

Interleukine 10 : facteur favorisant l'échappement d'une tumeur à la surveillance immunitaire ? ou facteur favorisant son rejet ?

Catherine Gérard
Catherine Bruyns
Michel Goldman
Thierry Velu

L'interleukine 10 (IL10) est une cytokine bien connue pour ses propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires. Par ailleurs, l'expression du gène de l'IL10 et/ou la production d'IL10 ont été mises en évidence dans divers types de tumeurs. Cela suggérerait que IL10 pourrait, en favorisant l'échappement au système immunitaire, constituer une des étapes de la tumorigenèse. Le transfert du gène de l'IL10 dans un modèle de mélanome chez la souris a été réalisé dans le but de mimer une situation où l'IL10 est sécrétée au sein d'une tumeur. Contrairement à ce qui était attendu, la production d'IL10 par ces cellules de mélanome, réduit la capacité de ces cellules de former des tumeurs chez des animaux syngéniques. De plus, une seule injection de cellules produisant l'IL10 protège les souris contre une nouvelle injection de cellules parentales. L'IL10 est donc une cytokine qui, selon le modèle testé, ou la dose sécrétée localement, serait plutôt pro-inflammatoire et immunostimulante ou, à l'inverse, anti-inflammatoire et immunosuppressive.

ADRESSE

C. Gérard: *docteur ès sciences, chercheur.*
C. Bruyns: *docteur ès sciences, chercheur.*
M. Goldman: *docteur en médecine, chef du service d'immunologie.* Service d'immunologie, hôpital Erasme, université libre de Bruxelles.
T. Velu: *docteur en médecine, chef de clinique adjoint au service de génétique médicale.* IRIBHN et service de génétique médicale, hôpital Erasme, université libre de Bruxelles, Campus Erasme, Route de Lennik 808, 1070 Bruxelles, Belgique.

m/s n° 10, vol. 11, octobre 95

Il existe une énorme diversité de cancers et les mécanismes d'échappement à la surveillance immunitaire sont, eux aussi, multiples et variés [1, 2]. Ils sont, soit associés à un défaut du système immunitaire de l'hôte, soit dus à des caractéristiques des cellules tumorales elles-mêmes qui les rendent

invisibles pour le système immunitaire ou incompétentes à induire une réponse immune efficace. Notamment, la synthèse par les cellules tumorales de molécules immunosuppressives, comme le TGF β , la prostaglandine PGE2, certains gangliosides, l'IL6 ou même l'IGF-1, pourrait favoriser leur développement.

RÉFÉRENCES

- Schreiber H. Tumor immunology. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. New York : Raven Press, 1993: 1143-78.
- Bruyns C, Gérard C, Velu T. Cancer escape from immune surveillance. How can it be overcome by gene transfer? *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1176-81.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin 10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-90.
- Goldman M, Velu T. L'interleukine 10, une nouvelle cytokine immunosuppressive et anti-inflammatoire. *médecine/sciences* 1993; 9: 453-5.
- Rousset F, Garcia E, DeFrance T, Perronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1890-3.
- Émilie D, Toutitout R, Raphael M, Peuchmaur M, Devergne O, Réa D, Contreras J, Crevon MC, Edelman L, Joab I, et al. *In vivo* production of interleukin 10 by malignant cells in AIDS lymphomas. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2937-42.
- Raphaël M, Eclache V, Martin A, Feuillard J. Les lymphomes du SIDA. *médecine/sciences* 1995; 11: 713-22.
- Merville P, Rousset F, Banchereau J, Klein B, Bataille R. Serum interleukin 10 in early stage multiple myeloma. *Lancet* 1992; 340: 1544-5.
- Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot M. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 1993; 82: 2169-74.
- Yamamura M, Madlin R, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest* 1993; 91: 1005-10.
- Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* 1994; 56: 755-60.
- Gotlieb W, Abrams JS, Watson JM, Velu TJ, Berek WH, Martinez Maza O. Presence of IL10 in the ascites of patients with ovarian and other intra-abdominal cancers. *Cytokines* 1992; 4: 385-90.
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising E, Bucht, Gerdin B, Kiessling R. Selective expression of IL10, IFN γ and GM-CSF in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7708-12.

Tableau I
ACTIONS DE L'IL10

Cellules	Type	Fonction	Système	Effet
Lymphocytes	T CD4 ⁺	Production de cytokines, prolifération	(+M ϕ)	↓
	T CD8 ⁺	Chimiotactisme, prolifération (?)		↑
	Thymocytes	Production d'IFN γ	+M ϕ -allo-Ag	↓
		Différenciation, prolifération	+IL2, +IL4	↑
	B	Production d'Ig, CMH-II, prolifération		
	NK	Production de cytokines (TNF α , IFN γ)	+M ϕ	↓
Cellules présentatrices d'antigène	M ϕ	Expression de signaux costimulateurs (B7, ICAM-1) de CMH-II, de cytokines (comme IL1, TNF α , IL12), de radicaux libres, de NO		↓
		Expression de récepteurs FC γ RI, ADCC		↑
	Cellules dendritiques	Expression de B7.2, capacité de stimuler la production d'IFN γ par les lymphocytes T		↓
Mastocytes		Prolifération, différenciation	+IL3, +IL4	↑
Leucocytes		Extravasation		↑
Cellules endothéliales		Expression de molécules d'adhérence (?)		↑

L'analyse histologique des tumeurs solides montre que la plupart d'entre elles sont infiltrées par des cellules inflammatoires (lymphocytes T, NK, neutrophiles, macrophages...). Bien que leur rôle exact reste encore mal compris, ces cellules sont susceptibles d'être activées par des cytokines et d'en produire elles-mêmes. La production locale de cytokines au sein d'une tumeur pourrait jouer un rôle crucial dans les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire de l'hôte.

L'IL10 est une molécule récemment identifiée, douée de puissantes propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires *in vitro* (Tableau I). Cette cytokine est produite par divers types cellulaires, incluant notamment des lymphocytes T CD4⁺ (surtout les lymphocytes Th2 chez la souris) et des monocytes/macrophages. Elle inhibe l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et de certaines molécules accessoires – notamment la molécule B7.1 – à la surface des cellules macrophagiques, réduisant à la fois leur capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T

et leur capacité de fournir un signal costimulateur à ces lymphocytes. Par son activité inhibitrice des réponses immunes à médiation cellulaire et des réactions inflammatoires [3, 4], l'IL10 pourrait favoriser la tumorigenèse en empêchant le développement d'une réponse antitumorale adéquate contre les cellules tumorales. L'IL10 n'a pourtant pas que des activités inhibitrices. Elle favorise, notamment, les réponses immunes de type humoral, en stimulant la production d'anticorps, ainsi que la différenciation et la prolifération des lymphocytes B [5] qui, eux-mêmes, peuvent produire de l'IL10 (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 726*). Cette production pourrait également jouer un rôle dans le développement d'hémopathies malignes de type B, en participant à l'établissement d'une boucle autocrine, stimulant la croissance et l'immortalisation des lymphocytes B. Des quantités importantes d'IL10 ont, en effet, été trouvées dans les syndromes lymphoprolifératifs à EBV associés au SIDA [6, 7], dans le myélome multiple [8] et dans les lymphomes non hodgkiniens, dans lesquels une corrélation a même été

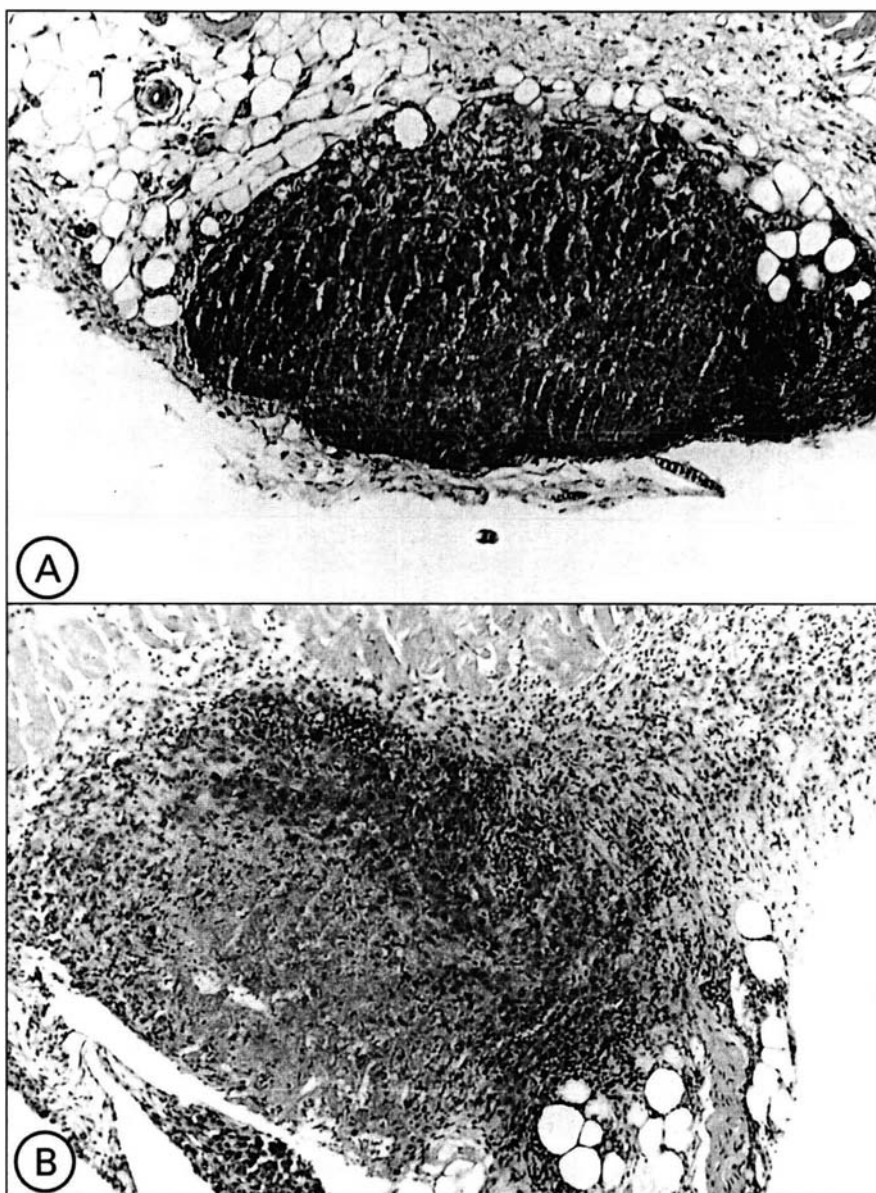


Figure 1. **Analyse histologique du mélanome murin B16-F1 par coloration à l'hématoxyline et l'éosine, quatre jours après l'injection cellulaire.** **A.** Les cellules B16-F1 transduites par un vecteur témoin forment une masse bien circonscrite. **B.** Les cellules B16-F1, modifiées génétiquement par un vecteur rétroviral véhiculant le gène de l'IL10, forment une masse caractérisée par une nécrose importante et un infiltrat polymorphe abondant en cellules inflammatoires.

trouvée entre la présence d'IL10 et une survie significativement plus courte des malades [9].

Ces deux dernières années, plusieurs groupes se sont attachés à doser l'IL10 produite par des lignées tumorales établies à partir de divers types de cancers, ou à déterminer, par PCR inverse sur des biopsies de tumeurs,

le profil des ARN messagers des gènes codant pour des cytokines présentes localement sur le site de la tumeur, considérant qu'il reflète l'état immunologique de celle-ci. Ces études concernent des carcinomes basocellulaires [10], des mélanomes [11], des tumeurs de l'ovaire [12, 13], du rein [14, 15], du système ner-

veux central [16] et du poumon [17]. L'ensemble des résultats ainsi obtenus montre qu'au sein d'une tumeur, le profil d'expression des cytokines est hétérogène et que le gène de l'IL10 n'est pas systématiquement transcrit dans toutes les tumeurs d'un même type, ni dans tous les types de tumeurs. Cependant, parmi les nombreuses cytokines étudiées, l'IL10 est celle dont la synthèse est le plus souvent retrouvée dans l'ensemble des tumeurs examinées. Dans un petit nombre de cas, l'activité biologique de l'IL10 produite a pu être démontrée. Il semble, néanmoins, qu'il soit difficile d'établir une corrélation entre le stade ou la classification histologique de la tumeur et la quantité d'IL10 produite. Dans les glioblastomes multiformes, l'ARN messager de l'IL10 semble être sélectivement – ou en tout cas plus – exprimé dans les cas invasifs, comparativement aux cas moins malins et plus localisés [18, 19]. Bien que la majorité des tumeurs solides soient infiltrées par des cellules inflammatoires susceptibles, elles-mêmes, de produire de l'IL10, toutes ces études suggèrent que la production locale d'IL10 pourrait jouer un rôle dans le développement de certaines tumeurs en inhibant les réponses immunes antitumorales, indépendamment du type cellulaire responsable de sa sécrétion.

Nous avons testé cette hypothèse et recréé une situation de sécrétion locale d'IL10 au sein d'une tumeur en transférant le gène de l'IL10 dans une lignée de cellules tumorales, dont nous avons ensuite étudié la tumorigénicité par leur injection *in vivo*. À l'aide de vecteurs rétroviraux, nous avons ainsi transféré l'ADNc de l'IL10 murine dans une lignée de mélanome de souris (B16-F1). Des cellules parentales, des cellules produisant l'IL10 ou des cellules transduites par un vecteur témoin ont été injectées sous la peau de souris syngéniques C57BL/6 et la croissance de la tumeur a été suivie au cours du temps. Contrairement à ce qui était attendu, nos résultats montrent que les cellules B16 qui expriment l'IL10 perdent leur tumorigénicité proportionnellement à la quantité d'IL10 produite. L'analyse histologique précoce du site d'injection, illustrée

RÉFÉRENCES

14. Filgueira L, Zuber M, Merlo A, Caetano V, Schultz E, Harder F, Spagnoli GC, Heberer M. Cytokine gene transcription in renal cell carcinoma. *Br J Surg* 1993; 56: 755-60.
 15. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, Chen M, Albino AP, Bander NH. IL10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to IL6 secretion. *Int J Cancer* 1993; 55: 96-101.
 16. Merlo A, Juretic A, Zuber M, Filgueira L, Luscher U, Caetano V, Ulrich J, Gratzl O, Heberer M, Spagnoli GC. Cytokine gene expression in primary brain tumours, metastases and meningiomas suggest specific transcription patterns. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 2118-25.
 17. Smith DR, Kunkel SL, Burdick MD, Wilke CA, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 145: 18-25.
 18. Nitta T, Hishii M, Sato K, Okumara K. Selective expression of IL10 gene within glioblastoma multiforme. *Brain Res* 1994; 649: 122-8.
 19. Huettnner C, Paulus W, Roggendorf W. mRNA expression of the immunosuppressive cytokine IL10 in human gliomas. *Am J Pathol* 1995; 146: 317-22.
 20. Gérard C, Bruyns C, Delvaux A, Baudson N, Dargent JL, Goldman M, Velu T. Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells. 1995, soumis pour publication.
 21. Richter G, Krueger-Krasagakes S, Hein G, Hülz C, Schmitt E, Diamantstein T, Blankenstein T. IL10 transfected into Chinese hamster ovary cells prevents tumor growth and macrophage infiltration. *Cancer Res* 1993; 53: 4134-7.
 22. Tepper RI, Mulé JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Human Gen Ther* 1994; 5: 153-64.
 23. Colombo MP, Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol Today* 1994; 15: 48-51.
 24. Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsuhashima K, Thestrup, Pedersen K. Human IL10 is a chemoattractant for CD8⁺ T lymphocytes and an inhibitor of IL8 induced CD4⁺ T lymphocyte migration. *J Immunol* 1993; 151: 4545-51.
 25. Wogensen L, Huang X, Sarvetnick N. Leukocyte extravasation into pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J Exp Med* 1993; 178: 175-85.
 26. Chen WF, Zlotnik A. IL10, a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991; 147: 528-34.
- dans la *figure 1*, montre qu'à l'opposé des mélanomes témoins qui forment un amas tumoral bien délimité, la masse tumorale formée par les cellules B16 produisant de l'IL10 est plus disséminée. Elle est, en outre, caractérisée par d'importantes zones de nécrose et par un afflux de cellules inflammatoires identifiées comme étant, pour 40 %, des lymphocytes et macrophages et, pour 60 %, des polynucléaires neutrophiles. L'ensemble de nos résultats suggère donc que l'IL10 induit un recrutement local de cellules inflammatoires qui seraient directement impliquées dans le rejet des cellules tumorales produisant cette cytokine. La co-injection, en un même site, de cellules tumorales génétiquement modifiées pour produire de l'IL10 et de cellules parentales induit une perte de tumorigénicité de ces dernières, ce qui démontre que ce n'est pas la modification génétique induite par le vecteur d'expression qui modifie, en elle-même, la tumorigénicité, mais bien la production d'IL10 qu'elle entraîne. A l'opposé, l'injection simultanée, mais controlatérale, de cellules produisant l'IL10 et de cellules parentales reste sans effet sur leur tumorigénicité. Le rôle des lymphocytes T dans la perte de tumorigénicité des cellules transduites a été confirmé par des études faites chez des souris syngéniques déficientes en cellules T. En effet, les cellules de mélanome produisant de l'IL10 s'avèrent tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des souris « nues », à l'opposé donc de ce qui avait été observé chez des souris immunocompétentes. Des expériences de déplétion réalisées *in vivo* sur des souris immunocompétentes ont montré que, contrairement aux lymphocytes T CD4⁺, les cellules CD8⁺ et NK sont deux populations cellulaires participant au rejet de ces cellules. Cette réponse T semble aussi participer à l'installation d'une mémoire immune capable de protéger spécifiquement les animaux contre une injection ultérieure de cellules parentales [20]. Cependant, le mécanisme de l'activité antitumorale de l'IL10 pourrait être différent selon le modèle de tumeur étudié. Une perte de tumorigénicité, similaire à celle que nous avons observée, a en effet été obtenue lors du transfert du gène de l'IL10 dans un modèle de tumeur ovarienne de hamster (cellules CHO) [21]. Dans ce modèle, la tumeur obtenue avec des cellules CHO parentales, chez des souris « nues », est fortement infiltrée par des macrophages, contrairement à la tumeur obtenue avec les cellules CHO qui produisent de l'IL10. Ces résultats suggèrent que l'IL10 pourrait supprimer la croissance de certaines tumeurs en inhibant l'infiltration ou l'activation des macrophages qui, dans ces cas particuliers, joueraient un rôle favorisant le développement tumoral. Par ces activités antitumorales, le gène codant pour l'IL10 rejoint une longue liste de gènes de cytokines qui, lorsqu'ils sont transférés dans différents types de tumeurs, aboutissent à leur rejet [22, 23]. L'activité antitumorale présentée par ces transferts est à la base du développement d'un nombre croissant de protocoles cliniques chez l'homme, proposant cette approche comme traitement du cancer. Le rejet tumoral implique très souvent le recrutement de cellules inflammatoires dont la nature diffère selon le gène de cytokine transféré: lymphocytes CD4⁺, CD8⁺, NK, éosinophiles, neutrophiles, macrophages. Cependant, dans le cas de l'IL10, ce recrutement est surprenant au vu des activités immunosuppressives et anti-inflammatoires de l'IL10, observées essentiellement *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Toutefois, une littérature récente décrit l'IL10 humaine comme un facteur chémo-tactique pour les lymphocytes T CD8⁺ [24] et l'IL10 murine comme un facteur induisant une extravasation leucocytaire [25] et la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ [26]. L'IL10 participe donc à des régulations complexes entre lymphocytes CD4⁺, qu'elle inhibe, et CD8⁺, qu'elle stimule. Le rôle joué par l'IL10 sur les cellules NK est plus difficile à définir. En effet, l'IL10 inhibe, de manière indirecte, la libération d'IFN γ par les cellules NK, laquelle est induite par l'IL12 et le TNF α libérés par les macrophages; cependant, elle n'inhibe pas, et pourrait même potentialiser, l'activité LAK (*lymphocyte activated killer*) de cellules NK induite par l'IL2, activité dont les effets antitumoraux sont bien connus (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 805*) [3].

Une réponse immune anti-tumorale efficace dépend probablement de l'équilibre de sécrétion entre différents facteurs solubles aux effets stimulateurs ou inhibiteurs sur d'autres types cellulaires. En effet, si l'expression du gène codant pour l'IL10 est souvent retrouvée dans des biopsies tumorales, c'est rarement le seul gène exprimé, et, dans certains cas, on retrouve au sein d'une même tumeur l'expression des gènes codant pour l'IL10 et l'IL2 dont les effets sont opposés. De plus, une même cytokine peut avoir des effets différents en fonction des doses sécrétées localement: les quantités d'IL10 dosées dans les surnageants de lignées tumorales sont en effet extrêmement faibles (0,02 à 1 U/ml) comparativement aux quantités sécrétées (20 à 200 U/ml), dans notre modèle, par les cellules tumorales transduites. Ces observations pourraient expliquer l'apparente discordance entre la présence d'IL10 au sein de tumeurs solides qui pourrait favoriser leur développement, et la perte de tumorigénicité de cellules tumorales génétiquement modifiées par le transfert du gène codant pour l'IL10 ■

* ABRÉVIATIONS *

ADCC: antibody dependent cell-dependent cytotoxicity
allo-Ag: *allo-antigène*
ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1
IFN γ : *interféron gamma*
Ig: *immunoglobulines*
IGF-1: insulin-like growth factor-1
IL: *interleukine*
LAK: lymphokine-activated killer cell
M ϕ : *monocyte/macrophage*
NK: *cellule tueuse* (natural killer)
NO: *dérivés nitrés*
PGE2: *prostaglandine E2*
Souris nues: nude mice
TGF β : transforming growth factor beta

Summary

Is interleukin 10 a good or a bad cytokine in a tumor context?

Tumors developed different ways of escaping immune recognition. The ability to release immunosuppressive factors directed against T lymphocytes may be one mechanism of such escape. Interleukin 10 (IL10) has been proposed to be one of these factors, because of its potent immunosuppressive properties on cell-mediated immune responses. Moreover, if the pattern of cytokine gene expression is analyzed within solid tumors, the IL10 gene is one of the most frequently expressed in many different tumor types. This suggests that the IL10 secretion in a tumor microenvironment may play a role in carcinogenesis by preventing an adequate antitumoral immune response. Contrarily to what was hypothesized, the transfer of the IL10 cDNA and its subsequent expression in mouse melanoma cells result in a loss of their tumorigenicity in syngeneic mice. Moreover, a single vaccination with IL10 producing melanoma cells is able to protect the mice against a subsequent challenge with parental cells. Thus, in this tumor model, IL10 seems to be immunostimulatory rather than immunosuppressive, and has a surprising antitumoral activity. It remains to determine if this effect could be generalized to other tumor types and if IL10 is finally a factor favoring the escape of a tumor to the immune system or if it could increase the immunogenicity of a tumor and help its rejection.

TIRÉS À PART

T. Velu.