

Première partie.....	29
Caractéristiques des cultures lymphocytaires en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3.....	29
Objectif .....	29
Chapitre 1: .....	30
Prolifération cellulaire .....	30
1.1. Introduction.....	30
1.2. Méthodologie .....	31
1.3. Résultats .....	31
1.3.1. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée .....	31
1.3.2. Numérations cellulaires.....	32
1.3.3. Marquage de l'ADN à la 7-amino-actinomycine D (7-AAD) .....	34
1.4. Discussion .....	36
Chapitre 2: .....	38
Populations lymphocytaires .....	38
2.1 Introduction.....	38
2.2. Méthodologie .....	40
2.3. Résultats .....	40
2.3.1 Les lymphocytes T .....	40
2.3.2. Les cellules NK .....	45
2.3.3. Les lymphocytes B .....	46
2.3.4. Monocytes .....	46
2.4. Discussion .....	47
Chapitre 3: .....	50
Marqueurs d'activation et de différenciation .....	50
3.1. Introduction.....	50
3.2. Méthodologie .....	51
3.3. Résultats .....	51
3.3.1. Aspect des cultures.....	51
3.3.2. Marqueurs d'activation.....	56
3.3.3. Marqueurs des cellules naïves et mémoires .....	58
3.3.4. Molécules d'adhésion .....	60
3.4. Discussion .....	61
Chapitre 4: .....	64
Activités cytotoxiques .....	64
4.1. Introduction.....	64
4.2. Méthodologie .....	65
4.3. Résultats .....	66
4.3.1. Activité sérine estérase.....	66
4.3.2. Activité cytotoxique mesurée par un test de relargage de chrome radioactif.....	66
4.3.3. Inhibition de la croissance tumorale .....	69
4.4. Discussion .....	72
Chapitre 5: .....	74
Effet d'une deuxième stimulation du complexe CD3 .....	74
5.1. Introduction.....	74
5.2. Méthodologie .....	76

5.3. Résultats .....	76
5.4. Discussion .....	79
Discussion de la première partie .....	81

Première partie  
Caractéristiques des cultures lymphocytaires  
en présence d'IL-2 et d'un anticorps  
anti-CD3

**Objectif**

La stimulation lymphocytaire dans un but d'immunothérapie doit remplir plusieurs conditions: elle doit générer un nombre important d'effecteurs cellulaires, elle doit permettre une activation de cellules cytotoxiques et enfin, les cellules effectrices obtenues doivent lyser les cellules tumorales. Ces différents aspects sont étudiés dans cette partie de notre travail. Nous avons choisi de comparer la stimulation des lymphocytes par l'interleukine-2, méthode classique pour induire la génération d'effecteurs LAK, et la stimulation par un anticorps anti-CD3. Ce dernier stimule directement les lymphocytes T qui sont responsables de l'activité cytotoxique spécifique et qui sont plus nombreux dans le sang que les cellules NK.

---

## Chapitre 1: Prolifération cellulaire

### 1.1. Introduction

L'estimation de la prolifération cellulaire a toute son importance, car les protocoles d'immunothérapie nécessitent un nombre important d'effecteurs cellulaires, de l'ordre de  $10^9$  à  $10^{11}$  cellules (Wang *et al.*, 1989, Nitta *et al.*, 1990, Curti *et al.*, 1993). De plus, la prolifération est un phénomène facilement mesurable qui reflète l'activation cellulaire. Nous avons étudié la prolifération cellulaire des lymphocytes en présence d'IL-2 et/ou d'IL-2 + un anticorps anti-CD3.

Le choix des lymphocytes du sang périphérique ou PBL a été dicté par le fait qu'ils sont facilement accessibles et généralement utilisés dans les essais cliniques. En effet, les cellules LAK sont des lymphocytes du sang stimulés par l'IL-2.

Les lymphocytes infiltrant la tumeur ou TIL sont également des candidats potentiels pour des protocoles d'immunothérapie. Des expériences réalisées chez la souris ont montré qu'ils possédaient un potentiel anti-tumoral supérieur à celui des PBL activés (Rosenberg *et al.*, 1986). L'efficacité accrue des TIL est peut-être en relation avec la mise en place d'une réponse immunitaire. Cette réponse induirait, au site de la tumeur, une proportion plus élevée de lymphocytes spécifiquement dirigée contre la tumeur. Cependant leur étude est plus difficile car elle nécessite l'accès à des prélèvements de tumeur frais et stériles alors que l'étude des PBL peut être réalisée à partir du sang de donneurs sains.

Différentes méthodes ont été utilisées pour déterminer la prolifération cellulaire: des techniques classiques et simples comme l'incorporation de thymidine tritiée et la numération cellulaire sur plaque de Thoma, mais également le marquage de l'ADN des cellules par de la 7-amino-actinomycine D (7-AAD) détectée par cytométrie en flux. L'incorporation de thymidine tritiée a lieu lors de la phase de synthèse de l'ADN (phase S). La fluorescence émise par la 7-AAD est en relation avec la quantité d'ADN présente dans les cellules. La fluorescence sera donc plus intense pour les cellules dans les

---

phases de synthèse, G<sub>2</sub> et entrant en mitose (phase M) par rapport à la fluorescence émise par les cellules au repos (G<sub>0</sub>) ou dans la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. Lorsque cette technique est couplée à un marquage de surface, elle permet de discriminer les cycles cellulaires de deux populations lymphocytaires .

## 1.2. Méthodologie

Les lymphocytes du sang périphérique (PBL) sont maintenus en culture soit pour des durées inférieures à sept jours, soit à plus long terme. Selon les conditions de stimulation, le milieu de culture est additionné d'IL-2 recombinante (50 U/ml), d'anticorps anti-CD3 (BMA030, IgG<sub>2a</sub>, 10 ng/ml), ou d'une combinaison de ces deux agents. Lorsque la culture dépasse six jours, le milieu de culture est renouvelé, deux fois par semaine, par du nouveau milieu additionné d'IL-2.

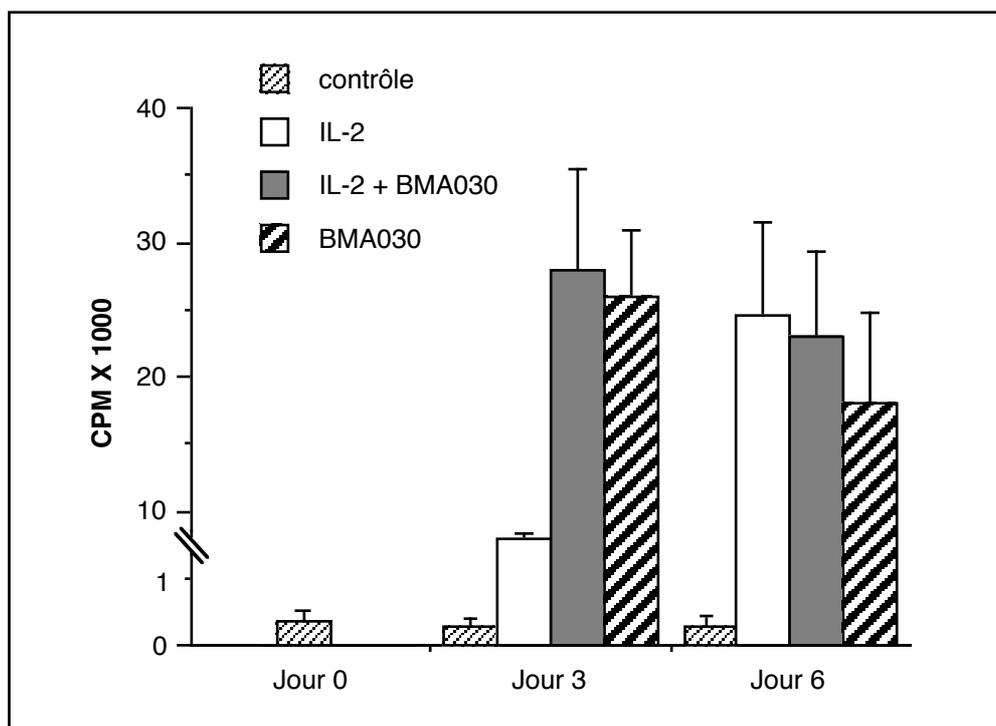
La prolifération cellulaire a été étudiée à plusieurs moments de la culture. Le comptage cellulaire sur une plaque de Thoma permet de calculer l'amplification maximale des cultures de PBL. La mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-Tr) est réalisée près quatre heures d'incubation, dans des puits de microplaques contenant 200.10<sup>3</sup> cellules. Pour déterminer les cellules en cycle, l'ADN des PBL est coloré par l'antibiotique 7-amino-actinomycine D (7-AAD) qui émet une fluorescence rouge. Cette coloration est couplée au marquage des cellules par les anticorps anti-CD3 et anti-CD16 conjugués à des fluorochromes de fluorescence verte (FITC) ou orange (PE) respectivement. Les différentes fluorescences sont simultanément détectées par cytométrie en flux.

## 1.3. Résultats

### 1.3.1. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée

Dans un premier temps, cette technique, basée sur la mesure de l'incorporation de thymidine radioactive par les cellules durant la phase de synthèse de l'ADN, a permis d'établir des courbes de prolifération en fonction de la concentration en IL-2 ou en anticorps anti-CD3 (BMA030). Sur base de ces résultats, les concentrations de 50 U/ml d'IL-2 et de 10 ng/ml de BMA030 ont été retenues pour la culture des cellules (résultats non illustrés).

Au moment de la mise en culture des lymphocytes du sang, l'incorporation de thymidine tritiée est quantifiée pour déterminer le niveau de base de prolifération cellulaire de chaque culture. Celui-ci est toujours inférieur à 400 CPM (figure 1-1). Aux troisième et sixième jours de culture, la prolifération est mesurée dans les différentes conditions expérimentales: en présence d'IL-2, d'un anticorps anti-CD3 (BMA030) ou d'une combinaison des deux mitogènes. Les cellules cultivées sans addition d'activateurs (condition contrôle) présentent un taux de prolifération comparable à celui obtenu le jour du prélèvement. Au troisième jour de culture, la prolifération cellulaire est trois fois plus intense (26.000 CPM) lorsque le milieu est additionné de BMA030 (seul ou en combinaison avec l'IL-2) par rapport à celle obtenue en présence d'IL-2 seule (8.000 CPM). Par contre, au sixième jour, l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules stimulées par l'IL-2 seule atteint des valeurs similaires aux deux autres conditions de stimulation (BMA030 seul et IL-2 + BMA030).

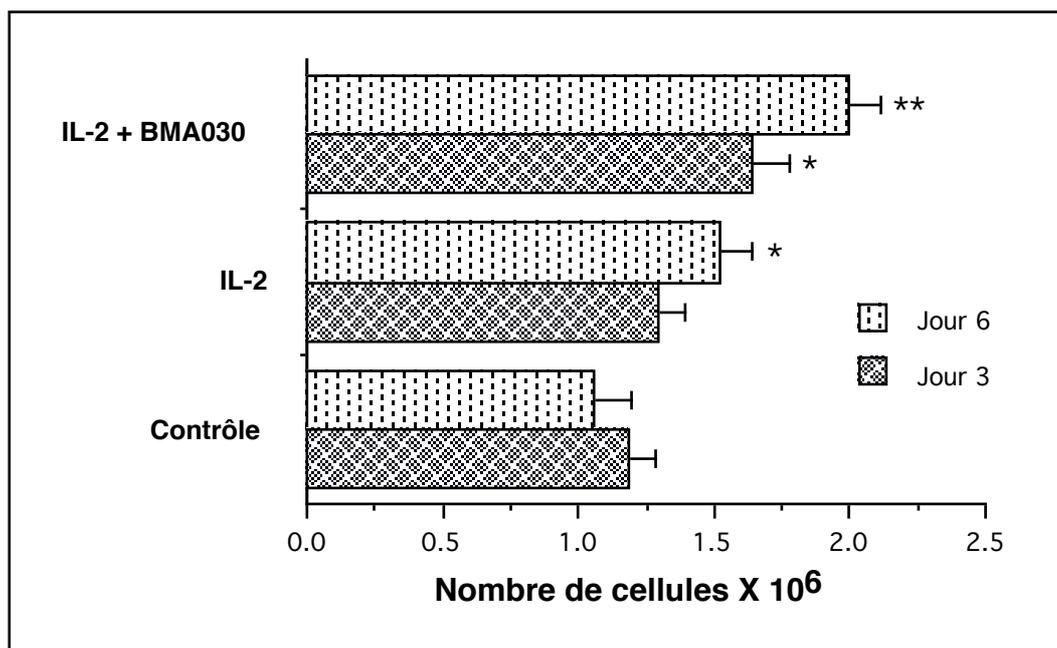


**Figure 1-1:** Incorporation de thymidine tritiée dans des PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'un anticorps anti-CD3 (BMA030) ou d'une combinaison des deux mitogènes. Les moyennes  $\pm$  les erreurs standards de cinq expériences indépendantes sont illustrées.

### 1.3.2. Numérations cellulaires

Etant donné que l'incorporation de thymidine tritiée ne mesure la prolifération que de façon ponctuelle, le rendement cellulaire réel de chaque condition expérimentale a été évalué par le comptage des cellules.

Après trois jours de culture, le nombre de lymphocytes du sang périphérique est sensiblement supérieur après activation par l'IL-2 et l'anticorps BMA030 par rapport à la condition sans stimulation ( $p < 0,05$ ). Par contre, en présence d'IL-2 seule, l'augmentation n'est significative qu'après six jours (figure 1-2).



**Figure 1-2:** Nombres de cellules dans des cultures de PBL après 3 ou 6 jours en présence d'IL-2 et/ ou de BMA030. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  les erreurs standards de 9 expériences dans lesquelles  $1,25 \cdot 10^6$  cellules ont été mises en culture. L'analyse statistique est réalisée par rapport aux valeurs contrôles (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

L'évolution du nombre de cellules a été étudiée pendant des périodes de temps plus longues. Des comptages ont été effectués à intervalles réguliers dans trois cultures de lymphocytes du sang périphérique. Pour simplifier l'analyse des résultats, nous les avons résumés dans le tableau 1-1.

Une prolifération cellulaire des PBL est obtenue dans toutes les conditions de stimulation (IL-2 seul, IL-2 + BMA030 et BMA030 seul). Pour toutes les cultures étudiées, l'amplification cellulaire est supérieure lorsque les deux activateurs sont présents. Une deuxième stimulation par un anticorps anti-CD3 ne semble pas induire une nouvelle prolifération (résultat non illustré). En général, les cellules non stimulées (condition contrôle) ou stimulées en présence de BMA030 seul ne survivent pas plus de

dix jours. En présence d'IL-2 et surtout d'IL-2 et de BMA030, les cultures sont maintenues plus longtemps (tableau 1-1).

	Durée de la culture	Expansion de la culture
Contrôle	7-10 jours	1
IL-2	21-31 jours	5 ± 3
IL-2 + BMA030	31-43 jours	37 ± 7
BMA030	10-14 jours	4 ± 1

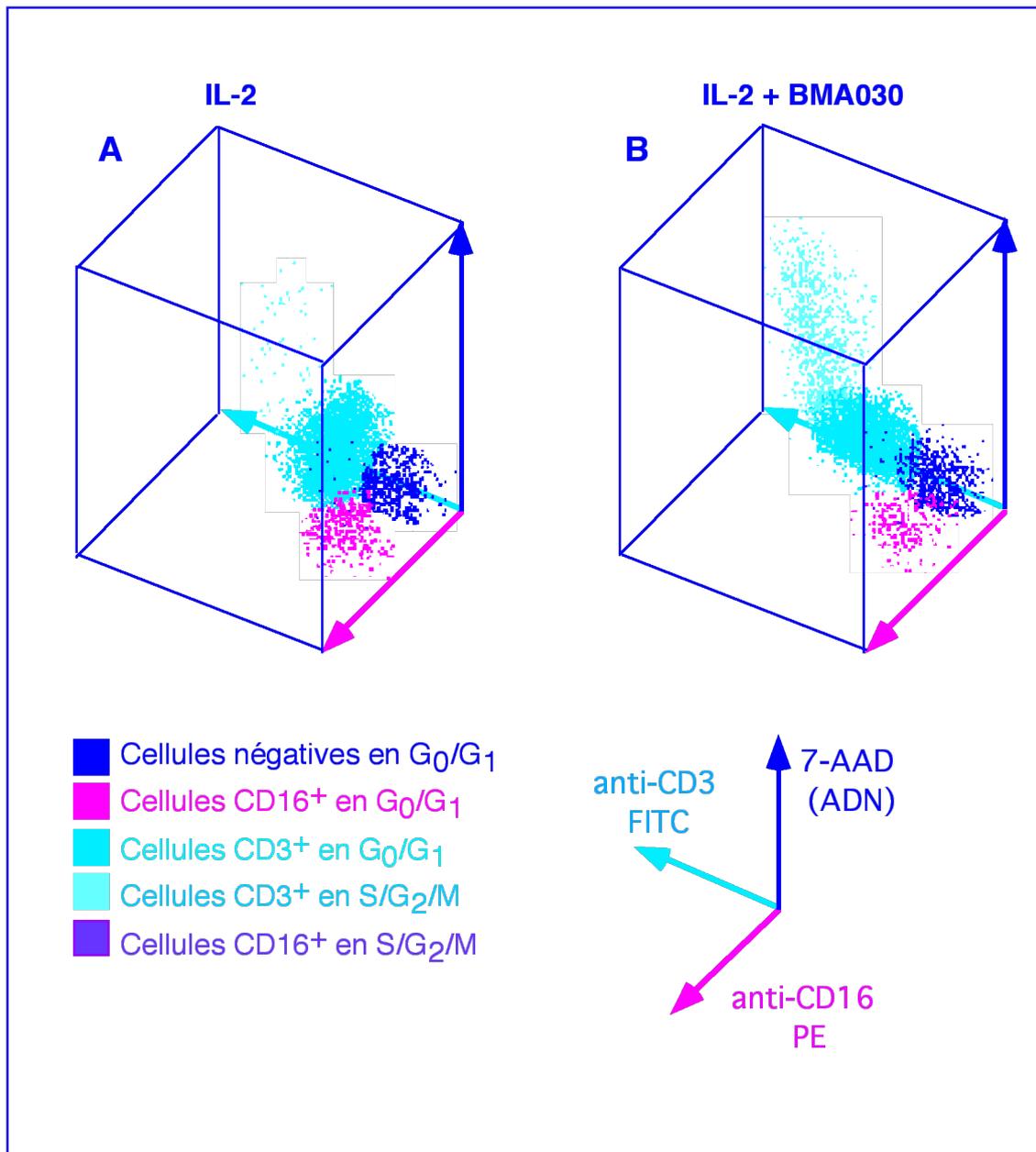
**Tableau 1-1: Nombres de jours de culture et expansions cellulaires maximales obtenues pour les différentes cultures.**

**L'expansion maximale est évaluée en multipliant les amplifications obtenues à chaque renouvellement du milieu de culture. La moyenne et l'écart type de l'amplification cellulaire des PBL ont été calculés sur les 3 cultures.**

### 1.3.3. Marquage de l'ADN à la 7-amino-actinomycine D (7-AAD)

L'ADN coloré par la 7-AAD émet une fluorescence rouge dont l'intensité est fonction de la quantité d'ADN présente par noyau. L'ADN ainsi quantifié permet l'estimation de la proportion de cellules en phase S/G<sub>2</sub>/M après trois jours de culture. Afin de discriminer les cycles des lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) et des cellules NK (CD16<sup>+</sup>), les cellules sont marquées par un anticorps anti-CD3-FITC et un anticorps anti-CD16-PE. Ce triple marquage est représenté par la figure 1-3 A pour les PBL stimulés par de l'IL-2 et par la figure 1-3 B pour les PBL stimulés par l'IL-2 et BMA030. Les résultats obtenus confirment une prolifération plus intense (points bleus clairs et mauves) pour la condition de culture IL-2 + BMA030. Les cellules en cycle représentent 7,5% de la population totale des cellules stimulées par l'IL-2 + BMA030 contre 1,5% pour la condition de culture en présence d'IL-2 seule. Cette représentation montre très clairement que les cellules en cycle sont essentiellement des lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) (points turquoises, 7%) lorsqu'un anticorps anti-CD3 est additionné au milieu

de culture (figure 1-3 B). Des lymphocytes T en cycle (0,8%) sont également observés en présence d'IL-2 (figure 1-3 A).



**Figure 1-3:** Cellules en cycle après stimulation par l'IL-2 (A) ou l'IL-2 et BMA030 (B). Les cellules NK et les lymphocytes T sont visualisés par l'utilisation d'un anticorps anti-CD16-PE et anti-CD3-FITC respectivement. Les cellules en phase S/G<sub>2</sub>/M sont discriminées par l'utilisation de la 7-AAD. Les fluorescences émises par chaque

---

marqueur sont mesurées en cytométrie en flux. Les flèches représentent l'intensité de fluorescence des trois marqueurs. Chaque point des diagrammes représente une cellule.

---

## 1.4. Discussion

Nous avons comparé la prolifération des lymphocytes induite en présence d'IL-2 ou d'un anticorps anti-CD3 (BMA030) ou d'une combinaison des deux mitogènes. Nos résultats indiquent une prolifération plus intense en présence d'un anticorps anti-CD3.

La cinétique d'induction de la prolifération est plus rapide lorsque les cellules sont cultivées en présence d'anticorps anti-CD3 comparée à celle observée en présence d'IL-2 seule. Après sept jours de culture, la présence d'IL-2 est toutefois nécessaire au maintien des cultures. En effet, tout comme dans les cultures contrôles, le BMA030 utilisé seul ne permet pas de conserver les lymphocytes pendant plus de dix jours, malgré une prolifération des lymphocytes supérieure à celle obtenue dans les cultures en présence d'IL-2. Signalons également que le BMA030 seul n'induit pas de prolifération des thymocytes (résultats non illustrés), alors qu'une synthèse d'ADN des PBL est détectée dans cette condition de culture. Cette absence de prolifération et même l'induction d'une mort cellulaire des thymocytes cultivés en présence d'un anticorps anti-CD3 est abondamment décrite (Smith *et al.*, 1989). D'autres travaux ont montré que la progression des lymphocytes T vers un stade activé nécessitait, outre le signal via le TCR/CD3, plusieurs signaux (van Seventer *et al.*, 1991; Sagerström *et al.*, 1993) et l'absence d'un signal peut conduire à des phénomènes d'anergie ou de mort cellulaire (Otten et Germain, 1991). L'IL-2 peut être ce signal supplémentaire. La production endogène d'IL-2 par les PBL permettrait à ceux-ci de proliférer tandis que les thymocytes ne produiraient pas suffisamment d'IL-2 pour soutenir leur prolifération. Pour appuyer cette hypothèse, signalons que l'apport d'IL-2 exogène dans des cultures de thymocytes murins inhibe l'apoptose induite par un anticorps anti-CD3 (Nieto *et al.*, 1990). Notons, toutefois, que la production endogène d'IL-2 est insuffisante pour maintenir les PBL plus de dix jours en culture.

Contrairement à l'IL-2 qui doit être additionnée au milieu de culture une à deux fois par semaine, la présence continue d'anticorps anti-CD3 n'est pas nécessaire. L'addition d'anticorps anti-CD3 durant la culture n'influence pas la prolifération. D'ailleurs, dans la majorité des protocoles de culture utilisant un anticorps anti-CD3, celui-ci est éliminé du milieu après 24 ou 48 heures même dans le cas de cultures supérieures à dix jours (Ochoa *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1992<sup>b</sup>).

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet synergique entre l'IL-2 et l'anticorps anti-CD3. En effet, la prolifération induite par une stimulation combinée l'IL-2 et de l'anticorps anti-CD3 est comparable à celle observée en présence d'anticorps anti-CD3 seul. Bien qu'un effet synergique ait été démontré, celui-ci est généralement observé lorsque les monocytes sont absents (Walker *et al.*, 1986) ou lorsque les cellules sont

---

cultivées en présence de concentrations d'anticorps anti-CD3 inférieures à 10 ng/ml (Tovar *et al.*, 1988). Ces conditions ne correspondent pas à celles utilisées dans nos cultures.

Les lymphocytes T sont la cible directe de la stimulation par un anti-CD3. Ils prolifèrent préférentiellement dans la condition de culture IL-2 + BMA030, comme le montre la proportion plus élevée de cellules CD3<sup>+</sup> en cycle. Dans la condition de culture en présence d'IL-2 seule, des cellules NK et des lymphocytes T sont en cycle. Une prolifération plus intense des cellules NK par rapport aux lymphocytes T en présence d'IL-2 seule a été décrite (London *et al.*, 1986). Par contre, Harel-Bellan et ses collaborateurs (1986) ainsi que Chinn et son équipe (1990) ont montré qu'en présence d'IL-2, la majorité des cellules en cycle expriment le complexe CD3. La technique que nous avons utilisée ne nous permet pas de visualiser une différence entre les deux populations, vu le faible pourcentage de cellules en cycle après une stimulation par l'IL-2 seule. Signalons que des pourcentages de cellules en cycle plus élevés ont été rapportés pour ces deux conditions de stimulations (IL-2: 15% et IL-2 + BMA030: 34%), mais dans cette étude les cellules sont restimulées par de l'IL-2 vingt-quatre heures avant d'estimer leur prolifération (Platts *et al.*, 1993).

Le but des expériences rapportées dans ce chapitre était de comparer la prolifération lymphocytaire induite par l'IL-2 ou un anticorps anti-CD3 et non d'obtenir un nombre élevé de cellules à des fins thérapeutiques comme, par exemple, dans les travaux de Lamers et ses collaborateurs (1992). Nous n'avons pas testé les composants du milieu ni optimisé la concentration cellulaire ou le récipient de culture permettant une amplification maximale des cultures. Les concentrations cellulaires utilisées dans la littérature pour obtenir un nombre élevé de cellules sont généralement plus faibles (0,1 à 0,2.10<sup>6</sup> cellules/ml contre 0,5.10<sup>6</sup> cellules/ml dans nos expériences). Ceci explique certainement les différences observées entre nos taux d'expansion des cultures (36 fois pour les PBL) par rapport à ceux décrits dans la littérature (supérieurs à 100 fois) (Ochoa *et al.*, 1987).

En résumé, la présence d'un anticorps anti-CD3 et d'IL-2 dans les cultures induit une prolifération lymphocytaire plus intense que celle observée en présence d'IL-2 seule. Cependant, l'IL-2 est nécessaire pour garder les lymphocytes en culture. La stimulation par BMA030 seul ne permettant pas de maintenir les cultures, cette condition expérimentale ne sera plus utilisée dans la suite des expériences. Seules les deux conditions de stimulation "IL-2" et "IL-2 + BMA030" ont été retenues pour les cultures de PBL.

## Chapitre 2: Populations lymphocytaires

### 2.1 Introduction

Différents types cellulaires peuvent intervenir dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette intervention s'effectue à différents niveaux. Certaines cellules comme les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques peuvent tuer les cellules tumorales. La sécrétion de facteurs solubles par des lymphocytes T auxiliaires ou par les cellules NK joue également un rôle clé dans la destruction des cellules tumorales. Il nous a donc paru important d'étudier les changements au sein des populations lymphocytaires dans nos différentes conditions expérimentales. Dans ce chapitre, un large éventail d'anticorps a été employé afin d'étudier les populations lymphocytaires obtenues après une stimulation par l'IL-2 ou par l'IL-2 + BMA030. Dans un souci de clarté, le tableau 2-1 reprend brièvement les marqueurs caractéristiques des différentes populations.

Cellules	Marqueurs
Lymphocytes T	CD2, CD3, CD5, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$
Cellules NK	CD2, CD16, CD56, CD57
Lymphocytes B	CD19, CD20
Monocytes	CD14

**Tableau 2-1:** Marqueurs phénotypiques utilisés pour caractériser les populations cellulaires dans les cultures.

---

Comme la stimulation par un anticorps anti-CD3 concerne directement les lymphocytes T, nous nous sommes tout d'abord intéressée à cette population. Pour déterminer la proportion de lymphocytes T présents dans les cultures, un anticorps anti-CD3 a été utilisé. Le pourcentage de lymphocytes T a aussi été évalué par un anticorps (anti-CD5) ne servant pas à la stimulation des lymphocytes T. La molécule CD2 est présente sur tous les lymphocytes T, mais aussi sur une proportion de cellules NK. Nous avons aussi précisé le type de récepteur à l'antigène (TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ ) porté par les lymphocytes T. Les molécules CD4 et CD8 reconnaissent respectivement les molécules de classe II et de classe I du CMH. Généralement, la molécule CD4 est exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires tandis que la molécule CD8 est présente à la surface des lymphocytes T cytotoxiques. Les variations du pourcentage de ces deux populations de lymphocytes T ont également été étudiées.

Les cellules NK ne possèdent pas de marqueur spécifique, mais habituellement elles expriment le récepteur de type III pour la partie constante des immunoglobulines G (Fc $\gamma$  RIII ou CD16). Les marqueurs CD56 (NKH-1, Leu-19) et CD57 (HNK-1, Leu-7) (Kruse *et al.*, 1984), initialement mis en évidence sur des cellules nerveuses, sont également détectés à la surface des cellules NK.

Des marquages multiples peuvent aider à mieux discriminer une population lymphocytaire particulière. Par exemple, la molécule CD56 est fréquemment détectée à la surface des cellules NK, mais une sous-population de lymphocytes T l'exprime également. Un marquage simultané des cellules par un anticorps anti-CD56 et anti-CD3 permet de visualiser les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>.

Bien que nous n'ayons pas étudié la fonction des lymphocytes B, le pourcentage de ceux-ci dans les cultures a été mesuré. Nous avons utilisé les anticorps anti-CD19 et anti-CD20 qui sont spécifiques des lymphocytes B.

La présence de monocytes dans les cultures est importante pour l'initiation de l'activation des lymphocytes T par un anticorps anti-CD3. Les monocytes, grâce à leurs récepteurs pour la partie constante des immunoglobulines G (Fc $\gamma$  R), immobilisent les anticorps anti-CD3. De plus, ils sécrètent de l'IL-1 qui participe à l'activation des lymphocytes T (Palacios 1985). L'anticorps anti-CD14 a été employé pour quantifier les monocytes.

## 2.2. Méthodologie

Les expériences ont été réalisées d'une part sur des PBL cultivés pendant 3 à 4 jours et d'autre part, pour quelques marqueurs de surface (CD3, TCR  $\gamma\delta$ , CD4, CD8),

---

sur des PBL maintenus plus longtemps en culture. Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture seul, additionné d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

La caractérisation des différentes populations présentes dans les cultures a été réalisée grâce à des marquages multiples (double ou triple) par des anticorps couplés à des fluorochromes. Les différentes fluorescences émises par les fluorochromes ont été quantifiées par cytométrie en flux. La liste des anticorps utilisés est reprise dans l'annexe méthodologique.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1 Les lymphocytes T

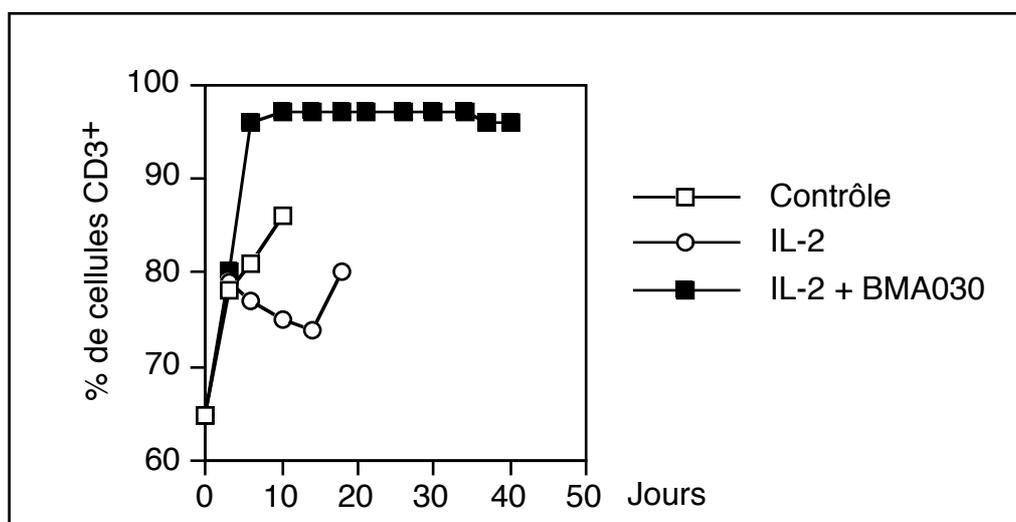
Après quatre jours de culture, le pourcentage de lymphocytes T totaux (identifiés par les marqueurs CD3 et CD5) est légèrement supérieur en présence de l'anticorps BMA030 par rapport au pourcentage de départ et aux pourcentages obtenus dans les autres conditions de culture ( $p < 0,01$ ) (tableau 2-2). Après dix jours de culture, la différence entre les conditions de culture est plus marquée comme le montre la figure 2-1. A ce stade, le nombre absolu de lymphocytes T en présence d'IL-2 et de BMA030 est environ dix fois supérieur à celui observé en présence d'IL-2 seule et vingt fois supérieur à celui de la condition contrôle. La proportion de lymphocytes CD2<sup>+</sup> (marqueur de lymphocytes T, mais aussi des cellules NK) augmente également après une stimulation par l'anticorps BMA030 (96% versus 83% en présence d'IL-2;  $p < 0,01$ ) (tableau 2-2).

En ce qui concerne le type de récepteur des lymphocytes, une minorité des lymphocytes du sang (environ 3 %) expriment le récepteur  $\gamma\delta$ , les autres exprimant le récepteur  $\alpha\beta$ . Après quatre jours, aucune variation majeure de ces proportions n'est observée quelle que soit la condition de culture (tableau 2-2). Cependant, lorsque la proportion de cellules T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> est étudiée sur une période de temps plus importante, nous avons constaté, par deux fois, une augmentation du pourcentage de cellules T TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> similaire pour les deux conditions de stimulation (IL-2 et IL-2 + BMA030) (figure 2-2). Si on considère le nombre absolu de lymphocytes T TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> au dixième jour de culture,  $0,3 \cdot 10^6$  cellules sont obtenues dans la condition contrôle,  $1,2 \cdot 10^6$  cellules en présence d'IL-2 et  $11,5 \cdot 10^6$  cellules en présence d'IL-2 + BMA030.

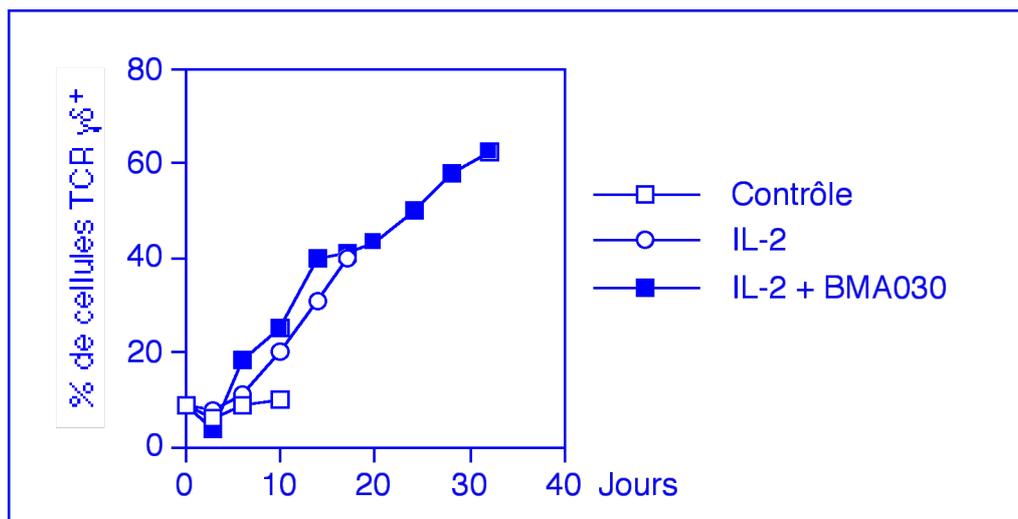
	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD2	80 ± 5 (21)	83 ± 5 (21)	83 ± 8 (21)	93 ± 5 (21)
CD3	70 ± 8 (52)	78 ± 7 (52)	78 ± 7 (52)	85 ± 5 (52)
CD5	71 ± 10 (5)	74 ± 3 (5)	76 ± 10 (5)	86 ± 4 (5)
TCR αβ	70 ± 7 (5)	72 ± 7 (3)	78 ± 7 (3)	82 ± 7 (3)
TCR γδ	2 ± 1 (5)	2 ± 1 (6)	3 ± 1,5 (10)	3 ± 2 (10)

**Tableau 2-2: Marqueurs des lymphocytes T dans les cultures de PBL.**

Les résultats (moyenne ± écart-type) sont exprimés en pourcentage de cellules exprimant un marqueur donné. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.



**Figure 2-1: Évolution du pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup> dans les cultures de lymphocytes du sang périphérique en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.**

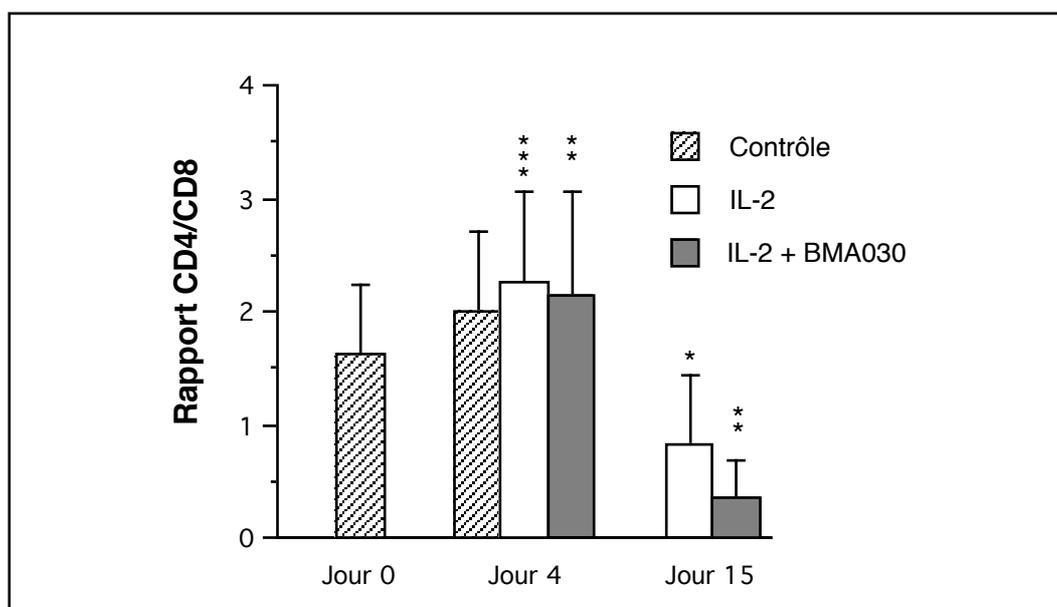


**Figure 2-2:** Évolution des pourcentages des lymphocytes T TCR  $\gamma\delta^+$  dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

Avant la mise en culture, environ 40% des lymphocytes expriment le marqueur CD4 et 30% le marqueur CD8 (tableau 2-3). Le total des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (tableau 2-3) est légèrement supérieur au pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup> (tableau 2-2), mais les cellules faiblement positives pour le marqueur CD8 n'expriment pas le complexe CD3 (résultats non illustrés). Après quatre jours de culture, une légère augmentation du rapport CD4/CD8 est observée par rapport au jour 0 dans les conditions de stimulation (2,25 dans la condition IL-2 et 2,15 dans la condition IL-2 + BMA030 versus 1,62 le jour de la mise en culture) ( $p < 0,01$ ) (figure 2-3). Par contre, ce rapport diminue lorsque la période de culture en présence des mitogènes augmente (figure 2-3). Cette diminution est accentuée en présence de BMA030 (0,36 versus 0,83 dans les cultures en présence d'IL-2).

	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD4	43 ± 10 (50)	53 ± 9 (50)	57 ± 9 (50)	60 ± 8 (50)
CD8	29 ± 7 (50)	29 ± 7 (50)	27 ± 6 (50)	31 ± 7 (50)
CD4 + CD8	72 ± 10 (50)	82 ± 8 (50)	84 ± 8 (50)	90 ± 5 (50)

**Tableau 2-3: Sous-populations des lymphocytes T dans les cultures de PBL.**  
**Les résultats (moyenne ± écart-type) sont exprimés en pourcentages. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.**

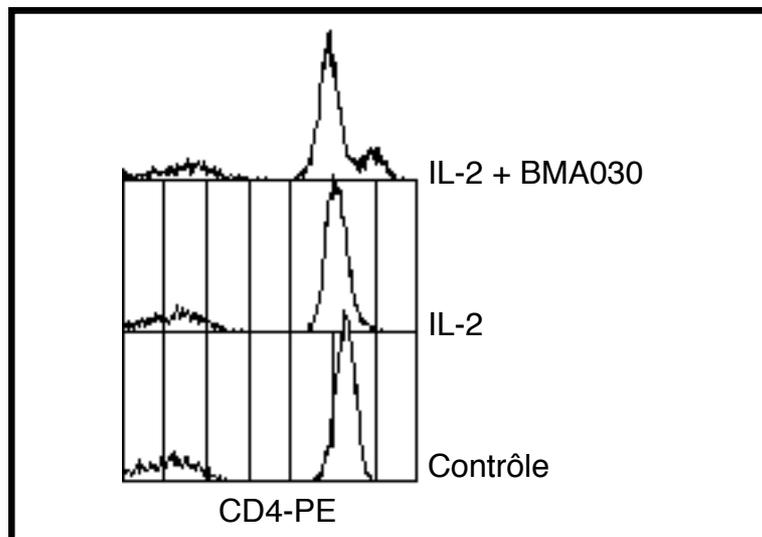


**Figure 2-3: Évolution du rapport CD4/CD8 dans les différentes conditions de culture**  
**Les résultats (moyenne ± écart type) proviennent de 50 expériences indépendantes pour les jours 0 et 4 et de 3 expériences pour le jour 15 (p est calculé par rapport au pourcentage obtenu le jour de la mise en culture; \* : p< 0,05; \*\* : p< 0,01; \*\*\*: p< 0,005).**

Outre les modifications des pourcentages des sous-populations de lymphocytes T, une augmentation de l'intensité de fluorescence est observée pour certains marqueurs comme le CD4 (figure 2-4) et le CD2 (figure 2-5) en présence de BMA030. Cette augmentation illustre un changement de la densité des marqueurs CD4

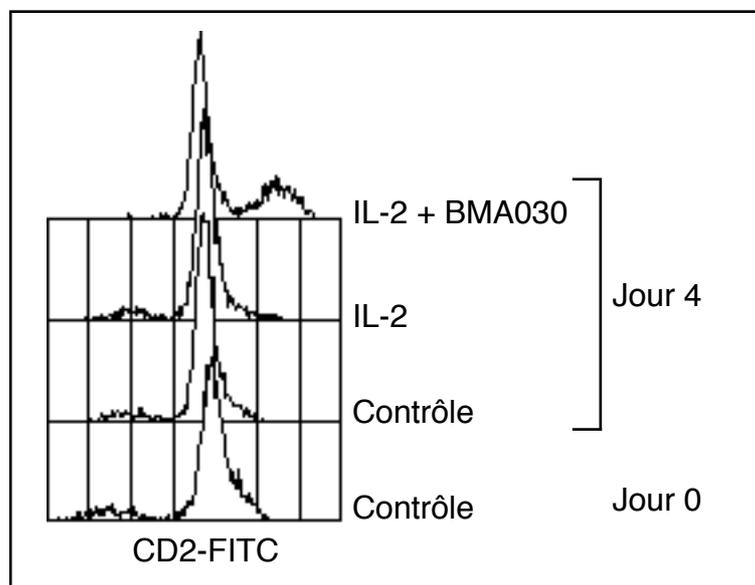
---

et CD2 à la surface des cellules. Environ  $25 \pm 10\%$  des PBL cultivés en présence d'IL-2 et de BMA030 "surexpriment" le marqueur CD4 tandis que cette population représente seulement  $5 \pm 3\%$  dans la condition de culture IL-2 seule. Avant la mise en culture, en moyenne  $17 \pm 11\%$  des PBL possèdent une forte expression du marqueur CD2. Après quatre jours de culture, ce pourcentage tombe respectivement à  $4 \pm 4\%$  et à  $12 \pm 6\%$  dans les conditions contrôle et IL-2 seule. Par contre, cette population représente  $55 \pm 17\%$  en présence d'IL-2 et de BMA030.



**Figure 2-4:** Expression de la molécule CD4 dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030

Le marquage a été réalisé après 4 jours de culture et les résultats d'une expérience représentative sont illustrés par les histogrammes de fluorescence de l'anticorps CD4-PE. Le nombre de cellules est représenté en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse.



**Figure 2-5:** Expression de la molécule CD2 dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030

Les marquages ont été réalisés au jour 0 et au jour 4 de la culture, les résultats d'une expérience représentative sont illustrés par les histogrammes de fluorescence de l'anticorps anti-CD2-FITC. Le nombre de cellules est représenté en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse.

Comme la molécule CD56 peut être exprimée par les lymphocytes T et par les cellules NK, nous avons réalisé des doubles marquages anti-CD3-FITC/anti-CD56-PE afin d'estimer le nombre de cellules T CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>. Quelle que soit la condition de culture, cette population cellulaire représente environ 3% de la population totale (tableau 2-4). Le marqueur CD57 est porté par une proportion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. La proportion de ces cellules diminue faiblement après stimulation par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 par rapport au jour 0 ( $p < 0,05$ ) (tableau 2-4).

	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	4 ± 3 (21)	2 ± 2 (21)	3 ± 2 (21)	3 ± 2 (21)
CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup>	9 ± 6 (35)	7 ± 4 (35)	6 ± 4 (35)	5 ± 3 (35)

**Tableau 2-4: Cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.**

**Les résultats (moyennes ± écart type) sont exprimés en pourcentages. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.**

### 2.3.2. Les cellules NK

Trois marqueurs ont été étudiés pour identifier les cellules NK: le CD16 (ou Fcγ RIII), le CD56 et le CD57.

Le pourcentage de lymphocytes exprimant ces marqueurs diminue au cours de la culture dans toutes les conditions expérimentales ( $p < 0,01$ ) (tableau 2-5). Cette diminution est légèrement plus accentuée pour la condition IL-2 + BMA030 ( $p < 0,005$ ). Cette diminution est beaucoup plus visible lorsqu'au moment de la mise en culture, le pourcentage de cellules NK est supérieur à 15% comme c'est le cas pour certains échantillons de PBL. Une fraction (40-70%) des cellules CD16<sup>+</sup> et CD56<sup>+</sup> expriment le CD2 (résultats non illustrés). Les marqueurs CD16, CD56 et CD57 peuvent être exprimés simultanément ou non sur la même cellule. Le nombre absolu de cellules NK diminue au cours de la culture, mais il reste similaire dans les deux conditions de stimulation.

	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD16	14 ± 7 (28)	7 ± 3 (28)	6 ± 4 (28)	4 ± 3 (28)
CD56	17 ± 9 (29)	7 ± 5 (29)	11 ± 6 (29)	9 ± 7 (29)
CD57	16 ± 7 (35)	11 ± 6 (35)	10 ± 6 (35)	9 ± 5 (35)

**Tableau 2-5: Marqueurs des cellules NK dans les cultures de PBL.**

**Les résultats (moyenne ± écart-type) sont exprimés en pourcentages. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.**

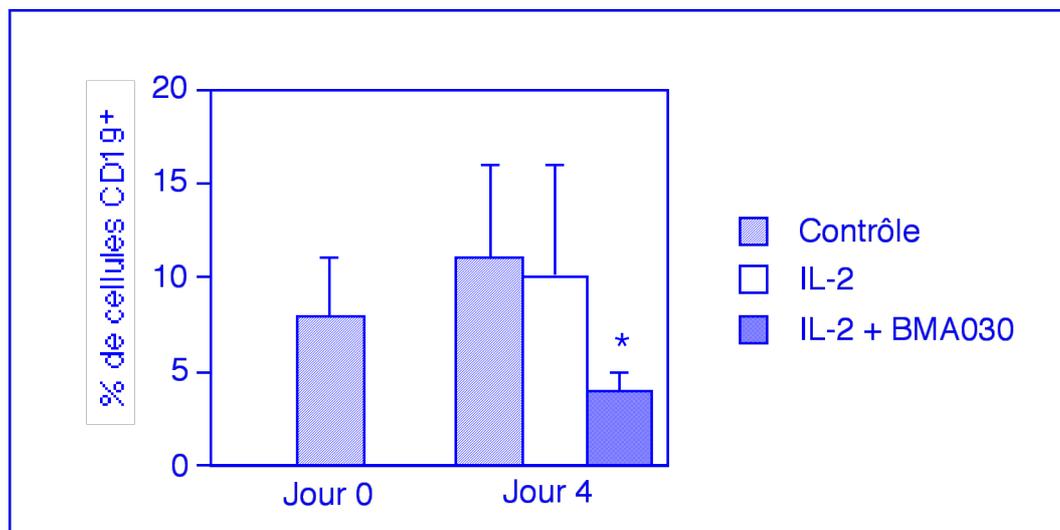
### 2.3.3. Les lymphocytes B

La proportion de lymphocytes B est définie grâce aux marqueurs CD19 et CD20 qui sont spécifiques de ce type cellulaire.

Le pourcentage des cellules CD19<sup>+</sup> diminue après quatre jours de culture en présence d'IL-2 + BMA030 ( $p < 0,05$ ) (figure 2-6). L'étude de l'expression du marqueur CD20 montre également une diminution du pourcentage de lymphocytes B après stimulation par un anticorps anti-CD3 (résultats non illustrés). Le nombre absolu de lymphocytes B diminue au cours de la culture, cette diminution est légèrement plus accentuée en présence d'IL-2 et de BMA030.

### 2.3.4. Monocytes

La majorité des cellules sont des lymphocytes, mais environ  $9 \pm 6 \%$  ( $n = 23$ ) de monocytes (CD14<sup>+</sup>) sont présents au moment de la mise en culture des leucocytes (résultat non illustré). Après quatre jours de culture, moins d'1% de ces monocytes (CD14<sup>+</sup>) sont détectés quelle que soit la condition de culture (résultat non illustré).



**Figure 2-6:** Pourcentage de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

Les résultats (moyenne  $\pm$  écart type) de 6 expériences sont représentés (p est calculé par rapport au pourcentage obtenu le jour de la mise en culture, \* :  $p < 0,05$ ).

## 2.4. Discussion

La mise en culture des lymphocytes sanguins et plus particulièrement la stimulation par l'IL-2 et par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 induit des changements dans les proportions des différentes populations lymphocytaires .

Dès le quatrième jour de culture des PBL en présence d'un anticorps anti-CD3, la proportion de lymphocytes T augmente par rapport aux autres conditions de culture. Cette augmentation est faible, mais le nombre élevé d'expériences (cinquante pour certains marqueurs) permet de dégager une différence statistiquement significative. La différence de pourcentage de lymphocytes T entre les deux conditions de stimulation s'accroît au cours de la culture. Si on considère le nombre absolu de lymphocytes T, la différence entre les deux conditions de stimulation peut atteindre un facteur 10. L'augmentation de la proportion des lymphocytes T, après une stimulation par un anticorps anti-CD3, se fait au détriment des populations de cellules NK et de lymphocytes B. Cependant, le nombre absolu de cellules NK est similaire dans les deux conditions de stimulation alors que le nombre de lymphocytes B est plus faible après une stimulation en présence de BMA030.

---

Après quatre jours de culture, la proportion de lymphocytes T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  est comparable à celle observée au moment de la mise en culture. Par contre, on remarque un enrichissement en lymphocytes T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  dans les cultures à long terme de PBL (Jacobs *et al.*, 1991). Les pourcentages sont similaires pour les deux conditions de stimulation, mais le nombre absolu de cellules T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  est nettement supérieur après une stimulation par un anticorps anti-CD3. Une autre étude, réalisée dans le laboratoire, sur des TIL provenant d'une métastase d'un ostéosarcome, a également montré une expansion des lymphocytes T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  pouvant atteindre 50% de la population totale en présence d'IL-2 (Moutschen *et al.*, 1994). Contrairement aux études réalisées chez des animaux, les échantillons de sang proviennent d'une population de donneur hétérogène du point de vue génétique et des antécédents immunitaires. De ce fait, Il est possible que la prolifération de lymphocytes T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  dépende du donneur. En effet, il existe des familles dont les lymphocytes T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  sont capables de répondre en culture à l'IL-2 tandis que d'autres pas.

Au sein de la population des lymphocytes T, les proportions relatives des sous-populations cellulaires CD4 et CD8 varient en fonction des conditions de culture. Un très faible pourcentage de cellules exprime simultanément les deux marqueurs dans le sang; ce pourcentage n'évolue pas au cours de la culture (résultats non illustrés). Le rapport entre les cellules T  $\text{CD4}^+$  et les cellulules T  $\text{CD8}^+$  vaut environ 1,6. Cette valeur correspond à celle rapportée dans la littérature (Chatenoud *et al.*, 1982). Après une augmentation faible de ce pourcentage au quatrième jour de culture, dans les conditions de stimulation, ce rapport diminue fortement. La diminution est plus accentuée en présence d'anticorps anti-CD3 (0,3 versus 0,8 pour la condition en présence d'IL-2 seule). Une augmentation de la proportion de lymphocytes  $\text{CD8}^+$  après une culture en présence d'un anticorps anti-CD3 a déjà été rapportée (Ochoa *et al.*, 1989; Moiré *et al.*, 1990). La détection préférentielle du récepteur  $\beta$  pour l'IL-2 (CD122) à la surface des lymphocytes  $\text{CD8}^+$  (Yagita *et al.*, 1989; Moiré *et al.*, 1991) pourrait être une explication de la prolifération accrue des lymphocytes  $\text{CD8}^+$ .

Nous n'avons pas constaté d'augmentation du pourcentage de cellules NK dans les cultures de PBL en présence d'IL-2, contrairement à Azuma et à ses collaborateurs (1994). Dans cette étude, une diminution de la proportion de cellules NK n'est observée qu'après 21 jours de culture. Notons que pour stimuler les PBL, ils ont utilisé une concentration en IL-2 deux fois plus élevée que celle que nous avons employée. Une diminution du pourcentage de cellules NK ( $\text{CD16}^+$  ou  $\text{CD56}^+$ ) en présence d'anticorps anti-CD3 a été également observée dans d'autres études (Platts *et al.*, 1993).

Des molécules intervenant dans l'activation des lymphocytes T (CD2 et CD4) (Brottier *et al.*, 1985; Veillette *et al.*, 1989, Valentin *et al.*, 1990) sont exprimées plus intensément à la surface des PBL après une culture en présence d'IL-2 et d'anticorps

---

anti-CD3. Une expression accrue du CD2 a déjà été décrite après une stimulation des lymphocytes par un anticorps anti-CD3 et il a été démontré que celle-ci est dépendante de l'activité de protéines kinases (PKC et PTK) (Chiaffarino *et al.*, 1994).

En résumé, la présence d'un anticorps anti-CD3 induit une augmentation du nombre de lymphocytes T au détriment des cellules NK et des lymphocytes B. Dans les cultures à long terme de PBL, l'expansion des lymphocytes T TCR  $\gamma\delta^+$  et CD8<sup>+</sup> est favorisée, mais le nombre réduit d'expériences ne permet pas de savoir si cette observation est dépendante du donneur. La stimulation par l'IL-2 seule induit peu de changements dans les proportions des différentes populations de lymphocytes du sang excepté une augmentation de la proportion des lymphocytes T TCR  $\gamma\delta^+$  et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par rapport aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les cultures à long terme.

## **Chapitre 3: Marqueurs d'activation et de différenciation**

### **3.1. Introduction**

Les cellules activées peuvent être discriminées des autres cellules par une modification de leur morphologie, mais aussi par la détection de nouveaux marqueurs de surface ou par un changement d'expression de certaines molécules de surface. Le récepteur pour l'IL-2 et la molécule de classe II du CMH sur les lymphocytes T sont deux exemples de ces marqueurs. D'autres molécules interviennent dans l'activation des lymphocytes T comme la molécule CD28 qui lie le CD80 (B7-1) ou le CD86 (B7-2) présents à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (pour revues: Linsley et Ledbetter, 1993; Boussiotis *et al.*, 1994<sup>b</sup>).

L'activation du système immunitaire par un antigène entraîne une réponse contre celui-ci, mais aussi une différenciation de certaines cellules en cellules mémoires (pour revues: Gray, 1994; Ahmed et Gray, 1996). Lors d'une deuxième exposition à cet antigène, les cellules mémoires induiront une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace (pour revues: Mackay, 1991; Bradley *et al.*, 1993). Des marqueurs de surface permettent d'identifier les cellules T mémoires et les cellules T naïves. Les isoformes de la molécule CD45 sont fréquemment utilisés. L'isoforme CD45R0 est présent à la surface des cellules T mémoires tandis que l'isoforme CD45RA est caractéristique des cellules T naïves (Akbar *et al.*, 1988; Lee et Vitetta, 1990; Plebanski *et al.*, 1992). Dans le thymus, ces marqueurs ont une autre signification qu'en périphérie. En fait, l'induction du passage du phénotype CD45RA<sup>+</sup> au phénotype CD45R0<sup>+</sup> déclencherait la mort par apoptose de ces cellules (Merkenschlager et Fisher, 1991).

Outre le CD45R0, les cellules T mémoires sont également caractérisées par une expression plus élevée d'autres marqueurs tels que le CD29, le CD44 et les molécules d'adhésion (CD2, CD11a/CD18 ou LFA-1) (Sanders *et al.*, 1988). Ces dernières interviennent à plusieurs niveaux dans la réponse immunitaire. Elles jouent un rôle important dans la migration des lymphocytes. Elles prennent part également à différentes fonctions des lymphocytes T. Par exemple, le complexe LFA-1 est

---

nécessaire à l'induction de l'activité cytotoxique des lymphocytes T (Lancki *et al.*, 1987).

Dans ce chapitre, nous avons étudié les changements morphologiques et les variations d'expression des marqueurs de différenciation dans les différentes conditions expérimentales.

## 3.2. Méthodologie

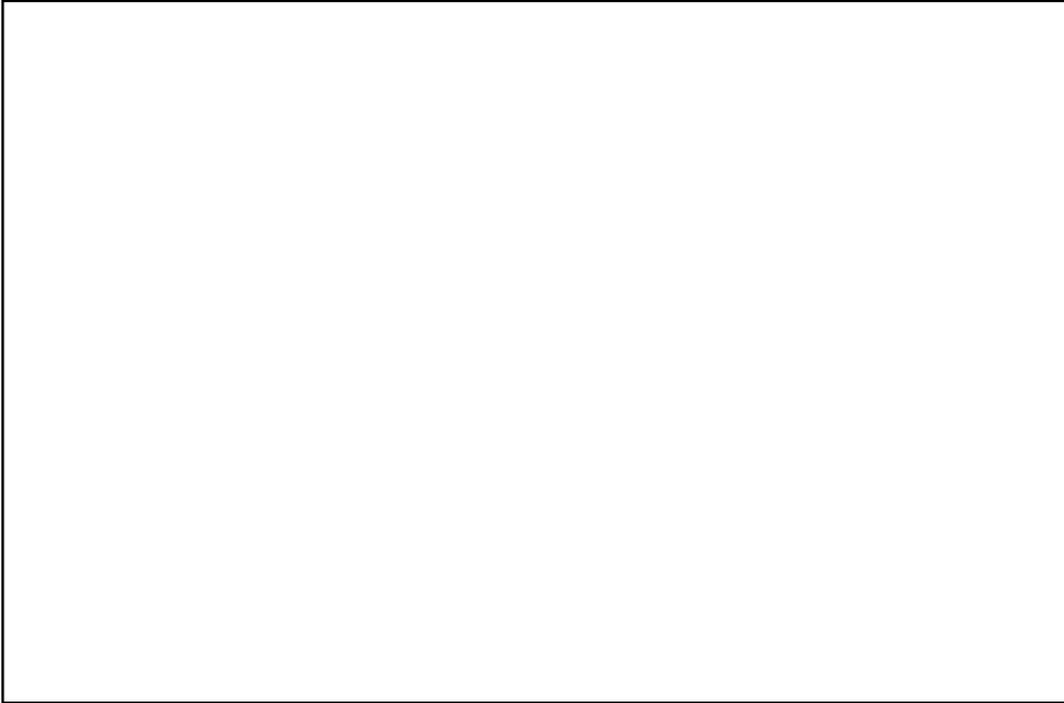
L'aspect des cellules a été analysé soit directement au microscope à contraste de phase, soit après réalisation de frottis cellulaires par cyto centrifugation et coloration des cellules par la technique de May-Grünvald.

La présence des marqueurs d'activation a été mise en évidence grâce à des anticorps fluorescents détectés par cytométrie en flux. Les cellules étudiées sont identiques à celles rapportées dans le chapitre 2. La liste des anticorps utilisés est reprise dans l'annexe méthodologique.

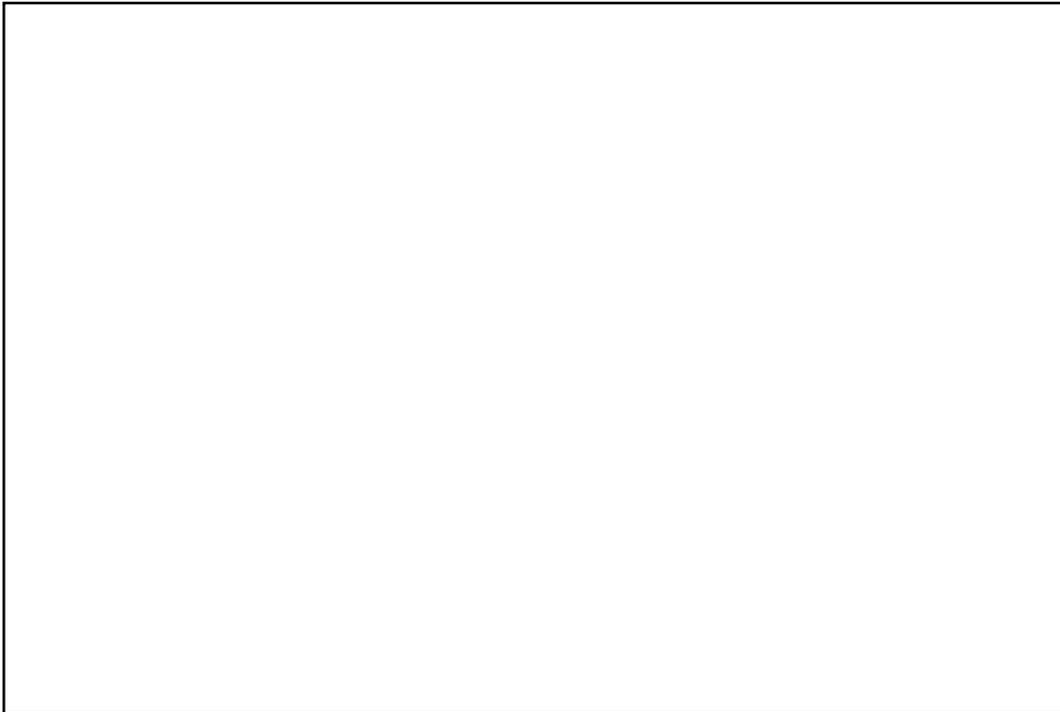
## 3.3. Résultats

### 3.3.1. Aspect des cultures

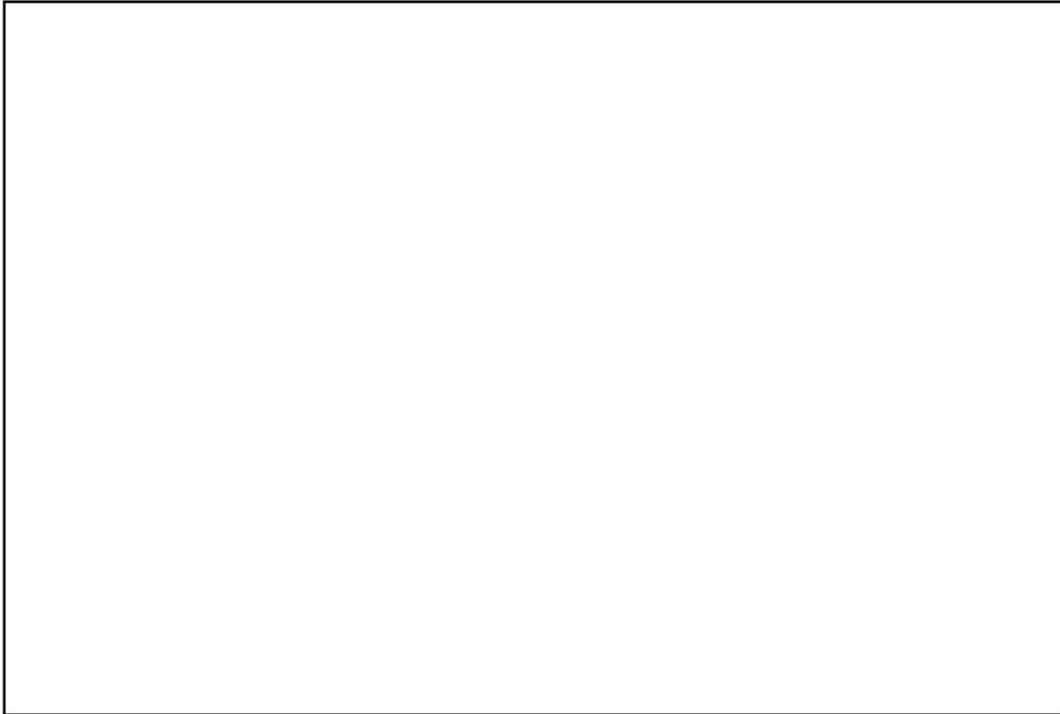
Les cellules provenant des différentes cultures sont observées au microscope à contraste de phase (figures 3-1, 3-3 et 3-5). Des frottis cellulaires par cyto centrifugation ont également été réalisés (figures 3-2, 3-4 et 3-6). L'aspect général des cultures diffère en fonction des conditions de stimulation. Lorsque le milieu de culture est additionné de BMA030, les cellules forment des amas constitués de nombreuses cellules (figure 3-5) alors qu'ils ne comprennent que quelques éléments en présence d'IL-2 seule (figure 3-3). De plus, certaines cellules se caractérisent par une forme différente. Les cellules fraîchement prélevées ou cultivées sans mitogène présentent une forme sphérique (figure 3-1) tandis que les cellules cultivées en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 ont une forme moins régulière et sont de plus grande taille (figures 3-3, 3-4, 3-5 et 3-6). La proportion de ces cellules et des figures de mitoses est accrue dans la condition de culture IL-2 + BMA030. Des cellules de grande taille sont également observées dans la condition de culture contrôle, mais dans ce cas ce ne sont pas des lymphocytes activés, mais des cellules de type macrophage (figure 3-2).



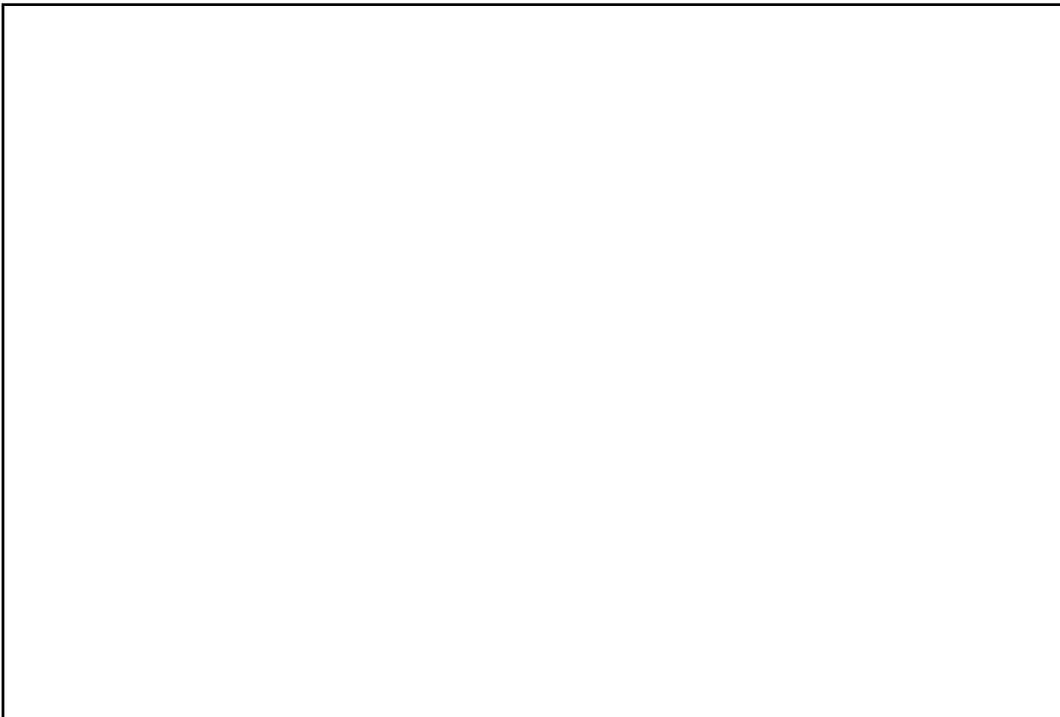
**Figure 3-1:** Lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours (condition contrôle).  
Grossissement 200X.



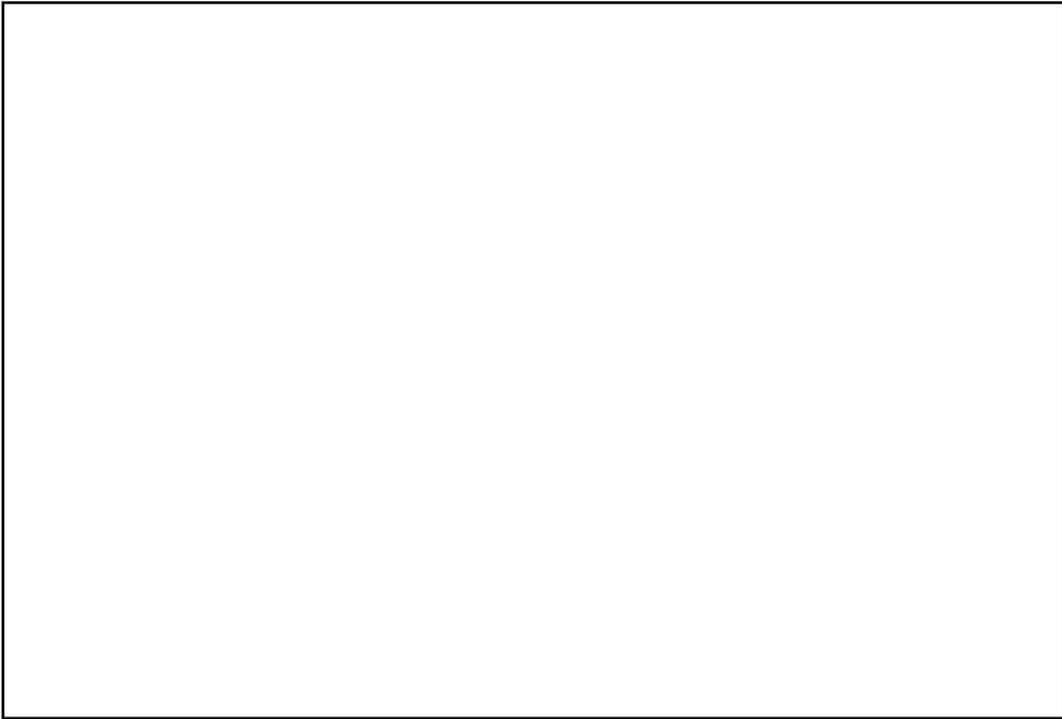
**Figure 3-2:** Frottis de lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours (condition contrôle).  
Les cellules sont colorées par la technique de May-Grünvald.



**Figure 3-3:** Lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 .  
Grossissement 200X.



**Figure 3-4:** Frottis de lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours en présence  
d'IL-2.  
Les cellules sont colorées par la technique de May-Grünvald.

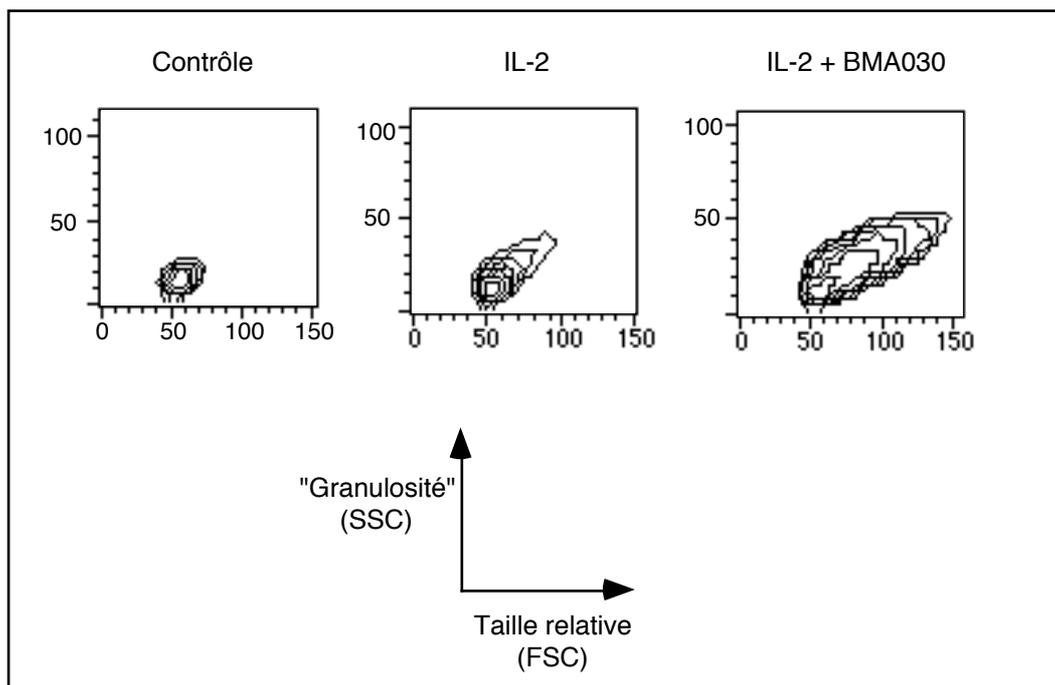


**Figure 3-5:** Lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 + BMA030.  
Grossissement 200X.



**Figure 3-6:** Frottis de lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 + BMA030.  
Les cellules sont colorées par la technique de May-Grünvald.

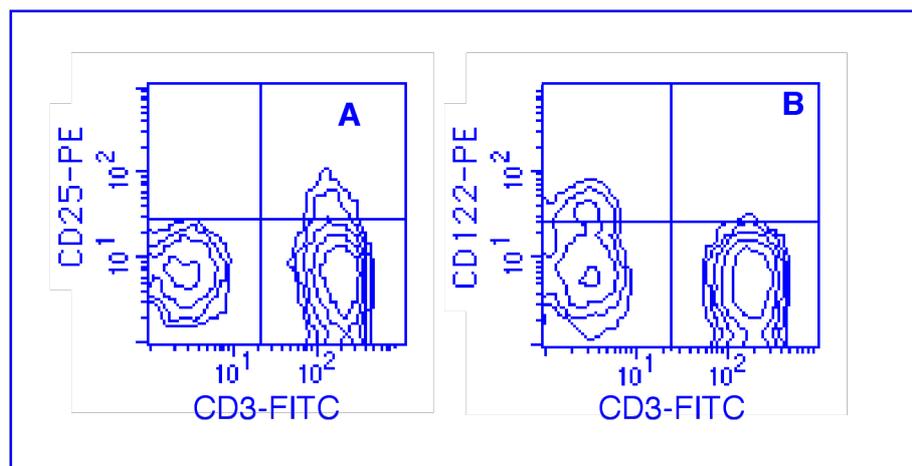
Une évaluation de la morphologie cellulaire peut également être réalisée en cytométrie en flux. La diffusion lumineuse mesurée aux petits angles (FSC), c'est-à-dire dans une direction proche de l'axe de propagation du laser, résulte de la lumière diffractée par les cellules dont l'intensité est fonction, notamment, de la taille relative de celles-ci. La diffusion lumineuse mesurée dans une direction orthogonale (SSC) à la précédente dépend essentiellement de la lumière réfractée par les cellules, dont l'intensité est fonction, notamment, des irrégularités des membranes et de la densité corpusculaire intracellulaire. Les cellules cultivées en présence d'IL-2 et d'IL-2 + BMA030 présentent une taille relative plus élevée que les cellules de la condition contrôle (figure 3-7). Les valeurs de SSC sont également supérieures indiquant une hétérogénéité accrue de la densité corpusculaire intracellulaire et un contour des cellules moins régulier. La proportion de cellules possédant ces caractéristiques est plus faible dans les cultures additionnées seulement d'IL-2 (figure 3-7).



**Figure 3-7:** Évaluation de la morphologie cellulaire des PBL par cytométrie en flux après une culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030. Les valeurs des "scatters" FSC (taille relative des cellules) et SSC (forme et texture interne des cellules) sont représentées par des contours d'isodensité.

### 3.3.2. Marqueurs d'activation

Le récepteur  $\alpha$  pour l'interleukine-2 (CD25) est principalement mis en évidence à la surface des cellules T (figure 3-8 A) alors que le récepteur  $\beta$  pour l'interleukine-2 (CD122) est détecté à la surface des cellules non T (CD3<sup>-</sup>) (figure 3-8 B). Après stimulation, le récepteur  $\alpha$  pour l'IL-2 (CD25) est exprimé par une plus grande proportion de cellules (11% pour la condition IL-2 versus 5% pour la condition contrôle). Cette augmentation est beaucoup plus intense (67%) lorsque l'anticorps anti-CD3 est présent dans le milieu de culture (tableau 3-1). Par contre, après quatre jours de culture, l'expression du récepteur  $\beta$  est similaire ou inférieure dans les conditions de stimulation par rapport à la condition contrôle. Les cellules qui expriment de manière plus intense le marqueur CD2 co-expriment le CD25 (résultats non illustrés).



**Figure 3-8:** Expression du CD25 (A) et du CD122 (B) sur les cellules T (CD3<sup>+</sup>) et non T (CD3<sup>-</sup>).

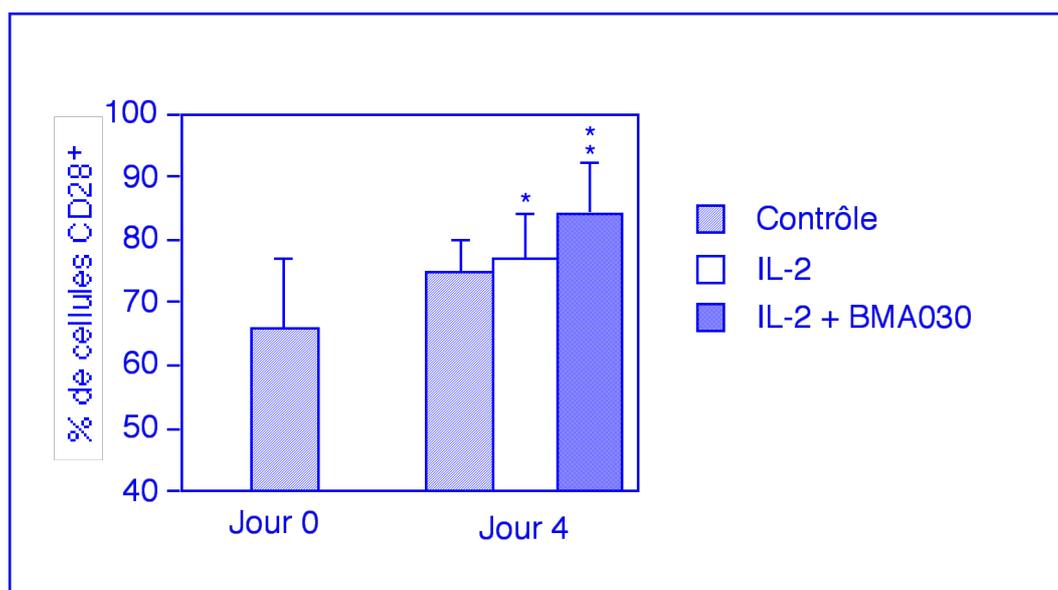
Le marquage a été réalisé sur des lymphocytes du sang périphérique fraîchement prélevés.

Les molécules de classe II du CMH (HLA-DR) sont exprimées sur un grand nombre de lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) après activation en présence d'IL-2 ( $p < 0,05$ ). La présence d'un anticorps anti-CD3 accroît encore ce pourcentage ( $p < 0,01$ ) (tableau 3-1).

	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD25	6 ± 5 (46)	5 ± 3 (46)	11 ± 4 (46)	67 ± 11 (46)
CD122	10 ± 4 (4)	8 ± 2 (4)	7 ± 3 (4)	4 ± 3 (4)
CD3 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	4 ± 3 (10)	6 ± 3 (10)	14 ± 7 (10)	34 ± 12 (10)

**Tableau 3-1:** Cellules exprimant les marqueurs d'activation CD25, CD122 et HLA-DR dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 et d'IL-2 + BMA030. Les résultats (moyenne ± écart type) sont exprimés en pourcentages. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.

Le pourcentage de cellules exprimant la molécule CD28 augmente dans les conditions de stimulation par rapport au pourcentage obtenu le jour de la mise en culture ( $p < 0,01$ ) (figure 3-9). L'augmentation est plus visible lorsque l'anticorps BMA030 est présent dans la culture. En effet,  $84 \pm 8\%$  ( $n = 9$ ) des lymphocytes expriment le CD28 dans cette condition contre  $77 \pm 7\%$  ( $n = 9$ ) en présence d'IL-2 et  $67 \pm 11\%$  ( $n = 9$ ) le jour de la mise en culture. Le pourcentage de cellules CD28<sup>+</sup> a également tendance à augmenter dans la condition de culture contrôle, mais dans ce cas on observe pas de différence statistique.



**Figure 3-9:** Pourcentage de lymphocytes CD28<sup>+</sup> dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

Les résultats (moyenne  $\pm$  écart type) de 9 expériences sont représentés (p est calculé par rapport au pourcentage obtenu le jour de la mise en culture, \* :  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Signalons que l'intensité d'expression de ce marqueur est plus élevée après stimulation par l'IL-2 + BMA030 (résultats non illustrés).

### 3.3.3. Marqueurs des cellules naïves et mémoires

Parmi les PBL, les cellules exprimant le marqueur CD45RA (64%) sont plus nombreuses que les cellules CD45R0<sup>+</sup> (39%) (tableau 3-2). Après quatre jours de culture, la stimulation par l'IL-2 + BMA030 induit une augmentation de la proportion de cellules mémoires CD45R0<sup>+</sup> (61%) au détriment des cellules CD45RA<sup>+</sup> (48%). Par contre, après une stimulation par IL-2 seule, aucune différence dans les pourcentages n'est observée (tableau 3-2). Il semble que le changement de phénotype CD45RA<sup>+</sup> vers un phénotype CD45R0<sup>+</sup> passe par un stade intermédiaire de cellules positives pour le CD45RA<sup>+</sup> et le CD45R0<sup>+</sup> (figure 3-10).

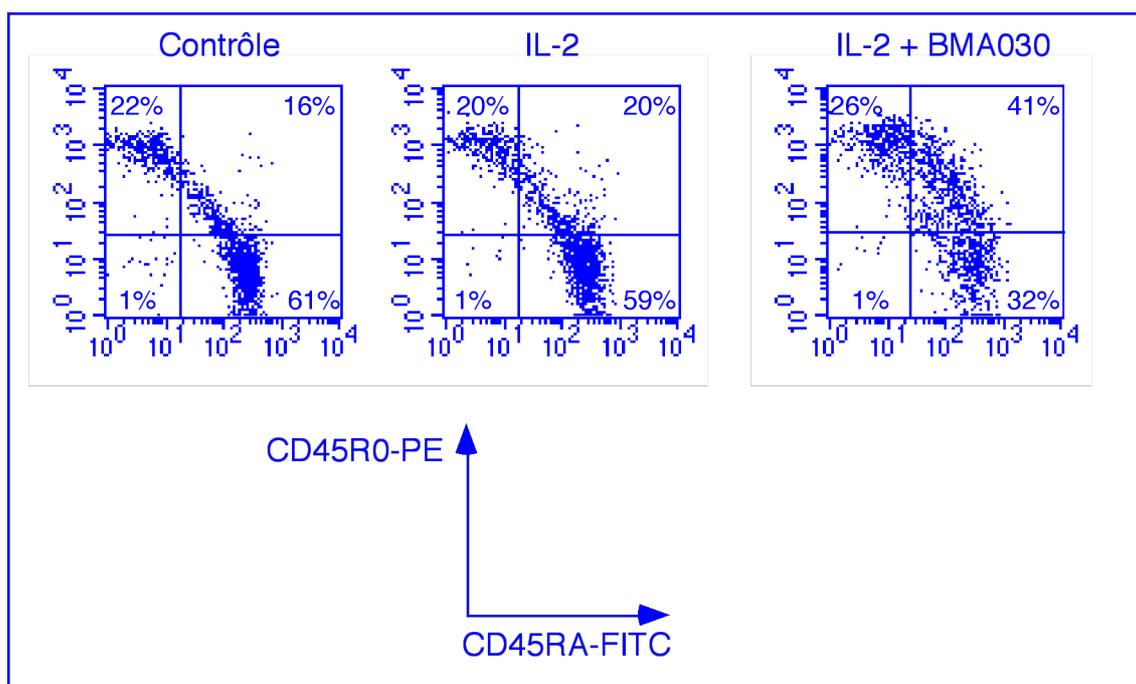
	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD45R0	39 $\pm$ 10 (47)	39 $\pm$ 10 (47)	39 $\pm$ 10 (47)	61 $\pm$ 11 (47)
CD45RA	64 $\pm$ 9 (44)	63 $\pm$ 11 (44)	66 $\pm$ 10 (44)	48 $\pm$ 16 (44)

**Tableau 3-2: Cellules CD45R0<sup>+</sup> et CD45RA<sup>+</sup> dans les différentes conditions de culture. Les résultats (moyenne  $\pm$  écart type) sont exprimés en pourcentages. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.**

En présence d'IL-2 et de BMA030, les cellules exprimant l'isoforme CD45R0 dans la condition de culture présentent une taille supérieure aux cellules CD45RA<sup>+</sup> (résultats non illustrés). Une augmentation des cellules exprimant intensément le marqueur CD29 est aussi observée dans cette condition de culture (résultats non illustrés).

L'expression de ces deux molécules a été étudiée dans la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (tableau 3-3). Environ la moitié des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> expriment le marqueur CD45RA le jour de la mise en culture et après quatre jours de culture en présence d'IL-2 ou sans mitogène (condition contrôle). Par contre, après une stimulation par un anticorps anti-CD3, la proportion de ces cellules diminue (35%) alors que le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> augmente (71%) ( $p < 0,01$ ).

Les cellules sur-exprimant le marqueur CD4 (voir chapitre 2) sont principalement CD45R0<sup>+</sup> (résultats non illustrés). La proportion de cellules CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> est également supérieure après une stimulation par l'IL-2 + BMA030 (54% contre environ 25% pour les autres conditions,  $p < 0,01$ ) (tableau 3-3). Nous n'avons pas évalué le pourcentage de cellules CD45RA<sup>+</sup> parmi les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> car les anticorps dont nous disposons ne nous permettait pas cette combinaison de marquage.



**Figure 3-10: Expression des marqueurs CD45RA et CD45R0 sur les PBL cultivés quatre jours en présence d'IL-2 et d'IL-2 + BMA030.**  
Les résultats d'une expérience représentative sont présentés sous forme de diagramme de dispersion des intensités de fluorescence représentées sur des échelles logarithmiques.

	Jour 0		Jour 4	
	Contrôle	Contrôle	IL-2	IL-2 + BMA030
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	48 ± 13 (15)	48 ± 12 (15)	51 ± 12 (15)	35 ± 12 (15)
CD4 <sup>+</sup> CD45R0 <sup>+</sup>	56 ± 12 (18)	51 ± 12 (18)	51 ± 15 (18)	71 ± 14 (18)
CD8 <sup>+</sup> CD45R0 <sup>+</sup>	26 ± 8 (10)	24 ± 6 (10)	27 ± 8 (10)	54 ± 14 (10)

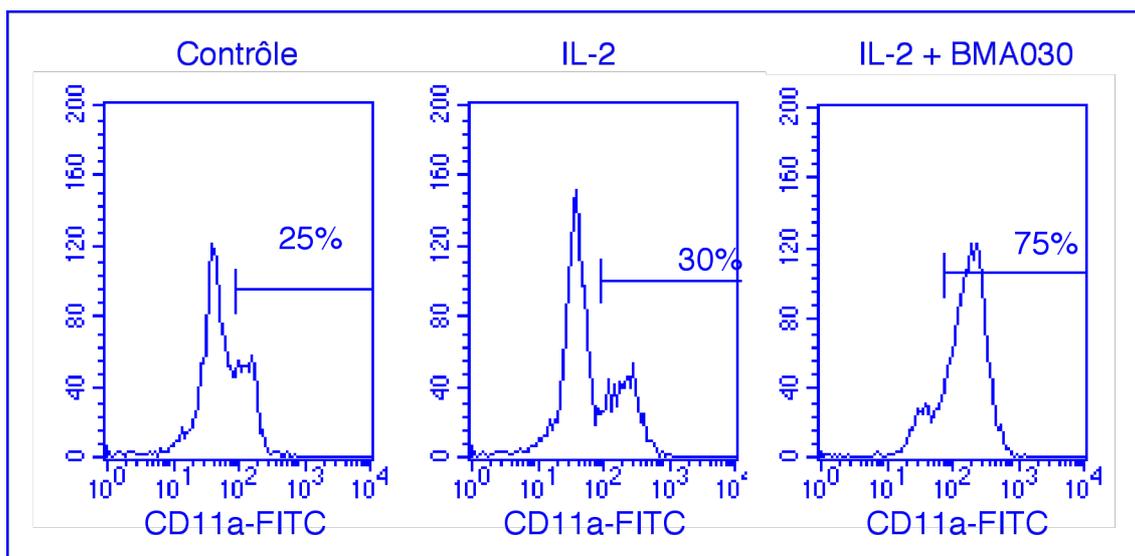
**Tableau 3-3: Cellules CD45R0<sup>+</sup> et CD45RA<sup>+</sup> dans les sous-populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.**

Les résultats (moyenne ± écart type) sont exprimés en pourcentages. Le nombre d'expériences est repris entre parenthèses.

Le nombre absolu de cellules CD4<sup>+</sup> exprimant le marqueur CD45RA est similaire dans les deux conditions de stimulations, par contre le nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> est approximativement doublé dans la culture en présence d'IL-2 + BMA030 par rapport aux nombres obtenus dans la condition contrôle ou en présence d'IL-2 seule. De même, une expansion des cellules CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> est observée uniquement après une stimulation par l'IL-2 et BMA030.

### 3.3.4. Molécules d'adhésion

L'expression des molécules CD11a et CD18 (complexe LFA-1) a été étudiée dans les différentes conditions de culture. La molécule CD11a est exprimée par tous les lymphocytes, mais seulement une proportion de ceux-ci l'exprime de manière intense (cellules CD11a<sup>high</sup>). En l'absence de stimulation ou en présence d'IL-2 seule, nous observons fréquemment une diminution de l'intensité de l'expression de la molécule CD11a par rapport à l'intensité mesurée au jour 0. Chez certains donneurs, un plus grand pourcentage de cellules exprimant intensément la molécule CD11a apparaît après stimulation par l'IL-2, mais généralement le pourcentage (environ 30%) de cellules de ce type est similaire à celui observé dans la condition contrôle (figure 3-11). Par contre, la population de cellules CD11a<sup>high</sup> est nettement plus importante après stimulation par l'IL-2 + BMA030 (61± 13%, n = 24) (figure 3-11). Des résultats similaires sont obtenus lorsque le marquage est réalisé avec l'anticorps anti-CD18 (résultats non illustrés).



**Figure 3-11: Expression de la molécule CD11a dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.**

Le marquage a été réalisé après quatre jours de culture et les résultats d'une expérience représentative sont illustrés par les histogrammes de fluorescence de

---

**l'anticorps CD11a-FITC. Le nombre de cellules est représenté en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse.**

Dans les cultures en présence de BMA030, une plus grande proportion des cellules mémoires (CD45R0<sup>+</sup>) expriment intensément le CD11a ( $63 \pm 16\%$  contre  $43 \pm 16\%$  dans la condition en présence d'IL-2 et  $33 \pm 11\%$  dans la condition contrôle,  $n = 5$ ).

### 3.4. Discussion

La stimulation des PBL par l'IL-2 et, dans une plus large mesure, la stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 induit des changements morphologiques et phénotypiques des lymphocytes. L'apparition de lymphocytes de plus grande taille et présentant un cytoplasme plus granuleux a déjà été décrite après stimulation par l'OKT3 qui est un anticorps anti-CD3 bien connu (Jung *et al.*, 1986).

L'expression du récepteur pour l'IL-2 est fréquemment utilisée pour détecter les cellules activées. Le jour de la mise en culture, un faible pourcentage des PBL expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'IL-2 (CD25). Cette expression est essentiellement localisée sur les lymphocytes T. En fait, la chaîne  $\alpha$  est exprimée par certains lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Ohashi *et al.*, 1989; Ishii *et al.*, 1994) et par une faible proportion de cellules NK CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (Nagler *et al.*, 1990). Une augmentation de l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'IL-2 est observée pour les deux conditions de stimulation, mais elle est plus importante lorsque l'anticorps anti-CD3 est présent dans la culture. Les pourcentages de cellules CD25<sup>+</sup> obtenus dans les cultures en présence d'IL-2 ou d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3 sont comparables à ceux décrits dans la littérature (Welte *et al.*, 1984; Harel-Bellan *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1987). Au moment de la mise en culture, environ 10% des lymphocytes expriment la chaîne  $\beta$  du récepteur pour l'IL-2 (CD122). Le CD122 est détecté principalement à la surface des cellules NK. Il est également exprimé constitutivement par les lymphocytes T (Ohashi *et al.*, 1989), mais cette expression est faible et difficilement décelable par cytométrie en flux. Par contre, elle est observée sur les cellules NK car ceux-ci l'expriment de manière plus intense (Phillips *et al.*, 1989). Ceci explique que nous n'avons détecté le CD122 qu'à la surface des cellules CD3<sup>-</sup>. L'utilisation d'un autre anticorps que celui employé dans ce travail aboutit aux mêmes résultats (Nakarai *et al.*, 1994). Une détection du CD122 sur les lymphocytes T, et plus particulièrement sur les cellules CD8<sup>+</sup>, est possible si le signal de fluorescence est amplifié par l'utilisation d'un

anticorps couplé à la biotine et reconnu par une streptavidine-PE (Yagita *et al.*, 1989; Taga *et al.*, 1991; Ishii *et al.*, 1994). Bien qu'une augmentation importante de l'expression de la chaîne  $\alpha$  ait été détectée après stimulation, aucune augmentation de l'expression de la chaîne  $\beta$  n'est constatée. Par contre, un net accroissement de l'expression de la chaîne  $\beta$  est observé après stimulation par des anticorps anti-CD2 et anti-CD28, mais la détection du CD122 est réalisée à l'aide d'un anticorps biotinylé révélé par une streptavidine-PE (Cerdan *et al.*, 1995). Signalons également qu'après une stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3, l'ARNm de la chaîne  $\beta$  est détecté en plus grande quantité (Moiré *et al.*, 1990). L'absence d'une augmentation de l'expression du CD122 est peut-être due au jour choisi pour déterminer le phénotype (le jour 4). En effet, une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD122 a été constatée après quarante heures d'incubation en présence d'anticorps anti-CD3 immobilisés (Pimentel-Muiños *et al.*, 1994). Cette augmentation semble provisoire puisqu'après une stimulation des lymphocytes par de la phytohémmagglutinine (PHA), Nakarai et ses collaborateurs (1994) observent, au deuxième jour de la culture, une augmentation de l'expression du CD122 suivie d'un retour au niveau de base trois jours plus tard. Cette augmentation est, de toute façon, nettement plus faible que celle observée pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur. Ceci démontre qu'une forte expression de la chaîne  $\alpha$  n'est pas le reflet du pourcentage de cellules exprimant le récepteur pour l'IL-2 de haute affinité composé des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Cependant, une expression élevée de la chaîne  $\alpha$  aide à la formation de ce récepteur de haute affinité. Une autre explication de la faible détection du CD122 pourrait être la présence d'IL-2 sur le récepteur car l'anticorps que nous avons utilisé (TU27) bloque le site de liaison de l'IL-2 sur la chaîne  $\beta$  du récepteur (Takeshita *et al.*, 1989). D'ailleurs, aucune expression de la chaîne  $\beta$  n'est visible à la surface des cellules après 24 heures de culture en présence d'IL-2 (résultats non illustrés).

Une proportion accrue de lymphocytes T HLA-DR<sup>+</sup> est observée dans nos deux conditions de stimulation des PBL. Ici encore, le meilleur résultat est obtenu lorsque l'anticorps anti-CD3 est additionné au milieu de culture. Les cellules T HLA-DR<sup>+</sup> sont considérées comme des lymphocytes T activés (Ko *et al.*, 1979; Robbins *et al.*, 1988; Kamoun *et al.*, 1992). Ces cellules semblent nécessaires à la stimulation des lymphocytes T quiescents. En effet, en présence d'IL-2 et d'anti-CD3, les cellules T HLA-DR<sup>-</sup> ne prolifèrent pas en l'absence de lymphocytes T HLA-DR<sup>+</sup> et l'intensité de la réponse est dépendante du nombre de lymphocytes T HLA-DR<sup>+</sup> présents dans la culture (Bentin *et al.*, 1988).

Des changements d'expression de molécules d'adhésion sont également observés. Ainsi, le complexe d'adhésion LFA-1, important dans les phénomènes de cytotoxicité (Galandrini *et al.*, 1992; Berg et Ostergaard, 1995), est plus intensément

---

exprimé à la surface des PBL après une culture en présence d'un anticorps anti-CD3. Une augmentation de cette expression n'est constatée que plus rarement après une stimulation par l'IL-2 seule.

Environ 50% des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et 25% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> expriment l'isoforme CD45R0 (cellules T mémoires). Après quatre jours de culture, ces proportions augmentent en présence d'IL-2 et de BMA030 pour atteindre 70% dans la population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et 50% dans la population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'augmentation de la proportion de cellules mémoires dans cette condition de culture est confirmée par l'accroissement du pourcentage de cellules exprimant intensément le marqueur CD29. Le pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> diminue après une stimulation par un anticorps anti-CD3, mais le nombre absolu de ces cellules reste similaire à celui observé dans les autres conditions de culture. L'augmentation du nombre de cellules T CD45R0<sup>+</sup> peut résulter d'une prolifération préférentielle de ces cellules en présence d'un anticorps anti-CD3 (Sanders *et al.*, 1989), mais aussi d'une conversion des cellules CD45RA<sup>+</sup> en cellules CD45R0<sup>+</sup>. En effet, une proportion plus élevée de cellules CD45R0<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> est également observée dans cette condition de culture. Ce phénotype transitoire a déjà été décrit dans d'autres études (Johannisson et Festin, 1995). Notons que les pourcentages de cellules CD45R0<sup>+</sup> obtenus dans les cultures contrôles et en présence d'IL-2 restent comparables aux pourcentages observés au moment de la mise en culture. Unutmaz et ses collaborateurs (1994) ont montré qu'une combinaison de cytokines (IL-2, TNF  $\alpha$  et IL-6) induit la prolifération des cellules T naïves (CD45RA<sup>+</sup>), mais pas la conversion en cellules mémoires (CD45R0<sup>+</sup>). Cette absence de conversion en présence de cytokines permettrait le maintien d'un pool de cellules T naïves en périphérie.

En résumé, après une culture en présence d'un anticorps anti-CD3, les lymphocytes du sang périphérique acquièrent un phénotype de cellules activées (expression du CD25, de HLA-DR et phénotype de cellules T mémoires).

---

## Chapitre 4: Activités cytotoxiques

### 4.1. Introduction

L'étape suivante de notre travail consiste à caractériser l'acquisition d'une activité cytotoxique anti-tumorale dans les cultures de lymphocytes de sang périphérique.

Plusieurs tests permettent de quantifier l'activité anti-tumorale *in vitro*. Le test classiquement utilisé mesure la lyse de cellules tumorales après une incubation de quatre heures en présence des lymphocytes. Les cellules cibles sont préalablement marquées par du chrome radioactif et la mesure de la radioactivité dans le surnageant permet de déterminer le pourcentage de lyse (Brunner *et al.*, 1968).

Plusieurs études (Suhrbier *et al.*, 1991; Lancki *et al.*, 1991) ont montré une corrélation étroite entre l'activité cytotoxique de clones de lymphocytes T mesurée par un test au chrome radioactif et leur production de sérine estérases. Ces enzymes, aussi appelées granzymes, sont présentes dans les granules cytotoxiques des lymphocytes T et des cellules NK et participent, avec la perforine, à la lyse de cellules cibles (pour revue: Berke, 1995). Des travaux récents (Isaaz *et al.*, 1995) indiquent que la sécrétion de la perforine et des sérine estérases peut également être réalisée sans l'intermédiaire de granules. Plusieurs types de granzymes existent, les premiers décrits et les mieux étudiés sont les granzymes A et B (Krähenbühl *et al.*, 1988; Gershenfeld *et al.*, 1988; Trapani *et al.*, 1988; Kummer *et al.*, 1995). Un de leurs rôles est la dégradation de l'ADN des cellules cibles (Smyth et Trapani, 1995; Shresta *et al.*, 1995). La mort cellulaire par dégradation de l'ADN en fragments d'environ 200 paires de bases est appelée apoptose. L'induction de l'apoptose fait intervenir une famille d'enzymes appelée ICE (pour "IL-1 $\beta$  converting enzyme") (Lazebnik *et al.*, 1994; Los *et al.*, 1995). Ces enzymes sont activées par un clivage protéolytique, mais la régulation de ce mécanisme et la relation avec les sérine estérases n'est pas encore connue. Le granzyme

B clive les protéines au niveau du groupement carboxyl d'acides aminés acides tandis que le granzyme A a une spécificité proche de la trypsine et son site de clivage des protéines est adjacent à des résidus basiques. L'activité enzymatique du granzyme A peut être détectée grâce à un test colorimétrique (Pasternack et Eisen, 1985).

D'après Kägi et ses collaborateurs (1994), les deux mécanismes principaux de déclenchement de la destruction d'une cellule cible, mesurée *in vitro*, sont d'une part la sécrétion de perforine et de sérine estérases et d'autre part la liaison de la molécule Fas à son ligand. Cependant, plusieurs cytokines telles que l'IFN  $\gamma$  et TNF  $\alpha$  interviennent également dans les phénomènes de cytotoxicité. La liaison du TNF à son récepteur peut également induire l'apoptose (Tartaglia *et al.*, 1993) mais, malgré une similitude de structure entre Fas et le récepteur pour le TNF, la transmission du signal semble au moins partiellement distincte (Schulz-Osthoff *et al.*, 1994; Grell *et al.*, 1994; Wong et Goeddel, 1994). L'activité anti-tumorale liée au TNF  $\alpha$  et à l'IFN  $\gamma$  nécessite des temps d'incubation plus longs pour être détectée et ne peut être mesurée par les tests classiques de cytotoxicité en quatre heures. L'étude, *in vitro*, de l'inhibition de la croissance tumorale induite par la présence de lymphocytes permet d'évaluer ces différents mécanismes anti-tumoraux. Cette approche rend mieux compte des phénomènes complexes mis en place *in vivo*. Dans certains modèles expérimentaux, le rôle des cytokines dans l'activité anti-tumorale ne semble pas négligeable puisque des lymphocytes injectés dans une souris porteuse d'une tumeur sont capables d'induire la régression de celle-ci malgré l'absence d'une activité cytotoxique détectée par un test au chrome radioactif (Qian *et al.*, 1991; Segal *et al.*, 1992; Beun *et al.*, 1993).

L'objectif de ce chapitre est l'étude, par plusieurs tests complémentaires, du potentiel anti-tumoral des lymphocytes après une culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

## 4.2. Méthodologie

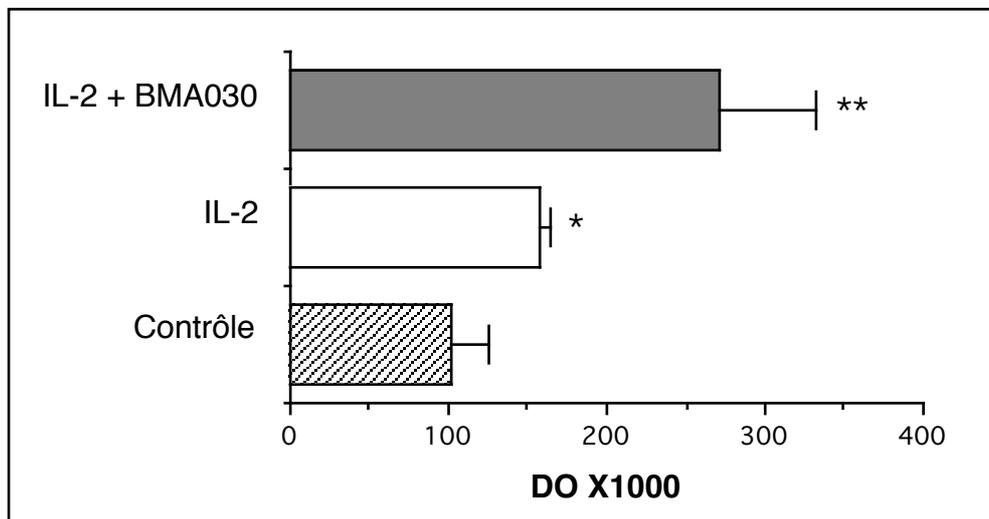
Les expériences rapportées dans ce chapitre sont réalisées avec des PBL cultivés pendant quatre jours. Les conditions de culture (contrôle, IL-2 et IL-2 + BMA030) sont identiques à celles décrites dans le chapitre 1 consacré à la prolifération cellulaire.

La production de sérine estérases est mesurée par un test colorimétrique (test BLT) (Pasternack et Eisen, 1985; Suhrbier *et al.*, 1991). Des tests de cytotoxicité de quatre heures au chrome radioactif (Brunner *et al.*, 1968) et des tests d'inhibition de croissance tumorale en 5 à 7 jours (test MTT) (Mosmann, 1983; Heo *et al.*, 1990) ont été réalisés.

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Activité sérine estérase

L'activité des sérine estérases, et plus particulièrement celle du granzyme A, est déterminée dans nos différentes conditions expérimentales par un test colorimétrique. Après quatre jours de culture, les cellules sont lysées et l'activité enzymatique totale est mesurée. L'activité du granzyme A est supérieure dans les deux conditions de stimulation ( $p < 0,05$ ) par rapport à la condition contrôle (figure 4-1). En présence de BMA030 et d'IL-2, la production de sérine estérases est plus importante qu'en présence d'IL-2 seule (figure 4-1).



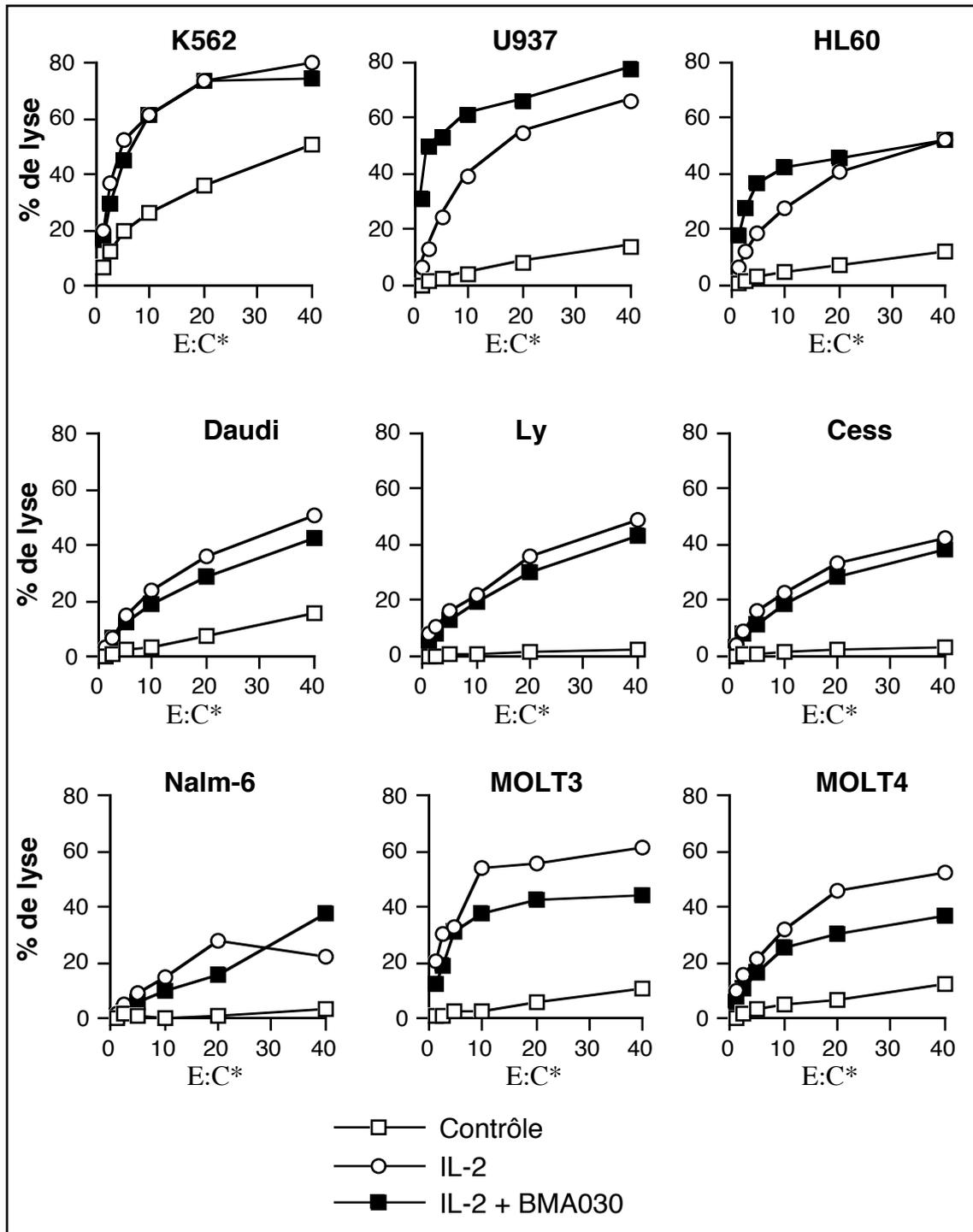
**Figure 4-1:** Activité du granzyme A dans des PBL cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

Les valeurs (moyenne  $\pm$  écart type) de trois expériences sont représentées (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; DO = densité optique).

---

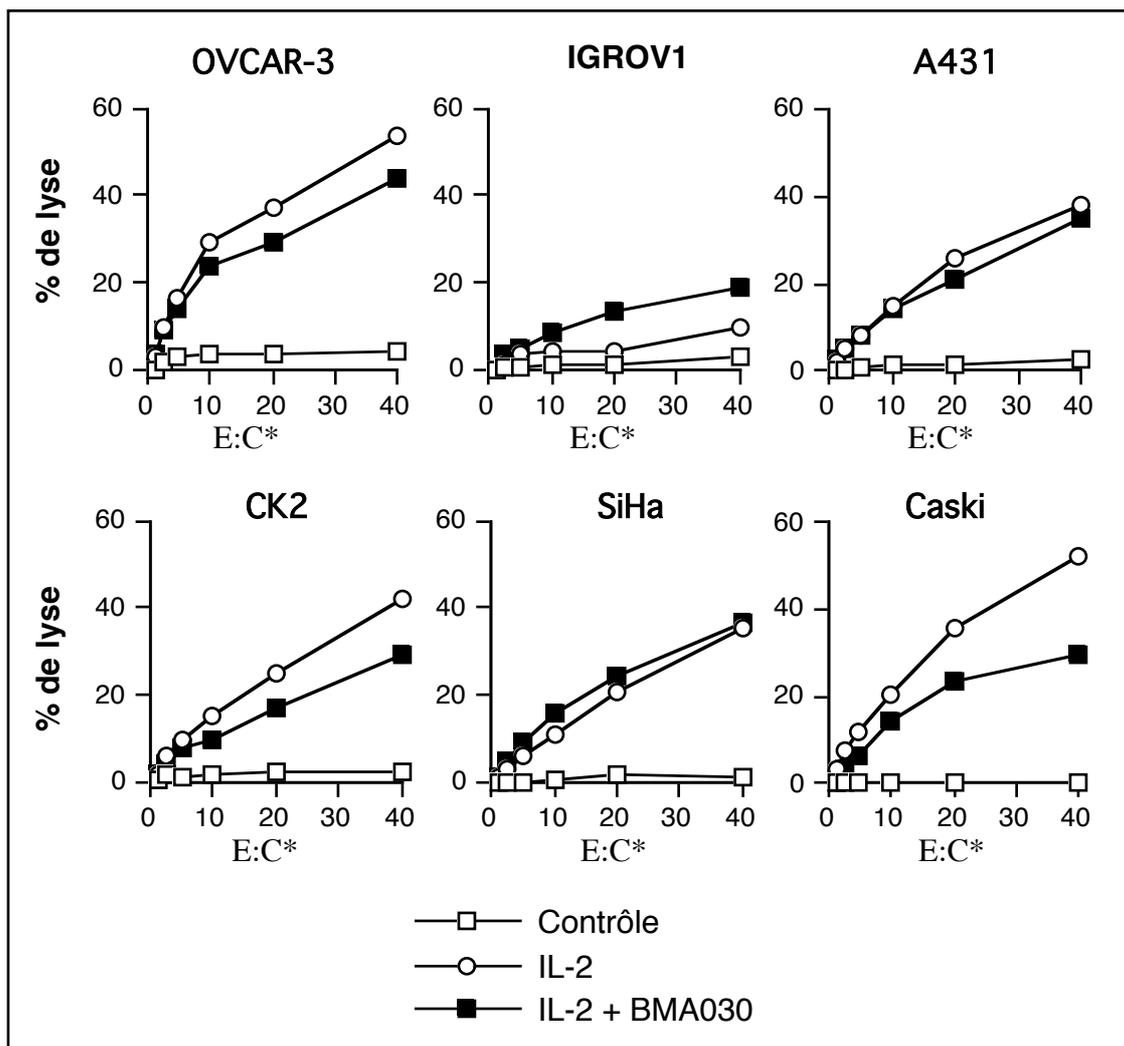
#### 4.3.2. Activité cytotoxique mesurée par un test de relargage de chrome radioactif

L'activité cytotoxique des PBL contre neuf lignées tumorales hématopoïétiques (K562, Daudi, U937, HL60, Cess, Ly, Nalm-6, MOLT-3, MOLT-4; figure 4-2) et six lignées tumorales adhérentes (OVCAR-3, IGROV1, A431, CK2, SiHa et Caski; figure 4-3) a été quantifiée par un test de cytotoxicité au  $^{51}\text{Cr}$  radioactif. Les lignées K562 et U937 sont décrites comme étant sensibles à la lyse par des cellules NK et les lignées Daudi et HL60 sont résistantes à la lyse par les cellules NK et sensibles à la lyse par des cellules LAK.



**Figure 4-2: Activités cytotoxiques de PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 contre neuf lignées tumorales hématopoïétiques.**

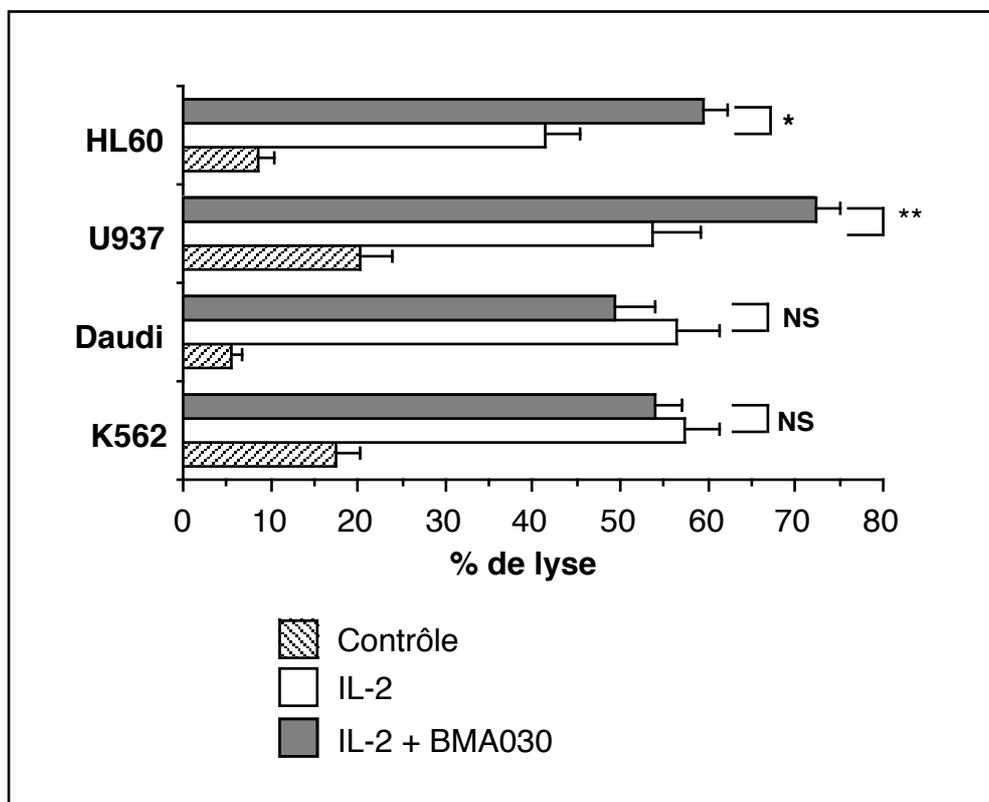
Le test de cytotoxicité au chrome est réalisé en triplicata (E:C\* = rapport cellules effectrices : cellules cibles marquées).



**Figure 4-3: Activités cytotoxiques de PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 contre six lignées tumorales adhérentes.**  
Le test de cytotoxicité au chrome est réalisé en triplicata (E:C\* = rapport cellules effectrices : cellules cibles marquées).

Les deux conditions de stimulation (IL-2 et IL-2 + BMA030) induisent des activités cytotoxiques contre ces différentes lignées tumorales. Ces activités sont supérieures à celles observées pour la condition contrôle (figure 4-2 et figure 4-3). Au moins deux expériences ont été réalisées avec chaque lignée cellulaire. Les différences observées entre les deux conditions de stimulation sont très variables selon les donneurs. Pour cette raison, un grand nombre d'expériences (15 à 30 expériences) ont été réalisées pour les lignées K562, Daudi, U937 et HL60 (figure 4-4). L'activité cytotoxique des cellules non-stimulées (contrôle) est inférieure à 25% contre les quatre lignées. Après stimulation (IL-2 et IL-2 + BMA030), le pourcentage de lyse est supérieur à 45% . Seule la lyse des lignées U937 ( $p < 0,01$ ) et HL60 ( $p < 0,05$ ) est

significativement plus élevée après stimulation par l'IL-2 + BMA030 par rapport à la stimulation par l'IL-2 (figure 4-4).

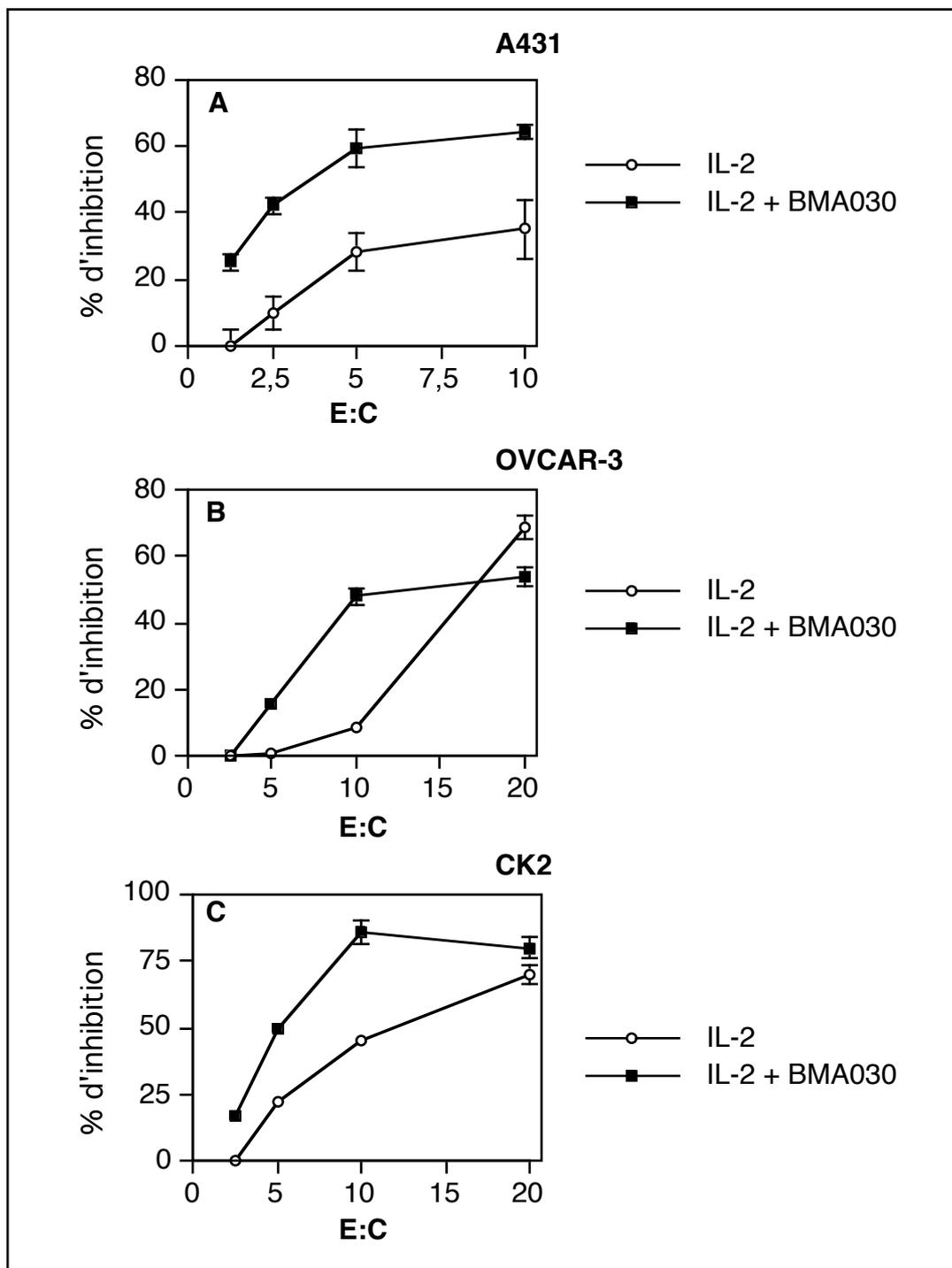


**Figure 4-4 :** Activités cytotoxiques des PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 contre quatre lignées tumorales. Les résultats (moyenne  $\pm$  erreur standard) sont représentés pour un rapport E:C\* égal à 20:1 (n = 15-30, \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; NS = non significatif).

#### 4.3.3. Inhibition de la croissance tumorale

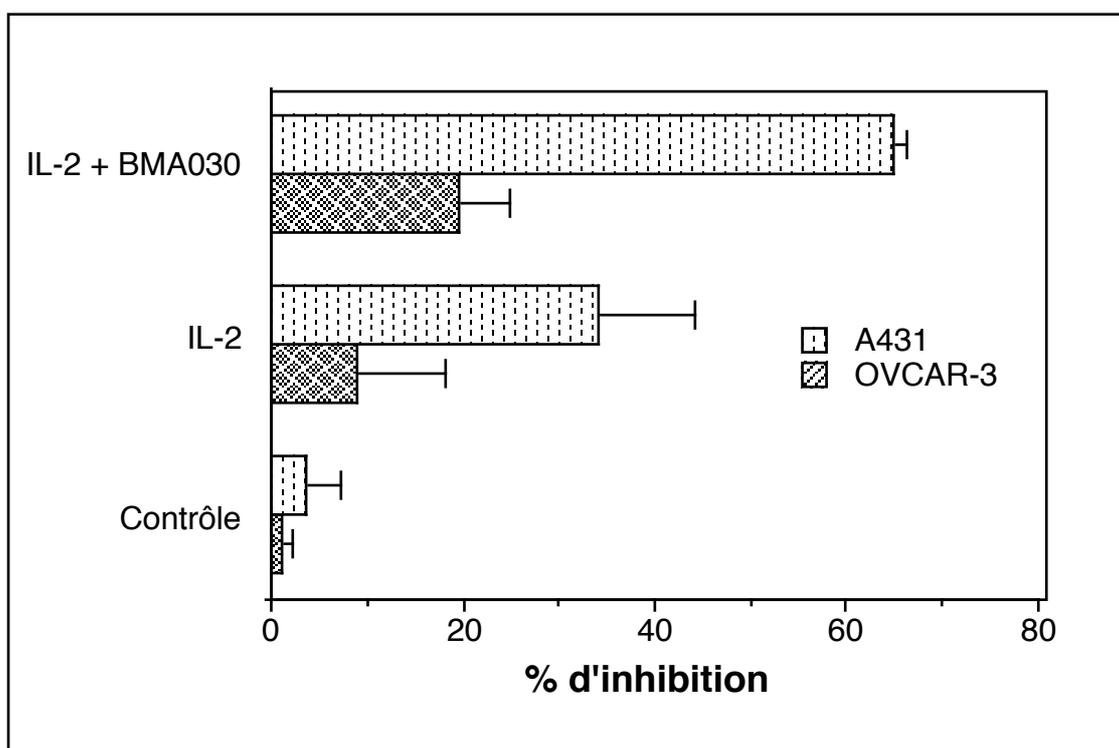
Des tests d'inhibition de croissance tumorale (tests MTT) ont été réalisés contre les trois lignées adhérentes A431, OVCAR-3 et CK2 (figure 4-5).

La stimulation des lymphocytes en présence d'un anticorps anti-CD3 génère une inhibition de croissance tumorale plus importante que la stimulation par IL-2 seule (figure 4-5). En effet, pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles de 10:1, l'inhibition de croissance de la lignée A431 est égale à 62% pour la condition IL-2 + BMA030 contre 30% pour la condition IL-2 seule (figure 4-5 A). Pour ce même rapport, les valeurs sont égales à 48% *versus* 8% pour la lignée OVCAR-3 (figure 4-5 B) et à 84% *versus* 42% pour la lignée CK2 (figure 4-5 C). Quatre expériences indépendantes ont été réalisées et des résultats similaires ont été observés.



**Figure 4-5:** Inhibition de la croissance tumorale des cellules A431 (A), OVCAR-3 (B) et CK2 (C) par des PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030. Le test MTT est réalisé en co-cultivant les cellules provenant des cultures de PBL en présence des cellules tumorales pendant 7 jours. Les résultats (moyenne  $\pm$  écart type) d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés (E : C = rapport cellules effectrices : cellules cibles adhérentes).

Afin de déterminer la participation de facteurs solubles dans l'inhibition de la croissance tumorale, les cellules effectrices ont été remplacées par le surnageant de leur culture. Dans cette condition, une inhibition de la croissance des lignées A431 et OVCAR-3 est également observée (figure 4-6). La sensibilité des deux lignées tumorales aux surnageants de culture est différente. En effet, l'inhibition de la croissance de A431 en présence du surnageant est comparable à celle obtenue avec les cellules stimulées tandis que la participation de facteurs solubles dans l'inhibition de la croissance des cellules OVCAR-3 est plus faible. L'inhibition est plus prononcée lorsque le surnageant provient de cultures de PBL stimulés par l'IL-2 + BMA030 (figure 4-6).



**Figure 4-6:** Effet du surnageant de culture sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales A431 et OVCAR-3.

Les cellules effectrices cultivées ou non en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 ont été remplacées dans le test MTT de 7 jours par leur surnageant de culture. Les résultats (moyenne  $\pm$  écart type) de deux expériences sont représentés.

---

#### 4.4. Discussion

Les deux conditions de stimulation induisent ou augmentent l'activité cytotoxique contre des lignées tumorales de diverses origines (cellules d'origine hématopoïétique, cellules provenant de carcinomes et kératinocytes transformés par le virus de papillome humain de type 33). Nos conditions de cultures sont manifestement suffisantes pour générer une activité LAK. Les concentrations en IL-2 utilisées dans les autres études sont généralement plus élevées (100 à 1500 U/ml) que celle utilisée ici (50 U/ml) (Owen-Schaub *et al.*, 1988<sup>b</sup>; Aebersold *et al.*, 1988, Hermann *et al.*, 1990). L'apport de l'anticorps anti-CD3 dans les cultures induit des résultats variables d'un donneur à l'autre, mais d'une manière générale, l'activité cytotoxique dans cette condition expérimentale est comparable à l'activité détectée après stimulation en présence d'IL-2 seule. La lyse des lignées HL60 et U937 fait exception. Dans ce cas, une activité cytotoxique significativement plus importante est mesurée après une stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3.

L'activité des sérine estérases est plus élevée après une culture en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3 par rapport à la culture en présence d'IL-2 seule. La production accrue de granzyme A après une stimulation par l'IL-2 ou par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 est bien documentée dans la littérature (Colamonici *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1989<sup>b</sup>; Lancki *et al.*, 1991). Par contre, à notre connaissance, la comparaison directe de ces deux conditions de stimulation n'a été réalisée que chez la souris (Ting *et al.*, 1995). Dans ce modèle, l'activité enzymatique est comparable pour les deux conditions de culture. Cependant, Nakajima et ses collaborateurs (1994) ont observé chez la souris une plus grande quantité de l'ARNm du granzyme B après injection d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3, par rapport à l'intensité d'expression détectée chez les souris traitées par IL-2 seule. Dans notre travail, les résultats obtenus lors des tests de cytotoxicité au chrome ne reflètent pas la différence de production de sérine estérases entre les deux conditions de stimulation, excepté contre les lignées HL60 et U937. Il est à noter que nous avons mesuré la production intracellulaire de sérine estérases et non la production excrétée. Il est possible que la stimulation par un anticorps anti-CD3 induise la synthèse de sérine estérases dans les lymphocytes T mais, en l'absence de reconnaissance d'une cellule cible, les sérine estérases ne sont pas sécrétées. La stimulation par un anticorps anti-CD3 permettrait la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T cytotoxiques, cependant un deuxième signal, après un contact avec la cellule cible, est nécessaire pour déclencher le processus lytique.

---

L'étude de l'inhibition de la croissance tumorale semble être plus sensible et donner plus d'informations que le test de cytotoxicité au chrome radioactif (Beun *et al.*, 1993). Malheureusement, cette approche est difficilement applicable aux cellules tumorales non-adhérentes. Nous avons réalisé des expériences de neutralisation de la croissance cellulaire sur trois lignées adhérentes. Ces expériences ont mis en évidence un effet inhibiteur plus important des lymphocytes provenant de cultures en présence d'anticorps anti-CD3. L'inhibition de la croissance tumorale semble être au moins partiellement due à la présence de facteurs solubles puisque les surnageants de culture induisent également une inhibition. L'effet négatif de cytokines sur la croissance tumorale (Segal *et al.*, 1992) et, plus précisément, l'effet inhibiteur de l'IFN  $\gamma$  et du TNF  $\alpha$  sur la croissance des cellules CK2 (Delvenne *et al.*, 1995) a déjà été décrit. Signalons que, lors de travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire, des taux plus élevés de TNF  $\alpha$  et d'IFN  $\gamma$  ont été détectés dans les cultures en présence d'un anticorps anti-CD3 (Moutschen *et al.*, 1990). L'utilisation d'anticorps anti-TNF  $\alpha$  et anti-IFN  $\gamma$  bloquants dans les tests d'inhibition de la croissance tumorale permettrait de déterminer le rôle de ces cytokines dans notre modèle.

En résumé, les deux conditions de stimulation (IL-2 et IL-2 + BMA030) induisent ou augmentent l'activité cytotoxique contre diverses lignées tumorales. Le potentiel cytotoxique semble plus important après une stimulation en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3.

## Chapitre 5: Effet d'une deuxième stimulation du complexe CD3

### 5.1. Introduction

Les anticorps anti-CD3 sont des agents immuno-stimulants. Mais, puisqu'ils sont également utilisés à des fins d'immuno-suppression, il est possible que la présence d'anticorps anti-CD3 dans les cultures de lymphocytes génère un effet négatif secondaire. L'inhibition fonctionnelle des lymphocytes T par les anticorps anti-CD3 peut être induite par un encombrement stérique et/ou une internalisation du complexe CD3/TCR (Chatenoud *et al.*, 1982; Ceuppens *et al.*, 1986). Cependant, des études *in vivo* chez la souris et des observations cliniques de patients transplantés ont montré que les effets immuno-suppressifs des anticorps anti-CD3 subsistaient après la réexpression du complexe CD3/TCR (Hirsch *et al.*, 1988), suggérant le développement de lymphocytes T non-répondeurs ou anergiques. L'anergie des lymphocytes T observée dans des tests de restimulation est précédée d'une prolifération importante de ces cellules, démontrant que les événements associés à une prolifération ne préviennent pas nécessairement l'anergie (Wolf *et al.*, 1994; Willems *et al.*, 1995).

L'anergie se traduit notamment par un défaut de production d'IL-2. La régulation de l'expression du gène codant pour l'IL-2 est un phénomène complexe qui fait intervenir divers facteurs de transcription dont les complexes NF-AT (pour revue: Mueller et Jenkins, 1995). Ces complexes sont activés suite à une série d'événements biochimiques (Hivroz-Burgaud *et al.*, 1991). Les ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) y jouent un rôle important et leur action est schématisée dans la figure 5-1. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium active la calcineurine via la calmoduline. La calcineurine permet la translocation du facteur NF-AT cytoplasmique vers le noyau où il va se lier à l'ADN en association avec le complexe AP-1. Cette association est nécessaire à la transcription du gène codant pour l'IL-2 (Jain *et al.*, 1993). La translocation de la PKC vers la membrane plasmique où elle sera activée par le diacylglycérol (DAG) nécessite également des ions calcium.

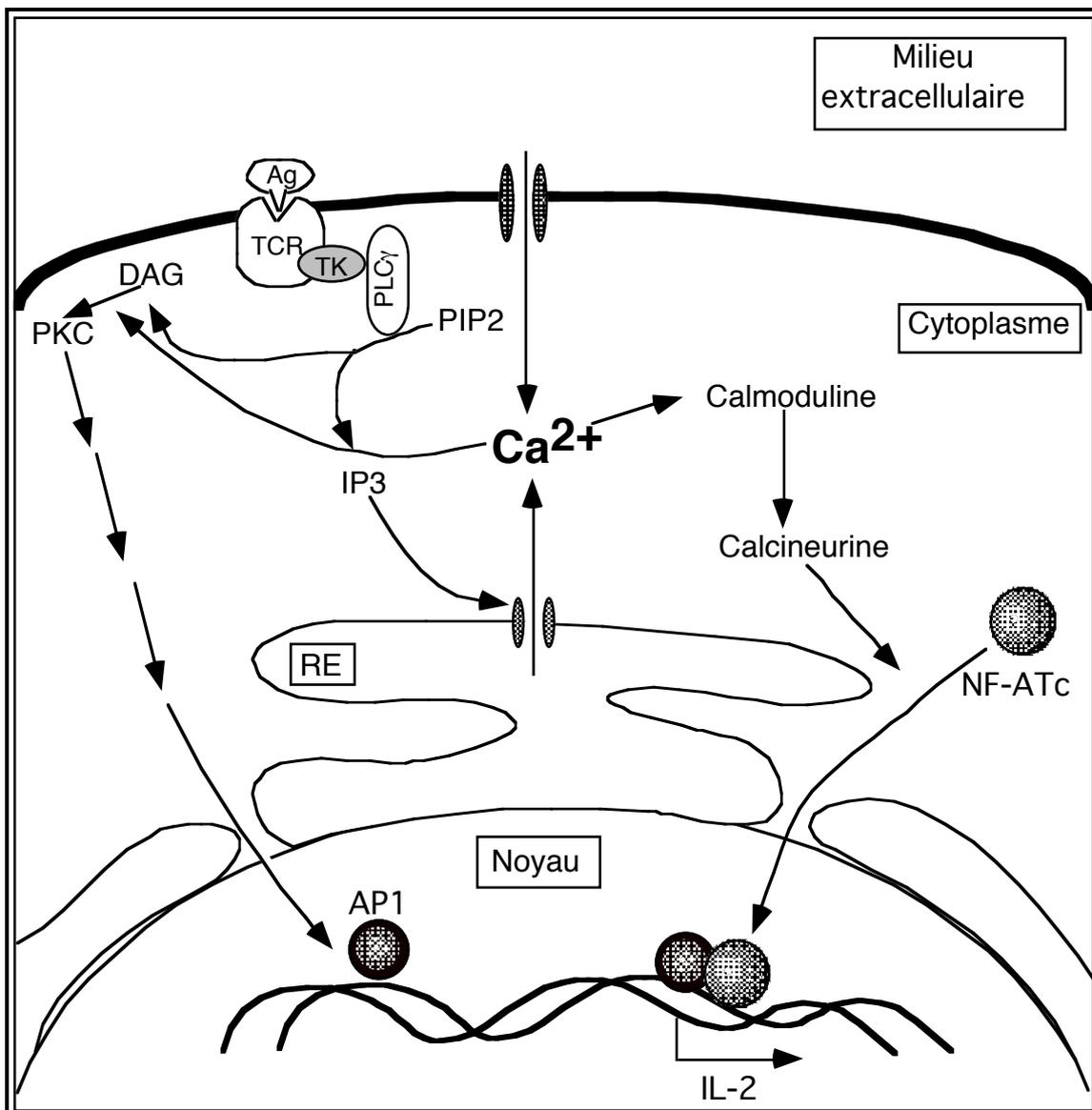


Figure 5-1: Rôle du calcium dans l'activation des lymphocytes T.

DAG: diacylglycérol, IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-triphosphate, PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PKC: protéine kinase C, PLC $\gamma$ : phospholipase C- $\gamma$ , TK: tyrosine kinase, RE: réticulum endoplasmique, d'après Lewis et Cahalan, 1995.

Comme nous venons de le voir, le calcium joue un rôle important dans la stimulation des lymphocytes T. De plus, plusieurs auteurs (Willens *et al.*, 1995; Andris *et al.*, 1996) ont notamment montré que les lymphocytes T anergiques sont incapables d'induire un flux de calcium en réponse à une stimulation par un anticorps anti-CD3.

Le développement de sondes fluorescentes se liant spécifiquement au calcium (quin-2, fura-2, indo-1, fluo-3) a permis de détecter les variations de la concentration en

---

calcium intracellulaire (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Tsien et Pozzan, 1989; Minta *et al.*, 1989). Nous avons choisi la sonde fluo-3 car celle-ci est utilisable en cytométrie en flux. De plus, elle est excitable par une lumière visible contrairement à la sonde indo-1 qui nécessite une lumière UV (Kao *et al.*, 1989). La liaison du fluo-3 aux ions calcium induit une augmentation de sa fluorescence verte. Cet accroissement de l'intensité de fluorescence est proportionnel à la concentration intracellulaire en ions calcium. Il est alors possible de déterminer la concentration en ions calcium soit par calcul (Kao *et al.*, 1989), soit par une calibration soignée du cytomètre (Chused *et al.*, 1987; Greimers *et al.*, 1996).

Dans ce chapitre, nous avons étudié la réponse des lymphocytes cultivés en présence d'IL-2 et de BMA030 à une deuxième stimulation par un anticorps anti-CD3. Cette réponse a été évaluée par la capacité des lymphocytes à induire des flux calciques. Nous avons comparé ce flux calcique à ceux générés par les PBL cultivés sans mitogène ou en présence d'IL-2 seule.

## 5.2. Méthodologie

Après quatre jours de culture dans les différentes conditions expérimentales (contrôle, IL-2 et IL-2 + BMA030), les cellules sont incubées en présence de la sonde fluo-3 afin de quantifier les flux calciques induits par un nouvel apport de BMA030 (1 $\mu$ g/ml). La liaison des ions Ca<sup>2+</sup> avec la sonde fluo-3 induit une augmentation de sa fluorescence verte qui est mesurée par cytométrie en flux. Après une calibration du signal en présence d'ionophore de calcium (concentration maximale en calcium intracellulaire) et de MnCl<sub>2</sub> (intensité minimale de fluorescence par déplacement des ions Ca<sup>2+</sup> fixés au fluo-3 par les ions Mn<sup>2+</sup>), les valeurs de fluorescence sont converties en concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. La concentration est calculée avant l'addition de BMA030 (niveau de base) et après addition de l'anticorps BMA030 lorsque l'intensité de fluorescence du fluo-3 est maximum.

## 5.3. Résultats

Le tableau 5-1 reprend les concentrations intracellulaires en calcium avant et après apport de BMA030 (1 $\mu$ g/ml) sur des cellules cultivées suivant les différentes conditions expérimentales (contrôle, IL-2 et IL-2 + BMA030).

La concentration moyenne en Ca<sup>2+</sup> intracellulaire des PBL est égale à 125  $\pm$  30 nM (n = 9) (résultats non illustrés). Après quatre jours de culture, la

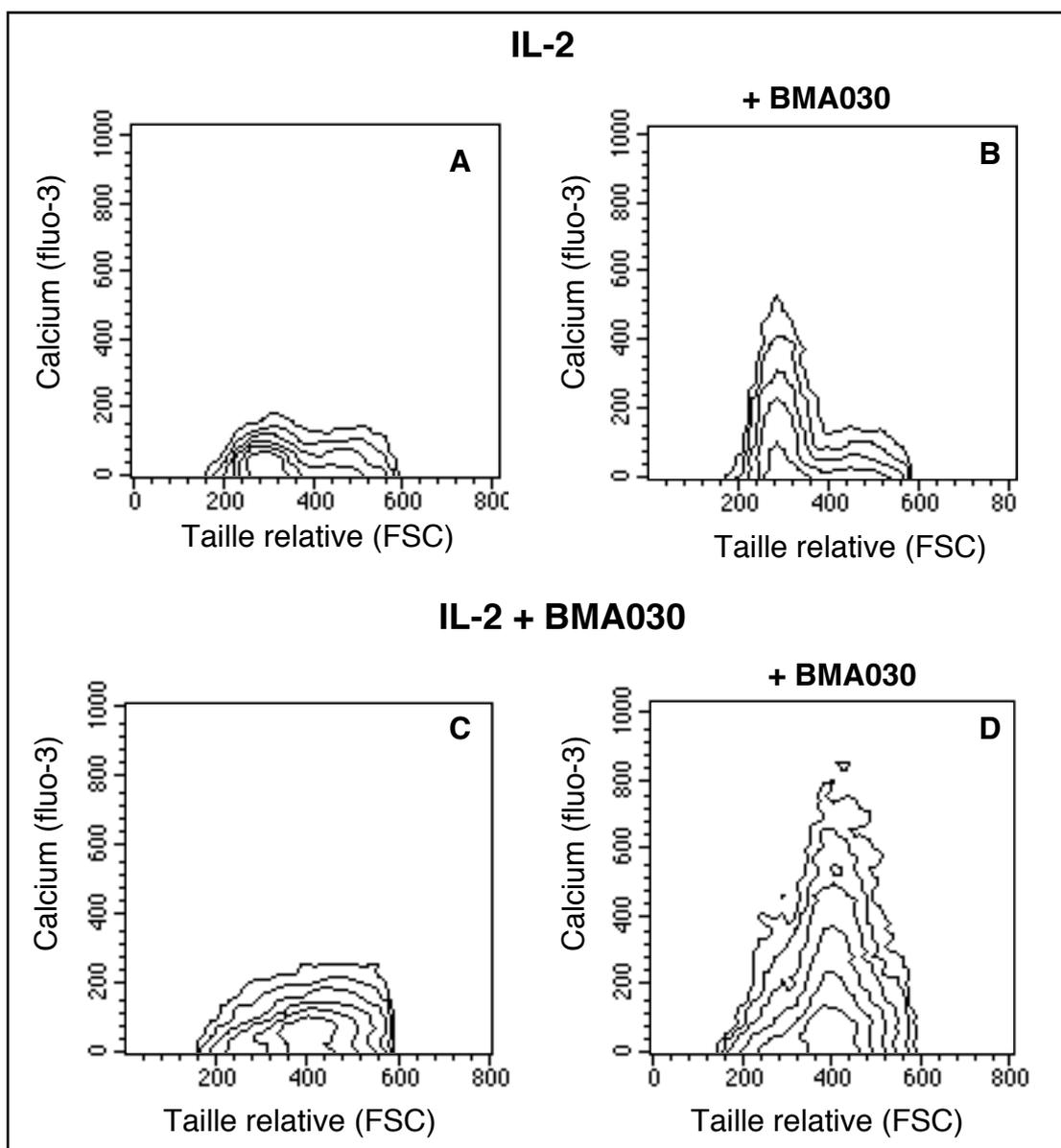
concentration vaut  $110 \pm 22$  nM ( $n = 4$ ) dans la condition contrôle (niveau de base). Généralement, cette concentration est légèrement plus élevée après une culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 par rapport à la culture contrôle, mais on n'observe pas de différence significative entre les moyennes des différentes conditions de culture (tableau 5-1). L'addition de BMA030 induit une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  qui peut atteindre 400 nM. Cette augmentation est visible quelle que soit la condition de culture. L'augmentation est généralement plus prononcée dans les cellules de la condition contrôle mais, ici encore, les différences ne sont pas significatives (tableau 5-1).

	Conditions de cultures					
	Contrôle		IL-2		IL-2 + BMA030	
	Niveau de base	+ BMA030	Niveau de base	+ BMA030	Niveau de base	+ BMA030
Exp 1	142	462	169	274	177	442
Exp 2	102	255	107	207	114	252
Exp 3	108	247	105	261	110	255
Exp 4	90	308	104	274	110	235
Moyenne $\pm$ écart type	$110 \pm 22$	$318 \pm 100$	$121 \pm 32$	$254 \pm 32$	$127 \pm 33$	$296 \pm 98$

**Tableau 5-1:** Concentration en calcium intracellulaire (nM) avant et après addition de BMA030 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) sur des PBL cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 .

Les diagrammes de contours d'isodensité de la fluorescence de fluo-3 en fonction de la taille relative des cellules (déterminée en cytométrie en flux par mesure de la diffusion lumineuse aux petits angles, FSC) est différente suivant la condition de culture (figure 5-2). Après une culture en présence d'IL-2, l'augmentation de la fluorescence de fluo-3 due à l'addition BMA030 est observée pour les cellules de petite taille (FCS inférieur à 400) (Figure 5-2 B). Par contre, l'accroissement de la

fluorescence concerne les cellules de toutes les tailles après une culture en présence d'IL-2 + BMA030 (figure 5-2 D). Dans les cultures en présence d'IL-2, les cellules de grande taille sont essentiellement des cellules CD3<sup>-</sup> dont une partie exprime le marqueur CD16 alors qu'en présence de BMA030 des cellules CD3<sup>+</sup> sont observées dans les petites et les grandes cellules (résultats non illustrés).



**Figure 5-2:** Augmentation de la concentration en calcium en relation avec la taille des cellules.

La concentration en calcium avant (A et C) et après addition de BMA030 (B et D) sur les cellules cultivées, pendant 4 jours en présence d'IL-2 (A et B) ou d'IL-2 + BMA030 (C et D), a été mesurée par cytométrie en flux après marquage des cellules par la sonde fluo-3.

## 5.4. Discussion

Une stimulation inadéquate par un anticorps anti-CD3 peut conduire à l'anergie des lymphocytes T (Pantaleo *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1989; Willems *et al.*, 1995) qui se traduit par une incapacité des cellules à proliférer et à produire de l'IL-2 suite à un nouveau stimulus. Plusieurs études ont montré que l'anergie des lymphocytes T pouvait provenir d'une altération des signaux conduisant à la transcription de gènes et notamment d'une perturbation des flux calciques (Schwartz, 1990, Wotton *et al.*, 1995). Par exemple, Wotton et ses collaborateurs (1995) suggèrent que la déficience du facteur de transcription NF-AT dans les cellules anergiques pourrait être la conséquence d'une diminution des flux calciques. La présence d'IL-2 et du BMA030 dans les cultures de lymphocytes ne semble pas avoir modifié la capacité des lymphocytes T à répondre à une stimulation via le TCR puisque aucune altération de l'induction de flux calcique n'est observée. En effet, nos résultats montrent que les flux calciques induits par une nouvelle stimulation par un anticorps anti-CD3 sont comparables dans toutes les conditions de culture.

La présence d'IL-2 dans le milieu de culture est certainement un des facteurs empêchant l'anergisation des lymphocytes T. Citons, par exemple, les travaux de Wolf et de ses collaborateurs (1994) qui ont montré que la capacité des lymphocytes T à proliférer suite à une seconde stimulation par un anticorps anti-CD3 était rétablie par la présence de l'IL-2. Cependant, dans un modèle murin, l'IL-2 ne suffit pas à protéger les cellules de l'anergie (Williams *et al.*, 1992). Signalons également que les monocytes présents dans les cultures peuvent donner des signaux co-stimulateurs aux lymphocytes T. La sécrétion d'IL-1 est notamment importante pour l'activation des lymphocytes T (Verwilghen *et al.*, 1991).

Les concentrations en calcium mesurées dans des PBL non cultivés sont en accord avec les concentrations décrites dans la littérature (Ledbetter *et al.*, 1986; Gelfand *et al.*, 1988; Vandenberghe et Ceuppens 1990). La concentration déterminée après addition de BMA030 correspond également à celle rapportée dans la littérature pour l'anticorps anti-CD3, OKT3 (Vandenberghe et Ceuppens 1990). Signalons que nous avons utilisé une méthode simple pour calibrer le signal émis par la sonde fluo-3 (Kao *et al.*, 1989), mais suffisante pour établir des comparaisons relatives. Il existe une autre méthode de calibration plus précise (Greimers *et al.*, 1996), mais elle est techniquement lourde et peu utilisée ce qui rend difficile les comparaisons.

Des cellules de grande taille apparaissent suite à la stimulation et celles-ci expriment préférentiellement les marqueurs d'activation (voir chapitre 3). Une

augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans ces cellules est observée seulement après une culture en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3. C'est dans cette condition de culture que des lymphocytes T de grande taille sont observés. En présence d'IL-2, ce sont principalement des cellules CD3<sup>-</sup> qui présentent une taille supérieure à la moyenne. Ces résultats montrent que les lymphocytes T, ayant certainement déjà subi une première stimulation, sont capables de répondre une seconde fois à une stimulation par un anticorps anti-CD3.

En résumé, la culture en présence d'un anticorps anti-CD3 et d'IL-2 ne semble pas induire une anergie secondaire des lymphocytes T.

## Discussion de la première partie

Malgré un nombre important de travaux étudiant les propriétés anti-tumorales des cellules LAK générées après une culture de PBL en présence d'IL-2 (Grimm *et al.*, 1982; Alder *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1989; Ishimitsu et Torisu, 1993), l'efficacité clinique des cellules LAK chez des patients atteint d'un cancer n'est pas satisfaisante excepté dans quelques cas notamment pour le mélanome ou le cancer du rein (Rosenberg, 1992). Selon Parmiani (1990), ce manque d'efficacité serait en relation avec l'origine NK de la plupart des cellules LAK (Ortaldo *et al.*, 1986; Phillips et Lanier, 1986). D'après cet auteur, les principaux responsables de la réponse immunitaire anti-tumorale sont les lymphocytes T. Nous avons donc choisi un autre mode de stimulation qui favorise l'activation des lymphocytes T à savoir un anticorps anti-CD3.

L'apport d'un anticorps anti-CD3 dans les cultures induit une prolifération nettement plus importante que la stimulation par l'IL-2 seule. Cette observation est intéressante pour les protocoles cliniques d'immunothérapie par transfert adoptif, surtout chez les enfants ou les personnes âgées chez qui il est particulièrement difficile d'obtenir un nombre élevé de cellules effectrices. Par exemple, chez des enfants atteints de leucémie ou de neuroblastome, la stimulation des PBL par un anticorps anti-CD3 a permis une amplification du nombre de cellules d'un facteur 500 contre seulement un facteur 7 dans la culture en présence d'IL-2 seule (Anderson *et al.*, 1988). De même, les doses élevées d'IL-2 ( $\geq 1000$  U/ml) utilisées dans les protocoles cliniques, alors que 50 U/ml suffisent pour générer une activité cytotoxique de type LAK, sont peut-être en relation avec le nombre élevé de cellules effectrices nécessaires dans ces protocoles d'immunothérapie. Cette concentration élevée serait utilisée pour induire une prolifération plus importante et permettrait d'obtenir plus rapidement le nombre de cellules effectrices requis. L'addition d'un anticorps anti-CD3 au milieu de culture pourrait contourner ce problème par la stimulation d'une prolifération cellulaire importante en présence de concentration faible d'IL-2 (Yun *et al.*, 1989). Signalons également que la condition de culture IL-2 + BMA030 induit une prolifération de

lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL); celle-ci semble même plus importante que celle observée pour les PBL (résultats non illustrés).

Une expansion des lymphocytes T est observée en présence d'anticorps anti-CD3, par contre la proportion de cellules NK est plus faible dans cette condition de culture. L'activité cytotoxique plus faible après une stimulation par le BMA030 par rapport à celle observée après une activation par l'IL-2 seule, constatée chez certains donneurs, est peut-être en relation avec la diminution de la proportion de cellules NK. En effet, une réduction de l'activité LAK a déjà été corrélée à une diminution du nombre de cellules NK CD56<sup>+</sup> et CD57<sup>+</sup> (Hermann *et al.*, 1990). Cependant, signalons que la stimulation par un anticorps anti-CD3 entraîne une augmentation de la proportion des cellules T possédant un phénotype de cellules mémoires (CD45R0<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD11a<sup>high</sup>). Ces cellules sécrètent des quantités plus importantes d'IFN  $\gamma$  que les lymphocytes T naïfs (CD45RA<sup>+</sup>) (Ferrer *et al.*, 1992). Rappelons que cette cytokine possède une activité anti-tumorale (Jaffe et Herberman, 1988; Qian *et al.*, 1991). De plus, Marvel et ses collaborateurs (1991) ont montré, dans un modèle murin, que les précurseurs de cellules T cytotoxiques expriment le CD45RA tandis que les cellules cytotoxiques effectrices ne l'expriment pas. Ces résultats indiquent que la différenciation des cellules cytotoxiques passe par une perte du marqueur CD45RA. En présence d'un anticorps anti-CD3, nous avons observé l'augmentation des cellules T auxiliaires mémoires (CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>), mais également un accroissement des cellules T CD8<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>.

Les deux conditions de stimulation (IL-2 et IL-2 + BMA030) induisent la génération de lymphocytes cytotoxiques contre toutes les lignées tumorales testées. La stimulation par un anticorps anti-CD3 permet d'obtenir un plus grand nombre de cellules effectrices, mais ne semble pas augmenter leur activité cytotoxique contre la plupart des lignées tumorales, du moins dans un test de quatre heures. En effet, le pourcentage de lyse des cellules tumorales est généralement similaire pour les deux conditions de stimulations excepté contre les lignées HL60 et U937. Pourtant, une production plus importante de molécules cytotoxiques, tel que le granzyme A, est détectée après quatre jours de culture en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3. Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre 4, il est possible que le granzyme A soit produit, mais pas excrété dans sa totalité. Afin de pouvoir observer une activité anti-tumorale nécessitant des périodes supérieures à quatre heures, nous avons étudié l'inhibition de la croissance tumorale lors de co-cultures de cellules tumorales et de lymphocytes préalablement stimulés soit par l'IL-2, soit par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. La stimulation par un anticorps anti-CD3 induit une inhibition de la croissance tumorale plus importante que la stimulation par l'IL-2. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un effet direct sur la croissance tumorale de la prolifération plus intense des

---

lymphocytes en présence d'IL-2 + BMA030. En effet, il pourrait y avoir une compétition entre les lymphocytes et les cellules tumorales pour les facteurs essentiels à la croissance cellulaire se trouvant dans le milieu de culture. Notons toutefois, que ce phénomène ne peut expliquer à lui seul l'inhibition de la croissance tumorale puisque les surnageants de culture des lymphocytes stimulés induisent également une inhibition tumorale.

Les anticorps anti-CD3 sont à la fois utilisés comme agent stimulant de la réponse immunitaire mais aussi comme agent immunosuppresseur notamment dans les protocoles de transplantation d'organes (Chatenoud *et al.*, 1982; Woodle *et al.*, 1991). Suivant les conditions de cultures, l'anticorps anti-CD3 peut générer une stimulation partielle qui induira un état de non réponse (anergie) des lymphocytes à des nouveaux stimuli (Wolf *et al.*, 1994). Le maintien de la capacité d'induire des flux calciques via une stimulation par le TCR, semble indiquer que les lymphocytes T stimulés par de l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 ne sont pas devenus réfractaires à ce type de stimulation. Dans une perspective d'immunothérapie adoptive, cette constatation est fort intéressante. En effet, les cellules effectrices peuvent être multipliées *in vitro* par ce mode d'activation sans altération apparente de la fonction du TCR qui, *in vivo*, pourra reconnaître la cellule cible soit directement dans le cas d'une stimulation de CTL spécifiques ou via un anticorps bispécifique dans le cas d'une stimulation de PBL.

En résumé, les deux conditions de culture (IL-2 et IL-2 + BMA030) que nous avons utilisées induisent une stimulation des PBL permettant la génération d'effecteurs cytotoxiques contre des lignées cellulaires tumorales. La présence d'un anticorps anti-CD3 amplifie la stimulation comme le démontrent une prolifération cellulaire plus importante et une proportion plus élevée de cellules présentant un phénotype de cellules activées. De même, une augmentation de l'activité cytotoxique, dirigée contre les cellules tumorales HL60 et U937 et détectée dans un test de quatre heures, est observée dans cette condition de culture. L'inhibition de la croissance de trois lignées tumorales est également accrue lorsque les lymphocytes sont stimulés par un anticorps anti-CD3. La participation des lymphocytes T dans cette activité anti-tumorale reste à déterminer.



Deuxième partie.....	84
Etudes des activités cytotoxiques des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3.....	84
Objectif .....	84
Chapitre 6: .....	85
Mise au point du tri des lymphocytes T par champ magnétique .....	85
6.1. Introduction.....	85
6.2. Méthodologie .....	86
6.3. Résultats .....	87
6.3.1. Nombre de cellules et viabilité des cellules après une sélection des lymphocytes T par le système MACS .....	87
6.3.2. L'influence du tri sur la prolifération cellulaire .....	89
6.3.3. Sélection des lymphocytes T dans la fraction positive et enrichissement en cellules NK dans la fraction négative.....	90
6.4. Discussion .....	93
Chapitre 7: .....	95
Activité cytotoxique des lymphocytes T .....	95
7.1. Introduction.....	95
7.2. Méthodologie .....	96
7.3. Résultats .....	96
7.3.1. Activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK.....	96
7.3.2. Comparaison de la stimulation par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 dans la génération de lymphocytes T cytotoxiques .....	97
7.3.3. Participation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ à l'activité cytotoxique .....	98
7.4. Discussion .....	100
Chapitre 8: .....	102
Participation de l'anticorps anti-CD3 dans l'activité cytotoxique .....	102
8.1. Introduction.....	102
8.2. Méthodologie .....	104
8.3. Résultats .....	105
8.3.1. Profil d'expression des récepteurs Fcγ sur les lignées tumorales.....	105
8.3.2. Détection de l'anticorps BMA030 à la surface des lymphocytes T.....	106
8.3.3. Influence du type d'anticorps anti-CD3 servant au tri sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T.....	109
8.3.4. Influence du type d'anticorps anti-CD3 servant à la stimulation sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T .....	110
8.4. Discussion .....	112
Chapitre 9: .....	114
Etude de l'activité cytotoxique redirigée.....	114
9.1. Introduction.....	114
9.2. Méthodologie .....	116
9.3. Résultats .....	116

9.3.1. Induction d'une cytotoxicité redirigée par un anticorps anti-CD3 .....	116
9.3.2. Induction d'une activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique.....	118
9.4. Discussion .....	120
Discussion de la deuxième partie .....	122

## **Deuxième partie**

### **Etudes des activités cytotoxiques des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3**

#### **Objectif**

Le complexe CD3 étant spécifique des lymphocytes T, seuls ceux-ci sont directement stimulés par un anticorps anti-CD3. Il nous a dès lors paru intéressant de caractériser leur activité cytotoxique propre après une stimulation par l'IL-2 ou l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. La première étape a été de sélectionner les lymphocytes T sans altérer leur fonction. Ensuite, nous avons comparé l'activité cytotoxique des lymphocytes T par rapport à l'activité des cellules NK, après stimulation en présence d'IL-2 ou d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3. La comparaison a été effectuée contre plusieurs lignées cellulaires tumorales. Nous avons envisagé la possibilité d'une participation de l'anticorps anti-CD3 dans la lyse des cellules tumorales. Enfin, nous avons également comparé les deux conditions de stimulation dans le cadre d'une activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique.

Ces différentes études ont été réalisées à partir de lymphocytes du sang périphérique.

**Chapitre 6:**  
**Mise au point du tri des lymphocytes T par champ magnétique**

### **6.1. Introduction**

La plupart des travaux qui étudient le signal transmis par le CD3 utilisent des clones ou des lignées de cellules T. Pour obtenir ces cellules, de longues périodes de culture comprenant des stimulations fréquentes ou des manipulations conduisant à l'immortalisation des cellules sont nécessaires. Ces événements peuvent éloigner les lymphocytes T de leur fonction originelle. Nous avons voulu travailler avec des lymphocytes T ayant subi le moins de manipulations possibles et nous avons décidé de les isoler à partir des lymphocytes du sang.

Les lymphocytes sont caractérisés par l'expression de différents marqueurs de surface qui peuvent servir à la sélection d'une population déterminée. Deux modes de purification sont possibles: soit la population cellulaire est enrichie en un type cellulaire déterminé (tri positif), soit les cellules des populations non désirées sont éliminées (tri négatif).

Nous avons choisi de sélectionner les lymphocytes T sur la base de l'expression de la molécule CD3, molécule spécifique des lymphocytes T. Notons que d'un point de vue fonctionnel, il aurait été préférable de trier les cellules de façon négative, en éliminant les lymphocytes B, les cellules NK et les monocytes de la population cellulaire totale. Malheureusement, il n'existe pas de marqueur spécifique des cellules NK, cellules qui, activées, sont responsables de la lyse LAK (Ortaldo *et al.*, 1986; Phillips et Lanier, 1986; Hermann *et al.*, 1990). Par exemple, la molécule CD56 est portée par les cellules NK, mais aussi par certains lymphocytes T et notamment des lymphocytes T cytotoxiques (Lanier *et al.*, 1986<sup>a</sup>; Ellis et Fisher, 1989).

Plusieurs paramètres ont influencé le choix de la méthode de sélection. Dans notre situation, le temps est un des paramètres primordiaux car l'étude de l'activité

cytotoxique nécessite un nombre important de cellules et il est préférable que le délai entre le prélèvement des lymphocytes et le test fonctionnel soit le plus bref possible. Dans ce but, nous avons choisi le tri par champ magnétique dont la durée est indépendante du nombre de cellules qui sont sélectionnées en masse. Par contre, le tri par cytométrie en flux s'effectue cellule par cellule et nécessite donc des temps plus longs, mais son avantage est l'obtention d'une population cellulaire de pureté très élevée (Pour revues: Greimers, 1990; 1993; Shapiro, 1995).

Le fait de trier de manière positive, c'est-à-dire de trier les cellules marquées par l'anticorps, nous a conduit à choisir parmi les différents systèmes de sélection par champ magnétique, le système MACS (Miltenyi *et al.*, 1990; Jacobs *et al.*, 1993). Grâce à son aimant puissant (0,6 tesla), il permet l'utilisation de particules paramagnétiques de petite taille (100-150 nm de diamètre) alors que les autres systèmes (Kandzia *et al.*, 1985; Kemshead *et al.*, 1986; Gee *et al.*, 1991) emploient des billes magnétiques de diamètre proche de la taille des cellules, ce qui peut empêcher les contacts cellulaires. De plus, cette méthode peut être couplée au tri par cytométrie en flux afin d'obtenir une pureté supérieure sans marquage supplémentaire.

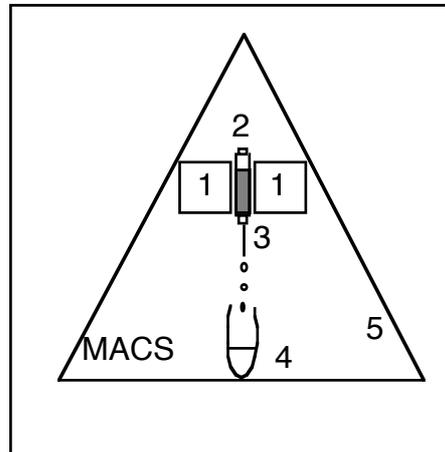
## 6.2. Méthodologie

Le principe du tri par le système MACS (MAGnetic Cell Sorter) (figure 6-1) consiste à retenir, par le champ magnétique d'un aimant (figure 6-1, 1), les cellules marquées par un anticorps et des billes paramagnétiques au sein d'une colonne remplie de matériel ferreux (figure 6-1, 2). Les cellules non marquées ne sont pas retenues dans la colonne et sont récoltées dans une première fraction appelée fraction négative. Le flux des cellules est réglé par l'utilisation d'aiguilles de diamètre variable (figure 6-1, 3). La colonne est ensuite rincée, les cellules récoltées dans cette fraction (lavage) ne sont pas utilisées. Les cellules marquées (fraction positive) sont récupérées en retirant la colonne de l'aimant et en expulsant les cellules à l'aide d'une seringue fixée au sommet de la colonne.

Le marquage des cellules s'effectue en trois étapes. Tout d'abord, les cellules sont marquées par un anticorps anti-CD3 couplé à la biotine. Elles sont ensuite incubées en présence de streptavidine-FITC. Enfin, les cellules sont mises en présence de billes paramagnétiques couplées à la biotine qui se fixent sur les sites de la streptavidine restés vacants.

Les cellules utilisées dans ce chapitre sont, soit des lymphocytes du sang stimulés quatre jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030, soit, pour certaines expériences de mise au point du tri, des lymphocytes sanguins non stimulés.

Des tests de prolifération par incorporation de thymidine tritiée ont été réalisés après stimulation par de la phytohémagglutinine (PHA, 0,1%) pendant trois jours ou après stimulation par l'IL-2 (50 U/ml) pendant 24 heures.



**Figure 6-1:** Représentation du système de tri par champ magnétique MACS. (1) aimant, (2) colonne remplie de matériel ferreux, (3) aiguille réglant le débit des cellules, (4) tube récolteur, (5) support de l'aimant.

### 6.3. Résultats

#### 6.3.1. Nombre de cellules et viabilité des cellules après une sélection des lymphocytes T par le système MACS

Lors d'expériences préliminaires, nous avons quantifié la perte de cellules durant le tri par le système MACS et le nombre de cellules triées que l'on pouvait attendre. Nous nous sommes surtout intéressée au taux de récupération des cellules CD3<sup>+</sup>. Pour ces expériences, les volumes récupérés pour la fraction négative et le lavage sont faibles (inférieurs à 3 ml, conditions de tri optimales pour la récupération maximale de lymphocytes T). Dans ces conditions, environ 80 % des cellules CD3<sup>+</sup>, présentes dans la population lymphocytaire non stimulée, sont récupérées dans la fraction positive. Cette moyenne a été calculée sur sept expériences. Moins de 10% des cellules CD3<sup>+</sup> sont perdues dans la fraction négative et dans la fraction de lavage (résultats non illustrés).

Le taux de récupération des cellules a aussi été calculé pour les cellules stimulées et dans les conditions de tri utilisées dans la suite de ce travail. Ces conditions sont un flux réglé par une aiguille 27G ou 26G pour la fraction négative et un flux

régulé par une aiguille 23G pour le lavage. Ces conditions sont optimales pour la pureté des populations cellulaires sélectionnées. Les volumes récupérés dépendent du nombre de cellules à trier. Par exemple, pour un tri de  $20 \cdot 10^6$  cellules, la fraction négative est récupérée dans un volume d'environ 3 ml, le lavage est effectué avec 6 ml et les cellules positives sont récoltées dans 12 ml. Dans ces conditions, nous récupérons environ 65% du nombre total de cellules  $CD3^+$  dans la fraction positive et 65% du nombre total de cellules  $CD3^-$  dans la fraction négative après un tri par le système MACS (tableau 6-1).

Des tests de viabilité au bleu Trypan et à l'iodure de propidium ne révèlent aucune augmentation significative de mort cellulaire après le tri par champ magnétique (résultats non illustrés).

	% de récupération après un tri par champ magnétique	
	de cellules $CD3^+$ dans la fraction positive	de cellules $CD3^-$ dans la fraction négative
Expérience 1	46	80
Expérience 2	65	60
Expérience 3	72	36
Expérience 4	82	79
Moyenne $\pm$ écart type	$66 \pm 15$	$64 \pm 20$

**Tableau 6-1: Récupération cellulaire pour les deux populations sélectionnées après stimulation par l'IL-2 et BMA030 dans quatre expériences de tri de  $20 \cdot 10^6$  cellules .**

**Le pourcentage de récupération des cellules  $CD3^+$  a été déterminé par la formule suivante:**

$$\frac{\text{nombre de cellules récupérées} \times \% \text{ de cellules } CD3^+ \text{ dans cette fraction}}{\text{nombre de cellules au départ} \times \% \text{ de cellules } CD3^+ \text{ au départ}} \times 100$$

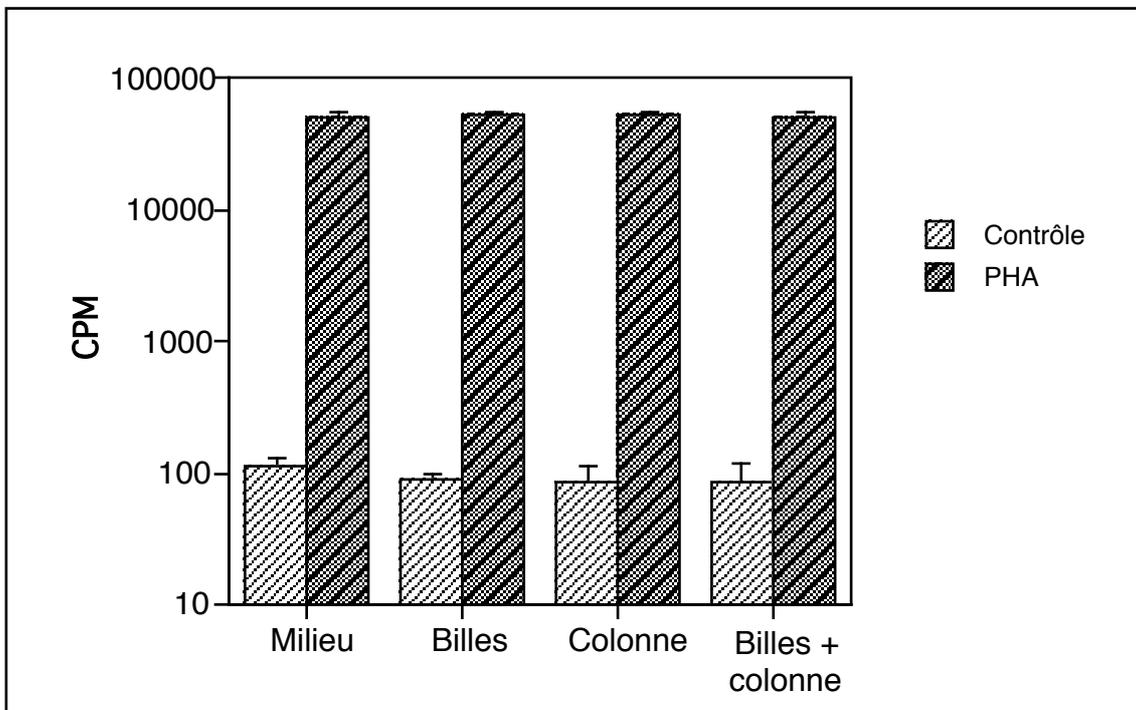
**Le pourcentage de récupération des cellules  $CD3^-$  est calculé suivant la même formule en remplaçant le pourcentage de cellules  $CD3^+$  par le pourcentage de cellules  $CD3^-$ .**

Indépendamment du nombre de cellules à trier ( $20 \cdot 10^6$  à  $200 \cdot 10^6$  cellules) ou du pourcentage de lymphocytes T au départ (de 60% à 90%), la durée du tri est

approximativement de quarante minutes. Le temps de tri est similaire que les cellules proviennent de culture en présence d'IL-2 ou en présence d'IL-2 et de BMA030.

### 6.3.2. L'influence du tri sur la prolifération cellulaire

Afin de vérifier que les composants du système MACS n'interfèrent pas avec l'état fonctionnel des cellules, nous avons testé leur capacité de prolifération en réponse à la PHA après une incubation en présence de billes paramagnétiques et/ou après passage sur une colonne. Ni les billes paramagnétiques ni le passage sur la colonne de séparation n'influencent la prolifération induite par la PHA (figure 6-2).

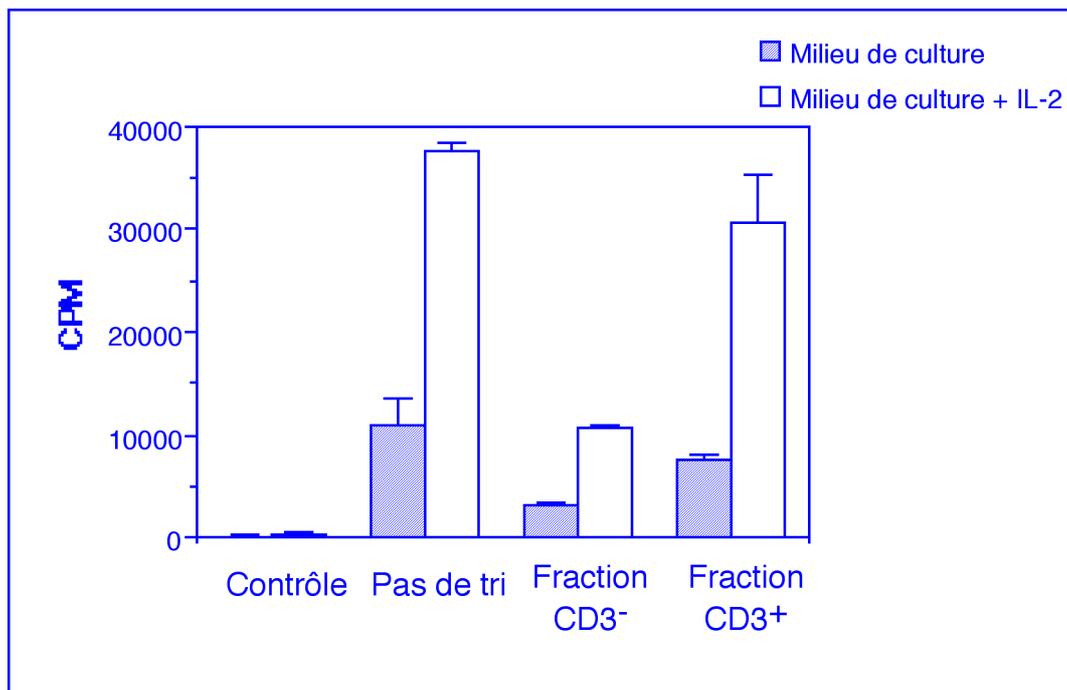


**Figure 6-2:** Effet des billes paramagnétiques et de la colonne du MACS sur la prolifération cellulaire estimée par incorporation de  $^3\text{H-Tr}$ .

Les PBL sont cultivés 3 jours dans du milieu de culture seul (contrôle) ou du milieu additionné de PHA (0,1%). Avant la mise en culture, les cellules subissent différents traitements: incubation en présence de billes paramagnétiques, passage au travers d'une colonne de tri, incubation en présence de billes et passage au travers d'une colonne. Les résultats (moyennes  $\pm$  écart type) d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés. L'utilisation d'une échelle logarithmique permet de visualiser les valeurs de la condition contrôle et de la condition PHA.

L'effet du tri en lui-même a été étudié en comparant la prolifération après 24 heures de culture en présence ou non d'IL-2 (50 U/ml). Les cellules stimulées par l'IL-2 + BMA030 et triées conservent leur capacité de proliférer en réponse à l'IL-2

(figure 6-3). En effet, les cellules triées prolifèrent comme les cellules non triées après addition d'IL-2 au milieu de culture. Notons que la prolifération est plus importante dans la fraction positive (CD3<sup>+</sup>) (7.500 CPM dans le milieu seul, 30.000 CPM en présence d'IL-2) que dans la fraction négative (CD3<sup>-</sup>) (4.000 CPM dans le milieu seul, 11.000 CPM en présence d'IL-2).



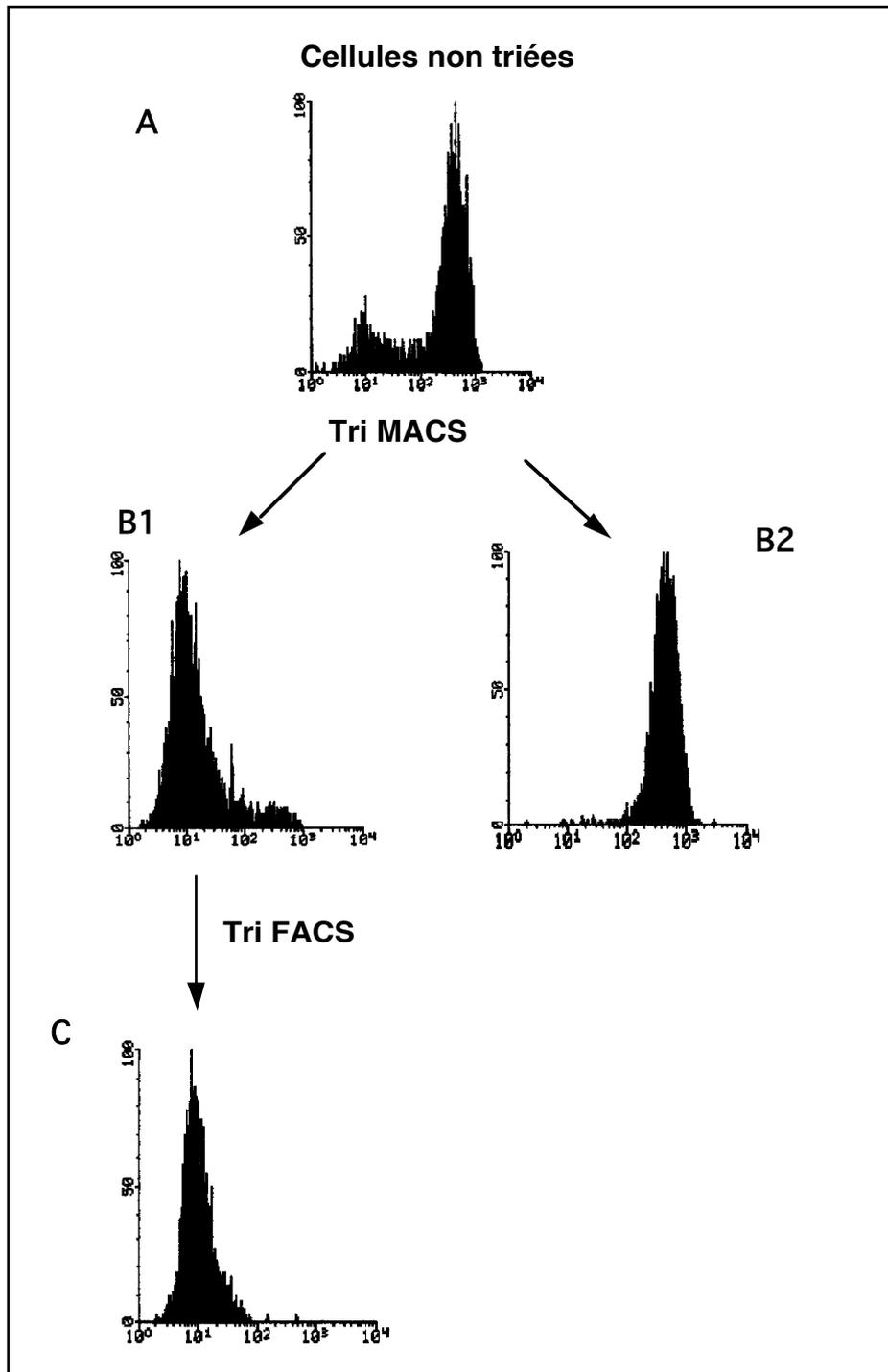
**Figure 6-3:** Réponse proliférative à l'IL-2 des cellules triées estimée par incorporation de <sup>3</sup>H-Tr.

Après stimulation par l'IL-2 + BMA030, les cellules séparées ou non sont cultivées pendant 24 heures en présence d'IL-2 (50 U/ml) ou non et leur prolifération est mesurée. Des cellules non stimulées servent de contrôle. Les résultats (moyennes ± écart type) d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés.

### 6.3.3. Sélection des lymphocytes T dans la fraction positive et enrichissement en cellules NK dans la fraction négative

Nous avons vérifié la pureté de la population de lymphocytes T obtenue par le système MACS. Elle peut être facilement contrôlée par cytométrie en flux grâce à la fluorescence verte émise par la streptavidine-FITC qui sert de pont entre l'anticorps anti-CD3 biotinylé et les billes paramagnétiques également biotinyllées. Lorsque les cellules sont cultivées en présence d'IL-2, la pureté est supérieure à 95% dans les deux fractions (résultats non illustrés), indépendamment du pourcentage de départ. Après

stimulation par un anticorps anti-CD3, la pureté de la fraction positive (CD3<sup>+</sup>) est similaire à celle obtenue après stimulation par IL-2 (97% ± 1,5%, n=12) (figure 6-4).



**Figure 6-4:** Expression du complexe CD3 à la surface des lymphocytes stimulés par l'IL-2 + BMA030 avant et après le tri.

Les histogrammes de fluorescence (FITC) d'une expérience représentative montrent le pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup> avant le tri (A) (83% de cellules CD3<sup>+</sup>), après le tri par le système MACS (B1 fraction négative, 15% de cellules CD3<sup>+</sup> et B2 fraction positive, 99%

de cellules CD3<sup>+</sup>) et après purification de la fraction négative par cytométrie en flux (FACS) (C) (1% de cellules CD3<sup>+</sup>).

Par contre, la pureté de la fraction négative varie de 50% à 98%. Lorsque celle-ci est inférieure à 95%, les cellules CD3<sup>-</sup> sont alors soumises à un nouveau tri par cytométrie en flux sans étape de marquage supplémentaire (figure 6-4C).

Pour confirmer la présence de lymphocytes T dans la fraction positive et pour définir les populations cellulaires présentes dans la fraction négative, des marquages avec des anticorps reconnaissant les différentes populations lymphocytaires ont été réalisés. Le tableau 6-2 reprend les résultats obtenus pour les cellules stimulées par l'IL-2 et BMA030.

Marqueurs de différenciation	Population totale	Fraction CD3 <sup>-</sup>	Fraction CD3 <sup>+</sup>
CD3	84 ± 5	≤ 1	97 ± 1
CD2	88 ± 7	45 ± 6	ND
CD4	64 ± 9	3 ± 1	67 ± 4
CD8	30 ± 9	30 ± 4	31 ± 4
CD16	3 ± 2	31 ± 4	<1
CD56	6 ± 2	49 ± 9	2 ± 1
CD57	5 ± 1	27 ± 8	ND
CD25	67 ± 16	38 ± 5	71 ± 1
CD19	ND	27 ± 5	ND
CD20	8 ± 4	ND	≤ 1
CD45 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	98 ± 1	98 ± 1	ND
CD14	≤ 1	≤ 1	ND

**Tableau 6-2: Phénotype de surface des lymphocytes stimulés par l'IL-2 et BMA030 avant et après le tri.**

Les résultats (moyenne ± écart type) sont exprimés en pourcentages (n ≤ 4). ND = non déterminé.

La population de départ est composée à plus de 98% de lymphocytes (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>) et moins d'un pourcent des cellules sont des monocytes (CD14<sup>+</sup>). Ces proportions sont semblables dans la fraction négative. Plus de 50% des cellules de la

fraction négative (CD3<sup>-</sup>) sont des cellules NK (CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>) et environ 30% sont des lymphocytes B (CD19<sup>+</sup>). Ceci indique un net enrichissement de ces deux populations dans la fraction négative par rapport à la population de départ (environ 5% de cellules NK et 8% de lymphocytes B) (tableau 6-2). Les cellules de la fraction positive (CD3<sup>+</sup>) expriment uniquement des marqueurs des lymphocytes T (CD2, CD3, CD4, CD8). Signalons que l'expression du marqueur CD8 est faible dans la fraction négative, alors que l'intensité de fluorescence pour ce marqueur est plus élevée dans la fraction positive (résultats non illustrés). Le pourcentage de cellules exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'IL-2 (CD25) est supérieur dans la fraction positive (71% contre 38% dans la fraction négative). Les résultats sont similaires après stimulation par l'IL-2, excepté que le pourcentage de cellules CD25<sup>+</sup> est moindre (résultats non illustrés).

#### 6.4. Discussion

Le tri par le système MACS remplit les différents critères nécessaires à l'étude de l'activité cytotoxique des lymphocytes T. Il permet d'obtenir, rapidement et indépendamment du pourcentage initial de lymphocytes T, un nombre suffisant de lymphocytes T pour tester leur activité cytotoxique contre plusieurs lignées tumorales.

La sélection de dix millions de lymphocytes T à partir d'une population de PBL contenant 75% de cellules CD3<sup>+</sup> nécessite environ trois heures en cytométrie en flux contre approximativement quarante minutes par le système MACS. Le système de tri par accrochage des cellules par des anticorps fixés sur le fond d'une boîte de culture ("panning") (Reinherz *et al.*, 1981) est également un système de tri rapide car comme dans le cas du MACS, il s'agit d'un tri de cellules en masse. Cependant ce système est peu adapté pour le tri des cellules portant le marqueur de sélection (tri positif) puisque celles-ci restent fixées dans la boîte de culture et une procédure supplémentaire est nécessaire pour les récupérer.

Après stimulation par un anticorps anti-CD3, la pureté moindre de la fraction cellulaire négative résulte certainement du marquage des lymphocytes T. En effet, les populations de cellules négatives (CD3<sup>-</sup>) et de cellules positives (CD3<sup>+</sup>) sont moins

discriminées que dans le cas des lymphocytes provenant de culture en présence d'IL-2 seule. Les différences d'intensité d'expression du complexe CD3 s'expliquent par le

phénomène d'internalisation et de réexpression de ce complexe lorsque les cellules sont activées par un anticorps anti-CD3 (Schwab *et al.*, 1985; Ledbetter *et al.*, 1986). Afin de vérifier que la fraction négative n'était pas contaminée par des lymphocytes T n'ayant pas encore réexprimé le complexe CD3, des marquages intra-cytoplasmiques de celui-ci ont été réalisés. Aucune cellule positive n'a été détectée (résultats non illustrés).

Le système MACS ne semble pas interférer avec la prolifération cellulaire. L'absence d'inhibition des fonctions cellulaires par les billes paramagnétiques, observée dans ce travail et par d'autres auteurs (Abts *et al.*, 1989; Pflueger *et al.*, 1990), est certainement en relation avec leur petite taille. Cette taille est environ dix fois inférieure aux billes utilisées par les autres systèmes de tri par champ magnétique. Le système magnétique le plus couramment utilisé (Dynabeads) (Lea *et al.*, 1985) nécessitait une culture de seize à vingt heures pour pouvoir enlever les billes magnétiques (Lea *et al.*, 1986; Funderud *et al.*, 1990). Actuellement, une procédure de détachement des billes Dynal existe, mais elle implique une manipulation supplémentaire qui consiste à incuber les cellules quarante-cinq minutes en présence de sérum anti-immunoglobuline de souris (Rasmussen *et al.*, 1992). Une comparaison de ces deux systèmes de tri (MACS et Dynal) réalisée par Manyonda et ses collaborateurs (1992) donne un avantage au système MACS pour la sélection positive d'une population cellulaire.

Cependant, une influence du tri sur les cellules sélectionnées ne peut être totalement exclue. Par exemple, l'anticorps utilisé pour marquer les cellules à sélectionner peut induire un encombrement stérique empêchant la fixation du ligand de la molécule reconnue ou d'une molécule proche. Ce problème n'est pas restreint aux systèmes de tri par champ magnétique, mais est commun à tous les systèmes de sélection utilisant des anticorps ("panning", cytométrie en flux).

Les cultures des cellules triées, pour les expériences de prolifération, montrent qu'il est possible d'obtenir des cellules triées dans des conditions stériles. Pour cela, il suffit de placer le système MACS dans une hotte à flux laminaire et les différents éléments nécessaires au tri (colonne, billes paramagnétiques et aiguilles) sont disponibles stériles et sont facilement re-stérilisables. Des expériences qui ne sont pas reprises dans ce travail, ont montré que les cellules triées pouvaient être cultivées pendant cinq jours sans problème de contamination.

En résumé, la mise au point d'un tri par le système MACS a permis de sélectionner rapidement un nombre suffisant de lymphocytes T sans altération significative de leur capacité fonctionnelle.

## Chapitre 7:

### Activité cytotoxique des lymphocytes T

#### 7.1. Introduction

L'activité cytotoxique des cellules NK ne requiert pas de stimulation préalable de ces cellules. Cependant, la présence d'IL-2 accroît leur activité cytotoxique. Cette stimulation ne nécessite pas de stimulus additionnel (Trinchieri *et al.*, 1984). Par contre, les lymphocytes T doivent subir un processus d'activation complexe avant d'acquérir une activité cytotoxique contre des cellules cibles qu'ils reconnaissent spécifiquement. De nombreux stimuli comprenant des cytokines et des molécules de surface sont impliqués dans ce phénomène. Toutefois, dans certaines circonstances, des lymphocytes T non stimulés sont capables de générer une activité cytotoxique (Geisberg *et al.*, 1992).

La lyse de cellules tumorales par les cellules LAK est principalement réalisée par les cellules NK (Itoh *et al.*, 1986; Ferrini *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1987). Néanmoins, plusieurs travaux ont mis en évidence une participation des lymphocytes T à l'activité cytotoxique anti-tumorale non restreinte par le CMH. Par exemple, chez la souris, des auteurs ont décrit l'induction de lymphocytes T cytotoxiques après une stimulation par un anticorps anti-CD3 (Stankova *et al.*, 1989). Ting et ses collaborateurs (1988) ont désigné ces cellules effectrices par le terme de cellules CD3-AK (pour "anti-CD3-induced Activated Killer cells"). Chez l'homme, la stimulation de PBL en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3 pendant 14 jours génère des lymphocytes T possédant une activité cytotoxique contre la lignée tumorale K562 (Ochoa *et al.*, 1989).

De plus, les résultats décrits dans le chapitre 4 montrent que notre condition expérimentale IL-2 + BMA030 génère une lyse des cellules tumorales HL60 et U937 plus importante que la stimulation par IL-2 alors que le pourcentage de cellules NK est plus faible dans cette condition de culture.

Nous avons donc étudié la participation des lymphocytes T, sélectionnés par le système MACS, dans la lyse de cellules tumorales. La participation à l'activité

cytotoxique des sous-populations de lymphocytes T portant le marqueur CD4 ou le marqueur CD8 est également étudiée.

## 7.2. Méthodologie

Les cellules cultivées quatre jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 ont été triées en cellules CD3<sup>+</sup> et CD3<sup>-</sup> par le système MACS. Pour certaines expériences, les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont été sélectionnées. Dans ce cas, le marquage est réalisé soit avec un anticorps anti-CD4 biotinylé (IgG<sub>1</sub>) soit avec un anticorps anti-CD8 biotinylé (IgG<sub>1</sub>). Pour obtenir les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, nous avons combiné un tri par le MACS et un tri par le FACS. Les cellules sont d'abord triées par le système MACS en cellules CD3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> et ensuite les cellules CD3<sup>+</sup> sont purifiées, au FACS, en cellules CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> grâce à un marquage par un anticorps anti-CD8-PE.

Directement après le tri, un test de cytotoxicité par relargage de chrome 51 radioactif est réalisé contre diverses lignées tumorales.

## 7.3. Résultats

### 7.3.1. Activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK

L'activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés en présence d'IL-2 et de BMA030 a été testée contre dix lignées tumorales (K562, Daudi, Cess, Ly, Nalm-6, Jurkat, MOLT-3, MOLT-4, HL60, U937).

Les cellules non triées sont capables de lyser de manière plus ou moins efficace toutes les lignées tumorales testées (15% à 67% de lyse pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles de 20) (tableau 7-1). L'activité des lymphocytes T est comparée à l'activité des cellules CD3<sup>-</sup> (dont la majorité sont des cellules NK ainsi que l'indique leur phénotype CD16<sup>+</sup> et/ou CD56<sup>+</sup>, voir chapitre 6). Les cellules CD3<sup>-</sup> exercent une activité cytotoxique significativement plus importante ( $p < 0,05$ ) que les cellules CD3<sup>+</sup>, excepté dans le cas des cellules tumorales HL60 et U937 où l'activité cytotoxique des deux populations cellulaires est comparable (tableau 7-1). Dans certaines expériences, nous avons trié les cellules CD3<sup>+</sup> par cytométrie en flux afin d'obtenir une pureté de cette population supérieure à 99% et les résultats obtenus ne diffèrent pas de ceux obtenus après un tri par le système MACS (résultats non illustrés).

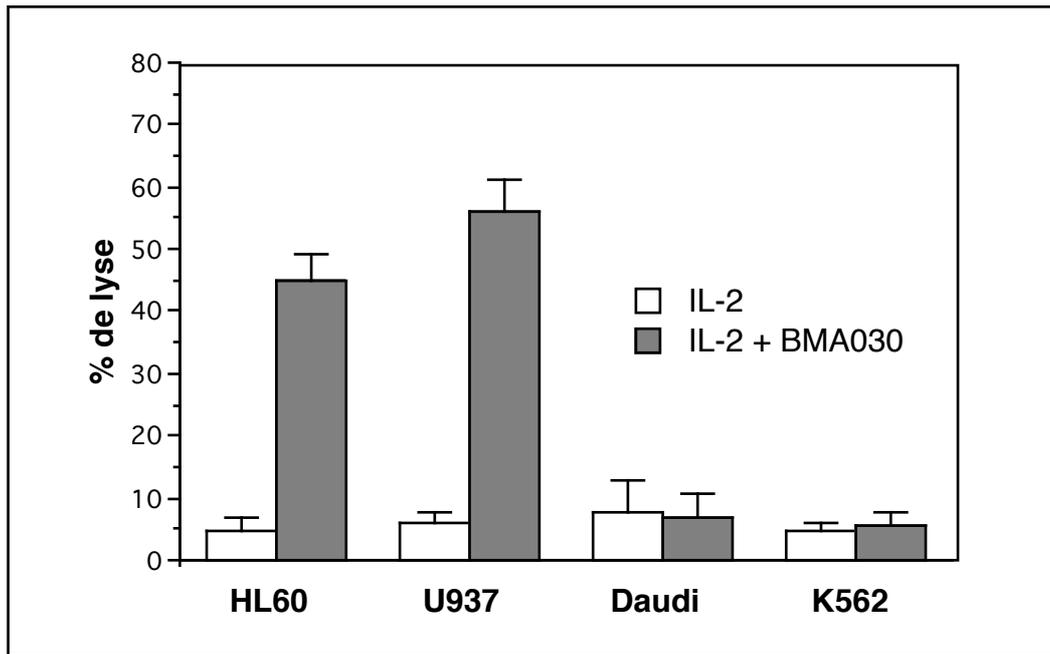
Lignées tumorales	Pourcentages de lyse			
	Cellules non triées	Cellules CD3 <sup>-</sup>	Cellules CD3 <sup>+</sup>	P
K562	47 ± 16	91 ± 12	9 ± 2	0,0003
Daudi	65 ± 16	75 ± 11	8 ± 6	0,0001
Ly	19 ± 9	30 ± 11	5 ± 2	0,0260
Cess	17 ± 12	32 ± 22	3 ± 3	0,0500
Nalm-6	15 ± 1	54 ± 8	13 ± 6	0,0290
Jurkat	67 ± 30	76 ± 1	13 ± 3	0,0250
MOLT-3	35 ± 6	53 ± 9	3 ± 1	0,0160
MOLT-4	27 ± 17	59 ± 1	2 ± 1	0,0001
U937	57 ± 13	62 ± 1	56 ± 1	NS
HL60	55 ± 3	56 ± 17	45 ± 4	NS

**Tableau 7-1: Activité cytotoxique des cellules non triées, des cellules CD3<sup>-</sup> et des cellules CD3<sup>+</sup> après une culture de quatre jours en présence d'IL-2 et de BMA030. Le rapport cellules effectrices : cellules cibles est égal à 20. L'activité cytotoxique des cellules CD3<sup>+</sup> et CD3<sup>-</sup> a été comparée par un test statistique (n ≥ 3). NS = non significatif, p < 0,05.**

### 7.3.2. Comparaison de la stimulation par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 dans la génération de lymphocytes T cytotoxiques

Nous avons comparé l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> stimulés par IL-2 ou IL-2 + BMA030 contre quatre lignées de cellules tumorales. Nous avons choisi deux lignées (K562 et Daudi) dont la lyse par les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 + BMA030 est faible (inférieure à 10%) et les deux lignées (HL60 et U937) dont la lyse par ces cellules est plus importante (environ 50%) (tableau 7-1).

Les activités cytotoxiques rapportées dans ce paragraphe ont été calculées pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles égal à 20. L'activité cytotoxique des lymphocytes T dirigée contre les lignées K562 et Daudi est inférieure à 10%, quelle que soit la condition de stimulation (figure 7-1). Les lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>) stimulés uniquement par l'IL-2 ne lysent pas de façon plus importante les lignées U937 et HL60, alors que le pourcentage lyse de ces deux lignées par les lymphocytes T cultivés en présence d'IL-2 et de BMA030 dépasse 40% (figure 7-1).



**Figure 7-1: Activité cytotoxique des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> stimulés par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 contre quatre lignées tumorales.**  
**Les valeurs (moyennes ± écart type) de quatre expériences sont représentées.**  
**Le rapport cellules effectrices:cellules cibles est égal à 20.**

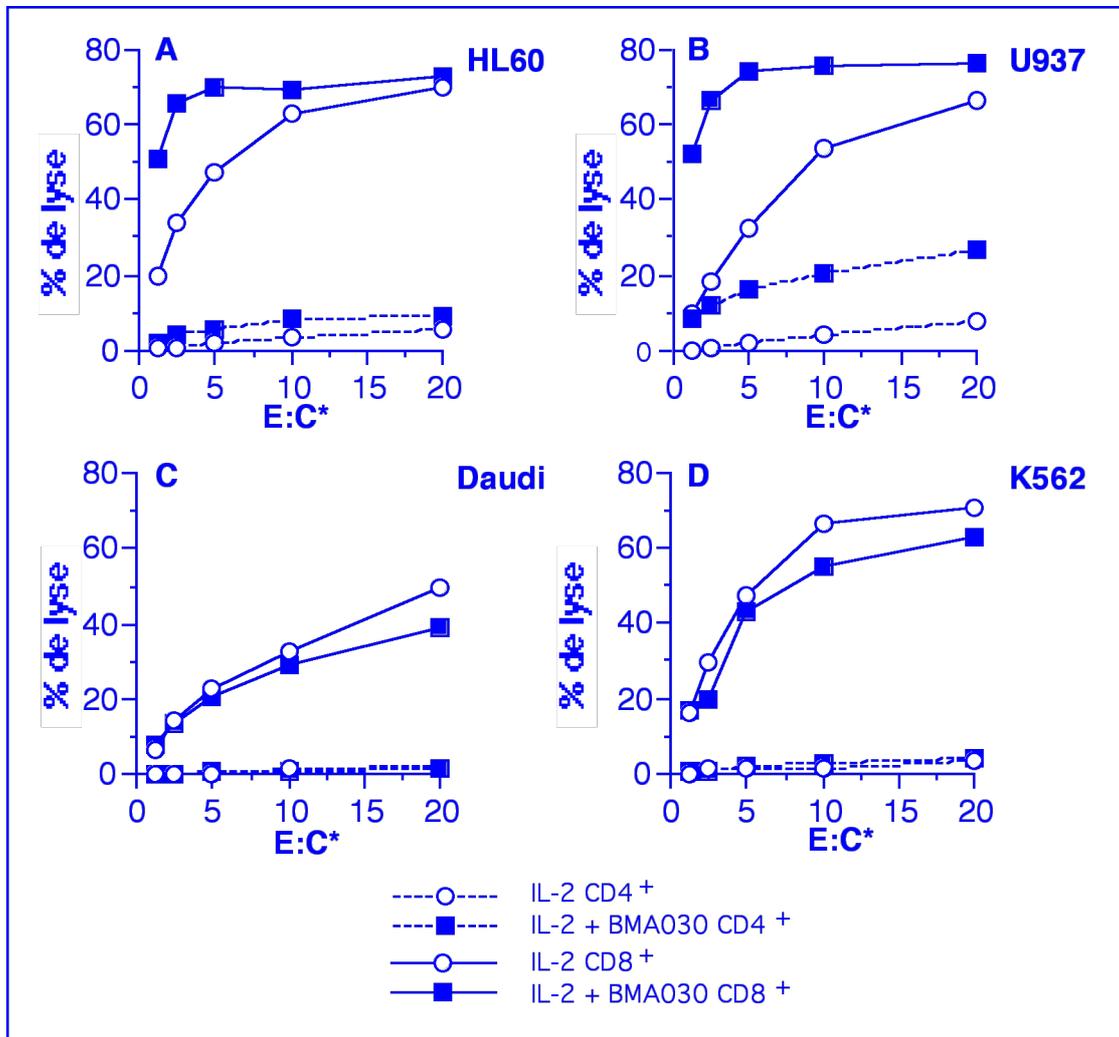
Comme pour la condition de culture IL-2 + BMA030, les cellules CD3<sup>+</sup> provenant de culture en présence d'IL-2 sont capables de tuer (plus de 30% de lyse) les cellules des quatre lignées tumorales testées (résultats non illustrés).

### 7.3.3. Participation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> à l'activité cytotoxique

Les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont été triées par le système MACS et leur activité cytotoxique contre les lignées tumorales HL60, U937, Daudi et K562 a été estimée par un test de cytotoxicité par relargage de chrome 51\* (figure 7-2).

Les cellules CD8<sup>+</sup> présentent une activité cytotoxique importante contre les quatre lignées testées. La lyse des cellules HL60 et U937 (figure 7-2 A et B) est supérieure après stimulation des lymphocytes en présence d'IL-2 et de BMA030. Par contre, la lyse des cellules Daudi et K562 (figure 7-2 C et D) est similaire pour les deux conditions de stimulation ou légèrement supérieure après activation des cellules en présence d'IL-2 seule. Les cellules CD4<sup>+</sup> ne possèdent pas d'activité cytotoxique contre Daudi et K562 quelle que soit la condition de stimulation (figure 7-2 C et D). L'activité cytotoxique des lymphocytes CD4<sup>+</sup> dirigée contre les cellules HL60 et U937 est très faible après une culture en présence d'IL-2 seule. Lorsque les lymphocytes sont stimulés en présence d'IL-2 et de BMA030, cette activité augmente très légèrement dans le cas

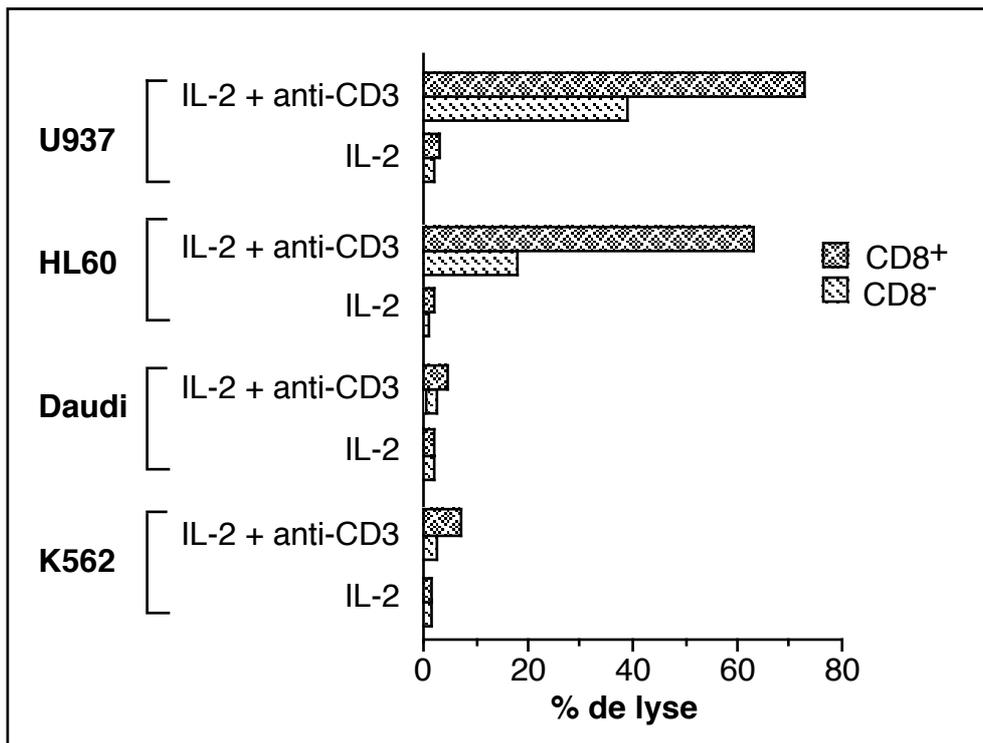
des cellules HL60 (figure 7-2 A) et plus significativement dans le cas des cellules U937 (figure 7-2 B).



**Figure 7-2: Activité cytotoxique des lymphocytes CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.** Après quatre jours de culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030, les lymphocytes sont triés en cellules CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> et leur activité cytotoxique est testée contre les lignées HL60 (A), U937 (B), Daudi (C) et K562 (D). Les valeurs illustrées proviennent d'une expérience représentative de trois autres.

Signalons qu'une proportion de cellules CD8<sup>+</sup> n'expriment pas le complexe CD3, mais expriment des marqueurs de cellules NK tels que les molécules CD16 et le CD56 (résultats non illustrés). Par contre, toutes les cellules CD4<sup>+</sup> portent à leur surface le complexe CD3 et sont négatives pour les molécules CD16 et CD56 (résultats non illustrés). Afin d'éviter la contamination des cellules T CD8<sup>+</sup> par des cellules NK exprimant aussi la molécule CD8, les lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ont été triés grâce à une procédure de tri combinant le MACS et le FACS.

Aucune activité cytotoxique n'est détectée après stimulation par l'IL-2 (figure 7-3). Après stimulation par l'IL-2 et BMA030, la lyse des cellules tumorales HL60 et U937 est principalement due aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Cependant, les lymphocytes T CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, considérés comme des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, possèdent également une activité cytotoxique. Celle-ci peut atteindre 35 % de lyse des cellules U937 pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles égal à 20 (figure 7-3). La lyse des cellules Daudi et K562 est très faible dans toutes les conditions (figure 7-3).



**Figure 7-3: Activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup>.** Après quatre jours de culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030, les lymphocytes sont triés en cellules CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Leur activité cytotoxique est testée contre les lignées HL60, U937, Daudi et K562. Les valeurs illustrées proviennent d'une expérience représentative de trois autres. Le rapport cellules effectrices : cellules cibles est égal à 20.

## 7.4. Discussion

La mise au point du tri par le système MACS a permis d'isoler des lymphocytes T afin d'étudier leur fonction. Parmi les dix lignées tumorales testées, les lymphocytes T sont capables de lyser des cellules tumorales HL60 et U937. Cette lyse n'apparaît

qu'après une culture en présence d'un anticorps anti-CD3 (BMA030). En effet, les lymphocytes stimulés par l'IL-2 seule ne possèdent qu'une faible activité cytotoxique. Remarquons que les deux lignées lysées par les lymphocytes T sont également plus efficacement tuées par les lymphocytes non séparés provenant de culture en présence d'anticorps anti-CD3 (voir chapitre 4).

Les lymphocytes triés uniquement sur la base d'une expression de la molécule CD8 possèdent une activité cytotoxique contre les cellules tumorales K562 et Daudi alors que celles-ci ne sont pas lysées par les lymphocytes T. Cette activité cytotoxique est certainement liée à la présence de cellules NK dans cette population de cellules. La détection de cellules CD3<sup>-</sup> et de cellules CD56<sup>+</sup> et CD16<sup>+</sup> confirme la présence de cellules NK. Afin d'éliminer les cellules NK, nous avons adapté notre méthode de tri et, par une combinaison d'immuno-marquages, nous avons sélectionné les lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Cette population cellulaire ne montre pas d'activité cytotoxique contre les lignées Daudi et K562.

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et dans une moindre mesure les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> participent à la lyse des cellules tumorales HL60 et U937. La contribution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à l'activité cytotoxique a déjà été décrite dans d'autres modèles (Jung *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1989; Azuma *et al.*, 1992; Smyth *et al.*, 1992; Kuge *et al.*, 1995). Citons également le travail de Geller et de ses collaborateurs (1991) qui montre que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> s'inhibent mutuellement. Dans leur modèle, une activité cytotoxique contre HL60 n'est observée qu'après purification des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et l'activité cytotoxique des deux populations est similaire. Il semblerait, du moins chez la souris, que les gènes de la perforine et du granzyme B soient exprimés préférentiellement dans les cellules de clones CD4<sup>+</sup> Th2 et non dans les clones CD4<sup>+</sup> Th1 (Lancki *et al.*, 1991). Cependant des cellules CD4<sup>+</sup> Th1 sont également capables d'induire des phénomènes de lyse notamment par induction de la fragmentation de l'ADN (Ozdemirli *et al.*, 1992).

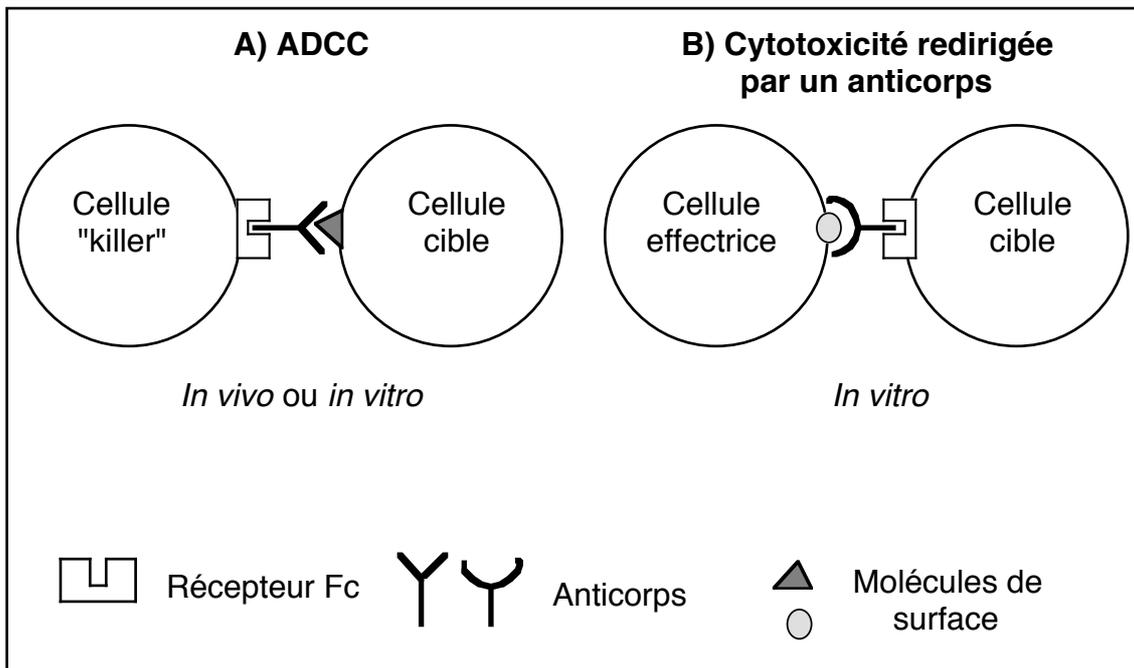
En résumé, les lymphocytes T stimulés en présence d'IL-2 et de BMA030 sont cytotoxiques contre les lignées tumorales HL60 et U937. Il reste à savoir pourquoi parmi les dix lignées tumorales testées, seules les lignées U937 et HL60 sont lysées par les lymphocytes T purifiés. Signalons que ces deux lignées ont été décrites comme étant sensibles à une lyse redirigée par un anticorps et notamment par un anticorps anti-CD3 (Leeuwenberg *et al.*, 1987; Deem *et al.*, 1988; Nishimura *et al.*, 1992). Dans ce contexte, nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'une participation de l'anticorps anti-CD3 dans l'activité cytotoxique.

## Chapitre 8: Participation de l'anticorps anti-CD3 dans l'activité cytotoxique

### 8.1. Introduction

Les mécanismes de cytotoxicité par contacts cellulaires précédemment décrits dans ce travail impliquent une liaison entre des molécules présentes à la surface des cellules cibles et leurs récepteurs présents à la surface des cellules effectrices. Toutefois, ce lien nécessaire au phénomène de cytotoxicité peut être induit par des anticorps. En effet, ceux-ci sont capables de former des "ponts" entre les cellules effectrices et les cellules tumorales. Ces ponts peuvent être établis de deux manières. *In vivo*, certains lymphocytes, les cellules "killer", portent à leur surface des récepteurs pour la partie constante des immunoglobulines (FcR). Sur ces récepteurs vont venir se fixer des anticorps spécifiques de molécules présentes à la surface des cellules cibles. Ainsi "armées", les cellules "killer" peuvent reconnaître les cellules cibles et les détruire. Ce type de cytotoxicité est appelé ADCC ("antibody-dependent cell mediated cytotoxicity") (Lovchik et Hong, 1977; Perlmann et al., 1972; Hellström *et al.*, 1981) (figure 8-1 A).

Il est possible d'imiter cette cytotoxicité *in vitro*, soit en utilisant des cellules effectrices porteuses de récepteurs Fc comme certaines cellules NK (CD16<sup>+</sup>) et des anticorps spécifiques des cellules cibles, soit en induisant la liaison inverse c'est-à-dire en utilisant un anticorps spécifique des cellules effectrices pour détruire des cellules cibles exprimant des récepteurs Fc (figure 8-1 B). Plusieurs auteurs ont notamment montré que des lymphocytes en présence d'anticorps anti-CD3 ou d'anticorps anti-CD16 sont capables de lyser des cellules tumorales portant des récepteurs pour la partie constante des immunoglobulines G (Fcγ R) (Staerz et Bevan, 1985; Notter *et al.*, 1993). Cette activité cytotoxique est désignée par le terme de cytotoxicité redirigée par un anticorps.



**Figure 8-1:** Représentation schématique de l'activité cytotoxique cellulaire dépendante d'un anticorps (ADCC) (A) et de l'activité cytotoxique redirigée par un anticorps (B).

Il existe trois types de récepteurs Fc $\gamma$  (pour revues: Ravetch, 1994; de Haas *et al.*, 1995; Kimberly *et al.*, 1995). Le récepteur de type I (Fc $\gamma$  RI ou CD64) possède une haute affinité pour les immunoglobulines G. Le récepteur de type II (Fc $\gamma$  RII ou CD32) et le récepteur de type III (Fc $\gamma$  RIII ou CD16) ne présentent qu'une faible affinité pour les immunoglobulines monomériques. Cette propriété des récepteurs Fc $\gamma$  est aussi dépendante de l'isotype de l'anticorps que celui-ci soit humain ou murin. Les différentes caractéristiques de ces récepteurs et leur liaison préférentielle avec les différents isotypes des immunoglobulines murines sont résumées dans le tableau 8-1.

Types	CD	Affinité	Isotypes murins reconnus
Fc $\gamma$ RI	CD64	Forte	IgG <sub>2a</sub> et IgG <sub>3</sub> > IgG <sub>1</sub>
Fc $\gamma$ RII	CD32	Faible	IgG <sub>1</sub> > IgG <sub>2a</sub>
Fc $\gamma$ RIII	CD16	Faible	IgG <sub>3</sub> > IgG <sub>2a</sub>

**Tableau 8-1:** Récepteurs Fc $\gamma$  humains et isotypes des immunoglobulines de souris préférentiellement reconnus par ceux-ci.

Le but de cette partie de notre travail est de déterminer si les résultats obtenus dans le chapitre précédent découlent d'une activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 murin BMA030.

## 8.2. Méthodologie

Plusieurs techniques ont été utilisées pour essayer de mettre en évidence une activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 BMA030 après une culture de quatre jours en présence d'IL-2 et de BMA030.

Tout d'abord, l'expression des différents récepteurs Fc $\gamma$  sur les lignées tumorales a été étudiée par cytométrie en flux.

La détection BMA030 résiduel sur les cellules effectrices a été réalisée par deux techniques. La première utilise un anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de souris et couplé au FITC. La fluorescence de l'anticorps est détectée par cytométrie en flux. La deuxième technique est effectuée sur des frottis de cellules réalisés par cyto-centrifugation. La révélation de l'anticorps anti-immunoglobuline de souris se fait grâce à un système amplificateur utilisant la peroxydase.

Des tris par le système MACS ont été réalisés avec différents anticorps anti-CD3 couplés à la biotine: SPVT3 (IgG<sub>1</sub>), UCHT1 (IgG<sub>1</sub>) et un anticorps ne possédant pas de portion Fc, SPVT3 F(ab)'<sub>2</sub>, ceci afin de déterminer la participation de l'anticorps servant au tri dans le processus de cytotoxicité. De plus, pour éviter l'utilisation d'un anticorps anti-CD3, les lymphocytes T ont été enrichis négativement en éliminant les cellules NK (CD16<sup>+</sup> et CD56<sup>+</sup>) par cytométrie en flux.

Enfin, pour évaluer l'effet de l'anticorps anti-CD3 servant à la stimulation, différents anticorps ainsi que d'autres mitogènes ont été additionnés au milieu de culture. Les lymphocytes du sang ont été cultivés pendant quatre jours, dans les conditions expérimentales suivantes:

- IL-2 (50U/ml)
- IL-2 + BMA030 (IgG<sub>2a</sub>, 10 ng/ml)
- IL-2 + BMA033 (IgG<sub>3</sub>, 10 ng/ml)
- IL-2 + UCHT1 (IgG<sub>1</sub>, 10 ng/ml)
- IL-2 + SPVT3 F(ab)'<sub>2</sub> fixé sur le fond de la boîte de culture (5  $\mu$ g/ml)
- IL-2 + phytohémagglutinine (PHA, 0,1%)
- IL-2 + entérotoxine A de staphylocoque (SEA, 10 ng/ml).

### 8.3. Résultats

#### 8.3.1. Profil d'expression des récepteurs Fc $\gamma$ sur les lignées tumorales

La présence des différents récepteurs Fc $\gamma$  à la surface des cellules tumorales a été recherchée afin de définir les lignées potentiellement sensibles à une cytotoxicité redirigée par l'anticorps anti-CD3 BMA030 (tableau 8-2).

Lignées cellulaires	Récepteurs Fc $\gamma$			Activité cytotoxique (%) des cellules CD3 $^{+}$
	I	II	III	
<b>K562</b>	-	+	-	<b>9 <math>\pm</math> 2</b>
<b>Daudi</b>	-	+	-	<b>8 <math>\pm</math> 6</b>
<b>Ly</b>	-	-	+	<b>5 <math>\pm</math> 2</b>
<b>Cess</b>	-	-	+	<b>3 <math>\pm</math> 3</b>
<b>Nalm-6</b>	-	+	-	<b>13 <math>\pm</math> 6</b>
<b>Jurkat</b>	-	-	-	<b>13 <math>\pm</math> 3</b>
<b>MOLT-3</b>	-	-	-	<b>3 <math>\pm</math> 1</b>
<b>MOLT-4</b>	-	-	-	<b>2 <math>\pm</math> 1</b>
<b>U937</b>	+	+	-	<b>56 <math>\pm</math> 1</b>
<b>HL60</b>	+	+	-	<b>45 <math>\pm</math> 4</b>

**Tableau 8-2:** Type de récepteurs Fc $\gamma$  sur les cellules des lignées tumorales. Comparaison avec les activités cytotoxiques développées par les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et BMA030 (le rapport cellules effectrices:cellules cibles est égal à 20). Ces valeurs sont reprises du tableau 7-1.

Les lignées MOLT-3, MOLT-4 et Jurkat ne portent à leur surface aucun des récepteurs Fc $\gamma$  (tableau 8-2). Les récepteurs Fc $\gamma$  de type I et II sont détectés à la surface des cellules U937 et HL60. Les lignées K562, Daudi et Nalm-6 expriment uniquement le récepteur Fc $\gamma$  de type II. Le récepteur Fc $\gamma$  de type III est décelé à la surface des cellules Ly et Cess (tableau 8-2).

Nous avons également déterminé la présence de récepteur Fc $\gamma$  à la surface des cellules adhérentes (A431, OVCAR-3 et CK2) utilisées dans les tests d'inhibition de

croissance tumorale. Aucune des trois lignées n'exprime un des trois récepteurs Fc $\gamma$  (résultats non illustrés).

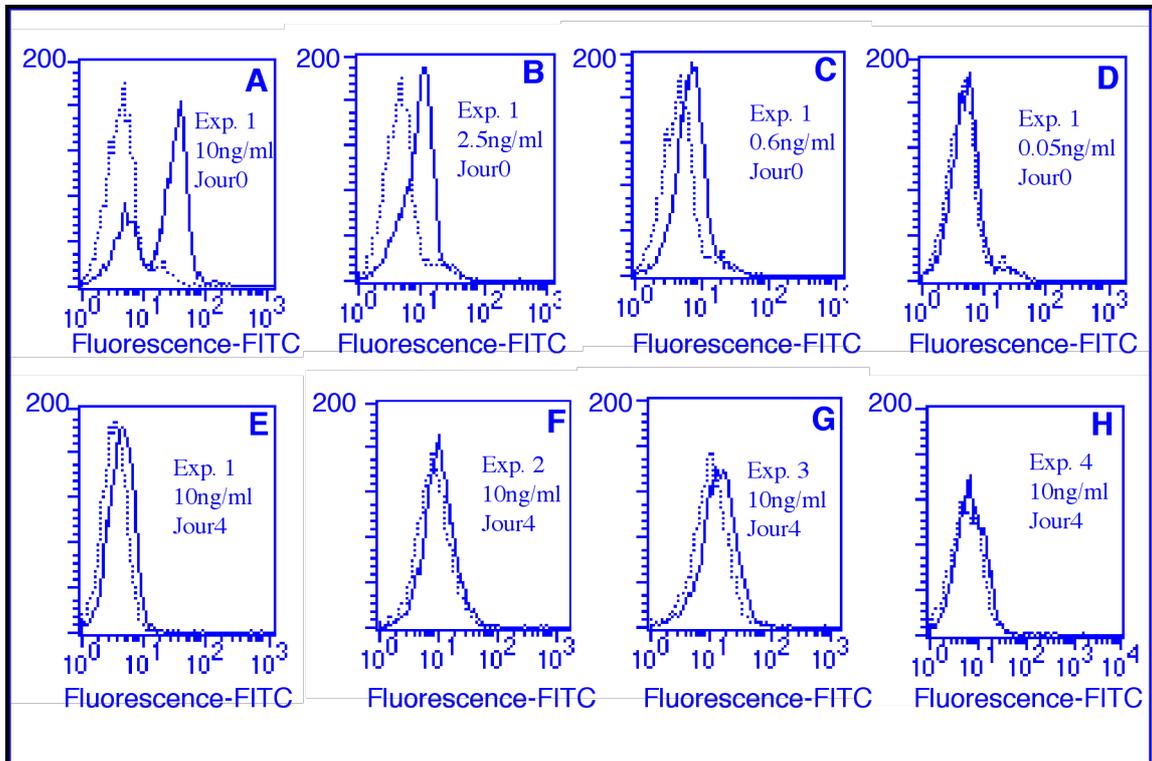
Pour pouvoir corrélérer la présence de récepteur Fc $\gamma$  et l'activité cytotoxique induite par les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et BMA030, nous avons repris le pourcentage de lyse du tableau 7-1. Signalons que les cellules HL60 et U937 qui sont tuées par les lymphocytes T sont les seules à porter le récepteur Fc $\gamma$  RI (tableau 8-2). Pour rappel, celui-ci lie avec une haute affinité les immunoglobulines murines IgG<sub>2a</sub> comme l'anticorps BMA030 utilisé pour la stimulation des lymphocytes.

### 8.3.2. Détection de l'anticorps BMA030 à la surface des lymphocytes T

La présence de l'anticorps anti-CD3, BMA030, à la surface des lymphocytes T cultivés pendant quatre jours en présence d'IL-2 et de BMA030 a été recherchée grâce à un anticorps couplé au FITC et reconnaissant les immunoglobulines de souris. Afin d'établir une correspondance entre le marquage observé et la quantité de BMA030 nécessaire pour l'obtenir, nous avons réalisé une relation dose/intensité de fluorescence en incubant des lymphocytes fraîchement prélevés en présence de différentes concentrations d'anticorps de BMA030 (0,05 à 10 ng/ml) (figure 8-2 A à D).

Après quatre jours de culture, les histogrammes de fluorescence montrent que peu ou pas d'anticorps anti-CD3 est détecté à la surface des lymphocytes (figure 8-2 E à H). En comparant ces histogrammes à ceux obtenus avec différentes concentrations de BMA030 (figure 8-2 A à D), on peut déduire que la quantité de BMA030 présente à la surface des lymphocytes correspond à celle induite par une incubation en présence d'une concentration en BMA030 inférieure à 0,6 ng/ml.

Afin d'améliorer la détection de l'anticorps BMA030, nous avons marqué les cellules par une technique d'amplification du signal. Les cellules sont cyto-centrifugées sur des lames et traitées par un anticorps anti-immunoglobuline de souris biotinylé révélé par une streptavidine couplée à la peroxydase. Dans quelques expériences, le BMA030 est détecté à la surface des cellules provenant d'une culture en présence d'IL-2 et de BMA030 (figure 8-3 C). Comme contrôles négatifs, des marquages ont été réalisés sur des cellules cultivées en présence d'IL-2 seule (figure 8-3 A) et en omettant d'ajouter l'anticorps anti-immunoglobuline de souris biotinylé (figure 8-3 B). Des cellules ont été incubées en présence de 100 ng/ml de BMA030 préalablement au marquage et ont été utilisées comme contrôle positif (figure 8-3 D). Cette technique semble plus sensible que celle utilisant la fluorescence car dans le cas de l'expérience illustrée par la figure 8-3, le BMA030 n'a pas été mis en évidence par cytométrie en flux (figure 8-2 H).



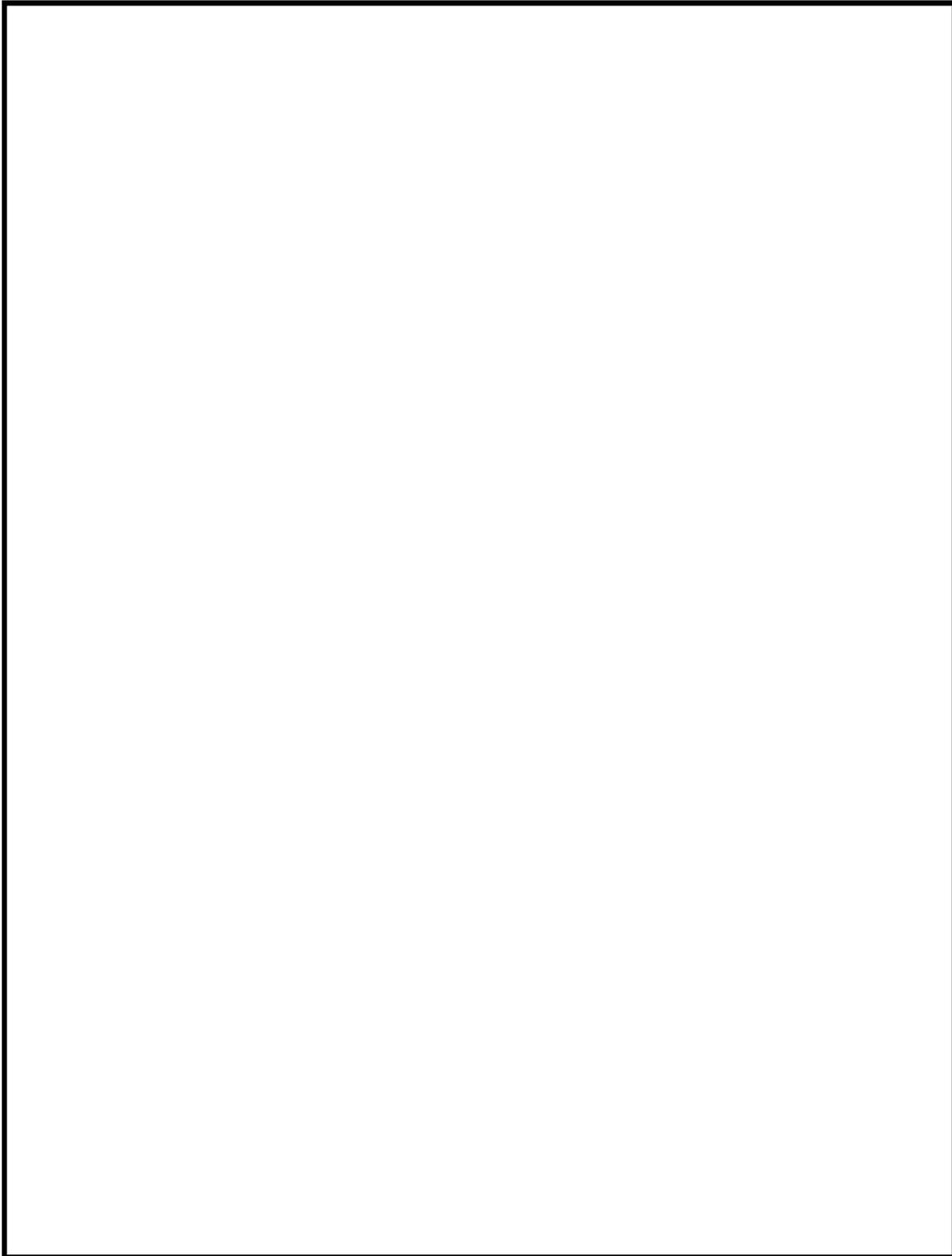
**Figure 8-2 :** Détection BMA030 présent à la surface des lymphocytes par un anticorps anti-immunoglobuline de souris couplé au FITC.

Des lymphocytes fraîchement prélevés ont été incubés en présence de différentes concentrations de BMA030. Les profils de marquage obtenus au FACS, après traitement des cellules par un anticorps-FITC détectant le BMA030 à la surface des lymphocytes, sont illustrés dans les graphiques A à D.

Dans les graphiques E à H sont représentés les profils de fluorescence de l'anticorps anti-immunoglobuline-FITC reconnaissant le BMA030. Les cellules proviennent de cultures de PBL de quatre donneurs différents. Les cellules ont été cultivées pendant quatre jours en présence d'IL-2 et de BMA030 (10 ng/ml).

Les cellules des graphiques A à E proviennent du même donneur.

Le nombre de cellules est représenté en ordonnée et l'intensité de fluorescence en abscisse. La courbe en pointillé représente la fluorescence obtenue pour un anticorps contrôle-FITC.



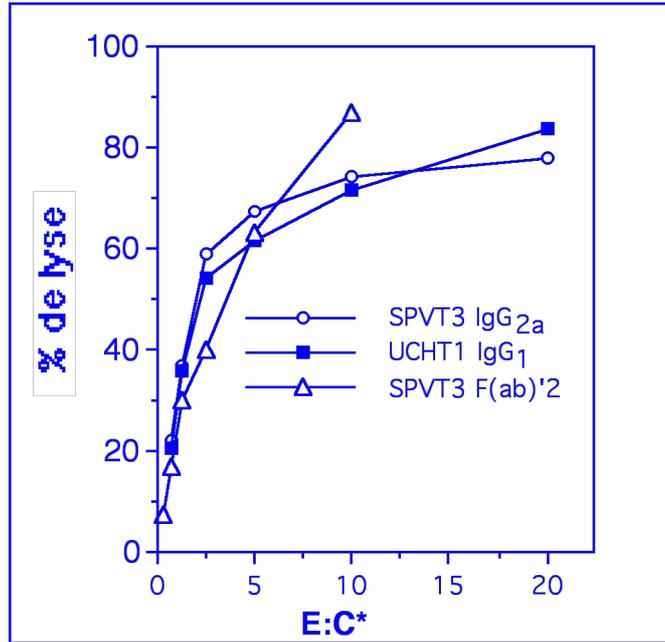
**Figure 8-3 :** Détection du BMA030 présent à la surface des lymphocytes par un anticorps anti-immunoglobuline de souris.

Les cellules stimulées pendant quatre jours en présence d'IL-2 (A) ou d'IL-2 + BMA030 (B-D) sont cytocentrifugées et traitées par un anticorps anti-immunoglobulines de souris biotinylé qui est révélé par un système d'amplification utilisant la peroxydase. Les cellules sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline. (B) contrôle négatif: marquage sans l'anticorps anti-immunoglobulines de souris biotinylé; (D) contrôle positif: les cellules ont été incubées en présence de 100 ng/ml de BMA030 avant le marquage. Grossissement: 400X.

### 8.3.3. Influence du type d'anticorps anti-CD3 servant au tri sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T

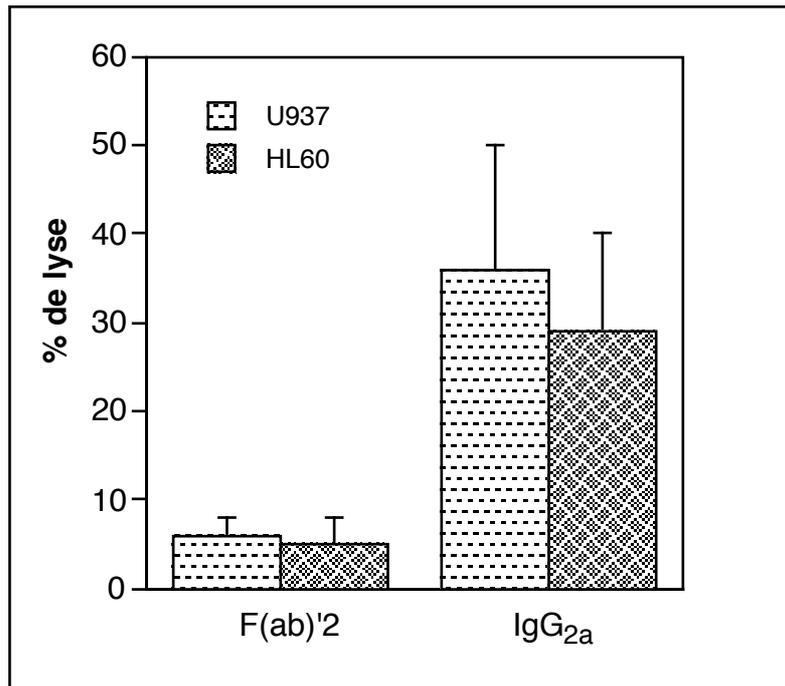
La quantité d'anticorps anti-CD3 nécessaire pour le tri des cellules T ( $1\mu\text{g}$  pour  $1.10^6$  cellules) est nettement plus importante que celle utilisée pour la stimulation ( $10\text{ ng}$  pour  $1,25.10^6$  cellules). De ce fait, l'anticorps servant au tri pourrait jouer un rôle important dans une cytotoxicité redirigée par un anticorps anti-CD3. Pour éviter ce problème, les cellules ont été sélectionnées après un marquage par un anticorps anti-CD3 ne possédant pas de partie constante Fc (SPVT3 F(ab)'2) et ne pouvant donc pas lier de récepteur Fc $\gamma$ .

Néanmoins, nous avons étudié l'effet de plusieurs anticorps anti-CD3 (UCHT1, IgG<sub>1</sub>; SPVT3, IgG<sub>2a</sub>; et SPVT3 F(ab)'2) sur la lyse des cellules U937 et HL60. Les lymphocytes T stimulés par IL-2 et BMA030 possèdent une activité cytotoxique dirigée contre U937 comparable quel que soit l'anticorps anti-CD3 utilisé pour le tri (figure 8-4). De même, la lyse des cellules HL60 n'est pas influencée par la sélection des lymphocytes T (résultats non illustrés). Pour compléter cette étude, nous avons également réalisé des tris éliminant les cellules NK (CD16<sup>+</sup> et/ou CD56<sup>+</sup>) de la population de départ par cytométrie en flux. La lyse des cellules des deux lignées tumorales est similaire à celle obtenue en utilisant des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> (résultats non illustrés).



**Figure 8-4:** Activité cytotoxique contre la lignée U937 des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> stimulés par l'IL-2 + BMA030 et triés à l'aide de différents anticorps anti-CD3 (E:C\* = rapport cellules effectrices : cellules cibles).

Par contre, la cytotoxicité générée par les cellules stimulées par l'IL-2 seule est influencée par le type d'anticorps anti-CD3 utilisé pour le tri des lymphocytes T. En effet, l'activité cytotoxique dirigée contre HL60 et U937 est supérieure lorsque les cellules sont triées par un anticorps IgG<sub>2a</sub> complet (SPVT3), par rapport à celle obtenue après un tri avec un anticorps incomplet (SPVT3 F(ab')<sub>2</sub>) (figure 8-5). Néanmoins, cette activité est moindre que celle développée par les lymphocytes T cultivés en présence de BMA030.



**Figure 8-5 :** Effet de l'anticorps servant au tri sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés par l'IL-2.

Les lymphocytes T provenant de culture en présence d'IL-2 ont été triés soit par un anticorps anti-CD3 complet IgG<sub>2a</sub> (SPVT3), soit par un anticorps incomplet F(ab)'2 (SPVT3 F(ab)'2). L'activité cytotoxique dirigée contre les lignées U937 et HL60 a été mesurée à un rapport cellules effectrices:cellules cibles de 20:1 (moyenne ± écart type, n =3).

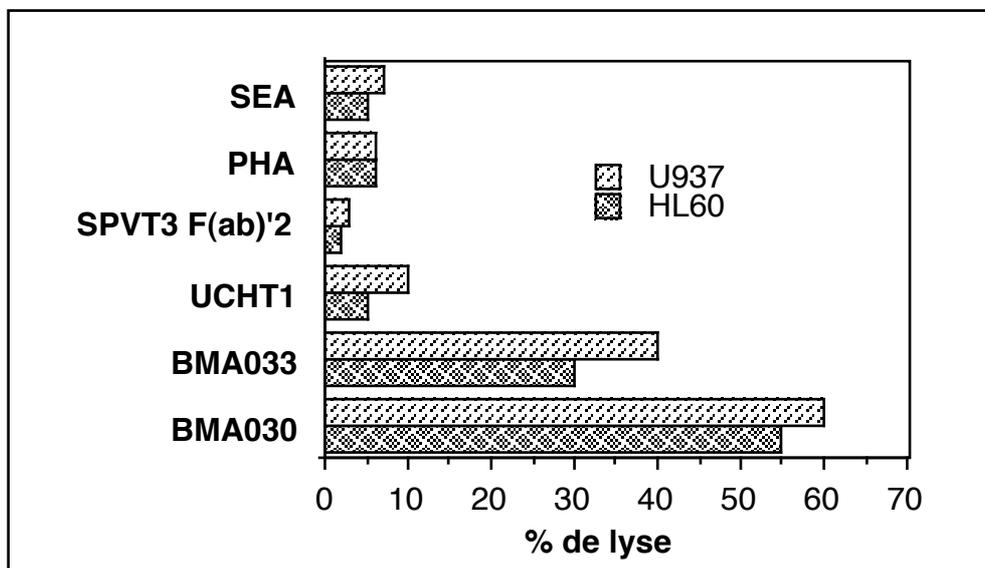
#### 8.3.4. Influence du type d'anticorps anti-CD3 servant à la stimulation sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T

Après avoir exclu une participation de l'anticorps anti-CD3 utilisé pour le tri dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et BMA030, nous nous sommes intéressée à l'effet BMA030. Dans ce but, les lymphocytes sont activés pendant quatre jours par des anticorps anti-CD3 d'isotypes différents (BMA030, IgG<sub>2a</sub>; UCHT1, IgG<sub>1</sub>; BMA033, IgG<sub>3</sub>) ou par un anticorps anti-CD3 incomplet (SPVT3 F(ab)'2) (figure 8-6). Des mitogènes des lymphocytes T autres que des anticorps ont également été utilisés, à savoir une lectine, la phytohémagglutinine (PHA) et un superantigène, l'entérotoxine A de staphylocoque (SEA).

Seules les stimulations par des anticorps anti-CD3 complets et possédant un isotype reconnu par les FcγR I (IgG<sub>2a</sub> ou IgG<sub>3</sub>) tels que le BMA030 et le BMA033 sont capables de générer une activité cytotoxique des lymphocytes T contre HL60 et U937. Celle-ci est supérieure ou égale à 30% de lyse pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles égal à 20 (figure 8-6).

La stimulation des lymphocytes T par la SEA ou par la PHA induit une activité cytotoxique faible et similaire à celle obtenue après culture en présence d'UCHT1 (IgG<sub>1</sub>) ou de l'anticorps anti-CD3 incomplet (inférieure à 10% de lyse pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles égal à 20) (figure 8-6).

L'activité cytotoxique faible n'est pas due à une absence d'activation des lymphocytes T car celle-ci a été vérifiée, par exemple, par l'augmentation du pourcentage de lymphocytes T exprimant à leur surface le récepteur pour l'IL-2 (CD25) (résultats non illustrés).



**Figure 8-6:** Activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés pendant quatre jours par des anticorps anti-CD3 différents ou par des mitogènes. Le rapport cellules effectrices : cellules cibles est égal à 20.

## 8.4. Discussion

Dans ce chapitre, la participation éventuelle de l'anticorps anti-CD3 dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T a été étudiée. Dans notre modèle, l'anticorps anti-CD3 joue un double rôle. En premier lieu, il est additionné au milieu de culture afin d'activer les cellules, mais il sert également au tri des lymphocytes T.

L'activité cytotoxique redirigée par un anticorps nécessite la présence de récepteur pour le fragment Fc $\gamma$  à la surface des cellules cibles. Les cellules Jurkat, MOLT-3, MOLT-4, A431, OVCAR-3 et CK2 n'expriment pas de récepteur Fc $\gamma$ , du

moins aucun récepteur n'a été détecté par les anticorps, dirigés contre le Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII, que nous avons utilisés. Ces cellules ne peuvent donc pas être détruites par ce mode de cytotoxicité. Les cellules des autres lignées (K562, Daudi, Cess, Ly, Nalm-6, HL60 et U937) portent à leur surface au moins un des types de récepteur Fc $\gamma$ . Nos résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature (Anderson et Looney, 1986; Fanger *et al.*, 1989). La présence de récepteur de haute affinité (Fc $\gamma$ RI), reconnaissant préférentiellement les immunoglobulines murines d'isotype IgG<sub>2a</sub> comme le BMA030 ou d'isotype IgG<sub>3</sub> comme le BMA033 (Ceuppens et Van Vaeck, 1989), sur les cellules des lignées U937 et HL60 explique leur sensibilité à une lyse redirigée par un anticorps. Ce type d'activité cytotoxique est aussi possible sur d'autres lignées tumorales comme K562 et Daudi (Leeuwenberg *et al.*, 1985; Jondal *et al.*, 1986). Dans ce cas, la quantité d'anticorps nécessaire doit être plus élevée car les récepteurs portés par ces cellules possèdent une affinité plus faible pour les immunoglobulines (Anderson, 1989). De plus, le récepteur Fc $\gamma$ RII exprimé par ces cellules lie préférentiellement les immunoglobulines murines d'isotype IgG<sub>1</sub>.

Après quatre jours de culture en présence d'IL-2 et de BMA030, la détection de l'anticorps BMA030 à la surface de cellules par un anticorps anti-immunoglobuline de souris-FITC est très faible ou nulle. L'intensité de fluorescence obtenue correspond à un marquage réalisé en présence d'une concentration en BMA030 inférieure à 0,6 ng/ml. A cette concentration, le nombre théorique de molécules de BMA030 à la surface est approximativement égal à 2.500. Cette valeur est équivalente à la limite de détection d'un anticorps-FITC en cytométrie (Steen, 1990). Une technique plus sensible permettant de détecter en cytométrie un signal correspondant à moins de 400 molécules par cellule (Zola *et al.*, 1990) a été utilisée, mais ne nous a pas permis d'améliorer la détection de l'anticorps BMA030 résiduel (résultats non illustrés). Par contre, dans certaines expériences, le BMA030 a été mis en évidence par une technique utilisant un système d'amplification du signal donné par un anticorps biotinylé et révélé par une streptavidine couplée à la peroxydase.

La lectine PHA est un mitogène des lymphocytes T largement utilisé (Bolhuis *et al.*, 1985; Gelfand *et al.*, 1986; Ho et Campana, 1991; Lamers *et al.*, 1992). La culture en présence d'un superantigène comme la SEA génère une activation importante des lymphocytes T via leur TCR (pour revue: Webb et Gascoigne, 1994). Dans notre travail, la stimulation des lymphocytes T par la PHA et la SEA a été confirmée par la détection du CD25 à la surface des lymphocytes T. L'absence de cytotoxicité des lymphocytes T après une stimulation par ces deux mitogènes confirme la nécessité de la présence de l'anticorps anti-CD3. De plus, l'obligation de stimuler les lymphocytes T par un anticorps anti-CD3 complet d'isotype liant préférentiellement les récepteurs Fc $\gamma$ RI (IgG<sub>2a</sub> et IgG<sub>3</sub>) montre l'importance de ce récepteur.

L'anticorps anti-CD3 servant généralement au tri n'intervient pas dans la cytotoxicité redirigée puisque nous avons utilisé un anticorps incomplet ne pouvant lier les récepteurs Fc $\gamma$ . Cependant, signalons que l'activité cytotoxique développée par les lymphocytes T cultivés en présence d'IL-2 est différente suivant que le tri est réalisé par un anticorps anti-CD3 complet ou incomplet. En effet, une activité cytotoxique dirigée contre HL60 et U937 est uniquement observée lorsque les lymphocytes T sont sélectionnés par un anticorps anti-CD3 complet IgG<sub>2a</sub>. Par contre, la cytotoxicité des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 + BMA030 n'est pas influencée par l'anticorps servant au tri. Il semblerait donc que la petite quantité d'anticorps BMA030 résiduel suffise à générer une cytotoxicité redirigée maximale.

En résumé, les résultats obtenus dans ce chapitre indiquent que les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 développent une cytotoxicité redirigée par le BMA030 résiduel contre les lignées HL60 et U937, mais ils suggèrent aussi que la quantité d'anticorps anti-CD3 nécessaire à la lyse redirigée est faible.

<p style="text-align: center;"><b>Chapitre 9:</b> <b>Etude de l'activité cytotoxique redirigée</b></p>
--

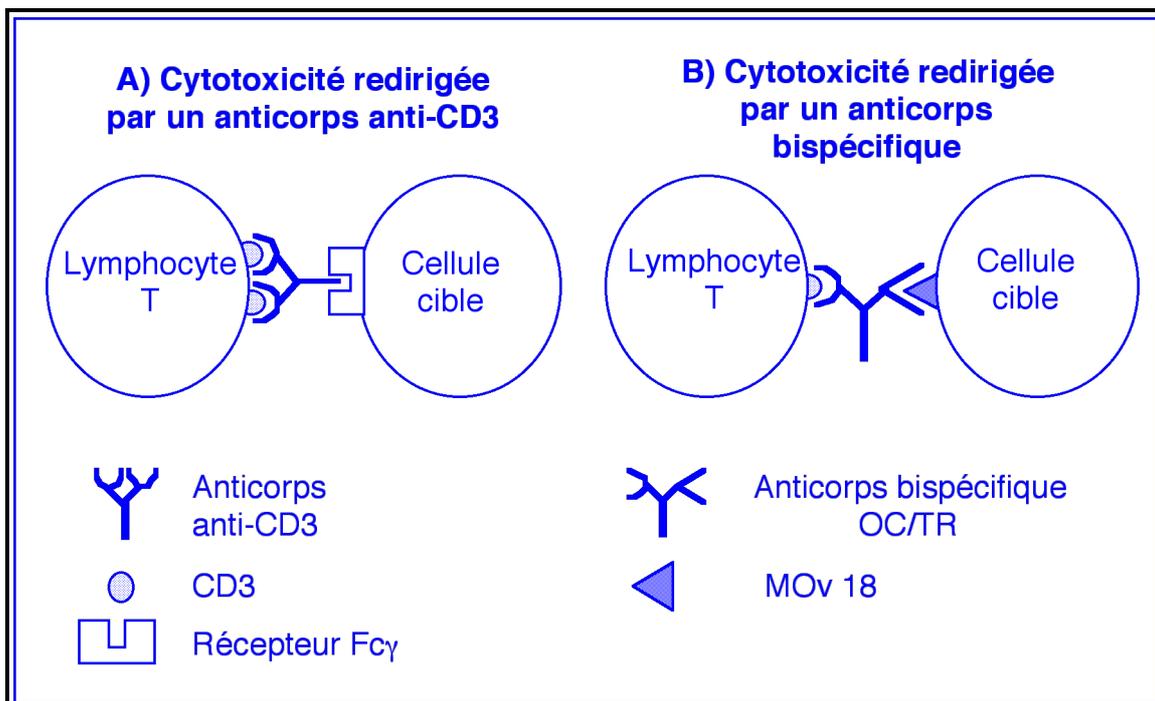
### 9.1. Introduction

La cytotoxicité redirigée par un anticorps est généralement observée dans une population de lymphocytes préalablement activés (Leeuwenberg *et al.*, 1985; Jung *et al.*, 1986; Smyth *et al.*, 1992; Chehimi *et al.*, 1993). Le mode d'activation des lymphocytes pourrait jouer un rôle dans l'intensité de cette activité ou dans la quantité d'anticorps nécessaire pour générer cette activité.

La cytotoxicité redirigée par un anticorps anti-CD3 est limitée aux cellules tumorales possédant à leur surface des récepteurs pour les fragments Fc $\gamma$  (figure 9-1 A). La possibilité d'une utilisation de ce type de cytotoxicité en immunothérapie est restreinte aux cellules tumorales portant un récepteur Fc $\gamma$  avec l'inconvénient que des cellules normales comme les macrophages portent ce type de récepteurs. Bien que, par exemple, Witz et Ran (1992) aient décrit la présence de récepteur Fc sur des cellules tumorales non-lymphoïdes, une telle situation n'est pas fréquente. Afin d'adapter ce mode de cytotoxicité à un nombre plus large de cancers, des anticorps bispécifiques ont été construits.

Les anticorps bispécifiques sont capables de reconnaître à la fois une molécule présente à la surface de la cellule effectrice et une molécule présente à la surface de la cellule tumorale (Perez *et al.*, 1985) (figure 9-1 B). Le choix d'un anticorps dont la spécificité anti-tumorale est dirigée contre une molécule exclusivement exprimée sur les cellules tumorales, permet d'éviter l'inconvénient d'une lyse des cellules normales. Les molécules spécifiques de certains cancers comme le CD30 qui est associé au lymphome de Hodgkin (Pohl *et al.*, 1993) ou encore la molécule 3e6/CAMA1, qui est présente à la surface de cellules de carcinome ovarien, de côlon et de sein (Nelson *et al.*, 1990) sont des cibles idéales d'anticorps bispécifiques. Malheureusement, des molécules spécifiques de la tumeur n'ont pas été mises en évidence dans tous les types de cancer. D'autres catégories de molécules sont alors utilisées pour cibler les cellules tumorales

(Canevari *et al.*, 1992). Des antigènes de différenciation cellulaire comme le CD19 qui est présent à une forte densité sur les cellules de certaines leucémies lymphoblastiques B sont également des candidats pour des protocoles d'immunothérapie utilisant des anticorps bispécifiques (Anderson *et al.*, 1992<sup>a</sup>; Haagen *et al.*, 1994). Des anticorps bispécifiques reconnaissant des récepteurs pour un nutriment comme les récepteurs liant le folate (Ferrini *et al.*, 1989), ou encore des récepteurs de facteur de croissance tels que le récepteur pour l'EGF ("epidermal growth factor") ou le c-erbB2 existent également (Ferrini *et al.*, 1992; Hsieh-Ma *et al.*, 1992; Shalaby *et al.*, 1992).



**Figure 9-1:** Représentation schématique de l'activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 ou par l'anticorps bispécifique OC/TR.

Outre la formation d'un lien entre la cellule effectrice et la cellule tumorale, l'anticorps bispécifique doit fournir un signal à la cellule effectrice. C'est pourquoi les marqueurs reconnus par les anticorps bispécifiques sont des molécules intervenant dans l'activation des lymphocytes T ou des cellules NK (Ferrini *et al.*, 1992).

La plupart des travaux sur l'activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique ont montré que celle-ci nécessite des cellules effectrices activées (Segal et Snider, 1989; Weiner *et al.*, 1994). Pour obtenir des lymphocytes activés, ceux-ci sont cultivés en présence de différents stimulants tels que l'IL-2, la PHA ou un anticorps anti-CD3 (Jung *et al.*, 1986; Mezzanzanica *et al.*, 1991; Lamers *et al.*, 1992; Weiner *et al.*, 1993). Afin d'éviter cette "pré-culture", des essais de stimulations simultanées du CD3 et du CD28 par deux anticorps bispécifiques ou par un anticorps possédant trois

spécificités (anti-CD3 X anti-CD28 X anti-tumeur) sont entrepris (Jung *et al.*, 1991; Renner *et al.*, 1995).

Dans ce travail, nous avons utilisé l'anticorps bispécifique OC/TR qui reconnaît d'une part le complexe CD3 et d'autre part la molécule MOv18. Cette dernière est un récepteur pour le folate (Campbell *et al.*, 1991) dont l'expression est restreinte aux cellules de carcinomes et plus particulièrement aux cellules de carcinomes ovariens (Miotti *et al.*, 1987; Miotti *et al.*, 1992).

## 9.2. Méthodologie

Après quatre jours de culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 et de BMA030, les lymphocytes T sont séparés de la population cellulaire totale. Leur activité cytotoxique contre les lignées HL60 et U937 est testée en présence de différentes concentrations (0,3 - 100 ng/ml) d'anticorps anti-CD3 (BMA030). L'anticorps BMA030 est ajouté aux cellules cibles une demi-heure avant le test de cytotoxicité par relargage de  $^{51}\text{Cr}^*$ . Les cellules cibles sont ensuite ajoutées telles quelles (sans lavage) aux cellules effectrices.

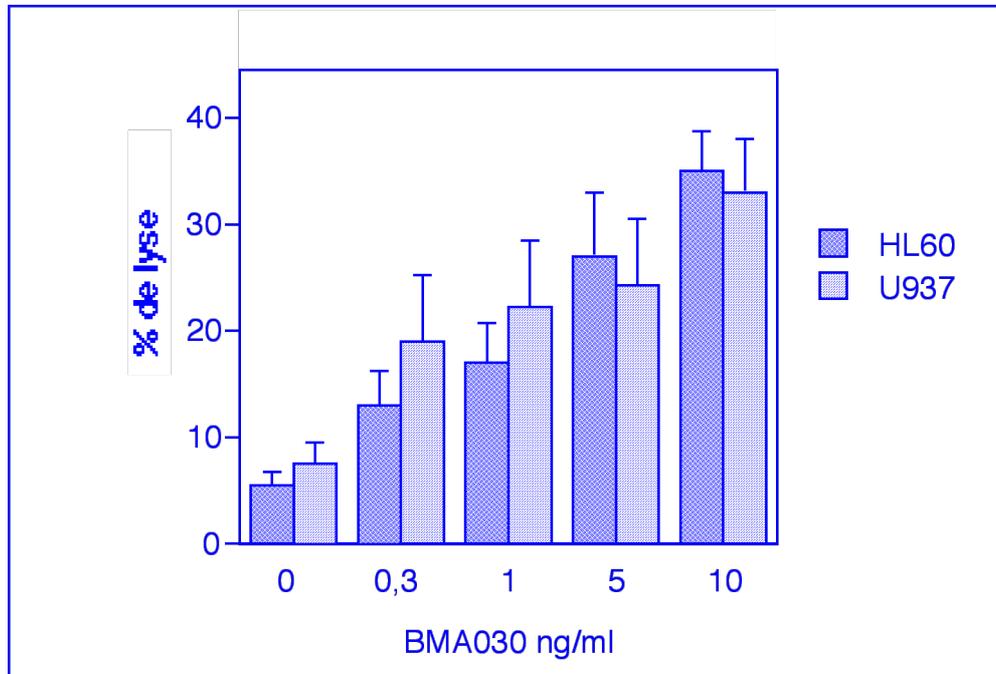
Lors des tests de cytotoxicité réalisés en présence de l'anticorps bispécifique (OC/TR), les cellules NK ( $\text{CD56}^+$  et/ou  $\text{CD16}^+$ ) ont été éliminées de la population cellulaire stimulée par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030. Les cellules effectrices sont incubées une demi-heure en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR F(ab)'2 (1-100 ng/ml) avant le test de cytotoxicité au chrome. Les cellules tumorales OVCAR-3 ( $\text{MOv18}^+$ ) reconnues par l'anticorps bispécifique sont utilisées comme cibles et les cellules tumorales A431 ( $\text{MOv18}^-$ ) ont servi de contrôle négatif.

## 9.3. Résultats

### 9.3.1. Induction d'une cytotoxicité redirigée par un anticorps anti-CD3

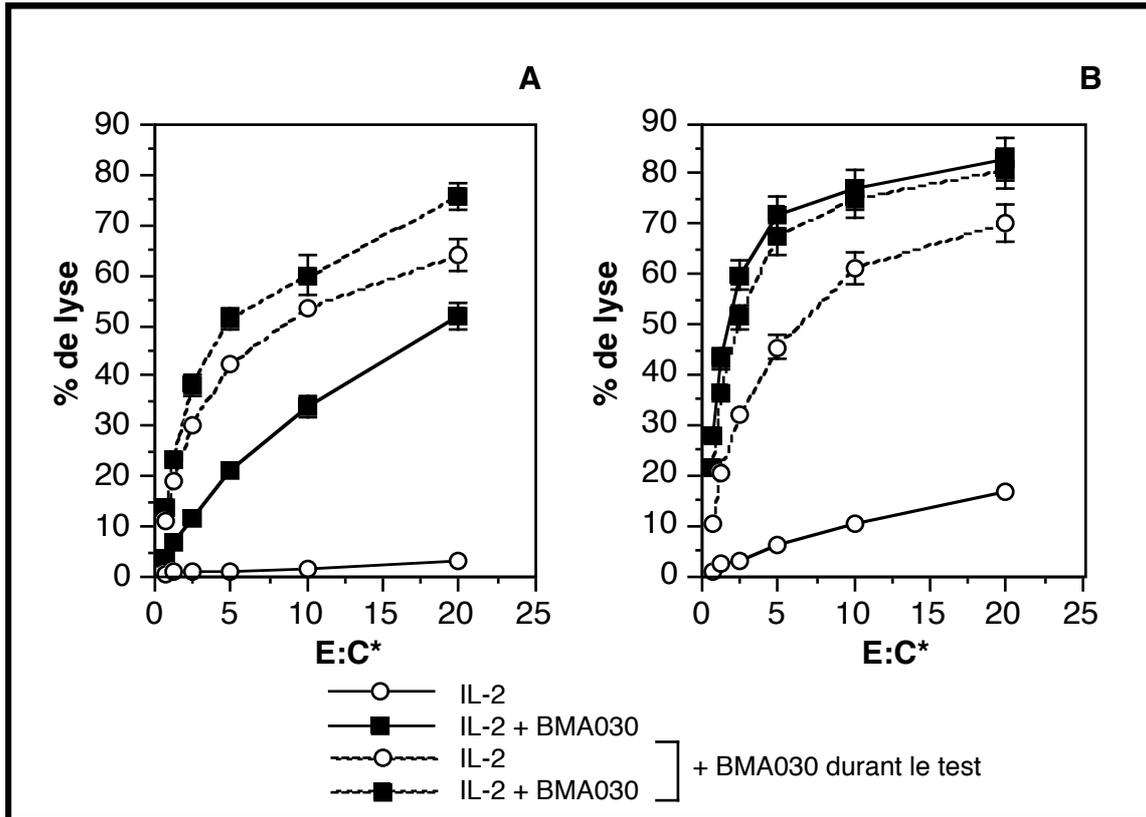
L'apport d'anti-CD3, au moment du test de cytotoxicité, augmente la lyse des cellules tumorales HL60 et U937 par les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 (figure 9-2). La quantité d'anticorps anti-CD3 nécessaire pour induire une activité redirigée est dépendante du donneur mais, d'une manière générale, celle-ci augmente avec la concentration utilisée (figure 9-2). Une concentration de 10 ng/ml de BMA030 induit chez tous les donneurs une activité cytotoxique redirigée contre U937 ou HL60. Par

contre, la lyse des cellules tumorales Daudi n'est pas affectée par l'addition de BMA030 (10 ng/ml) dans le test de cytotoxicité (résultats non illustrés).



**Figure 9-2:** Activité cytotoxique en présence de différentes concentrations de BMA030 des lymphocytes T stimulés par l'IL-2. L'anticorps anti-CD3 (BMA030) est ajouté aux cellules cibles (HL60 et U937) une demi-heure avant le test de relargage de  $^{51}\text{Cr}^*$ . Les résultats (moyenne  $\pm$  écart type) de cinq expériences sont représentés. Le rapport cellules effectrices:cellules cibles est égal à 20.

Deux situations sont observées lorsqu'un anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) est ajouté dans le test de cytotoxicité des cellules T stimulées par l'IL-2 + BMA030. Dans certains cas, l'activité cytotoxique dirigée contre les cellules tumorales U937 augmente (figure 9-3 A). Le pourcentage de lyse obtenu est alors supérieur à celui observé après stimulation par l'IL-2 seule. Pour d'autres donneurs, l'apport d'anticorps anti-CD3 ne modifie pas l'activité cytotoxique dirigée contre la lignée U937 (figure 9-3 B). Dans ce cas, la lyse maximale des cellules U937 semble être atteinte. Des résultats similaires sont obtenus avec la lignée HL60 (résultats non illustrés).



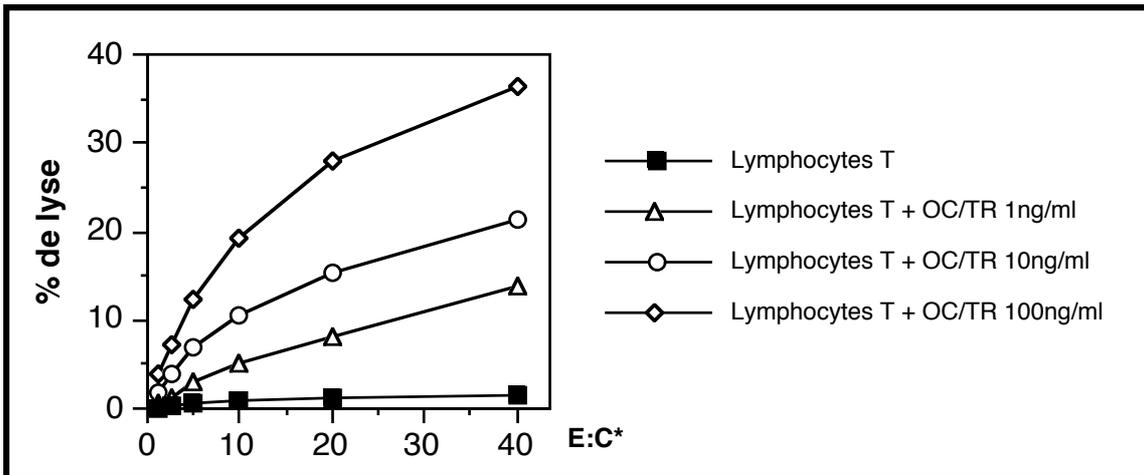
**Figure 9-3:** Activité cytotoxique en présence de BMA030 des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 ou par l'IL-2 + BMA030 .

Les lymphocytes T triés provenant de cultures de PBL stimulés par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 sont mis en présence de BMA030 (10 ng/ml) durant le test de cytotoxicité par relargage de  $^{51}\text{Cr}^*$ . Les cibles sont les cellules de la lignée tumorale U937. Les pourcentages de lyse (moyenne  $\pm$  écart type) d'expérience réalisée en triplicata sont représentés. A et B sont deux donneurs différents.

### 9.3.2. Induction d'une activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique

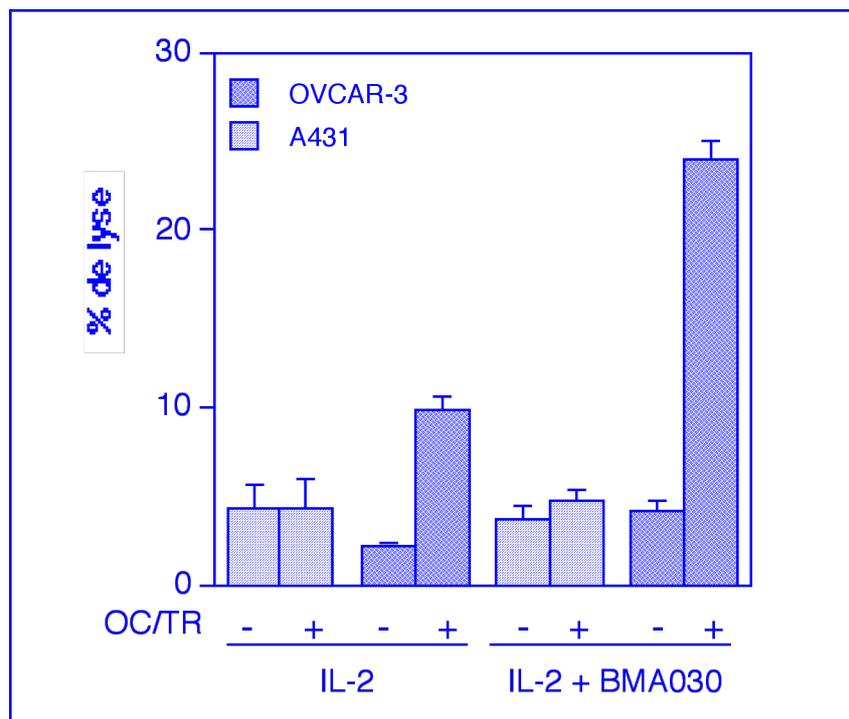
La lyse des cellules OVCAR-3 (MOv18<sup>+</sup>) par des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 + BMA030 a été mesurée en présence de différentes concentrations (1-100 ng/ml) de l'anticorps bispécifique OC/TR (anti-CD3 X anti-MOv18) (figure 9-4). L'activité cytotoxique augmente avec la concentration de l'anticorps OC/TR, mais une activité cytotoxique redirigée par l'anticorps bispécifique est déjà observée à une concentration de 1 ng/ml (figure 9-4).

Afin d'éviter un encombrement stérique du complexe CD3 dû à la présence de l'anticorps anti-CD3 servant au tri, les lymphocytes T ont été triés de manière négative par élimination des cellules NK CD16<sup>+</sup> ou CD56<sup>+</sup>. L'activité cytotoxique en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR (100 ng/ml) des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 est illustrée par la figure 9-5.



**Figure 9-4:** Activité cytotoxique en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 + BMA030.

Les lymphocytes T triés sont mis en présence de différentes concentrations de l'anticorps OC/TR durant le test de cytotoxicité par relargage de  $^{51}\text{Cr}^*$ . Les pourcentages de lyse (moyenne  $\pm$  écart type) de la lignée OVCAR-3 obtenus lors d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés.



**Figure 9-5:** Activité cytotoxique induite par un anticorps bispécifique (OC/TR) après stimulation des lymphocytes par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030.

Les cellules NK  $\text{CD56}^+$  et  $\text{CD16}^+$  ont été éliminées de la population cellulaire totale et l'activité cytotoxique des cellules restantes, en présence d'anticorps bispécifiques (100 ng/ml), est mesurée contre les lignées OVCAR-3 et A431 à un rapport cellules effectrices:cellules cibles égal à 20. Les valeurs (moyenne  $\pm$  écart type) représentées proviennent d'une expérience réalisée en triplicata.

La lyse redirigée par l'anticorps bispécifique OC/TR est nettement plus élevée lorsque les cellules sont préalablement activées par l'IL-2 + BMA030 par rapport à l'activation par l'IL-2 seule (figure 9-5). En effet, le pourcentage de lyse des cellules OVCAR-3 (MOv18<sup>+</sup>) en présence de 100 ng/ml d'anticorps OC/TR est de 30% après une stimulation en présence de BMA030 contre 17% après une stimulation par l'IL-2 seule (rapport cellules effectrices:cellules cibles = 20). Par contre, la lyse des cellules A431 (MOv18<sup>-</sup>) est peu influencée par la présence de l'anticorps bispécifique.

La stimulation par la PHA (0,1%) et l'IL-2 aboutit à une activité cytotoxique en présence de l'anticorps OC/TR comparable à celle observée après stimulation par l'IL-2 seule (résultats non illustrés).

## 9.4. Discussion

L'activité cytotoxique redirigée par un anticorps, et notamment par un anticorps bispécifique, semble nécessiter une activation des lymphocytes T (Weiner *et al.*, 1994). Nous avons comparé les deux modes de stimulation (IL-2 et IL-2 + BMA030) dans l'induction de cette activité cytotoxique.

En présence d'un anticorps anti-CD3, les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 seule génèrent une activité cytotoxique redirigée contre les cellules HL60 et U937. La concentration d'anticorps nécessaire varie en fonction du donneur. Cependant, chez tous les donneurs, une augmentation de l'activité cytotoxique est observée en présence de 10 ng/ml d'anticorps anti-CD3. Cette concentration est nettement plus faible que celle généralement utilisée (1 à 5  $\mu$ g/ml) pour l'induction d'une activité cytotoxique redirigée (Leeuwenberg *et al.*, 1985; Quinones *et al.*, 1989; Nishimura *et al.*, 1992; Chehimi *et al.*, 1993). La forte concentration utilisée par ces auteurs est certainement en relation avec les lignées tumorales généralement employées, à savoir K562 et Daudi. Les cellules K562 et Daudi expriment le récepteur Fc $\gamma$  RII qui possède une affinité pour les IgG<sub>2a</sub> inférieure à celle du récepteur Fc $\gamma$  RI exprimé par les cellules HL60 et U937 (Anderson, 1989 et résultats personnels repris au chapitre 8).

Dans plusieurs expériences, la petite quantité de BMA030 résiduel présente à la surface des lymphocytes T, cultivés en présence d'IL-2 et de BMA030, semble suffisante pour obtenir une lyse redirigée maximale. En effet, dans ces expériences l'apport d'un anticorps anti-CD3 au moment du test de cytotoxicité n'influence pas l'activité cytotoxique contre les lignées HL60 et U937. Lorsqu'une augmentation de la lyse est observée, celle-ci est supérieure à celle obtenue avec les lymphocytes T cultivés

en présence d'IL-2. Contrairement aux expériences réalisées à partir d'animaux, les PBL humains proviennent de population hétérogène d'un point de vue génétique et des antécédents immunitaires. La différence observée entre les donneurs est peut-être en relation avec des stimulations préalables du système immunitaire et notamment avec la proportion de cellules mémoires. Geisberg et Dupont (1992) ont montré que la cytotoxicité redirigée par un anticorps anti-CD3 est plus prononcée dans la population de lymphocytes CD8<sup>+</sup> CD45R0<sup>+</sup> en comparaison avec la cytotoxicité développée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>. Malheureusement, nous n'avons pas réalisé suffisamment d'expériences pour établir une corrélation entre le pourcentage de cellules mémoires (CD45R0<sup>+</sup>) et l'activité cytotoxique.

Les valeurs de cytotoxicité en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR sont comparables à celles obtenues par d'autres auteurs (Garrido *et al.*, 1990). En présence de l'anticorps bispécifique, l'activité cytotoxique développée par les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 + BMA030 est plus importante que celle obtenue après stimulation par l'IL-2. Il est possible que la différence entre les deux modes de stimulation soit liée à une différence dans la proportion de cellules effectrices puisque seules les cellules NK, et non les lymphocytes B, sont éliminées de la population cellulaire totale. Cependant, nous avons vérifié la proportion de lymphocytes B dans les populations de cellules triées et celle-ci était similaire pour les deux conditions de culture (IL-2 et IL-2 + BMA030) (résultats non illustrés). Une autre explication pourrait être une activation plus prononcée des lymphocytes T après une stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 (Anderson *et al.*, 1992). Le mécanisme de stimulation doit également être important puisque la stimulation des lymphocytes T par la PHA et l'IL-2 donne des résultats comparables à ceux de la condition de culture en présence d'IL-2 seule. Signalons que dans cette condition de culture (IL-2 + PHA) les signes d'activation (expression du CD25 et prolifération cellulaire) sont similaires à ceux observés après une stimulation par un anticorps anti-CD3 et l'IL-2. Lamers et ses collaborateurs (1992) ont également comparé la stimulation par la PHA et par un anticorps anti-CD3 (OKT3) dans un but de protocole d'immunothérapie utilisant des anticorps bispécifiques. Dans cette étude, l'induction de l'activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifiques est plus rapide lorsque les cellules sont stimulées par un anticorps anti-CD3.

En résumé, la stimulation des lymphocytes T par l'IL-2 + BMA030 génère une activité cytotoxique redirigée (par un anticorps anti-CD3 ou par un anticorps bispécifique) plus importante que lors de la stimulation par l'IL-2 seule.

## Discussion de la deuxième partie

Dans cette deuxième partie de notre travail, nous avons étudié les activités cytotoxiques des lymphocytes T stimulés par de l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. Malgré la présence d'une concentration en IL-2 suffisante pour générer des cellules LAK (Geller *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1992), la culture à court terme (quatre jours) en présence de BMA030 ne permet pas la différenciation de lymphocytes T possédant une activité cytotoxique de type LAK, comme le montre l'absence de lyse des lignées tumorales K562 et Daudi. En fait l'activité cytotoxique des lymphocytes T, observée dans un test de quatre heures par relargage de chrome, est dépendante de la présence sur les cellules cibles de récepteurs pour les fragments Fc $\gamma$  de type I. Il s'agit donc d'une cytotoxicité redirigée par l'anticorps anti-CD3. Notons que la quantité de BMA030 nécessaire pour induire cette activité est faible par rapport aux autres modèles de cytotoxicité redirigée (Leeuwenberg *et al.*, 1985; Thiele *et al.*, 1988; Nishimura *et al.*, 1992; Chehimi *et al.*, 1993). La stimulation des lymphocytes par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 génère également une activité cytotoxique en présence d'anticorps bispécifique plus importante que la stimulation par l'IL-2 seule.

La mise au point d'un système de tri par champ magnétique (MACS) a permis la sélection de lymphocytes T fonctionnels (Jacobs *et al.*, 1992; 1993). En effet, nous avons démontré que la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique ne sont pas altérées par le tri. Afin d'exclure une participation de l'anticorps anti-CD3 servant au tri dans l'activité cytotoxique, nous avons utilisé un anticorps F(ab)'2. Signalons que l'activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 n'aurait pas pu être mise en évidence par un autre système de tri par champ magnétique car la taille des billes magnétiques (0,5 à 4,5  $\mu$ m de diamètre contre 100 à 150 nm pour le système MACS (Kandzia *et al.*, 1985; Lea *et al.*, 1986; Miltenyi *et al.*, 1990) induirait certainement un encombrement stérique.

L'activité cytotoxique des lymphocytes T cultivés pendant quatre jours en présence d'anticorps anti-CD3 n'est pas restreint par le CMH, mais est dépendante de la présence de Fc $\gamma$ R I sur les cellules tumorales HL60 et U937 (Anderson et Looney, 1986). Une activité cytotoxique non spécifique de type LAK n'a pas été mise en

évidence. Effectivement, nous n'avons pas observé de lyse par les lymphocytes T des cellules tumorales sensibles à cette activité (K562 et Daudi). Ceci peut être un atout pour l'utilisation des lymphocytes T activés dans des protocoles d'immunothérapie utilisant des anticorps bispécifiques. Cela permettrait d'éviter la lyse faible, mais significative, de cellules normales par les cellules LAK (Sondel *et al.*, 1986).

Plusieurs points sont à relever dans l'induction de la cytotoxicité redirigée par les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. Tout d'abord, celle-ci est obtenue en présence de quantité de BMA030 résiduel nettement plus faible que les concentrations généralement utilisées pour ce mode de cytotoxicité. La détection du BMA030 par un anticorps couplé au FITC indique que cette quantité est inférieure à 0,6 ng/ml dans la plupart des expériences. Il est même possible que le nombre de molécules de BMA030 soit inférieur à 400 puisque la technique de marquage développée par Zola et ses collaborateurs (1990) ne donne pas de signal plus intense. Une corrélation entre la détection de BMA030 et l'activité cytotoxique n'a pas été établie. Cette absence de corrélation entre la cytotoxicité et le nombre de sites antigéniques par cellule a déjà été décrite dans des modèles de cytotoxicité redirigée par un anticorps bispécifique (Canevari *et al.*, 1992). Toutefois, un phénomène de saturation est observé chez certains donneurs. Deux observations illustrent ce phénomène. Premièrement, l'addition de BMA030, au moment du test de cytotoxicité, n'induit pas d'augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T provenant de ces donneurs et cultivés en présence d'IL-2 et d'anticorps anti-CD3. Deuxièmement, l'utilisation d'un anticorps anti-CD3 IgG<sub>2a</sub> complet ou d'un anticorps F(ab)<sub>2</sub> pour le tri des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et BMA030 donne des résultats similaires alors qu'une activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 seule n'est détectée

2a

qu'après un tri par un anticorps anti-CD3 IgG complet. Il semble donc que l'interaction entre la cellule effectrice et la cellule tumorale créée par le BMA030 résiduel présent à la surface des lymphocytes T suffise, dans certains cas dépendant du donneur, à générer une cytotoxicité redirigée maximale.

La différence constatée entre les donneurs ou entre les deux modes de stimulations (IL-2 versus IL-2 + BMA030) pour la cytotoxicité redirigée par un anticorps bispécifique peut dépendre du degré de différenciation ou d'activation des lymphocytes T. Une plus grande proportion de lymphocytes T exprimant l'isoforme CD45R0 caractéristique des cellules mémoires est observée après une stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. Comme nous l'avons déjà signalé, la majorité des cellules T cytotoxiques possèdent un phénotype de cellules T mémoires (Merkenschlager et Beverley, 1989; Marvel *et al.*, 1991; Geisberg et Dupont, 1991) et

---

plus particulièrement, Renner et ses collaborateurs (1995) ont constaté que les cellules effectrices de l'activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique possèdent également un phénotype mémoire. Les molécules d'adhésion jouent aussi un rôle important dans les phénomènes de cytotoxicité. Par exemple, l'interaction entre LFA-1 et ICAM intervient non seulement dans le renforcement du contact entre les cellules cytotoxiques et les cellules cibles, mais aussi dans la transmission d'un signal de co-stimulation (Braakman *et al.*, 1990).

---

De plus, la liaison LFA-1/ICAM participe à la cytotoxicité redirigée par un anticorps bispécifique anti-récepteur EGF X anti-CD3 (Ferrini *et al.*, 1994). En effet, la présence d'un anticorps anti-LFA-1 inhibe l'activité cytotoxique développée en présence de l'anticorps bispécifique. Rappelons que les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 expriment de manière plus intense la molécule LFA-1 (CD11a) et la molécule CD2 que les lymphocytes T stimulés par de l'IL-2 seule. Les ligands de ces molécules, le CD54 ou ICAM et le CD58 ou LFA-3, sont détectés à la surface de nombreux types de tumeurs et notamment de carcinomes ovariens (Fady *et al.*, 1993; Gardner *et al.*, 1995). L'activation des cellules effectrices est également un paramètre influençant la lyse des cellules tumorales induite par les anticorps bispécifiques (Fanger *et al.*, 1991). Une proportion plus large de lymphocytes T possédant un phénotype de cellules activées et/ou exprimant la molécule co-stimulatrice CD28 est observée dans les cultures en présence d'IL-2 et d'anticorps anti-CD3. Toutes ces observations pourraient être en relation avec une diminution du seuil des interactions nécessaires pour induire la lyse d'une cellule tumorale.

Les résultats exposés dans cette partie montrent que le rôle de l'anticorps anti-CD3 peut être double. Il peut former un pont entre la cellule tumorale et la cellule effectrice, mais aussi générer une meilleure différenciation des lymphocytes T en lymphocytes cytotoxiques.

En résumé, les lymphocytes T purifiés par le système MACS et stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 possèdent un potentiel de cytotoxicité redirigée par un anticorps (anti-CD3 ou anticorps bispécifique) supérieur aux lymphocytes T stimulés uniquement en présence d'IL-2. L'isotype de l'anticorps anti-CD3 par son affinité pour les récepteurs Fc influence l'induction de l'activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3. La question reste ouverte en ce qui concerne l'influence des autres caractéristiques des anticorps anti-CD3.

Troisième partie .....	125
Etude comparative de plusieurs anticorps anti-CD3 .....	125
Chapitre 10: .....	127
Liaison des différents anticorps anti-CD3 au complexe CD3 .....	127
10.1. Introduction .....	127
10.2. Méthodologie .....	129
10.3. Résultats .....	129
10.4. Discussion .....	131
Chapitre 11: .....	133
Induction de flux calciques et de phosphorylations de résidus tyrosines par des anticorps anti-CD3 .....	133
11.1. Introduction .....	133
11.2. Méthodologie .....	135
11.3. Résultats .....	136
11.3.1. Flux calciques .....	136
11.3.2. Phosphorylations des résidus tyrosines .....	139
11.4. Discussion .....	141
Chapitre 12: .....	144
Influence des anticorps anti-CD3 sur l'expression du complexe CD3 .....	144
12.1. Introduction .....	144
12.2. Méthodologie .....	145
12.3. Résultats .....	145
12.3.1. Détection du complexe CD3 .....	145
12.3.2. Détection des anticorps anti-CD3 à la surface des cellules .....	149
12.4. Discussion .....	151

---

**Troisième partie**

**Etude comparative de plusieurs anticorps**

**anti-CD3**

### **Objectif**

La présence d'anticorps anti-CD3 dans les cultures de lymphocytes peut générer des effets opposés suivant les conditions expérimentales. En effet, une activation des lymphocytes T a été rapportée (Van Wauwe *et al.*, 1980; Schrezenmeier *et al.*, 1985; Moutschen *et al.*, 1990), mais aussi une inhibition fonctionnelle de ceux-ci (Davis *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1994). Dans ce travail, nous sommes intéressée à l'effet activateur des anticorps anti-CD3 et cette partie est consacrée à la comparaison des différents anticorps anti-CD3 murins à notre disposition (tableau III-1). Cette comparaison a pour but de déterminer si la stimulation lymphocytaire décrite dans les deux premières parties pouvait être reproduite quel que soit l'anticorps utilisé. En parallèle, nous avons examiné la stimulation par un anticorps bispécifique (OC/TR) et par un anticorps anti-CD3 chimérique ( $\alpha$ CD3 chim.), constitué d'un site de reconnaissance d'origine murine associé à la fraction constante d'un anticorps d'origine humaine.

Différentes étapes de l'activation cellulaire ont été étudiées. Nous avons choisi de les exposer de manière séquentielle depuis la liaison de l'anticorps sur le complexe CD3 jusqu'à l'activation cellulaire, observée par la prolifération cellulaire ou l'activité anti-tumorale, en passant par l'analyse de médiateurs intracellulaires comme, par exemple, les ions calcium.

Les résultats exposés dans cette partie ont été réalisés en étroite collaboration avec l'équipe du Docteur Canevari à l'Institut National des Tumeurs de Milan.

Anticorps	Caractéristique	Isotype	Référence
BMA030	anti-CD3	IgG <sub>2a</sub>	Krause <i>et al.</i> , 1990
TR66	anti-CD3	IgG <sub>1</sub>	Lanzavecchia et Scheidegger 1987
OKT3	anti-CD3	IgG <sub>2a</sub>	Kung <i>et al.</i> , 1979
OC/TR	anticorps bispécifique (CD3/MOv18)	IgG <sub>1</sub>	Mezzanzanica <i>et al.</i> , 1988
αCD3	anti-CD3 de l'anticorps bispécifique OC/TR	IgG <sub>1</sub>	Pupa <i>et al.</i> , 1991
αCD3 chimérique	anti-CD3 de l'anticorps bispécifique OC/TR	Fraction constante d'origine humaine IgG <sub>1</sub>	Oi et Morrisson 1986
BMA033	anti-CD3	IgG <sub>3</sub>	Schlitt <i>et al.</i> , 1989
Leu-4	anti-CD3	IgG <sub>1</sub>	Kan <i>et al.</i> , 1983

**Tableau III-1: Liste des anticorps monoclonaux utilisés.**

---

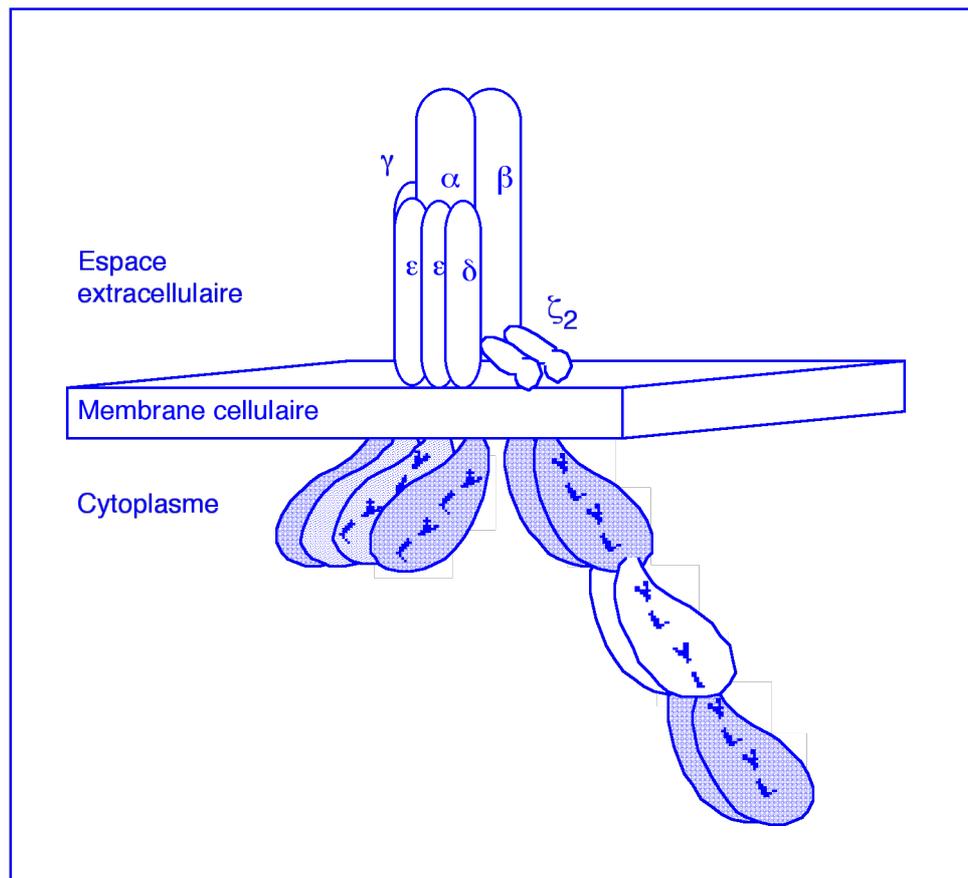
**Chapitre 10:**  
**Liaison des différents anticorps anti-CD3 au complexe CD3**

### 10.1. Introduction

Grâce au développement des techniques de production d'anticorps monoclonaux (Köhler et Milstein, 1975), il existe aujourd'hui de nombreux anticorps dirigés contre le complexe CD3. De plus, il est maintenant possible de créer des anticorps possédant une double spécificité (anticorps bispécifiques, par exemple: anti-CD3 X anti-tumeur). La production d'anticorps bispécifiques ouvre une nouvelle voie à l'immunothérapie. En effet, ces anticorps peuvent conférer aux cellules effectrices un système de reconnaissance en créant un lien entre celles-ci et les cellules tumorales.

Les propriétés fonctionnelles des anticorps sont conditionnées par leur isotype et leur idiotype. L'affinité et l'avidité de l'anticorps caractérisent son interaction étroite avec l'antigène. L'affinité mesure la force de réaction entre un déterminant antigénique monovalent (épitope) et un site de combinaison de l'anticorps monovalent (paratope). L'affinité dépend de la stéréo-complémentarité, ainsi que de la surface de contact entre l'épitope et le paratope. L'avidité est la résultante de l'affinité entre les épitopes et les paratopes et des valences de l'anticorps et de l'antigène.

Bien qu'il existe maintenant des anticorps dirigés contre les chaînes  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$  (Alarcon *et al.*, 1991; Sancho *et al.*, 1992), la majorité des anticorps anti-CD3 décrits reconnaissent la chaîne  $\epsilon$  du complexe CD3 (figure 10-1). C'est le cas des anticorps BMA030, TR66, OKT3 et Leu-4 (Tunnacliffe *et al.*, 1989; Salmeron *et al.*, 1991). Cependant, la liaison des anticorps OKT3 et Leu-4 sur la chaîne  $\epsilon$  nécessite la présence des chaînes  $\delta$  et  $\gamma$  (Salmeron *et al.*, 1991). L'épitope reconnu par les autres anticorps n'est pas décrit dans la littérature.



**Figure 10-1:** Représentation schématique des différentes chaînes composant le complexe CD3/TCR.

Les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  sont associées de façon non covalente au récepteur de l'antigène composé de l'hétérodimère  $\alpha\beta$ . Les chaînes  $\zeta$  sont présentes sous forme d'un homodimère  $\zeta\zeta$  ou d'un hétérodimère  $\zeta\eta$  (non représenté) et ces chaînes sont également liées au TCR ou aux autres chaînes du CD3. Les résidus tyrosine (Y), leucine (L) et isoleucine (I) des motifs ITAM sont représentés. D'après Wegener *et al.*, 1992.

La chaîne  $\epsilon$  joue un double rôle au sein du complexe CD3/TCR: elle initie l'assemblage du récepteur dans le réticulum endoplasmique et elle intervient dans la transmission du signal généré suite à la reconnaissance de l'antigène (Weiss et Imboden 1987; Klausner et Samelson, 1991). La chaîne  $\epsilon$ , tout comme les chaînes  $\delta$  et  $\gamma$ , possède dans son domaine cytoplasmique un motif contenant deux résidus tyrosines espacés de dix acides aminés et pouvant être phosphorylés. Ce motif est appelé motif de Reth (Reth, 1989), ou ARAM pour "antigen recognition activation motif" ou encore ITAM pour "Immunoreceptor tyrosine based activation motif" (Samelson et Klausner, 1992). En fait, le motif de la chaîne  $\epsilon$  n'est pas exactement identique au motif décrit par Reth. En effet, la première leucine est remplacée par une isoleucine. La phosphorylation de la chaîne  $\epsilon$  du complexe CD3 par une tyrosine kinase pourrait servir à coupler le complexe

CD3/TCR à d'autres molécules effectrices participant à l'activation des lymphocytes T (Sancho *et al.*, 1993).

La chaîne  $\zeta$  qui est représentée sous la forme d'un homodimère ou moins fréquemment (5-10%) d'un hétérodimère  $\zeta\eta$  (Bonifacino *et al.*, 1988; 1989), possède, quant à elle, trois motifs ITAM (figure 10-1). Aucun motif ITAM n'est mis en évidence dans la chaîne  $\eta$ .

Dans ce chapitre, les caractéristiques de liaison au complexe CD3 de trois anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66 et OKT3) et de l'anticorps bispécifique OC/TR ont été étudiées. Malheureusement, les quantités importantes d'anticorps nécessaires à cette étude ne nous ont pas permis de caractériser tous les anticorps anti-CD3.

## 10.2. Méthodologie

L'affinité a été étudiée pour les quatre anticorps BMA030, TR66, OKT3 et OC/TR. Ces anticorps ont été couplés à de l'iode<sup>125</sup> radioactif. Les PBL ont été incubés en présence de dilutions sériées d'anticorps anti-CD3 radioactifs et la radioactivité a été mesurée. Afin de déterminer la constante d'affinité et le nombre de sites reconnus par les anticorps, une analyse Scatchard est réalisée.

Les tests de compétition de la liaison au complexe CD3 sont réalisés en incubant une quantité fixe d'anticorps radioactifs avec différentes concentrations des autres anticorps compétiteurs non-radioactifs. La dose de compétiteur requise pour inhiber 50% de la liaison de l'anticorps anti-CD3 radioactif ( $IC_{50}$ ) est extrapolée d'une courbe dose réponse. Les résultats sont ensuite transformés en données relatives où l' $IC_{50}$  obtenue en incubant un anticorps radioactif avec le même anticorps froid est égale à 1.

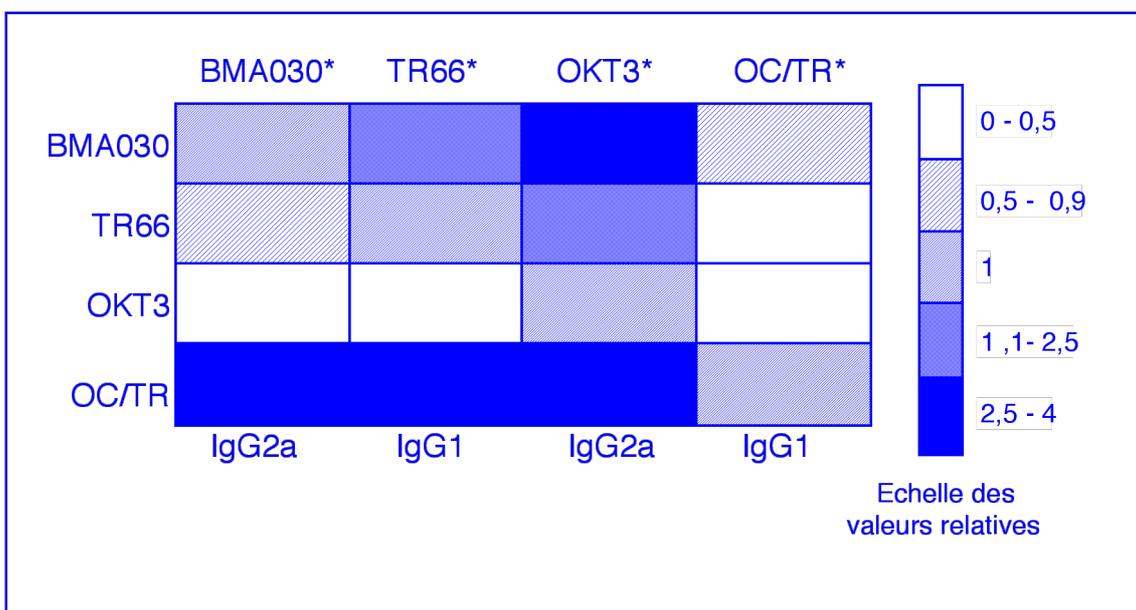
Les cellules utilisées pour ces différentes expériences sont des PBL stimulés pendant deux jours par la PHA et l'IL-2.

## 10.3. Résultats

Les résultats du test d'inhibition de la liaison des anticorps anti-CD3 couplés à de l'iode radioactif par des anticorps anti-CD3 froids sont donnés en valeurs relatives et sont résumés dans la figure 10-2. Cette figure reprend également les isotopes des anticorps.

Une inhibition de la radioactivité est observée quel que soit l'anticorps froid utilisé. Ces résultats illustrent une compétition entre les anticorps. Cependant, la force

de liaison de chaque anticorps au complexe CD3 est différente (figure 10-2). Par exemple, la quantité d'anticorps BMA030 froid requise pour inhiber de 50% la liaison de l'anticorps TR66 radioactif au complexe CD3 est environ deux fois supérieure à la quantité d'anticorps TR66 froid nécessaire (valeur relative de 1,1 à 2,5). La force de liaison la plus élevée est observée pour l'anticorps OKT3 (valeurs relatives inférieures à 0,5 contre tous les anticorps radioactifs) et la plus faible pour l'anticorps bispécifique OC/TR (valeurs relatives supérieures à 2,5 contre tous les anticorps radioactifs).



**Figure 10-2:** Détermination des caractéristiques de liaison au complexe CD3 de trois anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66 et OKT3) et d'un anticorps bispécifique (OC/TR, anti-CD3 X anti-MOv18).

Les PBL sont incubés en présence d'une quantité déterminée d'anticorps marqués à l'iode radioactif (\*). Ils sont ensuite incubés en présence de doses croissantes d'anticorps homologues ou hétérologues froids. Pour chaque anticorps radioactif, la concentration de l'anticorps homologue capable d'induire une inhibition de marquage de 50% (IC<sub>50</sub>) est considérée comme égale à 1 et les autres IC<sub>50</sub> sont calculées en les rapportant à cette valeur.

Le tableau 10-1 reprend les valeurs de constante d'affinité (K<sub>aff</sub>) et le nombre de sites reconnus par cellule. Les valeurs d'inhibition sont corrélées avec les valeurs de constante d'affinité, excepté dans le cas des anticorps BMA030 et OC/TR. En effet, la force de liaison de l'anticorps BMA030 semble plus importante, alors que sa constante d'affinité est plus faible que celle de l'anticorps bispécifique OC/TR. Le nombre de sites reconnus par cellule pour les quatre anticorps se situe entre  $1,1 \cdot 10^5$  et  $2,1 \cdot 10^5$ .

	BMA030	TR66	OKT3	OC/TR
Constante d'affinité (M <sup>-1</sup> )	8.10 <sup>7</sup>	4.10 <sup>8</sup>	7.10 <sup>8</sup>	1.10 <sup>8</sup>
Nombre de sites reconnus par cellule	2,1.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>	1,3.10 <sup>5</sup>	1,1.10 <sup>5</sup>

**Tableau 10-1: Constante d'affinité ( $K_{aff}$ ) de trois anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66 et OKT3) et d'un anticorps bispécifique (OC/TR) ainsi que le nombre de sites reconnus par cellule .**

## 10.4. Discussion

La force de liaison au complexe CD3 de trois anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3) et d'un anticorps bispécifique (OC/TR) a été déterminée. Les résultats rapportés dans ce chapitre indiquent que l'épitope reconnu par ces anticorps est identique ou fort proche. De fait, chaque anticorps inhibe la liaison des trois autres anticorps au complexe CD3, mais les quantités d'anticorps nécessaires à l'inhibition varient suivant l'anticorps testé. L'isotype de l'anticorps ne semble pas influencer son avidité. D'autres travaux ont démontré l'absence de relation entre l'isotype et l'avidité de l'anticorps (Bolt *et al.*, 1993).

Des valeurs de constante d'affinité différentes ont été rapportées pour l'anticorps BMA030 ( $2.10^8 \text{ M}^{-1}$ ) (Krause *et al.*, 1990) et pour l'anticorps OKT3 ( $1,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) (Jolliffe, 1993). Signalons qu'une technique différente a été utilisée par ces auteurs (anticorps couplé au fluorochrome FITC, plutôt qu'à l'iode radioactif); cependant, l'écart entre les deux constantes d'affinité est similaire quelle que soit la technique employée. Notons également qu'il aurait été préférable de répéter ce type d'expérience, mais les quantités disponibles en anticorps ne nous le permettaient pas. Toutefois, la constante d'affinité de l'anticorps TR66 a été déterminée dans deux expériences indépendantes et les résultats obtenus sont similaires (résultats non illustrés).

L'anticorps bispécifique OC/TR possède l'avidité la plus faible pour le complexe CD3. Cette observation pourrait s'expliquer par le mode de production de cet anticorps. En effet, l'anticorps bispécifique OC/TR provient d'un trioma résultant de la fusion de cellules de l'hybridome MOv18 et de cellules de rate provenant d'une souris immunisée avec un clone de lymphocytes T humains (Mezzanzanica *et al.*, 1988). Cet anticorps

bispécifique contient une chaîne spécifique pour l'épitope MOv18 et une chaîne spécifique pour le complexe CD3. Il reconnaît donc le complexe CD3 de manière monovalente, contrairement aux autres anticorps qui possèdent un site de reconnaissance bivalent.

L'avidité d'un anticorps bispécifique pour le complexe CD3 pourrait jouer un rôle dans l'induction de la lyse de cellules tumorales. En effet, l'utilisation d'un anticorps bispécifique possédant une bivalence pour le complexe CD3 induit une activité cytotoxique redirigée à des concentrations plus faibles que l'anticorps monovalent (Tutt *et al.*, 1991).

En résumé, une avidité croissante pour le complexe CD3 est observée pour les anticorps OC/TR, BMA030, TR66 et OKT3.

---

**Chapitre 11:**

**Induction de flux calciques et de phosphorylations de résidus tyrosines par des anticorps anti-CD3**

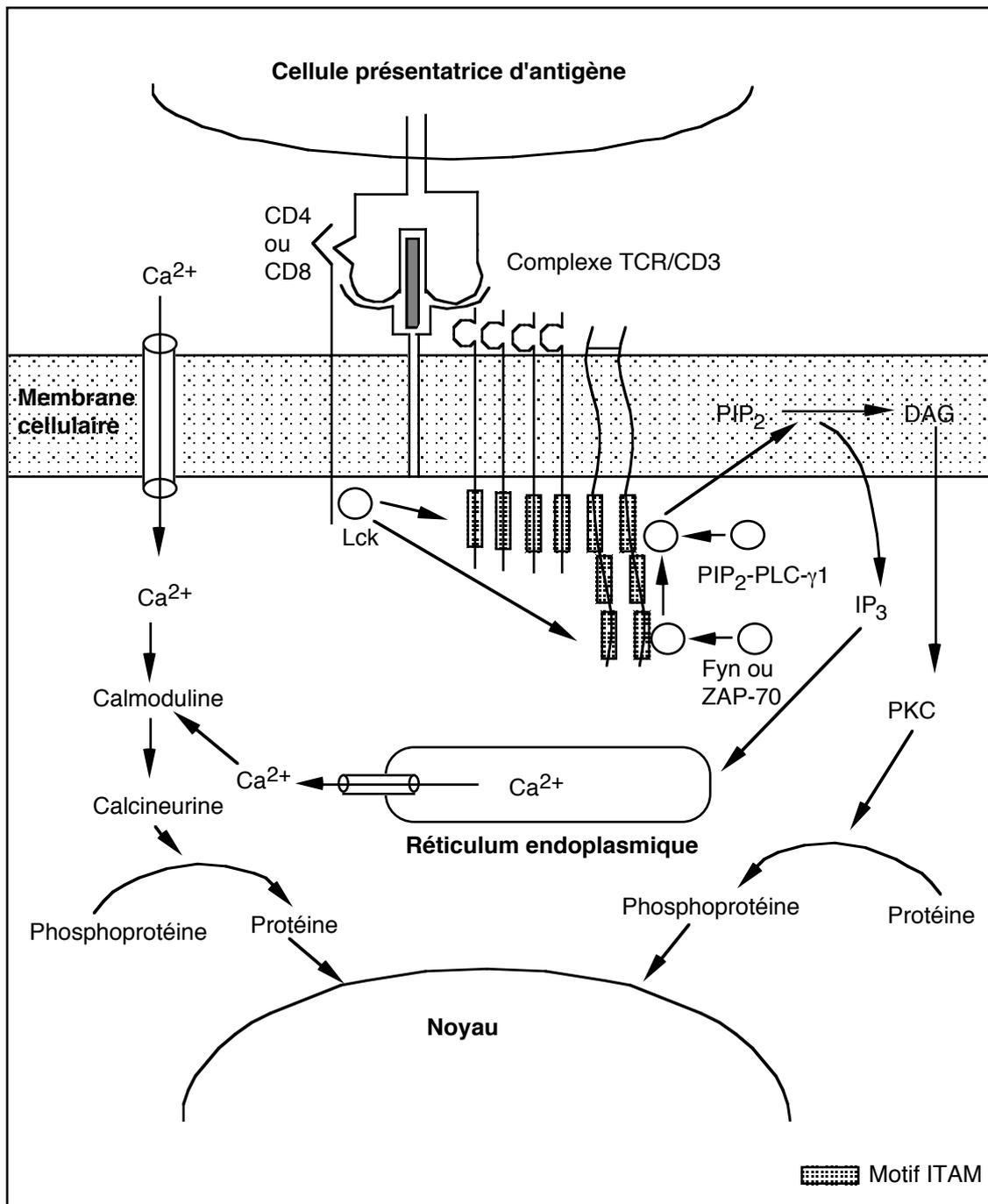
### 11.1. Introduction

La liaison de l'antigène au complexe CD3/TCR induit une cascade d'événements biochimiques aboutissant à l'activation de l'expression de gènes tel que le gène codant pour l'IL-2 (figure 11-1) (pour revue: Weiss *et al.*, 1994). Le calcium joue un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes T (Gardner, 1989). Les ions calcium interviennent notamment dans l'activation de facteurs de transcription via la calmoduline. L'action du calcium est détaillée dans le chapitre 5.

L'intervention séquentielle de tyrosines kinases est également essentielle dans la transduction du signal membranaire vers le noyau (pour revues: Sefton et Taddie 1994; Bolen, 1995). Les substrats cellulaires des tyrosines kinases sont les chaînes du complexe CD3, la chaîne  $\zeta$  (Samelson *et al.*, 1986; Qian *et al.*, 1993), le phosphatidylinositoldiphosphate-phospholipase C- $\gamma$ 1 (PIP2-PLC- $\gamma$ 1) (Weiss *et al.*, 1991), la molécule vav (Margolis *et al.*, 1992), mais aussi d'autres protéines kinases comme ZAP-70 (Chan *et al.*, 1992; Wange *et al.*, 1992). Les protéines Lck, Fyn et ZAP-70 sont les principales tyrosines kinases intervenant dans l'activation des lymphocytes T (pour revue: Weiss et Littman, 1994).

La phosphorylation des motifs ITAM du complexe CD3/TCR (décrits dans l'introduction du chapitre 10) induite par les protéines Lck et/ou Fyn conduit à la liaison des sous-unités phosphorylées du TCR avec la molécule ZAP-70, par l'intermédiaire de ses domaines tandem SH2 (*Src* homology domain 2) (Wange *et al.*, 1993). Bien que son nom, ZAP-70 (" $\zeta$ -associated protein"), indique que cette protéine kinase est associée à la chaîne  $\zeta$ , une liaison avec les motifs ITAM des autres chaînes a également été mise en évidence. Cependant, Isakov et ses collaborateurs (1995) ont démontré que l'affinité de la molécule ZAP-70 pour les différents motifs ITAM n'était pas identique. Ils ont observé une affinité croissante allant du motif ITAM  $\zeta$ 3 au motif ITAM  $\zeta$ 1 (ITAM  $\zeta$ 3  $\leq$

ITAM  $\epsilon < \text{ITAM } \zeta 2 \leq \text{ITAM } \zeta 1$ ). La cascade de phosphorylation aboutit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et en diacylglycérol (DAG). L' $\text{IP}_3$  intervient dans la libération du calcium du réticulum endoplasmique (pour revues: Berridge, 1993; 1995), tandis que le DAG active la protéine kinase C (Crabtree, 1989) (figure 11-1).



**Figure 11-1:** Signaux intracellulaires intervenant après une activation des lymphocytes T. Les principaux événements biochimiques qui suivent la liaison de l'antigène sur le TCR et qui conduisent à la transcription de gènes dans le noyau sont représentés.

Outre leur rôle clé dans la régulation de l'expression de gènes, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont étroitement associés à de nombreuses fonctions cellulaires comme les phénomènes de cytotoxicité (Poenie *et al.*, 1987; Harverstick *et al.*, 1991). La concentration intracellulaire en ion  $\text{Ca}^{2+}$  nécessite une régulation fine car des concentrations élevées maintenues de façon prolongée sont toxiques.

L'induction de flux calciques et de phosphorylations des acides aminés tyrosines après une stimulation des lymphocytes T par des anticorps anti-CD3 a déjà été décrite (Finkel *et al.*, 1987; Vandenberghe et Ceuppens, 1990; Rigley *et al.*, 1995). Nous avons tenté de déterminer si ces observations étaient dépendantes ou non des caractéristiques de l'anticorps anti-CD3 utilisé pour la stimulation. Outre les différents anticorps anti-CD3 et l'anticorps bispécifique OC/TR, nous avons aussi étudié la stimulation par un anticorps anti-CD3 chimérique ( $\alpha\text{CD3}$  chim) dont la région de reconnaissance d'origine murine a été placée dans un contexte d'immunoglobulines humaines. Cette construction permet une "humanisation" de l'anticorps (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Woodle *et al.*, 1992). Ce type d'anticorps est réalisé afin de minimiser les problèmes dus à l'injection d'anticorps d'origine murine chez l'homme. En effet, ces derniers provoquent une réaction immunitaire appelée HAMA pour "Human Anti-Murine Antibodies" (Jaffers *et al.*, 1983; 1986; Hammond *et al.*, 1990). Signalons également qu'il est actuellement possible d'obtenir des anticorps entièrement humains et reconnaissant des molécules humaines, notamment par clonage de l'ADN d'un anticorps dans un phage et expression de cet ADN par des bactéries (Esposito *et al.*, 1995) ou grâce à des souris transgéniques exprimant des immunoglobulines humaines (Lonberg *et al.*, 1994).

L'induction de flux calciques a été étudiée sur des lymphocytes humains du sang périphérique, préalablement stimulés ou non, et sur des clones de lymphocytes T, afin de déterminer une influence éventuelle de l'état d'activation des cellules.

## 11.2. Méthodologie

Les flux calciques induits par les huit anticorps anti-CD3 (repris dans le tableau III-1 de la page 126?) ont été étudiés sur des lymphocytes du sang fraîchement récoltés, sur des lymphocytes cultivés pendant quatre jours en présence d'IL-2 et de BMA030 et sur deux clones de lymphocytes T, l'un exprimant la molécule CD8 (DM3) et l'autre la molécule CD4 (DM13). Les clones sont utilisés lorsqu'ils sont en phase de croissance cellulaire. Les variations de concentration en calcium intracellulaire sont visualisées en

---

cytométrie de flux grâce à la sonde fluo-3. L'intensité de fluorescence de celle-ci augmente après sa liaison au calcium. Afin de normaliser les valeurs de fluorescence du fluo-3, la moyenne de fluorescence obtenue après addition de l'anticorps anti-CD3 (2  $\mu\text{g/ml}$ ) est rapportée à la valeur moyenne de fluorescence observée avant stimulation (niveau de base). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de réponse.

La détection de résidus tyrosines phosphorylés est réalisée sur des lymphocytes fraîchement prélevés. Après une incubation de trois minutes en présence d'anticorps anti-CD3 (2  $\mu\text{g/ml}$ ), les lymphocytes sont lysés et les protéines cytoplasmiques sont récupérées. Les profils de phosphorylation des protéines sont mis en évidence, après "Western blot" et transfert sur une membrane de nitrocellulose, à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine couplé à l'iode<sup>125</sup> radioactif. Ces expériences ont été réalisées avec quatre anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3 et  $\alpha\text{CD3}$  chimérique) et avec l'anticorps bispécifique OC/TR.

## 11.3. Résultats

### 11.3.1. Flux calciques

Quatre anticorps (BMA030, TR66,  $\alpha\text{CD3}$  et  $\alpha\text{CD3}$  chimérique, groupe 1) induisent une augmentation de fluorescence de la sonde fluo-3 supérieure à 150% de la valeur du niveau de base (tableau 11-1). Par contre, les flux calciques observés en présence des quatre autres anticorps (OKT3, BMA033, Leu-4, OC/TR, groupe 2) sont faibles ou non détectables (tableau 11-1). Parallèlement, la proportion de cellules répondant à la stimulation par un anticorps anti-CD3 est plus faible pour les anticorps du groupe 2 (OKT3, BMA033, Leu-4 et OC/TR). Par exemple, à un temps déterminé (trois minutes après la stimulation), environ 50% des cellules du clone  $\text{CD8}^+$  possèdent une intensité de fluorescence élevée en réponse à la stimulation par un anticorps anti-CD3 du groupe 1 contre 13% de cellules après stimulation par un anticorps du groupe 2.

L'absence ou la faible augmentation de fluorescence de la sonde fluo-3 après une stimulation par l'anticorps OKT3 n'est pas la conséquence d'une concentration inadéquate de l'anticorps. En effet, nous avons testé plusieurs concentrations (0,01  $\mu\text{g/ml}$  - 6  $\mu\text{g/ml}$ ) sans constater de modification dans l'intensité de fluorescence (résultats non illustrés). Nous avons également comparé notre anticorps OKT3 purifié à partir de surnageant d'hybridome à un anticorps OKT3 commercial. Les résultats obtenus pour les deux anticorps sont similaires (résultats non illustrés).

La division des anticorps en deux groupes est apparente et similaire quelles que soient les cellules étudiées (lymphocytes non stimulés, stimulés pendant quatre jours en présence d'IL-2 + l'anticorps BMA030 et clones de cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) (tableau 11-1).

Cependant, l'intensité des flux calciques après stimulation par les anticorps anti-CD3 varie en fonction du matériel cellulaire analysé. En effet, l'augmentation de la concentration en calcium est intense dans les cellules du clone de lymphocytes T exprimant le marqueur CD8, intermédiaire pour les lymphocytes stimulés ou non et faible pour les cellules T du clone exprimant le marqueur CD4 (tableau 11-1).

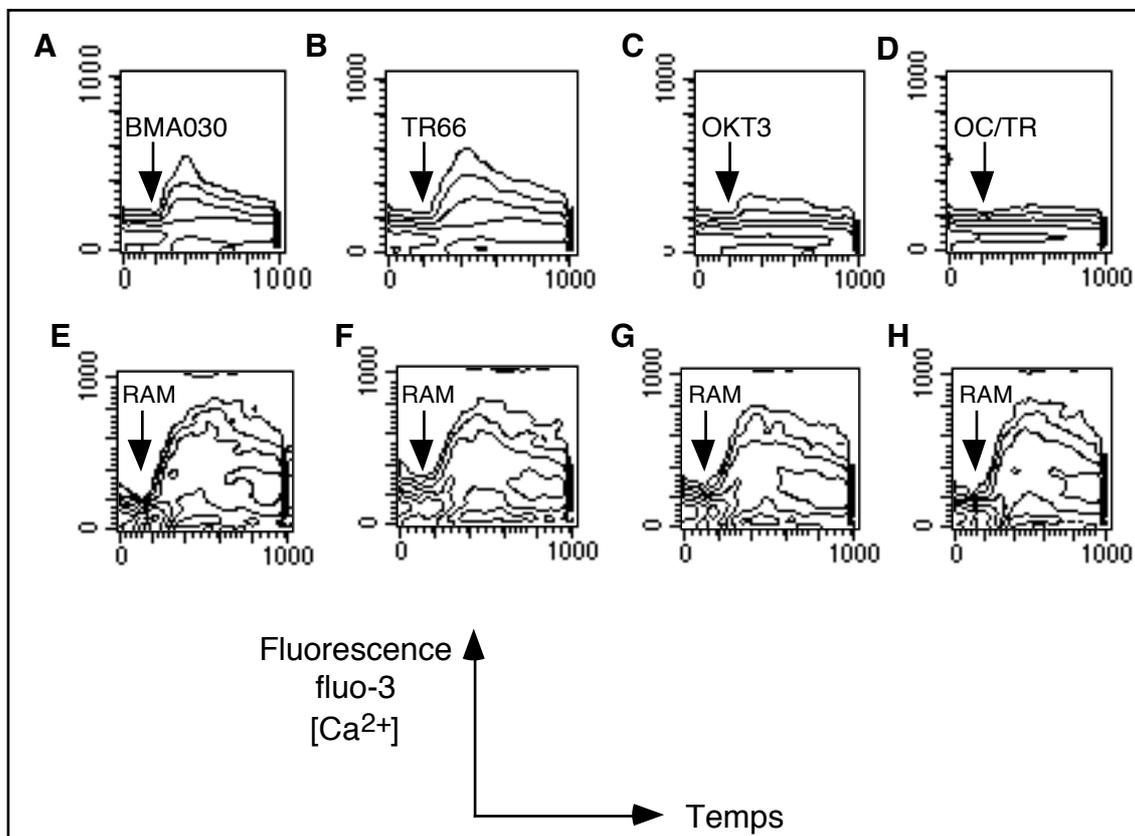
Anticorps anti-CD3	% de réponse après stimulation par des anticorps anti-CD3			
	PBL		Clones T	
	non activés	activés	CD8 <sup>+</sup> (DM3)	CD4 <sup>+</sup> (DM13)
BMA030	193 ± 21 (5)	171 ± 24 (5)	387 ± 83 (2)	148 ± 23 (4)
TR66	185 ± 13 (6)	172 ± 17 (4)	384 ± 51 (3)	147 ± 19 (4)
OKT3	122 ± 6 (5)	99 ± 4 (3)	127 ± 22 (2)	90 ± 6 (3)
OC/TR	125 ± 9 (4)	102 ± 4 (4)	171 ± 12 (2)	99 ± 6 (4)
αCD3	218 ± 11 (2)	278 (1)	455 (1)	163 ± 17 (2)
αCD3 Chim	198 ± 11 (3)	ND	355 (1)	137 ± 22 (2)
BMA033	118 (1)	98 (1)	96 (1)	96 (1)
Leu-4	138 ± 25 (2)	ND	ND	ND

**Tableau 11-1: Augmentation de la moyenne de fluorescence de fluo-3 dans des lymphocytes fraîchement prélevés (non activés), activés pendant 4 jours en présence d'IL-2 et de BMA030 (activés) ou des clones de lymphocytes T. Les moyennes de fluorescence après addition des anticorps anti-CD3 (2 µg/ml) sont rapportées aux valeurs obtenues avant stimulation et exprimées en pourcentage (moyenne ± erreur standard). Le nombre d'expériences réalisées est repris entre parenthèses. ND = non déterminé.**

Dans le but d'augmenter l'intensité des flux calciques, une liaison croisée ("cross-linking") des anticorps anti-CD3 par un second anticorps (anticorps de lapin reconnaissant les anticorps murins, RAM ou un anticorps reconnaissant les immunoglobulines humaines pour l'anticorps αCD3 Chim) a été réalisée. Dans ce cas,

tous les anticorps anti-CD3 génèrent des flux calciques similaires. Un exemple des résultats obtenus pour quatre anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3, OC/TR) utilisés seuls ou en combinaison avec l'anticorps RAM est illustré à la figure 11-2. Cette expérience a été réalisée sur des lymphocytes au repos, mais les réponses sont identiques pour tous les anticorps lorsque des lymphocytes activés ou les clones de cellules T sont analysés. Signalons que l'anticorps RAM seul n'induit pas de flux calcique (résultats non illustrés).

Enfin, la cinétique d'apparition des pics de fluorescence de fluo-3 après apport d'anticorps anti-CD3 ou d'anticorps anti-CD3 et d'anticorps RAM est similaire quel que soit l'anticorps utilisé.

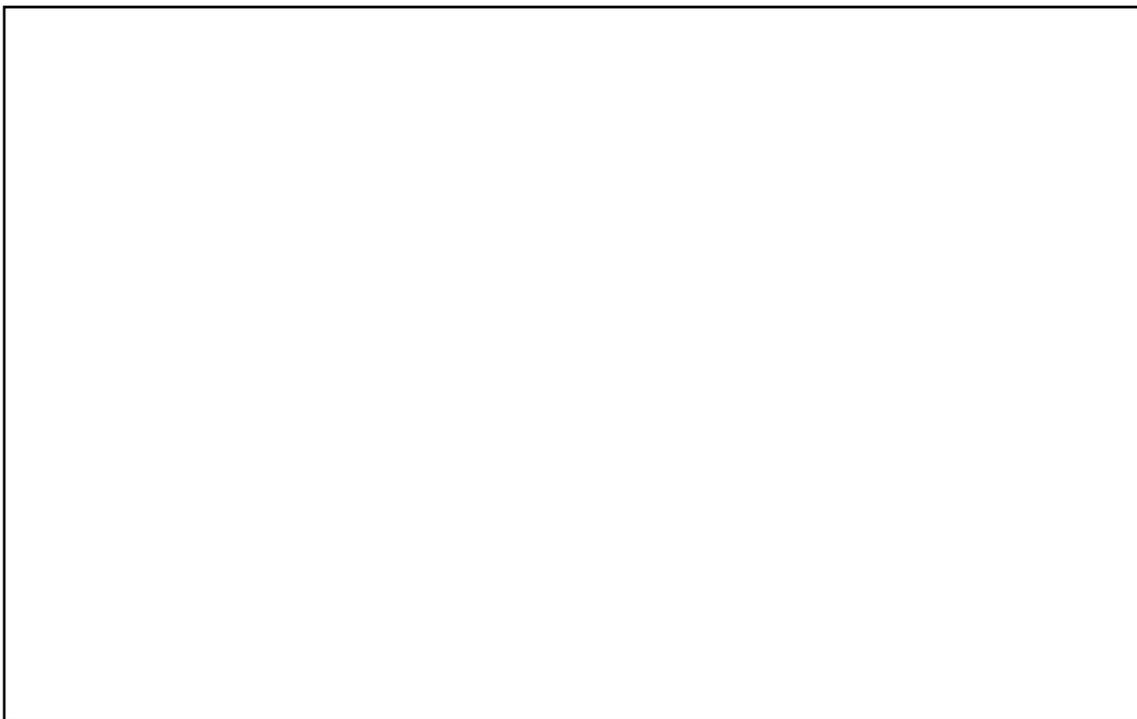


**Figure 11-2:** Intensité de la réponse calcique des lymphocytes du sang périphérique après stimulation par quatre anticorps anti-CD3 seuls ou après liaison croisée.

La concentration du calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]$ ) est évaluée par la mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde fluo-3. Les résultats sont représentés par des courbes d'isodensité. La flèche indique le moment où sont ajoutés les anticorps anti-CD3 (A, B, C, D) ou l'anticorps de lapin anti-souris (RAM) qui induit la liaison croisée des anticorps anti-CD3 (E, F, G, H). L'échelle de temps couvre 512 secondes (A - D) ou 204 secondes (E - H).

### 11.3.2. Phosphorylations des résidus tyrosines

La phosphorylation des résidus tyrosines induite par les anticorps BMA030, TR66, OKT3, OC/TR et  $\alpha$ CD3 chimérique a été analysée après migration par électrophorèse et transfert sur une membrane de nitrocellulose des protéines cytoplasmiques totales. Tous les anticorps anti-CD3 testés induisent une augmentation des phosphorylations par rapport à la condition sans stimulation (contrôle, figure 11-3). La liaison croisée des anticorps par un second anticorps (RAM) génère un marquage plus important. Des bandes supplémentaires sont visualisées sur la membrane (figure 11-4).



**Figure 11-3:** Phosphorylations de résidus tyrosines après stimulation de PBL par différents anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3 et  $\alpha$ CD3 chim) et par l'anticorps bispécifique OC/TR.

Les PBL sont stimulés trois minutes en présence des différents anticorps. Les cellules sont ensuite lysées. Les protéines cytoplasmiques sont séparées sur un gel de polyacrylamide (8%) et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les résidus tyrosines phosphorylés sont mis en évidence par autoradiographie grâce à un anticorps anti-phosphotyrosine couplé à  $^{125}\text{I}$ \*. Des PBL non stimulés par les anticorps anti-CD3 subissent le même traitement et constituent la condition contrôle. PM = marqueur de poids moléculaires.

Selon l'anticorps utilisé, les profils de phosphorylations sont légèrement différents. Cependant, cette observation ne semble pas refléter une différence réelle. En effet, lorsque les protéines proviennent de PBL stimulés par le même anticorps (OKT3), des variations dans l'intensité du marquage sont également observées (figure 11-5). Cette constatation rend aléatoire une quantification par densitométrie.

Afin de vérifier que l'augmentation des phosphorylations est bien la conséquence de l'interaction de l'anticorps anti-CD3 avec le complexe CD3, des cellules de la lignée IGROV1, provenant d'un carcinome ovarien et dépourvues du complexe CD3, ont servi de contrôle négatif. Dans ce cas, l'apport d'anticorps anti-CD3 (TR66) n'induit aucun changement du profil de phosphorylation des protéines issues de cellules IGROV1 (figure 11-5).



**Figure 11-4:** Induction de phosphorylation des résidus tyrosines après stimulation de PBL par différents anticorps anti-CD3 en présence ou non d'anticorps anti-immunoglobulines de souris (RAM).

Les PBL sont stimulés trois minutes en présence des différents anticorps anti-CD3. La moitié des échantillons sont ensuite incubés, trois minutes, en présence d'un anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris (RAM). Après une lyse cellulaire, les protéines cytoplasmiques sont séparées sur un gel de polyacrylamide (8%) et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les résidus tyrosines phosphorylés sont mis en évidence par autoradiographie grâce à un anticorps anti-phosphotyrosine couplé à  $^{125}\text{I}^*$ . Des PBL non stimulés par les anticorps anti-CD3 subissent le même traitement et constituent la condition contrôle. PM = marqueur de poids moléculaires.



**Figure 11-5:** Profil de phosphorylation des résidus tyrosines après stimulation de PBL ou de cellules IGROV1 par des anticorps anti-CD3.

Les PBL sont stimulés trois minutes en présence des différents anticorps anti-CD3. Deux échantillons de PBL stimulés par OKT3 ont été réalisés. Les cellules de la lignée tumorale IGROV1, n'exprimant pas le complexe CD3, ont été incubées en présence de l'anticorps TR66. Après une lyse cellulaire, les protéines cytoplasmiques sont séparées sur un gel de polyacrylamide (8%) et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les résidus tyrosines phosphorylés sont mis en évidence par autoradiographie grâce à un anticorps anti-phosphotyrosine couplé à  $^{125}\text{I}^*$ . Des PBL et des cellules IGROV1 incubés sans anticorps anti-CD3 subissent le même traitement et constituent les conditions contrôles. PM = marqueur de poids moléculaires.

## 11.4. Discussion

L'induction de flux calciques d'intensités différentes selon le type d'anticorps anti-CD3 utilisé a déjà été rapportée (Roosnek *et al.*, 1987; Ledbetter *et al.*, 1987). Signalons que ces auteurs ont employé des anticorps anti-CD3 différents des nôtres. Dans notre étude, les anticorps anti-CD3 peuvent être divisés en deux groupes suivant leur capacité (groupe 1) ou non (groupe 2) d'induire seuls un flux calcique important. Les anticorps BMA030, TR66,  $\alpha\text{CD3}$  et  $\alpha\text{CD3}$  chimérique font partir du groupe 1, tandis que les anticorps OKT3, OC/TR, BMA033 et Leu-4 appartiennent au groupe 2.

---

Les différences observées sont significatives. L'absence d'induction de flux calcique après une stimulation par l'anticorps OKT3 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) a également été décrite par d'autres (Davis *et al.*, 1989). Cependant, certains auteurs (Vandenberghe et Ceuppens, 1990) ont observé une réponse calcique en présence de cet anticorps. Signalons que dans cette étude (Vandenberghe et Ceuppens, 1990), la stimulation par l'anticorps OKT3 n'est pas comparée à d'autres anticorps anti-CD3. De plus, les valeurs observées sont exprimées en moyenne de fluorescence ou en concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et non par un rapport entre l'intensité de fluorescence de fluo-3 avant et après stimulation par l'anticorps anti-CD3 (pourcentage de réponse). Lorsque ce calcul est effectué, les différences entre ce travail et le nôtre s'amenuisent. La liaison croisée des anticorps anti-CD3 par un second anticorps induit une nouvelle vague de flux calciques. Dans cette condition expérimentale, les différences entre les anticorps anti-CD3 sont abolies (Davis *et al.*, 1989).

La discrimination des anticorps en deux groupes ne semble pas liée à la concentration puisque des concentrations variables d'OKT3 ne modifient pas la réponse calcique. De même, l'isotype de l'anticorps ne semble pas influencer l'intensité des flux calciques car des anticorps de même isotype comme, par exemple, OKT3 et BMA030 (IgG<sub>2a</sub>) induisent des flux calciques différents. Par contre, il n'est pas exclu que le phénotype des lymphocytes T joue un rôle dans l'intensité des flux calciques générés par des anticorps anti-CD3. En effet, les deux clones de lymphocytes T montrent des réponses d'intensités nettement différentes.

Une plus grande quantité de protéines phosphorylées sur leurs résidus tyrosines a été détectée après stimulation des PBL par un anticorps anti-CD3. Bien qu'un lien direct entre les tyrosines kinases et la régulation des flux calciques ait été suggéré par Niklinska et ses collaborateurs (1992), les différences de flux de calcium observées avec les différents anticorps anti-CD3 ne semblent pas être corrélées avec les profils de phosphorylation. En effet, ceux-ci sont similaires quel que soit l'anticorps utilisé. Il est possible que les variations de phosphorylations soient trop faibles pour être détectées par la méthode que nous avons utilisée. De plus, toutes les protéines pouvant être phosphorylées ne sont pas discriminées dans le type de gel (8% polyacrylamide) que nous avons utilisé. Par exemple, la chaîne  $\zeta$  du TCR est phosphorylée après stimulation via le TCR (Koyasu *et al.*, 1992), mais son poids moléculaire de 21 kDa ne permet pas de la visualiser.

En résumé, d'après les expériences que nous avons réalisées, les anticorps anti-CD3 peuvent être divisés en deux groupes. Les premiers (BMA030, TR66,  $\alpha\text{CD3}$ ,  $\alpha\text{CD3}$  chim.) induisent des flux calciques importants seuls tandis que les seconds (OKT3, OC/TR, BMA033, Leu-4) ne génèrent des flux calciques importants qu'en

présence d'un anticorps permettant des liaisons croisées. Nous n'avons pas observé de corrélation entre les flux calciques et le profil de phosphorylation des résidus tyrosines induits par les anticorps anti-CD3.

---

**Chapitre 12:**

**Influence des anticorps anti-CD3 sur l'expression du  
complexe CD3**

### 12.1. Introduction

Outre l'initiation de flux calciques et l'activation de protéines kinases, la présence de l'anticorps anti-CD3 sur le complexe CD3 peut induire l'internalisation de celui-ci (Chatenoud *et al.*, 1982; Telerman *et al.*, 1987). L'internalisation du complexe CD3 s'accompagne de l'internalisation du TCR. Ce phénomène est appelé modulation du complexe CD3/TCR. Un rassemblement des complexes CD3/anticorps à un pôle cellulaire précède l'internalisation. La nature (isotype et idiotype) de l'anticorps peut influencer la cinétique et l'intensité de ce phénomène. Ce phénomène est également observé lorsque des lymphocytes T cytotoxiques sont incubés en présence de leurs cibles spécifiques (Hommel-Berrey *et al.*, 1991).

Bien que la disparition du complexe CD3/TCR de la surface des lymphocytes T suite à la présence d'anticorps anti-CD3 ait été décrite comme responsable de l'inactivation des lymphocytes T (Davis *et al.*, 1989), d'autres travaux ont montré l'importance de la modulation de ce complexe pour l'induction de l'activation des lymphocytes T. Par exemple, Kurre et ses collègues (1985) n'ont constaté une prolifération des lymphocytes T que lorsque les conditions de culture permettaient la modulation du complexe CD3. Des protéines tyrosines kinases participent à l'internalisation du complexe CD3/TCR. En effet, la présence d'inhibiteurs des protéines tyrosines kinases retardent l'internalisation induite par un anticorps dirigé contre le TCR de CTL murins (Luton *et al.*, 1994).

La présence de monocytes semble nécessaire pour l'internalisation du complexe CD3 par un anticorps anti-CD3 (Rinnooy Kan *et al.*, 1986). Les monocytes interviennent en immobilisant les anticorps grâce à leurs récepteurs Fc. Cette immobilisation des anticorps peut être réalisée par la fixation des anticorps sur le fond de la boîte de culture ou à des billes de sépharose (Williams *et al.*, 1985), mais les

monocytes présentent l'avantage de produire de l'IL-1 nécessaire pour une stimulation complète des lymphocytes T (Palacios, 1985). Cependant, une proportion de la population humaine (30% des Caucasiens), possède des monocytes n'exprimant pas le récepteur Fc adéquat pour lier les anticorps murins d'isotype IgG<sub>1</sub>. Chez ces personnes, on ne constate pas de réponse à un anticorps anti-CD3 IgG<sub>1</sub> (Tax *et al.*, 1983; Kaneoka *et al.*, 1983; Ceuppens et Van Vaeck, 1987).

Dans ce chapitre, nous avons étudié la modulation du complexe CD3 induite par les différents anticorps. Pour ce faire, la présence du complexe CD3 et des anticorps anti-CD3 à la surface des lymphocytes T a été recherchée.

## 12.2. Méthodologie

Pour cette étude, nous avons sélectionné des donneurs répondant à une stimulation par un anticorps anti-CD3 d'isotype IgG<sub>1</sub>. Cette sélection s'est faite sur base de la capacité proliférative des lymphocytes de ces donneurs, en présence d'un anticorps anti-CD3 IgG<sub>1</sub>.

Nous avons réalisé, pendant quatre jours, des cultures de lymphocytes du sang dans du milieu de culture sans mitogène (condition contrôle), additionné d'IL-2 ou d'IL-2 et des différents anticorps anti-CD3. Les anticorps anti-CD3 ont été utilisés sous forme soluble (0,01 µg/ml) ou fixés (1 µg/ml) sur le fond des puits de culture par une incubation d'une heure à 37°C. L'anticorps Leu-4 n'a pas pu être étudié car il n'était pas disponible en quantité suffisante.

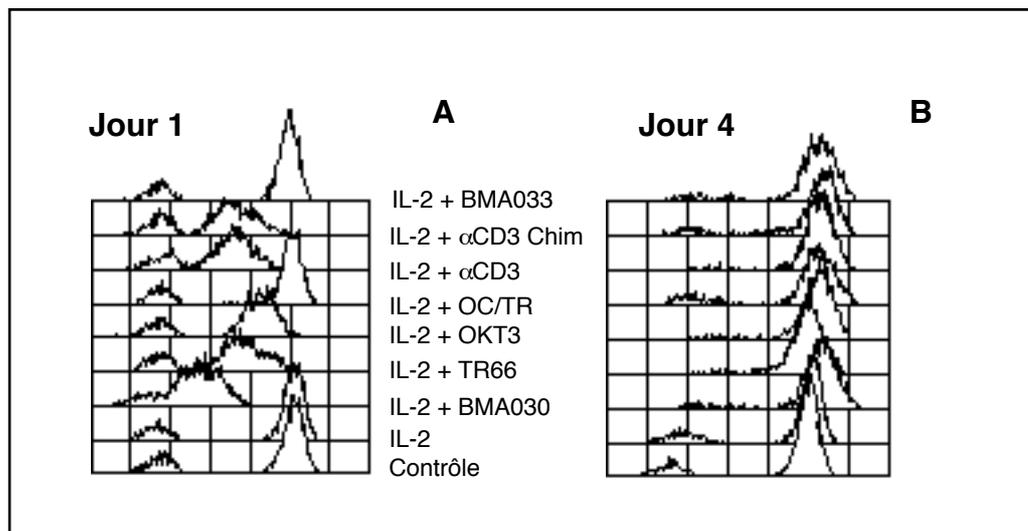
La détection de l'expression du complexe CD3 et la détection de la présence d'anticorps anti-CD3 à la surface des cellules ont été réalisées chaque jour par cytométrie en flux à l'aide respectivement d'un anticorps anti-CD3 (B-B11) et d'un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris (GAM) ou d'un anticorps de souris anti-immunoglobulines humaines. Ces anticorps sont couplés au FITC.

## 12.3. Résultats

### 12.3.1. Détection du complexe CD3

L'expression du complexe CD3 à la surface des PBL après un ou quatre jours de culture en présence des différents anticorps anti-CD3 est illustrée à la figure 12-1.

Après 24 heures de culture, l'expression du complexe CD3 diminue en présence de la plupart des anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) (figure 12-1 A). Seules les cellules stimulées en présence de l'anticorps BMA033 ou OC/TR expriment le complexe CD3 de manière comparable aux cellules de la condition de culture contrôle ou en présence d'IL-2 seule. Après quatre jours de culture, l'expression du CD3 est à nouveau similaire à celle observée dans la culture contrôle ou en présence d'IL-2 seule (figure 12-1 B). La cinétique de ré-expression varie suivant l'anticorps et le donneur (tableau 12-1).



**Figure 12-1:** Expression du complexe CD3 après un jour (A) ou 4 jours de culture (B) en présence des différents anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) et d'IL-2.

La détection du complexe CD3 après incubation des cellules avec un anticorps anti-CD3-FITC (B-B11) est réalisée par cytométrie en flux. Abscisse: intensité de fluorescence; ordonnée: nombre de cellules (total = 5.000 cellules).

L'anticorps servant à la stimulation ne devrait pas inhiber la liaison de l'anticorps anti-CD3-FITC car ce dernier est utilisé en excès (1  $\mu\text{g/ml}$  versus 0,01  $\mu\text{g/ml}$  pour la culture). Afin de vérifier cette absence d'inhibition, les cellules ont été marquées par un anticorps anti-CD3 FITC, une demi-heure après l'ajout des anticorps anti-CD3 utilisés pour la culture. La compétition entre les deux anticorps est faible ou inexistante (résultats non illustrés). Par contre, lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une concentration plus élevée d'anticorps anti-CD3 (2  $\mu\text{g/ml}$ , concentration utilisée pour les expériences de flux calciques), on note une compétition entre l'anticorps stimulateur et l'anticorps détecteur. Dans ce cas, il est difficile d'estimer le phénomène de modulation (résultats non illustrés).

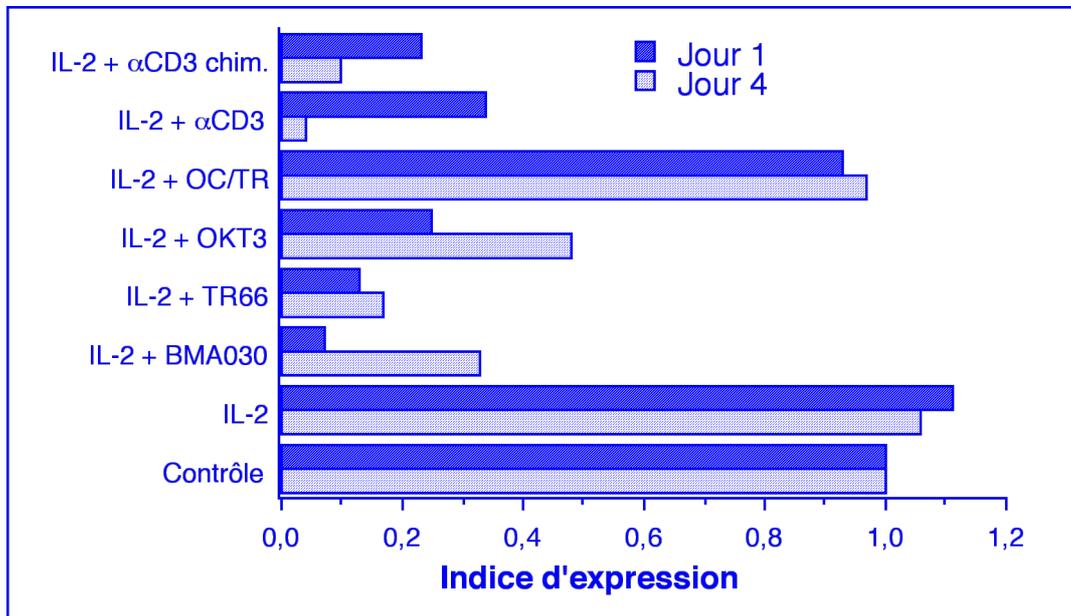
	Indice d'expression du complexe CD3			
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Contrôle	1,00	1,00	1,00	1,00
IL-2	1,01 ± 0,08	1,07 ± 0,09	1,25 ± 0,28	1,06 ± 0,09
IL-2 + BMA030	0,52 ± 0,33	0,71 ± 0,53	1,03 ± 0,65	1,15 ± 0,54
IL-2 + TR66	0,30 ± 0,06	0,45 ± 0,28	1,07 ± 0,17	0,91 ± 0,31
IL-2 + OKT3	0,58 ± 0,16	0,74 ± 0,18	1,15 ± 0,23	1,16 ± 0,30
IL-2 + OC/TR	0,91 ± 0,10	1,06 ± 0,11	1,39 ± 0,33	1,25 ± 0,19
IL-2 + αCD3	0,22 ± 0,12	0,74 ± 0,59	1,11 ± 0,83	1,19 ± 0,54
IL-2 + αCD3 chim.	0,29 ± 0,07	0,46 ± 0,12	1,08 ± 0,18	1,27 ± 0,22
IL-2 + BMA033	0,94 ± 0,05	0,92 ± 0,06	1,20 ± 0,30	1,28 ± 0,22

**Tableau 12-1: Expression du complexe CD3 au cours de la culture des lymphocytes en présence des différents anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) et d'IL-2.**

La détection du complexe est réalisée par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti-CD3-FITC (B-B11). L'indice d'expression est calculé en divisant la moyenne de l'intensité de fluorescence obtenue pour les différentes conditions de culture par la moyenne de fluorescence observée dans la condition contrôle. Les valeurs (moyenne ± écart type) de trois expériences sont représentées.

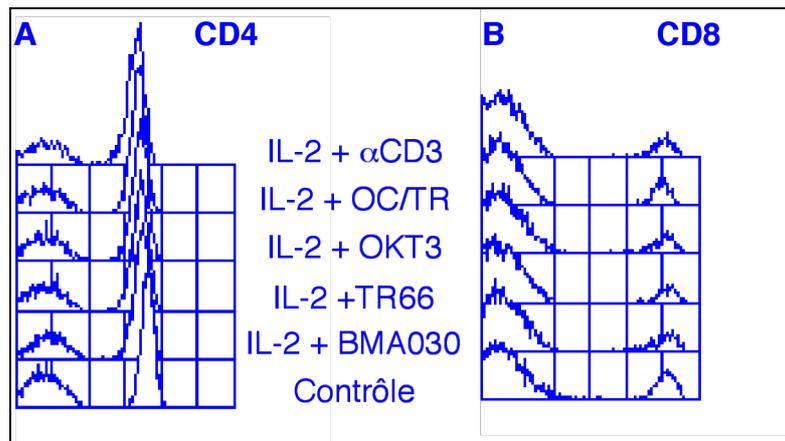
Une expérience a été réalisée en fixant les anticorps anti-CD3 sur le fond du puits de culture (1 µg/ml). Dans ce cas, une diminution de l'expression du complexe CD3 est observée pour les mêmes anticorps que dans les expériences précédentes. Cependant, au quatrième jour de culture, la ré-expression du complexe CD3 reste inférieure à la valeur obtenue dans la condition contrôle (figure 12-2). L'anticorps BMA033 n'a pas pu être utilisé dans cette expérience, car il n'était pas disponible en quantité suffisante pour permettre sa fixation.

Afin de savoir si la modulation du complexe CD3/TCR entraînait l'internalisation de molécules proches de ce complexe, l'expression d'autres marqueurs de surface des lymphocytes T comme le CD4 et le CD8 a également été analysée après une culture en présence d'anticorps induisant une modulation (BMA030, TR66, OKT3, αCD3) ou non (OC/TR). Après un jour de culture, l'intensité de fluorescence obtenue pour les anticorps dirigés contre les marqueurs CD4 et CD8 est similaire à la condition contrôle quel que soit l'anticorps anti-CD3 utilisé pour la stimulation (figure 12-3).



**Figure 12-2:** Expression du complexe CD3 après culture des cellules en présence d'anticorps anti-CD3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) fixés sur le fond des puits de culture.

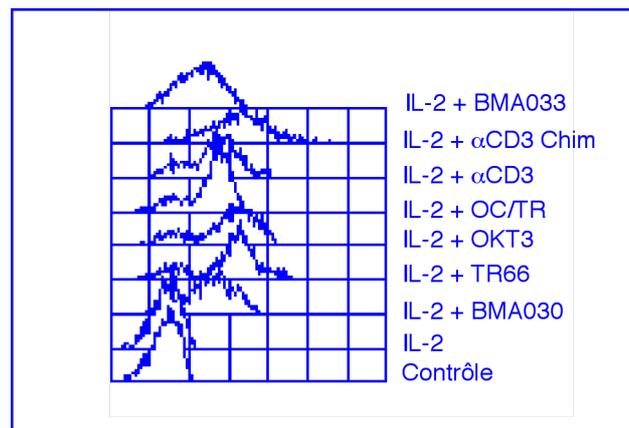
La détection du complexe est réalisée par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti-CD3-FITC (B-B11). L'indice d'expression est calculé en divisant la moyenne de la fluorescence obtenue pour les différentes conditions de culture par la moyenne de fluorescence observée dans la condition contrôle.



**Figure 12-3:** Expression des marqueurs CD4 (A) et CD8 (B) à la surface de lymphocytes cultivés 24 heures en présence d'anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) et d'IL-2. La détection des marqueurs CD4 et CD8 a été réalisée par cytométrie en flux après incubation des cellules en présence d'anticorps anti-CD4-FITC ou d'anticorps anti-CD8-PE. Abscisse: intensité de fluorescence; ordonnée: nombre de cellules (total = 5.000 cellules)

### 12.3.2. Détection des anticorps anti-CD3 à la surface des cellules

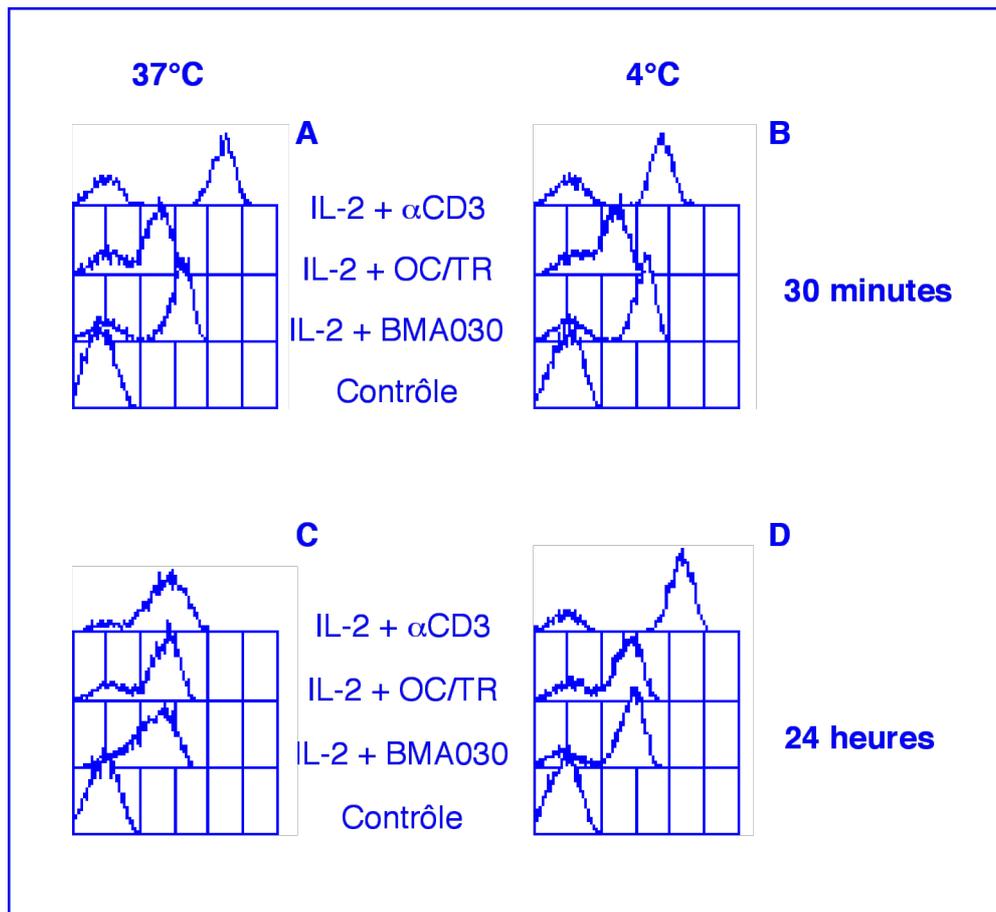
Les anticorps anti-CD3 présents à la surface des cellules sont mis en évidence grâce à un anticorps de chèvre reconnaissant les immunoglobulines de souris et couplé au FITC. Tous les anticorps anti-CD3 sont détectés à la surface des lymphocytes (figure 12-4) après 24 heures de culture. Signalons que l'intensité du marquage est plus faible lorsque les cellules sont cultivées en présence de l'anticorps OC/TR ou BMA033 et ceci pour les trois expériences. La cinétique de disparition de la surface des cellules de ces anticorps est fortement variable en fonction du donneur. D'une manière générale, après quatre jours de culture, on observe une nette diminution de la positivité de l'anticorps détectant les anticorps anti-CD3 à la surface des cellules. La diminution du marquage est moins marquée pour les anticorps OC/TR et BMA033 (résultats non illustrés).



**Figure 12-4:** Détection des anticorps anti-CD3 après 24 heures de culture.

Les anticorps anti-CD3 présents à la surface des lymphocytes sont mis en évidence en incubant les cellules en présence d'un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris-FITC ou d'un anticorps de souris anti-immunoglobulines humaines FITC. Abscisse: intensité de fluorescence; ordonnée: nombre de cellules (total = 5.000 cellules).

Afin de s'assurer que la diminution de l'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-immunoglobulines de souris est le reflet de la modulation du complexe CD3 et non la conséquence d'un détachement de l'anticorps, les cellules ont été incubées à 4°C et à 37°C (figure 12-5). En effet, la modulation étant un phénomène actif, elle ne peut avoir lieu qu'à 37°C. Après 24 heures de culture à 37°C en présence des anticorps BMA030 et  $\alpha$ CD3 l'intensité du marquage par l'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris-FITC (figure 12-5 C) diminue par rapport au marquage obtenu 30 minutes après addition des anticorps anti-CD3 dans les cultures (figure 12-5 A). Par contre, à 4°C, aucun changement important de l'intensité du marquage n'est observé après 24 heures de culture (figure 12-5 D) par rapport aux résultats obtenus après 30 minutes (figure 12-5 B). Signalons que le profil de marquage de l'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris est similaire à 4°C et à 37°C après 24 heures d'incubation en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR (figure 12-5 C et D).



**Figure 12-5:** Détection des anticorps anti-CD3 après 24 heures de culture à 37°C ou à 4°C.

Les anticorps anti-CD3 présents à la surface des lymphocytes sont mis en évidence en incubant les cellules en présence d'un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris-FITC ou d'anticorps anti-immunoglobulines humaines ( $\alpha$ CD3 chim). La détection est réalisée par cytométrie en flux. Abscisse: intensité de fluorescence; ordonnée: nombre de cellules (total = 5.000 cellules)

## 12.4. Discussion

La modulation de récepteurs à la surface de la cellule est un des processus permettant la propagation intracellulaire de messages extracellulaires transmis par des molécules se liant à ces récepteurs. D'autre part, la disparition d'un récepteur de la surface cellulaire suite à son internalisation a pour conséquence de stopper la réponse aux ligands de ce récepteur. La modulation du complexe CD3/TCR induite par un anticorps anti-CD3 est abondamment décrite dans la littérature aussi bien dans des modèles *in vitro* qu'*in vivo* (Chatenoud *et al.*, 1982; Kurrle *et al.*, 1985; Davis *et al.*,

1989). Dans notre étude, elle a été mise en évidence, après 24 heures de culture, par la diminution de la densité du complexe CD3 à la surface des lymphocytes T stimulés par un anticorps anti-CD3 par rapport aux lymphocytes T non stimulés. Cette diminution est observée en présence de tous les anticorps anti-CD3 testés, à l'exception de l'anticorps anti-CD3 BMA033 et l'anticorps bispécifique OC/TR.

L'absence d'internalisation du complexe CD3 en présence de l'anticorps OC/TR est peut être liée à la reconnaissance monovalente de cet anticorps bispécifique. Les résultats rapportés dans la littérature au sujet de la modulation du complexe CD3/TCR par un anticorps monovalent ne sont pas unanimes. Par exemple, Roosnek et Lanzavecchia (1989) n'ont pu mettre en évidence une modulation en présence d'un anticorps bispécifique reconnaissant de façon monovalente le complexe CD3. Par contre, Luton et ses collaborateurs (1994) ont montré que la fraction monovalente Fab d'un anticorps anti-TCR peut induire une internalisation, mais celle-ci est plus faible que pour l'anticorps complet. La faible détection du BMA033 à la surface des lymphocytes T par un anticorps reconnaissant les immunoglobulines de souris, après 24 heures de culture, est peut-être en relation avec l'incapacité de cet anticorps d'induire une modulation du complexe CD3. En effet, cet anticorps a peut-être une avidité comparable à celle de l'anticorps bispécifique OC/TR, bien qu'il possède un site de reconnaissance bivalent pour le complexe CD3. Malheureusement, il n'existe pas de donnée de la littérature à ce sujet et la quantité d'anticorps BMA033 dont nous disposions était insuffisante pour déterminer sa constante d'affinité.

L'utilisation d'anticorps anti-CD3 immobilisés par fixation sur le fond des puits de culture ne semble pas permettre une ré-expression complète du complexe CD3 après quatre jours de culture. Par contre, lorsque les anticorps anti-CD3 sont utilisés sous forme soluble, l'intensité d'expression du complexe CD3 est similaire ou supérieure à celle observée au moment de la mise en culture. Cette ré-expression est primordiale pour une utilisation de lymphocytes stimulés par un anticorps anti-CD3 dans des protocoles d'immunothérapie utilisant des anticorps bispécifiques anti-CD3 X anti-tumeur.

La cinétique de la modulation du complexe CD3 est variable suivant le donneur. Cette variation n'est pas due à l'absence de monocytes porteurs de récepteurs Fcγ adéquats puisque les donneurs ont été préalablement sélectionnés pour leur capacité d'induire une prolifération en présence d'anticorps anti-CD3 IgG<sub>1</sub> sous forme soluble. L'induction de la prolifération par un anticorps anti-CD3 IgG<sub>1</sub> est corrélée à la présence de récepteurs Fcγ capables de lier des immunoglobulines de souris IgG<sub>1</sub> (FcγR II).

En résumé, la modulation du complexe CD3 est observée en présence des anticorps BMA030, TR66, OKT3, αCD3, αCD3 chimérique. Par contre, aucune

modulation du complexe CD3 n'est détectée dans les cultures en présence d'anticorps BMA033 ou de l'anticorps bispécifique OC/TR.

---

Chapitre 13: .....	153
Influence des différents anticorps anti-CD3 sur la stimulation des lymphocytes .....	153
13.1. Introduction .....	153
13.2. Méthodologie .....	154
13.3. Résultats .....	154
13.3.1. Prolifération cellulaire .....	154
13.3.2. Phénotype de surface.....	156
13.4. Discussion .....	161
Chapitre 14: .....	163
Effet des anticorps anti-CD3 sur l'inhibition de la croissance tumorale.....	163
14.1. Introduction .....	163
14.2. Méthodologie .....	163
14.3. Résultats .....	164
14.4. Discussion .....	168
Discussion de la troisième partie .....	170

## **Chapitre 13:**

### **Influence des différents anticorps anti-CD3 sur la stimulation des lymphocytes**

#### **13.1. Introduction**

Comme nous l'avons déjà mentionné, les anticorps anti-CD3 génèrent des effets opposés en fonction du stade de différenciation des cellules et des conditions expérimentales. Ils sont capables de stimuler les lymphocytes T (Moutschen *et al.*, 1990) mais ils peuvent également être responsables de phénomènes conduisant à une inhibition de croissance cellulaire (Breitmeyer *et al.*, 1987; Webb et Sprent 1987), à une anergie (Sano *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1992) ou à une mort cellulaire par apoptose (Smith *et al.*, 1989; Russel *et al.*, 1990; Kabelitz *et al.*, 1993).

De nombreux paramètres influencent l'effet d'un anticorps anti-CD3. La présence de facteurs solubles comme l'IL-2 est un de ceux-ci (Wolf *et al.*, 1994). Des signaux co-stimulateurs induits par des interactions intercellulaires via des molécules de surface jouent également un rôle. Parmi celles-ci, la molécule CD28 et ses ligands, le CD80 ou le CD86 (pour revue: June *et al.*, 1994; Lenschow *et al.*, 1996), sont des molécules importantes pour une stimulation efficace des lymphocytes T. Par exemple, l'induction d'une prolifération de lymphocytes T purifiés par un anticorps anti-CD3 n'est possible qu'après la liaison du CD28 à son ligand (Azuma *et al.*, 1992). La concentration en anticorps intervient également. En effet, selon la dose d'anticorps utilisée, les lymphocytes T peuvent proliférer ou mourir par apoptose (Ucker *et al.*, 1992).

L'anticorps lui-même peut générer des phénomènes différents. En effet, la sécrétion de cytokines est différente suivant que l'anticorps reconnaisse le complexe CD3 ou plus particulièrement le TCR (Schwinzer *et al.*, 1992). De même, l'effet immunosuppresseur peut varier en fonction de l'anticorps anti-CD3 utilisé (Woodle *et al.*, 1991). Dans cette étude, c'est principalement l'isotype de l'anticorps qui influence l'activation induite par les anticorps anti-CD3 tandis que la spécificité de l'épitope

intervient de façon prédominante dans l'inhibition de l'activité cytotoxique de CTL (Woodle *et al.*, 1991).

Dans ce chapitre, nous avons étudié la capacité des différents anticorps anti-CD3 à induire une prolifération cellulaire. De plus, le phénotype de surface a été analysé afin de déterminer la présence de marqueurs d'activation tels que le CD25, mais aussi la proportion de cellules T possédant un phénotype de cellules mémoires (CD45R0<sup>+</sup>). L'expression de la molécule de co-stimulation CD28 a aussi été mesurée.

## 13.2. Méthodologie

Les lymphocytes du sang périphérique des donneurs sélectionnés pour leur capacité à répondre à des anticorps anti-CD3 IgG1 (voir chapitre 12) ont également été utilisés dans ce chapitre. Des cultures de quatre jours ont été réalisées.

La prolifération cellulaire a été estimée quotidiennement par incorporation de thymidine tritiée. Le phénotype de surface a été défini par des anticorps fluorescents détectés par cytométrie en flux.

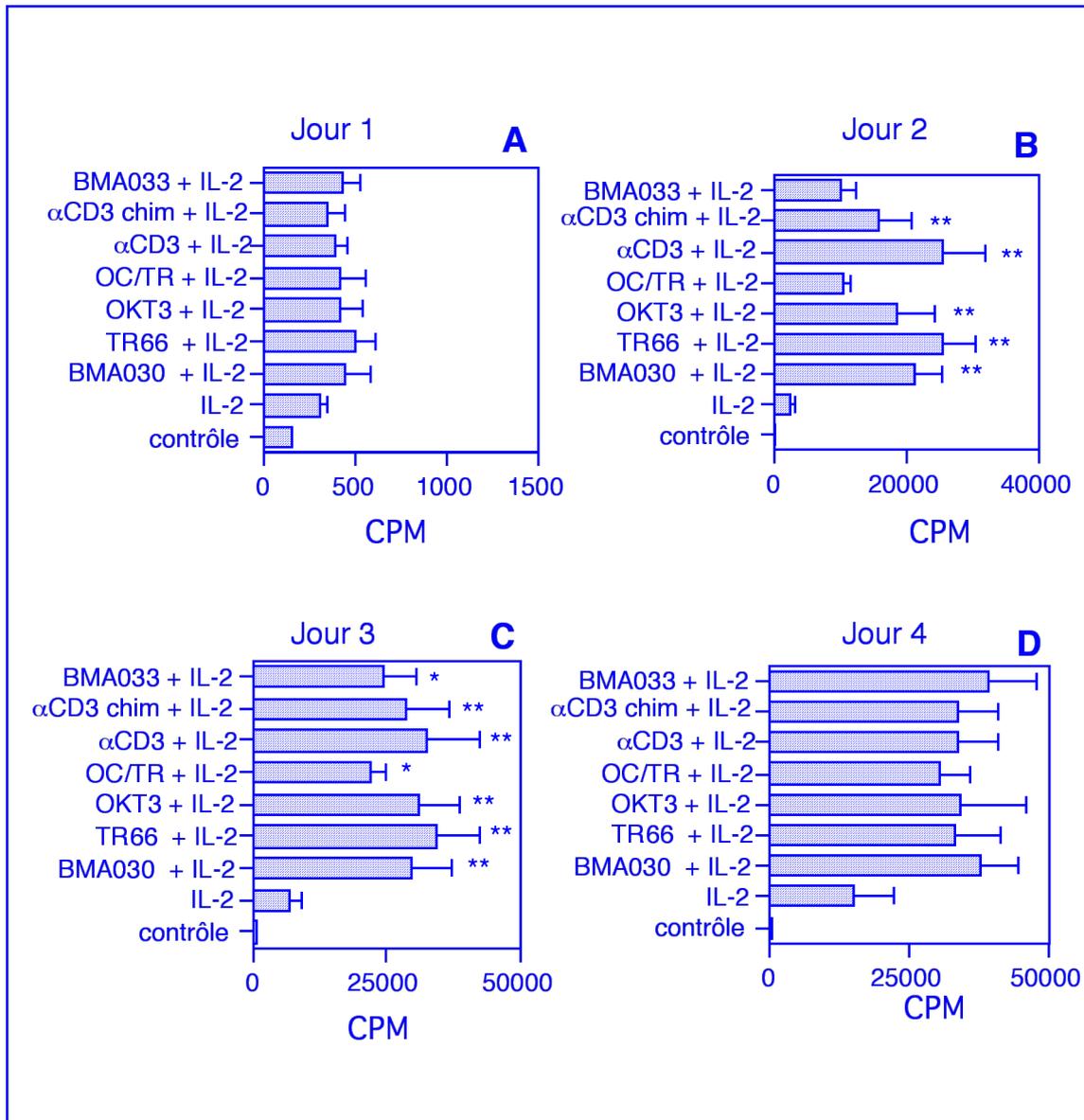
## 13.3. Résultats

### 13.3.1. Prolifération cellulaire

Les résultats de prolifération cellulaire obtenus dans trois cultures de lymphocytes en présence des anticorps anti-CD3 et d'IL-2 sont résumés dans la figure 13-1.

Dès le premier jour de culture, une prolifération cellulaire légèrement supérieure (> 300 CPM) à celle obtenue dans la condition contrôle est détectée dans les conditions de stimulations IL-2 et IL-2 + anticorps anti-CD3 ( $p < 0,05$ ) (figure 13-1 A). Au deuxième jour, on observe une différence très significative ( $p < 0,01$ ) entre la condition de culture en présence d'IL-2 seule ( $2.100 \pm 780$  CPM) et les conditions de culture en présence d'anticorps anti-CD3 (> 16.000 CPM) excepté pour les anticorps OC/TR et BMA033 (environ 10.000 CPM) (figure 13-1B). Au quatrième jour de culture, tous les anticorps anti-CD3 induisent une prolifération cellulaire semblable (> 30.000 CPM) (figure 13-1 D). A ce stade, aucune différence statistique (test ANOVA) entre les conditions de culture en présence des anticorps anti-CD3 + IL-2 et la condition de

culture en présence d'IL-2 seule n'est observée. Cependant dans les trois expériences, les valeurs obtenues en présence d'anticorps anti-CD3 sont supérieures à celles obtenues en présence d'IL-2 seule. Des résultats comparables sont obtenus lorsque les anticorps anti-CD3 sont fixés sur le fond des puits de culture (résultats non illustrés).

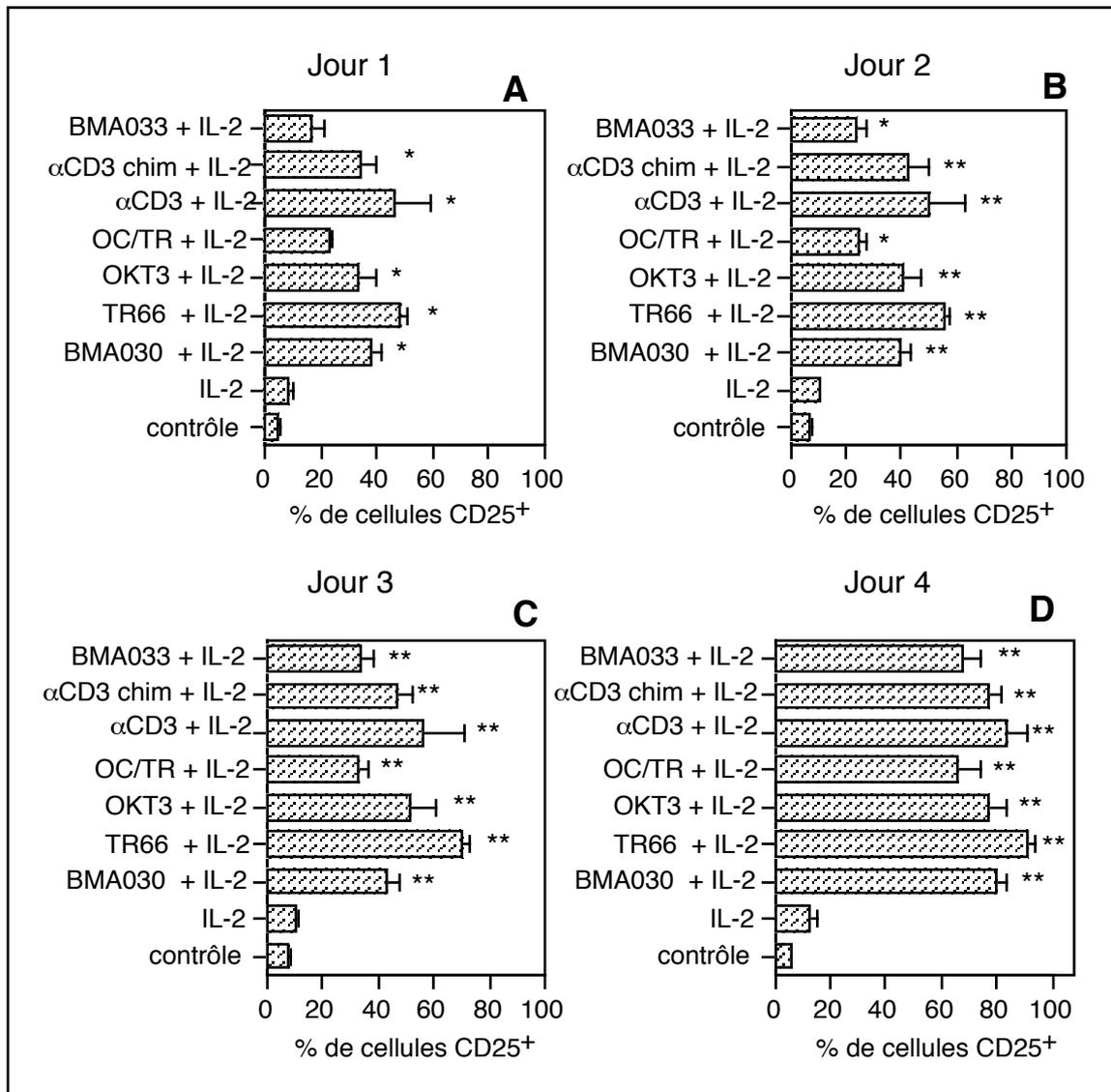


**Figure 13-1: Induction de la prolifération au cours de la culture et dans les différentes conditions expérimentales.**

Les anticorps anti-CD3 sont ajoutés au milieu de culture sous forme soluble (10 ng/ml) et chaque jour, la prolifération de  $2 \cdot 10^5$  cellules est évaluée par incorporation de thymidine tritiée après quatre heures d'incubation. Les valeurs (moyenne  $\pm$  erreur standard) de trois expériences indépendantes sont représentées. Les valeurs de prolifération induites par les différents anticorps anti-CD3 ont été comparées par un test statistique (ANOVA) à la valeur obtenue après une culture en présence d'IL-2 seule (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

### 13.3.2. Phénotype de surface

L'activation cellulaire est mise en évidence par la recherche de l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour IL-2 (CD25) (figure 13-2) et de l'acquisition d'un phénotype de cellules T mémoires (cellules CD45R0<sup>+</sup>) (figure 13-3).



**Figure 13-2:** Pourcentage de cellules exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'IL-2 (CD25) au cours de la culture et dans les différentes conditions expérimentales.

Les anticorps anti-CD3 sont ajoutés au milieu de culture sous forme soluble (10 ng/ml) et chaque jour, la détection du marqueur CD25 a été réalisée par cytométrie en flux après incubation des cellules en présence d'un anticorps anti-CD25-PE. Les valeurs (moyenne  $\pm$  écart type) de trois expériences sont représentées. Les pourcentages de cellules CD25<sup>+</sup> dans les cultures en présence des différents anticorps anti-CD3 ont été comparés par un test statistique (ANOVA) au pourcentage obtenu après une culture en présence d'IL-2 seule (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Dès le premier jour de la culture, un plus grand pourcentage de cellules expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'IL-2 (CD25) dans les conditions de culture en présence des anticorps anti-CD3 BMA030, TR66, OKT3,  $\alpha$ CD3 et  $\alpha$ CD3 chimérique ( $> 20\%$ ) par rapport à la condition contrôle ou en présence d'IL-2 seule ( $< 10\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (figure 13-2 A). Bien qu'aucune différence significative par rapport à la condition contrôle n'ait été établie par un test statistique ANOVA, le pourcentage de

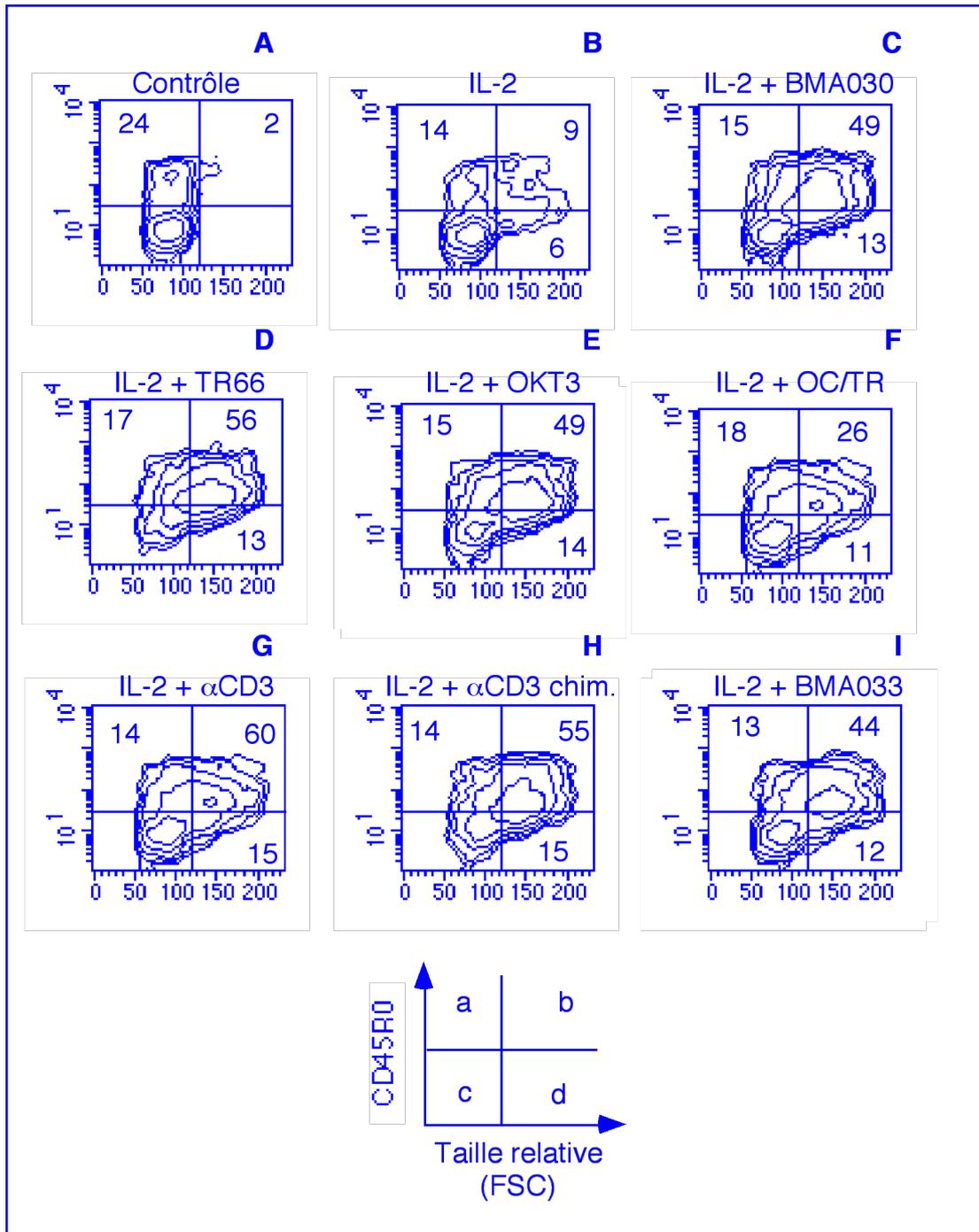
---

cellules CD25<sup>+</sup> est plus élevé en présence des anticorps OC/TR et BMA033 (< 10%) dans les trois expériences (figure 13-2 A). Le pourcentage de cellules CD25<sup>+</sup> s'accroît au cours du temps dans toutes les conditions de stimulation. Au quatrième jour, les différences entre les anticorps OC/TR, BMA033 et les autres anticorps anti-CD3 s'amenuisent.

Outre une augmentation du pourcentage de lymphocytes exprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur pour l'IL-2 (CD25), l'intensité de fluorescence émise par l'anticorps anti-CD25-PE augmente également illustrant une augmentation de la densité de ce marqueur à la surface des cellules (résultats non illustrés).

Des résultats similaires (pourcentage de cellules CD25<sup>+</sup> et intensité d'expression de ce marqueur) ont été observés lorsque les anticorps anti-CD3 ont été fixés sur le fond des puits de culture (résultats non illustrés).

Lors de trois expériences, le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD45R0 a été évalué au quatrième jour de la culture. En présence d'anticorps anti-CD3, la proportion des cellules CD45R0<sup>+</sup> augmente (> 40%) alors que cette proportion est comparable au pourcentage obtenu au moment de la mise en culture (résultats non illustrés) dans les deux autres conditions de culture (contrôle et IL-2 seule, < 30%) (figure 13-3). Signalons que la stimulation par l'anticorps bispécifique OC/TR induit la plus faible augmentation de pourcentage de cellules CD45R0<sup>+</sup>. Les résultats présentés dans la figure 13-3 montrent que les cellules de grande taille sont principalement des cellules CD45R0<sup>+</sup>. Notons que l'apparition de cellules de grande taille est généralement plus lente après stimulation par les anticorps OC/TR et BMA033 (résultats non illustrés). Le pourcentage de cellules CD45RA<sup>+</sup> diminue parallèlement à l'augmentation de cellules CD45R0<sup>+</sup> dans les conditions de culture en présence d'anticorps anti-CD3 (résultats non illustrés).

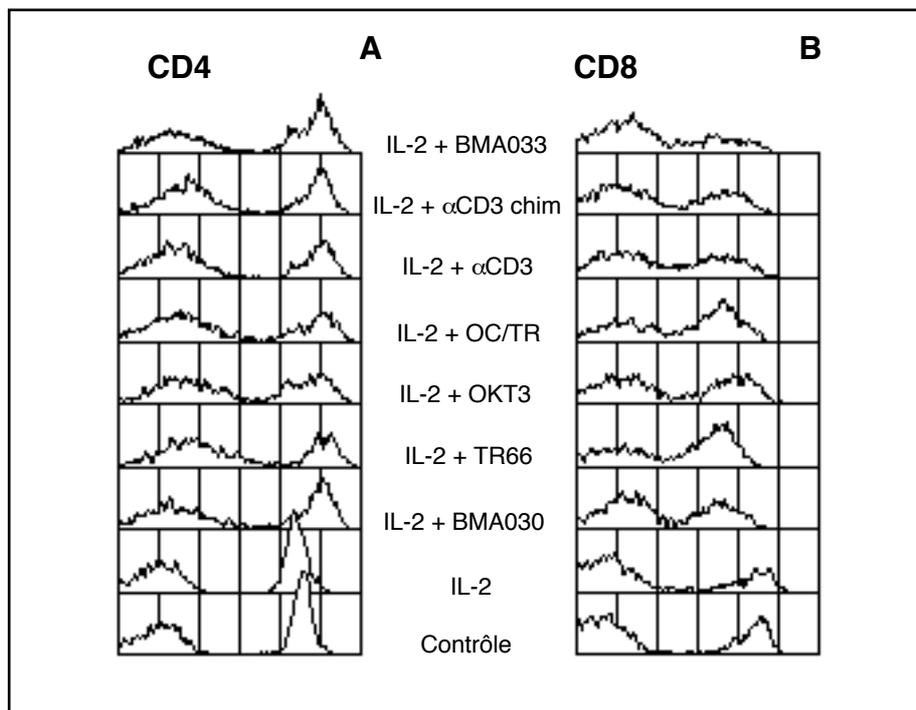


**Figure 13-3:** Expression du marqueur de CD45R0 en fonction de la taille (FSC) des cellules après une culture de quatre jours dans les différentes conditions expérimentales.

Les anticorps anti-CD3 sont utilisés sous forme soluble à une concentration de 10 ng/ml. Les résultats sont illustrés par des contours d'isodensité. (a): petites cellules CD45R0<sup>+</sup>; (b): grandes cellules CD45R0<sup>+</sup>; (c): petites cellules CD45R0<sup>-</sup>; (d): grandes cellules CD45R0<sup>-</sup>.

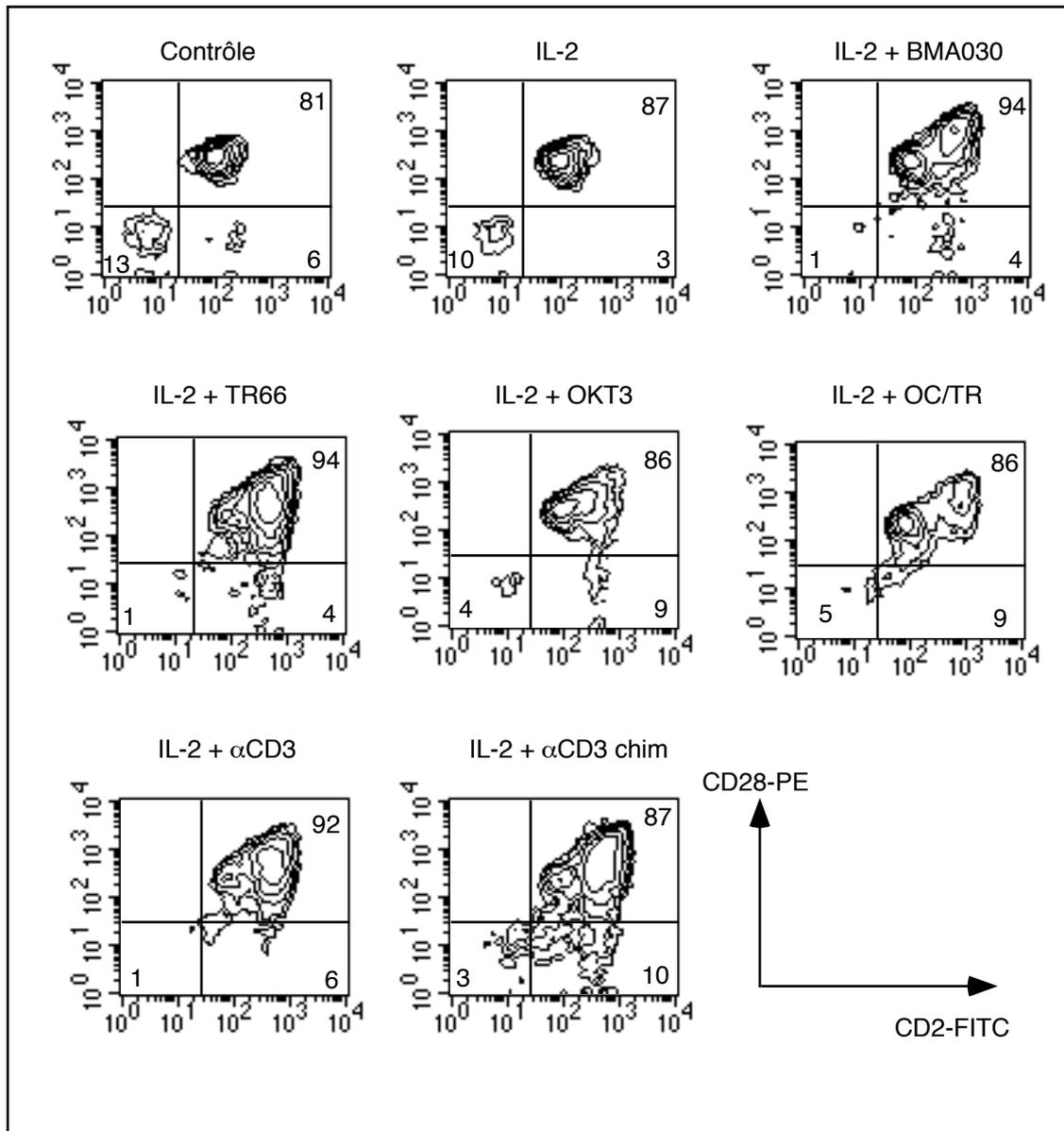
Comme nous l'avons montré dans le chapitre 2, la stimulation par l'anticorps anti-CD3 BMA030 induit une augmentation de l'intensité de l'expression des marqueurs CD2, CD4 et CD28. Les résultats illustrés dans la figure 13-4 montrent que l'augmentation de l'expression du marqueur CD4 est aussi observée avec les autres anticorps anti-CD3 bien qu'elle soit généralement plus faible après stimulation par l'anticorps bispécifique OC/TR. Par contre, après marquage par un anticorps anti-CD8-PE, l'intensité de fluorescence obtenue est plus faible après une culture en présence des anticorps anti-CD3 (figure 13-4).

De même, la moyenne de fluorescence émise par les anticorps anti-CD28-PE et CD2-FITC augmente lorsque les cellules sont cultivées en présence des anticorps anti-CD3 (figure 13-5). Les pourcentages de cellules CD28<sup>+</sup> et CD2<sup>+</sup> sont également plus élevés après une culture en présence d'IL-2 et des différents anticorps anti-CD3 par rapport aux pourcentages obtenus dans la condition contrôle ou en présence d'IL-2 seule (figure 13-5).



**Figure 13-4:** Expression des molécules CD4 (A) et CD8 (B) à la surface des lymphocytes après quatre jours de culture.

Les anticorps anti-CD3 sont utilisés sous forme soluble à une concentration de 10 ng/ml. La détection des molécules CD4 et CD8 a été réalisée par cytométrie en flux en utilisant respectivement un anticorps anti-CD4-FITC et anti-CD8-PE. Abscisse: intensité de fluorescence; ordonnée: nombre de cellules (total = 5.000 cellules).



**Figure 13-5:** Expression des marqueurs de CD28 et CD2 après une culture de quatre jours selon les différentes conditions expérimentales.

Les anticorps anti-CD3 sont utilisés sous forme soluble à une concentration de 10 ng/ml. La détection des marqueurs CD2 et CD28 a été réalisée par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-CD2-FITC et un anticorps anti-CD28-PE. Les résultats sont illustrés par des contours d'isodensité.

### 13.4. Discussion

L'activation des lymphocytes induite par les différents anticorps anti-CD3 a été estimée notamment par la mesure de la prolifération cellulaire. Tous les anticorps anti-CD3 génèrent une prolifération plus intense que la stimulation par de l'IL-2 seule. Cependant des différences dans la cinétique sont observées lorsque les lymphocytes sont cultivés en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR ou l'anticorps BMA033. Pour ces deux derniers, il faut attendre le troisième jour de culture pour observer une différence significative par rapport à la condition de culture en présence d'IL-2 seule alors que celle-ci est déjà visible au deuxième jour de culture pour les autres anticorps.

Récemment, Haagen et ses collaborateurs (1994) ont mis en évidence une stimulation des lymphocytes T après une culture en présence d'un anticorps bispécifique (anti-CD3 X anti-CD19). Leurs résultats de prolifération chez des donneurs normaux montrent, comme les nôtres, que le premier jour de la culture, la prolifération cellulaire est plus faible après stimulation par l'anticorps bispécifique par rapport à la stimulation par l'anticorps anti-CD3 parental. Le troisième jour de la culture, la prolifération est similaire pour les deux anticorps.

En présence des anticorps anti-CD3, le phénotype des lymphocytes change de manière plus importante qu'en présence d'IL-2 seule. En effet, une plus grande proportion de cellules expriment le CD25 et le CD28 et ceci de manière plus intense que les cellules non stimulées ou stimulées uniquement par de l'IL-2. De même, on observe une surexpression des marqueurs CD2 et CD4. Ces résultats ont déjà été amplement illustrés pour l'anticorps BMA030 dans les chapitres 3 et 4 de ce travail. Les résultats sont similaires pour tous les anticorps testés excepté une fois encore pour les anticorps OC/TR et BMA033. Pour ceux-ci, les changements phénotypiques sont plus lents ou moins marqués. Rappelons que toutes les molécules surexprimées ainsi que les sous-populations cellulaires en expansion interviennent dans l'activation ou la fonction cytotoxique des lymphocytes T (voir chapitres 3 et 4). Des différences dans l'induction de l'expression de marqueurs de surface (CD25 et CD69) par des variants isotypiques et idiotypiques de l'anticorps OKT3 ont été rapportées. Dans cette étude, l'augmentation de l'expression du CD69 était essentiellement dépendante de l'isotype de l'anticorps tandis que l'expression du CD25 dépendait également de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-CD3 (Woodle *et al.*, 1991). Nos résultats ont montré un accroissement de l'expression du CD25 similaire par l'anticorps  $\alpha$ CD3 et pour sa forme humanisée  $\alpha$ CD3 chim. Des expériences utilisant l'anticorps OKT3 et un anticorps OKT3

humanisé ont également mis en évidence une expression du CD25 semblable pour les deux anticorps (Woodle et al., 1992).

En résumé, tous les anticorps anti-CD3 induisent une prolifération cellulaire et l'acquisition de marqueurs de surface propres aux cellules T activées ou mémoires. Ces phénomènes semblent plus lents pour les anticorps OC/TR et BMA033.

---

**Chapitre 14:**  
**Effet des anticorps anti-CD3 sur l'inhibition de la croissance tumorale**

### **14.1. Introduction**

Le but principal de ce travail est de mettre en évidence les avantages d'une stimulation par un anticorps anti-CD3 dans une perspective d'immunothérapie anti-tumorale. Dans ce dernier chapitre, nous avons essayé d'estimer l'effet des différents anticorps dans une réponse anti-tumorale. L'action des lymphocytes stimulés par un anticorps anti-CD3 vis-à-vis de cellules tumorales peut être multiple. Les lymphocytes peuvent induire une lyse directe des cellules tumorales. Ils peuvent également agir par la sécrétion de cytokines induisant, à leur tour, la destruction ou l'arrêt de la croissance des cellules tumorales. Ces cytokines peuvent également stimuler l'activité cytotoxique d'autres populations lymphocytaires comme les cellules NK.

Le test d'inhibition de la croissance tumorale (Mosmann, 1983; Heo *et al.*, 1990), nous semble le mieux adapté pour estimer, dans une première approche, l'impact anti-tumoral des différents anticorps anti-CD3. En effet, ce test peut rendre compte de la destruction des cellules tumorales par des contacts cellulaires ou de l'inhibition de la croissance tumorale par sécrétion de facteurs solubles. L'effet de différents anticorps a été étudié au stade effecteur en les introduisant directement dans le test d'inhibition ou au stade précurseur en utilisant les anticorps pour pré-stimuler les lymphocytes avant de les mettre en présence des cellules tumorales.

### **14.2. Méthodologie**

L'inhibition de la croissance des cellules cibles OVCAR-3, IGROV1, A431 et CK2 a été mesurée par des tests colorimétriques MTT ou WTS1. Les cellules des lignées OVCAR-3 et IGROV1 expriment la molécule de surface MOv18 reconnue par

l'anticorps bispécifique OC/TR tandis que les deux autres lignées (A431 et CK2) ne l'expriment pas.

Les cellules effectrices et les cellules cibles ont été co-cultivées en présence d'IL-2 (50 U/ml). Les différents anticorps anti-CD3 sont ajoutés directement dans les puits de culture du test ou utilisés pour stimuler préalablement les lymphocytes du sang périphérique dans des cultures de quatre jours. Les cellules du clone de lymphocytes T (DM13) portant le marqueur CD4 ont également été utilisées comme cellules effectrices. Le test est arrêté lorsque les cellules tumorales cultivées seules sont à confluence (après cinq à sept jours de culture). Les tests sont réalisés en triplicata.

Les anticorps BMA033 et Leu-4 n'ont pas été utilisés dans cette série d'expériences car nous ne possédions pas ces anticorps en quantité suffisante.

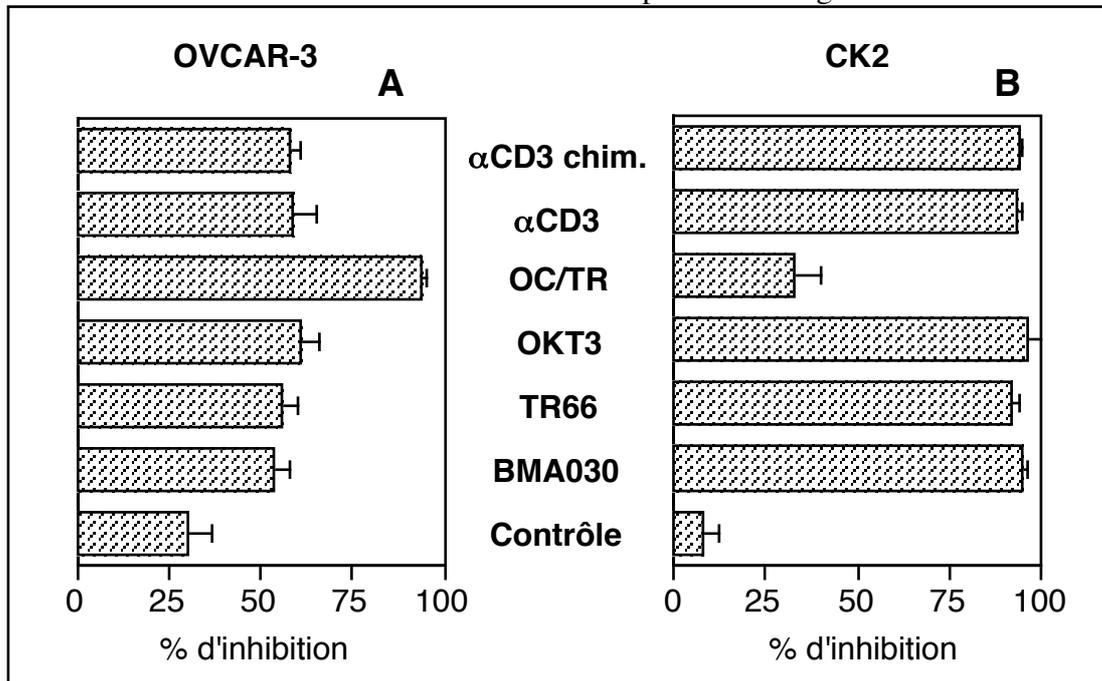
### 14.3. Résultats

L'inhibition de la croissance des cellules OVCAR-3 et CK2 par les PBL fraîchement isolés en présence des différents anticorps anti-CD3 est représentée dans la figure 14-1.

L'inhibition de la croissance de la lignée OVCAR-3 vaut environ 25% en présence des PBL seuls (figure 14-1 A) et celle des cellules CK2 est inférieure à 15% dans cette condition (figure 14-1 B). L'apport d'un anticorps anti-CD3 durant le test d'inhibition de croissance des lignées OVCAR-3 et CK2 accroît l'inhibition générée par les PBL. L'inhibition est similaire pour tous les anticorps anti-CD3, mais des différences sont observées en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR. En effet, l'inhibition de la lignée portant la molécule MOv18 (OVCAR-3) est plus importante en présence de cet anticorps (figure 14-1 A), tandis que l'inhibition de la lignée négative pour MOv18 (CK2) est plus faible dans cette condition expérimentale (figure 14-1 B). Ces expériences ont été réalisées pour un minimum de trois donneurs différents. Des résultats similaires à ceux observés pour les cellules CK2 ont été obtenus avec la lignée A431 (MOv18<sup>-</sup>). Un test de prolifération cellulaire a été réalisé en présence des différents anticorps anti-CD3 pour vérifier que les donneurs étudiés pouvaient répondre aux anticorps anti-CD3 IgG<sub>1</sub> (résultats non illustrés).

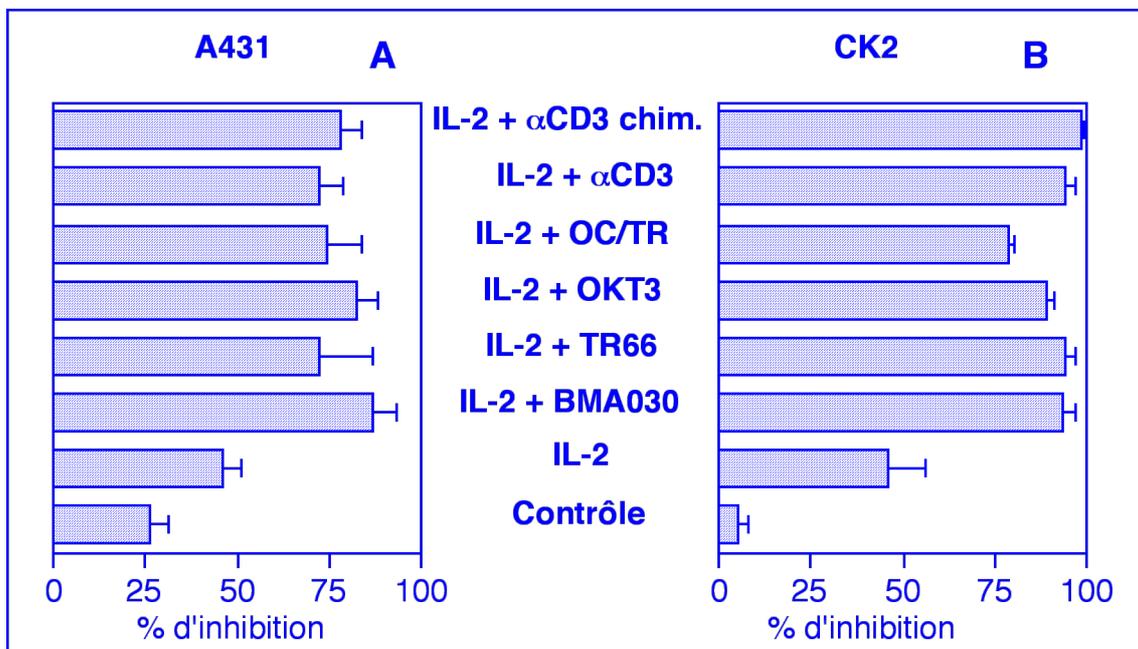
Dans une seconde série d'expériences, les PBL sont "pré-stimulés" par une culture de quatre jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + les différents anticorps anti-CD3. Après un lavage des PBL dans du milieu de culture sans anticorps anti-CD3, les PBL

sont ajoutés aux cultures de cellules cibles en présence d'IL-2. Les résultats d'inhibition de la croissance des cellules A431 et CK2 sont repris dans la figure 14-2.



**Figure 14-1:** Inhibition de la croissance des lignées OVCAR-3 (A) et CK2 (B) par les PBL en présence des différents anticorps anti-CD3.

Les pourcentages (moyenne  $\pm$  écart type) d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés. E : C = 2,5 :1 pour OVCAR-3 et 10:1 pour CK2.



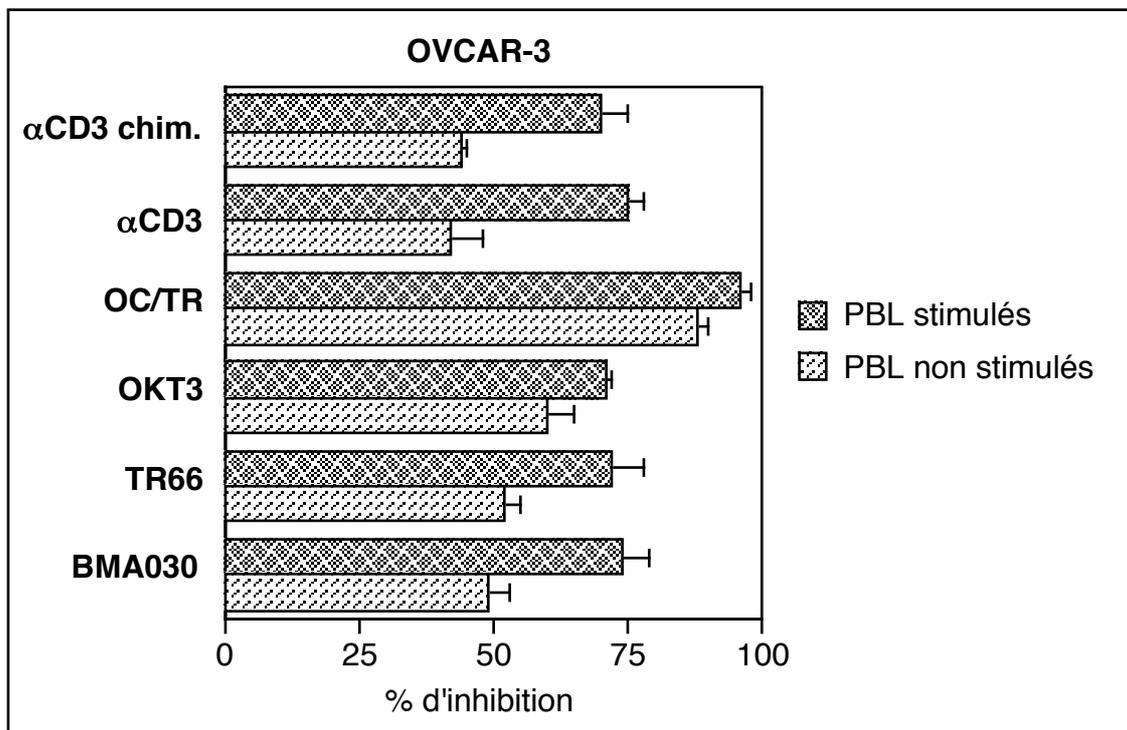
**Figure 14-2:** Inhibition de la croissance des cellules A431 (A) et CK2 (B) en présence de PBL pré-stimulés pendant quatre jours par les différents anticorps anti-CD3.

Les PBL sont cultivés pendant quatre jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + les différents anticorps anti-CD3. Après lavage, ils sont co-cultivés avec les cellules cibles en

présence d'IL-2. Les pourcentages (moyenne  $\pm$  écart type) d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés. E: C = 10:1.

La pré-culture des PBL en présence des anticorps annule la différence observée dans la figure 14-1 B pour l'anticorps bispécifique OC/TR. En effet, dans ce cas, l'inhibition de la croissance des cellules cibles A431 (figure 14-2 A) ou CK2 (14-2 B) générée par les PBL stimulés par l'anticorps OC/TR est similaire à celle observée pour les autres anticorps anti-CD3. Par contre, l'inhibition plus importante des cellules OVCAR-3 induite par l'anticorps bispécifique OC/TR est toujours visible en présence des PBL pré-stimulés (figure 14-3).

Lors d'une expérience, les PBL provenant du même donneur ont été utilisés directement dans le test d'inhibition ou stimulés pendant quatre jours par les anticorps anti-CD3 avant d'être additionnés au test d'inhibition de la croissance des cellules tumorales. Cette expérience a été réalisée avec les cellules cibles OVCAR-3 (figure 14-3). L'inhibition des cellules tumorales OVCAR-3 est plus importante lorsque les PBL sont pré-stimulés avant d'être ajoutés au test d'inhibition (figure 14-3).

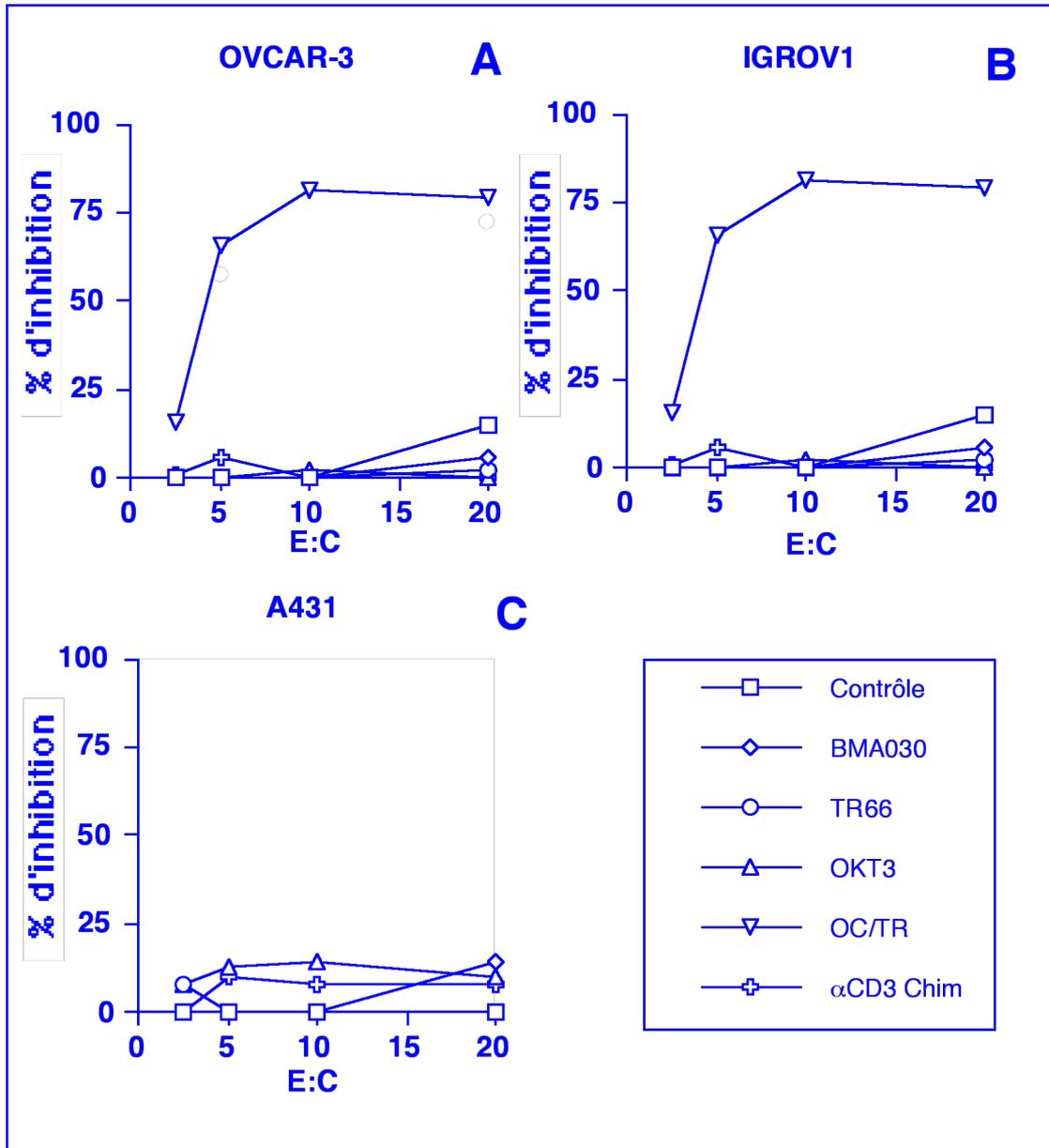


**Figure 14-3:** Inhibition de la croissance des cellules OVCAR-3 en présence de PBL stimulés ou non provenant du même donneur.

Après isolement, les PBL (non stimulés) sont directement additionnés aux cellules cibles OVCAR-3 en présence d'IL-2 et des anticorps anti-CD3. Dans l'autre condition expérimentale, les PBL (stimulés) sont cultivés pendant quatre jours en présence d'IL-2 et des différents anticorps anti-CD3 et après lavage sont ajoutés en présence d'IL-2 au

test d'inhibition de croissance des cellules OVCAR-3. Les pourcentages (moyenne  $\pm$  écart type) d'une expérience réalisée en triplicata sont représentés. E : C = 2,5.

L'inhibition de la croissance tumorale a également été étudiée en présence d'un clone de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (DM13). Les cellules cibles utilisées sont les lignées OVCAR-3 et IGROV1 (MOv18<sup>+</sup>) et la lignée A431 (MOv18<sup>-</sup>) (figure 14-4).



**Figure 14-4:** Inhibition de la croissance tumorale des cellules OVCAR-3 (A), IGROV1 (B) et A431 (C) en présence du clone de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (DM13) et des différents anticorps anti-CD3.

---

En présence de l'anticorps bispécifique (OC/TR), l'inhibition de la croissance des cellules tumorales OVCAR-3 (figure 14-4 A) et IGROV1 (figure 14-4 B) est importante (supérieure à 50% pour un rapport E : C = 5). Par contre, les lymphocytes T en présence des anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3 et  $\alpha$ CD3 chimérique) n'induisent pas d'inhibition de croissance de ces lignées tumorales. L'inhibition de croissance des cellules tumorales A431 qui ne sont pas reconnues par les anticorps bispécifiques est inférieure à 20% dans toutes les conditions expérimentales (figure 14-4 C).

#### 14.4. Discussion

La réponse anti-tumorale induite par des lymphocytes stimulés par de l'IL-2 et différents anticorps anti-CD3 a été estimée par un test d'inhibition de la croissance des cellules tumorales (Mosmann, 1983; Heo *et al.*, 1990). Nous avons choisi ce type de test car il permet de rendre compte de plusieurs phénomènes intervenant dans la destruction des cellules tumorales (cytolyse directe par les lymphocytes et sécrétion de cytokines possédant une activité anti-tumorale). A notre connaissance, la comparaison de l'inhibition de la croissance tumorale induite par des lymphocytes cultivés en présence de différents anticorps anti-CD3 n'a pas encore été rapportée dans la littérature. Par contre, des études comparatives de l'activité cytotoxique générée par des anticorps anti-CD3 et mesurée par un test de relargage de chrome ont été réalisées. Il s'agit essentiellement d'études d'activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 (Leeuwenberg *et al.*, 1985; Jacobs *et al.*, 1996). Dans ce type d'études, l'isotype de l'anticorps intervient de façon prédominante puisqu'il détermine la liaison sur les récepteurs Fc présents à la surface des cellules tumorales. Dans notre modèle d'inhibition de la croissance tumorale, l'activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 n'intervient pas car les lignées tumorales que nous avons utilisées ne portent pas de récepteur Fc $\gamma$ . Par contre, les lignées OVCAR-3 et IGROV1 expriment la molécule MOv18 et peuvent donc être sensibles à une activité cytotoxique induite par l'anticorps bispécifique OC/TR.

La présence des anticorps anti-CD3 et d'IL-2 induit une inhibition de la croissance tumorale des lignées A431, OVCAR-3 et CK2 plus importante que dans la condition de culture en présence uniquement d'IL-2. Comme attendu, l'anticorps

bispécifique est plus efficace que les autres anticorps dans l'inhibition de la croissance des cellules tumorales MOv18<sup>+</sup> (OVCAR-3). Par contre, son efficacité est moindre contre les cellules MOv18<sup>-</sup> (A431 et CK2). Pour certaines expériences, les PBL ont été "pré-stimulés" par une culture de quatre jours en présence d'IL-2 et des différents anticorps anti-CD3, avant d'être introduits dans le test d'inhibition de la croissance tumorale. Cette "pré-stimulation" efface les différences entre l'anticorps OC/TR et les autres anticorps excepté contre la lignée OVCAR-3. Il semble donc, une fois de plus, que l'anticorps bispécifique soit capable d'induire une stimulation comparable aux autres anticorps, mais que sa cinétique d'induction soit plus lente.

L'activité anti-tumorale décrite ci-dessus tient compte de l'activité des lymphocytes T et des cellules NK puisque ces deux populations cellulaires n'ont pas été séparées. Un clone de lymphocytes T (DM13) a été utilisé afin d'estimer plus particulièrement l'effet anti-tumoral de lymphocytes T en présence d'anticorps anti-CD3. Dans ce cas, une inhibition de la croissance tumorale des cellules OVCAR-3 et IGROV1 n'est observée qu'en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR.

Il est possible que l'activité anti-tumorale des PBL ne soit pas directement due aux lymphocytes T, mais dépende de l'activité cytotoxique des cellules NK activées par des cytokines sécrétées par les lymphocytes T. Alternativement, des cytokines, telles que le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  sécrétées par les lymphocytes T et les cellules NK activés, pourraient être responsables de l'inhibition de la croissance tumorale. Les cellules du clone DM13 en présence des anticorps anti-CD3 sont peut-être incapables de produire des quantités suffisantes de ces cytokines pour induire une inhibition de la croissance tumorale. Ces deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives.

En résumé, une augmentation de l'activité anti-tumorale est observée en présence de tous les anticorps anti-CD3. La réponse induite par l'anticorps bispécifique OC/TR est plus faible excepté lorsque les cellules tumorales expriment la molécule MOv18 ou lorsque les cellules sont stimulées par l'anticorps OC/TR et l'IL-2 quatre jours avant de tester leur activité anti-tumorale.

## Discussion de la troisième partie

L'intérêt d'une stimulation des lymphocytes par un anticorps anti-CD3 a été démontré dans les deux premières parties de ce travail. Actuellement, de nombreux anticorps anti-CD3 dont la plupart sont d'origine murine sont disponibles. Certains de ceux-ci ont été modifiés afin de les rendre mieux adaptés à des protocoles d'immunothérapie. Dans cette optique, "l'humanisation" des anticorps murins et la production d'anticorps bispécifiques ont été réalisées. La première transformation permet de minimiser les réactions immunitaires dirigées contre un anticorps murin. La seconde consiste à réunir au sein d'un même anticorps un site de reconnaissance du complexe CD3 et un site de reconnaissance d'une molécule présente à la surface de cellules tumorales, ce qui permet de créer un pont entre le lymphocyte T et la cellule tumorale. Cette profusion d'anticorps anti-CD3 de types différents nous a conduit à évaluer le potentiel d'activation de plusieurs anticorps anti-CD3. Nous avons inclus, dans cette étude, un anticorps chimérique comprenant une région constante d'origine humaine ( $\alpha$ CD3 chimérique) et un anticorps bispécifique (OC/TR, reconnaissant d'une part le complexe CD3 et d'autre part la molécule MOv18 présente à la surface de cellules de carcinome ovarien). Signalons que cet anticorps bispécifique fait déjà l'objet d'essais cliniques de phase I et II (Bolhuis *et al.*, 1992; Canevari *et al.*, 1995). Les résultats obtenus pour les différents anticorps sont résumés dans le tableau III-2.

Différents auteurs ont montré que le mode d'activation des lymphocytes T par des anticorps anti-TCR/CD3 ne dépendait pas uniquement de leur isotype, mais de nombreux paramètres dont notamment l'épitope reconnu (Schlitt *et al.*, 1989; Woodle *et al.*, 1991). Les co-signaux requis pour la stimulation par les anticorps anti-CD3 peuvent être également différents. Par exemple, l'anticorps OKT3 immobilisé par un anticorps anti-immunoglobulines de souris nécessite la présence d'IL-1 $\beta$  produite par les monocytes pour induire la prolifération des lymphocytes T alors que d'autres anticorps anti-CD3 tels que UCHT1 génèrent une prolifération importante en absence de monocytes (Verwilghen *et al.*, 1991). Au vu de l'importance des monocytes dans l'activation par un anticorps anti-CD3, non seulement par la sécrétion de cytokines,

mais aussi par la fixation des anticorps anti-CD3 sur leur récepteur Fc, nous avons choisi de stimuler les lymphocytes en présence de monocytes. Comme les anticorps murins IgG<sub>1</sub> ne se lient pas aux monocytes de toute la population humaine, nous avons sélectionné les donneurs possédant des monocytes capables de les fixer. Nous avons précédemment démontré ainsi que d'autres (Tovar *et al.*, 1988) l'intérêt de la présence d'IL-2 lors d'une stimulation par un anticorps anti-CD3. Les cultures des lymphocytes ont donc été réalisées en présence d'IL-2.

Anticorps	Avidité relative	Flux calciques	Modulation	Activation	Activité anti-tumorale
BMA030	++	++	+	++	++
TR66	+++	++	+	++	++
OKT3	++++	-/+	+	++	++
OC/TR	+	-/+	-	+	+
αCD3	ND	++	+	++	++
αCD3 chimérique	ND	++	+	++	++
BMA033	ND	-/+	-	+	ND
Leu-4	ND	-/+	ND	ND	ND

**Tableau III-2:** Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour les différents anticorps anti-CD3 utilisés.

L'avidité relative a été déterminée par des expériences de compétition de la liaison des anticorps au complexe CD3. Dans ce tableau sont repris les résultats des flux calciques induits par les anticorps anti-CD3 seuls. Après liaison croisée par un second anticorps, tous les anticorps génèrent des flux calciques similaires. L'activation cellulaire a été estimée par la mesure de la prolifération cellulaire et par l'analyse du phénotype de surface. L'activité anti-tumorale a été mesurée dans des tests d'inhibition de la croissance tumorale par des PBL stimulés par les différents anticorps. Le sigle + comparé au sigle ++ dans ces deux dernières colonnes ne signifie pas une activation ou une inhibition moins importante, mais plus lente à établir. L'induction de phosphorylation de résidus tyrosines n'est pas reprise dans ce tableau car les résultats sont semblables pour tous les anticorps. ND = non déterminé.

Nous n'avons pas établi de corrélation étroite entre l'efficacité de la liaison, entre l'anticorps anti-CD3 et le complexe CD3, et l'activation des lymphocytes par les anticorps anti-CD3, excepté pour l'anticorps bispécifique OC/TR. La liaison plus faible de cet anticorps au complexe CD3 est due à sa reconnaissance monovalente du CD3. Signalons que Zhu et Carter (1995) ont démontré une corrélation entre la force de

liaison et l'induction de la prolifération cellulaire grâce à un variant d'un anticorps anti-CD3 humanisé. Cependant, ils ont également montré que la force de la liaison entre le complexe CD3 et l'anticorps n'intervenait pas dans l'induction de l'activité cytotoxique *in vitro*. Les expériences de compétition de la liaison au complexe CD3 que nous avons réalisées montrent que les épitopes reconnus par les quatre anticorps testés (BMA030, OKT3, OC/TR et TR66) sont soit identiques, soit proches les uns des autres.

Des différences majeures sont observées dans l'induction des flux calciques qui suivent la liaison de l'anticorps sur le complexe CD3. En effet, les anticorps peuvent être divisés en deux groupes suivant qu'ils sont capables d'induire une mobilisation importante du calcium seul (BMA030, TR66,  $\alpha$ CD3 et  $\alpha$ CD3 chim.) ou après une liaison croisée induite par un second anticorps (OKT3, OC/TR, BMA033 et Leu-4). Notons que deux des anticorps (OC/TR et BMA033) peu efficaces pour l'induction d'un flux calcique sont également plus lents à induire une prolifération cellulaire ou l'expression du CD25. Par contre, l'anticorps OKT3 induit une activation des lymphocytes T similaire aux autres anticorps alors que la détection de flux calciques pour cet anticorps est faible ou indécélable. Cette absence de corrélation entre l'induction de flux calcique et l'activation des lymphocytes T a déjà été rapportée (Roosnek *et al.*, 1987). La discordance entre les deux types de propriétés est peut-être en relation avec la concentration en anticorps utilisée dans l'étude des flux calciques. Celle-ci correspond aux concentrations rapportées dans la littérature (Gelfand *et al.*, 1988; Vandenberghe et Ceuppens, 1990), mais est cent fois supérieure à celle nécessaire à la prolifération et à l'expression des marqueurs d'activation.

Il est intéressant de constater que l'anticorps bispécifique OC/TR n'induit pas de modulation du complexe CD3. Cette absence de modulation est importante car la persistance de l'anticorps à la surface des cellules est nécessaire à sa fonction de lien entre la cellule effectrice et la cellule cible. Le fait qu'aucune modulation du complexe CD3 ne soit observée en présence des anticorps OC/TR et BMA033 et que ceux-ci montrent une cinétique d'activation des lymphocytes plus lente que les autres anticorps suggère l'existence de voies de signalisation via le complexe CD3/TCR. Les anticorps OC/TR et BMA033 n'utiliseraient qu'une seule voie de signalisation. Cette voie serait indépendante de la modulation du complexe CD3 et ne nécessiterait pas des concentrations en calcium élevées. Les autres anticorps (BMA030, OKT3, TR66,  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD3 chim.) transmettraient le signal d'activation par deux voies distinctes dont une nécessiterait la modulation du complexe CD3. L'utilisation combinée des deux voies de signalisation permettrait une cinétique plus rapide de l'activation des lymphocytes T. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse. Par exemple, il serait intéressant de comparer la présence de facteurs de transcription intervenant dans la stimulation via le TCR dans des conditions permettant

ou bloquant la modulation de ce complexe. Signalons que plusieurs voies de signalisation couplées au TCR ont déjà été décrites (Cantrell, 1994) et que des expériences réalisées avec d'autres récepteurs (récepteur pour IL-1 $\beta$  et pour le TNF  $\alpha$ ) ont montré que la modulation du récepteur semble influencer la voie de signalisation empruntée (Andrieu *et al.*, 1995; Bonizzi et Bours, communication personnelle).

En résumé, malgré des différences dans l'induction des flux calciques et dans la cinétique d'activation des lymphocytes, tous les anticorps anti-CD3 sont capables de générer une stimulation des lymphocytes qui peut conduire à l'induction d'une réponse anti-tumorale.

## Résumé des résultats personnels et conclusions

Le système immunitaire est potentiellement capable d'éliminer des tumeurs. Cependant, dans de nombreux cas, il est évident qu'une manipulation de la réponse immunitaire anti-tumorale est nécessaire pour générer une réponse efficace et utilisable dans le traitement de patients cancéreux. Notre travail s'inscrit dans cette perspective de stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans un premier temps, nous avons comparé la stimulation de lymphocytes du sang périphérique cultivés pendant quatre jours en présence d'IL-2 ou en présence d'IL-2 et d'anticorps anti-CD3. Ensuite, nous avons étudié différents anticorps anti-CD3 afin de déterminer si la stimulation lymphocytaire induite par ceux-ci était dépendante du type d'anticorps utilisé. Brièvement, rappelons les principaux résultats obtenus:

- La prolifération cellulaire, principalement des lymphocytes T, est plus importante lorsque les lymphocytes sont cultivés en présence d'anticorps anti-CD3 et d'IL-2. En combinaison avec l'IL-2, tous les anticorps anti-CD3 que nous avons testés sont capables d'induire une prolifération plus intense que l'IL-2 seule. Cependant l'anticorps bispécifique OC/TR et l'anticorps BMA033 nécessitent des temps de culture plus longs pour obtenir des niveaux de prolifération similaires à ceux obtenus en présence des anticorps BMA030, TR66, OKT3,  $\alpha$ CD3 et  $\alpha$ CD3 chimérique.

- La prolifération préférentielle des lymphocytes T induit une augmentation de la proportion de lymphocytes T dans la condition de culture en présence d'IL-2 et un anticorps anti-CD3 au détriment des cellules NK et des lymphocytes B. De plus, cette condition de culture provoque un accroissement du nombre de lymphocytes possédant un phénotype de cellules activées (CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) ou de cellules T mémoires (CD45R0<sup>+</sup>). Notons également une expression accrue de molécules d'adhésion telles que le CD2 et LFA-1. En présence d'IL-2 seule, ces modifications sont nettement plus faibles ou inexistantes. Les changements de phénotype de surface sont similaires quel que soit l'anticorps anti-CD3 utilisé excepté que l'anticorps bispécifique

---

OC/TR et l'anticorps BMA033 induisent ces phénomènes plus lentement ou plus faiblement.

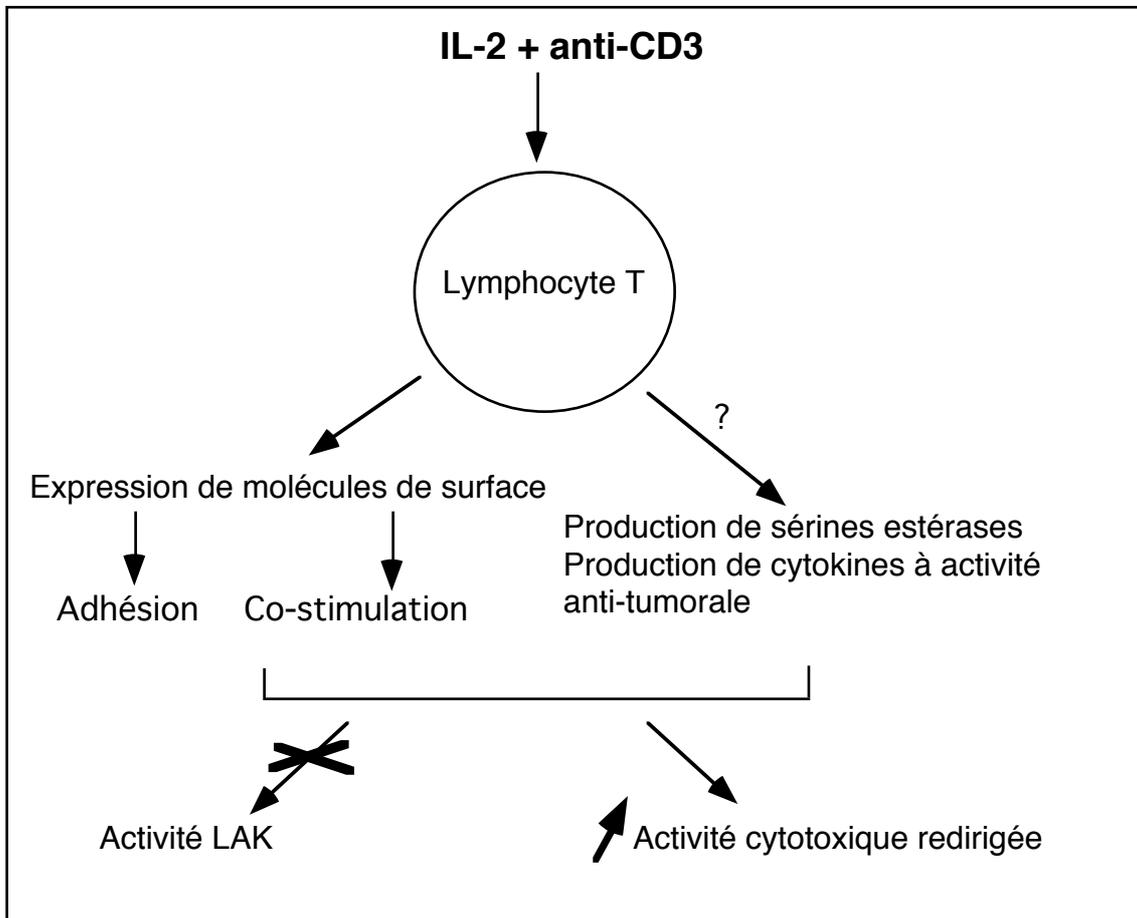
- La stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 augmente le potentiel cytotoxique des lymphocytes. Cette augmentation se traduit par une production accrue de sérine estérases et par une sécrétion de facteurs solubles induisant une inhibition de la croissance de cellules tumorales plus importante comparativement aux cultures en présence d'IL-2 seule. Une inhibition de la croissance tumorale plus intense que celle obtenue en présence d'IL-2 seule, est observée en présence de tous les anticorps anti-CD3. Cependant, une fois de plus, celle-ci est plus lente à obtenir en présence de l'anticorps OC/TR.

- La mise au point d'un tri des lymphocytes T par champ magnétique (système MACS), nous a permis de déterminer que les lymphocytes T n'acquièrent pas d'activité cytotoxique de type LAK. Par contre, stimulés par un anticorps anti-CD3, les lymphocytes T développent une activité cytotoxique redirigée par un anticorps anti-CD3 ou un anticorps bispécifique plus élevée que les lymphocytes activés uniquement en présence d'IL-2.

- Les résultats repris ci-dessus montrent que tous les anticorps anti-CD3 testés sont capables de générer une activation des lymphocytes T bien que les anticorps OC/TR et BMA033 induisent des cinétiques d'activation plus lentes. Ces deux anticorps ainsi que l'anticorps OKT3 sont de faibles inducteurs de flux calciques en comparaison avec les autres anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66,  $\alpha$ CD3 et  $\alpha$ CD3 chimérique). Signalons que l'anticorps OC/TR reconnaît de manière monovalente le complexe CD3, contrairement aux autres anticorps qui possèdent un site de reconnaissance bivalent. Ce mode de reconnaissance se traduit notamment par une force de liaison plus faible au complexe CD3 comme le montrent les expériences d'inhibition de la liaison anticorps/complexe CD3 réalisées avec les anticorps BMA030, TR66, OKT3 et OC/TR.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail nous permettent de répondre par l'affirmative à la question: l'activation des lymphocytes par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 présente-t-elle, dans une optique anti-tumorale, des avantages sur la stimulation par de l'IL-2 seule? Les effets de la stimulation des lymphocytes T par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 sont résumés dans la figure C-1. Ceux-ci ont été étudiés, dans un premier temps, en présence de l'anticorps anti-CD3 BMA030 et ont été reproduits avec d'autres anticorps anti-CD3. Deux de ces anticorps, l'anticorps bispécifique OC/TR et l'anticorps humanisé  $\alpha$ CD3 chimérique, sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont adaptés à des protocoles d'immunothérapie. Le premier, par ses deux sites de reconnaissances, permet la liaison d'un lymphocyte T avec une cellule

tumorale et le deuxième permet de minimiser la réaction immunitaire dirigée contre un anticorps xénogène lorsqu'il est injecté chez l'homme.



**Figure C-1:** Illustration de l'activation des lymphocytes T par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3.

Bien que l'induction d'une activité anti-tumorale de type LAK suite à une culture en présence d'anticorps anti-CD3 ait déjà été décrite (Ting *et al.*, 1988; Ochoa *et al.*, 1989), notre mode de stimulation en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3 n'augmente pas l'activité LAK obtenue en présence uniquement d'IL-2. Les expériences rapportées dans la littérature indiquent que les cellules NK sont responsables principalement de cette activité cytotoxique (Ortaldo *et al.*, 1986; Hermann *et al.*, 1990). Nos résultats confirment cette observation puisque les lymphocytes T, contrairement aux cellules NK, ne sont pas capables de lyser des lignées tumorales (Daudi, K562) décrites comme étant sensibles à l'activité LAK. Rappelons que l'activité cytotoxique non-spécifique des cellules LAK n'est pas uniquement dirigée contre des cellules tumorales, mais également, dans une proportion plus faible, contre des cellules normales autologues (Sondel *et al.*, 1986). Dans nos expériences, les lymphocytes T ne

---

semblent pas acquérir une activité cytotoxique non spécifique qui pourrait être dirigée contre des cellules normales, du moins cette activité n'est pas détectable dans un test de quatre heures.

Cependant, les lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 acquièrent une activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique plus importante que les lymphocytes T stimulés par de l'IL-2 seule. Ce type d'activité cytotoxique présente l'avantage de pouvoir contourner le problème du spectre réduit de tumeurs sensibles à l'activité LAK. En effet, les résultats positifs d'une thérapie adoptive par cellules LAK sont essentiellement observés chez des patients atteints de mélanomes, de cancers du côlon ou du rein (Rosenberg, 1992). Par contre, toutes les tumeurs dont un antigène spécifique a été identifié sont susceptibles d'être la cible de lymphocytes T cytotoxiques redirigés par un anticorps bispécifique. Ce mode de cytotoxicité permet, après une stimulation polyclonale touchant théoriquement tous les lymphocytes T, d'induire une activité anti-tumorale spécifique des cellules tumorales.

Malgré quelques travaux rapportant la présence d'activité cytotoxique redirigée de lymphocytes non stimulés (Perrez *et al.*, 1985; Azuma *et al.*, 1992), l'activation optimale des lymphocytes est un paramètre important pour l'obtention d'une activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique. Nous avons démontré l'intérêt d'une stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 en comparaison avec la stimulation par de l'IL-2 seule. La différence constatée entre les deux modes de stimulation peut s'expliquer par un plus grand pourcentage de cellules exprimant ou sur-exprimant des molécules de surface particulièrement importantes dans l'induction de l'activité cytotoxique. Par exemple, l'expression accrue de molécules d'adhésion, constatée après une culture des lymphocytes en présence d'IL-2 et d'un anticorps anti-CD3, renforce le contact entre la cellule effectrice et la cellule cible. L'importance de ces molécules dans l'activité cytotoxique redirigée par un anticorps bispécifique a été mise en évidence par l'utilisation d'anticorps anti-molécule d'adhésion durant le test de cytotoxicité (Ferrini *et al.*, 1994). La transmission de signaux de co-stimulation, notamment via le CD28, intervient également dans ce type de cytotoxicité. D'ailleurs, Renner et ses collaborateurs (1995) ont montré qu'une combinaison de deux anticorps bispécifiques, l'un liant le CD3 et l'autre liant la molécule CD28 (tous deux reconnaissant également le même marqueur sur la cellule tumorale) permettait une lyse plus efficace des cellules tumorales. Une autre possibilité expliquant le potentiel cytotoxique accru des lymphocytes activés par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 est l'augmentation de la production de sérines estérases, molécules intervenant dans le phénomène de lyse. La participation de cytokines sécrétées par les lymphocytes activés dans le processus de cytotoxicité induit par un anticorps bispécifique a déjà été décrite (Segal *et al.*, 1992). Nous avons constaté une sécrétion de cytokines possédant un pouvoir anti-tumoral.

---

Cependant, tout comme la production de sérines estérases, nous n'avons pas prouvé directement qu'elle était dépendante de la présence de lymphocytes T.

Un des problèmes de l'immunothérapie adoptive est la migration des cellules effectrices au site de la tumeur. L'utilisation de lymphocytes T comme cellules effectrices plutôt que les cellules NK permettrait de diminuer ce problème puisque leur capacité de recirculation est plus importante que celle des cellules NK (Hamann, 1992). Curti et ses collègues (1993) ont montré une accumulation de lymphocytes T au site de la tumeur après l'injection d'IL-2 et de cellules stimulées *in vitro* par un anticorps anti-CD3 à des patients atteints de cancer. L'absence de réponse anti-tumorale dans cette étude, malgré la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur indique que les lymphocytes ont besoin d'un signal supplémentaire pour induire la lyse des cellules tumorales. Ce signal pourrait être apporté par un anticorps bispécifique qui permettrait la reconnaissance de la cellule tumorale.

Le choix de l'anticorps anti-CD3 influence surtout la cinétique de la stimulation des lymphocytes T. De manière intéressante, l'anticorps humanisé  $\alpha$ CD3 chimérique génère une activation des lymphocytes T comparable à son homologue murin ( $\alpha$ CD3) tout en minimisant les possibilités d'une réaction immunitaire dirigée contre lui. La version bispécifique de cet anticorps (OC/TR,  $\alpha$ CD3 X anti-MOv18) induit une réponse plus lente. Cependant, notons que cet anticorps ne provoque pas de modulation du complexe CD3 et persiste à la surface des cellules, contrairement à la plupart des autres anticorps testés. Il reste donc disponible pour son rôle de pont entre le lymphocyte T et la cellule tumorale.

En conclusion, la stimulation par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3 est particulièrement bien adaptée à l'induction d'une réponse anti-tumorale spécialement dans des protocoles d'immunothérapie utilisant des anticorps bispécifiques. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue les effets immunosuppresseurs et toxiques des anticorps anti-CD3, c'est pourquoi les conditions de stimulation (doses, présence de signaux de co-stimulation...) doivent être minutieusement déterminées afin d'induire uniquement ou essentiellement les effets désirés.

**Abbas AK**, Lichtman AH and Pober JS (1994). Tumor necrosis factor. Cellular and Molecular Immunology. Second Edition. 245-249.

**Abts H**, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A and Tesch H (1989). CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. J. Immunol. Methods 125, 19-28.

**Adler A**, Chervenick PA, Whiteside TL, Lotzova E and Herberman RB (1988). Interleukin 2 induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in the peripheral blood and bone marrow of acute leukemia patients. I. Feasibility of LAK generation in adult patients with active disease and in remission. Blood 71, 709-716.

**Aebersold P**, Carter CS, Hyatt C, Johnson S, Ottaway K, Leitman SF and Rosenberg SA (1988). A simplified automated procedure for generation of human lymphokine-activated killer cells for use in clinical trials. J. Immunol. Methods 112, 1-7.

**Ahmed R** and Gray D (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science 272, 54-60

**Aichele P**, Hengartner H, Zinkernagel RM and Schulz M (1990). Antiviral cytotoxic T cell response induced by in vivo priming with a free synthetic peptide. J. Exp. Med. 171, 1815-1820.

**Akbar AN**, Terry L, Timms A, Beverley PCL and Janossy G (1988). Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. J. Immunol. 140, 2171-2178.

**Alarcon B**, Ley SC, Sanchez-Madrid F, Blumberg RS, Ju ST, Fresno M and Terhorst C (1991). The CD3- $\gamma$  and CD3- $\delta$  subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. EMBO J. 10, 903-912.

**Alderson MR**, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F and Lynch DH (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J. Exp. Med. 181, 71-77.

**Anderson CL** and Looney RJ (1986). Human leukocyte IgG Fc receptors. Immunol. Today 7, 264-266.

**Anderson CL** (1989). Structural and functional polymorphism of human Fc receptor for IgG. Chem. Immunol. 47, 1-20.

**Anderson PM**, Bach FH and Ochoa AC (1988). Augmentation of cell number and LAK activity in peripheral blood mononuclear cells activated with anti-CD3 and interleukin-2. Cancer Immunol. Immunother. 27, 82-88.

**Anderson PM**, Crist W, Hasz D, Carroll AJ, Myers DE and Uckun FM (1992)<sup>a</sup>. G19.4 ( $\alpha$ CD3) X B43 ( $\alpha$ CD19) monoclonal antibody heteroconjugate triggers CD19 antigen-specific lysis of t(4:11) acute lymphoblastic leukemia cells by activated CD3 antigen-positive cytotoxic T cells. Blood 80, 2826-2834.

**Anderson PM**, Ochoa AC, Ramsay NKC, Hasz D and Weisdorf D (1992)<sup>b</sup>. Anti-CD3 + interleukin-2 stimulation of marrow and blood: comparison of proliferation and cytotoxicity. Blood 80, 1846-1853.

**Andrieu N**, Salvayre R, Jaffr  zou J-P and Levade T (1995). Low temperatures and hypertonicity do not block cytokine-induced stimulation of the sphingomyelin pathway but inhibit nuclear factor- $\kappa$ B activation. J. Biol. Chem. 270, 24518-24524

**Andris F**, Van Mechelen M, De Mattia F, Baus E, Urbain J and Leo O (1996). Induction of T-cell unresponsiveness by anti-CD3 antibodies occurs

independently of co-stimulatory functions. Eur. J. Immunol. 26, 1187-1195.

**Armitage RJ** (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. Current Opin. Immunol. 6, 407-413.

**Arnaiz-Villena A**, Timon M, Rodriguez-Gallego C, Pérez-Blas M, Corell A, Martin-Villa JM and Regueiro JR (1992). Human T-cell activation deficiencies. Immunol. Today 13, 259-265.

**Aruffo A**, Kanner SB, Sgroi D, Ledbetter JA and Stamenkovic I (1992). CD22-mediated stimulation of T cells regulates T-cell receptor/CD3-induced signalling. Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 10242-10246.

**Asano Y** and Tada T (1989). Generation of T cell repertoire. Two distinct mechanisms for generation of T suppressor cells, T helper cells, and T augmenting cells. J. Immunol. 142, 365-373.

**Ashwell JD** and Klausner RD (1990). Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. Ann. Rev. Immunol. 8, 139-167.

**Azuma A**, Yagita H, Okumura K, Kudho S and Niitani H (1994).

Potentiation of long-term-cultured lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against small-cell lung carcinoma by anti-CD3 x anti-(tumor-associated antigen) bispecific antibody. Cancer Immunol. Immunother. 38, 294-298.

**Azuma M**, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH and Lanier LL (1992). CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. J. Exp. Med. 175, 353-360.

**Baetz K**, Isaaz S and Griffiths GM (1995). Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. J. Immunol. 154, 6122-6131.

**Baauerle PA** and Henkel T (1994). Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. Annu. Rev. Immunol. 12, 141-179.

**Bakker ABH**, Shreurs MWJ, de Boer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ and Figdor CG (1994). Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. J. Exp. Med. 179, 1005-1009.

**Bamford RN**, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E and Waldmann TA (1994). The interleukin (IL) 2 receptor  $\beta$  chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4940-4944.

**Bénard J**, Da Silva J, De Bois M-C, Boyer P, Duvillard P, Chiric E and Riou G (1985). Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. Cancer Res. 45, 4970-4979.

**Bentin J**, Vaughan JH and Tsoukas CD (1988). T cell proliferation induced by anti-CD3 antibodies: requirement for a T-T cell interaction. Eur. J. Immunol. 18, 627-632.

**Berg NN** and Ostergaard HL (1995). Characterization of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-augmented degranulation by cytotoxic T cells. J. Immunol. 155, 1694-1702.

**Berke G** (1995). The CTL's kiss of death. Cell 81, 9-12.

**Berridge MJ** (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. Nature 361, 315-325.

**Berridge MJ** (1995).

Inositol triphosphate and calcium signaling.  
Annals New York Acad. Sci. 766: 31-43.

**Beun GDM**, Gorter A, Nooyen Y, van de Velde CJH and Fleuren GJ (1993).  
T cell retargeting using bispecific monoclonal antibodies in a rat colon carcinoma model.  
J. Immunol. 150, 2305-2315.

**Beutler B** and van Huffel C (1994).  
Unraveling function in the TNF ligand and receptor families.  
Science 264, 667-668.

**Bino T**, Frey JL and Ortaldo JR (1992).  
Mechanism of target cell recognition by CD3-LGL. I. Development of a monoclonal antibody to a K562-associated target cell antigen.  
Cell. Immunol. 142, 28-39.

**Bolen JB** (1995).  
Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling.  
Current Opin. Immunol. 7, 306-311.

**Bolhuis RLH** and van de Griend RJ (1985).  
Phytohemagglutinin-induced proliferation and cytolytic activity in T3<sup>+</sup> but not in T3<sup>-</sup> cloned T lymphocytes requires the involvement of the T3 antigen for signal transmission.  
Cell. Immunol. 93, 46-57.

**Bolhuis RLH**, Lamers CHJ, Goey SH, Eggermont AMM, Trimbos JBMZ, Stoter G,

Lanzavecchia A, di Re E, Miotti S, Raspagliesi F, Rivoltini L and Colnaghi MI (1992).  
Adoptive immunotherapy of ovarian carcinoma with BS-MAb-targeted lymphocytes: a multicenter study.  
Int. J. Cancer :Suppl 7, 78-81.

**Bolt S**, Routledge E, Lloyd I, Chatenoud L, Pope H, Gorman SD, Clark M and Waldmann H (1993).  
The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains *in vitro* immunosuppressive properties.  
Eur. J. Immunol. 23, 403-411.

**Bolton AE** and Hunter WM (1973).  
The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I-containing acylating agent.  
Biochem. J. 133, 529-539.

**Boniface JJ** and Davis MM (1995).  
T-cell recognition of antigen. A process controlled by transient intermolecular interactions.  
Annals New York Acad. Sci. 766, 62-69.

**Bonifacino JS**, Lippincott-Schwartz J, Chen C, Antusch D, Samelson LE and Klausner RD (1988).  
Association and dissociation of the murine T cell receptor associated protein (TRAP).

J. Biol. Chem. 263, 8965-8971.

**Bonifacino JS**, Suzuki CK, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM and Klausner RD (1989).  
Pre-golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly.  
J. Cell Biol. 109, 73-83.

**Bonnema JD**, Rivlin KA, Ting AT, Schoon RA, Abraham RT and Leibson PJ (1994).  
Cytokine-enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. Positive modulatory effects of IL-2 and IL-12 on stimulus-dependent granule exocytosis.  
J. Immunol. 152, 2098-2104.

**Boon T**, Gajewski TF and Coulie PG (1995).  
From defined human tumor antigens to effective immunization.  
Immunol. Today 16, 334-336.

**Boussiotis VA**, Barber DL, Nakarai T, Freeman GJ, Gribben JG, Bernstein GM, D'Andrea AD, Ritz J and Nadler LM (1994)<sup>a</sup>.  
Prevention of T cell anergy by signaling through the  $\gamma_c$  chain of the IL-2 receptor.  
Science 266, 1039-1042.

**Boussiotis VA**, Gribben JG, Freeman GJ and Nadler LM (1994)<sup>b</sup>.  
Blockade of the CD28 costimulatory pathway: a means to induce tolerance.  
Current Opin. Immunol. 6, 797-807.

**Braakman E**, Goedegebuure PS, Vreugdenhil RJ, Segal DM, Shaw S and Bolhuis RL (1990).

ICAM<sup>-</sup> melanoma cells are relatively resistant to CD3-mediated T-cell lysis.

Int. J. Cancer 46, 475-80.

**Bradford M.M.** (1976).

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72, 248-254.

**Bradley LM**, Croft M and Swain SL (1993).

T-cell memory: new perspectives.

Immunol. Today 14, 197-199.

**Brasseur F**, Marchand M, Vanwijck R, Hérin M, Lethé B, Chomez P and Boon T (1992).

Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors.

Int. J. Cancer 52, 839-841.

**Breitmeyer JB**, Oppenheim SO, Daley JF, Levine HB and Schlossman SF (1987).

Growth inhibition of human T cells by antibodies recognizing the T cell antigen receptor complex.

J. Immunol. 138, 726-731.

**Brenner MB**, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip S, Rosen F and Krangel MS (1986)

Identification of a putative second T-cell receptor. Nature 322, 145-149.

**Brichard V**, Van Pel A, Wölfel T, Wölfel C, De Plaen E, Lethé B, Coulie P and Boon T (1993).

The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.

J. Exp. Med. 178, 489-495.

**Brottier P**, Boumsell L, Gelin C and Bernard A (1985).

T cell activation via CD2 [T, gp50] molecules: accessory cells are required to trigger T cell activation via CD2-D66 plus CD2-9.6/T11(1) epitopes.

J. Immunol. 135, 1624-1631.

**Browning JL**, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP., Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF and Ware CF (1993).

Lymphotoxin  $\beta$  a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface.

Cell 72, 847-856.

**Brunda MJ**, Tarnowski D and Davatelis V (1986).

Interaction of recombinant interferons with recombinant interleukin-2: differential effects on natural killer cell activity and interleukin-2-activated killer cells.

Int. J. Cancer 37, 787-793.

**Brunda MJ**, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF and Gately MK (1993).

Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors.

J. Exp. Med. 178, 1223-1230.

**Brunner KT**, Manuel J, Cerottini JC and Chapuis B (1968).

Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on <sup>51</sup>Cr-labeled allogeneic target cells *in vitro*: inhibition by isoantibody and by drugs.

Immunology 14: 181-196.

**Bulkley GB**, Cohen MH, Banks PM, Char DH and Ketcham AS (1975).

Long-term spontaneous regression of malignant melanoma with visceral metastases. Report of a case with immunologic profile.

Cancer 36, 485-494.

**Campbell IG**, Jones TA, Foulkes WD and Trowsdale J (1991).

Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer.

Cancer Res. 51, 5329-5338.

**Campbell MJ**, Carrol W, Kon S, Thielemans K, Rothbard JB, Levy S and Levy R (1987).

Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular responses elicited by tumor-derived immunoglobulin M and its molecular subunits.

J. Immunol. 139, 2825-2833.

**Canevari S**, Mezzanzanica D, Ménard S, Ferrini S, Moretta L and Colnaghi MI (1992). Possible targets on carcinoma for biMAb retargeting of lymphocyte or drug cytotoxicity. Int. J. Cancer: Suppl 7, 42-44.

**Canevari S**, Stoter G, Arienti F, Bolis G, Colnaghi MI, Di RE EM, Eggermont AMM, Goev SH, Gratama JW, Lamers CHJ, Nooy MA, Parmiani G, Raspagliesi F, Ravagnani F, Scarfone G, Trimbos JB, Warnaar SO and Bolhuis RLH (1995). Regression of advanced ovarian carcinoma by intraperitoneal treatment with autologous T lymphocytes retargeted by a bispecific monoclonal antibody. J. Natl. Cancer Inst. 87, 1463-1469.

**Cantrell D** (1994). G proteins in lymphocyte signalling. Current Opin. Immunol. 6, 380-384.

**Carson WE**, Giri JG, Lidmann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann, Grabstein K and Caligiuri (1994). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. J. Exp. Med. 180, 1395-1403.

**Cepko CL**, Roberts BE and Mulligan RC (1984). Construction and applications of a highly

transmissible murine retrovirus shuttle vector. Cell 37, 1053-1062.

**Cerdan C**, Lipcey C, Lopez M, Nunes J, Pierres A, Mawas C and Olive D (1989). Monoclonal antibodies against LFA-1 or its ligand ICAM-1 accelerate CD2 (T11.1 + T11.2)-mediated T cell proliferation. Cell. Immunol. 123, 344-353.

**Cerdan C**, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F and Olive D (1995). CD28 costimulation Up-regulates long-term IL-2R $\beta$  expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. J. Immunol. 154, 1007-1013.

**Cesano A**, Visonneau S, Clark SC and Santoli D (1993). Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. J. Immunol. 151, 2943-2957.

**Ceuppens JL**, Meurs L, Baroja ML and Van Wauwe JP (1986). Effect of T3 modulation on pokeweed mitogen-induced T cell activation: evidence for an alternative pathway of T cell activation. J. Immunol. 136, 3346-3350.

**Ceuppens JL** and Van Vaeck F (1987). Direct demonstration of binding of anti-Leu 4 antibody to the 40 kDa Fc

receptor on monocytes as a prerequisite for anti-Leu 4-induced T cell mitogenesis. J. Immunol. 139, 4067-4071.

**Ceuppens JL** and Van Vaeck F (1989). Human T cell activation induced by a monoclonal mouse IgG3 anti-CD3 antibody (RIV9) requires binding of the Fc part of the antibody to the monocytic 72-kDa high-affinity Fc receptor (FcRI). Cell. Immunol. 118, 136-146.

**Chan AC**, Iwashima M, Turck CW and Weiss A (1992). ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. Cell 71, 649-662.

**Chatenoud L**, Baudrihay MF, Kreis H, Goldstein G, Schindler J and Bach J-F (1982). Human *in vivo* antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. Eur. J. Immunol. 12, 979-982.

**Chehimi J**, Valiante NM, D'Andrea A, Rengaraju M, Rosado Z, Kobayashi M, Perussia B, Wolf SF, Starr SE and Trinchieri G (1993). Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells. Eur. J. Immunol. 23, 1826-1830.

**Chen L**, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellström I and Hellström KE (1994).

Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity.  
J. Exp. Med. 179, 523-532.

**Cherwinski HM**, Semenuk GT and Ransom JT (1992).

Stimulation of a T helper cell class 2 clone with immobilized anti-T cell receptor antibody activates a Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C-independent lethal signaling pathway.  
J. Immunol. 148, 2996-3003.

**Chiapparino F**, Biffi M, Luciano A, Gromo G, Leoni F (1994).

Involvement of multiple protein kinases in CD3-mediated activation of human T lymphocytes.  
Cell. Immunol. 153, 39-51.

**Chicz RM**, Urban RG, Gorga JC, Vignalli DAA, Lane WS and Strominger JL (1993).

Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles.  
J. Exp. Med. 178, 27-47.

**Chinn A**, Cosyns M and Hayward AR (1990).

T cell proliferative response to interleukin 2: different frequency of responders among CD45R0 and CD45RA subsets.  
Cell. Immunol. 131, 132-139.

**Chong AS**, Jiang XL, Scuderi P, Lamas M and Graf LH (1994).

ICAM-1 and LFA-3 enhance the ability of anti-CD3 mAb to stimulate interferon gamma production in interleukin-2-activated T cells.

Cancer Immunol. Immunother. 39, 127-134.

**Chused TM**, Wilson HA, Greenblatt D, Ishida Y, Edison LJ, Tsien RY and Finkelman FD (1987).

Flow cytometric analysis of murine splenic B lymphocyte cytosolic free calcium response to anti-IgM and anti-IgD.  
Cytometry 8, 396-404.

**Ciccone E**, Pende D, Nanni L, Di Donato C, Viale O, Beretta A, Vitale M, Sivori S, Moretta A and Moretta L (1995).

General role of HLA class I molecules in the protection of target cells from lysis by natural killer cells: evidence that the free heavy chains of class I molecules are not sufficient to mediate the protective effect.  
Int. Immunol. 7, 393-400.

**Clark EA** (1993).

CD22, a B cell-specific receptor, mediates adhesion and signal transduction.  
J. Immunol. 150, 4715-4718.

**Clement LT**, Grossi CE and Gartland GL (1984).

Morphologic and phenotypic features of the subpopulation of Leu-2<sup>+</sup> cells that suppresses B cell differentiation.

J. Immunol. 133, 2461-2469.

**Cleveland JL** and Ihle JN (1995).

Contenders in FasL/TNF death signaling.  
Cell 81, 479-482.

**Colamonici OR**,

Quinones R, Rosolen A, Trepel JB, Sausville E, Phares JC, Gress R, Poplack D, Weber J, Schechter GP and Neckers LM (1988).

The beta subunit of the interleukin-2 receptor mediates interleukin-2 induction of anti-CD3 redirected cytotoxic capability in large granular lymphocytes.  
Blood 71, 825-828.

**Collins SJ**, Gallo RC and Gallagher RE (1977).

Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.  
Nature 270, 347-349.

**Collins TL**, Kassner PD, Bierer BE and Burakoff SJ (1994).

Adhesion receptors in lymphocyte activation.  
Current Opin. Immunol. 6, 385-393.

**Constant P**, Davodeau F, Peyrat M-A, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M and Fournié JJ (1994).

Stimulation of human  $\gamma\delta$  T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands.  
Science 264, 267-270.

**Coulie PG**, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora J-P, Renaud J-C and Boon T (1994).

A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J. Exp. Med. 180, 35-42.

**Cox AL**, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF and Slingluff CL (1994).

Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines.

Science 264, 716-718.

**Crabtree GR** (1989).

Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.

Science 243, 355-361.

**Cronin II DC**, Stack R and Fitch FW (1995).

IL-4-producing CD8<sup>+</sup> T cell clones can provide B cell help.

J. Immunol. 154, 3118-3127.

**Crowe PD**, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG and Smith CA (1994).

A lymphotoxin- $\beta$ -specific receptor.

Science. 264, 707-710.

**Curti BD**, Longo DL, Ochoa AC, Conlon KC, Smith II JW, Alvord WG, Creekmore SP, Fenton RG, Gause BL, Holmlund J, Janik JE, Ochoa J, Rice PA, Sharfman WH, Sznal M and Urba WJ (1993).

Treatment of cancer patients with *ex vivo* anti-CD3-activated killer cells and interleukin-2.

J. Clin. Oncology 11, 652-660.

**Dacie JV** and Lewis SM (1968).

Practical Hematology. IV Eds.

**Darnell Jr JE**, Kerr IM and Stark GR (1994).

Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.

Science 264, 1415-1421.

**Davis L**, Vida R and Lipsky PE (1986).

Regulation of human T lymphocyte mitogenesis by antibodies to CD3.

J. Immunol. 137, 3758-3767.

**Davis LS**, Wacholtz MC and Lipsky PE (1989).

The induction of T cell unresponsiveness by rapidly modulating CD3.

J. Immunol. 142, 1084-1094.

**Davis MM** and Chien Y-H (1995).

Issues concerning the nature of antigen recognition by  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell receptors.

Immunol. Today 16: 316-318.

**Debatin K-M**, Goldmann CK, Bamford R, Waldmann TA and Krammer PH (1990).

Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia. Lancet 335, 497-500.

**Deckert M**, Kubar J and Bernard A (1992).

CD58 and CD59 molecules exhibit potentializing effects in T

cell adhesion and activation.

J. Immunol. 148, 672-677.

**Deem RL**, Shanahan F, Niederlehner A, and Targan SR (1988).

Role of the CD45 (T-200) molecule in anti-CD3-Triggered T cell-mediated cytotoxicity.

Cell. Immunol. 117, 99-110.

**Degiovanni G** and Schaaf-Lafontaine N (1981).

FCS-activated blast T cells inhibit the in vitro response of memory CTL precursors to alloantigens by removal of factor(s) from MLC supernatant.

J. Immunol. 126, 641-647.

**de Haas M**, Vossebeld PJM, Von dem Borne AEGK and Roos D (1995).

Fc $\gamma$  receptors of phagocytes.

J. Lab. Clin. Med. 126, 330-341.

**de Jong R**, Stokkers P, Lamme E, Kool JM, Borst F, Brouwer M, Miedema F, van Lier RA (1991).

Regulation of T-cell differentiation by CD2 and CD28 accessory molecules.

Immunology 74, 175-82.

**Delvenne P**, Al-Saleh W, Gilles C, Thiry A and Boniver J (1995).

Inhibition of growth of normal and human papillomavirus-transformed keratinocytes in monolayer and organotypic cultures by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ .

Am. J. Pathol. 146, 589-598.

**Demanet C**, Brissinck J, Van Mechelen M, Leo O and Thielemans K (1991). Treatment of murine B cell lymphoma with bispecific monoclonal antibodies (anti-idiotypic X anti-CD3). J. Immunol. 147, 1091-1097.

**De Maria R**, Todaro M, Stassi G, Di Blasi F, Giordano M, Galluzzo A and Giordano C (1994). Defective T cell receptor/CD3 complex signaling in human type I diabetes. Eur. J. Immunol. 24, 999-1002.

**Dinarello CA** (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood 77, 1627-1652.

**Dohi Y**, Sunada S, Aoki M, Moriguchi A, Okabayashi M, Miyata M and Matsuda H (1993). Eradication of metastatic tumour cells from lymph nodes by local administration of anti-CD3 antibody. Cancer Immunother. Immunother. 36, 357-363.

**D'Orazio JA**, Burke GW and Stein-Streilein J (1995). Staphylococcal enterotoxin B activates purified NK cells to secrete IFN- $\gamma$  but requires T lymphocytes to augment NK cytotoxicity. J. Immunol. 154, 1014-1023.

**Düchler M**, Offterdinger M, Holzmüller H, Lipp J, Chu C-T, Aschauer B,

Bach FH and Hofer E (1995). NKG2-C is a receptor on human natural killer cells that recognizes structures on K562 target cells. Eur. J. Immunol. 25, 2923-2931.

**Dunn PL** and North RJ (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. Infect. Immun. 59, 2892-2900.

**Durrant LG**, Buckley TJD, Denton GWL, Hardcastle JD, Sewell HF and Robins RA (1994). Enhanced cell-mediated tumor killing in patients immunized with human monoclonal antiidiotypic antibody 105AD7. Cancer Res. 54, 4837-4840.

**Dustin ML**, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA and Springer TA (1986). Induction by IL-1 and interferon- $\gamma$ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). J. Immunol. 137, 245-254.

**Eischen CM**, Schilling JD, Lynch DH, Krammer PH and Leibson PJ (1996). Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. J. Immunol. 156, 2693-2699.

**Ellenhorn JDI**, Hirsch R, Schreiber H and Bluestone JA (1988). In vivo administration of anti-CD3 prevents malignant progressor tumor growth. Science 242, 569-571.

**Ellenhorn JDI**, Schreiber H and Bluestone JA (1990). Mechanism of tumor rejection in anti-CD3 monoclonal antibody-treated mice. J. Immunol. 144, 2840-2846.

**Ellis TM** and Fisher RI (1989). Functional heterogeneity of Leu 19<sup>bright+</sup> and Leu 19<sup>dim+</sup> lymphokine-activated killer. J. Immunol. 142, 2949-2954.

**Engel P**, Nojima Y, Rothstein D, Zhou L-J, Wilson GL, Kehrl JH and Tedder TF (1993). The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. J. Immunol. 150, 4719-4732.

**Esposito G**, Scarselli E, Cerino A, Mondelli MU, La Monica N and Traboni C (1995). A human antibody specific for hepatitis C virus core protein: synthesis in a bacterial system and characterization. Gene 164, 203-209.

**Fady C**, Gardner A, Gera JF and Lichtenstein A (1993).

Interferon-gamma-induced increased sensitivity of HER2/neu-overexpressing tumor cells to lymphokine-activated killer cell lysis: importance of ICAM-1 in binding and post-binding events.  
Cancer Immunol Immunother 37, 329-336.

**Fanger MW**, Shen L, Graziano RF and Guyre PM (1989). Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG.  
Immunol. Today 10, 92-99.

**Fanger MW**, Segal DM and Romet-Lemonne J-L (1991). Bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity.  
Immunol. Today 12, 51-54.

**Ferrer JM**, Plaza A, Kreisler M and Diaz-Espada F (1992). Differential interleukin secretion by in vitro activated human CD45RA and CD45RO T cell subsets.  
Cell. Immunol. 141, 10-20.

**Ferrini S**, Miescher S, Zocchi MR, Von Flidner V and Moretta A (1987). Phenotypic and functional characterization of recombinant interleukin 2 (rIL 2)-induced activated killer cells: analysis at the population and clonal levels.  
J. Immunol. 138, 1297-1302.

**Ferrini S**, Prigione I, Mammoliti S, Colnaghi

MI, Menard S, Moretta A and Moretta L (1989). Retargeting of T-cell-receptor  $\gamma\delta^+$  lymphocytes against tumor cells by bispecific monoclonal antibodies. Induction of cytolytic activity and lymphokine production.  
Int. J. Cancer :Suppl. 4, 53-55.

**Ferrini S**, Cambiaggi A, Cantoni C, Canevari S, Mezzanzanica D, Colnaghi MI, Moretta L (1992). Targeting of T or NK lymphocytes against tumor cells by bispecific monoclonal antibodies: role of different triggering molecules.  
Int. J. Cancer Suppl. 7, 15-18.

**Ferrini S**, Sforzini S, Cambiaggi A, Poggi A, Meazza R, Canevari S, Colnaghi MI and Moretta L (1994). The LFA-1/ICAM cell adhesion pathway is involved in tumor-cell lysis mediated by bispecific monoclonal-antibody-targeted T lymphocytes.  
Int. J. Cancer 56, 846-852.

**Finkel TH**, McDuffie M, Kappler JW, Marrack P and Cambier JC (1987). Both immature and mature T cells mobilize  $Ca^{2+}$  in response to antigen receptor crosslinking.  
Nature 330, 179-181.

**Fiorentino DF**, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW and O'Garra A (1991).

IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.  
J. Immunol. 146, 3444-3451.

**Firestein GS**, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE and Glasebrook AL (1989). A new murine CD4<sup>+</sup> T cell subset with an unrestricted cytokine profile.  
J. Immunol. 143, 518-525.

**Flamand V**, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Leo O, Urbain J, Moser M (1993). Vaccination with tumor-antigen-pulsed dendritic cells induces in vivo resistance to a B cell lymphoma.  
Adv. Exp. Med. Biol. 329, 611-616.

**Flanagan WM**, Corthésy B, Bram RJ and Crabtree GR (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A.  
Nature 352, 803-807.

**Fournel S**, Morel P, Revillard JP, Lizard G and Bonnefoy-Berard N (1993). Inhibition of human T cell response to staphylococcal enterotoxin B by prior ligation of surface CD4 molecules.  
Cell. Immunol. 150, 194-204.

**Freedman AS**, Freeman GJ, Rhyhart K and Nadler LM (1991). Selective induction of B7/BB-1 on interferon- $\gamma$

stimulated monocytes: A potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway.

Cell. Immunol. 137, 429-437.

**Friedl F**, Kimura I, Osato T and Ito Y (1970).

Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 543-545.

**Funderud S**, Erikstein B, Asheim HC, Nustad K, Stokke T, Blomhoff HK, Holte H and Smeland EB (1990).

Functional properties of CD19<sup>+</sup> B lymphocytes positively selected from buffy coats by immunomagnetic separation.

Eur. J. Immunol. 20, 201-206.

**Furukawa T**, Itoh M, Krueger NX, Streuli M and Saito H (1994).

Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3  $\zeta$  chain.

Proc. Natl. Acad. Sc. USA 91, 10928- 10932.

**Gabriele L**, Kaido T, Woodrow D, Moss J, Ferrantini M, Proletti E, Santodonato L, Rozera C, Maury C, Belardelli F and Gresser I (1995).

Local and systemic response of mice to interferon-alpha 1-transfected Friend leukemia cells.

Am. J. Pathol. 147, 445-460.

**Galandrini R**, Albi N, Zarccone D, Grossi CE and Velardi A (1992).

Adhesion molecule-mediated signals regulate major histocompatibility complex-unrestricted and CD3/T cell receptor-triggered cytotoxicity.

Eur. J. Immunol. 22, 2047-2053.

**Gallo-Hendrikx E**, Copps J, Percy D, Croy BA and Wildeman AG (1994).

Enhancement of pancreatic tumor metastasis in transgenic immunodeficient mice.

Oncogene 9, 2983-90.

**Gansbacher B**, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R and Gilboa E (1990).

Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity.

J. Exp. Med. 172, 1217-1224.

**Gardner MJ**, Jones LM, Catterall JB and Turner GA (1995).

Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis.

Cancer Letters 91, 229-234.

**Gardner P** (1989).

Calcium and T lymphocyte activation.

Cell 59, 15-20.

**Garrido MA**, Valdayo MJ, Winkler DF, Titus JA, Hecht TT, Perez P, Segal DM and Wunderlich JR (1990).

Targeting human T-lymphocytes with bispecific antibodies to react against human ovarian carcinoma cells growing in *nu/nu* mice.

Cancer Res. 50, 4227-4232.

**Gee AP**, Mansour VH and Weiler MB (1991).

Effects of target antigen density on the efficacy of immunomagnetic cell separation.

J. Immunol. Methods 142, 127-136.

**Geisberg M** and Dupont B (1992).

Cytolytic effector function is present in resting peripheral T lymphocytes.

Int. Immunol. 4, 1273-1281.

**Gelfand EW**, Cheung RK, Grinstein S and Mills G (1986).

Characterization of the role for calcium influx in mitogen-induced triggering of human T cells. Identification of calcium-dependent and calcium independent signals.

Eur. J. Immunol. 16, 907-912.

**Gelfand EW**, Cheung RK, Mills GB and Grinstein S (1988).

Uptake of extracellular Ca<sup>2+</sup> and not recruitment from internal stores is essential for T lymphocyte proliferation.

Eur. J. Immunol. 18, 917-922.

**Geller RL**, Smyth MJ, Strobl SL, Bach FH, Ruscetti FW, Longo DL and Ochoa AC (1991).

Generation of lymphokine-activated killer activity in T cells. Possible regulatory circuits.

J. Immunol. 146, 3280-3288.

**Gershenfeld HK**, Hershberger RJ, Shows TB and Weissman IL (1988).

Cloning and chromosomal assignment of a human cDNA encoding a T cell- and natural killer cell-specific trypsin-like serine protease.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1184-1188.

**Gershon RK** and Kondo K (1971).

Infectious immunological tolerance.

Immunology 21, 903-14.

**Giard DJ**, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersley JH, Dosik H and Parks WP (1973).

In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.

J. Natl. Cancer Inst 51, 1417-1421.

**Gill BM**, Nishikata H, Chan G, Delovitch TL and Ochi A (1994).

Fas antigen and sphingomyelin-ceramide turnover-mediated signaling: Role in life and death of T lymphocytes.

Immunol. Rev. 142, 113-125.

**Gilles C**, Piette J, Rombouts S, Laurent C and Foidart J-M (1993).

Immortalization of human cervical keratinocytes by human papillomavirus type 33.

Int. J. Cancer 53, 872-879.

**Glaichenhaus N**, Shastri N, Littman DR and Turner JM (1991).

Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells.

Cell 64, 511-520.

**Goldsmith MA**, Amaral MC and Greene WC (1995).

Ligand binding by the IL-2 receptor is modulated by intracellular determinants of the IL-2 receptor  $\beta$ -chain.

J. Immunol. 154, 2033-2040.

**Grabbe S**, Beissert S, Schwarz T and Granstein RD (1995).

Dendritic cells as initiators of tumor immune response: a possible strategy for tumor immunotherapy?

Immunology Today 16, 117-121

**Gray D** (1994).

Regulation of immunological memory.

Current Opin. Immunol. 6, 425-430.

**Gray JD**, Hirokawa M and Horwitz DA (1994).

The role of transforming growth factor  $\beta$  in the generation of suppression: An interaction between CD8<sup>+</sup> T and NK cells.

J. Exp. Med. 180, 1937-1942.

**Greenberg PD**, Klarnet JP, Kern DE and Cheever MA (1988).

Therapy of disseminated tumors by adoptive

transfer of specifically immune T cells.

Prog. Exp. Tumor Res. 32, 104-127.

**Greimers R** (1990).

Cytométrie en flux: analyses multiparamétriques et tri cellulaire.

Université de Liège.

**Greimers R**, Rongy AM, Schaaf-Lafontaine N and Boniver J (1991).

CUBIC: a three-dimensional colored projection of Consort 30 generated trivariate flow cytometric data.

Cytometry 12, 570-578.

**Greimers R.** (1993).

Contribution à l'analyse multiparamétrique par cytométrie en flux de lymphome radio-induits chez la souris et de tumeurs solides humaines.

Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur Spécial en Sciences Biomédicales Expérimentales.

Université de Liège.

**Greimers R**, Trebak M, Moutschen M, Jacobs N and Boniver J (1996).

Improved four-color flow cytometry method using Fluo-3 and a triple immunofluorescence for analysis of intracellular calcium ion ([CA<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) fluxes among mouse lymph node B- and T-lymphocyte subsets.

Cytometry 23, 205-217

**Grell M**, Krammer PH and Scheurich P (1994).

Segregation of APO-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis.

Eur. J. Immunol. 24, 2563-2566.

**Grimm EA**, Mazumder A, Zhang HZ and Rosenberg SA (1982). Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J. Exp. Med. 155, 1823-1841.

**Gryniewicz G**, Poenie M and Tsien RY (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.

**Guinan EC**, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ and Nadler LM (1994). Pivotal role of the B7: CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. Blood 84, 3261-3282.

**Guillaume T**, Hamdan O, Staquet P, Sekhavat M, Chatelain B, Bosly A, Rubinstein DB, Humblet Y, Doyen C, Coiffier B, Felman P and Symann M (1993). Blunted rise in intracellular calcium in CD4+ T cells in response to mitogen following autologous bone marrow transplantation. Br. J. Haematol. 84, 131-136.

**Guttinger M**, Gassmann M, Amrein KE and Burn P (1992). CD45 phosphotyrosine phosphatase and p56 lck

protein tyrosine kinase: a functional complex crucial in T cell signal transduction. Int. Immunol. 4, 1325-1330.

**Haagen IA**, de Lau WBM, Bast BJEG, Geerars AJG, Clark MR and de Gast BC (1994). Unprimed CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells can be rapidly activated by a CD3XCD19 bispecific antibody to proliferate and become cytotoxic. Cancer Immunol. Immunother. 39, 391-396.

**Hahn S**, Gehri R and Erb P (1995). Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. Immunol. Rev. 146, 57-79.

**Hamann A** (1992). Mechanisms of lymphocyte traffic and cell targeting. Int. J. Cancer Suppl. 7, 19-23

**Hamilton TC**, Young RC, Louie KG, Behrens BC, McKoy WM, Grotzinger KR and Ozols RF (1984). Characterization of a xenograft model of human ovarian carcinoma which produces ascites and intraabdominal carcinomatosis in mice. Cancer Res. 44, 5286-5290.

**Hammond EH**, Wittwer CT, Greenwood J, Knape WA, Yowell RL, Menlove RL, Craven C, Renlund DG, Bristow MR, DeWitt CW and O'Connell JB (1990).

Relationship of OKT3 sensitization and vascular rejection in cardiac transplant patients receiving OKT3 rejection prophylaxis. Transplantation 50, 776-782.

**Hara T** and Fu SM (1985). Human T cell activation. 1. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-Tetradecanoyl Phorbol-13-acetate. J. Exp. Med. 161, 641-656.

**Harding CV** (1991). Pathways of antigen processing. Curr. Opin. Immunol. 3, 3-9.

**Harel-Bellan A**, Bertoglio J, Quillet A, Marchiol C, Wakasugi H, Mishall Z and Fradelizi D (1986). Interleukin 2 (IL-2) up-regulates its own receptor on a subset of human unprimed peripheral blood lymphocytes and triggers their proliferation. J. Immunol. 136, 2463-2469.

**Haugland RP** (1992-1994). Calcium indicators, chelators and ionophores. Molecular probes handbook of fluorescent probes and research chemicals. Set 20, 113

**Haverstick DM**, Engelhard VH and Gray LS (1991). Three intracellular signals for cytotoxic T

lymphocyte-mediated killing.  
J. Immunol. 146, 3306-3313.

**Hawkins RE**, Zhu D, Ovecka M, Winter G, Hamblin TJ, Long A and Stevenson FK (1994). Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines.  
Blood 83, 3279-3288.

**Heald R**, McLoughlin M and McKeon F (1993). Human Wee 1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase.  
Cell 74, 463-474.

**Hellström I**, Hellström KE and Yeh M-Y (1981). Lymphocyte-dependent antibodies to antigen 3.1, a cell-surface antigen expressed by a subgroup of human melanomas.  
Int. J. Cancer 27, 281-285.

**Heo DS**, Park J-G, Hata K, Day R, Herberman RB and Whiteside TL (1990). Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity.  
Cancer Res. 50: 3681-3690.

**Hermann GG**, Petersen KR, Steven K and Zeuthen J (1990). Reduced LAK cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in patients with bladder cancer: decreased LAK

cytotoxicity caused by a low incidence of CD56<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> mononuclear blood cells.  
J. Clinical Immunol. 10, 311-319.

**Hesketh TR**, Smith GA, Moore JP, Taylor MV and Metcalfe JC (1983). Free cytoplasmic calcium concentration and the mitogenic stimulation of lymphocytes.  
J. Biol. Chem. 258, 4876-4882.

**Heusel JW**, Wesselschmidt RL, Shersta S, Russel JH, Ley TJ (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells.  
Cell 76, 977-987.

**Hirsch R**, Eckhaus M, Auchincloss H, Sachs DH and Bluestone JA (1988). Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in Mice.  
J. Immunol. 140, 3766-3772.

**Hivroz-Burgaud C**, Clipstone NA and Cantrell DA (1991). Signaling requirements for the expression of the transactivating factor NF-AT in human T lymphocytes.  
Eur. J. Immunol. 21, 2811-2819.

**Ho S** and Campana D (1991). Phenotypic changes and proliferative activity of human  $\gamma\delta$  T cell receptor-bearing cells upon activation.

Clin. Exp. Immunol. 84, 376-382.

**Holcombe RF**, Jones KL and Stewart RM (1994). Lysosomal enzyme activities in Chediak-Higashi syndrome: evaluation of lymphoblastoid cell lines and review of the literature.  
Immunodeficiency 5, 131-140.

**Holliger P**, Prospero T and Winter G (1993). "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448.

**Hommel-Berrey GA**, Shenoy AM and Brahmi Z (1991). Receptor modulation and early signal transduction events in cytotoxic T lymphocytes inactivated by sensitive target cells.  
J. Immunol. 147, 3237-3243.

**Hoskin DW**, Stankova J, Anderson SK and Roder JC (1989). Amelioration of experimental lung metastasis in mice by therapy with anti-CD3 monoclonal antibodies.  
Cancer Immunol. Immunother. 29, 226-230.

**Hsieh-Ma ST**, Eaton AM, Shi T and Ring DB (1992). In vitro cytotoxic targeting by human mononuclear cells and bispecific antibody 2B1. Recognizing c-erbB-2 protooncogene product and Fc $\gamma$  receptor III.  
Cancer Res. 52, 6832-6839.

**Hu-Li J**, Shevach EM, Mizuguchi J, Ohara J, Mosmann T and Paul WE (1987).

B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. J. Exp. Med. 165, 157-172.

**Hurwitz R**, Hozier J, Lebien T, Minowada J, Gail-Peczaska K, Kubonishi I and Kersey J (1979).

Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. Int. J. Cancer 23, 174-180.

**Ihle JN** (1996).

STATs: Signal transducers and activators of transcription. Cell 84, 331-334.

**Ioannides CG**, Freedman RS, Platsoucas CD, Rashed S and Kim YP (1991).

Cytotoxic T cell clones isolated from ovarian tumor-infiltrating lymphocytes recognize multiple antigenic epitopes on autologous tumor cells. J. Immunol. 146, 1700-1707.

**Isaacs A** and Lindemann J (1957).

Virus interference: The interferon. Proc. R. Soc. Lond. (Biology) 147, 259-267.

**Isaaz S**, Baertz K, Olsen K, Podack E and Griffiths GM (1995).

Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of

the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway.

Eur. J. Immunol. 25, 1071-1079.

**Isakov N**, Wange RL, Burgess WH, Watts JD, Aebersold R and Samelson LE (1995).

ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity.

J. Exp. Med. 181, 375-380.

**Ishii N**, Takeshita T, Kimura Y, Tada K, Kondo M, Nakamura M and Sugamura K (1994).

Expression of the IL-2 receptor  $\gamma$  chain on various populations in human peripheral blood. Int. Immunol. 6, 1273-1277.

**Ishimitsu T** and Torisu M (1993).

The role of eosinophils in interleukin-2/lymphokine-activated killer cell therapy. Surgery 113, 192-199.

**Itoh K**, Tilden AB and Balch CM (1986).

Lysis of human solid tumor cells by lymphokine-activated natural killer cells. J. Immunol. 136, 3910-3915.

**Itoh N**, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y and Nagata S (1991).

The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 66, 233-243.

**Jacobs N**, Moutschen M, Boniver J, Greimers R and Schaaf-Lafontaine N (1991).

Cytolytic activities and T-cell receptor expression in cultures of human PBL activated with anti-CD3 mAbs.

Biol. Cell. 73, 51.

**Jacobs N**, Moutschen M, Boniver J, Greimers R and Schaaf-Lafontaine N (1992).

Immunoselection of cytolytic CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup> effector lymphocytes using a magnetic cell sorter (MACS).

Biol. Cell. 76, 31.

**Jacobs N**, Moutschen MP, Boniver J, Greimers R and Schaaf-Lafontaine N (1993).

Efficient immunoselection of cytolytic effectors with a magnetic cell sorter. Res. Immunol. 144, 141-150.

**Jacobs N**, Greimers R, Mazzoni A, Trebak M, Schaaf-Lafontaine N, Boniver J and Moutschen MP (1996).

Further characterization of cytotoxic T cells generated by short term culture of human PBL with interleukin-2 and anti-CD3 mAb.

Cancer Immunol. Immunother. (sous presse).

**Jaffe HS** and Herberman RB (1988).

Rationale for recombinant human interferon- $\gamma$

adjuvant immunotherapy for cancer.

J. Nat. Cancer Inst. 80, 616-618.

**Jaffers GJ**, Colvin RB, Cosimi AB, Ciorgi JV, Goldstein G, Fuller TC, Kurnick JT, Lillehei C and Russel PS (1983).

The human immune response to murine OKT3 monoclonal antibody.

Transplant. Proc. 15, 646-648.

**Jaffers GJ**, Fuller TC, Cosimi AB, Russel PS, Winn HJ and Colvin RB (1986).

Monoclonal antibody therapy.

Transplantation 41, 573-578.

**Jain J**, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T and Rao A (1993).

The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun.

Nature 365, 352-355.

**Jain J**, Loh C and Rao A (1995).

Transcriptional regulation of the IL-2 gene.

Current Opin. Immunol. 7, 333-342.

**Jenkins MK**, Chen C, Jung G., Mueller DL and Schwartz RH (1990).

Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody.

J. Immunol. 144, 16-22.

**Jenkins MK** and Johnson JG (1993).

Molecules involved in T-cell costimulation.

Current Opin. Immunol. 5, 361-367.

**Johannisson A** and Festin R (1995).

Phenotype transition of CD4<sup>+</sup> T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation.

Cytometry 19, 343-352.

**Jolliffe LK** (1993).

Humanized antibodies: enhancing therapeutic utility through antibody engineering.

Int. Rev. Immunol. 10, 241-250.

**Jondal M**, Kullman C, Alter M-B and Ljunggren K (1986).

Monoclonal antibodies against the NK cell-FcR and the T3-complex potentiate normal lymphocyte killing.

Cell. Immunol. 100, 158-166.

**Jones KL**, Stewart RM, Fowler M, Fukuda M and Holcombe RF (1992).

Chediak-Higashi lymphoblastoid cell lines: granule characteristics and expression of lysosome-associated membrane proteins.

Clin. Immunol. Immunopathol. 65, 219-226.

**Jones PT**, Dear PH, Foote J, Neuberger MS and Winter G (1986).

Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.

Nature 321, 522-525.

**June CH**, Bluestone JA, Nadler LM and Thompson CB (1994).

The B7 and CD28 receptor families.

Immunol. Today 15, 321-331.

**Jung G**, Honsik CJ, Reisfeld RA and Müller-Eberhard HJ (1986).

Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4479-4483.

**Jung G**, Martin DE and Müller-Eberhard HJ (1987).

Induction of cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells by monoclonal antibody OKT3.

J. Immunol. 139, 639-644.

**Jung G**, Freimann U, Von Marschall Z, Reisfeld RA and Wilmanns W (1991).

Target cell-induced T cell activation with bi- and trisppecific antibodies fragments.

Eur. J. Immunol. 21, 2431-2435.

**Kabelitz D**, Pohl T and Pechhold K (1993).

Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes.

Immunol. Today 14, 338-339.

**Kägi D**, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H and Golstein P (1994).

Fas and perforin pathways as a major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. Science 265, 528-530.

**Kamoun M**, Zerva L, Sloan S, Zmijewski C, Monos D and Trinchieri G (1992).

Induction of HLA class II molecules on human T cells: relationship to immunoregulation and the pathogenesis of AIDS. DNA Cell Biology 11, 265-268.

**Kan EA**, Wang CY, Wang LC and Evans RL (1983).

Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with anti-Leu-4 antibody. J. Immunol. 131, 536-539.

**Kandzia J**, Scholz W, Anderson MJD and Müller-Ruchholtz W (1985).

Magnetic albumin/protein A immunomicrospheres. II. Specificity, reproductibility, and resolution of the magnetic cell separation technique. Diagn. Immunol. 3, 83-88.

**Kaneoka H**, Perez-Rojas G, Sasasaki T, Benike CJ and Engleman EG (1983). Human T lymphocyte proliferation induced by a pan-T monoclonal antibody (anti-Leu 4): Heterogeneity of response is a function of monocytes. J. Immunol. 131, 158-162.

**Kang X**, Kawakami Y, El-Gamil M, Wang R, Sakaguchi K, Yanelli JR,

Appella E, Rosenberg SA and Robbins PF (1995).

Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. J. Immunol. 155, 1343-1348.

**Kao JPY**, Harootunian AT and Tsien RY (1989).

Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. J. Biol. Chem. 254, 8179-8184.

**Kapp JA**, Pierce CW, Webb DR, Devens B, Godfrey W, Fukuse S, Engleman E, Lake JP, Magnani JI, Maiti PH and Sehon A (1995).

Characterization of the epitope recognized by a mAb that reacts differentially with murine suppressor T cells. Int. Immunol. 7, 1319-1330.

**Kast WM**, Offringa R, Peters PJ, Voordouw AC, Meloen RH, van der Eb A and Melief CJM (1989).

Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. Cell 59, 603-614.

**Kast WM**, Brandt RM, Sidney J, Drijfhout J-W, Kubo RT, Grey HM, Melief CJM and Sette A (1994).

Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. J. Immunol. 152, 3904-3912.

**Kawahara A**, Minami Y and Taniguchi T (1994).

Evidence for a critical role for the cytoplasmic region of the interleukin 2 (IL-2) receptor  $\gamma$  chain in IL-2, IL-4, and IL-7 signalling. Mol. Cel. Biol. 14, 5433-5440.

**Kawakami Y**, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T and Rosenberg SA (1994).

Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor.

Proc. Natl. Acad. Sc. USA 91, 3515-3519.

**Kawasaki A**, Shinkai Y, Yagita H, Okumura K (1992).

Expression of perforin in murine natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes in vivo. Eur. J. Immunol. 22, 1215-1219.

**Kelso A** (1995).

Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? Immunol. Today 16, 374-379.

**Kemeny DM**, Noble A, Holmes BJ and Diaz-Sanchez D (1994).

Immune regulation: a new role for the CD8<sup>+</sup> T cell. Immunol. Today 15, 107-110.

**Kemshead JT**, Heath L, Gibson FM, Katz F, Richmond F, Treleaven J and Ugelstad. J (1986).

Magnetic microspheres and monoclonal antibodies for the depletion of

neuroblastoma cells from bone marrow: Experiences, improvements and observations. Br. J. Cancer 54, 771-778.

**Kim HT**, Nelson EL, Clayberger C, Sanjanwala M, Sklar J and Krensky AM (1995).  $\gamma\delta$  T cell recognition of tumor Ig peptide. J. Immunol. 154, 1614-1623.

**Kimberly RP**, Salmon JE and Edberg JC (1995). Receptors for immunoglobulin G. Arthritis and Rheum. 38, 306-314.

**Kishimoto T** (1989). The biology of interleukin-6. Blood 74: 1-10.

**Kisielow P** and Von Boehmer H (1995). Development and selection of T cells: facts and puzzles. Adv. Immunol. 58, 87-209.

**Klaus SJ**, Sidorenko SP and Clark EA (1996). CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. J. Immunol. 156, 2743-2753.

**Klausner RD** and Samelson LE (1991). T cell antigen receptor activation pathways: The tyrosine kinase connection. Cell 64, 875-878.

**Klein G** (1968). Tumor-specific transplantation antigens: G. H. A. Clowes memorial lecture.

Cancer Res. 28, 625-35.

**Klein E**, Klein G, Nadkarni J, Nadkarni JJ, Wigzell H and Clifford P (1968). Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. Cancer Res. 28, 1300-1310.

**Knuth A**, Wölfel T and Meyer K-H (1991). Cellular and humoral immune responses against cancer: implication for cancer vaccines. Current Opin. Immunol. 3, 659-664.

**Ko HS**, Fu SM, Winchester RJ, Yu DT and Kunkel HG (1979). Ia determinants on stimulated human T lymphocytes. Occurrence on mitogen- and antigen-activated T cells. J. Exp. Med. 150, 246-255.

**Kobayashi M**, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B and Trinchieri G (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J. Exp. Med. 170, 827-845.

**Koch N** and Stockinger B (1991). Molecules that modify antigen recognition. Curr. Opin. Immunol. 3, 10-15.

**Koizumi H**, Liu C-C, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J and Young D-E (1991). Expression of perforin and serine esterases by human  $\gamma\delta$  T cells. J. Exp. Med. 173, 499-502.

**Köhler G** and Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.

**Kos FJ** and Engleman EG (1995). Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells. J. Immunol. 155, 578-584.

**Koyasu S**, McConkey DJ, Clayton LK, Abraham S, Yandava B, Katagiri T, Moingeon P, Yamamoto T and Reinherz EL (1992). Phosphorylation of multiple CD3 $\epsilon$  tyrosine residues leads to formation of pp21 *in vitro* and *in vivo*. J. Biol. Chem. 267, 3375-3381.

**Kranz DM**, Patrick TA, Brigle KE, Spinella MJ and Roy EJ (1995). Conjugates of folate and anti-T-cell-receptor antibodies specifically target folate-receptor-positive tumor cells for lysis. Proc. Natl. acad. Sci. USA 92, 9057-9061.

**Krähenbühl O**, Rey C, Jenne D, Lanzavecchia A, Groscurth P, Carrel S and Tschopp J (1988). Characterization of granzyme A and B isolated from granules of cloned human cytotoxic T lymphocytes. J. Immunol. 141, 3471-3477.

**Krause D**, Shearman C, Lang W, Kanzy EJ and Kurrle R (1990). Determination of affinities of murine and chimeric anti  $\alpha/\beta$ -T-cell receptor antibodies by flow cytometry. Berhing Inst. Mitt. 87, 56-67.

**Kriegler M**, Perez C, DeFay K, Albert I and Lu SD (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 53, 45-53.

**Kripke ML** (1981). Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 34, 69-106.

**Kroesen BJ**, Buter J, Sleijfer DT, Janssen RAJ, van der Graaf TH, de Leij L and Mulder NH (1994). Phase I study of intravenously applied bispecific antibody in renal cell cancer patients receiving subcutaneous interleukin 2. Br. J. Cancer 70, 652-661.

**Kruse J**, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A,

Sommer I, Goridis C and Schachner M (1984). Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. Nature 311, 153-155.

**Kuge S.**, Miura Y, Nakamura Y, Miotomi T, Habu S and Nishimura T (1995). Superantigen-induced human CD4<sup>+</sup> helper/killer T cell phenomenon. Selective induction of Th1 helper/killer T cells and application to tumor immunotherapy. J. Immunol. 154, 1777-1785.

**Kummer JA**, Kamp AM, Tadema TM, Vos W, Meijer CJLM and Hack CE (1995). Localization and identification of granzymes A and B-expressing cells in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. Clin. Exp. Immunol. 100, 164-172.

**Kung P**, Goldstein G, Reinherz EL and Schlossman SF (1979). Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science 206, 347-349.

**Kurrle R**, Seyfert W, Trautwein A and Seiler FR (1985). Cellular mechanism of T cell activation by modulation of the T3 antigen complex. Transplantation Proc. 13, 880-885.

**Lamers CHJ**, Van De Griend RJ, Braakman E, Ronteltap CPM, Bénard J, Stoter G, Gratama JW and Bolhuis RLH (1992). Optimization of culture conditions for activation and large-scale expansion of human T lymphocytes for bispecific antibody-directed cellular immunotherapy. Int. J. Cancer 51, 973-979.

**Lamont AG** and Adorini L (1996). IL-12: a key cytokine in immune regulation. Immunol. Today 17, 214-217.

**Lancki DW**, Weiss A and Fitch FW (1987). Requirements for triggering of lysis by cytolytic T lymphocyte clones. J. Immunol. 138, 3646-3653.

**Lancki DW**, Hsieh C-S and Fitch FW (1991). Mechanisms of lysis by cytotoxic T lymphocyte clones. Lytic activity and gene expression in cloned antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. J. Immunol. 146, 3242-3249.

**Lanier LL** and Loken MR (1984). Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8, and Leu-11 cell surface antigen expression. J. Immunol. 132, 151-159.

**Lanier LL**, Le AM, Civin CI, Loken MR and Phillips JH (1986)<sup>a</sup>.

The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. J. Immunol. 136, 4480-448.

**Lanier LL**, Cwirla S, Federspiel N and Phillips JH (1986)<sup>b</sup>.

Human natural killer cells isolated from peripheral blood do not rearrange T cell antigen receptor  $\beta$  chain genes. J. Exp. Med. 163, 209-214.

**Lanier LL** (1993).

Distribution and function of lymphocyte surface antigens. Molecules costimulating T lymphocyte activation and effector function. Ann. NY Acad. Sci. 677, 86-93.

**Lanzavecchia A** and Scheidegger D (1987).

The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 17, 105-111.

**Lazebnik YA**, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG and Earnshaw WC (1994).

Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 371, 346-347.

**Lea T**, Vartdal F, Davies C and Ugelstad J (1985). Magnetic monosized polymer particles for fast

and specific fractionation of human mononuclear cells.

Scand. J. Immunol. 22, 207-216.

**Lea T**, Smeland E, Funderud S, Vartdal F, Davies C, Beiske K and Ugelstad J (1986).

Characterization of human mononuclear cells after positive selection with immunomagnetic particles.

Scand. J. Immunol. 23, 509-519.

**Ledbetter JA**, June CH, Martin PJ, Spooner CE, Hansen JA and Meier KE (1986).

Valency of CD3 binding and internalization of the CD3 cell-surface complex control T cell responses to second signals: distinction between effects on protein kinase C, cytoplasmic free calcium, and proliferation. J. Immunol. 136, 3945-3952.

**Ledbetter JA**, June CH, Grosmaire LS and Rabinovitch PS (1987).

Crosslinking of surface antigens causes mobilization of intracellular ionized calcium in T lymphocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1384-1388.

**Lee KH**, Talpaz M, Rothberg JM, Murray JL, Papadopoulos N, Plager C, Benjamin R, Levitt D and Gutterman J (1989).

Concomitant administration of recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon  $\alpha$ -2A in cancer patients: A phase I study.

J. Clinical Oncol. 7, 1726-1732.

**Lee WT** and Vitetta ES (1990).

Limiting dilution analysis of CD45R<sup>hi</sup> and CD45R<sup>lo</sup> T cells: Further evidence that CD45R<sup>lo</sup> cells are memory cells.

Cell. Immunol. 130, 459-471.

**Lenschow DJ**, Walunas TL and Bluestone JA (1996).

CD28/B7 system of T cell costimulation.

Ann. Rev. Immunol. 14, 233-258.

**Leo O**, Foo M, Sachs DH, Samelson LE and Bluestone JA (1987).

Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1374-1378.

**Leeuwenberg JFM**, Spits H, Tax WJM and Capel PJA (1985).

Induction of nonspecific cytotoxicity by monoclonal anti-CD3 antibodies.

J. Immunol. 134, 3770-3775.

**Leeuwenberg JFM**, Lems SPM and Capel PJA (1987).

Anti-T3 induced cytotoxicity: the role of target cell Fc-Receptors in the lysis of autologous monocytes and the Fc-independent lysis of T3-positive target cells.

Transplant. Proc. 19, 428-431.

**Lewis GD**, Aggarwal BB, Eessalu TE, Sugarman BJ and Shepard HM (1987).

Modulation of the growth of transformed cells by human tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$ . Cancer Res. 47, 5382-5385.

**Lewis RS** and Cahalan MD (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. 13, 623-653.

**Lichtenheld MG**, Olsen KJ, Lowrey PDM, Hameed A, Hengart H and Podack ER (1988). Structure and function of human perforin. Nature 335, 448-451.

**Linsley PS** and Ledbetter JA (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu. Rev. Immunol. 11, 191-212.

**Liu C-C**, Detmers PA, Jiang S and Young JD-E (1989)<sup>a</sup>. Identification and characterization of a membrane-bound cytotoxin of murine cytolytic lymphocytes that is related to tumor necrosis factor/cachectin. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 86, 3286-3290.

**Liu C-C**, Rafii S, Granelli-Piperno A, Trapani JA and Young JD-E (1989)<sup>b</sup>. Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells. Kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporin A. J. Exp. Med. 170, 2105-2118.

**Liu C-C**, Walsh CM and Young JD-E (1995). Perforin: structure and function. Immunol. Today 16, 194-201.

**Ljunggren HG** and Kärre K (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. Immunol. Today 11, 237-244.

**Lobo PI** and Patel HC (1994). A novel role for MHC class II antigens: Evidence implicating a protective effect on tumour cells against cytotoxicity by NK and LAK cells. Immunol. 83, 240-244.

**Loetscher H**, Pan Y-C E, Lahm H-W, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H and Lesslauer W (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. Cell 61, 351-359.

**Lombardi G**, Sidhu S, Batchelor R and Lechler R (1994). Anergic T cells as suppressor cells in vitro. Science 264, 1587-1589.

**Lonberg N**, Taylor LD, Harding FA, Troustine M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo C-C, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG, Munoz-O'Regan D, O'Donnell SL, Lapachet ESG, Bengoechea T, Fishwild DM, Carmack CE, Kay RM and Huszar D (1994). Antigen-specific human antibodies from mice

comprising four distinct genetic modifications. Nature 368, 856-859.

**London L**, Perussia B and Trinchieri G (1986). Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. J. Immunol. 137, 3845-3854.

**Lopez-Botet M**, Moretta L and Strominger J (1996). NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecules. Immunol. Today 17, 212-214.

**Lopez-Nevot MA**, Esteban F, Ferron A, Gutiérrez J, Oliva MR, Romer C, Huelin C, Ruiz-cabello F and Garrido F (1989). HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. Br. J. Cancer 59, 221-226.

**Lorenzen J**, Lewis CE, McCracken D, Horak E, Greenall M and McGee JOD (1991). Human tumour-associated NK cells secrete increased amounts of interferon- $\gamma$  and Interleukin-4. Br. J. Cancer 64, 457-462.

**Los M**, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer

PH, Fiers W and Schulze-Osthoff K (1995).

Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis.

Nature 375, 81-83.

**Lotze MT**, Line BR, Mathisen GJ, Rosenberg SA (1980).

The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in T cell growth factor (TCGF): Implications for the adoptive immunotherapy of tumors.

J. Immunol. 125: 1487-1493.

**Lotze MT** and Finn OJ (1990).

Recent advances in cellular immunology: implications for immunity to cancer. Immunol. Today 11, 190-192.

**Lovchik JC** and Hong R (1977).

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC): analyses and projections.

Progress in Allergy 22, 1-44.

**Lovens-De Graef D**, Delvenne P, Lelièvre P, Martin-Simonet M-T, Greimers R, Boniver J and Schaaf-Lafontaine N (1993).

Phenotypical and functional analyses of mononuclear cells during rejection of a transplanted murine fibrosarcoma.

Virchows Arch. B Cell Pathol. 64, 335-344.

**Lowcry DM**, Aebischer T, Olsen K, Lichtenheld

M, Rupp F, Hengartner H and Podack ER (1989).

Cloning, analysis, and expression of murine perforin 1 cDNA, a component of cytolytic T-cell granules with homology to complement component C9.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 247-251.

**Lozzio CB** and Lozzio BB (1975).

Human chronic myelogenous leukaemia cell line with positive Philadelphia chromosome.

Blood 45, 321-326.

**Luton F**, Buferne M, Davoust J, Schmitt-Verhulst AM and Boyer C. (1994)

Evidence for protein tyrosine kinase involvement in ligand-induced TCR/CD3 internalization and surface redistribution.

J. Immunol. 153, 63-72.

**Lynch DH**, Ramsdell F and Alderson MR (1995).

Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses.

Immunol. Today 16, 569-574.

**Mackay CR** (1991).

T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways.

Immunol. Today 12, 189-192.

**Makino M**, Sei Y, Arora PK, Morse III HC and Hartley JW (1992).

Impaired calcium mobilization in CD4<sup>+</sup>

and CD8<sup>+</sup> T cells in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, murine AIDS. J. Immunol. 149, 1707-1713.

**Mandelboim O**, Berke G, Fridkin M, Feldman M, Eisenstein M and Eisenback L (1994).

CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. Nature 369, 67-71.

**Manyonda IT**, Soltys A J and Hay FC (1992).

A critical evaluation of the magnetic cell sorter and its use in the positive and negative selection of CD45R0<sup>+</sup> cells.

J. Immunol. Methods 149, 1-10.

**Marchalonis JJ**. (1969).

An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins.

Bioch. J. 113, 299-305.

**Margolis B**, Hu P, Katzav S, Li W, Oliver JM, Ullrich A, Weiss A and Schessinger J (1992).

Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs.

Nature 356, 71-74.

**Marvel J**, Lighstone E, Samberg NL, Ettinghausen D and Stauss HJ (1991).

The CD45RA molecule is expressed in naive murine CTL precursors but absent in memory and effector CTL.

Int. Immunol. 3, 21-28.

**Mauri D**, Wyss-Coray T, Gallati H and Pichler WJ (1995).

Antigen-presenting T cells induce the development of cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells. I. Involvement of the CD80-CD28 adhesion molecules. J. Immunol. 155, 118-127.

**McFarland ED**, Hurley TR, Pingel JT, Stefton BM, Shaw A and Thomas ML (1993).

Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1402-1406.

**Melief CJM** and Kast WM (1991).

T-cell immunotherapy of cancer. Res. Immunol. 142, 425-429.

**Melief CJ** (1992).

Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. Adv. Cancer Res. 58, 143-75.

**Merkenschlager M** and Beverley PC (1989).

Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursors for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45RO (UCHL1) Int. Immunol. 1, 450-459.

**Merkenschlager M** and Fisher AG (1991).

CD45 isoform switching precedes the activation-

driven death of human thymocytes by apoptosis. Int. Immunol. 3, 1-7.

**Merrit JE**, McCarthy SA, Davies MPA, and Moores KE (1990).

Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca<sup>2+</sup> in platelets and neutrophils. Biochem. J. 269, 513-519.

**Mezzanzanica D**, Canevari S, Ménard S, Pupa SM, Tagliabue E, Lanzavecchia A and Colnaghi MI (1988).

Human ovarian carcinoma lysis by cytotoxic T cells targeted by bispecific monoclonal antibodies: analysis of the antibody components. Int. J. Cancer 41, 609-615.

**Mezzanzanica D**, Garrido MA, Neblock DS, Daddona PE, Andrew SM, Zurawski VR Jr, Segal DM and Wunderlich JR (1991).

Human T-lymphocytes targeted against an established human ovarian carcinoma with a bispecific F(ab')<sub>2</sub> antibody prolong host survival in a murine xenograft model. Cancer Res. 51, 5716-5721.

**Mier JW**, Brandon EP, Libby P, Janicka MW and Aronson FR (1989).

Activated endothelial cells resist lymphokine-activated killer cell-mediated injury. Possible role of induced cytokines in limiting capillary leak during IL-2 therapy. J. Immunol. 143, 2407-2414.

**Miltenyi S**, Müller W, Weichel W and Rabruch A (1990).

High gradient magnetic cell separation with MACS.

Cytometry 11, 231-238.

**Minami Y**, Kono T, Yamada K, Kobayashi N, Kawahara A, Perlmutter RM and Taniguchi T (1993).

Association of p56<sup>lck</sup> with IL-2 receptor  $\beta$  chain is critical for the IL-2 induced activation of p56<sup>lck</sup>. EMBO J. 12, 759-768.

**Minami Y** and Taniguchi T (1995).

IL-2 signaling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the components of the IL-2 receptor. Curr. Opin. Cell Biol. 7, 156-162

**Minowada J**, Ohnuma T and Moore GE (1972).

Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. J. Natl. Cancer Inst. 49, 891-895.

**Minta A**, Kao JPY and Tsien RY (1989).

Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J. Biol. Chem. 264, 8171-8178.

**Miotti S**, Canevari S, Ménard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, Regazzoni M, Tagliabue

E and Colnaghi MI (1987).

Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity.  
Int. J. Cancer 39, 297-303.

**Miotti S**, Alberti S, Facheris P, Mantovani L, Fornaro M, Stella M, Ménard S, Canevari S and Colnaghi MI (1992).  
Membrane association and shedding of the GPI-anchored Ca-MOV18 antigen in human ovary carcinoma cells.  
Int. J. Cancer 51, 499-505.

**Miyazaki T**, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu Z-J, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN and Taniguchi T (1994).  
Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits.  
Science 266, 1045-1046.

**Miyazaki T**, Liu Z-J, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Perimutter RM and Taniguchi T (1995).  
Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation.  
Cell 81, 223-231.

**Moingeon P**, Chang H-C, Wallner BP, Stebbins C, Frey AZ and Reinherz EL (1989).  
CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte

antigen recognition function.  
Nature 339, 312-314.

**Moiré N**, Calvo C-F, Métivier D, Perrot J-Y, Vaquero C, Hatakeyama M and Senik A (1990).  
Role of interleukin 2 receptor  $\beta$  chain in initiating anti-CD3 and interleukin 2-induced proliferation of human resting T cells.  
Eur. J. Immunol. 20, 1981-1987.

**Moiré N**, Rouleau M, Metivier D, Charpentier B, Senik A (1991).  
IL-2-R  $\beta$  expression and function within resting CD8<sup>+</sup> T cells preferentially segregate with the CD45R0<sup>+</sup> subset.  
Eur-Cytokine-Netw 2, 319-327.

**Moretta L**, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R and Moretta A (1994).  
Human natural killer cells: Origin, clonality, specificity, and receptors.  
Adv. Immunol. 55, 341-380.

**Morita T**, Yonese Y and Minato N (1987).  
In vivo distribution of recombinant interleukin-2-activated autologous lymphocytes administered by intra-arterial infusion in patients with renal cell carcinoma.  
J. Natl. Cancer Inst. 78, 441-450.

**Mosmann T** (1983).  
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.  
J. Immunol. Methods 65, 55-63.

**Mosmann TR**, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL (1986).  
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
J. Immunol. 136, 2348-2357.

**Moutschen MP**, Baudrihay MF, Greimers R, Franchimont P and Boniver J (1990).  
Polyclonal T cell stimulation with an anti-CD3 monoclonal antibody generates cytotoxic effectors different from interleukin-2 activated killer cells.  
Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 3, 75-93.

**Moutschen M**, Jacobs N, Hoyoux C, Martin-Simonet M-T, Schaaf-Lafontaine N and Boniver J (1994).  
Presence of  $\gamma\delta$  TcR<sup>+</sup> Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in one case of pediatric Osteogenic sarcoma.  
Int. J. Ped. Hematol. Oncol. 1, 277-281.

**Mueller DL** and Jenkins MK (1995).  
Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness.  
Current Opin. Immunol. 7, 375-381.

**Mulé JJ**, McIntosh JK, Jablons DM and Rosenberg SA (1990).  
Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice.  
J. Exp. Med. 171, 629-636.

**Muraguchi A**, Kishimoto T, Miki Y, Kiaritani T, Kaieda T, Yoshizaki K and Yamamura Y (1981). T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. J. Immunol. 127, 412-413.

**Nagata S** and Golstein P (1995). The Fas death factor. Science 267, 1449-56.

**Nagler A**, Lanier LL and Phillips JH (1990). Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16<sup>-</sup> natural killer cells in vivo. J. Exp. Med. 171, 1527-1533.

**Nakajima F**, Khanna A, Xu G, Lagma M, Haschemeyer R, Mouradian J, Wang JC, Stenzel KH, Rubin AL and Suthanthiran M (1994). Immunotherapy with anti-CD3 monoclonal antibodies and recombinant interleukin-2: stimulation of molecular programs of cytotoxic killer cells and induction of tumor regression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7889-7893.

**Nakajima H**, Tomiyana H and Tokiguchi M (1995). Inhibition of  $\gamma\delta$  T cell recognition receptors for MHC class I molecules. J. Immunol. 155, 4139-4142.

**Nakarai T**, Robertson MJ, Streuli M, WU Z, Ciardelli TL, Smith KA and Ritz J (1994). Interleukin 2 receptor  $\gamma$  chain expression on resting and activated lymphoid cells. J. Exp. Med. 180, 241-245.

**Nakata M**, Smyth MJ, Norihisa Y, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K and Yagita H (1990). Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood  $\gamma/\delta$  T cells: Implication for their cytotoxic role in vivo. J. Exp. Med. 172, 1877-1880.

**Nakata M**, Kawasaki A, Azuma M, Tsuji K, Matsuda H, Shinkai Y, Yagita H and Okumura K (1992). Expression of perforin and cytolytic potential of human peripheral blood lymphocyte subpopulations. Int. Immunol. 4, 1049-1054.

**Nastala CL**, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ and Lotze MT (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- $\gamma$  production. J. Immunol. 153, 1697-1706.

**Neckers LM** and Cossman J (1983). Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required

for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3494-3498.

**Nelson BH**, Lord JD and Greenberg PD (1994). Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma$  chains mediate the signal for T-cell proliferation. Nature 369, 333-336.

**Nelson H**, Ramsey PS, Kerr LA, McKean DJ and Donohue JH (1990). Regional and systemic distribution of anti-tumor X anti-CD3 heteroaggregate antibodies and cultured human peripheral blood lymphocytes in a human colon cancer xenograft. J. Immunol. 145, 3507-3515.

**Nieto MA**, Gonzalez A, Lopez-Rivas A, Diaz-Espada F and Gambon F (1990). IL-2 protects against anti-CD3-induced cell death in human medullary thymocytes. J. Immunol. 145, 1364-1368.

**Niklinska BB**, Yamada H, O'Shea JJ, June CH, Ashwell JD (1992). Tyrosine kinase-regulated and inositol phosphate  $Ca^{2+}$  elevation and mobilization in T cells. J. Biol. Chem. 267, 7154-7159.

**Nishimura T**, Nakamura Y, Takeuchi Y, Tokeda Y, Iwasawa M, Kawasaki A, Okumura K, Habu S (1992). Generation, propagation, and targeting of human

CD4<sup>+</sup> helper/killer T cells induced by anti-CD3 monoclonal antibody + recombinant IL-2. An Efficient strategy for adoptive immunotherapy. J. Immunol. 148, 285-291.

**Nitta T**, Yagita H, Azuma T, Sato K and Okumura K (1989).  
Bispecific F(ab')<sub>2</sub> monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytotoxicity of human T cells.  
Eur. J. Immunol. 19, 1437-1441.

**Nitta T**, Sato K, Yagita H, Okumura K and Ishii S (1990).  
Preliminary trial of specific targeting therapy against malignant glioma.  
Lancet 335, 368-371.

**North RJ**, Awwad M and Dunn PL (1989).  
The immune response to tumors.  
Transplantation Proc. 21, 575-577.

**Northrop JP**, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A and Crabtree GR (1994).  
NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation.  
Nature 369, 497-502.

**Notter M**, Ludwig W-D, Bremer S and Thiel E (1993).  
Selective targeting of human lymphokine-activated killer cells by CD3 monoclonal antibody against the interferon-inducible high-affinity

Fcγ RI receptor (CD64) on autologous acute myeloid leukemic blast cells.  
Blood 82, 3113-3124.

**Ochoa AC**, Gromo G, Alter BJ, Sondel PM and Bach FH (1987).  
Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, β-IL 1, interferon-γ and -β.  
J. Immunol. 138, 2728-2733.

**Ochoa AC**, Hasz DE, Rezonzew R, Anderson PM and Bach FH (1989).  
Lymphokine-activated Killer activity in long-term cultures with anti-CD3 + interleukin-2: identification and isolation of effector subsets.  
Cancer Res. 49, 963-968.

**O'Garra A** and Murphy K (1994).  
Role of cytokines in determining T-lymphocyte function.  
Current Opin. Immunol. 6, 458-466.

**Ohashi Y**, Takeshita T, Nagata K, Mori S and Sugamura K (1989).  
Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells.  
J. Immunol. 143, 3548-3555.

**Oi VT** and Morrison (1986)  
Chimeric antibodies.  
Biotechniques 4, 214-221.

**Ortaldo JR**, Mason A and Overton R (1986).

Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors.  
J. Exp. Med. 164, 1193-1205.

**Ostensen ME**, Thiele DL and Lipsky PE (1987).  
Tumor necrosis factor-α enhances cytolytic activity of human natural killer cells.  
J. Immunol. 138, 4185-4191.

**Otten GR** and Germain RN (1991).  
Split anergy in a CD8<sup>+</sup> T cell: Receptor-dependent cytotoxicity in the absence of interleukin-2 production.  
Science 251, 1228-1229.

**Owen-Schaub LB**, Gutterman JU and Grimm EA (1988)<sup>a</sup>.  
Synergy of tumor necrosis factor and interleukin 2 in the activation of human cytotoxic lymphocytes: Effect of tumor necrosis factor α and interleukin 2 in the generation of human lymphokine-activated killer cell cytotoxicity.  
Cancer Res. 48, 788-792.

**Owen-Schaub LB**, Loudon WG, Yagita M and Grimm EA (1988)<sup>b</sup>.  
Functional differentiation of human lymphokine-activated killing (LAK) is distinct from expansion and involves dissimilar interleukin 2 receptors.  
Cell. Immunol. 111, 235-246.

**Ozdemirli M**, El-Khatib M, Bastiani L, Akdeniz H, Kuchroo V and Ju S-T (1992).  
The cytotoxic process of CD4 Th1 clones.

J. Immunol. 149, 1889-1895.

**Pantaleo G**, Olive D, Poggi A, Pozzan T, Moretta L and Moretta A (1987).

Antibody-induced modulation of the CD3/T cell receptor complex causes T cell refractoriness by inhibiting the early metabolic steps involved in T cell activation. J. Exp. Med. 166, 619-624.

**Palacios R** (1985).

Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. Eur. J. Immunol. 15, 645-651.

**Pardi R.**, Bender JR, Dettori C, Giannazza E and Engleman EG (1989). Heterogeneous distribution and transmembrane signaling properties of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in human lymphocyte subsets. J. Immunol. 143, 3157-3166.

**Parmiani G** (1990).

An explanation of the variable clinical response to interleukin 2 and LAK cells. Immunol. Today 11, 113-115.

**Pasternack MS** and Eisen NE (1985). A novel serine esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes. Nature 314, 743-745.

**Pater MM** and Pater A. (1985).

Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. Virology 145, 313-318.

**Paul WE** (1991).

Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 77, 1859-1870.

**Pellegrini S** and Schindler C. (1993).

Early events in signalling by interferons. Trends Biochem. Sci. 18, 338-342.

**Perez P**, Hoffman RW, Shaw S, Bluestone JA and Segal DM (1985).

Specific targeting of cytotoxic T cells by anti-T3 linked to anti-target cell antibody. Nature 316, 354-356.

**Peri KG** and Veillette A (1994).

Tyrosine protein kinases in T lymphocytes. Chem. Immunol. Samelson LE (ed) 59, 19-39.

**Perkins GR**, Flemming CL, Kabat D and Collins MKL (1993).

The role of IL-2 interaction with p75 and p55 receptor molecules in the stimulation of cell proliferation. Int. Immunol. 5, 541-549.

**Perlmann P**, Perlmann H and Biberfeld P (1972).

Specifically cytotoxic lymphocytes produced by preincubation with antibody-complexed target cells. J. Immunol. 108, 558-561.

**Pernis A**, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E,

Coffman RL, Schindler C and Rothman P (1995).

Lack of interferon  $\gamma$  receptor  $\beta$  chain and the prevention of interferon  $\gamma$  signaling in Th1 cells. Science 269, 245-247.

**Pestka S**, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987).

Interferons and their actions. Annu. Rev. Biochem. 56, 727-777.

**Peter HH** (1983).

The origin of human NK cells. An ontogenic model derived from studies in patients with immunodeficiencies. Blut 46, 239-245.

**Pflueger E**, Mueller EA and Anderer FA (1990).

Preservation of cytotoxic function during multi-cycle immunomagnetic cell separations of human NK cells using a new type of magnetic bead. J. Immunol. Methods 129, 165-173.

**Phillips JH** and Lanier LL (1986).

Dissection of the lymphokine-activated killer cell phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocyte to cytolysis. J. Exp. Med. 164, 814-825.

**Phillips JH**, Takeshita T, Sugamura K and Lanier LL (1989).

Activation of natural killer cells via the p75 interleukin 2 receptor. J. Exp. Med. 170, 291-296.

**Pimentel-Muñoz FX**, Muñoz-Fernández MA, Fresno M (1994).

Control of T lymphocyte activation and IL-2 receptor expression by endogenously secreted lymphokines.  
J. Immunol. 152, 5714-5722

**Platts KE**, Lawry J, Hancock BW and Rees RC (1993).

Phenotypic and cell cycle analysis of human peripheral blood mononuclear cells activated with interleukin-2 and/or OKT3.  
Exp. Cell Res. 208, 154-160.

**Plebanski M**, Saunders M, Burtles SS, Crowe S and Hooper DC (1992).

Primary and secondary human *in vitro* T-cell responses to soluble antigens are mediated by subsets bearing different CD45 isoforms.  
Immunology. 75, 86-91.

**Podack ER**, Hengartner H and Lichtenheld M (1991).

A central role of perforin in cytotoxicity?  
Ann. Rev. Immunol. 9, 129-157.

**Poenie M**, Tsien RY and Schmitt-Verhulst A-M (1987).

Sequential activation and lethal hit measured by  $[Ca^{2+}]_i$  in individual cytolytic T cells and targets.  
EMBO J. 6, 2223-2232.

**Pohl C**, Denfeld R, Renner C, Jung W, Bohlen H, Sahin U, Hombach A, van Lier R, Schwomzen M, Diehl V

and Pfreundschuh M (1993).

CD30-antigen-specific targeting and activation of T cells via murine bispecific monoclonal antibodies against CD3 and CD28: Potential use for the treatment of Hodgkin's lymphoma.  
Int. J. Cancer 54, 820-827.

**Powell LD**, Sgroi D, Sjoberg ER, Stamenkovic I and Varki A (1993).

Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 $\beta$  carry N-linked oligosaccharides with  $\alpha$ -2,6-linked sialic acids that are required for recognition.  
J. Biol. Chem. 268, 7019-7027.

**Pupa SM**, Canevari S, Fontanell R, Ménard S, Mezzanzanica D, Lanzavecchia A and Colnaghi MI (1988).

Activation of mononuclear cells to be used for hybrid monoclonal antibody-induced lysis of human ovarian carcinoma cells.  
Int. J. Cancer 42, 455-459.

**Pupa SM**, Canevari S, Colzani E, Damgard EM, Ménard S, Miotti S and Colnaghi MI (1991).

Purification of bispecific monoclonal antibodies produced by a hybrid hybridoma.  
J. Immunol. Res. 3, 16-23.

**Qian D**, Griswold-Prenner I, Rosner MR and Fitch FW (1993).

Multiple components of the T cell antigen receptor complex become tyrosine-

phosphorylated upon activation.

J. Biol. Chem. 268, 4488-4493.

**Qian J-H**, Titus JA, Andrew SM,

Mezzanzanica D, Garrido MA, Wunderlich JR and Segal DM (1991).

Human peripheral blood lymphocytes targeted with bispecific antibodies release cytokines that are essential for inhibiting tumor growth.  
J. Immunol. 146, 3250-3256.

**Quinones RR**, Segal DM, Henkart P, Perez P and Gress RE (1989).

Inhibition of cytotoxic T cell lysis by anti-CD8 monoclonal antibodies: studies with CD3-targeted cytolysis of nominal antigen-negative targets.  
J. Immunol. 142, 2200-2206.

**Rabinovitch PS**, Torres RM, and Engel D (1986).

Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: applications to study of cell activation and the cell cycle of murine LY-1 B cells.  
J. Immunol. 136, 2769-2775.

**Rammensee H-G**, Falk K and Rötzschke O (1993).

MHC molecules as peptide receptors.  
Curr. Opin. Immunol. 5, 35-44.

**Rasmussen A-M**, Smeland EB, Erikstein

BK, Cagnault L and Funderud S (1992).

A new method for detachment of Dynabeads from positively selected B lymphocytes.

J. Immunol. Methods 146, 195-202.

**Ravetch JV** (1994).

Fc receptors: Rubor redux.

Cell 78, 553-560.

**Reed PW** and Lardy HA (1972).

A23187: a divalent cation ionophore.

J. Biol. Chem. 247, 6970-6977.

**Reilly EB** and Antognetti G (1991).

Increased tumor-specific CTL activity in human tumor-infiltrating lymphocytes stimulated with autologous tumor lines.

Cell. Immunol. 135, 526-33.

**Reinherz EL**, Penta AC, Hussey RE, Schlossman SF (1981).

A rapid method for separating functionally intact human T lymphocytes with monoclonal antibodies.

Clin. Immunol. Immunopathol. 21, 257-66.

**Renner C**, Jung W, Sahin U, van Lier R and Pfreundschuh M (1995).

The role of lymphocyte subsets and adhesion molecules in Tcell-dependent cytotoxicity mediated by CD3 and CD28 bispecific monoclonal antibodies.

Eur. J. Immunol. 25, 2027-2033.

**Renner C** and Pfreundschuh M (1995).

Tumor therapy by immune recruitment with bispecific antibodies.

Immunol. Rev. 145, 179-209.

**Reth M** (1989).

Antigen receptor tail clue.

Nature 338, 383-384.

**Rheinwald JG** and Green H (1975).

Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.

Cell 6, 331-344.

**Richards JM**, Vogelzang NJ and Bluestone JA (1990).

Neurotoxicity after treatment with muromonab-CD3.

New Eng. J. Med. 323, 7-8.

**Riechmann L**, Clark M, Waldmann H and Winter G (1988).

Reshaping human antibodies for therapy.

Nature 332, 323-327.

**Rigley K**, Slocombe P, Proudfoot K, Wahid S, Mandair K and Bebbington C (1995).

Human p59<sup>fyn</sup>(T) regulates OKT3-induced calcium influx by a mechanism distinct from PIP<sub>2</sub> hydrolysis in Jurkat T cells.

J. Immunol. 154, 1136-1145.

**Rinnoy Kan EA**, Wright SD, Welte K and Wang CY (1986).

Fc receptors on monocytes cause OKT3 treated lymphocytes to

internalize T3 and to secrete IL-2.

Cell. Immunol. 98, 181-187.

**Robbins PA**, Maino VC, Warner NL and Brodsky FM (1988).

Activated T cells and monocytes have characteristic patterns of class II antigen expression.

J. Immunol. 141, 1281-1287.

**Roberts K**, Lotze MT and Rosenberg SA (1987).

Separation and functional studies of the human lymphokine-activated killer cell.

Cancer Res. 47, 4366-4371.

**Robey E** and Allison JP (1995).

T-cell activation: Integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules.

Immunol. Today 16, 306-309.

**Robins RA** and Baldwin RW (1985).

T-cell subsets in tumour rejection responses.

Immunol. Today 6, 55-58.

**Roder J** and Duwe A (1979).

The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function.

Nature 278, 451-453.

**Romagnani S** (1994).

Lymphokine production by human T cells in disease states.

Ann. Rev. Immunol. 12, 227-257.

**Roosnek EE**, Van Lier RA and Aarden LA (1987).

Two monoclonal anti-CD3 antibodies can induce different events in human T lymphocyte activation.

Eur. J. Immunol. 17, 1507-1510.

**Roosnek E** and Lanzavecchia A (1989).

Triggering T cells by otherwise inert hybrid anti-CD3/antitumor antibodies requires encounter with the specific target cell.

J. Exp. Med. 170, 297-302.

**Rosenberg SA**, Grimm EA, McGrogan M, Doyle M, Kawasaki E, Koths K and Mark DF (1984).

Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*.

Science 223, 1412-1415.

**Rosenberg SA**, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, Seipp CA, Simpson C and Reichert CM (1985).

Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer.

New Eng. J. Med. 313, 1485-1492.

**Rosenberg SA**, Spiess P and Lafreniere R (1986).

A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.

Science 233, 1318-1321.

**Rosenberg SA**, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JG, Seipp CA, Simpson C, Carter C, Bock S, Schwartzentruber D, Wei JP and White DE (1988).

Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma.

New Eng. J. Med. 319, 1676-1680.

**Rosenberg SA** (1992).

The immunotherapy and gene therapy of cancer.

J. Clin. Oncol. 10, 180-199.

**Rosenfeld MA**,

Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M, Guggino WB, Pavirani A, Lecocq J-P and Crystal RG (1992).

In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium.

Cell 68, 143-155.

**Rosenstein M**, Yron I, Kaufmann Y and Rosenberg SA (1984).

Lymphokine-activated killer cells: lysis of fresh syngeneic natural killer-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin 2.

Cancer Res. 44, 1946-1953.

**Rouvier E**, Luciani M-F and Golstein P (1993).

Fas involvement in Ca<sup>2+</sup>-independent T cell-mediated cytotoxicity.

J. Exp. Med. 177, 195-200.

**Russell JH**, White CL, Loh DY and Meleedy-Rey P (1991).

Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2151-2155.

**Russell JH** and Wang R (1993).

Autoimmune *gld* mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells.

Eur. J. Immunol. 23, 2379-2382.

**Russell SM**, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M, Berg M, McVicar DW, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Goldman AS, Shmalstieg FC, Ihle JN, O'Shea JJ and Leonard WJ (1994).

Interaction of IL-2R $\beta$  and  $\gamma$ c chains with Jak1 and Jak3: Implications for XSCID and XCID.

Science 266, 1042-1044.

**Sagerström CG**, Kerr EM, Allison JP and Davis MM (1993).

Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8987-8991.

**Sakihama T**, Smolyar A and Reinherz EL (1995).

Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4,

MHC class II and TCR molecules.  
Immunol. Today 16, 581-587.

**Samelson LE**, Patel MD, Weissman AM, Harford JB and Klausner RD (1986).

Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor.  
Cell 46, 1083-1090.

**Samelson LE** and Klausner RD (1992).

Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. Current research on activation via the T cell antigen receptor.  
J. Biol. Chem. 267, 24913-24916.

**Salmeron A**, Sanchez-Madrid F, Ursa MA, Fresno M and Alarcon B (1991).

A conformational epitope expressed upon association of CD3- $\epsilon$  with either CD3- $\delta$  or CD3- $\gamma$  is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies.

J. Immunol. 147, 3047-3052.

**Sancho J**, Ledbetter JA, Choi M-S, Kanner SB, Deans JP and Terhorst C (1992).

CD3- $\zeta$  surface expression is required for CD4-p56<sup>lck</sup>-mediated up-regulation of T cell antigen receptor-CD3 signaling in T Cells.

J. Biol. Chem. 267, 7871-7879.

**Sancho J**, Franco R, Chatila T, Hall C and Terhorst C (1993).

The T cell receptor associated CD3- $\epsilon$  protein is phosphorylated upon T cell activation in the two tyrosine residues of a conserved signal transduction motif.

Eur. J. Immunol. 23, 1636-1642.

**Sanders ME**, Makgoba MW, Sharrow SO, Stephany D, Springer TA, Young HA and Shaw S (1988).

Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN- $\gamma$  production.

J. Immunol. 140, 1401-1407.

**Sanders ME**, Makgoba MW, June CH, Young HA and Shaw S (1989).

Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD2 and CD3 receptor-mediated activation.

Eur. J. Immunol. 19, 803-808.

**Sano S**, Kiyotaki C, Tatsumi Y-I, Fujiwara H and Hamaoka T (1989).

Cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness induced by prolonged treatment with immobilized anti-CD3 antibody. Association of impairment of cytolytic activity with temporary depletion of intracellular protein Kinase C.

J. Immunol. 143, 2797-2805.

**Scatchard G** (1949).

The attraction of proteins for small molecules and ions.

Ann N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672.

**Schaaf-Lafontaine N** (1978).

Separation of lymphoid cells with a suppressor effect on the activity of cytotoxic cells in vitro during the growth of a syngeneic mouse tumour.

Int. J. Cancer 21, 329-333.

**Schall TJ**, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GHW, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, Kohr WJ and Goeddel DV (1990).

Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor.

Cell 61, 361-370.

**Scheurich P**, Thoma B, Ucer U and Pfizenmaier K (1987).

Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ : induction of TNF receptors on human T cells and TNF- $\alpha$ -mediated enhancement of T cell responses.

J. Immunol. 138, 1786-1790.

**Schild H**, Mavaddat N, Litzberger C, Ehrlich EW, Davis MM, Bluestone JA, Matis L, Draper RK and Chien Y-H (1994).

The nature of major histocompatibility complex recognition by  $\gamma\delta$  T cells.

Cell 76, 29-37.

**Schlitt HJ**, Kurrie R and Wonogiet K (1989).

T cell activation by monoclonal antibodies

directed to different epitopes on the human T cell receptor/CD3 complex: evidence for two different modes of activation.

Eur. J. Immunol. 19, 1649-1655.

**Schrezenmeier H**, Kurrle R, Wagner H and Fleischer B (1985).

Activation of human T lymphocytes. III. Triggering of bystander cytotoxicity in cytotoxic T cell clones by antibodies against the T3 antigen or by a calcium ionophore.

Eur. J. Immunol. 15, 1019-1024.

**Schulze-Osthoff K**, Krammer PH and Dröge W (1994).

Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death.

EMBO J. 13, 4587-4596.

**Schwab R**, Crow MK, Russo C and Weksler ME (1985).

Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody: role of modulation of T3 molecules and interleukin 1.

J. Immunol. 135, 1714-1718.

**Schwartz RH** (1990).

A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. Science 248, 1349-1356.

**Schwartz RH** (1992).

Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy.

Cell 71, 1065-1068.

**Schwartzentruber DJ**, Topalian SL, Mancini M and Rosenberg SA (1991).

Specific release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, and IFN-gamma by human tumor-infiltrating lymphocytes after autologous tumor stimulation.

J. Immunol. 146, 3674-3681.

**Schwartzentruber DJ**, Stetler-Stenvenson M, Rosenberg SA and Topalian SL (1993).

Tumor-infiltrating lymphocytes derived from selected B-cell lymphomas secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to autologous tumor stimulation.

Blood 82, 1204-1211.

**Schwinger R**, Franklin RA, Domenico J, Renz H and Gelfand EW (1992).

Monoclonal antibodies directed to different epitopes in the CD3-TCR complex induce different states of competence in resting human T cells.

J. Immunol. 148, 1322-1328.

**Sciammas R**, Johnson RM, Sperling AI, Brady W, Linsley PS, Spear PG, Fitch FW and Bluestone JA (1994).

Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR- $\gamma\delta$  cell.

J. Immunol. 152, 5392-5397.

**Scott P** (1993).

IL-12: Initiation cytokine for cell-mediated immunity.

Science 260, 496-497.

**Seder RA** and Paul WE (1994).

Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells.

Ann. Rev. Immunol. 12, 635-673.

**Sefton BM** and Taddie JA (1994).

Role of tyrosine kinases in lymphocytes activation. Current Opin. Immunol. 6, 372-379.

**Segal DM** and Snider DP (1989).

Targeting and activation of cytotoxic lymphocytes. Chem Immunol. 47, 179-213.

**Segal DM**, Qian J-H, Titus JA, Moreno B, George AJT, Jost CR, Kurucz I, El-Gamil M and Wunderlich JR (1992).

Targeted cytokine production. Int. J. Cancer Suppl. 7, 36-38.

**Sei Y** and Arora PK (1991).

Quantitative analysis of calcium (Ca<sup>2+</sup>) mobilization after stimulation with mitogens or anti-CD3 antibodies. Simultaneous fluo-3 and immunofluorescence flow cytometry.

J. Immunol. Methods 137, 237-244.

**Sgroi D**, Varki A, Braesch-Andersen S and Stamenkovic I (1993).

CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. J. Biol. Chem. 268, 7011-7018.

**Shalaby MR**, Shepard HM, Presta L, Rodrigues ML, Beverley PCL, Feldmann M and Carter P (1992).

Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. J. Exp. Med. 175, 217-225.

**Shapiro HM** (1995). Practical flow cytometry. Third edition. Wiley-Liss

**Shaw AS**, Chalupny J, Whitney JA, Hammond G, Amrein KE, Kavathas P, Sefton BM and Rose JK (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56<sup>lck</sup> tyrosine kinase. Mol. Cell. Biol. 10, 1853-1862.

**Shi L**, Nishiota WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW and Greenberg AH (1994). Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. Science 263, 1143-1145.

**Shinkai Y**, Takio K and Okumura K (1988). Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). Nature 334, 525-527.

**Shinkai Y**, Rathbun G, Lam K-P, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM and Alt FW (1992). RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell 68: 855-867.

**Shresta S**, Heusel JW, Macivor DM, Wesselschmidt RL, Russel JH, and Ley TJ (1995). Granzyme B plays a central role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. Immunol. Rev. 146, 211-221.

**Shuai K**, Horvath CM, Huang LHT, Qureshi SA, Cowburn D and Darnell JE (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-Phosphotyrosyl peptide interactions. Cell 76, 821-828.

**Si L** and Whiteside TL (1983). Tissue distribution of human NK cells studied with anti-Leu-7 monoclonal antibody. J. Immunol. 130, 2149-2155.

**Smith CA**, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ and Owen JJT (1989). Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. Nature 337, 181-184.

**Smyth MJ**, Norihisa Y and Ortaldo JR (1992). Multiple cytolytic mechanisms displayed by activated human peripheral blood T cell subsets. J. Immunol. 148, 55-62.

**Smyth MJ** and Trapani JA (1995). Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. Immunol. Today 16, 202-206.

**Sondel PM**, Hank JA, Kohler PC, Chen BP, Minkoff DZ and Molenda JA (1986). Destruction of autologous human lymphocytes by interleukin 2-activated cytotoxic cells. J. Immunol. 137: 502-511.

**Spero L** and Metzger JF (1981). Staphylococcal enterotoxin A (SEA). Meth. Enzymol. 78, 331-336.

**Srivastava PK**, deleo AB and Old LJ (1986). Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 83, 3407-3411.

**Staerz UD** and Bevan MJ (1985). Cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis via the Fc receptor of target cells. Eur. J. Immunol. 15, 1172-1177.

**Stamenkovic I**, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS and Anderson T (1991). The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte

common antigen CD45R0 on T cells and  $\alpha$  2-6 sialytransferase, CD75, on B cells.  
Cell 66, 1133-1144.

**Stankova J**, Hoskin DW and Roder JC (1989). Murine anti-CD3 monoclonal antibody induces potent cytolytic activity in both T and NK cell populations.  
Cell. Immunol. 121, 13-29.

**Steen HB** (1990). Characteristics of flow cytometers.  
In: "Flow Cytometry and sorting", pp 11-26; Melamed MR, Lindmo T and Mendelsohn ML Edts, Wiley-Liss, NY.

**Steger GG**, Pierce WC, Figlin R, Czernin J, Kaboo R, deKernion JB, Okarma T and Belldegrun A (1994). Patterns of cytokine release of unselected and CD8+ selected renal cell carcinoma tumor-infiltrating lymphocytes (TIL). Evidence for enhanced specific killing of tumor necrosis factor-secreting/IL-6 nonsecreting TIL in vitro and correlation with complete response in vivo.  
Clin. Immunol. Immunother. 72, 237-247.

**Street NE**, Schumacher JH, Fong TAT, Bass H, Fiorentino DF, Leverah JA and Mosmann TR (1990). Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells.

J. Immunol. 144,1629-1639.

**Suda T**, Takahashi T, Golstein P and Nagata S (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.  
Cell 75, 1169-1178.

**Suda T** and Nagata S (1994). Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis.  
J. Exp. Med. 179, 873-879.

**Suhrbier A**, Fernan A, Burrows SR, Saul A and Moss DJ (1991). BLT esterase activity as an alternative to chromium release in cytotoxic T cell assays.  
J Immunol Methods 145, 43-53

**Sundström C** and Nilsson K (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int. J. Cancer 17, 565-577.

**Taga K**, Kasahara Y, Yachie A, Miyawaki T and Taniguchi N (1991). Preferential expression of IL-2 receptor subunits on memory populations within CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.  
Immunology. 72, 15-19.

**Takahashi T**, Ishikura H, Iwai K, Takahashi C, Kato H, Tanabe T and Yoshiki T (1993). Cytokine regulation of cell-to-cell interactions in

lymphokine-activated killer cell cytotoxicity in vitro.  
Cancer Immunol. Immunother. 36, 76-82.

**Takeshita T**, Goto Y, Tada K, Nagata K, Asao H and Sugamura K (1989). Monoclonal antibody defining a molecule possibly identical to the p75 subunit of interleukin 2 receptor.  
J. Exp. Med. 169, 1323-1332.

**Talento A**, Nguyen M, Law S, Wu JK, Poe M, Blake JT, Patel M, Wu T-J, Manyak CL, Silberklang M, Mark G, Springer M, Sigal NH, Weissman IL, Bleackley RC, Podack ER, Tykocinski ML and Koo GC (1992). Transfection of mouse cytotoxic T lymphocyte with an antisense granzyme A vector reduces lytic activity.  
J. Immunol. 149, 4009-4015.

**Tao M-H** and Levy R (1993). Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma.  
Nature 362, 755-758.

**Tartaglia LA**, Ayres TM, Wong GHW and Goeddel DV (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death.  
Cell 74, 845-853.

**Tax WJM**, Willems HW, Reekers PPM, Capel PJA and Koene RAP (1983).

Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. Nature 304, 445-447.

**Taylor J**, Trimarchi C, Weinberg R, Languet B, Guillemin F, Desmettre P and Paoletti E (1991). Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. Vaccine 9, 190-193.

**Telerman A**, Amson RB, Romasco F, Wybran J, Galand P and Mosselmans R (1987). Internalization of human T lymphocytes receptors. Eur. J. Immunol. 17, 991-997.

**Terstappen LWMM**, Huang S and Picker LJ (1992). Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. Blood 79, 666-677.

**Testi R**, D'Ambrosio D, De Maria R and Santoni A (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. Immunol. Today 15, 479-483.

**Thiele DL**, Patel SS and Lipski PE (1988). Anti-CD3 and phorbol myristate acetate regulation of MHC unrestricted T cell cytotoxicity. Lack of a requirement for CD3/T cell receptor complex expression during tumor cell lysis. J. Immunol. 140, 3253-3260.

**Ting C-C**, Hargrove M and Yun YS (1988). Augmentation by anti-T3 antibody of the lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 141, 741-748.

**Ting C-C**, Hargrove ME, Wang J and Patel AD (1995). Differential requirement of protein tyrosine kinase and protein kinase C in the generation of IL-2-induced LAK cell and  $\alpha$ CD3-induced CD3-AK cell responses. Cell. Immunol. 160, 286-296.

**Titus JA**, Garrido MA, Hecht TT, Winkler DF, Wunderlich JR and Segal DM (1987). Human T cells targeted with anti-T3 cross-linked to antitumor antibody prevent tumor growth in nude mice. J. Immunol. 138, 4018-4022.

**Tomazic VJ**, Farha M, Loftus A and Elias EG (1988). Anti-tumor activity of recombinant tumor necrosis factor on mouse fibrosarcoma in vivo and in vitro. J. Immunol. 140, 4056-4061.

**Topalian SL**, Rivoltini L, Mancini M, Markus NR, Robbins PF, Kawakami Y and Rosenberg SA (1994). Human CD4<sup>+</sup> T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene.

Proc. Natl. Acad. Sc. USA 91, 9461-9465.

**Torimoto Y**, Rothstein DM, Dang NH, Schlossman SF and Morimoto C (1992). CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation. J. Immunol. 148, 388-396.

**Tovar Z**, Dauphinée M and Talal N (1988). Synergistic interaction between anti-CD3 and IL-2 demonstrated by proliferative response, interferon production, and non-MHC-restricted killing. Cell. Immunol. 117, 12-21.

**Trapani JA**, Klein JL, White PC and Dupont B (1988). Molecular cloning of an inducible serine esterase gene from human cytotoxic lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6924-6928.

**Trauth BC**, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin K-M and Krammer PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 245, 301-304.

**Traversari C**, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, van Pel A, De Plaen E, Amar-Costesec A and Boon T (1992). A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T

lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E.  
J. Exp. Med. 176, 1453-1457.

**Trinchieri G**, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sehra J, London L and Perussia B (1984).  
Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2.  
J. Exp. Med. 160, 1147-1169.

**Trinchieri G** (1989).  
Biology of natural killer cells.  
Adv. Immunol. 47, 187-376.

**Trinchieri G** (1994).  
Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.  
Blood 84, 4008-4027.

**Triozzi PL**, Eicher DM, Smoot J and Rinehart JJ (1992).  
Modulation of leukemic cell sensitivity to lymphokine-activated killer cytotoxicity: role of intercellular adhesion molecule-1.  
Exp. Hematol. 20, 1072-1076.

**Trowbridge IS** (1994).  
CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development.  
Ann. Rev. Immunol. 12: 85-116.

**Tsien RY**, Pozzan T and Rink TJ (1982).  
Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator.  
J. Cell Biol. 94, 325-334.

**Tsien R** and Pozzan T (1989).  
Measurement of cytosolic free  $Ca^{2+}$  with quin2.  
Method. Enzymol. 172, 230-262.

**Tsuda M.**, Kitamura F. and Miyasaka M (1989).  
Characterization of the interleukin 2 receptor  $\beta$  chain using three distinct monoclonal antibodies.  
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 86, 1982-1986

**Tunnacliffe A**, Olsson C and de la Hera A (1989).  
The majority of human CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain.  
Int. Immunol. 1, 546-550.

**Tutt A**, Greenman J, Stevenson GT and Glennie MJ (1991).  
Bispecific F(ab' $\gamma$ )<sub>3</sub> antibody derivatives for redirecting unprimed cytotoxic T cells.  
Eur. J. Immunol. 21, 1351-1358.

**Tutt MM**, Schuler W, Kuziel WA, Tucker PW, Bennett M, Bosma MJ and Kumar V (1987).  
T cell receptor genes do not rearrange or express functional transcripts in natural killer cells of scid mice.  
J. Immunol. 138, 2338-2344.

**Ucker DS**, Meyers J and Obermiller PS (1992).  
Activation-driven T cell death.  
II. Quantitative differences alone distinguish stimuli triggering nontransformed T cell proliferation or death.  
J. Immunol. 149, 1583-1592.

**Unutmaz D**, Pileri P and Abrignani S (1994).  
Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination.  
J. Exp. Med. 180, 1159-1164.

**Valentin H**, Groux H, Gelin C, Chretien I and Bernard A (1990).  
Modulation of lymphokine release and cytolytic activities by activating peripheral blood lymphocytes via CD2.  
J. Immunol. 144, 875-882.

**Vandenberghe PA** and Ceuppens JL (1990).  
Flow cytometric measurement of cytoplasmic free calcium in human peripheral blood T lymphocytes with fluo-3 a new fluorescent calcium indicator.  
J. Immunol. Methods 127, 197-205.

**van den Broek MF**, Kagi D, Zinkernagel RM and Hengartner H (1995).  
Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo.  
Eur. J. Immunol. 25, 3514-3516.

**Van den Eynde B** and Brichard VG (1995).  
New tumor antigens recognized by T cells.  
Current Opin. Immunol. 7, 674-681.

**van der Bruggen P**, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, van den Eynde B, Knuth A and Boon T (1991).  
A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.  
Science 254, 1643-1647

**Van Pel A**, Vessièrè F and Boon T (1983).  
Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis.  
J. Exp. Med. 157, 1992-2001.

**Van Pel A**, Van der Bruggen P, Coulie PG, Brichard VG, Lethé B, Van den Eynde B, Uyttenhove C, Renauld J-C and Boon T (1995).  
Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes.  
Immunol. Rev. 145, 229-250.

**van Ravenswaay Claasen HH**, van de Griend RJ, Mezzanzanica D, Bolhuis RLH, Warnaar SO and Fleuren GJ (1993).  
Analysis of production, purification, and cytolytic potential of bi-specific antibodies reactive with ovarian-carcinoma-associated antigens and the T-cell antigen CD3.  
Int. J. Cancer 55, 128-136.

**van Seventer GA**, Shimizu Y and Shaw S (1991).  
Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation.  
Current Opin. Immunol. 3, 294-303.

**Van Wauwe JP**, De Mey JR and Goossens JG (1980).  
OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties.  
J. Immunol. 124: 2708-2713.

**Vassalli P** (1992).  
The pathophysiology of tumor necrosis factors.  
Annu. Rev. Immunol. 10, 411-452.

**Veillette A**, Bookman MA, Horak EM, Samelson LE and Bolen JB (1989).  
Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>.  
Nature 338, 257-259

**Versteeg R** (1992).  
NK cells and T cells: mirror images.  
Immunol. Today 13, 244-247.

**Verwilghen J**, Baroja ML, Van Vaeck F, Van Damme J and Ceuppens JL (1991).  
Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation.  
Immunology 72, 269-276.

**Vignaux F** and Golstein P (1994).  
Fas-based lymphocytes-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway?  
Eur. J. Immunol. 24, 923-927.

**Vose BM** and Moore M (1985).  
Human tumor infiltrating lymphocytes: a marker of host response.  
Sem. Hematol. 22, 27-40.

**Voss SD**, Sondel PM and Robb RJ (1992).  
Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: Association of the p64 IL-2R  $\gamma$  chain with the IL-2R  $\beta$  chain in functional intermediate-affinity IL-2R.  
J. exp. Med. 176, 531-541.

**Vose BM** and Moore M (1985).  
Human tumor infiltrating lymphocytes: a marker of host response.  
Sem. Hematol. 22, 27-40.

**Walker C**, Pichler WJ, Koponen M, Domzig W and De Weck AL (1986).  
Different effects of IL-2 addition or antibody crosslinking on T-cell subset stimulation by CD3 antibodies.  
Cell. Immunol. 101, 195-203.

**Wang ECY**, Lehner PJ, Graham S and Borysiewicz LK (1994).  
CD8<sup>high</sup> (CD57<sup>+</sup>) T cells in normal, healthy individuals specifically

suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus transformed B cell lines. Eur. J. Immunol. 24, 2903-2909.

**Wang JCL**, Walle A, Novogrodsky A, Suthanthiran M, Silver RT, Bander NH, Rubin AL and Stenzel KH (1989).  
A phase II clinical trial of adoptive immunotherapy for advanced renal cell carcinoma using mitogen-activated autologous leukocytes and continuous infusion interleukin-2. J. Clinical Oncol. 7, 1885-1891.

**Wang RL**, Kong A-N T and Samelson LE (1992).  
A tyrosine-phosphorylated 70-kDa protein binds a photoaffinity analogue of ATP and associates with both the  $\epsilon$  chain and CD3 components of the activated T cell antigen receptor. J. Biol. Chem. 267, 11685-11688.

**Wang RL**, Malek SN, Desiderio S and Samelson LE (1993).  
Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor  $\zeta$  and CD3 $\epsilon$  from activated Jurkat T cells. J. Biol. Chem. 268, 19797-19801.

**Watanabe-Fukunaga R**, Brannam CI, Copeland NG, Jenkins NA and Nagata S (1992).  
Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in

Fas antigen that mediates apoptosis. Nature 356, 314-317.

**Webb S** and Sprent J (1987).  
Down regulation of T cell responses by antibodies to the T cell receptor. J. Exp. Med. 165, 584-589.

**Webb SR** and Gascoigne NRJ (1994).  
T-cell activation by superantigens. Current Opin. Immunol. 6, 467-475.

**Wegener A-M K**, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F and Malissen B (1992).  
The T cell Receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. Cell 68, 83-95.

**Weinberg K** and Parkman R (1990).  
Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. New Eng. J. Med. 322, 1718-1723.

**Weiner LM**, Holmes M, Adams GP, LaCreta F, Watts P and Garcia De Palazzo I (1993).  
A human tumor xenograft model of therapy with a bispecific monoclonal antibody targeting *c-erbB-2* and CD16. Cancer Res. 53, 94-100.

**Weiner GJ**, Kostelny SA, Hillstrom JR, Cole MS, Link BK, Wang SL and Tso JY (1994).

The role of T cell activation in anti-CD3 X antitumor bispecific antibody therapy. J. Immunol. 152, 2385-2392.

**Weintraub BC**, Jackson MR and Hedrick SM (1994).  
 $\gamma\delta$  T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. J. Immunol. 153, 3051-3056.

**Weiss A**, Wiskocil RL and Stobo JD (1984).  
The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J. Immunol. 133, 123-128.

**Weiss A** and Imboden JB (1987).  
Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. Adv. Immunol. 41, 1-38

**Weiss A**, Koretzky G, Schatzman RC and Kadlecik T (1991).  
Functional activation of the T-cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 88, 5484-5488.

**Weiss A** and Littman DR (1994).  
Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. Cell 76, 263-274.

**Weiss A**, Iwashima M, Irving B, van Oers NSC, Kadlecck TA, Straus D and Chan A (1994).

Molecular and genetic insights into T-cell antigen receptor signal transduction. Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation V. Gupta (Eds). Plenum Press, New York 53-62.

**Weiss A**, Kadlecck T, Iwashima M, Chan A and van Oers N (1995).

Molecular and genetic insights into T-cell antigen receptor signaling. Annals New York Acad. Sci. 766, 149-157.

**Welte K**, Andreeff M, Platzer E, Holloway K, Rubin BY, Moore MAS and Mertelsmann R (1984).

Interleukin 2 regulates the expression of Tac antigen on peripheral blood T lymphocytes. J. Exp. Med. 160, 1390-1403.

**Wesselborg S**, Janssen O and Kabelitz D (1993).

Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. J. Immunol. 150, 4338-4345.

**West WH**, Tauer KW, Yanelli JR, Marshall GD, Orr DW, Thurman GB and Oldham RK (1987).

Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer.

New England J. Med. 316, 898-905.

**Weynants P**, Lethé B, Brasseur F, Marchand M and Boon T (1994).

Expression of MAGE genes by non-small-cell lung carcinomas.

Int. J. Cancer 56, 826-829.

**Wiegmann K**, Schüze S, Machleidt T, Witte D and Krönke M (1994).

Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling.

Cell 78, 1005-1015.

**Whiteside TL** and Heberman RB (1995).

The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer.

Current Opin. Immunol. 7, 704-710.

**Willems F**, Andris F, Xu D, Abramowicz, Wissing M, Goldman M and Leo O (1995).

The induction of human T cell unresponsiveness by soluble anti-CD3 mAb requires T cell activation.

Int. Immunol. 7, 1593-1598.

**Williams JM**, Deloria D, Hansen JA, Dinarello CA, Loertscher R, Shapiro HM and Strom TB (1985).

The events of primary T cell activation can be staged by use of sepharose-bound anti-T3 (64.1) monoclonal antibody and purified interleukin 1.

J. Immunol. 135, 2249-2256.

**Williams ME**, Lichtman AH and Abbas AK (1990).

Anti-CD3 antibody induces unresponsiveness to IL-2 in Th1 clones but not in Th2 clones.

J. Immunol. 144, 1208-1214.

**Williams ME**, Shea CM, Lichtman AH and Abbas AK (1992).

Antigen receptor-mediated anergy in resting T lymphocytes and T cell clones. Correlation with lymphokine secretion patterns.

J. Immunol. 149, 1921-1926.

**Williams N** (1996).

An immune boost to the war on cancer.

Science 272, 28-30.

**Witz IP** and Ran M (1992).

FcR may function as a progression factor of nonlymphoid tumors.

Immunol. Res. 11, 283-295.

**Wolf H**, Müller Y, Salmen S, Wilmanns W and Jung G (1994).

Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies.

Eur. J. Immunol. 24, 1410-1417.

**Wong GH** and Goeddel DV (1994).

Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways.

J. Immunol. 152, 1751-1755.

**Wong JT**, Pinto CE, Gifford JD, Kurnick JT and Kradin RL (1989).

Characterization of the CD4+ and CD8+ tumor

infiltrating lymphocytes propagated with bispecific monoclonal antibodies.  
J. Immunol. 143, 3404-3411.

**Woodle ES**, Thistlethwaite JR, Jolliffe LK, Fucello AJ, Stuart FP and Bluestone JA (1991). Anti-CD3 monoclonal antibody therapy. An approach toward optimization by in vitro analysis of new anti-CD3 antibodies.  
Transplantation 52: 361-368.

**Woodle ES**, Thistlethwaite JR, Jolliffe LK, Zivin RA, Collins A, Adair JR, Bodmer M, Athwal D, Alegre M-L and Bluestone JA (1992). Humanized OKT3 antidodies: successful transfer of immune modulating properties and idiotype expression.  
J. Immunol. 148, 2756-2763.

**Wotton D**, Higgins JA, O'Hehir RE, Lamb JR and Lake RA (1995). Differential induction of the NF-AT complex during restimulation and the induction of T-cell anergy.  
Hum. Immunol. 42, 95-102.

**Wu S**, Rodabaugh K, Martinez-Maza O, Watson JM, Silberstein DS, Boyer CM, Peters WP, Weinberg JB, Berek JS and Bast RC (1992). Stimulation of ovarian tumor cell proliferation with monocyte products including interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$ .

Am. J. Obstet. Gynecol. 166, 997-1007.

**Yagita H**, Nakata M, Azuma A, Nitta T, Takeshita T, Sugamura K and Okumura K (1989). Activation of peripheral blood T cells via the p75 interleukin 2 receptor.  
J. Exp. Med. 170, 1445-1450.

**Yagita H**, Hanabuchi S, Asano Y, Tamura T, Nariuchi H and Okumura K (1995). Fas-mediated cytotoxicity - A new immunoregulatory and pathogenic function of Th1 CD4<sup>+</sup> T cells.  
Immunol. Rev. 146, 223-239.

**Yamamoto N**, Zou J-P, Li X-F, Takenaka H, Noda S, Fujii T, Ono S, Kobayashi Y, Mokaida N, Matsushima K, Fujiwara H and Hamaoka T (1995). Regulatory mechanisms for production of IFN- $\gamma$  and TNF by antitumor T cells or macrophages in the tumor-bearing state.  
J. Immunol. 154, 2281-2290.

**Yamamoto T**, Yoneda K, Osaki T, Yoshimura N and Akagi N (1995). Longer local of adoptively transferred T-Lak cells correlates with lesser adhesion molecule expression than NK-LAK cells.  
Clin. Exp. Immunol. 100, 13-20.

**Yang CY**, Owen-Schaub L, Grimm EA and Roth JAI (1989). Induction of lymphokine-activated

killer cytotoxicity with interleukin-2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  against primary lung cancer targets.  
Cancer Immunol. Immunother. 29, 193-198.

**Yang T-H**, Aosai F, Norose K, Ueda M and Yano A (1995). Enhanced cytotoxicity of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes specific for T. *goondii*-infected human melanoma cells.  
J. Immunol. 154, 290-298.

**Yannelli JR**, Crumacker DB, Good RW, Friddell CD, Poston R, Horton S, Maleckar JR and Oldham RK (1990). Use of anti-CD3 monoclonal antibody in the generation of effector cells from human solid tumors for use in cancer biotherapy.  
J. Immunol. Methods 1, 91-100.

**Yokota S**, Geppert TD and Lipsky PE (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- $\alpha$ .  
J. Immunol. 140, 531-536.

**Yron I**, Wood TA, Spiess PJ and Rosenberg SA (1980). In vitro growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors.  
J. Immunol. 125, 238-245.

**Yun Y-S**, Hagrove ME and Ting C-C (1989).

In vivo antitumor activity of anti-CD3-induced activated killer cells. Cancer Res. 49, 4770-4774.

**Zelenin AV**, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM, Zhuze AL and Gnutchev NV (1984). 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. Cytometry 5, 348-354.

**Ziegler SF**, Morella KK, Anderson D, Kumaki N, Leonard W, Cosman D and Baumann H (1995). Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor  $\gamma$  chain is required for IL-7 signal transduction. Eur. J. Immunol. 25, 399-404.

**Zitvogel L**, Tahara H, Robbins PD, Storkus WJ, Clarke MR, Nalesnik MA and Lotze MT (1995). Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. J. Immunol. 155, 1393-1403.

**Zola H**, Neoh SH, Mantzioris BX, Webster J and Loughnan MS (1990). Detection by immunofluorescence of surface molecules present in low copy numbers. High sensitivity staining and calibration of flow cytometer. J. Immunol. Methods 135, 247-255.

**Zhu Z** and Carter P (1995). Identification of heavy chain residues in a humanized anti-CD3 antibody important for efficient antigen binding and T cell activation. J. Immunol. 155, 1903-1010.