

L'arabinoxylane de son de riz MGN-3 module l'immunité innée chez les patients atteints de myélome multiple

Dana Cholujoja - Jana Jakubikova - Branislav Czako -
Michaela Martisova - Luba Hunakova - Jozef Duraj -
Martin Mistrik - Jan Sedlak

Reçu : 27 février 2012/Accepté : 14 août 2012
© Springer-Verlag 2012

Résumé Les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes Natural Killer (NK) sont des composants centraux de l'immunité innée qui empêchent la croissance des tumeurs. Les effets thérapeutiques de certains médicaments anti-myélome sont partiellement médiés par le ciblage de la réponse immunitaire innée. En outre, de nouveaux types de composés naturels ont été mis au point pour moduler efficacement l'activité des compartiments cellulaires et humoraux de l'immunité. Le MGN-3 est connu pour être un activateur des lymphocytes Natural Killer, inducteur de l'apoptose et de la production de cytokines et modulateur de la maturation et de la différenciation des cellules dendritiques *in vitro*. Nous avons mené une étude randomisée, contrôlée par placebo afin d'examiner les effets du MGN-3 sur les paramètres du système immunitaire inné chez 48 patients atteints de myélome multiple. Nous avons réalisé une analyse immunophénotypique des échantillons de sang périphérique, déterminé l'activité des lymphocytes NK et évalué les profils de cytokines du plasma avant et pendant 3 mois de traitement. Les résultats démontrent une nette augmentation de l'activité NK chez les patients traités au MGN-3 par rapport au groupe placebo, un niveau accru de DC myéloïdes dans le sang périphérique et des concentrations accrues de cytokines liées aux cellules T helper de type 1. La présente étude suggère que le MGN-3 pourrait représenter un produit immunologiquement pertinent pour l'activation de l'immunité innée dans de nombreux

cas de maladies infectieuses l'efficacité clinique de ce médicament est démontrée par des examens supplémentaires de patients atteints de myélome.

Mots clés Immunité innée • Cellules dendritiques • Lymphocytes Natural Killer • Cytokines • MGN-3 • Myélome multiple

Introduction

Différents types de cellules de la moelle osseuse (MO), dont les cellules du système immunitaire, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules stromales de la MO peuvent contribuer au développement du myélome multiple (MM). Les patients atteints de MM souffrent d'une capacité immunitaire généralement diminuée qui est probablement due à la création d'un environnement suppressif. Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans l'immunité innée et adaptative, car elles interagissent avec les cellules des deux systèmes. Les CD sont essentielles à l'amorçage des lymphocytes T, mais la charge tumorale peut nuire à la différenciation des CD, ce qui les rend dysfonctionnelles [1]. Un manque de stimulation dans l'environnement tumoral ainsi que des défauts de différenciation des CD peuvent être responsables de la faible activité du système immunitaire [2]. Chez les patients atteints de MM au moment du diagnostic, les taux de CD myéloïdes (CDM) et de CD plasmacytoïdes (CDP) sont réduits par rapport aux donneurs témoins, mais les taux normaux de CDM tendent à être rétablis en cas de rémission [3]. L'interaction entre les CD et les lymphocytes NK peut déclencher l'activation des lymphocytes NK. Il est important de noter que les CD ont également besoin de stimuli externes pour déclencher les lymphocytes NK [4], car les CD immatures sont de piètres inducteurs de la sécrétion d'interféron (IFN)- γ par les lymphocytes NK. Une fois activés, les lymphocytes NK peuvent soit tuer, soit favoriser la maturation des CD, en fonction du rapport CD/lymphocytes NK [5].

Les cellules myélomateuses elles-mêmes peuvent affecter l'immunité de l'hôte. Ces cellules préparent les CD à un état de maturation qui favorise la génération de lymphocytes T régulateurs plutôt que

Les auteurs Dana Cholujoja et Jana Jakubikova ont contribué de manière égale à ce travail.

D. Cholujoja (✉) • J. Jakubikova • L. Hunakova • J. Duraj •
J. Sedlak
Institut de recherche sur le cancer SAS, Vlarska 7,
833 91 Bratislava, Slovaquie
e-mail : dana.cholujoja@savba.sk

B. Czako • M. Martisova • M. Mistrik
Département d'hématologie et de transfusion de l'hôpital universitaire de
Bratislava, hôpital Saint-Cyrille et Méthode, Antolska 11, 851 07
Bratislava, Slovaquie

phénotypes effecteurs [6]. Contrairement aux plasmocytes normaux, les cellules primaires du MM expriment l'antigène CD1d et peuvent activer les cellules T tueuses naturelles invariantes (iNKT) [7]. Chez les patients atteints de MM, il existe une polarisation marquée vers les cytokines des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2), tandis que les cytokines des lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1) restent supprimées [8]. L'interleukine (IL)-6 et l'IL-10 favorisent la prolifération des cellules MM [9]. Le marqueur pronostique du MM, la β 2-microglobuline, est un régulateur négatif du système immunitaire, et des concentrations élevées de β 2-microglobuline inhibent la génération de DC fonctionnelles in vitro [10].

Une proportion significative d'agents chimiothérapeutiques courants utilisés à des concentrations infra-cytotoxiques augmentent la capacité de stimulation des CD [11]. Une étude préclinique a démontré que le nouvel inhibiteur de pan-histone désacétylase LBH589 a diminué la production de cytokines pendant l'activation des CD induite par les récepteurs de type Toll et a altéré de manière significative le phénotype et la fonction des CD [12]. Les médicaments peuvent influencer d'autres types de cellules présentes dans le microenvironnement tumoral, en plus des CD. La gemcitabine réduit spécifiquement le nombre de cellules suppressives myéloïdes présentes dans la rate des animaux porteurs de grosses tumeurs [13]. Le nouveau médicament anti-MM, le lénalidomide, renforce l'effet antitumoral des lymphocytes iNKT en partie en augmentant la production de cytokines Th1 et en réduisant la production de cytokines Th2 [7]. Le lénalidomide et le thalidomide abrogent l'effet stimulant des cellules stromales et diminuent de manière significative le pourcentage de cellules MM clonogéniques de type souche [14]. Le bortézomib, agent pharmacologique à petites molécules, est un inhibiteur du protéasome qui a reçu l'approbation de la FDA pour le traitement du MM, qui a ensuite été étendu à d'autres hémopathies malignes. Les inhibiteurs du protéasome diminuent la présentation des peptides antigéniques et réduisent la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques, mais augmentent de manière inattendue la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes NK [15]. L'interaction entre les récepteurs activateurs des lymphocytes NK et leurs ligands représente une partie cruciale de la réponse immunitaire innée contre plusieurs tumeurs malignes dont le MM. Bien que la potentialisation de la lyse par les lymphocytes NK induite par les médicaments s'accompagne d'une augmentation de l'expression des ligands [16–18], l'effet potentiellement suppressif de l'augmentation des ligands sur l'activité cytotoxique dans le MM doit être pris en compte [19]. Le dérivé de la curcumine FLLL32 inhibe sélectivement la phosphorylation de STAT3 et la liaison de STAT3 à l'ADN, réduit la viabilité cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules de myélome multiple et d'autres carcinomes cancéreux dont la signalisation STAT3 est activée de manière constitutive [20]. Récemment, un potentiel synergique d'induction de l'apoptose par l'arabinoxylane de son de riz et la curcumine a été observé dans la lignée cellulaire MM humaine U266 [21].

Des recherches antérieures sur le MGN-3 ont suggéré que ce composé pourrait avoir des propriétés immunomodulatrices,

principalement en agissant sur les lymphocytes NK et en renforçant leur activité [22, 23]. Nous avons montré que la MGN-3 induit la maturation des CD dérivées de monocytes humains in vitro [24]. Dans cette étude randomisée contrôlée par placebo, nous avons évalué les effets modulateurs potentiels du MGN-3 sur les paramètres du système immunitaire inné chez des patients atteints de MM.

Matériels et méthodes

Patients

Pour les diagnostics de MM, des aspirats de MO ont été évalués pour déterminer le pourcentage de plasmocytes de BM par morphologie et électrophorèse du sérum pour la présence d'immunoglobulines (Ig) mono-clonales. L'évaluation préalable au traitement comprenait une numération sanguine complète, des tests biochimiques pour les fonctions rénales et hépatiques, et une analyse de la β 2-microglobuline et de la protéine C-réactive. Une étude radiologique du squelette a été réalisée pour évaluer la présence d'une maladie osseuse. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital universitaire, conformément à la déclaration d'Helsinki sur l'utilisation de sujets humains à des fins de recherche. Les patients ont été diagnostiqués et traités à l'hôpital St. Cyril et Méthode (Bratislava, Slovaquie). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé par écrit. Au total, 48 patients ayant reçu un diagnostic de MM (dont 27, soit 56 % présentaient le sous-type IgG) ont été évalués avant et après le traitement par MGN-3 dans le cadre de cette étude randomisée, en double aveugle et contrôlée par placebo (un tiers des patients recrutés ont reçu un placebo), et leurs caractéristiques de base sont résumées dans le Tableau 1. Les patients traités ont reçu en alternance une chimiothérapie basée sur une association d'agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide), d'anthracyclines (doxorubicine, idarubicine) et de glucocorticoïdes (dexaméthasone). Les patients positifs pour l'Ig monoclonale, présentant moins de 20 % de plasmocytes myélomateux dans l'aspirat de MO et négatifs pour les critères CRAB n'ont pas reçu de traitement chimiothérapeutique et sont restés en observation. Les patients ont reçu 2 g par jour de granulés de MGN-3 en poudre ou une quantité équivalente de placebo dissous dans de l'eau. Le contenu des sachets de placebo et de MGN-3 était non différenciable en termes de goût et d'apparence. Les patients ont été suivis pendant une semaine avant le traitement pour obtenir les valeurs de référence de tous les paramètres analysés, puis pendant trois mois de traitement. Du sang périphérique (15 ml) a été prélevé pour analyse dans des tubes contenant de l'héparine toutes les 4 semaines.

MGN-3

Le MGN-3 est un complément alimentaire dérivé de l'hémicellulose du son de riz qui a été traité enzymatiquement par de multiples enzymes d'hydrolyse provenant des mycéliums de *Lentinus edodes* (champignons shiitake). Le composant actif est un

Tableau 1 Caractéristiques à la référence des patients du groupe placebo et du groupe MGN-3

	Groupe MGN-3 (N = 32)	Groupe placebo (N = 16)
Âge, années médiane (plage)	65 (36-82)	63 (50-80)
Rapport de sexe, hommes/femmes	10/22	7/9
<i>Sous-type de myélome</i>		
IgG	17	10
IgA	7	2
IgM	1	
Chaînes légères	2	2
Non sécrétoire	3	1
NA	2	1
<i>Stade</i>		
Maladie de Durie-Salmon stade I/II/III	3/8/17	2/5/9
Plasmocytome solitaire	2	
NA	2	
<i>Traitement</i>		
Sans CHT, patients en observation	11	6
CHT uniquement avant MGN-3	7	3
CHT pendant MGN-3	14	7

NA non analysé, CHT chimiothérapie

arabinoxylane qui contient un xylose dans sa chaîne principale et un polymère d'arabinose dans sa chaîne latérale. Le MGN-3 a été fourni par Daiwa Pharmaceuticals Co. Ltd, Tokyo, Japon.

Test de cytotoxicité basé sur la cytométrie de flux

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) effectrices ont été isolées à partir des échantillons prélevés dans des tubes traités à l'héparine par centrifugation en gradient de densité au Pancol (1,077 g/ml, PAN-Biotech, Aidenbach, Allemagne). Les cellules mononucléaires de l'interface ont été collectées, lavées deux fois avec du PBS et remises en suspension dans 10 ml de milieu de culture complet (CM ; RPMI 1640, 10 % de FCS inactivé à la chaleur, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine) avant d'être utilisées dans le test de cytotoxicité. Les cellules Target K-562, une lignée cellulaire érythroleucémique, ont été maintenues en CM et divisées tous les 3 à 4 jours. Pour les tests, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS et chargées avec 0,1 µM de sonde de calcéine (CAM ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) dans un milieu RPMI sans FCS pendant 15 minutes à 37 °C dans l'obscurité.

Pour déterminer le nombre absolu de cellules viables et mortes, des volumes égaux (100 µl) de Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis) et de cellules ont été mélangés et analysés avec un cytomètre de flux Coulter Epics Altra. La viabilité des cellules cibles et effectrices a été déterminée par la négativité à l'iodure de propidium (IP) (4 µl d'IP par échantillon, stock de 1 mg/ml). Seules les populations présentant une viabilité de [95 % ont fait l'objet d'une analyse plus poussée.

Les concentrations cellulaires ont été calculées selon la formule suivante : cellules/µl = (numération viable cellules X concentration billes)/(numération billes).

L'activité cytotoxique des NK dans les PBMC de patients atteints de MM a été déterminée contre les cellules cibles K-562 en utilisant le test CAM comme décrit précédemment [25]. Brièvement, les cellules cibles K-562 marquées au CAM ont été mélangées avec des PBMC effectrices pour obtenir six dilutions en série de deux fois les rapports E/T en commençant par 50:1. Des triplicats des échantillons et des contrôles ont été ensemencés dans des microplaques 96 puits à fond en V, centrifugés à 200x g 3 minutes et incubés dans le CM pendant 3 heures à 5 % de CO₂, 37 °C. Ensuite, les échantillons ont été transférés dans des tubes cytométriques et de l'IP (4 µl d'un stock de 1 mg/ml par échantillon) a été ajouté pour identifier les cellules mortes. Les échantillons ont été analysés avec un cytomètre de flux Coulter Epics Altra à quatre couleurs équipé d'un laser à argon fonctionnant à 488 nm. La sélection a été effectuée en utilisant la diffusion latérale (SSC ; ordonnée) par rapport à l'échelle logarithmique de la fluorescence verte de la sonde CAM (abscisse) pour séparer les cellules cibles des cellules effectrices. Pour mesurer la mort des cellules cibles, les événements positifs à la fluorescence verte ont été classés et la positivité de l'IP a été analysée. En moyenne, 3.000 cellules cibles ont été collectées par échantillon. Les données ont été analysées avec le logiciel FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA, États-Unis).

Le pourcentage de lyse spécifique (PSL) a été calculé à chaque rapport E/T comme suit : % de lyse spécifique = (CT-TE/CT) x 100 (où CT est le pourcentage de cellules cibles fluorescentes viables dans les tubes de contrôle et TE est le pourcentage de cellules cibles fluorescentes viables dans les tubes expérimentaux (cible + effecteur)). Une unité lytique (UL) est définie comme le nombre de cellules effectrices nécessaires pour lyser 20 % d'un nombre standard prédéterminé (TSTD = 2 x 10⁴) de cellules cibles. Le calcul de LU a été effectué en ajustant la courbe sur un tracé semi-log₂ valeurs E/T transformées logarithmiquement en valeurs E/T versus la lyse spécifique, conformément à Bryant et al. [26] and Pross et al. [27]. Les résultats sont exprimés en nombre d'UL dans 10⁷ cellules effectrices.

Analyse immunophénotypique des cellules

Les anticorps monoclonaux anti-humains de souris suivants ont été utilisés pour analyser les sous-ensembles de cellules mDC, pDC et NK dans le sang périphérique de patients atteints de MM : CD11c-FITC, CD16-FITC, CD123-PE, CD56-PE, HLA-DR-ECD, CD45-ECD, CD3-PC5, CD14-PC5, CD16-PC5 et CD19-PC5 (Immunotech, Marseille, France). Les sous-ensembles de CDM et de CDP circulants ont été définis par l'absence concomitante de marqueurs de lignage (CD3⁺, CD14⁺, CD16⁺, and CD19⁺), d'expression HLA-DR et d'exclusivité réciproque entre les deux sous-ensembles l'expression membranaire du CD11c ou du CD123, respectivement.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de mDC ou pDC parmi les cellules HLA-DR⁺Lin⁻. La sous-population de cellules NK a été évaluée comme le pourcentage de cellules CD56^{dim}CD16⁺ et CD56^{bright}CD16⁻ parmi les lymphocytes périphériques CD3⁺CD45⁺.

Pour l'immunophénotypage, une coloration du sang entier et une méthode de lyse/sans lavage ont été utilisées. En bref, des aliquotes de sang total (50 µl/puits) ont été colorées avec 2 µl d'ACm conjugués au fluorochrome approprié dans des microplaques 96 puits à fond en V à température ambiante pendant 30 minutes dans l'obscurité. La solution de lyse OptiLyse B (50 µl) a été ajoutée à chaque puits et incubée pendant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été transférés dans des tubes cytométriques et incubés avec de l'H₂O désionisée (500 µl) pendant 10 minutes. Les échantillons ont été mesurés par cytométrie de flux (1 × 10⁵ événements comptés), et les données ont été analysées avec le logiciel FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA, États-Unis).

Dosage immunologique multiplex des cytokines basé sur des microbilles

Les échantillons de plasma ont été préparés à partir de sang périphérique hépariné (1 ml) par centrifugation à 5 000 tours/minute pendant 10 minutes. Les surnageants ont été recueillis et filtrés à travers un filtre stérile.

Des filtres de 0,22 µm ont été utilisés et des aliquotes ont été conservées à l'abri de l'humidité -80 °C jusqu'à l'analyse. Les taux plasmatiques de cytokines, notamment l'IL-1β, l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra), l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-8, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-12(p70), l'IL-13, l'IL-15, l'IL-17, l'IFN-γ et le facteur de nécrose tumorale (TNF)-α, ont été analysés à l'aide du système Bio-Plex Suspension Array (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, États-Unis). Le dosage immunologique multiplex des cytokines à base de microbilles a été réalisé dans des microplaques à 96 puits filtrants conformément aux instructions du fabricant. Les standards et les échantillons de cytokines (50 µl) ont été dilués dans un tampon de dilution du plasma et incubés avec les microsphères marquées par fluorescence couplées à des anticorps monoclonaux spécifiques (50 µl) pendant 30 minutes sur un agitateur de plaques (300 tr/min) dans l'obscurité. Après une étape de lavage, les billes ont été incubées avec le cocktail d'anticorps de détection biotinylés (25 µl/puits) pendant 30 minutes, puis avec la streptavidine-PE (50 µl/puits) pendant 10 minutes. Enfin, 125 µl de tampon de dosage ont été ajoutés à chaque puits avant de lire la plaque sur un système Bio-Plex. Les concentrations de cytokines ont été calculées avec le logiciel Bio-Plex Manager.

Analyse statistique

La signification statistique a été calculée à l'aide de la suite logicielle SigmaPlot ver. 11 (Systat Software Inc., Erkrath, Allemagne). Le test *T* apparié, le test des rangs signés de Wilcoxon ou le test de la somme des rangs de Mann-Whitney ont été utilisés pour l'évaluation des données.

Résultats

Le MGN-3 augmente l'activité cytolytique des NK chez les patients atteints de MM.

Le pourcentage de base des lymphocytes NK cytolytiques CD56^{dim}CD16⁺ et des cellules NK productrices de cytokines CD56^{bright}CD16⁻ parmi les lymphocytes périphériques CD45⁺CD3⁺ ne différait pas entre les patients traités par MGN-3 et ceux traités au placebo (24,5 ± 2,8 % vs 17,5 ± 3,5 %, *p* = 0,128 ; et 1,4 ± 0,2 % vs 2,2 ± 1,0 %, *p* = 0,683, respectivement). Aucun changement statistiquement significatif n'a été observé dans les pourcentages des sous-populations CD56^{dim} et CD56^{bright} des cellules NK au cours du traitement (données non présentées).

L'activité cytolytique des lymphocytes NK contre les cibles sensibles du K-562 a été analysée dans les PBMC de patients atteints de MM recevant du MGN-3 (*N* = 32) ou un placebo (*N* = 16) à l'aide d'un test CAM basé sur la cytométrie de flux. Des échantillons de sang ont été prélevés une semaine avant le traitement (référence) et après 1, 2 et 3 mois de traitement. L'activité cytolytique des NK a été évaluée en tant que PSL à des rapports *E/T* de 50:1, 25:1 et 12,5:1 (Fig. 1a) et en calculant le nombre d'UL produisant 20 % de cytotoxicité pour 10⁷ cellules effectrices (Fig. 1b).

Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre les groupes MGN-3 et placebo en ce qui concerne les niveaux de base de l'activité NK lorsque la PSL a été comparée à des rapports *E/T* de 50:1, 25:1, et 12,5:1 (*p* = 0,297, *p* = 0,257, et *p* = 0,307, respectivement) ou les UL (*p* = 0,814). L'activité cytolytique des NK a augmenté de façon significative au-dessus des niveaux de base (27 ± 4,1 % à 50:1 ; 17,1 ± 3,1 % à 25:1 ; 9,7 ± 1,9 % à 12,5:1) dans le groupe MGN-3 pour les trois rapports *E/T* après 1 mois (39,8 ± 5,8 %, *p* ≤ 0,001 à 50:1 ; 25 ± 3,6 % à 25:1, *p* = 0,003 ; 13,9 ± 2,2 % à 12,5:1, *p* = 0,008) et 2 mois de traitement (39,3 ± 5,7 %, *p* = 0,038 à 50:1 ; 25,3 ± 4,1 % à 25:1, *p* = 0,021 ; 14,4 ± 2,6 % à 12,5:1, *p* = 0,044 ; Fig. 1a). Cette augmentation de l'activité des lymphocytes NK a également été confirmée par la comparaison des unités lytiques ; une augmentation significative par rapport aux niveaux de base (30,8 ± 7,4 LU) a été observée après 1 mois (47,0 ± 8,5 LU, *p* = 0,045) et 2 mois (56,6 ± 12,2 LU, *p* = 0,029 ; Fig. 1b) de traitement par MGN-3. Aucune modification significative de l'activité des NK n'a été observée dans le groupe placebo au cours du traitement (Fig. 1a, b).

Le traitement par MGN-3 augmente les niveaux de DC myéloïdes circulantes

Les fréquences des DC myéloïdes CD11c⁺CD123⁻ et des DC plasmacytoïdes CD11c⁻CD123⁺ ainsi que le rapport mDC/ pDC ont été examinés chez les patients traités par MGN-3 (*N* = 20) et dans le groupe placebo (*N* = 15) avant le traitement (référence) et après 1, 2 et 3 mois de traitement (Fig. 2). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative du pourcentage de mDC dans les groupes placebo et MGN-3.

Fig. 1. Effet du traitement au MGN-3 sur l'activité cytolytique des NK chez les patients atteints de MM. L'activité lytique des lymphocytes NK contre les cellules cibles K-562 dans les PBMC de patients atteints de MM recevant du MGN-3 ($N = 32$) et ceux recevant un placebo ($N = 16$) a été évaluée à l'aide d'un test de cytotoxicité CAM basé sur la FC de 3 heures avant le traitement (*référence*), et après 1, 2 ou 3 mois de traitement. Signification statistique : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ par rapport à la référence.

a Le pourcentage moyen de lyse spécifique $\pm$ SEM est indiqué pour les rapports/T ratio 50:1, 25:1 et 12,5:1. **b** Unités lytiques (UL, moyenne $\pm$ SEM) pour 10^7 de cellules effectrices.

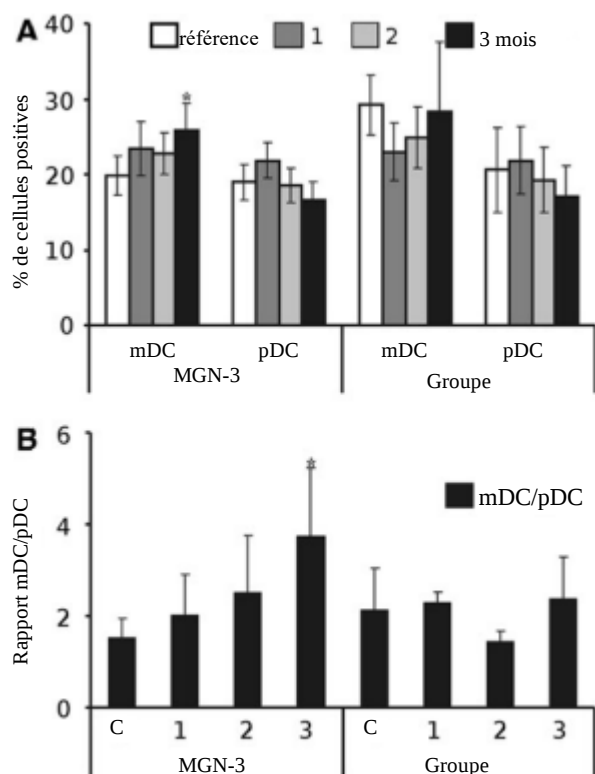
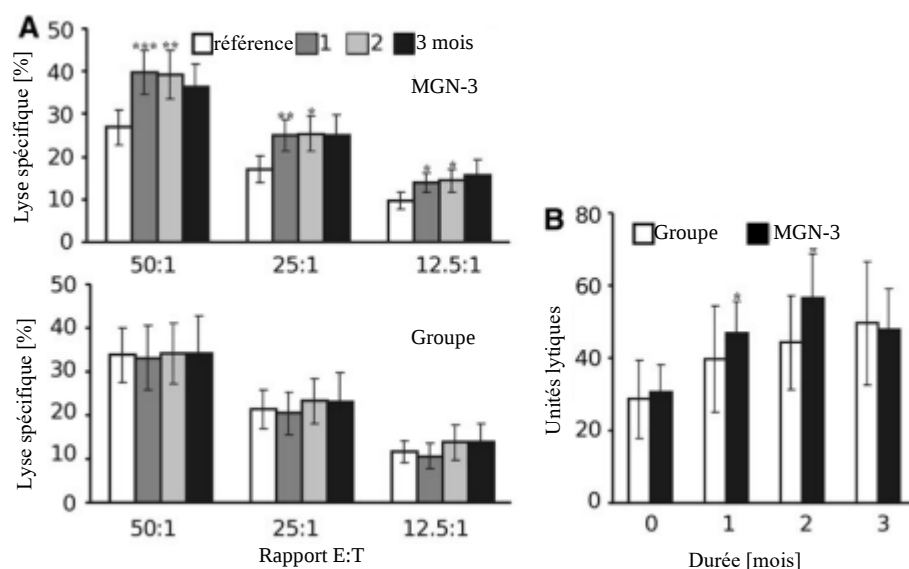


Fig. 2 Modifications au niveau des sous-ensembles de CD circulantes après traitement par MGN-3. Les niveaux de CD11c⁺CD123⁺ mDC et CD11c⁺CD123⁺ pDC dans le sang périphérique de patients atteints de MM recevant du MGN-3 ($N = 20$) et un placebo ($N = 15$) ont été analysés par cytométrie de flux avant le traitement (*référence*) et après 1, 2 et 3 mois de traitement * $p < 0,05$, en utilisant le test de rang signé de Wilcoxon. **a** Le pourcentage de cellules mDC et pDC de HLA-DR⁺Lin⁻ (moyenne $\pm$ SEM est montré. **b** Les valeurs du rapport mDC/pDC (moyenne $\pm$ SEM) dans le groupe MGN-3 et le groupe placebo.

à la référence ($p = 0,103$). Le pourcentage de CDM circulantes parmi les leucocytes périphériques HLA-DR⁺Lin⁻ a augmenté de manière significative après 3 mois de traitement au MGN-3 par rapport aux niveaux de base ($25,8 \pm 3,6\%$ vs. $17,6 \pm 2,6\%$, $p = 0,036$), alors qu'il n'y a pas eu de modification significative dans le groupe placebo au fil du temps. Les valeurs de base des pDC circulantes étaient similaires dans les groupes MGN-3 ($16,6 \pm 2,4\%$) et placebo ($24,9 \pm 5,6\%$), sans modification significative au cours du traitement (Fig. 2a). Le rapport mDC/pDC (Fig. 2b) a augmenté de manière significative après 3 mois de traitement par MGN-3 ($p = 0,030$). Dans le groupe placebo, aucune modification significative du rapport mDC/pDC n'a été observée au fil du temps.

Caractérisation du profil Th1/Th2 chez les patients atteints de MM

Les patients atteints de cancer avancé présentent souvent une immunité à médiation cellulaire déficiente associée à un passage d'un schéma de cytokines Th1 à Th2 dans l'environnement tumoral local et dans le sang périphérique. Parmi les cytokines Th1 analysées, seul l'IFN- γ était significativement augmenté ($p = 0,034$) chez les patients atteints de MM ($N = 45$) que chez les contrôles sains ($N = 30$; Tableau 2). En revanche, nous avons observé des différences significatives dans les niveaux de six des sept cytokines Th2 analysées. Les taux plasmatiques d'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13 étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de MM que chez les contrôles sains (les médianes, l'intervalle interquartile (IQR) et les valeurs p sont présentées dans le Tableau 2). Cependant, les concentrations d'IL-9 et d'IL-10 étaient significativement plus faibles chez les patients atteints de MM que chez les contrôles sains (les médianes, l'IQR et les valeurs p sont présentées dans le Tableau 2).

Tableau 2 Comparaison des taux de cytokines Th1 et Th2 entre les patients atteints de MM et les donneurs sains

Cytokine		Donneurs sains (N = 30)		Patients atteints de MM (N = 45)		Différence valeur p
		Médiane (pg/ml)	IQR (pg/ml)	Médiane (pg/ml)	IQR (pg/ml)	
Th1	IFN- γ	44,8	16,9-74,6	82,4	24,1-137,9	0,034*
	IL-1 β	1,4	0,7-2,0	1,8	0,2-2,8	0,231
	IL-2	2,4	0,0-7,6	4,2	0,0-9,3	0,175
	IL-12	3,6	2,4-9,2	3,1	0,8-6,3	0,284
	IL-15	1,5	0,0-5,2	0,7	0,0-3,1	0,550
	IL-17	0,0	0,0-3,9	1,6	0,0-4,4	0,189
	TNF- α	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-0,0	0,571
Th2	IL-1ra	71,6	35,6-114,3	76,4	13,9-220,1	0,837
	IL-4	0,6	0,0-0,9	0,9	0,0-2,0	0,040*
	IL-5	0,3	0,0-0,5	1,4	0,0-2,9	0,002**
	IL-6	1,9	0,0-7,3	6,4	0,0-13,0	0,027*
	IL-9	38,9	21,5-93,5	4,5	0,0-23,7	< 0,001***
	IL-10	3,3	1,7-7,7	1,8	0,9-4,4	0,008**
	IL-13	1,2	0,0-2,7	4,5	0,0-23,7	0,012*

La concentration plasmatique (pg/ml) des cytokines Th1 et Th2 chez les patients atteints de MM (N = 45) et les donneurs sains (N = 30) a été évaluée par dosage immunologique multiplex à base de microbilles.

Les résultats sont rapportés en tant que médianes avec plage interquartile (IQR ; 25–75e percentile). Les valeurs p (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) ont été calculées à l'aide du test de la somme des rangs de Mann-Whitney.

HD	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-13
IFN- γ	57.1	137.7	12.8	0.3	9.1	34.5
IL-1 β	1.5	3.7	0.3	0.0	0.2	0.9
IL-2	12.1	29.2	2.7	0.1	1.9	7.3
IL-12	8.1	19.6	1.8	0.0	1.3	4.9
IL-15	3.6	8.6	0.8	0.0	0.6	2.2
MM						
IFN- γ	66.0	53.7	14.1	6.5	31.4	6.5
IL-1 β	1.2	1.0	0.3	0.1	0.6	0.1
IL-2	4.1	3.3	0.9	0.4	1.9	0.4
IL-12	2.9	2.4	0.6	0.3	1.4	0.3
IL-15	0.9	0.8	0.2	0.1	0.4	0.1

Fig. 3 Rapports des cytokines Th1/Th2 chez les donneurs sains (HD) et les patients atteints de MM. Les valeurs de 5 cytokines Th1 (lignes : IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12 et IL-15) et 6 cytokines Th2 (colonnes : IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13) (au total 30 rapports Th1/Th2). Les valeurs des ratios ont été calculées à l'aide de l'équation suivante : $\text{valeur rangée, colonne} = \text{somme} ((C_{\text{rangée}}/C_{\text{colonne}})_{\text{pat1}}, (C_{\text{ligne}}/C_{\text{colonne}})_{\text{pat2}}, \dots (C_{\text{ligne}}/C_{\text{colonne}})_{\text{partN}})/N$. Les valeurs supérieures à 1,0 sont représentées en blanc, les rapports inférieurs à 1 dans des rectangles gris.

Nous avons également analysé les rapports Th1/Th2 de 5 cytokines Th1 (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12 et IL-15) et de 6 cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13) chez des patients atteints de MM et des donneurs sains (Fig. 3). Chez les individus sains, 20 des 30 rapports Th1/Th2 analysés étaient supérieurs à 1,0, et seulement 10 étaient inférieurs à 1,0 (score Th1/Th2 20:10). Chez les patients atteints de MM, 14 rapports Th1/Th2 étaient supérieurs à 1,0 et 16 rapports Th1/Th2 étaient supérieurs à 1,0.

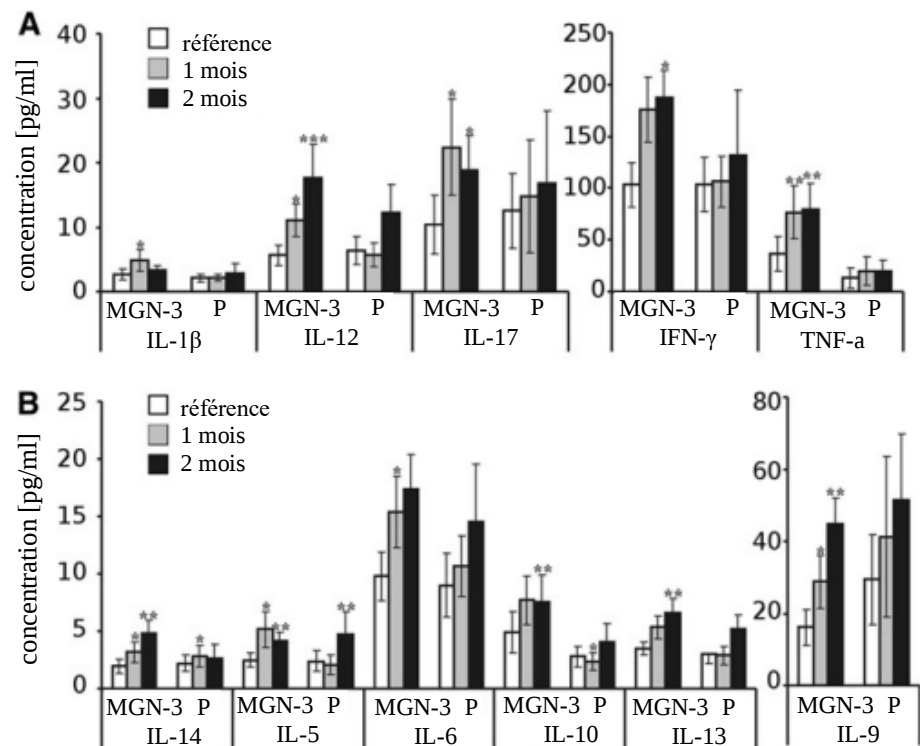
étaient inférieurs à 1,0 (score Th1/Th2 14:16), ce qui suggère que l'immunité Th2 pourrait être principalement active chez les patients atteints de MM. Plus précisément, un déplacement vers le modèle Th2 a été observé pour les rapports IL-12/IL-6, IL-12/IL-13, IL-2/IL-6, IL-2/IL-13, IL-15/IL-4, IL-15/IL-5 et IL-15/IL-13 des patients atteints de MM par rapport aux donneurs sains.

Effet du traitement par MGN-3 sur les niveaux de cytokines Th1 et Th2

Nous avons également évalué les concentrations plasmatiques des cytokines Th1 et Th2 chez les patients traités par MGN-3 (N = 30) ou placebo (N = 15; Fig. 4). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes lorsque les valeurs de base des cytokines Th1 et Th2 ont été comparées. Après un mois de traitement par MGN-3, nous avons observé des niveaux significativement élevés d'IL-1 β ($p = 0,047$), IL-12 ($p = 0,011$), IL-17 ($p = 0,036$), et TNF- α ($p = 0,01$) par rapport aux niveaux de référence avant traitement (Fig. 4a). Après 3 mois, nous avons observé une augmentation des niveaux d'IL-12 ($p \leq 0,001$), IL-17 ($p = 0,032$), IFN- γ ($p = 0,018$), et TNF- α ($p = 0,007$) dans le groupe MGN-3 (Fig. 4a).

Parmi les cytokines Th2, les niveaux d'IL-5 et d'IL-9 étaient significativement plus élevés dans le groupe MGN-3 ($p = 0,014$ and $p = 0,031$, respectivement). Cependant, les niveaux d'IL-10 étaient significativement réduits dans le groupe placebo après 1 mois de traitement ($p = 0,037$), et les niveaux d'IL-4 étaient élevés à la fois dans le groupe MGN-3 et dans le groupe placebo par rapport au groupe placebo.

Fig. 4 Changements dans le profil des cytokines Th1 et Th2 après traitement par MGN-3. La concentration plasmatique (pg/ml) de la cytokines Th1 et IL-17 et b cytokines Th2 a été mesurée à l'aide d'un dosage immunologique multiplex à base de microbilles chez les patients traités au MGN-3 ($N = 30$) ou un placebo ($N = 15$). Signification statistique : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



aux niveaux de base ($p = 0,034$ and $p = 0,024$, respectivement). Après 3 mois de traitement au MGN-3, les niveaux d'IL-4 ($p = 0,003$), IL-6 ($p = 0,031$), IL-9 ($p = 0,006$), IL-10 ($p = 0,010$) et IL-13 ($p = 0,002$) ont augmenté de façon significative par rapport au placebo, alors que les niveaux d'IL-5 ont augmenté à la fois dans le groupe MGN-3 et dans le groupe placebo ($p = 0,006$ et $p = 0,004$, respectivement ; Fig. 4b).

Discussion

Des preuves récentes suggèrent que les lymphocytes NK jouent un rôle important dans l'immunosurveillance du MM en exerçant une cytotoxicité anti-MM. L'expression différentielle des récepteurs de surface des lymphocytes NK et de leurs ligands sur les cellules myélomateuses au cours de la progression de la maladie reflète l'édiction immunitaire et la sélection de clones myélomateux plus agressifs qui sont résistants à la lyse médiée par les NK [19, 28, 29]. L'effet de la cytotoxicité anti-MM peut être renforcé par de nouvelles thérapies, telles que le transfert adoptif de lymphocytes NK activées in vitro avec une activité anti-myélome accrue [30] ou un traitement complet par des inhibiteurs du protéasome [31] et des médicaments immuno-modulateurs [32, 33], dont il a été démontré qu'ils augmentent le nombre et la fonction des lymphocytes NK.

Nous avons évalué l'activité des lymphocytes NK dans le sang périphérique de patients atteints de MM pendant le traitement par MGN-3. Conformément aux données publiées précédemment [22], nous avons observé une augmentation statistiquement significative de la cytotoxicité médiée par les NK

pendant les 2 premiers mois de traitement au MGN-3, alors qu'aucune différence statistiquement significative de la cytotoxicité des NK n'a été détectée dans le groupe contrôlé par le placebo. Cependant, l'analyse phénotypique réalisée chez les patients atteints de MM n'a pas révélé de modifications du pourcentage des sous-ensembles de lymphocytes NK. Cet effet est similaire aux résultats observés chez l'humain lors de traitements par d'autres types de produits naturels [34-36].

Dans notre précédente étude in vitro, nous avons démontré que le MGN-3 augmentait la maturation des CD dérivées de monocytes et induisait un changement de phénotype de type pDC [24]. Les cellules dendritiques sont un élément clé du système immunitaire et jouent un rôle essentiel dans l'amorçage des lymphocytes T naïfs et dans l'induction de réponses immunitaires protectrices spécifiques aux tumeurs [37]. Les patients atteints de MM souffrent d'une altération générale de l'immunité impliquant des déficiences dans les fréquences et les fonctions des CD. Les sous-ensembles mDC et pDC des CD ont été significativement réduits dans le sang périphérique des patients atteints de MM par rapport aux contrôles sains appariés selon l'âge [3, 38, 39]. En outre, les CD des patients atteints de MM présentent des anomalies phénotypiques ainsi qu'une altération de la sécrétion de cytokines inflammatoires [39-41]. Notre analyse phénotypique du sang périphérique des patients atteints de MM a révélé une augmentation significative de la concentration relative des mDC. De même, une augmentation du rapport mDC/pDC a été observée après le traitement par MGN-3, mais pas dans le groupe placebo, alors qu'il n'y a pas eu de modifications significatives des niveaux de pDC circulants dans les deux groupes. Notre étude étant limitée à l'analyse du sang périphérique, d'autres études sont nécessaires pour déterminer si

la modification phénotypique des pDC observée *in vivo* et l'augmentation des mDC dans le sang périphérique sont dus à la préférence des pDC pour la moelle osseuse [42].

Le dysfonctionnement des CD immunitaires a été lié à des niveaux élevés de facteurs solubles, y compris de multiples cytokines, telles que le VEGF, l'IL-6 et l'IL-10, qui interfèrent avec la différenciation et la maturation des CD [43, 44]. En tant que médiateurs de la réponse immunitaire, les cytokines sont souvent classées en cytokines de type Th1, qui induisent principalement l'immunité à médiation cellulaire, et en cytokines de type Th2, qui induisent principalement l'immunité humorale [45].

Nous avons analysé les concentrations de cytokines liées à Th1 et Th2 dans le plasma de patients atteints de MM par rapport à des donneurs sains. Les niveaux de cytokines plasmatiques et les profils Th1/Th2 observés chez les témoins sains étaient cohérents avec les données publiées [46, 47]. Chez les patients atteints de MM, nous avons observé une augmentation statistiquement significative de l'IFN- γ lié à la Th1 ainsi qu'une augmentation des cytokines Th2 IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13, tandis que les niveaux d'IL-9 et d'IL-10 étaient significativement plus bas chez les patients atteints de MM que chez les contrôles sains. Ces résultats indiquent une dérégulation de l'homéostasie immunitaire et un passage à une dominance systémique des cytokines Th2, comme cela a déjà été décrit chez des patients atteints de cancers, dont le MM [8].

Outre les cytokines Th1, une concentration accrue d'IL-1(α , β) et d'IL-6 est systématiquement associée à une immunosurveillance anti-myélome réussie [48] et à une possible éradication du cancer. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation des niveaux de plusieurs cytokines Th1 importantes, en particulier IL-1 β , IL-12, IFN- γ et TNF- α , chez les patients MM recevant du MGN-3, contrairement au groupe placebo. En outre, la concentration d'IL-17 a augmenté de manière significative lors du traitement par MGN-3. Très récemment, un schéma similaire de production *in vitro* de cytokines pro-inflammatoires et immunorégulatrices dans les CD stimulées par le MGN-3 a été observé pour induire la prolifération des lymphocytes CD4 + la prolifération cellulaire et la production d'IFN γ , IL-10 et IL-17 [49].

Les résultats de l'étude démontrent une nette augmentation de l'activité des NK, une augmentation du niveau des mDC dans le sang périphérique et une augmentation des niveaux de cytokines liées à Th1 dans le plasma des patients atteints de MM traités par MGN-3 par rapport au groupe placebo. Pour élucider les mécanismes sous-jacents, les effets immunomodulateurs du MGN-3 méritent d'être étudiés plus avant, en accordant une attention particulière à l'environnement de la moelle osseuse.

Remerciements Nous remercions tous les patients qui ont participé à cette étude ainsi que Gitka Sulikova et Janka Chovancova pour leur aide dans le traitement des échantillons. L'étude a bénéficié d'un financement de recherche de Daiwa Pharmaceutical to J.S.

Conflit d'intérêts J.S. a reçu des fonds de recherche de Daiwa Pharmaceutical. Les autres auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

Références

- Steinman RM (2001) Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 68(3):160–166
- Do TH, Johnsen HE, Kjaersgaard E, Taaning E, Svane IM (2004) Impaired circulating myeloid DCs from myeloma patients. *Cytotherapy* 6(3):196–203
- Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, Svane IM (2010) Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol* 72(6):540–547
- Zitvogel L (2002) Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med* 195(3):F9–14
- Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195(3):335–341
- Fiore F, Nuschak B, Peola S, Mariani S, Muraro M, Foglietta M, Coscia M, Bruno B, Boccadoro M, Massaia M (2005) Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells. *Eur J Immunol* 35(4):1155–1163
- Song W, van der Vliet HJ, Tai YT, Prabhala R, Wang R, Podar K, Catley L, Shammas MA, Anderson KC, Balk SP et al (2008) Generation of antitumor invariant natural killer T cell lines in multiple myeloma and promotion of their functions via lenalidomide: a strategy for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 14(21): 6955–6962
- Sharma A, Khan R, Joshi S, Kumar L, Sharma M (2010) Dys-regulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 51(5):920–927
- Kovacs E (2010) Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells? *Leuk Res* 34(7):912–916
- Xie J, Wang Y, Freeman ME III, Barlogie B, Yi Q (2003) Beta 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit *in vitro* generation of functional dendritic cells. *Blood* 101(10):4005–4012
- Tanaka H, Matsushima H, Mizumoto N, Takashima A (2009) Classification of chemotherapeutic agents based on their differential *in vitro* effects on dendritic cells. *Cancer Res* 69(17):6978–6986
- Song W, Tai YT, Tian Z, Hideshima T, Chauhan D, Nanjappa P, Exley MA, Anderson KC, Munshi NC (2011) HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells. *Leukemia* 25(1):161–168
- Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM (2005) Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 11(18):6713–6721
- Jakubikova J, Adamia S, Kost-Alimova M, Klippel S, Cervi D, Daley JF, Cholujo D, Kong SY, Leiba M, Blotta S et al (2011) Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood* 117(17):4409–4419
- Driscoll JJ, Dechowdhury R (2010) Therapeutically targeting the SUMOylation, Ubiquitination and Proteasome pathways as a novel anticancer strategy. *Target Oncol* 5(4):281–289
- Kim JY, Bae JH, Lee SH, Lee EY, Chung BS, Kim SH, Kang CD (2008) Induction of NKG2D ligands and subsequent enhancement of NK cell-mediated lysis of cancer cells by arsenic trioxide. *J Immunother* 31(5):475–486

17. Poggi A, Catellani S, Garuti A, Pierri I, Gobbi M, Zocchi MR (2009) Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia* 23(4):641–648
18. Fionda C, Soriani A, Malgarini G, Iannitto ML, Santoni A, Cippitelli M (2009) Heat shock protein-90 inhibitors increase MHC class I-related chain A and B ligand expression on multiple myeloma cells and their ability to trigger NK cell degranulation. *J Immunol* 183(7):4385–4394
19. von Lilienfeld-Toal M, Frank S, Leyendecker C, Feyler S, Jarmin S, Morgan R, Glasmacher A, Marten A, Schmidt-Wolf IG, Brossart P et al (2010) Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother* 59(6):829–839
20. Lin L, Deangelis S, Foust E, Fuchs J, Li C, Li PK, Schwartz EB, Lesinski GB, Benson D, Lu J et al (2010) A novel small molecule inhibits STAT3 phosphorylation and DNA binding activity and exhibits potent growth suppressive activity in human cancer cells. *Mol Cancer* 9:217
21. Ghoneum M, Gollapudi S (2011) Synergistic apoptotic effect of arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) and curcumin (turmeric) on human multiple myeloma cell line U266 in vitro. *Neoplasma* 58(2):118–123
22. Ghoneum M, Jewett A (2000) Production of tumor necrosis factor- α and interferon- γ from human peripheral blood lymphocytes by MGN-3, a modified arabinoxylan from rice bran, and its synergy with interleukin-2 in vitro. *Cancer Detect Prev* 24(4):314–324
23. Ghoneum M (1998) Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylane from rice bran (MGN-3). *Int J Immunother* 14(2):89–99
24. Choluja D, Jakubikova J, Sedlak J (2009) BioBran-augmented maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Neoplasma* 56(2):89–95
25. Choluja D, Jakubikova J, Kubes M, Arendacka B, Sapak M, Ihnatko R, Sedlak J (2008) Comparative study of four fluorescent probes for evaluation of natural killer cell cytotoxicity assays. *Immunobiology* 213(8):629–640
26. Bryant J, Day R, Whiteside TL, Herberman RB (1992) Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 146(1):91–103
27. Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS (1981) Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* 1(1):51–63
28. Bernal M, Garrido P, Jimenez P, Carretero R, Almagro M, Lopez P, Navarro P, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2009) Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: implications for tumor evasion of T and NK cells. *Hum Immunol* 70(10):854–857
29. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, Cook G, Feyler S, Richards SJ, Davies FE et al (2007) The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res* 67(18):8444–8449
30. Wu JY, Ernstoff MS, Hill JM, Cole B, Meehan KR (2006) Ex vivo expansion of non-MHC-restricted cytotoxic effector cells as adoptive immunotherapy for myeloma. *Cytotherapy* 8(2):141–148
31. Wu X, Shao Y, Tao Y, Ai G, Wei R, Meng X, Hou J, Han Y, Zhan F, Zheng J et al (2011) Proteasome inhibitor lactacystin augments natural killer cell cytotoxicity of myeloma via down-regulation of HLA class I. *Biochem Biophys Res Commun* 415(1):187–192
32. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, Podar K, Yasui H, Raje N, Kumar S, Chauhan D, Treon SP, Richardson P et al (2005) Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *Br J Haematol* 128(2):192–203
33. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, Lin B, Podar K, Gupta D, Chauhan D et al (2001) Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 98(1):210–216
34. Chen X, Hu ZP, Yang XX, Huang M, Gao Y, Tang W, Chan SY, Dai X, Ye J, Ho PC et al (2006) Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colo-rectal cancer. *Int Immunopharmacol* 6(3):499–508
35. Nielsen CH, Balachandran P, Christensen O, Pugh ND, Tamta H, Sufka KJ, Wu X, Walsted A, Schjorring-Thyssen M, Enevold C et al (2010) Enhancement of natural killer cell activity in healthy subjects by Immulina[®], a Spirulina extract enriched for Braun-type lipoproteins. *Planta Med* 76(16):1802–1808
36. Thakur M, Connellan P, Deseo MA, Morris C, Praznik W, Loeppert R, Dixit VK (2012) Characterization and in vitro immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd. *Int J Biol Macromol* 50(1):77–81
37. Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449(7161):419–426
38. Harrison SJ, Franklin IM, Campbell JD (2008) Enumeration of blood dendritic cells in patients with multiple myeloma at presentation and through therapy. *Leuk Lymphoma* 49(12):2272–2283
39. Martin-Ayuso M, Almeida J, Perez-Andres M, Cuella R, Galende J, Gonzalez-Fraile MI, Martin-Nunez G, Ortega F, Rodriguez MJ, San Miguel JF et al (2008) Peripheral blood dendritic cell subsets from patients with monoclonal gammopathies show an abnormal distribution and are functionally impaired. *Oncologist* 13(1):82–92
40. Brimnes MK, Svane IM, Johnsen HE (2006) Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin Exp Immunol* 144(1):76–84
41. Wang S, Yang J, Qian J, Wezeman M, Kwak LW, Yi Q (2006) Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood* 107(6):2432–2439
42. Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, Bianchi G, Podar K, Tai YT, Mitsiades C et al (2009) Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 16(4):5309–5323
43. Whiteside TL (2006) Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16(1):3–15
44. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S et al (2002) Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 100(1):230–237
45. Zhu J, Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112(5):1557–1569
46. Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN (2009) Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 15(6):1931–1939
47. Szodoray P, Alex P, Brun JG, Centola M, Jonsson R (2004) Circulating cytokines in primary Sjogren's syndrome determined by a multiplex cytokine array system. *Scand J Immunol* 59(6):592–599
48. Haabeth OA, Lørvik KB, Hammarström C, Donaldson IM, Haraldsen G, Bogen B, Corthay A (2011) Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat Commun* 2:240
49. Ghoneum M, Agrawal S (2011) Activation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro by the biological response modifier arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *Int J Immunopathol Pharmacol* 24(4):941–948

Contact :

ImunoBran Luxembourg et France

www.imunobranlu

+352 621 707 719