

# LE PB-100, MEDICAMENT ANTICANCEREUX SELECTIF, SUPPRIME L'ACCROISSEMENT DE LA PROLIFERATION DES CELLULES DE GLIOBLASTOME INDUIT PAR L'INTERLEUKINE-6.

Mirko Beljanski et Sylvie Crochet

Cerbiol Application, Centre de Recherche Biologique, "Domaine de la Source", 38370 Saint-Prim, France

**Résumé :** Cytokine multifonctionnelle, l'interleukine-6 (IL-6) agit comme un facteur de croissance sur certains cancers. Les cellules de glioblastome produisent des quantités importantes d'IL-6. Si l'on ajoute de l'IL-6 exogène (pg/ml) au milieu de culture de cellules de glioblastome humain et d'astrocytes normaux (non cancéreux), ces derniers servant de témoins, la cytokine exerce un effet différentiel et dose-dépendant sur ces deux lignées cellulaires. L'accroissement de la prolifération cellulaire est deux fois plus élevé pour les cellules de glioblastome que pour les astrocytes. In vitro, cette stimulation due à l'IL-6 est inhibée de manière dose-dépendante par le PB-100, agent anticancéreux de conception nouvelle, employé à des concentrations de l'ordre du µg/ml. En outre, des concentrations croissantes de PB-100 finissent par provoquer la mort des cellules malignes, sans pour autant entraver la multiplication des astrocytes normaux. Le PB-100 ne supprime pas la production cellulaire d'IL-6, mais l'abaisse jusqu'à son niveau physiologique. Le PB-100 devrait donc trouver sa place dans des traitements où il est nécessaire de contrôler la production d'IL-6.

**Abréviations :** IL-6 : interleukine 6 ; PB-100 : flavopéridine ; ADN : acide désoxyribonucléique.

**Mots clés :** astrocytes, cellules de glioblastome, interleukine 6, alcaloïde PB-100.

**Correspondance :** Dr. M. Beljanski, Cerbiol Application, Centre de Recherche Biologique, Saint-Prim 38370, France.

## Introduction

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine d'importance majeure, aux multiples fonctions. Elle est impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques, dont les uns sont

normaux, comme la régulation de l'hématopoïèse ou l'activation des lymphocytes T et B, mais dont d'autres sont pathologiques, comme l'induction et l'entretien de maladies inflammatoires et autoimmunes ou de la prolifération de certains cancers (1,3). Un grand nombre de cellules de mammifères peuvent produire de l'IL-6, généralement en réponse à divers facteurs d'activation, certains des plus puissants, tant l'IL-1, le TNF et le LPS bactérien (2). Les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes sont d'importants producteurs d'IL-6.

Dans des tumeurs telles que les myélomes (10), les lymphomes ou les plasmocytomes (2), l'IL-6 se comporte en facteur de croissance endogène. Ainsi, la lignée cellulaire SK-MG4, obtenue à partir d'un glioblastome, tumeur cérébrale létale extrêmement fréquente, produit spontanément de l'IL-6. Une grande partie de notre recherche a porté sur l'inhibition in vitro de la prolifération d'une lignée humaine (U 251) de glioblastome résistante au BCNU, et nous avons choisi comme cellules-témoins une lignée d'astrocytes normaux (CRL 1656). Nous avons récemment démontré que notre agent anticancéreux sélectif, le PB-100, inhibe efficacement la multiplication des cellules de glioblastome (5).

Dans le présent travail, en utilisant ces cellules, nous avons d'abord étudié l'accroissement de la multiplication cellulaire induit par l'IL-6 ; cet accroissement est beaucoup plus élevé pour les cellules de glioblastome que pour les astrocytes. Nous avons ensuite démontré que cette activité pouvait être efficacement supprimée par le PB-100.

Les recherches décrites dans cet article ont été faites à la lumière des résultats expérimentaux et des conclusions théoriques auxquels notre étude du processus cancéreux nous a conduits de longue date, et en utilisant les techniques de base qui ont autorisé ces découvertes (7). Il nous faut brièvement résumer ce qui, dans cet ensemble de travaux, concerne plus particulièrement le présent exposé.

Il y a une quinzaine d'années, après avoir comparé un très grand nombre d'ADN cancéreux aux ADN normaux correspondants, nous avons compris que la propriété essentielle de l'ADN cancéreux, celle qui détermine le comportement caractéristique des cellules tumorales, est sa structure secondaire fortement relâchée et déstabilisée. Nous l'avons démontré en mesurant l'absorption du rayonnement ultraviolet de 260 nm par les ADN ; cette absorption augmente à mesure que se rompt, à l'intérieur de la molécule, un nombre croissant des liaisons hydrogène qui relient les deux brins. L'absorption UV des ADN cancéreux est toujours nettement plus forte que celle des ADN normaux. Cette hyperchromicité ressort comme le caractère fondamental de l'ADN cancéreux, s'écartent localement, de façon transitoire, au moment de leur liaisons hydrogène, les brins d'ADN cancéreux restent séparés en permanence en de nombreuses régions et sur de longues étendues. De ce fait, une grande diversité de molécules va avoir accès aux zones dans lesquelles les brins sont isolés, et beaucoup d'entre elles peuvent à leur tour rompre des liaisons hydrogène : pour cette raison, ces molécules peuvent être considérées comme cancérogènes. Leur liste est longue et comprend aussi bien des produits exogènes qu'un certain nombre de substances physiologiques, telles que les hormones stéroïdes.

Dans les régions où les brins d'ADN cancéreux sont séparés, de nouveaux sites d'initiation deviennent désormais accessibles, de façon anarchique, aux enzymes de réplication et de transcription. Cela explique la prolifération accrue et les synthèses protéiques anormales des cellules malignes, l'expression des gènes se trouvant d'autant plus perturbée que certains de ces derniers sont rendus muets par le resserrement des chaînes de part et d'autre des régions distendues (6). Expérimentalement, on observe une nette corrélation entre l'hyperchromicité de l'ADN cancéreux élevée de sa synthèse in vitro et la multiplication accrue des cellules cancéreuses in vitro et in vivo qui en résulte.

Nous avons pu découvrir un certain nombre de substances de provenance naturelle, telles que le PB-100, d'origine végétale, qui sont spécifiquement capables de restabiliser l'ADN cancéreux en ramenant ses brins l'un vers l'autre en position normale pour refermer ses chaînes. La démonstration expérimentale en est apportée par une diminution de l'absorption UV de l'ADN cancéreux ; cette absorption redescend à sa valeur normale, tandis que s'abaissent la réplication in vitro de l'ADN et la multiplication cellulaire in vitro et in vivo.

Il est beaucoup plus difficile d'accéder aux chaînes non relâchées, fermées, de l'ADN normal ; ce dernier est donc bien moins sensible aux agents déstabilisants ou

restabilisants. Toutefois, des cancérogènes présents à fortes doses ou de façon persistante peuvent à la longue surmonter les défenses de la cellule normale et induire finalement un processus malin. Comme nos agents anticancéreux ne peuvent pas se lier à l'ADN normal, ils ne troublent ni sa réplication, ni l'expression de ses gènes et ne sont donc pas toxiques pour les tissus non cancéreux. Comme ils se lient sélectivement à l'ADN cancéreux, ils agissent spécifiquement sur les cellules malignes.

Il nous a semblé que le PB-100 serait un moyen approprié d'inhiber la stimulation de la multiplication des cellules cancéreuses induite par une molécule physiologique comme l'IL-6, sans risquer de déséquilibrer la production de cette cytokine par les cellules normales.

## Matériel et méthodes

Produits : IL-6 : Boehringer-Mannheim (Mannheim, Allemagne). IL-6 EASIA: Medgenix Diagnostics (Fleurus, Belgique). Trypsine, milieu de culture RPMI 1640, sérum de veau foetal, glutamine : Gibco (Grand Island, NY, USA). Autres produits chimiques : Prolabo (Paris, France). Le PB-100 a été purifié dans notre laboratoire.

Lignées cellulaires et méthodes de culture. Lignée cellulaire U 251 de glioblastome humain résistant au BCNU : Swedish Cell Collection (Uppsala, Suède). Lignée astrocytaire normale CRL 1656 Mpf (American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur et entretenues par passage continu en milieu RPMI 1640 addition, de 10% de sérum de veau foetal. Le milieu a été renouvelé trois jours après ensemencement, puis deux fois par semaine. L'absence de mycoplasmes et de bactéries a été vérifiée tous les trois mois. Pour les expériences, un inoculum de  $4 \times 10^4$  cellules de chaque type a été mis en culture dans des plaques à 6 puits (de 9.8 cm<sup>2</sup> chacun). La viabilité cellulaire a été évaluée au bleu trypan : elle atteignait 99-100% au début des expériences.

Inhibition et stimulation de la croissance. Après avoir été stérilisées par filtration, des concentrations croissantes des substances testées (IL-6 et PB-100) ont été ajoutées aux suspensions cellulaires dans les puits. Au bout de 48 h d'incubation, 0,05 ml de trypsine + 0,05% d'EDTA ont été ajoutés dans chacun des puits. Ensuite, après 5 minutes d'incubation, les cellules ont été détachées des plaques de culture. La trypsinisation a été terminée en ajoutant 4 ml de RPMI 1640 neuf dans chacun des puits. Les cellules ont alors été comptées au moyen d'un compteur Coulter.

Chacun des essais, comprenant trois expériences identiques, a été répété trois fois.

Isolément des ADN. Les ADN des cellules de glioblastome U 251 et des astrocytes CRL 1656 ont été isolés et purifiés par la méthode décrite par ailleurs (7). La quantité d'ADN a été déterminée par pesée et par absorption UV à 260 nm, puis la pureté des ADN a été contrôlée par des techniques classiques ( $260/280=2,05$ ) (8). Après incubation avec une solution décinormale de KOH, l'hyperchromicité des ADN était de 45-52%.

Mesure de l'absorption UV des ADN au cours des expériences. L'ADN a été dissous dans du tampon Tris-HCl (0,01M, pH 7,3). Des concentrations croissantes des substances testées, dissoutes dans 10 µl du même tampon, ont été ajoutées à la solution d'ADN et au témoin de lecture. Le mélange a été agité doucement à température ambiante, puis son absorption UV à 260 nm a été mesurée.

Mesure de l'IL-6. Le test immunoenzymatique "Enzyme Amplified Sensitivity ImmunoAssay" (EASIA) est fondé sur le système oligoclonal, qui utilise plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes distincts de l'IL-6. Il est présent, en kit pour emploi sur sérum, plasma sanguin ou milieu de culture.

## Résultats

Effet de l'IL-6 sur la prolifération cellulaire. Dans une première série d'expériences, nous avons montré que la production d'IL-6 par les cellules de glioblastome U 251 atteignait plus de 8 fois celle des astrocytes CRL 1656 ; parallèlement, la croissance des cellules de glioblastome était de 30 à 40% plus forte que celle des astrocytes normaux. Nous avons observé en outre que la cytokine était principalement contenue dans le lysat cellulaire ; le milieu de culture dans lequel baignaient les cellules en renfermait beaucoup moins. Le lysat de cellules de glioblastome contenait cinq fois plus d'IL-6 que le milieu où elles s'étaient développées ; le lysat d'astrocytes contenait quatre fois plus d'IL-6 que le milieu qui les entourait (Tableau I).

Ces observations nous ont conduits à investiguer de plus près les effets de l'IL-6 sur la prolifération in vitro des cellules de glioblastome et des astrocytes. Lorsque de l'IL-6 exogène fut ajoutée au milieu de culture, la multiplication cellulaire augmenta en fonction de la dose de cytokine, mais, en outre, elle s'accrut différemment selon qu'il s'agissait de la lignée cancéreuse ou normale. L'augmentation maximum, induite par 200 pg/ml d'IL-6, atteignait 80% pour les cellules de glioblastome, contre seulement 30-40% pour les astrocytes (Fig. 1). L'élévation maximum de la synthèse in vitro d'ADN, obtenue sous l'effet de 2400 pg/ml

d'IL-6, était de 250% pour l'ADN de glioblastome, mais ne dépassait pas 150% pour l'ADN d'astrocyte (Fig. 2). A ces résultats correspondent les valeurs de l'absorption UV : l'hyperchromicité maximum, induite par la concentration ci-dessus d'IL-6, était de 39% pour l'ADN de glioblastome et de 29% pour l'ADN astrocytaire (Fig. 3).

En étudiant l'activité de multiples substances mitogènes, nous avons régulièrement noté cet écart entre les effets obtenus sur les cellules en culture et sur les ADN isolés (6). Dans la cellule vivante, l'activité des substances mitogènes est limitée par de nombreux processus de régulation physiologique (dont certains sont mentionnés plus loin dans la Discussion), qui mettent en jeu la réponse coordonnée d'un certain nombre d'éléments cellulaires. Aucune régulation de cet ordre ne protège l'ADN isolé, et l'activité directe de la substance mitogène peut donc s'exercer jusqu'à des concentrations beaucoup plus fortes.

### Effet du PB-100 sur la prolifération cellulaire

1) *En l'absence d'IL-6 exogène.* De précédentes expériences, effectuées sans addition d'IL6 exogène, nous avaient montré que des concentrations croissantes de PB-100 inhibent efficacement la prolifération in vitro des cellules de glioblastome : avec 100 µg/ml de PB-100, toutes ces cellules cancéreuses sont tuées.

La multiplication des astrocytes n'est aucunement diminuée; elle augmente même très légèrement, probablement à cause de la présence d'un facteur tel que l'ATP dans le milieu de culture, car le PB-100 n'accroît pas la synthèse d'ADN astrocytaire. En revanche, la synthèse d'ADN de glioblastome est spectaculairement inhibée (Fig. 2). De manière correspondante, le PB-100 supprime l'hyperchromicité de l'ADN de glioblastome, tandis que l'absorption UV de l'ADN d'astrocyte n'est pas modifiée (Fig. 4) (5). Sous l'effet de 12,5 µg/ml de PB-100, la production d'IL-6 par les cellules de glioblastome diminue de dix fois, s'abaissant jusqu'au taux de sa production astrocytaire normale. Dans les mêmes conditions, le nombre de cellules tumorales ne diminue que de 10 à 20%, comme nous l'avions précédemment indiqué (5). Quant à la production astrocytaire d'IL-6, elle n'est pas affectée. Sous l'effet de 25 µg/ml de PB-100, la production de la cytokine par les cellules de glioblastome n'évolue pratiquement plus, tandis que celle des astrocytes diminue légèrement, la quantité totale d'IL-6, tant désormais également répartie entre les cellules et le milieu de culture (Tableau I).

2) *En présence d'IL-6 exogène.* Des effets inhibiteurs comparables sont obtenus en présence d'IL-6 exogène. Le PB-100 provoque

Table I. Production d'IL-6 endogène par des lignées de cellules de glioblastome humain (U 251) et d'astrocytes normaux (CRL 1656)

|                          | IL-6 pg/ml |          |
|--------------------------|------------|----------|
|                          | U 251      | CRL 1656 |
| Milieu cellulaire témoin | 58,33      | 8        |
| Lysat cellulaire témoin  | 296,66     | 35       |
| + PB 100 12,5 µg/ml      |            |          |
| Milieu de culture        | 12         | 7,5      |
| Lysat cellulaire         | 24,5       | 35,5     |
| + PB 100 25 µg/ml        |            |          |
| Milieu de culture        | 14         | 17       |
| Lysat cellulaire         | 23         | 16,5     |

Les lignées de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251) et d'astrocytes normaux (CRL 1656) ont été cultivées pendant 48 h à 37°C. Le milieu de culture (2 ml) a été séparé des cellules et 0,1 ml a servi à la mesure de l'IL-6. Les cellules de chaque espèce (10<sup>7</sup> par puits) ont été traitées à la trypsine, lavées dans une solution tampon (HBSS), centrifugées et remises en suspension dans 2 ml de Tris-HCl, pH 7,5. Une solution de sulfate de lauryle (0,15 ml de solution à 20%) a été employée pour lyser les cellules et 0,1 ml de lysat a été utilisé pour la mesure de l'IL-6 au moyen du kit Medgenix (voir Méthodes). Les résultats représentent les moyennes de trois expériences séparées. (U 251: DS ± 7,49 ; CRL 1656: DS ± 4,58)

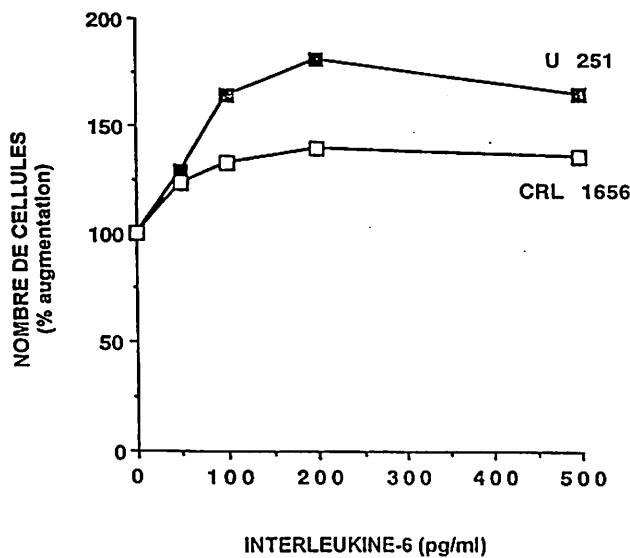


Figure 1. Les lignées d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251) ont été cultivées en l'absence et en présence des concentrations indiquées d'interleukine-6. Le nombre de cellules (% d'augmentation) représente les moyennes de trois expériences séparées. (U 251: DS ± 5,09 ; CRL 1656: DS ± 4,36)

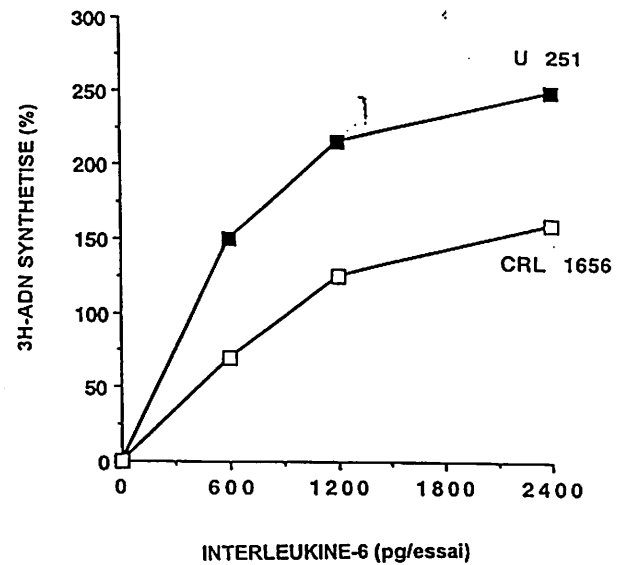


Figure 2. Effet de l'IL-6 sur la synthèse in vitro d'ADN isolé à partir de lignées d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251). La synthèse d'ADN a été évaluée d'après l'incorporation de 3H-TTP dans le matériel précipitable en milieu acide, comme décrit par ailleurs (5). Les résultats représentent les moyennes de trois expériences séparées. (U 251: DS ± 9,35 ; CRL 1656: DS ± 13,77)

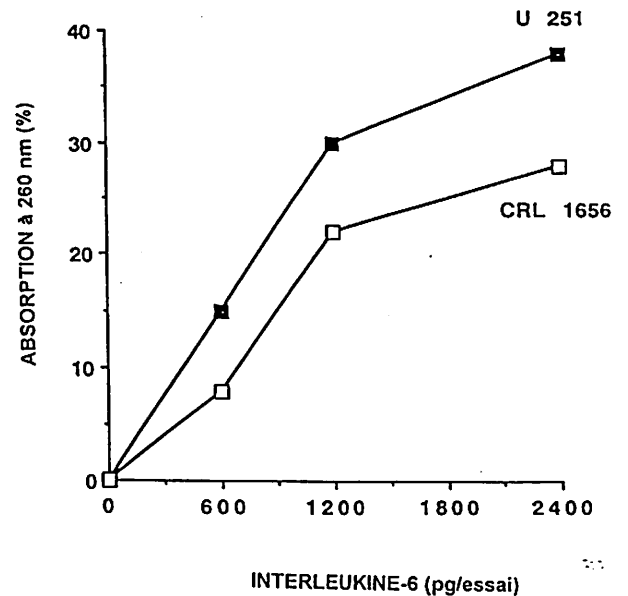


Figure 3. Effet de l'interleukine-6 sur l'absorption UV des ADN isolés à partir de lignées d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251). L'ADN (10 µg) a été dissous dans une solution tampon de Tris-HCl, pH 7,3. Les substances testées, dissoutes dans 1 ml du tampon, ont été ajoutées à la solution témoin et à la solution d'ADN, qui ont été agitées doucement à température ambiante. L'absorption UV à 260 nm a ensuite été mesurée pour chacune des différentes concentrations d'IL-6. Les résultats représentent les moyennes de trois expériences séparées. (U 251: DS ± 3,27 ; CRL 1656: DS ± 1,36)

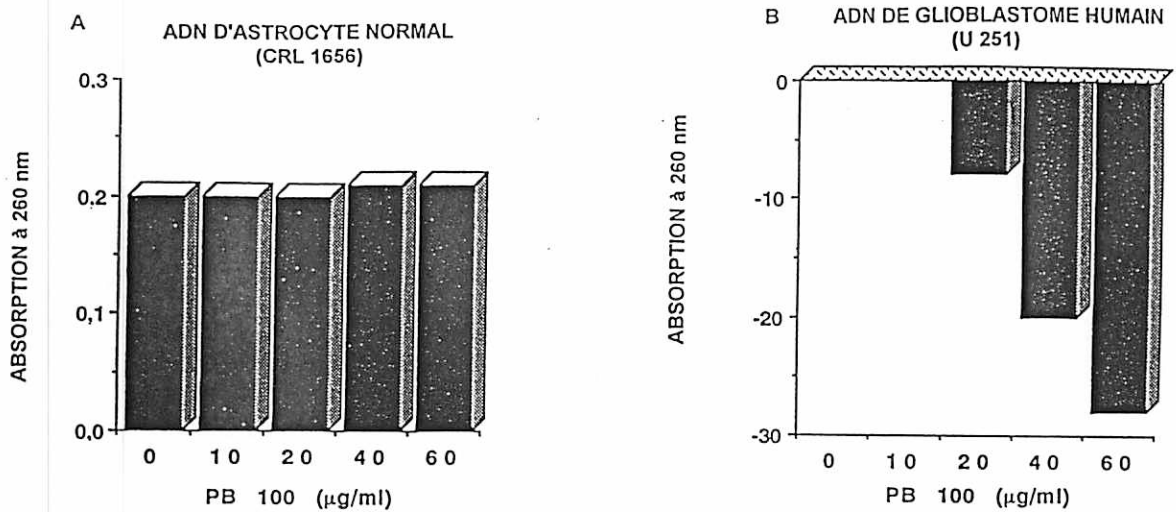


Fig. 4: Effet du PB-100 sur l'absorption UV à 260 nm d'ADN isolé à partir de lignées d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251) (5). Voir légende de la Fig. 3.

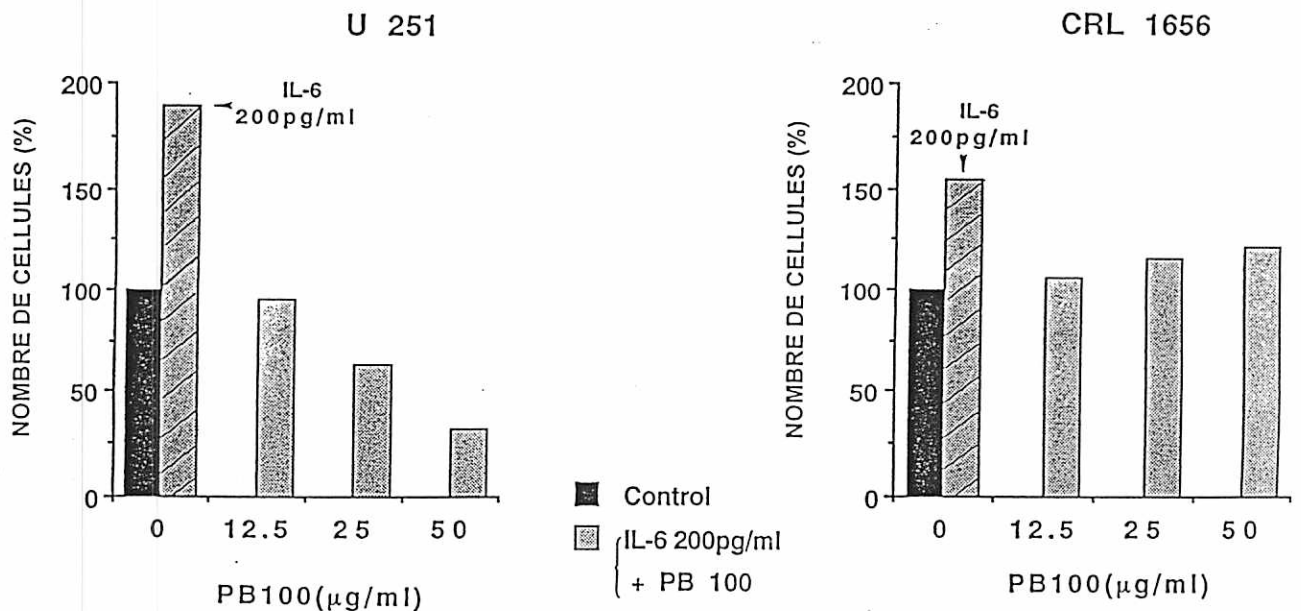


Fig. 5. Les lignées d'astrocytes normaux (CRL 1656) et de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251) ont été cultivées pendant 48 h en l'absence et en présence d'IL-6, ajoutée soit seule (témoins), soit avant des concentrations croissantes de PB-100. Au bout de 48 h, les cellules ont été traitées à la trypsine et comptées. Les résultats représentent les moyennes de trois expériences séparées et sont exprimés en pourcentage de la variation du nombre de cellules. (U 251: DS  $\pm$  2,89 ; CRL 1656: DS  $\pm$  3,48)

une diminution dose-dépendante de la stimulation exercée par l'IL-6 sur la multiplication cellulaire. Comme l'indique la Fig. 5, 12,5 µg/ml de PB-100 suppriment l'action stimulante qu'exerce l'IL-6 à la fois sur la prolifération des cellules de glioblastome et sur celle des astrocytes ; 50 µg/ml de PB-100 diminuent ensuite de 75% le nombre des cellules malignes, tandis que celui des astrocytes augmente très légèrement. De façon correspondante, en utilisant pour chaque expérience 20 µg de PB-100 et 2400 pg d'IL-6 (c'est-à-dire la dose de cytokine qui augmente

le plus fortement l'hyperchromicité de l'ADN isolé), l'hyperchromicité de l'ADN de glioblastome est largement supprimée, tandis que l'absorption UV de l'ADN astrocytaire demeure légèrement supérieure à la normale, indiquant ainsi que la dose de PB-100 utilisée, tout en inhibant activement la réplication de l'ADN tumoral, ne supprime pas totalement la stimulation des cellules normales par l'IL-6 ; c'est là, en fait, une condition nécessaire pour que l'IL-6 puisse conserver son activité physiologique (Figs. 6 et 7).

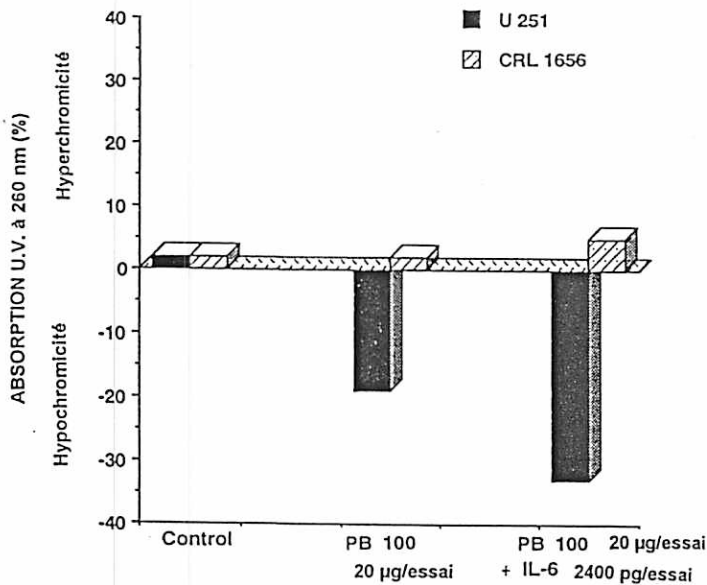


Figure 6. L'absorption des UV de 260 nm par les ADN de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251) et d'astrocytes normaux (CRL 1656) a été mesurée en l'absence (témoins) et en présence de PB-100 seul, puis de PB-100 et d'IL-6. Les résultats représentent les moyennes de trois expériences séparées.

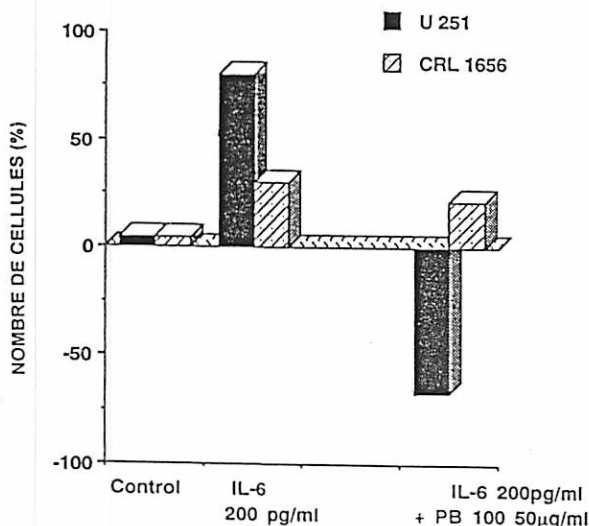


Figure 7. Effet du PB-100 sur la multiplication de cellules de glioblastome humain résistant au BCNU (U 251) et d'astrocytes normaux (CRL 1656). Les cellules ont été cultivées en l'absence (témoins) et en présence d'IL-6 pendant 48 h à 37°C. Les résultats expriment la variation du nombre de cellules (%). (U 251: DS ± 9,53 ; CRL 1656: DS ± 5,95).

## Discussion

Cette recherche avait un double objectif. En premier lieu, nous voulions étudier l'activité de l'interleukine-6 en tant que facteur de croissance des cellules de glioblastome. Ensuite, nous désirions voir dans quelle mesure il serait possible, au moyen de notre médicament anticancéreux sélectif et non toxique, le PB-100, de supprimer

l'accroissement de la multiplication des cellules cancéreuses induit par l'IL-6. Cette recherche a été effectuée in vitro en utilisant la lignée cellulaire humaine U 251 provenant d'un glioblastome résistant au BCNU et la lignée astrocytaire normale CRL 1656, choisie comme témoin normal correspondant.

Les données expérimentales présentées dans cet article, tout en confirmant le fait que les cellules de glioblastome sont des productrices d'IL-6 beaucoup plus actives que les astrocytes normaux, démontrent deux faits : 1) l'addition d'IL-6 exogène au milieu de culture cellulaire augmente de manière différentielle et dose-dépendante le nombre des cellules tumorales ainsi que celui des cellules non cancéreuses ; et 2) l'anticancéreux sélectif PB-100 supprime efficacement cette activité stimulante due à l'IL-6, sans empêcher la cytokine de jouer son rôle physiologique dans les cellules normales.

Il est bien connu que les cytokines peuvent se comporter "comme des anges ou des démons" et l'IL-6 ne fait pas exception. Elle a des activités bénéfiques, comme la capacité de promouvoir les défenses immunitaires à différents niveaux (1,2,9) ou de favoriser la différenciation des cellules souches des plaquettes sanguines et des cellules nerveuses ; mais elle est également un facteur de croissance pour certains cancers du sang (2) tels que les lymphomes T ou B, les myélomes et les plasmocytomes (10).

Dans les cellules humaines U 251, obtenues à partir d'une tumeur cérébrale hautement maligne, le glioblastome, nous avons détecté une production significative d'IL-6, qui leur permet de proliférer de manière autocrine. Notre travail indique que la presque totalité de la cytokine se trouve à l'intérieur des cellules (où elle se comporte vraisemblablement en facteur de croissance autocrine), les quantités libérées dans le milieu de culture, tant de 3 à 4 fois plus faibles. Quant aux astrocytes témoins, ils contiennent des quantités plus modestes, physiologiques, d'IL-6, soit 40 à 50 pg/ml. La mesure de l'absorption UV à 260 nm confirme également que celle-ci est plus forte (hyperchromicité) pour l'ADN de glioblastome que pour l'ADN d'astrocyte, ce qui est le cas pour tous les ADN cancéreux que nous avons comparés aux ADN normaux correspondants durant plus de 15 années de recherche à ce sujet (voir l'Introduction).

Pour mieux connaître l'activité de l'IL-6, il nous fallait étudier les effets de l'addition de cytokine exogène. En ajoutant des concentrations croissantes d'IL-6 au milieu de culture cellulaire, la prolifération des cellules, malignes aussi bien que normales, a augmenté. Le plus fort accroissement de la multiplication des cellules de glioblastome, provoqué par 200 pg/ml de cytokine, a atteint le double de celui des astrocytes (l'augmentation était

respectivement de 80% et de 30-40%). Obtenues avec 2400 pg/ml d'IL-6, l'élévation maximum de la synthèse in vitro d'ADN, respectivement de 250% et de 150%, et l'hyperchromicité maximum de l'ADN, de 39% et de 29%, évoluaient de façon semblable.

Ces résultats appellent plusieurs remarques. La première concerne le mode d'action de l'IL-6. Elle se lie à un récepteur à la surface de la cellule ; ce dernier, qui a été cloné et séquencé, est constitué de deux glycoprotéines, dont l'une porte un site de liaison pour une protéine G (2). Il est donc admis que l'IL-6 agit par l'intermédiaire d'un second messager.

Au cours de nos travaux, nous avons montré, dans des essais sur l'ADN isolé, que l'IL-6 elle-même peut se lier in vitro à la molécule déstabilisée de l'ADN cancéreux, dans laquelle la cytokine poursuit la cassure des liaisons hydrogène, comme en atteste l'augmentation de l'hyperchromicité. D'après les conclusions de nos recherches précédentes (voir l'Introduction), il s'agit là d'une activité "cancérogène-like", pour ne pas dire cancérogène. L'augmentation parallèle de la prolifération des cellules de glioblastome en apporte la confirmation.

La seconde remarque concerne le degré d'activité de l'IL-6 observé dans nos expériences. L'augmentation de 80% de la multiplication des cellules de glioblastome, sous l'effet de quantités de cytokine bien au-dessus de leur niveau physiologique (lequel ne dépasse pas 40-50 pg/ml), doit être considérée comme une réponse modérée. Cette relative faiblesse peut s'expliquer de plusieurs façons. D'une part, la capacité de réponse des cellules de glioblastome à l'IL-6 exogène pourrait être partiellement saturée, en raison de la forte activité autocrine de l'IL-6. D'autre part, dans certaines cellules, telles que les hépatocytes, la présence d'IL-6 diminue le nombre de ses récepteurs membranaires (2). Un processus similaire se produit peut-être à la surface des cellules de glioblastome ; en outre, l'expression des récepteurs est peut-être déjà limitée en raison de la production endogène d'IL-6.

Or, l'addition d'IL-6 exogène agit également, bien que deux fois moins, sur les astrocytes. N'étant pas cancéreuses, ces cellules ne devraient répondre que très faiblement à l'activité "cancérogène-like" de la cytokine. Cependant, la relation entre l'IL-6 et les astrocytes est complexe : c'est celle d'un médiateur physiologique et de ses cellules-cibles. Non seulement les astrocytes portent des récepteurs de l'IL-6 à leur surface, propriété qu'ils partagent avec de nombreuses autres espèces cellulaires de mammifères, mais, en outre, on sait qu'ils produisent eux-mêmes cette cytokine (11). Ils ne sont plus considérés comme de simples cellules nourricières des neurones. On constate aujourd'hui qu'ils jouent

un rôle dans divers processus fondamentaux, tels que le développement du système nerveux central, le métabolisme de certains neuromédiateurs et même la défense immunitaire du cerveau (12) ; dans ce dernier domaine, quelques-unes de leurs activités évoquent celles des monocytes/macrophages, importants producteurs d'IL-6. L'IL-6 synthétisée par les astrocytes semble avoir une activité autocrine, du moins en ce qui concerne la stimulation qu'elle exerce sur la libération du facteur de croissance des nerfs (NGF) par ces cellules (11). On peut donc s'attendre à ce que les astrocytes se comportent comme des cellules-cibles soumises à l'activité physiologique normale de l'IL-6. Etant en quelque sorte destinés à répondre à de faibles variations de la quantité d'IL-6, les astrocytes devraient être particulièrement sensibles à cette cytokine, même au niveau de leur ADN. Il faut se rappeler que, de façon semblable, d'autres composés physiologiques, comme, par exemple, les hormones stéroïdes, deviennent cancérogènes pour leurs cellules-cibles lorsqu'ils sont présents en quantités excessives ou simplement en proportions mal équilibrées. De fait, nous avons montré que cet effet bien connu des hormones stéroïdes s'accompagne d'une augmentation de l'hyperchromicité de l'ADN des cellules-cibles (7). Il faut donc savoir que des quantités excessives d'IL-6 n'accroissent pas seulement la prolifération des cellules de glioblastome, mais également celle des astrocytes normaux ; cela signifie que l'IL-6 est potentiellement cancérogène pour ces derniers. Une production accrue d'IL-6 par les cellules de glioblastome peut affecter les astrocytes voisins, de même qu'une production accrue d'IL-6 par les astrocytes peut présenter divers dangers (voir plus loin). Il ne faut pas non plus oublier que les cytokines sont intégrées à des réseaux d'activités auxquels appartiennent de nombreuses autres cytokines, chacune subissant l'influence des autres.

Le PB-100, anticancéreux non toxique d'origine végétale (c'est un alcaloïde de la classe des beta-carbolines) supprime de façon dose-dépendante l'accroissement de la prolifération cellulaire in vitro que provoque l'IL-6. Sous l'effet de 12,5 µg de PB-100/ml, a) la forte production d'IL-6 endogène par les cellules de glioblastome s'abaisse jusqu'à redevenir normale, c'est-à-dire qu'elle diminue d'environ 90% (Tableau I) ; b) l'augmentation de la prolifération des cellules de glioblastome induite par 200 pg d'IL-6 exogène/ml est totalement supprimée ; c) dans les astrocytes témoins, la production physiologique d'IL-6 endogène n'est pas affectée ; d) la prolifération des astrocytes induite par 200 pg d'IL-6 exogène/ml est supprimée (Fig. 5, Tableau I). Lorsqu'on utilise 50 µg de PB-100/ml en présence de 200 pg d'IL-6 exogène/ml, 75% des cellules de glioblastome sont tuées, tandis que la

multiplication des astrocytes augmente faiblement (Fig. 5). Parallèlement, et avec les mêmes concentrations de produits, l'hyperchromicité de l'ADN de glioblastome est supprimée par le PB-100, mais l'absorption UV de l'ADN d'astrocyte demeure légèrement supérieure à la normale (Fig. 6).

Les recherches en cours dans notre laboratoire indiquent que l'entrée de la petite molécule de PB-100 dans la cellule ne dépend pas d'un récepteur ; la compétition avec l'IL-6 n'a donc pas lieu au niveau d'un récepteur. L'une des régions de l'ADN dans lesquelles le PB-100 corrige la séparation anarchique des brins contient sans doute le gène de l'IL-6.

Le PB-100 forme un complexe avec l'ADN de glioblastome (6), mais ne se lie à l'ADN d'astrocyte que dans la mesure où ses chaînes ont été anormalement ouvertes par l'IL-6 exogène. Si l'on ajoute le PB-100 au milieu de culture avant l'IL-6 exogène, il inhibe la stimulation de la prolifération tumorale par la cytokine, parce que les chaînes de l'ADN de glioblastome sont fermées préventivement par l'anticancéreux. Ainsi, le PB-100 ne fait pas que supprimer la production excessive d'IL-6 par les cellules de glioblastome ; il les empêche également de répondre à l'activité stimulante de la cytokine, qu'elle soit endogène ou exogène. De plus, à mesure que les concentrations (en µg/ml) de l'anticancéreux augmentent, les cellules malignes ne peuvent plus survivre, car leur multiplication et leur métabolisme dépendaient de sites d'initiation anormalement exposés par la séparation des brins (voir l'introduction) et que le PB-100, en refermant les chaînes, les rend désormais inaccessibles. Dans le cas des astrocytes, nos résultats montrent que le PB-100 diminue la réceptivité de leur ADN à des quantités excessives d'IL-6, mais n'altère ni leur production physiologique de la cytokine, ni leur multiplication normale (Tableau I, Fig. 5).

Ces données indiquent non seulement que le PB-100 représente un bon candidat pour le traitement du glioblastome, mais qu'il pourrait servir à contrôler les effets et la production de l'IL-6 dans d'autres cas aussi. L'IL-6 est impliquée dans bien d'autres maladies que le cancer (14). Elle est présente dans diverses affections liées à une prolifération cellulaire non cancéreuse (kératinocytes dans le psoriasis, cellules mésangiales dans certaines glomérulonéphrites) et dans des maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux. L'IL-6 est largement présente dans les maladies inflammatoires : exemple frappant, il a été rapporté que le liquide synovial des patients atteints d'arthrite rhumatoïde peut contenir des quantités d'IL-6 de 10 à 1000 fois supérieures à la normale (15, 16, 17) ; les synoviocytes et chondrocytes endommagés contribuent à leur tour à la production d'IL-6.

L'IL-6 augmente également dans les liquides biologiques au cours des maladies infectieuses et en particulier au cours de l'infection par le virus du sida (VIH). Il a été démontré que l'IL-6 et le TNF-alpha stimulent la multiplication du VIH (18). Il a été suggéré que l'IL-6 libérée par les lymphocytes B activés pouvait réactiver le VIH à l'intérieur des monocytes (2). En outre, l'inflammation de la barrière hématoencéphalique peut faciliter l'infection du cerveau par le VIH et par d'autres pathogènes. Des observations récentes ont montré que les monocytes/macrophages de patients infectés par le VIH produisaient de fortes quantités d'IL-6. In vitro, environ 80% de cette production peut être supprimée par le PB-100 (Pr. J. Cahn, communication personnelle) ; ainsi la synthèse de cytokine demeure-t-elle suffisante pour assurer son rôle physiologique.

L'on peut espérer que le PB-100 trouvera sa place en thérapeutique chaque fois qu'une production excessive d'IL6 se trouve impliquée.

## Références

1. LEVY Y, FERNAND JP, BROUET JC : Differential effects of low and high concentrations of interleukin-6 on human B cells. Eur J Immunol 20 : 2389-2393, 1990.
2. CAVAILLON JM, L'interleukine-6. In : Les cytokines. Cavaillon JM (ed) Paris, Masson, pp183-196, 1993.
3. KLEIN B, ZHANG ZX, JOURDAN M, CONTENT J, HOUSSIAU F, AARDEN L, PIECHACZYK M, BATAILLE R : Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. Blood 73 : 517-526, 1989.
4. FALUS A : Interleukin-6 biosynthesis is increased by histamine in human B-cell and glioblastoma cell lines. Immunology 78 : 193-196, 1993.
5. BELJANSKI M, CROCHET S, and BELJANSKI MS : PB-100 : a potent and selective inhibitor of human BCNU resistant glioblastoma cell multiplication. Anticancer Res 13 : 2301-2308, 1993.
6. BELJANSKI M, CROCHET S : Differential effects of ferritin, calcium, zinc, and gallic acid on *in vitro* proliferation of human glioblastoma cells and normal astrocytes. J Lab Clin Med 123 : 547-555, 1994.

7. BELJANSKI M, BOURGAREL P, BELJANSKI MS : Correlation between *in vitro* DNA synthesis, strand separation and *in vivo* multiplication of cancer cells. *Expl Cell Biol* 49 : 220-231, 1981.
8. HOTCHKISS RD : Methods for characterization of nucleic acids I. Characterization of nucleic acids by spectrophotometry. In : *Methods in Enzymology*. Colowich SP and Kaplan NO (eds.), New-York, Academic Press, pp708-717, 1957.
9. PAROLI M, CARLONI G, ALFANI E, DE PETRILLO G BARNABA V : Interleukin-6 production by human hepatoma lines is related to a low degree of cell differentiation. *Res Virol* 144 : 323-326, 1993.
10. RUSSEL LL : Myeloma : the role of interleukin-6. *J of the Royal Society of Med* 86 : 488-490, 1993.
11. BENVENISTE EN, SPARACIO SM, NORRIS JG, GRENETT HE FULLER GM : Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J of Neuroimmunol* 30 : 201-212, 1990.
12. MALLAT M., CHAMAK B. and THERY C. Les macrophages cérébraux : rôle dans les remaniements morphologiques et la dégénérescence des neurones. *Médecine/Sciences* 7 : 768-774, 1991.
13. KIMELBERG H, NOREMBERG M : Les astrocytes. *Pour la Science* 140 : 78-89, 1989.
14. VILCEK J, LE J : Immunology of cytokines : an introduction. In : *The cytokine handbook*. Thomson A (ed.), New-York, Academic Press 1-17, 1989.
15. BHARDWAJ N, SANTHANAM U, LAU LL, TATTER SB, GHRAYED J, RIVELIS M, STEINMAN RM, SEGHAL PB, MAY LT : IL-6/IFN- $\beta_2$  in synovial effusion of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *J Immunol* 143 : 2153-2159, 1989.
16. GUERNE PA, ZURAW BL, VAUGHAN JH., CARSON DA, LOTZ M : Synovium as a source of interleukin-6 *in vitro*. Contributions to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest* 83 : 585-592, 1989.
17. WAAGE A, KAUFMANN C, ESPEVIK T, HUSBY G : Interleukin-6 in synovial fluid from patients with arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 50 : 394-398, 1989.
18. POLI G, FAUCI AS : The role of monocytes / macrophages and cytokines in the pathogenesis of HIV infection. *Pathobiology* 602 : 246-251, 1992.