

## La leucémie aiguë promyélocytaire : un paradigme des traitements ciblés sur l'oncogène ?

Valérie  
Lallemand-Breitenbach  
Jun Zhu  
Hugues de Thé

La leucémie aiguë promyélocytaire est associée à différentes translocations chromosomiques impliquant toujours le gène du récepteur nucléaire RAR $\alpha$ . La plus fréquente conduit à la formation d'une protéine de fusion PML/RAR $\alpha$ , dont l'expression suffit à provoquer des leucémies chez la souris. Le blocage de la différenciation myéloïde semble dû à la répression de gènes-clés inconnus par des dimères PML/RAR $\alpha$  qui recrutent des histone désacétylases. L'inhibition par PML/RAR $\alpha$  des fonctions antiprolifératives et/ou pro-apoptotiques de PML expliquerait la transformation cellulaire. L'acide rétinoïque et l'arsenic induisent tous deux des rémissions cliniques, ainsi que la dégradation de PML/RAR $\alpha$ , en ciblant respectivement RAR $\alpha$  et PML, mais les mécanismes moléculaires impliqués dans ces rémissions sont encore discutés. L'importance de la fusion réciproque RAR $\alpha$ /PML dans la leucémogénèse a été démontrée chez les souris transgéniques. Celles-ci constituent de précieux modèles précliniques de thérapies par différenciation ciblées sur l'oncoprotéine.

**L**es leucémies sont souvent associées à des translocations chromosomiques impliquant des gènes-clés de la différenciation cellulaire. Ces translocations sont de deux types. Les premières juxtaposent un promoteur fort à un gène régulateur de la différenciation ou de la survie cellulaire. Elles conduisent à l'expression ectopique d'un gène de structure normale. Ce premier type est surtout observé dans les leucémies T et les lymphomes différenciés. Le prototype de ces translocations est la t(8;14) du lymphome de Burkitt qui active l'expression du gène myc. Le deuxième type de translocation pro-

voque la fusion de deux gènes, ce qui conduit à l'expression d'une protéine chimère possédant des éléments de séquence des deux protéines constitutives. Cette chimère présente un gain de fonction et/ou un effet dominant négatif sur la fonction des protéines parentales. Ce deuxième type de translocation est généralement retrouvé dans les leucémies myéloïdes et les leucémies lymphoïdes B. Le premier exemple décrit est la translocation t(9;21) (chromosome Philadelphie) associée à la leucémie myéloïde chronique. Celle-ci conduit à l'expression de l'oncogène *bcr-abl*. La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est caractérisée par un blocage

### ADRESSE

V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, H. de Thé : Cnrs UPR 9051, Laboratoire associé n° 11 du Comité de Paris de la Ligue contre le cancer, Université de Paris VII, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux 75475 Paris Cedex 10, France.

de la différenciation au stade promyélocytaire. La caractérisation, il y a dix ans, de la translocation à l'origine de cette maladie a permis une analyse extrêmement fine des mécanismes de la transformation, ce qui fait de cette maladie un modèle de première importance en cancérologie (*pour revue, voir* [1]). La possibilité, pour l'instant unique, de moduler le phénotype des cellules cancéreuses par des agents non génotoxiques comme l'acide rétinoïque tout-*trans* (AR) et le trioxyde d'arsenic (As) qui ciblent tous deux le produit de la translocation, ouvre des perspectives de traitements ciblés et rationnels du cancer.

### Les translocations classiques et variantes

La plupart des LAP présentent la translocation réciproque t(15;17) (q22;q21) qui conduit à la formation de deux gènes de fusion *PML/RARα* (retrouvé chez tous les malades) et *RARα/PML* (présent chez la plupart d'entre eux). *PML* appartient à la

famille des protéines RBCC caractérisée par deux types de motifs à doigt de zinc, un domaine RING et deux boîtes B, ainsi que par un long domaine de dimérisation par hélices hydrophobes (*coiled-coil*) (*figure 1*). La fonction de *PML* est mal connue, mais cette protéine semble contribuer au contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire [2-5]. La protéine *RARα* est un des récepteurs de l'AR. Elle appartient à la classe des récepteurs nucléaires, qui se lient à l'ADN après hétérodimérisation avec un autre récepteur nucléaire, RXR. En l'absence d'AR, le complexe RXR/*RARα* se lie sur les éléments de réponse présents sur des gènes cibles primaires dont il réprime l'expression. Cette répression fait appel aux co-répresseurs N-CoR et SMRT qui recrutent des complexes histone-désacétylases (HDAC) et ainsi compactent la chromatine. L'AR, en se liant à *RARα*, va provoquer le détachement des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs tels que SRC-1 ou CBP. Ceux-ci vont à leur tour recruter des complexes

d'histone-acétyl-transférases (HAT) qui, grâce à l'ouverture de la chromatine vont activer la transcription des gènes cibles (*figure 3A*). Quatre types de translocations variantes, impliquant toujours le gène *RARα*, ont été décrites chez de rares patients atteints de LAP (*figure 1*). La translocation t(11;17) (q23;q21) implique le gène *PLZF* (*promyelocytic leukemia zinc finger*) dont le produit est un répresseur transcriptionnel qui possède un domaine de multimérisation POZ et un motif doigt de zinc (C2-H2) permettant sa liaison à l'ADN [6]. La fusion de *RARα* avec le gène *NPM* codant pour la nucléophosmine, a également été décrite chez trois patients possédant la translocation t(5;17) (q35;q21) [7]. *NPM* est une protéine nucléolaire de fonction inconnue associée à la matrice nucléaire. La translocation variante t(11;17) (q13;21) implique le gène *NuMA* dont la protéine est, comme *PML* et *NPM*, associée à la matrice nucléaire. *NuMA* joue un rôle dans la coordination de la mitose [8]. Enfin, l'anomalie chromosomique la plus

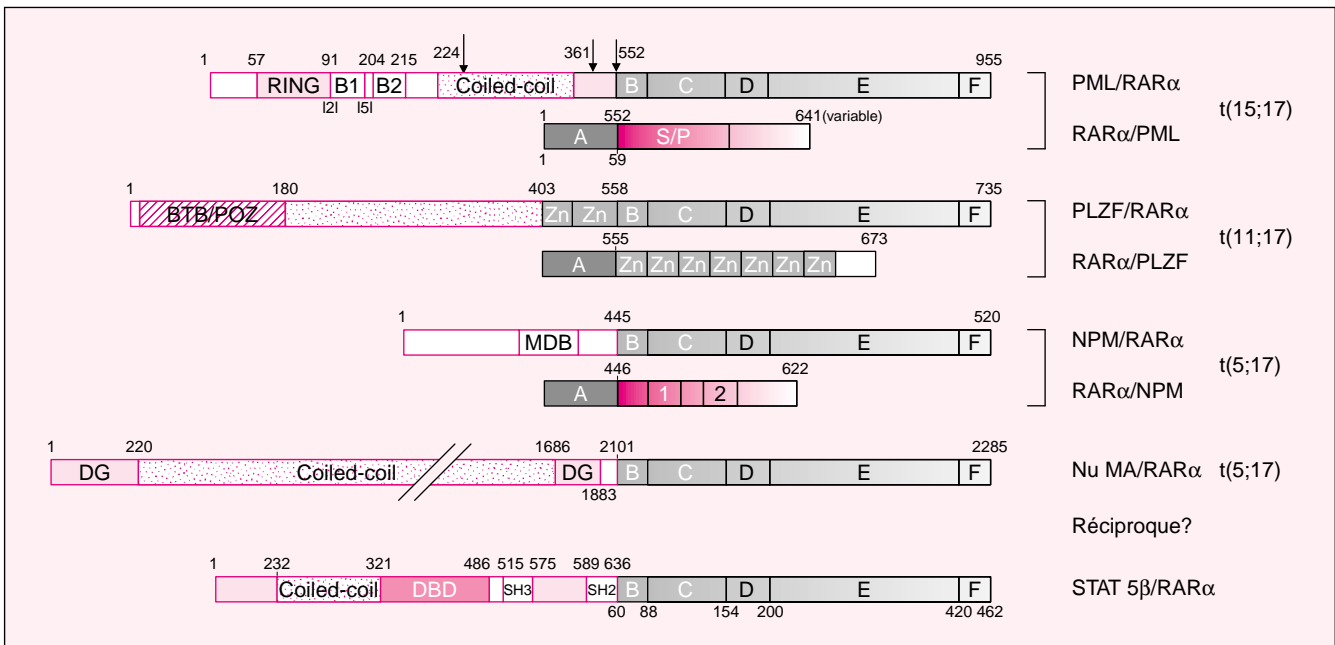


Figure 1. **Structure des protéines chimères produites par les différentes translocations impliquées dans la LAP.** A/B/C/D/E/F sont les différents domaines de *RARα* (en gris). Le domaine A/B représente le domaine transactivateur AF-1 indépendant de la liaison à l'AR. Le domaine C contient deux doigts de zinc, responsables de la reconnaissance des séquences cibles et de la liaison à l'ADN. Le domaine E est le domaine de transactivation AF-2, dépendant de l'hormone, et également la région de liaison au ligand. RING: RING-finger; B1 et B2: Boîte-B (doigts de zinc); S/P: région riche en sérines/prolines; BTB/POZ: domaine de dimérisation; Zn: doigt de zinc; MDB: domaine de liaison aux microtubules. 1 et 2: régions riches en acides aminés acides; DG: domaine globulaire; DBD: domaine de liaison à l'ADN.

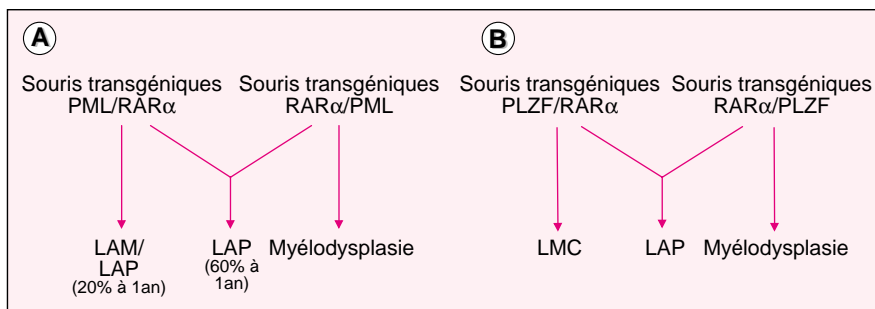


Figure 2. Implication des translocations réciproques dans le développement de la LAP chez des souris transgéniques.

récemment découverte est responsable de la fusion de  $RAR\alpha$  au gène  $STAT5\beta$  codant pour un facteur de transcription activé par certaines cytokines [9].

L'implication systématique de  $RAR\alpha$  dans ces différentes translocations souligne son rôle central dans la transformation cellulaire. Les protéines partenaires sont toutes nucléaires et possèdent toutes un domaine de dimérisation toujours présent dans les chimères  $X/RAR\alpha$ . Ainsi, le point commun de toutes ces translocations serait de créer des protéines nucléaires capables de constituer des homodimères  $X/RAR\alpha$ . Toutefois, la fréquence de l'implication de  $PML$  (plus de 98 % des cas) suggère un rôle propre de cette protéine dans la leucémogénèse (voir plus loin).

### Apport des modèles animaux

#### Les fusions $X-RAR\alpha$ induisent des leucémies aiguës myéloïdes

Des souris transgéniques exprimant  $PML/RAR\alpha$  et développant une leucémie ont été obtenues après de nombreuses tentatives infructueuses pour lesquelles l'expression de  $PML/RAR\alpha$  était très faible et les désordres hématopoïétiques induits minimes. Ceci souligne la nécessité d'exprimer le transgène à des stades précis de la différenciation myéloïde pour obtenir une leucémie. Ainsi, le phénotype des souris transgéniques  $PML/RAR\alpha$  varie beaucoup en fonction du type de promoteur utilisé. Deux équipes ont placé le gène  $PML/RAR\alpha$  sous contrôle du promoteur de la cathepsine G humaine ( $hCG-PML/RAR\alpha$ ). La fusion s'exprime du stade myéloblaste à

celui de myélocyte. Tardivement, à un an, 20 à 30 % des souris développent une leucémie myéloïde aiguë. Celle-ci se caractérise par une très importante leucocytose associée à une anémie et à une thrombocytopénie. La moelle présente une prolifération de myéloblastes, de promyélocytes et de myélocytes qui gardent une faible capacité de différenciation en granulocytes mûrs [10, 11]. La fusion  $PML/RAR\alpha$  a également été placée sous contrôle du promoteur du gène  $hMRP8$  ( $hMRP8-PML/RAR\alpha$ ), qui s'exprime depuis le stade de promyéloblaste jusqu'à celui de neutrophile ou de monocyte. La moitié des souris  $hMRP8-PML/RAR\alpha$  développent une LAP très proche de la maladie humaine [12]. Celle-ci associe une moelle riche en cellules bloquées au stade promyélocytaire à un tableau d'insuffisance médullaire. Ce développement tardif des leucémies chez les souris transgéniques suggère que si  $PML/RAR\alpha$  induit bien la leucémogénèse, d'autres événements génétiques doivent s'accumuler pour le développement complet de celle-ci. Lorsque le transgène est placé sous contrôle du promoteur métallothioniline, les souris développent des dysplasies hépatiques avec apparition d'hépatocarcinomes après induction par le zinc de l'expression de  $PML/RAR\alpha$  [13]. Cette observation souligne à la fois les capacités oncogéniques de  $PML/RAR\alpha$  dans d'autres tissus et par là même l'importance de la spécificité tissulaire d'expression de  $PML/RAR\alpha$  dans le développement de la LAP.

Contrairement aux souris  $PML/RAR\alpha$ , les souris transgéniques  $hCG-PLZF/RAR\alpha$  développent des leucémies de type myéloïde chronique (LMC) et les souris  $hCG-NPM/RAR\alpha$

des leucémies qui varient d'une LAP classique à une LMC. La leucémie est précédée d'une phase de prolifération et d'accumulation de précurseurs myéloïdes qui conservent une capacité normale de différenciation. Ainsi, bien qu'oncogènes, les fusions  $PLZF-RAR\alpha$  et  $NPM/RAR\alpha$  ne semblent pas conduire à un blocage systématique de la différenciation chez la souris.

#### Contribution des chimères réciproques $RAR\alpha/PML$ et $RAR\alpha/PLZF$ à l'établissement de la leucémie

L'hétérogénéité de ces résultats indique que la nature de la fusion, son niveau d'expression ainsi que sa fenêtre d'expression dans la différenciation myéloïde sont très importants pour la leucémogénèse. L'expression de la fusion réciproque ou la modification du rapport allèle normal/allèle fusion pourraient également intervenir. En effet, bien que les souris transgéniques  $hCG-RAR\alpha/PML$  ne développent pas de leucémie, les souris co-exprimant  $PML/RAR\alpha$  et  $RAR\alpha/PML$  développent des LAP avec une pénétrance beaucoup plus élevée (figure 2) [14]. De même, le croisement de souris  $PLZF/RAR\alpha$  avec les souris  $RAR\alpha/PLZF$ , qui présentent de discrets troubles de la maturation myéloïde, modifie le spectre de la leucémie qui d'une prolifération myéloïde globale devient une LAP typique. Ainsi, les gènes de fusion réciproque apparaissent comme de puissants modulateurs du phénotype leucémique. Si cela est compréhensible pour  $RAR\alpha/PLZF$  qui contient le site de liaison à l'ADN de  $PLZF$ , cela ne l'est pas pour  $RAR\alpha/PML$  qui ne contient pas de domaine fonctionnel connu.

Dans tous les cas, la leucémie est transplantable à des souris syngéniques, preuve du caractère transformé des cellules. Ce modèle de leucémie transplantée qui mime la situation humaine (un clone leucémique dans une hématopoïèse normale) a été utilisé comme modèle thérapeutique (voir plus loin).

#### $RAR$ , rétinoïdes et hématopoïèse

Une fois établies les propriétés transformantes des fusions  $X-RAR\alpha$ , de





## Interférence des protéines chimères avec la réponse aux rétinoïdes

### Rôle des chimères X/RAR $\alpha$ dans le blocage de la différenciation myéloïde

L'effet inhibiteur des protéines X/RAR $\alpha$  sur la différenciation myéloïde a été mis en évidence dans plusieurs systèmes cellulaires. Dans la lignée U937 qui se différencie en réponse à la vitamine D3 et au TGF $\beta$ , l'expression de PML/RAR $\alpha$  ou PLZF/RAR $\alpha$  bloque la différenciation monocyttaire [21, 22]. Ces deux chimères bloquent également la différenciation myélocytaire de précurseurs hématopoïétiques primaires [15].

Au niveau moléculaire, les protéines X/RAR $\alpha$  peuvent dimériser avec RXR. Les complexes X/RAR $\alpha$ -RXR ainsi formés se lient efficacement aux éléments de réponse reconnus par l'hétérodimère RXR-RAR. Ils peuvent donc interférer avec la réponse à l'AR. La surexpression de RAR $\alpha$  portant une mutation dans le domaine de liaison à l'AR n'est pas suffisante pour induire la leucémie [23]. Ce résultat permet d'exclure la séquestration de RXR par la chimère comme cause de la leucémogénèse, sans toutefois exclure que ceci puisse être un co-facteur favorisant la transformation. Sous forme d'homodimères, les chimères X/RAR $\alpha$  peuvent se fixer sur les éléments cibles des homodimères RXR et pourraient donc bloquer la signalisation dépendante de ce récepteur par effet dominant négatif. Enfin, les homodimères X/RAR $\alpha$  pourraient reconnaître des éléments de réponse qui ne seraient reconnus ni par les homodimères RXR, ni par les hétérodimères RXR-RAR $\alpha$ . Dans cette hypothèse de gain de fonction, les homodimères X/RAR $\alpha$  pourraient moduler l'expression de gènes impliqués dans la transformation qui ne seraient pas des cibles normales des rétinoïdes.

### Les fusions X-RAR $\alpha$ se comportent comme des répresseurs transcriptionnels

La répression des gènes cibles des rétinoïdes explique très probablement le

blocage de la différenciation. Au niveau mécanistique, la protéine PML/RAR $\alpha$  se lie aux co-répresseurs N-CoR et SMRT avec une plus grande affinité que RAR $\alpha$ , empêchant la dissociation des complexes aux doses physiologiques d'AR (*figure 3B*) [24, 25]. A ce titre, une chimère PML/RAR $\alpha$  ne se liant plus aux co-répresseurs n'a plus d'effet de blocage de la différenciation *in vitro* [24]. La plus forte affinité de PML/RAR $\alpha$  pour les co-répresseurs a récemment trouvé des éléments d'explication [26]. L'interaction N-CoR/RAR $\alpha$  étant plus forte que l'interaction N-CoR/RXR, un complexe ayant deux molécules de RAR $\alpha$  fixera mieux une molécule de N-CoR qu'un hétérodimère RAR $\alpha$ /RXR ou un homodimère RXR. Ce mécanisme général rendrait compte du caractère répresseur de tout homodimère X/RAR $\alpha$ .

### Mode d'action de l'acide rétinoïque : un exemple de stratégie thérapeutique ciblant la transcription

En 1987, l'équipe de Z.Y. Wang a montré que l'AR pouvait induire des rémissions complètes chez les patients atteints de LAP t(15;17) en rétablissant la différenciation des cellules leucémiques en polynucléaires. S'il est initialement apparu paradoxal qu'une hormone dont le récepteur est altéré soit curative, cet effet sur la différenciation est aujourd'hui mieux compris. Bien que l'AR n'éradique jamais la maladie, l'association AR/chimiothérapie a permis une spectaculaire amélioration de la survie en comparaison à un traitement par chimiothérapie seule avec près de 80 % de guérison.

### Des doses pharmacologiques d'AR lèvent la répression transcriptionnelle exercée par PML/RAR $\alpha$ , mais pas celle exercée par PLZF/RAR $\alpha$

La plus forte affinité des co-répresseurs pour les complexes X-RAR $\alpha$  va déplacer la courbe d'activation des gènes cibles par l'AR vers de plus hautes concentrations : une plus forte dose d'AR est alors nécessaire pour l'activation de l'expression des gènes cibles

(*figure 3B*). La reprise de la différenciation en présence d'AR peut donc être en partie expliquée par le détachement des co-répresseurs et des HDAC provoquant ainsi le recrutement des HAT, l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription.

Le rôle central de l'homodimère X/RAR $\alpha$  dans l'induction de la réponse à l'AR a été démontré par l'introduction dans des cellules leucémiques d'un mutant dominant négatif de RXR $\alpha$  connu pour bloquer la réponse des complexes contenant RXR. Ce mutant bloque la différenciation myéloïde induite par l'AR dans les cellules n'exprimant pas PML/RAR $\alpha$ , mais n'a aucun effet sur des cellules exprimant PML/RAR $\alpha$  suggérant que la différenciation AR-induite ne passe pas par des hétérodimères PML/RAR $\alpha$ -RXR. [26]. L'induction de la différenciation par l'AR dans des cellules exprimant PML/RAR $\alpha$  nécessite aussi l'intégrité des domaines transactivateurs AF2 et de liaison à l'hormone. En effet, des mutations dans l'un de ces deux domaines sont trouvées chez des malades ayant acquis une résistance à l'AR. De plus, les souris transgéniques exprimant une protéine PML/RAR $\alpha$  mutée dans le domaine de liaison à l'hormone présentent une leucémie, mais ne répondent pas à un traitement par l'AR [23]. Ainsi, l'activation transcriptionnelle par l'AR est nécessaire à la réponse, mais pas à la transformation par la chimère.

La différenciation des cellules LAP induite par l'AR est dépendante de la nature de la chimère X/RAR $\alpha$ . En effet, si l'expression de PML/RAR $\alpha$  est associée à une bonne réponse chez les malades, ce n'est pas le cas de celle de PLZF/RAR $\alpha$ . Cette insensibilité à l'AR des leucémies t(11;17) a récemment trouvé une explication dans le maintien de la liaison des co-répresseurs à PLZF/RAR $\alpha$  en présence de doses pharmacologiques d'hormones (*figure 3B*). En effet, PLZF possède dans son domaine POZ, un site de liaison aux co-répresseurs supplémentaire insensible à l'action de l'AR [24, 25].

### La dégradation des fusions X-RAR $\alpha$ joue-t-elle un rôle dans la rémission ?

Avant la mise en évidence de l'action de l'AR sur les co-répresseurs, plu-

sieurs équipes avaient montré que l'AR induisait la dégradation de la chimère PML/RAR $\alpha$  [27]. Cette dégradation explique la restauration des corps nucléaires PML après traitement avec cet agent (*voir plus loin*). Deux voies complémentaires sont impliquées dans ce catabolisme. La première est un clivage de la protéine chimère PML/RAR $\alpha$  par des caspases spécifiquement activées lors de la différenciation induite par l'AR [28]. Le site caspase est présent dans la partie PML de la chimère [29]. La seconde est une dégradation dépendante du protéasome de RAR $\alpha$  ou de toute fusion X-RAR $\alpha$ , après activation par l'hormone [29-31]. Tous les domaines nécessaires à l'activation transcriptionnelle ou à la liaison de l'hormone sont également nécessaires à la dégradation. Cette dégradation n'est probablement pas indispensable à la différenciation puisqu'elle est observée pour PML/RAR $\alpha$  comme pour PLZF/RAR $\alpha$ . En revanche, la disparition de l'oncoprotéine pourrait moduler le contrôle de l'apoptose par PML (*voir plus loin*).

#### **L'association AR/inhibiteurs d'HDAC, une thérapie plus efficace ?**

Une forte accélération de la différenciation des blastes t(15;17) est obtenue *in vitro* en associant l'AR avec des inhibiteurs d'HDAC comme le butyrate ou la trichostatine A (TSA), alors que ces inhibiteurs seuls sont dépourvus d'activité de différenciation. L'explication de leur effet coopératif réside dans le fait que l'AR va provoquer le relargage des co-répresseurs ainsi que la dégradation de la chimère, et les inhibiteurs d'HDAC vont induire l'acétylation des histones et l'ouverture de la chromatine. De la même manière, la sensibilité à l'AR des cellules exprimant PLZF/RAR $\alpha$  peut être restaurée par une combinaison TSA/AR [24]. Dans cette combinaison, l'AR provoque le relargage du co-répresseur lié à la partie RAR $\alpha$  de la fusion et la TSA l'inactivation du complexe HDAC fixé par le domaine POZ (*figures 3B et 5*). Récemment, une combinaison butyrate/AR a été utilisée avec succès chez un patient en rechute ayant développé une résistance à l'AR [32], mais l'instabilité du butyrate rend pour le moment difficile son utilisation en clinique. Ce

type de stratégies thérapeutiques ciblant la transcription pourrait donc s'avérer efficace tant pour le traitement des patients porteurs de la translocation t(11;17) que pour celui des patients résistants à l'AR.

#### **Les agonistes de RXR et de la PKA : mise en évidence d'une nouvelle voie de différenciation indépendante de RAR**

L'utilisation conjointe d'agonistes spécifiques des récepteurs RXR et de la protéine-kinase A (le 8CTP-AMPC) permet la différenciation en granulocytes de cellules LAP résistantes à l'AR. Cette différenciation est indépendante de RAR $\alpha$  et de PML/RAR $\alpha$  puisque l'utilisation d'antagonistes spécifiques de RAR $\alpha$  n'a aucun effet inhibiteur sur cette combinaison. Bien que le programme génétique régulé par la combinaison agoniste de RXR/8CTP-AMPC recouvre partiellement celui régulé par l'AR, il diffère pour l'activation de l'expression d'un certain nombre de cytokines comme le GM-CSF ou le G-CSF [33]. Ces résultats suggèrent l'existence de deux voies parallèles convergeant vers une différenciation en granulocytes : l'une dépendante des RAR, l'autre dépendante des RXR, ouvrant vers l'utilisation d'une nouvelle stratégie thérapeutique transcriptionnelle.

#### **PML joue-t-il un rôle dans la leucémogénèse ?**

La protéine chimère PML/RAR $\alpha$  pourrait également agir comme dominant négatif de la fonction de PML. Quatre des membres de la famille «RBCC» sont retrouvés dans des fusions à activité oncogène: PML/RAR $\alpha$ , RFP/RET, TIF-1/RET et TIF-1 $\alpha$ /B-RAF. Si les fusions TIF-1/RAF et RFP/RET ont été observées dans deux cas de tumeurs expérimentales chez la souris, les fusions PML/RAR $\alpha$  et TIF-1/RET sont, elles, retrouvées de manière récurrente chez l'homme, associées respectivement à la LAP et aux cancers thyroïdiens. Il est à noter que dans chacune des chimères, les domaines RBCC sont conservés, la fusion se faisant en carboxy-terminal du *coiled-coil*, ce qui pourrait suggérer un rôle

propre de cette famille de protéines dans l'oncogénèse.

#### **PML, une protéine pro-apoptotique**

La protéine PML possède des effets antiprolifératif et pro-apoptotique. Bien que les souris agéniques aient un développement normal, les fibroblastes et les splénocytes dérivés de ces animaux présentent une apoptose réduite après stimulation par irradiation  $\gamma$ , par des anticorps anti-FAS, par les céramides, et par le TNF ou les IFN [4]. De plus, le cycle cellulaire des fibroblastes *PML*<sup>-/-</sup> est plus rapide. Enfin, ces souris *PML*<sup>-/-</sup> sont beaucoup plus sensibles aux carcinogènes chimiques et résistent aux radiations ionisantes. Réciproquement, la surexpression de PML provoque dans de nombreux systèmes cellulaires un arrêt de cycle et/ou une induction de l'apoptose et de la sénescence [2, 5]. Ces propriétés pourraient être liées à la capacité de PML à agir comme co-activateur de p53 dans la sénescence induite par Ras activé [34, 35]. En outre, les souris *PML*<sup>-/-</sup> présentent une diminution de la différenciation des cellules myéloïdes en granuleux, *in vivo* et *in vitro*, montrant que PML influence également la différenciation myéloïde. Enfin, les cellules *PML*<sup>-/-</sup> répondent moins bien aux rétinoïdes, suggérant que PML serait un co-activateur de ces récepteurs peut être grâce à sa liaison à TIF-1 $\alpha$  et à CBP [36, 37]. La base biochimique de la fonction de PML responsable de phénomènes aussi variés est encore inconnue.

#### **Rôle des corps nucléaires dans l'apoptose, la transcription et la leucémogénèse ?**

La protéine PML possède deux localisations dans le noyau : une fraction est nucléoplasmique, probablement associée à la chromatine, l'autre est localisée dans les corps nucléaires (CN), structure de la matrice dont la fonction est inconnue [38, 39]. PML est essentielle à la formation de ces corps nucléaires [40]. De nombreuses protéines aux fonctions diverses, telles que Sp100, CBP, p53, pRB et Daxx, sont associées aux CN. Deux de ces protéines sont capables de former un complexe avec PML : Daxx et

CBP. Elles sont particulièrement intéressantes car elles pourraient expliquer certains des effets de PML. En effet, la protéine CBP intervient dans l'acétylation des histones et active la transcription de nombreux gènes. L'interaction CBP/PML pourrait donc expliquer les effets modulateurs de PML sur la transcription [41]. La protéine Daxx est impliquée dans la voie apoptotique induite par Fas. S'il a été initialement proposé que Daxx se lie à Fas et module sa fonction, il semble à présent que Daxx potentialise l'apoptose Fas-dépendante par sa capacité à réprimer spécifiquement l'expression de gènes cibles encore inconnus. Une version de Daxx tronquée de son domaine d'adressage sur les CN n'est plus apoptotique suggérant un rôle des CN dans l'apoptose [42, 43]. Enfin, Daxx et PML synergisent pour induire l'apoptose et Daxx n'induirait plus la mort dans les cellules *PML<sup>-/-</sup>*.

Dans les cellules LAP, PML/RAR $\alpha$  provoque, par hétérodimérisation avec PML, la délocalisation de PML des CN vers des structures à l'aspect microponctué qui correspondent probablement aux sites d'ancrage de PML/RAR $\alpha$  sur la chromatine. Les partenaires de PML tels que Daxx, Sp100 ou CBP sont alors également

délocalisés (*figure 4A*) [43]. Cet effet dominant négatif de PML/RAR $\alpha$  sur la localisation de PML pourrait donc se traduire par le blocage de sa fonction pro-apoptotique et de son rôle dans la différenciation myéloïde. Effectivement, l'expression de PML/RAR $\alpha$  dans de nombreuses lignées hématopoïétiques confère une résistance à l'apoptose [4]. Ainsi, à travers un double effet dominant négatif, PML/RAR $\alpha$  permettrait aux cellules d'échapper à l'apoptose, tout en induisant un blocage de la différenciation.

### Quelles sont les bases moléculaires de l'action de l'arsenic ?

Les effets sur la LAP d'agents thérapeutiques de la médecine traditionnelle chinoise contenant des dérivés d'arsenic (As) a conduit l'équipe de Z. Chen à tester l'efficacité de l'As sur cette maladie. Des doses modérées de trioxyde d'arsenic (10 mg/j par voie intraveineuse) vont induire des rémissions cliniques chez la majorité des patients LAP [44]. *In vivo*, c'est principalement la différenciation et dans une moindre mesure l'apoptose qui sont activées. *In vitro*, cette dualité est retrouvée : de fortes

doses (de 0,5 à 2  $\mu$ M) d'As provoquent une apoptose des cellules primaires LAP t(15;17) alors que 0,1 à 0,5  $\mu$ M d'As induit une différenciation partielle. *In vitro*, l'As est un agent pro-apoptotique non spécifique. Pourtant, lors du traitement de la leucémie, très peu d'effets secondaires ont été observés, suggérant que l'expression de PML/RAR $\alpha$  confère une sensibilité particulière aux cellules leucémiques [45]. L'As induit très rapidement la reformation des corps nucléaires dans les cellules leucémiques. Cette reformation des CN dans les cellules LAP s'accompagne de la dégradation de PML/RAR $\alpha$ . L'arsenic cible PML, puisque dans des cellules n'exprimant pas PML/RAR $\alpha$ , il induit l'agrégation de PML sur les CN, le transfert de PML vers la matrice nucléaire et enfin la dégradation de PML (*figure 4*) [46, 47]. De plus, l'arsenic induit le transfert vers les CN des autres protéines associées à ces structures. Il a été proposé que cet adressage, en particulier celui de Daxx, soit impliqué dans l'induction de l'apoptose. Dans ce sens, plusieurs groupes ont montré que la surexpression de PML ou celle de PML/RAR $\alpha$  sensibilise fortement aux effets pro-apoptotiques de l'As [5, 42, 48], mais ceci reste encore controversé [29, 49, 50].

Ainsi, les deux agents thérapeutiques, As et AR, induisent la dégradation de l'oncoprotéine PML/RAR $\alpha$  en ciblant respectivement l'un PML et l'autre RAR $\alpha$  (*figure 4A, B*). La dégradation de PML/RAR $\alpha$  induite par l'AR pourrait sensibiliser à l'apoptose induite par PML. Effectivement, dans certains modèles, l'AR est plus apoptotique que différenciant [10]. Réciproquement, la dégradation de PML/RAR $\alpha$  induite par l'As pourrait avoir un rôle dans la dérégulation des gènes contrôlés par PML/RAR $\alpha$  (*figure 5*) [51]. L'As ciblant PML, il serait attendu que cet agent n'induisse ni apoptose ni différenciation sur les cellules exprimant PLZF/RAR $\alpha$ , ce qui semble être le cas, au moins *ex vivo* [30].

### Les effets synergiques de la combinaison As/AR

Compte tenu des modes d'action distincts de l'As et de l'AR, et donc de

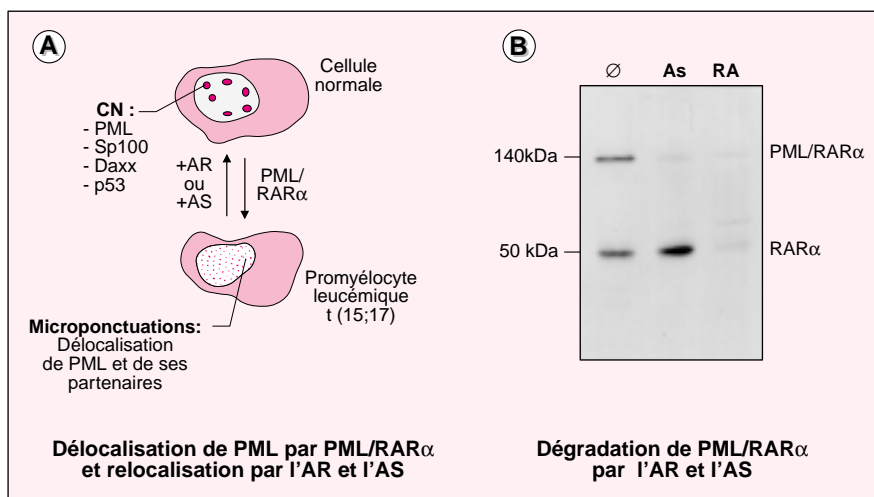


Figure 4. **Implication des corps nucléaires dans la leucémogénèse.** A. Délocalisation de PML par PML/RAR $\alpha$  et relocalisation sous AR ou As. La délocalisation de PML provoque la destruction des corps nucléaires et la délocalisation des partenaires Sp100, Daxx, CBP. Un traitement des cellules LAP par l'AR ou l'As induit la reformation des CN et la relocalisation des antigènes associés. B. Dégradation de PML/RAR $\alpha$  par l'AR et l'As dans des cellules de souris transgéniques visualisée par des anticorps anti-RAR $\alpha$ . PML/RAR $\alpha$  (haut) et RAR $\alpha$  (bas) sont visibles, l'AR dégrade également son récepteur RAR $\alpha$ .



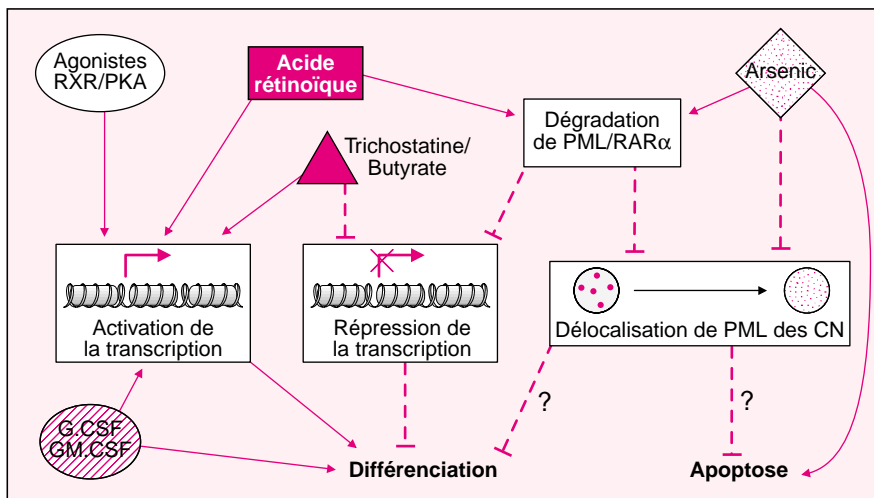


Figure 5. **Modèle d'action des différents agents thérapeutiques.** La flèche indique une activation. La barre indique une inhibition. CN : corps nucléaires.

l'absence de résistances croisées, il était logique de chercher à les associer. S'il est clair que les lignées résistantes à l'AR sont sensibles à l'As et vice versa, les résultats obtenus *in vitro* sur le traitement de lignées cellulaires LAP par l'association des deux agents sont contradictoires [51]. Les souris syngéniques transplantées avec des blastes leucémiques provenant des souris transgéniques PML/RAR $\alpha$  ont été utilisées comme modèle d'étude préclinique [52]. L'AR induit une différenciation synchrone des promyélocytes de la moelle qui vont être éliminés dans la rate. L'As induit une différenciation et une apoptose simultanées qui aboutissent également à une régression de la tumeur. Toutefois, un à deux mois après l'arrêt de ces traitements, tous les animaux rechutent. Ainsi, chez la souris comme chez l'homme, les monothérapies par l'AR ou l'As n'arrivent pas à éradiquer la maladie. En revanche, l'association AR/AS augmente tant les effets différenciants de l'AR que les effets apoptotiques de l'As. De manière spectaculaire, ce double traitement aboutit à la guérison des souris. Ainsi, il apparaît que l'association de deux traitements induit une facilitation croisée de leurs effets, compatible avec le modèle proposé plus haut. Nous avons cherché, dans cet article, à mettre en exergue les principaux axes de recherches développés ces 10 dernières années. Ces travaux ont été semés d'explications simplistes, de

controverses et de paradoxes. Même s'il reste des inconnues, la compréhension de la pathogénie de cette leucémie et la multiplicité des approches thérapeutiques rationnelles, toutes ciblées sur PML/RAR $\alpha$ , en font un modèle pour l'instant unique. Grâce à des modèles animaux proches de la maladie humaine, une extraordinaire panoplie d'approches thérapeutiques (agonistes RAR, agonistes RXR, As, inhibiteurs d'histone-désacétylase, cytokines...) peut être évaluée (figure 5). Bien que le traitement actuel de la maladie (AR + chimiothérapie) donne des résultats assez satisfaisants (80 % de guérisons), de nouvelles approches, peut-être moins agressives, pourraient voir le jour à partir de ces nouvelles stratégies thérapeutiques ■

## RÉFÉRENCES

- Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 3167-215.
- 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.
- Koken MHM, Linares-Cruz G, Quignon F, et al. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 1995; 10: 1315-24.
- Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, et al. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 1998; 20: 266-72.
- Quignon F, de Bels F, Koken M, et al. PML induces a caspase-independent cell death process. *Nat Genet* 1998; 20: 259-65.

- Chen Z, Brand N, Chen A, et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor a locus due to a variant t(11,17) translocation in acute promyelocytic leukemia. *EMBO J* 1993; 12: 1161-7.

- Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5-17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin retinoic acid receptor fusion. *Blood* 1996; 87: 882-6.

- Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S. Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet* 1997; 17: 109-13.

- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, et al. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1741-9.

- Grisolano JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RARalpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 1997; 89: 376-87.

- He L-Z, Tribioli C, Rivi R, et al. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5302-7.

- Brown D, Kogan S, Lagasse E, et al. A PML RAR alpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2551-6.

- David G, Terris B, Marchio A, Lavau C, Dejean A. The acute promyelocytic leukemia PML-RAR alpha protein induces hepatic preneoplastic and neoplastic lesions in transgenic mice. *Oncogene* 1997; 14: 1547-54.

- Pollock JL, Westervelt P, Kurichety AK, et al. A bcr-3 isoform of RARalpha/PML potentiates the development of PML/RARalpha-driven acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15103-8.

- Du C, Redner RL, Cooke MP, Lavau C. Overexpression of wild-type retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) recapitulates retinoic acid-sensitive transformation of primary myeloid progenitors by acute promyelocytic leukemia RAR alpha-fusion genes. *Blood* 1999; 94: 793-802.

- Kuwata T, Wang IM, Tamura T, et al. Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* 2000; 95: 3349-56.

- 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.

- Labrecque J, Allan D, Chambon P, et al. Impaired granulocytic differentiation *in vitro* in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood* 1998; 92: 607-15.

- Casini T, Pelicci P-G. A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. *Oncogene* 1999; 18: 3235-43.



## RÉFÉRENCES

20. Jansen JH, de Ridder MC, Geertsma WMC, *et al*. Complete remission of t(11;17) positive acute promyelocytic leukemia induced by all-trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1999; 94: 39-45.
21. Grignani F, Ferrucci P, Testa U, *et al*. The acute promyelocytic leukemia specific PML/RAR $\alpha$  fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 1993; 74: 423-31.
22. Ruthardt M, Testa U, Nervi C, *et al*. Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha fusion proteins on retinoic acid signalling. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4859-69.
23. Kogan SC, Bishop JM. Acute promyelocytic leukemia: from treatment to genetics and back. *Oncogene* 1999; 18: 5261-7.
24. Grignani F, de Matteis S, Nervi C, *et al*. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 815-8.
25. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, *et al*. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 811-4.
26. Lin RJ, Evans RM. Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell* 2000; 5: 821-30.
27. Raelson JV, Nervi C, Rosenauer A, *et al*. The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1996; 88: 2826-32.
28. Nervi C, Ferrara FF, Fanelli M, *et al*. Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* 1998; 92: 2244-51.
29. Zhu J, Gianni M, Kopf E, *et al*. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and oncogenic RAR alpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14807-12.
30. Koken MHM, Daniel M-T, Gianni M, *et al*. Retinoic acid, but not arsenic trioxide, degrades the PLZF/RARalpha fusion protein, without inducing terminal differentiation or apoptosis, in a RA-therapy resistant t(11;17)(q23;q21) APL patient. *Oncogene* 1999; 18: 1113-8.
31. Koken MHM, Reid A, Quignon F, *et al*. Leukemia-associated retinoic acid receptor  $\alpha$  fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10255-60.
32. Warrell RP, He L-Z, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1621-5.
33. Benoit G, Altucci L, Flexor M, *et al*. RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *EMBO J* 1999; 18: 7011-8.
34. Pearson P, Carbone R, Sebastiani C, *et al*. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000; 406: 207-10.
35. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, *et al*. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000; 14: 2015-27.
36. Zhong S, Delva L, Rachez C, *et al*. A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RAR alpha and T18 oncoproteins. *Nat Genet* 1999; 23: 287-95.
37. Wang ZG, Delva L, Gaboli M, *et al*. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 1998; 279: 1547-51.
38. Dyck JA, Maul GG, Miller WH, *et al*. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 1994; 76: 333-43.
39. Koken M, Puvion-Dutilleul F, Guillemain MC, *et al*. The t(15,17) translocation alters a nuclear body in a RA-reversible fashion. *EMBO J* 1994; 13: 1073-83.
40. Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, *et al*. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 1999; 147: 221-34.
41. Doucas V, Tini M, Egan DA, Evans RM. Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2827-32.
42. Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J* 1999; 18: 6037-49.
43. Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S, *et al*. Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 2000; 191: 631-9.
44. Chen GQ, Shi XG, Tang W, *et al*. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukaemia (APL): I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 1997; 89: 3345-53.
45. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, *et al*. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 1998; 339: 1341-8.
46. Zhu J, Koken MHM, Quignon F, *et al*. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3978-83.
47. Muller S, Matunis MJ, Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 1998; 17: 61-70.
48. Sternsdorf T, Puccetti E, Jensen K, *et al*. Pic-1/SUMO-1-modified PML-retinoic acid receptor alpha mediates arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5170-8.
49. Wang Z-G, Rivi R, Delva L, *et al*. Arsenic trioxide and melarsoprol induce programmed cell death in myeloid leukemia cell lines and function in a PML and PML-RARalpha independent manner. *Blood* 1998; 92: 1497-504.
50. Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, *et al*. 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.
51. Gianni M, Koken MHM, Chelbi-Alix MK, *et al*. Combined arsenic and retinoic acid treatment enhances differentiation and apoptosis in arsenic-resistant NB4 cells. *Blood* 1998; 91: 4300-10.
52. Lallemand-Breitenbach V, Guillemain M-C, Janin A, *et al*. Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 1999; 189: 1043-52.

## Summary

### Promyelocytic leukemia, a unique model to design treatments targeting oncogenes

All acute promyelocytic leukemia associated translocations involve a nuclear receptor gene, RAR $\alpha$ . The most common translocation yields a PML/RAR $\alpha$  fusion protein. PML/RAR $\alpha$  homodimers with an increased affinity for corepressor proteins account for the block in myeloid differentiation. Interference of the fusion protein with PML function is likely responsible for proliferation of the leukemic cells, but the pathways involved are ill understood. Retinoic acid and arsenic both induce clinical remissions in patients. How exactly these drugs induce remissions is disputed, but both induce degradation of the PML/RAR $\alpha$  fusion, retinoic acid targeting its RAR $\alpha$  moiety and arsenic its PML moiety. Transgenic mice have demonstrated that the reciprocal RAR $\alpha$ /PML fusion accelerates and facilitates leukemogenesis. These animals constitute invaluable preclinical models to assess a variety of drugs targeted at the PML/RAR $\alpha$  fusion or acting downstream on its molecular targets.

## TIRÉS À PART

H. de Thé.