaya, R.F., Schultze, P., Smith, F.W., Roe, J.A. and Feigon, J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3745-3749.
56. Smith, F.W. and Feigon, J. (1992) Quadruplex structure of Oxytricha telomeric DNA oligonucleotides. *Nature*, **56**, 164-168.
57. Aboul-ela, F., Murchie, A.I. and Lilley, D.M. (1992) NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG4T). *Nature*, **360**, 280-282.
58. Ourliac-Garnier, I., Elizondo-Riojas, M.A., Redon, S., Farrell, N.P. and Bombard, S. (2005) Cross-links of quadruplex structures from human telomeric DNA by dinuclear platinum complexes show the flexibility of both structures. *Biochemistry*, **44**, 10620-10634.
59. Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R.A. and Yang, D. (2006) Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res*, **34**, 2723-2735.

60. Luu, K.N., Phan, A.T., Kuryavyi, V., Lacroix, L. and Patel, D.J. (2006) Structure of the human telomere in K⁺ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold. *J Am Chem Soc*, **128**, 9963-9970.
61. Xu, Y., Noguchi, Y. and Sugiyama, H. (2006) The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution. *Bioorg Med Chem*, **14**, 5584-5591.
62. Phan, A.T., Kuryavyi, V., Luu, K.N. and Patel, D.J. (2007) Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution. *Nucleic Acids Res*.
63. Dai, J., Carver, M., Punchihewa, C., Jones, R.A. and Yang, D. (2007) Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4927-4940.
64. Wang, Y. and Patel, D.J. (1994) Solution structure of the Tetrahymena telomeric repeat d(T₂G₄)₄ G-tetraplex. *Structure*, **2**, 1141-1156.
65. Hazel, P., Huppert, J., Balasubramanian, S. and Neidle, S. (2004) Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *J Am Chem Soc*, **126**, 16405-16415.
66. De Cian, A., Cristofari, G., Reichenbach, P., De Lemos, E., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.P., Shin-ya, K., Lacroix, L., Lingner, J. and Mergny, J.L. (2007) Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, in press.
67. Parkinson, G.N., Lee, M.P. and Neidle, S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, **417**, 876-880.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Table 1. Oligonucleotide sequences and T_m values.

T_m s were determined at 295 nm at 3 μ M oligonucleotide concentration in a 10 mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100 mM NaCl or KCl. The same values were obtained at 245, 260 and 273 nm within $\pm 1^\circ\text{C}$ accuracy. 21G is the human telomeric sequence.

Table 2. *In vitro* anti-plasmodial activity of G-quadruplex ligands.

IC₅₀ values were determined by [³H]-hypoxanthine incorporation on asynchronous cultures of the F32/Tanzania strain (chloroquine sensitive and mefloquine resistant), the FCB1/Colombia strain (chloroquine resistant and mefloquine sensitive) and the K1/Thailand strain (chloroquine resistant, mefloquine sensitive and pyremithamine resistant). IC₅₀ values are the mean values ($\pm$ the standard deviations) of three independent assays. Nd: not determined.

Fig. 1. G-quartets and examples of G-quadruplexes.

(A) G-quadruplexes are four-stranded DNA structures based on the formation and stacking of quartets of coplanar guanines or G-quartets. These structures are stabilised by several cations, in particular by the monovalent cations K⁺ and Na⁺. **(B, C, D)** Schematic representations of resolved structures of the human telomeric sequence, as examples of intramolecular G-quadruplex folding: **(B)** antiparallel folding based on the NMR structure in Na⁺ (54); **(C)** parallel folding based on the X-ray structure in K⁺ (67); **(D)** hybrid-folding based on the NMR structure in K⁺ (59,60). In a G-quadruplex, two possible G-quartet orientations are possible; they are indicated by the circular arrows or by the different G-quartet colours (grey-clockwise or white-anticlockwise). The G-quartet stacking pattern is related to the folding pattern.

Fig. 2. Formulas of the tested compounds.

MMQ are mono-*meta*-quinacridine derivatives (29,30); NCQ, NCPhen, and NCA are macrocyclic compounds composed of an aromatic unit (quinacridine, phenanthroline, or acridine) capped with a neomycin moiety (31); Phen-DC and BiPy-DC are crescent-shaped bisquinolinium compounds with a phenanthroline or bipyridine central unit, respectively (32).

Fig. 3. Solution hybridisation assays under non-denaturing conditions.

(A) Analysis of 0.8% agarose gels of *P. falciparum* genomic DNA incubated with *G-probe (d(GGGTTTA)₃, ³²P at 5'-end) or *C-probe (d(TGAACCC)₃, ³²P at 5'-end) at 37°C or 50°C. Top panels: gels imaged by ³²P radioactivity, to detect probe hybridisation; bottom panels: gels imaged by ethidium fluorescence (EtBr), to detect DNA.

(B) Native and denaturing TRF assays. Left and central panels: 0.8% agarose gel of *P. falciparum* telomeric restriction fragments incubated with the *G- or *C-probe at 37°C, imaged by ethidium fluorescence to detect DNA (left panel) and ³²P radioactivity to detect probe hybridisation (central panel). Right panel: Southern blot of the telomeric restriction fragments detected with the *C-probe.

(C) T-OLA. Bottom panels: agarose gel of samples of *P. falciparum* genomic DNA after incubation with the *C-probe and ligation reaction, imaged by ethidium fluorescence and ³²P radioactivity. T-OLA panel: 5% denaturing polyacrylamide gel of the same samples, imaged by ³²P radioactivity to detect ligated *C-probes. The assay was run with genomic DNA non-treated (lane 1) or treated with T7Exo or ExoI (lane 2 and lane 3, respectively).

Fig. 4. Spectroscopic investigation of the Pf sequences

(A, B) Normalised thermal difference spectra of the eight *Plasmodium* telomeric sequences Pf1-Pf8 (dotted lines) and of the human telomeric sequence 21G (solid bolded line) in **(A)** NaCl and **(B)** in KCl.

(C, D) UV-melting profiles at 295 nm of the *Plasmodium* telomeric sequences Pf4 (dotted lines) and of the human telomeric sequence 21G (solid bolded line) in **(C)** NaCl and **(D)** in KCl.

(E, F) CD spectra of the eight telomeric sequences of *Plasmodium* Pf1-Pf8 (dotted lines) and of the human telomeric sequence 21G (solid bolded line) in **(E)** NaCl and in **(F)** KCl at 20°C. All UV-measurements were carried out at 3 µM oligonucleotide concentration in a 10 mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100 mM NaCl or KCl.

Fig. 5. Examples of FRET-melting experiments.

Thermal melting of the double-labelled oligonucleotides FPf1T and FPf8T followed by FRET.

(A) FPf1T alone (blue curve); in the presence of NCA1 (black curve); in the presence of NCA1 and of the duplex competitor ds26 (grey curve).

(B) FPf8T alone (red curve); in the presence of MMQ10 (black curve); in the presence of MMQ10 and ds26 (grey curve).

The experiments were performed at 0.2 μM labelled oligonucleotide, 1 μM ligand and 3 μM ds26 in a 10 mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100 mM NaCl.

Fig. 6. Results of FRET-melting experiments.

(A, B) Thermal stabilisation ($\Delta T_{1/2}$) induced by the different compounds on the *Plasmodium* telomeric quadruplexes FPf1T (A) and FPf8T (B) vs. $\Delta T_{1/2}$ induced on the human quadruplex F21GT (0.2 μM labelled oligonucleotide and 1 μM compound). For clarity of representation, the error bars are reported only in Supplementary materials (Fig. 1S). For all the compounds, the distance from the straight line fell within the limits of the error bars, except for the Cu-ttpy complex (in red).

(C) Quadruplex vs. duplex selectivity (i.e. the ratio S between the $\Delta T_{1/2}$ in the presence and in the absence of 10 μM duplex competitor ds26: $S = \Delta T_{1/2}(+ds26)/\Delta T_{1/2}(-ds26)$), for F21GT (green column), FPf1T (blue column) and FPf8T (red column).

The experiments were carried out in a 10 mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100 mM NaCl. The $T_{1/2}$ s of FPf1T, FPf8T and F21GT alone (with no ligand and no competitor) were 43.8°C, 44.7°C and 49.7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), respectively. In the absence of ligand, the presence of the duplex competitor did not affect the $T_{1/2}$ of the three labelled telomeric sequences.

Fig. 7. Parasite growth inhibition by telomestatin.

Synchronized parasites at the ring stage were maintained in the presence of 1 and 5 μM of telomestatin. Parasitaemia was determined on Giemsa-stained smears at 24 h and 48 h after drug addition. Parasite growth inhibition was calculated by comparison of the level of parasitaemia in treated cultures with that in untreated cultures. Parasite stages were distinguished according to the criteria defined in *Materials and Methods*. Data are the results of a typical experiment performed in duplicate.

(A) Parasite growth inhibition after 24 h and 48 h of incubation.

(B) Parasite stage distribution into ring (empty column), trophozoite (grey column), and schizont (black column) stages after 24 h of incubation.

Fig. 8. Morphological effects of telomestatin on parasite development.

Synchronized cultures at the ring stage were maintained in the presence of 1 and 5 μM of telomestatin or the equivalent volume of DMSO. Parasite morphology was examined on Giemsa-stained blood smears 24 h and 48 h after drug addition.

(a-b) Parasites maintained in the presence of DMSO.

(d-f) Parasites maintained with 1 μ M telomestatin.

(g-i) Parasites maintained with 5 μ M telomestatin. T0: parasite at the ring stage at the time of drug addition.

	Oligonucleotide sequence	T_m (°C)	
		Na ⁺	K ⁺
Pf1	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	58	65
Pf2	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	54	63
Pf3	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	55	64
Pf4	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	54	63
Pf5	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	54	64
Pf6	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	55	63
Pf7	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	55	64
Pf8	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	52	62
21G	dG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃ TTTAG ₃	59	67

Table 1

Compound	IC ₅₀ (μ M)		
	<i>P. falciparum</i> strain		
	F32	FCB1	K1
Chloroquine	0.010 $\pm$ 0.003	0.108 $\pm$ 0.030	0.147 $\pm$ 0.056
Mefloquine	0.023 $\pm$ 0.021	0.003 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001
PIPER	0.158 $\pm$ 0.038	0.088 $\pm$ 0.020	0.130 $\pm$ 0.007
Telomestatin	1.8 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.1
NCA1	>5	>5	n d
NCA2	>7.5	>7.5	n d
NCPHEN	>5	>5	n d
Phen-DC3	1.9 $\pm$ 0.3	0.652 $\pm$ 0.051	0.631 $\pm$ 0.047
Phen-DC6	7.7 $\pm$ 0.7	2.4 $\pm$ 0.2	>10
BiPy-DC3	0.356 $\pm$ 0.030	0.195 $\pm$ 0.017	1.0 $\pm$ 0.2
BiPy-DC6	0.101 $\pm$ 0.018	0.213 $\pm$ 0.016	0.293 $\pm$ 0.010

Table 2

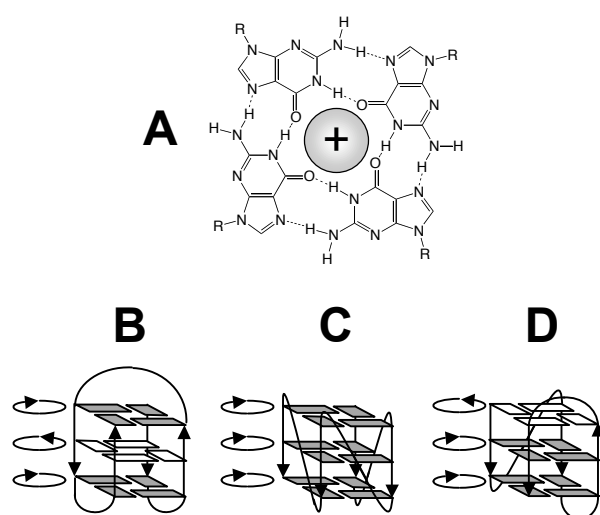


Figure 1

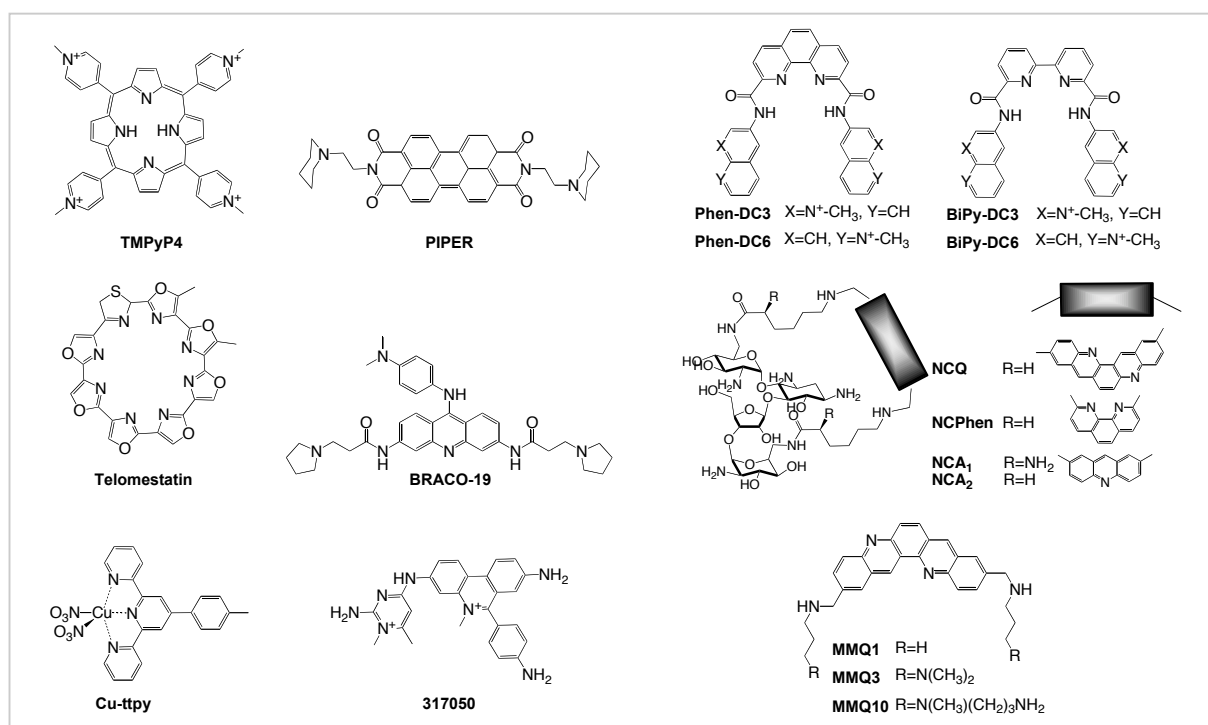


Figure 2

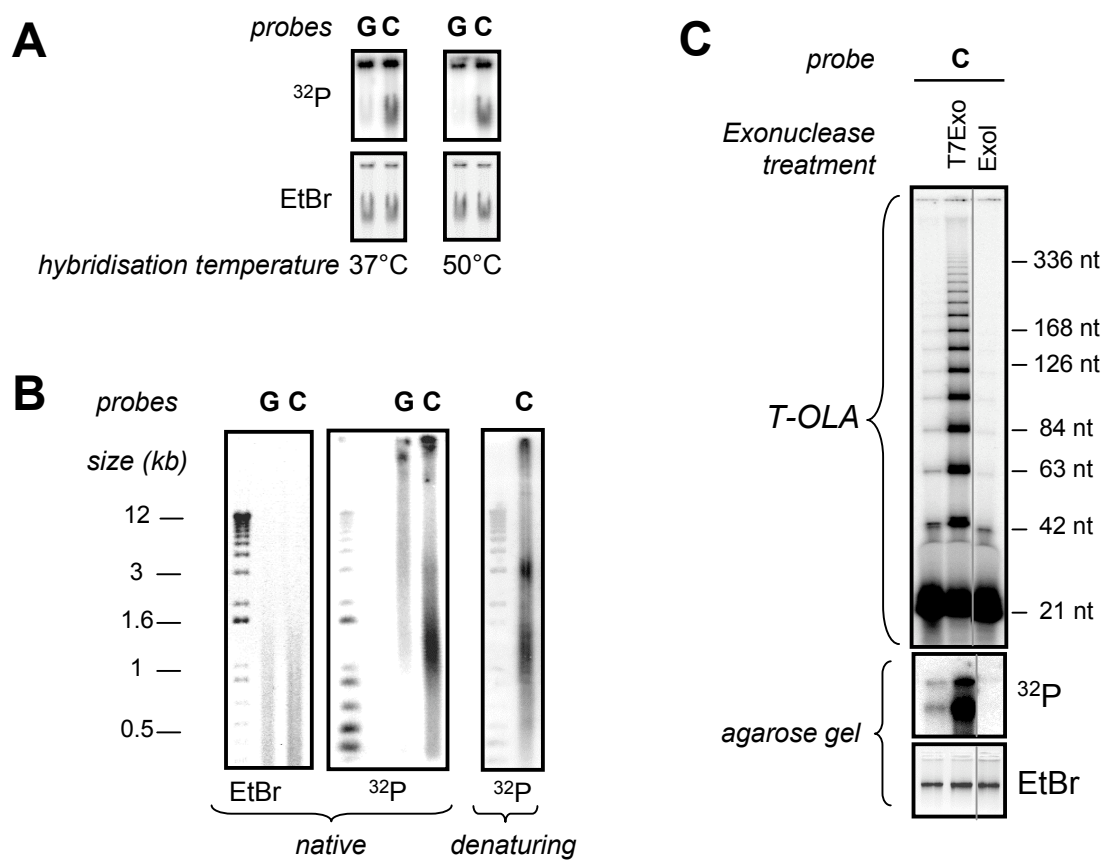


Figure 3

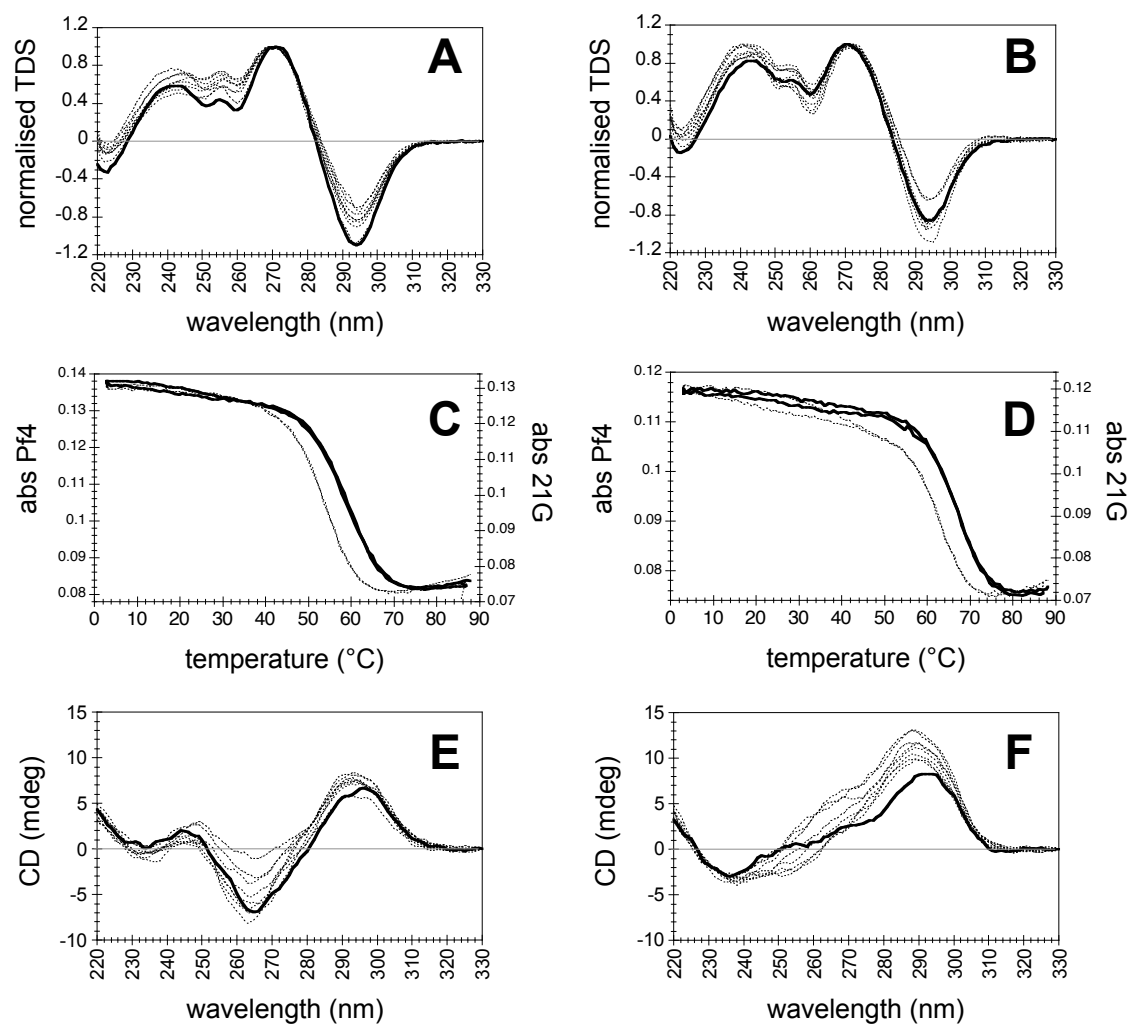


Figure 4

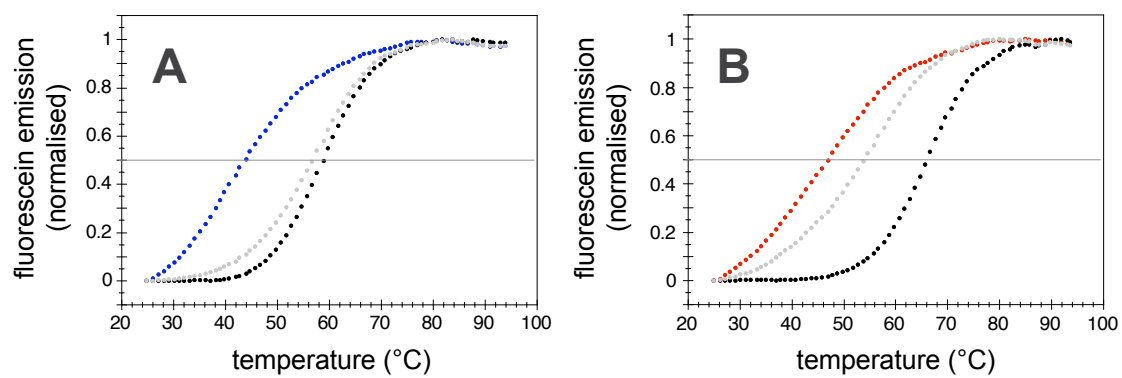


Figure 5

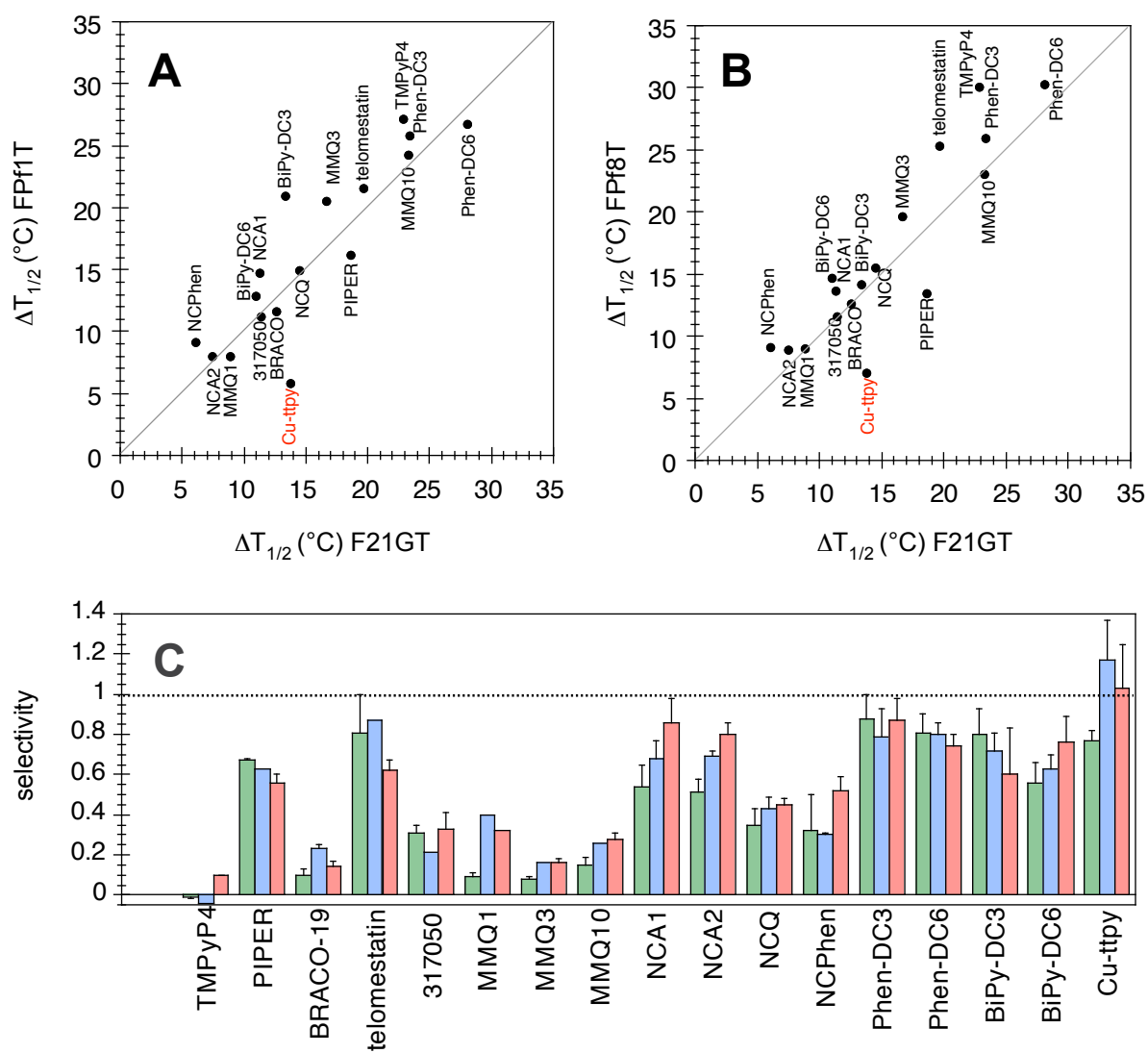


Figure 6

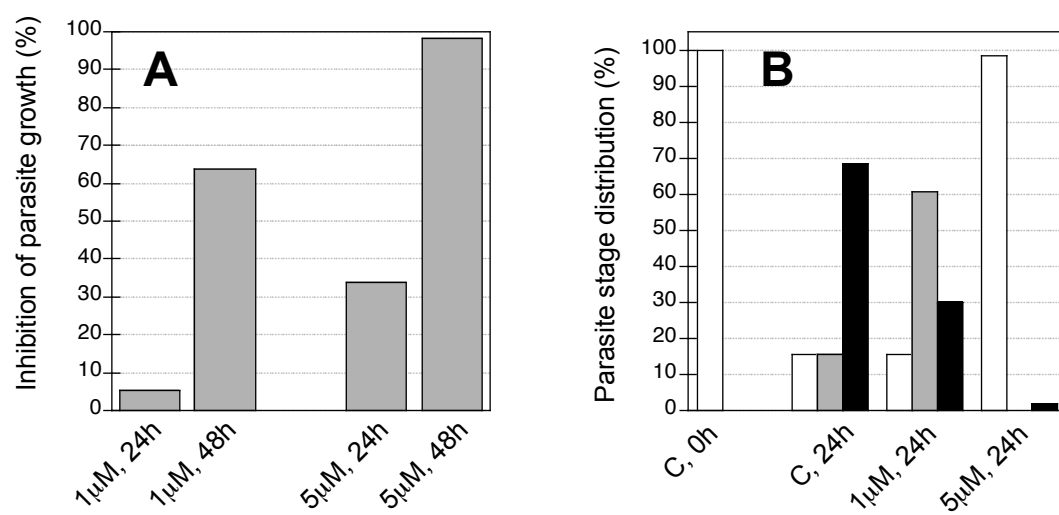


Figure 7

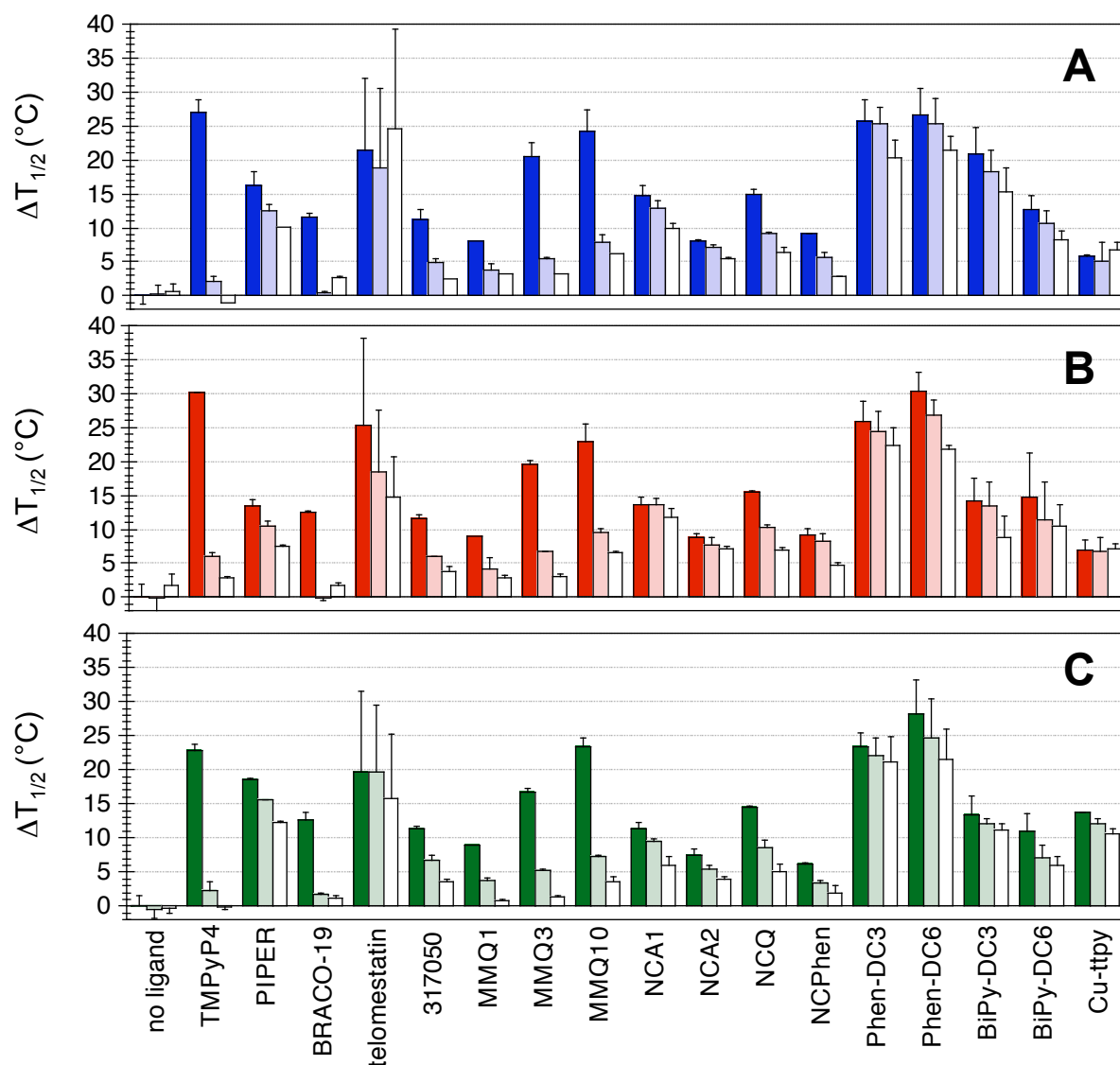


Figure 1S
Thermal stabilisation and *quadruplex vs duplex* selectivity in NaCl

Thermal stabilisation ($\Delta T_{1/2}$) induced by 1 μM compound on 0.2 μM FPf1T (A), FPf8T (B) and F21GT (C) in the presence of increasing concentrations of the duplex competitor ds26: no ds26 (dark colour columns), 3 μM ds26 (light colour columns) and 10 μM ds26 (white columns). The experiments were carried out in a 10mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100mM NaCl. Under this experimental condition, the $T_{1/2}$ of FPf1T, FPf8T and F21GT alone (with no ligand and no competitor) were 43.8°C, 44.7°C and 49.7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), respectively. Since the presence of the duplex competitor did not significantly affect the $T_{1/2}$ of the three telomeric sequences, the $\Delta T_{1/2}$ were calculated using these values. The error bars are the standard deviations obtained from several experiments. For telomestatin, two different stock solutions were used. These two stock solutions did not induce the same $\Delta T_{1/2}$: a $\Delta T_{1/2}$ of about 58°C were obtained with the first one and of about 78°C with the second one. Despite this strong difference, probably due to solubility problems, each stock displayed a strong selectivity *quadruplex vs duplex* for the three sequences. For this reason, the error bars reported for telomestatin in the presence of duplex competitor are overestimated.

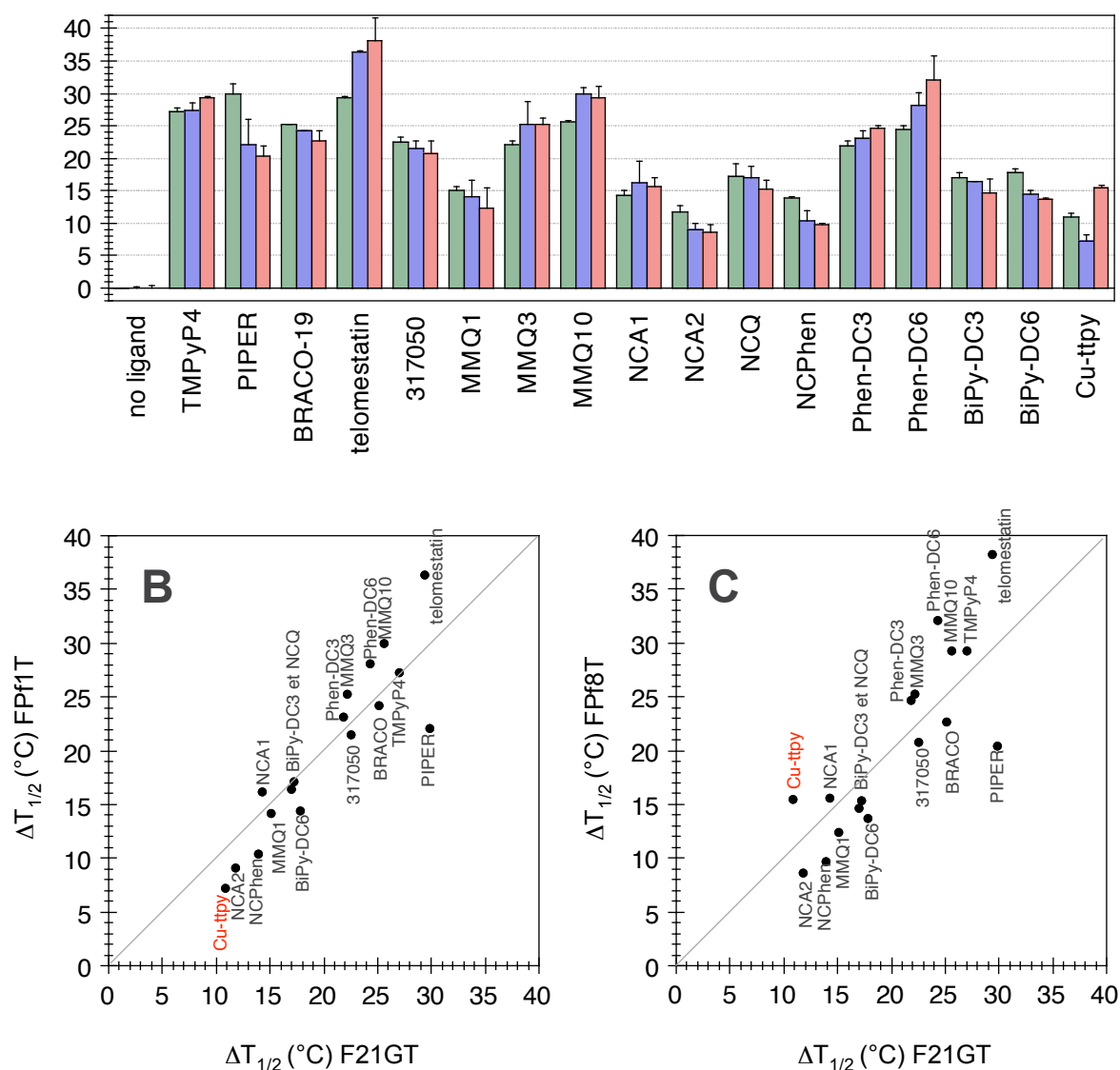


Figure 2S
Thermal stabilisation in KCl

(A) Thermal stabilisation ($\Delta T_{1/2}$) induced by 1 μ M compound on 0.2 μ M F21GT (green columns), FPf1T (blue columns) and FPf8T (red columns), in a 10mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 10mM KCl and 90mM LiCl. Under this experimental condition, the $T_{1/2}$ of FPf1T, FPf8T and F21GT were 52.7°C, 48.5°C and 48.5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), respectively, *i.e.* near the $T_{1/2}$ values in 100mM NaCl. LiCl was added in order to keep the same ionic strength as in the FRET-melting experiments carried out in 100mM NaCl.

(B) Plot of $\Delta T_{1/2}$ induced on FPf1T vs. $\Delta T_{1/2}$ induced on F21GT .

(C) Plot of $\Delta T_{1/2}$ induced on FPf8T vs. $\Delta T_{1/2}$ induced on F21GT .

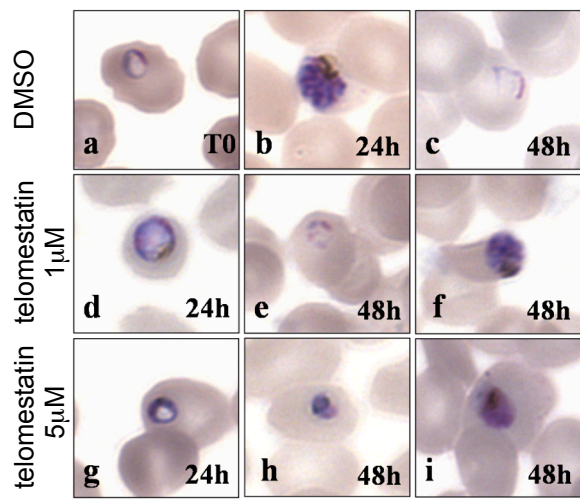


Figure 8

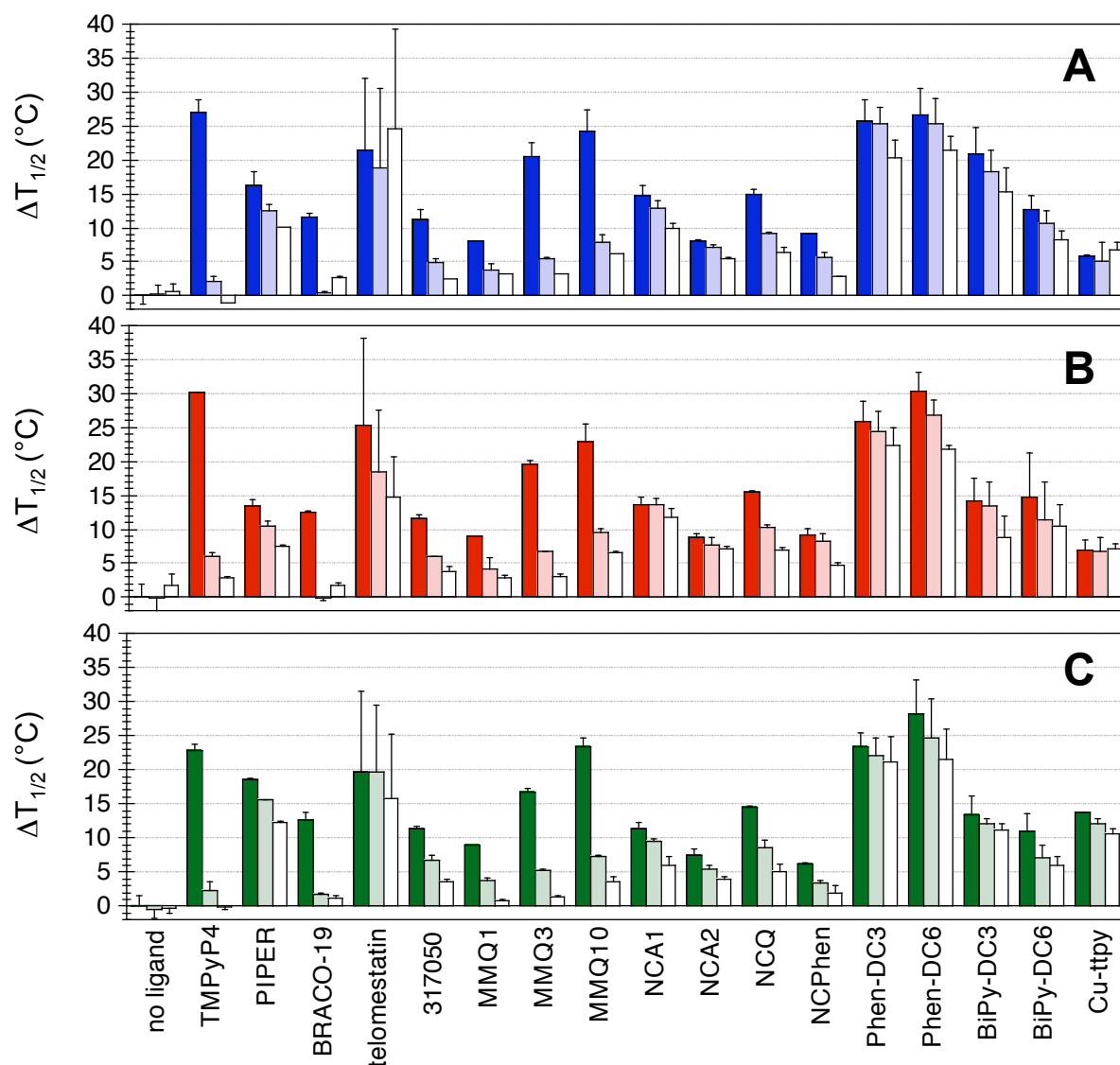


Figure 1S
Thermal stabilisation and *quadruplex vs duplex* selectivity in NaCl

Thermal stabilisation ($\Delta T_{1/2}$) induced by 1 μM compound on 0.2 μM FPf1T (A), FPf8T (B) and F21GT (C) in the presence of increasing concentrations of the duplex competitor ds26: no ds26 (dark colour columns), 3 μM ds26 (light colour columns) and 10 μM ds26 (white columns). The experiments were carried out in a 10mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 100mM NaCl. Under this experimental condition, the $T_{1/2}$ of FPf1T, FPf8T and F21GT alone (with no ligand and no competitor) were 43.8°C, 44.7°C and 49.7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), respectively. Since the presence of the duplex competitor did not significantly affect the $T_{1/2}$ of the three telomeric sequences, the $\Delta T_{1/2}$ were calculated using these values. The error bars are the standard deviations obtained from several experiments. For telomestatin, two different stock solutions were used. These two stock solutions did not induce the same $\Delta T_{1/2}$: a $\Delta T_{1/2}$ of about 58°C were obtained with the first one and of about 78°C with the second one. Despite this strong difference, probably due to solubility problems, each stock displayed a strong selectivity *quadruplex vs duplex* for the three sequences. For this reason, the error bars reported for telomestatin in the presence of duplex competitor are overestimated.

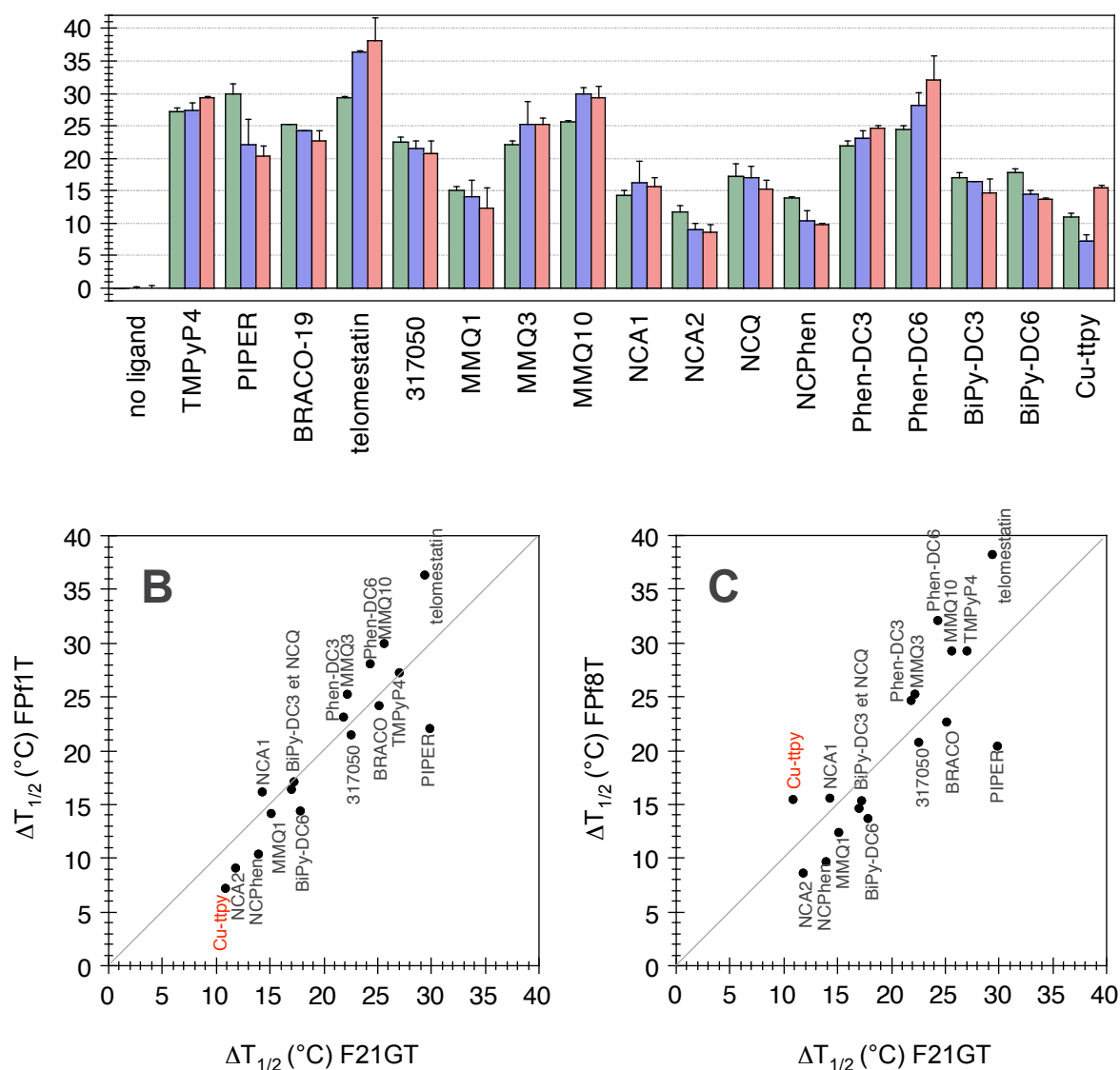


Figure 2S
Thermal stabilisation in KCl

(A) Thermal stabilisation ($\Delta T_{1/2}$) induced by 1 μ M compound on 0.2 μ M F21GT (green columns), FPf1T (blue columns) and FPf8T (red columns), in a 10mM cacodylic acid buffer (pH 7.2, adjusted with LiOH) containing 10mM KCl and 90mM LiCl. Under this experimental condition, the $T_{1/2}$ of *FPf1T*, *FPf8T* and *F21GT* were 52.7.°C, 48.5°C and 48.5°C ($\pm 1^\circ$ C), respectively, *i.e.* near the $T_{1/2}$ values in 100mM NaCl. LiCl was added in order to keep the same ionic strength as in the FRET-melting experiments carried out in 100mM NaCl.

(B) Plot of $\Delta T_{1/2}$ induced on FPf1T vs. $\Delta T_{1/2}$ induced on F21GT .

(C) Plot of $\Delta T_{1/2}$ induced on FPf8T vs. $\Delta T_{1/2}$ induced on F21GT .

3 Données complémentaires

3.1 *Activité télomérase et effet des ligands dans le test Pf-TRAP*

Nous avons détecté une activité télomérase à partir d'extraits totaux de parasites asynchrones. L'activité observée en test Pf-TRAP est bien ARN-dépendante comme le montre le traitement à la RNaseA effectué sur les extraits (Figure 40, droite).

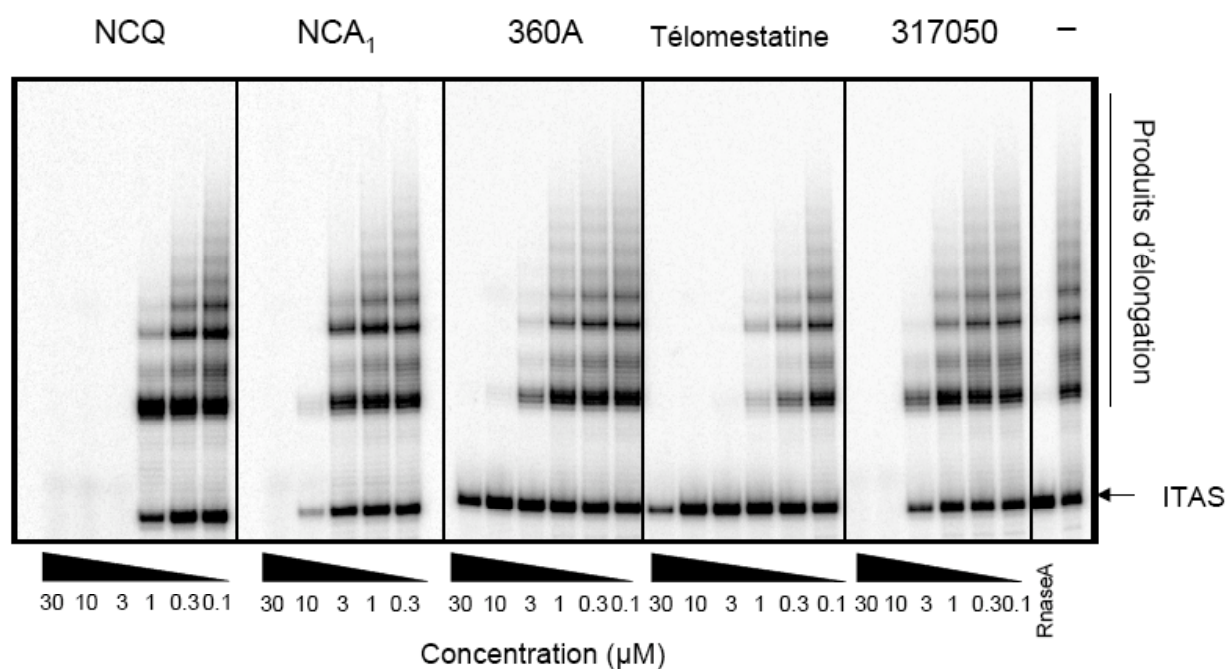


Figure 40 : Test Pf-TRAP en présence de ligands de G-quadruplexes

Des expériences de TRAP en présence de ligand ont été réalisées. Nous observons que les ligands les plus affins et les plus sélectifs en test FRET, comme la **télomestatine** et **360A**⁽⁷⁾, sont capables d'inhiber sélectivement la production d'ADN télomérique (CI₅₀ de l'ordre du μM) alors que le contrôle interne n'est pas affecté à ces concentrations. Comme nous l'avons montré dans la partie précédente sur l'inhibition de la télomérase humaine, ceci ne démontre pas l'effet de ces ligands sur l'activité de la télomérase. Ces résultats montrent néanmoins que certains des ligands testés, la **télomestatine** en particulier, sont susceptibles d'inhiber sélectivement la polymérisation et l'amplification *in vitro* de ces régions télomériques, suggérant un effet possible de ces composés au niveau de la réplication de ces régions *in vivo*. Nous remarquons que des composés, moins sélectifs par compétition avec ds26 en test FRET, comme **317050** ou **NCQ** sont également

⁽⁷⁾ en raison de la non-conversion d'éventuels effets antiparasitaire des dérivés pyridodicarboxamides 360A et 307A, par le brevet publié en collaboration avec Sanofi-Aventis, nous avons choisi de ne pas présenter les données obtenues avec ces composés dans l'article 6. 360A présente comme les autres composés testés des stabilisations sur les séquences *Pf* proches de celles observées sur la séquence humaine. Nous présentons ici les données de PfTRAP avec 360A, afin de donner un autre exemple de ligand (en plus de la télomestatine), dont l'action est sélective vis-à-vis du contrôle interne dans ce test.

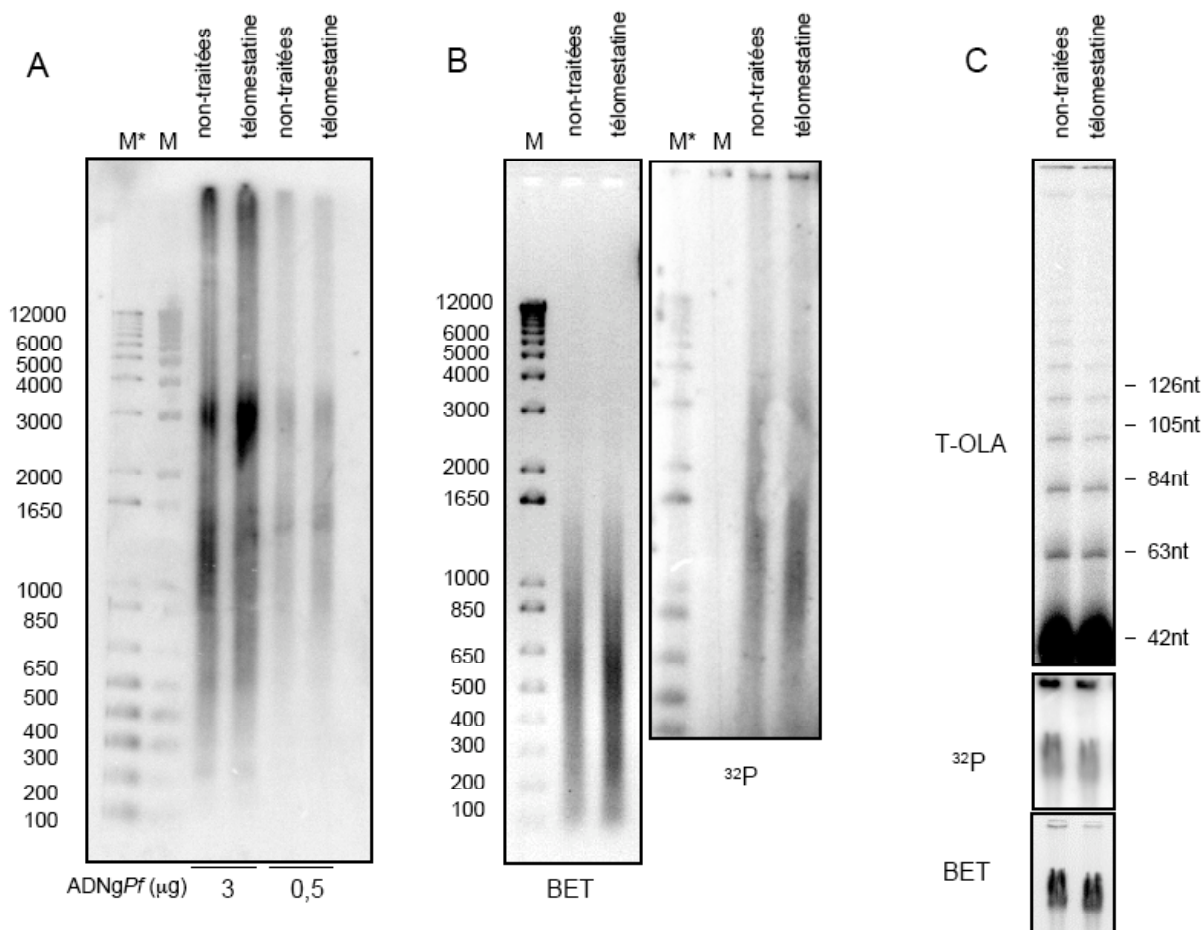


Figure 41 : Effet du traitement par la télomestatine sur les télomères du parasite :

ADN génomique extrait de parasites préalablement synchronisés en anneaux avant traitement (ou absence de traitement) par 0,72 µM de télomestatine pendant 11h (de $t=24h$ à $t=35h$) (stade trophozoïte). (A) TRF dénaturant réalisé sur 3 µg ou 0,5 µg d'ADN génomique. (B) TRF natif avec la quantité d'ADN digéré (BET, gauche) et la quantité de sonde C hybridée (³²P, droite). (C) T-Ola, hybridation en solution du 3'-"overhang" (³²P) et quantité d'ADN génomique hybridée (BET)

moins sélectifs pour inhiber spécifiquement l'amplification des régions télomériques. En outre, la sélectivité du composé **NCA₁**, qui semblait prometteuse en test FRET sur les séquences télomériques de *P.falciparum*, reste décevante en test Pf-TRAP.

Nous avons également essayé à partir de ces mêmes extraits cellulaires, d'effectuer une expérience de "direct assay" avec une amorce contenant 3 répétitions télomériques pour tester les ligands, et s'affranchir d'une étape d'amplification par PCR. Malheureusement, d'autres activités présentes dans les extraits (dégradation, polymérisation) ne nous ont pas permis d'observer le signal caractéristique d'une activité télomérase.

3.2 Effet du traitement des parasites par la télomestatine

3.2.1 Effet au niveau des télomères

Suite aux expériences prometteuses réalisées sur le ralentissement de la croissance du parasite en présence de **télomestatine** (Figure 8, **article 6**), nous avons voulu analyser l'effet de la molécule sur les télomères du parasite. Cependant, l'analyse de l'ADN génomique du parasite nécessitait une augmentation importante des volumes de culture et donc l'augmentation de la quantité de ligand consommée. Notre stock en composé étant fortement limité, le traitement que nous avons effectué s'est concentré sur la phase de prolifération du parasite.

Ces traitements ont été effectués par Philippe Grellier, à partir de parasites synchronisés en anneaux. Après 25h de culture, 0,72 μ M de **télomestatine**, ou la quantité équivalente de DMSO : MeOH, ont été ajoutés au milieu de culture, et le traitement a été mené pendant 11h. Nous avons réalisé l'extraction de l'ADN génomique de ces parasites (traités et non traités) et l'analyse de la longueur moyenne des télomères par TRF et "Southern blot" avec la sonde C a été effectuée (Figure 41A). Aucun raccourcissement de la taille moyenne des télomères n'a pu être observée en comparant l'ADN extrait de cellules traitées ou non traitées.

Nous avons également étudié si la longueur de l'extrémité 3' simple-brin était modifiée par le traitement (Figure 41B et C). L'hybridation de l'ADN génomique dans des conditions natives (37 ou 50°C) a été réalisée avec la sonde C. On observe en TRF natif, dans la partie droite de la Figure 41B, que le signal radioactif résultant de l'hybridation de la sonde au niveau de l'extrémité 3' simple-brin des télomères est semblable sur l'ADN des cellules traitées et non-traitées. Un tel résultat est également observé dans le bas de la Figure 41C, à partir d'ADN génomique non digéré. De plus, l'analyse en T-ola ne révèle pas de différences majeures concernant la longueur des produits de ligation.

Ces résultats indiquent que le court traitement, que nous avons effectué avec la **télomestatine**, n'a pas eu d'incidence majeure sur la taille de l'extrémité 3' simple-brin, ou sur la

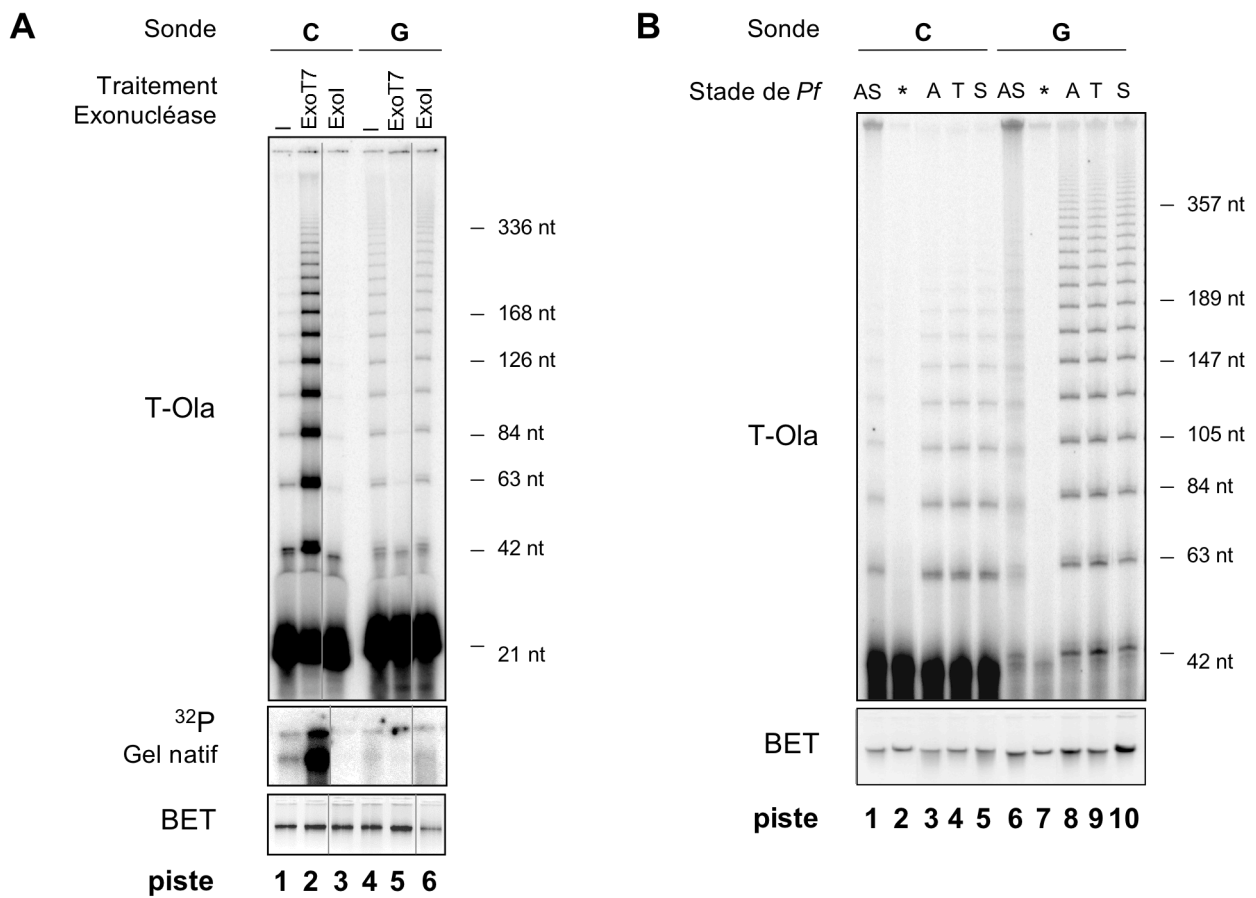


Figure 42 : T-ola avec le brin G (complémentaire d'un éventuel 5' "overhang") (A) et effet du stade érythrocytaire du parasite sur la longueur des produits de ligation estimée en T-ola (B).

AS : parasites asynchrones ; A : anneaux ; T : trophozoïtes ; S = schizontes ; * ADN génomique humain (cellules DU145). BET : ADN génomique migré sur gel d'agarose (contenant du BET) après T-ola. ³²P : sonde hybridée à l'ADN génomique après migration en gel d'agarose et réaction de T-ola. T-ola : produits de ligation visualisés sur gel dénaturant. Sonde C : oligonucléotide C-TolaPf (5'-(AAGTCCC)₃-3') ; sonde G : oligonucléotide G-TolaPf (5'-(GGGTTTA)₃-3').

longueur moyenne totale des télomères du parasite. D'autres traitements couvrant la totalité du cycle, voire 2 cycles du parasite devront être expérimentés, pour conclure quant à l'effet télomérique du composé. Il serait également intéressant d'établir l'effet de traitements à des concentrations plus élevées en **télomestatine** pendant un temps court sur la longueur de l'extrémité 3' simple-brin. Enfin, nous souhaiterions également pouvoir observer l'effet de la molécule sur l'ancrage de télomères à la membrane nucléaire. Ces expériences devraient pouvoir être prochainement réalisées par FISH en collaboration avec l'équipe de Artur Scherf à l'Institut Pasteur.

3.3 Extrémités télomériques chez le parasite *P.falciparum*

3.3.1 Existence d'une extrémité 5' sortante chez le parasite *P.falciparum* ?

Nous avons montré par hybridation en solution (Figure 3A et 3B, **article 6**), qu'une sonde C, complémentaire d'un 3' "overhang", permettait bien d'observer un signal sur l'ADN génomique de *P.falciparum* dans des conditions natives, suggérant l'existence d'une extrémité télomérique 3' sortante. En outre, un signal bien plus faible sur l'ADN génomique, résultant de l'hybridation d'une sonde G, complémentaire d'un éventuel 5' "overhang", a été constaté. Lorsque nous nous sommes intéressés de plus près à la longueur de l'extrémité télomérique 3' sortante par la méthode de T-ola, nous avons également réalisé l'expérience avec la sonde G contrôle. Les résultats de cette expérience, et certains traitements par des exonucléases sont présentés dans la Figure 42A. La partie gauche de la figure (pistes 1-3) correspond à la Figure 3C présentée dans l'**article 6**, et montre l'existence d'une extrémité télomérique 3' sortante qui est allongée après traitement par la 5' → 3' exonucléase T7 (piste 2), et qui est réduite après traitement par la 3' → 5' exonucléase I simple-brin (piste 3). De façon très inattendue, de longs produits de ligation sont également observés en présence de la sonde G (piste 4). D'après l'expérience de T-ola et la résolution du gel dénaturant de polyacrylamide, ces produits peuvent mesurer jusqu'à 400 nucléotides de long. Après traitement avec l'exonucléase T7gene6 (piste 5, Figure 42A), les produits de ligation sont supprimés, alors que l'ExoI n'a pas d'effet sur la longueur ou la quantité des produits détectés. Un signal résultant de l'hybridation de la sonde G sur l'ADN génomique après ligation est également détecté en gel natif (³²P, pistes 4 et 6). Néanmoins ce signal est diffus comparé au signal obtenu avec la sonde C (pistes 1). Ces résultats surprenants, s'ils ne découlent pas d'un artefact de la méthode, semblaient suggérer l'existence d'une extrémité télomérique 5' sortante.

3.3.2 Effet du stade érythrocytaire du parasite sur la longueur des extrémités

Ces résultats particulièrement étonnants nous ont interpellé. L'existence d'une extrémité 5' sortante paraît difficilement envisageable compte tenu du mécanisme de réplication de l'ADN. Pourtant, l'existence d'extrémité 5' télomérique de taille importante a déjà été reportée dans de cellules humaines en prolifération [352]. Les auteurs proposaient un mécanisme de réplication incomplète du brin continu, qui était ensuite réséqué pour générer une extrémité 3' simple-brin.

Afin de voir si les produits de ligation observés avec la sonde C ou G étaient dépendants de la prolifération des parasites, des cultures synchronisées de *P. falciparum* à différents stades érythrocytaires ont été réalisées par E. Mouray et P. Grellier. Nous avons extrait l'ADN génomique de parasites asynchrones (AS, pistes 1 et 6, Figure 42B), au stade anneau, où aucune réplication d'ADN n'a lieu (A, pistes 3 et 8, Figure 42B), au stade réplcatif trophozoïte, où débute la phase S (T, pistes 4 et 9, Figure 42B) et au stade schizonte, où les dernières divisions nucléaires ont lieu (S, pistes 5 et 10, Figure 42B). Afin de bien vérifier que les signaux obtenus étaient spécifiques de séquence, nous avons également testé l'hybridation et la ligation de nos sondes sur de l'ADN génomique humain, extrait de cellules DU145 (*, pistes 2 et 7, Figure 42B). Aucun signal n'a été obtenu en présence d'ADN génomique humain, ce qui confirmait la spécificité de nos sondes. Par ailleurs, aucune variation de la longueur ou de la quantité des produits de ligation n'a été observée en fonction du stade du parasite. Le signal obtenu ne semblait donc pas corrélé à la prolifération cellulaire.

3.3.3 Discussion sur l'existence d'un 5' "overhang"

Afin de confirmer ces résultats, nous avons tenté d'effectuer d'autres traitements de l'ADN génomique extrait. La "mung bean" nucléase (nucléase simple-brin) devait permettre, dans le cas de l'existence d'extrémités 3' et 5' sortantes, de supprimer les signaux et produits de ligation résultant de la présence des "overhangs". Malheureusement, le génome très riche en A/T de *P.falciparum* favorise la "respiration" de l'ADN génomique et la digestion totale de l'ADN par la "mung bean" nucléase. Nous n'avons pas réussi à mettre les conditions de digestion au point avec cette enzyme. Une digestion à la 3' → 5' exonucléase III (double-brin) a également été menée. Celle-ci n'a pas conduit à la diminution des signaux attendus avec la sonde G, dans le cas de l'existence d'un 5' "overhang". De même, une polymérisation par le fragment de Klenow sur l'ADN génomique n'a pas donné les résultats escomptés, c'est-à-dire une extrémité 3' inchangé et une extrémité 5' comblée par la Klenow (perte du signal et des produits de ligation). S'il est possible que les réactions n'aient pas fonctionné, cela peut également suggérer que le signal observé en T-ola avec la sonde G est un artefact dû à l'étape de ligation. En effet, le signal

d'hybridation sur l'ADN génomique est augmenté après ligation (Figure 42A), alors qu'il est très faible lorsque cette étape est absente (cf. Figure 3A, **article 6**). Ces résultats sont d'autant plus discutables qu'il serait particulièrement étonnant que le parasite possède des extrémités 5' sortantes atteignant pratiquement la taille moyenne de ses télomères. L'ensemble de ces observations suggère que les produits de ligation observés avec la sonde G sont des artefacts. Nous n'avons pas réellement d'hypothèse permettant d'expliquer leur formation. Néanmoins, il est possible qu'une hybridation sur le brin C de la sonde G soit facilitée par la formation de G-quadruplexes le long du brin G télomérique, qui permettrait l'ouverture ou la respiration du duplexe télomérique. La préparation des extraits d'ADN génomique pourrait également avoir une incidence sur la présence de régions simple-brin. D'autres méthodes d'extractions permettant de garder l'ADN génomique intact devraient être employées pour vérifier cette hypothèse. L'utilisation de plots d'agarose permettant de lyser les cellules, réaliser l'hybridation avec la sonde télomérique et faire migrer ensuite l'ADN génomique, devrait permettre de s'assurer de l'intégrité de l'ADN génomique au moment de l'hybridation.

4 Discussion : Chapitre V

Nous avons mis en évidence dans ce chapitre la possibilité de cibler les télomères de *P.falciparum* par des ligands de G-quadruplexes déjà développés pour leur stabilisation du G-quadruplexe télomérique humain. Nous avons testé ces composés sur différentes souches du parasite résistantes ou non à trois antipaludéens, deux dérivés de la quinine, la chloroquine et la méfloquine et un antifolate, la pyriméthamine (Figure 43).

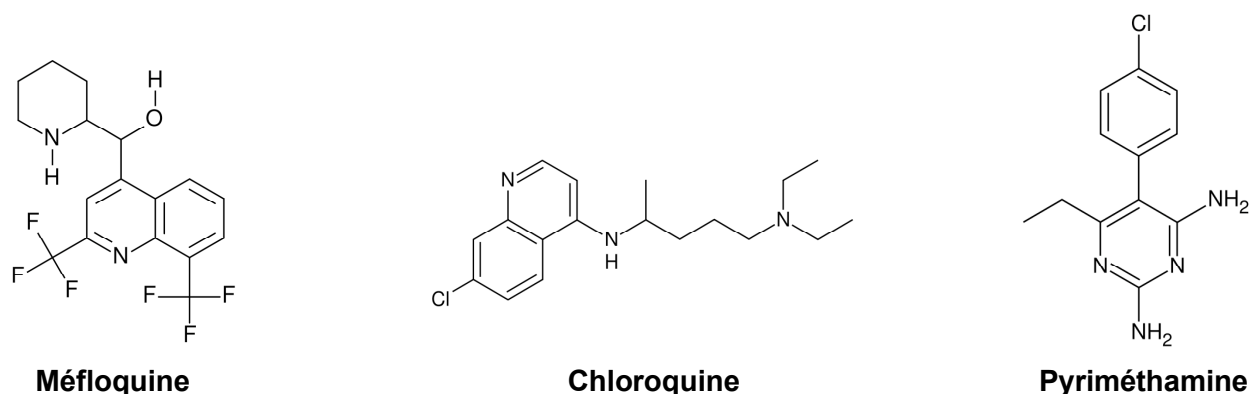


Figure 43 : Structures chimiques de la méfloquine, de la chloroquine et de la Pyriméthamine.

Certaines des molécules testées montrent effectivement des activités antiprolifératives vis-à-vis de différentes souches du parasite. Il reste néanmoins difficile de corrélérer directement les

activités observées sur le parasite aux stabilisations sur le G-quadruplexe télomérique ou à un effet direct au niveau des télomères. Comme discutées dans l'article, ces différences entre les effets sur le parasite et les tests de stabilisation en FRET pourraient être médiées par des propriétés pharmacologiques différentes de ces molécules, en particulier relatives à leur pénétration cellulaire

Nous sommes également conscients que d'autres mécanismes sont susceptibles d'induire la mort ou l'arrêt du parasite, et que des travaux complémentaires sont à fournir pour élucider le mécanisme d'action de ces composés. En outre, étant donné la forme aromatique plane des ligands, il est tout à fait envisageable qu'un des mécanismes d'action soit médié, comme pour la chloroquine, par une inhibition de la polymérisation de l'hème en hémotoïne. En effet, l'hème présent dans les globules rouges étant toxique pour le parasite, ce dernier a mis en place un mécanisme de polymérisation de l'hème permettant de limiter sa toxicité. Des tests *in vitro* d'inhibition de la polymérisation de l'hème en hémotoïne en présence des composés devraient être prochainement menés pour répondre à cette question.

Il sera également nécessaire de vérifier la cytotoxicité de ces molécules sur des cellules normales pour établir de degré de sélectivité possible des ligands. Même si les traitements à moyen terme de cellules normales par la **télomestatine** à 1 ou 5 μM n'ont pas mis en évidence de toxicité importante sur ces cellules [313], il paraît néanmoins peu envisageable d'effectuer des traitements prophylactiques avec ce type de composés. De plus comparées aux composés antipaludéens actuellement utilisés, les concentrations nécessaires pour limiter la croissance de 50 % des parasites restent encore 20 à 400 fois supérieures. Il faudra également étudier l'effet de l'arrêt du traitement en rapport avec une reprise éventuelle de la croissance du parasite.

Quoi qu'il en soit, en raison de leur effet probable sur les phases de divisions du parasite, de tels composés seraient plus particulièrement indiqués pour des traitements en association avec d'autres drogues antipaludéennes, agissant à d'autres niveaux. C'est d'ailleurs la méthode actuellement employée pour limiter l'apparition de résistances des parasites aux nouveaux principes actifs développés. Des tests sur la prolifération du parasite devront donc être menés en ce sens.

Discussion, Conclusions et Perspectives

Chapitre VI. Discussion, conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans ce document de thèse s'inscrivent dans une perspective d'identification et de développement de nouvelles molécules bioactives (agents anticancéreux ou anti-parasitaires), mais également de compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans leur action.

1 Vers de nouveaux ligands des (d'un) G-quadruplexe(s) ...

1.1 *Affinité versus Sélectivité*

De nombreux ligands des structures en G-quadruplexe ont été développés ces dernières années, dans le but avéré d'augmenter leur spécificité d'interaction avec ces structures particulières par rapport aux autres structures d'acides nucléiques majoritaires (duplexe, simple-brin). Cette démarche est intuitivement nécessaire pour limiter la toxicité et le potentiel mutagène de ces composés. Elle représente également un intérêt pour comprendre l'implication des structures en G-quadruplexes au niveau cellulaire, par utilisation de ligands spécifiques.

Au cours de cette étude, grâce à une fructueuse collaboration avec les chimistes du laboratoire de Marie-Paule Teulade-Fichou, nous avons exploré plusieurs manières de favoriser l'interaction des molécules avec les G-quadruplexes. Dans ce manuscrit sont présentées deux voies que nous avons explorées : (i) l'étendue de la surface aromatique plane à partir de ligands de 2^{ème} génération déjà très stabilisants et sélectifs, les N-méthylbisquinolinium pyridodicarboxamides (Figure 44) et (ii) la fonctionnalisation de plateformes aromatiques avec des aminoglycosides pouvant interagir avec les boucles.

1.1.1 Adapter la partie aromatique plane au G-quartet

L'exemple de la **télomestatine**, composé très affiné et hautement sélectif vis-à-vis des duplexes, dont la surface aromatique recouvre avec une très bonne adéquation un G-quartet, illustre parfaitement la légitimité de cette stratégie. En revanche, le composé **TMPyP4** qui paraît également adapté à une interaction sur les G-quartets par sa symétrie d'ordre 4, souligne par son affinité mais son absence totale de sélectivité, le fragile équilibre existant entre ces deux aspects pour la conception des ligands. On remarquera notamment la sélectivité accrue de composés

neutres comme la **télomestatine**, ou même anionique comme la porphyrine **NMM** (cf. : §I.3.3.1.4). Ainsi, si la charge de la molécule semble être, en effet, le principal acteur de cet équilibre, la présence d'un métal central et de chaînes latérales pouvant interagir avec les sillons est susceptible d'inverser cette tendance (cf. : la Mn(III)-porphyrine [283]).

La présence des chaînes latérales N-méthylbisquinolinium s'est révélée être essentielle aux propriétés stabilisatrices de certains composés précédemment développées par notre groupe, comme les dérivés de triazines [298] et les pyridodicarboxamides [272] (Figure 44, haut). Ces fonctions N-méthylées apportent chacune une charge positive, dont l'absence réduit très fortement la stabilisation du G4 télomérique humain en test FRET. Nous avons montré dans l'**article 3** que l'étendue de la pyridine centrale en phénanthroline augmente l'affinité de la molécule pour le G-quadruplexe télomérique tout en permettant de conserver une bonne sélectivité. La forme particulièrement adaptée au G-quartets de la molécule **Phen-DC3**, vraisemblablement permise par un réseau de liaisons Hydrogène internes entre les azotes aromatiques et les Hydrogènes de fonctions amide, peut être proposée comme hypothèse pour expliquer ces résultats, et l'affinité/sélectivité accrue des composés depuis la 1^{ère} génération de molécules (**12459**).

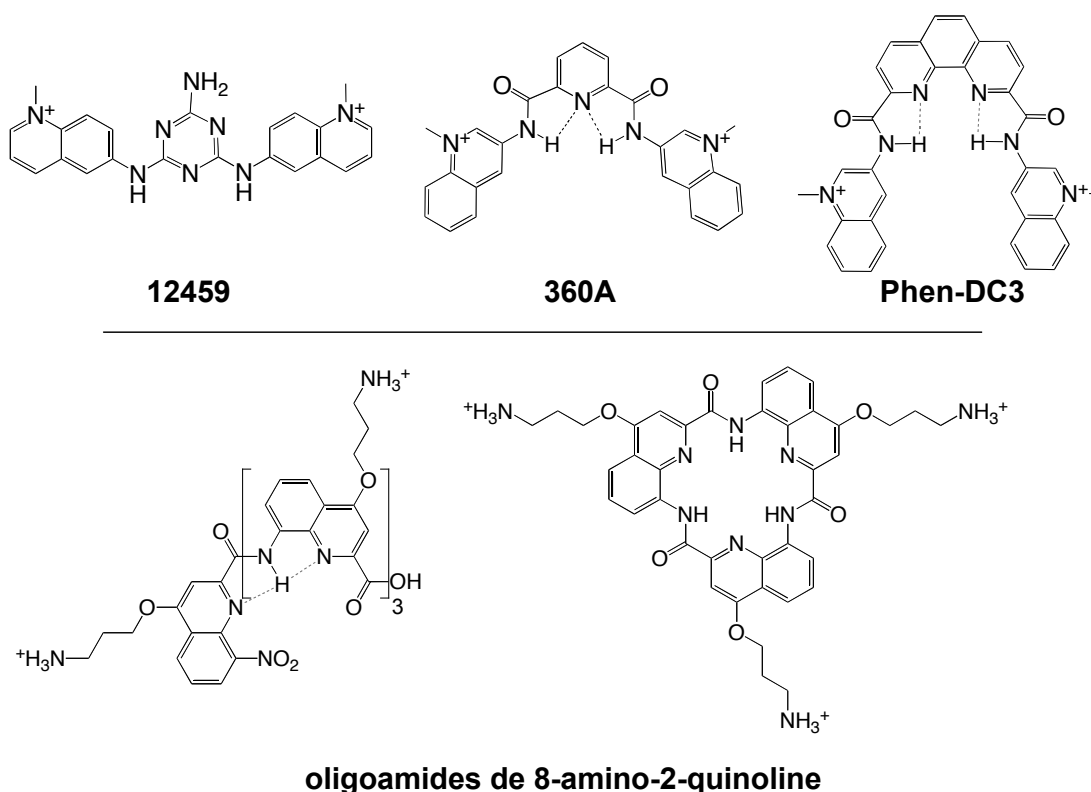


Figure 44 : Quinoléine et G-quadruplexes :

(haut) ligands de 1^{ère} (**12459**) ($\Delta T_{1/2} (1\mu\text{M}) \text{Na}^+ = +8^\circ\text{C}$), 2^{ème} (**360A**) ($\Delta T_{1/2} (1\mu\text{M}) \text{Na}^+ = +23^\circ\text{C}$) et 3^{ème} (**Phen-DC3**) génération ($\Delta T_{1/2} (1\mu\text{M}) \text{Na}^+ = +28^\circ\text{C}$).
(bas) ligands de G-quadruplexes oligomériques de motif 8-amino-2 quinoléine identifiés par l'équipe de S. Balasubramanian [319].

Récemment, l'équipe de S. Balasubramanian a publié des travaux sur la stabilisation des G-quadruplexes télomériques humains, et du promoteur de *c-kit*, par des oligoamides cycliques et hélicoïdaux, formés à partir du motif 8-amino-2-quinoléine acide carboxylique [319](Figure 44, bas). Nous constatons que l'utilisation de ce même motif quinoléine organisé de façon cyclique ou hélicoïdale, par un réseau de liaisons Hydrogène similaire à celui décrit dans le paragraphe précédent, permet également la production de ligands de très bonne affinité / sélectivité, révélant l'intérêt du motif quinoléine pour la reconnaissance des G-quadruplexes. La symétrie d'ordre 3 du macrocycle, et la non-planéité de la forme hélicoïdale ne paraissent pourtant pas *a priori* être les plus adaptés à l'empilement sur un G-quartet.

Nous avons montré que les bisquinolinium phénanthrolines sont des composés stabilisant remarquablement les G-quadruplexes et avec une très bonne sélectivité vis-à-vis des duplexes d'ADN. **Phen-DC3** présente par ailleurs des comportements vis-à-vis de l'induction des structures en G-quadruplexes, de l'inhibition de l'amplification par PCR sur des régions riches en guanines (TRAP) et de l'élongation par la télomérase sur un substrat structuré en G-quadruplexes tout à fait comparables au ligand de G-quadruplexe de référence, la **télomestatine**. Une particularité par rapport à cette dernière consiste en sa capacité à enrayer la télomérase pendant son élongation processive (cf. : **article 5**). Des expériences cellulaires avec ce composé prometteur devraient prochainement être menées au laboratoire par l'équipe de Jean-François Riou, à Clermont-Ferrand dans le laboratoire du Professeur Pierre Verrelle, ainsi que dans plusieurs laboratoires européens du consortium "Mol. Cancer Med.", pour déterminer l'intérêt thérapeutique de ces molécules et élucider leur mécanisme d'action.

Il est néanmoins envisageable d'améliorer encore davantage la sélectivité de ces molécules. En effet, en s'inspirant des résultats obtenus avec la terpyridine **Cu-ttpty** (Figure 31), l'ajout d'un métal coordonné par les azotes des fonctions amides et de la phénanthroline devrait pouvoir permettre d'augmenter l'affinité pour le G-quadruplexe tout en limitant l'intercalation du composé dans un duplexe d'ADN, si un ligand axial est présent. Il reste à néanmoins à vérifier que l'apport de charge par le métal sur un composé déjà chargé (contrairement aux terpyridines neutres) ne contrebalance pas le gain de sélectivité permis par la présence d'un ligand axial sur le métal. Des résultats intéressants pourraient également être obtenus en ce sens, en appliquant cette stratégie aux composés non chargés (en absence de N-méthylation des quinoléines).

1.1.2 Cibler les boucles des G-quadruplexes

La deuxième stratégie que nous avons explorée pour lier sélectivement ces structures consiste en une interaction du composé par empilement avec le G-quartet, additionnée d'une

interaction avec les boucles du G-quadruplexe. Les aminoglycosides, comme la néomycine, la kanamycine et la paromomycine, constituent une classe d'antibiotiques qui, par leur liaison au site A de l'ARNr 16S inhibent la translocation du ribosome bactérien et induisent des erreurs dans sa lecture des codons [353-355]. Grâce à la présence de sucres aminés, donneurs de liaisons Hydrogène, ces molécules sont capables d'interagir avec les bases nucléiques. De plus la charge globale nettement positive de ces composés à pH physiologique favorise l'interaction avec le squelette phosphaté des acides nucléiques. L'utilisation de la néomycine associée à un agent permettant l'empilement sur un G-quartet, constitue donc une approche originale pour interagir sélectivement avec les G-quadruplexes par l'intermédiaire des boucles. Nous avons montré dans l'**article 2** que de tels dérivés interagissent avec le G-quadruplexe télomérique humain avec une sélectivité accrue vis-à-vis d'un duplexe d'ADN, comparée à celle des composés aromatiques sans néomycine. De plus, une préférence pour les G-quadruplexes contenant des boucles a également été mise en évidence, confirmant ainsi la validité de notre stratégie. Cependant, comparée à celle d'autres ligands, et en particulier celle des bisquinolinium phénanthroline, la sélectivité de ces dérivés vis-à-vis des duplexes et simple-brins pourrait encore être très largement améliorée. En outre, l'inhibition du contrôle interne en test TRAP montre que ces ligands inhibent la PCR sur des régions ne formant pas de G-quadruplexes, ce qui dénote leur interaction potentielle avec des duplexes d'ADN, les amorces simple-brins, ou encore la Taq polymérase. Si l'action vis-à-vis de la télomérase a bien été démontrée par un test direct d'extension d'amorce, on peut néanmoins s'interroger sur la spécificité d'action de tels composés aux télomères, et sur le choix de la **néomycine** pour cibler les boucles des G-quadruplexes connaissant le potentiel d'interaction de tels composés avec les ARN et d'autres structures d'acides nucléiques. Il faudrait en effet vérifier la sélectivité de ces ligands vis-à-vis d'autres acides nucléiques ARN ou ADN simple-brins. Si l'interaction électrostatique de la **néomycine** avec la membrane plasmique est susceptible d'avoir un effet positif sur la pénétration cellulaire, il est également vraisemblable que le poids moléculaire et la charge élevé de telles molécules limite leur passage au travers de la bicouche lipidique et leur accès au noyau. En outre, la faible toxicité des composés au niveau du cycle érythrocytaire de *P.falciparum* pourrait résulter de cette faible pénétration cellulaire, étant donné la nécessité pour le composé de franchir trois types de membranes : celle du globule rouge, celle de la vacuole parasitophore et celle du parasite.

Cette stratégie originale de conception de ligand est intéressante, car elle aborde le ciblage spécifique d'un G-quadruplexe par l'intermédiaire des boucles de la structure. Par cette approche, en choisissant ou en modifiant l'aminoglycoside cyclisé de façon adéquate, il devrait être possible, en théorie, de reconnaître spécifiquement chaque nucléotide présent dans les boucles d'une structure particulière en G-quadruplexe, et de pouvoir ainsi différencier les G-quadruplexes

entre eux. Néanmoins, dans un premier temps, des améliorations au niveau de la sélectivité vis-à-vis d'autres structures d'acides nucléiques et d'autres processus enzymatiques (traduction, polymérisation d'ADN et d'ARN, etc.) doivent être apportées pour valider cette approche. Par ailleurs, l'utilisation d'une plateforme aromatique initialement plus sélective pour les structures en G-quadruplexes, comme les pyridodicarboxamides ou les bisquinolinium phénanthrolines permettrait certainement d'améliorer la sélectivité. Enfin, des études concernant la pénétration cellulaire de telles molécules devraient également être menées.

1.1.3 Cibler les sillons des G-quadruplexes

Nous avons exploré dans ce manuscrit la possibilité de reconnaître sélectivement les boucles des G-quadruplexes. Une autre stratégie prometteuse pour reconnaître un type de G-quadruplexe particulier, consiste à cibler les sillons de ces structures. Ceux-ci peuvent effectivement être très variable en fonction du type de repliement adopté. Cette approche a déjà été partiellement appliquée par l'équipe de Stephen Neidle concernant la conception de **BRACO19**, dont la structure a été optimisée à partir des acridines disubstituées par ajout d'une 3^{ème} chaîne latérale pouvant interagir avec un des sillons [278]. La **Mn(III)-porphyrine** est également susceptible d'interagir partiellement avec les sillons du G-quadruplexe par l'intermédiaire de ses chaînes latérales [283].

D'autre part, comme nous l'avons présenté brièvement dans l'introduction générale, les dérivés de bifuryl, développés par l'équipe de D. Wilson semblent particulièrement prometteurs pour le développement de cette stratégie [295]. Peut-on envisager le couplage de ce genre de composés avec des plateformes aromatiques sélectives des G-quartets pour associer les 2 effets : affinité et sélectivité ? Il est probable que ce genre d'approche sera développé dans les prochaines générations de ligands. La rationalisation de ligands des sillons nécessite néanmoins une bonne connaissance des structures tridimensionnelles des G-quadruplexes ciblés, or celles-ci sont encore rares.

1.2 Induction et/ou stabilisation des structures en G-quadruplexe

Pour la stratégie ciblant les sillons des G-quadruplexes, comme pour celle consistant à reconnaître les boucles de ces structures, se pose la question de la validité des structures tridimensionnelles résolues par RMN en solution dans un contexte nucléaire encombré. Les différences de conformation tant au niveau des sillons que des boucles de la structure du G-quadruplexe télomérique humain résolue par RMN et diffraction de rayon X en présence de

potassium, laissent dubitatif sur le meilleur modèle d'étude. On peut également s'interroger sur la pertinence d'un modèle figé de G-quadruplexe alors que de nombreux travaux dans la littérature et dans ce manuscrit montrent que, certes, les ligands se lient aux G-quadruplexes, mais sont également capables d'induire certaines conformations préférentielles. Quel est l'impact de la stabilisation ou de l'induction d'un G-quadruplexe au niveau cellulaire ? Quelle conformation induite est susceptible d'avoir le plus d'impact au niveau du télomère ?

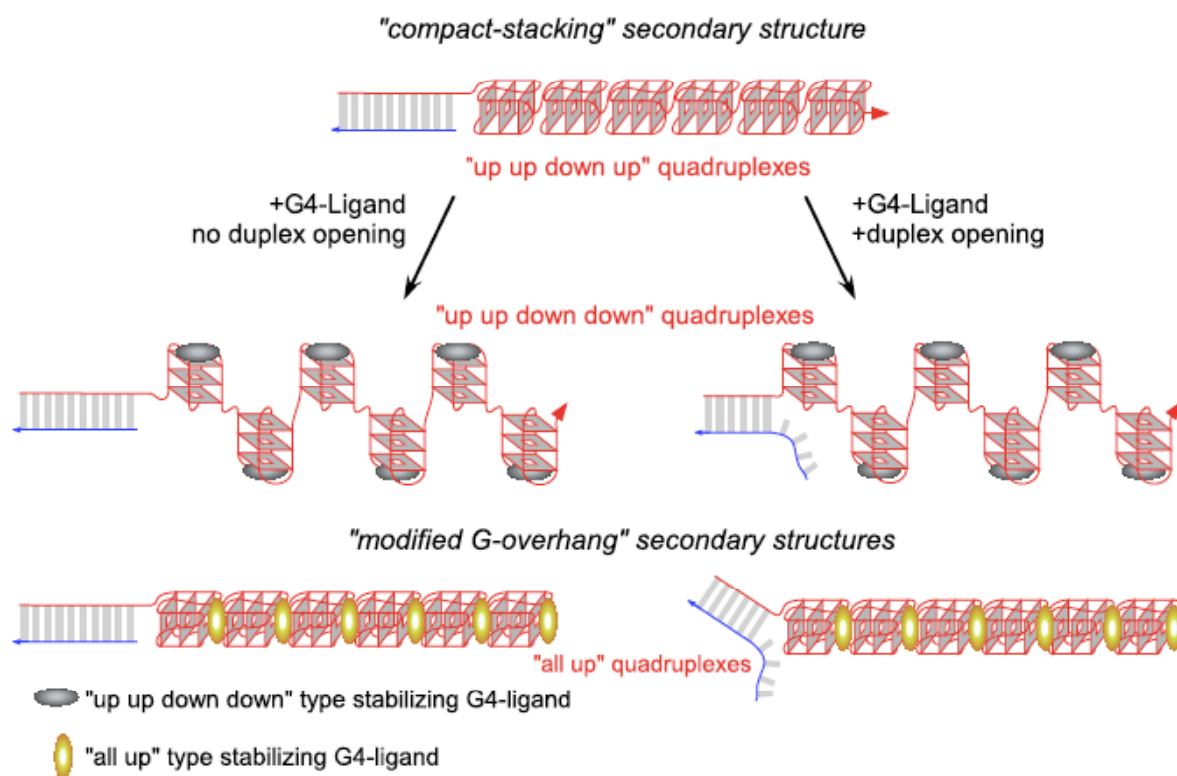


Figure 45 : Hypothèses de conformations de l'extrémité 3' télomérique induites par des ligands (d'après [258])

Les structures RMN ou cristallographiques de complexes G4 / ligand montrent que certains ligands comme **RHPS4** ou **TMPyP4** peuvent s'intercaler entre des paires ou triplets de base adjacents aux G-quadruplexes et les G-quartets externes [54, 269]. En outre, on peut supposer que de tels ligands peuvent favoriser une conformation compacte de l'extrémité 3' télomérique, où les G-quadruplexes sont empilés les uns aux autres (Figure 45, "all up type stabilizing G4 ligand"). De même, il est envisageable que d'autres ligands interagissant probablement par empilement de type π , comme les pyridodicarboxamides **360A** et **307A**, la **télomestatine**, **BRACO19** ou les dérivés de bisquinolinium phénanthroline comme **Phen-DC3** soient susceptibles d'induire ces structures compactes. Pourtant, l'étude que nous avons réalisée en dichroïsme circulaire suggère que ces ligands induisent davantage une forme de type

“antiparallèle” (Figure 45, “up up down down type stabilizing G4-ligand”) (Figure 30 et Figure 34). Cette préférence pour ce type de conformation pourrait s’expliquer par une interaction de ces ligands avec certaines bases présentes dans les boucles, et/ou une plus importante accessibilité des G-quartets externes dans certaines conformations de G-quadruplexe particulières. Cependant, nous avons également observé que le signal de dichroïsme circulaire induit à 260 nm par **360A**, **Phen-DC3** ou **BRACO19** après dénaturation et renaturation à 37°C était augmenté (Figure 30). Cette observation suggère que la forme thermodynamique la plus stable correspond tout de même à une forme compacte de type “parallèle” (“all up”) ou “hybride” (“up up down up”) (Figure 45).

En revanche, on peut s’interroger sur l’effet d’un ligand comme un dérivé de néomycine. En effet, un tel ligand ne permet pas d’envisager simplement l’hypothèse d’une structure compacte en G-quadruplexes le long de l’extrémité 3 sortante, étant donné les interactions avec les nucléotides présents dans les boucles et l’encombrement engendré sur les G-quartets terminaux. Il serait intéressant d’étudier l’effet de ces dérivés sur le G-quadruplexe télomérique humain en dichroïsme circulaire pour confirmer cette hypothèse.

Cette perspective pour le développement des ligands de G-quadruplexes est intéressante puisqu’en fonction de la conformation de l’extrémité 3’ télomérique induite par le ligand, des effets *in vivo* totalement différents pourraient être générés. Néanmoins, afin de préciser les effets inducteurs des différents ligands sur la conformation des G-quadruplexes, il semble essentiel de préciser la nature et la signification des signaux de dichroïsme circulaire pour interpréter les conformations induites et liées par ces ligands. En effet, l’appellation des formes “parallèles” et “antiparallèles” en fonction des signaux induits à 295 nm et 260 nm reste abusive. Ces signaux pourraient simplement résulter de la fixation et de la stabilisation préférentielle de certains G-quartets de compositions *syn/anti* particulières, n’impliquant pas de modification dans l’orientation des brins, mais l’empilement de G-quartets de polarités différentes [356]. Il serait par ailleurs pertinent d’étudier l’effet de ces ligands sur des séquences télomériques plus longues, afin d’évaluer réellement l’effet des ligands sur l’empilement des G-quadruplexes le long de la séquence.

2 ...pour quelles cibles ?

2.1 La télomérase

Initialement développés comme des agents inhibiteurs de la télomérase, nous avons souhaité clarifier l’action de certains ligands de G-quadruplexes récemment développés vis-à-vis de cette enzyme. Nous avons montré que l’inhibition de l’activité de l’enzyme par des ligands de G-quadruplexes a longtemps été surestimée par le test d’activité TRAP, en raison de l’inhibition de

l'amplification par PCR des régions pouvant former des G-quadruplexes par les ligands. Grâce à une collaboration avec le laboratoire de Joachim Lingner, nous avons pu évaluer directement l'inhibition par les ligands de l'élongation processive de la télomérase présente dans des extraits enrichis. Nous avons ainsi testé pour la première fois le comportement du composé de référence qu'est la **télomestatine** vis-à-vis de l'enzyme, ainsi que quelques ligands nouvellement développés comme **360A**, **Phen-DC3** et **BRACO-19**. Alors que les composés sont capables d'inhiber l'accès de la télomérase sur un substrat pouvant former dès le départ un G-quadruplexe intramoléculaire, nous avons montré que seuls **360A** et **Phen-DC3** semblaient induire des arrêts préférentiels de l'enzyme compatibles avec la formation de G-quadruplexe, lorsque celle-ci allonge un substrat ne formant pas de G-quadruplexe intramoléculaire initialement. De façon surprenante, la **télomestatine** n'a pas un tel effet. Au contraire, une augmentation de la processivité de l'enzyme, en présence de ce composé, a été observée. Comment peut-on expliquer un tel effet ? La stabilisation du G-quadruplexe peut-elle, contre toute attente, augmenter l'activité de l'enzyme ? Comment expliquer que les effets des ligands soient si différents ? S'il a effectivement été montré que la télomérase de ciliés était capable d'allonger des G-quadruplexes intermoléculaires [357, 358], il est bien établi, et nous le démontrons à nouveau dans l'**article 5**, que la formation de G-quadruplexe intramoléculaire inhibe l'activité de l'enzyme. En outre, l'activité de la télomérase sur des substrats de G-quadruplexes intermoléculaire reste plus faible, sans processivité accrue de l'enzyme, ce qui semble exclure un tel mécanisme pour l'action de la **télomestatine**. En revanche, une hypothèse permettant d'expliquer l'effet de la télomestatine sur la processivité de la télomérase consiste en une interaction avec l'ARN de la télomérase. En effet, la partie 5' de hTR est constituée de la séquence 5'-GGGUUGCGGAGGGUGGG-3' qui est compatible avec la formation d'un G-quadruplexe. Il a été montré que la délétion de cette séquence permet d'augmenter l'activité télomérase (test adapté du TRAP) [359]. On peut donc penser que certains ligands comme la **télomestatine** sont susceptibles de se lier à ce G-quadruplexe d'ARN et que cette liaison/compaction de l'extrémité 5' de hTR a un effet positif sur la processivité de la télomérase. Actuellement, Julien Gros au laboratoire étudie la possibilité de former des G-quadruplexes d'ARN à l'extrémité 5' de hTR et de l'influence de ligands de G-quadruplexes sur la formation de l'hélice P1. Des éléments de réponses sur les comportements différents de la **télomestatine** et de **Phen-DC3** devraient être apportés au cours de cette étude.

Quoi qu'il en soit, les effets observés sur l'activité télomérase au cours de ce travail, confirment le fait que la télomérase n'est certainement pas l'unique cible des ligands de G-quadruplexes, et que l'inhibition de cette enzyme n'est pas seule responsable des effets cellulaires de ces composés. En répertoriant les implications potentielles des structures en G-quadruplexes au niveau de la dynamique du génome, on peut imaginer autant de rôles des ligands de ces structures

au niveau cellulaire. Un schéma des multiples effets potentiels des ligands de G-quadruplexes est présenté dans la Figure 46. Ils sont discutés dans les paragraphes suivants.

2.2 Structure et protection des télomères

Les effets des ligands au niveau des télomères sont ceux qui ont été le plus étudiés étant donnée la stratégie initiale d'inhibition de l'activité télomérase. La découverte, en parallèle au développement des ligands de G-quadruplexes, des protéines impliquées dans la protection des télomères et d'anticorps contre ces protéines, a permis de mettre en évidence l'effet de ces ligands sur la localisation des protéines télomériques telles que POT1 et TRF2 aux télomères. La délocalisation de ces deux protéines télomériques dans des cellules traitées par la **télomestatine** suggère fortement que les ligands de G-quadruplexes agissent sur la structure du télomère [308, 311]. Avec la découverte récente d'homologie de la protéine TPP1 à TEBP β chez les ciliés et de son rôle aux télomères et vis-à-vis de la télomérase [201, 202], de nouvelles perspectives d'études s'ouvrent, en particulier concernant son comportement vis-à-vis des structures en G-quadruplexes et de ligands stabilisant ces structures. Peut-on tout de même envisager des mécanismes de protection similaires entre ciliés et mammifères ? TPP1 en association avec POT1 peuvent-elles induire la formation de G-quadruplexes comme leurs homologues de cilié, ou la partie C-terminale de TPP1 a-t-elle totalement évolué pour maintenir l'interaction de POT1 et TPP1 avec le reste du complexe "shelterin" et former la T-loop ?

Si la structure de T-loop décrite par T. de Lange en association avec les protéines du "shelterin" pour la protection des télomères reste une hypothèse de travail, il serait intéressant d'étudier *in vitro* l'impact réel des ligands sur la formation de cette structure. Si l'on considère que la télomérase n'est qu'une cible parmi d'autres des ligands de G-quadruplexes, il semble en effet que la mise au point d'autres tests biochimiques de l'activité de ces ligands soit nécessaire pour une évaluation des ligands davantage en rapport avec leurs effets cellulaires potentiels. Ainsi comme l'ont utilisé R. Verdun [192] et l'équipe d'Eric Gilson [186], on peut imaginer un test de formation de D-loop à partir d'un plasmide contenant des répétitions télomériques et un oligonucléotide mimant une extrémité 3' télomérique. Ce type d'expérience peut être envisagé en présence d'extraits nucléaires, ou de protéines purifiées. Si la présence de G-quadruplexes stabilisés par un ligand devrait effectivement empêcher la formation de cette D-loop, il serait également intéressant d'étudier l'effet du ligand sur la rupture d'une D/T-loop préformée. En outre, la sélectivité d'action des ligands pourrait être évaluée en présence de plasmides et de séquences contrôles.

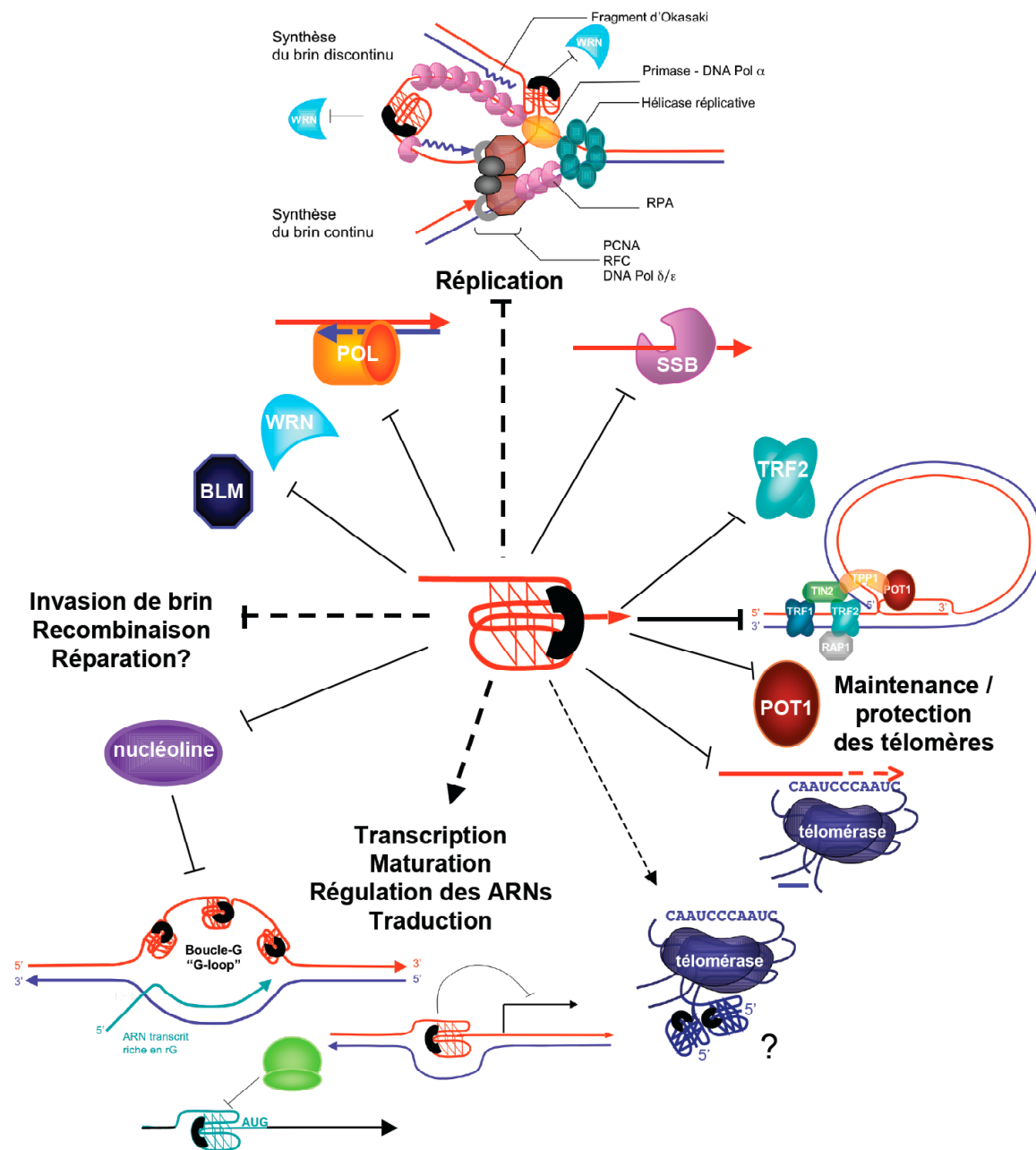


Figure 46 : Multiples effets potentiels des ligands de G-quadruplexes

Les effets télomériques (inhibition de la télomérase et de la formation de la T-loop) sont schématisés sur la droite de la figure. Les effets au niveau de la réplication dans les régions répétées riches en guanines (en particulier pour la réplication discontinue des régions télomériques) sont schématisés en-haut. Ils impliquent en particulier l'inhibition des hélicases RecQ (WRN et BLM), de la fixation des protéines liant les régions simple-brin (SSB) comme RPA (Replication Protein A), ou des polymérases α et δ/ϵ . L'inhibition de WRN et BLM, ou d'autres protéines liant les simple-brins pourraient également causer des dysfonctions au niveau des processus de recombinaison (à gauche), de même que l'inhibition de la fixation de la nucléoline à l'ADNr ou dans les CSR. Enfin, sont présentés dans le bas de la figure, les effets possibles au niveau de la transcription (activation dans les "G-loops" et répression dans les promoteurs de gènes), de la maturation et de la régulation des ARNs, ainsi que de leur traduction.

2.3 Réplication des télomères et des régions pouvant former des G-quadruplexes

Comme le montre le schéma dans la Figure 46 (haut), des structures en G-quadruplexe stabilisées par des ligands pourraient également avoir des implications au niveau de la réplication des télomères, et de façon plus générale dans les régions répétées riches en blocs de guanines (certains minisatellites, ADN_r, régions de commutation de classe des Ig, etc.). En effet, on peut faire l'hypothèse que des ligands stabilisant suffisamment les G-quadruplexes dans ces régions sont capables d'inhiber des hélicases RecQ comme WRN et BLM, ou des protéines liant les simple-brins comme RPA, certains de ces effets ayant déjà été démontrés *in vitro* [112, 118, 126]. La synthèse par POL α (ADN-polymérase α -primase) et POL δ/ϵ (ADN polymérases δ et ϵ) pourrait ainsi être enraillée, causant des contractions, des expansions ou des erreurs dans la réplication de ces régions. En outre, au niveau des télomères, une dysfonction dans la synthèse du brin discontinu devrait être observée comme dans les cellules déficientes en activité hélicase de WRN et en activité télomérase [124]. Ce type de dysfonction de la réplication télomérique, pourrait expliquer le raccourcissement télomérique à relativement court terme observé dans des cellules traitées pas des ligands, qui ne peut être simplement appréhendé par une inhibition seule de l'activité télomérase.

2.4 Effets sur les autres régions pouvant former des G-quadruplexes

Les analyses génomiques récentes nous mènent à envisager l'effet potentiel de ces ligands dans de nombreuses autres régions que les télomères. Même si l'avantage de l'existence d'une région simple-brin aux télomères suggère que ces régions sont des cibles privilégiées pour la formation des G-quadruplexes, d'autres processus cellulaires sont susceptibles d'intervenir transitoirement pour ouvrir le duplexe d'ADN (réplication, transcription), ou générer des extrémités 3' (réparation, recombinaison).

Dans les effets connexes que pourraient avoir ces ligands, on peut donc citer des effets répresseurs d'expression dans les régions pouvant potentiellement former des G-quadruplexes (PQS) en amont des sites de transcription, comme c'est le cas pour le promoteur de *c-myc* avec **TMPyP4** et le composé développé par Cylene Pharmaceuticals **CX-3543** [61, 360] ou plus récemment pour le promoteur de *c-kit* avec des isoalloxazines trisubstituées [361]. En particulier, la stabilisation de quadruplexes dans ces régions par des ligands serait susceptible d'inhiber la fixation de facteurs de transcription.

Une région riche en guanines qu'il ne faut pas négliger est constituée par l'ADNr. Ainsi, alors que le ligand **CX-3543** a été conçu pour sa sélectivité vis-à-vis du G-quadruplexe du promoteur de *c-myc* et inhibe effectivement son expression, il semble que la cible préférentielle se situe davantage dans les régions G-riches de l'ADNr. Les composés permettraient l'inhibition de la synthèse d'ARNr surexprimé dans les cellules cancéreuses en empêchant par sa liaison aux G-quadruplexe ribosomiques l'interaction avec des protéines essentielles telle que la nucléoline [362], conduisant à une mort cellulaire par apoptose. On peut donc s'interroger, de façon globale, sur la cible préférentielle de ligands des G-quadruplexes. Comme pour les oligonucléotides riches en guanines (GROs), il semble que la nucléoline soit une cible indirecte de l'action de certains ligands de G-quadruplexe. Est-ce une caractéristique générale des ligands ? L'effet apoptotique des ligands tels que la **télomestatine** ou **307A** serait-il médié par cette interaction plutôt que par leurs effets aux télomères ? Il semble nécessaire de s'intéresser prochainement à cet aspect et de tester *in vitro* les effets de tels ligands sur l'interaction de la nucléoline avec des régions riches en guanines, sur son expression ou sur sa localisation cellulaire sur des cellules traitées. Par ailleurs, la nucléoline (facteur LR1) a un rôle essentiel dans la recombinaison des régions de commutation de classe des Ig. Les ligands pourraient ainsi induire des dysfonctions au niveau de la différenciation des lymphocytes B en perturbant ces mécanismes.

Enfin, l'étude des G-quadruplexes d'ARN, de leur rôle au niveau de leur maturation ou de leur traduction est actuellement en plein développement. De nombreux ligands pourraient effectivement avoir des effets à ces niveaux et moduler l'expression de nombreux gènes. L'exemple de l'extrémité 5' du composant ARN de la télomérase illustre la complexité d'analyse des effets de ces ligands : est-ce au niveau du substrat ou de l'ARN que se forme le G-quadruplexe ? Les deux effets sont-ils antagonistes ? De même sur une région génique pouvant former un G-quadruplexe, il n'est pas toujours évident de savoir si l'effet est dû à une inhibition/activation de la transcription, de la traduction et/ou de la maturation de l'ARN. Enfin la découverte très récente de l'ARN télomérique TERRA [363], pose la question de l'effet des ligands sur sa transcription/traduction et de la répercussion de ces effets au niveau cellulaires. Si, comme l'a décrit N. Maizels, la transcription de ces régions est stimulée par la formation de "G-loops" [37], des ligands devraient activer la transcription de TERRA. Quel en serait l'effet sur la régulation des télomères ? Nous constatons que de nombreux effets de ces ligands sont encore à élucider.

3 Paradoxe des ligands de G-quadruplexes comme agents thérapeutiques ?

Les ligands de G-quadruplexes pourraient donc avoir certes des effets télomériques mais également liés à la réplication, la transcription ou/et la recombinaison. Il paraît donc envisageable que la stabilisation de ces structures au cours des différents processus ait également un effet inductif d'instabilité génomique menant à l'apparition de cancers. Ces effets pourraient en particulier s'apparenter aux dysfonctions observées au niveau cellulaire dans les syndromes de Werner et Bloom. Contrairement au paradigme des inhibiteurs de télomérase, sensés cibler uniquement – ou très préférentiellement - les cellules cancéreuses, il est donc fort probable que de tels composés ne soient pas, dans leur état actuel, des agents anticancéreux “miraculeux”, puisque les risques de cancers chimio-induits et d'autres effets indésirables semblent importants.

Si l'on souhaite limiter l'action de ces ligands, et déconvoluer leurs effets, il sera certainement nécessaire de concevoir des ligands spécifiques de chaque structure en G-quadruplexe. Ceci n'est pas le cas, actuellement, pour la plupart des ligands dont nous disposons, comme le montrent nos études sur les G-quadruplexes formés par la séquence de *P.falciparum* ou encore nos expériences de compétition avec le G-quadruplexe de la région promotrice de *c-myc*.

Il semble également essentiel de mieux caractériser les effets de ces molécules sur des cellules normales à moyen et plus long terme. De même, l'action inattendue de certains ligands sur les cellules ALT doit être précisée : passe-t-elle par un mécanisme télomérique ou est-elle liée aux effets connexes de ces ligands ? De nombreux efforts sont donc encore à fournir pour valider l'utilisation de ces molécules à des fins thérapeutiques.

4 Des quadruplexes et des ligands pour d'autres applications ?

Nous avons exploré dans le dernier chapitre de résultats de ce manuscrit la possibilité d'utiliser ces ligands comme agents antiparasitaires permettant l'inhibition de la prolifération de *P.falciparum*. Si l'existence d'une extrémité 3' simple-brin chez le parasite et sa structuration *in vitro* dans des conditions physiologiques ont bien été démontrées, des expériences supplémentaires concernant la relation entre l'effet cytotoxique des composés et un effet télomérique reste à effectuer. En particulier, nous souhaitons étudier l'effet d'un traitement plus long du parasite par la **télomestatine**, et éventuellement par **PIPER** qui semble particulièrement actif sur toutes les souches du parasite testées. Nous devons également étudier l'effet de ces ligands sur la polymérisation de l'hème, qui pourrait être un autre mécanisme causant la mort du parasite. Il serait également intéressant de voir si d'autres régions pouvant former des G-quadruplexes sont présentes dans le génome du parasite, qui rappelons-le est riche à plus de 80%

en A-T, et pourraient être autant d'autres cibles privilégiées des ligands. D'autre part, les ligands testés ne discriminent pas les G-quadruplexes formés par les séquences télomériques du parasite de celles de l'hôte. Une connaissance plus détaillée de la structure du (ou des) G-quadruplexe(s) formé(s) par les séquences télomériques de *P. falciparum* par analyse RMN ou cristallographique serait très utile pour concevoir des ligands spécifiques des G-quadruplexes télomériques du parasite et augmenter la sélectivité d'action des composés au niveau des organismes.

Par ailleurs, la connaissance du télomère et de la télomérase du parasite restent sommaires. On ignore actuellement presque tout de la structure du télomères et des protéines jouant un rôle dans sa maintenance. De plus, si la sous-unité catalytique est connue, l'ARN matrice de la télomérase n'a toujours pas été identifiée. Des analyses bioinformatiques et phylogénétiques combinées à une validation expérimentale chez le parasite *P. bergeri* devraient prochainement permettre d'identifier quelques-unes de ces composantes (travaux réalisés par Loïc Ponger, Patrizia Alberti et Delphine Depoix au USM 503 et 504 du Muséum National d'Histoire Naturelle). Enfin, il reste à confirmer ou infirmer l'existence éventuelle d'une extrémité 5' terminant certains des chromosomes du parasite. Néanmoins, celle-ci reste tout de même très peu probable.

Au-delà d'applications thérapeutiques potentielles, les ligands de G-quadruplexes pourraient également servir de sondes pour la détection de ces structures dans un contexte chromatinien. À l'exception de quelques familles de composés, la fluorescence de la majorité des ligands développés est éteinte lorsqu'ils sont liés aux G-quadruplexes. Pour ce type d'applications, la sélectivité de fixation des ligands est encore davantage déterminante. Ainsi, parmi les quelques composés développés pour leur exaltation de fluorescence en présence de G-quadruplexe, les dérivés d'éthidium ont une sélectivité trop faible pour permettre ce type d'applications, et avec sa faible affinité et son rendement quantique limité, la porphyrine anionique **NMM** n'est pas un meilleur candidat. À ce jour, seul un composé a été utilisé pour ce type d'applications : il s'agit du carbazole **BMVC** (Figure 47) [364, 365].

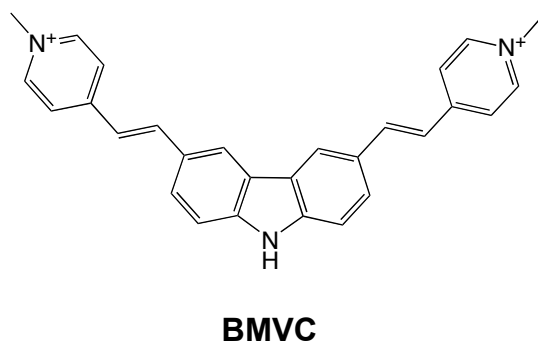


Figure 47 : Structure chimique du composé BMVC

In vitro, ce composé possède des propriétés d'émission légèrement différentes en fonction de sa liaison à un duplexe d'ADN ou à un G-quadruplexe. Il possède par ailleurs un bon rendement quantique de fluorescence. Néanmoins, seule une analyse contestable en temps de vie de fluorescence a permis de distinguer les deux structures au sein de chromosomes métaphasiques, démontrant que des efforts sont encore nécessaires pour une utilisation du composé en temps que sonde des G-quadruplexes dans un contexte chromatinien [364, 365]. Au laboratoire, Peng Yang a synthétisé des dérivés de thiazole orange-pyridodicarboxamides. La fluorescence de ces molécules est effectivement exaltée lorsqu'elles sont liées à des G-quadruplexes, et la présence du cœur pyridodicarboxamide permet de conserver une bonne sélectivité vis-à-vis des duplexes d'ADN et des simple-brins. Néanmoins le rendement de fluorescence de ces composés reste faible, et leur utilisation dans des cellules ou sur des chromosomes métaphasiques n'a pas mis en évidence de colorations révélatrices de structures particulières au sein de l'ADN génomique. Des efforts restent donc à fournir pour accéder à ce type de molécules sondes.

Enfin, on pourra mentionner l'utilisation potentielle de ces ligands dans un contexte d'électronique moléculaire. En effet, les G-quadruplexes sont actuellement à l'étude pour leur potentiel de conduction et leur capacité à former des fils moléculaires. Nous avons montré dans l'**article 4** que certains ligands comme ceux de la famille des dicarboxamides permettaient d'accélérer considérablement l'association de G-quadruplexes tétramoléculaires. On peut imaginer que ce type de ligands, ou des ligands permettant la multimérisation de blocs élémentaires de courts G-quadruplexes puissent être utilisés pour aider à la conception de ces fils moléculaires.

En conclusion, nous avons contribué à l'identification de nouvelles molécules spécifiques des quadruplexes de guanines et à la caractérisation de leurs effets au niveau moléculaire. Ce travail à l'interface de plusieurs domaines est le fruit de multiples collaborations ; il n'aurait pu être réalisé sans l'important travail de synthèse réalisé par les chimistes. Les résultats obtenus sur diverses familles de composés illustrent l'intérêt de pouvoir accéder à des chimiothèques et de l'utilisation d'un test de criblage à moyen débit. Par l'intermédiaire de ce travail, nous soulignons également les difficultés rencontrées pour comparer les affinités et sélectivités des diverses molécules développées par les différents groupes travaillant sur le sujet. Alors que des constantes d'affinité de ces composés sont rarement disponibles, il paraît indispensable de d'évaluer les nouveaux composés développés par comparaison à des composés de référence, comme la **télomestatine**. Enfin, l'identification d'une molécule potentiellement plus active que la télomestatine dans nos tests, et les éventuels effets anti-parasitaires de certains ligands de G-

quadruplexes, ouvrent la voie à d'importants travaux complémentaires qui permettront de clarifier le(s) mode(s) d'action de ces composés. Nous sommes conscients que de nombreux efforts sont encore à fournir afin de valider le potentiel thérapeutique de ces molécules. Néanmoins, au terme de ce travail, nous pouvons moduler la question posée dans le titre de ce manuscrit, que nous transformerons volontiers en : “cibler quel(s) G-quadruplexe(s) ?”

Matériel et Méthodes

Chapitre VII. Matériel et Méthodes

1 Produits

1.1 *Les tampons*

Pour les expériences de spectroscopie, nous utilisons généralement des tampons qui n'absorbent pas ou peu dans le domaine de longueurs d'onde étudiées, entre 200 nm et 700 nm, et qui n'ont pas de propriétés de fluorescence notables. D'autre part, les expériences de dénaturation thermique nécessitent des tampons dont le pH varie peu avec la température. Le tampon composé par le couple acide faible/base faible, acide cacodylique/cacodylate ($pK_a = 6,27$ à 25°C) possède ces deux propriétés, avec un pouvoir tamponnant à compris entre 5,0 et 7,4. Il constitue donc le tampon de choix pour les études spectroscopiques à pH physiologique en absorbance, dichroïsme circulaire et fluorescence.

Le tampon que nous nommons dans ce manuscrit cacodylate de lithium, classiquement utilisé à 10 mM et pH 7,2, est obtenu par basification d'une solution d'acide cacodylique avec une solution d'hydroxyde de lithium. La quantité d'ions Li^+ ajoutés au cours de cette opération est sensiblement égale à la quantité de cacodylate, 8,9 mM pour une solution à 10 mM en cacodylate. L'ion Li^+ n'a pas ou peu d'effet stabilisant sur les G-quadruplexes, certainement en raison de son plus faible rayon ionique par rapport à la cavité formée par un quartet de guanines. L'utilisation de ce contre ion pour nos études spectroscopiques sur les G-quadruplexes nous permet donc négliger son effet sur la stabilisation et d'associer d'autres ions comme le sodium ou le potassium sans changer de tampon. L'utilisation de ce tampon a donc remplacé progressivement celle du sel commercial de cacodylate de sodium qui introduisait systématiquement 10 mM d'ions Na^+ - pouvant jouer un rôle important dans la stabilité des structures.

Pour les expériences de biochimie et de biologie moléculaire, nous utiliserons des tampons classiques comme l'HEPES ($pK_a = 7,48$ à 25°C) ou le Tris-HCl ($pK_a = 8,06$ à 25°C) qui possèdent des pouvoirs tampons entre les pH 6,8 - 8,2 et 7,5 - 9,0 respectivement.

1.2 *Les oligonucléotides*

Les oligonucléotides utilisés sont synthétisés par la société *Eurogentec* (Belgique). Délivrés sous forme lyophilisée, ils sont resuspendus dans de l'eau bidistillée.

Nom	Longueur	$\epsilon(\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1})$	Séquence (5' → 3')
F21T	21 mer	245000	FAM-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-TAMRA
F21D	21 mer	245000	FAM-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-DABCYL
21G	21 mer	215000	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
22AG	21 mer	228500	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
30AG	30 mer	309300	AGGGGGTTAGGGGGTTAGGGGGTTAGGGGG
21Gmu3	21 mer	203500	GGCTTACGGTTAGCGTTAGGG
Telo3R	18 mer	183500	TTAGGGTTAGGGTTAGGG
Telo4R	24 mer	244600	TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
21C	21 mer	185900	CCCTAACCCTAACCCTAACCC
27hm	27 mer	254200	TAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA
27dx	27 mer	267000	TAACCCTAACCCTAAGGGTTAGGGTTA
27dy	27 mer	252000	AAACCCAAACCCTTTGGGTTTGGGTTT
Ds26	26 mer	253200	CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG
DT26	26 mer	211200	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Pu27Myc	27 mer	279900	TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG
Py27Myc	27 mer	215200	CCTTCCCCACCCCTCCCCACCCCTCCCCA
Pu27Mycm	27 mer	273800	TGAGTAGCGTGAGCAGAGTGCGTAACG
TG3T	5 mer	47700	TGGGT
PTG3T	5 mer	47700	PO ₄ -TGGGT
TG4T	6 mer	57800	TGGGGT
TG5T	7 mer	67900	TGGGGGT
T2G5T2	9 mer	85100	TTGGGGGTT
T2AG3	6 mer	61300	TTAGGG
T2AG3T	7 mer	69800	TTAGGGT
TS-4R	42 mer	423800	AATCCGTCGAGCAGAGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
TS	18 mer	179400	AATCCGTCGAGCAGAGTT
TSNT	36 mer	370100	AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT
NT	18 mer	151800	ATCGCTTCTCGGCCTTTT
ACX	30 mer	261000	GCGCGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC
PfACX	33 mer	299700	GGCGCGTTAACCCTTAACCCTTAACCCTTAACC
C-TolaPf	21 mer	192900	TGAACCCCTGAACCCCTGAACCC
C-TolaPfm1	21 mer	189300	TTAACCCTTAACCCTTAACCC
C-TolaPfm2	21 mer	177600	TTTACCCTTTACCCTTTACCC
G-TolaPf	21 mer	209500	GGGTTTAGGGTTTAGGGTTTA
PfTS-6R	60 mer	599400	AATCCGTCGAGCAGAGTT(YAGGGTT) ₆ (Y=T/C)
PfTS-12R	102 mer	1043000	AATCCGTCGAGCAGAGTT(YAGGGTT) ₁₂ (Y=T/C)
PfTS-18R	144 mer	1463000	AATCCGTCGAGCAGAGTT(YAGGGTT) ₁₈ (Y=T/C)
FPf1T	24 mer	269300	FAM-GGGTTTAGGGTTTAGGGTTAGGG-TAMRA
FPf8T	24 mer	264800	FAM-GGGTTCAGGGTTCAGGGTTCAGGG-TAMRA
Pf1	24 mer	239300	GGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGG
Pf2	24 mer	237800	GGGTTTAGGGTTTAGGGTTCAGGG
Pf3	24 mer	237800	GGGTTTAGGGTTCAGGGTTTAGGG
Pf4	24 mer	236300	GGGTTTAGGGTTCAGGGTTCAGGG
Pf5	24 mer	237800	GGGTTCAGGGTTTAGGGTTTAGGG
Pf6	24 mer	236300	GGGTTCAGGGTTCAGGGTTCAGGG
Pf7	24 mer	236300	GGGTTCAGGGTTCAGGGTTTAGGG
Pf8	24 mer	234800	GGGTTCAGGGTTCAGGGTTCAGGG

Table 7 : Liste des oligonucléotides utilisés dans ce manuscrit (excepté ceux utilisés uniquement dans la Dialyse à l'équilibre (cf. : § VII.3).

PO₄ : phosphate terminal ; *FAM* : 6-carboxyfluorescéine ; *TAMRA* : Tétraméthylrhodamine.

Leur concentration est déterminée par spectroscopie d'absorbance à 260 nm (cf. : § VII.2.1) en utilisant les coefficients d'extinction molaires publiés [366], utilisant le modèle du 1^{er} voisin selon l'équation :

$$(1) \quad \epsilon_{260nm} = 2 \times \left(\sum_1^{m-1} \epsilon_{dNpdN} \right) - \sum_2^{m-1} \epsilon_{dN} + \sum_1^m \epsilon_{modification}$$

avec m , la longueur de l'oligonucléotide et $N = A, T, G$ ou C avec les valeurs présentées dans la Table 8.

ADN	ϵ_{260nm} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ADN	ϵ_{260nm} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ADN	ϵ_{260nm} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ADN	ϵ_{260nm} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ADN	ϵ_{260nm} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
pdA	15400	dApdA	13700	dCpdA	10600	dGpdA	12600	dTpdA	11700
pdC	7400	dApdC	10600	dCpdC	7300	dGpdC	8800	dTpdC	8100
pdG	11500	dApdG	12500	dCpdG	9000	dGpdG	10800	dTpdG	9500
pdT	8700	dApdT	11400	dCpdT	7600	dGpdT	10000	dTpdT	8400

Table 8 : Valeur des coefficients d'extinction molaire à 260 nm (mol⁻¹.L.cm⁻¹) des monomères et dimères de déoxyribonucléosides-5'-monophosphates [366].

Tous les stocks d'oligonucléotides sont ensuite conservés à -20°C dans de l'eau bidistillée pour éviter l'introduction d'ions non désirés, pouvant influencer la stabilité et la cinétique de formation de certaine structures.

1.3 Les ligands

Les molécules chimiques que nous avons testées et caractérisées pour leur capacité à lier des structures particulières d'ADN ont des origines diverses. Certaines sont commerciales comme **TMPyP4**, **PIPER** (Calbiochem) et le bromure d'éthidium (Sigma) ; d'autres ont été synthétisées dans le cadre de l'ACI "Médicaments et Cibles thérapeutiques" par la société Sanofi-Aventis : les triazines, dérivés d'éthidium, **BRACO19**, dérivés d'acridine et d'anthraquinone et dérivés de pyridine 2,6-dicarboxamides. Nous remercions le Dr. Patrick Mailliet pour nous avoir transmis tous ces composés.

Une grande partie des molécules testées plus récemment a été synthétisée par les chimistes du groupe de Marie-Paule Teulade-Fichou au Collège de France/Institut Curie (Markus Kaiser pour les dérivés macrocycliques de néomycine, Candide Hounsou pour les dérivés de méta-quinacridines, Hélène Bertrand pour les dérivés organométalliques de terpyridine, et David Monchaud et Elsa De Lemos pour les dérivés de bipyridine et phénanthroline bisquinolinium) ou à l'Institut Curie (Chi-Hung Nguyen pour les dérivés pyridopyrazines ou pyrazophenanthroline pentacycliques).

Enfin la **télomestatine** a été purifiée et fournie par Kazuo Shin-ya (Université de Tokyo).

2 Spectroscopies

2.1 Absorbance

2.1.1 Matériel :

Les expériences de spectroscopie d'absorbance ont été réalisées sur des spectrophotomètres Uvikon 940, 943, 933, XL (Kontron) présentant un passeur de 9 échantillons et 2 références et qui peuvent être thermostatés par cryostat. Pour les mesures d'absorbance dans l'UV à l'aide de ces spectrophotomètres, des cuves en quartz (Hellma, France) de divers parcours optiques (10, 2, 1 et 0,5 mm) et contenance (3 ml, 600 µl, 300 µl ou 150 µl) peuvent être utilisées. L'utilisation d'un Nanodrop ND-1000 a également permis ponctuellement la détermination rapide et économique de concentrations d'ADN génomique ou d'oligonucléotides pour des applications en biologie moléculaire.

2.1.2 Quelques bases théoriques de l'absorbance UV/Visible :

La lumière peut être décrite de deux manières différentes : elle peut être considérée comme un courant de corpuscules (photons) ou comme une onde électromagnétique. Dans le cas de cette deuxième définition, l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière peut être décrite par les équations de Maxwell régissant la théorie électromagnétique. On peut déduire des équations régissant la propagation des ondes dans un milieu absorbant que l'intensité de la lumière transmise I est décrite par l'équation suivante:

$$(2) \quad I = I_0 e^{(-2,303\epsilon l C)},$$

avec I_0 l'intensité de la lumière incidente, ϵ le coefficient d'absorption molaire, l la longueur du parcours de la lumière au travers du milieu, et C la concentration de composé absorbant, équation constituant la loi de Beer-Lambert. Cette loi est généralement exprimée sous sa forme logarithmique et définit l'absorbance A :

$$(3) \quad A = \epsilon l C = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Dans la gamme de températures utilisée, et conformément à la loi de Boltzmann, une molécule en solution se trouve à l'état fondamental S_0 . L'interaction de la lumière avec la matière conduit à des transitions de l'état fondamental à des états excités particuliers. Pour la lumière UV-visible (200 – 700 nm) cette interaction conduit au phénomène d'absorption de la lumière correspondant à des transitions électroniques de l'état S_0 aux états S_n et des excitations vibrationnelles. Les états excités $S_{n>1}$ ne sont pas stables et la molécule revient rapidement au

premier état excité S_1 en 10^{-12} s environ par relaxation vibrationnelle. À partir de l'état S_1 , où la molécule reste un temps de l'ordre de la nanoseconde, différents processus peuvent entrer en compétition pour ramener la molécule à son état fondamental (Figure 48)

- Désactivation non radiative et retour à l'état fondamental sans émission de photon.
- Fluorescence, c'est-à-dire émission spontanée d'un photon (cf : § VII.2.3)
- Passage à l'état triplet T_1 par un système de conversion intersystème, pouvant conduire à la phosphorescence.

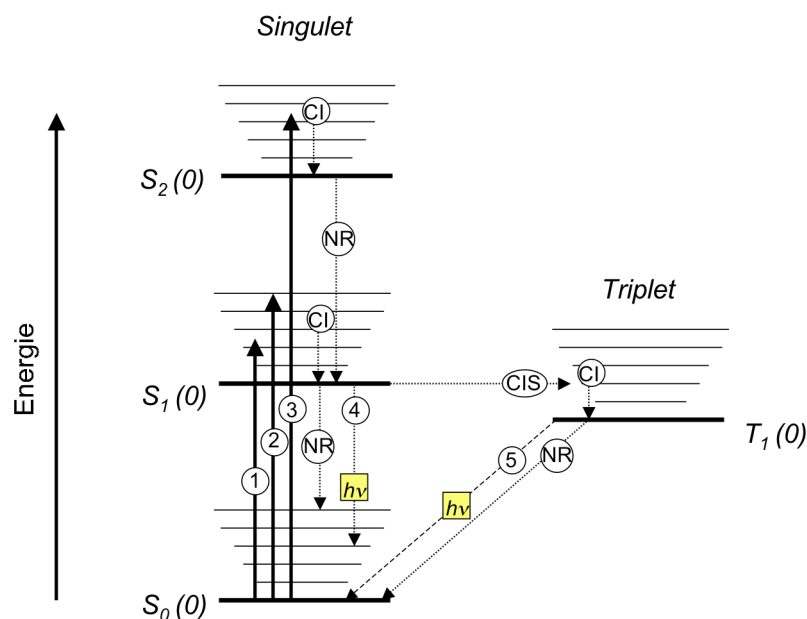


Figure 48 : Diagramme de Jablonski simplifié :

(1-3) L'absorption d'un photon amène la molécule dans un état électronique excité $S_n(m)$ ($n = 1, 2 \dots ; m = 0, 1 \dots$ correspond aux états vibrationnels). Très rapidement la molécule revient à l'état $S_n(0)$, par conversion interne (CI) (ou relaxation vibrationnelle), puis à l'état $S_1(m)$, en dissipant non radiativement (NR), la différence d'énergie. À partir de $S_1(m)$, la molécule revient à $S_1(0)$ par relaxation vibrationnelle, puis à partir de là, elle peut retourner à l'état $S_0(0)$ par désactivation non radiative, ou en émettant un photon de fluorescence (4). Elle peut aussi parvenir à l'état triplet par conversion intersystème (CIS) d'où elle peut émettre un photon dit de phosphorescence (5). Cette transition étant interdite, le temps de vie de cet état est beaucoup plus long, de l'ordre de la milliseconde (10^{-3} s).

L'absorbance des acides nucléiques entre 200 et 300 nm est exclusivement due aux systèmes insaturés conjugués et aux fonctions carbonyles présents dans les bases puriques et pyrimidiques. En effet, la contribution du squelette phosphaté n'est mesurable qu'à des longueurs d'onde inférieures à 190 nm. Le maximum d'absorption dépend donc de la séquence, de la structure et de la composition en bases ; il est compris entre 254 nm pour des séquences riches en purines A et G et 270 nm pour des séquences riches en pyrimidines C, T et U.

D'autre part, une grande partie des ligands étudiés est constituée de molécules polyaromatiques puisqu'elles sont en majorité destinées à interagir par empilement sur les bases

de l'ADN - sur les quartets terminaux pour les G-quadruplexes ou par intercalation entre les bases dans le cas des duplexes ou des triplexes. Elles absorbent donc souvent dans le proche UV et le visible grâce à la présence de nombreux systèmes conjugués.

2.1.3 Spectres d'absorption, détermination de concentrations et spectres de différence thermique.

Comme nous venons de le mentionner, l'absorption d'un acide nucléique dépend de sa séquence, de sa structure et de sa composition en bases. Pour certaines structures d'ADN, une importante variation d'absorbance peut en effet être observée pour des formes structurées et déstructurées. Les coefficients d'extinction molaire étant calculés à 260 nm pour des oligonucléotides non structurés, les concentrations doivent en général être déduites des spectres enregistrés à haute température, lorsque les oligonucléotides sont dénaturés. Néanmoins pour certaines structures ou la variation d'absorbance à 260 nm est faible - c'est généralement le cas des G-quadruplexes [27] - l'approximation de concentration réalisée à partir des spectres à basse température est acceptable.

Ces observations ont permis de montrer, que la courbe, obtenue par soustraction des spectres enregistrés à basse température (ADN structuré) à ceux obtenus à haute température (ADN simple-brin), nommée TDS pour "Thermal Difference Spectra", pouvait révéler la présence de certaines structures d'acides nucléiques caractéristiques (ADN B, ADN Z, duplexes parallèles, triplexes, G-quadruplexes...)[367].

2.1.4 Étude des interactions ligand - acides nucléiques

L'étude des interactions entre des ligands et des acides nucléiques est possible par changement des propriétés d'absorbance du ligand ou de l'acide nucléique. Cela nécessite néanmoins une absorption des composés dans une gamme de longueurs d'ondes différente de celle de l'ADN, au-delà de 300 nm par exemple. Un modèle de fixation de ligand à n sites équivalents est présenté en Annexe II, et peut permettre dans certains cas la détermination du K_d . Notons cependant que l'absorbance est une technique relativement peu sensible pour l'étude des interactions, puisque les concentrations typiquement utilisées dans de telles expériences sont de l'ordre du micromolaire. Pour des ligands très affins, il sera donc possible de déterminer la stoechiométrie des complexes, mais difficile de donner numériquement une valeur de la constante de dissociation. Quand c'est possible, l'utilisation de la fluorescence des composés, qui permet généralement la détection de quantités plus faibles de matériel, est donc préférable.

2.1.5 Mesures et Dénaturation thermique de structures d'ADN

Les spectrophotomètres utilisés possèdent un double faisceau qui permet la soustraction, à l'acquisition, du solvant ou tampon de référence. Nous utilisons généralement de l'eau bidistillée en référence, l'absorbance des tampons utilisés étant négligeable. Une première étape consiste à réaliser une ligne de base avec 2 cuves contenant la solution de référence, permettant l'initialisation et la mise à zéro du signal entre les 2 chariots. Cette ligne de base est généralement réalisée de 900 à 190 nm, à une vitesse de 200 nm.min⁻¹, avec un pas de 1 nm. Le spectre d'absorbance de la cuve contenant l'échantillon est ensuite mesuré entre 220 et 340 nm pour les acides nucléiques, et jusqu'à 700 nm pour les molécules absorbant dans le visible, à une vitesse comprise entre 200 et 1000 nm.min⁻¹ en fonction de la gamme de longueurs d'ondes balayée (pas 1 nm). Les données d'absorbance en fonctions de la longueur d'onde sont ensuite exportées et traitées par des logiciels tels que Kaléida Graph ou Excel.

Les expériences de dénaturation thermique suivies par spectroscopie d'absorbance permettent de mesurer la stabilité d'une structure en fonction de la température. En effet, la variation des propriétés d'absorbance de l'échantillon, à des longueurs d'ondes bien choisies (cf. : TDS § VII.2.1.3), peut témoigner d'un changement conformationnel de la molécule. En fonction de sa structure, la dénaturation thermique d'un ADN structuré peut s'accompagner d'un hyperchromisme (augmentation de l'absorbance) ou d'un hypochromisme (diminution de l'absorbance) de l'ordre de 15-20% du signal d'absorbance à la longueur d'onde choisie. Les spectrophotomètres sont reliés à des cryostats qui permettent la régulation thermique des passeurs d'échantillons, c'est-à-dire le chauffage et le refroidissement à des gradients de température bien définis, classiquement compris entre 0,2 et 1 °C.min⁻¹. La concentration en acides nucléiques doit être choisie pour obtenir une variation de signal d'absorbance de l'ordre de 0,1, ce qui est généralement le cas en se plaçant à une absorbance à 260 nm comprise entre 0,7 et 1,2. Nous avons vérifié que ces spectromètres étaient linéaires jusqu'à une absorbance de 2,5 environ dans l'UV lointain. Les programmes "MacroTm" sur les Uvikon 940, 943 ou 933, développés par le Pr. Jian-Sheng Sun, dans notre unité, et "ThermAlys" sur les Uvikons XL, permettent l'enregistrement à intervalles réguliers de l'absorbance des échantillons (9 au maximum) avec un temps d'intégration de 1s, et de la température relevée par une sonde immergée dans une cuve. Les données sont ensuite exportées sous forme de tableur (Kaléida Graph ou Excel). Les variations d'absorbance à une longueur d'onde de référence, où aucune variation dépendante de la structure étudiée n'est attendue, sont soustraites aux absorbances mesurées aux autres longueurs d'onde.

Les courbes de dénaturation thermiques obtenues présentent une transition qui se déroule sur une gamme restreinte de température. Ce type de transition marque le passage de la forme

associée ou repliée de la molécule (à basse température) vers sa forme dissociée ou dépliée (à haute température). Il est possible de déduire de ces courbes sigmoïdales la température de demi-transition T_m , qui correspond à la température pour laquelle 50% des molécules ont été dénaturées. Celle-ci est déterminée graphiquement en traçant la médiane entre les lignes de bases à basse et haute température. On notera que les lignes de base à basse $L_1(T)$ et haute température $L_0(T)$ correspondent à la variation supposée linéaire des propriétés d'absorbance des états repliés et dépliés respectivement. La fraction molaire $\theta(T)$ de molécules dans l'état replié peut alors s'exprimer en fonction de la courbe de dénaturation thermique obtenu $A(T)$:

$$(4) \quad \theta(T) = \frac{L_0(T) - A(T)}{L_0(T) - L_1(T)},$$

la T_m étant définie pour $\theta = 0,5$ ($\theta = 1$ quand $T \ll T_m$ et $\theta = 0$ pour $T \gg T_m$).

Dans le cas de structures à l'équilibre thermodynamique, les courbes de dénaturation et de renaturation doivent être superposables. Il est alors possible de déduire des paramètres thermodynamiques des courbes de dénaturation thermique, en exprimant les constantes d'association ou de dissociation en fonction de θ . Dans le cas contraire, un phénomène d'hystérésis lié à des cinétiques lentes de dénaturation et / ou de renaturation apparaît et les courbes de montée et descente en température ne sont pas superposables. C'est le cas très particulier des G-quadruplexes tétramoléculaires que nous avons étudié en présence ou non de ligands spécifiques des G-quadruplexes. Dans ce cas précis, il est nécessaire de préformer les structures à haute concentration avant de pouvoir étudier leur stabilité thermique. L'association des brins d'ADN en G-quadruplexes étant négligeable dans la gamme de température où ces structures se dissocient, la transition observée ne reflète pas l'équilibre thermodynamique. Il est alors préférable, pour éviter toute confusion, de parler de $T_{1/2}$ plutôt que de T_m .

Toujours dans le cas particulier des G-quadruplexes tétramoléculaires, il est possible de suivre en spectroscopie d'absorbance la cinétique lente d'association des brins d'ADN, préalablement dénaturés, en G-quadruplexes. En utilisant les mêmes programmes que pour les expériences de dénaturation thermique, il est possible de mesurer l'absorbance, aux longueurs d'onde caractéristiques de la structure étudiée (240 et 295 nm classiquement pour les G-quadruplexes), en fonction du temps, chaque mesure étant effectuée à un intervalle de temps bien défini. Les courbes obtenues peuvent être ajustées avec une courbe théorique qui dépend de l'ordre de la réaction, et permettent de déduire la constante de vitesse d'association k_{on} des simples brins d'ADN en G-quadruplexes tétramoléculaires. Nous développerons davantage ce point dans la deuxième partie expérimentale de ce manuscrit.

2.2 Dichroïsme Circulaire

2.2.1 Matériel :

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur un spectropolarimètre JASCO J810, à lampe de Xénon (150W refroidie par l'air), purgé par de l'azote pour préserver les systèmes optiques et équipé d'un passeur de 6 échantillons, thermostaté par un effet Peltier. Des cuves en quartz (Hellma, France) de divers parcours optiques (10, 2, 1 et 0,5 mm) et contenance (3 ml, 600 µl, 300 µl ou 150 µl) peuvent être utilisées. Pour les acides nucléiques étudiés, il est possible sur un même échantillon d'effectuer quasi-simultanément une étude en absorbance et en dichroïsme circulaire en utilisant des cuves micrométriques noires de 1 cm de parcours optique, les concentrations nécessaires pour effectuer les deux mesures étant très similaires.

2.2.2 Principe :

Le dichroïsme circulaire est une méthode de choix pour l'étude de molécules chirales en solutions, et donc une méthode particulièrement attractive pour l'étude de systèmes biologiques. Le dichroïsme circulaire est communément utilisé pour étudier les macromolécules biologiques soit (i) pour évaluer les changements de conformation des macromolécules elles-mêmes, soit (ii) pour révéler leurs interactions avec de petites molécules, plus particulièrement celles qui sont achirales et dont le signal CD induit est uniquement dû à leur interaction avec la macromolécule.

On définit le signal CD d'une molécule par la différence d'absorption entre la lumière polarisée circulairement à gauche A_g et celle polarisée à droite A_d .

$$(5) \quad CD = A_g - A_d$$

En pratique le spectropolarimètre possède un modulateur piezoélastique qui produit alternativement une lumière polarisée circulairement à droite puis à gauche avec une fréquence de changement de 50 Hz. Lorsque la lumière, d'intensité constante, traverse un échantillon chiral, une fluctuation d'intensité en phase avec le modulateur de fréquence apparaît. Les photons transmis sont détectés par un photomultiplicateur qui produit un courant dont l'amplitude dépend du nombre de photons incidents, ce qui génère le signal CD (positif ou négatif en fonction de la phase du courant alternatif piloté par le modulateur).

Il est possible de mettre en relation le signal CD (en unités d'absorbance), la concentration C de l'échantillon et la parcours optique l par une loi analogue à la celle de Beer-Lambert pour l'absorbance :

$$(6) \quad CD = \Delta A = \Delta \epsilon l C = (\epsilon_g - \epsilon_d) l C$$

Il est également possible de convertir le signal CD (en unité d'absorbance) en ellipticité θ (en millidegrés) selon la relation :

$$(7) \quad \theta = 32980 \times CD$$

2.2.3 Dichroïsme circulaire des acides nucléiques

Entre 200 et 300 nm, les spectres CD des acides nucléiques résultent des transitions dues aux couplages entre bases, lorsqu'elles sont empilées dans une structure chirale - par exemple, de type hélicoïdal. Le signal reflète ainsi l'orientation des bases entre elles. En cela le dichroïsme circulaire se révèle être un outil précieux pour l'étude conformationnelle de structures d'acides nucléiques et s'avère particulièrement adapté à des structures hautement polymorphiques comme les G-quadruplexes. Plusieurs signatures spectrales ont été décrites comme caractéristiques de G-quadruplexes "parallèles", "antiparallèles" ou "hybride" (Figure 49), en fonction des structures cristallographiques et RMN décrites. Il est néanmoins difficile à ce jour, de savoir si ces signatures sont réellement représentatives de l'orientation des brins au sein du quadruplexe, où si elles reflètent plutôt l'enchaînement des bases (*syn-anti*) au sein de la structure, indépendamment de l'orientation des 4 brins constituant le quadruplexe. Cette nomenclature pour décrire de tels spectres peut donc s'avérer relativement abusive. Un article récent de D. Gray [356] propose une hypothèse intéressante reposant sur la polarité de deux G-quartets successifs empilés. Des polarités alternées 2 à 2 de deux G-quartets empilés (enchaînement *syn/anti* ou *anti/syn* de 2 guanines successives sur un brin) induiraient des signaux du type "antiparallèle" (cf. forme Na⁺ du G-quadruplexe télomérique humain, courbes rouges, Figure 49), alors que des polarités identiques 2 à 2 de deux G-quartets empilés (enchaînement *syn/syn* ou *anti/anti* de 2 guanines successives sur un brin) induiraient des signaux du type "parallèle" (cf. forme K⁺ de [TG₃T]₄, courbe noire, Figure 49). Ainsi, typiquement, un G-quadruplexe possédant 3 G-quartets de polarités successives - / + / + (enchaînement *syn/anti/anti* sur un brin par exemple) devraient conduire à un signal CD de forme mixte, résultant d'une combinaison entre les formes "parallèles" et "antiparallèles" (cf. forme K⁺ de 22AG ou 21G, courbes bleues, Figure 49). S'ajoute à cela, le polymorphisme inhérent aux G-quadruplexes qui conduit au mélange de diverses structures en solution pour certaines séquences, ce qui complexifie encore davantage l'interprétation des signaux.

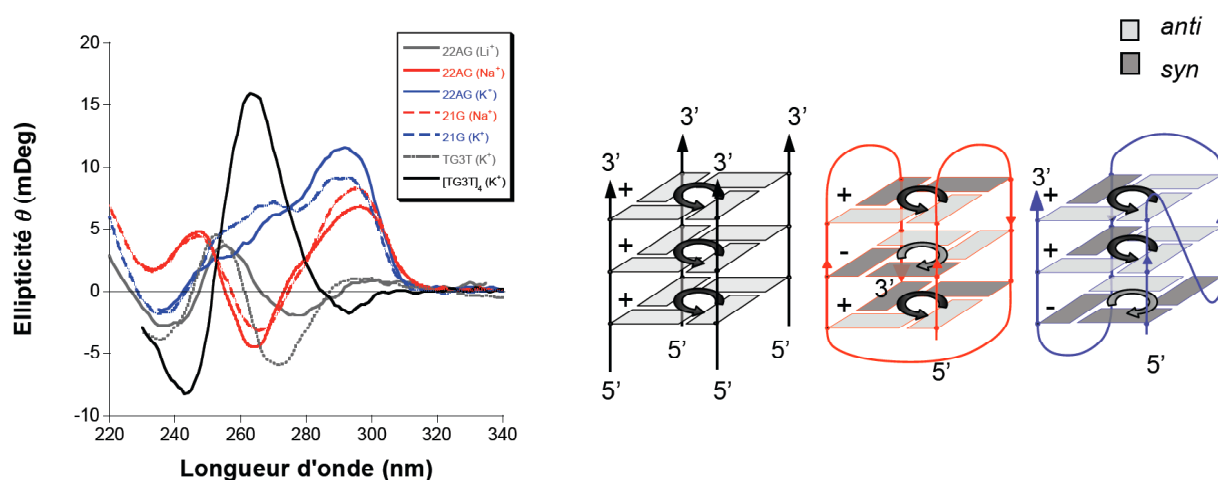


Figure 49 : Exemples de spectres CD pour différents types de structures en G-quadruplexe ou simple-brin.

Les spectres ont été réalisés dans des cuves de 1 cm de parcours optique, contenant 10 mM cacodylate de lithium seul (Li^+), en présence de 100 mM NaCl (Na^+) ou 100 mM KCl (K^+), avec 3 μM en structure (soit 12 μM en brin pour TG_3T et 3 μM pour 21G et 22AG (voir séquences Table 7)). Une préincubation sur plusieurs jours à 4°C à une concentration de l'ordre de 1000 μM est nécessaire pour former le G-quadruplexe parallèle $[\text{TG}_3\text{T}]_4$. Une dénaturation à 90°C est un retour rapide à 20°C a été réalisé pour 21G, 22AG et TG_3T simple-brin (gris). Les spectres ont été enregistrés à 20°C, sauf pour le spectre de 22AG (Li^+) enregistré à 37°C pour limiter toute structuration. En Na^+ (rouge), spectres dit de type “antiparallèle”, en K^+ (noir et bleu), spectre dit “parallèle” pour $[\text{TG}_3\text{T}]_4$, (noir) spectre dit “mixte” pour les oligonucléotides 21G et 22AG (bleu) : la forme du spectre peut résulter d'un mélange de diverses structures et/ou de la prépondérance de la forme dite “hybride” (3+1) [175] [174]. En gris, les spectres correspondant à un oligonucléotide non structuré. A droite, schéma des enchaînement syn/anti des guanines sur un brin et polarité des G-quartets.

Comme pour les mesures en absorbance, l'acquisition du signal CD en fonction de la température permet de tracer des courbes de dénaturation thermique. La forme structurée, à basse température possède généralement un signal CD, positif ou négatif, relativement important dû à l'empilement et à l'appariement des bases entre-elles, alors qu'à haute température, le couplage entre bases (et donc le signal CD) de la forme déstructurée est fortement réduit. Une transition d'un signal positif ou négatif vers un signal proche de 0 est donc généralement observée. Le traitement des courbes de dénaturation thermique obtenues est effectué de la même manière que précédemment (cf.: § VII.2.1.5)

2.2.4 Étude des interactions ligand - acides nucléiques

De nombreuses molécules se lient à l'ADN, et plus particulièrement aux G-quadruplexes, sont elles-même achirales. Néanmoins quand elles se lient à l'ADN, en particulier dans les sillons, elles peuvent acquérir un signal CD induit qui est caractéristique de leur interaction.

L'étude des interactions en dichroïsme circulaire s'effectue à des concentrations sensiblement identiques aux études en absorbance. Elle se révèle donc relativement insensible et

inadaptée à l'étude de ligands très affins, possédant des K_d inférieurs au micromolaire. Néanmoins pour des ligands achiraux absorbant peu ou absorbant dans la région d'étude de l'ADN, le dichroïsme circulaire peut s'avérer être une alternative intéressante pour la détermination du nombre de sites de liaison. Il peut également apporter des informations complémentaires, en particulier sur des éventuels changements conformationnels de la macromolécule en présence de ligand (cf. Chapitre II, **article 3**). Un modèle de fixation de ligand à n sites équivalents est présenté en Annexe II, et peut permettre, dans certains cas, la détermination du K_d .

2.2.5 Mesures et traitement des données:

Le Jasco J-810 est un spectropolarimètre monofaisceau, il est donc nécessaire d'enregistrer une ligne de base correspondant au tampon sans macromolécule pour toute mesure réalisée. Il est par ailleurs préférable d'effectuer le spectre du tampon dans la même cuvette en quartz que la mesure elle-même, chaque cuve pouvant avoir un signal CD intrinsèque. La concentration en acide nucléique nécessaire dépend de l'empilement des bases dans la structure ; néanmoins les mesures doivent être effectuées à des absorbances comprises entre 0,6 et 1 (ou 1,5 en fonction du type de cuvettes utilisées) afin que le signal HT du photomultiplicateur ne dépasse pas 600 Volts.

L'acquisition des spectres de CD est réalisée à l'aide du logiciel "Spectra Manager" développé par Jasco. Le balayage est généralement effectué de 340 nm à 220 nm à une vitesse de 200 nm.s^{-1} , avec un pas de 1 nm, une largeur de bande de 1 nm et un temps de réponse de 1 s. Le signal CD est généralement faible et les spectres résultant bien plus bruité que des spectres d'absorbance ; il est donc préférable d'accumuler plusieurs spectres (2 ou 3 en moyenne) pour limiter le bruit.

La soustraction de la ligne de base est effectuée manuellement sur le logiciel "Spectra Analysis" fourni par Jasco, ou après exportation des données brutes sous Excel ou Kaléïda Graph.

Pour les expériences de dénaturation thermique, le passeur d'échantillon est thermostaté par un effet Peltier piloté directement par le logiciel "Spectra Manager" ou par "Macro Command for Spectra Manager". Une sonde de température externe, immergée dans une cuve, permet en théorie de relever la température réelle de la cuve ; néanmoins dans l'état actuel des choses, il n'est pas possible de piloter avec précision le gradient de température réalisé par l'effet pelletier et de relever à des temps précis la température de la sonde. En pratique, il est donc nécessaire de réaliser des successions de variations de température / temps d'attente / mesures pour permettre à l'instrument de se stabiliser à la température désirée dans la cuve ; cette façon de procéder peut poser de sérieux problèmes dans le cas de gradients rapides de température. Il est également possible de réaliser des dénaturations thermiques en "3 dimensions", où, à chaque température un spectre CD intégral est enregistré. Dans ce cas, l'accumulation de plusieurs spectres, en respectant

les temps permettant de réaliser le gradient de température désiré, peut être délicate. Pour les expériences de dénaturation en 3D avec les G-quadruplexes tétramoléculaires présentées dans la deuxième partie expérimentale de ce manuscrit, nous avons utilisé la succession $+1^{\circ}\text{C}$ à $5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ / attente 1 min / spectre de 340 à 220 nm à $200 \text{ nm}.\text{s}^{-1}$. Cette séquence correspond, en ajoutant les temps d'initialisations de l'instrument pour la mesure, à un gradient d'environ $0,5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. Les données de T_m sont ensuite exportées par l'intermédiaire du logiciel "Interval Spectra Analysis".

2.3 Fluorescence

2.3.1 Matériel:

Les spectres ainsi que les premières expériences de dénaturation thermiques suivies en fluorescence ont été effectués sur un spectrofluorimètre FluoroMax-3 (Jobin Yvon) à lampe de Xénon (150W) équipé d'un passeur de 4 échantillons et relié à un cryostat permettant de faire varier la température de 4 à 85°C . Occasionnellement, un fluorimètre SPEX Fluorolog 1681B à lampe de Xénon (450W), possédant deux monochromateurs pour l'émission a également été utilisé. Les expériences sont réalisées dans des cuvettes en quartz (Hellma, France) possédant 4 faces polies, de parcours optiques de 10 ou 2 mm, et de contenance 3 ml ou 600 μl .

Enfin, pour augmenter le débit des tests de stabilisation de G-quadruplexes suivis en fluorescence, nous avons été amenés à utiliser une machine de PCR quantitative, la Mx3000P (Stratagène). Elle est munie d'un système de filtres permettant la détection de la 6-carboxyfluorescéine que nous utiliserons dans nos tests (filtre d'excitation centré à $496 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ (FWHM ("full width at half maximum") = $9 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$)), filtre d'émission centré à $516 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ (FWHM = $10 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$). Les expériences sont réalisées dans des plaques 96 puits à capuchons optiquement "transparents", et sont thermo régulées entre 25 et 95°C par le bloc chauffant de la machine à PCR.

2.3.2 Quelques propriétés de l'émission de fluorescence :

La spectrométrie de fluorescence est une méthode de spectroscopie optique très largement utilisée pour l'étude des processus physiques fondamentaux des molécules ; les relations structures-fonctions et les interactions entre biomolécules ; la localisation et l'activité dans des cellules vivantes ou fixées, utilisant des techniques comme la microscopie confocale ; le séquençage de l'ADN. La principale raison pouvant expliquer cette utilisation extensive est sa très grande sensibilité et la large fenêtre dynamique de détection.

2.3.2.1 Relation entre intensité de fluorescence et concentration:

On peut noter qu'à partir de la loi de Beer-Lambert, il existe une relation entre la concentration en espèces C et l'intensité de fluorescence intégrée (I_F en photons.s^{-1}) décrite par l'équation suivante :

$$(8) \quad I_F = I_0(1 - 10^{-\epsilon l C})\phi_F$$

Avec I_0 l'intensité de la lumière incidente (en photons.s^{-1}), ϵ le coefficient d'extinction molaire du composé et ϕ_F le rendement quantique du composé, c'est-à-dire le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre total de photons absorbés.

Un paramètre important qu'il est nécessaire de considérer est l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation. En effet dans une solution diluée on peut développer l'équation en série et faire l'approximation ne tenant compte que du premier terme ; on obtient alors une relation linéaire entre I_F et la concentration :

$$(9) \quad I_F \approx I_0(\epsilon l C)\phi_F$$

Cette approximation mène à une erreur que l'on appelle "effet d'écran". La solution à l'avant de la cuve est exposée à une excitation lumineuse plus importante que la solution à l'arrière de celle-ci, en raison de l'absorbance de la solution. Ceci conduit à une erreur et une non-linéarité entre I_F et A . Pour limiter cette erreur on se place généralement à une absorbance maximale de 0,05 à la longueur d'onde d'excitation (pourcentage d'erreur sur I_F inférieur à 6%).

2.3.2.2 Principe du FRET:

La fluorescence est un outil puissant pour l'analyse des propriétés dynamiques de fluorophores d'intérêt biologique. En effet, la molécule reste pendant un temps suffisamment long à l'état excité S_1 pour que son émission de fluorescence reflète son environnement. L'intensité de fluorescence pouvant être reliée à la concentration des espèces en solution, il est possible de caractériser une interaction entre molécules par l'étude des modifications de propriétés de fluorescence d'une des substances.

Nous avons notamment utilisé au cours de ce travail le phénomène de transfert d'énergie d'excitation de fluorescence par résonance ("FRET") entre deux chromophores, étudié par Förster (1949). Ce phénomène, qui résulte du transfert d'énergie d'excitation d'un donneur de fluorescence D vers un accepteur A , se produit par le biais d'un couplage très faible entre le moment de transition d'émission du donneur et le moment de transition d'absorption de l'accepteur (Figure 50).

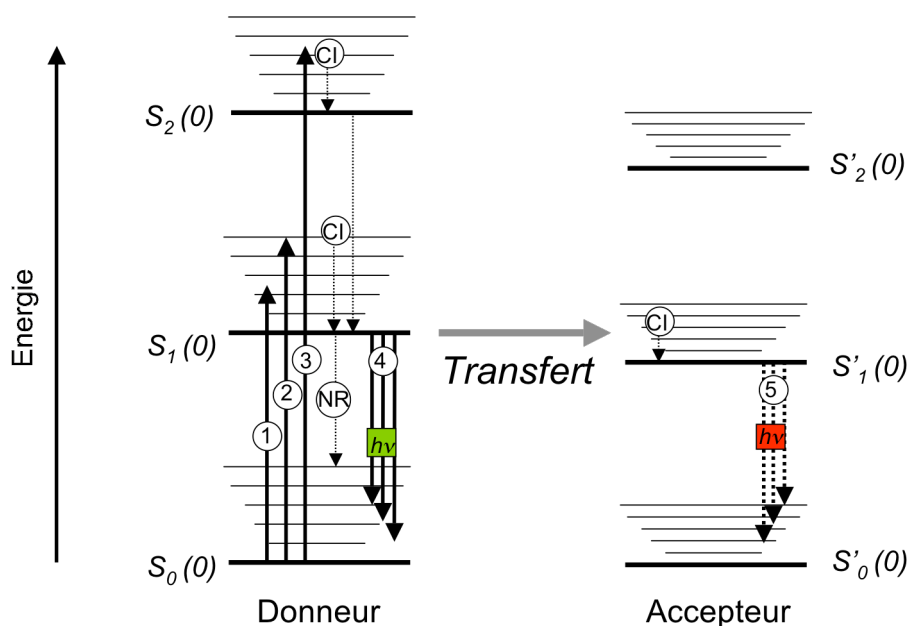


Figure 50 : Diagrammes de Jablonski modifié : Transfert d'énergie d'excitation par résonance

Seuls les états singulets des 2 molécules, donneur et accepteur sont représentés. (1-3) Le donneur absorbe un photon (Figure 48). Une fois parvenu à l'état $S_1(0)$, le donneur peut revenir à l'état fondamental en émettant un photon de fluorescence (4) ou par désexcitation non radiative (NR) ou bien transférer son énergie à un accepteur proche, qui peut à son tour émettre un photon de fluorescence (5). Le phénomène de transfert résulte d'un couplage direct entre le dipôle d'émission du donneur et le dipôle d'absorption de l'accepteur.

L'efficacité de transfert E dépend de la distance entre les fluorophores R , selon la relation :

$$(10) \quad E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6},$$

avec R_0 la distance critique de Förster définie comme étant la distance entre les 2 fluorophores où l'efficacité de transfert est égale à 0,5. Cette distance, spécifique à chaque couple de fluorophores, dépend notamment de l'intégrale de recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.

2.3.3 Étude des interactions acides nucléiques / ligands par fluorescence

2.3.3.1 Principe

La fluorescence intrinsèque des acides nucléiques est difficilement exploitable étant donné leurs faibles rendements quantiques (rapport des photons émis par rapport à ceux qui sont absorbés), de 10^{-4} à 10^{-5} (à l'exception de certaines bases modifiées présentes dans les ARNt).

En ce qui concerne les propriétés de fluorescence des ligands, certaines des molécules polyaromatiques ont des rendements de fluorescence satisfaisants quand elles sont libres en

solutions aqueuses. Une interaction avec des acides nucléiques se traduit souvent par une extinction de leur fluorescence (“quenching”). Il est alors possible de caractériser l’interaction en déterminant la stœchiométrie et éventuellement la constante de dissociation, si celle-ci est supérieure à la concentration de la molécule étudiée au cours de l’expérience. Quelques précautions sont néanmoins nécessaires pour limiter l’effet d’écran et respecter l’équation (9). Il faut notamment garder en mémoire qu’un effet d’écran important peut être causé par l’absorbance des bases nucléotidiques à des longueurs d’onde d’excitation inférieures à 290 nm.

Dans de plus rares occasions, les molécules ont un faible rendement quantique de fluorescence lorsqu’elles sont libres en solution, et leur fluorescence est exaltée lorsqu’elles sont liées à des acides nucléiques. Plus intéressantes pour des applications de détection de l’ADN en gels d’électrophorèse ou en microscopie optique, elles permettent de la même façon de déterminer les paramètres comme la stœchiométrie ou l’affinité.

Un modèle de fixation de ligand à n sites équivalents est présenté en Annexe II, et peut permettre dans certains cas la détermination du K_d .

2.3.3.2 Mesure et traitement du signal

Nous déterminons dans un premier temps la longueur d’onde d’excitation. Il s’agit, en général, de la longueur d’onde où l’absorption de la molécule est maximale, en dehors de la zone d’absorbance de l’ADN afin de respecter les conditions de solution diluée ($A_{\lambda_{\max}} < 0,05$), et qui permet, quand c’est possible, une bonne séparation avec le signal Raman de l’eau ($\nu_{\text{O-H}} = 3300 \text{ cm}^{-1}$) qui peut-être calculé selon l’équation :

$$(11) \quad \frac{1}{\lambda_{RA}} = \frac{1}{\lambda_{ex}} - 0,00033 \text{ (en nm}^{-1}\text{)}$$

Classiquement pour des ligands étudiés, en excitant à la longueur d’onde λ_{ex} , le spectre d’émission de la molécule est enregistré entre $\lambda_{ex} + 10$ à 20 nm, pour éviter d’enregistrer la lumière diffusée par l’excitation, et $\lambda_{ex} + 200$ ou 300 nm (en fonction de la forme du spectre de la molécule), en faisant attention aux diffusions secondaires dues au réseau. Les paramètres de balayages sont: un pas de 1 nm, une intégration du signal de 0,2 à 1 s/nm, en fonction du rapport signal sur bruit désiré, et des fentes correspondant une largeur de bande de 5 nm à l’excitation et à l’émission.

2.3.4 Expérience de dénaturation thermique suivi par Transfert d'Energie d'Excitation par Résonance (FRET).

2.3.4.1 Principe

L'oligonucléotide F21T (5'- GGG(TTAGGG)₃ -3'), mimant la séquence télomérique humaine, est couplé à ses extrémités à deux fluorophores : la 6-carboxyfluorescéine FAM en 5' (F ou Fluo) et la tétraméthylrhodamine en 3' (T ou Tamra). La formation par cet oligonucléotide d'un quadruplexe de guanines intramoléculaire est suivie par fluorescence grâce aux fluorophores. En effet, lorsque l'oligonucléotide est sous sa forme structurée (à basse température) il peut y avoir un transfert d'énergie d'excitation par résonance du "donneur" (la fluorescéine) vers l' "accepteur" (la tétraméthylrhodamine) (Figure 51). Une extinction de la fluorescence du donneur sera observée dans ce cas précis. En revanche, si l'oligonucléotide est sous sa forme dépliée (à haute température), il n'y aura pas ou peu de transfert car les fluorophores sont trop éloignés l'un de l'autre (Distance de Förster entre FAM et TAMRA : $R_0 = 3,5 - 5$ nm). Cela se traduit donc par une extinction presque totale de l'émission sensibilisée de la tétraméthylrhodamine et une augmentation de celle de la fluorescéine. La distance entre le donneur et l'accepteur doit être suffisamment importante pour qu'il n'y ait pas de transfert lorsque l'oligonucléotide est déplié. En enregistrant la fluorescence du donneur (l'augmentation de l'intensité de fluorescence dans ce cas précis), il est possible de mesurer la température de demi-dissociation de l'oligonucléotide en présence ou en absence de ligands de quadruplexes de guanines. Les expériences étaient initialement réalisées sur les fluorimètres SPEX ou FluoroMax-3; l'émission de fluorescence était alors suivie à 520 nm pour la fluorescéine et à 588 nm pour la tétraméthylrhodamine en excitant à 470 nm [314]. Les expériences de dénaturation thermique étaient réalisées entre 20 et 85°C (gradient 1°C.min⁻¹), dans des cuves de quartz de volume 600 µl contenant : l'oligonucléotide F21T (0,2 µM) et le ligand (1 µM) dans un tampon cacodylate de sodium à pH 7,2 (10 mM) et LiCl (0,1 M). L'utilisation de la machine à PCR quantitative Mx3000P a permis de nettement diminuer les quantités de matériels utilisés et d'augmenter le nombre de conditions testées. La méthode est détaillée dans l'article 1 présenté dans la 1^{ère} partie expérimentale de ce manuscrit. Brièvement, les expériences de dénaturation thermique sont réalisées entre 25 et 95°C (gradient 1°C.min⁻¹), dans un volume final de 25 µl contenant l'oligonucléotide F21T (0,2 µM) et le ligand à diverses concentrations dans un tampon cacodylate de lithium à pH 7,2 (10 mM) et NaCl (100 mM) ou KCl (10 mM) et LiCl (90 mM).

Un autre oligonucléotide F21D a été également utilisé dans quelques expériences. Cet oligonucléotide est couplé à la 6-carboxyfluorescéine en 5' et au dabcyI en 3'. Le dabcyI ne fluoresce pas mais quenche la fluorescence du donneur. Lorsque l'oligonucléotide est structuré nous observons une diminution de la fluorescence ("quenching") de la fluorescéine. Lors de la

dénaturation thermique avec ou sans ligand, nous suivons l'augmentation de fluorescence du donneur.

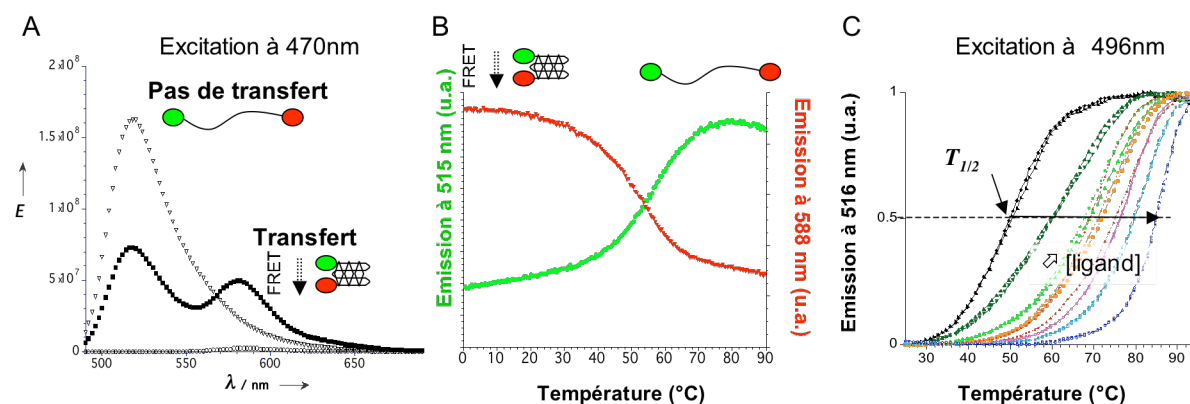


Figure 51 : Schéma pour la dénaturation thermique de G-quadruplexe suivie par “FRET”

(A) Spectres de fluorescence de l'oligonucléotide F21T ($\lambda_{ex} = 470$ nm) sous sa forme déstructurée à haute température (fluorescence du donneur la FAM à 515 nm) et sous sa forme G-quadruplexe à basse température (apparition de la fluorescence sensibilisée de l'accepteur la TAMRA à 588 nm). (B) Dénaturation thermique du G-quadruplexe formé par l'oligonucléotide F21T suivie en fluorescence ($\lambda_{ex} = 470$ nm) (fluorimètre SPEX) aux longueurs d'onde respectives du donneur (515 nm) et de l'accepteur (588 nm). (C) Dénaturation thermique du G-quadruplexe formé par l'oligonucléotide F21T suivie en fluorescence ($\lambda_{ex} = 496$ nm) (Machine Q-PCR Mx3000P) à la longueur d'onde du donneur (516 nm) en absence (courbe noire) et en présence de concentrations croissantes d'un ligand de G-quadruplexe (courbes vertes à bleues).

2.3.4.2 Traitement des données

Les intensités de fluorescence obtenues au cours de la dénaturation thermique sont ensuite normalisées entre 0 et 1. Il est ensuite aisé de superposer les différentes courbes de dénaturation thermique, d'évaluer le $T_{1/2}$, correspondant à la température pour laquelle l'intensité de fluorescence normalisée est égale à 0,5, et de déterminer le degré de stabilisation du quadruplexe par les ligands. Cette méthode de détermination de la $T_{1/2}$ permet un traitement rapide, et facilement automatisable des données, par le logiciel Excel par exemple. Néanmoins elle ne représente pas rigoureusement la T_m de la structure, celle-ci devant être calculée à partir des lignes de bases respectives des courbes de dénaturation thermiques [27, 330]. Il est également important d'examiner les données brutes afin d'éviter certaines normalisations abusives.

3 La dialyse à l'équilibre

La dialyse à l'équilibre est une technique permettant l'étude de l'interaction d'une molécule vis-à-vis de différentes conformations d'acides nucléiques [265, 368]. Elle permet

d'analyser la fixation d'un ligand sur 19 acides nucléiques de structure distincte. L'ensemble de ces structures comprend des simple-brins, des duplexes, des triplexes, des quadruplexes de guanines et de cytosines.

3.1 Principe

Les solutions d'acides nucléiques sont placées dans des chambres de dialyse munies d'une membrane semi-perméable permettant le passage de petites molécules (ligands) et bloquant les macromolécules (oligo- et polynucléotides). Nous utilisons des membranes de dialyse ne permettant que le passage de molécules inférieures à 3500 Da. Les chambres sont disposées sur un portoir adéquat dans un bécher contenant la molécule à tester dans un tampon. À l'équilibre, la quantité de ligand devrait être égale à l'intérieur et à l'extérieur de la chambre de dialyse. La quantité en excès à l'intérieur des chambres est alors attribuée à la fixation sur les acides nucléiques. Le volume de tampon contenant le ligand doit être largement plus important que le volume d'acides nucléiques afin de garder la concentration en ligand libre relativement constante. Nous évaluons la quantité de ligand fixé sur 19 acides nucléiques de structures différentes. À l'équilibre, le ligand s'est accumulé dans la chambre de dialyse qui contient l'acide nucléique pour lequel il a le plus d'affinité.

La liste des différents acides nucléiques utilisés est indiquée dans la Table 9. Tous les polynucléotides sont commerciaux et obtenus par Amersham-Pharmacia. Les triplex TC, GA et GT résultent de l'association de deux brins de différentes longueurs

3.2 Protocole expérimental

Les chambres de dialyse (Pierce) sont préparées après avoir préalablement hydraté les membranes de dialyse dans de l'eau bidistillée. Afin de vérifier si les chambres sont conçues correctement, elles sont remplies avec 200 μ l d'eau bidistillée et soumises à une agitation durant une nuit. Les chambres présentant un volume différant largement des 200 μ l introduits initialement sont alors écartées. L'eau bidistillée est ensuite remplacée par 200 μ l d'oligonucléotides à 75 μ M en motif (base, doublet de base, triplet et quadruplet de base) dans le tampon Dialyse (0,185 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 15 mM cacodylate de sodium pH 6.5). Les chambres sont plongées dans 400 ml de tampon Dialyse contenant la molécule à tester à 1 μ M. Les béchers sont alors recouverts de parafilm et d'aluminium pour éviter respectivement l'évaporation du tampon et la photodégradation des composés testés.

À la fin de la période d'équilibre (24 à 48h), 160 μ l des 19 solutions d'acides nucléiques, de la chambre de dialyse contrôle et du bécher sont transférés dans de nouveaux tubes.

<i>Numéro</i>	<i>Nom</i>	<i>Type et Longueur</i>	<i>Structure</i>	<i>Séquences</i>
1	Triplexe TC	Oligo (30+13)	Triplexe	 TT-CTTCTCTCCTCC-3' 5'-GAAAGAGAGGAGG-3' CC-CTTCTCTCCTCC-5'
2	Triplexe GA	Oligo (30+13)	Triplexe	 TT-GGAGGAGAGAAAG-3' CC-GGAGGAGAGAAAG-5' 5'-CCTCCTCTCTTC-3'
3	Triplexe GT	Oligo (30+13)	Triplexe	 TT-GGTGGTGTGTTTG-3' CC-GGAGGAGAGAAAG-5' 5'-CCTCCTCTCTTC-3'
4	(poly dA) 2 (poly dT)	Polynucléotide	Triplexe	
5	Duplexe GA	Oligo (24)	Duplexe parallèle	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA-3' 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA-3'
6	Duplexe PSD	Oligo (24+24)	Duplexe parallèle	5'-AAAAAAAAAATAATTTTAAATATT-3' 5'-TTTTTTTTTTTATTAATTTTATAA-3'
7	24CTG	Oligo (24)	Duplexe (?)	5'-CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG-3'
8	poly d(A-T)	Polynucléotide	Duplexe	
9	poly d(G-C)	Polynucléotide	Duplexe	
10	ADN de thymus de veau	Polynucléotide	Duplexe	
11	Duplexe DS26	Oligo (26)	Duplexe autocomplémentaire	5'-CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG-
12	poly dC	Polynucléotides	Motif-i	
13	22CT	Oligo (22)	Motif-i et/ou simple-brin	5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCT-3'
14	22AG	Oligo (22)	Quadruplexe de guanines intramoléculaire	5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'
15	24G20	Oligo (24)	Quadruplexe de guanines intermoléculaire	5'-TTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGTT-3'
16	poly dT	Polynucléotide	Simple-brin ADN	
17	poly dA	Polynucléotide	Simple-brin ADN	
18	poly rU	Polynucléotide	Simple-brin ARN	
19	poly rA	Polynucléotide	Simple-brin ARN	

Table 9 : Table des oligonucléotides utilisés dans la dialyse à l'équilibre [368].

Pour permettre la dissociation du ligand des acides nucléiques, 17 μ l de SDS 10 % sont ajoutés aux solutions pour atteindre une concentration finale de 1%. La dissociation des complexes ligand-acides nucléiques par le SDS semble être un phénomène très rapide (millisecondes à la seconde) et totale après 5 minutes. Si l'interaction ligand-acides nucléiques semble être trop forte, il est également possible de chauffer les tubes à 65 °C pendant quelques minutes.

Les 21 échantillons sont dosés spectrophotométriquement par absorbance et fluorescence suivant les propriétés spectrales des composés utilisés. L'utilisation de cuves de fluorescence en quartz (Hellma, France) permettant l'analyse de petits volumes (150 μ l pour un parcours optique de 2 mm) est préconisée. Une étude spectroscopique préliminaire doit assurer que les molécules testées absorbent la lumière au-delà de 320 nm. En effet, l'absorption très importante des acides nucléiques en dessous de 320 nm exclue totalement une mesure de la concentration du ligand par absorbance. D'autre part les propriétés fluorescentes des molécules doivent également répondre à certains critères :

- Étant données les fortes concentrations en ADN dans les échantillons au moment de la mesure de fluorescence, il n'est pas envisageable d'exciter la molécule à une longueur d'onde inférieure à 300 nm ; celle-ci entraînerait un effet d'écran trop important et une non-proportionnalité entre l'intensité du signal de fluorescence et la concentration de ligand libre en solution.
- Les molécules libres doivent avoir une fluorescence suffisante à 1 μ M en présence de 1 % de SDS.

En respectant ces conditions, le signal obtenu par fluorescence (intégration du signal d'émission) ou absorbance (à une longueur d'onde) est directement proportionnel à la concentration. Nous évaluons donc la quantité de ligand fixé de la manière suivante :

$$C_{lié} = C_{tube} - C_{bêcher} \quad \text{ce qui équivaut à} \quad C_{lié} = \frac{A_{tube} - A_{bêcher}}{\epsilon l} \quad \text{ou} \quad C_{lié} = \frac{I_{F,tube} - I_{F,bêcher}}{\epsilon I_0 \phi_F}$$

On considère que la concentration de ligand dans le b cher ne varie pas (1 μ M), il est donc possible de déterminer $C_{lié}$ en normalisation par $C_{b cher}$. Ceci permet notamment de

$$\text{s'affranchissant de la détermination de } \epsilon \text{ ou } \epsilon I_0 \phi_F. \quad C_{lié} = \left(\frac{A/I_{F,tube}}{A/I_{F,b cher}} - 1 \right) \times C_{b cher}$$

Les valeurs obtenues de $C_{lié}$ de chaque échantillon sont représentées sous la forme d'un histogramme permettant directement de comparer la fixation sur les différents acides nucléiques. Une normalisation entre 0 et 1 des quantités fixées peut être utile pour comparer les profils de dialyse entre eux.

La méthode présente un certain nombre de limites :

- Elle consomme une quantité importante d'acides nucléiques et de ligand.

- Elle ne s'applique qu'aux ligands ayant des propriétés spectrales exploitables.
- Les résultats obtenus sont, de manière générale, assez peu reproductibles, en raison de possibles défauts des boutons de dialyses (fuites), de l'adsorption possible des composés sur les membranes de dialyse ou de leur possible agrégation avec les acides nucléiques et dégradation au cours de la période d'équilibration.
- La quantité de ligand fixé sur chaque structure est dépendante de la définition du motif qui a été faite au départ. Or celle-ci est très subjective puisque la plupart du temps, le nombre de sites de fixation du ligand sur la structure est inconnu. En théorie, à l'équilibre, la concentration de ligand libre est égale dans le bécher et dans les tubes, et la concentration dans le bécher ne varie pas. D'après la loi d'action de masse, la concentration de ligand fixé doit donc être proportionnelle à la concentration en sites de fixation introduits au départ. Cette propriété permet donc, en théorie, d'interpréter les résultats en s'affranchissant de la définition des motifs faite au départ. Pourtant, en pratique, une telle proportionnalité n'est pas toujours observée, suggérant que l'équilibre n'est pas toujours atteint ou que la concentration de ligand libre dans le bécher n'est pas constante au cours de l'expérience.
- Les boutons de dialyse étant relativement étroits, la période d'équilibration doit être suffisamment longue pour permettre la diffusion des espèces et l'homogénéisation à l'intérieur du tube. D'après mon expérience, un temps de 24h d'équilibration n'est pas suffisant pour que la quantité de ligand dans le bécher et dans un tube sans acide nucléique soit identique. Néanmoins, en attendant plus longtemps, les risques de dégradations sont également plus importants. Ces inconvénients seraient résolus par un nouveau type de montage réalisé par J.B. Chaires (communication personnelle) qui améliore le rapport (surface de membrane / volume) et permet de tester en parallèle un grand nombre d'échantillons (d'où la possibilité de tester la reproductibilité).

4 Analyse et purification des acides nucléiques

4.1 Radiomarquage des acides nucléiques

4.1.1 Marquage en position 5'

Les oligonucléotides (20 pmol) avec une extrémité 5'-OH libre sont marqués par 10 unités de T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs (NEB)) dans le tampon suivant : 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothréitol, pH 7,6 en présence de 10 μ Ci de γ -³²P-ATP (3000Ci/mmol) (Amersham Biosciences). Dans le cas d'extrémités 5' phosphorylées (cas de

marqueurs de taille double brins), le tampon de réaction est le suivant : 50 mM Imidazole-HCl (pH 6,4), 12 mM MgCl_2 , 70 μM ADP et 1 mM 2-mercaptoéthanol ("Exchange Buffer", Gibco). Dans les deux conditions, l'incubation a lieu à 37°C pendant trente à quarante minutes. L'ATP non incorporé et l'enzyme sont éliminés après passage sur une mini-colonne d'exclusion pendant 4 minutes à 1000 g (Biospin SP6, Biorad). Dans le cas d'oligonucléotides courts (<10 nucléotides), la purification est réalisée par migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (cf. : § VII.4.2.3.3).

4.1.2 Marquage en position 3'

Les oligonucléotides (20 pmol) avec une extrémité 3'-OH sont marqués par 20 unités de Terminal Transférase (TdT) (New England Biolabs) dans le tampon suivant : 20 mM Tris-acétate, 50 mM acétate de potassium, 10 mM acétate de magnésium, 1 mM Dithiothréitol, pH 7,9 (tampon NEB 4), en présence de 250 μM de CoCl_2 et de 10 μCi de $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -ddATP ou $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dNTP (3000Ci/mmol) (Amersham Biosciences) selon l'application. L'incubation a lieu à 37°C pendant quarante minutes. Les nucléotides radiomarqués non incorporés ainsi que l'enzyme sont éliminés après passage sur une mini-colonne d'exclusion 4 minutes à 1000 g (Biospin SP6 Biorad).

4.2 *Électrophorèse gels de polyacrylamide*

4.2.1 Conditions dénaturantes

Les oligonucléotides ou les produits d'une réaction enzymatique sur un acide nucléique peuvent être analysés par radiomarquage en 3' ou 5' au ^{32}P (cf. : § VII.4.1), par incorporation de nucléotides radiomarqués ou par "UV-shadow" sur gel de polyacrylamide 15 ou 20 % (acrylamide : bisacrylamide (19 :1)) en conditions dénaturantes (urée 7M, TBE 1X) dans un tampon TBE 1X. Une fois polymérisé par 0,1% de TEMED (N, N, N', N'-Tetraméthyléthylènediamine) et 0,1% d'ammonium persulfate, une migration du gel (7 Watts / cm^2) sans échantillon est effectuée afin d'atteindre une température de 50 à 60°C. Les échantillons sont ensuite dilués dans un tampon de charge dénaturant contenant 90% de formamide (50% de formamide final au minimum) et pouvant contenir 0,02% de xylène-cyanol et 0,02% de bleu de bromophénol. L'ajout des bleus pour le contrôle de la migration n'est pas recommandé dans le cas d'une détection par "UV-shadow", ceux-ci pouvant masquer la bande d'ADN à analyser. Les échantillons sont dénaturés 3 minutes à 90°C dans un bain à sec. Ils sont ensuite déposés sur gel : environ 2 μg d'ADN par puits pour une visualisation par "UV shadow" et 0,5-1 pmol pour une détection après un radiomarquage classique (0,5 μCi /pmol d'ADN).

4.2.2 Conditions natives

L'électrophorèse de gels de polyacrylamide en conditions natives permet d'observer d'éventuelles structures particulières d'acides nucléiques. En effet, des conditions de température et de sels contrôlées permettent de conserver certaines structures intra- ou intermoléculaires ou certaines interactions avec des ligands ou des protéines. Ces espèces migrent dans le gel en fonction de leur taille et de leur charge apparentes.

Pour la visualisation de G-quadruplexes tétramoléculaires, nous avons utilisé des gels de polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide (19 : 1)) à 20 %, contenant 20 mM de NaCl ou de KCl et du TBE 1X. Après incubation des oligonucléotides monomères à 4°C dans un tampon 10 mM cacodylate de lithium pH 7,2 et 110 mM de NaCl ou de KCl, 10 % de sucrose est ajouté pour permettre de charger les échantillons sur le gel. La migration des gels est effectuée dans du TBE 1X supplémenté de 20 mM en NaCl ou KCl, en chambre froide à 3W / gel, soit environ 120 V, pour une température maximale des gels de 13°C en fin de migration (2h30). Ces conditions permettent de préserver les structures formées à basse température et de minimiser la dénaturation au cours de la migration. Après migration les gels sont transférés sur du film plastique épais dans le cas d'une détection par "UV shadow" ou sur du papier Whatman 3MM, suivi d'une exposition contre un écran radiosensible dans le cas d'une détection radioactive.

4.2.3 Modes de détection

4.2.3.1 Détection radioactive

Après migration, si les échantillons sont radiomarqués, les gels d'acrylamide sont transférés puis séchés sur du papier Whatman 3MM avant d'être exposés contre un écran radiosensible à base de cristaux de BaFBr :Eu²⁺ dans une matrice organique (Molecular Dynamics ou Amersham Biosciences). Ces écrans permettent la conversion des électrons émis par le rayonnement β^- du ³²P en photons. En effet, quand l'écran est exposé contre un gel radioactif, la radiation excite Eu²⁺, et induit son oxydation en Eu³⁺ ainsi que la réduction de BaFBr en BaFBr⁻. L'écran est ensuite numérisé à l'aide d'un PhosphorImager (Molecular Dynamics) ou d'un Typhoon (Amersham Biosciences). L'instrument détecte l'émission des photons à 390 nm après une excitation à 633 nm qui induit la réduction et la désexcitation des cristaux d'euporium. L'image générée est analysée à l'aide du logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

4.2.3.2 Détection par “UV-shadow”

Dans le cas d’une visualisation de l’ADN par “UV-shadow”, le gel est transféré sur un film plastique épais. L’ADN est visualisé à 254 nm par l’“ombre” - causée par son absorbance dans l’UV - sur une plaque de silice fluorescente (pour CCM, Whatman). L’image d’épifluorescence générée par caméra numérique (Bioprint) peut ensuite être analysée par le logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). La quantification reste néanmoins semi-quantitative. En effet, l’image obtenue par cette caméra possède une dynamique limitée (8 bits / pixel) et l’illumination hétérogène de la plaque de silice par une lampe UV engendre un bruit de fond qu’il est assez subjectif d’éliminer.

4.2.3.3 Détection par fluorescence

Dans le cas d’acides nucléiques conjugués à des molécules fluorescentes, il est possible de les détecter en utilisant les propriétés d’excitation et d’émission des chromophores. Pour des acides nucléiques non marqués, il est également possible de “colorer” le gel après migration, avec un bain de tampon contenant une molécule qui fluoresce davantage lorsqu’elle est liée à l’ADN (par exemple le bromure d’éthidium ou le SyBR green ou gold (Molecular Probes)). La visualisation peut alors se faire par transillumination dans l’UV (cas du bromure d’éthidium) et capture par caméra numérique ou à l’aide d’un Typhoon (Amersham Biosciences). Ce dernier est muni de quatre lasers permettant une excitation des molécules à 457, 488, 532 et 633 nm et possède un ensemble de filtres permettant de numériser spécifiquement les molécules étudiées.

Le problème de ces méthodes de révélation est de s’assurer que l’intensité des bandes reflète fidèlement l’abondance relative des espèces, ce qui revient à montrer que les différentes structures sont colorées de manière similaire. En particulier, nous n’avons pas trouvé de colorant permettant de révéler de façon identique de courtes séquences d’ADN du type d(TG_nT) (n=3-5), sous leur forme simple brin ou G-quadruplexe tétramoléculaire. Le signal obtenu sur le simple brin était souvent inexistant, ce qui empêchait toute quantification pour la détermination des cinétiques d’association (cf. : Chapitre I).

4.3 Purification d’oligonucléotides sur gels de polyacrylamide

Les oligonucléotides peuvent être purifiés par “UV-shadow” ou radiomarquage. Les oligonucléotides radiomarqués ou non sont déposés, selon leur taille, sur un gel de polyacrylamide 15 ou 20 % (acrylamide : bisacrylamide (19 :1)) en conditions dénaturantes (urée 7M, TBE 1X). Après migration, une bande majoritaire d’ADN est révélée, dans le cas d’oligonucléotides non radiomarqués, par “UV-shadow” comme décrit précédemment, ou, dans le cas d’un

radiomarquage, par exposition courte contre un écran radiosensible, numérisation et impression en taille réelle de l'image générée.

La bande correspondant à l'ADN désiré est ensuite découpée, broyée et éluée dans de l'eau bidistillée (à 50°C pendant 5 minutes à trois reprises, ou pendant 16 heures à 4°C suivi de 2 fois 5 minutes à température ambiante dans le cas d'oligonucléotides plus fragiles). L'éluât est ensuite déposé sur une colonne de purification Spin-X 0,22 µm (Costar) et centrifugé. Les oligonucléotides sont mis en présence de 0,3 M d'acétate de sodium (ou 2,5 M d'acétate d'ammonium), précipités par au moins 3 volumes d'éthanol, incubés 5 à 10 minutes à -80°C et centrifugés 20 minutes à 14000 g à 4°C. Ils sont enfin resuspendus dans de l'eau bidistillée et leur concentration est déterminée spectrophotométriquement comme décrit précédemment. L'utilisation de l'acétate d'ammonium pour la précipitation d'ADN est particulièrement intéressante pour l'étude des G-quadruplexes, car ces ions étant "volatiles", ils peuvent être éliminés par une ou deux étapes de lyophilisation supplémentaires, après reprise dans l'eau bidistillée. La précipitation à l'acétate d'ammonium reste néanmoins généralement moins efficace que la précipitation à l'acétate de sodium.

5 Tests d'activité télomérase

5.1 Le TRAP : "Telomeric Repeat Amplification Protocol"

5.1.1 Sur cellules Humaines

5.1.1.1 Préparation des extraits protéiques (extraits CHAPS).

Les extraits protéiques ont été préparés à partir de cellules A431 ou HEK 293T "supertélomérases". Les cellules sontensemencées dans des flasques de culture T150 afin d'obtenir une quantité importante d'extraits. Avant d'atteindre la confluence, les cellules sont trypsinées pour les décrocher de leur support. Elles sont ensuite disposées dans des tubes de 15 ml puis centrifugées 5 min à 1000 g. Le culot cellulaire, typiquement $20 \cdot 10^6$ cellules, est ensuite lavé dans du PBS et centrifugé à nouveau (5 min à 1000 g). Les cellules sont resuspendues dans un tampon froid de lavage contenant 10 mM HEPES-KOH pH 7,5, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl et 1 mM DTT, puis à nouveau centrifugées (5 min à 1000 g). Les cellules sont enfin lysées sur la glace pendant 30 minutes dans un tampon CHAPS contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM β -mercaptoéthanol, 0.5 % CHAPS, 10% glycérol et 1X de cocktail d'inhibiteur de protéases sans EDTA (Roche) (10^6 cellules / 20µl de tampon CHAPS). Les extraits sont ensuite centrifugés à 14000 g pendant 30 minutes à 4° C. Les surnageants sont aliquotés (20µl) dans des tubes préalablement disposés dans la glace puis placés à -80° C. La

quantité de protéines totales extraites est évaluée en plaque de 96 puits (triplicatas) par spectrophotocolorimétrie à 595 nm, à l'aide d'un Victor 2 (Wallac), en utilisant un réactif de Bradford (Bio-Rad) et par comparaison à une gamme étalon de BSA.

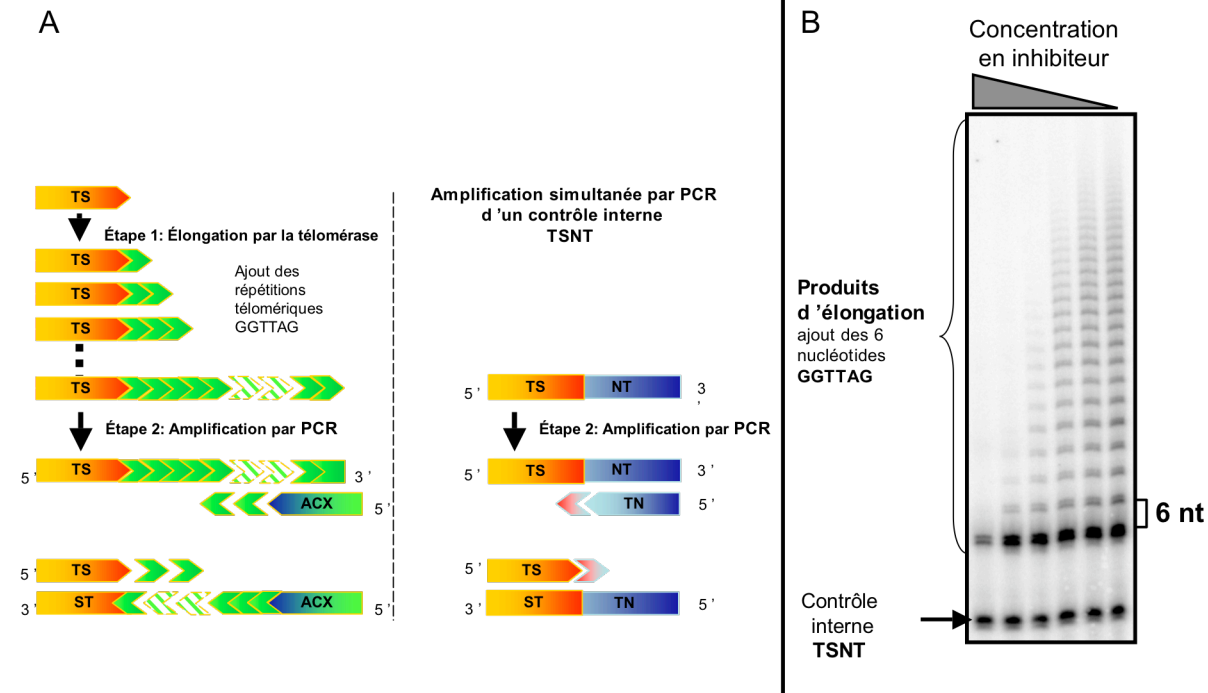
5.1.1.2 Test TRAP

L'activité télomérase peut être déterminée par ce test. Un oligonucléotide TS (0,4 μ M) (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') (18 mère) sert de substrat pour la télomérase en rajoutant le motif télomérique GTTAGG n fois. Les produits d'élongation sont ensuite amplifiés par PCR par les amorces ACX (0,4 μ M) (5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC -3') et TS (qui est en excès). Afin de contrôler le bon déroulement de la PCR et l'inhibition non spécifique des ligands sur la Taq polymérase ou sur un duplexe canonique d'ADN, un oligonucléotide TSNT (20 fM) (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3') (36 mère) est amplifié par deux oligonucléotides TS (déjà présent) et TN (0,4 μ M) (5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3') (18 mère).

La réaction est réalisée dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA, 50 μ M dNTP (sauf dCTP), 5 μ M dCTP, 0,1 mg / ml BSA, 2 unités de Taq DNA polymérase (Proméga ou NEB), 1 μ Ci α - 32 P-dCTP (3000 Ci / mmol). Chaque tube contient 200 ng d'extraits protéiques (pour les cellules A431, soit environ 10000 cellules) contenant la télomérase. L'étape d'élongation de TS pendant 15 minutes à 30° C précède l'amplification par 28 cycles de PCR (30 s à 94°C, 30 s à 50°C, 1 min 30 s à 72°C).

Pour déterminer une inhibition en présence de molécules, 5 ou 10 μ l de solution de ligand à différentes concentrations (5 ou 10 X) sont ajoutés au milieu réactionnel pour atteindre la concentration finale désirée.

Les produits d'amplification sont ensuite déposés sur gels dénaturants 7,5 % (TBE 1X, 7M Urée). Les gels sont séchés puis exposés durant une nuit contre un écran radiosensible. La révélation des gels s'effectue à l'aide d'un Typhoon (Amersham Biosciences).



10% de glycérol ($1-2.10^6$ parasites / μ l de tampon). Les extraits sont ensuite centrifugés à 14000 g pendant 30 minutes à 4° C. Les surnageants, correspondant aux extraits dits “cytoplasmiques”, sont aliquotés (20 μ l) dans des tubes préalablement disposés dans la glace puis placés à -80° C. Le reste des cellules est, en théorie, enrichi en noyaux, est soniqué sur glace (10 impulsions à puissance moyenne) dans un volume de tampon de lyse permettant d’atteindre également une concentration de $1-2.10^6$ parasites/ μ l pour les extraits dits “nucléaires”. Les extraits sont centrifugés à 14000 g pendant 30 minutes à 4° C. Les surnageants, correspondant aux extraits dits “nucléaires”, sont aliquotés (10 μ l) dans des tubes préalablement disposés dans la glace puis placés à -80° C. Les concentrations protéiques ne sont pas déterminées, celles-ci pouvant radicalement changer en fonction du cycle érythrocytaire du parasite, nous avons préféré déterminer l’activité télomérase en fonction de la concentration en parasites plutôt qu’en fonction de la concentration en protéines extraites.

5.1.2.2 Test Pf-TRAP

À partir du TRAP publié par Bottius E. *et al*, permettant de détecter l’activité télomérase chez *Plasmodium falciparum*, nous avons réalisé un certain nombre d’adaptations en nous inspirant de notre expérience du TRAP sur cellules humaines, avec notamment l’introduction du contrôle interne TSNT.

L’oligonucléotide TS (0,4 μ M) (5’-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3’) (18 mère) sert de substrat pour la télomérase de *Plasmodium falciparum* qui rajoute le motif télomérique YAGGGTT (Y= C ou T) (ou une permutation de ce motif) n fois. Les produits d’élongation sont ensuite amplifiés par PCR par les amorces PfACX (0,4 μ M) (5’-GGCGCGTTAACCCTTAACCCTTAACCCTTAACC -3’) et TS (qui est en excès). Afin de contrôler le bon déroulement de la PCR et l’inhibition non spécifique des ligands sur la Taq polymérase ou sur un duplexe canonique d’ADN, l’oligonucléotide TSNT (200 fM) (5’-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3’) (36 mère) est amplifié par les deux oligonucléotides TS (à nouveau) et TN (0,4 μ M) (5’-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3’) (18 mère). La réaction est réalisée dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA, 50 μ M dNTP (sauf dCTP), 5 μ M dCTP, 0,1 mg / ml BSA, 2 unités de Taq DNA polymérase (Proméga ou NEB), 1 μ Ci α - 32 P-dCTP (3000 Ci / mmol). Chaque tube contient 10^5 parasites issus des extraits dits “nucléaires” qui sont plus riches en activité télomérase. L’étape d’élongation de TS pendant 1h à 37° C précède l’amplification par 30 cycles de PCR (30 s à 94°C, 30 s à 50°C, 1 min 30 s à 72°C).

Pour déterminer une inhibition en présence de molécules, 5 ou 10 µl de solution de ligand à différentes concentrations (5 ou 10 X) sont ajoutés au milieu réactionnel pour atteindre la concentration finale désirée.

Les produits d'amplification sont ensuite déposés sur gels dénaturants 7,5 % (TBE 1X, 7M Urée). Les gels sont ensuite séchés puis exposés durant une nuit contre un écran radiosensible. La révélation des gels s'effectue à l'aide d'un Typhoon (Amersham Biosciences).

5.2 “Direct-Assay” : Test d’extension d’amorce par la télomérase

Ce test permet d'évaluer directement l'activité télomérase sans étape d'amplification par PCR. Ceci n'est possible qu'avec des extraits protéiques enrichis en activité télomérase soit par surexpression, soit par ultracentrifugation et fractionnement. Il n'a pas été possible d'appliquer cette technique à l'étude de la télomérase chez le parasite *Plasmodium falciparum* étant donné la faible activité des extraits obtenus.

Par cette méthode, les produits d'élongation sont directement visualisés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes grâce à l'incorporation de α -³²P-dGTP. Pour cette expérience, il est nécessaire de travailler avec des oligonucléotides particulièrement propres et, si nécessaire, purifiés sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

Les oligonucléotides Telo3R (TTAGGG)₃, Telo4R (TTAGGG)₄ ou TS (cf. : TRAP § VII.5.1) servent de substrat pour la réaction d'élongation par la télomérase. La réaction s'effectue à 30 °C pendant 45 minutes dans un volume de 20 µl, contenant 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM β-mercaptoéthanol, 1 mM spermidine, 35 nM d'oligonucléotide substrat pour la télomérase Telo3R, Telo4R ou TS, 20 µCi de α -³²P-dGTP (3000 Ci/mmol) et 2µM de dGTP (soit l'équivalent de 20 µCi de α -³²P-dGTP à 750 Ci/mmol), 40 µM de dATP et 80 µM de dTTP et 2 µg d'extraits protéiques. La télomérase provient d'extraits CHAPS de cellules HEK 293T, surexprimant transitoirement hTR et hTERT. Ces extraits ont été préparés dans le laboratoire de Joachim Lingner [230]. Les échantillons sont préparés sur la glace, et mis en présence de 2 µl des solutions de ligand concentrées 10 fois. Les extraits riches en télomérase sont stables plusieurs heures à 4°C. Après l'incubation à 30°C, les échantillons sont remis dans la glace pour arrêter la réaction, et l'ADN est précipité, sans autre purification, par 10 µl d'Acétate d'ammonium 7,5 M et 1 µl de glycogène à 20 mg/ml. On ajoute à cette solution une faible quantité (typiquement 0,2 pmol) d'un oligonucléotide radiomarké (en 5' ou en 3') comme dT₁₂ pour avoir un contrôle interne de précipitation et de charge sur le gel. Après avoir bien agité les échantillons, 120 µl d'éthanol absolu froid sont ajoutés ; les tubes sont à nouveau vortexés, éventuellement incubés à -20°C une nuit, puis centrifugés à vitesse maximale (20000 g) pendant

15 min. Les culots obtenus sont lavés à l'éthanol 70 % une fois, re-centrifugés 15 minutes à la vitesse maximale. Une fois séchés, les culots sont repris avec 1 μ l d'oligonucléotide formant un G-quadruplexe pu27Myc (5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3') à 200 μ M afin de compétitionner éventuellement le ligand restant lié aux produits d'élongation générés par la télomérase. Enfin 10 μ l de tampon de charge dénaturant contenant 90 % formamide, 0,02 % de xylène-cyanol et 0,02 % de bleu de bromophénol sont ajoutés et après 2 min de dénaturation à 90°C, 5 μ l des échantillons sont enfin chargés sur un gel dénaturant 12 % (TBE 1X, 7 M Urée) dans un tampon TBE 1X qui aura préalablement été préchauffé à 40-50°C. La migration est réalisée à 70 W pendant 1h45. Les gels sont ensuite fixés pendant 5 minutes dans un bain d'acide acétique à 10 % pour limiter le bruit de fond pouvant gêner la quantification des produits d'élongation engendrés par la télomérase.

Les gels sont ensuite séchés puis exposés contre un écran radiosensible durant 1 à 6 jours. La révélation des gels s'effectue à l'aide d'un Typhoon (Amersham Biosciences).

5.3 “Telospot” : Test d'extension d'amorce par la télomérase et hybridation des produits d'élongation

Ce test s'apparente au test de “direct assay”. Utilisant des extraits supertélomérase, la réaction est réalisée sur Telo3R (TTAGGG)₃ sans radioélément. Les produits d'élongation sont ensuite déposés sur une membrane et visualisés par hybridation d'une sonde radiomarquée par l'incorporation de α -³²P-dCTP [231].

La réaction s'effectue à 30 °C pendant 45 minutes dans un volume de 20 μ l, contenant 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM spermidine, 35 nM d'oligonucléotide substrat pour la télomérase Telo3R 40 μ M de dGTP, 40 μ M de dATP et 80 μ M de dTTP et 2 μ g d'extraits protéiques. La télomérase provient d'extraits CHAPS de cellules HEK 293T, surexprimant transitoirement hTR et hTERT. Ces extraits ont été préparés dans le laboratoire de Joachim Lingner [230]. Les échantillons sont préparés sur la glace, et mis en présence de 2 μ l des solutions de ligand concentrées 10 fois. Les extraits riches en télomérase sont stables plusieurs heures à 4°C. Après l'incubation à 30°C, les échantillons sont remis dans la glace et 2 μ l d'une solution contenant 0,5 % de bleu de bromophénol et 0,25 M d'EDTA sont ajoutés pour arrêter la réaction. 0,5 μ l d'échantillons sont déposés en triplicata sur une membrane GeneScreen Plus (PerkinElmer). La membrane est pontée sous UV, dénaturée dans une solution de NaOH (0,4 M) / NaCl (0,6 M) pendant 10 minutes, puis neutralisée dans une solution de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 / NaCl (0,6 M) et enfin lavée dans de l'eau bidistillée.

La membrane est ensuite préhybridée pendant 1 h à 65°C avec 10 ml de tampon de préhybridation GeneScreen contenant 10% de Dextran sodium sulfate, 1% de SDS et 1M de NaCl. La sonde est préparée par “random priming” (45 minutes à 25°C) à partir d’un fragment de plasmide contenant environ 300 bp de répétitions télomériques (pRST5 voir référence [185]) (75-100 ng), 50 ng d’oligonucléotide d(CCCAAT)₂, 100 µM de dNTP (A, T, G), 50 µCi de ³²P-α-dCTP (3000 Ci / mmol), 5 unités de Klenow (NEB) dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9 (volume final 50 µl). La sonde est ensuite supplémentée de 50 µl d’ADN de sperme de saumon à 10 mg/mL, diluée dans 900 µL d’eau bidistillée, et chauffée à 55°C pendant 10 minutes. Après 10 minutes de refroidissement sur glace, la sonde est ajoutée aux 10 mL de tampon de préhybridation GeneScreen à 65°C et l’hybridation est réalisée sur la nuit à 65°C. Le tampon contenant la sonde est éliminé, et la membrane est lavée 2 fois 5 minutes à température ambiante dans du 2X SSC, puis 2 fois 30 minutes à 60°C dans du 2X SSC, 1% SDS, puis 2 fois 30 minutes à température ambiante dans 0,1X SSC. La membrane est exposée contre un écran radiosensible durant 1 à 6 jours. La révélation des gels s’effectue à l’aide d’un Typhoon (Amersham Biosciences).

6 Analyse d’ADN génomique

6.1 Extraction d’ADN génomique

6.1.1 De cellules Humaines

Les cellules sont trypsinées puis lavées dans du PBS. Elles sont ensuite lysées (500µl / 10⁷ cellules) dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0,6% SDS et 100µg/ml de Protéinase K (Gibco) pendant une nuit à 48°C ou 2h à 56°C. Si la présence d’ARNs est gênante pour les expériences suivantes, une digestion à la RNase A (2µg/ml) peut être effectuée pendant 1h à 37°C dans le tampon d’extraction avant l’ajout de la protéinase K. L’ADN génomique est ensuite extrait avec 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24 :25 :1) (2 fois), 1 volume de chloroforme, puis précipité par 3 volumes d’éthanol et 0,3 M d’acétate de sodium. Après centrifugation, le culot est lavé à une fois à l’éthanol 70%. Le culot est ensuite repris dans du 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) et laissé à température ambiante (ou une nuit à 4°C) pour assurer une meilleure solubilisation. L’ADN génomique extrait est dosé spectrophotométriquement à 260 nm. On vérifie que les rapports d’absorbance à 260 / 280 nm et 260 / 270 nm sont supérieurs ou égaux à 1,8 et 1,2 respectivement, pour exclure les contaminations respectives par des protéines ou du phénol. Pour assurer une solution homogène d’ADN génomique la concentration doit généralement être inférieure à 1 µg/µl.

Les kits d'extraction Quiagen ont également été ponctuellement utilisés pour réaliser des extractions d'ADN génomique. Les rendements d'extractions sont généralement moins bons. Ce mode de purification permet néanmoins souvent une meilleure accessibilité de l'extrémité 3' télomérique ; l'ADN n'étant pas précipité mais passé sur une colonne d'affinité, il n'y a pas de remise en solution à effectuer.

6.1.2 De parasites *Plasmodium falciparum*

Les parasites de la souche FCB1 de *Plasmodium falciparum* sont cultivés dans des érythrocytes humains au sein de l'USM 504 du Muséum National d'Histoire Naturelle par Philippe Grellier. Les cellules parasitées sont lavées au PBS et centrifugées à 5000g pendant 5 minutes à 4°C (2 fois). Le surnageant éliminé, le culot de cellules est placé sur la glace pour éviter une activité DNase et 1 ml de saponine à 0,2% est ajouté. La saponine est un détergent qui rend la membrane des hématies perméables, celle du parasitophore étant plus résistante. Après homogénéisation, le surnageant devient rouge foncé en raison de la fuite de l'hémoglobine. Après 1 à 2 minutes d'activité de la saponine, du PBS froid est ajouté pour arrêter la réaction. Les parasites sont centrifugés à 14000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant éliminé, 4 à 5 lavages au PBS sont réalisés jusqu'à élimination totale de l'hémoglobine, qui est susceptible d'inhiber des réactions ultérieurement. L'extraction d'ADN est généralement réalisée immédiatement après avoir récolté les parasites surtout pour l'étude de l'extrémité 3' télomérique. Néanmoins une congélation à -20°C peut également être effectuée après le lavage des parasites si l'extraction ne peut avoir lieu immédiatement.

Le protocole d'extraction d'ADN génomique pour le parasite *Plasmodium falciparum* est dérivé du protocole de Blin (1976). Un volume de parasite (typiquement 10^8 parasites correspondent à un culot de 100 µl) est extrait par 10 volumes d'un tampon d'extraction contenant 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 0,5% SDS et 20 µg/ml de RNase A par homogénéisation sous agitation à 37°C pendant 1h. Après 1h de digestion, 20 µg/ml de RNase A sont ajoutés et la digestion à 37°C se poursuit pendant 1h. Les protéines et la RNase sont ensuite digérées par la protéinase K à 100 µg/ml pendant 2h30 à 50°C. L'ADN est purifié par 1 extraction phénolique volume à volume (Sigma, neutralisé par 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), suivie d'une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24 :25 :1) (Sigma, neutralisé par 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) et d'une extraction au chloroforme. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 0,2 volumes d'acétate d'ammonium à 7,5 M et de 2,5 volumes d'éthanol absolu, ce procédé permettant en théorie d'obtenir des fragments d'ADN d'au moins 100 à 150 kpb. Le culot obtenu est lavé par diffusion avec de l'éthanol à 70% pendant 5 minutes, centrifugé 5 minutes à

14000 g, séché à l'air puis repris dans 1 volume de TE (typiquement 50-100µl) une nuit à 4°C. L'ADN génomique extrait est dosé spectrophotométriquement à 260 nm. On vérifie que les rapports d'absorbance à 260 / 280 nm et 260 / 270 nm sont supérieurs ou égaux à 1,8 et 1,2 respectivement, pour exclure les contaminations respectives par des protéines ou du phénol. Pour assurer une solution homogène d'ADN génomique la concentration doit généralement être inférieure à 1 µg/µl.

6.2 Restriction des fragments télomériques (TRF): mesure de la longueur moyenne totale des télomères

6.2.1 Sur cellules humaines

L'ADN génomique (10 µg) est digéré par deux enzymes de restriction ne coupant pas au niveau des séquences télomériques, mais coupant fréquemment sur le reste de l'ADN génomique. La digestion est effectuée par 5U de Hinf I (NEB) et 5U de Rsa I (NEB) dans le tampon 2 NEB contenant 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothréitol, pH 7,9, pendant une nuit à 37°C dans un volume final de 30 µl. Il est possible également de digérer cet ADN par un second couple d'enzyme : Hae III et Alu I. Du glycérol est ajouté aux échantillons pour atteindre une concentration finale de 10%, et l'ADN est ensuite déposé sur un gel d'agarose à 0,8% contenant 625 ng/ml de bromure d'éthidium et du TBE 1X. La migration est effectuée dans le TBE 1X pendant plusieurs heures (minimum 6h) à 4V/cm de longueur de gel (80-100 V en moyenne). En général, un marqueur de taille ADN (1kb plus, Invitrogen) est radiomarké en 5' dans du tampon "Exchange" (cf. : § VII.4.1.1), et quelques µl sont déposés sur le gel afin de pouvoir identifier la taille des télomères après le "Southern Blot". Une photographie du gel sous irradiation UV à 254 nm (fluorescence du bromure d'éthidium intercalé) est réalisée avant d'effectuer le transfert pour vérifier la migration des marqueurs de taille ADN ainsi que la digestion des ADN et les quantités déposées sur le gel.

Le transfert de l'ADN sur membrane de nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences) est réalisé de manière classique : une dénaturation du gel d'agarose dans NaOH 0,4M (préparée *de novo* dans l'eau bidistillée) est réalisée pendant 30 minutes sous agitation puis le gel est déposé sur un pont de 2 papiers Whatman dont les extrémités sont immergées dans le tampon de transfert contenant 0,4M NaOH et 1,5M NaCl. Le transfert du gel vers la membrane est réalisé par capillarité dans le tampon de transfert pendant une nuit. La membrane est rincée dans du SSC 2X puis préhybridée dans du "Rapid Hybrid Buffer" (Amersham Biosciences) pendant 30 minutes à 42 °C.

La sonde pour l'hybridation est obtenue par combinaison de 4 radiomarquages en 5' par la T4 polynucléotide kinase et un total de 200 μCi de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ sur l'oligonucléotide complémentaire de la séquence télomérique 27 hm (5'-TAA(CCCTAA)₄-3') (4 x 20 pmol). L'hybridation est réalisée dans 10 mL de tampon d'hybridation pendant 4h à 42°C. La membrane est ensuite lavée par un lavage rapide au SSC 2X pour enlever l'excès de sonde, puis 2 lavages de 15 minutes à froid dans une solution contenant 0,1% SDS et 2X SSC, un lavage de 15 minutes à froid dans 0,1% SDS, 0,2X SSC et enfin quand c'est nécessaire un lavage à 40°C dans ce dernier tampon. La membrane est alors emballée dans un film "Saran" puis exposée contre un écran radiosensible et analysée à l'aide d'un Typhoon et du logiciel ImageQuant (Amersham Biosciences).

6.2.2 Sur les parasites *Plasmodium falciparum*

Le protocole est très similaire à celui qui est décrit ci-dessus pour les cellules humaines. L'ADN génomique (0,5-3 μg) est digéré par un cocktail de 4 enzymes de restriction, ne coupant pas au niveau des séquences télomériques, mais coupant fréquemment le reste de l'ADN génomique [341]. Il s'agit des enzymes Alu I (NEB), Rsa I (NEB), Dde I (NEB) et Mbo II (NEB) chacune à 5 U dans le tampon 2 NEB contenant 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM Dithiothréitol, pH 7,9, pendant une nuit à 37°C dans un volume final de 30 μl . La suite du protocole est identique exceptée l'utilisation de la sonde C-TolaPf (5'-TTGACCCTTGACCCTTGACCC-3').

6.3 Étude de l'extrémité 3' télomérique

Il est possible de détecter la présence (ou l'accessibilité) de l'extrémité 3' télomérique de l'ADN génomique extrait de cellules humaines [287, 369, 370] ou du parasite *Plasmodium falciparum* par hybridation d'un oligonucléotide complémentaire radiomarké (Figure 53). Il est alors nécessaire de rester au cours de l'extraction de l'ADN et de l'hybridation dans des conditions natives de température (<50°C) pour éviter l'ouverture possible de la double hélice d'ADN, et une hybridation sur des régions qui ne sont pas initialement en simple brin. Pour des raisons similaires, l'absence d'ARNs dans les préparations d'ADN génomique est nécessaire. Les protocoles expérimentaux présentés ci-après s'appliquent à l'ADN extrait de *Plasmodium falciparum*.

6.3.1 Hybridation du simple brin télomérique en solution

Un marquage en 5' de 20 pmol d'oligonucléotide brin C (C-TolaPf) ou du brin G (G-TolaPf) (voir séquences Table 7) est réalisé avec 80 μ Ci de γ -³²P-ATP dans un volume de 30 μ l (cf. Conditions :§ VII.4.1.1). Après purification sur colonne d'exclusion Spin 6 (Biorad), le volume est ajusté à 100 μ l.

L'hybridation de 3 μ g d'ADN génomique est réalisée sur une nuit à 50°C dans un volume de 20 μ l (incubation en machine PCR pour éviter l'évaporation), en présence de 3 μ l de brin C radiomarké (0,6 pmol), dans du tampon 2 de NEB contenant 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothréitol, pH 7,9. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel d'agarose 0,8% dans du TBE 1X, contenant du bromure d'éthidium. La migration est effectuée pendant 1h30-2h à 80V.

Le gel d'agarose est préalablement photographié sous transillumination UV à 254 nm avec une caméra numérique pour quantifier les quantités d'ADN déposées. Il est ensuite séché à froid 15 min, puis à 42°C pendant 30 min, entre 2 membranes de nylon (Hybond N+, Amersham Biosciences) et des papiers Whatman 3MM changés régulièrement, pour éviter les contaminations radioactives dues aux fuites d'oligonucléotide radiomarké hors du gel d'agarose. Le gel séché, entouré des membranes de nylon, est emballé dans du film plastique et exposé ainsi contre un écran radiosensible. Après 16h d'exposition, l'écran est numérisé sur le Typhoon (Amersham Biosciences). Les bandes peuvent être quantifiées sous ImageQuant.

6.3.2 "Telomeric oligonucleotide ligation assay" (T-OLA)

Ce protocole s'apparente à celui décrit ci-dessus, auquel s'ajoute une étape de ligation des oligonucléotides hybridés les un à côté des autres sans mésappariement. Cette méthode permet en théorie de mesurer la taille de l'extrémité 3' simple-brin (Figure 53B).

Un marquage en 5' de 20 pmol d'oligonucléotide brin C (C-TolaPf) ou du brin G (G-TolaPf) (voir séquences Table 7) est réalisé avec 80 μ Ci de γ -³²P-ATP dans un volume de 30 μ l pendant 40 min (cf. Conditions :§ VII.4.1.1). Une étape de phosphorylation supplémentaire, en ajoutant 1 μ l de rATP (0,1 M) et 1 μ l de T4 PNK (NEB) pendant 10 min à 37°C est nécessaire pour s'assurer que la totalité des oligonucléotides sont phosphorylés et pourront être ligués les uns aux autres. Nous avons noté que cette étape a pour conséquence une forte diminution de l'activité spécifique de la sonde, mettant en cause un échange possible des 5' phosphates radiomarkés. Après purification sur colonne d'exclusion Spin 6 (Biorad), le volume est ajusté à 100 μ l.

L'hybridation de 3 μ g d'ADN génomique est réalisé à 50°C dans un volume de 20 μ l (incubation en machine PCR pour éviter l'évaporation), en présence de 3 μ l de brin C

radiomarké (0,6 pmol), dans le tampon de la Taq DNA ligase (NEB) contenant 20 mM Tris-HCl, 25 mM KCH₃COO, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 10 mM Dithiothréitol, 1 mM de cofacteur NAD (β -Nicotinamide adénine dinucléotide), 0,1% Triton X-100, pH 7,6 à 25°C. Après 16 h d'incubation, la ligation est effectuée pendant 5h à 50°C par ajout de 0,5 μ L (20 unités) de Taq DNA ligase (NEB).

Les échantillons sont ensuite précipités par ajout de 80 μ l de NaCl 0,625 M (0,5 M final) et 200 μ L d'éthanol absolu froid, puis centrifugés 15 minutes à 14000 g. Les culots sont lavés 5 minutes sans agitation avec de l'éthanol 70%, puis centrifugés 5 minutes à 14000 g. Ils sont ensuite séchés à température ambiante 15 minutes ou 2 minute à 50°C, repris dans 10 μ l d'eau bidistillée et incubés à 50°C pendant 30 minutes pour permettre une bonne solubilisation de l'ADN génomique.

Les échantillons (2 μ l) sont ensuite chargés sur un petit gel d'agarose 0,8% dans le TBE 0,5X contenant du bromure d'éthidium pour vérifier les quantités d'ADN génomiques précipitées pour chaque échantillon, et voir l'hybridation des oligonucléotides ligués en condition native. La migration est effectuée pendant 30 minutes à 100V. En parallèle, 7 μ l d'échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide 5% en conditions dénaturantes (40 minutes de migration à 70W).

Le gel d'agarose est préalablement photographié sous transillumination UV à 254 nm par caméra numérique pour quantifier les quantités d'ADN déposées, avant d'être séché et exposé (cf. :§ VII.6.3.1). Par ailleurs, le gel dénaturant est également séché sur papier Whatman 3MM et exposé. Après 16h d'exposition, les écrans sont numérisés sur le Typhoon (Amersham Biosciences) et les bandes peuvent être quantifiées sous ImageQuant.

6.3.3 TRF en conditions natives

Il s'agit simplement d'effectuer de façon simultanée, la digestion enzymatique caractéristique du TRF (cf.: § VII.6.2), et l'hybridation du simple brin télomérique (Figure 53C). Le marquage de la sonde, des marqueurs de taille, l'hybridation et la digestion enzymatiques sont réalisées comme dans les paragraphes VII.6.3.1 et VII.6.2.2; l'hybridation/digestion s'effectue dans 30 μ l de tampon 2 (NEB) 1X dans une étuve à 37°C.

Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel d'agarose 0,8% dans du TBE 1X, contenant du bromure d'éthidium. La migration est effectuée pendant environ 8h à 80V ; les marqueurs de taille, autour de la taille attendue des télomères, doivent être convenablement séparés. Le gel d'agarose est préalablement photographié avec une caméra numérique, sous transillumination UV à 254 nm, pour quantifier les quantités d'ADN déposées. Il est ensuite séché à froid 15 min, puis à 42°C pendant 30 min, entre 2 membranes de nylon N⁺ et des papiers

Whatman 3MM changés régulièrement, pour éviter les contaminations radioactives dues au tampon de migration radioactif et aux fuites d'oligonucléotide hors du gel d'agarose. Le gel séché, entouré des membranes de nylon, est emballé dans du film plastique et exposé ainsi contre un écran radiosensible. Après 16h d'exposition, l'écran est numérisé sur le Typhoon (Amersham Biosciences). On observe ainsi la taille moyenne des télomères qui possèdent une extrémité 3' simple-brin détectable par hybridation.

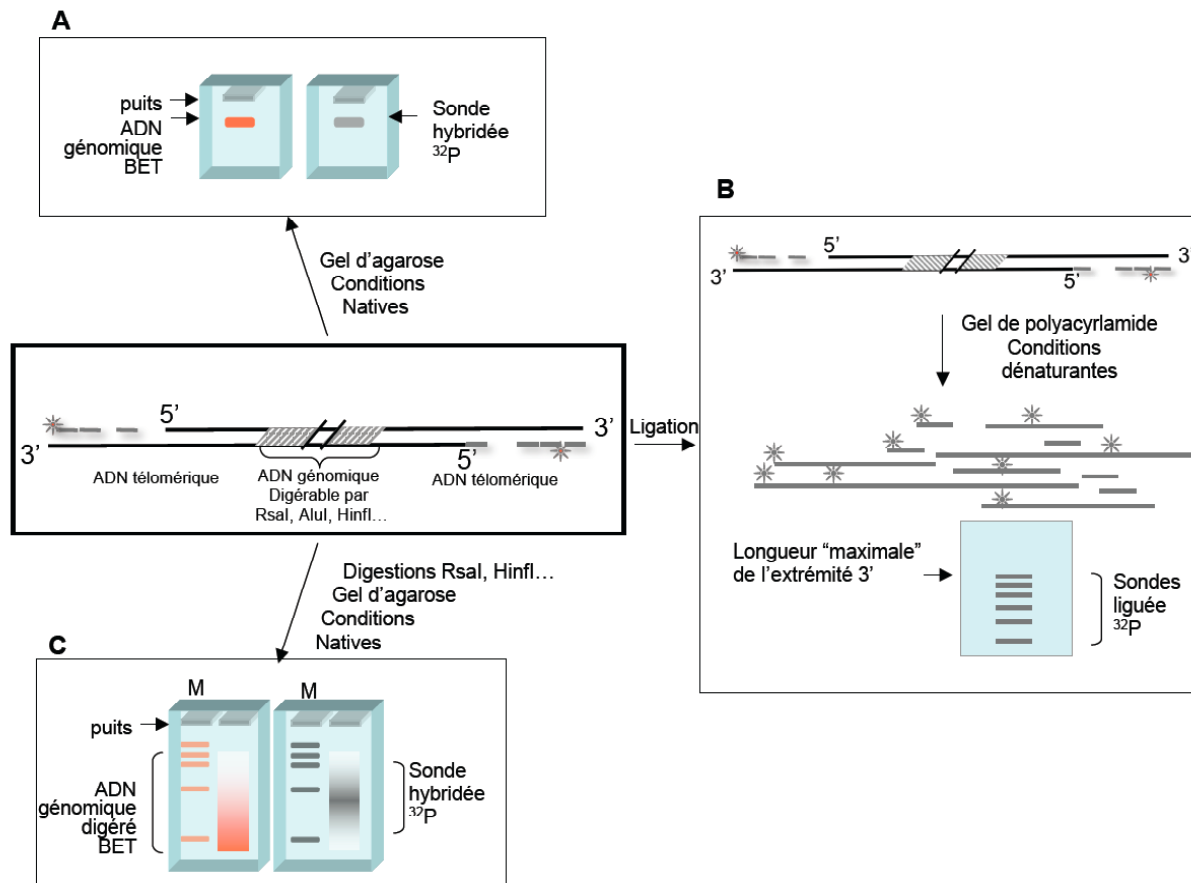


Figure 53 : Schéma des techniques utilisant l'hybridation du simple brin télomérique.

(A) Hybridation du simple brin télomérique en solution puis migration sur gel d'agarose et détection de la sonde radiomarquée hybridée à l'ADN génomique (cf. : § VII.6.3.1). (B) Après hybridation et ligation, détection des oligonucléotides sondes ligués sur gel dénaturant (cf. : T-Ola § VII.6.3.2). (C) Après hybridation du simple brin télomérique et digestions par des enzymes de restriction coupant en dehors des régions télomériques, migration sur un gel d'agarose en conditions natives (cf. : § VII.6.3.3).

Annexes

Liste des publications scientifiques co-signées

- **De Cian A**, Cristofari G, Reichenbach P, De Lemos E, Monchaud D, Teulade-Fichou MP, Shinya K, Lacroix L, Lingner J, Mergny JL. Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**; 104(44) :17347-52.
- **De Cian A**, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou JF, Mergny JL. Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie.* **2007** (publié en ligne)
- **De Cian A** and Mergny JL. Quadruplex ligands may act as molecular chaperones for tetramolecular quadruplex formation, *Nucleic Acids Res.* **2007**; 35(8): 2483-93.
- **De Cian A**, DeLemos E, Mergny JL, Teulade-Fichou MP, and Monchaud D. Highly Efficient G-quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**; 129(7): 1856-7.
- **De Cian A**, Guittat L, Kaiser M, Saccà B, Amrane S, Bourdoncle A, Patrizia Alberti P, Teulade-Fichou MP, Lacroix L and Mergny JL. Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands, *Methods* **2007**; 42(2):183-195.
- Bertrand H, Monchaud D, **De Cian A**, Guillot R, Mergny JL and Teulade-Fichou MP. The importance of the metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**; 16(5): 2555 - 2559.
- Brassart B, Gomez D, **De Cian A**, Paterski R, Montagnac A, Qui KH, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Mergny JL, Gueritte F, Riou JF. A new steroid derivative stabilizes G-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells. *Mol Pharmacol.* **2007**; 72(3): 631-40.
- Mergny JL, **De Cian A**, Amrane S and Webba da Silva M. Kinetics of Double-Chain Reversals Bridging Contiguous Quartets in Tetramolecular Quadruplexes, *Nucleic Acids Res.* **2006**; 34(8): 2386–97.
- Kaiser M, **De Cian A**, Sainlos M, Renner C, Mergny JL and Teulade-Fichou MP. Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**; 4(6): 1049–57.
- Granotier C, Pennarun G, Riou L, Hoffschir F, Gauthier LR, **De Cian A**, Gomez D, Mandine E, Riou JF, Mergny JL, Mailliet P, Dutrillaux B, Boussin FD. Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res.* **2005**; 33(13): 4182-90.
- Guittat L, **De Cian A**, Rosu F, Gabelica V, De Pauw E, Delfourne E, Mergny JL. Ascididemin and meridine stabilise G-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro. *Biochim Biophys Acta.* **2005**; 1724(3): 375-84.
- Mergny JL, **De Cian A**, Ghelab A, Sacca B, Lacroix L. Kinetics of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2005**; 33(1): 81-94.

- **De Cian A**, Guittat L, Shin-ya K, Riou JF and Mergny JL. Affinity and selectivity of G4 ligands measured by FRET. *Nucleic Acids symposium Series* **2005**; 49: 235-236.
- Gros J, Webba da Silva M, **De Cian A**, Amrane S, Rosu F, Bourdoncle A, Saccà B, Alberti P, Lacroix L, and Mergny JL. Kinetics and thermodynamic of G-Quadruplexes *Nucleic Acids symposium Series* **2005**; 49: 61-62.

.

Annexe I

Article : “Kinetics of tetramolecular quadruplexes”. *Nucleic Acid Res.* 33 (2005) 81-94.

J-L Mergny, A. De Cian, A. Ghelab, B. Saccà, L. Lacroix.

Résumé en français :

La dénaturation thermique de quadruplexes tétramoléculaires ADN ou ARN est cinétiquement irréversible. Cependant, plutôt que d’être un inconvénient, cette inertie cinétique nous permet d’étudier les processus d’association et de dissociation de façon indépendante. D’un point de vue cinétique, l’association est une réaction d’ordre quatre en monomère, et la dissociation d’ordre un en quadruplexe. La constante d’association k_{on} , exprimée en $M^{-3} \cdot s^{-1}$ décroît quand la température est augmentée, ce qui reflète une énergie d’activation E_{on} négative pour les séquences présentées dans cet article. L’association est favorisée par une augmentation de la concentration en monocation. Le processus de dissociation d’ordre un est dépendant de la température, avec une énergie d’activation E_{off} largement positive, mais presque indépendante de la force ionique. Des règles générales se dégagent des différents motifs de séquences ADN et ARN, impliquant 3-6 guanines consécutives et 0-5 bases adjacentes, qui ont été étudiés. Les quadruplexes ARN sont plus stables que leur homologue ADN, résultant à la fois d’une association plus rapide et d’une dissociation plus lente. Dans la plupart des cas, aucune dissociation n’est observée pour de blocs de G de 5 guanines et plus en sodium, et de 4 guanines et plus en potassium. Les données rassemblées dans cette étude nous permettent de prédire le temps nécessaire pour former 50% (ou 90%) de quadruplexe en fonction de la séquence, de la concentration en brin, de la température et de la force ionique.

Kinetics of tetramolecular quadruplexes

Jean-Louis Mergny*, Anne De Cian, Amar Ghelab, Barbara Saccà and Laurent Lacroix

Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle USM503, INSERM U565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

Received October 21, 2004; Revised and Accepted December 7, 2004

ABSTRACT

The melting of tetramolecular DNA or RNA quadruplexes is kinetically irreversible. However, rather than being a hindrance, this kinetic inertia allows us to study association and dissociation processes independently. From a kinetic point of view, the association reaction is fourth order in monomer and the dissociation first order in quadruplex. The association rate constant k_{on} , expressed in $M^{-3} \cdot s^{-1}$ decreases with increasing temperature, reflecting a negative activation energy (E_{on}) for the sequences presented here. Association is favored by an increase in monocation concentration. The first-order dissociation process is temperature dependent, with a very positive activation energy E_{off} , but nearly ionic strength independent. General rules may be drawn up for various DNA and RNA sequence motifs, involving 3–6 consecutive guanines and 0–5 protruding bases. RNA quadruplexes are more stable than their DNA counterparts as a result of both faster association and slower dissociation. In most cases, no dissociation is found for G-tracts of 5 guanines or more in sodium, 4 guanines or more in potassium. The data collected here allow us to predict the amount of time required for 50% (or 90%) quadruplex formation as a function of strand sequence and concentration, temperature and ionic strength.

INTRODUCTION

The inclination of GMP or guanine-rich poly- and oligonucleotides to self-assemble into G-quadruplexes has been recognized for over 40 years (1–3). A G-quartet is a planar association of four guanines held together by eight hydrogen bonds (Figure 1A, left); G-quadruplexes result from the hydrophobic stacking of several quartets (Figure 1A, right) (4). A cation (typically Na^+ or K^+) is located between two quartets

forms cation–dipole interactions with eight guanines, reducing the repulsion of the 2×4 central oxygen atoms, enhancing hydrogen bond strength and stabilizing quartet stacking.

G-quartets may have applications in areas ranging from supramolecular chemistry to medicinal chemistry [for a recent review see (5)]. Several reports suggest that DNA may be used as a building block for novel nano-sized objects (6). Quadruplex DNA is an excellent module for the design of devices for nano-technology, because of its extreme rigidity and self-recognition properties. G-quadruplexes are also likely to form higher-order structures such as synapsable DNA (7,8) or G-wires (9,10). We and others have described DNA nano-devices based on quadruplex–duplex interconversion (11,12) or biosensors (13). The self-assembly of G-rich sequences can constitute liquid crystals (14) and may serve as the scaffold for artificial ion channels or receptors (15,16). Quadruplex-prone segments may also be found in biologically significant regions such as telomeres (17–21) or oncogene promoter regions (22), and a number of proteins or small molecules bind to G-quadruplexes (23–25).

In the tetramolecular quadruplex configuration (also called G4-DNA), all strands are parallel, and all guanines are in the *anti* conformation. These tetramolecular quadruplexes offer an interesting paradox: on the one hand, their conformation is very well known, and a number of high or very high [0.61 Å; (26)] resolution X-ray or NMR structures are available. This structural wealth might be explained in part by the extraordinary stiffness of this motif, as demonstrated by molecular dynamic simulations (27,28). On the other hand, one cannot but notice the paucity of thermodynamic and even more kinetic data [with one notable exception (29)] on these structures. This is rather unfortunate, as these quadruplexes may play important roles. First, several tetramolecular quadruplexes strongly interact with the HIV gp120 protein, and act as specific inhibitors of infection *in vitro* (30). Second, the conformation of the stem of these quadruplexes is very close to the central core of intramolecular parallel quadruplexes found for human telomeric repeats (20,31) or other motifs. These quadruplexes may be seen as simpler models of biologically relevant tetrads, and several groups have used such motifs to obtain high resolution data on drug–DNA interactions

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 40 79 36 89; Fax: +33 1 40 79 37 05; Email: mergny@vnumail.com

Present address:

Barbara Saccà, Laboratoire de Biophysique de l'ADN, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use permissions, please contact journals.permissions@oupjournals.org.

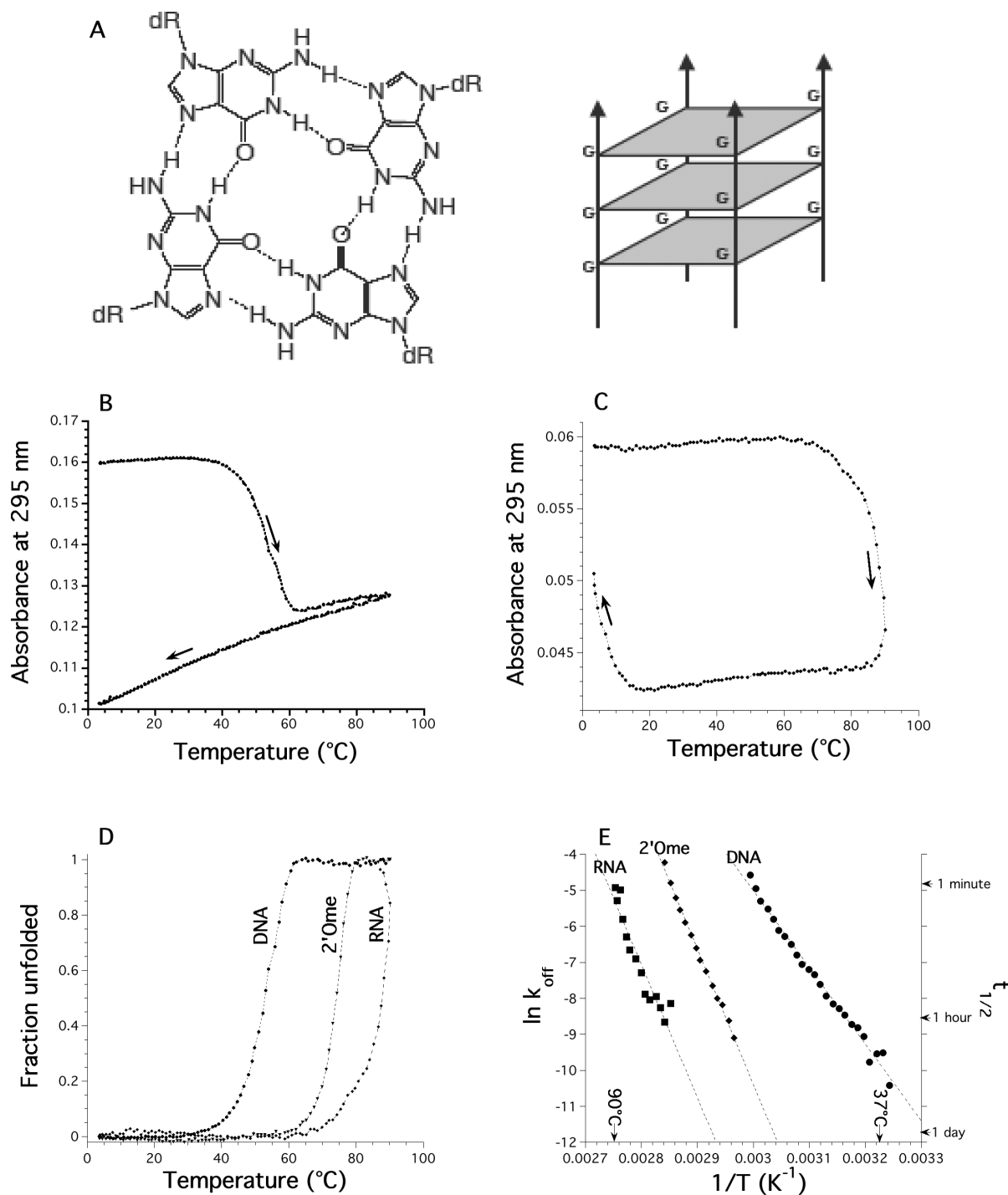


Figure 1. Quadruplex melting and cooling profiles. (A) Scheme of a G-quartet (left) and a tetramolecular quadruplex (right). (B) d-(TG₄T)₄ (20 μM) in 0.11 M Na⁺. Melting profile: at this strand concentration, once melted, the tetramolecular quadruplex does not refold. Absorbance at 295 nm is recorded every 6 min with a thermal gradient of ~0.18°C/min in a 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) supplemented with 0.1 M NaCl. Arrows indicate directions of temperature changes (heating or cooling). (C) r-(UG₄U)₄ (10 μM) in 0.11 M Na. Absorbance at 295 nm is recorded every 6 min with a thermal gradient of ~0.18°C/min in a 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) supplemented with 0.1 M NaCl. Arrows indicate directions of temperature changes (heating or cooling). (D) Fraction unfolded as a function of temperature for the DNA d-(TG₄T)₄, RNA and 2'-O-methyl r-(UG₄U)₄ samples, deduced from the heating profiles shown in Figure 1B (DNA) or 1C (RNA). (E) Arrhenius plot of ln(*k*_{off}) versus 1/*T* for the DNA d-(TG₄T)₄, RNA and 2'-O-methyl r-(UG₄U)₄ samples. Calculated lifetimes of the complexes are shown on the right y-scale.

(32–34). All *in vitro* experiments would benefit from precise knowledge of the kinetics of these structures, in order to define acceptable incubation times, choice of temperature and buffer. Finally, the intracellular ionic environment, where potassium

is present at high concentrations, favors tetramolecular parallel quadruplexes over foldback structures (35–37).

In this manuscript, we will demonstrate that the slow kinetics of association and dissociation of tetramolecular

G-quadruplexes actually make equilibrium measurement impractical (29). We show here that, as for other nucleic acid structures, k_{on} , but not k_{off} , is strongly ionic strength dependent. General rules will be drawn up for various DNA and RNA sequence motifs, involving 3–6 consecutive guanines and a variable number of 5' and/or 3' protruding bases. This allows us to calculate the amount of time required for 50% (or 90%) quadruplex formation as a function of strand sequence and concentration (in the micromolar to millimolar range), temperature (between 2 and 37°C) and ionic strength.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides and nomenclature

The DNA and RNA oligonucleotides presented here were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) on the 200 or 1000 nmol scale and dissolved in 200–500 μl of double-distilled water. Once formed, some quadruplexes are difficult to disrupt and 30 min at 100°C did not lead to significant quadruplex unfolding. When undesired quadruplex formation is observed before a kinetic experiment, the addition of limited

amounts of sodium hydroxide followed by HCl neutralization is a convenient and fast method to disrupt these complexes (38,39), but results in a net increase in salt concentration. Concentrations of all oligodeoxynucleotides were estimated by UV absorption using published sequence-dependent extinction coefficients (40) (Table 1).

All oligonucleotides studied here contain only one block of guanines and form tetramolecular species. In this manuscript, the tetramolecular quadruplex resulting from the association of four d-TGGGGT strands will be called d-(TG₄T)₄.

Thermal denaturation and renaturation

Formation and dissociation of the different duplexes and quadruplexes were estimated by heating/cooling experiments, recording the UV absorbance at several wavelengths as a function of temperature on Kontron Uvikon 940 spectrophotometers thermostated with an external ThermoNeslab RTE111 or a ThermoHaake Phoenix C25P1 waterbath. The temperature of the bath was increased or decreased at a rate of 0.02–3.4°C/min. All temperatures were measured in a buffer-containing cuvette as significant differences between water bath and sample temperatures may be observed. Hence, the

Table 1. Oligonucleotides chosen for this study

Sequence (5' → 3')	G-tract length	ϵ^a	k_{on}^b	$T_{1/2}^c \text{ Na}^+$	$T_{1/2}^d \text{ K}^+$	Reference(s)
DNA: d-						
TGGG ^f	3	39 200	n.d.	n.d.	51	
TGGGT	3	47 700	5.2×10^7	16	48	(72,75,76)
TTAGGG	3	61 300	1.8×10^{7h}	17	50	(77)
TTAGGGT	3	69 800	2.1×10^6	24	55	(77,78)
TGGGG	4	49 300	2.8×10^{9e}	47	—	(46)
GGGGT ^f	4	50 300	^e	63	—	
TTGGGG	4	57 400	n.d.	48.5	—	(77,79)
GGGGTT ^f	4	58 400	1.5×10^{9e}	64.5	—	
TGGGGT	4	57 800	3.8×10^8	54.5	—	(49–56)
AGGGG	4	55 300	$3.9 \times 10^{10e,f}$	54	—	
AGGGGT	4	63 800	1.3×10^{10}	59.5	—	
TTGGGGT	4	65 900	4.3×10^7	n.d.	n.d.	(56,77,80)
TTGGGGTT	4	74 000	1.5×10^6	71	—	(29,56,64)
TTTGGGGT	4	74 000	1.3×10^6	67	n.d.	
TGGGGG	5	59 400	3.1×10^{11}	—	—	
TTGGGGG	5	67 500	2.2×10^{10}	—	—	
TGGGGGT	5	67 900	6.1×10^9	—	—	
TTGGGGGT	5	84 100	6.1×10^{7h}	—	—	
TGGGGGGT ^f	6	78 000	1.4×10^{11}	—	—	
RNA: r-						
UGGGU	3	49 900	n.d.	50	n.d.	
UGGGGU	4	60 000	5.0×10^{12}	89	—	(81)
UGGGGU ^g	4	60 000	2.0×10^{11}	75	—	
UUGGGGU	4	69 700	5.0×10^{12}	>85	n.d.	
UGGGGUUU	4	79 400	2.1×10^{11}	69	n.d.	
UUUGGGGU	4	79 400	6.3×10^{11}	>85	n.d.	
UUGGGGUU	4	79 400	2.0×10^{11}	79	n.d.	

n.d.: not done. Reference oligomers (TG₄T and UG₄U) are shown in bold.

^aExtinction coefficient, in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, according to (40).

^bAssociation rate constant at 4°C, pH 7, with 0.11 M Na⁺, in $\text{M}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$. k_{on} is given $\pm 30\%$. Note that, as in Wyatt *et al.*, we defined k_{on} as $d[A]/dt = -4 \cdot d[A_4]/dt = -k_{\text{on}}[A]^4$.

^c(Non-equilibrium) melting temperature of the preformed quadruplex, in °C, in 0.11 M Na⁺, determined with a temperature gradient of 0.18°C/min. —: no melting of the quadruplex, even at the highest temperature recorded (94°C).

^d(Non-equilibrium) melting temperature of the preformed quadruplex, in °C, in 0.11 M K⁺ determined with a temperature gradient of 0.18°C/min. —: no melting of the quadruplex, even at the highest temperature recorded (94°C). $T_{1/2}$ is provided with a 0.5°C accuracy.

^ePoor fit.

^fAnomalous migration/several bands (for a simple tetramolecular quadruplex) on a non-denaturing gel; see Supplementary Figure S4 for details.

^g2'-O-methyl.

^hSingle point determination.

temperature values reported here reflect the real temperature of the sample, even when fast heating/cooling experiments are performed. All experiments were carried out in 10 mM sodium cacodylate or lithium cacodylate buffer (pH 7.0 or 7.2) containing 50–400 mM NaCl or KCl. The thermal denaturation of the G-quadruplex gives rise to hyperchromism at 240–245 nm and to a large hypochromism at 295 nm (41). Following absorbance at 240 or 295 nm is therefore a convenient way to monitor quadruplex dissociation or formation. Depending on strand concentration, 0.2 or 1 cm pathlength cuvettes were used. In order to convert absorbance values into unfolded fraction, linear baselines were manually chosen, as previously described (42). For tetramolecular quadruplexes, this conversion was simple, especially for the low temperature baseline, as the absorbance of the folded species was nearly temperature independent (see Figure 1B and C).

A prerequisite for the recovery of thermodynamic, that is equilibrium, parameters from these curves is that they are true equilibrium curves. A simple and useful criterion for this is the coincidence of the heating and cooling curves at the chosen rate of heating and cooling. This is generally the case for double-stranded helix–coil transitions of oligodeoxynucleotides. We have previously observed that a rapid increase in temperature may lead to experimental curves that do not correspond to the equilibrium curves (43,44). Most melting curves recorded by heating a preformed quadruplex do not correspond to equilibrium melting curves; the ‘ T_m ’ deduced from these experiments (which depends on the heating rate) is therefore inaccurate. It is still informative, though, as it reflects the temperature dependency of the dissociation process. In order to distinguish it from the true thermodynamic T_m , we will call this value $T_{1/2}$. For the tetramolecular quadruplex structures studied here, the hysteresis phenomenon is extreme: no renaturation is observed for the DNA sample at low strand concentration (Figure 1B) whereas a 60°C difference may be found between the ‘ T_m ’ obtained during heating and cooling of a RNA quadruplex (Figure 1C). The apparent melting temperature ($T_{1/2}$) was found to be strongly dependent on the temperature gradient chosen for the experiment (i.e. the rate of heating; see Figure 2A and B for an example).

Isothermal kinetic analysis for association

Isothermal experiments were performed on a Kontron Uvikon 940 UV/Vis spectrophotometer. In general, association experiments were carried out at various strand concentrations (up to 500 μ M), depending on the kinetics. In order to fit the experimental data (using Kaleidagraph 3.5) with a proper mathematical model, we had to make the following assumptions or determinations:

- (i) A two-state analysis is required. Our data were analyzed within the framework of a concerted ‘two-state’ or ‘all-or-none’ model of dissociation. In this model, it is assumed that species with incomplete base pairing are not significantly populated, so that the only absorbing species are the separated strands and the full quadruplex. Note that this model does not necessarily imply a simple kinetic process. A useful criterion was recently proposed by Wallimann *et al.* (45): a dual wavelength parametric test allowed us to verify the two state model for various experiments (Supplementary Figure S3).

- (ii) The order (n) of the reaction in separate strands was initially floating (the kinetic order, the stoichiometry and the molecularity of the reaction may be different). For all further analysis, n was fixed equal to 4.
- (iii) Denaturation may be neglected: once formed, the quadruplex lifetime is long compared to the duration of the experiment (1–3 days).

For each set of experimental conditions (temperature, buffer) experimental curves were obtained at several strand concentrations. However, because of the extreme dependence of reaction rate on oligonucleotide concentration, the useful concentration range for kinetic analysis is often limited. Assuming that unfolding is negligible, the association of four identical A strands leads to the formation of the tetramer A_4 : $4A \rightarrow A_4$. At each wavelength, the absorbance Abs of the sample is linked to the fraction unfolded α by:

$$\text{Abs} = C_0 [\alpha \epsilon_{ss} + (1 - \alpha) \epsilon_q], \quad 1$$

where ϵ_{ss} and ϵ_q are the extinction coefficients of the unstructured single-strand and of the oligonucleotide involved in a quadruplex, respectively. α is the fraction of unfolded strand [$\alpha = [A](t)/C_0$]. The order of the reaction n may be experimentally estimated by analyzing the concentration dependency of the association process $d[A]/dt = -k_{on} [A]^n$. Assuming that at $t = 0$; $\alpha = 1$, one can demonstrate that (29)

$$\alpha = [1 + C_0^{n-1} \cdot (n - 1) \cdot k_{on} \cdot t]^{1/(1-n)}, \quad 2$$

where C_0 is the initial strand concentration and k_{on} the association rate constant. Experimental curves were fitted with this formula using the Kaleidagraph 3.5 software.

In most cases, this equation gave excellent fits, with parameters independent of the wavelength chosen for analysis (usually 240 or 295 nm, sometimes 230, 260 and/or 273 nm; Supplementary Figure S2a). Therefore, the observed reactions seem to obey a simple kinetic pathway and there is no evidence that significant concentrations of intermediate species are present. Nevertheless, one should note that oligomers ending with a terminal 3' guanine are more likely to form higher-order molecular species. The time-dependent association of a few oligonucleotides, such as d-G₄T was much more complicated (Figure S2c). In our hands, profiles obtained with some guanine-rich sequences such as TG₃₋₅ or G₃₋₅T at various wavelengths do not always agree, as pointed out with CD by Lieberman and Hardin (46). This does not necessarily imply a measurable buildup of intermediate species, but could also be the result of the presence of several distinct tetra- or higher molecular end products having different kinetics (47,48). It should be noted that there is no need and no theoretical reason to fit these profiles with bi-exponential forms. In any case, results obtained with oligomers that do not involve guanine as a terminal 5' or 3' base (such as d-TG₄T for example) are usually simpler.

Kinetic analysis for dissociation

The analysis of non-equilibrium melting profiles is based on the methods we developed for triplexes (43) and i-DNA (44). In our case, the calculations are even simpler as re-association was not measurable in the temperature range where melting

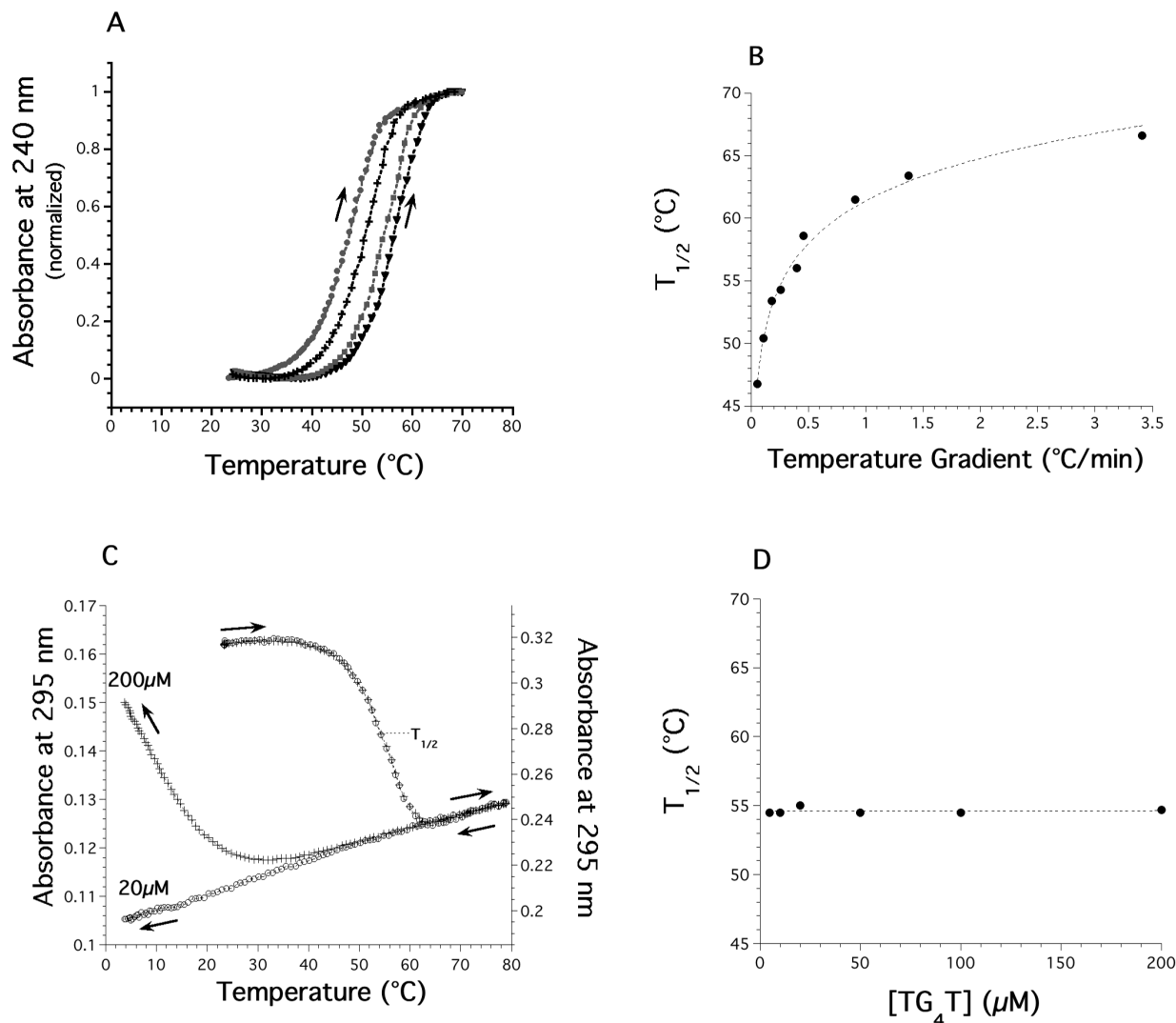


Figure 2. $T_{1/2}$ is dependent on the temperature gradient, not on strand concentration. (A) Normalized melting profiles recorded at 240 nm of the preformed d-(TG₄T)₄ quadruplex (20 μM strand concentration) in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 0.11 M NaCl at four different heating rates (circles: 0.054; crosses: 0.107; squares: 0.26 and triangles 0.4°C/min). (B) $T_{1/2}$ of the d-(TG₄T)₄ quadruplex as a function of the average temperature gradient. Note that the 'true' equilibrium T_m , which would be obtained with an infinitely slow gradient is calculated to be below 30°C. $T_{1/2}$ is provided with a 0.5°C accuracy. (C) Melting and cooling profiles recorded at 295 nm of the preformed d-(TG₄T)₄ quadruplex in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 0.11 M NaCl at two different strand concentrations (20 μM: circles and 200 μM: squares. y-scale values shown on the left and right axis, respectively. 1 cm pathway cuvette for 20 μM, 0.2 cm for 200 μM). Thermal gradient: 0.24°C/min. (D) Dependence of the $T_{1/2}$ value (obtained upon heating at a rate of 0.24°C/min) of the preformed d(TG₄T)₄ quadruplex (5–200 μM strand concentration) in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 0.11 M NaCl.

occurs ($k_{on} \approx 0$). As a result, rather than solving at each temperature a system of two equations with two unknowns (k_{off} and k_{on}), one has to deal with a single equation and one unknown parameter (k_{off}). As reformation of the complex is negligible, $d[A]/dt = k_{off}[A_4]$, hence

$$\frac{d\alpha}{dt} = \frac{d(\alpha_{(T)})}{dT} \cdot \frac{dT}{dt} = \frac{+k_{off}(1 - \alpha)}{4}, \quad 3$$

where α is the fraction of unfolded strand and k_{off} the rate constant for appearance of single strands. k_{off} may simply be deduced from Equation 3 at each temperature T where $d[\alpha_{(T)}]/dt$ (the time-dependent variation of the unfolded fraction at a given temperature) and α may be determined with some confidence (generally $0.05 < \alpha < 0.95$).

RESULTS

All quadruplex-forming oligonucleotides studied here are presented in Table 1. For most sequences, quadruplex formation has been demonstrated previously, and relevant references are provided. Our goal was not to re-demonstrate quadruplex formation for these oligomers; nevertheless, one should note that the thermal difference spectra of all these structures (Supplementary Figure S1) are in agreement with the formation of quadruplexes (41). Furthermore, non-denaturing gel electrophoresis confirmed that, at least for some sequences, a single major retarded band was observed when the oligonucleotides were preincubated at high concentration in the presence of NaCl or KCl (Supplementary Figure S4). Long G-runs such as TG₆T sometimes led to more complicated migration

patterns. We aimed to obtain reliable thermodynamic and kinetic data on these structures. We initially concentrated our efforts on well-known tetramolecular quadruplexes d-(TG₄T)₄ (49–56) and r-(UG₄U)₄ formed by the tetramerization of 6-base long oligonucleotides before analyzing other DNA and RNA guanine-rich oligomers.

Dissociation of the preformed d-(TG₄T)₄ and r-(UG₄U)₄ quadruplexes

Hybridization to a complementary oligonucleotide is a convenient method to study the dissociation process of a quadruplex (31,57–59). Unfortunately, in this work, most sequences were too short to allow the formation of a stable DNA duplex, making this method inapplicable. The other method commonly used relies on concentration jumps (31,60), but the thermal inertia of preformed tetramolecular quadruplexes is so high that lifetimes of the complexes are very long (30) (see below). We therefore had to use melting experiments to study the dissociation process.

Starting from preformed quadruplexes (several days at 0°C and high strand concentration: 200–500 µM), one can simply follow the denaturation of this structure by recording the absorbance at 295 nm (41) in a 0.11 M Na⁺ buffer. This leads to a ‘nice’ inverted and ‘cooperative’ curve (Figure 1B), which resembles data collected by CD experiments. As shown in Figure 1B, this profile does not reflect an equilibrium denaturation curve. Upon cooling, no renaturation of the DNA quadruplex is obtained, and further heating/cooling cycles led to a similar monotonous variation of absorbance with no evidence for quadruplex reformation or denaturation. On the other hand, one should note that partial renaturation of the RNA quadruplex is observed below 10°C (Figure 1C). Furthermore, this apparent melting temperature strongly depends on the rate of heating (Figure 2A and B) again indicating that this profile does not correspond to an equilibrium curve. It should be noted that if sodium is replaced by potassium, no melting of this quadruplex is observed, in agreement with a previous report (55).

This apparently annoying behavior has an interesting consequence: the melting profile actually solely reflects the dissociation of the quadruplex and it is possible to extract k_{off} values at each temperature. In this temperature range, what we see in practice is a simple one-way reaction from a folded quadruplex to a dissociated state. As the reverse reaction (refolding) is not considered here, the only species for which concentration matters is the folded tetramer. This requires several assumptions or verifications. (i) Renaturation at this temperature has to be minimal. This was checked by using different strand concentrations (from 5 to 200 µM): no variation at all of the $T_{1/2}$ was observed, in agreement with the complete absence of renaturation in that temperature range (Figure 2C and D). Another indication of negligible reassociation is provided by following the second heating profiles: starting from completely unfolded species, one does not observe any trace of reassociation (data not shown). (ii) k_{off} values extracted from a melting curve had to be confirmed with another technique: we and others performed T-jump experiments in which a preformed quadruplex (at low temperature) is suddenly transferred to high temperature, and the time-course of isothermal quadruplex dissociation is recorded

(29,60). Values obtained through this method were, within experimental error, in agreement with the k_{off} values deduced from melting experiments (data not shown). (iii) The melting temperature depends on the temperature gradient and knowing E_{off} (see below), it is even possible to predict the dependence of $T_{1/2}$ on the heating rate (29,60).

In the temperature range in which the dissociation occurs (35–60°C for the DNA quadruplex; 75–90°C for the RNA quadruplex) one can determine α , the fraction of unfolded oligonucleotide (Figure 1D) and $d(\alpha)/dt$, the time-dependent variation of the unfolded fraction. From Equation 3 (see Materials and Methods) one can write:

$$k_{\text{off}}(T) = \frac{[4 \cdot d(\alpha_{(T)})/dt]}{[1 - \alpha_{(T)}]} \quad 4$$

The temperature range for which $d(\alpha_{(T)})/dt$ may be accurately determined is relatively narrow (the melting transition is spread over a limited temperature range). Hence, the Arrhenius plots of $\ln[k_{\text{off}}(T)]$ as a function of temperature (presented in Figure 1E) involve a relatively limited number of points, especially for RNA. Note that this temperature range may be extended by using different temperature gradients which lead to different apparent melting temperatures $T_{1/2}$ (Figure 2A and B). For d-(TG₄T)₄, this apparent melting temperature variation (between 46 and 66°C, Figure 2B) extends the practical range for $d(\alpha_{(T)})/dt$ determination to ≈ 36 –76°C (data not shown). This ‘trick’ is not applicable to the RNA sample: faster scan rates lead to partial denaturation only ($T_{1/2}$ too high), whereas slower scans lead to unacceptable evaporation and degradation of the sample. Therefore, E_{off} values deduced from the slope of Arrhenius plots of $\ln[k_{\text{off}}(T)]$ as a function of temperature (+43 and +74 kcal/mol for DNA and RNA, respectively) are determined with a much greater confidence for DNA than for RNA.

Association of the isolated strands at low temperature: effects of concentration

Isothermal renaturation experiments were used to study the formation of the quadruplexes. We first determined that the low temperature renaturation was minimal for the DNA sample at concentrations <20 µM (Figure 2C). Starting with a concentration of 30 µM or higher, a time-dependent increase of absorbance at 295 nm was observed (Figure 3A). An opposite trend was seen at 240 nm, with a time-dependent decrease of absorbance. These variations reflect the spectral differences between the initial single-strand and the quadruplex (Supplementary Figure S1).

Concentration played a dramatic role in the kinetics of association. Formation of the quadruplex at 3°C was nearly complete in 2 h at 200 µM whereas much longer times are required at 30 µM (Figure 3A). It was then possible to fit the experimental profiles with the mathematical function defined in the experimental section (Equation 2) for the determination of the order of the reaction. Data could be fitted with $3.4 \leq n \leq 4.1$; we defined $n = 4$ for all further studies. As illustrated in Figure 3A, these fits (dotted lines) are in nearly perfect agreement with the experimental curve (solid line); the overlap between the two precludes seeing the mathematical fit over most of the curve. This agreement is also reflected

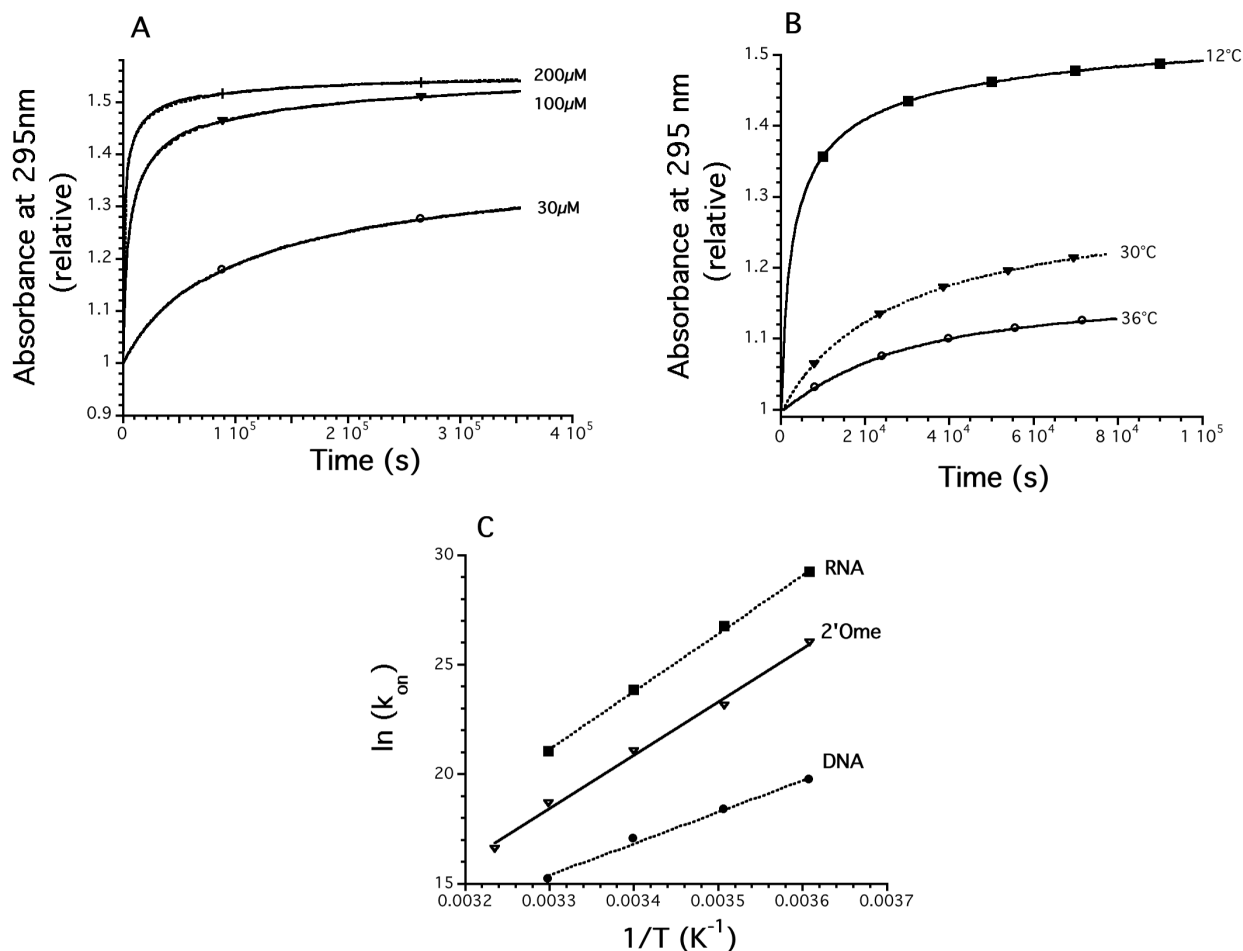


Figure 3. Kinetics of association. (A) Effect of strand concentration (30–200 μM) for d-TG₄T at 3°C in 0.11 M Na⁺ on the relative absorbance at 295 nm. Quadruplex formation leads to an increase of absorbance at this wavelength (see Figure S1). Mathematical fits (Equation 2) are shown as dotted lines; data points are displayed as solid lines (each curve results from the recording of 900 experimental points; only a few are shown). (B) Effect of temperature for d-TG₄T (178 μM) on the relative absorbance at 295 nm. Circles: 36°C, triangles: 30°C, squares: 12°C (each curve results from the recording of 300 experimental points; only a few are shown). (C) Arrhenius plots [ln(k_{on}) versus 1/T] for the association of the DNA d-TG₄T (circles), RNA (squares) and 2'-O-methyl (triangles) r-UG₄U oligonucleotides. All experiments were performed in a 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) supplemented with 0.1 M NaCl.

by $R > 0.995$ and χ^2 as low as 10^{-4} in most cases). Moreover, the k_{on} values determined from the curves at three different concentrations or at two different wavelengths (240 and 295 nm; see Supplementary Figure S2A for an example) were in excellent agreement [see Supplementary Figure S3 for a dual wavelength parametric test (45)]. The association rate constant at 4°C was 3.75×10^8 and $5.0 \times 10^{12} \text{ M}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ for the DNA and RNA samples, respectively (see Table 1). The value found for RNA ($>10^{12}$) may look extremely high when compared with bimolecular rate constants (in the 10^5 to $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ range for duplexes); one should note, however, that these quadruplex rate constants reflect fourth-order reactions and are expressed in different units ($\text{M}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) which prevents a direct comparison of the numerical values. These values allowed us to calculate the amount of time required for half formation of the DNA, 2'Ome and RNA quadruplex at various strand concentrations (Table 2).

Next, we performed the same renaturation experiment at various temperatures. As shown in Figure 3B, an increase in temperature has a deleterious impact on the kinetics of association: at a given strand concentration, folding was

Table 2. Half-association times^a for the d(TG₄T)₄ and r(UG₄U)₄ quadruplexes^b

Oligonucleotide/ concentration	1 μM	10 μM	100 μM	1 mM
d-TG ₄ T (DNA)	>100 years	110 days	2.6 h	6 s
o-UG ₄ U (2'Ome)	120 days	2.9 h	11 s	$10^{-2} \cdot \text{s}$
r-UG ₄ U (RNA)	3 days	4.4 min	0.25 s	$<10^{-3} \cdot \text{s}$

^aCalculated from Equation 2. To determine the time required for 90% quadruplex formation, multiply by 143. For 99% quadruplex formation, multiply by 143 000!

^bCalculated at 4°C in a 0.1 M NaCl, 10 mM sodium cacodylate pH 7.0 buffer (total Na⁺ concentration 0.11 M). At 21°C, the reaction will take 15 times longer (for DNA) and 150–200 times longer for RNA and 2'Ome. In 0.11 M KCl (instead of NaCl) divide these durations by ≈ 50 . For sequences other than dTGGGGT, multiply these numbers by the ratio between k_{on} (d-TG₄T) and k_{on} of the chosen sequence (values found in Table 1) (higher k_{on} means faster association!).

much slower at 36°C (circles) than at 12°C (squares). Similar experiments were done for the RNA and 2'Ome samples at various temperatures in the 2–37°C range. The association rates are shown in Figure 3C (Arrhenius plot: natural

logarithm of k_{on} as a function of $1/T$). At low temperature (3°C), the RNA sample folded 10^4 times faster than DNA (note the logarithmic scale on the y-axis). At 30°C, this difference was less pronounced: for the RNA UG₄U sample, the association process was even more temperature-dependent: a 10°C increase led to a >20 times lower k_{on} .

Thermodynamics of the d-(TG₄T)₄ and r-(UG₄U)₄ quadruplexes

From the Arrhenius representations of association (Figure 3C) and dissociation (Figure 1E) processes, it is possible, at least in theory, to recalculate the equilibrium constant at every temperature. However, one should note that the experimental points are not experimentally determined in the same temperature range (2–37°C for association, 37–90°C for dissociation): an extrapolation of these data is therefore required. Fortunately, a reasonable linear fit may be obtained for these points: their slopes allow the determination of the association and dissociation activation energies (E_{on} and E_{off}). The ΔH° of the reaction may be deduced from the relation $\Delta H^\circ = E_{\text{on}} - E_{\text{off}}$ (Table 3). The values found for the DNA and RNA quadruplexes were –72 and –127 kcal/mol, suggesting that the RNA quadruplex is significantly more enthalpy driven. The value for DNA is in close agreement with calorimetric data for the

Table 3. Kinetic parameters for the d(TG₄T)₄ and r(UG₄U)₄ quadruplexes

Oligonucleotide	E_{on}^a	E_{off}^a	$\Delta H^{\circ a,b}$	$T_{1/2}^c$	$t_{1/2}^d$
d-TG ₄ T (DNA)	-29 ± 2	43 ± 1	-72 ± 3	54.5	6 h
o-UG ₄ U (2'Ome)	-49 ± 2	75 ± 2	-124 ± 4	75	3 years
r-UG ₄ U (RNA)	-53 ± 4	74 ± 7	-127 ± 11	89	>100 years

All values determined in a 0.1 M NaCl, 10 mM sodium cacodylate pH 7.0 buffer (total Na⁺ concentration 0.11 M).

^aIn kcal/mol.

^bDeduced from $\Delta H^\circ = E_{\text{on}} - E_{\text{off}}$.

^cIn °C, determined with a temperature gradient of 0.2°C/min. $T_{1/2}$ is provided with a 0.5°C accuracy. The true T_m value (in °C), calculated at 100 μM strand concentration is at least 20°C lower (data not shown).

^dLifetime of the tetramolecular quadruplex at 37°C.

same quadruplex under slightly different conditions (0.2 M NaCl) (54). Note, however, that the values found for RNA are less precise, as E_{off} is difficult to measure accurately.

Buffer effects on the association and dissociation of the d-(TG₄T)₄ quadruplex

All profiles shown before were obtained in a buffer containing Na⁺ ions at 110 mM. Next, we investigated the effects of varying sodium concentration, replacing sodium by potassium, changing the pH or adding divalent or multivalent cations.

First, sodium was replaced by potassium. As previously described, K⁺ stabilizes quadruplexes, as demonstrated by an increase in melting temperature, which reflects a slower dissociation at a given temperature. However, potassium also increases the association rate constant by a factor of 20–50 (data not shown). In other words, potassium affects k_{on} and k_{off} . This difference in k_{on} between sodium and potassium was more or less conserved over a 2–37°C temperature range, suggesting that the activation energies of association were close. The 50-fold difference in k_{on} between Na⁺ and K⁺ was more or less constant in the 50–300 mM NaCl or KCl concentration range (Figure 4B).

Second, various concentrations of sodium and potassium were tested in the 50–400 mM range. Increasing NaCl concentration played little, if any role in the thermal dissociation of the d-(TG₄T)₄ quadruplex ($\Delta T_{1/2} < 2^\circ\text{C}$; data not shown). However, varying the sodium concentration had a dramatic effect on the association process, as shown in Figure 4A. This illustrates the fact that the stability of parallel quadruplexes is indeed dependent on the cation concentration, and that this effect is mainly reflected in k_{on} , as for many other nucleic acid structures such as duplexes or triplexes. A 10-fold increase in Na⁺ concentration leads to a 1×10^3 to 2×10^3 increase in the association rate constant, in agreement with the involvement of several (≈ 3) Na⁺ or K⁺ ions in the association process.

Third, pH was varied between 5.0 and 7.8. No variation of association and of thermal stability was found between pH 5.5 and 7.8 (Supplementary figures S5A and S5B). However, the association rate was significantly faster at pH 5.0. This

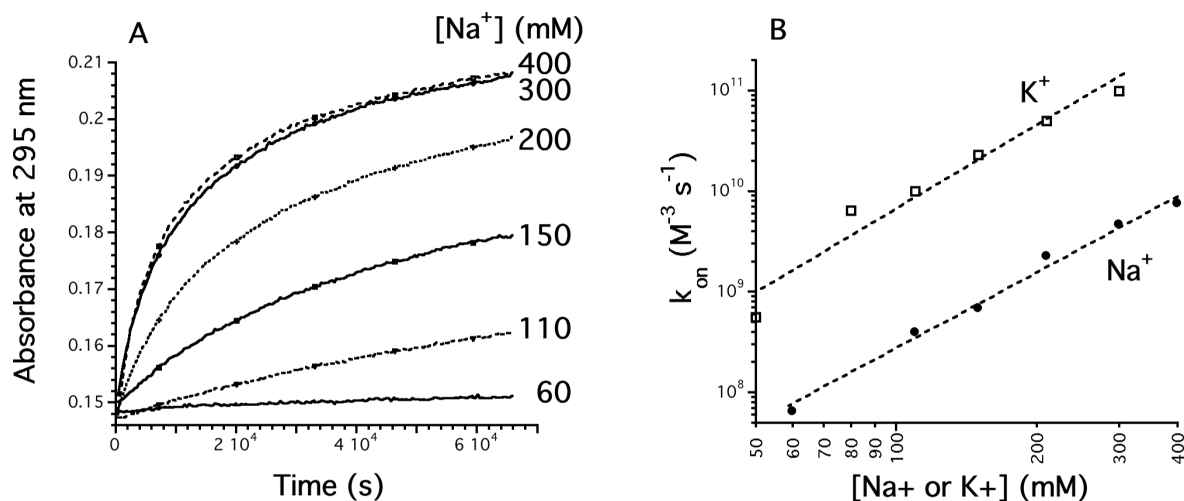


Figure 4. Effect of NaCl concentration. (A) Examples of kinetics of association at 3.5°C at various NaCl concentrations (shown on the right in a 10 mM cacodylate buffer). Absorbance recorded at 295 nm as a function of time, starting from an unfolded d-TG₄T oligodeoxynucleotide (25 μM). Quadruplex formation leads to a time-dependent increase of absorbance at this wavelength. (B) k_{on} values determined as a function of NaCl (circles) or KCl (squares) concentration.

stabilizing effect (on association) is compensated by a destabilizing effect on the denaturation process (evidenced by a 4°C decrease in $T_{1/2}$). These mildly acidic conditions have a paradoxical role on the stability of the quadruplexes, as a low pH both accelerates association and dissociation.

Fourth, magnesium chloride was added to a sodium- or potassium-containing buffer. The results are shown in Supplementary Figure S6A for the association rate at 4°C. Magnesium ions accelerate the association process in a concentration-dependent manner. This effect was observed both in 0.11 M Na⁺ and 0.11 M K⁺. At the highest tested Mg²⁺ concentration (15 mM), the association rate constant was six times larger than in the absence of magnesium. We next investigated whether magnesium affected the melting temperature ($T_{1/2}$) of the preformed quadruplex. As shown in Supplementary Figures S6B–S6C, increasing magnesium concentration led to a decrease of the apparent melting temperature, hence, led to an increase of the dissociation process.

Finally, multivalent cations (spermine and spermidine, in the 0.04–0.2 mM concentration range) were added to a 10 mM sodium cacodylate buffer at pH 7.2 containing 0.1 M NaCl (data not shown). Results were in qualitative agreement with

the effects of magnesium (i.e. a net acceleration of association and dissociation at 0.2 mM spermine or spermidine).

Sequence effects

So far, all results were obtained with the d-(TG₄T)₄ quadruplex or its RNA equivalent. We next investigated if the results obtained for this sequence could be extended to other motifs. The sequences used for this analysis are shown in Table 1, and some of the results are summarized in Figure 5. For most oligomers, the association process could well be fitted with the same mathematical models.

First, concerning DNA oligomers, one can observe that the longer the G-tract, the faster the association (Figure 5A). This effect is surprisingly large: each extra guanine leads to ~10-fold larger association rate constant. As expected, a stabilizing effect could also be seen on dissociation: the longer the G-tract, the higher the $T_{1/2}$. Unfortunately, this effect was harder to quantify as many quadruplexes did not dissociate at 90°C (Table 1).

Second, one can also notice that extra non G-bases at the 5' or 3' end play a detrimental role in the association of DNA and RNA (Figure 5B and Table 1). The addition of one thymine/uracil to a DNA or RNA oligonucleotide decreased

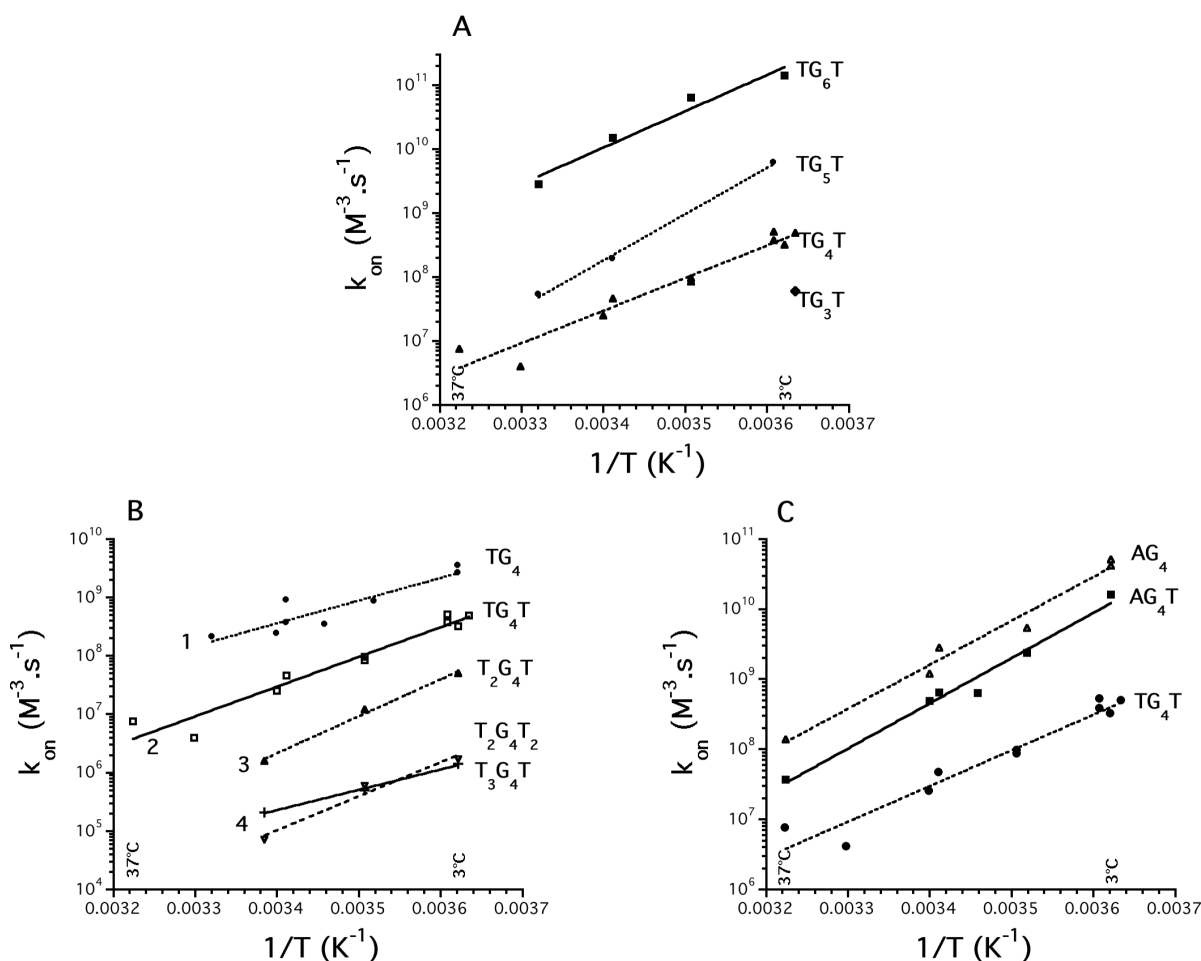


Figure 5. Sequence effects on k_{on} . (A) Impact of G-tract length on association rate constant. Squares: d-TG₆T; circles: d-TG₅T; triangles: d-TG₄T; diamonds: d-TG₃T (single determination at 3°C). (B) Impact of non-guanine bases on association. Total number of 5' and 3' thymines shown on the left. Circles: d-TG₄; squares: d-TG₄T; triangles: d-T₂G₄T; crosses: d-T₃G₄T; inverted triangles: d-T₂G₄T₂. (C) Influence of a 5' terminal adenine on association. Sequence shown on the right. All experiments performed in a pH 7.0 or 7.2 10 mM sodium cacodylate buffer containing 100 mM NaCl between 2 and 37°C (total Na⁺ concentration: 110 mM).

the association rate constant by a factor of roughly 10. This effect was cumulative; the slowest forming quadruplexes involved strands containing four thymines. The effect on k_{off} was more variable. As shown in Table 1, the presence of extra 5' or 3' thymines was often stabilizing (compare TTAGGG and TTAGGGT, $\Delta T_{1/2} = +5^\circ\text{C}$ in K^+ , $+7^\circ\text{C}$ in Na^+ or TGGGGT and TTTGGGGT, $\Delta T_{1/2} = +12.5^\circ\text{C}$ in Na^+). A counter-example is provided by TGGG and TGGGT, $\Delta T_{1/2} = -3^\circ\text{C}$ in K^+ . In other words, the presence of extra thymines was always detrimental to the association rate constant but often beneficial to the thermal stability of the quadruplex.

Third, the replacement of a 5' thymine by adenine had a strong beneficial effect on the kinetics of association (Figure 5C). One may observe that d-AG₄T has a 5–40 times higher association rate constant than d-TG₄T: the presence of a terminal 5' adenine is much more favorable than a 5' thymine, especially at 4°C . This is the first direct evidence of the impact of the nature of a 5' terminal base on the kinetics of quadruplex formation.

Generally, association processes for all these sequences were temperature dependent, with a large negative energy of activation of association (E_{on}). Plots of k_{on} versus temperature for a variety of sequences are shown in Figure 5 and as Supplementary Material (Supplementary Figures S7A–H). Association was studied in 0.11 M Na^+ or K^+ . For most sequences, and whatever the temperature studied, faster association was obtained in potassium. The ratio $k_{\text{on}}^{\text{K}^+}/k_{\text{on}}^{\text{Na}^+}$ varied between 1 (for d-TTAGGG, Supplementary Figure S7H) and 400 (d-TGGGGGT at 4°C , Supplementary Figure S7B). The energies of activation of association (E_{on}) were negative in sodium and potassium (and in some cases very close, see Figure S7A for d-TTGGGGG).

DISCUSSION

In the present study, absorbance spectroscopy was used to measure kinetics of association and dissociation. In agreement with the seminal paper by Wyatt *et al.* (29), who used size exclusion chromatography to study this process, we found that dissociation of quadruplexes appeared first order and association fourth order with respect to strand concentration. We actually took advantage of the unusual concentration dependency of the association process to measure association rate constants that differed by 10^5 or more: a 100-fold increase in concentration (from 5 to 500 μM in this manuscript) allowed us to analyze processes with a 10^6 slower association rate constant. Most experiments were performed on the d-(TG₄T)₄ DNA quadruplex and its corresponding RNA tetraplex r-(UG₄U)₄. These oligomers adopt relatively similar folded conformations: the four strands are parallel, all nucleotides are in the *anti* conformation and both of these structures exhibit right-handed helicity. Differences may be found in the organization of the thymine/uracil and in sugar pucker: in the DNA and RNA motifs, the sugar conformations are mostly of the S-type and mixed type, respectively (61).

Temperature effects

We took advantage of the large hysteresis or quasi-irreversible melting of these complexes to study the association and

dissociation processes independently. This difference between heating and cooling (and between the first and second heating) should lead to great caution concerning conclusions reached solely by the likening of the heating curves to thermodynamic equilibrium curves. For most oligonucleotides, it was possible to find the following:

- A temperature range for which association could be studied with negligible dissociation (once formed, the structure was so inert that no dissociation occurred in the time range of the experiment, making the association process a quasi-irreversible reaction).
- A (higher) temperature range where association could be neglected, and stability of the complexes was sufficiently lowered to observe their dissociation. Again, denaturation of the complex at these high temperatures could be considered as an irreversible process.

This uncoupling between the association and dissociation processes allowed easy determination of k_{on} and k_{off} . Unfortunately, this uncoupling necessarily means that k_{on} and k_{off} values were not obtained at the same temperature. The calculation of the equilibrium constant required the determination of k_{on} and k_{off} at several temperatures and an extrapolation (which in turn required a precise measurement of the association and dissociation activation energies E_{on} and E_{off}) to the desired temperature range. In the temperature range delimited in Figures 1E and 3C where these values are obtained with some confidence, straight lines are obtained with a positive slope for k_{on} and a negative one for k_{off} . In other words, the activation energy E_{on} for the association is negative and the activation energy E_{off} for the dissociation is positive.

Once formed, the structure is extremely inert, as the ring protons of the guanines involved in central quartets require days to exchange even at 60°C (62). This is consistent with the exceptional thermal stability of this structure, which is still partially formed at $95\text{--}100^\circ\text{C}$ in the presence of potassium (36,63). In our hands, it was difficult or impossible to observe the melting of a pre-formed DNA quadruplex that involves four or more guanines (in 0.11 M K^+) or five or more guanines (in 0.11 M Na^+). Hence, data on k_{off} could only be collected for a subset of the sequences shown in Table 1, corresponding to oligomers containing relatively short runs of guanines. For these oligomers, it was clear that (i) stability was strongly temperature dependent; the activation energy for dissociation E_{off} was strongly positive, (ii) at a given temperature k_{off} was smaller in potassium than in sodium, (iii) at physiological temperature or lower, the time for half dissociation of these complexes was generally long (days or more), (iv) a decrease in NaCl concentration had little effect on G4 dissociation but strongly decreased the rate constant of association hence, the equilibrium constant.

Concentration effects

For the T₂G₄T₂ sequence, Shida *et al.* noted that the transformation of the single-stranded form into the quadruplex-stranded form was undetectable at 43 μM strand concentration at room temperature. However, at a 50-fold higher strand concentration, the single-stranded oligomer was gradually converted into the quadruplex (64). The rates of association of the DNA, RNA and 2'Ome oligomers depend strongly on

oligonucleotide strand concentration (see Figures 2C and 3A): fourth-order reactions are not common in biochemistry, and the practical consequences of this reaction order are important. At some concentrations (below 30 μ M for d-TG₄T) no detectable association may be measured over a 3-day period. In contrast, at slightly higher concentrations, the association is so rapid that a majority of the oligonucleotide is already folded when the first measurement is performed. This is illustrated in Table 2, where the times required for 50% quadruplex formation is indicated for the DNA, RNA and 2'Ome oligomers.

Mechanism for quadruplex association

Concerning association, two important results were found: (i) the association process is fourth order in monomer; (ii) the activation energy of association is negative. These observations were valid for a majority of different DNA and RNA sequences under a variety of experimental conditions.

A fourth-order reaction does not imply that an elementary kinetic step involves a four-body collision. Such mechanism is extremely unlikely and other processes could lead to this fourth order. For example, our data are in full agreement with the pathway proposed by Wyatt *et al.* (29), where single strands and dimers are in a rapid pre-equilibrium that favors single strands, and tetramer formation from dimers is rate limiting. The structure of this elusive dimer intermediate remains unknown: Steff *et al.* have recently demonstrated that a Hoogsteen G–G duplex is an improbable intermediate (28). Its identification will be experimentally difficult, as numerical simulations indicate that it may not be present at detectable levels (29).

Concerning the activation energy of association, Pörschke and Eigen (65) obtained negative 'apparent' activation energies for duplex formation and interpreted their results within the now so-called nucleation-zipping model. Our data is consistent with the observed fourth-order dependence of the association rate and with the negative energy of activation for association, which implies a rapid pre-equilibrium step (29). The negative values we have obtained for E_{on} are in favor of the nucleation-zipping model. Our finding that k_{on} strongly decreases upon reducing ionic strength whereas k_{off} is independent of NaCl concentration is also in good agreement with what is observed in the duplex case. Other nucleic acid structures such as duplexes (65,66) triplexes (43) and i-DNA (44) also exhibit a negative E_{on} . The observation that ionic strength and nature of the monocation plays an important role in the value of k_{on} indicates that several ions are involved in this rate-limiting step and participate in the early stages of the quadruplex stem assembly (28): k_{on} strongly decreases upon reducing the NaCl concentration but k_{off} is independent of ionic strength.

In most (but not all cases, see d-TG_n and d-G_nT), there is no clear evidence for complicated folding pathways proceeding through stable intermediate states, as observed by Hardin *et al.* (46,67). Nevertheless, the order of the reaction n , when left unknown in Equation 2 is often experimentally found between 3.4 and 4 (i.e. lower than 4; data not shown); this could be the signature of small amounts of stable intermediates. Finally, one may note that low pH, magnesium, spermine and spermidine seem to act as catalysts for quadruplex association and dissociation. These cations lead to an increased rate of both

association and dissociation; it is difficult to determine whether these effects cancel each other out, in other words if the equilibrium constant is unaffected.

DNA versus RNA and other nucleic acid analogs

It is important to emphasize the extreme stability of parallel RNA quadruplexes. r-UG₄U forms a much more stable quadruplex than its DNA counterpart (d-TG₄T). This increased stability results from a faster association (350 times faster at 30°C) and a slower dissociation (at least 1000 times slower at 60°C). Besides a larger number of sugars in the C3'-endo conformation in the RNA quadruplex, the main structural difference between the two structures is the organization of the uracyl/thymine groups (61). This is in contrast with phosphorothioate (PS) oligomers, which exhibited a slower association and faster dissociation as compared to DNA (29). Data collected from this study, Wyatt *et al.* (29) and unpublished observations from our group (B. Saccà and J.L. Mergny, in preparation) allow oligomers to be ranked in the following order of thermodynamic stability:

MP $\ll$ PS < DNA < 2'Ome < RNA

Besides methylphosphonate oligonucleotides (MP) which are, in our hands, totally unable to form tetramolecular quadruplexes, it should be noted that all other modifications (RNA, DNA, 2'O-methyl and phosphorothioates) exhibit a fourth-order dependence of the association rate, a negative energy of activation for association and a strongly positive energy of activation for dissociation. The extremely high stability of RNA parallel quadruplexes was unexpected: bi- and intramolecular RNA quadruplexes are less stable than their DNA counterparts in sodium (B. Saccà and J.L. Mergny, in preparation). This difference might be explained by the greater difficulty in adopting a *syn* conformation for the ribonucleoside residues, making the formation of quadruplexes involving an antiparallel strand alignment unfavorable (68).

This suggests that the kinetic model initially proposed for DNA and phosphorothioates (29) could apply to a variety of nucleic acid modifications. In particular, close inspection of the melting profile of the 'Locked Nucleic Acid' (LNA) parallel quadruplex (69) suggests that these locked nucleic acids could also obey to the same kinetic rules. LNA could actually induce a change from an antiparallel to parallel structure (70). On the other hand, the question remains open for 'Peptide Nucleic Acids' (PNA) quadruplexes (71,72): the PNA TG3 sequence exhibited a surprising independence of the presence/nature of the monocation (72). It should be noted that, contrary to most nucleic acids discussed above, interbase linkers in PNA are not charged, and that the global charge of these PNA at neutral pH is often positive because of an N- or C-terminal lysine group.

Sequence effects

Oligomers that have a single multi-guanine motif at their 3' or 5' end, with a guanine as the terminal base, also form higher-order products (47,48,63,73), which may sometimes be evidenced by an anomalous migration on a non-denaturing gel (Supplementary Figure S4). This is in agreement with the observation that mathematical fits were often of lower quality

for G_nT_m sequences than for TG_nT_m (e.g. in Supplementary Figure S2C). Previous work indicated that the additional T at the 5' or 3' end not only inhibited formation of higher-order structures, but also stabilized the complex (63). As demonstrated here, this stabilization is reflected by a lower dissociation rate constant; on the other hand, this extra base has a strong detrimental effect on the association rate of the quadruplex. The net effect on the thermodynamic constant $K_d = k_{off}/k_{on}$ may be detrimental. On the other hand, extra 5' thymines are always detrimental, not only because the $T_{1/2}$ is decreased (74), but also because the association rate constant is negatively affected. In that case, the effects on k_{on} and k_{off} are in the same direction. We would like to point out that an increase in $T_{1/2}$ does not always imply a higher thermodynamic stability: it rather indicates a slower dissociation process. One should compare the association and dissociation processes of these modified quadruplexes to conclude that such modifications provide a net gain in free energy.

Conclusion and perspectives

Our data enable us to propose a quantification of the kinetic inertia of tetramolecular quadruplexes. We have summarized the impact of a number of parameters on the kinetics of association and dissociation of these complexes (Table 4). This might be helpful for a variety of applications. One may for instance study the interaction of small ligands or proteins with quadruplexes: are these molecules able to accelerate the kinetics of association of monomers giving the tetrameric form, or do they only bind to the structured quadruplex, lowering its dissociation rate constant? What happens with helicases of the RecQ family such as Werner or Bloom's? Knowledge of the kinetics of folding should also be useful for structural studies (X-ray or NMR) where high concentrations are often chosen: as shown in Table 2, millimolar strand concentrations lead to fast processes: tetrameric quadruplex formation is not necessarily a long timescale event with complicated kinetics. Finally, one should emphasize the extraordinary stability of RNA quadruplexes, coupled with their

relatively fast kinetics of association. Runs of guanines are frequent in biological RNAs: or pose a specific problem, as cellular or viral machineries (such as reverse transcriptases) cannot displace these structures. Our results suggest that the presence of a few extra bases delays association: what are the effects of a much longer overhang, e.g. in the context of a natural RNA? This will be a crucial question for mRNA or genomic DNA, but also for antisense/triplex-forming ≈ 20 -base-long oligonucleotides involving short stretches of guanines. It would be interesting to investigate whether some helicases are able to disrupt these RNA quadruplexes.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

This manuscript is dedicated to the memory of Professor Claude Hélène (1938–2003). We thank M. Rougée (MNH, Paris, France) and C. Gosse (CNRS/LPN Marcoussis, France) for helpful discussions and both referees for helpful suggestions. This work was supported by an ARC grant (#3365 to J.L.M.). Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by the INSERM.

REFERENCES

- Gellert, M., Lipsett, M.N. and Davies, D.R. (1962) Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **48**, 2013–2018.
- Fresco, J.R. and Massoulié, J. (1963) Polynucleotides. V. Helix-coil transition of polyriboguanilyc acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1352–1353.
- Guschlbauer, W., Chantot, J.F. and Thiele, D. (1990) Four-stranded nucleic acid structures 25 years later: from guanosine gels to telomer DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **8**, 491–511.
- Williamson, J.R. (1994) G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 703–730.
- Davis, J.T. (2004) G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 668–698.
- Seeman, N.C. and Belcher, A.M. (2002) Emulating biology: building nanostructures from the bottom up. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 6451–6455.
- Venczel, E.A. and Sen, D. (1996) Synapsable DNA. *J. Mol. Biol.*, **257**, 219–224.
- Fahlman, R.P. and Sen, D. (1998) Cation-regulated self-association of 'Synapsable' DNA duplexes. *J. Mol. Biol.*, **280**, 237–244.
- Marsh, T.C. and Henderson, E. (1994) G-wires: self-assembly of a telomeric oligonucleotide, d(GGGTTGGGG), into large superstructures. *Biochemistry*, **33**, 10718–10724.
- Poon, K. and Macgregor, R.B. (2000) Formation and structural determinants of multi-stranded guanine-rich DNA complexes. *Biophys. Chem.*, **84**, 205–216.
- Alberti, P. and Mergny, J.L. (2003) DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 1569–1573.
- Li, J.J. and Tan, W. (2002) A single DNA molecule nanomotor. *Nano Letters*, **2**, 315–318.
- Ueyama, Y., Takagi, M. and Takenaka, A.J. (2002) A novel potassium sensing in aqueous media with a synthetic oligonucleotide derivative. Fluorescence resonance energy transfer associated with guanine. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14286–14287.
- Bonazzi, S., Capobianco, M., De Morais, M.M., Garbesi, A., Gottarelli, G., Mariani, P., Ponzi, B., Maria, G., Spada, G.P. and Tondelli, L. (1991) Four stranded aggregates of oligodeoxy-guanilates forming lyotropic liquid crystals: a study by circular dichroism, optical microscopy and X-ray diffraction. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5809–5816.

Table 4. Summary of the effects of various parameters on G-quadruplexes

Parameter	Association	Dissociation	Equilibrium $K_a = k_{on}/k_{off}$
Increased temperature	—	++	—
Increased concentration	++	0	n/a
Increased ionic strength	+	0	+
Mg ²⁺ addition	+	+	≈ 0
Spermine/spermidine add.	+	+	≈ 0
Lower pH ^a	0	—	—
Na ⁺ → K ⁺	++	—	++
DNA → RNA	++	—	++
DNA → PS ^c	—	+	—
Longer G-stretch	++	—	++
Longer non-G overhang	—	+/- ^b	varies ^b

0: no effect. n/a: not applicable.

+/-: increase or strong increase (>30-fold), respectively of the association or dissociation process or of the equilibrium constant.

—/—: decrease (strong decrease) of the parameter.

^aBelow pH 5.5. No effect of pH in the 6.0–7.8 range.

^bGenerally, dissociation is slower, but sequence-dependent effects may be observed, depending on length, base composition, side (5' or 3') of the extra thymines.

^cFrom Wyatt *et al.* and B. Saccà *et al.*, unpublished data.

15. Forman, S.L., Fetting, J.C., Pieraccini, S., Gottarelli, G. and Davis, J.T. (2000) Toward artificial ion channels: a lipophilic G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4060–4067.
16. Shi, X.D., Mullaugh, K.M., Fetting, J.C., Jiang, Y., Hofstadler, S.A. and Davis, J.T. (2003) Lipophilic G-quadruplexes are self-assembled ion pair receptors, and the bound anion modulates the kinetic stability of these complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10830–10841.
17. Sen, D. and Gilbert, W. (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its applications for meiosis. *Nature*, **334**, 364–366.
18. Williamson, J.R., Raghuraman, M.K. and Cech, T.R. (1989) Monovalent cation induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*, **59**, 871–880.
19. Wang, Y. and Patel, D.J. (1993) Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure*, **1**, 263–282.
20. Parkinson, G.N., Lee, M.P.H. and Neidle, S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, **417**, 876–880.
21. Neidle, S. and Parkinson, G.N. (2003) The structure of telomeric DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 275–283.
22. Rangan, A., Fedoroff, O.Y. and Hurley, L.H. (2001) Induction of duplex to G-quadruplex transition in the c-myc promoter region by a small molecule. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4640–4646.
23. Shafer, R.H. and Smirnov, I. (2000) Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes. *Biopolymers*, **56**, 209–227.
24. Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Hurley, L.H. (1997) Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.*, **40**, 2113–2116.
25. Neidle, S. and Parkinson, G. (2002) Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nature Rev. Drug. Des.*, **1**, 383–393.
26. Deng, J.P., Xiong, Y. and Sundaralingam, M. (2001) X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)(4) with divalent Sr²⁺ ions at subatomic resolution (0.61 angstrom). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 13665–13670.
27. Spackova, N., Berger, I. and Sponer, J. (1999) Nanoseconds molecular dynamics simulations of parallel and antiparallel guanine quadruplex DNA molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5519–5534.
28. Stefl, R., Cheatham, T.E., Spackova, N., Fadrna, E., Berger, I., Koca, J. and Sponer, J. (2003) Formation pathways of a guanine-quadruplex DNA revealed by molecular dynamics and thermodynamic analysis of the substates. *Biophys. J.*, **85**, 1787–1804.
29. Wyatt, J.R., Davis, P.W. and Freier, S.M. (1996) Kinetics of G-quartet-mediated tetramer formation. *Biochemistry*, **35**, 8002–8008.
30. Wyatt, J.R., Vickers, T.A., Roberson, J.L., Buckheit, R.W., Klimkait, T., Debaets, E., Davis, P.W., Rayner, B., Imbach, J.L. and Ecker, D.J. (1994) Combinatorially selected guanosine-quartet structure is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus envelope-mediated cell fusion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 1356–1360.
31. Phan, A.T. and Patel, D.J. (2003) Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15021–15027.
32. Fedoroff, O.Y., Salazar, M., Han, H., Chemeris, V.V., Kerwin, S.M. and Hurley, L.H. (1998) NMR-based model of a telomerase inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry*, **37**, 12367–12374.
33. Read, M. and Neidle, S. (2000) Structural characterization of a guanine-quadruplex ligand complex. *Biochemistry*, **39**, 13422–13432.
34. Clark, G.R., Pytel, P.D., Squire, C.J. and Neidle, S. (2003) Structure of the first parallel DNA quadruplex-drug complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4066–4067.
35. Miura, T., Benevides, J.M. and Thomas, G.J. (1995) A phase diagram for sodium and potassium ion control of polymorphism in telomeric DNA. *J. Mol. Biol.*, **248**, 233–238.
36. Sen, D. and Gilbert, W. (1990) A sodium–potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature*, **344**, 410–414.
37. Crnugelj, M., Hud, N.V. and Plavec, J. (2002) The solution structure of d(G(4)T(4)G(3))₂: a bimolecular G-quadruplex with a novel fold. *J. Mol. Biol.*, **320**, 911–924.
38. Arimondo, P., Riou, J.F., Mergny, J.L., Tazi, J., Sun, J.S., Garestier, T. and Hélène, C. (2000) Interaction of human DNA topoisomerase I with intermolecular G-quartet structures. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4832–4838.
39. Lyounnais, S., Hounsou, C., Teulade-Fichou, M.P., Jeusset, J., LeCam, E. and Mirambeau, G. (2002) G-quartets assembly within a G-rich DNA flap. A possible event at the center of the HIV-1 genome. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 5276–5283.
40. Cantor, C.R., Warshaw, M.M. and Shapiro, H. (1970) Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers*, **9**, 1059–1077.
41. Mergny, J.L., Phan, A.T. and Lacroix, L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **435**, 74–78.
42. Mergny, J.L. and Lacroix, L. (2003) Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, **13**, 515–537.
43. Rougée, M., Faucon, B., Mergny, J.L., Barcelo, F., Giovannangeli, C., Garestier, T. and Hélène, C. (1992) Kinetics and thermodynamics of triple-helix formation: effects of ionic strength and mismatches. *Biochemistry*, **31**, 9269–9278.
44. Mergny, J.L. and Lacroix, L. (1998) Kinetics and thermodynamics of i-DNA formation: phosphodiester vs. modified oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4797–4803.
45. Wallimann, P., Kennedy, R.J., Miller, J.S., Shalango, W. and Kenp, D.S. (2003) Dual wavelength parametric test of two-state models for circular dichroism spectra of helical polypeptides: anomalous dichroic properties of alanine-rich peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1203–1220.
46. Lieberman, D.V. and Hardin, C.C. (2004) Extraction of information on the buildup and consumption of reactive intermediates from quadruplex DNA assembly time courses. *Biochim. Biophys. Acta*, **1679**, 59–64.
47. Uddin, M.K., Kato, Y., Takagi, Y., Mikuma, T. and Taira, K. (2004) Phosphorylation at 5' end of guanosine stretches inhibits dimerization of G-quadruplexes and formation of a G-quadruplex interferes with the enzymatic activities of DNA enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4618–4629.
48. Krishnan-Ghosh, Y., Liu, D. and Balasubramanian, S. (2004) Formation of an interlocked quadruplex dimer by d(GGGT). *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11009–11016.
49. Aboul-ela, F., Murchie, A.I.H. and Lilley, D.M.J. (1992) NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG4T). *Nature*, **360**, 280–282.
50. Aboul-ela, F., Murchie, A.I.H., Norman, D.G. and Lilley, D.M.J. (1994) Solution structure of a parallel-stranded tetraplex formed by d(TG(4)T) in the presence of sodium ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, **243**, 458–471.
51. Laughlan, G., Murchie, A.I.H., Norman, D.G., Moore, M.H., Moody, P.C.E., Lilley, D.M.J. and Luisi, B. (1994) The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science*, **265**, 520–524.
52. Phillips, K., Dauter, Z., Murchie, A.I.H., Lilley, D.M.J. and Luisi, B. (1997) The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.*, **273**, 171–182.
53. Caceres, C., Wright, G., Gouyette, C., Parkinson, G. and Subirana, J.A. (2004) A thymine tetrad in d(TGGGGT) quadruplexes stabilized with Tl⁺/Na⁺ ions. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1097–1102.
54. Petraccone, L., Erra, E., Esposito, V., Randazzo, A., Mayol, L., Nasti, L., Barone, G. and Giancola, C. (2004) Stability and structure of telomeric DNA sequences forming quadruplexes containing four G-tetrads with different topological arrangements. *Biochemistry*, **43**, 4877–4884.
55. Dapic, V., Abdomerovic, V., Marrington, R., Peberdy, J., Rodger, A., Trent, J.O. and Bates, P.J. (2003) Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2097–2107.
56. Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H.J. and Plückthun, A. (2001) *In vitro* generated antibodies specific for telomeric guanine quadruplex DNA react with Styloynchia lemnae macronuclei. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 8572–8577.
57. Li, W., Miyoshi, D., Nakano, S. and Sugimoto, N. (2003) Structural competition involving G-quadruplex DNA and its complement. *Biochemistry*, **42**, 11736–11744.
58. Green, J.J., Ying, L.M., Klenerman, D. and Balasubramanian, S. (2003) Kinetics of unfolding the human telomeric DNA quadruplex using a PNA trap. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3763–3767.
59. Rosu, F., Gabelica, V., Shin-ya, K. and DePauw, E. (2003) Telomestatin induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry. *Chem. Commun.*, **34**, 2702–2703.
60. Hardin, C.C., Corregan, M., Brown, B.A. and Frederick, L.N. (1993) Cytosine-cytosine + base pairing stabilizes DNA quadruplexes and

- cytosine methylation greatly enhances the effect. *Biochemistry*, **32**, 5870–5880.
61. Cheong, C.J. and Moore, P.B. (1992) Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G-Quartet and U-Quartet structures. *Biochemistry*, **31**, 8406–8414.
62. Gupta, G., Garcia, A.E., Guo, Q., Lu, M. and Kallenbach, N.R. (1993) Structure of a parallel-stranded tetramer of the Oxytricha telomeric DNA sequence dT4G4. *Biochemistry*, **32**, 7098–7103.
63. Lu, M., Guo, Q. and Kallenbach, N.R. (1992) Structure and stability of sodium and potassium complexes of dT4G4 and dT4G4T. *Biochemistry*, **31**, 2455–2459.
64. Shida, T., Yokoyama, K., Tamai, S. and Sekiguchi, J. (1991) Self-association of telomeric short oligodeoxyribonucleotides containing a dG cluster. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **39**, 2207–2211.
65. Pörschke, D. and Eigen, M. (1971) Co-operative non-enzymic base recognition. 3. Kinetics of the helix–coil transition of the oligoribouridylic–oligoriboadenylic acid system and of oligoriboadenylic acid alone at acidic pH. *J. Mol. Biol.*, **62**, 361–381.
66. Craig, M.E., Crothers, D.M. and Doty, P. (1971) Relaxation kinetics of dimer formation by self complementary oligonucleotides. *J. Mol. Biol.*, **62**, 383–401.
67. Hardin, C.C., Corregan, M.J., Lieberman, D.V. and Brown II, B.A. (1997) Allosteric interactions between DNA strands and monovalent cations in DNA quadruplex assembly: thermodynamic evidence for three linked association pathways. *Biochemistry*, **36**, 15428–15450.
68. Liu, H., Kugimiya, A., Sakurai, T., Katahira, M. and Uesugi, S. (2002) A comparison of the properties and the solution structure for RNA and DNA quadruplexes which contain two GGAGG sequences joined with a tetranucleotide linker. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **21**, 785–801.
69. Randazzo, A., Esposito, V., Ohlenschlager, O., Ramachandran, R. and Mayol, L. (2004) NMR solution structure of a parallel LNA quadruplex. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3083–3092.
70. Dominick, P.K. and Jarstfer, M.B. (2004) A conformationally constrained nucleotide analogue controls the folding topology of a DNA G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5050–5051.
71. Datta, B., Schmitt, C. and Armitage, B.A. (2003) Formation of a PNA(2)–DNA(2) hybrid quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4111–4118.
72. Krishnan-Ghosh, Y., Stephens, E. and Balasubramanian, S. (2004) A PNA(4) quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5944–5945.
73. Sen, D. and Gilbert, W. (1992) Novel DNA superstructures formed by telomere-like oligomers. *Biochemistry*, **31**, 65–70.
74. Guo, Q., Lu, M. and Kallenbach, N.R. (1993) Effect of thymine tract length on the structure and stability of model telomeric sequences. *Biochemistry*, **32**, 3596–3603.
75. Jin, R.Z., Gaffney, B.L., Wang, C., Jones, R.A. and Breslauer, K.J. (1992) Thermodynamics and structure of a DNA tetraplex—a spectroscopic and calorimetric study of the tetramolecular complexes of d(TG3T) and d(TG3T2G3T). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 8832–8836.
76. Esposito, V., Randazzo, A., Piccialli, G., Petraccone, L., Giancola, C. and Mayol, L. (2004) Effects of an 8-bromodeoxyguanosine incorporation on the parallel quadruplex structure [d(TGGGT)](4). *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 313–318.
77. Wang, Y. and Patel, D.J. (1992) Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with antighlycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry*, **31**, 8112–8119.
78. Gavathiotis, E. and Searle, M.S. (2003) Structure of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)(4) containing the human telomeric repeat: evidence for A-tetrad formation from NMR and molecular dynamics simulations. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1650–1656.
79. Sugimoto, N., Ohmichi, T. and Sasaki, M. (1996) The stability of DNA and RNA G-quartets. *Nucleosides Nucleotides*, **15**, 559–567.
80. Wang, Y. and Patel, D.J. (1993) Solution structure of a parallel-stranded G-quadruplex DNA. *J. Mol. Biol.*, **234**, 1171–1183.
81. Kim, J., Cheong, C. and Moore, P.B. (1991) Tetramerization of an RNA oligonucleotide containing a GGGG sequence. *Nature*, **351**, 331–332.

Annexe II

1 Titration n sites équivalents : Concentration en ligand fixé $=C_0$

- concentration ligand fixée $=C_0$
- nombre de sites de fixation $=n$
- concentration en **nombre de sites** $=n \cdot C$ (à chaque ajout)
- $\alpha = [\text{sites liés}] / [\text{sites}]_{\text{tot}}$



État initial	nC	C_0	
A l'équilibre	$(1-\alpha)nC$	$C_0 - \alpha nC$	αnC

$$K_d = \frac{(1-\alpha)(C_0 - \alpha \times n \times C)}{\alpha}$$

D'où $nC\alpha^2 - (K_d + nC + C_0)\alpha + C_0 = 0$

D'où

$$\alpha = \frac{1}{2nC} \left(K_d + nC + C_0 \pm \sqrt{(K_d + nC + C_0)^2 - 4nC \times C_0} \right)$$

Pour la fluorescence :

$$\bar{I}_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + I_{F_{\text{ligand lié}}}$$

$$I_F = (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} C_{\text{ligand libre}} + (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} C_{\text{ligand lié}}$$

$$I_F = (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} \times (C_0 - \alpha nC) + (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} \times \alpha nC$$

$$I_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + \left(\frac{I_{F_{\text{ligand lié}}} - I_{F_{\text{ligand libre}}}}{C_0} \right) \times \alpha nC$$

$$I_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + \left(\frac{I_{F_{\text{ligand lié}}} - I_{F_{\text{ligand libre}}}}{C_0} \right) \times \left(\frac{K_d + nC + C_0 \pm \sqrt{(K_d + nC + C_0)^2 - 4nC \times C_0}}{2} \right)$$

Pour l'absorbance :

Idem en remplaçant I_F par $A = \epsilon l C$

- Si $\alpha' = 1 - \alpha = [\text{sites libres}] / [\text{sites}]_{\text{tot}}$

Site + ligand → complexe

État initial	nC	C_0	
À l'équilibre	$\alpha' nC$	$C_0 - (1 - \alpha') nC$	$(1 - \alpha') nC$

$$K_d = \frac{(\alpha') (C_0 - (1 - \alpha') \times n \times C)}{1 - \alpha'}$$

D'où $nC\alpha'^2 - (nC - K_d - C_0)\alpha' - K_d = 0$
D'où

$$\alpha' = \frac{1}{2nC} \left(nC - K_d - C_0 \pm \sqrt{(nC - K_d - C_0)^2 - 4nC \times K_d} \right)$$

Pour la fluorescence :

$$I_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + \left(\frac{I_{F_{\text{ligand lié}}} - I_{F_{\text{ligand libre}}}}{C_0} \right) \times (1 - \alpha') nC$$

$$I_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + \left(\frac{I_{F_{\text{ligand lié}}} - I_{F_{\text{ligand libre}}}}{C_0} \right) \times \left(nC - \frac{nC - K_d - C_0 \pm \sqrt{(nC - K_d - C_0)^2 - 4nC \times K_d}}{2} \right)$$

Pour l'absorbance :

Idem en remplaçant I_F par $A = \epsilon/C$

...

2 Titration n sites équivalents : Concentration de molécule possédant n sites fixée = C_0

- concentration de molécule (ADN / Protéine / composé) fixée = C_0
- nombre de sites de fixation = n
- concentration en sites de fixation = $n \cdot C_0$
- variation de la concentration en ligand = C (à chaque ajout)
- $\alpha = [\text{ligands liés}] / [\text{ligand}]_{\text{tot}}$



État initial	nC_0	C	
À l'équilibre	$nC_0 - \alpha C$	$(1 - \alpha)C$	αC

$$K_d = \frac{(1 - \alpha)(nC_0 - \alpha C)}{\alpha}$$

D'où $C\alpha^2 - (K_d + C + nC_0)\alpha + C_0 = 0$
D'où

$$\alpha = \frac{1}{2C} \left(K_d + C + nC_0 \pm \sqrt{(K_d + C + nC_0)^2 - 4C \times nC_0} \right)$$

Pour l'absorbance à la longueur d'onde λ en suivant l'absorbance de la molécule:

$$A = A_{\text{molécule libre}} + A_{\text{molécule liée}}$$

$$\frac{A}{l} = \varepsilon_{\text{molécule libre}} C_{\text{molécule libre}} + \varepsilon_{\text{molécule liée}} C_{\text{molécule liée}}$$

$$\frac{A}{l} = \varepsilon_{\text{molécule libre}} (nC_0 - \alpha C) + \varepsilon_{\text{molécule liée}} \alpha C$$

$$A = A_{\text{molécule libre}} + (A_{\text{molécule liée}} - A_{\text{molécule libre}}) \times \frac{\alpha C}{nC_0}$$

$$A = A_{\text{molécule libre}} + \left(\frac{A_{\text{molécule liée}} - A_{\text{molécule libre}}}{nC_0} \right) \times \left(\frac{K_d + C + nC_0 \pm \sqrt{(K_d + C + nC_0)^2 - 4C \times nC_0}}{2} \right)$$

Pour le Dichroïsme Circulaire à la longueur d'onde λ en suivant le signal CD de la molécule:

On a de même :

$$\frac{CD}{l} = \Delta\epsilon_{\text{molécule libre}} (nC_0 - \alpha C) + \Delta\epsilon_{\text{molécule liée}} \alpha C$$

$$CD = CD_{\text{molécule libre}} + \left(\frac{CD_{\text{molécule liée}} - CD_{\text{molécule libre}}}{nC_0} \right) \times \left(\frac{K_d + C + nC_0 \pm \sqrt{(K_d + C + nC_0)^2 - 4C \times nC_0}}{2} \right)$$

Pour la fluorescence :

$$\bar{I}_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + I_{F_{\text{ligand lié}}}$$

$$I_F = (\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} C_{\text{ligand libre}} + (\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} C_{\text{ligand lié}}$$

$$I_F = (\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} \times (1 - \alpha)C + (\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} \times \alpha C$$

$$I_F = (\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} \times C + \left((\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} - (\epsilon I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} \right) \times \left(\frac{K_d + C + nC_0 \pm \sqrt{(K_d + C + nC_0)^2 - 4C \times nC_0}}{2} \right)$$

- Si $\alpha' = 1 - \alpha = [\text{sites libres}] / [\text{sites}]_{\text{tot}}$



État initial nC_0 C
 À l'équilibre $nC_0 - (1 - \alpha')C$ $\alpha'C$ $(1 - \alpha')C$

$$K_d = \frac{\alpha'(nC_0 - (1 - \alpha')C)}{1 - \alpha'}$$

D'où $C\alpha'^2 - (C - K_d - nC_0)\alpha' - K_d = 0$
 D'où

$$\alpha' = \frac{1}{2C} \left(C - K_d - nC_0 \pm \sqrt{(C - K_d - nC_0)^2 - 4C \times K_d} \right)$$

Pour la fluorescence :

$$\bar{I}_F = I_{F_{\text{ligand libre}}} + I_{F_{\text{ligand lié}}}$$

$$I_F = (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} C_{\text{ligand libre}} + (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} C_{\text{ligand lié}}$$

$$I_F = (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} \times \alpha' C + (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} \times (1 - \alpha') C$$

$$I_F = (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} \times C + \left((\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} - (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} \right) \times \left(\frac{C - K_d - nC_0 \pm \sqrt{(C - K_d - nC_0)^2 - 4C \times K_d}}{2} \right)$$

Si $(\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand lié}} \approx 0$

$$I_F \approx (\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}} \times \left(\frac{C - K_d - nC_0 \pm \sqrt{(C - K_d - nC_0)^2 - 4C \times K_d}}{2} \right)$$

$(\epsilon l I_0 \phi_F)_{\text{ligand libre}}$ est à déterminer expérimentalement avec le ligand libre dans des conditions de tampon identiques

Bibliographie

Bibliographie

1. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**: p. 737-8.
2. Franklin, S.E. and R.G. Gosling, *Molecular configuration in sodium thymonucleate*. Nature, 1953. **171**: p. 740-1.
3. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. Nature, 1953. **171**: p. 964-7.
4. Donohue, J., *Hydrogen-Bonded Helical Configurations Of Polynucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1956. **42**: p. 60-5.
5. Felsenfeld, G. and A. Rich, *Studies on the formation of two- and three-stranded polyribonucleotides*. Biochim Biophys Acta, 1957. **26**: p. 457-68.
6. Hoogsteen, K., *The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine*. Acta Crystallographica, 1959. **12**: p. 822-823.
7. Hoogsteen, K., *The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine*. Acta Crystallographica, 1963. **16**: p. 907-916.
8. Rich, A., D.R. Davies, F.H. Crick, and J.D. Watson, *The molecular structure of polyadenylic acid*. J Mol Biol, 1961. **3**: p. 71-86.
9. Gellert, M., M.N. Lipsett, and D.R. Davies, *Helix formation by guanylic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 2013-8.
10. Hays, F.A., A. Teegarden, Z.J. Jones, M. Harms, D. Raup, J. Watson, E. Cavaliere, and P.S. Ho, *How sequence defines structure: a crystallographic map of DNA structure and conformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 7157-62.
11. Creze, C., B. Rinaldi, R. Haser, P. Bouvet, and P. Gouet, *Structure of a d(TGGGGT) quadruplex crystallized in the presence of Li(+) ions*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**: p. 682-688.
12. Pinnavaia, T.J., C.L. Marshall, C.M. Mettler, C.L. Fisk, H.T. Miles, and E.D. Becker, *Alkali metal ion specificity in the solution ordering of a nucleotide, 5'-guanosine monophosphate*. J. Am. Chem. Soc., 1978. **100**: p. 3625-3627.
13. Wong, A. and G. Wu, *Selective Binding of Monovalent Cations to the Stacking G-Quartet Structure Formed by Guanosine 5'-Monophosphate: A Solid-State NMR Study*. J. Am. Chem. Soc., 2003. **125**: p. 13895-13905.
14. Wong, A., R. Ida, L. Spindler, and G. Wu, *Disodium Guanosine 5'-Monophosphate Self-Associates into Nanoscale Cylinders at pH 8: A Combined Diffusion NMR Spectroscopy and Dynamic Light Scattering Study*. J. Am. Chem. Soc., 2005. **127**: p. 6990-6998.
15. Ralph, R.K., W.J. Connors, and H.G. Khorana, *Secondary Structure and Aggregation in Deoxyguanosine Oligonucleotides*. J. Am. Chem. Soc., 1962. **84**: p. 2265-2266.
16. Zimmerman, S.B., G.H. Cohen, and D.R. Davies, *X-ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid*. J Mol Biol, 1975. **92**: p. 181-92.
17. Phillips, K., Z. Dauter, A.I. Murchie, D.M. Lilley, and B. Luisi, *The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 Å resolution*. J Mol Biol, 1997. **273**: p. 171-82.
18. Laughlan, G., A.I. Murchie, D.G. Norman, M.H. Moore, P.C. Moody, D.M. Lilley, and B. Luisi, *The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex*. Science, 1994. **265**: p. 520-4.
19. Venczel, E.A. and D. Sen, *Parallel and antiparallel G-DNA structures from a complex telomeric sequence*. Biochemistry, 1993. **32**: p. 6220-8.

20. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, L. Stryer, and N.D. Clarke, *Biochemistry*. 5th edition ed, ed. S. Moran. Vol. The Molecular Design of life. 2002: W. H. Freeman and Company. Table 13.2. Properties of alkali cations.
21. Guittat, L., et al., *Quadruplex structures and quadruplex ligands*. Dynamical Genetics, ed. V. Parisi, V. De Fonzo, and F. Aluffi-Pentini. 2004, Kerala, India: Research Signpost. 199-236.
22. Parkinson, G.N., M.P. Lee, and S. Neidle, *Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA*. *Nature*, 2002. **417**: p. 876-80.
23. Minton, A.P., *The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media*. *J Biol Chem*, 2001. **276**: p. 10577-80.
24. Dai, J., C. Punchihewa, A. Ambrus, D. Chen, R.A. Jones, and D. Yang, *Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**: p. 2440-50.
25. Dai, J., T.S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R.A. Jones, and D. Yang, *An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution*. *J Am Chem Soc*, 2006. **128**: p. 1096-8.
26. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell*. fourth ed. 2002: Garland Science Textbooks. 1616.
27. Mergny, J.L., A.T. Phan, and L. Lacroix, *Following G-quartet formation by UV-spectroscopy*. *FEBS Lett*, 1998. **435**: p. 74-8.
28. Phan, A.T. and J.L. Mergny, *Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**: p. 4618-25.
29. Miyoshi, D., S. Matsumura, S. Nakano, and N. Sugimoto, *Duplex dissociation of telomere DNAs induced by molecular crowding*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**: p. 165-9.
30. Kan, Z.Y., Y. Lin, F. Wang, X.Y. Zhuang, Y. Zhao, D.W. Pang, Y.H. Hao, and Z. Tan, *G-quadruplex formation in human telomeric (TTAGGG)₄ sequence with complementary strand in close vicinity under molecularly crowded condition*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**: p. 3646-53.
31. Huppert, J.L. and S. Balasubramanian, *Prevalence of quadruplexes in the human genome*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**: p. 2908-16.
32. Todd, A.K., M. Johnston, and S. Neidle, *Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**: p. 2901-7.
33. Bourdoncle, A., A. Estevez Torres, C. Gosse, L. Lacroix, P. Vekhoff, T. Le Saux, L. Jullien, and J.L. Mergny, *Quadruplex-based molecular beacons as tunable DNA probes*. *J Am Chem Soc*, 2006. **128**: p. 11094-105.
34. Eddy, J. and N. Maizels, *Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**: p. 3887-96.
35. Huppert, J.L. and S. Balasubramanian, *G-quadruplexes in promoters throughout the human genome*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**: p. 406-13.
36. Sen, D. and W. Gilbert, *Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis*. *Nature*, 1988. **334**: p. 364-6.
37. Duquette, M.L., P. Handa, J.A. Vincent, A.F. Taylor, and N. Maizels, *Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA*. *Genes Dev*, 2004. **18**: p. 1618-29.
38. French, S.L., Y.N. Osheim, F. Cioci, M. Nomura, and A.L. Beyer, *In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**: p. 1558-68.
39. Hanakahi, L.A., H. Sun, and N. Maizels, *High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA*. *J Biol Chem*, 1999. **274**: p. 15908-12.

40. Jeffreys, A.J., et al., *Human minisatellites, repeat DNA instability and meiotic recombination*. Electrophoresis, 1999. **20**: p. 1665-75.
41. Lew, A., W.J. Rutter, and G.C. Kennedy, *Unusual DNA structure of the diabetes susceptibility locus IDDM2 and its effect on transcription by the insulin promoter factor Pur-1/MAZ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**: p. 12508-12.
42. Kennedy, G.C., M.S. German, and W.J. Rutter, *The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription*. Nat Genet, 1995. **9**: p. 293-8.
43. Maleki, S., H. Cederberg, and U. Rannug, *The human minisatellites MSI, MS32, MS205 and CEB1 integrated into the yeast genome exhibit different degrees of mitotic instability but are all stabilised by RAD27*. Curr Genet, 2002. **41**: p. 333-41.
44. Howell, R.M., K.J. Woodford, M.N. Weitzmann, and K. Usdin, *The chicken beta-globin gene promoter forms a novel "cinched" tetrahelical structure*. J Biol Chem, 1996. **271**: p. 5208-14.
45. Woodford, K.J., R.M. Howell, and K. Usdin, *A novel K(+)-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes*. J Biol Chem, 1994. **269**: p. 27029-35.
46. De Armond, R., S. Wood, D. Sun, L.H. Hurley, and S.W. Ebbinghaus, *Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter*. Biochemistry, 2005. **44**: p. 16341-50.
47. Sun, D., K. Guo, J.J. Rusche, and L.H. Hurley, *Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 6070-80.
48. Cogoi, S. and L.E. Xodo, *G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**: p. 2536-49.
49. Phan, A.T., V. Kuryavyi, S. Burge, S. Neidle, and D.J. Patel, *Structure of an Unprecedented G-Quadruplex Scaffold in the Human c-kit Promoter*. J Am Chem Soc, 2007. **129**: p. 4386-92.
50. Fernando, H., A.P. Reszka, J. Huppert, S. Ladame, S. Rankin, A.R. Venkitaraman, S. Neidle, and S. Balasubramanian, *A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene*. Biochemistry, 2006. **45**: p. 7854-60.
51. Rankin, S., A.P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G.N. Parkinson, A.K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, and S. Neidle, *Putative DNA quadruplex formation within the human c-kit oncogene*. J Am Chem Soc, 2005. **127**: p. 10584-9.
52. Dai, J., D. Chen, R.A. Jones, L.H. Hurley, and D. Yang, *NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**: p. 5133-44.
53. Dexheimer, T.S., D. Sun, and L.H. Hurley, *Deconvoluting the structural and drug-recognition complexity of the G-quadruplex-forming region upstream of the bcl-2 P1 promoter*. J Am Chem Soc, 2006. **128**: p. 5404-15.
54. Phan, A.T., V. Kuryavyi, H.Y. Gaw, and D.J. Patel, *Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter*. Nat Chem Biol, 2005. **1**: p. 167-73.
55. Ambrus, A., D. Chen, J. Dai, R.A. Jones, and D. Yang, *Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization*. Biochemistry, 2005. **44**: p. 2048-58.
56. Phan, A.T., Y.S. Modi, and D.J. Patel, *Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human c-myc promoter*. J Am Chem Soc, 2004. **126**: p. 8710-6.
57. Seenisamy, J., E.M. Rezler, T.J. Powell, D. Tye, V. Gokhale, C.S. Joshi, A. Siddiqui-Jain, and L.H. Hurley, *The dynamic character of the G-quadruplex element in the c-MYC promoter and modification by TMPyP4*. J Am Chem Soc, 2004. **126**: p. 8702-9.

58. Grand, C.L., H. Han, R.M. Munoz, S. Weitman, D.D. Von Hoff, L.H. Hurley, and D.J. Bearss, *The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**: p. 565-73.
59. Seenisamy, J., S. Bashyam, V. Gokhale, H. Vankayalapati, D. Sun, A. Siddiqui-Jain, N. Streiner, K. Shin-Ya, E. White, W.D. Wilson, and L.H. Hurley, *Design and synthesis of an expanded porphyrin that has selectivity for the c-MYC G-quadruplex structure*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**: p. 2944-59.
60. Berberich, S.J. and E.H. Postel, *PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element*. *Oncogene*, 1995. **10**: p. 2343-7.
61. Siddiqui-Jain, A., C.L. Grand, D.J. Bearss, and L.H. Hurley, *Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**: p. 11593-8.
62. Cheong, C. and P.B. Moore, *Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G- and U-quartet structures*. *Biochemistry*, 1992. **31**: p. 8406-14.
63. Kumari, S., A. Bugaut, J.L. Huppert, and S. Balasubramanian, *An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation*. *Nat Chem Biol*, 2007. **3**: p. 218-21.
64. Sacca, B., L. Lacroix, and J.L. Mergny, *The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**: p. 1182-92.
65. Darnell, J.C., K.B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S.T. Warren, and R.B. Darnell, *Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function*. *Cell*, 2001. **107**: p. 489-99.
66. Brown, V., et al., *Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome*. *Cell*, 2001. **107**: p. 477-87.
67. Ramos, A., D. Hollingworth, and A. Pastore, *G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA*. *Rna*, 2003. **9**: p. 1198-207.
68. Schaeffer, C., B. Bardoni, J.L. Mandel, B. Ehresmann, C. Ehresmann, and H. Moine, *The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif*. *Embo J*, 2001. **20**: p. 4803-13.
69. Christiansen, J., M. Kofod, and F.C. Nielsen, *A guanosine quadruplex and two stable hairpins flank a major cleavage site in insulin-like growth factor II mRNA*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**: p. 5709-16.
70. Nussinov, R., *Conserved signals around the 5' splice sites in eukaryotic nuclear precursor mRNAs: G-runs are frequent in the introns and C in the exons near both 5' and 3' splice sites*. *J Biomol Struct Dyn*, 1989. **6**: p. 985-1000.
71. Marcucci, R., F.E. Baralle, and M. Romano, *Complex splicing control of the human Thrombopoietin gene by intronic G runs*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**: p. 132-42.
72. McCullough, A.J. and S.M. Berget, *G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**: p. 4562-71.
73. Kostadinov, R., N. Malhotra, M. Viotti, R. Shine, L. D'Antonio, and P. Bagga, *GRSDB: a database of quadruplex forming G-rich sequences in alternatively processed mammalian pre-mRNA sequences*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**: p. D119-24.
74. Gomez, D., T. Lemarteleur, L. Lacroix, P. Mailliet, J.L. Mergny, and J.F. Riou, *Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**: p. 371-9.
75. Bonnal, S., C. Schaeffer, L. Creancier, S. Clamens, H. Moine, A.C. Prats, and S. Vagner, *A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives*

- fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons.* J Biol Chem, 2003. **278**: p. 39330-6.
76. Wieland, M. and J.S. Hartig, *RNA quadruplex-based modulation of gene expression.* Chem Biol, 2007. **14**: p. 757-63.
 77. Fry, M., *Tetraplex DNA and its interacting proteins.* Front Biosci, 2007. **12**: p. 4336-51.
 78. Kejnovska, I., J. Kypr, and M. Vorlickova, *Oligo(dT) is not a correct native PAGE marker for single-stranded DNA.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**: p. 776-9.
 79. Dempsey, L.A., H. Sun, L.A. Hanakahi, and N. Maizels, *G4 DNA binding by LRI and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination.* J Biol Chem, 1999. **274**: p. 1066-71.
 80. Arimondo, P.B., J.F. Riou, J.L. Mergny, J. Tazi, J.S. Sun, T. Garestier, and C. Helene, *Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**: p. 4832-8.
 81. Larson, E.D., M.L. Duquette, W.J. Cummings, R.J. Streiff, and N. Maizels, *MutSalpha binds to and promotes synopsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions.* Curr Biol, 2005. **15**: p. 470-4.
 82. Walsh, K. and A. Gualberto, *MyoD binds to the guanine tetrad nucleic acid structure.* J Biol Chem, 1992. **267**: p. 13714-8.
 83. Etzioni, S., A. Yafe, S. Khateb, P. Weisman-Shomer, E. Bengal, and M. Fry, *Homodimeric MyoD preferentially binds tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes.* J Biol Chem, 2005. **280**: p. 26805-12.
 84. Yafe, A., S. Etzioni, P. Weisman-Shomer, and M. Fry, *Formation and properties of hairpin and tetraplex structures of guanine-rich regulatory sequences of muscle-specific genes.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 2887-900.
 85. Bock, L.C., L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, and J.J. Toole, *Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin.* Nature, 1992. **355**: p. 564-6.
 86. Weisman-Shomer, P. and M. Fry, *Stabilization of tetrahelical DNA by the quadruplex DNA binding protein QUAD.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**: p. 305-11.
 87. Weisman-Shomer, P. and M. Fry, *QUAD, a protein from hepatocyte chromatin that binds selectively to guanine-rich quadruplex DNA.* J Biol Chem, 1993. **268**: p. 3306-12.
 88. Horvath, M.P. and S.C. Schultz, *DNA G-quartets in a 1.86 Å resolution structure of an Oxytricha nova telomeric protein-DNA complex.* J Mol Biol, 2001. **310**: p. 367-77.
 89. Schaffitzel, C., I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H.J. Lipps, and A. Pluckthun, *In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**: p. 8572-7.
 90. Frantz, J.D. and W. Gilbert, *A novel yeast gene product, G4p1, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids.* J Biol Chem, 1995. **270**: p. 20692-7.
 91. Frantz, J.D. and W. Gilbert, *A yeast gene product, G4p2, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids.* J Biol Chem, 1995. **270**: p. 9413-9.
 92. Wen, J.D., C.W. Gray, and D.M. Gray, *SELEX selection of high-affinity oligonucleotides for bacteriophage Ff gene 5 protein.* Biochemistry, 2001. **40**: p. 9300-10.
 93. Oliver, A.W., I. Bogdarina, E. Schroeder, I.A. Taylor, and G.G. Kneale, *Preferential binding of fd gene 5 protein to tetraplex nucleic acid structures.* J Mol Biol, 2000. **301**: p. 575-84.
 94. Lyonais, S., R.J. Gorelick, J.L. Mergny, E. Le Cam, and G. Mirambeau, *G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**: p. 5754-63.
 95. Hanakahi, L.A., L.A. Dempsey, M.J. Li, and N. Maizels, *Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LRI.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**: p. 3605-10.

96. Srivastava, M. and H.B. Pollard, *Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights*. FASEB J, 1999. **13**: p. 1911-22.
97. Ugrinova, I., K. Monier, C. Ivaldi, M. Thiry, S. Storck, F. Mongelard, and P. Bouvet, *Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 66.
98. Derenzini, M., V. Sirri, D. Trere, and R.L. Ochs, *The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells*. Lab Invest, 1995. **73**: p. 497-502.
99. Bates, P.J., J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, and D.M. Miller, *Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 26369-77.
100. Giraldo, R., M. Suzuki, L. Chapman, and D. Rhodes, *Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: p. 7658-62.
101. Giraldo, R. and D. Rhodes, *The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA*. Embo J, 1994. **13**: p. 2411-20.
102. Fang, G. and T.R. Cech, *Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the beta-subunit of the Oxytricha telomere-binding protein*. Biochemistry, 1993. **32**: p. 11646-57.
103. Fang, G. and T.R. Cech, *The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA*. Cell, 1993. **74**: p. 875-85.
104. Paeschke, K., T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, and H.J. Lipps, *Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**: p. 847-54.
105. Chung, I.K., V.B. Mehta, J.R. Spitzner, and M.T. Muller, *Eukaryotic topoisomerase II cleavage of parallel stranded DNA tetraplexes*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**: p. 1973-7.
106. Sun, H., A. Yabuki, and N. Maizels, *A human nuclease specific for G4 DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**: p. 12444-9.
107. Liu, Z., A. Lee, and W. Gilbert, *Gene disruption of a G4-DNA-dependent nuclease in yeast leads to cellular senescence and telomere shortening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: p. 6002-6.
108. Liu, Z. and W. Gilbert, *The yeast KEM1 gene encodes a nuclease specific for G4 tetraplex DNA: implication of in vivo functions for this novel DNA structure*. Cell, 1994. **77**: p. 1083-92.
109. Liu, Z., J.D. Frantz, W. Gilbert, and B.K. Tye, *Identification and characterization of a nuclease activity specific for G4 tetrastranded DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: p. 3157-61.
110. Fukuda, H., M. Katahira, N. Tsuchiya, Y. Enokizono, T. Sugimura, M. Nagao, and H. Nakagama, *Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UPI*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**: p. 12685-90.
111. Zaug, A.J., E.R. Podell, and T.R. Cech, *Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 10864-9.
112. Salas, T.R., I. Petruseva, O. Lavrik, A. Bourdoncle, J.L. Mergny, A. Favre, and C. Saintome, *Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**: p. 4857-65.
113. Vaughn, J.P., S.D. Creacy, E.D. Routh, C. Joyner-Butt, G.S. Jenkins, S. Pauli, Y. Nagamine, and S.A. Akman, *The DEXH protein product of the DHX36 gene is the major source of tetramolecular quadruplex G4-DNA resolving activity in HeLa cell lysates*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 38117-20.
114. Harrington, C., Y. Lan, and S.A. Akman, *The identification and characterization of a G4-DNA resolvase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 24631-6.

115. Huber, M.D., M.L. Duquette, J.C. Shiels, and N. Maizels, *A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases*. J Mol Biol, 2006. **358**: p. 1071-80.
116. Sun, H., J.K. Karow, I.D. Hickson, and N. Maizels, *The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 27587-92.
117. Mohaghegh, P., J.K. Karow, R.M. Brosh Jr, Jr., V.A. Bohr, and I.D. Hickson, *The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**: p. 2843-9.
118. Li, J.L., R.J. Harrison, A.P. Reszka, R.M. Brosh, Jr., V.A. Bohr, S. Neidle, and I.D. Hickson, *Inhibition of the Bloom's and Werner's syndrome helicases by G-quadruplex interacting ligands*. Biochemistry, 2001. **40**: p. 15194-202.
119. Sun, H., R.J. Bennett, and N. Maizels, *The Saccharomyces cerevisiae Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**: p. 1978-84.
120. Wu, X. and N. Maizels, *Substrate-specific inhibition of RecQ helicase*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**: p. 1765-71.
121. Caponigro, G. and R. Parker, *Mechanisms and control of mRNA turnover in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev, 1996. **60**: p. 233-49.
122. Kamath-Loeb, A.S., L.A. Loeb, E. Johansson, P.M. Burgers, and M. Fry, *Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)_n trinucleotide repeat sequence*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 16439-46.
123. Crabbe, L., A. Jauch, C.M. Naeger, H. Holtgreve-Grez, and J. Karlseder, *Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**: p. 2205-10.
124. Crabbe, L., R.E. Verdun, C.I. Haggbloom, and J. Karlseder, *Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity*. Science, 2004. **306**: p. 1951-3.
125. Schawalder, J., E. Paric, and N.F. Neff, *Telomere and ribosomal DNA repeats are chromosomal targets of the bloom syndrome DNA helicase*. BMC Cell Biol, 2003. **4**: p. 15.
126. Huber, M.D., D.C. Lee, and N. Maizels, *G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**: p. 3954-61.
127. Macaya, R.F., P. Schultze, F.W. Smith, J.A. Roe, and J. Feigon, *Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: p. 3745-9.
128. Li, W.X., A.V. Kaplan, G.W. Grant, J.J. Toole, and L.L. Leung, *A novel nucleotide-based thrombin inhibitor inhibits clot-bound thrombin and reduces arterial platelet thrombus formation*. Blood, 1994. **83**: p. 677-82.
129. Phan, A.T., V. Kuryavyi, J.B. Ma, A. Faure, M.L. Andreola, and D.J. Patel, *An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: a potent inhibitor of HIV-1 integrase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 634-9.
130. Ireson, C.R. and L.R. Kelland, *Discovery and development of anticancer aptamers*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**: p. 2957-62.
131. Dapic, V., V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, and P.J. Bates, *Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxynucleotides*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**: p. 2097-107.
132. Xu, X., F. Hamhouyia, S.D. Thomas, T.J. Burke, A.C. Girvan, W.G. McGregor, J.O. Trent, D.M. Miller, and P.J. Bates, *Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 43221-30.
133. Girvan, A.C., Y. Teng, L.K. Casson, S.D. Thomas, S. Juliger, M.W. Ball, J.B. Klein, W.M. Pierce, Jr., S.S. Barve, and P.J. Bates, *AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**: p. 1790-9.

134. Bates, P., J.L. Mergny, and D. Yang, *Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA*. EMBO Rep, 2007. (**sous presse**).
135. Barnhart, K.M., D.A. Laber, P.J. Bates, J.O. Trent, and D.M. Miller, *AGRO100: The translation from lab to clinic of a tumor-targeted nucleic acid aptamer*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2004. **22**: p. 3126.
136. Laber, D.A., M.A. Choudry, B.S. Taft, L. Bhupalam, V.R. Sharma, F.J. Hendler, and K.M. Barnhart, *A phase I study of AGRO100 in advanced cancer*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2004. **22**: p. 3112.
137. Sharifabrizi, A. and M.S. Eller, *Telomere homolog oligonucleotides and the skin: current status and future perspectives*. Exp Dermatol, 2007. **16**: p. 627-33.
138. Tsai, Y.C., H. Qi, and L.F. Liu, *Protection of DNA ends by telomeric 3' G-tail sequences*. J Biol Chem, 2007. **282**: p. 18786-92.
139. Marsh, T.C. and E. Henderson, *G-wires: self-assembly of a telomeric oligonucleotide, d(GGGGTTGGGG), into large superstructures*. Biochemistry, 1994. **33**: p. 10718-24.
140. Miyoshi, D., H. Karimata, Z.M. Wang, K. Koumoto, and N. Sugimoto, *Artificial G-wire switch with 2,2'-bipyridine units responsive to divalent metal ions*. J Am Chem Soc, 2007. **129**: p. 5919-25.
141. Cohen, H., T. Sapir, N. Borovok, T. Molotsky, R. Di Felice, A.B. Kotlyar, and D. Porath, *Polarizability of G4-DNA observed by electrostatic force microscopy measurements*. Nano Lett, 2007. **7**: p. 981-6.
142. Alberti, P. and J.L. Mergny, *DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**: p. 1569-73.
143. Alberti, P., A. Bourdoncle, B. Sacca, L. Lacroix, and J.L. Mergny, *DNA nanomachines and nanostructures involving quadruplexes*. Org Biomol Chem, 2006. **4**: p. 3383-91.
144. Kaucher, M.S., W.A. Harrell, Jr., and J.T. Davis, *A unimolecular G-quadruplex that functions as a synthetic transmembrane Na⁺ transporter*. J Am Chem Soc, 2006. **128**: p. 38-9.
145. Mathieu, N., L. Pirzio, M.A. Freulet-Marriere, C. Desmaze, and L. Sabatier, *Telomeres and chromosomal instability*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**: p. 641-56.
146. LeBel, C. and R.J. Wellinger, *[The structures at the termini of chromosomes: what is there hidden under the cap?]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**: p. 207-12.
147. Muller, H.J., *The remaking of chromosomes*. Collecting Net, 1938. **13**: p. 181-195, 198.
148. McClintock, B., *The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1939. **25**: p. 405-16.
149. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
150. Olovnikov, A.M., *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**: p. 181-90.
151. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**: p. 458-60.
152. Harley, C.B., *Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?* Mutat Res, 1991. **256**: p. 271-82.
153. Pandita, T.K., C.R. Hunt, G.G. Sharma, and Q. Yang, *Regulation of telomere movement by telomere chromatin structure*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**: p. 131-8.
154. Tham, W.H. and V.A. Zakian, *Transcriptional silencing at Saccharomyces telomeres: implications for other organisms*. Oncogene, 2002. **21**: p. 512-21.
155. Blackburn, E.H. and J.G. Gall, *A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena*. J Mol Biol, 1978. **120**: p. 33-53.
156. Teixeira, M.T. and E. Gilson, *Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm*. Chromosome Res, 2005. **13**: p. 535-48.

157. Jacob, N.K., R. Skopp, and C.M. Price, *G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres*. *Embo J*, 2001. **20**: p. 4299-308.
158. Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott, *All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**: p. 3015-9.
159. Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian, *Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase*. *Cell*, 1993. **72**: p. 51-60.
160. Riha, K., T.D. McKnight, J. Fajkus, B. Vyskot, and D.E. Shippen, *Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures*. *Plant J*, 2000. **23**: p. 633-41.
161. Dreesen, O., B. Li, and G.A. Cross, *Telomere structure and shortening in telomerase-deficient Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**: p. 4536-43.
162. Munoz-Jordan, J.L., G.A. Cross, T. de Lange, and J.D. Griffith, *t-loops at trypanosome telomeres*. *Embo J*, 2001. **20**: p. 579-88.
163. Hemann, M.T. and C.W. Greider, *G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**: p. 3964-9.
164. McElligott, R. and R.J. Wellinger, *The terminal DNA structure of mammalian chromosomes*. *Embo J*, 1997. **16**: p. 3705-14.
165. Chai, W., J.W. Shay, and W.E. Wright, *Human telomeres maintain their overhang length at senescence*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**: p. 2158-68.
166. Makarov, V.L., Y. Hirose, and J.P. Langmore, *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening*. *Cell*, 1997. **88**: p. 657-66.
167. Chai, W., Q. Du, J.W. Shay, and W.E. Wright, *Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands*. *Mol Cell*, 2006. **21**: p. 427-35.
168. Sfeir, A.J., W. Chai, J.W. Shay, and W.E. Wright, *Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes*. *Mol Cell*, 2005. **18**: p. 131-8.
169. Gilson, E. and V. Geli, *How telomeres are replicated*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**: p. 825-38.
170. Verdun, R.E. and J. Karlseder, *Replication and protection of telomeres*. *Nature*, 2007. **447**: p. 924-31.
171. Wang, Y. and D.J. Patel, *Solution structure of a parallel-stranded G-quadruplex DNA*. *J Mol Biol*, 1993. **234**: p. 1171-83.
172. Haider, S., G.N. Parkinson, and S. Neidle, *Crystal structure of the potassium form of an Oxytricha nova G-quadruplex*. *J Mol Biol*, 2002. **320**: p. 189-200.
173. Ambrus, A., D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, and D. Yang, *Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**: p. 2723-35.
174. Luu, K.N., A.T. Phan, V. Kuryavyi, L. Lacroix, and D.J. Patel, *Structure of the human telomere in K⁺ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold*. *J Am Chem Soc*, 2006. **128**: p. 9963-70.
175. Dai, J., M. Carver, C. Punchedhewa, R.A. Jones, and D. Yang, *Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**: p. 4927-40.
176. Phan, A.T., K.N. Luu, and D.J. Patel, *Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K⁺ solution*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**: p. 5715-9.
177. van Overbeek, M. and T. de Lange, *Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase*. *Curr Biol*, 2006. **16**: p. 1295-302.

178. Lenain, C., S. Bauwens, S. Amiard, M. Brunori, M.J. Giraud-Panis, and E. Gilson, *The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair*. Curr Biol, 2006. **16**: p. 1303-10.
179. Schultze, P., F.W. Smith, and J. Feigon, *Refined solution structure of the dimeric quadruplex formed from the Oxytricha telomeric oligonucleotide d(GGGGTTTTGGGG)*. Structure, 1994. **2**: p. 221-33.
180. Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange, *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell, 1999. **97**: p. 503-14.
181. Granotier, C., et al., *Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 4182-90.
182. Cesare, A.J., N. Quinney, S. Willcox, D. Subramanian, and J.D. Griffith, *Telomere looping in P. sativum (common garden pea)*. Plant J, 2003. **36**: p. 271-9.
183. Murti, K.G. and D.M. Prescott, *Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**: p. 14436-9.
184. Nikitina, T. and C.L. Woodcock, *Closed chromatin loops at the ends of chromosomes*. J Cell Biol, 2004. **166**: p. 161-5.
185. Stansel, R.M., T. de Lange, and J.D. Griffith, *T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang*. Embo J, 2001. **20**: p. 5532-40.
186. Amiard, S., et al., *A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**: p. 147-54.
187. Liu, D., M.S. O'Connor, J. Qin, and Z. Songyang, *Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 51338-42.
188. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev, 2005. **19**: p. 2100-10.
189. van Steensel, B. and T. de Lange, *Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1*. Nature, 1997. **385**: p. 740-3.
190. Smogorzewska, A., B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M.R. Schaefer, G. Schnapp, and T. de Lange, *Control of human telomere length by TRF1 and TRF2*. Mol Cell Biol, 2000. **20**: p. 1659-68.
191. van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. Cell, 1998. **92**: p. 401-13.
192. Verdun, R.E. and J. Karlseder, *The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres*. Cell, 2006. **127**: p. 709-20.
193. Wang, R.C., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres*. Cell, 2004. **119**: p. 355-68.
194. Bae, N.S. and P. Baumann, *A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends*. Mol Cell, 2007. **26**: p. 323-34.
195. Baumann, P. and T.R. Cech, *Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans*. Science, 2001. **292**: p. 1171-5.
196. Veldman, T., K.T. Etheridge, and C.M. Counter, *Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype*. Curr Biol, 2004. **14**: p. 2264-70.
197. Hockemeyer, D., A.J. Sfeir, J.W. Shay, W.E. Wright, and T. de Lange, *POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end*. Embo J, 2005. **24**: p. 2667-78.
198. Loayza, D., H. Parsons, J. Donigian, K. Hoke, and T. de Lange, *DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 13241-8.

199. Ye, J.Z., D. Hockemeyer, A.N. Krutchinsky, D. Loayza, S.M. Hooper, B.T. Chait, and T. de Lange, *POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex*. Genes Dev, 2004. **18**: p. 1649-54.
200. Lei, M., A.J. Zaug, E.R. Podell, and T.R. Cech, *Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 20449-56.
201. Xin, H., D. Liu, M. Wan, A. Safari, H. Kim, W. Sun, M.S. O'Connor, and Z. Songyang, *TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase*. Nature, 2007. **445**: p. 559-62.
202. Wang, F., E.R. Podell, A.J. Zaug, Y. Yang, P. Baciú, T.R. Cech, and M. Lei, *The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor*. Nature, 2007. **445**: p. 506-10.
203. Cristofari, G., K. Sikora, and J. Lingner, *Telomerase unplugged*. ACS Chem Biol, 2007. **2**: p. 155-8.
204. Greider, C.W. and E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell, 1985. **43**: p. 405-13.
205. Autexier, C. and N.F. Lue, *The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 493-517.
206. Moriarty, T.J., R.J. Ward, M.A. Taboski, and C. Autexier, *An anchor site-type defect in human telomerase that disrupts telomere length maintenance and cellular immortalization*. Mol Biol Cell, 2005. **16**: p. 3152-61.
207. Huard, S., T.J. Moriarty, and C. Autexier, *The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**: p. 4059-70.
208. Chen, J.L., M.A. Blasco, and C.W. Greider, *Secondary structure of vertebrate telomerase RNA*. Cell, 2000. **100**: p. 503-14.
209. Antal, M., E. Boros, F. Solymosy, and T. Kiss, *Analysis of the structure of human telomerase RNA in vivo*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**: p. 912-20.
210. Legassie, J.D. and M.B. Jarstfer, *The unmasking of telomerase*. Structure, 2006. **14**: p. 1603-9.
211. Theimer, C.A., B.E. Jady, N. Chim, P. Richard, K.E. Breece, T. Kiss, and J. Feigon, *Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals*. Mol Cell, 2007. **27**: p. 869-81.
212. Theimer, C.A., C.A. Blois, and J. Feigon, *Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function*. Mol Cell, 2005. **17**: p. 671-82.
213. Tesmer, V.M., L.P. Ford, S.E. Holt, B.C. Frank, X. Yi, D.L. Aisner, M. Ouellette, J.W. Shay, and W.E. Wright, *Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro*. Mol Cell Biol, 1999. **19**: p. 6207-16.
214. Leeper, T., N. Leulliot, and G. Varani, *The solution structure of an essential stem-loop of human telomerase RNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**: p. 2614-21.
215. Leeper, T.C. and G. Varani, *The structure of an enzyme-activating fragment of human telomerase RNA*. Rna, 2005. **11**: p. 394-403.
216. Mitchell, J.R., J. Cheng, and K. Collins, *A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end*. Mol Cell Biol, 1999. **19**: p. 567-76.
217. Jady, B.E., E. Bertrand, and T. Kiss, *Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal*. J Cell Biol, 2004. **164**: p. 647-52.
218. Ting, N.S., Y. Yu, B. Pohorelic, S.P. Lees-Miller, and T.L. Beattie, *Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 2090-8.
219. Vulliamy, T., A. Marrone, F. Goldman, A. Dearlove, M. Bessler, P.J. Mason, and I. Dokal, *The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita*. Nature, 2001. **413**: p. 432-5.

- 220. Cristofari, G., E. Adolf, P. Reichenbach, K. Sikora, R.M. Terns, M.P. Terns, and J. Lingner, *Human telomerase RNA accumulation in cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation*. Mol Cell, 2007. **27**: p. 882-9.
- 221. Cohen, S.B., M.E. Graham, G.O. Lovrecz, N. Bache, P.J. Robinson, and R.R. Reddel, *Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells*. Science, 2007. **315**: p. 1850-3.
- 222. Mergny, J.L., L. Lacroix, and J.F. Riou, *Telomerase: A Dimeric Menage a Trois*. Chembiochem, 2007. **8**: p. 1483-1485.
- 223. Lafontaine, D.L. and D. Tollervy, *Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**: p. 383-8.
- 224. Vulliamy, T.J. and I. Dokal, *Dyskeratosis congenita: The diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex*. Biochimie, 2007. **(sous presse)**.
- 225. Morin, G.B., *The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats*. Cell, 1989. **59**: p. 521-9.
- 226. Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay, *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science, 1994. **266**: p. 2011-5.
- 227. Wright, W.E., M.A. Piatyszek, W.E. Rainey, W. Byrd, and J.W. Shay, *Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells*. Dev Genet, 1996. **18**: p. 173-9.
- 228. Hiyama, E. and K. Hiyama, *Telomere and telomerase in stem cells*. Br J Cancer, 2007. **96**: p. 1020-4.
- 229. Masutomi, K., et al., *Telomerase maintains telomere structure in normal human cells*. Cell, 2003. **114**: p. 241-53.
- 230. Cristofari, G. and J. Lingner, *Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting*. Embo J, 2006. **25**: p. 565-74.
- 231. Cristofari, G., P. Reichenbach, P.O. Regamey, D. Banfi, M. Chambon, G. Turcatti, and J. Lingner, *Low- to high-throughput analysis of telomerase modulators with Telospot*. Nat Methods, 2007. **4**: p. 851-853.
- 232. Bryan, T.M., A. Englezou, J. Gupta, S. Bacchetti, and R.R. Reddel, *Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity*. Embo J, 1995. **14**: p. 4240-8.
- 233. Dunham, M.A., A.A. Neumann, C.L. Fasching, and R.R. Reddel, *Telomere maintenance by recombination in human cells*. Nat Genet, 2000. **26**: p. 447-50.
- 234. Cesare, A.J. and J.D. Griffith, *Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops*. Mol Cell Biol, 2004. **24**: p. 9948-57.
- 235. Compton, S.A., J.H. Choi, A.J. Cesare, S. Ozgur, and J.D. Griffith, *Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells*. Cancer Res, 2007. **67**: p. 1513-9.
- 236. de Lange, T., *T-loops and the origin of telomeres*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**: p. 323-9.
- 237. Yeager, T.R., A.A. Neumann, A. Englezou, L.I. Huschtscha, J.R. Noble, and R.R. Reddel, *Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body*. Cancer Res, 1999. **59**: p. 4175-9.
- 238. Jiang, W.Q., Z.H. Zhong, J.D. Henson, and R.R. Reddel, *Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference*. Oncogene, 2007. **26**: p. 4635-47.
- 239. Potts, P.R. and H. Yu, *The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**: p. 581-90.
- 240. Cook, B.D., J.N. Dynek, W. Chang, G. Shostak, and S. Smith, *Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres*. Mol Cell Biol, 2002. **22**: p. 332-42.

241. Gomez, M., J. Wu, V. Schreiber, J. Dunlap, F. Dantzer, Y. Wang, and Y. Liu, *PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres*. Mol Biol Cell, 2006. **17**: p. 1686-96.
242. Dantzer, F., M.J. Giraud-Panis, I. Jaco, J.C. Ame, I. Schultz, M. Blasco, C.E. Koering, E. Gilson, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia, and V. Schreiber, *Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**: p. 1595-607.
243. Dynek, J.N. and S. Smith, *Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis*. Science, 2004. **304**: p. 97-100.
244. Opresko, P.L., M. Otterlei, J. Graakjaer, P. Bruheim, L. Dawut, S. Kolvraa, A. May, M.M. Seidman, and V.A. Bohr, *The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2*. Mol Cell, 2004. **14**: p. 763-74.
245. Opresko, P.L., P.A. Mason, E.R. Podell, M. Lei, I.D. Hickson, T.R. Cech, and V.A. Bohr, *POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 32069-80.
246. Opresko, P.L., C. von Kobbe, J.P. Laine, J. Harrigan, I.D. Hickson, and V.A. Bohr, *Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 41110-9.
247. Ivessa, A.S., J.Q. Zhou, V.P. Schulz, E.K. Monson, and V.A. Zakian, *Saccharomyces Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA*. Genes Dev, 2002. **16**: p. 1383-96.
248. Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *DNA damage foci at dysfunctional telomeres*. Curr Biol, 2003. **13**: p. 1549-56.
249. d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson, *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**: p. 194-8.
250. Smogorzewska, A., J. Karlseder, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, and T. de Lange, *DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2*. Curr Biol, 2002. **12**: p. 1635-44.
251. Verdun, R.E., L. Crabbe, C. Haggbloom, and J. Karlseder, *Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle*. Mol Cell, 2005. **20**: p. 551-61.
252. d'Adda di Fagagna, F., M.P. Hande, W.M. Tong, D. Roth, P.M. Lansdorp, Z.Q. Wang, and S.P. Jackson, *Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells*. Curr Biol, 2001. **11**: p. 1192-6.
253. Celli, G.B., E.L. Denchi, and T. de Lange, *Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination*. Nat Cell Biol, 2006. **8**: p. 885-90.
254. Laud, P.R., A.S. Multani, S.M. Bailey, L. Wu, J. Ma, C. Kingsley, M. Lebel, S. Pathak, R.A. DePinho, and S. Chang, *Elevated telomere-telomere recombination in WRN-deficient, telomere dysfunctional cells promotes escape from senescence and engagement of the ALT pathway*. Genes Dev, 2005. **19**: p. 2560-70.
255. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 57-70.
256. Hahn, W.C., S.A. Stewart, M.W. Brooks, S.G. York, E. Eaton, A. Kurachi, R.L. Beijersbergen, J.H. Knoll, M. Meyerson, and R.A. Weinberg, *Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells*. Nat Med, 1999. **5**: p. 1164-70.
257. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**: p. 577-84.
258. De Cian, A., L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.F. Riou, and J.L. Mergny, *Targeting telomeres and telomerase*. Biochimie, 2007. **(sous presse)**.
259. Zahler, A.M., J.R. Williamson, T.R. Cech, and D.M. Prescott, *Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures*. Nature, 1991. **350**: p. 718-20.

- 260. Sun, D., B. Thompson, B.E. Cathers, M. Salazar, S.M. Kerwin, J.O. Trent, T.C. Jenkins, S. Neidle, and L.H. Hurley, *Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound*. J Med Chem, 1997. **40**: p. 2113-6.
- 261. Guo, Q., M. Lu, L.A. Marky, and N.R. Kallenbach, *Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats*. Biochemistry, 1992. **31**: p. 2451-5.
- 262. Wheelhouse, R.T., D. Sun, H. Han, F.X. Han, and L.H. Hurley, *Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**: p. 3261-3262.
- 263. Ford, K., K.R. Fox, S. Neidle, and M.J. Waring, *DNA sequence preferences for an intercalating porphyrin compound revealed by footprinting*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**: p. 2221-34.
- 264. Fedoroff, O.Y., A. Rangan, V.V. Chemeris, and L.H. Hurley, *Cationic porphyrins promote the formation of i-motif DNA and bind peripherally by a nonintercalative mechanism*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 15083-90.
- 265. Ren, J. and J.B. Chaires, *Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 16067-75.
- 266. Parkinson, G.N., R. Ghosh, and S. Neidle, *Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres*. Biochemistry, 2007. **46**: p. 2390-7.
- 267. Rosu, F., E. De Pauw, L. Guittat, P. Alberti, L. Lacroix, P. Mailliet, J.F. Riou, and J.L. Mergny, *Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis*. Biochemistry, 2003. **42**: p. 10361-71.
- 268. Koepfel, F., J.F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P.B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Helene, and J.L. Mergny, *Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**: p. 1087-96.
- 269. Gavathiotis, E., R.A. Heald, M.F. Stevens, and M.S. Searle, *Drug recognition and stabilisation of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat*. J Mol Biol, 2003. **334**: p. 25-36.
- 270. Gowan, S.M., R. Heald, M.F. Stevens, and L.R. Kelland, *Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes*. Mol Pharmacol, 2001. **60**: p. 981-8.
- 271. Guittat, L., *Identification de ligands de quadruplexes de guanines inhibiteurs de l'activité télomérase*, in RDDM USM 503. 2004, Muséum National d'Histoire Naturelle: PARIS.
- 272. Pennarun, G., C. Granotier, L.R. Gauthier, D. Gomez, F. Hoffschir, E. Mandine, J.F. Riou, J.L. Mergny, P. Mailliet, and F.D. Boussin, *Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands*. Oncogene, 2005. **24**: p. 2917-28.
- 273. Mergny, J.L., et al., *Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**: p. 3062-7.
- 274. Fedoroff, O.Y., M. Salazar, H. Han, V.V. Chemeris, S.M. Kerwin, and L.H. Hurley, *NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA*. Biochemistry, 1998. **37**: p. 12367-74.
- 275. Han, H., C.L. Cliff, and L.H. Hurley, *Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 6981-6.
- 276. Read, M.A., A.A. Wood, J.R. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, H.S. Dosanjh, and S. Neidle, *Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships*. J Med Chem, 1999. **42**: p. 4538-46.
- 277. Harrison, R.J., S.M. Gowan, L.R. Kelland, and S. Neidle, *Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**: p. 2463-8.
- 278. Read, M., R.J. Harrison, B. Romagnoli, F.A. Tanious, S.H. Gowan, A.P. Reszka, W.D. Wilson, L.R. Kelland, and S. Neidle, *Structure-based design of selective and potent G*

- quadruplex-mediated telomerase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**: p. 4844-9.
279. Gowan, S.M., J.R. Harrison, L. Patterson, M. Valenti, M.A. Read, S. Neidle, and L.R. Kelland, *A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity*. Mol Pharmacol, 2002. **61**: p. 1154-62.
280. Haider, S.M., G.N. Parkinson, and S. Neidle, *Structure of a G-quadruplex-ligand complex*. J Mol Biol, 2003. **326**: p. 117-25.
281. Hounsou, C., L. Guittat, D. Monchaud, M. Jourdan, N. Saettel, J.L. Mergny, and M.P. Teulade-Fichou, *G-Quadruplex Recognition by Quinacridines: a SAR, NMR, and Biological Study*. ChemMedChem, 2007. **2**: p. 655-66.
282. Reed, J.E., A.A. Arnal, S. Neidle, and R. Vilar, *Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity by square-planar nickel(II) complexes*. J Am Chem Soc, 2006. **128**: p. 5992-3.
283. Dixon, I.M., F. Lopez, A.M. Tejera, J.P. Esteve, M.A. Blasco, G. Pratviel, and B. Meunier, *A G-quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA*. J Am Chem Soc, 2007. **129**: p. 1502-3.
284. Arthanari, H., S. Basu, T.L. Kawano, and P.H. Bolton, *Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**: p. 3724-8.
285. Shin-ya, K., K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa, and H. Seto, *Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from Streptomyces anulatus*. J Am Chem Soc, 2001. **123**: p. 1262-3.
286. Kim, M.Y., H. Vankayalapati, K. Shin-Ya, K. Wierzba, and L.H. Hurley, *Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex*. J Am Chem Soc, 2002. **124**: p. 2098-9.
287. Gomez, D., R. Paterski, T. Lemarteleur, K. Shin-Ya, J.L. Mergny, and J.F. Riou, *Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 41487-94.
288. Kim, M.Y., M. Gleason-Guzman, E. Izbicka, D. Nishioka, and L.H. Hurley, *The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures*. Cancer Res, 2003. **63**: p. 3247-56.
289. Rezler, E.M., J. Seenisamy, S. Bashyam, M.Y. Kim, E. White, W.D. Wilson, and L.H. Hurley, *Telomestatin and diseleno sapphyrin bind selectively to two different forms of the human telomeric G-quadruplex structure*. J Am Chem Soc, 2005. **127**: p. 9439-47.
290. Gavathiotis, E., R.A. Heald, M.F. Stevens, and M.S. Searle, *Recognition and Stabilization of Quadruplex DNA by a Potent New Telomerase Inhibitor: NMR Studies of the 2:1 Complex of a Pentacyclic Methylacridinium Cation with d(TTAGGGT)(4)*. Angew Chem Int Ed Engl, 2001. **40**: p. 4749-4751.
291. Cocco, M.J., L.A. Hanakahi, M.D. Huber, and N. Maizels, *Specific interactions of distamycin with G-quadruplex DNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**: p. 2944-51.
292. Clark, G.R., P.D. Pytel, C.J. Squire, and S. Neidle, *Structure of the first parallel DNA quadruplex-drug complex*. J Am Chem Soc, 2003. **125**: p. 4066-7.
293. Mehta, A.K., Y. Shayo, H. Vankayalapati, L.H. Hurley, and J. Schaefer, *Structure of a quinobenzoxazine--G-quadruplex complex by REDOR NMR*. Biochemistry, 2004. **43**: p. 11953-8.
294. Chen, Q., I.D. Kuntz, and R.H. Shafer, *Spectroscopic recognition of guanine dimeric hairpin quadruplexes by a carbocyanine dye*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: p. 2635-9.
295. White, E.W., F. Tanious, M.A. Ismail, A.P. Reszka, S. Neidle, D.W. Boykin, and W.D. Wilson, *Structure-specific recognition of quadruplex DNA by organic cations: influence of shape, substituents and charge*. Biophys Chem, 2007. **126**: p. 140-53.

296. Ren, J. and J.B. Chaires, *Preferential Binding of 3,3'-Diethyloxadicarbocyanine to Triplex DNA*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**: p. 424-425.
297. Burger, A.M., F. Dai, C.M. Schultes, A.P. Reszka, M.J. Moore, J.A. Double, and S. Neidle, *The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function*. Cancer Res, 2005. **65**: p. 1489-96.
298. Riou, J.F., L. Guittat, P. Mailliet, A. Laoui, E. Renou, O. Petitgenet, F. Megnin-Chanet, C. Helene, and J.L. Mergny, *Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**: p. 2672-7.
299. Tauchi, T., K. Shin-Ya, G. Sashida, M. Sumi, A. Nakajima, T. Shimamoto, J.H. Ohyashiki, and K. Ohyashiki, *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, 2003. **22**: p. 5338-47.
300. Sumi, M., T. Tauchi, G. Sashida, A. Nakajima, A. Gotoh, K. Shin-Ya, J.H. Ohyashiki, and K. Ohyashiki, *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**: p. 1481-7.
301. Shammash, M.A., R.J. Shmookler Reis, C. Li, H. Koley, L.H. Hurley, K.C. Anderson, and N.C. Munshi, *Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**: p. 770-6.
302. Binz, N., T. Shalaby, P. Rivera, K. Shin-ya, and M.A. Grotzer, *Telomerase inhibition, telomere shortening, cell growth suppression and induction of apoptosis by telomestatin in childhood neuroblastoma cells*. Eur J Cancer, 2005. **41**: p. 2873-81.
303. Zhang, L., K. Tamura, K. Shin-ya, and H. Takahashi, *The telomerase inhibitor telomestatin induces telomere shortening and cell death in Arabidopsis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**: p. 39-44.
304. Phatak, P., J.C. Cookson, F. Dai, V. Smith, R.B. Gartenhaus, M.F. Stevens, and A.M. Burger, *Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism*. Br J Cancer, 2007. **96**: p. 1223-33.
305. Incles, C.M., C.M. Schultes, H. Kempfski, H. Koehler, L.R. Kelland, and S. Neidle, *A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**: p. 1201-6.
306. Leonetti, C., S. Amodei, C. D'Angelo, A. Rizzo, B. Benassi, A. Antonelli, R. Elli, M.F. Stevens, M. D'Incalci, G. Zupi, and A. Biroccio, *Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 (3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate) is associated with telomere capping alteration*. Mol Pharmacol, 2004. **66**: p. 1138-46.
307. Douarre, C., D. Gomez, H. Morjani, J.M. Zahm, F. O'Donohue M, L. Eddabra, P. Mailliet, J.F. Riou, and C. Trentesaux, *Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 2192-203.
308. Tahara, H., K. Shin-Ya, H. Seimiya, H. Yamada, T. Tsuruo, and T. Ide, *G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells*. Oncogene, 2006. **25**: p. 1955-66.
309. Gomez, D., M.F. O'Donohue, T. Wenner, C. Douarre, J. Macadre, P. Koebel, M.J. Giraud-Panis, H. Kaplan, A. Kolkes, K. Shin-ya, and J.F. Riou, *The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences in vitro and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells*. Cancer Res, 2006. **66**: p. 6908-12.

310. Gunaratnam, M., O. Greciano, C. Martins, A.P. Reszka, C.M. Schultes, H. Morjani, J.F. Riou, and S. Neidle, *Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **74**: p. 679-89.
311. Gomez, D., T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M.F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-Ya, H. Morjani, C. Trentesaux, and J.F. Riou, *Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**: p. 38721-9.
312. Phatak, P., J.C. Cookson, F. Dai, V. Smith, R.B. Gartenhaus, M.F. Stevens, and A.M. Burger, *Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism*. *Br J Cancer*, 2007.
313. Tauchi, T., K. Shin-ya, G. Sashida, M. Sumi, S. Okabe, J.H. Ohyashiki, and K. Ohyashiki, *Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia*. *Oncogene*, 2006. **25**: p. 5719-25.
314. Mergny, J.L. and J.C. Maurizot, *Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat*. *Chembiochem*, 2001. **2**: p. 124-32.
315. Darby, R.A., M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, N. Brown, C. Barton, T. Brown, and K.R. Fox, *High throughput measurement of duplex, triplex and quadruplex melting curves using molecular beacons and a LightCycler*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**: p. e39.
316. Schultes, C.M., B. Guyen, J. Cuesta, and S. Neidle, *Synthesis, biophysical and biological evaluation of 3,6-bis-amidoacridines with extended 9-anilino substituents as potent G-quadruplex-binding telomerase inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. **14**: p. 4347-51.
317. Guittat, L., A. De Cian, F. Rosu, V. Gabelica, E. De Pauw, E. Delfourne, and J.L. Mergny, *Ascididemin and meridine stabilise G-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1724**: p. 375-84.
318. Goncalves, D.P., R. Rodriguez, S. Balasubramanian, and J.K. Sanders, *Tetramethylpyridiniumporphyrazines--a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands*. *Chem Commun (Camb)*, 2006: p. 4685-7.
319. Shirude, P.S., E.R. Gillies, S. Ladame, F. Godde, K. Shin-Ya, I. Huc, and S. Balasubramanian, *Macrocyclic and Helical Oligoamides as a New Class of G-Quadruplex Ligands*. *J Am Chem Soc*, 2007. **129**: p. 11890-1.
320. Chang, C.C., C.W. Chien, Y.H. Lin, C.C. Kang, and T.C. Chang, *Investigation of spectral conversion of d(TTAGGG)₄ and d(TTAGGG)₁₃ upon potassium titration by a G-quadruplex recognizer BMVC molecule*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**: p. 2846-60.
321. Rodriguez, R., G.D. Pantos, D.P. Goncalves, J.K. Sanders, and S. Balasubramanian, *Ligand-driven G-quadruplex conformational switching by using an unusual mode of interaction*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**: p. 5405-7.
322. Ren, L., A. Zhang, J. Huang, P. Wang, X. Weng, L. Zhang, F. Liang, Z. Tan, and X. Zhou, *Quaternary ammonium zinc phthalocyanine: inhibiting telomerase by stabilizing G quadruplexes and inducing G-quadruplex structure transition and formation*. *Chembiochem*, 2007. **8**: p. 775-80.
323. Xue, Y., Z.Y. Kan, Q. Wang, Y. Yao, J. Liu, Y.H. Hao, and Z. Tan, *Human Telomeric DNA Forms Parallel-Stranded Intramolecular G-Quadruplex in K(+) Solution under Molecular Crowding Condition*. *J Am Chem Soc*, 2007. **129**: p. 11185-11191.
324. Brassart, B., D. Gomez, A. De Cian, R. Paterski, A. Montagnac, K.H. Qui, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.L. Mergny, F. Gueritte, and J.F. Riou, *A new steroid derivative stabilizes g-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**: p. 631-40.
325. Bertrand, H., D. Monchaud, A. De Cian, R. Guillot, J.L. Mergny, and M.P. Teulade-Fichou, *The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes*. *Org Biomol Chem*, 2007. **5**: p. 2555-2559.

- 326. Bales, B.C., T. Kodama, Y.N. Weledji, M. Pitie, B. Meunier, and M.M. Greenberg, *Mechanistic studies on DNA damage by minor groove binding copper-phenanthroline conjugates*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 5371-9.
- 327. Lyounnais, S., C. Hounsou, M.P. Teulade-Fichou, J. Jeusset, E. Le Cam, and G. Mirambeau, *G-quartets assembly within a G-rich DNA flap. A possible event at the center of the HIV-1 genome*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**: p. 5276-83.
- 328. Wyatt, J.R., P.W. Davis, and S.M. Freier, *Kinetics of G-quartet-mediated tetramer formation*. Biochemistry, 1996. **35**: p. 8002-8.
- 329. Mergny, J.L., A. De Cian, A. Ghelab, B. Sacca, and L. Lacroix, *Kinetics of tetramolecular quadruplexes*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 81-94.
- 330. Mergny, J.L. and L. Lacroix, *Analysis of thermal melting curves*. Oligonucleotides, 2003. **13**: p. 515-37.
- 331. Lemarteleur, T., D. Gomez, R. Paterski, E. Mandine, P. Mailliet, and J.F. Riou, *Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**: p. 802-8.
- 332. Patel, S.D., M. Isalan, G. Gavory, S. Ladame, Y. Choo, and S. Balasubramanian, *Inhibition of human telomerase activity by an engineered zinc finger protein that binds G-quadruplexes*. Biochemistry, 2004. **43**: p. 13452-8.
- 333. Damm, K., et al., *A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation*. Embo J, 2001. **20**: p. 6958-68.
- 334. Phillips, R.S., *Parasitisme: Life Cycles and Host Defences against Parasites*. Encyclopedia of life sciences, 2002.
- 335. Snow, R.W., C.A. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint, and S.I. Hay, *The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2005. **434**: p. 214-7.
- 336. Baird, J.K., *Effectiveness of antimalarial drugs*. N Engl J Med, 2005. **352**: p. 1565-77.
- 337. Gardner, M.J., et al., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **419**: p. 498-511.
- 338. Ponzi, M., T. Pace, E. Dore, and C. Frontali, *Identification of a telomeric DNA sequence in Plasmodium berghei*. Embo J, 1985. **4**: p. 2991-5.
- 339. Dore, E., T. Pace, M. Ponzi, R. Scotti, and C. Frontali, *Homologous telomeric sequences are present in different species of the genus Plasmodium*. Mol Biochem Parasitol, 1986. **21**: p. 121-7.
- 340. Vernick, K.D. and T.F. McCutchan, *Sequence and structure of a Plasmodium falciparum telomere*. Mol Biochem Parasitol, 1988. **28**: p. 85-94.
- 341. Figueiredo, L.M., L.H. Freitas-Junior, E. Bottius, J.C. Olivo-Marin, and A. Scherf, *A central role for Plasmodium falciparum subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation*. Embo J, 2002. **21**: p. 815-24.
- 342. Pace, T., M. Ponzi, R. Scotti, and C. Frontali, *Structure and superstructure of Plasmodium falciparum subtelomeric regions*. Mol Biochem Parasitol, 1995. **69**: p. 257-68.
- 343. Figueiredo, L.M., L.A. Pirrit, and A. Scherf, *Genomic organisation and chromatin structure of Plasmodium falciparum chromosome ends*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **106**: p. 169-74.
- 344. Freitas-Junior, L.H., E. Bottius, L.A. Pirrit, K.W. Deitsch, C. Scheidig, F. Guinet, U. Nehrbass, T.E. Wellems, and A. Scherf, *Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of P. falciparum*. Nature, 2000. **407**: p. 1018-22.
- 345. Bottius, E., N. Bakhsis, and A. Scherf, *Plasmodium falciparum telomerase: de novo telomere addition to telomeric and nontelomeric sequences and role in chromosome healing*. Mol Cell Biol, 1998. **18**: p. 919-25.
- 346. Sriwilaijareon, N., S. Petmitr, A. Mutirangura, M. Ponglikitmongkol, and P. Wilairat, *Stage specificity of Plasmodium falciparum telomerase and its inhibition by berberine*. Parasitol Int, 2002. **51**: p. 99-103.

347. Figueiredo, L.M., E.P. Rocha, L. Mancio-Silva, C. Prevost, D. Hernandez-Verdun, and A. Scherf, *The unusually large Plasmodium telomerase reverse-transcriptase localizes in a discrete compartment associated with the nucleolus*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. 1111-22.
348. Figueiredo, L. and A. Scherf, *Plasmodium telomeres and telomerase: the usual actors in an unusual scenario*. Chromosome Res, 2005. **13**: p. 517-24.
349. Freitas-Junior, L.H., R. Hernandez-Rivas, S.A. Ralph, D. Montiel-Condado, O.K. Ruvalcaba-Salazar, A.P. Rojas-Meza, L. Mancio-Silva, R.J. Leal-Silvestre, A.M. Gontijo, S. Shorte, and A. Scherf, *Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites*. Cell, 2005. **121**: p. 25-36.
350. Duraisingh, M.T., T.S. Voss, A.J. Marty, M.F. Duffy, R.T. Good, J.K. Thompson, L.H. Freitas-Junior, A. Scherf, B.S. Crabb, and A.F. Cowman, *Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in Plasmodium falciparum*. Cell, 2005. **121**: p. 13-24.
351. Scherf, A., L.M. Figueiredo, and L.H. Freitas-Junior, *Plasmodium telomeres: a pathogen's perspective*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**: p. 409-14.
352. Cimino-Reale, G., E. Pascale, E. Alvino, G. Starace, and E. D'Ambrosio, *Long telomeric C-rich 5'-tails in human replicating cells*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 2136-40.
353. Moazed, D. and H.F. Noller, *Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA*. Nature, 1987. **327**: p. 389-94.
354. Recht, M.I., S. Douthwaite, K.D. Dahlquist, and J.D. Puglisi, *Effect of mutations in the A site of 16 S rRNA on aminoglycoside antibiotic-ribosome interaction*. J Mol Biol, 1999. **286**: p. 33-43.
355. Recht, M.I., S. Douthwaite, and J.D. Puglisi, *Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics*. Embo J, 1999. **18**: p. 3133-8.
356. Gray, D.M., J.D. Wen, C.W. Gray, R. Repges, C. Repges, G. Raabe, and J. Fleischhauer, *Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities*. Chirality, 2007.
357. Oganessian, L., M.E. Graham, P.J. Robinson, and T.M. Bryan, *Telomerase recognizes g-quadruplex and linear DNA as distinct substrates*. Biochemistry, 2007. **46**: p. 11279-90.
358. Oganessian, L., I.K. Moon, T.M. Bryan, and M.B. Jarstfer, *Extension of G-quadruplex DNA by ciliate telomerase*. Embo J, 2006. **25**: p. 1148-59.
359. Li, X., H. Nishizuka, K. Tsutsumi, Y. Imai, Y. Kurihara, and S. Uesugi, *Structure, interactions and effects on activity of the 5'-terminal region of human telomerase RNA*. J Biochem (Tokyo), 2007. **141**: p. 755-65.
360. Lim, J.K.C., W.G. Rice, M.K. Schwaebe, A. Siddiqui-Jain, K.B. Trent, J.P. Whitten, L.H. Hurley, and D.D. von Hoff, *Clinical development of CX-3543, a novel multi-targeting antitumor agent*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2005. **23**: p. 3206.
361. Bejugam, M., S. Sewitz, P.S. Shirude, R. Rodriguez, R. Shahid, and S. Balasubramanian, *Trisubstituted Isoalloxazines as a New Class of G-Quadruplex Binding Ligands: Small Molecule Regulation of c-kit Oncogene Expression*. J Am Chem Soc, 2007. **129**: p. 12926-7.
362. Papadopoulos, K.P., D.W. Northfelt, D.M. Hufnagel, A.D. Ricart, P.P. Griffin, M.D. Oslund, D.D. Von Hoff, W.G. Rice, J.K. Lim, and R.F. Marschke, *Phase I clinical trial of CX-3543, a protein-rDNA quadruplex inhibitor*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2007. **25**: p. 3585.
363. Azzalin, C.M., P. Reichenback, L. Khorauli, E. Giulotto, and J. Lingner, *Telomeric Repeat Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends*. Science, 2007. **(sous presse)**.
364. Chang, C.C., J.F. Chu, F.J. Kao, Y.C. Chiu, P.J. Lou, H.C. Chen, and T.C. Chang, *Verification of antiparallel G-quadruplex structure in human telomeres by using two-*

- photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy of the 3,6-Bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide molecule*. Anal Chem, 2006. **78**: p. 2810-5.
365. Chang, C.C., J.Y. Wu, C.W. Chien, W.S. Wu, H. Liu, C.C. Kang, L.J. Yu, and T.C. Chang, *A fluorescent carbazole derivative: high sensitivity for quadruplex DNA*. Anal Chem, 2003. **75**: p. 6177-83.
366. Cantor, C.R., M.M. Warshaw, H. Shapiro, *Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides*. Biopolymers, 1970. **9**: p. 1059-1077.
367. Mergny, J.L., J. Li, L. Lacroix, S. Amrane, and J.B. Chaires, *Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. e138.
368. Alberti, P., et al., *Triplex- versus Quadruplex-Specific Ligands and Telomerase Inhibition*, in *Small Molecule DNA and RNA Binders*, D.C.B.P.D.W.D.W. Dr. Martine Demeunynck, Editor. 2004. p. 315-336.
369. Cimino-Reale, G., E. Pascale, E. Battiloro, G. Starace, R. Verna, and E. D'Ambrosio, *The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**: p. E35.
370. Stewart, S.A., I. Ben-Porath, V.J. Carey, B.F. O'Connor, W.C. Hahn, and R.A. Weinberg, *Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence*. Nat Genet, 2003. **33**: p. 492-6.

Résumé

Les quadruplexes de guanines (G4) sont des structures non canoniques d'acides nucléiques formées par des séquences d'ADN ou d'ARN contenant des blocs de guanines. *In vivo*, ces structures pourraient être impliquées de façon transitoire dans de nombreux processus cellulaires, en particulier au niveau des télomères. Dans ce dernier cas, la formation de G4 aux télomères au moyen de ligands favorisant ces structures pourrait limiter la prolifération de cellules tumorales. Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé une méthode de criblage à moyen débit permettant de tester l'effet de diverses molécules sur la stabilisation du G4 télomérique humain. Cette méthode, basée sur la dénaturation thermique de G4 suivie en fluorescence, en présence d'autres structures compétitrices d'ADN, a permis d'identifier plusieurs familles de ligands présentant des affinités et des sélectivités intéressantes, tels que des dérivés macrocycliques de néomycine et des N-méthylbisquinolinium phénanthrolines. Nous avons ensuite caractérisé plus précisément les mécanismes moléculaires expliquant la stabilisation des G4 par divers ligands. L'étude cinétique sur un modèle de G4 tétramoléculaire a permis de mettre en évidence la possibilité d'une accélération importante de la vitesse d'association des G4 par certaines familles de composés. Nous avons également analysé l'inhibition de la télomérase en présence de ces ligands. En utilisant un test d'extension d'amorce par la télomérase, nous avons montré que seuls certains ligands étaient capables d'enrayer l'élongation par la télomérase sur un substrat ne formant pas initialement de G4 intramoléculaire. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les effets cellulaires de ces ligands ne sont pas uniquement corrélés à leur effet sur la télomérase, mais aussi à des effets connexes impliquant d'autres protéines télomériques, essentielles au maintien de télomères fonctionnels. Enfin, nous avons transposé cette stratégie de ciblage du télomère pour limiter la prolifération cellulaire, à l'agent pathogène responsable de la Malaria : *Plasmodium falciparum*. Nous avons montré l'existence d'une extrémité télomérique 3' sortante chez le parasite et son potentiel repliement en G4 dans des conditions physiologiques. Plusieurs molécules stabilisant les G4 télomériques du parasite avec une bonne sélectivité ont été identifiées, et leur impact sur sa prolifération a été testé.

Abstract

Guanine quadruplexes (G4) are non-canonical nucleic acids structures formed by guanine-rich DNA and RNA sequences. *In vivo*, such structures appear to be implicated in genome dynamics, and especially at telomeres. In the latter case, G4 folding at telomeres using ligands stabilizing these structures could limit the proliferation of cancer cells. During this thesis work, we developed a middle-throughput method allowing to test the effect of various molecules on the stabilization of the human telomeric G4. This method is based on thermal dissociation of G4 followed by FRET, in the presence of several DNA competitive structures. It allowed us to identify some series of ligands displaying interesting affinity and selectivity for G4-DNA, such as neomycin-capped macrocycles and N-methylbisquinolinium phenanthroline derivatives. We then characterized more thoroughly the molecular mechanisms by which these ligands could stabilize G4 structures. A kinetic study using a model of tetramolecular G4 showed that some peculiar G4 ligand families were able to strongly increase the association rate of the G4. We also analyzed telomerase inhibition in presence of these ligands. Using a direct primer extension assay, we highlighted that only few ligands were able to interfere with the telomerase processive elongation on a DNA substrate which did not form an intramolecular G4 initially. These results contribute to the already growing suspicion that cellular effects of these ligands are not solely related to their effect on telomerase, but should also result from their effect on other telomeric proteins essential to maintain functional telomeres. Finally, we investigated the possibility to transpose the strategy of targeting telomeres with G4 ligands to limit cellular proliferation, to the pathogen organism responsible for Malaria : *Plasmodium falciparum*. We showed the existence of a 3' telomeric overhang in the parasite and its potential folding into a G4 structure under physiological conditions. We identified several molecules stabilizing the parasite telomeric G4 with a good selectivity *versus* duplex DNA, and we tested these drugs on the parasite proliferation.