

L'arabinoxylane de son de riz (MGN-3/Biobran) renforce les effets toxiques des cellules NK sur les cellules cancéreuses chez les enfants *in vitro* et *in vivo*

Antonio Perez-Martinez¹, Jaime Valentin², Lucia Fernandez³, Petra Zerbes⁴, Ellen Schworer⁴, Fernando Nunez⁵, Inmaculada Genesis Martin⁵, Hannah Maxwell⁶, Miguel Angel Diaz⁷, Rupert Handgretinger⁴, Matthias Pfeiffer⁴.

¹du Service de d'hémo-oncologie pédiatrique de l'Hôpital universitaire La Paz, Madrid, Espagne.

²du Groupe de recherche d'immunité congénitale, IdiPAZ, Madrid, Espagne.

³du Programme de recherche clinique du Centre national de recherche sur le cancer, Madrid, Espagne.

⁴de l'Hôpital universitaire pédiatrique, Université de Tübingen, Tübingen, Allemagne.

⁵du Laboratoire d'animaux -cobayes. Institut de recherche biomédicale Albert Sols. C.S.I.C./ Artru Duperier 4. Madrid, Espagne.

⁶de la Faculté de médecine de l'Université de Cardiff, Heath Park, Cardiff, CF14 4X, Pays de Galles.

⁷du Service d'hémo-oncologie et de transplantation de cellules souches de l'Hôpital universitaire pédiatrique Niño Jesús, Madrid, Espagne.

Auteur-correspondant : Antonio Perez-Martinez, Centre d'hémo-oncologie. Paseo de la Castellana 261, Madrid, 28046, Espagne. Téléphone : +34917277223, Télécopie : +34917277042

Courriel : aperezmartinez@salud.madrid.org

Cet élaborat a partiellement bénéficié du soutien de la bourse de l'Agence nationale d'harmonisation des services de santé n° FIS PI12/01622, de la Fondation de la Société espagnole d'hémo-oncologie infantile et de la Fondation CRIS pour la lutte contre le cancer (<http://www.criscancer.org/en/index.php>) au profit d'Antonio Perez Martinez, ainsi que du soutien de la Fondation allemande José Carreras de lutte contre la leucémie au profit de Matthias Pfeiffer.

ABRÉGÉ

L'activité cytotoxique des cellules NK (tueuses naturelles) s'avère essentielle dans la maîtrise des infections virales et des malignités. L'arabinoxylane de son de riz (MGN-3/Biobran) a été décrit comme un produit potentiel de renforcement l'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (cellules NK). Ces cellules, activées et proliférées, constituent un mode auquel il est fait de plus en plus souvent recours dans le cadre de la thérapie immunologique généralement acceptée dans le traitement du cancer. La présente étude s'est fixé pour but d'examiner l'effet du MGN-3 Biobran sur l'activité cytotoxique des cellules tueuses face aux tumeurs solides chez les enfants ainsi que sur le processus d'activation et de prolifération des cellules NK. Nous avons donc réalisé des études *in vitro* et *in vivo*. En comparaison avec les cellules non stimulées, les cellules NK stimulées au moyen du MGN3/Biobran ont induit une expression plus marquée du marqueur d'activation CD69 ($p < 0.05$). L'expression des récepteurs NKG2D, DNAM, NCR et TLR après stimulation au moyen du MGN3/Biobran est demeurée inchangée. La stimulation effectuée pendant la nuit entière au moyen du MGN3/Biobran a provoqué également une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK par rapport aux lignées cellulaires K562, Jurkat, A673, A204, RD et RH30 *in vitro* et a ralenti la progression du neuroblastome *in vivo*. Par ailleurs, l'administration du MGN3/Biobran a causé au cours du processus d'expansion une augmentation du nombre des cellules NK et une réduction des cellules T. Les données ont démontré que le MGN3/Biobran stimulait l'activité cytotoxique des cellules NK sur les tumeurs solides chez les enfants et provoquait de manière sélective une prolifération des cellules NK. Ces résultats peuvent être utiles pour les stratégies thérapeutiques futures basées sur l'effet des cellules NK.

Mots-clés : arabinoxylane de son de riz (MGN-3/Biobran), cellules tueuses naturelles (cellules NK), activité cytotoxique, tumeurs solides chez les enfants.

Résumé

L'arabinoxylane de son de riz (MGN3/Biobran) accroît l'activité cytotoxique des cellules NK contre les tumeurs chez les enfants *in vitro* et *in vivo*. Le MGN3/Biobran induit en même temps de manière sélective une prolifération des cellules NK. Ces résultats peuvent être utiles pour les stratégies thérapeutiques futures basées sur l'effet des cellules NK.

INTRODUCTION

L'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (cellules NK) joue un rôle primordial dans la défense immunologique naturelle contre les malignités. Une activité réduite des cellules NK est liée à un risque accru du développement de tumeur chez les personnes en bonne santé [1]. Le cancer lui-même, également, réduit l'activité cytotoxique des cellules NK en libérant les cytokines suppressives, voire en induisant une expression réduite des récepteurs à la surface des cellules NK [2-3]. Par ailleurs, une haute activité cytotoxique des cellules NK telle que celle enregistrée suite à la transplantation des cellules souches hématopoïétiques empêche la récurrence chez les patients [4]. En conséquence, il apparaît comme primordial de maintenir, et ce tant chez les patients malades du cancer que chez la population saine, un niveau élevé de l'activité cytotoxique des cellules.

L'activité cytotoxique des cellules NK augmente grâce à un régime de vie sain[5-7], aux modificateurs de réponse biologique [8-9], aux hormones [10], aux cytotoxines [11-14], aux anticorps [15-16] ou aux médicaments chimiothérapeutiques [17]. Le MGN-3/Biobran est un composé d'arabinoxylane de son de riz, modifié au moyen d'enzymes du shiitaké capables d'hydrolyser les carbohydrates [18]. Le MGN-3/Biobran modifié est un complément alimentaire qui, d'après les données de recherches, renforce l'activité cytotoxique des cellules NK par rapport aux tumeurs chez les adultes *in vitro* et *in vivo* [19-20]. De plus, d'après les propriétés décrites et conjointement au traitement conventionnel, il a un effet

anticancéreux synergique sur certains types de cancer, comme par exemple le cancer du sein ou le carcinome hépatocellulaire [21-25]. Ces données ont entrouvert la possibilité de son emploi en tant que traitement complémentaire du traitement conventionnel de patients atteints du cancer. Toutefois aucune concernant des recherches faites sur des enfants malades du cancer n'a été publiée jusqu'à présent.

Notre objectif a été donc d'examiner le rôle du MGN-3/Biobran en tant que stimulateur de l'activité des cellules tueuses contre les tumeurs chez les enfants *in vitro* et *in vivo*. Les processus de prolifération capables de générer de grandes quantités de cellules NK provenant des cellules mononucléaires du sang périphérique suscitent un intérêt grandissant pour ce traitement au moyen de cellules tueuses. Pour cette raison nous avons décidé d'examiner aussi le rôle du MGN-3/Biobran dans le processus de prolifération des cellules NK.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Les échantillons de sang ont été obtenus avec l'accord de volontaires en bonne santé. L'étude a été approuvée par notre Commission éthique locale.

Préparation des cellules

Les échantillons ont été collectés dans des éprouvettes EDTA, les cellules mononucléaires sanguines périphériques (PBMC) ont été ensuite isolées par centrifugation en gradient de densité : les échantillons ont été mis dans un milieu Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suède) adéquat et centrifugés à 400 g et pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules mononucléaires sanguines périphériques obtenues ont été ôtées de la surface **z plochy rozhrania**, rincées deux fois dans un tampon phosphate salin (PBS) et centrifugées à 400 g et pendant 10 minutes. Les cellules NK ont été ensuite isolées par séparation

magnétique (à l'aide du kit „NK cell isolation KIT“ ou de „CD56 microbeads“ de Miltenyi Biotec).

Réponse et lignées cellulaires

Dans l'étude on a utilisé des anticorps monoclonaux anti-humains (mAb) : mAb marqués au fluorochrome dirigés contre les cellules CD3PE-Cy7, CD45-FITC, CD69-FITC et NKG2D-APC obtenus auprès de la société Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, Etats-Unis) ; mAb marqués au fluorochrome dirigés contre les cellules CD56-APC, DE25-PE et NKp44-PE obtenus chez Beckman Coulter (Fullerton, CA, Etats-Unis) ; Etats-Unis CD337 (NKp30)-PE obtenus chez la société Miltenyi Biotec ; mAb marqués au fluorochrome dirigés contre les TLR4 et TLR9 obtenus chez la société Enzo Life Sciences AG, Lausen, Suisse.

Pour tester la cytotoxicité naturelle des cellules NK *in vitro* les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées : des K562 d'érytroleucémie, des cellules Jurkat de leucémie lymphoblastique à précurseurs T, des A673 de sarcome d'Ewing (tous provenant de chez ATCC, Manassas, Etats-Unis), des A-204 de rhabdomyosarcome embryonnaire, des RD de rhabdomyosarcome embryonnaire et des RH30 de rhabdomyosarcome alvéolaire provenant de chez DSZM, Braunschweig, Allemagne). La lignée cellulaire avec luciférase de neuroblastome transduit (NB1691luc) fournie gentiment par le Dr. A. Davidoff (de l'Hôpital de Recherche pédiatrique St. Jude) a été utilisée comme cible sur un modèle souris quantitatif [26-27]. Nous avons utilisé comme cellules nourricières pour l'activation et la prolifération des cellules tueuses naturelles les lignées cellulaires suivantes : K562 irradiées et K562 transfectées sur membrane cellulaire au moyen de IL-15 et 4-1BBL (K562-mb15-41BBL) liantes et exprimées, fournies gentiment par le Dr. D. Campano [28].

L'IL-15 a été obtenue auprès de CellGro/CellGenix, Freiburg, Allemagne. Le MGN-3/Biobran a été fourni par la société Diawa Pharmaceuticals Co. Ltd. Tokio, Japon. Le lipopolysaccharide (LPS, Sigma 0127:B8) a été utilisé comme ligand du récepteur-4 de type Toll (TLR4) et la polymyxine B (InvivoGen,

San Diego, Etats-Unis) comme inhibiteur de l'activation du TLR4 induite par LPS.

Analyse de phénotype

Le phénotype superficiel des cellules NK stimulées pendant la nuit au moyen du produit MGN-3/Biobran (100 mkg/ml), des cellules NK stimulées pendant la nuit par de l'interleukine-15 (10 ng/ml), des cellules NK non stimulées et des cellules NK proliférées a été établi à partir de trois volontaires adultes en bonne santé à l'aide de six colorations immunofluorescentes. Des cellules NK de quantité 5×10^5 de différentes conditions d'origine ont été colorées par des anticorps monoclonaux anti-humains de la souris correspondants conjugués avec du fluorochrome sur une durée de 30 minutes, dans l'obscurité et à une température de 4°. Les cellules ont été rincées à deux reprises dans du PBS froid, resuspendues dans un PBS de 0,5 ml et analysées au moyen d'un cytomètre analyseur FACSCanto II (Becton Dickinson). Des pourcentages ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ont été établis. Le contrôle a été réalisé par coloration des cellules NK par des anticorps de contrôle d'isotype différent.

Analyse de toxicité et stimulation des cellules NK

La cytotoxicité naturelle des cellules NK a été suivie, comme nous l'avons déjà indiqué, par un test conventionnel de TDA-europium de 2 heures (Perkin-Elmer Wallac, Turku, Finlande) [29]. Les cellules cibles provenaient des lignées cellulaires K562, Jurkat, A673, NB1691, A-204, RD, RH-30. En bref, les cellules cibles ont été marquées au ligand d'ester renforçant la fluorescence (BATDA). Ce ligand hydrophobe a percé rapidement la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, l'hydrolyse des liens d'ester a fait que le ligand est devenu hydrophile et incapable de traverser la membrane de la cellule pour en sortir. La cytolyse a provoqué sa libération dans le surnageant où il a réagi à l'euporpium avec lequel il a formé un chélate d'euporpium fluorescent stable (eu-TDA) qui a été ensuite mesuré au fluorimètre (lecteur Infinite F200 de chez TECAN Group Ltd, Männedorf, Suisse). Les formules suivantes ont été

utilisées pour le calcul de la cytotoxicité spontanée et spécifique :

% ligands libérés spécifiquement = (nombre de ligands libérés expérimentalement - nombre de ligands libérés spontanément) / (nombre maximal de ligands libérés - nombre de ligands libérés spontanément) × 100.

% de ligands libérés spontanément = (nombre de ligands libérés spontanément - fond) / (nombre maximal de ligands libérés - fond) × 100.

Les cellules NK des volontaires en bonne santé ont été stimulées pendant la nuit par 100 µg/ml de MGN-3/BioBran, voire 10 ng/ml d'IL-15 (CellGro® / CellGenix). Les cultures ont été réalisées dans un médium de culture (RPMI 1640 avec addition de sérum foetal de boeuf inactivé par la chaleur de l'ordre de 10 %, 100 IU/ml de pénicilline, 100 ng/ml de streptomycine et 2 mM/L-glutamine) dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO₂ et 95 % d'air. L'activité cytotoxique a été mesurée selon le mode décrit ci-dessus.

Modèle de souris

Par voie intraveineuse on a introduit dans le corps de souris NOD-scid IL2R^{gnull} âgées de douze semaines 2×10^5 de cellules de neuroblastome NB-1691. Les cellules NK qui ont été ensuite utilisées dans le traitement ont été isolées à partir des cellules sanguines mononucléaires périphériques (PMBC) obtenues auprès des volontaires en bonne santé par la technique de séparation magnétique (au moyen du NK cell isolation KIT ou de CD56 microbeads de chez Miltenyi Biotec). Les cellules NK obtenues étaient > 90 % CD3-CD56⁺. Elles ont été utilisées soit directement ou après une activation de toute la nuit au moyen du MGN-3/BioBran de concentration 100 µg/ml. Nous avons entamé le traitement intraveineux aux cellules NK au bout de 7 jours après l'administration des cellules cancéreuses et l'avons poursuivi deux fois par semaine de façon ininterrompue pendant 4 semaines. Sur deux expériences indépendantes

l'une de l'autre (4 individus dans chaque groupe), nous avons observé les individus non traités du groupe de contrôle par rapport à ceux auxquels nous avons administré 1×10^6 de cellules NK non stimulées (groupe NK) et à ceux auxquels nous avons administré 1×10^6 de cellules NK stimulées pendant la nuit au moyen du MGN-3/Biobran de concentration 100 $\mu\text{g/ml}$ (groupe NK-Biobran). Nous avons effectué un contrôle par imagerie de bioluminescence les 7e, 14e, 28e et 42e jour à compter du début du traitement par les cellules NK, et ce à chaque fois après l'injection intrapéritonéale de 100 ml de luciférine diluée dans du PBS de concentration 15 mg/ml.

Cinq minutes après l'administration du substrat, les animaux ont été mis sous narcose au moyen de l'isoflurane (anesthésie avec un niveau de concentration de 3 % et maintenue ensuite à un niveau de concentration de 1,5 %) et transférés dans la chambre de l'appareil Xenogen IVIS Lumina II (Imagerie quantitative de fluorescence et de bioluminescence, Xenogen Corporation, Hopkinton, MA). Nous avons fait des prises d'images avec divers temps d'exposition, images que nous avons ensuite analysées à l'aide du logiciel Xenogen Living Image® (version 3.2). Pour réaliser la représentation graphique de l'imagerie bioluminescente, on a choisi pour chaque souris une région d'intérêt (R.O.I.) de forme rectangulaire couvrant toute la poitrine et le ventre, et le débit global (nombre de photons par seconde) pour la position sur le dos et sur le ventre a été calculé pour une exposition de 180 secondes. Cette valeur a été calibrée en rapport avec celle comparable du fond (issue de la souris de contrôle non atteinte de cancer, avec injection de luciférine). Tous les essais ont été réalisés conformément aux instructions des Comités de soin et d'utilisation des animaux de laboratoires locaux correspondants et d'après les critères définis dans les Instructions ayant trait aux soins et à l'utilisation des animaux de laboratoires définies par l'Institut national de la santé¹.

¹ Institut national de la santé - agence fédérale chapeautée par le Ministère de la Santé des Etats-Unis. Chaque institution de biomédecine faisant l'usage d'animaux de laboratoire est tenue, selon les instructions émises par cette agence, de créer un „Comité de soin et d'utilisation des animaux de laboratoires”. (Note du trad.)

Activation et prolifération des cellules NK

On a obtenu une prolifération dans des cultures de 14 jours contenant/ne contenant pas 100 µg/ml de MGN-3/Biobran et de cytokines (100 IU/ml IL-2 Preleukine® de chez Novartis Pharmaceuticals), voire de 100 IU/ml IL-2 plus 10 ng/ml IL15 de chez Cellgenix GmbH, Freiburg, Allemagne), ou encore dans une culture commune contenant des cellules nourricières irradiées K562 ou K562-mb15-41BBL [29]. En bref, les cellules sanguines mononucléaires périphériques (PBMC) ont été obtenues auprès de trois volontaires adultes en bonne santé par centrifugation en gradient de densité (Ficoll). Les PBMC ont été ensuite mises en incubation sur une palette de laboratoire à fond plat à 6 trous contenant/ne contenant pas de MGN3/Biobran et de cytokines humaines (IL2, IL2+IL15), voire cultivées ensemble avec les cellules nourricières irradiées à l'état subléthal K562 ou K562-mb15-41BBL selon une proportion de 1:1,5. C'est le RPMI 1640 (de chez Biochrom, Allemagne) complété de plasma humain fraîchement congelé de groupe AB de l'ordre de 10 %, de L-glutamine, de pénicilline-streptomycine (Biochrom) qui a servi de médium de culture. Du médium frais a été rajouté tous les 2 jours. Au bout de 14 jours, les cellules ont été récupérées et analysées pour la phénotypisation et l'activité *in vitro* des cellules NK.

Les mécanismes de l'activation : contamination agonistique du récepteur de type Toll (TLR) lors de l'application du MGN-3/Biobran

L'effet agonistique potentiel du composé MGN-3/Biobran sur le TLR2,-3-4-5-7-8 et 9 a été testé dans le laboratoire du Dr. Chevrier (InvivoGen). Puisqu'on n'a observé que l'activation de TLR4, nous avons déterminé la présence d'endotoxicité du lipopolysaccharide (LPS), du ligand du TLR4, avec application de MGN-3/Biobran (100 mkg/ml) dans le laboratoire microbiologique du Dr. Leisa (BioChem GmbH, Tübingen, Allemagne) au moyen de l'essai turbidimétrique cinétique avec du *Limulus polyphemus*. En outre, nous avons quantifié également le LPS, l'endotoxine, et ce au moyen du test chromogénique

(ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit, GenScript). Après exposition du lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml), on a détecté positivement une libération de l'IL-8, de l'IL-6, du TNF- α , de l'IL-10, de l'IL-1 β et de l'IL-12 dans les macrophages humains au moyen de l'analyse cytométrique (système de Becton Dickinson) et du MGN-3/Biobran (de concentrations 10, 100, 1000 et 10000 mg/ml). Les analyses de la cytotoxicité fonctionnelle *in vitro* ciblaient les lignées cellulaires K562 et NB1691 avec le LPS (10 ng/ml) en tant que stimulateur des cellules NK d'une part, et de la polymyxine B en tant qu'inhibiteur de LPS de l'activation induite du TLR4 d'autre part. Nous avons terminé par une analyse de la cytotoxicité de la lignée cellulaire NB1691 en ayant recours à la stimulation par le MGN-3/Biobran et en bloquant en même temps le mécanisme TLR-4 des cellules NK stimulées à la surface au moyen de la polymyxine B.

Analyse statistique

S'il n'est pas mentionné autrement, les résultats sont indiqués avec prise en compte d'un écart moyen $\pm$ standard. Dans la comparaison des effets du MGN-3/Biobran sur les cellules NK, nous avons utilisé des tests non paramétriques. Dans le modèle de souris, la survie a été calculée d'après la méthode Kaplan Meier. La signification statistique a été définie de l'ordre de $p < 0.05$.

RÉSULTATS

Phénotypisation des cellules tueuses naturelles

Sur le tableau n° 1 et l'image n° 1a on voit la réaction des récepteurs d'activation sur les cellules NK à la stimulation nocturne réalisée au moyen du MGN-3/Biobran et de l'IL-15. Le MGN-3/Biobran a accru l'expression des CD69 chez les cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran du taux moyen de 8 % à celui de 11 % (l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) a été multipliée par 1,6) (cf. image n° 1b). Le

pourcentage de l'expression tout comme la MFI des autres récepteurs observés sont restés inchangés – cf. tableau n° 1). Les cellules NK stimulées par l'interleukine 15 ont augmenté de manière significative l'expression moyenne des cellules CD25 (de 3 à 5 % et MFI multipliée par 1,91), CD69 (de 8 à 77 % et MFI multipliée par 2,9), NKG2D (de 77 à 91 % et MFI multipliée par 1,9), NKp44 (de 2 à 12 %) et NKp30 (de 4 à 32 %).

Analyses *in vitro* de la cytotoxicité

La stimulation nocturne au moyen du MGN-3/Biobran a eu pour conséquence une croissance significative de la cytotoxicité pour ce qui est de toutes les lignées cellulaires testées avec une proportion de cellules effectrices par rapport aux cellules ciblées de 8:1 (K562, Jurkat, A673), voire 10:1 (A-204, RD, RH-30), comparativement à la cytotoxicité des cellules NK non stimulées (image n° 2a, K562 80 % contre 69 %, $p = 0.03$, Jurkat 40 % contre 19 %, $p = 0.03$, A673 34 % contre 13 %, $p = 0.02$, A204 34 % contre 18 %, $p = 0.03$, RD 45 % contre 22 %, $p = 0.002$, RH-30 34 % contre 18 %, $p = 0.02$). La stimulation au moyen de l'IL-15 a provoqué une lyse bien plus importante des lignées cellulaires suivantes : K562 (100 %), Jurkat (60 %) et A673 (58 %) (image n° 2b). Pour le test de l'effet synergique de l'IL-2 et du produit MGN-3/Biobran, nous avons procédé à la comparaison de la stimulation à grande dose d'IL-2 (1000 IU/ml) avec la stimulation à petite dose d'IL-2 (40 IU/ml) et petite dose d'IL-2 + MGN-3/Biobran. L'addition de MGN-3/Biobran à la petite dose d'IL-2 a renforcé l'effet stimulateur des 40 IU/ml d'interleukine 2 à un point tel que la cytotoxicité résultante était comparable à celle générée par les 1000 IU/ml d'IL-2 (image n° 2c).

Modèle *in vivo*

Nous avons étendu notre recherche à un modèle de xénogreffe de neuroblastome transfecté par luciférase

afin d'examiner si l'effet stimulateur du MGN-3/Biobran sur les cellules NK *in vitro* pouvait avoir une signification clinique. L'image n° 3a représente les biophotos ventrales et dorsales de trois individus souris représentatifs auxquels on a administré du sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS) (groupe de contrôle), 1×10^6 de cellules NK non stimulées, voire 1×10^6 de cellules NK stimulées au MGN. Dans le groupe de contrôle et dans le groupe aux cellules NK non stimulées, on a noté une progression dramatique des cellules cancéreuses NB1691 tandis que, dans celui auquel on a administré 1×10^6 de cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran, on a enregistré une inhibition importante du grossissement du neuroblastome. Nous avons observé par ailleurs que les cellules NK stimulées par le MGN-3/Biobran réussissaient à augmenter fortement la survie des souris NOD/scid/IL2R γ null-hu ($p < 0.05$; cf. image n° 3b).

Rôle du MGN-3/Biobran dans la prolifération des cellules tueuses naturelles

Après deux semaines de culture le nombre total de cellules, avant tout des cellules NK, a augmenté de manière significative dans toutes les cultures où on avait ajouté du MGN-3/Biobran au médium de culture. Au contraire, s'agissant des cellules T dans le médium de culture contenant du MGN-3/Biobran, l'expansion de ces cellules a diminué (cf. image n° 4A). En bref, le fait d'ajouter du MGN-3/Biobran aux cultures d'IL2 et d'IL2+IL15 a eu pour conséquence une augmentation du nombre total des cellules dans la culture sans cellules nourricières multipliée par 1,8 et 1,2, une prolifération des cellules dans la culture contenant des cellules K562 multipliée par 1,3 jusqu'à 1,2, et une prolifération des cellules dans la culture contenant des cellules K562mbII15-41bbl multipliée par 1,4 jusqu'à 1,2. Le fait d'ajouter du MGN-3/Biobran aux cultures d'IL2 et d'IL2+IL15 a eu pour conséquence une prolifération des cellules NK dans la culture ne contenant pas de cellules nourricières, dans la culture contenant les cellules K562 et dans la culture contenant les cellules K562mbII15-41bbl multipliée respectivement par 2,1 et 0,9, par 2,6

jusqu'à 1,3 , par 2,5 jusqu'à 1,4. Le fait d'ajouter du MGN-3/Biobran aux cultures d'IL2 et d'IL2+IL15 a eu pour conséquence une prolifération des cellules T dans la culture ne contenant pas de cellules nourricières, dans la culture contenant les cellules K562 et dans la culture contenant les cellules K562mbII15-41bbl multipliée respectivement par 1,7 et 1,2 , par 0,2 jusqu'à 0,6 , par 0,7 jusqu'à 0,7. Le fait d'ajouter du MGN-3/Biobran aux cultures d'IL2 et d'IL2+IL15 a eu pour conséquence une prolifération des cellules NKT dans la culture ne contenant pas de cellules nourricières, dans la culture contenant les cellules K562 et dans la culture contenant les cellules K562mbII15-41bbl multipliée respectivement par 6,1 et 2,4 , par 0,4 jusqu'à 0,6 , par 0,7 jusqu'à 1. Le fait d'ajouter du MGN-3/Biobran aux cultures d'IL2 et d'IL2+IL15 a eu pour conséquence une prolifération des cellules B dans la culture ne contenant pas de cellules nourricières, dans la culture contenant les cellules K562 et dans la culture contenant les cellules K562mbII15-41bbl multipliée respectivement par 0,2 et 2,1 , par 0,5 jusqu'à 0,8, par 1,3 jusqu'à 0,8.

L'activité cytotoxique des cellules NK proliférées n'a pas beaucoup changé après l'addition du MGN-3/Biobran au médium de culture (image n° 4B). Cependant, l'addition de l'IL-15 a renforcé la cytotoxicité en comparaison avec l'IL-2 seul, et ce même après l'utilisation des K562 transfectées.

Mécanismes de stimulation des cellules NK au moyen du MGN-3/Biobran

Etant donné que les récepteurs de type Toll (TLRs) sont capables de stimuler les cellules tueuses naturelles humaines, nous avons testé la contamination des ligands TLR en présence du MGN-3/Biobran. Tous les ligands TLR testés n'ont montré qu'une contamination au lipopolysaccharide (LPS) (5078 EU/ml en présence de 100 mkg/ml de MGN-3/Biobran). Pour examiner le rôle de la contamination par LPS en tant que facteur stimulant, nous avons observé la véritable libération des cytokines sur les macrophages humains. Nous avons vu alors que la haute concentration de MGN-3/Biobran (10 g/ml) a augmenté la

libération des cytokines IL-8, IL-6, TNF- α et IL-10 (respectivement de quantités 4776, 164, 132 et 4 mkg/ml). Ces valeurs sont nettement en dessous de celles observées dans le cas de stimulation des mêmes cytokines (IL-8, IL-6, TNF- α et IL-10) par le lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml) (7487, 362, 208 et 37 mkg/ml). Les analyses *in vitro* de la cytotoxicité des cellules NK par rapport aux cellules NB1691 ont montré que les cellules NK stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) sous les proportions 8, 4, 2 et 1:1 ont accru la cytotoxicité des cellules NK au repos (jusqu'à 31, 20, 15, 12 % contre 19, 14, 13, 9 % précédemment). Nous avons interrompu la stimulation par le LPS au moyen de la polymyxine B et les cellules sont ensuite revenues à leur état de repos (23, 12, 7 et 6 %). Ensuite nous avons testé la cytotoxicité des cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran par rapport aux cellules NB1691. Nous avons alors observé une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK (43, 27, 25 et 24 % sous les proportions 8, 4, 2 à 1:1), non antagonisée par la polymyxine B (45, 29, 23 et 27 % sous les proportions 8, 4, 2 et 1:1).

DISCUSSION

Les résultats que nous avons recueillis indiquent un effet bénéfique *in vitro* et *in vivo* du MGN-3/Biobran sur l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de tumeurs chez les enfants. Nous avons également observé que l'addition du MGN-3/Biobran au médium de culture a accru la prolifération/l'activation des cellules NK en réduisant par ailleurs la prolifération des cellules T. Cette constatation correspond à celles observées en présence de tumeurs chez les adultes [30-31]. L'étude clinique effectuée avec des patients souffrant de carcinome hépatocellulaire a démontré que le fait de compléter le traitement d'intervention avec le MGN-3/Biobran renforçait l'effet antinéoplasique et la survie [21]. Il a été publié récemment que le MGN-3 stimulait l'immunité congénitale chez les patients souffrant de myélome multiple ; on a observé une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK, une augmentation du niveau des cellules myéloïdes dendritiques ainsi qu'une concentration accrue des cytokines sécrétées par les lymphocytes

auxiliaires Th1 [32]. Selon notre expérience, la stimulation des cellules NK provenant de donneurs en bonne santé au moyen du MGN-3/Biobran a amélioré l'activité cytotoxique *in vitro* et *in vivo* de ces cellules par rapport aux lignées cellulaires des tumeurs infantiles. Nous avons démontré la décimation *in vitro* des lignées cellulaires de la leucémie, du neuroblastome, du sarcome d'Ewing, du rhabdomyosarcome embryonnaire. Nous avons testé par ailleurs l'activité des cellules NK stimulées par le MGN-3/Biobran sur le neuroblastome des souris NOD/scid/IL2R γ null – modèle qui permet la poussée d'un neuroblastome humain sans aucune activité des cellules NK endogènes. Chez les souris soignées par les cellules tueuses naturelles stimulées par le MGN-3/Biobran, nous avons observé une inhibition significative de la poussée du neuroblastome. Non moins intéressant est l'effet constaté sur ces souris soignées aux cellules NK stimulées par le MGN-3/Biobran consistant en une prolongation importante de leur survie. Ces données correspondent à celles publiées précédemment à propos des malignités chez les adultes [20-25].

Les mécanismes des effets du produit MGN-3/Biobran se traduisant par l'augmentation de l'activité des cellules NK restent inconnus. Etant donné que les agonistes TLR ont la capacité de stimuler les cellules NK humaines, on suppose que la contamination par le liposaccharide (LPS) lors de l'utilisation du produit MGN-3/Biobran peut, en provoquant un signal au TLR, augmenter la cytotoxicité des cellules NK. Et même si nous n'avons constaté qu'une petite quantité de LPS, on peut attester que sa neutralisation à la polymyxine B n'a pas stoppé l'effet stimulant du Biobran sur l'activité des cellules tueuses naturelles. D'après nos données, il semblerait que le MGN-3/Biobran active les cellules NK au repos mais qu'il n'est pas par ailleurs capable d'activer les cellules qui prolifèrent avec l'IL-15, et ce bien qu'il ait été démontré qu'il augmente cette prolifération. Ceci indique la présence d'un mécanisme qui interfère partiellement avec l'IL-15. Une autre théorie suppose l'existence d'un effet apoptotique induit par l'activation des cellules NK libérant du TNF- α et du IFN- γ [30, 33]. Ce n'est que récemment qu'a été décrit l'effet synergique avec la chimiothérapie sur les cellules du carcinome du sein, avec le renforcement de

l'apoptose et avec l'inhibition de la prolifération cellulaire [34]. On a observé aussi une croissance du marqueur d'activation CD69 sur les cellules tueuses naturelles stimulées par le MGN-3/Biobran provenant de donneurs en bonne santé. La croissance du CD69 sur les cellules NK est en corrélation avec l'augmentation de leur cytotoxicité [35-37]. Nous supposons que nous avons affaire à plusieurs mécanismes générateurs de cet effet bénéfique observé lors du traitement au MGN-3/Biobran. On a en effet noté également des interactions du MGN-3/Biobran avec d'autres cellules immunitaires [38-39].

De nouvelles méthodes de traitement se développent telles que le transfert adoptif des cellules NK activées *in vitro* mettant en évidence une activité anticancéreuse accrue. Les études récentes ont prouvé que les cellules tueuses naturelles pouvaient se reproduire en des quantités énormes *ex vivo* en utilisant diverses méthodes, comme par exemple avec l'aide des cellules nourricières K562-mb15-41BBL [28]. Les cellules NK ainsi proliférées ont déjà fait preuve d'une activité anticancéreuse *in vitro* contre toute une série de lignées cellulaires et de malignités y compris des tumeurs atteignant les adultes et les enfants [40-42]. En ajoutant du MGN-3/Biobran à divers protocoles de prolifération, nous avons observé une meilleure prolifération des cellules tueuses naturelles et en même temps le maintien de l'activité cytotoxique et de la réduction de la prolifération des cellules T. Ces données pourraient être d'importance par exemple pour une grande prolifération des cellules NK cliniques à haute cytotoxicité notamment d'origine alogène, où les cellules T devraient être éliminées suite à la prévention de maladie causée par une réaction éventuelle d'un greffon contre l'hôte.

L'information importante qui ressort est que le MGN-3/Biobran combiné à une petite dose d'IL-2 a augmenté l'activité cytotoxique des cellules NK de la même mesure que la grande dose d'IL-2. Le MGN-3/Biobran et les petites doses d'IL-2 fonctionnent de manière synergique ouvrant ainsi la voie à l'élimination des toxicités en rapport avec les hautes doses proprement dites de l'IL-2 du traitement.

Les données des études réalisées sur des patients adultes parlent en faveur de l'utilisation du MGN-

3/Biobran en tant que traitement alternatif ou auxiliaire sous diverses formes immuno-thérapeutiques. Quoique nos données nécessitent l'appui d'autres études, elles indiquent un apport positif du produit MGN-3/Biobran pour les traitements immuno-thérapeutiques basés sur l'activité des cellules NK chez les enfants atteints de cancer. D'autres études qui expliqueraient le rôle du MGN-3/Biobran combiné avec les protocoles chimio-immuno-thérapeutiques doivent être effectuées avant tout dans le milieu clinique pédiatrique.

Remerciements :

Nous remercions ici la société Daiwa Pharmaceutical Co. LTD, Tokio, Japon pour la fourniture du produit MGN3/Biobran.

Conflit d'intérêt :

Les auteurs ne disposent de rien qu'il soit nécessaire de publier.

Les auteurs déclarent que ce manuscrit est original, n'a jamais été publié auparavant et n'est pas soumis ailleurs en ce moment à publication.

Légendes des images/tableaux :

Tableau n° 1 – Intensité moyenne de fluorescence (MFI) des récepteurs des cellules NK sur les cellules NK non stimulées, voire stimulées au moyen du produit MGN-3/Biobran, provenant du groupe de contrôle sain.

Image n° 1 - (A) Intensité moyenne de fluorescence des récepteurs actifs des cellules NK : au repos (blanches) et stimulées par le MGN-3/Biobran ou l'IL-15 (noires) chez 3 individus du groupe de contrôle sains. (B) Expression du CD69 sur des cellules NK au repos et stimulées par le MGN-3/Biobran.

Image n° 2 - (A) activité cytotoxique stimulée par le MGN-3 des cellules NK contre les lignées cellulaires K562, NB1691, Jurkat, A673 (rapport cellules effectrices / cellules cibles 8:1), A-204, RD et RH-30 (cellules effectrices / cellules cibles 10:1). (B) activité cytotoxique des cellules NK stimulées par l'IL-15 et le MGN-3 contre les lignées cellulaires K562, NB1691, Jurkat, A673 (cellules effectrices / cellules cibles 8:1). (C) activité cytotoxique stimulée par l'IL-2 et le MGN-3 contre A-204, RD et RH-30 (cellules effectrices / cellules cibles 10:1). Les données proviennent de trois volontaires en bonne santé et trois expériences réalisées indépendamment. *indique la signification statistique.

Image n° 3 - (A) Vue de luciférase découvrant les cellules cancéreuses NB1691 qui illustre le ballast neuroblastomique chez les souris auxquelles il a été administré : PBS (groupe de contrôle), 1×10^6 de cellules NK fraîchement isolées et non stimulées, voire 1×10^6 de cellules NK stimulées par le MGN-3 (huit injections intraveineuses deux fois par semaine sans interruption sur une période de 4 semaines). On y voit trois individus en position ventrale et dorsale, représentant chaque groupe. (B) Le volume de la tumeur par rapport à ses valeurs de départ était nettement plus petit dans la cohorte des souris qui avaient reçu les cellules NK stimulées par le MGN-3 en comparaison avec le groupe de contrôle et le groupe ayant obtenu les cellules NK au repos. Les courbes Kaplan Meier marquent une survie des individus dans chaque groupe. * indique la signification statistique.

Image n° 4 - (A) Quantité de toutes les cellules, des cellules NK, des cellules T, des cellules NKT et des cellules B après 14 jours de prolifération dans la solution de culture provenant de 3 donneurs en bonne santé, avec/sans contenu de MGN-3/Biobran et des cytokines (IL-2, voire IL-2 plus IL15), voire cultivées avec les cellules nourricières irradiées contenant les cellules K562 ou K562-mb15-41BBL. * indique la signification statistique. (B) Activité cytotoxique des cellules NK proliférées après addition du produit MGN-3/Biobran dans le médium de culture.