

Immunologie des tumeurs ; Thérapeutique immunologique

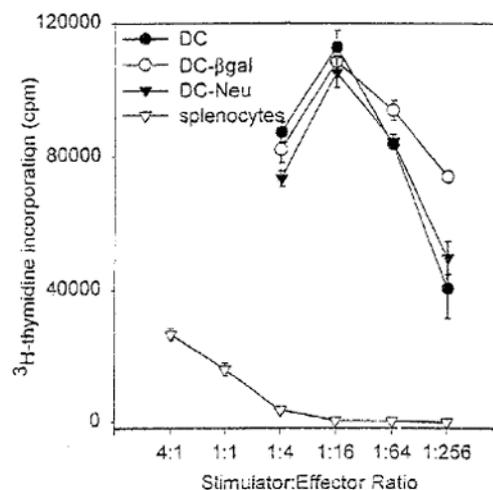
I.

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 immatures. 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 [³H]thymidine as described in Materials and Methods. Results from triplicate wells were corrected for [³H]thymidine incorporation by irradiated stimulators and T cells alone, and are plotted as the mean \pm SEM.

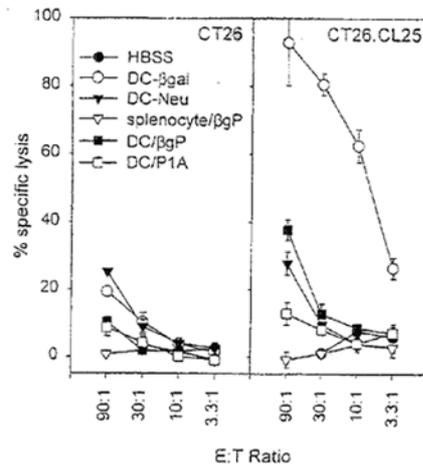


Question 1. Que concluez-vous ?

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, tous deux présentés 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 ⁵¹Cr. 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-βgP and DC-P1A) or peptide-pulsed splenocytes (splen-βgP). Splenocytes from immunized animals were harvested, restimulated in vitro for 7 d with the L⁴-restricted β-gal peptide₈₇₁₋₈₈₄, and mixed in graduated doses with 5×10^3 ⁵¹Cr-labeled target cells. Cells were incubated for 4 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. ⁵¹Cr released from the lysed target cells was measured. Results are plotted as the mean percent specific lysis ± SEM.



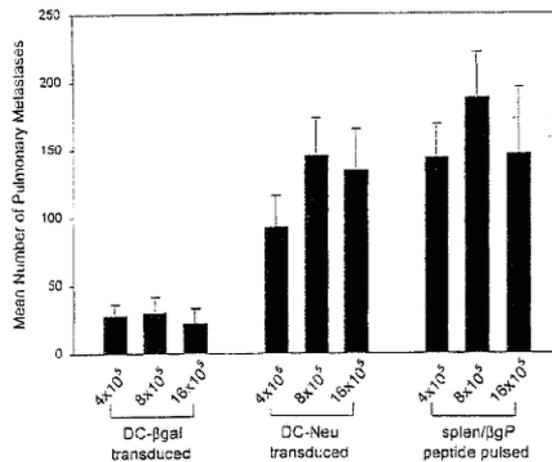
Question 2. Que concluez-vous ?

Question 3. Quel types 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 ($4-16 \times 10^5$). 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.

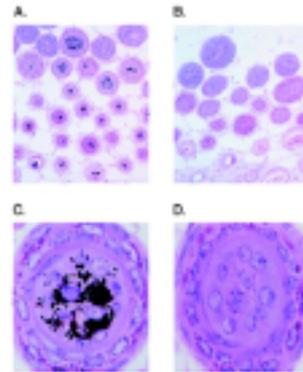
(d'après Overwijk et coll. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2982-2987 ; Xiang et coll. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5492-5497 ; Janetzki et coll. (2000) *Int. J. Cancer*, 88, 232-238)

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 4** :

Figure 4 :

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 5**.

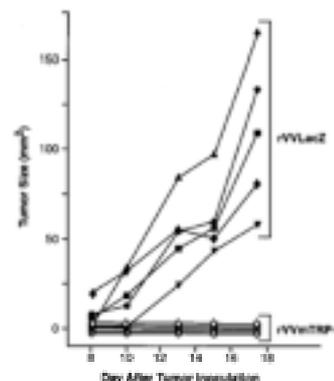
Le sérum de souris « normales », ou déficientes en molécules du CMH de classes I ou II, de même fonds génétique, vaccinées par rVVmTRP-1 ou rVVLacZ, est ensuite testé vis-à-vis de lysats cellulaires de la tumeur B16 ; les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

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 7**.

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

Figure 5 :

Immune responses to the normal melanocyte antigen mTRP-1 can prevent melanoma growth. Mice vaccinated with $2 \cdot 10^7$ plaque-forming units of either rVVLacZ or rVVmTRP-1 and boosted 3 weeks later were challenged with $1 \cdot 10^5$ 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.



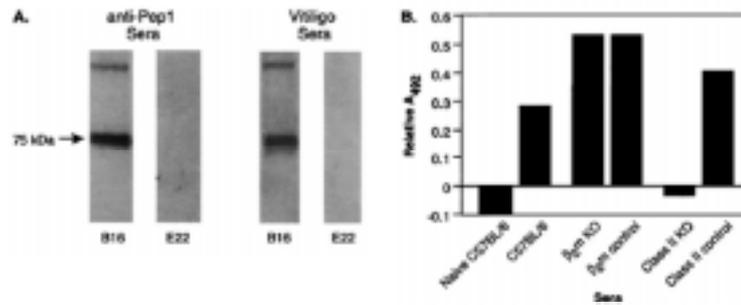


Figure 6 :

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, α PEP1 (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, $\beta 2m$ 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.

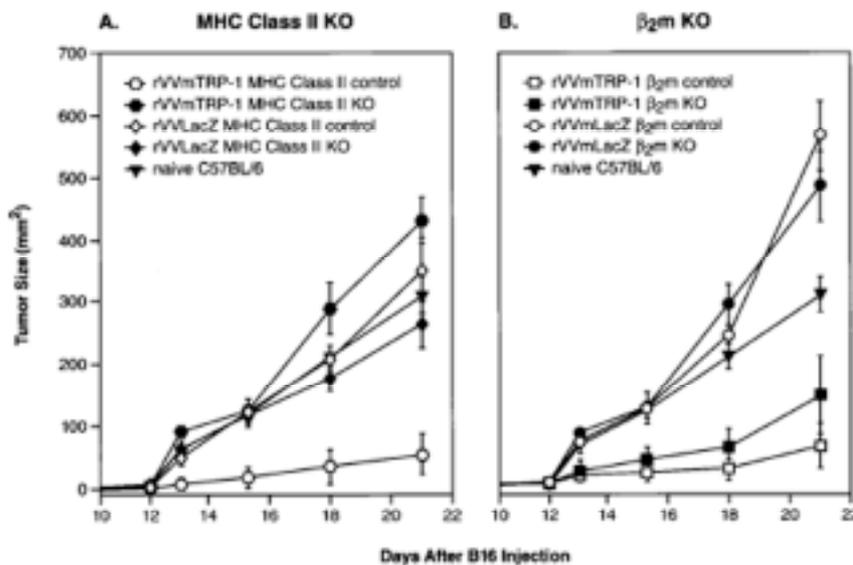


Figure 7 :

$\beta 2m$ 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 $\beta 2m$ 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 8.

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 9**. La fonction des cellules CD8⁺ est ensuite déterminée dans un test de cytotoxicité *in vitro* (**Figure 10**) et par dosage de l'IFN- γ sécrété (**Figure 11**).

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

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

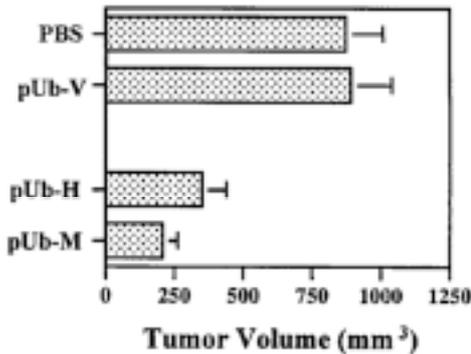


Figure 8

Induction of tumor-protective immunity. C57BL/6J mice (n=8) received three vaccinations of 10⁸ 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 1.10⁵ 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).

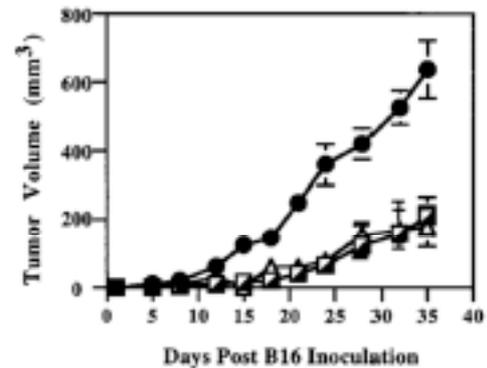


Figure 9

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 1.10⁵ wild-type B16 cells, naïve syngeneic SCID mice were reconstituted with a total of 4.5.10⁷ CD8⁺ T cells by *i.v.* injection of 1.5.10⁷ 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 x width² x length.

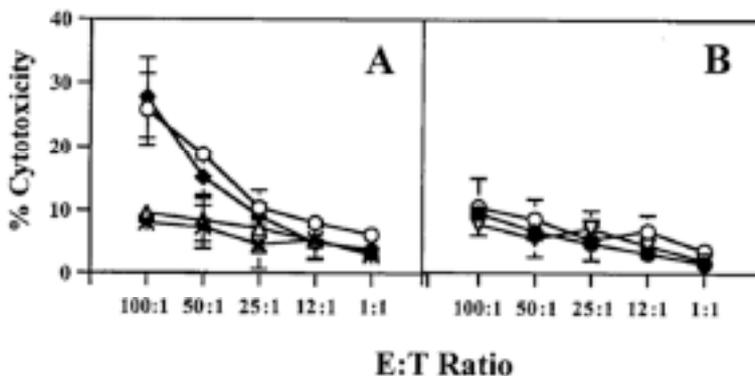


Figure 10

Cytotoxicity induced by CD8⁺ T cells of C57BL/6J mice against murine B16 melanoma cells after immunization with DNA vaccines

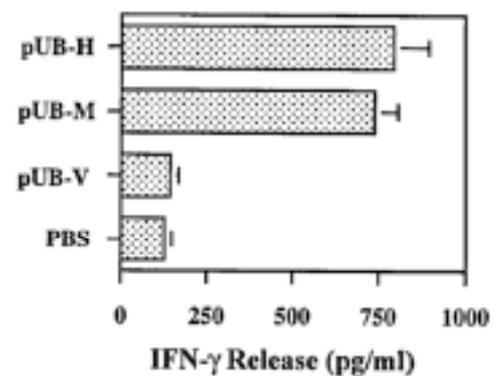


Figure 11

Cytokine release by CD8⁺ T cells isolated from splenocytes of C57BL/6J mice treated

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 (μ), pUb-M (ν), empty vector pUb-V (ρ), 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 (ν) and pUb-H (μ) DNA vaccines. Nonspecific syngeneic prostate cancer target cells (TRAMP-C1) were not lysed by pUb-M-specific CD8⁺ T cells (σ).

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 μ g 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	3	None	Tumor necrosis to ,50% of original size
			Breast carcinoma, stage IV	5	Hot flashes (G1) Hyperuricemi + Hyperpotassemia (G4) Kidney failure (G2)	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 2nd immunization
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 12**.

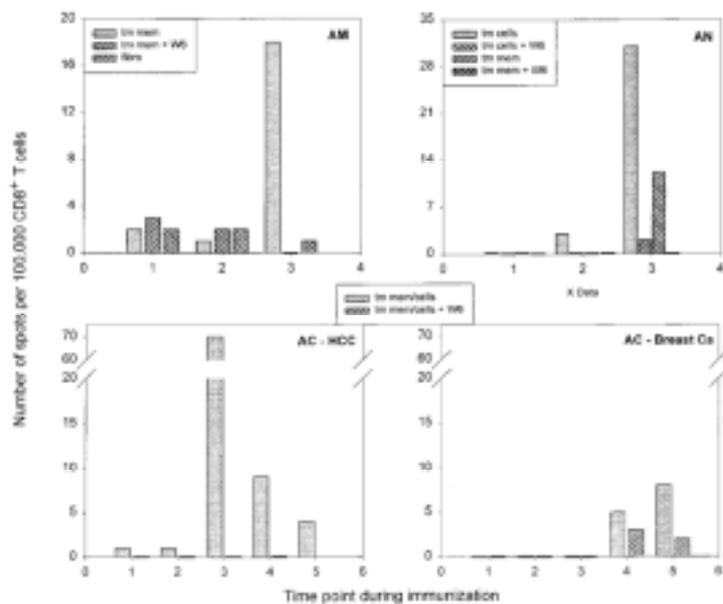
Tableau 2 : Anti-tumor reactivity of CD8 cells from 12 patients immunized with autologous, tumor-derived gp96 preparations as determined by IFN- γ Elispot assay¹

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 12 :

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.



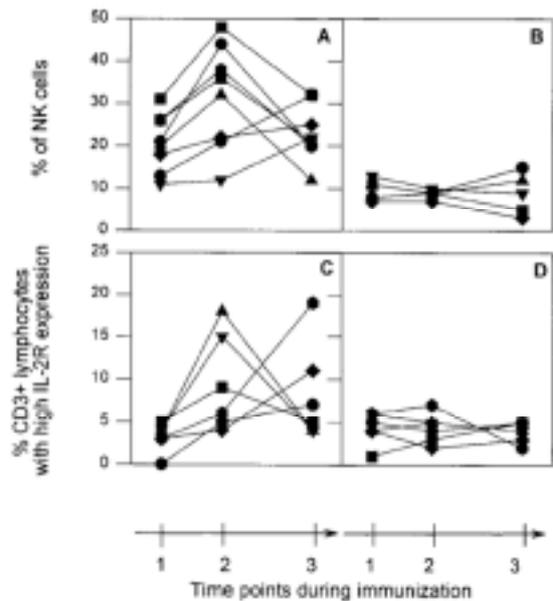
Enfin le pourcentage de cellules NK ainsi que le pourcentage de cellules CD3⁺ exprimant un fort taux de IL-2R est mesuré chez ces patients. Les résultats sont présentés sur la **Figure 13**.

Figure 13

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 ?

Exercice II (noté sur 6 points)

(d'après Kunzmann, V. *et al.* (2000) *Blood* 96:384)

Les cellules malignes plasmocytaires 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.

Question 1. Quelles modifications concernant l'hématopoïèse et la composition sérique en immunoglobuline observe-t-on chez les patients atteints de myélome multiple ?

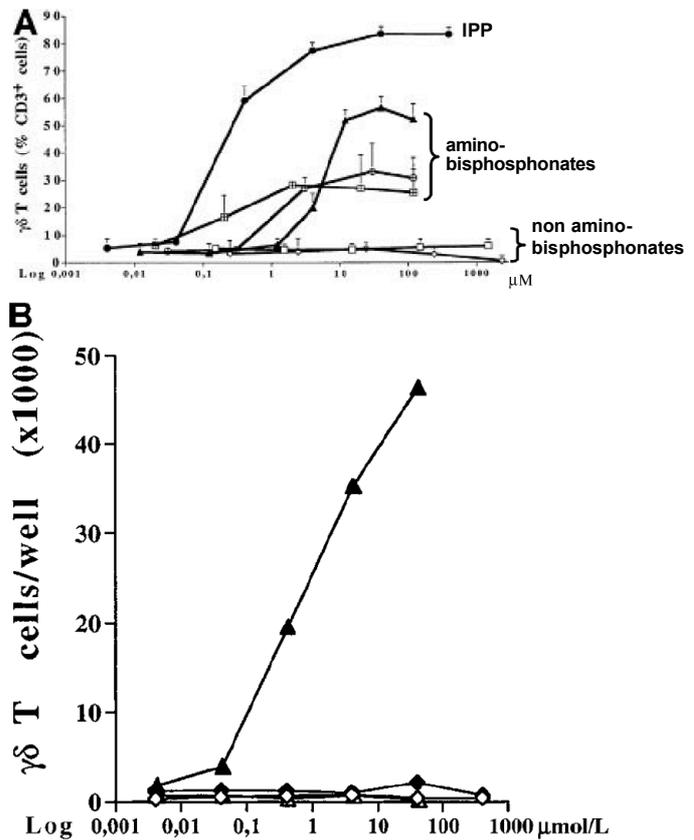
Question 2. Quelles sont les manifestations cliniques généralement observées chez ces patients ?

Les bisphosphonates sont un traitement de choix pour les maladies qui impliquent une résorption osseuse excessive ; ils ont été notamment montrés efficaces dans la prévention de l'ostéolyse chez des patients atteints de myélome multiple. Les bisphosphonates sont des analogues synthétiques de pyrophosphates endogènes. Cependant, les mécanismes d'inhibition de la résorption osseuse par les bisphosphonates ne sont pas connus. Les expériences présentées ci-dessous s'attachent à préciser leur mode d'action.

Il existe des relations structurales entre les bisphosphonates et certains ligands identifiés des lymphocytes T $\gamma\delta$. Sur la base de cette observation, la capacité de stimulation des lymphocytes T $\gamma\delta$ par les bisphosphonates a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 14**.

Figure 14

- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de différents bisphosphonates en présence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ parmi les cellules CD3⁺ a été mesuré en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ couplés à des fluorochromes. Comme contrôle positif, les cellules ont été stimulées avec IPP, un stimulateur des cellules T $\gamma\delta$ isolés des mycobactéries.
- B. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de chlodonate (non amino-bisphosphonate) ou de pamidronate (amino-bisphosphonate), en présence ou en absence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le nombre absolu de cellules T $\gamma\delta$ dans chaque culture a été mesuré.

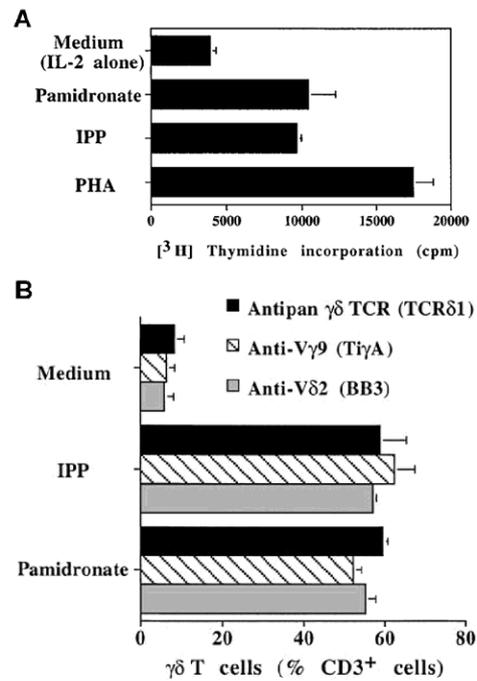


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

Dans une deuxième expérience, l'expression de V γ 9 et V δ 2 à la surface de lymphocytes T $\gamma\delta$ activés par le pamidronate, l'IPP ou la PHA a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 15**.

Figure 15

- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en l'absence (Medium) ou en présence de 4 μ M d'IPP, 4 μ M de pamidronate ou 4 μ g/ml de PHA, en présence d'IL-2. Après 4 jours, la prolifération des cellules a été déterminée par incorporation de thymidine tritiée.
- B. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en l'absence (Medium) ou en présence de 4 μ M d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL-2. Après 7 jours, les cultures ont été analysées en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ (Anti- $\gamma\delta$ TCR), anti-V γ 9 ou anti-V δ 2.



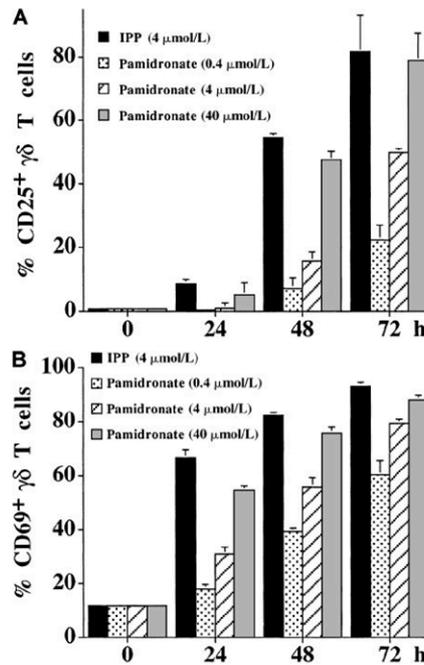
Question 4. *Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)*

Dans une autre expérience, l'activation des cellules T $\gamma\delta$ par le pamidronate en l'absence d'IL-2 a été évaluée par la mesure de l'expression de CD25 et CD69, deux marqueurs d'activation des lymphocytes T. Les résultats sont présentés dans la **Figure 16**.

Question 5. *Analyser ces résultats. En particulier, discutez du rôle de l'IL-2 dans la prolifération ou l'activation des cellules T $\gamma\delta$ par le pamidronate. (8 lignes maximum)*

Figure 16

Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en présence de 4 μM d'IPP ou de 0,4, 4 et 40 μM de pamidronate, en l'absence d'IL-2. L'expression de CD25 (A) ou CD69 (B) a été déterminée à 0, 24, 48 et 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-Cδ et anti-CD25(A) ou anti-CD69 (B).

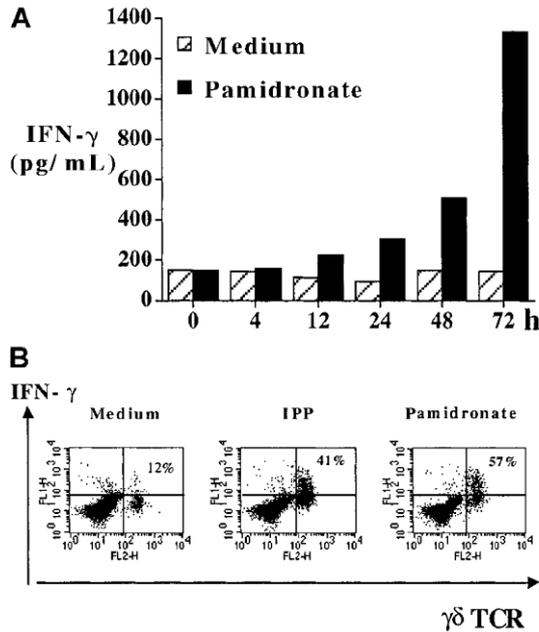


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la Figure 17.

Figure 17

Des PBMC ont été incubés en absence (Medium) ou en présence de 40 μM d'IPP ou de 40 μM de pamidronate, en l'absence d'IL-2.

- (A) La production d'IFN γ a été mesurée par ELISA au cours du temps pour les cellules incubées en absence ou en présence de pamidronate.
- (B) L'expression d'IFN γ intracellulaire par les cellules T $\gamma\delta$ a été déterminée après 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-Cδ et anti-IFN γ .



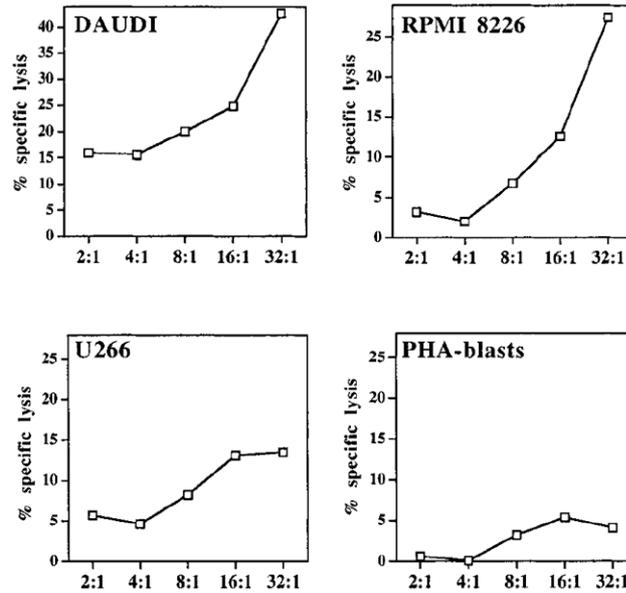
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 17B. (5 lignes maximum)

Question 7. Analysez ces résultats. (8 lignes maximum)

La capacité de cytolyse *in vitro* d'une lignée T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée vis-à-vis de différentes lignées tumorales. Les résultats sont présentés dans la Figure 18.

Figure 18

La cytotoxicité d'une lignée T $\gamma\delta$ activée par le pamidronate a été testée vis-à-vis de cellules de la lignée de lymphome DAUDI, des lignées de myélome RPMI 8826 et U266 ou de PBMC allogéniques activés par la PHA, préalablement chargés en Cr⁵¹. La capacité de lyse a été mesurée pour différents ratios effecteur:cible.



Question 8. Analysez ces résultats. En particulier, vous indiquerez de quelle(s) expérience(s) contrôle(s) vous auriez souhaité disposer afin de préciser votre interprétation. (5 lignes maximum)

Pour finir, des cellules de moelle osseuse de 24 patients atteints de myélome multiple ont été cultivées en milieu seul (Medium), en présence d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL2. Pour une proportion significative de patients (14/24), on observe une augmentation de l'expression de CD25 par les cellules T $\gamma\delta$ en présence de pamidronate et d'IPP. Le nombre de cellules plasmocytaires vivantes après culture a été déterminé et exprimé en pourcentage du nombre de cellules cultivées en milieu seul. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Activité anti-plasmocytaire de l'IPP et du pamidronate chez des patients atteints de myélome multiple

Treatment	Plasma cells (%)	P
Medium (n = 24)	100	—
IPP (n = 24)	87.0 ± 28.4	.0345
Pamidronate (n = 24)	65.9 ± 38.4	.0002
Pamidronate (patients with activation of BM- $\gamma\delta$ T cells) (n = 14)	54.8 ± 28.8	.0001

n : nombre de patients ; p : valeur de signification du test de Student par rapport à la culture en milieu seul.

Question 9. Quelle information complémentaire cette expérience apporte-t-elle ? Quelle perspective d'application thérapeutique peut-on envisager. (8 lignes maximum)

Question 10. A l'aide d'un tableau comparatif vous indiquerez en quoi la reconnaissance des lymphocytes T $\gamma\delta$ diffère de celle des lymphocytes T $\alpha\beta$.