

L'interféron γ transforme le pronostic des patients atteints de leishmaniose chimiorésistante

Les malades atteints de leishmaniose viscérale ont des tests cutanés spécifiques négatifs. Les lymphocytes T de ces malades ne prolifèrent ni ne synthétisent d'interféron γ lorsqu'ils sont traités *in vitro* par les antigènes de leishmanies. L'inverse s'observe dans les leishmanioses cutanéomuqueuses où les deux tests sont positifs. Cependant, les malades réfractaires au traitement par l'antimoine, présentant l'une ou l'autre de ces deux formes de leishmaniose, guérissent lorsqu'ils sont traités par antimoine combiné à l'interféron γ . De nombreuses interprétations de l'inversion de la résistance à la chimiothérapie induite par l'interféron γ peuvent être envisagées : action sur le système de type MDR (*multidrug resistance*), modulation des sous-populations lymphocytaires ou action sur les populations cellulaires des lésions de la leishmaniose.

Ernesto Falcoff
Jorge Bernabo
Oscar Bottasso

ADRESSES

E. Falcoff : directeur de recherche à l'Inserm, Institut Curie, Inserm U.196, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

J. Bernabo : docteur en médecine, responsable du département médical Roussel-Uclaf, Buenos-Aires, Argentine.

O. Bottasso : docteur en médecine, docteur ès sciences. Consejo de investigaciones, division immunologie, faculté des sciences médicales, Rosario, Argentine.

TIRÉS A PART

E. Falcoff.

L'interféron a été décrit pour la première fois en 1957 [1] comme un produit sécrété par les cellules infectées par un virus et capable d'inhiber la multiplication virale dans des cellules de même espèce non encore infectées. Le système apparaissait comme un mécanisme « pré-immunitaire » : l'interféron agit dès les premières heures suivant l'infection, tandis que les anticorps spécifiques ne sont détectables que quelques jours plus tard. De plus, son action antivirale se manifeste non seulement sur le virus inducteur mais aussi sur beaucoup d'autres.

Par la suite, de nombreux travaux

ont établi qu'il s'agissait d'une protéine relativement thermolabile, qui n'avait pas une action directe sur le virus puisqu'il fallait la synthèse *de novo* de protéines pour que la cellule développe l'état antiviral [2]. Dans des systèmes acellulaires de synthèse de protéines préparées à partir de cellules prétraitées à l'interféron, nous avons pu montrer que la traduction des ARNm était inhibée au niveau de l'initiation de la synthèse des protéines [3, 4]. En ce qui concerne la production d'interféron, sa synthèse semblait être associée à la présence d'ARN double-brin d'origine, soit virale, soit synthétique [5]. De plus, Wheelock a détecté une activité antivirale dans

le surnageant de culture de leucocytes humains traités par un mitogène, la phytohémagglutinine [6].

Dès 1970, nous avons entrepris d'étudier l'activité antivirale de ce modèle et l'avons rapportée à l'existence d'une protéine antivirale qui comportait des différences majeures avec l'interféron induit dans la même culture de leucocytes infectés par un virus. Cela nous a amenés à reconnaître l'existence d'un interféron « viral » et d'un interféron « immun » [7].

Les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique ont largement confirmé ces travaux pour aboutir à une nomenclature internationale des interférons : α et β pour ceux induits par des virus et des ARN et γ pour celui induit par la stimulation de lymphocytes T [8]. Tous ces interférons sont actuellement produits par génie génétique. En ce qui concerne plus particulièrement l'interféron γ , nous avons participé à son clonage [9] en collaboration avec Transgène (Strasbourg, France), la production à l'échelle industrielle étant assurée par Roussel-Uclaf (Romainville, France).

Les interférons α (plus de 20 molécules différentes) et β ont des homologies séquentielles et structurales non partagées par l'interféron γ [2]. Celui-ci est un produit de la stimulation par un antigène ou un mitogène des lymphocytes T : il est donc par définition une lymphokine, terme introduit à la fin des années 1960 pour désigner les médiateurs de réponses immunes synthétisés par les lymphocytes et distincts des anticorps. Parmi les nombreuses propriétés de l'interféron γ , il faut signaler l'induction de l'expression d'antigènes de classe II et de molécules d'adhérence cellulaire, l'activation des monocytes et des macrophages, la sélection isotypique d'immunoglobulines et sa participation à l'activation/prolifération et à la maturation des lymphocytes B.

A la suite des travaux de McKaness dans les années 1960 [10], il est devenu évident que les macrophages activés jouaient un rôle fondamental dans le contrôle des infections intracellulaires. Un grand nombre

de micro-organismes (bactéries, mycobactéries, protozoaires, champignons) se développent dans ces cellules. Cependant, ils sont détruits sur place. Nous savons maintenant que ce processus microbicide résulte de l'apparition de métabolites toxiques de l'oxygène, du monoxyde d'azote (NO) et du *tumor necrosis factor* (TNF) synthétisés dans les macrophages activés par l'action de l'interféron γ [11]. Cette propriété de l'interféron γ suggère des possibilités nouvelles pour son utilisation thérapeutique dans de nombreuses maladies infectieuses où sont en cause des défauts immunologiques au niveau de l'activation des macrophages.

Notre choix s'est porté sur la leishmaniose, dont le nombre de malades est estimé à 12 millions et la population à risque à 350 millions de personnes, réparties dans 80 pays [12]. Parmi les différentes formes cliniques de la maladie, la leishmaniose viscérale ou Kala-azar est particulièrement intéressante. Le protozoaire responsable appartient au genre *leishmania*, qui prolifère dans les cellules réticulo-endothéliales, provoquant hépatosplénomégalie, lymphadénopathies, perte de poids, fièvre, anémie, leucopénie, thrombocytopenie. Les lymphocytes T de ces patients, incapables de produire de l'interféron γ en présence des antigènes parasitaires [13], ne peuvent donc pas fournir les moyens nécessaires au système phagocytaire mononucléé pour l'élimination efficace des parasites. Le traitement classique du Kala-azar repose sur l'antimoine pentavalent. Cependant, 5 % des patients sont réfractaires à ce traitement [14] et évoluent inéluctablement vers la mort. Le Kala-azar est un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays. Etant donné l'absence d'effets secondaires significatifs provoqués par l'administration systémique de l'interféron γ recombinant (Roussel-Uclaf), nous avons décidé d'étudier l'action de cette cytokine dans la leishmaniose viscérale, en collaboration avec l'université de Bahia (Brésil). Un premier essai thérapeutique non comparatif a inclus dix-sept patients atteints de leishmaniose viscérale. Huit patients étaient résis-

tants au traitement par antimoine, et neuf présentaient une forme très sévère de la maladie et n'avaient encore reçu aucun traitement. L'interféron γ a été administré à la dose de 2×10^6 unités (100 μg)/ m^2 /jour, en association avec la dose conventionnelle d'antimoine (Glucantime®, Rhône-Poulenc) de 20 mg Sb/kg/jour.

Après en moyenne 20 à 22 jours de traitement, six patients sur les huit du premier groupe et huit sur les neuf du deuxième groupe ont répondu favorablement pour arriver, après plusieurs semaines, à la guérison totale, sans récurrence pendant les six mois du suivi [15].

Ces résultats, suggérant que l'interféron γ a sa place dans l'arsenal thérapeutique contre la leishmaniose viscérale, sont logiques : il est établi que les malades atteints de Kala-azar sont incapables de produire de l'interféron γ . En revanche, il est plus hasardeux de prévoir l'action de l'interféron γ sur d'autres formes cliniques de leishmaniose aux profils immunologiques très différents mais présentant également des cas réfractaires à l'antimoine, notamment la leishmaniose cutanéomuqueuse. La maladie commence par une ou plusieurs lésions cutanées, qui peuvent guérir spontanément mais, après une période variable de quelques jours à plusieurs années, des granulomes apparaissent dans la muqueuse des voies respiratoires supérieures. Ils peuvent affecter les muqueuses nasales, le palais, le larynx, le pharynx, détruisant de proche en proche les cartilages et entraînant finalement la mort par malnutrition ou septicémie.

Contrairement à l'immunodépression observée dans la leishmaniose viscérale, les patients atteints de leishmaniose cutanéomuqueuse ont une immunité cellulaire spécifique exacerbée, qui pourrait être partiellement responsable du dommage tissulaire. Leurs lymphocytes stimulés *in vitro* par les antigènes parasitaires synthétisent l'interféron γ mais nous ne connaissons pas leur réponse *in situ*.

En octobre 1989, au cours d'une réunion de travail avec un groupe de chercheurs de la *Division de Immunologia de la Facultad de Ciencias*

RÉFÉRENCES

1. Isaacs A, Lindenmann H. The interferon. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1957; 147: 258-67.
2. De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. *Interferons and other regulatory cytokines*. New-York: John Wiley and Sons, 1988.
3. Falcoff E, Lebleu B, Falcoff R, Revel M. Interferon treatment inhibits mengo mRNA and globin mRNA translation in cell-free extracts of L cells. *Nature New Biol* 1972; 240: 145-7
4. Falcoff E, Falcoff R, Lebleu B, Revel M. Correlation between the antiviral effect of interferon treatment and the inhibition of *in vitro* messenger RNA translation in non infected L cells. *J Virol* 1973; 12: 421-30.
5. Falcoff E, Falcoff R, Cherby J, Florent J, Lunel J, Ninet L, de Ratuld Y, Tissier R, Vuillemin B, Werner GH. Double-stranded ribonucleic acid from mengovirus. Production, characterization, interferon inducing and antiviral activities in comparison with poly(I):(C). *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 3: 590-8.
6. Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohaemagglutinin. *Science* 1965; 149: 310-1.
7. Falcoff R. Some properties of virus and immune induced human lymphocyte interferon. *J Gen Virol* 1972; 16: 250-3.
8. Stewart II WE. Interferon nomenclature. *J Immunol* 1980; 125: 2353.
9. Vaquero C, Sancéau J, Catinot L, et al. Translation of mRNA from phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes: characterization of interferon mRNAs. *J Interferon Res* 1982; 2: 217-27.
10. Mackaness GB. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*. *J Exp Med* 1969; 129: 973-92.
11. Nathan CF, Murray H, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983; 158: 670-89.
12. Lutte contre la leishmaniose. Série d'Information Technique 793. Genève: OMS, 1990.
13. Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, et al. Absence of gamma interferon and interleukin-2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985; 76: 2066-9.
14. Bryceson AD, Chulay JD, Mugambi M, et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drug. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 705-14.
15. Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A, Carvalho JS, Barral-Netto M. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 1990; 322: 16-21.
16. Bottasso OA, Cabrini JM, Falcoff E, Falcoff R. Successful treatment of an antimony resistant American mucocutaneous leishmaniasis: a case report. *Arch Dermatol* 1992; 128: 996-7.
17. Falcoff E, Taranto N, Remondegui C, et al. Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon-gamma and pentavalent antimonials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993 (sous presse).
18. Murray HW, Berman JD, Wright SD. Immunochemotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection: gamma interferon plus pentavalent antimony. *J Infect Dis* 1988; 157: 973-8.
19. Groggl M, Martin RK, Oduolla AMJ, Milhous WK, Kyle DE. Characteristics of multidrug resistance in *plasmodium* and *leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 987-91.
20. Neal RA, Van Bueren J, McCoy NG, Iwobi M. Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 197-8.
21. Scala S, Pacelli R, Iaffaioli RV, Normanno N, Pepo S, Frasci G, Genua G, Tsuruo T, Tagliaferri P, Bianco AR. Reversal of adriamycin resistance by recombinant α -interferon in MDR human colon carcinoma L^oV^o-doxorubicin cells. *Cancer Res* 1991; 51: 4898-902.
22. Heinzel FP, Sadick MD, Mutha S, Locksley RM. Production of interferon- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 by CD4⁺ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7011-5.
23. Nickoloff BJ, Griffiths C, Barker J. The role of adhesion molecules, chemotactic factors and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 151S-7.
24. Bottasso O, Besuschio S, Merlin G, et al. Lepromatous leprosy treated with recombinant interferon- γ : cutaneous histologic changes. *Int J Dermatol* 1992; 31: 813-7.

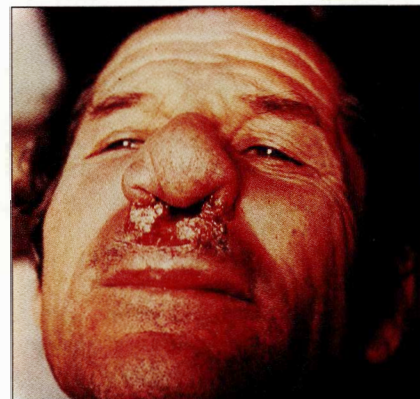


Figure 1. **Malade atteint de leishmaniose cutanéomuqueuse, avant traitement par l'interféron γ .** Ce malade, atteint de leishmaniose depuis douze ans, avait eu de nombreux cycles de traitement par la glucantime (composé d'antimoine) à laquelle il était résistant. Il présentait une large perforation de la cloison nasale, une atteinte sévère des voies respiratoires supérieures et une dysphagie.

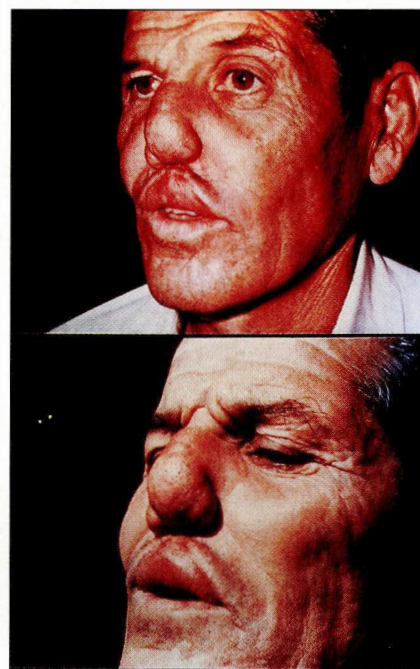


Figure 2. **Le même malade, guéri après trois mois de traitement combiné Glucantime® et interféron γ .** Le malade n'a pas présenté de récurrence à ce jour, après un suivi de plus de deux ans.

Medicas de Rosario (Argentine), nous avons eu l'occasion de voir un malade atteint d'une forme très grave de leishmaniose cutanéomuqueuse. Son histoire clinique faisait état de douze ans d'évolution, il était devenu totalement réfractaire à l'antimoine et présentait une large perforation de la cloison nasale, une atteinte sévère des voies respiratoires supérieures et une dysphagie. Au vu de l'extrême gravité de son état et avec son accord, nous avons tenté un traitement par l'interféron γ combiné à l'antimoine. De façon spectaculaire, les lésions commencèrent à régresser dès la deuxième semaine. Après trois mois de traitement, il était guéri et n'a pas présenté de récurrence à ce jour, après un suivi de deux ans [16] (figures 1 et 2). A la suite de ce résultat, en coordination avec la filiale de Roussel-Uclaf en Argentine, un essai multicentrique (Argentine et Bolivie) a été initié, afin d'élargir notre expérience sur l'action thérapeutique de l'interféron γ associé à des doses faibles d'antimoine. Cet essai, qui a inclus treize patients réfractaires à l'antimoine, vient de prendre fin et notre première observation a été largement confirmée. A la fin du traitement, qui a duré entre trente et soixante jours, douze patients étaient cliniquement guéris. Le résultat s'est maintenu après six mois de suivi. Un seul malade, très sévèrement atteint, n'a pas montré de modifications après 30 jours de traitement.

L'association interféron-antimoine s'est donc avérée efficace, avec un recul de six mois pour douze patients sur treize ayant reçu le traitement complet [17].

Si l'interféron γ a un effet thérapeutique dans ce type de leishmaniose où le nombre de parasites est faible et les lésions tissulaires semblent associées à une réponse immunitaire exacerbée, il est simpliste d'imaginer qu'une telle action s'exerce uniquement par la stimulation de l'action microbicide des macrophages. On sait que la molécule possède des effets pléiotropes. En particulier, il a été démontré [18] que l'interféron γ augmente

in vitro l'action anti-leishmania de l'antimoine. En tenant compte des similitudes qui existent entre le mécanisme de résistance aux drogues (MDR pour *multi-drug resistance*) des cellules tumorales et des leishmanies [19-21], on peut se demander si l'interféron γ est capable d'annuler la résistance à l'antimoine comme l'interféron α le fait dans certaines cellules néoplasiques réfractaires à la chimiothérapie. La confirmation de cette hypothèse étendrait le champ d'expérimentation clinique de l'interféron γ à de nombreuses maladies où le gène MDR est susceptible d'inactiver le traitement conventionnel.

A l'heure actuelle, les processus qui déterminent un changement dans la réponse immunitaire — de destructive à protectrice — sont peu connus. Dans des leishmanioses expérimentales chez la souris, la guérison est associée à l'émergence des clones de lymphocytes Th1 producteurs d'interféron γ et d'IL2 tandis que la dissémination de la maladie est caractérisée par l'expansion de lymphocytes Th2, sécréteurs d'IL4 et d'IL10 [22]. Bien que ces résultats ne puissent pas être extrapolés à la maladie humaine, il est concevable que l'administration d'interféron γ modifie la régulation entre les différentes classes de lymphocytes T et, par conséquent, la production de cytokines. L'expression des récepteurs pour ces médiateurs pourrait également être modifiée, le résultat final étant l'installation d'une réponse immunitaire protectrice.

En raison de la complexité des processus de réparation tissulaire, l'interféron γ pourrait également changer le profil histologique des lésions, recrutant des populations cellulaires nouvelles à travers l'induction de molécules d'adhérence, comme cela a été démontré sur la peau de sujets sains et chez des lépreux traités par cette cytokine [23, 24].

Il devient de plus en plus évident que plusieurs maladies infectieuses (dont la leishmaniose), inflammatoires et prolifératives, se caractérisent par une activité non appro-

priée ou excessive des médiateurs des réponses biologiques. Leur contrôle impliquerait des stratégies destinées à contrecarrer les excès ou les défauts de ces réponses. En ce qui concerne l'interféron γ , depuis que nous l'avons caractérisé en 1972 [7], le cheminement des connaissances a été lent jusqu'aux résultats rapportés dans la leishmaniose : son utilisation thérapeutique ne fait que commencer ■

Summary

γ interferon induces clinical healing in chemoresistant leishmaniasis

T lymphocytes from patients with visceral leishmaniasis treated *in vitro* with leishmania antigens are unable to proliferate and to produce γ interferon. These patients have negative specific skin tests. Opposite results are obtained in patients with another clinical form of the disease named mucocutaneous leishmaniasis, in which both tests are positive. Nevertheless, patients with visceral leishmaniasis or mucocutaneous leishmaniasis, refractory to chemotherapy (antimonium complex), were cured when treated with antimonium in combination with γ interferon, in spite of different immunological profiles. Different interpretative hypotheses of the reversion of chemoresistance induced by gamma interferon are discussed.

Third Conference of the European Society for Analytical Cellular Pathology (3rd ESACP)

16-20 Mai 1994

Europole, World Trade Center, Grenoble

Colloque Satellite : Colloque commun de l'Association de Cytométrie en Flux (ACF) et du Cercle Français de Microscopie Quantitative (CFMQ), 18-19 Mai 1994

Inscription : Destination Congrès, BP56 38242 Meylan Cedex, France. Tél. : (33) 76.90.18.12. - Fax : (33) 76.90.33.26

Information scientifique : Pr. Gérard Brugal, Université Joseph Fourier, CERMO BP53, 38041 Grenoble, Cedex 9, France. Tél. : (33) 76.63.14.02 - Fax : (33) 76.51.49.48.