

# Quand l'ADN donne du fil à retordre aux topoisomérases

## Une liaison pour le meilleur et pour le pire exploitée dans la conception de médicaments

Paola B. Arimondo et Dominique Guianvarc'h

**Résumé** « *Les topoisomérases sont les véritables magiciennes du monde de l'ADN* », c'est ainsi que James Wang décrit ces étonnantes protéines ubiquitaires et conservées chez tous les organismes vivants, depuis les archaebactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs, en passant par les virus. Elles sont essentielles à la viabilité de tous les organismes, en résolvant les problèmes topologiques dans pratiquement tous les aspects du métabolisme de l'ADN. Pour effectuer ces opérations, une coupure transitoire dans l'ADN est nécessaire. Des produits naturels utilisent cette propriété pour transformer les topoisomérases en poison pour la cellule. Des dérivés de ces substances naturelles sont actuellement utilisés comme médicaments : ainsi certains antibiotiques et antitumoraux ont pour cible les topoisomérases bactériennes et humaines respectivement. Cet article résume brièvement le fonctionnement des topoisomérases d'ADN et le mode d'action de quelques inhibiteurs utilisés en thérapie.

**Mots-clés** Topoisomérases, ADN, agents antitumoraux, antibiotiques.

**Abstract** **DNA, topoisomerases and drugs**  
« *DNA topoisomerases are the magicians of the DNA world* » states James Wang. Nature invented a family of enzymes to solve the topological problems of DNA. By allowing the passage of a DNA strand or a double helix through each other, they can solve all the topological problems of DNA in replication, transcription and other cellular transactions. Natural products exploit the breaks induced in the DNA by the enzyme to poison the cell and induce cell death. Derivatives of these natural products are now currently used as antibiotics when directed against the bacterial topoisomerases, and as anticancer agents when directed against the human topoisomerases I and II. This article presents a brief overview of the mechanism of action of the topoisomerases and their poisoning by the drugs.

**Keywords** Topoisomerases, DNA, antitumor agents, antibiotics.

« *Science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment.* »

Rosalind Franklin, 1940

À l'ère du séquençage des génomes, nos connaissances sur les régions importantes de l'ADN nous incitent maintenant à envisager la conception de petites molécules qui vont agir spécifiquement sur ces séquences afin de réguler certaines activités biologiques. C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos recherches, qui visent à développer des composés capables de se fixer sur des séquences précises de l'ADN afin de moduler des processus biologiques impliqués dans des pathologies.

La découverte de la structure en double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par Watson, Crick, Wilkins et Franklin en 1953 a constitué une étape importante de la biologie moderne [1-3]. Quatre bases forment cette échelle de la vie : deux purines, adénine (A) et guanine (G), et deux pyrimidines, thymine (T) et cytosine (C). L'ADN est constitué de deux chaînes dites complémentaires et l'ordre d'enchaînement des nucléotides définit l'information génétique, segmentée en gènes. L'information codée par la séquence de bases de l'ADN est utilisée par la cellule pour accomplir ses

fonctions au sein d'un organisme vivant. Le maintien de l'intégrité du génome est vital : l'existence de deux brins complémentaires dans l'ADN constitue une sorte de copie de sauvegarde de notre patrimoine génétique, qui se duplique à chaque division cellulaire pendant la *réplication*.

La structure en double hélice a immédiatement suggéré l'idée d'un mécanisme de réplication. Pour cela, les deux brins de la double hélice doivent se dissocier afin de servir de modèle pour la synthèse du brin complémentaire. De plus, la cellule est un volume très étroit et très encombré dans lequel il faut compacter ce fil d'ADN extrêmement long, volumineux et fragile (jusqu'à 40 000 fois). Il suffit d'imaginer que chez l'homme le fil d'ADN de presque deux mètres de long rentre dans un noyau d'environ 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ! En réalité, la double hélice d'ADN présente un degré d'organisation supérieur : la superhélicité. Ce concept a été introduit dans les années 60 à la suite d'une étude réalisée par Vinograd sur de l'ADN circulaire de virus mettant en évidence deux formes différentes du même ADN.

L'image souvent employée pour décrire ces supertours de l'ADN est celle d'un élastique (représentant la double hélice d'ADN) tenu en deux points qui, lorsqu'on lui applique une torsion, a tendance à s'enrouler sur lui-même, donnant lieu à une forme entortillée compacte. Tant que les extrémités de l'élastique sont fixées, cette structure torsadée ne peut pas se démêler. Pour la molécule d'ADN, cette superhélicité est bien présente *in vivo* puisque même si la plupart des génomes ne sont pas circulaires, du fait de l'organisation de la chromatine dans le noyau, l'ADN se présente en fait sous forme de boucles fermées. Ce surenroulement permet de compacter énormément l'ADN et constitue par ailleurs une réserve d'énergie, comparable à ce qui se passe lorsque l'on relâche un ressort maintenu fermé, et qui permet à l'ADN de subir des transitions structurales.

Cependant, pendant les processus biologiques, l'information génétique contenue dans la séquence d'ADN doit pouvoir être lue et être accessible aux diverses protéines qui réalisent ces processus. Pour cela, l'ADN doit être débobiné localement et temporairement en deux brins, ce qui nécessite une machine biologique très efficace capable de gérer les contraintes topologiques de l'ADN, faute de quoi le génome s'effondrerait dans une pelote entremêlée topologiquement dont la cellule ne saurait pas quoi faire. La résolution des brins de l'ADN est un problème complexe mais, comme l'écrivent déjà Watson et Crick, pas insurmontable.

La compréhension du processus de désenroulement de l'ADN a conduit à la découverte d'une famille d'enzymes, les topoisomérases, qui ont la capacité de supprimer les enchevêtrements de l'ADN au moment où c'est nécessaire (pour une revue récente, voir [4]). La protéine  $\omega$  d'*E. coli*, identifiée par James Wang en 1971, fut la première topoisomérase mise en évidence [5]. Il observa que cette enzyme était capable de relâcher un plasmide surenroulé négativement. Un an après, James Champoux et Renato Dulbecco ont identifié une enzyme dans le thymus de veau,

capable de relâcher à la fois l'ADN surenroulé négativement et positivement : c'est la première topoisomérase IB identifiée [6]. Puis en 1976, Gellert *et al.* mirent en évidence encore chez *E. coli* la première topoisomérase II : la *gyrase* [7]. Depuis, un grand nombre de travaux ont permis de caractériser les différentes topoisomérases présentes chez tous les êtres vivants. Après leur découverte, ces enzymes ont suscité un intérêt grandissant lorsqu'elles ont été identifiées comme étant les cibles de différents agents antibiotiques et anticancéreux.

## Les topoisomérases I et II

« Les topoisomérases sont les véritables magiciennes du monde de l'ADN » ; c'est ainsi que James Wang décrit ces étonnantes protéines ubiquitaires, conservées chez tous les organismes vivants, depuis les archaebactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs, en passant par les virus. Elles sont essentielles à la viabilité de tous les organismes, en résolvant les problèmes topologiques dans pratiquement tous les aspects du métabolisme de l'ADN. Elles permettent à des processus tels que la réplication, la transcription et la recombinaison d'avoir lieu et de se dérouler sans accumulation de contraintes sur l'ADN. Elles régulent la superhélicité de l'ADN et sont aussi capables de désenlacer des cercles d'ADN et de démêler de longs fragments, permettant la séparation de plasmides et de chromosomes sans dommage, ce qui est essentiel pour la transmission du matériel génétique aux cellules filles [4]. Chaque topoisomérase peut posséder un ou plusieurs des rôles suivants : relaxation de l'ADN, surenroulement positif ou négatif de l'ADN, caténation et décaténation de deux molécules d'ADN, ou encore la résolution de nœuds entre doubles hélices.

Pour effectuer ces opérations, une coupure transitoire dans l'ADN est nécessaire. La réaction catalysée par toutes les topoisomérases s'effectue en trois temps : coupure d'un

fragment d'ADN, passage d'un autre fragment d'ADN à travers la coupure, et refermeture. À l'issue de cette réaction, la double hélice d'ADN est intacte mais sa topologie a changé (figure 1). Selon la nature simple ou double brin du fragment d'ADN coupé, on distingue deux types de topoisomérases : les topoisomérases de type II font passer des doubles brins d'ADN à travers des coupures doubles brins, et les topoisomérases de type I coupent l'ADN sur un seul brin et catalysent le passage de l'autre fragment d'ADN à travers cette brèche. Les topoisomérases I, qui sont monomériques, n'utilisent pas d'adénosine triphosphate (ATP) ; par contre, les topoisomérases II, qui sont multimériques, utilisent l'ATP afin de coordonner les changements conformationnels de leurs sous-unités pendant le cycle catalytique. Ces deux catégories d'enzymes sont elles-mêmes divisées en sous-familles (A et B), au sein desquelles les membres sont similaires du point de vue de leur structure et de leur mécanisme enzymatique [8].

Du point de vue mécanistique, la réaction catalysée par les topoisomérases est une simple transestérification : elle implique la formation d'une liaison covalente transitoire

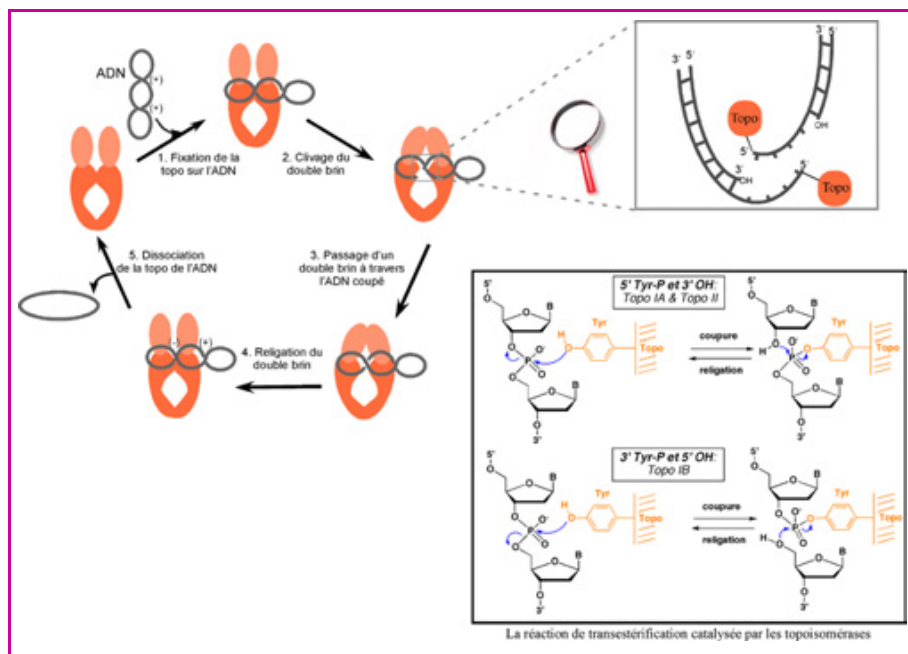


Figure 1 - Schéma simplifié du cycle catalytique d'une topoisomérase II qui relâche un plasmide d'ADN circulaire contenant deux supertours positifs.

Détail de la coupure double brin de l'ADN avec un décalage de quatre paires de bases par les deux sous-unités de l'enzyme. Réactions de transestérification dans laquelle la tyrosine catalytique (Tyr) se lie au phosphate du squelette de l'ADN.


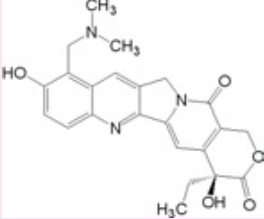

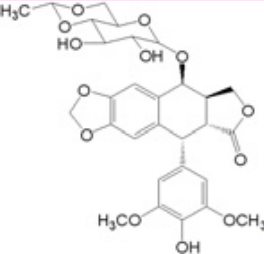
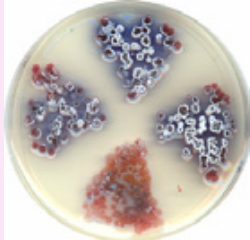
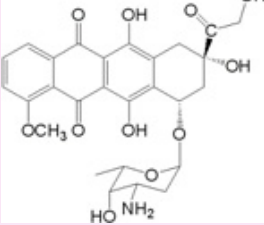

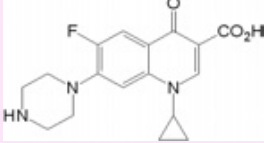
entre un résidu de tyrosine catalytique présent dans le site actif de l'enzyme et le phosphate 5' ou 3' (en fonction du type de la topoisomérase) de la liaison phosphodiester du brin d'ADN concerné (figure 1). Cet intermédiaire transitoire dans lequel l'ADN est coupé et lié de façon covalente à l'enzyme est appelé « complexe de clivage ». Une fois les modifications topologiques effectuées (par passage de brins à travers la brèche ou par rotation de brins), la liaison phosphodiester originale peut se reformer via la réaction de transestérification inverse. Cette étape de religation du ou des brin(s) coupé(s) est évidemment cruciale pour le maintien de l'intégrité de l'ADN. Pendant la réplication, ces opérations de coupure-religation ont lieu toutes les 10-20 paires de bases, ce qui représente, dans une cellule humaine, environ un milliard de coupures et de passages dans l'ADN par cycle de réplication. Pourtant, les dysfonctionnements, qui auraient pour conséquence des coupures irréversibles dans l'ADN, sont rarissimes.

Par leur fonctionnement, les topoisomérases peuvent agir comme transférases de brins de l'ADN ; cette activité de recombinaison d'ADN de la topoisomérase I du virus de la vaccine a été récemment mise à profit pour concevoir des outils maintenant très utilisés en biologie moléculaire afin de cloner des fragments d'ADN dans des plasmides (kit TOPO® TA Cloning d'Invitrogen).

## Les poisons des topoisomérases : anticancéreux et antibiotiques

De nombreux processus nucléaires, essentiels pour la survie cellulaire, ont aussi la capacité de déstabiliser le génome. Étant donné le rôle crucial des topoisomérases dans la plupart des mécanismes génétiques, il n'est pas surprenant de trouver parmi les antibiotiques et les antitumoraux utilisés en thérapie, de nombreux agents qui interfèrent avec ces enzymes (voir tableau I). Le mode d'action de ces composés est assez particulier puisqu'ils agissent en stabilisant les intermédiaires réactionnels dans lesquels l'ADN est clivé et lié de façon covalente à l'enzyme (figure 2). Ces molécules sont appelées *poisons des topoisomérases* puisqu'elles sont capables de transformer la topoisomérase qu'elles ciblent en toxine cellulaire, ou *inhibiteurs des topoisomérases* puisqu'elles inhibent l'étape de religation [9-10]. Elles sont toutefois bien distinctes des inhibiteurs catalytiques qui pour leur part empêchent la topoisomérase d'accomplir son cycle catalytique, par exemple en inhibant sa fixation à l'ADN, ou dans le cas de la topoisomérase II, à l'ATP [11]. En formant un complexe ternaire enzyme-ADN-poison, ces composés sabotent l'action de l'enzyme qui agit alors comme une véritable paire de ciseaux sur le génome, coupant l'ADN irréversiblement en de multiples endroits, conduisant ainsi à la mort cellulaire. La cytotoxicité de ces composés semble directement liée à

Tableau I - Exemples de médicaments inhibiteurs de topoisomérases.  
\*DCI : système des dénominations communes internationales.

Classes d'inhibiteurs	Structure chimique d'un exemple représentatif DCI* (nom commercial)	Activité biologique
<b>Camptothécines</b> 	 <b>Topotécan</b> <b>(Hycamtin®)</b>	Anticancéreux (ovaires, colon)
<b>Epipodophyllotoxines</b> 	 <b>Étoposide</b> <b>(VP16®, Vepesid®)</b>	Anticancéreux (sein, poumon, lymphome)
<b>Anthracyclines</b> 	 <b>Doxorubicine</b> <b>(Adriamycin®, Rubex®)</b>	Anticancéreux (leucémie aiguë, lymphome, sein, poumon)
<b>Fluoroquinolones</b> 	 <b>Ciprofloxacine</b> <b>(ex : Ciflox®)</b>	Antibactérien (infections urinaires, respiratoires, oculaires)

l'accumulation des complexes de clivage. La dualité de l'action des topoisomérases, qui selon les circonstances participent à la protection des cellules contre les dommages de l'ADN ou bien induisent des lésions irréversibles sur celui-ci, leur a valu un parallèle avec le célèbre personnage du roman de Robert Louis Stevenson, « Dr Jekyll et Mr Hyde » [12].

La figure 2 illustre comment sont identifiés expérimentalement les poisons de topoisomérase. Il s'agit d'un test de relaxation d'un plasmide surenroulé (forme I), où l'on utilise le fait que les poisons stabilisent les intermédiaires réactionnels fugaces du cycle catalytique de l'enzyme. En présence de topoisomérase, le plasmide surenroulé (forme I) perd ses

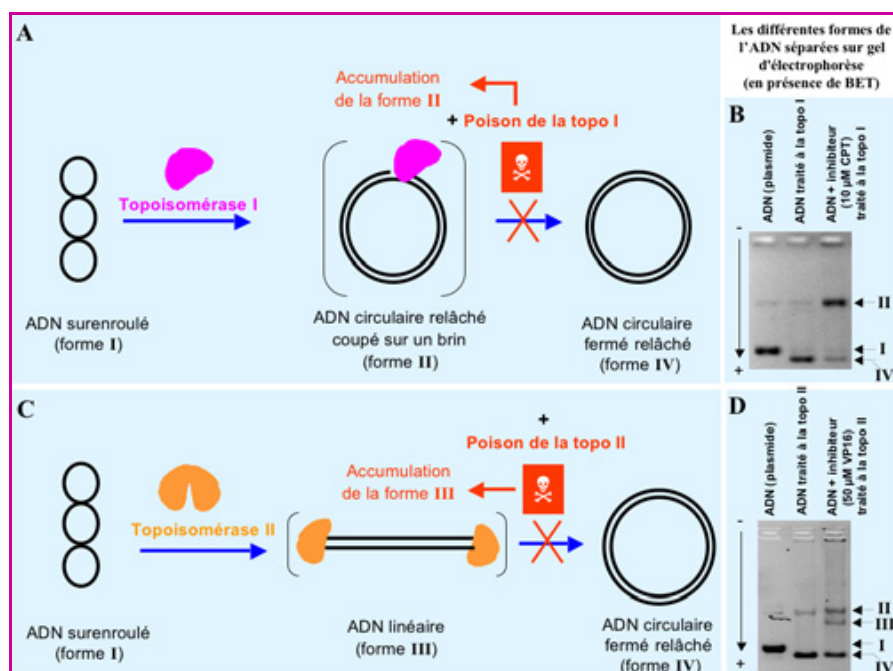


Figure 2 - Représentation schématique du relâchement d'un plasmide d'ADN surenroulé par A) la topoisomérase I et C) la topoisomérase II.

Les formes transitoires clivées (formes II et III), où l'ADN est coupé et lié de façon covalente à l'enzyme, sont stabilisées par un poison des topoisomérases (camptothécine (CPT) pour la topoisomérase I et étoposide (VP16) pour la topoisomérase II). Les différentes formes d'ADN peuvent être séparées dans un gel d'électrophorèse et révélées en présence de bromure d'éthidium. Les figures B et D présentent respectivement un exemple pour chaque topoisomérase. Ce type d'expérience constitue un test simple pour évaluer l'efficacité des inhibiteurs *in vitro*.

supertours pour donner une forme relâchée (forme IV), et ce *via* le passage par une forme intermédiaire dans laquelle l'ADN est coupé sur un brin (forme II) dans le cas de la topoisomérase I, ou sur les deux brins (forme III) dans le cas de la topoisomérase II. Ces intermédiaires réactionnels transitoires sont stabilisés en présence d'inhibiteur. Les différentes formes de l'ADN plasmidique sont séparables par électrophorèse sur gel d'agarose et peuvent être visualisées en présence de bromure d'éthidium qui fluoresce en s'intercalant dans l'ADN double brin. Les formes II et III n'étant visibles qu'en présence d'inhibiteur, ce test de relaxation de plasmide permet aisément d'identifier et de quantifier l'action de nouveaux inhibiteurs de topoisomérases.

La plupart des inhibiteurs de topoisomérases sont d'origine naturelle et leur activité bactéricide ou cytotoxique a été identifiée bien avant que l'on mette en évidence leur effet sur les topoisomérases. Cette origine naturelle suggère que la nature les a développés et sélectionnés au cours de l'évolution afin de permettre aux organismes de mieux se défendre les uns contre les autres [13].

La **camptothécine** (tableau I), par exemple, est un alcaloïde pentacyclique isolé par Wani et Wall en 1966 à partir d'un arbre originaire de Chine, *Camptotheca acuminata* Decne, dont certains extraits étaient utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise. Ses propriétés antitumorales ont rapidement été mises en évidence et des essais cliniques ont été engagés dès les années 70 [14]. Étant donné la faible solubilité de la camptothécine dans l'eau, l'utilisation d'un sel de sodium de la forme carboxylate soluble avait été envisagée. Cependant, l'apparition d'effets secondaires très sévères (cystites hémorragiques et toxicité myéloïde) liés à l'ouverture du cycle lactone a suspendu le développement

de cette molécule comme anticancéreux potentiel. La découverte de la cible de la camptothécine en 1985, qui s'est avérée être la topoisomérase I, a suscité un regain d'intérêt pour cette molécule, permettant de grandes avancées dans la conception d'analogues plus efficaces [15]. Actuellement, deux dérivés hémisynthétiques hydrosolubles, conservant le cycle lactone intact, le topotécan (Hycamtin™) et l'irinotécan (Camptosar®) sont utilisés en clinique dans le traitement de certains cancers ovariens et du côlon, respectivement.

L'**étoposide** (tableau I), dont l'activité antitumorale est liée à l'inhibition de la topoisomérase II humaine, est un dérivé hémisynthétique d'une substance naturelle, la podophyllotoxine, présente dans les racines de *Podophyllum peltatum* (ou « pomme de Mai »), dont les extraits sont utilisés en médecine traditionnelle depuis des siècles. Après la découverte en 1971 de ses propriétés antitumorales, l'étoposide a été commercialisé en 1983 et constitue l'un des médicaments anticancéreux les plus utilisés dans la chimiothérapie de certains cancers comme celui du poumon, des testicules ou de lymphomes, notamment dans la maladie de Hodgkin [16]. Jusqu'à l'arrivée des taxanes, il s'agissait de la molécule la plus

prescrite dans le monde en chimiothérapie. Néanmoins, plusieurs facteurs viennent limiter l'efficacité clinique de l'étoposide tels que l'impact d'effets secondaires importants (myélosuppression) et le développement de résistances de la part des cellules tumorales liées à une augmentation de l'expulsion cellulaire.

La **daunorubicine** et la **doxorubicine** (tableau I) sont des aminoglycosides naturels possédant un chromophore anthraquinone tétracyclique qui leur confère une couleur rouge caractéristique. Ces composés ont été isolés dans les années 60 à partir d'une bactérie du sol, *Streptomyces peucetius*, contenue dans des échantillons de terrains prélevés dans une région du nord des Pouilles en Italie appelée Daunia (d'où l'origine du nom). Ces molécules ont été approuvées dans les années 70 et sont toujours couramment utilisées dans le traitement de diverses tumeurs (leucémies, lymphomes, cancers du sein, poumon, etc.). Elles agissent en s'intercalant dans l'ADN à côté d'une paire de base G•C, mais leur mécanisme d'action antitumorale n'a pas encore été entièrement élucidé. Il a été montré qu'elles sont aussi capables, entre autres, d'inhiber la topoisomérase II humaine [16]. Un inconvénient majeur de ces molécules est leur cardiotoxicité, elles sont donc administrées avec un cardioprotecteur.

Les topoisomérases des bactéries (ADN gyrase et topoisomérase IV) sont également les cibles d'une famille d'antibiotiques couramment utilisés : les **quinolones** [17]. Contrairement aux autres poisons de topoisomérases cités jusqu'à présent, ces composés sont d'origine purement synthétique. La première quinolone ayant des propriétés antibactériennes a été mise en évidence à la fin des années 50 ; il s'agissait en fait d'un produit secondaire (la 7-chloroquinoline) issu de la synthèse de la chloroquine, un

médicament antipaludique. Très rapidement, un analogue de cette molécule, l'acide nalidixique, a été mis sur le marché pour traiter des infections urinaires à Gram-négatif. Les **fluoroquinolones**, toujours issues de la synthèse totale, sont apparues dans les années 80 et constituent la deuxième génération de cette famille d'antibiotiques (*tableau I*). Outre leur efficacité supérieure et leur excellente biodisponibilité, elles possèdent un spectre antibactérien beaucoup plus large incluant les bactéries à Gram-positif. Parmi ces fluoroquinolones, la ciprofloxacine et la levofloxacine font partie des cent médicaments les plus prescrits en Amérique du Nord et sont principalement utilisées dans le traitement des infections urinaires, génitales, oculaires et dans certaines infections respiratoires. Par ailleurs, l'utilisation de ciprofloxacine est préconisée comme traitement de premier choix dans le cas d'infections liées à la bactérie *Bacillus anthracis* (responsable de l'anthrax). Lors de leur utilisation initiale comme antibiotique dans les années 60, le mode d'action moléculaire de ces composés n'était pas encore connu. C'est en utilisant l'acide nalidixique que l'ADN gyrase fut mise en évidence [7, 18]. Les fluoroquinolones forment un complexe ternaire avec l'ADN et l'enzyme qui, en interférant avec la transcription, la réplication et la réparation, devient rapidement bactéricide. Malgré des homologues significatives entre les topoisomérases bactériennes et la topoisomérase II humaine, cette dernière n'est pas affectée par ces agents aux doses employées dans les conditions thérapeutiques. L'émergence de bactéries résistantes à ces antibiotiques est lente mais significative. Cette résistance acquise est liée dans certains cas à des mutations chromosomiques qui, modifiant l'enzyme, diminuent l'affinité des quinolones pour le complexe ADN-topoisomérase.

## Ciblage de poisons : utilisation des conjugués

Malgré l'intérêt incontestable de ces molécules dans le traitement de certains cancers, de nombreux problèmes liés à leur utilisation subsistent. L'un des problèmes majeur est lié au fait que les coupures induites sont peu spécifiques et ont lieu sur des sites multiples et non identifiés de l'ADN. En s'accumulant, ces coupures peuvent devenir létales pour d'autres cellules que les cellules tumorales ou provoquer des translocations chimio-induites. Ce manque de spécificité peut être responsable d'effets secondaires graves chez les patients suivant un tel traitement. Ainsi, l'utilisation de l'étoposide conduit dans 10 % des cas à l'apparition d'une leucémie secondaire survenant dans les dix ans qui suivent la guérison [19].

L'identification de cibles spécifiques du développement tumorale permet maintenant d'envisager la conception d'inhibiteurs dirigés contre celles-ci. À l'heure post-génomique, le développement d'outils qui permettent d'agir en des sites choisis du génome prend toute son importance. Dans ce contexte, nous avons développé une stratégie qui consiste à lier de façon covalente des inhibiteurs de topoisomérase tels que la camptothécine ou l'étoposide à des ligands de l'ADN capables de reconnaître

une séquence d'ADN comprise entre six et vingt paires de bases, afin de positionner l'inhibiteur spécifiquement au site de fixation du ligand et de diriger ainsi la coupure par la topoisomérase uniquement à ce site (*figure 3*) [20-21]. Le choix de chacune des trois entités qui constituent le conjugué (*i.e.* ligand, inhibiteur et bras de liaison, *figure 3*) est évidemment crucial pour obtenir une activité.

Concernant les ligands de l'ADN, il faut qu'ils se fixent durablement sur leur cible, qu'ils soient spécifiques et sélectifs. Deux types de ligands ont été utilisés qui diffèrent par leur structure chimique (de type carboxamide ou oligonucléotide) et par leur site de liaison à l'ADN (dans le petit ou le grand sillon). Les oligonucléotides (nommés TFO pour « triplex-forming oligonucleotide ») se fixent de façon spécifique dans le grand sillon de séquences oligopuriques•oligopyrimidiques de l'ADN *via* la formation de liaisons H spécifiques avec les purines de la paire de base Watson-Crick, formant ainsi localement une structure en triple hélice. Les polyamides (nommés MGB pour « minor groove binding ») constitués de *N*-méthylpyrroles et de *N*-méthylimidazoles adoptent une structure en épingle à cheveux en se fixant dans le petit sillon de l'ADN *via* des interactions spécifiques avec les paires de bases. Les TFO permettent de reconnaître des séquences d'ADN d'une vingtaine de paires de bases à condition que ces séquences soient de type oligopyrimidique•oligopuriques. Cette restriction ne s'applique pas aux MGB qui pour leur part ne peuvent pas reconnaître des séquences supérieures à 6-10 paires de bases. Ces ligands ont régulièrement subi des améliorations *via* l'introduction de différentes modifications chimiques, l'objectif étant à terme d'être en mesure de cibler spécifiquement une séquence unique dans le génome humain.

Le bras de liaison entre le ligand et le poison joue également un rôle important : selon le type d'inhibiteur et la chimie de couplage, il faut adapter la nature et la longueur du

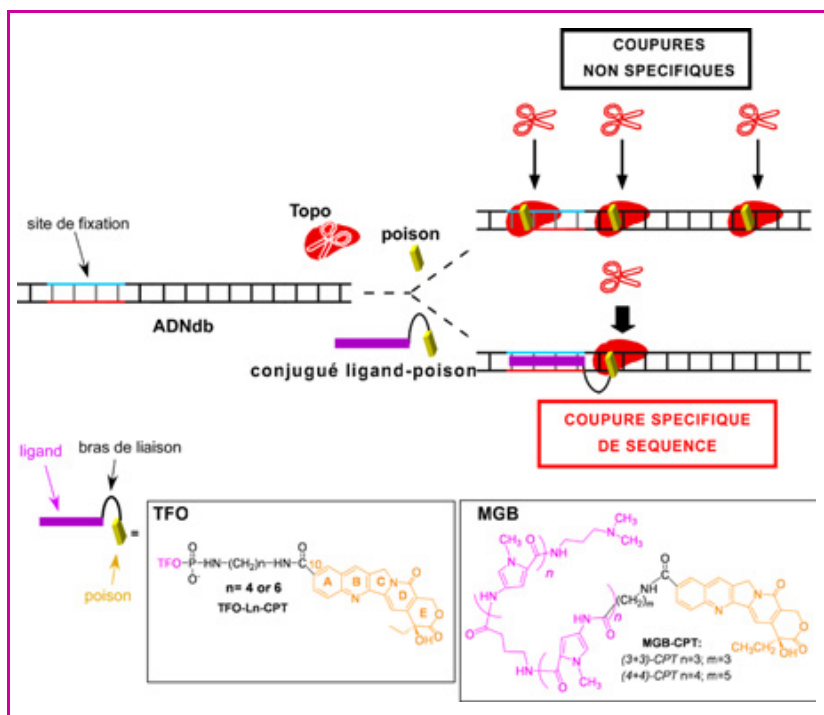


Figure 3 - Ciblage des inhibiteurs de topoisomérase par couplage à des ligands de l'ADN spécifiques de séquence. Exemple de conjugués d'oligonucléotides formant une triple hélice (TFO) et de ligands du petit sillon (MGB) couplés à la camptothécine (CPT).

bras. Un bras trop long conduit à une perte entropique qui diminue l'activité, tandis qu'un bras trop court ne permet pas le positionnement correct de l'inhibiteur dans le complexe ADN/topoisomérase. De la même manière, le point d'attachement du ligand sur l'inhibiteur joue un rôle critique sur l'efficacité du conjugué : il faut en effet que lors de la fixation du ligand sur l'ADN, le poison soit orienté correctement de façon à former un complexe ternaire avec l'enzyme et l'ADN [22].

Enfin, l'efficacité intrinsèque du poison détermine l'efficacité des conjugués : plus l'inhibiteur est puissant et plus le conjugué est efficace [23].

Dans le cas de la topoisomérase I, nous nous sommes intéressés essentiellement à des analogues de la camptothécine (CPT). Les conjugués TFO-CPT ou MGB-CPT ont donné lieu à des résultats très encourageants aussi bien *in vitro* que dans des tests cellulaires (figure 3) [20, 22, 24]. En effet, lorsque l'on compare le profil des sites de coupure de l'ADN en présence d'inhibiteur libre ou conjugué à un ligand, on observe une augmentation des coupures spécifiques au site de fixation du ligand ainsi qu'une diminution des coupures sur les sites éloignés du ligand. De plus, les coupures induites par les conjugués sont plus durables que celles induites par l'inhibiteur libre. La présence du ligand maintient l'inhibiteur dans le complexe ADN/topoisomérase, ce qui rend les conjugués potentiellement plus efficaces. Dans les cellules, les conjugués sont capables d'atteindre leur cible, d'induire des coupures par l'enzyme et d'inhiber l'expression du gène cible. Ces conjugués deviennent donc des ciseaux qui coupent l'ADN et peuvent être dirigés contre des gènes choisis, ce qui leur confère un important potentiel thérapeutique : en les dirigeant contre des gènes impliqués dans le maintien et le développement de certains cancers, ils pourraient permettre d'agir sélectivement sur ces cellules cancéreuses. Actuellement, nous sommes en train de tester l'approche sur le cancer de la prostate.

Dans le cas de la topoisomérase II, nous avons travaillé principalement avec des inhibiteurs de la famille de l'étoposide. Une étude structure-activité de différents analogues de l'étoposide nous a permis de mettre en évidence quelques composés plus efficaces et possédant une fonction chimique compatible avec leur conjugaison à des ligands de l'ADN [25-26]. Les conjugués synthétisés ont été utilisés pour sonder le mécanisme d'inhibition de la topoisomérase II par ces poisons. Nos résultats suggèrent un mécanisme d'inhibition nouveau par rapport à ceux décrits précédemment, dans lequel l'inhibiteur se positionnerait à une articulation de l'enzyme impliquée dans les changements conformationnels qu'elle subit pendant son cycle catalytique. La présence de l'inhibiteur dans l'articulation empêcherait le mouvement des sous-unités de l'enzyme, bloquant ainsi le cycle catalytique [21].

Les conjugués sont donc des agents très puissants qui peuvent être utilisés soit comme outils pour sonder le mécanisme d'action des inhibiteurs et la structure du complexe ternaire ADN/topoisomérase/inhibiteur, soit comme outils thérapeutiques pour développer des chimiothérapies ciblées et plus efficaces. Dans ce cadre, il sera peut-être possible dans l'avenir d'imaginer des médicaments « individualisés », conçus en se basant sur la carte génomique de chaque patient afin de choisir des agents adaptés à une situation pathologique particulière.

## Références

- [1] Franklin S.E., Gosling R.G., Molecular configuration in sodium thymonucleate, *Nature*, **1953**, 171(4356), p. 740.
- [2] Watson J.D., Crick F.H., Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **1953**, 171(4356), p. 737.
- [3] Wilkins M.H. *et al.*, Molecular structure of deoxypentose nucleic acids, *Nature*, **1953**, 171(4356), p. 738.
- [4] Wang J.C., Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2002**, 3(6), p. 430.
- [5] Wang J.C., Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega, *J. Mol. Biol.*, **1971**, 55(3), p. 523.
- [6] Champoux J.J., Dulbecco R., An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA - a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1972**, 69(1), p. 143.
- [7] Gellert M. *et al.*, DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1976**, 73(11), p. 3872.
- [8] Champoux J.J., DNA topoisomerases: structure, function and mechanism, *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, 70, p. 369.
- [9] Burden D.A., Osheroff N., Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1400(1-3), p. 139.
- [10] Meng L.H. *et al.*, Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, 3(3), p. 305.
- [11] Larsen A.K. *et al.*, Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacol. Ther.*, **2003**, 99(2), p. 167.
- [12] Anderson V.E., Osheroff N., Type II topoisomerases as targets for quinolone antibacterials: turning Dr. Jekyll into Mr. Hyde, *Curr Pharm Des.*, **2001**, 7(5), p. 337.
- [13] Capranico G. *et al.*, DNA topoisomerase inhibitors, *Cancer Chemother Biol. Response Modif.*, **1996**, 16, p. 68.
- [14] Wall M.E. *et al.*, Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, p. 3888.
- [15] Thomas C.J. *et al.*, Camptothecin: current perspectives, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12(7), p. 1585.
- [16] Baldwin E.L., Osheroff N., Etoposide, topoisomerase II and cancer, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2005**, 5(4), p. 363.
- [17] Mitscher L.A., Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents, *Chem. Rev.*, **2005**, 105(2), p. 559.
- [18] Sugino A. *et al.*, Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74(11), p. 4767.
- [19] Felix C.A., Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors, *Med. Pediatr. Oncol.*, **2001**, 36(5), p. 525.
- [20] Arimondo P.B. *et al.*, Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates, *Mol. Cell Biol.*, **2006**, 26(1), p. 324.
- [21] Duca M. *et al.*, Molecular basis of the targeting of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by VP16 derivatives conjugated to triplex-forming oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34(6), p. 1900.
- [22] Arimondo P.B. *et al.*, Design and optimization of camptothecin conjugates of triple helix-forming oligonucleotides for sequence-specific DNA cleavage by topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(5), p. 3132.
- [23] Arimondo P.B. *et al.*, Targeting topoisomerase I cleavage to specific sequences of DNA by triple helix-forming oligonucleotide conjugates. A comparison between a rebeccamycin derivative and camptothecin, *C.R. Acad. Sci. III*, **1999**, 322(9), p. 785.
- [24] Arimondo P.B. *et al.*, Directing topoisomerase I mediated DNA cleavage to specific sites by camptothecin tethered to minor- and major-groove ligands, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, 40(16), p. 3045.
- [25] Guianvarc'h D. *et al.*, Synthesis and biological activity of sulfonamide derivatives of epipodophyllotoxin, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47(9), p. 2365.
- [26] Duca M. *et al.*, Synthesis and biological study of a new series of 4'-demethylepipodophyllotoxin derivatives, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48(2), p. 593.



**P.B. Arimondo**

**Paola B. Arimondo**

(auteur correspondant)  
est chargée de recherche  
au laboratoire Régulation et  
dynamique des génomes\*.

**Dominique Guianvarc'h**  
est maître de conférences  
en chimie bioorganique\*\*.



**D. Guianvarc'h**

\* UMR 5153 CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle USM0503, Inserm UR565, Laboratoire Régulation et dynamique des génomes, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05.  
Courriel : arimondo@mnhn.fr

\*\* Synthèse, structure et fonction de molécules bioactives, Université Paris 6, UMR 7613 CNRS, 4 place Jussieu, 75005 Paris.