

L'arabinoxylane de son de riz (MGN-3/Biobran) améliore la cytotoxicité par les cellules tueuses naturelles en présence de neuroblastome *in vitro* et *in vivo*

ANTONIO PÉREZ-MARTÍNEZ^{1,2}, JAIME VALENTÍN², LUCÍA FERNÁNDEZ³, ENRIQUE HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ², EDUARDO LÓPEZ-COLLAZO², PETRA ZERBES⁴, ELLEN SCHWÖRER⁴, FERNANDO NUÑEZ⁵, INMACULADA GÉNESIS MARTÍN⁵, HANNAH SALLIS⁶, MIGUEL ÁNGEL DÍAZ⁷, RUPERT HANDGRETINGER⁴ et MATTHIAS MANUEL PFEIFFER⁴

¹ Service de pédiatrie d'hémo-oncologie de l'Hôpital universitaire La Paz de Madrid, Espagne, ² Groupe pour la recherche sur l'immunité innée auprès de l'Institut de recherche de l'Hôpital universitaire La Paz de Madrid, Espagne, ³ Programme de recherche clinique auprès du Centre national pour la recherche sur le cancer, Madrid, Espagne, ⁴ Hôpital pédiatrique universitaire de Tübingen, Tübingen, Allemagne, ⁵ Institut des essais sur les animaux auprès de l'Institut de recherche biologique Alberto Solso, Comité suprême pour la recherche scientifique, Madrid, Espagne, ⁶ Faculté de Médecine de l'Université de Cardiff, Heath Park, Cardiff, Pays de Galle, et ⁷ Service d'hémo-oncologie et de transplantation de moëlle épinière de l'Hôpital pédiatrique universitaire Niño Jesús, Madrid, Espagne

Résumé

Objectifs de l'étude : l'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (cellules NK) joue un rôle important dans la défense immunologique naturelle dans les cas de tumeurs malignes. Les cellules NK apparaissent comme un nouvel outil de traitement oncologique adoptif. L'arabinoxylane du son de riz (MGN-3/Biobran) est décrit comme un modificateur de la réponse biologique capable d'améliorer l'activité cytotoxique des cellules NK. Cette étude s'est donnée pour but d'évaluer l'effet du produit MGN-3/Biobran sur l'activation, l'expansion et la cytotoxicité des cellules NK en présence de cellules de neuroblastome. **Méthodes :** nous avons stimulé au moyen du produit MGN-3/Biobran les cellules NK enrichies de billes magnétiques. Nous avons procédé à l'évaluation de l'activation des cellules NK en faisant l'analyse de leurs phénotypes et nous avons suivi leur capacité d'expansion. La capacité cytotoxique des cellules NK a été testée *in vitro* sur des lignées cellulaires K562, Jurkat, A673, NB1691, A-204, RD et RH-30, et *in vivo* sur des cellules de lignée NB1691. **Résultats :** la stimulation des cellules NK au moyen du MGN-3/Biobran a induit une augmentation de l'expression des récepteurs CD25 et CD69 associés à l'activation comparativement aux cellules dormeuses ($P < 0.05$). L'expression des récepteurs NKG2D, DNAM, NCR et TLR est restée inchangée. La stimulation réalisée au moyen du MGN-3/Biobran pendant la nuit a augmenté l'activité cytotoxique des cellules NK par rapport à toutes les lignées cellulaires testées *in vitro* et a ralenti la croissance du neuroblastome *in vivo*. Pour ce qui est du produit MGN-3/Biobran, ce mécanisme n'est pas dû à la contamination par les lipopolysaccharides. Par ailleurs, l'application du MGN-3/Biobran a renforcé l'expansion des cellules NK et la réduction des cellules T *in vitro*. **Conclusion :** nos données indiquent que le MGN-3/Biobran régule à la hausse les marqueurs d'activation des cellules NK, stimule l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de neuroblastome *in vitro* et *in vivo*, et provoque de manière sélective l'expansion des cellules tueuses. Ces résultats peuvent être utiles à l'avenir pour le traitement du neuroblastome lors du développement des stratégies thérapeutiques basées sur l'activité des cellules NK.

Mots-clés : arabinoxylane de son de riz (MGN-3/Biobran), activité cytotoxique, cellules tueuses naturelles (cellules NK), neuroblastome

Introduction

L'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (cellules NK) joue un rôle important dans notre défense immunologique naturelle contre le développement de tumeurs malignes, ce dont témoigne le fait que leur activité réduite est liée à un risque plus grand de développement de maladie cancéreuse chez les individus en bonne santé [1]. De plus, l'activité des cellules cytotoxiques des cellules NK chez les patients ayant subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques est liée à une réduction du risque de récurrence [2]. L'activité cytotoxique des cellules NK

peut être accrue en pratiquant un mode de vie sain [3-5], grâce aux modificateurs de la réponse biologique [6,7], aux hormones de croissance [8] ainsi qu'aux cytokines [9-12]. Les cellules cancéreuses peuvent réduire l'activité cytotoxique des cellules NK en sécrétant des cytokines suppressives, ou encore en réduisant les récepteurs d'activation sur les cellules NK. [13,14]. L'activité des cellules NK peut être inhibée par des anticorps [15,16] et des médicaments chimiothérapeutiques [17].

Correspondant : Antonio Pérez-Martínez, MD, PhD, Service d'hémo-oncologie infantile de l'Hôpital universitaire La Paz, Paseo de la Castellana 261, Madrid, 28046, Espagne. E-mail: aperezmartinez@salud.madrid.org

(Etude reçue le : 12 juin 2014 ; acceptée le : 6 novembre 2014)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.001>

ISSN 1465-3249 Droit d'auteurs © 2015, Société internationale de la thérapie cellulaire. Editeur : Elsevier Inc. Tous droits réservés.

2 A. Pérez-Martínez et collectif

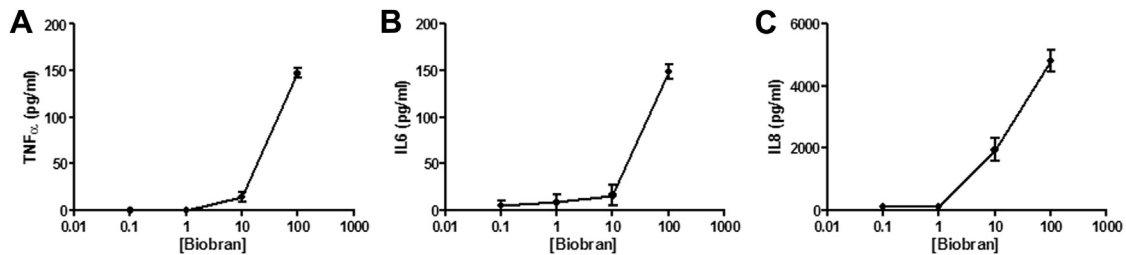


Fig. 1- Niveaux des cytokines dans des surnageants de culture, définis à l'aide du système Cytometric Bead Array Flex Set (de chez BD Biosciences) et analysés par cytométrie en flux au moyen du cytomètre BD FACSCalibur (de chez BD Biosciences). (A) Niveaux TNF- α , (B) Niveaux IL-6 et (C) Niveaux IL-8.

Nous devrions donc nous orienter, et ce non seulement chez les patients atteints du cancer mais aussi chez la population en bonne santé, sur le maintien d'un haut niveau d'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles.

Le MGN-3/Biobran est composé d'arabinoxylane de son de riz, modifié à l'aide d'enzymes hydrolysant les hydrates de carbone issus du champignon shiitaké [18]. Il s'agit d'un complément nutritif qui, d'après les publications disponibles, améliore l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de tumeurs chez les patients adultes, et ce *in vitro* et *in vivo* [19,20]. On décrit également son effet anticancéreux lorsqu'il est associé à une thérapie oncologique conventionnelle appliquée sur certains nouveaux types de cancer tels que le cancer du sein ou le carcinome hépatocellulaire [21-25]. Ceci permet d'envisager l'utilisation du MGN-3/Biobran comme complément au traitement du cancer chez les patients adultes. Jusqu'à présent, en revanche, aucune donnée n'avait été publiée concernant les tumeurs chez les enfants. Notre objectif a été d'examiner le rôle du MGN-3/Biobran en tant que stimulateur des cellules NK en présence de tumeurs infantiles *in vitro* et *in vivo*, de même que le rôle de ce produit sur l'expansion des cellules tueuses naturelles tout en faisant usage de différentes combinaisons de cytokines et de diverses lignées cellulaires stimulées.

Méthodes

Préparation des cellules

L'étude a été approuvée par la commission éthique de notre institution. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) d'échantillons sanguins prélevés chez des individus

volontaires en bonne santé ont été isolées par centrifugation en gradient de densité. Une couche de sang a été étalée délicatement sur une couche de volume égal de milieu de séparation Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) et centrifugée à température ambiante et à 400 g pendant 20 min. Les MBPK ont été prélevés de l'interface et rincés deux fois au moyen d'un tampon phosphate salin (PBS) et centrifugé à 400 g pendant 10 min.. Les cellules NK ont été ensuite mises en présence de billes magnétiques (en utilisant le Cell Isolation KIT ou CD56 microbeads, de chez Miltenyi Biotec) (cf. online [Figure complémentaire n° 1](#) pour les évaluateurs). Tout le sang était en couche au-dessus du coussin de Ficoll et centrifugée à température ambiante et 1800 tours/min. pendant de 30 minutes. La fraction lymphocytes/monocytes une fois isolée a été rincée au moyen d'un tampon phosphate salin et soumise à la lyse des globules rouges (dans une solution de chlorure d'ammonium; Stem Cell Technologies) pendant 5 minutes à température ambiante et, après l'arrêt de la réaction par rinçage au tampon phosphate salin, les monocytes accolés ont été cultivés en milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies Ltd.) enrichi de 10% de sérum de fœtus de veau en atmosphère humide avec 5% CO₂ à la température de 37°C. Les monocytes accolés ont été cultivés sur une durée de 7 à 10 jours en vue de permettre une différenciation des macrophages. Ceux-ci ont été utilisés en guise de biocapteurs pour l'identification de la dose optimale de MGN-3/Biobran qui stimule les cellules NK sans stimuler les macrophages.

Réactifs

Dans l'étude ont été utilisés les anticorps monoclonaux (mAbs) suivants: CD3PE-Cy7, CD45-FITC, CD69-FITC et CD314 (NKG2D)-APC (tous de chez Becton Dickinson) ; CD56-APC, CD25-PE, CD336

Tableau n° 1 – Effet stimulant de l'incubation nocturne aux Biobran et IL-15 sur l'activation des récepteurs des cellules NK

	Dormeuses		Stimulées au Biobran		Stimulées au IL-15		Rapport Biobran/ dormeuses	Rapport IL-15/ dormeuses
	MFI	SD	MFI	SD	MFI	SD		
CD69	508.3	889.2	1591.7	741.1	18032.6	14136.6	3.13	35.48
CD25	481	448.9	1537	520.3	1864	2843.8	3.2	3.88
NKG2D	4634.2	5762	5074.3	4761	9914.9	11491	1.09	2.14
DNAM	1960.6	2529	2501.1	1174	3344.8	5391	1.28	1.71
NKp44	1017.7	1473	1808	2780	886.3	2110	1.78	0.87
NKp30	1300.7	1990	1519.8	2508	4971.5	1567	1.17	3.82
NKp46	1134.4	1044	1159.4	1695	1568.8	1187	1.02	1.38
TLR4	2654	2858	1348	2533	1963	2150	0.51	0.74
TLR9	5854	6284	5200	6448	8779	6231	0.89	1.50

Les données indiquent l'intensité moyenne de fluorescence (MFI), écart-type (SD) et les rapports chez 3 individus contrôlés en bonne santé. Les données en gras marquent l'importance statistique.

(NKp44)-PE et CD335 (NKp46)-PE (tous de chez Beckman Coulter) ; CD337 (NKp30)-PE (de chez Miltenyi Biotec). Les mAbs marqués au fluochrome contre les TLR-4 et TLR-9 ont été obtenus auprès de la société Enzo Life Sciences AG.

L'interleukine (IL)-15 a été obtenue auprès de la société CellGenix et l'IL-2 (proleukine) chez Novartis. Le MGN-3/Biobran nous a été fourni par la société Daiwa Pharmaceuticals Co Ltd. Le lipopolysaccharide (LPS ; de chez Sigma 0127:B8) a été utilisé en tant que ligand de récepteur de type Toll et la polymyxine B (de chez InvivoGen) en tant qu'inhibiteur de l'activation du TLR-4 induite par LPS.

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires K562 d'érythroleucémie, Jurkat T de leucémie lymphoïde, A673 de sarcome d'Ewing (tous de chez ATCC), la lignée cellulaire NB1691 de neuroblastome (fournie aimablement par le Dr. A. Davidoff de l'Université de recherche pédiatrique St-Jude), par ailleurs les lignées cellulaires A-204 de rhabdomyosarcome embryonnaire, RD de rhabdomyosarcome embryonnaire, et RH-30 de rhabdomyosarcome alvéolaire (toutes de chez DSZM) ont été choisies comme cellules cibles du test de cytotoxicité naturelle des cellules NK *in vitro*. La lignée cellulaire de neuroblastome transduit par luciférase (NB1691luc) qui nous a été fournie aimablement par le Dr. A. Davidoff a été utilisée *in vitro* dans un modèle murin quantitatif *in vivo* [26,27]. Pour l'activation et l'expansion des cellules NK, on a utilisé comme cellules nourrices des lignées cellulaires irradiées K562 et K562 avec expression des IL-15 et 4-1BBL (K562-mb15-41BBL, fournie aimablement par le Dr. D. Campana de l'Université nationale de Singapour) [28] liées sur membrane cellulaire.

Analyse phénotypique

A l'aide d'une coloration fluorescente à 6 couleurs, on a déterminé le phénotype de surface des cellules NK stimulées pendant la nuit au MGN-3/Biobran (100 µg/ml) d'une part, des cellules NK stimulées pendant la nuit à l'IL-15 (10 ng/ml) d'autre part, des cellules NK non stimulées et des cellules NK expansées par ailleurs, provenant de 3 personnes volontaires en bonne santé. Nous avons coloré 5×10^5 cellules NK fraîches issues de différentes conditions au moyen d'anticorps anti-humains monoclonaux murins à la température de 4°C pendant 30 minutes. Les cellules ont été ensuite rincées deux fois avec un PBS froid, et resuspendues dans 0,5ml de PBS puis analysées dans un cytomètre de flux FACASCanto II (Becton Dickinson). Nous avons déterminé, pour chaque antigène de surface cellulaire, le pourcentage de cellules positives et les taux d'intensité fluorescente moyenne (MFI). Sur le groupe de contrôle nous avons utilisé des anticorps de contrôle d'isotypes adéquats.

Essais de la cytotoxicité et stimulation des cellules NK

La cytotoxicité naturelle des cellules NK a été suivie dans le cadre d'un test conventionnel de 2 heures de libération d'acide d'europium-2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylique (Perkin-Elmer Wallac), effectué comme il

a été décrit ci-dessus [29]. Comme cellules cibles ont été utilisées des cellules des lignées cellulaires K562, Jurkat, A673, NB1691, A-204, RD et RH-30. Bref, les cellules cibles ont été marquées par un ligand améliorant la fluorescence (bis(acétoxyméthyl)2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-dicarboxylate). Ce ligand hydrophobe pénètre rapidement dans la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, il se produit une hydrolyse des liaisons ester qui fait que le ligand devient hydrophile et donc incapable de passer à travers la membrane cellulaire. La cytolysse, cependant, provoque une libération du ligand et finalement une réaction de celui-ci à l'europium pour former un chélate stable fluorescent que l'on peut évaluer fluorométriquement (à l'aide du lecteur Infinite F200 Reader-TECAN Group Ltd.). Le calcul de la cytotoxicité spontanée et spécifique a été réalisé en utilisant les formules suivantes :

% Libération spécifique

$$= \frac{(\text{Libération expérimentale} - \text{libération spontanée})}{(\text{Libération maximale} - \text{libération spontanée})} \times 100$$

% Libération spécifique

$$= \frac{(\text{Libération spontanée} - \text{arrière-plan})}{(\text{Libération maximale} - \text{arrière-plan})} \times 100$$

Des cellules NK obtenues auprès de volontaires en bonne santé ont été stimulées pendant la nuit avec 100 µg/ml de MGN-3/BioBran, 10 ng/ml d'IL-15, 40 IU/ml ou 1000 IU/ml d'IL-2, voire avec une combinaison de MGN-3/Biobran et de 40 IU/ml d'IL-2. Les cultures ont été effectuées dans un milieu de culture complet (RPMI 1640 auquel on a ajouté 10% de sérum de veau foetal non activé par la chaleur, 100 IU/ml de pénicilline, 100 ng/ml de streptomycine et 2mmol/l de glutamine) dans une atmosphère humidifiée de 5% CO₂ et de 95% d'air. L'activité cytotoxique a été évaluée selon le mode décrit ci-dessus.

Modèle murin

Une quantité de 2×10^5 de cellules de neuroblastome NB-1691luc a été injectée de manière intraveineuse à des souris NOD-scid IL-2Rgnull âgées de 12 semaines. Nous avons utilisé des cellules mononucléaires du sang périphérique provenant d'individus volontaires en bonne santé pour isoler les cellules NK. Les cellules NK ont été ensuite enrichies par une sélection de billes magnétiques (NK cell isolation KIT, Miltenyi Biotec). Les cellules NK obtenues étaient > 90% CD3-CD56+. On a employé des cellules NK fraîches ou des cellules NK activées pendant la nuit avec 100 µg/ml de MGN-3/BioBran. La thérapie intraveineuse de cellules NK a débuté 7 jours après l'injection des cellules cancéreuses et a été réalisée deux fois par semaine pendant 4 semaines. Sur 2 expériences indépendantes (4 souris par groupe), nous avons comparé la cohorte de souris non traitées (groupe de contrôle) avec une cohorte de souris auxquelles on avait administré 1×10^6 de cellules NK non stimulées (groupe NK) et une cohorte de souris ayant reçu 1×10^6 de cellules NK

4 A. Pérez-Martínez et collectif

stimulées pendant la nuit avec 100 µg/ml de MGN-3/Biobran (groupe NK-Biobran). Des images de bioluminescence ont été réalisées les 7e, 14e, 28e et 42e jours après le début de la thérapie des cellules NK et après une injection intrapéritonéale de 100 µl de luciférine diluée dans un tampon phosphate salin de 15 mg/ml.

Cinq minutes après l'administration du substrat, les animaux ont été mis sous anesthésie à l'isoflurane (induction de l'anesthésie à 3% puis maintenue à 1,5%) et placés ensuite sur l'appareil Xenogen IVIS Lumina II (Imagerie quantitative par fluorescence et par bioluminescence, Xenogen Corporation). Les images ont été faites sous diverses expositions et analysées au moyen du logiciel Xenogen Living Image Software (version 3.2). Pour les diagrammes des images de bioluminescence, une zone d'intérêt de forme rectangulaire comprenant le thorax et l'abdomen en entier a été choisie pour chaque souris et le flux total (photons/s) calculé dans les positions ventrale et couchée sur le ventre avec exposition de 180 s. Cette valeur s'étale par rapport à une valeur de fond comparable (d'une souris de contrôle sans tumeur et à laquelle on n'a injecté que de la luciférine). Toutes les expériences ont été effectuées en suivant les instructions des Comités institutionnels de soin et d'utilisation des animaux conformément aux critères établis dans le Guide des instituts nationaux de santé pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Activation et expansion des cellules NK

L'expansion s'est produite dans les 14 jours dans des cultures comprenant et ne comprenant pas 100 µg/ml de MGN-3/Biobran et de cytokines (100 IU/ml IL-2 ou 100 IU/ml IL-2 plus 10 ng/ml IL-15), ou encore dans des cocultures supplémentaires contenant des cellules nourrices irradiées composées de cellules K562 ou K562-mb15-41BBL [28]. Bref, les cellules mononucléaires obtenues du sang périphérique (PBMCs) auprès de 5 adultes volontaires en bonne santé ont été isolées par centrifugation en gradient de densité (Ficoll). Ces cellules ont été mises en incubation dans un plateau à 6 puits à fond plat avec ou sans MGN-3/Biobran et cytokines humaines (IL-2, IL-2 + IL-15), ou encore cultivées sous la proportion 1:1,5 avec des cellules nourrices irradiées sublétales K562 ou K562-mb15-41BBL. Comme milieu de culture on a utilisé du RPMI 1640 enrichi de 10% de plasma humain fraîchement congelé AB, L-glutamine et pénicilline-streptomycine (Biocrom). Ce milieu frais était ajouté tous les 2 jours. Au bout de 14 jours, les cellules ont été récupérées et analysées pour déterminer le phénotype et la cytotoxicité *in vitro* des cellules NK.

Cytometric Bead Array et analyse par cytométrie en flux pour déterminer la contamination du MGN-3/Biobran par agoniste de TLR

Grâce à la technique Cytometric Bead Array Flex Set (de chez BD Biosciences) utilisée suivant le protocole du fabricant, nous avons détecté la libération du facteur de nécrose de tumeur (TNF)- α , IL-6 et IL-8 dans les macrophages humains après exposition aux effets du lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml) et du MGN-3/Biobran (à raison de 10, 100, 1000 et 10000 µg/ml), puis nous en avons fait l'analyse par cytométrie en flux au moyen du cytomètre en flux BD FACSCalibur (BD Biosciences). La

concentration de 100 µg/ml de BioBran a été déterminée comme étant la plus forte ne causant pas d'inflammation (augmentation des TNF- α , IL-6 et IL-8, Fig.1). Le MGN-3/Biobran a été examiné du point de vue de son effet agonistique sur les récepteurs de type Toll TLR-2, -3, -4, -5, -7, -8 et 9 de chez InvivoGen. Puisque des traces de LPS dans le MGN-3/Biobran pourraient accroître la cytotoxicité des cellules NK par signalisation du TLR-4, la société BioChem GmbH a réalisé le test de détermination de la présence de lipopolysaccharide/endotoxine contaminante, le ligand TLR-4, dans le MGN-3/Biobran (100 µg/ml). Par ailleurs, nous avons procédé à la quantification de la présence de LPS/endotoxine par test chromogénique (ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit, GenScript). Ensuite nous avons réalisé les essais fonctionnels de la cytotoxicité *in vitro* par rapport aux lignées cellulaires K562 et NB1691 en tant que cibles et en utilisant le LPS (10 ng/ml) en tant que stimulant des cellules NK et la polymyxine B en tant qu'inhibiteur de l'activation du TLR-4 induite par le LPS. Enfin, nous avons effectué des tests de cytotoxicité envers la lignée cellulaire NB1691 en appliquant des cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran avec de la polymyxine B en tant qu'inhibiteur.

Analyse statistique

Les résultats sont indiqués comme moyennes $\pm$ SD (écart-type). Pour la comparaison des effets du MGN-3/Biobran sur le phénotype, la cytotoxicité et le taux d'expansion des cellules NK, nous avons eu recours aux tests non paramétriques de Wilcoxon. Dans le modèle murin, le taux de survie a été estimé par la méthode Kaplan-Meier à une variante puis comparé au moyen du test log-rank. Une signification statistique de $P < 0,05$ a été définie.

Résultats

Etablissement du phénotype des cellules NK

L'addition de cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran a conduit à une augmentation du taux d'expression des clusters de différenciation CD69 et CD25 d'une moyenne de 9%-88% et de 6%-90% respectivement (le taux d'intensité de fluorescence moyenne (MFI) a été multiplié respectivement par 3,1 et 3,2). Les taux et l'intensité de fluorescence moyenne des autres récepteurs examinés sont restés inchangés. Sur les cellules NK stimulées par IL-15, utilisées comme contrôle positif, le taux d'expression moyenne des différents marqueurs a augmenté de manière significative (CD25 6%-92%, taux MFI multiplié par 3,9, CD 69 (9%-98%, taux MFI multiplié par 35,5), NKG2D (92%-97%, taux MFI multiplié par 2,1), DNAM (81%-96%, taux MFI multiplié par 1,7) et Nkp30 (de 54 à 81, taux MFI multiplié par 3,8). Le tableau I et la Fig.2 - A et B - représentent la réaction des récepteurs activateurs sur les cellules NK à la stimulation au MGN-3/Biobran et à l'IL-15 pendant la nuit.

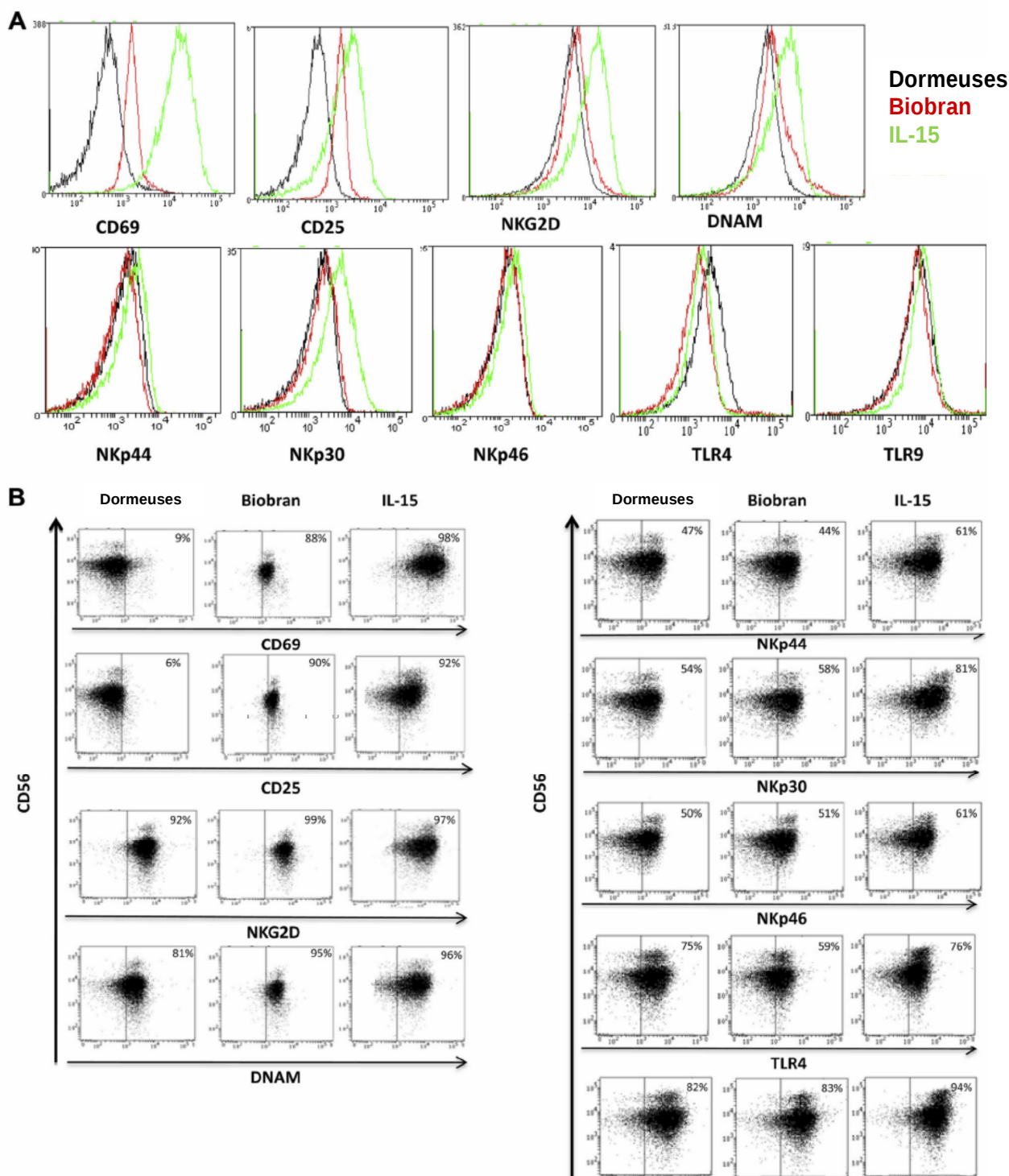


Fig. 2 (A) - Intensité de fluorescence moyenne des récepteurs activateurs des cellules NK : dormeuses (courbe noire), stimulées au MGN-3/Biobran (rouge) et à l'IL-15 (verte) chez 3 individus de contrôle en bonne santé. (B) - Pourcentages d'expression des marqueurs d'activation sur les cellules NK dormeuses, stimulées au MGN-3/Biobran et à l'IL-15.

Essais de cytotoxicité *in vitro*

La stimulation pendant la nuit au MGN-3/Biobran a provoqué une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires testées selon une proportion effet/cible de 8:1 (K562, NB1691, Jurkat, A673) ou de 10:1 (A-204, RD, RH-30) comparativement aux cellules NK dormeuses (Fig. 3A, K562 80% contre 69%, $P = 0.03$, NB1691 41% contre 23%, $P = 0.03$, 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 à l'IL-15 a conduit à des taux encore plus élevés de la lyse des lignées cellulaires K562 (100%), NB1691 (61%), Jurkat (60%) et A673 (58%) (Fig. 3B). Pour tester l'effet synergique de l'IL-2 et du MGN-3/Biobran nous avons comparé la stimulation à forte dose d'IL-2 (1000 IU/ml) avec celle à faible dose d'IL-2 (40 IU/ml) et avec celle à faible dose de IL-2+ MGN-3/Biobran. L'addition de MGN-3/Biobran à une faible dose d'IL-2 a amélioré l'effet stimulant de 40 IU/ml d'IL-2 atteignant une cytotoxicité comparable à celle obtenue avec 1000 IU/ml d'IL-2 (Fig. 3C). Afin de tester le profil de sécurité des cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran, nous avons réalisé des essais de cytotoxicité sur des cohortes de contrôle négatives (cellules autologues négatives CD56) qui ont fait apparaître une absence de cytotoxicité (Figure 2 complémentaire et Tableau n° 1 complémentaire pour les évaluateurs).

Modèle *in vivo*

Afin d'examiner si l'effet de stimulation du MGN-3/Biobran sur les cellules NK *in vitro* revête une importance clinique, nous avons élargi notre recherche à un modèle xéno-graft de neuroblastome transfecté par luciférase. Sur la Fig. 4 on voit des bio-images ventrales et dorsales de 3 groupes représentatifs de souris auxquelles on a administré un tampon phosphate salin (groupe de contrôle), 1×10^6 de cellules NK dormeuses et 1×10^6 de cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran. Dans le groupe de contrôle tout comme dans le groupe des cellules NK dormeuses, on a noté une progression dramatique des tumeurs NB1691 tandis que, dans la cohorte à laquelle on avait administré 1×10^6 de cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran, on a observé une inhibition de poussée du neuroblastome significative (Fig. 4B et Tableau II complémentaire pour les évaluateurs). Nous avons observé également que les cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran avaient accru de manière sensible la survie dans le modèle comportant les souris NOD/scid/IL2R γ null-hu ($P < 0.05$; Fig. 4C).

Rôle du MGN-3/Biobran dans l'expansion des cellules NK

Au bout de 2 semaines de culture, il s'est avéré que l'expansion des cellules NK s'est accrue de manière plus importante dans le milieu de culture auquel le MGN-3/Biobran avait été ajouté (Tableau III complémentaire). Par contre, l'addition du MGN-3/Biobran au médium de culture a provoqué une réduction de l'expansion (Fig. 5A). L'addition de MGN-3/Biobran aux cultures IL-2 et IL-2 + IL-15 n'ont produit aucune différence significative du point de vue statistique sur les cellules NKT et sur les

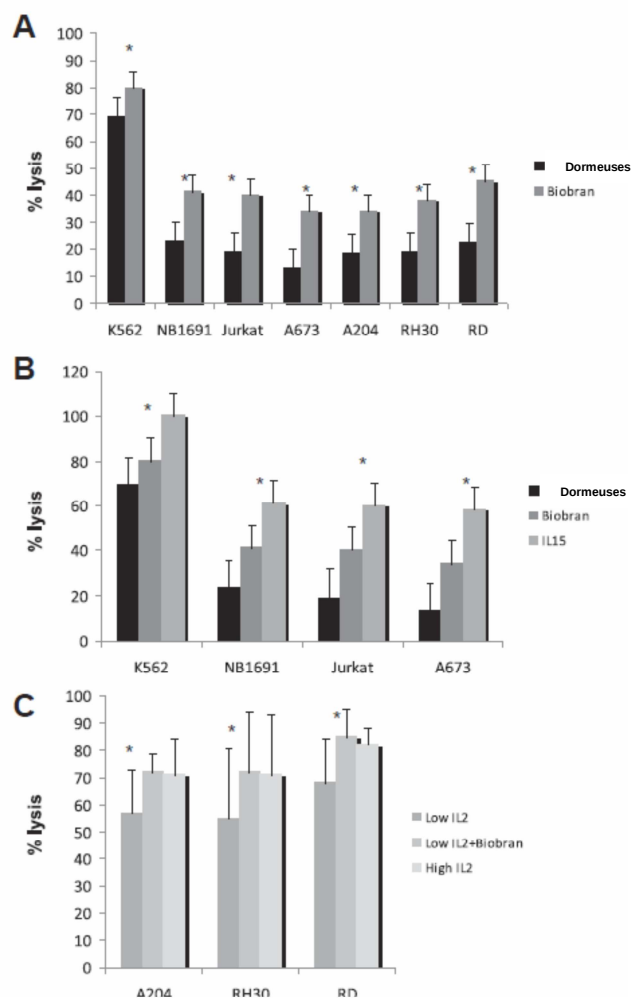


Fig. 3 (A) - Activité cytotoxique des cellules NK stimulées au MGN-3 vis-à-vis des lignées cellulaires K562, NB1691, Jurkat et A673 (rapport effecteur/cible de 8:1), A-204, RD et RH-30 rapport effecteur/cible de 10:1). (B) - Activité cytotoxique des cellules NK stimulées à l'IL-15 et au MGN- vis-à-vis des lignées cellulaires K562, NB1691, Jurkat et A673 (rapport effecteur/cible de 8:1). (C) - Activité cytotoxique des cellules NK stimulées à l'IL-2 et au MGN-3 vis-à-vis des cellules A-204, RD et RH-30 (rapport effecteur/cible de 10:1). Les données représentent les résultats de 3 expériences indépendantes faites à partir de 3 volontaires en bonne santé. *Résultat significatif du point de vue statistique.

cellules B. L'activité cytotoxique des cellules NK expansées n'a pas changé de manière significative dans le cas de l'addition de MGN-/Biobran au milieu de culture (Fig. 5B). En revanche, l'addition d'IL-15 a renforcé la cytotoxicité comparativement au milieu contenant uniquement de l'IL-2, et ce même en utilisant une lignée cellulaire K562 transfectée.

Mécanisme de stimulation des cellules NK au MGN-3/Biobran

Etant donné que les cellules NK peuvent être stimulées par les récepteurs de type Toll (TLR), nous avons testé le déclenchement de TLR sous l'influence du MGN-3/Biobran en utilisant les macrophages humains en tant que biocapteurs, et ce en vue de déterminer la dose optimale MGN-3/Biobran capable de stimuler les cellules NK sans

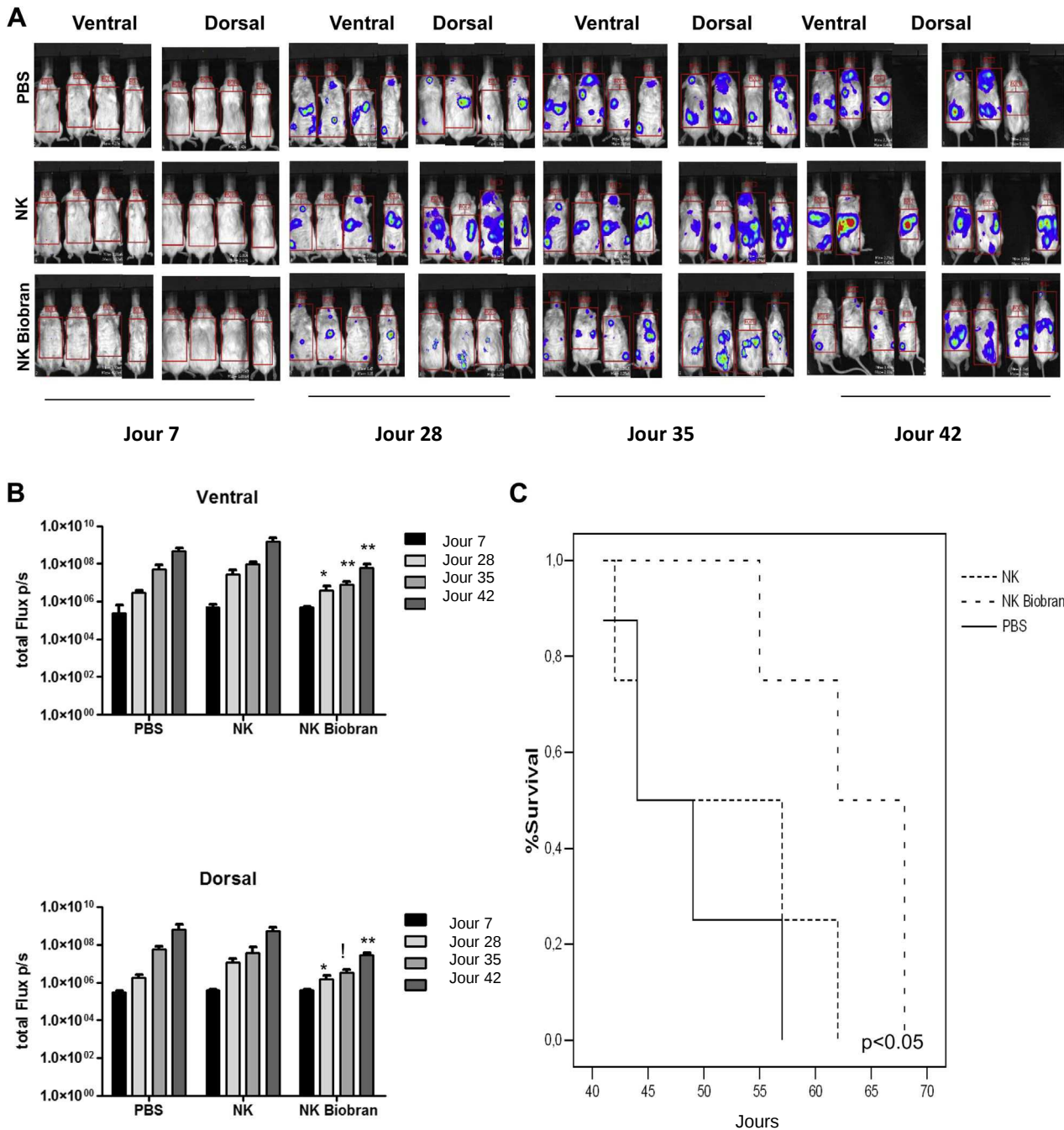


Fig. 4 (A) – Les images de tumeurs NB1691 exprimant la luciférase illustrent le volume du neuroblastome chez les souris auxquelles un tampon phosphate salin a été administré (groupe de contrôle), 1×10^6 cellules NK dormeuses fraîchement isolées, et 1×10^6 de cellules NK stimulées au MGN-3 (injection intraveineuse de 8 doses, soit deux fois par semaine pendant 4 semaines consécutives). Trois souris représentatives de chaque groupe y sont montrées - vues ventrales et dorsales avec marquage de la zone d'intérêt. (B) - Le multiple du volume tumoral rapporté aux valeurs de base était nettement inférieur chez la cohorte de souris auxquelles des cellules NK stimulées au MGN-3 avaient été administrées comparativement au groupe de contrôle ou au groupe de souris ayant reçu des cellules NK dormeuses. (C) – Les courbes de Kaplan-Meier indiquent les taux de survie des souris au sein des différents groupes. [†] Résultat significatif du point de vue statistique comparativement au groupe de contrôle. * Résultat significatif du point de vue statistique comparativement au groupe ayant reçu des cellules NK dormeuses. ** Résultat significatif du point de vue statistique comparativement aux deux groupes.

stimuler les macrophages. Il s'est avéré que seuls de hauts niveaux de MGN-3/Biobran (10 mg/ml) aboutissaient au déclenchement d'IL-8, IL-6 et de TNF- α (respectivement 4776, 164 et 132 pg/ml) – cf. Figure 1. Ces mesures étaient sensiblement inférieures à celles observées lors de la stimulation au LPS (10 ng/ml) (respectivement 7487, 362 et 208 pg/ml).

Un test LAL (lysate d'amœbocyte de limule) nous a révélé des traces (Eu/ml = 1,68) de contamination dans le MGN-3/Biobran par LPS. Afin de rechercher le rôle de la contamination par lipopolysaccharide du MGN-3/Biobran comme mécanisme de stimulation, nous avons effectué des tests de cytotoxicité in vitro vis-à-vis des cellules NB1691.

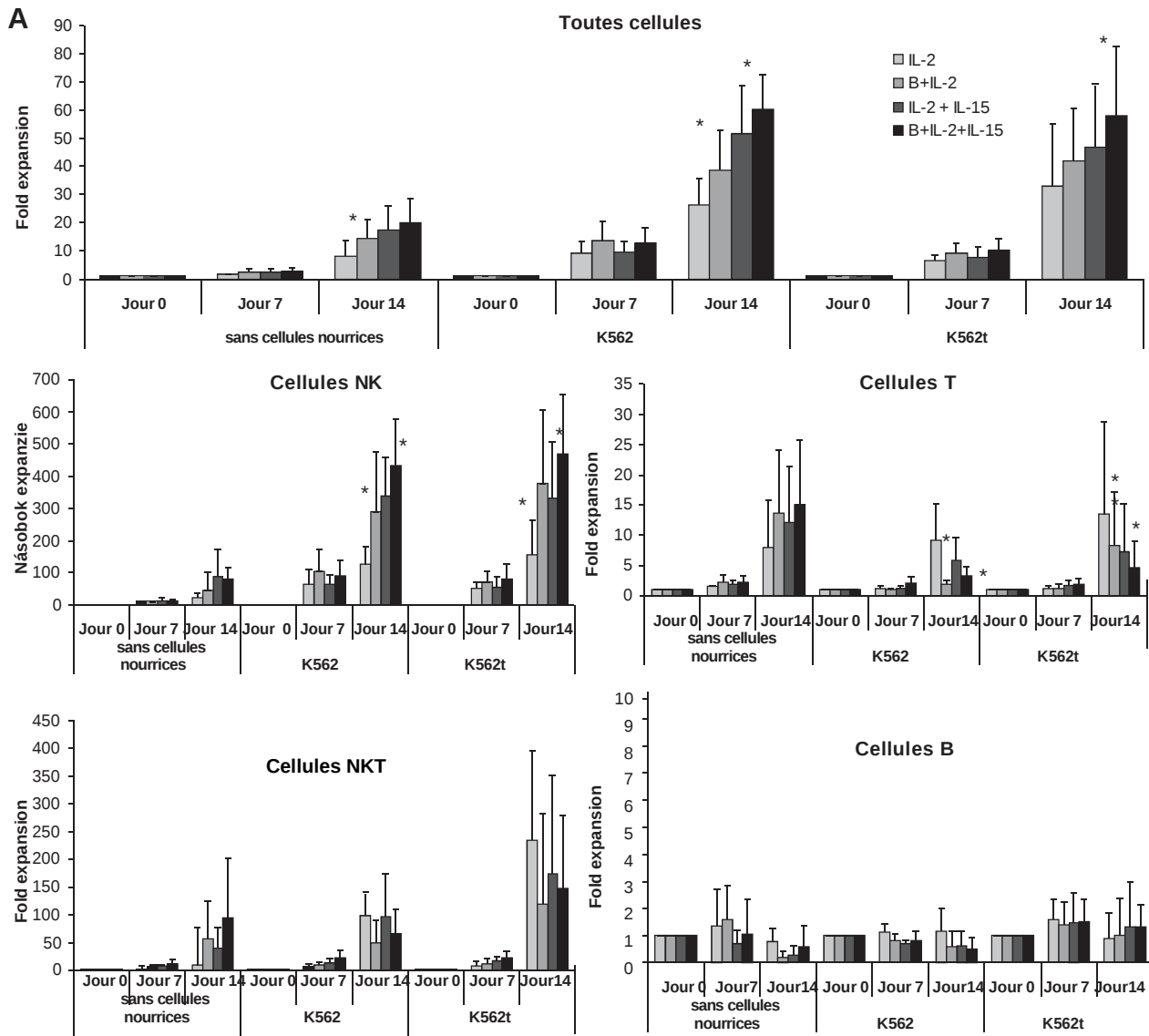


Fig. 5 (A) – Cinétique de toutes les cellules, cellules NK, cellules T, cellules NKT et B obtenues auprès de 5 donneurs en bonne santé après 14 jours de culture d'expansion, avec et sans MGN-3/Biobran et cytokines (IL-2 ou IL-2 + IL-15), ou de coculture avec cellules nourrices irradiées consistant en cellules K562, ou K562-mb15-41BBL. * Résultat significatif du point de vue statistique. (B) – Activité cytotoxique de cellules NK expansées avec addition de MGN-3/Biobran au milieu de culture.

Ces tests ont montré une activité cytotoxique accrue des cellules NK stimulées au LPS par rapport aux cellules NK dormeuses, tandis que la polymyxine B a annulé l'effet de la stimulation au lipopolysaccharide (Fig. 6A). Par contre, l'effet stimulant du MGN-3/Biobran sur l'activité des cellules NK contre le NB1691 n'a pu être enrayé avec la polymyxine B (Fig. 6B). Le mécanisme de stimulation des cellules NK n'est donc pas dû à la contamination du MGN-3/Biobran par le lipopolysaccharide.

Discussion

Les résultats publiés ont démontré que l'utilisation du MGN-3/Biobran dans le traitement du cancer pouvait améliorer les résultats chez certains des patients oncologiques adultes [30,31]. Les recherches cliniques réalisées sur des patients adultes souffrant de carcinome hépatocellulaire ont montré que le taux global de survie

était amélioré par l'addition de MGN-3/Biobran aux thérapies d'intervention telles que chimioembolisation artérielle, injection percutanée d'éthanol, ablation par radiofréquence et cryoablation [21]. Les publications indiquent également que l'addition du MGN-3 stimulait l'immunité innée chez des patients atteints de myélome multiple en faisant accroître l'activité cytotoxique des cellules NK, les niveaux des cellules dendritiques myéloïdes et les concentrations des cytokines liées aux cellules auxiliaires Th-1 [32]. Aucune donnée n'a été publiée jusqu'à présent concernant l'utilisation du MGN-3/Biobran en présence de tumeurs pédiatriques.

Notre étude démontre que la stimulation des cellules NK au MGN-3/Biobran améliore de l'activité cytotoxique *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de diverses lignées cellulaires de tumeurs pédiatriques. Nous avons démontré une activité cytotoxique accrue des cellules NK

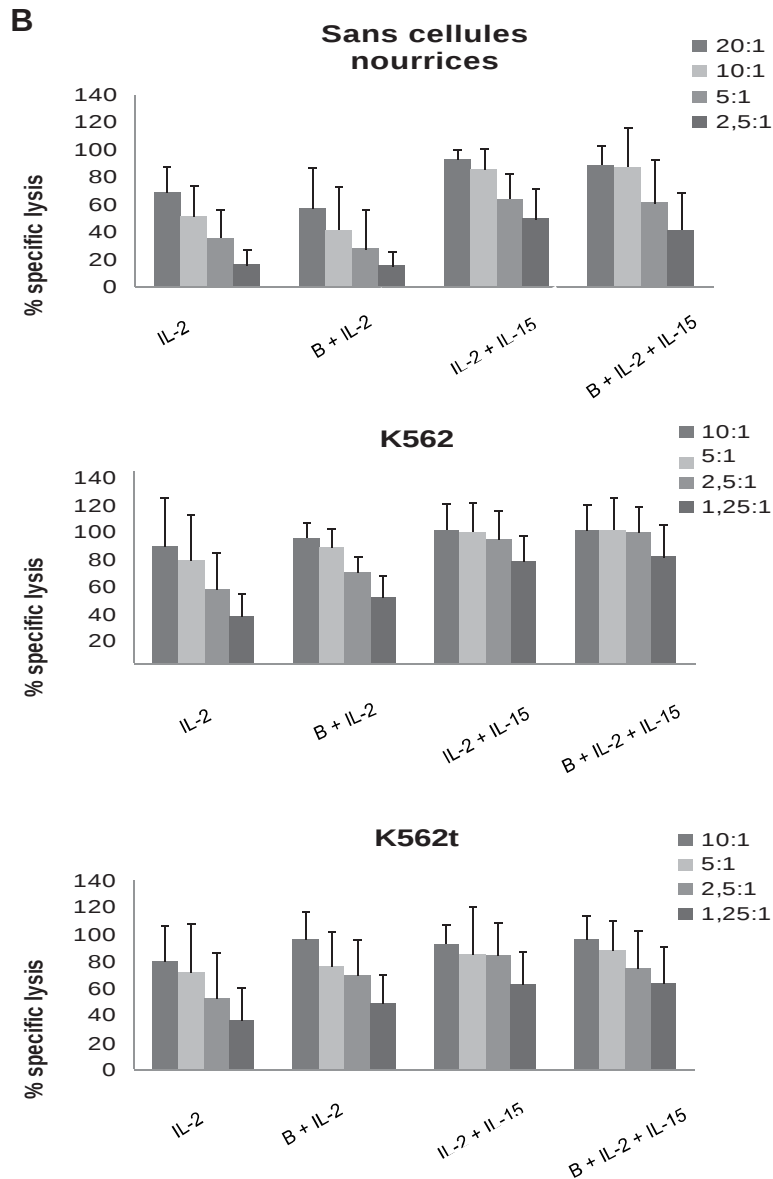


Fig. 5 (suite).

des lignées cellulaires de leucémie aiguë, de neuroblastome, de sarcome d'Ewing, de rhabdomyosarcome embryonnaire et de rhabdomyosarcome alvéolaire *in vitro* après stimulation au MGN-3/Biobran. Nous avons observé par ailleurs une inhibition significative de la croissance de neuroblastome ainsi qu'une amélioration sensible du taux de survie dans le cadre du modèle murin (NOD/scid/IL-2R γ null) avec neuroblastome. Ces données concordent avec celles publiées précédemment portant sur des tumeurs adultes [20-25].

Le mécanisme et la dose de MGN-3/Biobran qui font augmenter l'activité des cellules tueuses naturelles demeurent inconnus. Nous estimons que ce sont divers mécanismes immunitaires qui peuvent être la clé de l'effet bénéfique observé dans le cas des cellules traitées au MGN-3/Biobran. Du fait que de hautes doses de MGN-3/Biobran avaient pour conséquence une modification des macrophages de M0 à M1, avec libération d'IL-6, IL-8 et TNF- α , nous avons utilisé une dose réduite de MGN-3/

Biobran en vue d'éliminer l'activation des cellules NK causée par une inflammation. Sachant que les agonistes de TLR peuvent stimuler les cellules NK humaines, nous avons supposé que la contamination par LPS du MGN-3/Biobran pouvait augmenter la cytotoxicité des cellules NK par signalisation via TLR-4. Dans notre étude nous avons observé une petite quantité de contamination par LPS. Toutefois, la neutralisation du LPS au moyen de la polymyxine B n'a pas annulé l'effet stimulant du MGN-3/Biobran sur l'activité des cellules NK, par conséquent le mécanisme permettant la stimulation des cellules NK par le MGN-3/Biobran n'est pas la contamination par LPS. Selon nos données, il semble que le MGN-3/Biobran active les cellules NK dormeuses mais ne parvient pas à activer les cellules en cours d'expansion avec l'IL-15 bien que l'expansion-même augmente pendant cette phase.

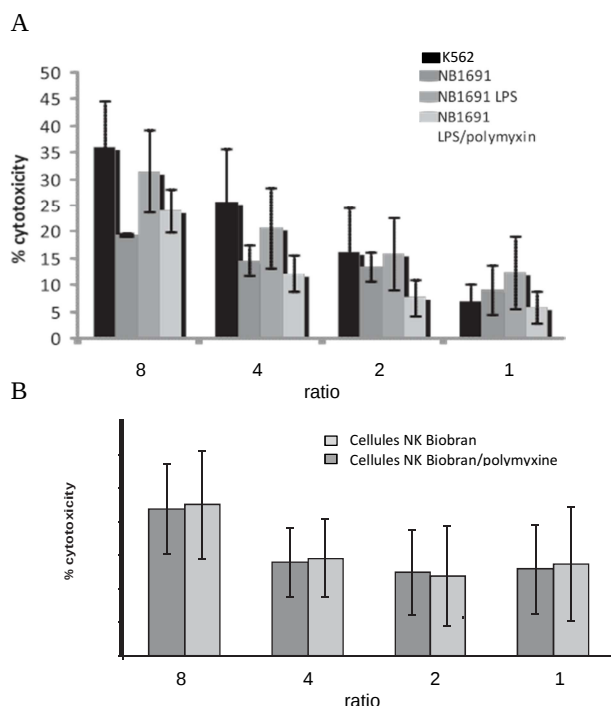


Fig. 6 (A) – La stimulation des cellules NK par LPS accroît la cytotoxicité des cellules NK dormeuses contre le NB1691 tandis que la polymyxine B annule la stimulation par LPS jusqu'à l'état de repos. (B) – Le MGN-3/Biobran stimule les cellules NK contre le NB1691 non antagonisé par polymyxine B.

Ce fait laisse supposer la présence d'un mécanisme qui coïncide en partie avec l'IL-15. Une autre théorie serait un effet apoptotique causé par l'activation des cellules NK libérant les cytokines TNF- α et IFN- γ [30,33]. Cette théorie serait soutenue par les données publiées récemment indiquant que l'addition de MGN-3/Biobran à la chimiothérapie avait un effet synergique, ce dont témoignent notamment l'augmentation de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération des cellules du cancer du sein [34]. Un autre mécanisme possible pourrait être l'augmentation des récepteurs d'activation sur les cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran. Nous avons observé une croissance des récepteurs CD69 et CD25 associés à l'activation sur les cellules NK stimulées au MGN-3/Biobran de donneurs en bonne santé. La croissance du CD69 sur les cellules NK est en corrélation avec l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK [35-37]. Par ailleurs, la croissance de l'expression du CD25 sur les cellules NK laisse supposer un potentiel de prolifération [38]. Et enfin, les rapports publiés font également état d'une interaction du MGN-3/Biobran avec d'autres cellules immunitaires [39,40].

A l'heure actuelle, on utilise le transfert adoptif des cellules NK activées *in vitro* pour le traitement du cancer. Des études récentes ont démontré que les cellules NK pouvaient être expansées en grandes quantités *ex vivo* à l'aide de différentes méthodes y compris en utilisant les lignées K562-mb15-41BBL comme cellules nourrices [28]. Ces cellules NK expansées faisaient preuve d'une activité anticancéreuse *in vitro* sur toute une variété de lignées cellulaires et de cancers adultes et pédiatriques [41-43]. Lorsque le MGN-3/Biobran a été ajouté à divers protocoles d'expansion, nous avons constaté une amélioration de l'expansion

réduction d'activité cytotoxique ainsi qu'une réaction de la prolifération des cellules T. Ces résultats pourraient être importants pour une vaste expansion de cellules NK cliniques fortement cytotoxiques, tout spécialement dans un milieu allogénique où les cellules T devraient être ôtées afin d'éviter la réaction du greffon contre l'hôte. En outre, l'utilisation du MGN-3/Biobran combiné avec une faible dose d'IL-2 a augmenté l'activité cytotoxique des cellules NK dans la même mesure que combiné avec une forte dose d'IL-2. Ces données sont en concordance avec les résultats d'études plus récentes [44]. Autrement dit, le MGN-3/Biobran et une faible dose d'IL-2 agissent par synergie ; une telle approche permet d'éviter les toxicités liées au traitement à forte dose d'IL-2 *in vivo*.

Les données issues d'études portant sur des patients adultes laissent supposer que l'utilisation du MGN-3/Biobran en tant que traitement alternatif ou adjuvant à diverses approches immunothérapeutiques peuvent être bénéfiques dans le cas de traitement de cancers [20,22,24]. Les résultats que nous avons obtenus étendent cette constatation à la population des patients pédiatriques, ainsi que la croissance de l'activité cytotoxique des cellules NK après addition du MGN-3/Biobran contre divers types de tumeurs pédiatriques *in vivo* et contre le neuroblastome *in vivo* en témoigne. Nous avons observé également que l'addition de MGN-3/Biobran augmentait l'expansion/activation des cellules NK et que, en combinaison avec une faible dose d'IL-2, ceci avait un effet bénéfique sur l'activation des cellules NK en vue de la maîtrise immunothérapeutique du neuroblastome. D'autres études sont garanties en milieu clinique pédiatrique dont le but est d'éclaircir le rôle du MGN-3/Biobran en combinaison avec les protocoles immunochimiques.

Remerciements

Nous tenons à remercier la société Daiwa Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japon, pour la fourniture du produit MGN-3/Biobran. Nous remercions le Dr. J. Torres Canizales pour son aide apportée lors des analyses de cytométrie en flux, le Dr. J. Diez Sebastián pour le contrôle statistique et le Dr. Aimee Talleur pour le contrôle de la grammaire anglaise.

Ce travail a été soutenu en partie par la bourse n° FIS PI12/01622 du Service national de la santé espagnol, Fondation de la société espagnole d'hémo-oncologie infantile et Fondation contre le cancer (<http://www.criscancer.org/en/index.php>) accordée à Antonio Pérez-Martínez d'une part, et de la Fondation allemande de lutte contre la leucémie Jose Carreras et de la Fondation allemande de lutte contre le cancer infantile (DKS) accordée à Matthias Pfeiffer d'autre part.

Déclaration d'intérêt : Les auteurs ne possèdent aucune part commerciale, part de propriété ou part financière dans les produits ou les compagnies décrites dans le présent article.