

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, G₂ et entrant en mitose (phase M) par rapport à la fluorescence émise par les cellules au repos (G₀) ou dans la phase G₁ 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_{2a}, 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 (³H-Tr) est réalisée près quatre heures d'incubation, dans des puits de microplaques contenant 200.10³ 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).

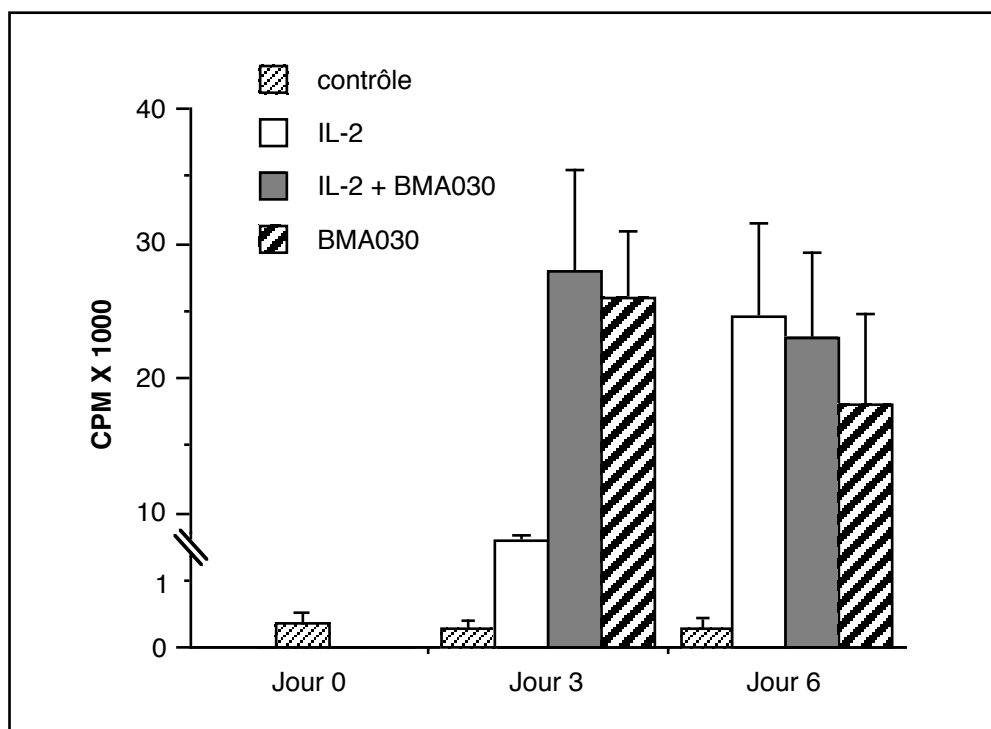


Figure 1-1: Incorporation de thymidine tritiée dans des PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'un anticorps anti-CD3 (BMA030) ou d'une combinaison des deux mitogènes. Les moyennes \pm les erreurs standards de cinq expériences indépendantes sont illustrées.

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).

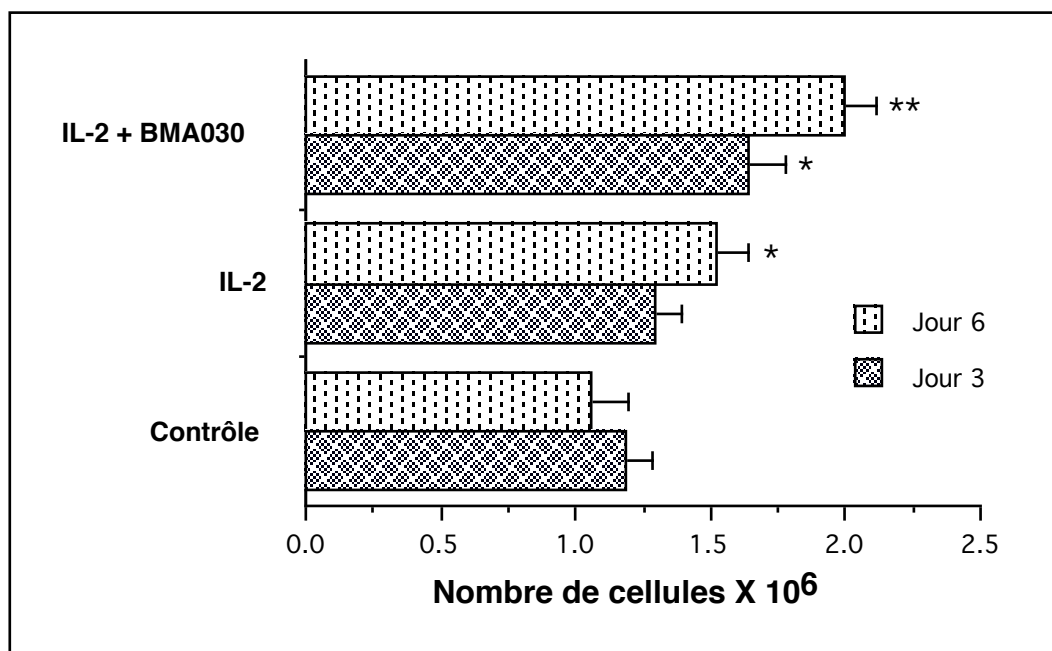


Figure 1-2: Nombres de cellules dans des cultures de PBL après 3 ou 6 jours en présence d'IL-2 et/ ou de BMA030. Les valeurs sont les moyennes \pm les erreurs standards de 9 expériences dans lesquelles $1,25 \cdot 10^6$ cellules ont été mises en culture. L'analyse statistique est réalisée par rapport 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/G₂/M après trois jours de culture. Afin de discriminer les cycles des lymphocytes T (CD3⁺) et des cellules NK (CD16⁺), 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⁺) (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).

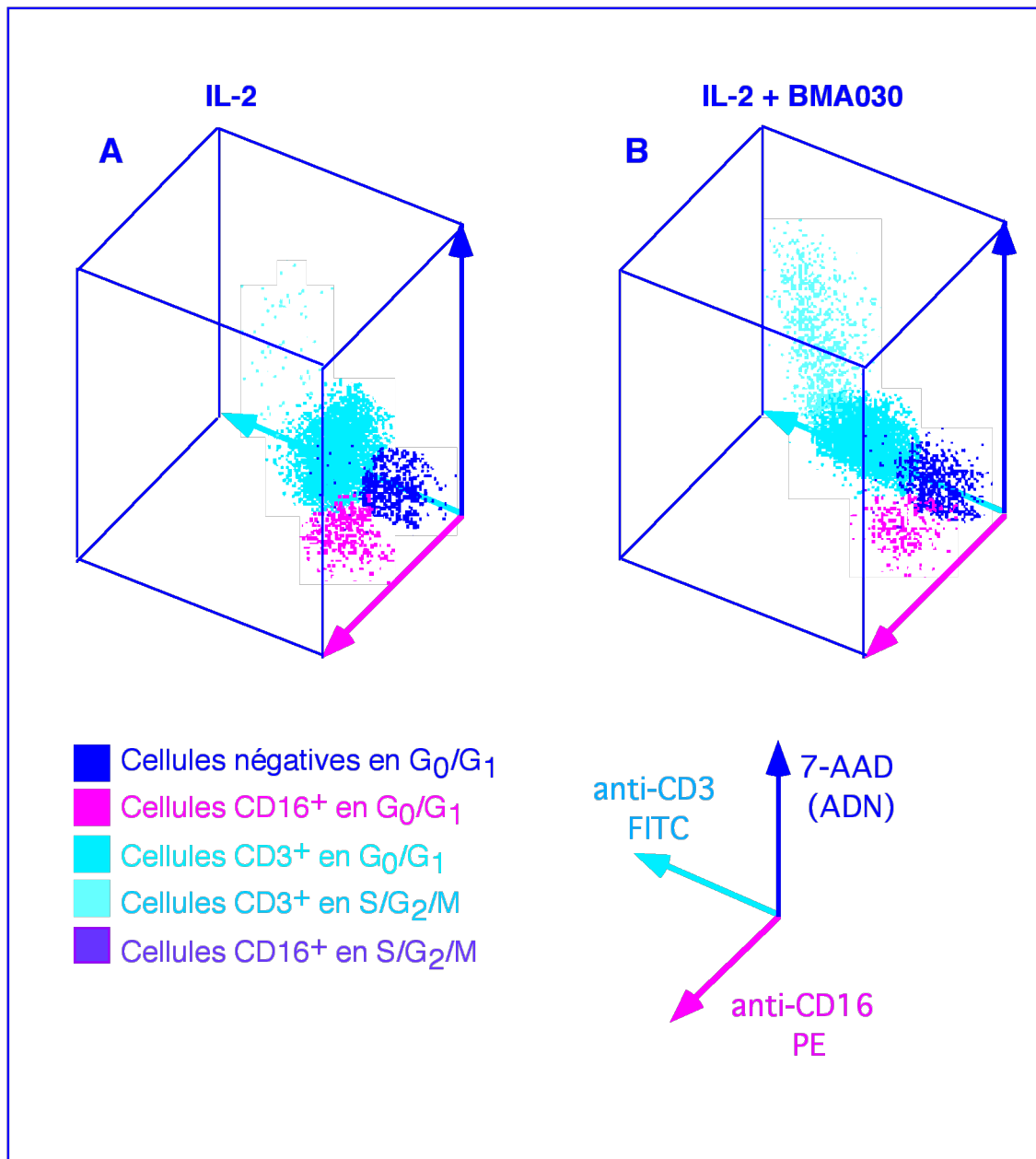


Figure 1-3: Cellules en cycle après stimulation par l'IL-2 (A) ou l'IL-2 et BMA030 (B). Les cellules NK et les lymphocytes T sont visualisés par l'utilisation d'un anticorps anti-CD16-PE et anti-CD3-FITC respectivement. Les cellules en phase S/G₂/M sont discriminées par l'utilisation de la 7-AAD. Les 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^b).

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⁺ 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 0,2.10⁶ cellules/ml contre 0,5.10⁶ 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 γ 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⁺ CD56⁺.

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 γ 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⁺ (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 $\gamma\delta$ ⁺ est étudiée sur une période de temps plus importante, nous avons constaté, par deux fois, une augmentation du pourcentage de cellules T TCR $\gamma\delta$ ⁺ 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 $\gamma\delta$ ⁺ 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.

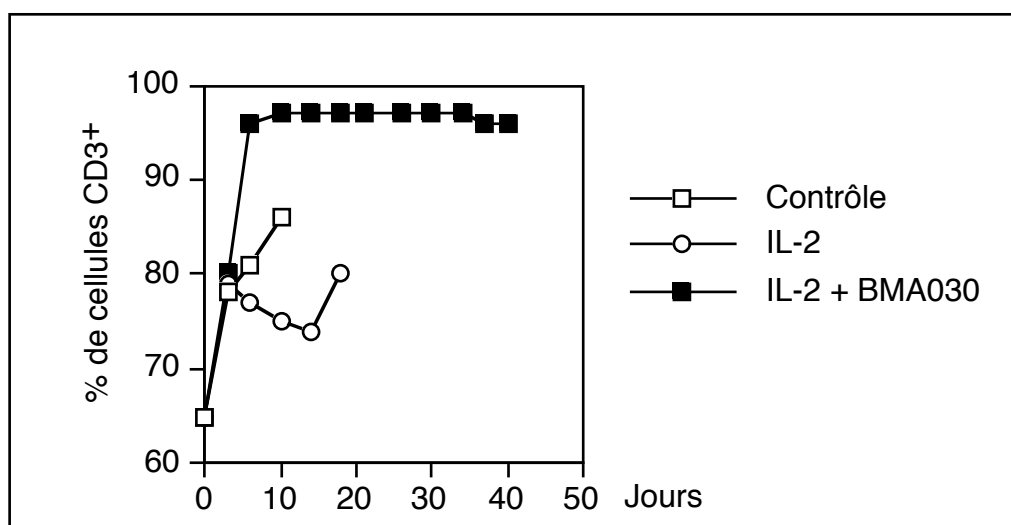


Figure 2-1: Évolution du pourcentage de cellules CD3⁺ dans les cultures de lymphocytes du sang périphérique en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

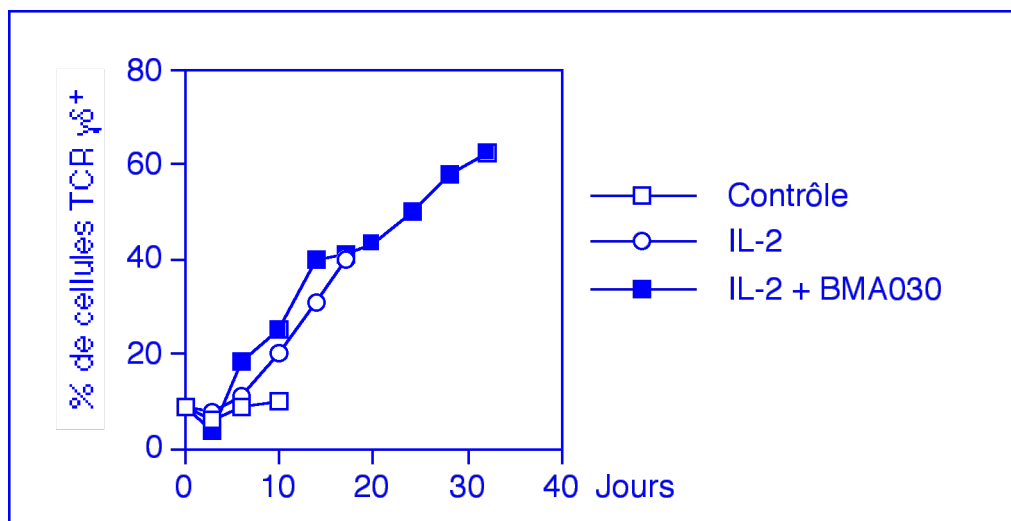


Figure 2-2: Évolution des pourcentages des lymphocytes T TCR $\gamma\delta^+$ dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

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⁺ et CD8⁺ (tableau 2-3) est légèrement supérieur au pourcentage de cellules CD3⁺ (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.

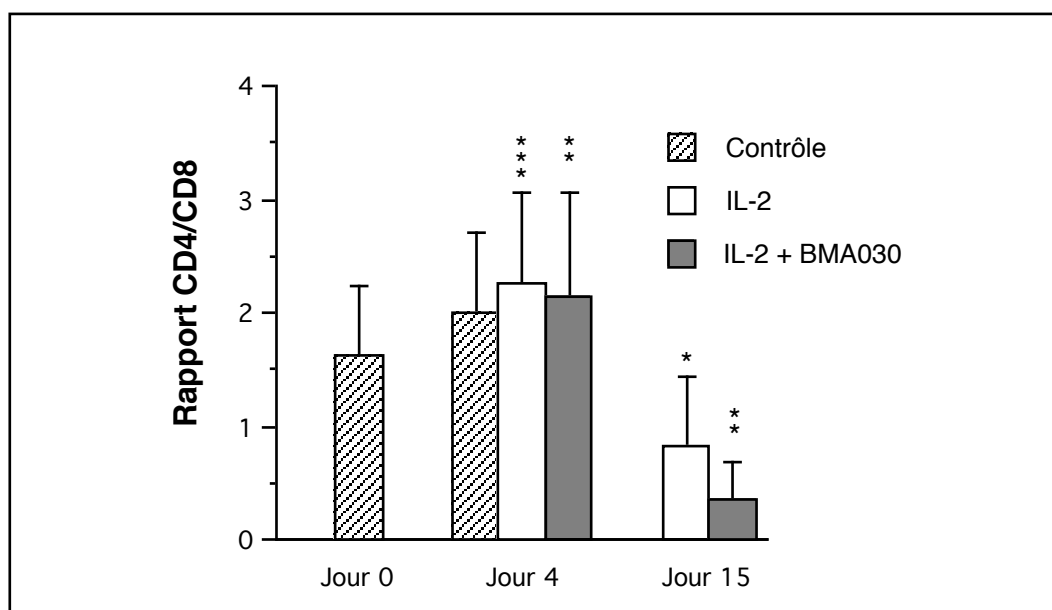


Figure 2-3: Évolution du rapport CD4/CD8 dans les différentes conditions de culture
Les résultats (moyenne ± écart type) proviennent de 50 expériences indépendantes pour les jours 0 et 4 et de 3 expériences pour le jour 15 (p est calculé par rapport au pourcentage obtenu le jour de la mise en culture;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

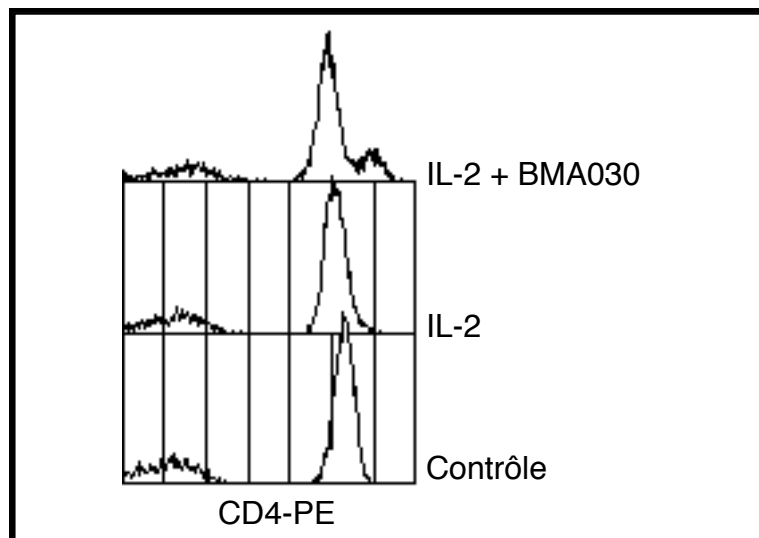


Figure 2-4: Expression de la molécule CD4 dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030

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.

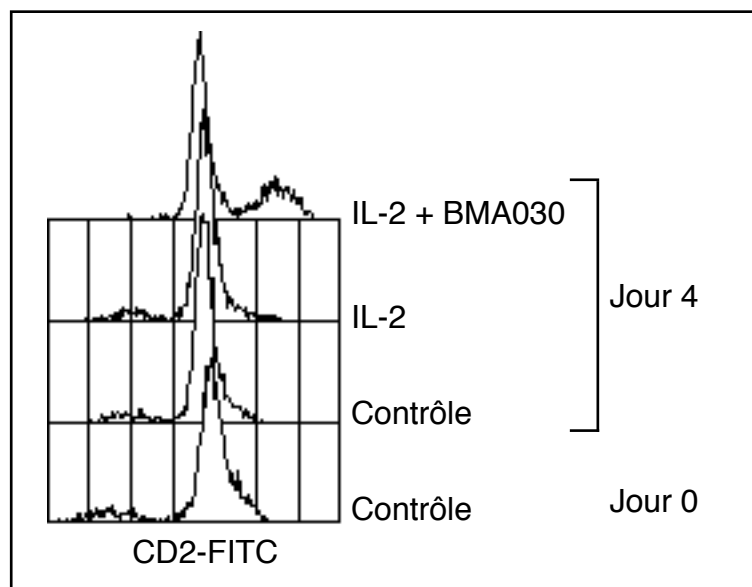


Figure 2-5: Expression de la molécule CD2 dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030

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⁺CD56⁺. 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⁺. 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 ⁺ CD56 ⁺	4 ± 3 (21)	2 ± 2 (21)	3 ± 2 (21)	3 ± 2 (21)
CD8 ⁺ CD57 ⁺	9 ± 6 (35)	7 ± 4 (35)	6 ± 4 (35)	5 ± 3 (35)

Tableau 2-4: Cellules CD3⁺CD56⁺ et CD8⁺CD57⁺ 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⁺ et CD56⁺ 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⁺ 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⁺) 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⁺) sont détectés quelle que soit la condition de culture (résultat non illustré).

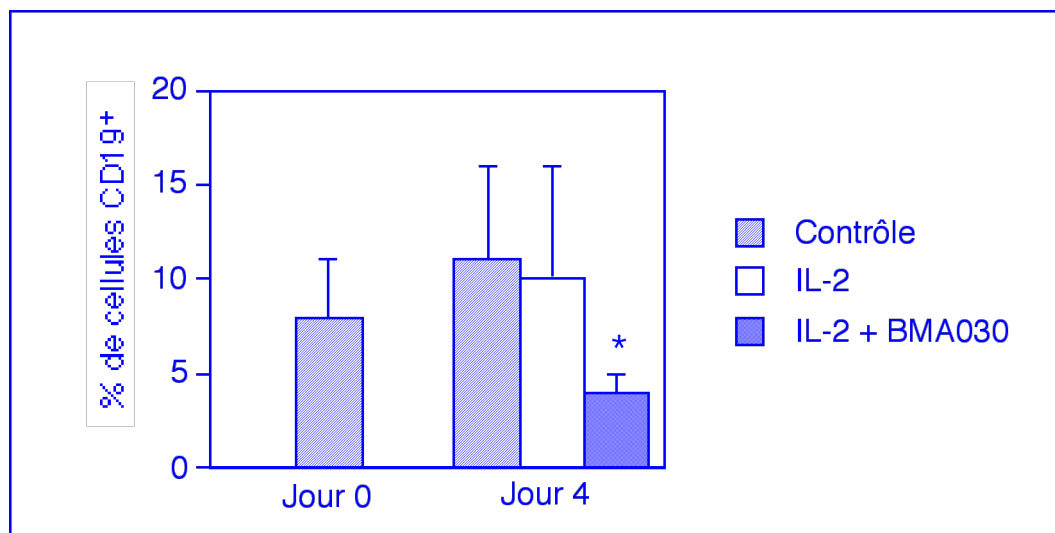


Figure 2-6: Pourcentage de lymphocytes B CD19⁺ dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

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 CD4^+ et les cellules T 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 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 β pour l'IL-2 (CD122) à la surface des lymphocytes CD8^+ (Yagita *et al.*, 1989; Moiré *et al.*, 1991) pourrait être une explication de la prolifération accrue des lymphocytes 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 (CD16^+ ou 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⁺ 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⁺ par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ 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^b).

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⁺ au phénotype CD45R0⁺ 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).

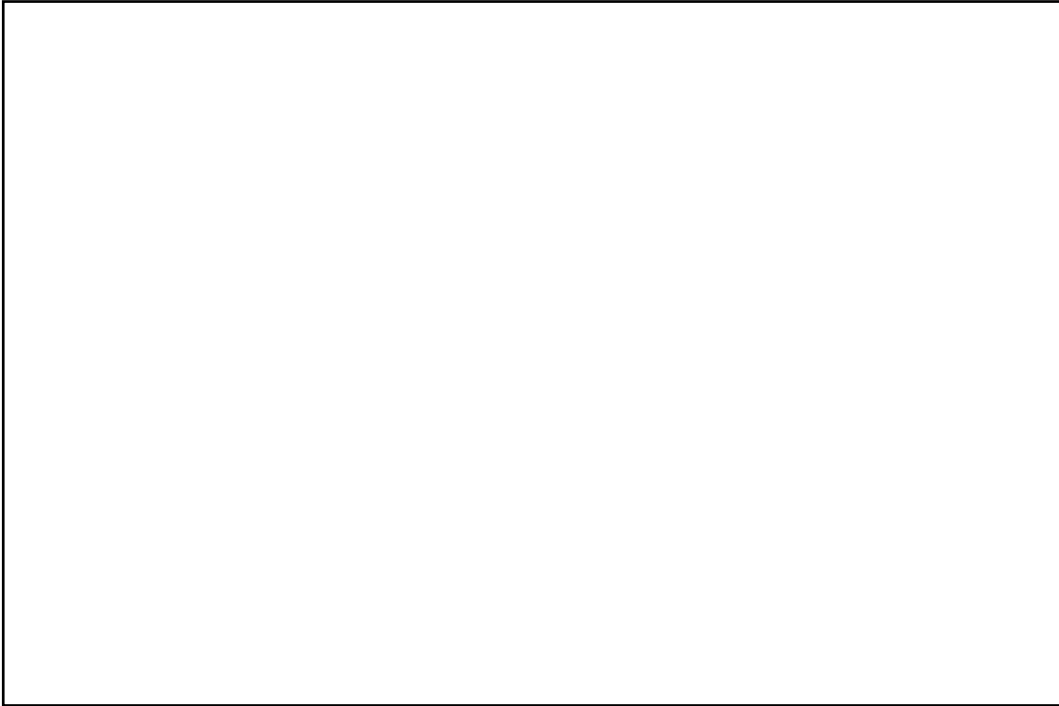


Figure 3-1: Lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours (condition contrôle).
Grossissement 200X.

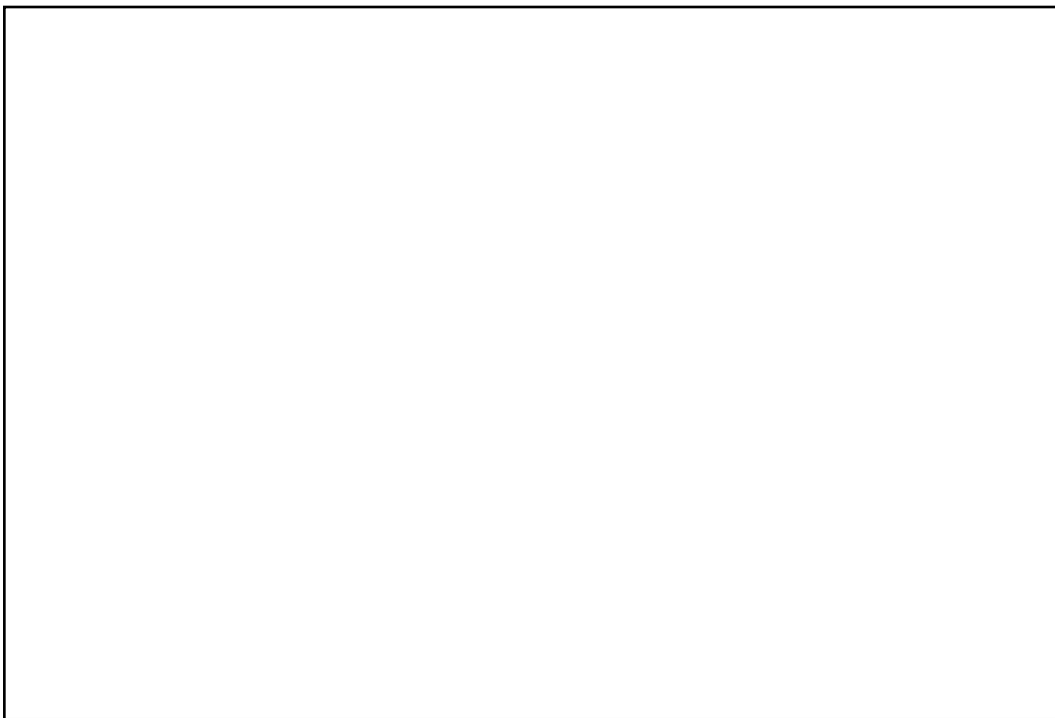


Figure 3-2: Frottis de lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours (condition contrôle).
Les cellules sont colorées par la technique de May-Grünvald.



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

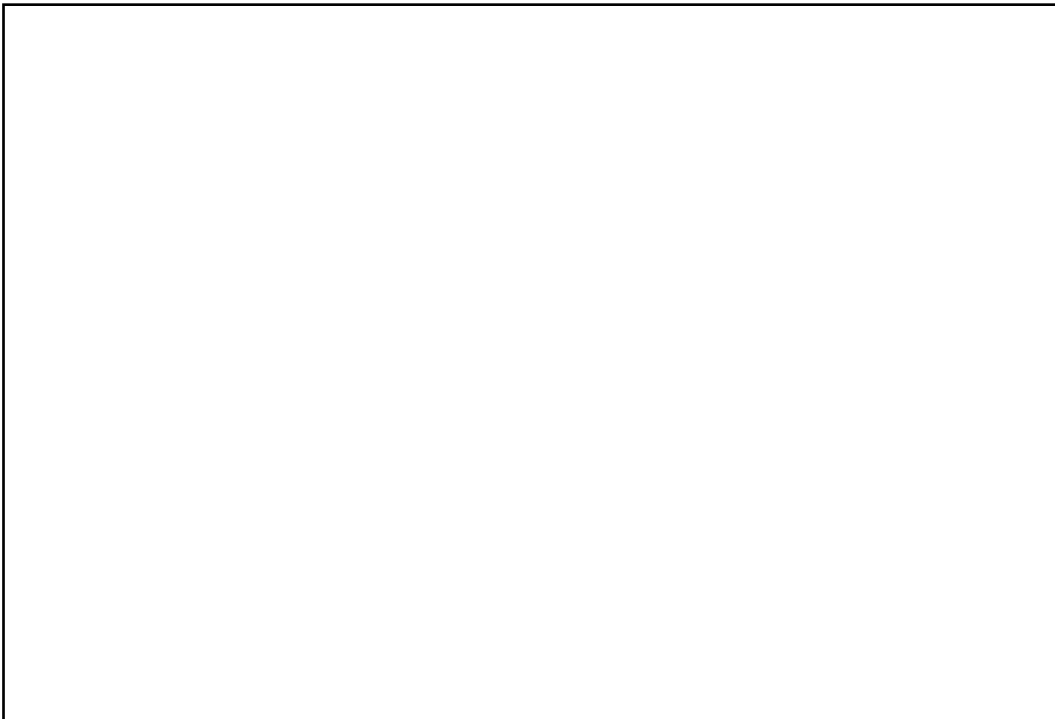


Figure 3-4: Frottis de lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours en présence
d'IL-2.
Les cellules sont colorées par la technique de May-Grünvald.

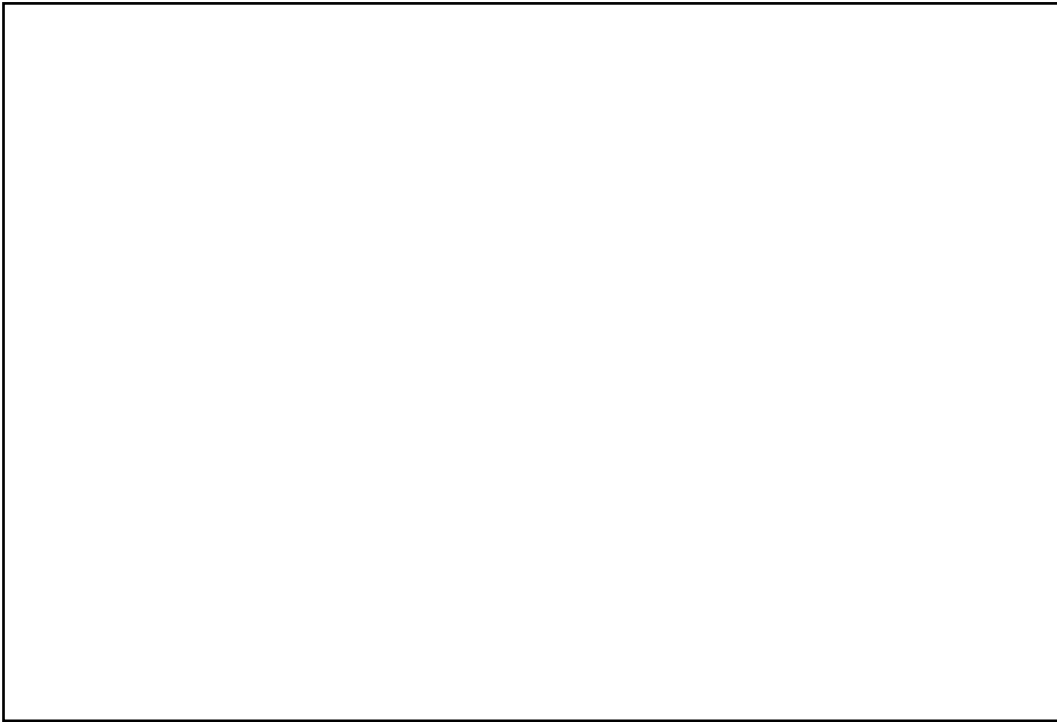


Figure 3-5: Lymphocytes du sang cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 + BMA030.
Grossissement 200X.



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).

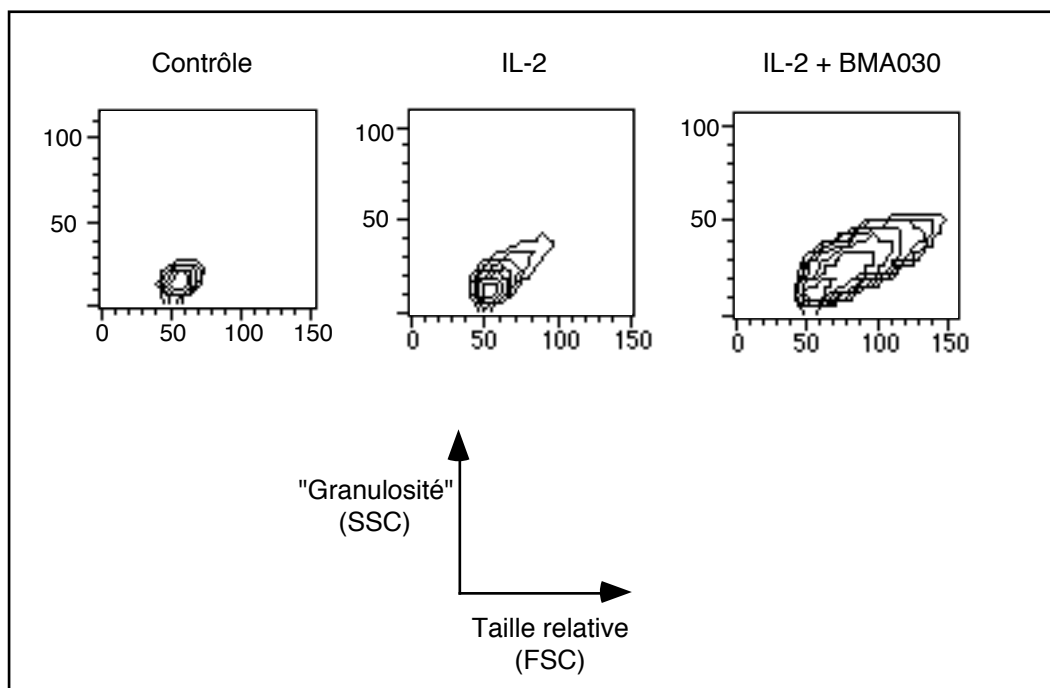


Figure 3-7: Évaluation de la morphologie cellulaire des PBL par cytométrie en flux après une culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

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 α pour l'interleukine-2 (CD25) est principalement mis en évidence à la surface des cellules T (figure 3-8 A) alors que le récepteur β pour l'interleukine-2 (CD122) est détecté à la surface des cellules non T (CD3⁻) (figure 3-8 B). Après stimulation, le récepteur α 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 β 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).

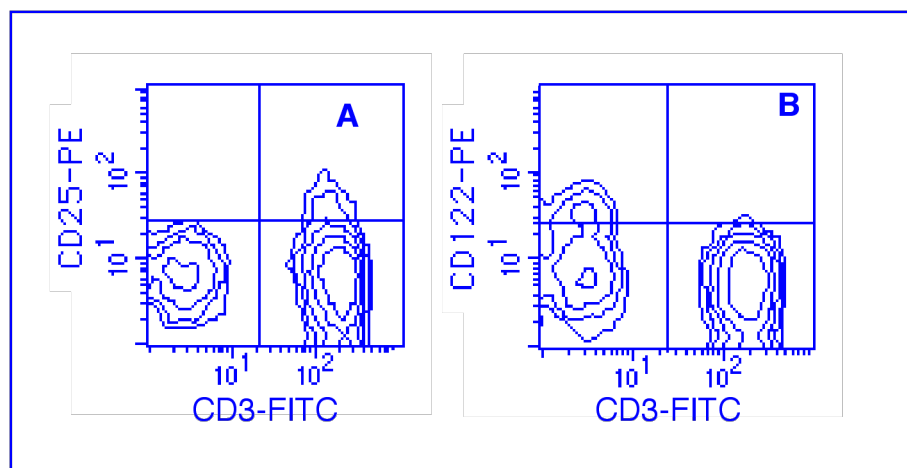


Figure 3-8: Expression du CD25 (A) et du CD122 (B) sur les cellules T (CD3⁺) et non T (CD3⁻).

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⁺) 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 ⁺ DR ⁺	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⁺ a également tendance à augmenter dans la condition de culture contrôle, mais dans ce cas on observe pas de différence statistique.

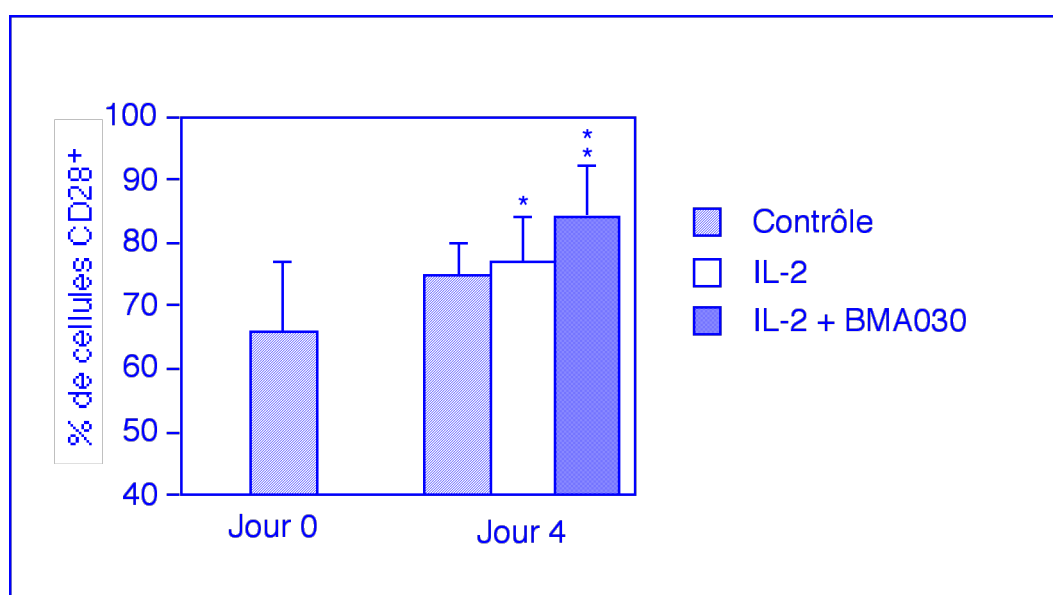


Figure 3-9: Pourcentage de lymphocytes CD28⁺ dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

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⁺ (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⁺ (61%) au détriment des cellules CD45RA⁺ (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⁺ vers un phénotype CD45R0⁺ passe par un stade intermédiaire de cellules positives pour le CD45RA⁺ et le CD45R0⁺ (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⁺ et CD45RA⁺ 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⁺ (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⁺ et CD8⁺ (tableau 3-3). Environ la moitié des lymphocytes T CD4⁺ 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⁺CD45R0⁺ augmente (71%) ($p < 0,01$).

Les cellules sur-exprimant le marqueur CD4 (voir chapitre 2) sont principalement CD45R0⁺ (résultats non illustrés). La proportion de cellules CD8⁺CD45R0⁺ 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⁺ parmi les lymphocytes T CD8⁺ car les anticorps dont nous disposons ne nous permettait pas cette combinaison de marquage.

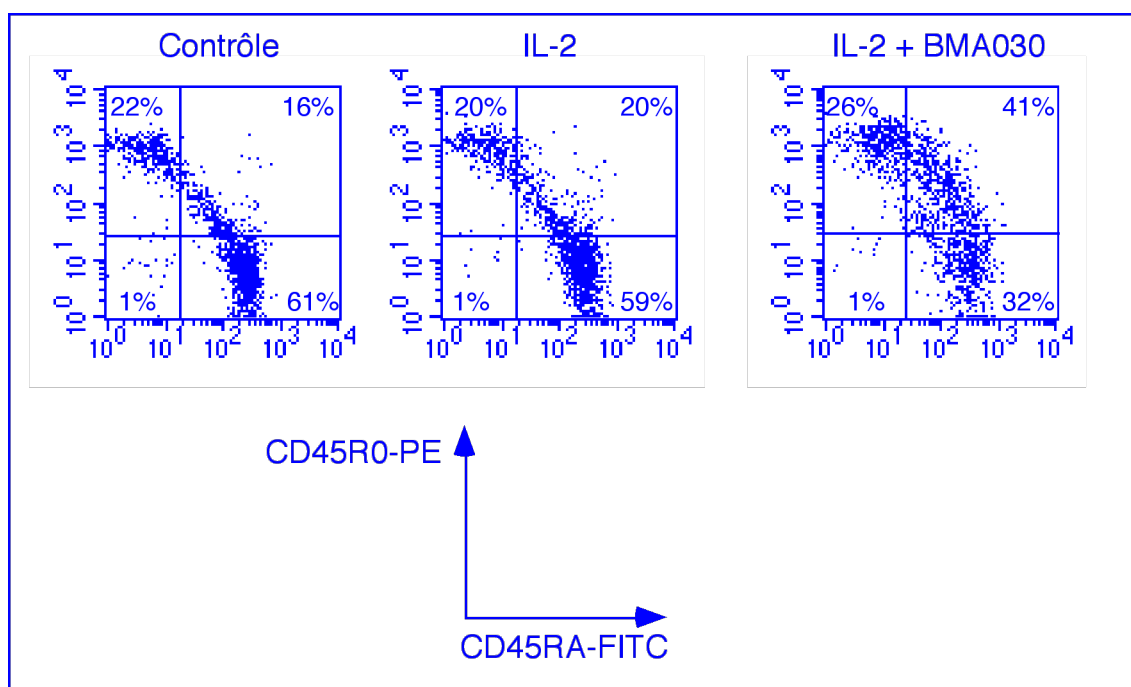


Figure 3-10: Expression des marqueurs CD45RA et CD45R0 sur les PBL cultivés quatre jours en présence d'IL-2 et d'IL-2 + BMA030.
Les résultats d'une expérience représentative sont présentés sous forme de diagramme de dispersion des intensités de fluorescence représentées sur des échelles logarithmiques.

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

Tableau 3-3: Cellules CD45R0⁺ et CD45RA⁺ dans les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺.

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

Le nombre absolu de cellules CD4⁺ exprimant le marqueur CD45RA est similaire dans les deux conditions de stimulations, par contre le nombre de cellules CD4⁺CD45R0⁺ 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⁺CD45R0⁺ 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^{high}). 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^{high} 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).

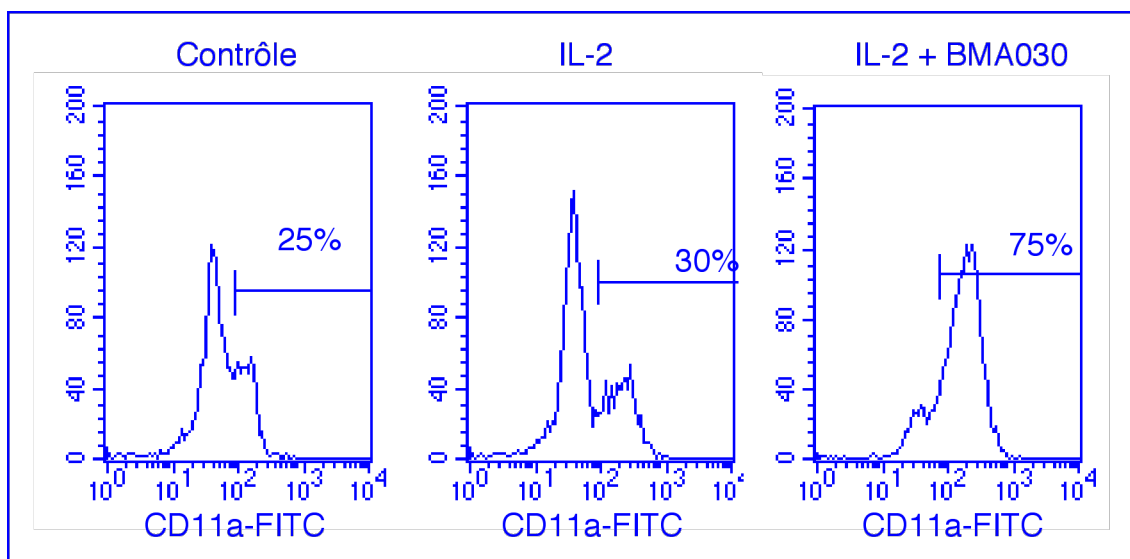


Figure 3-11: Expression de la molécule CD11a dans les cultures de PBL en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

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⁺) 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 α du récepteur pour l'IL-2 (CD25). Cette expression est essentiellement localisée sur les lymphocytes T. En fait, la chaîne α est exprimée par certains lymphocytes T CD4⁺ (Ohashi *et al.*, 1989; Ishii *et al.*, 1994) et par une faible proportion de cellules NK CD16-CD56⁺ (Nagler *et al.*, 1990). Une augmentation de l'expression de la chaîne α 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⁺ 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 β 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⁻. 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⁺, 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 α ait été détectée après stimulation, aucune augmentation de l'expression de la chaîne β n'est constatée. Par contre, un net accroissement de l'expression de la chaîne β 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 β 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 α du récepteur. Ceci démontre qu'une forte expression de la chaîne α n'est pas le reflet du pourcentage de cellules exprimant le récepteur pour l'IL-2 de haute affinité composé des chaînes α , β et γ . Cependant, une expression élevée de la chaîne α 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 β du récepteur (Takeshita *et al.*, 1989). D'ailleurs, aucune expression de la chaîne β 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⁺ 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⁺ 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⁻ ne prolifèrent pas en l'absence de lymphocytes T HLA-DR⁺ et l'intensité de la réponse est dépendante du nombre de lymphocytes T HLA-DR⁺ 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⁺ et 25% des lymphocytes T CD8⁺ 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⁺ et 50% dans la population de lymphocytes T CD8⁺. 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⁺CD45RA⁺ 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⁺ 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⁺ en cellules CD45R0⁺. En effet, une proportion plus élevée de cellules CD45R0⁺CD45RA⁺ 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⁺ 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 α et IL-6) induit la prolifération des cellules T naïves (CD45RA⁺), mais pas la conversion en cellules mémoires (CD45R0⁺). 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 β 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 γ et TNF α 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 α et à l'IFN γ 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).

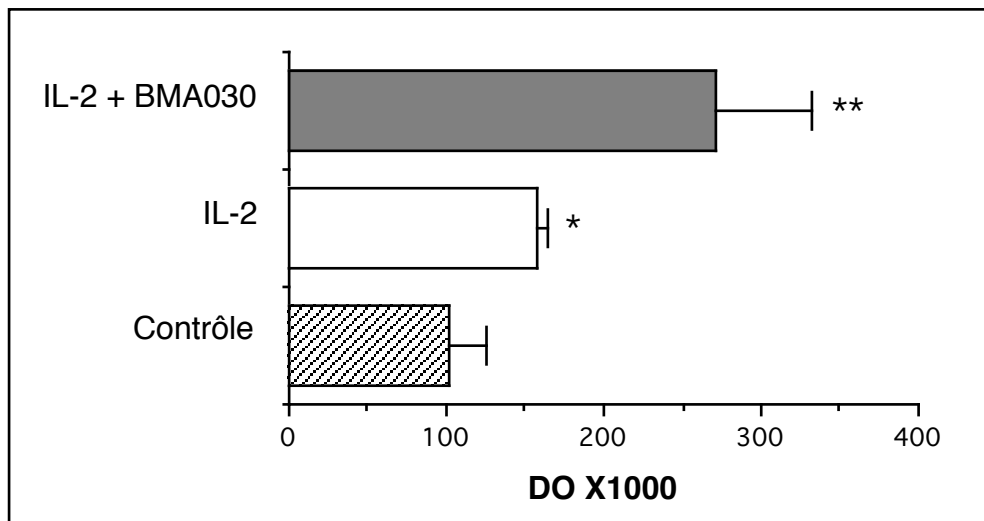


Figure 4-1: Activité du granzyme A dans des PBL cultivés pendant 4 jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030.

Les valeurs (moyenne ± 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}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.

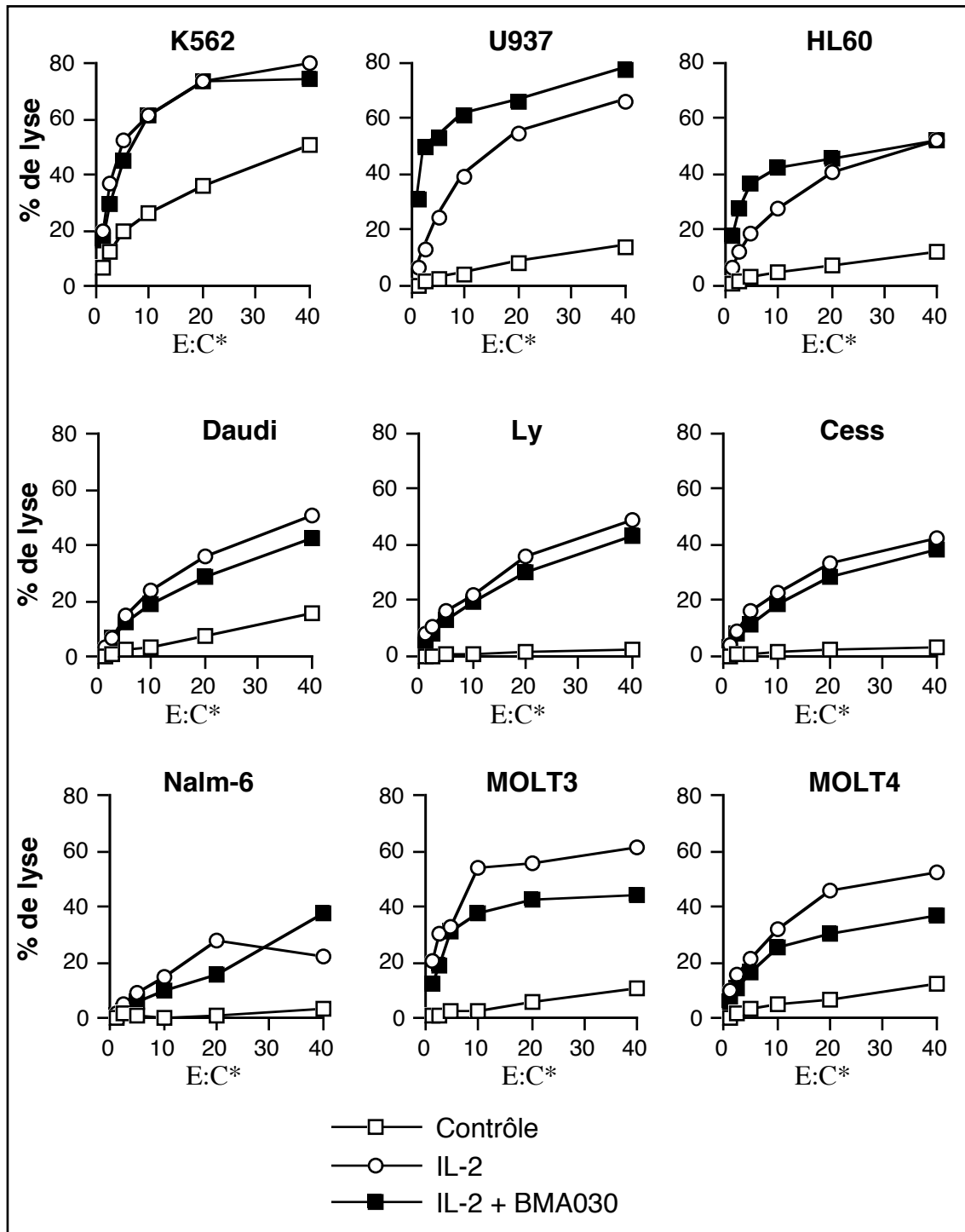


Figure 4-2: Activités cytotoxiques de PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 contre neuf lignées tumorales hématopoïétiques.

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

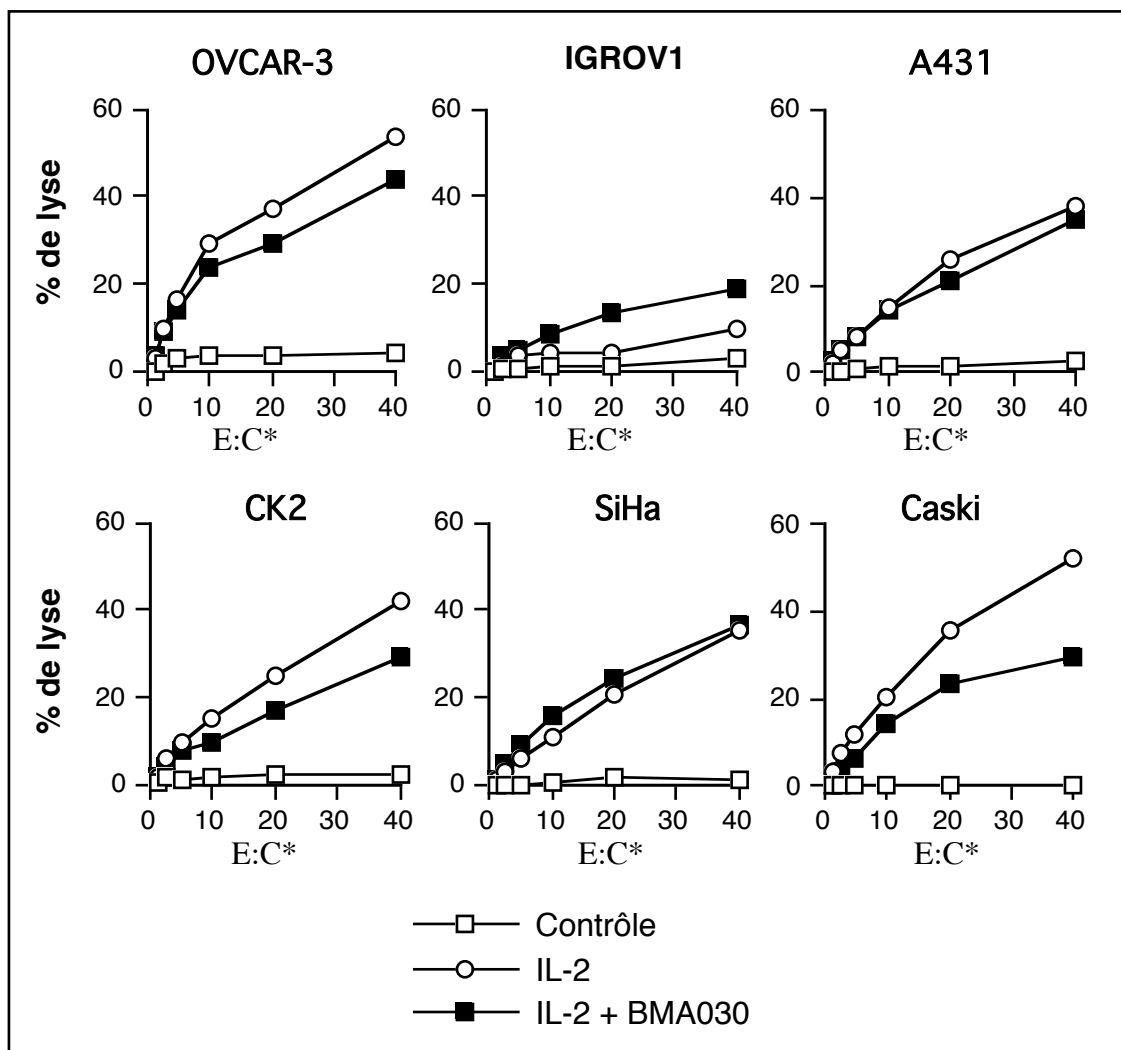


Figure 4-3: Activités cytotoxiques de PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 contre six lignées tumorales adhérentes.
Le test de cytotoxicité au chrome est réalisé en triplicata (E:C* = rapport cellules effectrices : cellules cibles marquées).

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).

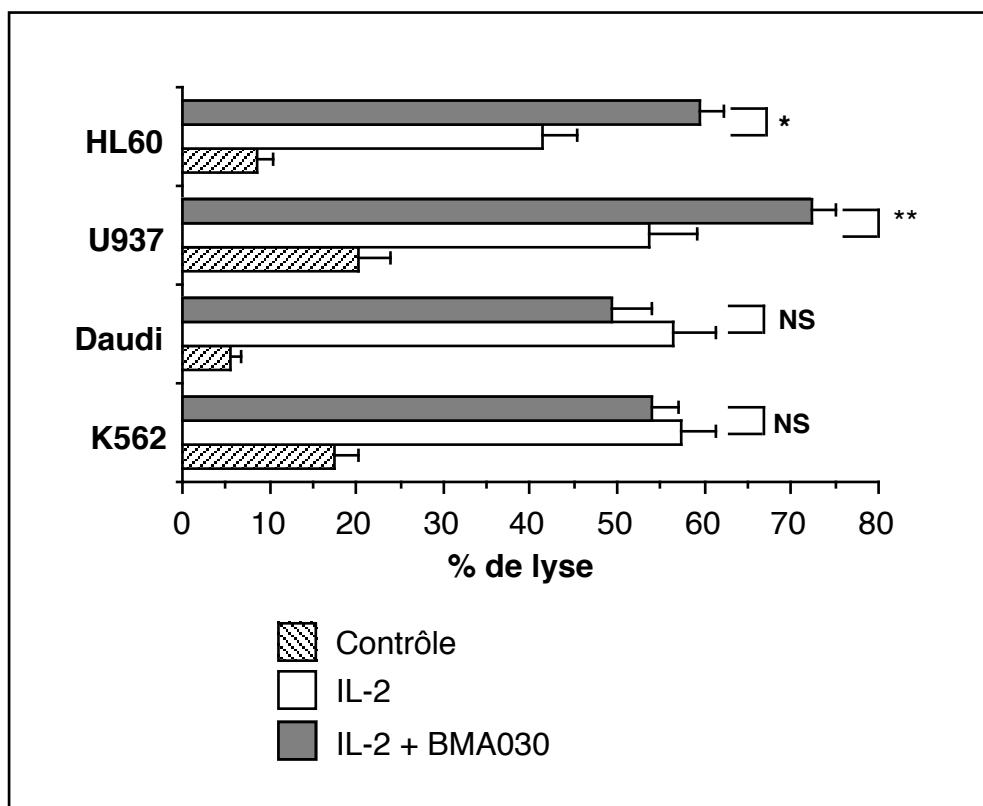


Figure 4-4 : Activités cytotoxiques des PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 contre quatre lignées tumorales. Les résultats (moyenne \pm erreur standard) sont représentés pour un rapport E:C* égal à 20:1 (n = 15-30, *: p < 0,05; **: p < 0,01; NS = non significatif).

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.

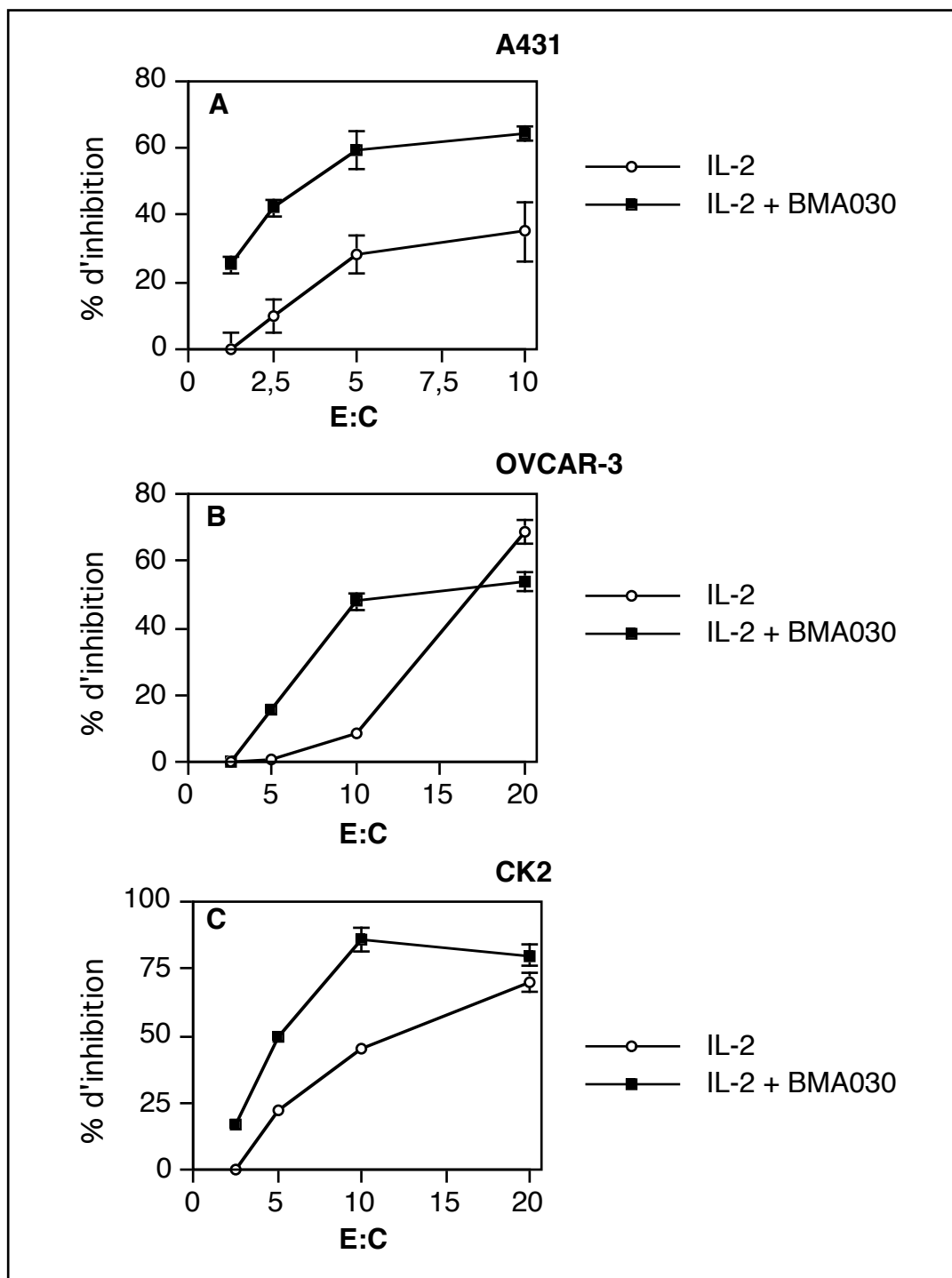


Figure 4-5: Inhibition de la croissance tumorale des cellules A431 (A), OVCAR-3 (B) et CK2 (C) par des PBL cultivés en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030. Le test MTT est réalisé en co-cultivant les cellules provenant des cultures de PBL en présence des cellules tumorales pendant 7 jours. Les résultats (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).

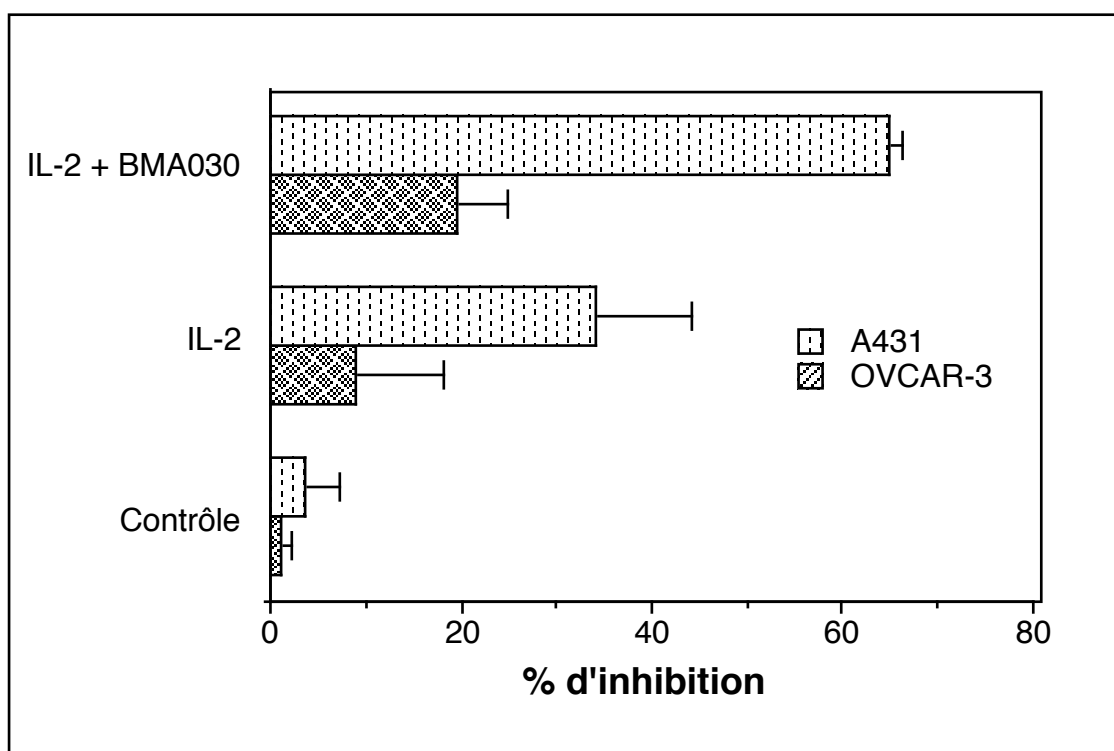


Figure 4-6: Effet du surnageant de culture sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales A431 et OVCAR-3.

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^b; 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^b; 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 γ et du TNF α 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 α et d'IFN γ ont été détectés dans les cultures en présence d'un anticorps anti-CD3 (Moutschen *et al.*, 1990). L'utilisation d'anticorps anti-TNF α et anti-IFN γ 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.

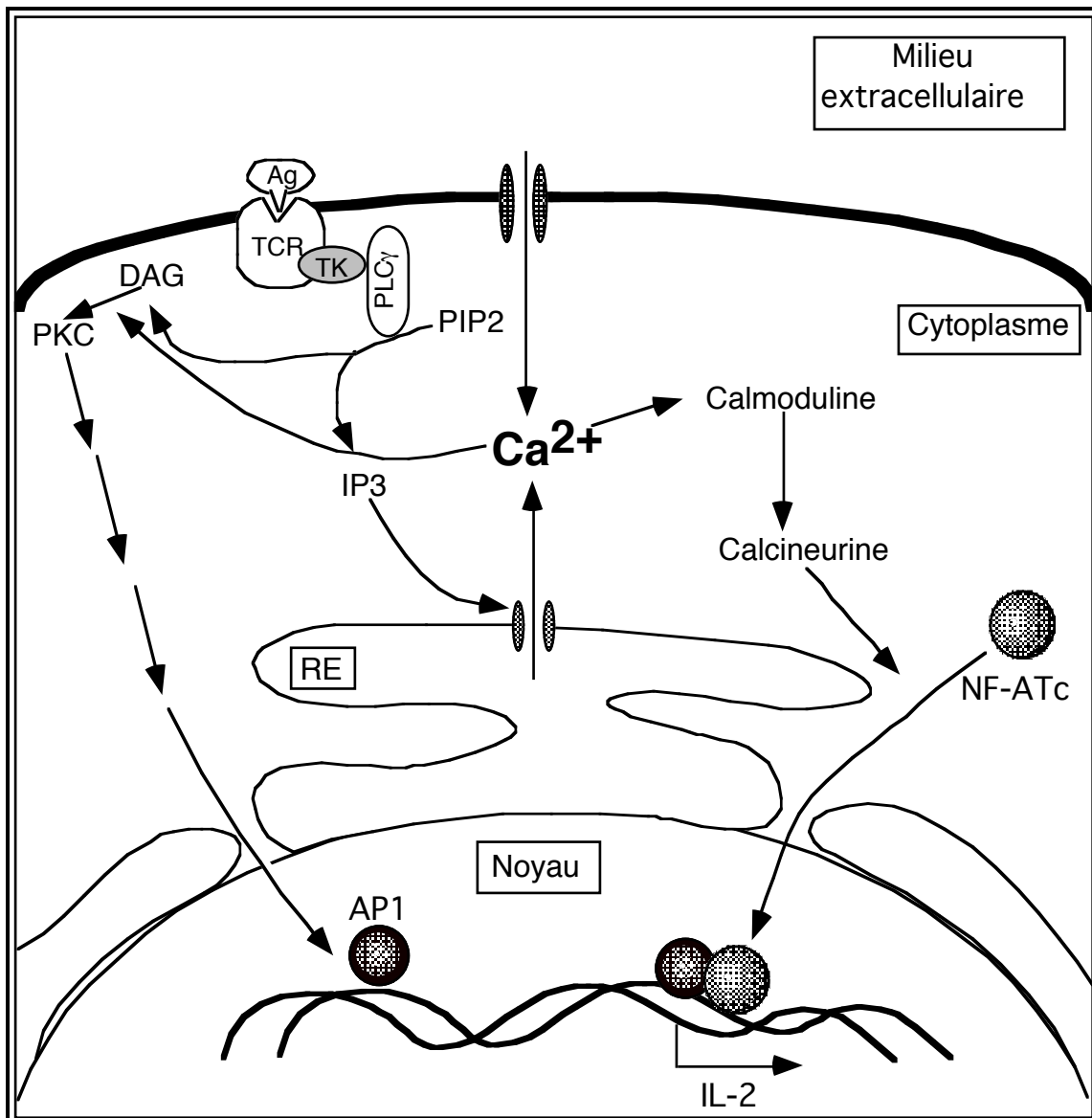


Figure 5-1: Rôle du calcium dans l'activation des lymphocytes T.

DAG: diacylglycérol, IP₃: inositol 1,4,5-triphosphate, PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PKC: protéine kinase C, PLC γ : phospholipase C- γ , 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 μ g/ml). La liaison des ions Ca²⁺ 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 MnCl₂ (intensité minimale de fluorescence par déplacement des ions Ca²⁺ fixés au fluo-3 par les ions Mn²⁺), les valeurs de fluorescence sont converties en concentration de Ca²⁺ 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 μ g/ml) sur des cellules cultivées suivant les différentes conditions expérimentales (contrôle, IL-2 et IL-2 + BMA030).

La concentration moyenne en Ca²⁺ intracellulaire des PBL est égale à 125 \pm 30 nM (n = 9) (résultats non illustrés). Après quatre jours de culture, la

concentration vaut 110 ± 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 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 ± 22	318 ± 100	121 ± 32	254 ± 32	127 ± 33	296 ± 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⁻ dont une partie exprime le marqueur CD16 alors qu'en présence de BMA030 des cellules CD3⁺ sont observées dans les petites et les grandes cellules (résultats non illustrés).

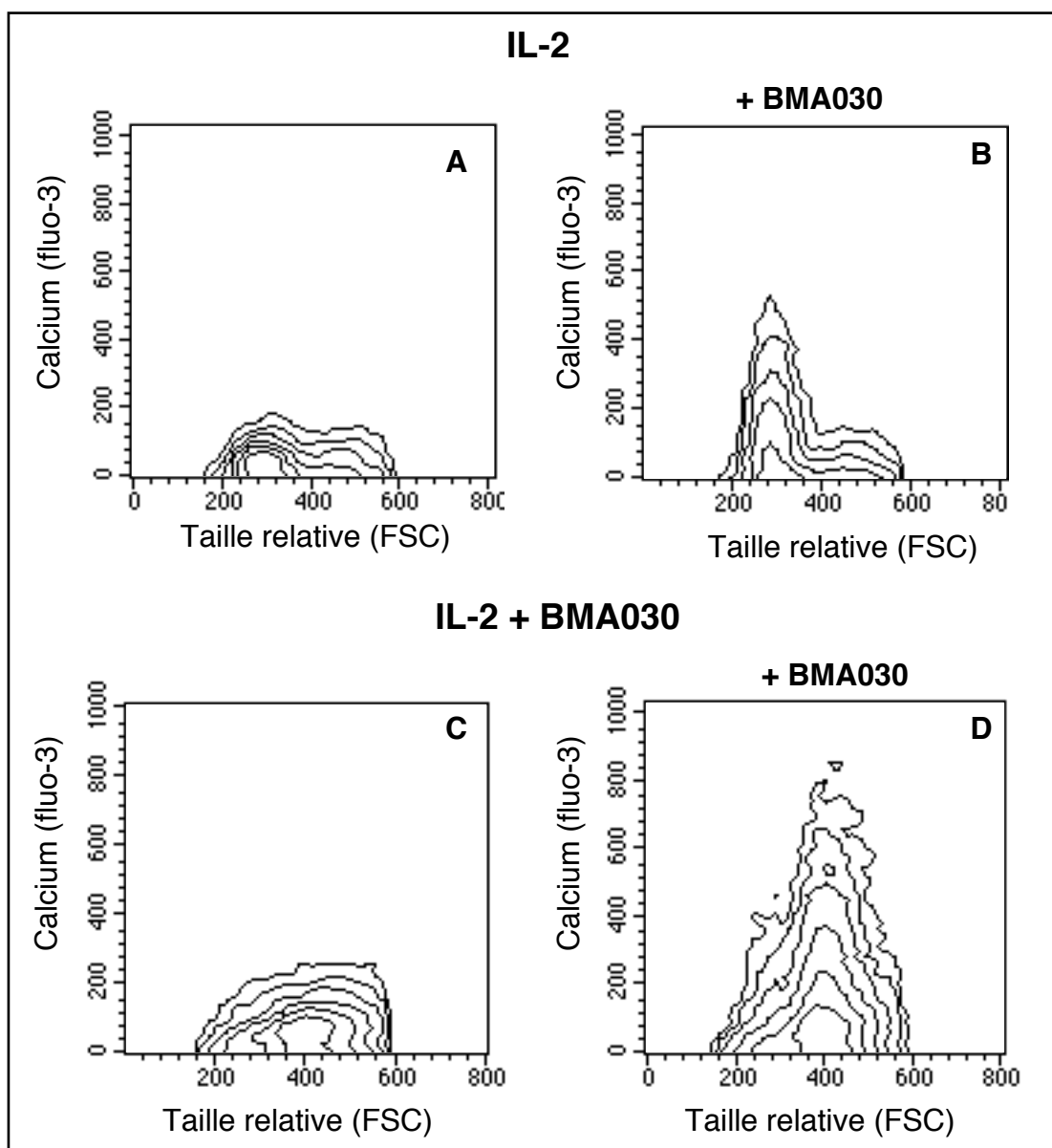


Figure 5-2: Augmentation de la concentration en calcium en relation avec la taille des cellules.

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⁻ 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 (≥ 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⁺ et CD57⁺ (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⁺, CD29⁺, CD11a^{high}). Ces cellules sécrètent des quantités plus importantes d'IFN γ que les lymphocytes T naïfs (CD45RA⁺) (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⁺CD45R0⁺), mais également un accroissement des cellules T CD8⁺CD45R0⁺.

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.

