

Prolifération, cancer et apoptose

L'oxyde d'arsenic : après l'acide rétinoïque, un nouveau traitement ciblé de la leucémie aiguë promyélocytaire

Les dérivés de l'arsenic semblent être entrés dans la pharmacopée avant même l'époque romaine. Au siècle dernier, les préparations à base d'arsenic constituaient la base du traitement de nombreuses maladies comme la syphilis ou les leucémies.

Un poison bien connu

L'arsenic a une image très forte de poison dans l'inconscient collectif et ses dérivés ne sont plus guère utilisés que dans la mort aux rats, des pesticides et des herbicides, et comme antiparasitaires dans les trypanosomiases.

Les dérivés de l'arsenic ont des propriétés chimiques distinctes suivant qu'ils sont trivalents ou pentavalents [1]. Les dérivés trivalents réagissent avec les groupements sulfhydryl des résidus de cystéines pour former des dérivés (adduits) covalents. Un résidu de cystéine convenablement exposé suffit, mais deux résidus séparés de quelques acides aminés représentent le substrat idéal, car les deux valences réactives forment un pontage intramoléculaire. Cette situation est retrouvée dans le site actif de certaines phosphatases qui sont inhibées par des concentrations micromolaires d'arsenic. Les dérivés pentavalents ont une très forte ressemblance stérique et électrique avec les ions phosphates. Ils peuvent donc entrer en compétition avec ceux-ci sur un très grand nombre d'enzymes. Une illustration classique est le découplage de la phosphorylation oxydative par ces dérivés qui induisent une

déplétion aiguë en ATP. L'ensemble de ces propriétés (poison de sites actifs et blocage de la production d'ATP) fait que ces agents ont été très utilisés en biochimie.

L'arsenic et ses dérivés sont cancérigènes : de nombreuses études font état d'une forte surmortalité par tumeurs pulmonaires chez des sujets exposés à des vapeurs de ces toxiques (principalement dans la métallurgie) et de tumeurs de la peau après exposition cutanée ou ingestion d'eau de boisson contaminée [2]. L'augmentation de l'incidence des tumeurs solides après exposition est, quant à elle, controversée [3]. Contrairement à beaucoup de carcinogènes, l'arsenic présente un net effet seuil et n'a aucune action chez les rongeurs. Le mécanisme par lequel cet élément provoque des tumeurs est inconnu. L'arsenic ne semble pas directement génotoxique et n'a pas d'action transformante sur des cellules en culture [2]. Il a donc été proposé qu'il favorise la promotion tumorale et non son déclenchement, par exemple en induisant la prolifération cellulaire. Cet effet pourrait passer par l'inhibition d'une phosphatase cytoplasmique constitutivement active, ce qui activerait en retour les cascades de kinases conduisant à l'activation du facteur de transcription AP1 dont le rôle dans la transformation cellulaire est bien établi [4]. La signification physiologique de cette hypothèse doit être étayée car les concentrations d'arsenic (trivalent) (10 à 50 mM) nécessaires à cet effet sont très élevées.

Un nouvel antileucémique

Comment imaginer qu'une telle substance soit un antileucémique dont le mode d'action commence à être élucidé ! C'est pourtant ce qui vient d'être montré par une collaboration entre équipes chinoises et françaises qui, outre d'importantes perspectives thérapeutiques, permet d'élaborer un modèle de thérapie directement ciblée sur des oncogènes [5-7]. Deux équipes (Drs P. Zhang et T.D. Zhang) à Harbin avaient mis en évidence l'effet majeur qu'une médication traditionnelle avait sur des leucémies [8, 9]. Rapidement, il a été montré que cet effet était restreint à la leucémie aiguë promyélocytaire et que cette substance donnait 65 % de réponses cliniques complètes et 25 % de guérisons à dix ans. Depuis 1971, ces deux équipes utilisaient l'arsenic trivalent As_2O_3 comme agent thérapeutique et plus de 70 patients ont été traités par chacune, alors qu'un groupe à DaLian (Mandchourie) utilise toujours une préparation traditionnelle contenant surtout du sulfate d'arsenic. Compte tenu des difficultés du traitement de cette maladie en Chine, une telle survie est exceptionnelle. L'analyse des substances constitutives et de leurs effets a montré que le tri-oxyde d'arsenic était le principe actif de cette médication traditionnelle. Il semble que l'oxyde d'arsenic entre dans la composition de nombreuses préparations traditionnelles et un article récent indiquait que de très nombreuses préparations chinoises tradition-

nelles contiennent des métaux lourds (arsenic et mercure) à des concentrations susceptibles d'induire une toxicité chronique [10].

Ces données ont été confirmées par le groupe des Prs Wang et Chen à Shanghai, qui avait déjà mis en évidence l'effet sur la différenciation de l'acide rétinoïque dans la même maladie. Chez des sujets en état de résistance aux rétinoïdes, l'injection intraveineuse de tri-oxyle d'arsenic trivalent induit des rémissions complètes et prolongées. Il n'y a donc pas de résistance croisée entre ces deux agents [5, 6].

La leucémie aiguë promyélocytaire

La leucémie aiguë promyélocytaire est très spécifiquement associée à une translocation $t(15;17)$ qui conduit à la fusion des gènes *PML* et *RAR α* . Les anomalies moléculaires induites par cette translocation et le fondement de la réponse paradoxale aux rétinoïdes ont fait l'objet de multiples revues [11-13]. Il n'existe pas de modèle satisfaisant de transformation cellulaire *ex vivo*. Néanmoins, l'expression de *PML/RAR α* chez des souris transgéniques conduit dans certains cas à une maladie presque identique à celle observée chez l'homme, démontrant formellement que celle-ci est liée à la synthèse de la protéine chimère [14, 15]. Très schématiquement, il a été proposé que la protéine chimère *PML/RAR α* ait un effet dominant négatif sur la fonction de *RAR* comme sur celle de *PML*. Les rétinoïdes sont connus pour induire la différenciation myéloïde et *PML/RAR α* , ainsi qu'un mutant dominant négatif de *RAR α* , bloquent la différenciation myéloïde [16-20]. Même si les preuves sont moins directes, *PML* semble également participer à la leucémogénèse. *PML* a des effets antiprolifératifs et son expression bloque la transformation de fibroblastes embryonnaires par des oncogènes [21-23]. L'association de *PML* à des domaines nucléaires spécifiques, mais de fonction inconnue (les corps nucléaires *PML*), a déjà été résumée dans *médecine/sciences* [24, 25]. Ces domaines semblent avoir un rapport avec les interférons puisque toutes les protéines qui lui sont asso-

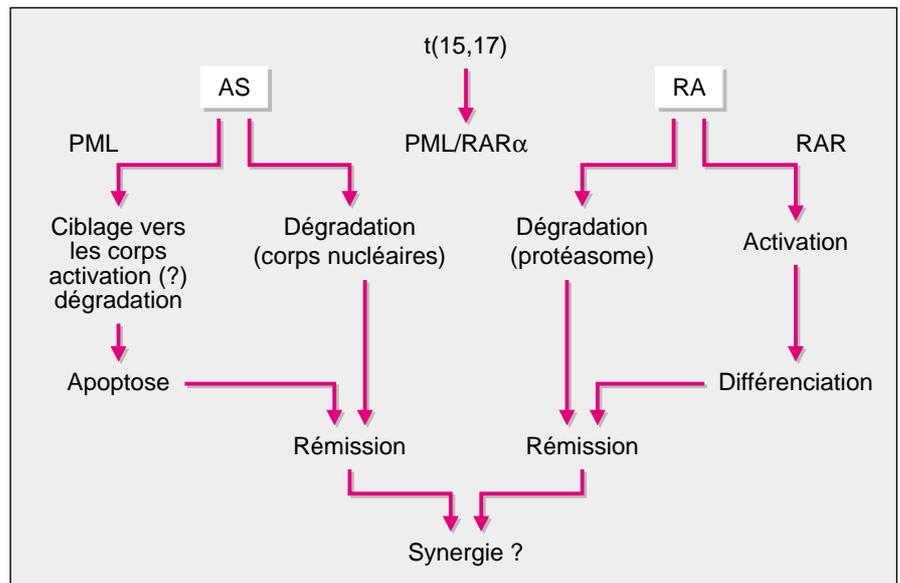


Figure 1. **Représentation schématique de l'action des deux agents antileucémiques** (acide rétinoïque (AR) et arsenic (AS)) sur la protéine chimère *PML/RAR α* résultant de la translocation $t(15;17)$. L'AS et l'AR induisent tous les deux la dégradation de *PML/RAR α* . En parallèle, l'AR active le récepteur *RAR α* normal, ce qui déclencherait la différenciation. L'AS, qui modifie la localisation intranucléaire de *PML* et induit sa dégradation, augmenterait son effet antiprolifératif et induirait l'apoptose. L'indépendance des voies activées par ces deux agents permet d'envisager des effets synergiques.

ciées sont directement induites par ces cytokines [26-28]. La synthèse de la protéine chimère *PML/RAR α* conduit à la perte de cette localisation spécifique. La chimère et toutes les protéines associées aux corps nucléaires se retrouvent sur des structures nucléaires plus petites et beaucoup plus nombreuses, dont certaines semblent être des sites de transcription (figure 2A) [29-33]. Le fondement moléculaire de cette délocalisation semble être la formation d'hétérodimères *PML/RAR-PML*. La perte de la localisation spécifique de *PML* au sein du noyau serait associée à la perte de son pouvoir antiprolifératif. Ainsi, la maladie aurait deux facettes: l'inhibition de la différenciation (liée à un effet dominant négatif sur *RAR*) et l'induction de la prolifération (liée à une perte du contrôle assuré par *PML* sur la croissance cellulaire) [11].

L'acide rétinoïque induit la différenciation des blastes leucémiques. Celle-ci semble procéder à la fois de l'acti-

vation transcriptionnelle du récepteur normal et de la restauration de la localisation des antigènes associés aux corps nucléaires *PML* [29-33]. Dans des lignées résistantes à l'acide rétinoïque, ce regroupement n'est pas observé, suggérant qu'il participe effectivement à l'induction de la différenciation [30, 34]. Cette réagrégation a récemment trouvé une explication dans le fait que l'acide rétinoïque induit directement le catabolisme de la protéine chimère [7, 35, 36]. En l'absence de celle-ci, *PML* et les protéines associées aux corps nucléaires retrouvent leur localisation. Cette dégradation de *PML/RAR α* induite par l'acide rétinoïque est bloquée par la lactacystine, démontrant l'implication du protéasome. La protéine chimère est donc une cible directe du traitement par les rétinoïdes (figure 1).

Mode d'action de l'arsenic

Les premières études furent entreprises à Shanghai et concernaient l'effet de l'arsenic sur l'unique lignée

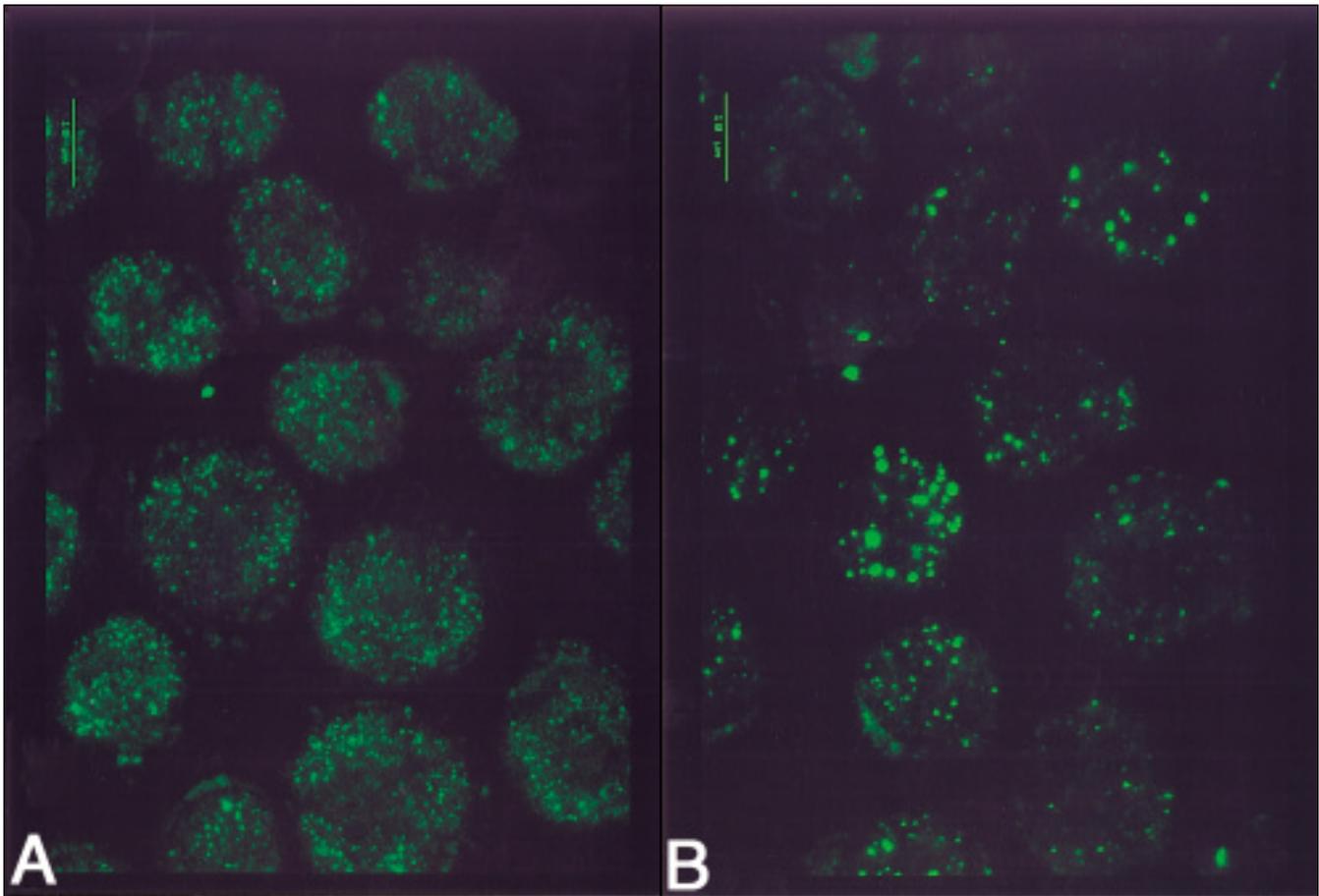


Figure 2. **Localisation de PML/RAR α (comme les antigènes de corps nucléaires) dans les cellules leucémiques.** **A.** Avant traitement: l'aspect microponctué nucléaire est évident. **B.** Après traitement à l'arsenic: la reformation des corps nucléaires (sous forme de quelques taches de plus grande taille) est observée dans certaines cellules. La dégradation de PML et PML/RAR α se manifeste par la disparition du marquage dans la plupart des noyaux. (D'après [7].)

cellulaire issue d'une leucémie aiguë promyélocytaire, NB4 [37]. A la dose de 10^{-6} M (qui correspond au pic de concentration sérique après injection) l'arsenic n'induit pas de différenciation (comme l'acide rétinoïque), mais une apoptose. Cette apoptose est associée à l'effondrement de la transcription du gène *BCL2* [5]. A dose plus faible (telle que celle que l'on peut observer dans le sang quelques heures après l'injection), ces cellules répondent par une différenciation jusqu'au stade de promyélocyte anormal (mais qui n'atteint jamais le stade terminal des polynucléaires) avant de mourir par apoptose. Les dérivés pentavalents n'ont aucun effet aux mêmes concentrations. L'étude *in vivo* du devenir des blastes leucémiques chez deux

malades traités suggère la coexistence des deux phénomènes [6].

D'une manière inattendue, l'arsenic induit certains des effets de l'acide rétinoïque: il induit la dégradation de PML/RAR α et donc la reformation des corps nucléaires PML [7] (figures 1 et 2). Alors que l'acide rétinoïque cible la partie RAR α de la fusion, l'arsenic cible sa partie PML. En effet, les protéines PML normales sont, elles aussi, dégradées en réponse à l'arsenic [7]. Cette induction de la dégradation de PML est précédée de son transfert vers les corps nucléaires. Ces travaux ont permis de montrer l'existence de deux localisations nucléaires distinctes pour PML: le nucléoplasme et les corps nucléaires. Dans les conditions normales PML va du premier vers les

seconds; l'arsenic accélère le transfert et la dégradation de PML (mais pas des autres protéines associées à ces structures). Le mécanisme par lequel l'arsenic induit la destruction de PML et de PML/RAR α n'est pas encore compris. Au vu des effets multiples de ces agents, plusieurs explications peuvent être proposées. La liaison directe de l'arsenic à PML ou l'induction de sa phosphorylation (par l'inhibition d'une phosphatase) semblent les plus plausibles.

Dans les cellules leucémiques, la chimère PML/RAR α n'est pas associée aux corps PML pendant le traitement par l'acide rétinoïque [29]. En revanche, l'arsenic provoque le ciblage de PML/RAR α et RAR α vers les corps PML (figure 2B) [7]. Dans un cas, PML/RAR α est dégradé,

puis PML retourne à sa place ; dans l'autre cas, PML entraîne PML/RAR α vers les corps nucléaires et les deux protéines sont dégradées. Les actions des deux agents ne sont donc semblables qu'en première approche et les filières de dégradation sont distinctes. Médicalement, l'arsenic agit même chez des malades en situation clinique de résistance aux rétinoïdes [5, 6]. Les modes de dégradation distincts expliquent probablement l'absence de résistance croisée entre ces deux agents. Celle-ci pourrait être un fondement rationnel à des traitements combinés.

Vers une thérapie rationnelle : des médicaments ciblés sur l'oncogène ?

Plus que jamais, ces nouvelles données font de la leucémie aiguë promyélocytaire un modèle unique en cancérologie. Il est tout de même paradoxal qu'un modèle de pathogénie à la symétrie aussi élégante (figure 1) soit né grâce à l'empirisme clinique. En effet, ces deux traitements constituent le seul exemple à ce jour de thérapeutiques agissant directement sur le produit d'une lésion génétique. L'acide rétinoïque agit sur le fragment RAR α de la fusion alors que l'arsenic agit sur la partie PML. L'acide rétinoïque et l'arsenic induisent la dégradation de PML/RAR α qui pourrait être un prérequis à leurs effets thérapeutiques (figure 1). Mais ces deux agents ont des effets biologiques distincts : différenciation, d'une part, et apoptose, d'autre part, qui résultent probablement de leurs effets sur les protéines RAR α et PML normales. S'il est déjà bien connu que RAR α contribue à l'induction de la différenciation, ces résultats suggèrent un rôle de PML dans l'induction de l'apoptose. Bien que l'arsenic induise la dégradation de PML, la modification de sa localisation nucléaire pourrait augmenter son effet antiprolifératif. Ainsi, les effets spécifiques de l'arsenic sur la leucémie aiguë promyélocytaire, comme sur les corps nucléaires, renforcent l'hypothèse d'une participation de PML à la pathogénie de cette leucémie [7].

L'arsenic, un nouveau traitement de la leucémie et un outil pour l'étude des corps nucléaires ?

Deux questions d'importance clinique se posent désormais : l'arsenic aura-t-il un effet apoptotique sur d'autres types de cellules cancéreuses ? Y a-t-il une place pour un traitement combiné arsenic/acide rétinoïque dans la prise en charge de ces malades ? Compte tenu de la bonne efficacité du traitement actuel (acide rétinoïque et chimiothérapie) les protocoles risquent d'être difficiles à mettre en place. Enfin, l'arsenic, par le contrôle du trafic intranucléaire de PML, pourrait être un outil très puissant pour percer l'énigme du rôle des corps nucléaires PML qui, malgré leur découverte il y a presque 40 ans [38], sont toujours à la recherche d'une fonction ■

RÉFÉRENCES

- Goodman LS, Gilman A. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: MacMillan, 1991: 1602-4.
- Snow ET. Metal carcinogenesis: mechanistic implications. *Pharmac Ther* 1992; 53: 31-65.
- Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C. Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 462-76.
- Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M. The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J* 1996; 15: 6269-79.
- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia. As₂O₃ induces NB₄ cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. *Blood* 1996; 88: 1052-61.
- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, Han ZG, Ni JH, Shi GY, Jia PM, Liu MM, He KL, Niu C, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Paul P, Waxman S, Wang ZY, de Thé H, Chen SJ, Chen Z. Use of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukaemia: I As₂O₃ Exerts dose dependent dual effects on APL cells. *Blood* 1997 (sous presse).
- Zhu J, Koken MHM, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Degos L, Wang ZY, Chen Z, de Thé H. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3978-83.

- Zhang P, Wang SY, Hu LH, Shi FD, Qiu FD, Hong RJ, Han XY, Yang HF, Song YZ, Liu YP, Zhou J, Jin ZJ. Treatment of acute promyelocytic leukemia with intravenous arsenic trioxide. *Chin J Hematol* 1996; 17: 58-60.
- Sun HD, Ma L, Hu HX, Zhang TD. Ai-Lin1 treated 32 cases of acute promyelocytic leukaemia. *Chin J Integrat Chin & West Med* 1992; 12: 170-1.
- Espinoza E, Mann M, Bleasdel B. Arsenic and mercury in traditional chinese herbal balls. *N Engl J Med* 1995; 333: 803-4.
- De Thé H. Altered retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996; 10: 955-60.
- Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Dotti E, Biondi A, LoCoco F, Grignani F, Pelicci PG. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; 83: 10-25.
- Degos L. Differentiation therapy of leukaemia. *Leukaemia* 1993; 7: 766-70.
- Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR α under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 1997; 89: 376-87.
- Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, Atwater S, Bishop JM. A PML RAR alpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2551-6.
- Tsai S, Bartelmez S, Heyman R, Damm K, Evans R, Collins SJ. A mutated retinoic acid receptor exhibiting dominant - negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. *Genes Dev* 1993; 6: 2258-69.
- Tsai S, Collins S. A dominant negative retinoic acid receptor blocks neutrophil differentiation at the promyelocytic stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7153-7.
- Tsai S, Bartelmez S, Sitnicka E, Collins S. Lymphohematopoietic progenitors immortalized by a retroviral vector harboring a dominant-negative retinoic acid receptor can recapitulate lymphoid, myeloid, and erythroid development. *Genes Dev* 1994; 8: 2831-41.
- Grignani F, Ferrucci P, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, Mencarelli A, Grignani F, Peschle C, Nicoletti I, Pelicci P. The acute promyelocytic leukemia specific PML/RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 1993; 74: 423-31.
- Grignani F, Testa U, Rogaia D, Ferrucci PF, Samoggia P, Pinto A, Aldinucci D, Gelmetti V, Fagioli M, Alcalay M, Seeler J, Grignani F, Nicoletti I, Peschle C, Pelicci PG. Effects on differentiation by the promyelocytic leukemia PML/RAR α protein depend on the fusion of the PML protein dimerization and RAR α DNA binding domains. *EMBO J* 1996; 15: 4949-58.

RÉFÉRENCES

21. Mu ZM, Chin KV, Liu JH, Lozano G, Chang KS. PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6858-67.
22. Liu JH, Mu ZM, Chang KS. PML suppresses oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by activated *neu*. *J Exp Med* 1995; 181: 1965-73.
23. Koken MHM, Linares-Cruz G, Quignon F, Viron A, Chelbi-Alix MK, Sobczak-Thépot J, Juhlin L, Degos L, Calvo F, de Thé H. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 1995; 10: 1315-24.
24. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque: le paradoxe. *Med Sci* 1994; 10: 817-24.
25. De Thé H, Koken M, Stadler M, Daniel M, Puvion E, Chomienne C, Degos L. Un nouveau compartiment nucléaire, révélé par des auto-anticorps de la cirrhose biliaire primitive, pourrait être impliqué dans la pathogénie de la leucémie aiguë promyélocytaire. *Med Sci* 1994; 10: 577-82.
26. Stadler M, Chelbi-Alix MK, Koken MHM, Venturini L, Lee C, Saïb A, Quignon F, Pelicano L, Guillemain MC, Schindler C, de Thé H. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 1995; 11: 2565-73.
27. Guldner H, Szosteki C, Grotzinger T, Will H. IFN enhances expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1992; 149: 4067-73.
28. Koriath F, Gieffers C, Maul GG, Frey J. Molecular characterization of NDP52, a novel protein of the nuclear domain 10, which is redistributed upon virus infection and interferon treatment. *J Cell Biol* 1995; 130: 1-13.
29. Koken MHM, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC, Viron A, Linares-Cruz G, Stuurman N, de Jong L, Szosteki C, Calvo F, Chomienne C, Degos L, Puvion E, de Thé H. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a RA-reversible fashion. *EMBO J* 1994; 13: 1073-83.
30. Dyck JA, Maul GG, Miller WH, Chen JD, Kakizuka A, Evans RM. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 1994; 76: 333-43.
31. Daniel MT, Koken M, Romagné O, Barbey S, Bazarbachi A, Stadler M, Guillemain M, Degos L, Chomienne C, de Thé H. PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1993; 82: 1858-67.
32. Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML/RAR α in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 1994; 76: 345-56.
33. Grande MA, van der Kraan I, van Steensel B, Schul W, de Thé H, van der Voort HTM, de Jong L, van Driel R. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem* 1996; 63: 280-91.
34. Duprez E, Lillehaug JR, Naoe T, Lanotte M. cAMP signalling is decisive for recovery of nuclear bodies (PODs) during maturation of RA-resistant t(15;17) promyelocytic leukemia NB4 cells expressing PML-RAR alpha. *Oncogene* 1996; 12: 2451-9.
35. Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, Ohno R, Naoe T. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. Possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* 1996; 56: 2945-8.
36. Raelson JV, Nervi C, Rosenauer A, Benedetti L, Monczak Y, Pearson M, Pelicci PG, Miller WH. The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1996; 88: 2826-32.
37. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1991; 77: 1080-6.
38. De Thé G, Rivière M, Bernhardt W. *Bull Cancer* 1960; 47: 570-84.

Hugues de Thé

Cnrs UPR 9051, hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France.

TIRÉS À PART

H. de Thé.