

79

## Nouvelles substances (R.L.B.) actives dans la leucopoïèse et la formation des plaquettes

M. BELJANSKI, M. PLAWECKI, P. BOURGAREL, Monique BELJANSKI (\*)

Présenté par P. LÉPINE

On sait que le traitement à l'aide de certains médicaments employés en chimiothérapie anticancéreuse abaisse de façon dangereuse le taux des leucocytes et plaquettes dans le sang et doit, pour cette raison, être fréquemment interrompu, ce qui diminue d'autant son efficacité. On était jusqu'à présent désarmé contre cet effet toxique.

Nos recherches biochimiques antérieures nous avaient permis d'isoler plusieurs types d'acides ribonucléiques à courte chaîne dont certains, que nous appelons *amorces*, ont la propriété de déclencher la réplication de l'ADN des cellules, c'est-à-dire en définitive la multiplication cellulaire et ceci de façon spécifique, chaque amorceur agissant sur l'ADN d'un type de cellule déterminé (1) (2) (3) (4) (5).

Nous venons d'isoler de nouveaux amorces qui montrent une affinité spécifique pour l'ADN extrait de tissus hématopoïétiques. Ils stimulent de façon considérable la réplication d'ADN extrait de rate ou de moelle osseuse de mammifères, alors qu'ils restent sans action sur, par exemple, l'ADN de cerveau. *In vivo*, lorsqu'on les a marqués à l'aide d'un traceur radioactif et qu'on suit leur distribution dans le corps de l'animal après administration I.V. ou *per os*, on retrouve ces amorces fortement concentrés dans la rate et dans la moelle osseuse. Enfin, quand, à des lapins traités par de fortes doses d'un médicament tel que l'Endoxan (cyclophosphamide) qui diminue fortement le taux des leucocytes circulants, nous administrons quelques milligrammes de ces nouveaux amorces, nous constatons que le taux de leucocytes remonte rapidement à sa valeur normale. Aussi avons-nous nommé ces amorces R.L.B. (Remontent-Leucocytes Beljanski).

Les R.L.B. sont obtenus à partir d'un hôte essentiel du tractus intestinal humain, *Escherichia coli*, dont on extrait les ARN ribosomiques qui sont ensuite dégradés en fragments par une enzyme également de grande importance pour l'organisme, la ribonucléase pancréatique. En choisissant cette méthode, nous avons tenu à nous rapprocher le plus possible des conditions dans lesquelles nous pensons que les R.L.B. et, d'une manière générale, bien d'autres ARN-fragments peuvent être produits de façon naturelle

(\*) Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacodynamie, Tour D1, 92290 Chatenay-Malabry.

dans l'organisme en réponse à des stimulations variées et pour agir dans des réactions biochimiques bien précises. Nous avons également obtenu les R.L.B. à l'aide de la ribonucléase N<sup>1</sup> de *Neurospora crassa*, ainsi que par l'action ménagée de la soude ou de la potasse.

Nous avons montré (6) que les R.L.B. sont des ARN de faible poids moléculaire à simple chaîne qui ne contiennent ni ADN, ni impureté de nature protéique. Leur activité est bien liée à la structure spécifique de leur molécule, car s'ils sont complètement dégradés ils perdent toutes leurs propriétés stimulantes caractéristiques *in vitro* comme *in vivo* (6). En outre, pour agir comme amorceur, il faut que leur molécule se termine par un groupement 3'OH libre (1).

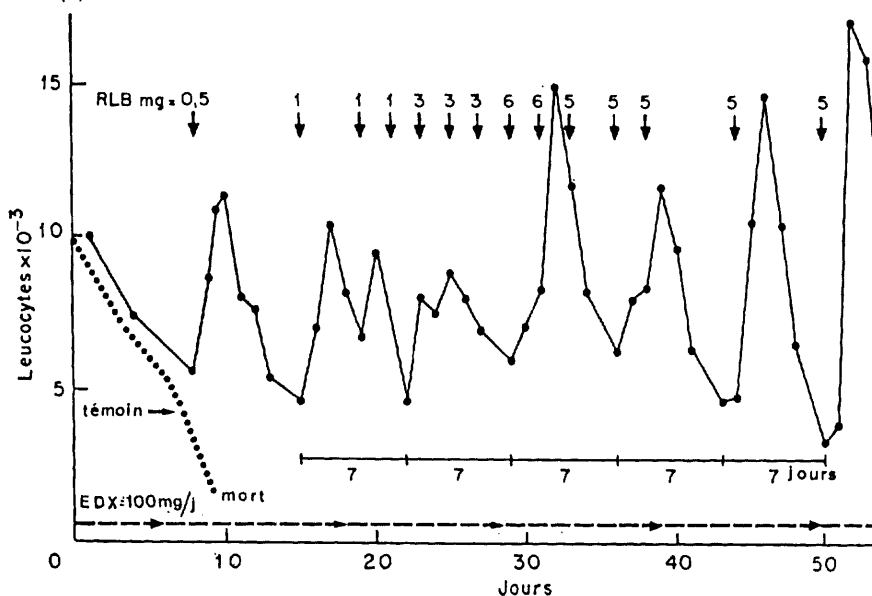


FIG. 1. — Effet des doses répétées de R.L.B. dans la leucopoièse chez un lapin constamment traité par de fortes doses d'Endoxan. Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte et dans la figure. Le nombre des leucocytes a été déterminé à l'aide d'un « Coulter-Counter ».

Nos expériences sur la stimulation de la formation des leucocytes et des plaquettes par les R.L.B. ont été faites principalement sur le lapin blanc (New-Zealand) soumis à de fortes doses d'antimitotiques employés en thérapeutique anticancéreuse humaine : l'Endoxan (cyclophosphamide) et le Méthotrexate, qui diminuent le nombre des leucocytes dans le sang, et la Daunorubicine, qui abaisse en outre fortement le taux des plaquettes circulantes.

Le sang du lapin normal contient entre 7000 et 12000 leucocytes par mm<sup>3</sup> (il y a de fortes variations individuelles). L'administration quotidienne à des lapins de 3 à 4 kg, par voie I.V., de 100 mg d'Endoxan (soit 75 mg de cyclophosphamide), ce qui représente une quarantaine de fois la dose hebdo-

madaira communément prescrite en thérapeutique humaine, est létale en 8 à 10 jours. En une semaine, le taux des leucocytes tombe à 5000 ou même 3000 par  $\text{mm}^3$ . Si l'on injecte à ce moment, par voie I.V., de 1 à 6 mg de R.L.B. (dissous dans de l'eau physiologique), le taux de leucocytes remonte rapidement et redevient normal en 24 à 48 heures (Fig. 1). Des lapins ont été traités ainsi quotidiennement par l'Endoxan pendant 4 à 8 semaines et l'un d'eux pendant 81 jours; il a suffi d'une injection de R.L.B. par semaine de 2 à 4 mg en moyenne, parfois de 0,5 mg (la dose de R.L.B. étant au maximum de l'ordre du 20<sup>e</sup> de celle de l'antimitotique) pour maintenir les lapins en bonne santé avec un taux leucocytaire suffisamment élevé pendant toute la durée du traitement. L'Endoxan doit être interrompu dès que l'abaissement du nombre des érythrocytes met en danger la vie de l'animal, car les R.L.B. n'agissent pas sur les érythrocytes et sont peu actifs lorsque le taux de ceux-ci est trop bas. Après arrêt de l'Endoxan et des R.L.B., les lapins ont survécu longtemps en parfaite santé (recul de plus d'un an dans certains cas).

L'augmentation du nombre des leucocytes n'excède jamais 250 % du taux le plus bas dû à l'Endoxan. Toute augmentation éventuelle du taux leucocytaire au-delà des valeurs physiologiques normales (excès qui n'a jamais dépassé 100 % de ces valeurs) est corrigée en l'espace de 24 heures par une puissante régulation naturelle. Celle-ci intervient également chez les lapins témoins, non traités par l'Endoxan : seule une première injection de R.L.B. provoque une remontée du taux leucocytaire; ce taux revient rapidement à sa valeur normale et s'y maintient ensuite constamment en dépit du fait que l'on administre à nouveau des R.L.B.

Chez le lapin *constamment soumis à l'action de l'Endoxan* (100 mg par jour) et qui après une semaine présente un taux leucocytaire rétabli pour 6 jours par une première injection I.V. de 0,5 mg de R.L.B., puis reçoit après ce laps de temps des doses croissantes de R.L.B. répétées tous les deux jours (de 1 à 5 mg), nous n'avons constaté ni accroissement excessif du nombre de leucocytes, ni perte d'activité due à la répétition des doses, ni action toxique, ni apparition d'une résistance aux R.L.B. Leur action stimulante ne se manifeste que lorsque l'effet d'une dose précédente s'estompe; le cycle de cette activité est d'environ une semaine. De très fortes doses de R.L.B. (50 mg dans 3 ml de solution physiologique administrés en une seule injection I.V. à un lapin témoin) sont parfaitement tolérées.

Chez le lapin traité par le Méthotrexate (60 mg par jour), la diminution du nombre de leucocytes est importante et rapide; le retour à la normale s'accomplit plus ou moins vite selon que les R.L.B. sont administrés par voie I.V., I.M., S.C. ou *per os*. (Fig. 2).

Contrairement à la phytohémagglutinine qui transforme *in vitro* certains lymphocytes en blastes (aucune action sur la formation de plaquettes) mais R.L.B. agissent sur la genèse des globules blancs normaux ainsi que sur la formation des plaquettes.

Tant chez les lapins traités par l'Endoxan que chez les témoins, on note parfois, environ 4 heures après l'injection I.V. de R.L.B., une baisse transitoire du nombre des leucocytes (qui tombe de 7 000 à 3 500 par exemple), suivie d'une remontée rapide et forte pendant 24 heures et enfin d'un retour

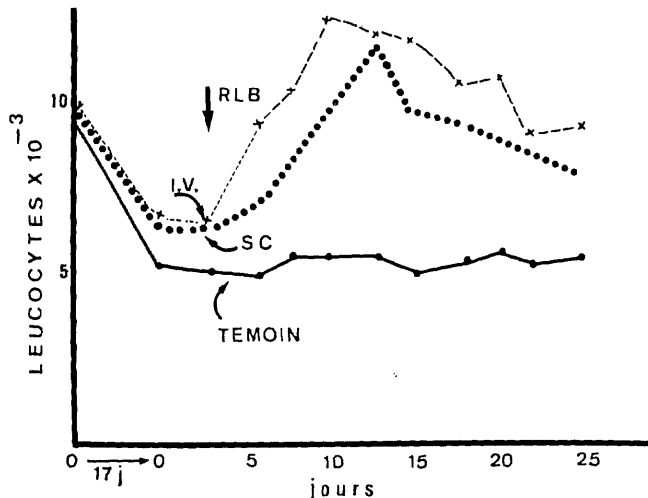


FIG. 2. — Effet des R.L.B. sur l'évolution des leucocytes circulants chez un lapin traité par le méthotrexate.

Chacun des trois lapins a reçu 55 mg de méthotrexate par voie I.V. 48 heures après, un lapin a reçu 5 mg de R.L.B. par voie I.V., l'autre par voie S.C., et le troisième a servi de témoin.

à la normale. Cette réaction ne se produit ni chez tous les individus, ni à coup sûr chez le même individu au cours d'injections répétées. Les R.L.B. sont relativement riches en nucléotides A et G (liaison phosphodiester), et il est probable que ceux-ci sont responsables du phénomène, car le Poly AG, injecté aux lapins par voie I.V. à la dose de 3 mg, provoque une baisse temporaire du nombre des leucocytes circulants. Lorsque les R.L.B. sont administrés par voie orale, cette baisse transitoire ne se produit pas. Pour un même résultat, les doses *per os* doivent être deux fois plus fortes que les doses I.V. La remontée du taux leucocytaire est un peu plus lente. Mais on n'observe ni toxicité, ni accoutumance, ni effet cumulatif indésirable.

L'administration d'Endoxan et de certains autres médicaments a pour conséquence grave d'entraîner un déséquilibre entre le pourcentage des lymphocytes et celui des polynucléaires, au détriment de ces derniers. Chez le lapin, où ces deux types de globules blancs existent en quantités à peu près égales, les polynucléaires peuvent, après une semaine de traitement par l'Endoxan (100 mg par jour), tomber de 50-65 % à environ 18 % du nombre total de leucocytes. Une seule injection I.V. de 5 mg de R.L.B. (ou 10 à 20 mg par voie orale) rétablit en 4 ou 5 heures l'équilibre normal entre polynucléaires

et lymphocytes. Ici encore, l'effet d'une dose de R.L.B. dure quelques jours et de nouvelles doses administrées à intervalles réguliers maintiennent l'équilibre.

L'action stimulante des R.L.B. sur la formation des plaquettes a été en particulier étudiée chez des lapins (3-4 kg) traités par la Daunorubicine (7). Administré par voie I.V. à raison de 1,5 mg par Kg et par jour pendant 4 jours consécutifs, ce médicament entraîne une diminution du nombre des plaquettes telle que l'animal meurt d'hémorragie au bout de 6 à 8 jours. En une semaine, le nombre des plaquettes circulantes, normalement de  $400.000/m^3$ , peut tomber à  $15.000/m^3$ . A ce moment, deux injections I.V. de 5 mg de R.L.B. accompagnées de 20 mg *per os* (un excès) ont permis de provoquer une remontée du taux des plaquettes, qui reprend sa valeur normale 5 à 6 jours après la seconde injection et reste stable pendant plus de trois semaines en dépit de nouvelles injections de Daunorubicine (fig. 3). On retrouve, dans le cas des plaquettes, les résultats observés dans celui des leucocytes : bonne efficacité des diverses voies d'administration, absence d'effets adverses et, parfois, baisse transitoire suivie de remontée lors des injections I.V.

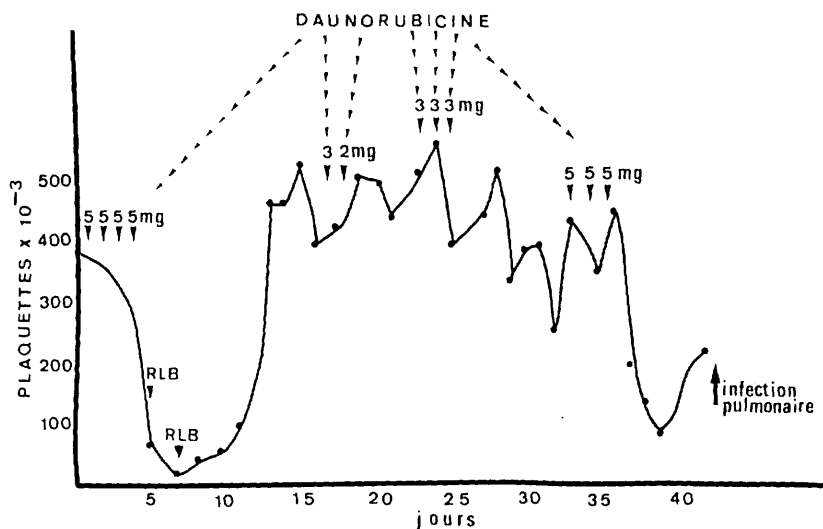


FIG. 3. — Effet des R.L.B. sur l'évolution des plaquettes circulantes chez un lapin traité par la Daunorubicine.

Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte et dans la figure. Le nombre des plaquettes a été déterminé à l'aide d'un « Coulter-Counter ».

Injectés par voie I.V., les R.L.B. sont très faiblement pyrogènes : chez des lapins (témoins ainsi que sous Endoxan) 1,5  $\mu$ g de Poly I-Poly C élève la température anale de 2 °C pendant environ 5 heures; 1 mg de Poly AG/Kg fait rapidement monter la température de 2 °C et elle demeure relativement élevée pendant plus de 28 heures; 1 mg de R.L.B./Kg ne fait monter la tem-

pérature que de 1°C pendant 4 heures. Si l'on augmente la dose des R.L.B., l'élévation de température n'est pas plus forte, mais la période de température dure plus longtemps. Les R.L.B. complètement dégradés injectés par I.V. ou bien administrés intacts par voie orale ne sont aucunement pyrogènes.

La réaction de Schwartzman est complètement négative lors des essais faits sur le lapin avec les R.L.B., ce qui permet donc d'affirmer que ceux-ci ne contiennent pas d'endotoxine (signalons qu'il est possible d'obtenir des R.L.B. actifs à partir d'ARN isolés de foie de mammifères). D'autre part, la libération de leucocytes provoquée par l'injection d'endotoxine ne dure que quelques heures, tandis que l'effet des R.L.B. se prolonge pendant des jours.

Des expériences menées sur la souris porteuse de tumeurs ascitiques d'Ehrlich et traitée par l'Endoxan et les R.L.B. nous ont montré que ces derniers n'entraient aucunement l'action antimototique du médicament. Nous avons également pu constater, chez des souris porteuses d'ascite d'Ehrlich ou de lymphome YC 8, que les R.L.B. ne favorisent en aucune manière la multiplication des cellules tumorales.

Nous pensons que les R.L.B. agissent sur les cellules souches qui donnent naissance aux leucocytes et aux plaquettes, sans toutefois pouvoir préciser s'ils amorcent la réplication de l'ADN des cellules du compartiment de division ou de maturation. Nous espérons que les R.L.B., non toxiques, aisés à fabriquer, capables de normaliser le taux de leucocytes et de plaquettes et de rééquilibrer les pourcentages de lymphocytes et polynucléaires lorsque les conditions sanguines normales sont bouleversées par certains antimitotiques, permettront d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse et, par extension, celle de la radiothérapie, efficacité limitée jusqu'à présent par leurs effets délétères sur les systèmes de défense de l'organisme.

#### RÉSUMÉ

Lorsque les taux de leucocytes et de plaquettes dans le sang ont été abaissés par l'effet secondaire de certaines chimiothérapies, ces taux peuvent être ramenés rapidement et sans danger à leurs valeurs normales par des ARN-fragments, les R.L.B.

SUMMARY : *New substances active on leucocytes and platelets formation.*

When the leucocytes and blood platelets have their counts reduced in the blood following chemotherapy, they can be rapidly and safely, restored to normal values by injecting cellular ARN fragments, which the authors call R.L.B. factors.

REMERCIEMENTS : nous remercions le Dr R. Maral (Rhône-Poulenc) de nous avoir aimablement fourni la Daunorubicine.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BELJANSKI et coll. *Comptes rendus*, 1975, 280, Série D, p. 363.
  - [2] PLawecki (M.) et BELJANSKI (M.), *Comptes rendus*, 1974, 278, Série D, p. 1413.
  - [3] BELJANSKI (M.) et coll. *Comptes rendus*, 1975, 280, Série D, p. 783 et p. 1189.
  - [4] BELJANSKI (M.) et AARON-DA CUNHA (M.I.). *Molecular Biology Reports*, 1976, 2, P. 497.
  - [5] BELJANSKI (M.), demande de brevet français n° 7616875.
  - [6] BELJANSKI (M.) et coll. *Comptes rendus* (sous presse).
-