

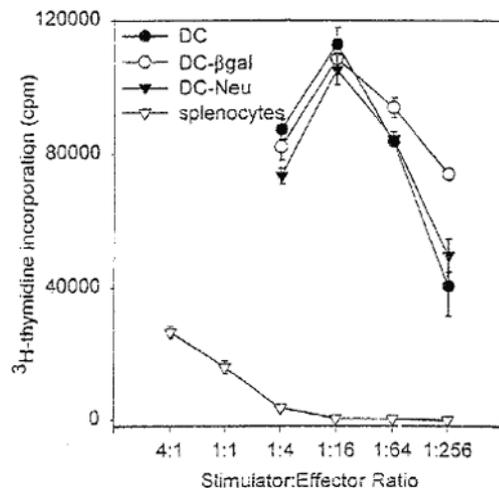
Immunologie des tumeurs ; Thérapeutique immunologique

I.

On utilise dans cet exercice la protéine β -galactosidase comme modèle d'antigène tumoral. On transduit le gène de la β -gal dans des cellules de moelle osseuse de souris BALB/c ($H-2^d$) avec un rétrovirus contenant le gène codant pour LacZ ou le gène codant pour Neu (contrôle négatif). On cultive ensuite les DC en présence de GM-CSF et d'IL-4 de façon à obtenir des cellules dendritiques matures. On teste leur capacité à stimuler des cellules T allogéniques par culture des DC irradiées en présence de cellules T de souris C57BL/6. On la compare à celle de DC non transduites ou de splénocytes de souris BALB/c. Au bout de trois jours, on mesure l'incorporation de thymidine tritiée. On obtient les résultats présentés à la **Figure 1** :

Figure 1

Allogeneic MLR of bone marrow-derived DCs and splenocytes. Bone marrow cells were transduced by coculture with retroviral producer lines, CreLacZ (DC- β -gal) and CreNeu (DC-Neu), and differentiated into DCs *in vitro*. DCs were cocultured with allogeneic, C57BL/6 T cells, isolated from bulk splenocytes by passing cells through an immunoaffinity column. After 3.5 d in culture, cells were pulsed with [3 H]thymidine as described in Materials and Methods. Results from triplicate wells were corrected for [3 H]thymidine incorporation by irradiated stimulators and T cells alone, and are plotted as the mean \pm SEM.

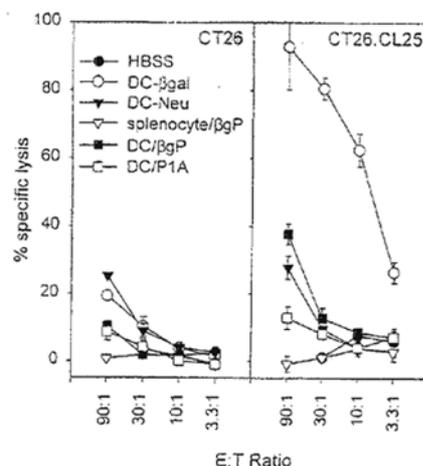


Question 1. Que concluez-vous ?

On teste ensuite la capacité des DC à induire des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) *in vivo*. Pour cela on injecte à des souris BALB/c aux jours 0 et 3 soit des DC pulsées avec le peptide 876-884 de la β -gal (β -gal pep) ou avec un peptide contrôle P1A présenté sur L^d , soit des DC transduites β -gal (ou Neu), soit des splénocytes préalablement incubés en présence de β -gal pep. Trois semaines plus tard on prélève les splénocytes des souris et on les stimule *in vitro* avec β -gal pep. Au jour 7, on mesure l'activité cytotoxique des cellules vis-à-vis de cellules tumorales transfectées avec LacZ (CT26.CL25) ou non transfectées (CT26) et marquées au ^{51}Cr . On obtient les résultats présentés à la **Figure 2** :

Figure 2

Lysis of tumor targets by CTLs from mice immunized with transduced (DC- β -gal and DC-Neu) or peptide-pulsed DCs (DC- β gP and DC-P1A) or peptide-pulsed splenocytes (splen- β gP). Splenocytes from immunized animals were harvested, restimulated *in vitro* for 7 d with the L^d -restricted β -gal peptide₈₇₆₋₈₈₄, and mixed in graduated doses with 5×10^3 ^{51}Cr -labeled target cells. Cells were incubated for 4 h at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator. ^{51}Cr released from the lysed target cells was measured. Results are plotted as the mean percent specific lysis \pm SEM.



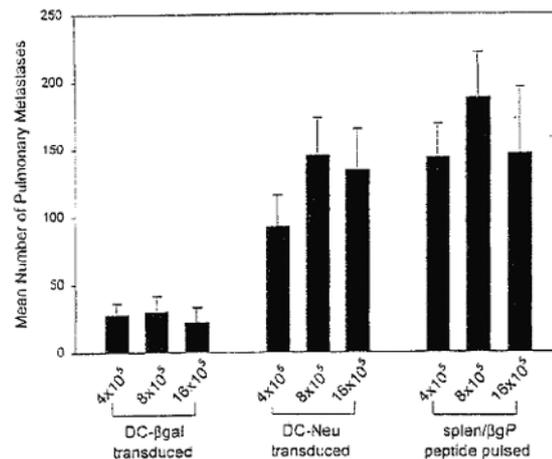
Question 2. Que concluez-vous ?

Question 3. Quel type de présentation antigénique peuvent intervenir dans ce modèle de DC transduites ?

On étudie ensuite la capacité des DC à inhiber l'apparition des métastases pulmonaires chez des souris BALB/c injectées avec des cellules de cancer du colon transfectées avec LacZ (CT26.CL25). Pour cela on injecte les cellules tumorales au jour 0 par voie intraveineuse, les DC au jour 3 et 6 et on mesure le nombre de métastases pulmonaires au jour 12. On obtient les résultats présentés à la **Figure 3** :

Figure 3

BALB/c mice were challenged with 3×10^5 CT26.CL25 tumor cells. On days 3 and 6 after tumor challenge, mice received intravenous injections of transduced DCs or fresh peptide-pulsed splenocytes at varying doses ($\pm 16 \times 10^5$). On day 12 after tumor challenge, lungs were harvested and pulmonary nodules were enumerated in a blinded fashion.



Question 4. Que concluez-vous ?

Question 5. Quels sont les mécanismes qui peuvent expliquer l'activité des DC à empêcher la formation de métastases ?

Question 6. Pourquoi les DC sont-elles plus actives que les splénocytes ?

II. Etude de cas

(d'après *Case studies in immunology: A clinical companion*. 1996. F.S. Rosen and R.F. Geha, Current Biology Ltd/Garland Publishing)

Les tumeurs malignes résultent de la croissance d'une cellule transformée. Les tumeurs malignes qui résultent de la croissance de lymphocytes B peuvent survenir à toutes les étapes de développement de la lignée B (**Figure 4**). Ces cellules B malignes expriment alors le même marqueur clonotypique d'immunoglobuline issue du même réarrangement, soit à leur surface soit secrété en tant qu'anticorps monoclonal.

Les cellules malignes plasmacytaires causent une maladie appelée myélome multiple. C'est une maladie des os parce que les tumeurs se développent dans la moelle osseuse. Au fur et à mesure que les masses tumorales s'étendent, elles entraînent des érosions locales de l'os et l'apparition sur les radiographies de lésions osseuses multiples (**Figure 5**).

Ces myélomes sécrètent des quantités énormes d'immunoglobuline monoclonale, d'isotypes IgG ou IgA, rarement IgD ou IgE isotype, de chaînes légères κ ou λ . Les cellules plasmacytaires malignes synthétisent généralement davantage de chaînes légères que des chaînes lourdes, si bien que l'excès de chaînes légères est excrété dans les urines en quantité importante. En 1846, le Docteur Charles

McIntyre, un médecin londonien, rendant visite à un marchand de fruits et légumes, observe un homme malade dépérissant avec maladie des os fragilisés ; il lui vient à l'esprit que cet homme perd peut-être des quantités excessives de protéine ('animal matter') dans son urine. Il a prélevé un spécimen d'urine et constate que un précipité se forme dans l'urine entre 45 et 60°C qui se dissout après chauffage jusqu'au point d'ébullition. Le jour suivant, il envoie un spécimen de cette urine au Docteur Henry Bence-Jones, professeur de Chimie Clinique au Guy's Hospital, avec une description des caractéristiques étranges de cette protéine et lui demande ce que peut être cette protéine. On appelle depuis cette protéine, protéine de Bence-Jones. Il faudra plus de 100 ans pour répondre à la question et finalement démontrer qu'il s'agit d'immunoglobulines.

Name of tumor	Normal cell equivalent	Location
Chronic lymphocytic leukemia	CD5 B cell	Blood
Acute lymphoblastic leukemia	Lymphoid progenitor	Bone marrow and blood
Pre-B-cell leukemia	Pre-B-cell	
Follicular-center-cell lymphoma Burkitt's lymphoma	Mature B cell	Periphery
Waldenström's macroglobulinemia	IgM-secreting B cell	Bone marrow
Multiple myeloma	Plasma cell Various isotypes	

Figure 4

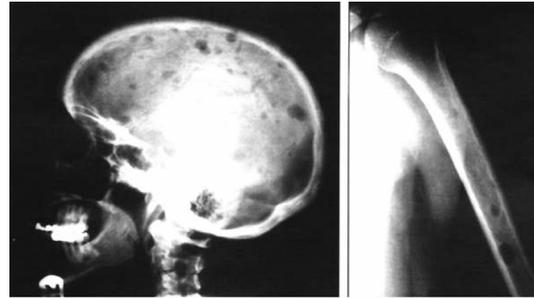


Figure 5

Le cas d'Isabel Archer : conséquences de la croissance non contrôlée d'un clone de cellule B producteur d'anticorps.

Isabel Archer était une ménagère de 55 ans en 1989, quand elle a commencé à éprouver une fatigue excessive. Elle avait été en bonne santé sa vie entière. Son mari de 57 ans était aussi en bonne santé, comme l'étaient leurs trois fils. Au moment d'un contrôle de routine, elle signale à son médecin comment est apparu cet état de fatigue inhabituel. Le médecin ne trouve aucune anomalie au niveau de l'examen physique.

Une analyse sanguine révèle qu'elle présente une légère anémie ; sa numération des globules rouges était de $3,5 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ (normal : $4,2-5,0 \cdot 10^6/\mu\text{l}$). Son compte de leucocytes était de $3600/\mu\text{l}$ (normal : $5000/\mu\text{l}$). Le taux de sédimentation des globules rouges, supérieur à la normale, pouvant révéler un taux élevé de fibrinogène ou d'IgG, son taux d'IgG sériques est mesuré : la concentration d'IgG trouvée, 3790 mg/dl, est bien supérieure à la normale (600-1500 mg/dl), au contraire de celle des IgA (14 mg/dl vs. normale 150-250 mg/dl) et celle des IgM (53 mg/dl vs. normale 75-150 mg/dl). Une électrophorèse des protéines sériques révèle la présence d'une protéine monoclonale, qui s'avère être une IgG, κ (Figure 6). Les radiographies osseuses ne montrent pas d'anomalie. Aucun traitement n'est recommandé.

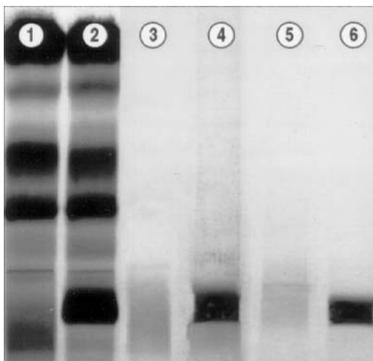


Figure 6 :

Profil électrophorétique d'un sérum normal (1) et du sérum de Mme Archer (2). L'électrophorèse est réalisée à nouveau avec le sérum normal (3&5) et le sérum de Mme Archer (4&6) et les protéines sont révélées après marquage avec un anticorps dirigé contre les chaînes γ (3&4) ou un anticorps dirigé contre les chaînes κ (5&6). On ne note pas de réactivité du sérum de Mme Archer vis-à-vis d'un anticorps dirigés contre les chaînes λ .

Mme Archer est retournée régulièrement chez son médecin qui, à chaque occasion, a mesuré son taux d'IgG sériques remarquant une augmentation graduelle : 4520 mg/dl en avril 1991, 5100 mg/dl en

janvier 1992. En novembre 1992, son anémie avait empiré et son compte de globules rouges était tombé à $3,0 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ et sa numération leucocytaires à $2600/\mu\text{l}$.

En décembre 1992, Mme Archer a soudainement éprouvé une douleur dorsale supérieure. Elle a été adressée à un radiologiste qui a exécuté une radiographie de l'épine thoracique ainsi qu'un scanner en résonance magnétique. Il a identifié une destruction du deuxième corps vertébral thoracique avec extrusion d'un plasmocytome comprimant la moelle épinière. Mme Archer a été traitée par des corticostéroïdes, du decadron et une radiothérapie. Ses symptômes se sont améliorés. Cependant, son taux d'IgG sériques a encore augmenté (6312 mg/dl) et elle a dû subir une transfusion sanguine à cause de l'aggravation de l'anémie. Elle a été traitée par melphalan et prednisone.

En avril 1993, elle a reçu une nouvelle chimiothérapie à cause de l'élévation persistante de son taux d'IgG sériques. Elle a été traitée pendant 9 mois avec vincristine, adriamycine et decadron et son taux d'IgG sériques est tombé de 6785 mg/dl à 5308 mg/dl. Quand son taux d'IgG sériques est remonté à 8200 mg/dl, elle a été traitée par cyclophosphamide, etoposide et decadron, ce qui a réduit son taux d'IgG sériques à 6000 mg/dl.

En février 1995, Mme Archer a développé une forte fièvre et une douleur de poitrine. La radiographie thoracique a révélé qu'elle était atteinte de pneumonie du lobe inférieur du poumon gauche. Elle a été traitée avec succès par des antibiotiques. Elle a de nouveau éprouvé une forte fièvre accompagnée de douleurs de poitrine en mai 1995.

Elle a alors été admise en unité de soins intensifs en raison de son hypotension et a reçu un traitement antibiotique et des stimulateurs cardiaques pour relever sa tension. Une infection par *Streptococcus pyogenes* a été diagnostiquée. Elle s'est remise de cet épisode et reste entièrement active, même si elle exige des transfusions sanguines occasionnelles pour son anémie et se plaint de temps en temps de douleurs osseuses. Son taux d'IgG sériques est stable à 6200 mg/dl.

Isabel Archer présente beaucoup, sinon la plupart, des symptômes de myélome multiple. Le myélome multiple est une tumeur très maligne résistante à la plupart des chimiothérapies. Le melphalan, administré à Mme Archer, est une des rares drogues de chimiothérapie efficaces dans le traitement de cette maladie. Bien que Mme Archer paraissent en relativement bonne santé, sa perspective de survie est très faible.

- Question 1.** *Les IgG sériques de Mme Archer ont été supposées monoclonales en raison du profil électrophorétique resserré (Figure 6) et de la réactivité vis-à-vis des anticorps anti- κ , mais pas anti- λ . Quelles autres preuves pourraient étayer l'hypothèse de la monoclonalité de cette IgG ?*
- Question 2.** *Mme Archer est devenue anémique (faible taux de globules rouges) et neutropénique (faible taux leucocytaire). Pour quelle raison ?*
- Question 3.** *Au fur et à mesure que sa maladie a progressé, Mme Archer est devenue susceptible aux infections pyogéniques, en particulier les deux épisodes rapprochés de pneumonie. Quelle est la raison de cette susceptibilité accrue aux infections ?*
- Question 4.** *On pourrait penser qu'il serait utile d'administrer des γ -globulines intraveineuses à Mme Archer pour la protéger de ces infections. Pourquoi ce traitement serait-il moins efficace que dans le cas d'une agammaglobulinémie liée à l'X ?*

Question 5. Une immunoglobuline sérique monoclonale est appelée « composant M » (pour myélome). Est-ce que la présence d'un « composant M » dans le sérum est nécessairement indicateur d'un myélome multiple ?

Question 6. Très rarement, un individu atteint de myélome multiple présente deux « composants M » dans le sang. Bien que ces deux « composants M » utilisent des régions constantes différentes, ils partagent la même région variable. Pouvez-vous formuler une hypothèse ?

III.

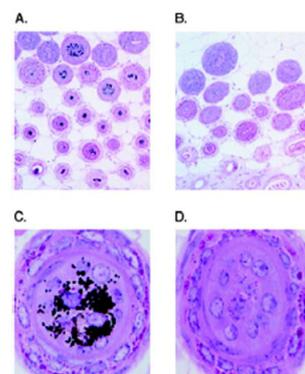
(d'après Overwijk et coll. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2982-2987 ; Xiang et coll. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5492-5497 ; Janetzki et coll. (2000) *Int. J. Cancer*, 88, 232-238)

De nombreux antigènes tumoraux humains ou murins sont en réalité des antigènes normalement exprimés au cours de la différenciation. Le système immunitaire est par conséquent a priori tolérant vis-à-vis de ces antigènes, considérés comme antigènes du soi. Les expériences suivantes visent à décrire des stratégies vaccinales ayant pour but d'induire une réponse immunitaire contre de tels antigènes exprimés à la surface de tumeurs, ainsi que les conséquences sur la tolérance.

Des souris de pelage noir sont vaccinées avec un virus de vaccine recombinant exprimant l'antigène TRP-1 (rVVmTRP-1), un antigène de différenciation des mélanocytes, ou un antigène contrôle LacZ (rVVLacZ). Les souris vaccinées par rVVmTRP-1 présentent une dépigmentation du pelage similaire à celle observée chez des patients atteints de mélanomes et traités par l'IL-2 qui développent un vitiligo, une maladie auto-immune de la peau caractérisée par une perte de la pigmentation suite à la destruction des mélanocytes. Une analyse histologique de la peau des souris vaccinées par rVVmTRP-1 ou rVVLacZ est montrée sur la **Figure 7** :

Figure 7 :

Immunization with rVVmTRP-1 induces destruction of cutaneous melanocytes. Mice were vaccinated twice with rVVmTRP-1 (B and D) and developed a patchy and permanent loss of coat color pigmentation. Histologic comparison is with mice receiving control virus rVVLacZ twice (A and C). [Magnifications: x10 (A and B) and x100 (C and D).]



Les souris ainsi vaccinées sont testées pour leur susceptibilité au développement d'une tumeur de mélanome (B16). Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.

Le sérum de souris « normales », ou déficientes en molécules du CMH de classes I ou II, de même fonds génétique, vaccinées par rVVmTRP-1 ou rVVLacZ, est ensuite testé vis-à-vis de lysats cellulaires de la tumeur B16 ; les résultats sont présentés sur la **Figure 9**.

L'effet protecteur contre le développement de la tumeur B16 chez les souris vaccinées par rVVmTRP-1 est à nouveau testé chez des souris déficientes en molécules du CMH de classes I ou II. Les résultats sont présentés sur la **Figure 10**.

Question 1. Analysez et interprétez l'ensemble de ces résultats

Figure 8 :

Immune responses to the normal melanocyte antigen mTRP-1 can prevent melanoma growth. Mice vaccinated with 2.10^7 plaque-forming units of either rVVLacZ or rVVmTRP-1 and boosted 3 weeks later were challenged with 1.10^5 B16 s.c. after an additional 3 weeks. Mice receiving rVVmTRP-1 developed vitiligo and completely rejected tumor challenge. The experiment was repeated three times with similar results.

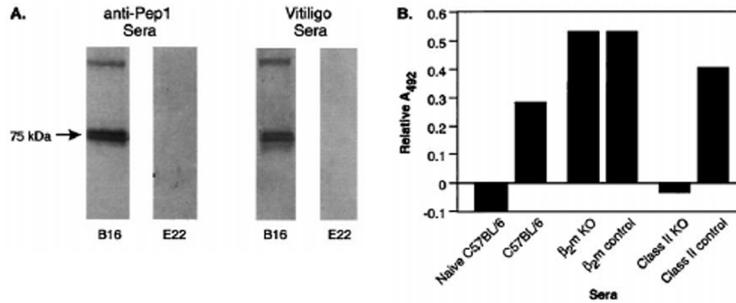
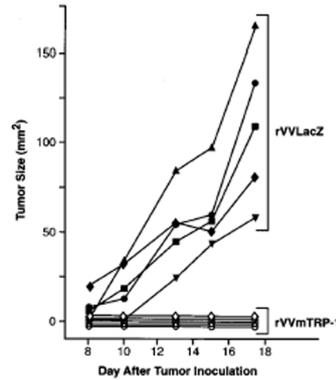


Figure 9 :

Sera from mice immunized with rVVmTRP-1 recognizes mTRP-1 in melanoma cells. (A) Lysates from B16 melanoma (lanes 1 and 3) and E22 thymoma cells (lanes 2 and 4) were subjected to SDS-PAGE, and stained with the mTRP-1 peptide-specific rabbit sera, αPEP1 (lanes 1 and 2), or sera from depigmented mice vaccinated twice with rVVmTRP-1 (lanes 3 and 4). Both sera specifically detected a 75-kDa TRP-1 band in lysate from B16 tumor, but not in lysate from TRP-1 negative E22 control tumor. (B) Induction of mTRP-1-specific antibodies depends on CD4⁺ T lymphocytes. MHC class II knockout mice, β2m knockout mice, and nontransgenic litter mates were immunized with 2.10^7 plaque-forming units of either rVVLacZ or rVVmTRP-1 and boosted 3 weeks later. Sera from each group of mice were tested by ELISA. Nonspecific absorption of sera from mice immunized twice with rVVLacZ was subtracted. The experiment was repeated twice with similar results.

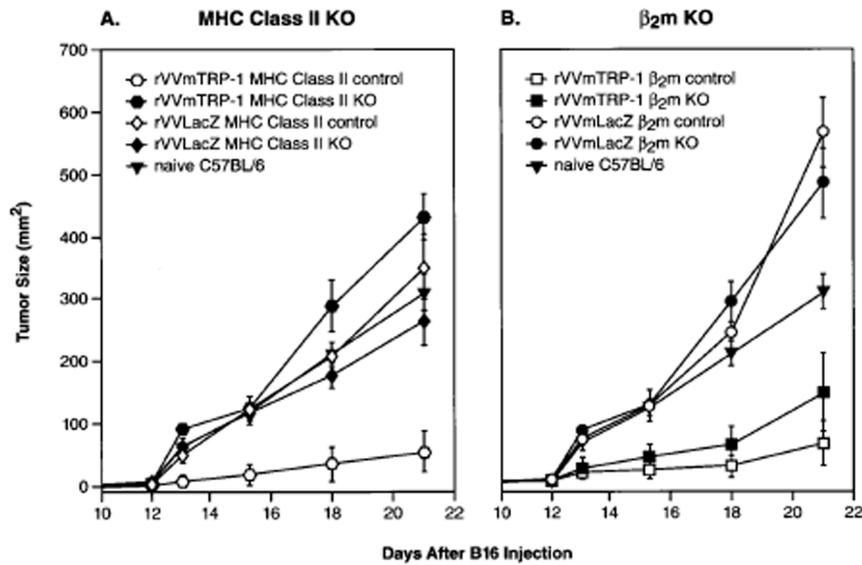


Figure 10 :

β2m knockout mice, MHC class II knockout mice, or respective nontransgenic litter mates were immunized with 2.10^7 plaque-forming units of either rVVLacZ or rVVmTRP-1, boosted 3 weeks later and challenged with 1.10^5 B16 s.c. after an additional 3 weeks. MHC class II knockout mice never developed vitiligo after immunization with rVVmTRP-1 when nontransgenic littermates did (A). In the same experiment, both β2m knockout mice and nontransgenic littermates receiving rVVmTRP-1 developed vitiligo (B).

Une autre stratégie de vaccination est mise en œuvre afin d'induire une réponse immunitaire contre la lignée de mélanome B16. Des bactéries *Salmonella typhimurium* atténuées sont transfectées avec un plasmide porteur de différentes constructions de vaccin ADN. *S.typhimurium* est ici utilisée comme vecteur pour délivrer l'ADN plasmidique dans les macrophages infectés.

10^8 bactéries ainsi transfectées par des constructions plasmidiques codant les épitopes d'antigènes de mélanocyte gp100₂₅₋₃₃ et TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ de souris (pUb-M) ou humain (pUb-H) sont ajoutées à l'alimentation des souris trois fois à deux semaines d'intervalle. On précise que les épitopes gp100₂₅₋₃₃ de souris (EGSRNQDWL) et humain (KVPRNQDWL) sont présentés par H-2D^b; les épitopes TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ de souris (VYDFFVWL) et humain (VYDFFVWL) sont présentés par H-2K^b. Les souris sont alors soumises à l'injection de 10^5 cellules de la lignée de mélanome B16. Les résultats sont présentés sur la **Figure 11**.

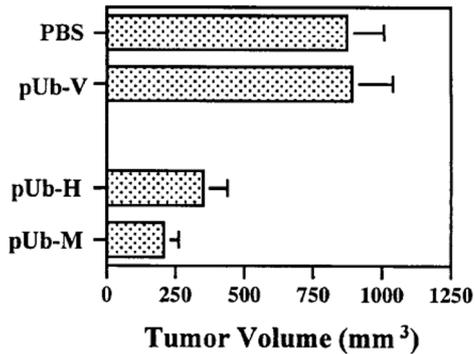


Figure 11

Induction of tumor-protective immunity. C57BL/6J mice (n=8) received three vaccinations of 10^8 attenuated *S. typhimurium* harboring DNA vaccines by oral gavage at 2-week intervals. Experimental groups were immunized with vaccines encoding murine gp100₂₅₋₃₃ and TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ peptide epitopes (pUb-M), human gp100₂₅₋₃₃ and TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ epitopes (pUb-H). Control groups of mice (n=8) included those treated with PBS or a vaccine containing only the empty vector (pUb-V). Mice were challenged with 1.10^5 B16 murine melanoma cells 1 week after the final vaccination. Bars represent means and standard deviations of eight mice per group. Differences in tumor volume between experimental groups treated with either pUb-M or pUb-H and all control groups were statistically significant ($P < 0.01$).

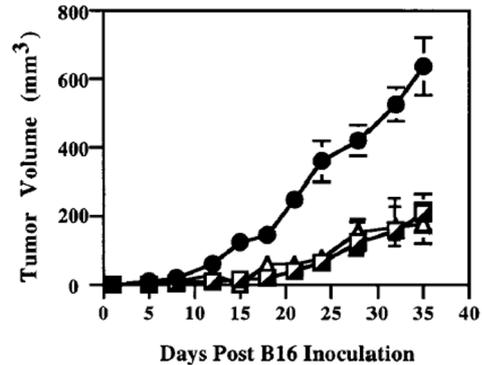


Figure 12

Horizontal transfer of tumor immunity by adoptive transfer of T lymphocytes. CD8⁺ T cells were isolated from C57BL/6J mice successfully immunized with pUb-M DNA vaccine or pUb-V empty vector control. All donor animals were killed 1 week after tumor cell challenge, and their CD8⁺ T cells were isolated from their pooled splenocyte suspensions. At 48h before *i.v.* challenge with 1.10^5 wild-type B16 cells, naïve syngeneic SCID mice were reconstituted with a total of $4.5.10^7$ CD8⁺ T cells by *i.v.* injection of $1.5.10^7$ T cells on days 23, 21, and 13. Tumor growth was analyzed in mice receiving CD8⁺ T cells either from animals vaccinated with pUb-M (■) or pUb-H (▲) or from mice vaccinated with the empty vector control (●). Tumor growth was determined by microcaliper measurements, and tumor volume was calculated according to $0.5 \times \text{width}^2 \times \text{length}$.

Le rôle des lymphocytes CD8⁺ dans la protection contre la croissance de la tumeur de mélanome est testé dans une expérience de transfert à des souris *scid*. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la **Figure 12**. La fonction des cellules CD8⁺ est ensuite déterminée dans un test de cytotoxicité *in vitro* (**Figure 13**) et par dosage de l'IFN- γ sécrété (**Figure 14**).

Question 2. Analysez et interprétez les résultats de cette deuxième série d'expériences

Question 3. Comparez les résultats des deux séries d'expériences

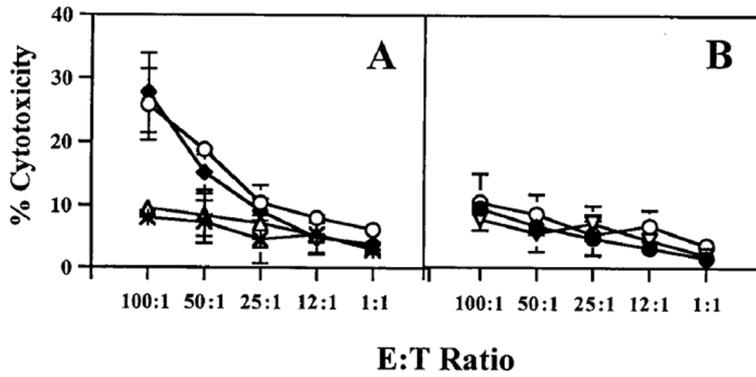


Figure 13

Cytotoxicity induced by CD8⁺ T cells of C57BL/6J mice against murine B16 melanoma cells after immunization with DNA vaccines encoding melanoma-specific epitopes. Splenocytes were isolated 1 week after the third vaccination, and CD8⁺ T cells were analyzed for their lytic activity in a 4-h ⁵¹Cr-release assay at different effector-to-target cell ratios (E:T) ratios.

(A) Specific lysis mediated by CD8⁺ T cells from different experimental groups of mice: pUb-H (○), pUb-M (◆), empty vector pUb-V (△), and PBS (*).

(B) Lysis mediated by CD8⁺ T cells was blocked by anti-MHC class I antibody (H-2K^b/D^b) after immunization with the pUb-M (◆) and pUb-H (○) DNA vaccines. Nonspecific syngeneic prostate cancer target cells (TRAMP-C1) were not lysed by pUb-M-specific CD8⁺ T cells (▽).

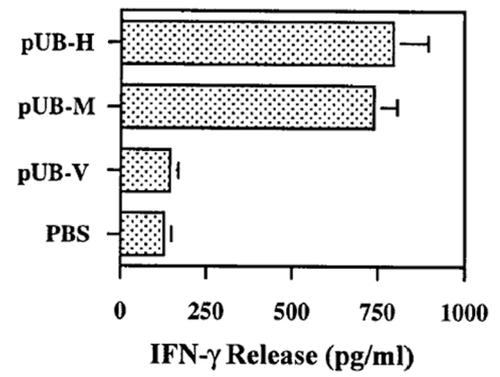


Figure 14

Cytokine release by CD8⁺ T cells isolated from splenocytes of C57BL/6J mice treated with DNA vaccines. Release of IFN-γ by CD8⁺ T cells isolated from splenocytes of C57BL/6J mice was measured by solid-phase sandwich ELISA. Splenocytes were obtained from mice immunized with either pUb-H or pUb-M DNA vaccines and from control mice treated with either PBS or the empty vector (pUb-V). Bars represent means and standard deviations of eight mice per group. Differences in IFN-γ release observed between experimental groups treated with either pUb-M or pUb-H and all control groups were statistically significant (P < 0.01).

Le principe de vaccination par un antigène du soi pour induire une réponse anti-tumorale est appliqué dans un essai clinique chez l'homme. Les protéines HSP (*heat shock protein*) gp96 ont été isolées à partir de biopsies tumorales chez 16 patients atteints de tumeurs avancées réfractaires à la thérapie recommandée. Ces patients ont été immunisés, quatre fois à une semaine d'intervalle, de manière sous-cutanée, avec 25 µg de protéine gp96 autologue. Les caractéristiques cliniques des patients sélectionnés sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 :

Patients immunized with autologous tumor-derived gp96 preparations. Status of patients as of October 1999 is shown.

Patient	Age (years)	Sex	Tumor type and stage	Tumor volume used for vaccine (ml)	Toxicity	Clinical course of disease
AA	65	F	Pleural mesothelioma, stage III	8.5	None	Progression, death 14 months after immunization
AB	64	F	Pancreatic carcinoma, stage IV	4	Pain (G1), Fever (G1)	Progression, death 11 weeks after immunization
AC	71	F	HCC, stage III Breast carcinoma, stage IV	3 5	None Hot flashes (G1) Hyperuricemi + Hyperpotassemia (G4) Kidney failure (G2)	Tumor necrosis to ,50% of original size Progression, death 3 weeks after immunization for breast cancer
AD	53	F	Adenocarcinoma of sigmoid colon, stage IV	22.5	Hot flashes (G1)	Disease-free since surgery (4 years), alive to date
AE	56	M	Poorly differentiated HCC, stage IV	5	None	Dropped out after 2 nd immunization
AF	39	M	Rectal carcinoma, stage IV	5	Pain (G1)	Progression, death 27 weeks after immunization
AG	48	M	Signet-cell carcinoma of cecum, stage IV	1	None	Progression, death 25 weeks after immunization
AH	42	F	Follicular thyroid cancer, stage IV	4	Hot flashes (G1)	Disease stabilization for 7 months, followed by progression, death 28 months after immunization
AI	32	F	Adenocarcinoma of transverse colon, stage IV	11	None	Progression, death 11 months after immunization
AJ	33	M	HCC, stage IVB	2	None	Disease-free for .2 years; reoccurrence; alive to date
AK	69	F	Poorly differentiated papillary thyroid cancer, stage IVB	3	None	Stabilization of disease for 13 weeks, followed by progression; alive to date
AL	53	M	Poorly differentiated adenocarcinoma of rectum, stage IV	8	None	Death after 2 nd immunization

Tableau 1 :

Patients immunized with autologous tumor-derived gp96 preparations. Status of patients as of October 1999 is shown.

Patient	Age (years)	Sex	Tumor type and stage	Tumor volume used for vaccine (ml)	Toxicity	Clinical course of disease
AM	25	F	Signet-cell carcinoma of stomach, stage IV	8	Neutropenia (G1)	Stabilization of disease for 6 months, followed by clinical signs of progression, death 11 months after immunization
AN	66	M	Adenocarcinoma of transverse colon, stage IV	10	Neutropenia (G1)	Stabilization of disease for 6 months, followed by progression, death 11 months after immunization
AO	56	F	Poorly differentiated adenocarcinoma of endometrium, stage IV	3	None	Progression, death 8 months after immunization
AP	71	F	Anaplastic thyroid cancer	8	None	Progression, death 19 weeks after immunization

L'activité anti-tumorale des cellules CD8⁺ est analysée au cours de l'essai par la technique Elispot pour l'IFN- γ comme présenté dans le **Tableau 2** et sur la **Figure 15**.

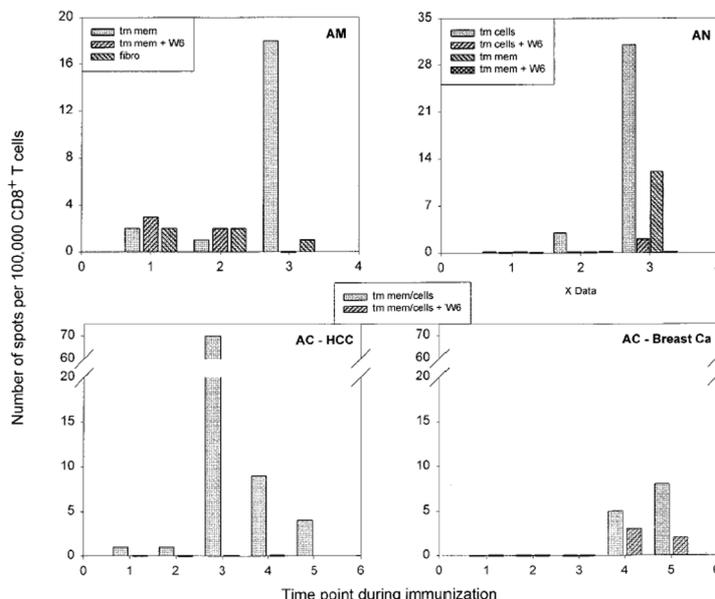
Tableau 2 : Anti-tumor reactivity of CD8 cells from 12 patients immunized with autologous, tumor-derived gp96 preparations as determined by IFN- γ Elispot assay¹

Patient	Stimulator	Number of spots per 100,000 CD8 ⁺ T cells in wells with			
		CD8 ⁺ cells alone	CD8 ⁺ + stimulator	CD8 ⁺ + stimulator + W6/32	CD8 ⁺ + fibroblasts
AA	Tumor cells	0-0-0	2-2-3	0-0-0	ND
AB	Tumor cell membranes	2-0-2	0-2-0	2-2-0	ND
AC	Tumor cell membranes (HCC)	1-0-0-1-2	2-1-70-10-6	0-0-0-0-0	ND
	Tumor cells (breast carcinoma)	1-0-0-1-2	0-0-0-6-10	0-0-0-3-2	ND
AD	Tumor cell membranes	0-0-0	1-1-0	0-0-0	ND
AF	Tumor cell membranes	2-0-0	1-0-0	0-0-2	ND
AG	Tumor cell membranes	2-6-7	3-4-7	8-7-7	ND
AH	Tumor cells	3-3-0	1-10-3	1-2-3	ND
AI	Tumor cells	0-ND-0	0-ND-6	0-ND-0	0-ND-0
AJ	Tumor cell membranes	1-0-0	0-0-3	0-0-1	ND
AK	Tumor cell membranes	0-2-1	0-6-2	0-0-2	ND
AM	Tumor cell membranes	0-1-0	2-2-18	3-3-0	2-3-1
AN	Tumor cell line	1-1-4	1-4-35	0-1-6	ND
	Tumor cell membranes	1-1-4	1-0-16	0-1-1	ND

¹Values represent the mean of triplicate determinations of spots per 100,000 CD8⁺ T cells in time-dependent order (first value 5 mean spot number before first immunization; second value 5 mean spot number before third immunization; third value 5 mean spot number 2 weeks after fourth immunization; fourth and fifth values are shown for patient AC as she was immunized with gp96 from 2 different primary tumors). Mean values were rounded. In patient AN, 2 different stimulators were used. Patient AC was tested against 2 different tumors as indicated. ND, not determined. W6/32 is an anti-HLA class I antibody.

Figure 15 :

Tumor-specific CD8⁺ responses measured by an IFN- γ Elispot assay. Results from patients with strong response to tumor antigens are shown (patients AM, AN, AC). Control wells with medium alone, cancer cells or membranes alone, W6/32 anti-HLA class I antibody alone or cancer cells or membranes with W6/32 antibody alone had no spots/well. Time points are (1) before first immunization, (2) before second immunization, (3) 2 weeks after third immunization (patients AM, AN; upper panel). In patient AC (lower panel), these time points refer to immunization with HCC-derived gp96, whereas (4) is before the third immunization and (5) is 2 weeks after the third immunization with breast cancer-derived gp96. Background spots (CD8 alone) were subtracted. Stimulators used in each patient are indicated.



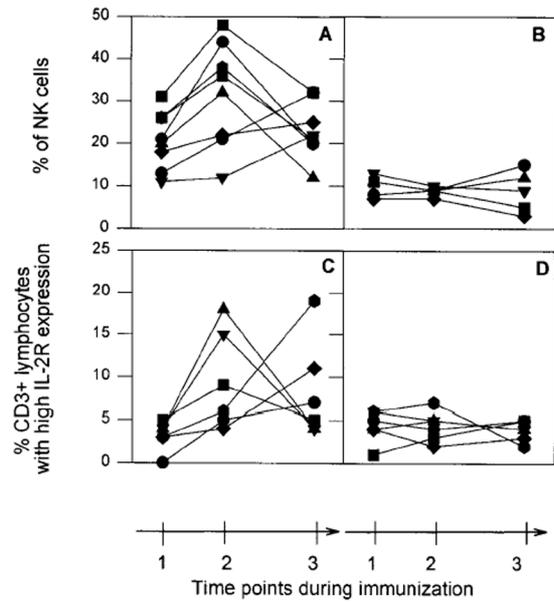
Enfin le pourcentage de cellules NK ainsi que le pourcentage de cellules CD3⁺ exprimant un fort taux de IL-2R est mesuré chez ces patients. Les résultats sont présentés sur la **Figure 16**.

Figure 16

General immunological parameters of gp96-immunized patients before the first immunization (1), before the third immunization (2) and 2 weeks after the fourth immunization (3).

(a,b) NK cells in the peripheral blood of 13 immunized patients. Numbers of NK cells, as determined by expression of surface markers CD16 and CD57, are shown as percentage of total lymphocytes. Eight patients showed a significant increase of NK cells above normal levels upon immunization ($p=0.00015$, a). In 5 patients, no changes above normal values were observed (b).

(c,d) Number of lymphocytes with high expression of IL-2 receptor in the peripheral blood of immunized patients. The parameter was determined in 12 patients. Six patients (c) showed a significant increase of lymphocytes with high IL-2 receptor expression upon immunization ($p=0.003$), though none showed an increase above normal levels. Six patients (d) showed no significant change.



Question 4. Analysez et interprétez ces résultats

Question 5. Cette stratégie de thérapie anti-tumorale vous paraît-elle prometteuse ?