

RAPPORT DE RECHERCHES :
Augmentation Synergétique de la Prolifération des Cellules
Souches Humaines par des Nutraceutiques.

Traduit de l'Américain par Jacques Prunier.

Ce document est la propriété de « ISIS GARDEN Ltd. » U.K.

Toute utilisation totale ou partielle doit faire l'objet d'un accord écrit de « Isis Garden Ltd »

SOURCE :

**Paula c. Bickford,^{1,2} jun tan,¹ r. Douglas shytle,¹ cyndy d. Sanberg,³ nagwa el-badri,¹
et Paul r. Sanberg¹**

Résumé

Une alternative viable au greffe de cellules souches serait de concevoir une approche qui stimulerait les cellules souches endogènes à promouvoir leur régénération. Plusieurs composés naturels ont montré un effet curatif ; cependant, les effets de ces composés sur les cellules souches n'ont pas encore été évalués. Nous rapportons ici les effets de nombreux de ces composés naturels dans la prolifération de la moelle osseuse humaine et des cellules humaines de type CD34 et CD133. Un effet lié aux doses de myrtille, de thé vert, de catéchine, de carnosine et de vitamine D3 a été observé sur la prolifération des cellules souches de moelle osseuse humaine en comparaison avec le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages humains (hGM-CSF). Nous avons, par ailleurs, démontré que les combinaisons de nutriments ont produit un effet synergique pour promouvoir la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques humains. Cela démontre que les nutriments peuvent agir dans la recherche de la guérison, par une interaction avec la population de cellules souches.

INTRODUCTION

Les cellules souches se trouvent dans plusieurs organes de l'être humain adulte, comme la moelle osseuse, le sang périphérique, le sang du cordon ombilical, la rate, la pulpe dentaire et le cerveau. Ces cellules progénitrices sont l'objet de recherches pour démontrer leur potentiel d'utilisation en tant que tissus greffés dans le traitement de maladies comme le cancer, les diabètes, les arrêts cardiaques, la sclérose latérale amyotrophique (ALS), et la maladie de Parkinson. Cependant, très peu d'efforts se concentrent sur l'augmentation des cellules souches endogènes adultes comme un moyen de promouvoir la guérison.

Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) ont été l'objet d'investigations depuis plusieurs années déjà pour leur utilité dans les traitements du cancer. Des études expérimentales sur l'hématopoïèse et des approches plus cliniques pour corriger ses défaillances se sont concentrées sur l'activité de la cytokine. Les cytokines modulent l'hématopoïèse en maintenant l'auto régénération de cellules souches et en stimulant la prolifération et la maturation de cellules progénitrices compétentes qui sont indispensables à la substitution permanente de cellules sanguines matures (1-3).

Il a été constaté *in vitro*, que des combinaisons variées de cytokines comme les interleukines (IL-1, IL-3, IL-6), du facteur de croissance des cellules souches (SCF), et d'érythropoïétine (EPO), soutenaient la croissance de cellules progénitrices multipotentes (4,5). Individuellement, le facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) et d'EPO sont, respectivement, des facteurs de croissance pour les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes compétents (6). Médicalement, le G-CSF et l'EPO offrent un traitement effectif pour la neutropénie et l'anémie (7,8) et sont utilisés pour augmenter les progéniteurs de sang périphérique comme une alternative aux greffes de la moelle osseuse pour les patients atteints de cancer. Cependant, de tels traitements sont coûteux et ne sont pas sans risques.

Bien que des traitements potentiellement meilleurs sont en développement, très peu d'études se sont intéressées aux effets de produits naturels, vitamines, et autres nutriments qui peuvent gérer le renouvellement des cellules souches. Cependant, l'intérêt porté aux effets provenant de déficiences alimentaires sur les réponses immunitaires et hématopoïétiques, a considérablement augmenté lors de ces dernières années. Le folate, la vitamine B12, et le fer jouent des rôles cruciaux pour l'érythropoïèse. Les érythroblastes nécessitent du folate et de la vitamine B12 pour la prolifération pendant leur période de différenciation. Un apport insuffisant en folate ou vitamine B12 inhibe la synthèse de purine et thymidylate, ce qui altère la synthèse de l'ADN, et provoque l'apoptose érythroblaste, résultant en une anémie à cause d'une défaillance érythropoïétique (9). Récemment, d'autres études ont montré que les acides gras alimentaires, en particulier l'acide oléique et linoléique, participent activement à la prolifération de cellules souches hématopoïétiques (10,11) tout en régulant le renouvellement de cellules épithéliales intestinales (12).

La Vitamine D a également reçu une attention accrue depuis ces dernières années, d'une part, parce que des études récentes suggèrent que presque la moitié de la population des Etats-Unis serait déficiente en vitamine D (13). Des recherches récentes en laboratoire ont démontré que la vitamine D₃ a un effet conséquent sur la stimulation de la prolifération de différentes formes de cellules progénitrices multipotentes, en particulier celles liées au système immunitaire (14). La recherche sur la sénescence cellulaire (la fin du cycle de vie des cellules en division) suggère que la carnosine, nutriment alimentaire présent dans les muscles et le cerveau des mammifères, a une capacité remarquable de

régénérer les cellules qui approchent de la sénescence, en restaurant leur apparence normale et allongeant la durée de vie cellulaire (15,16).

De plus, d'autres études suggèrent que des suppléments alimentaires en compléments d'aliments riches en antioxydants, comme la myrtille, peuvent prévenir et même convertir des paramètres cellulaires et comportementaux qui déclinent avec l'âge (17,18). Par exemple, un supplément alimentaire qui présente 2% d'extrait de myrtille a produit des effets neuroprotecteurs et neuro-régénérateurs chez des animaux âgés, peut-être comme le résultat d'une modulation des réactions en cascade des cellules (19). En outre, il a été démontré que l'extrait de myrtille accroît la neurogenèse de cerveaux de rats âgés (20).

Le thé vert est une boisson faite à partir des feuilles séchées et laissées en infusion d'un arbuste d'origine asiatique, la *Camellia sinensis*. Le thé vert a été largement consommé au Japon, en Chine, et dans d'autres pays d'Asie pour ses vertus pour la santé depuis au moins 3000 ans. Récemment, les scientifiques ont commencé à étudier ses effets sur la santé des animaux, en laboratoire et par l'observation chez les humains. Bien qu'il a été montré que des éléments actifs parmi l'extrait de thé vert ont inhibé le développement d'un bon nombre de lignées de cellules tumorales, ils n'affectent pas la croissance des cellules normales à des concentrations similaires (21,22) et peuvent même offrir une protection cellulaire au vieillissement (23).

A la lumière de telles découvertes décrites ci-dessus, il semble que certains nutriments, vitamines et flavonoïdes peuvent avoir un rôle important dans le maintien du renouvellement des cellules souches et sur la stimulation de la prolifération et différenciation de progéniteurs compétents requis pour le remplacement continu de cellules en maturité dans le sang, le cerveau et autres tissus. Par ailleurs, il serait possible d'utiliser certains produits naturels, seuls ou synergiquement, pour le traitement des cas où le remplacement des cellules souches semble être compromis.

Ainsi, l'objet de cette étude a été d'analyser les propriétés de différents composés naturels et leur capacité à stimuler la prolifération de HSCs humaines. Nous avons examiné les effets de composés naturels dans les cellules de la moelle osseuse, CD34 HSCs, et CD133 cellules progénitrices du sang périphérique. Pour la première fois, il est démontré que certains composés naturels peuvent augmenter la prolifération de cellules souches hématopoïétiques, et, plus spécifiquement, qu'une combinaison d'extrait de myrtille, de thé vert, de carnosine et de vitamine D3 présente une activité synergique.

Matériels et Méthodes

Réactifs

Tous les composés ont été ajoutés à des cultures de cellules comme cela est écrit dans la section des résultats. La provenance des composés est la suivante: extrait de myrtille (poudre séchée et congelée, Van Drunen Farms, Momence, IL), extrait de thé vert (Rexall), carnosine (Sigma), catéchine (Sigma), et les formes activées de vitamine D3 (25-hydroxy-cholecalciferol; Sigma).

Cultures de cellules et analyse MTT

Pour l'analyse de prolifération cellulaire, des cellules humaines de la moelle osseuse, des cellules CD34, ou CD133 (BioWhittaker, Inc.) ont été cultivées dans des plaques de 96 puits (5 10^4 /puits) contenant 100 ml de milieu de culture consistant de RPMI-1640 complété par 5% de sérum fœtal de veau (FCS). Ces cellules ont été traitées pendant

72 heures avec différents extraits à un dosage varié (8 ng/ml à 500 ng/ml) ou avec des composés moléculaires différents (0.3125 M à 20 M). Cinq heures avant la fin du traitement, 20 ml de solution MTT (MTT kit, Sigma) ont été ajoutés à chaque puits. Ces plaques sont ensuite incubées dans un incubateur à CO₂ à une température de 37°C pendant 5h et le milieu de culture a été enlevé avec une aiguille et une seringue. Un total de 200 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été ajouté à chaque puits, en pipetant de bas en haut pour dissoudre les cristaux. Ces plaques ont été réintroduites dans l'incubateur à 37°C pendant 5 minutes, puis transférées dans une plaque lectrice et l'absorbance a été mesurée à 550 nm. Les données ont été rapportées comme le pourcentage relatif par prolifération, définie comme le nombre de lecture O.D. de cellules traitées par rapport à des cellules de contrôle (en absence de traitement).

RESULTATS

L'amélioration de la prolifération de cellules de la moelle épinière d'une manière directement liée à l'administration de la dose.

Plusieurs extraits d'aliments complets, extraits de plantes et de composés naturels spécifiques ont été examinés individuellement pour constater une action de multiplication des cellules humaines de la moelle osseuse cultivées. L'épinard, la spiruline, l'EGCG, l'epicatéchine, le withania, le somnifera, le carao, la rehmmania glutinosa, et l'astragalus membranaceus n'ont pas montré une contribution importante pour la prolifération de cellules humaines de la moelle osseuse et n'ont plus été testés ultérieurement.

Nous avons découvert que certains extraits d'aliments complets, comme la myrtille, le thé vert et des composés spécifiques dont la catéchine, la carnosine, et la vitamine D₃, accroissent la prolifération cellulaire des cellules de la moelle osseuse humaine de manière dépendante de la dose (Fig.1). La prolifération cellulaire déterminée par analyse MTT est représentée comme le pourcentage de prolifération cellulaire par rapport à celui de contrôle, ce qui représente un taux de cellules cultivées dans les mêmes conditions sans aucun extrait composé ajouté. Le contrôle positif, facteur stimulant les colonies de granulocytes humains (hGM-CSF; Fig. 1A), a conduit à une augmentation de 44.5, 8.1% au dosage le plus élevé de 100 ng/ml. La myrtille et la catéchine ont montré produire un accroissement de 34.5 = + 6.7% et 34,8 = + 5.2% de la prolifération à 500 ng/ml et 20 M, respectivement (Fig. 1B, C). La carnosine a provoqué une augmentation de 26.6 = + 6.0% à 20 M (Fig. 1D), et la vitamine D₃, a entraîné un pourcentage inférieur de prolifération, 14.8 = + 3.3% à 5 M (Fig. 1F). Le thé vert a produit une prolifération similaire à celle de la myrtille et de la catéchine, avec 35.6 = + 9.2% de prolifération à 500 ng/ml (Fig. 1E).

Effet stimulant et synergétique des extraits et composés pour la prolifération

Pour déterminer si les extraits et les composés ont affiché un effet synergétique sur la prolifération cellulaire, nous avons cultivé des cellules humaines de la moelle osseuse avec des combinaisons différentes d'extraits et composés. Nous avons également cultivé les cellules de la moelle osseuse avec des extraits et des composés individuellement aux doses les plus élevées dans le but d'atteindre le niveau le

plus important de prolifération, ce qui a été rapporté dans la Fig. 1A–F.

Le contrôle positif, du hGM-CSF a affiché une prolifération de $48.3 \pm 7.4\%$, tandis que la myrtille, la catéchine, la carnosine, le thé vert et la vitamine D3 seuls n'ont pas conduit à une prolifération aussi significative, comme cela est démontré dans la Fig. 1 (Fig. 2A). Cependant, la combinaison des extraits et des composés a résulté en un pourcentage plus important de prolifération que celui observé pour les extraits et les composés séparément. Par exemple, la combinaison myrtille/vitamine D3 a présenté une augmentation de 62% de la prolifération, la myrtille/catéchine une augmentation de 70%, et la myrtille/carnosine, avec laquelle l'effet synergétique a été le plus considérable, une augmentation de 83% (Fig. 2A). Les combinaisons myrtille/thé vert, myrtille/vitamine D3/thé vert et myrtille/vitamine D3/thé vert/carnosine ont également montré une augmentation significative de la prolifération, respectivement de 56%, 72%, et 70% (Fig. 2A).

L'amélioration de la prolifération des cellules CD34 et des propriétés synergétiques des extraits et des composés.

Pour déterminer si ces extraits et ces composés activent la prolifération cellulaire d'autres cellules progénitrices, nous avons cultivé des cellules souches hématopoïétiques humaines de type CD34 dans les mêmes conditions que les cellules de la moelle osseuse en utilisant différentes combinaisons d'extraits et de composés avec des taux d'extraits et de composés individuellement aux dosages les plus élevés prévus pour promouvoir le taux de prolifération le plus important dans les cellules de la moelle osseuse, comme cela est montré dans la Fig. 1A–F. Les résultats ont révélé une augmentation de $48.3 \pm 7.4\%$ pour le hGM-CSF, ce qui correspond à approximativement une augmentation de 5% de la prolifération, en comparaison avec l'effet du hGM-CSF sur les cellules de la moelle osseuse (Fig. 2B). Cependant, individuellement, la myrtille, la catéchine, la carnosine, le thé vert et la vitamine D3 ont montré respectivement, une augmentation de $20.9 \pm 3.0\%$, $24.8 \pm 5.0\%$, $11.05 \pm 2.1\%$, $14.0 \pm 3.7\%$, et $6.9 \pm 2.6\%$ de la prolifération, ce qui est beaucoup moins élevé que celle observée dans les cellules de la moelle osseuse (Fig. 2B). Cependant, lorsqu'ils sont combinés, la myrtille/vitamine D3, la myrtille/catéchine, la myrtille/carnosine, la myrtille/thé vert, et la myrtille/vitamine D3/thé vert ont démontré respectivement, une augmentation de $39.3 \pm 2.0\%$, $57.3 \pm 10.4\%$, $30.9 \pm 3.4\%$, $27.9 \pm 10.0\%$, et $49.9 \pm 13.1\%$ de la prolifération, ce qui est au moins additif et dans certains cas plus qu'additif (Fig. 2B). Ce qui est intéressant, c'est que la combinaison de myrtille/vitamine D3/thé vert/carnosine a résulté en une augmentation de $67.6 \pm 11.9\%$, un simple effet additif aurait été de 52%, ce qui démontre un effet synergétique de cette combinaison (Fig. 2B).

L'augmentation de la prolifération cellulaire des CD133 et des propriétés synergétiques des extraits et des composés.

Certains des composés et des combinaisons ayant la plus grande capacité à augmenter la prolifération des cellules de la moelle osseuse dérivées des CD34 ont ensuite été utilisés pour traiter des cellules CD133 (progénitrices) prélevées du sang périphérique et cultivées dans les mêmes conditions que ci-dessus. La prolifération cellulaire a été déterminée par une analyse MTT (voir Matériels et Méthodes) et est représentée comme le pourcentage de prolifération cellulaire sur celui de contrôle. Les résultats ont révélé une augmentation de $21.11 \pm 2.9\%$ après le traitement avec du hGM-CSF (Fig. 2C). Séparément, la myrtille, la carnosine, le thé vert et la vitamine D3 ont montré respectivement, une augmentation de $11.9 \pm 3.1\%$,

16.9 = + 3.3%, 13.57 = + 3.0 et 7.6 = + 1.39% de la prolifération (Fig. 2C). Lorsque combinés entre eux, la myrtille/ vitamine D3/thé vert et la myrtille/vitamine D3/thé vert/carnosine ont présenté une augmentation de 29.2 = + 3.6% et 42.5 = + 5.9% de la prolifération (Fig. 2C), ce qui traduit un effet additif de la combinaison de ces composés lorsque nous examinons la prolifération de cellules humaines CD133.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois que des composés naturels variés et leurs combinaisons agissent pour l'augmentation de la prolifération de cellules humaines de la moelle osseuse, des cellules humaines de la moelle osseuse dérivées des CD34, et des cellules humaines dérivées du sang périphérique CD13. Lorsque testés individuellement, ces composés ont été plus effectifs dans l'augmentation de la prolifération de cellules de la moelle osseuse et moins effectifs lorsqu'ils ont été utilisés pour traiter des populations de cellules progénitrices. Cette constatation peut être le reflet d'un effet individuel des composés sur des populations de cellules matures qui sont également présentes dans les cultures de cellules de la moelle osseuse. Lorsque l'activité des composés a été examinée en combinaisons, les effets additifs et synergiques ont été plus importants pour les cellules progénitrices CD34 et CD13. Pour notre surprise, certaines des combinaisons testées ont résulté en une prolifération excédant celle produite par le contrôle positif, du hGM-CSF. Par exemple, la combinaison de l'extrait de myrtille, l'extrait de thé vert, de carnosine, et de vitamine D3 a produit une prolifération plus importante que celle induite par du hGM-CSF pour les trois types de cellules, celles de type CD133 étant les plus sensibles, avec une prolifération étant le double de celle retrouvée pour le hGM-CSF. Pour tous ces composés testés, l'extrait de myrtille est celui qui a produit de manière plus consistante une prolifération significative, lorsque combiné avec d'autres composés.

Il y a plusieurs réticences à l'interprétation et l'étendue de nos conclusions. Tout d'abord, notre analyse sur la prolifération a été uniquement basée sur l'analyse au MTT, qui reflète l'activité de la chaîne mitochondriale respiratoire. Bien que l'analyse au MTT est une méthode très précise utilisée pour mesurer la viabilité cellulaire *in vitro*, ses résultats peuvent avoir d'autres interprétations.

D'autre part, ces conclusions nécessitent des vérifications *in vivo* avant de faire des déclarations à propos de l'application de nos conclusions. Par exemple, nos études ont été réalisées *in vitro* et pour cela elles n'ont pas la complexité associée à la pharmacocinétique de ces différents composés lorsqu'ils sont administrés oralement. De plus, des recherches ultérieures devront déterminer si la prolifération perpétuée par les substances et leurs combinaisons accroissent le risque de tumeur. Parce que la majorité de ces composés soit (1) inhibent la croissance de certaines cellules cancérigènes, (2) soit conduisent à une différenciation des cellules cancérigènes, ou (3) n'affectent pas ou augmentent la croissance des cellules de type normal (22,24–26), notre hypothèse de travail est que cette combinaison va promouvoir la croissance de cellules souches normales nécessaires à la guérison tout en réduisant aussi une tumeur potentielle. Finalement, bien que la présente étude démontre une prolifération accrue, on ne sait pas encore quels seront les phénotypes au final de ces cellules qui ont suivi le traitement. Un objectif pour les recherches futures serait de déterminer si l'on peut identifier des composés naturels qui peuvent non seulement augmenter la prolifération de cellules souches normales, mais aussi de les pousser vers des phénotypes souhaités et spécifiques à certains dysfonctionnements.

En conclusion, on a démontré pour la première fois que certains composés

naturels peuvent promouvoir la prolifération de cellules souches hématopoïétiques *in vitro*, et plus spécifiquement, qu'une combinaison d'extrait de myrtille, d'extrait de thé vert, de carnosine, et de vitamine D₃ démontrent une activité synergétique dans ces analyses. Des recherches ultérieures vont examiner les effets de ces composés dans des cellules non hématopoïétiques dérivées.

FIG. 1. Les extraits de plantes et les composés alimentaires activent la prolifération cellulaire des cellules de la moelle osseuse humaine, en conséquence de l'administration de la dose. Des cellules humaines de la moelle osseuse ont été cultivées dans des plaques de 96 puits (5×10^4 /puit) et traitées avec du hGM-CSF humain (A, pour positif), de l'extrait de myrtille (B), de la catéchine (C), de la carnosine (D), de l'extrait de thé vert (E), et de la vitamine D₃ (F) à des dosages extrêmement variés, comme cela est indiqué pendant 72 h. Après le traitement, ces cellules ont été préparées pour une analyse au MTT pour examiner la prolifération cellulaire, comme indiqué dans la partie consacrée aux matériels et aux méthodes. Les données ont été représentées comme le pourcentage sur celui de contrôle (c'est-à-dire sans aucun traitement et dans les mêmes conditions de culture). Pour l'analyse A–F de la variation (ANOVA) les tests post hoc montrent des différences significatives de pourcentage par rapport au contrôle (SD avec $n = 3$ expérimentations indépendantes) entre des doses élevées et faibles ($p < 0.005$).

FIG. 2. L'extrait de myrtille affecte de manière synergétique la prolifération cellulaire lorsqu'elle est en présence d'un traitement conjoint avec du D₃, CH, D₃/GT, ou D₃/GT/Ca. (A) Des cellules humaines de la moelle osseuse ont été cultivées dans des plaques de 96 puits (5×10^4 /puit) et traitées avec de l'extrait de myrtille (500 ng/ml) en présence de D₃ (5 M), CH (20 M), Ca (20 M), GT (500 ng/ml), D₃ (5 M)/GT (500 ng/ml), ou D₃ (5 M)/GT (500 ng/ml)/Ca (20 M) pendant 72 h. (B) Des cellules souches humaines dérivées de CD34 (5×10^4 /puit) et traitées comme ci-dessus (A). Pour l'analyse au MTT, ces cellules ont été préparées pour une étude sur la prolifération cellulaire. Les données ont également été représentées comme le pourcentage constaté sur celui de contrôle. ANOVA et des tests post hoc montrent des différences significatives du pourcentage par rapport à celui de contrôle (SD avec $n = 3$ expérimentations indépendantes) entre les composés séparément et certains traitements combinés, pour A, BB/D₃ un traitement combiné comparé à BB ou à D₃ des traitements indépendants ($p < 0.005$), BB/CH comparé à BB ou CH ($p < 0.005$), BB/Ca comparé à BB ou à Ca ($p < 0.001$), BB/D₃/GT comparé à BB, à D₃ ou à GT, BB/D₃/GT/Ca comparé à BB, à D₃, à GT ou à Ca; pour B BB/CH traitement combiné comparé à BB ou à CH des traitements individuels ($p < 0.005$), BB/D₃/GT/Ca comparé à BB, à D₃, à GT ou à Ca ($p < 0.001$).

DIVULGATION

P.B. et P.R.S. sont des fondateurs, et R.D.S., J.T., et N.D. sont des consultants chez Natura Therapeutics, Inc. (Tampa, Floride), une compagnie USF émergente.