

Mécanismes de résistance aux « ligands g-quadruplexes » inhibiteurs de télomérase

Hamid Morjani, Jérôme Macadre, Céline Douarre, Lahcen Eddabra, Dennis Gomez, Thomas Wenner, Chantal Trentesaux Et Jean-François Riou

JE 2428 Onco-Pharmacologie, IFR 53, UFR de Pharmacie, 51096 Reims, France
Fax : 00 33 3 26 91 89 26 – E-mail : hamid.morjani@univ-reims.fr

Résumé

L'extrémité du télomère est composée d'un ADN simple-brin riche en guanine qui peut adopter des structures particulières comme la "T-loop" ou le G-quadruplexe, une structure à quatre brins de l'ADN formée par les répétitions de guanines. L'ADN simple-brin télomérique est le substrat de la télomérase, une enzyme nécessaire à la réplication du télomère qui est surexprimée dans la majorité des cellules cancéreuses et qui participe au processus de tumorigenèse. La formation d'un G-quadruplexe au niveau du télomère bloque l'activité de la télomérase et représente une stratégie originale pour rechercher de nouveaux agents anticancéreux. Grâce à une approche combinant le criblage et la synthèse rationnelle, plusieurs séries de molécules ont été identifiées pour se fixer spécifiquement au quadruplexe télomérique. Ces dérivés dénommés sous le terme générique de « ligands de l'ADN G-quadruplexe » sont capables de bloquer la réplication des télomères dans les cellules cancéreuses et provoquent la sénescence répliquative et/ou l'apoptose après un délai de plusieurs cycles cellulaires. Les travaux de notre équipe portent d'une part sur la caractérisation des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires de ces ligands. D'autre part, et à l'aide de modèles cellulaires résistants à ces ligands, nous avons démontré que le télomère représente la cible d'action intracellulaire principale de ces molécules ainsi que l'existence implicite d'une résistance aux ligands de l'ADN G-quadruplexe due à des modifications des protéines du télomère ainsi qu'à une modification de la réponse cellulaire à l'induction de l'apoptose et/ou la sénescence en fonction du « ligand » qui a servi à la sélection. En collaboration avec des partenaires académiques et industriels l'optimisation de ces ligands en dérivés pharmacologiquement actifs devrait permettre la validation *in vivo* de ce nouveau concept thérapeutique.

Mots clés :

Introduction

Chez les eucaryotes, les extrémités des chromosomes sont protégées par des structures particulières, les télomères. Ceux-ci contiennent un grand nombre de séquences répétées, de type (TTAGGG)_n chez l'homme, formant des complexes avec des protéines spécifiques (Telomerase Repeat Factors TRF1, TRF2...) (Blackburn, 2001), (Figure 1). Les télomères comportent une région simple-brin proéminente à leur extrémité 3', susceptible de former des structures en quadruplexe de G (G4) par des appariements de type Hoogsteen, mais aussi des boucles (T-loops) en envahissant le duplex en amont de la partie simple-brin (Griffith et al., 1999).

Les télomères permettent à la fois de stabiliser et de maintenir l'individualité des chromosomes, en empêchant par exemple leur fusion. Les cellules somatiques normales possèdent une capacité limitée à

se diviser, du fait du raccourcissement des télomères à chaque division (Shay, 1995), un phénomène qui conduit à la sénescence des cellules. Au contraire, les cellules tumorales peuvent se diviser indéfiniment et cette propriété coïncide avec le maintien de la longueur des télomères dans ces cellules par induction de la télomérase à un niveau élevé d'expression (Counter et al, 1992). La télomérase est donc devenue rapidement une cible intéressante pour le développement de produits anticancéreux (Lavelle et al, 2000) avec un mode d'action radicalement différent de celui des poisons des topoisomérases I et II utilisés couramment en chimiothérapie (Duguet et Riou, 1994). La stabilisation des structures en G4 par divers ligands (Figure 2), qui a pour conséquence de bloquer l'élongation effectuée par la télomérase, est une autre voie thérapeutique activement développée actuellement (Mergny et Helene, 1998).

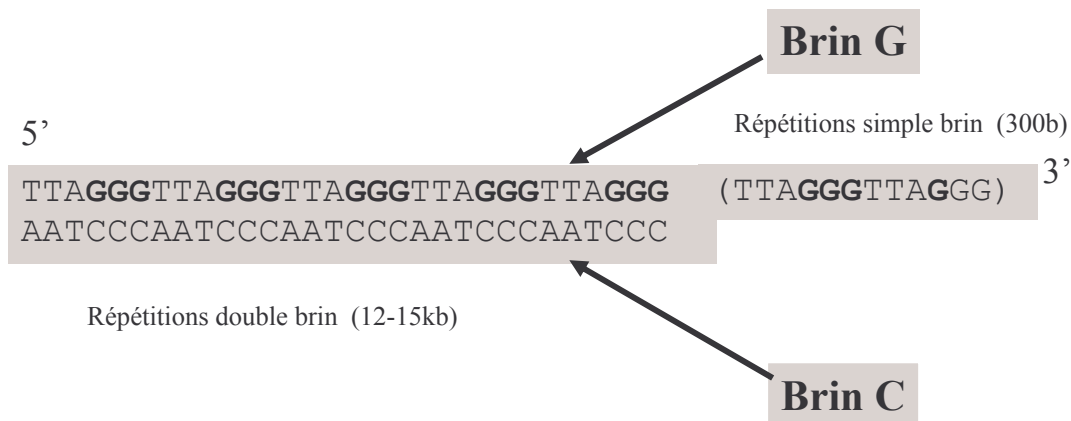


Figure 1 : Répétitions TTAGGG au niveau de l'ADN simple brin du télomère

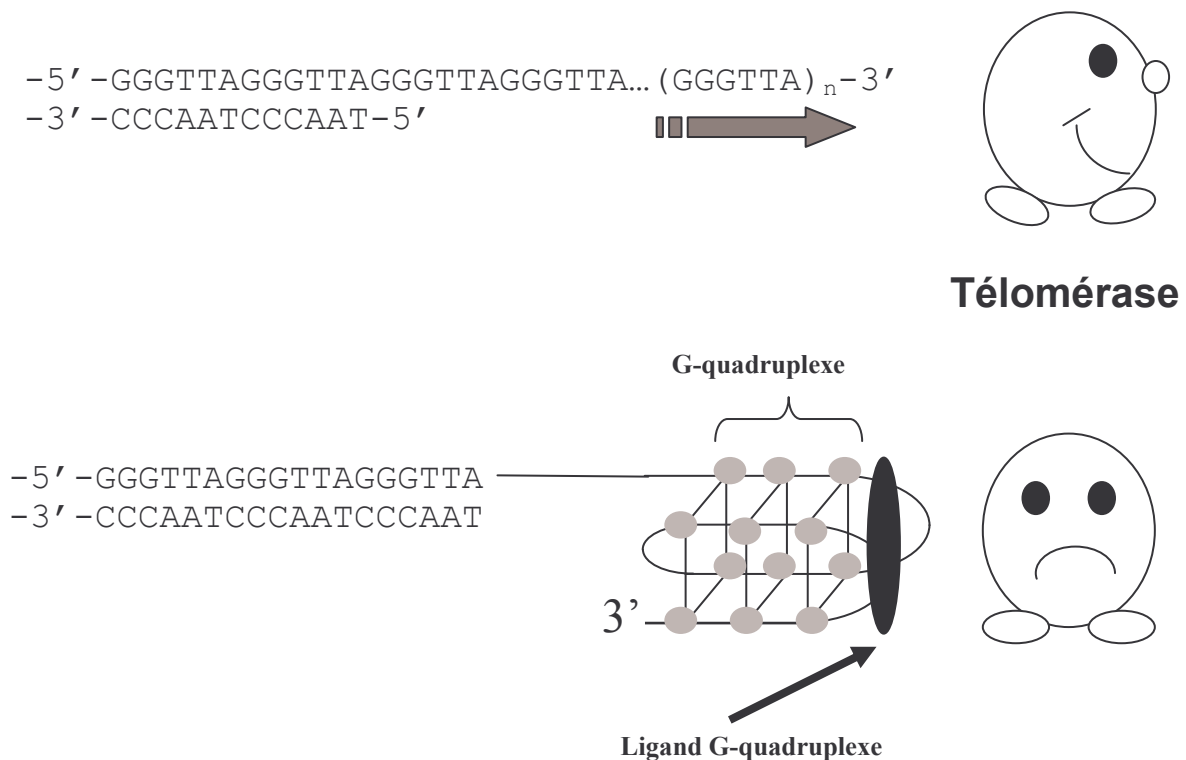


Figure 2 : Inhibition de la telomerase par les G-quadruplexes

Identification de ligands g-quaruplexes

En collaboration avec Sanofi-Aventis et le Muséum National d'Histoire Naturelle, notre équipe a identifié des dérivés triazine et en particulier le 12459 (figure 3), capables d'interagir avec les structures G-quadruplexes télomériques et de bloquer

l'activité de la télomérase (Riou et al., 2002). L'équipe a mis au point un nouveau test de criblage permettant d'évaluer les propriétés inhibitrices de ligands G4 vis à vis de la télomérase (Gomez et al., 2002). Ce test permet de discriminer, à l'aide d'un primer modifié TSG4, entre une inhibition catalytique de la télomérase et une inhibition de la télomérase liée à la stabilisation de structure G4 et permet de

déterminer la sélectivité de l'inhibition de l'activité télomérase par rapport à l'activité taq polymérase. Comme d'autres groupes l'avaient démontré pour d'autres ligands, un traitement cellulaire à long terme

par ces ligand G4 entraîne une diminution de la longueur du télomère et conduit à une sénescence répliquative des cellules tumorales (Riou et al., 2002 ; Gomez et al., 2004a).

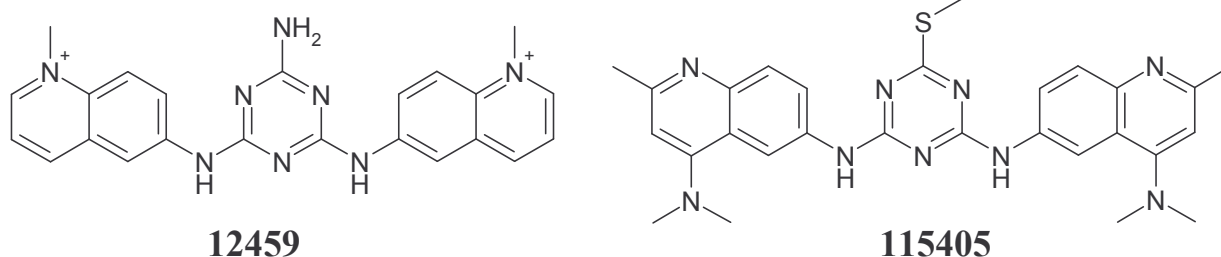


Figure 3 : Structure du 12459 et 115405

De façon indirecte, l'existence de structure de type G4 dans les cellules humaines a été montrée (Gomez et al., 2004b). Les ligands G4 peuvent se fixer rapidement sur la séquence simple brin télomérique et qu'ils peuvent induire à court terme une dégradation de cette extrémité. Ces résultats établissent le premier lien entre une réorganisation conformationnelle du télomère simple brin par les ligands G4 et l'instabilité télomérique (Gomez et al., 2003a).

Pour l'ensemble des ligands G4 une mort cellulaire par apoptose peut être observée après un délai de 2 ou 3 cycles de division cellulaire. Cette apoptose s'accompagne également d'une forte instabilité télomérique, avec l'apparition, au cours de la mitose, de pontages anaphasiques et de chromosomes quadricentriques.

Résistance aux ligands de g-quadruplexes

Nous avons sélectionné plusieurs lignées A549 (carcinome des bronches) résistantes au dérivé 12459 (Gomez et al., 2003a, 2003b). Les clones JFD obtenus par mutagenèse, montrent une résistance stable à une activité apoptotique du 12459. La lignée JFA2 est obtenue par sélection de la résistance à l'induction de sénescence par le 12459.

La moitié des clones JFD analysés (8/15) présentent une surexpression de l'activité transcriptionnelle de hTERT, qui se traduit par une augmentation de l'activité télomérase et de la longueur des télomères. Le phénotype de résistance de ces clones ne correspond pas à une surexpression des gènes de multidrogue résistance, tels que MDR1, BCRP et MRP1. L'expression transcriptionnelle des gènes correspondant aux protéines télomériques hPot1, TRF1, TRF2 et des hélicases WRN et BLM n'est pas modifiée dans ces clones. Dans les clones JFD

surexprimant l'activité télomérase, on observe une augmentation des jonctions anaphasiques des extrémités télomériques, ce qui traduit une altération de la structure et de la protection des télomères dans les cellules résistantes (Gomez et al., 2003a).

La transfection de hTERT (partie catalytique de la télomérase) ou d'un dominant négatif de hTERT dans la lignée parentale A549 ne provoque aucune modification de la sensibilité (induction d'apoptose ou de sénescence) aux ligands de G-quadruplexe, ce qui suggère que le niveau d'activité télomérase n'est pas le déterminant principal de l'activité de ces ligands. L'introduction d'un dominant négatif de hTERT dans la lignée JFD18 restaure la sensibilité à l'activité apoptotique du 12459, ce qui suggère un rôle de la télomérase dans le mécanisme de résistance à ce ligand de G-quadruplexe. Dans ce modèle résistant, l'activité de protection de la télomérase devient un facteur nécessaire pour maintenir la structure du télomère sous l'action du 12459.

La lignée résistante à la sénescence JFA2, établie en présence de concentrations croissantes de 12459, présente une surexpression d'un facteur 2 de l'activité transcriptionnelle de hTERT et un allongement de la taille des télomères. JFA2 présente une résistance croisée (facteur 5) à l'effet court terme (apoptose) du 12459, mais ne présente pas de résistance croisée, à court terme, vis-à-vis de la télomestatine et du BRACO19, deux ligands de G-quadruplexe d'une autre série chimique (Gomez et al., 2003b). Par contre la lignée JFA2 présente une résistance croisée vis-à-vis de l'induction de sénescence par la télomestatine. La surexpression de l'activité télomérase dans la lignée résistante JFA2 est associée avec une absence de raccourcissement des télomères et une résistance à l'induction de sénescence par le

12459 et par la télomestatine, un autre ligand de G-quadruplexe.

A l'inverse, les clones JFD10 et 18 ne montrent pas de résistance à l'induction de sénescence par le 12459 ou la télomestatine, ce qui suggère que la modulation de l'activité transcriptionnelle de hTERT n'est pas un facteur suffisant pour induire la résistance à l'induction de sénescence par ces ligands de G4. D'autre part, une étude plus récente, nous a permis de montrer que certains des clones résistants qui surexpriment h-TERT présentaient une surexpression de Bcl-2, protéine responsable de la résistance de ces cellules à l'apoptose induite par le 12459 à court terme mais pas à la sénescence induite à long terme (Douarre et al., 2005). D'autres facteurs que hTERT participeraient donc aux mécanismes d'action des ligands G4 et d'autres protéines télomériques semblent aussi jouer un rôle important dans la structure, la protection et l'allongement des télomères (figure 4) (Riou et al., 2005).

TRF1 et TRF2 interagissent avec le télomère double-brin. Pot1 interagit avec le télomère simple-brin. PIP1 (appelé aussi TINT1 ou PTOP) relaie l'interaction entre POT1 et le complexe TIN2/TRF1. PIP1 interagit à la fois avec POT1 et TIN2 par 2 domaines

différents. La connexion entre TRF1 et TRF2 par TIN2 permet de relier les fonctions de modulation de l'activité télomérase avec les fonctions de modulation de la protection des télomères. Ces facteurs font l'objet de recherche approfondie au sein de notre groupe sur des modèles cellulaires résistants mais cette fois-ci établis en présence d'une nouvelle génération de ligands G4 de la famille des pyridine dicarboxamide 307A et 360A (Figure 5).

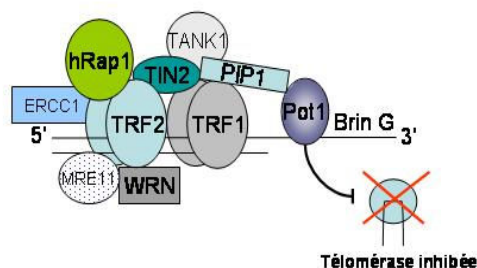


Figure 4 : Protéines interagissant avec l'extrémité télomérique

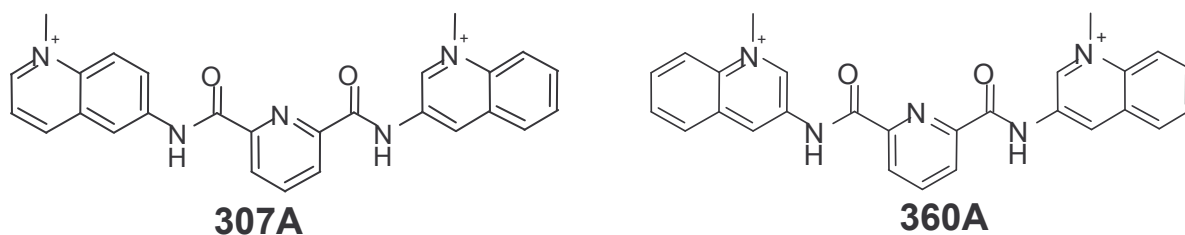


Figure 5 : Structure du 307A et 360A

L'objectif général est de permettre d'explorer d'autres mécanismes moléculaires permettant le maintien et l'allongement des télomères dans les lignées tumorales humaines. A terme ce projet permettra de disposer de modèles cellulaires résistants pour le criblage de nouveaux ligands G4.

Remerciements

Ces travaux sont soutenus par l'action Concertée Incitative Molécules et Cibles Thérapeutiques (ACI 324), l'Association pour la Recherche contre le Cancer (contrat 4691), Ligue Nationale contre le Cancer (labellisation 2006-2008), PHRC National - Cohorte de Collection de Matériels Biologiques, le Conseil Régional de Champagne Ardenne et par l'ARERS.

Bibliographie

- Blackburn, E.H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**, 661-73.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. and Bacchetti, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, **11**, 1921-9.
- Douarre, C., Gomez, D., Morjani, H., Zahm, JM., O'Donohue, MF., Eddabra, L., Mailliet, P., Riou, JF., Trentesaux, C. (2005) 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.* **33**: 2192-2203.

- Duguet, M. and Riou, J.F. (1994) De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux. *Medecine/Science*, **10**, 962-72.
- Gomez D, Mergny JL, Riou JF. (2002) Detection of telomerase inhibitors based on g-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res.* **62**: 3365-8.
- Gomez, D., Aouali, N., Londono-Vallejo, A., Lacroix, L., Megnin-Chanet, F., Lemarteleur, T., Douarre, C., Shin-ya, K., Mailliet, P., Trentesaux, C., Morjani, H., Mergny, J.L. and Riou, J.F. (2003a) Resistance to the short-term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration. *J Biol Chem*, **278**, 50554-62.
- Gomez, D., Aouali, N., Renaud, A., Douarre, C., Shin-Ya, K., Tazi, J., Martinez, S., Trentesaux, C., Morjani, H. and Riou, J.F. (2003b) Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase. *Cancer Res*, **63**, 6149-53.
- Gomez, D., Lemarteleur, T., Lacroix, L., Mailliet, P., Mergny, J.L. and Riou, J.F. (2004a) Telomerase down-regulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, **32**, 371-379.
- Gomez, D., Paterski R., Lemarteleur, T., Shin-Ya K., Mergny, J.L. and Riou, J.F (2004b) Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang. *J Biol Chem*. **279**, 41487-94.
- 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**, 503-14.
- Lavelle, F., Riou, J.F., Laoui, A. and Mailliet, P. (2000) Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit Rev Oncol Hematol*, **34**, 111-26.
- Mergny, J.L. and Helene, C. (1998) G-quadruplex DNA: a target for drug design. *Nat Med*, **4**, 1366-7.
- Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, Mergny JL.(2002). Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2672-2677.
- Riou, JF., Gomez, D., Mergny, JL., Guittat, L., Paterski, R., Chenais, B, Morjani, H., Trentesaux, C. (2005) Régulation de la longueur des télomères : rendre le télomère accessible ? [Bull Cancer](#) (2005) **92**, 11-22.
- Shay, J.W. (1995) Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection ? *Mol Med Today*, **1**, 378-84.