

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

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

Deuxième partie

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

Objectif

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

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

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

6.1. Introduction

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

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

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

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

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

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

6.2. Méthodologie

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

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

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

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

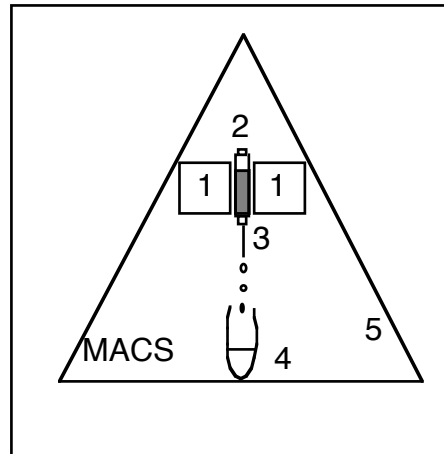


Figure 6-1: Représentation du système de tri par champ magnétique MACS. (1) aimant, (2) colonne remplie de matériel ferreux, (3) aiguille réglant le débit des cellules, (4) tube récolteur, (5) support de l'aimant.

6.3. Résultats

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.3.2. L'influence du tri sur la prolifération cellulaire

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

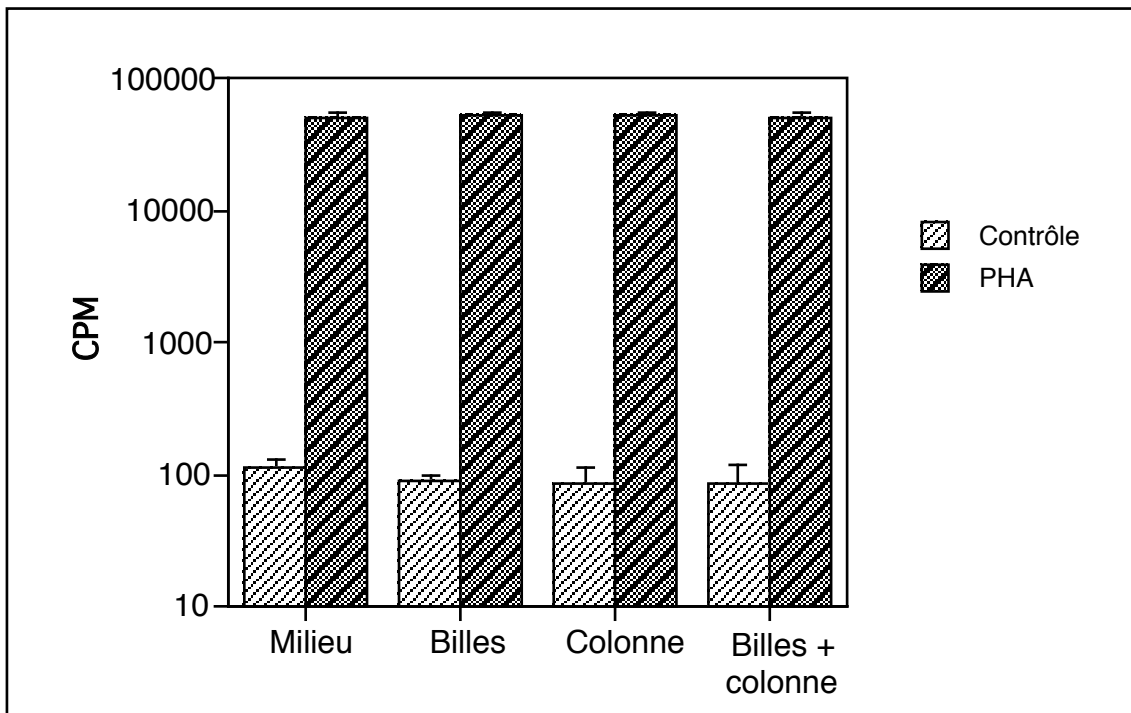


Figure 6-2: Effet des billes paramagnétiques et de la colonne du MACS sur la prolifération cellulaire estimée par incorporation de $^3\text{H-Tr}$.

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

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

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

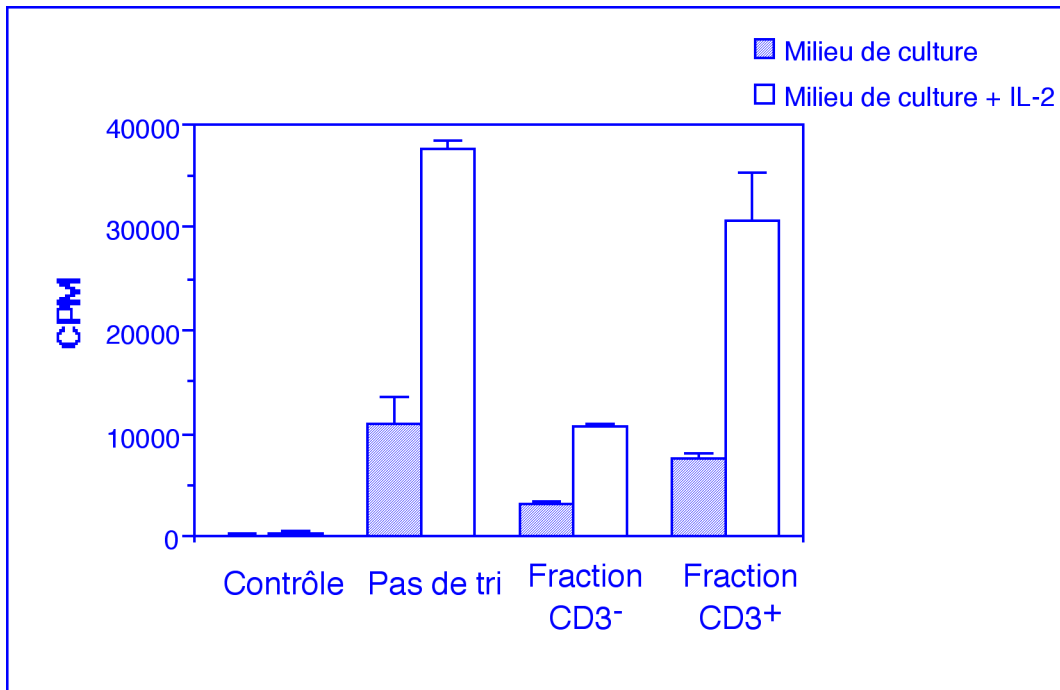


Figure 6-3: Réponse proliférative à l'IL-2 des cellules triées estimée par incorporation de ³H-Tr.

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

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

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

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

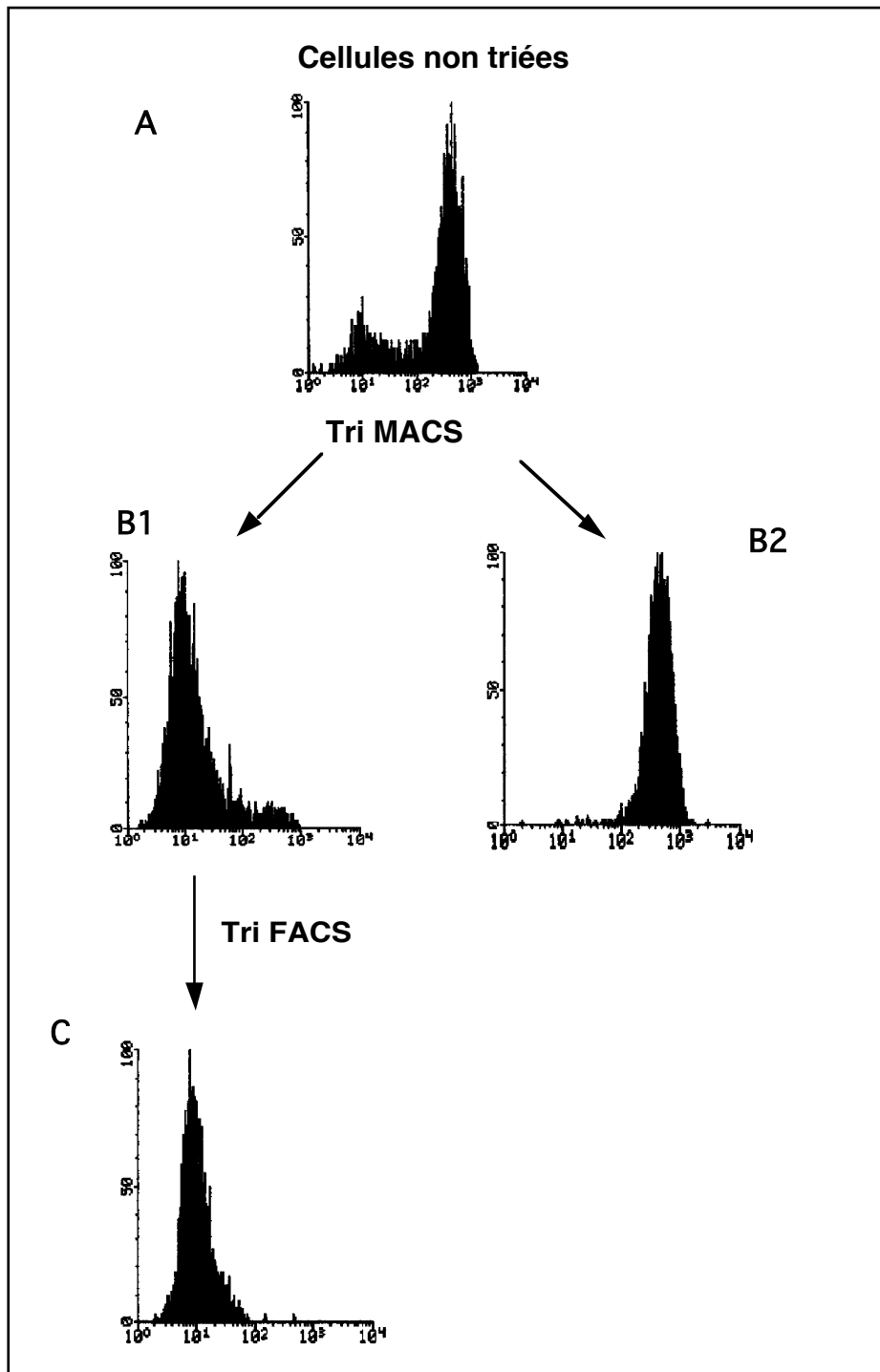


Figure 6-4: Expression du complexe CD3 à la surface des lymphocytes stimulés par l'IL-2 + BMA030 avant et après le tri.

Les histogrammes de fluorescence (FITC) d'une expérience représentative montrent le pourcentage de cellules CD3⁺ avant le tri (A) (83% de cellules CD3⁺), après le tri par le système MACS (B1 fraction négative, 15% de cellules CD3⁺ et B2 fraction positive, 99% de cellules CD3⁺) et après le tri FACS (C) (97% de cellules CD3⁺).

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

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

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

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

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

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

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

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

6.4. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<p style="text-align: center;">Chapitre 7: Activité cytotoxique des lymphocytes T</p>

7.1. Introduction

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

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

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

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

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

7.2. Méthodologie

Les cellules cultivées quatre jours en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030 ont été triées en cellules CD3⁺ et CD3⁻ par le système MACS. Pour certaines expériences, les cellules CD4⁺ et CD8⁺ ont été sélectionnées. Dans ce cas, le marquage est réalisé soit avec un anticorps anti-CD4 biotinylé (IgG₁) soit avec un anticorps anti-CD8 biotinylé (IgG₁). Pour obtenir les lymphocytes T CD8⁺, nous avons combiné un tri par le MACS et un tri par le FACS. Les cellules sont d'abord triées par le système MACS en cellules CD3⁺/CD3⁻ et ensuite les cellules CD3⁺ sont purifiées, au FACS, en cellules CD3⁺CD8⁺ et CD3⁺CD8⁻ grâce à un marquage par un anticorps anti-CD8-PE.

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

7.3. Résultats

7.3.1. Activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK

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

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

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

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

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

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

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

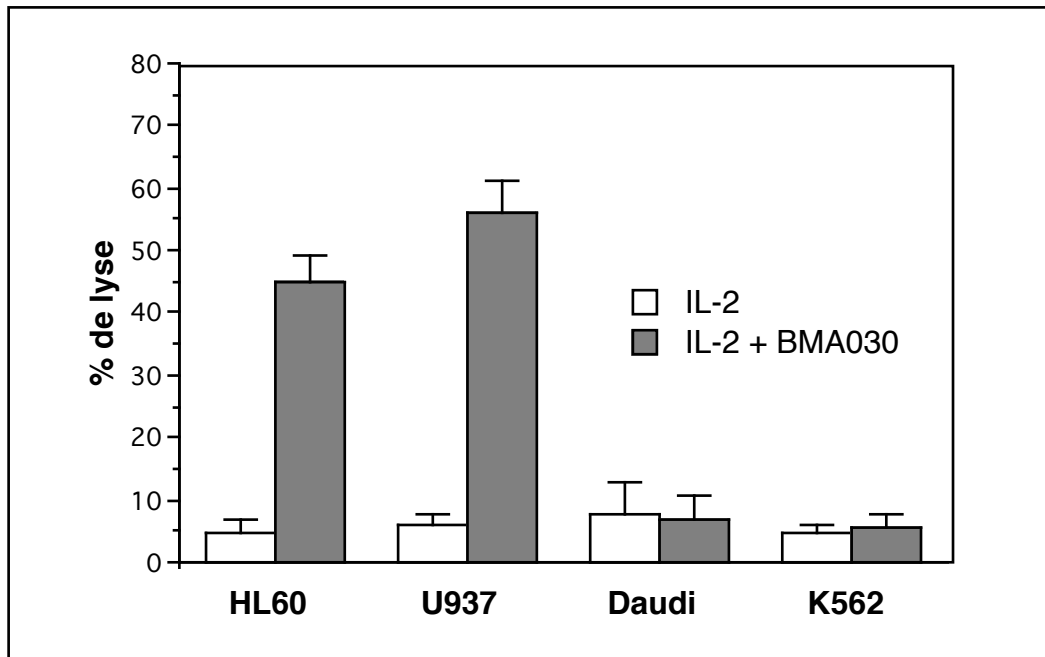


Figure 7-1: Activité cytotoxique des lymphocytes T CD3⁺ stimulés par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030 contre quatre lignées tumorales.
Les valeurs (moyennes ± écart type) de quatre expériences sont représentées.
Le rapport cellules effectrices:cellules cibles est égal à 20.

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

7.3.3. Participation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ à l'activité cytotoxique

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

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

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

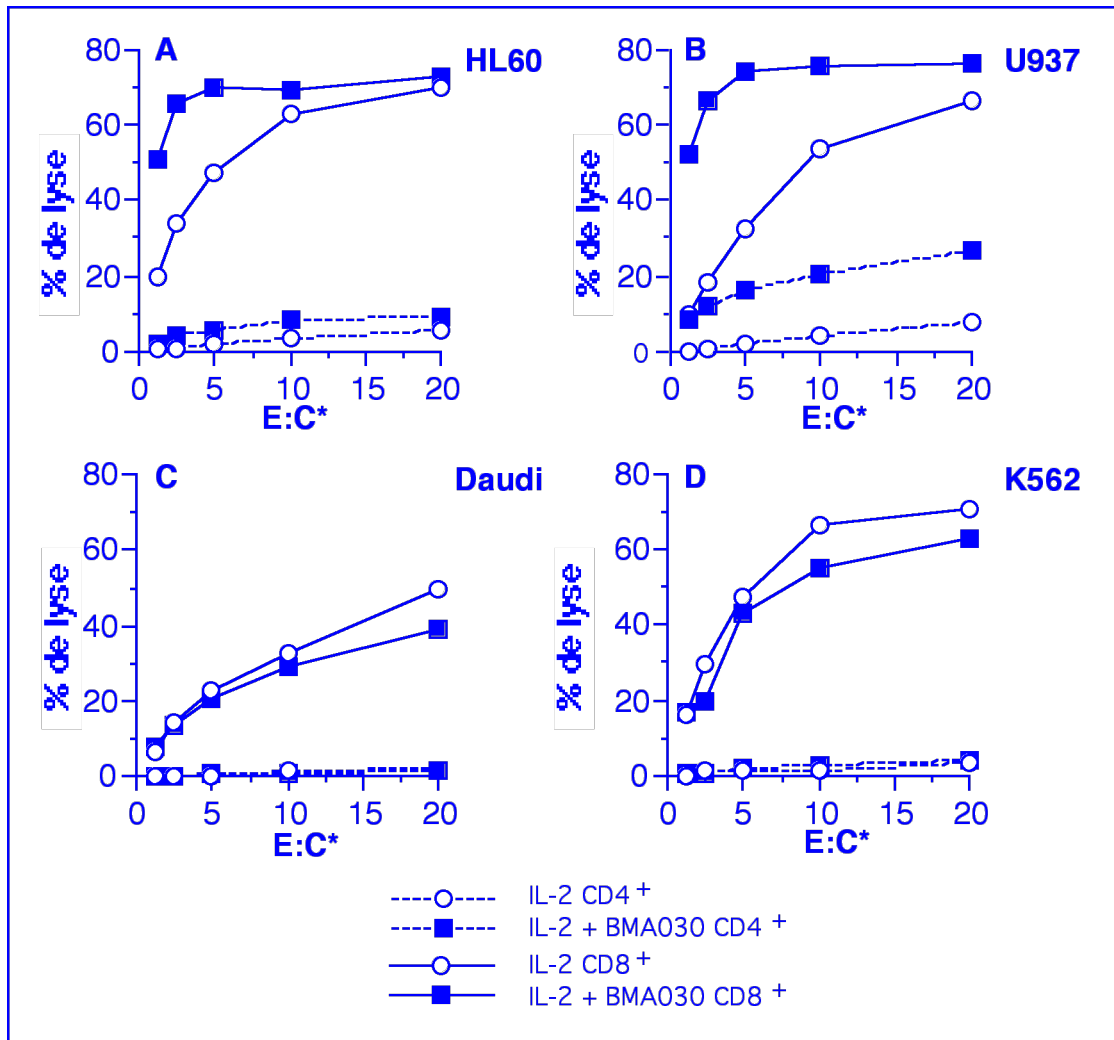


Figure 7-2: Activité cytotoxique des lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺. Après quatre jours de culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030, les lymphocytes sont triés en cellules CD8⁺ et CD4⁺ et leur activité cytotoxique est testée contre les lignées HL60 (A), U937 (B), Daudi (C) et K562 (D). Les valeurs illustrées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

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

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

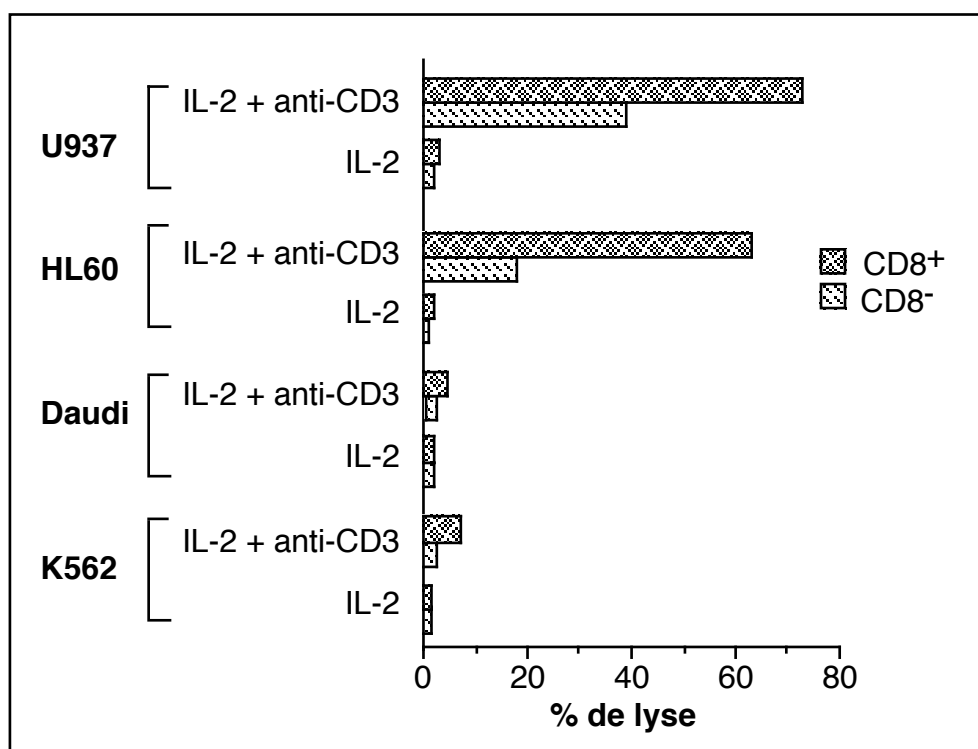


Figure 7-3: Activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ et CD8⁻. Après quatre jours de culture en présence d'IL-2 ou d'IL-2 + BMA030, les lymphocytes sont triés en cellules CD3⁺CD8⁺ et CD3⁺CD8⁻. Leur activité cytotoxique est testée contre les lignées HL60, U937, Daudi et K562. Les valeurs illustrées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

7.4. Discussion

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

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

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

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

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

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

8.1. Introduction

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

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

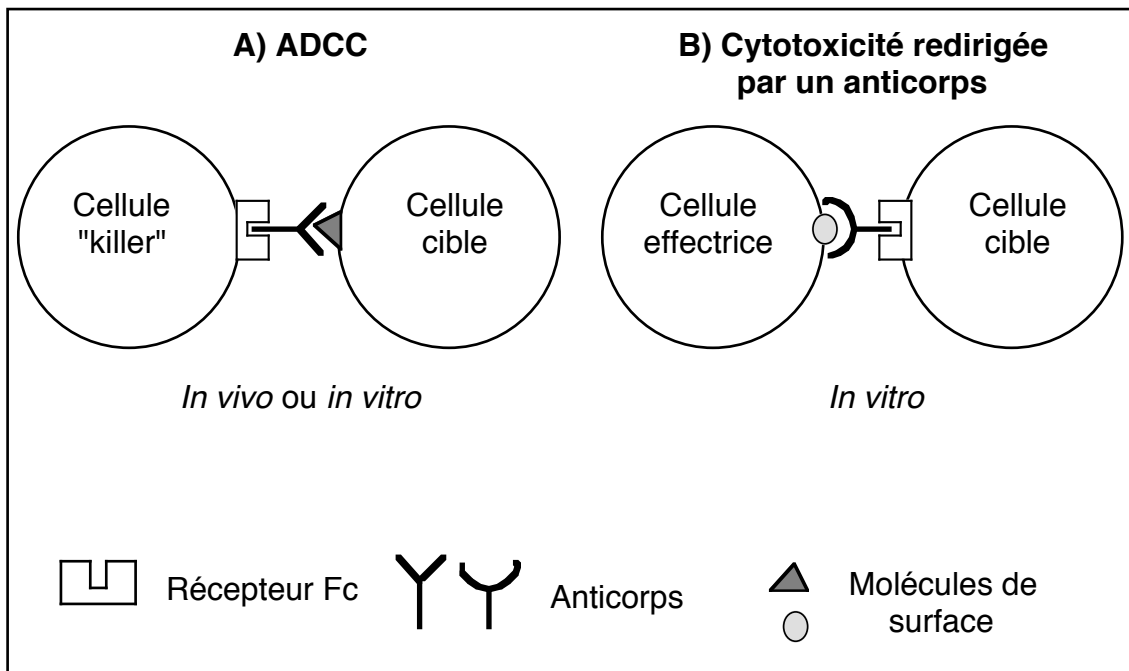


Figure 8-1: Représentation schématique de l'activité cytotoxique cellulaire dépendante d'un anticorps (ADCC) (A) et de l'activité cytotoxique redirigée par un anticorps (B).

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

Types	CD	Affinité	Isotypes murins reconnus
Fc γ RI	CD64	Forte	IgG _{2a} et IgG ₃ > IgG ₁
Fc γ RII	CD32	Faible	IgG ₁ > IgG _{2a}
Fc γ RIII	CD16	Faible	IgG ₃ > IgG _{2a}

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

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

8.2. Méthodologie

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

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

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

Des tris par le système MACS ont été réalisés avec différents anticorps anti-CD3 couplés à la biotine: SPVT3 (IgG₁), UCHT1 (IgG₁) et un anticorps ne possédant pas de portion Fc, SPVT3 F(ab)'₂, ceci afin de déterminer la participation de l'anticorps servant au tri dans le processus de cytotoxicité. De plus, pour éviter l'utilisation d'un anticorps anti-CD3, les lymphocytes T ont été enrichis négativement en éliminant les cellules NK (CD16⁺ et CD56⁺) par cytométrie en flux.

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

- IL-2 (50U/ml)
- IL-2 + BMA030 (IgG_{2a}, 10 ng/ml)
- IL-2 + BMA033 (IgG₃, 10 ng/ml)
- IL-2 + UCHT1 (IgG₁, 10 ng/ml)
- IL-2 + SPVT3 F(ab)'₂ fixé sur le fond de la boîte de culture (5 μ g/ml)
- IL-2 + phytohémagglutinine (PHA, 0,1%)
- IL-2 + entérotoxine A de staphylocoque (SEA, 10 ng/ml).

8.3. Résultats

8.3.1. Profil d'expression des récepteurs Fc γ sur les lignées tumorales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

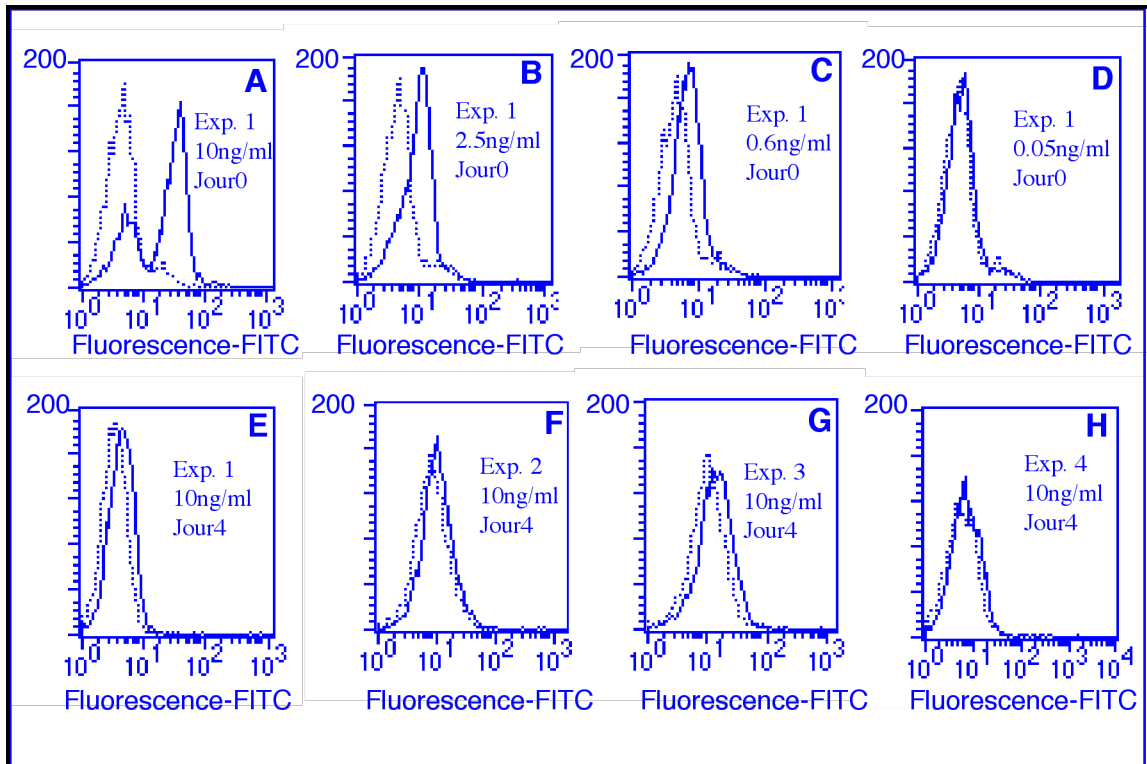


Figure 8-2 : Détection BMA030 présent à la surface des lymphocytes par un anticorps anti-immunoglobuline de souris couplé au FITC.

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

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

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

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

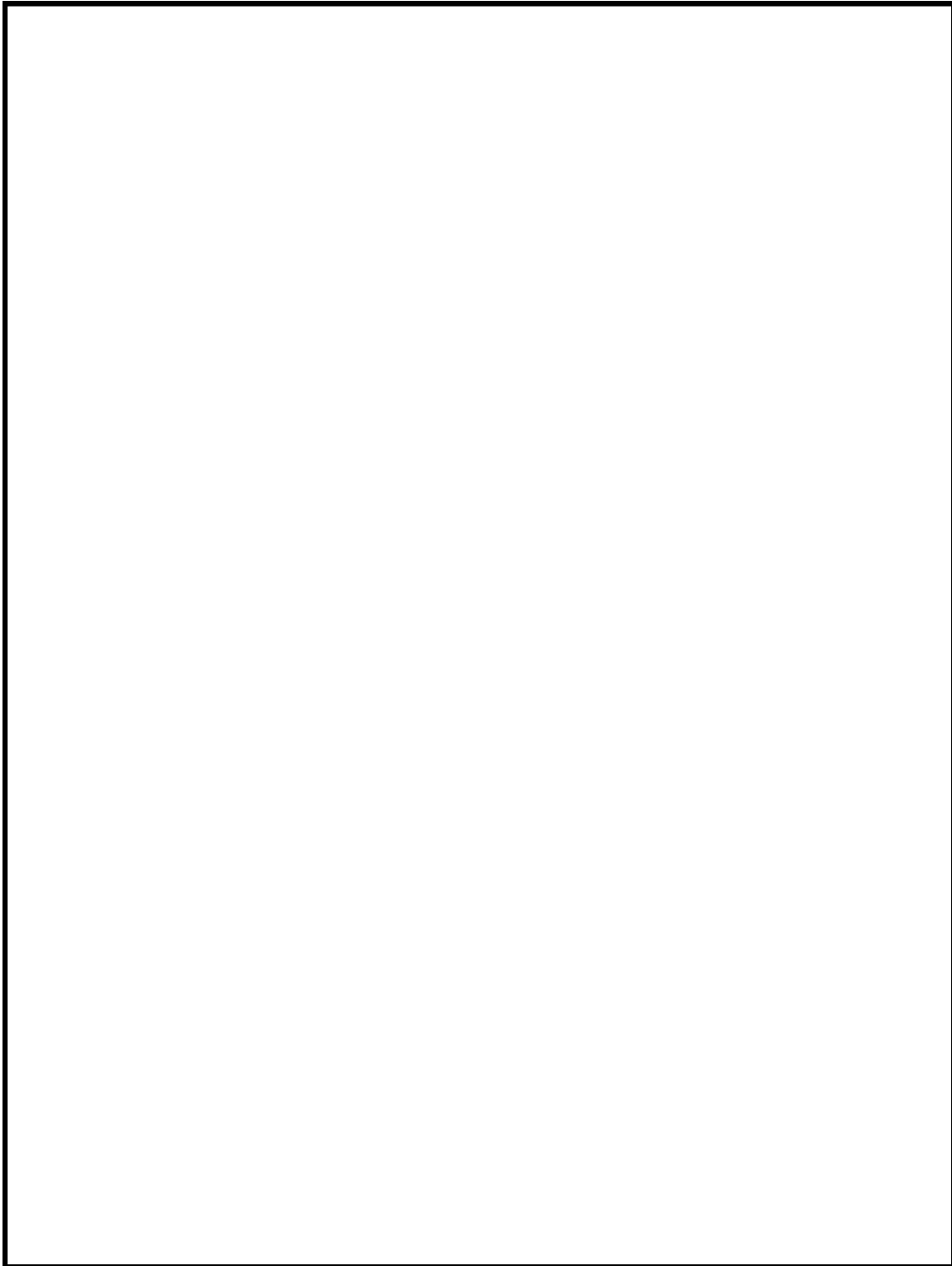


Figure 8-3 : Détection du BMA030 présent à la surface des lymphocytes par un anticorps anti-immunoglobuline de souris.

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

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

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

Néanmoins, nous avons étudié l'effet de plusieurs anticorps anti-CD3 (UCHT1, IgG₁; SPVT3, IgG_{2a}; et SPVT3 F(ab)'2) sur la lyse des cellules U937 et HL60. Les lymphocytes T stimulés par IL-2 et BMA030 possèdent une activité cytotoxique dirigée contre U937 comparable quel que soit l'anticorps anti-CD3 utilisé pour le tri (figure 8-4). De même, la lyse des cellules HL60 n'est pas influencée par la sélection des lymphocytes T (résultats non illustrés). Pour compléter cette étude, nous avons également réalisé des tris éliminant les cellules NK (CD16⁺ et/ou CD56⁺) de la population de départ par cytométrie en flux. La lyse des cellules des deux lignées tumorales est similaire à celle obtenue en utilisant des lymphocytes T CD3⁺ (résultats non illustrés).

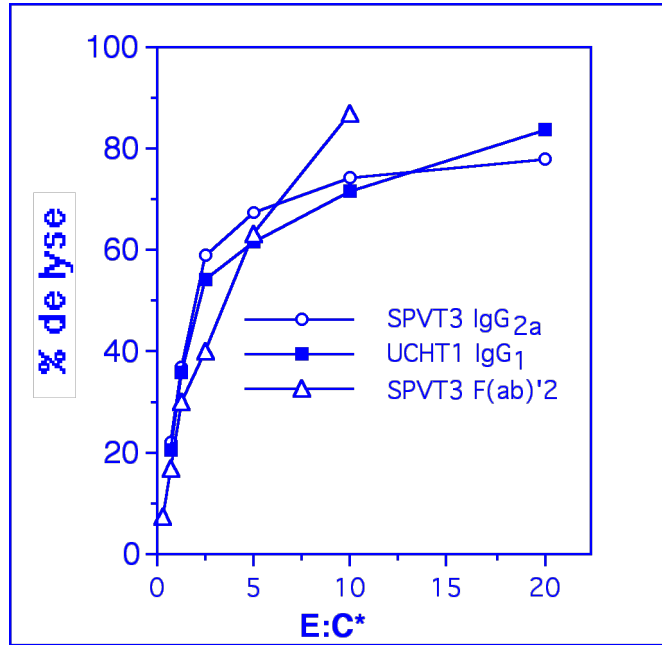


Figure 8-4: Activité cytotoxique contre la lignée U937 des lymphocytes T CD3⁺ stimulés par l'IL-2 + BMA030 et triés à l'aide de différents anticorps anti-CD3 (E:C* = rapport cellules effectrices : cellules cibles).

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

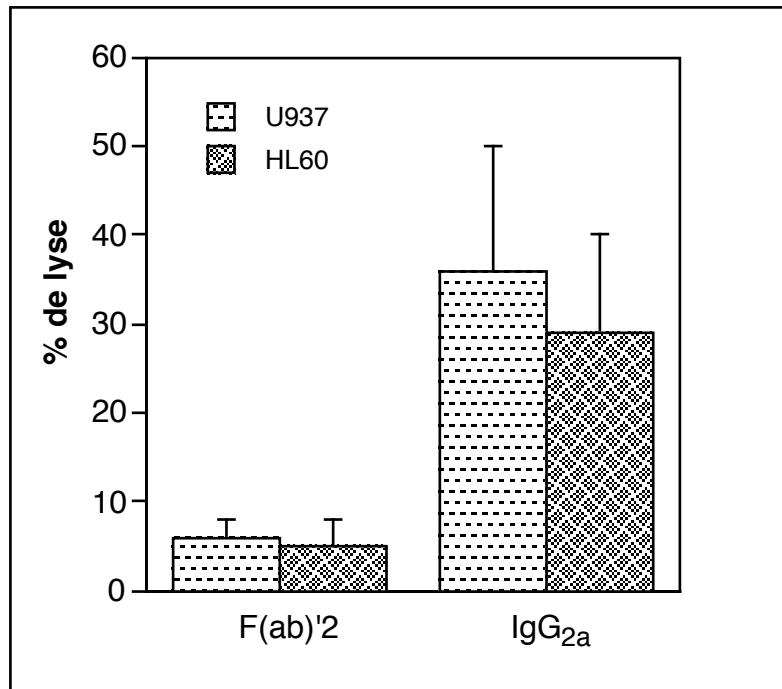


Figure 8-5 : Effet de l'anticorps servant au tri sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés par l'IL-2.

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

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

Après avoir exclu une participation de l'anticorps anti-CD3 utilisé pour le tri dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 et BMA030, nous nous sommes intéressée à l'effet BMA030. Dans ce but, les lymphocytes sont activés pendant quatre jours par des anticorps anti-CD3 d'isotypes différents (BMA030, IgG_{2a}; UCHT1, IgG₁; BMA033, IgG₃) ou par un anticorps anti-CD3 incomplet (SPVT3 F(ab)'2) (figure 8-6). Des mitogènes des lymphocytes T autres que des anticorps ont également été utilisés, à savoir une lectine, la phytohémagglutinine (PHA) et un superantigène, l'entérotoxine A de staphylocoque (SEA).

Seules les stimulations par des anticorps anti-CD3 complets et possédant un isotype reconnu par les FcγR I (IgG_{2a} ou IgG₃) tels que le BMA030 et le BMA033 sont capables de générer une activité cytotoxique des lymphocytes T contre HL60 et U937. Celle-ci est supérieure ou égale à 30% de lyse pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles égal à 20 (figure 8-6).

La stimulation des lymphocytes T par la SEA ou par la PHA induit une activité cytotoxique faible et similaire à celle obtenue après culture en présence d'UCHT1 (IgG₁) ou de l'anticorps anti-CD3 incomplet (inférieure à 10% de lyse pour un rapport cellules effectrices : cellules cibles égal à 20) (figure 8-6).

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

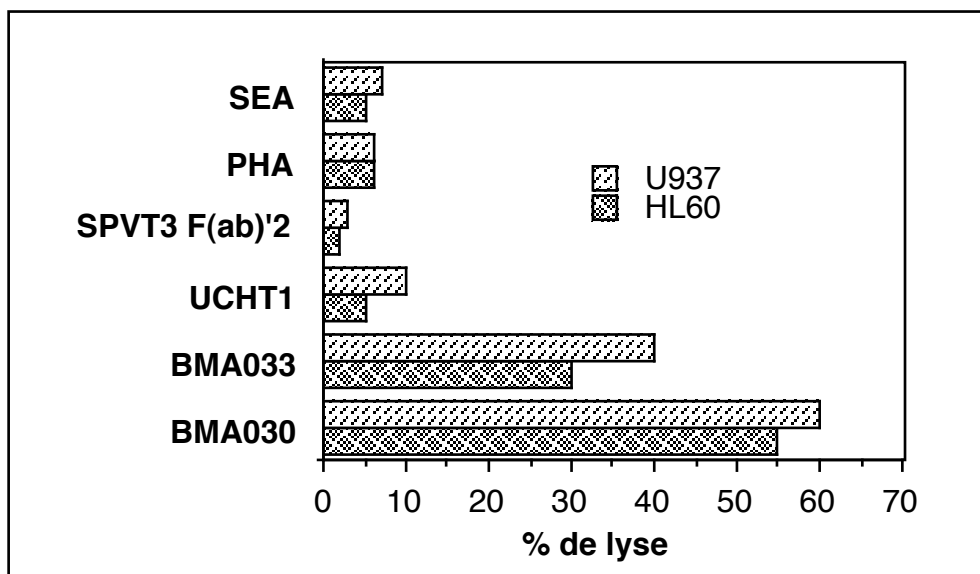


Figure 8-6: Activité cytotoxique des lymphocytes T stimulés pendant quatre jours par des anticorps anti-CD3 différents ou par des mitogènes. Le rapport cellules effectrices : cellules cibles est égal à 20.

8.4. Discussion

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

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

moins aucun récepteur n'a été détecté par les anticorps, dirigés contre le Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII, que nous avons utilisés. Ces cellules ne peuvent donc pas être détruites par ce mode de cytotoxicité. Les cellules des autres lignées (K562, Daudi, Cess, Ly, Nalm-6, HL60 et U937) portent à leur surface au moins un des types de récepteur Fc γ . Nos résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature (Anderson et Looney, 1986; Fanger *et al.*, 1989). La présence de récepteur de haute affinité (Fc γ RI), reconnaissant préférentiellement les immunoglobulines murines d'isotype IgG_{2a} comme le BMA030 ou d'isotype IgG₃ comme le BMA033 (Ceuppens et Van Vaeck, 1989), sur les cellules des lignées U937 et HL60 explique leur sensibilité à une lyse redirigée par un anticorps. Ce type d'activité cytotoxique est aussi possible sur d'autres lignées tumorales comme K562 et Daudi (Leeuwenberg *et al.*, 1985; Jondal *et al.*, 1986). Dans ce cas, la quantité d'anticorps nécessaire doit être plus élevée car les récepteurs portés par ces cellules possèdent une affinité plus faible pour les immunoglobulines (Anderson, 1989). De plus, le récepteur Fc γ RII exprimé par ces cellules lie préférentiellement les immunoglobulines murines d'isotype IgG₁.

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

La lectine PHA est un mitogène des lymphocytes T largement utilisé (Bolhuis *et al.*, 1985; Gelfand *et al.*, 1986; Ho et Campana, 1991; Lamers *et al.*, 1992). La culture en présence d'un superantigène comme la SEA génère une activation importante des lymphocytes T via leur TCR (pour revue: Webb et Gascoigne, 1994). Dans notre travail, la stimulation des lymphocytes T par la PHA et la SEA a été confirmée par la détection du CD25 à la surface des lymphocytes T. L'absence de cytotoxicité des lymphocytes T après une stimulation par ces deux mitogènes confirme la nécessité de la présence de l'anticorps anti-CD3. De plus, l'obligation de stimuler les lymphocytes T par un anticorps anti-CD3 complet d'isotype liant préférentiellement les récepteurs Fc γ RI (IgG_{2a} et IgG₃) montre l'importance de ce récepteur.

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

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

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

9.1. Introduction

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

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

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

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

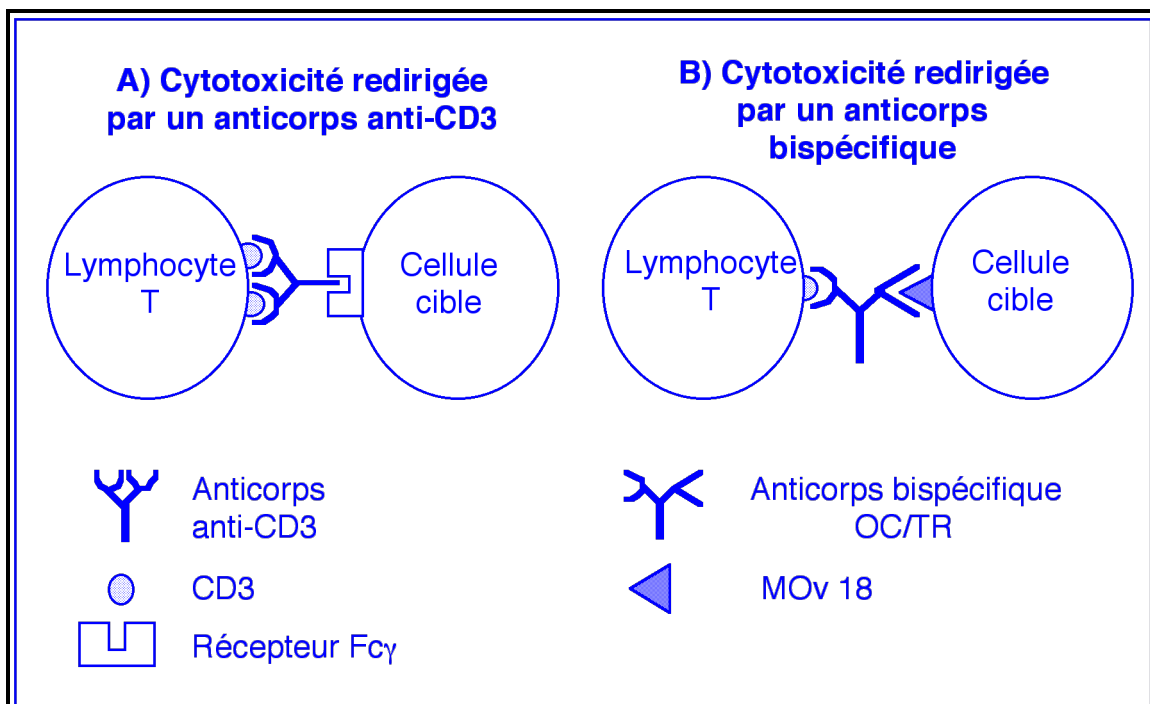


Figure 9-1: Représentation schématique de l'activité cytotoxique redirigée par l'anticorps anti-CD3 ou par l'anticorps bispécifique OC/TR.

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

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

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

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

9.2. Méthodologie

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

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

9.3. Résultats

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

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

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

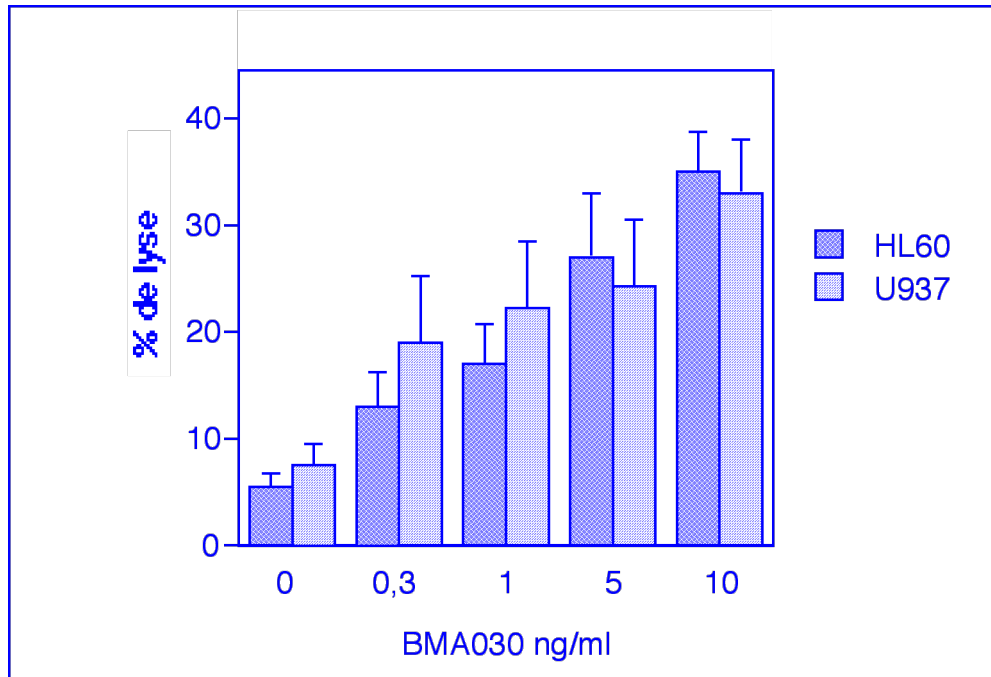


Figure 9-2: Activité cytotoxique en présence de différentes concentrations de BMA030 des lymphocytes T stimulés par l'IL-2. L'anticorps anti-CD3 (BMA030) est ajouté aux cellules cibles (HL60 et U937) une demi-heure avant le test de relargage de $^{51}\text{Cr}^*$. Les résultats (moyenne \pm écart type)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

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

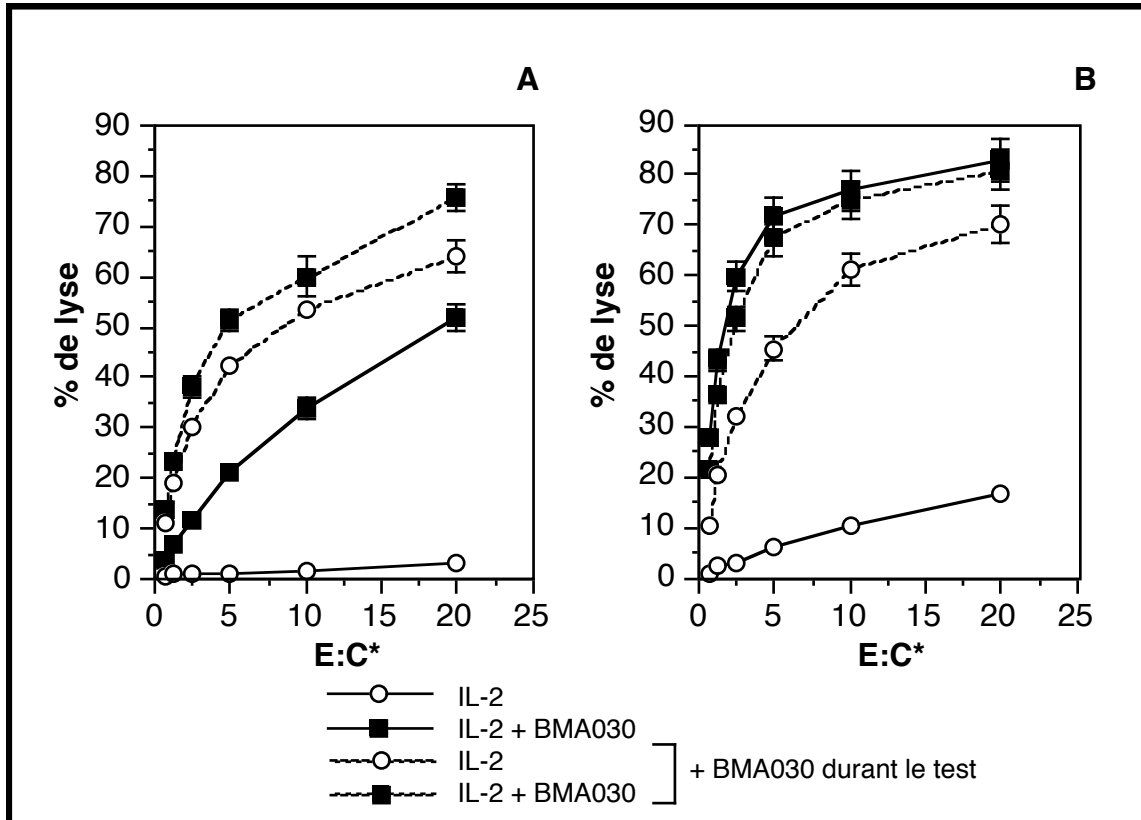


Figure 9-3: Activité cytotoxique en présence de BMA030 des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 ou par l'IL-2 + BMA030 .

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

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

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

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

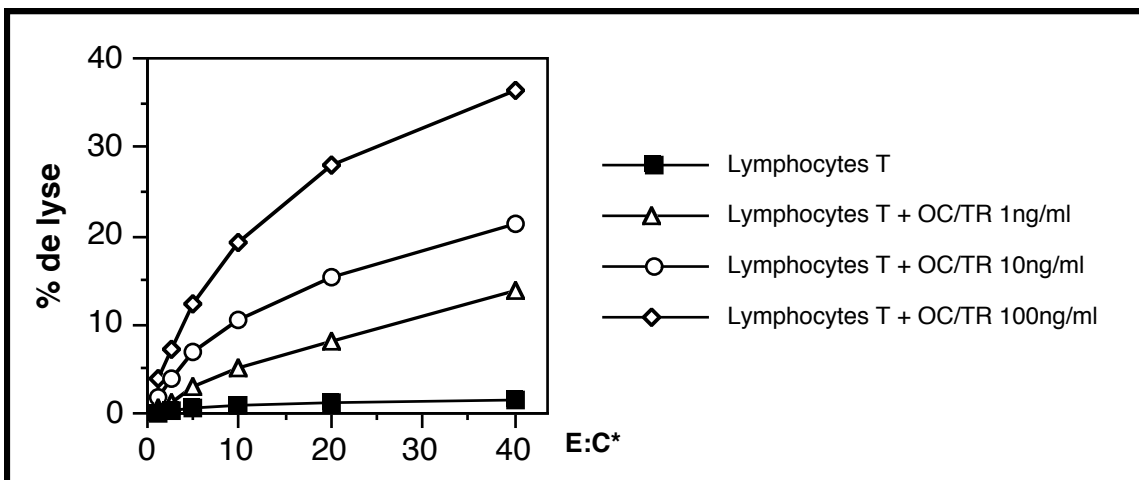


Figure 9-4: Activité cytotoxique en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR des lymphocytes T stimulés par l'IL-2 + BMA030.

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

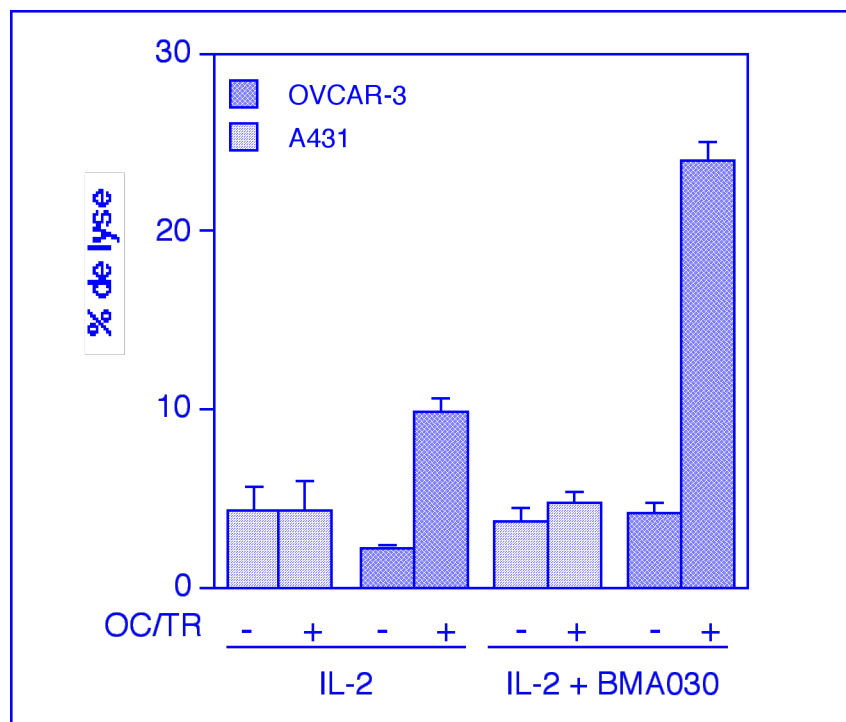


Figure 9-5: Activité cytotoxique induite par un anticorps bispécifique (OC/TR) après stimulation des lymphocytes par l'IL-2 ou l'IL-2 + BMA030.

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

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

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

9.4. Discussion

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

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

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

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

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

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

Discussion de la deuxième partie

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

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

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

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

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

2a

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

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

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

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

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

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