

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

Troisième partie

Etude comparative de plusieurs anticorps anti-CD3

Objectif

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

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

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

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

Tableau III-1: Liste des anticorps monoclonaux utilisés.

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

10.1. Introduction

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

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

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

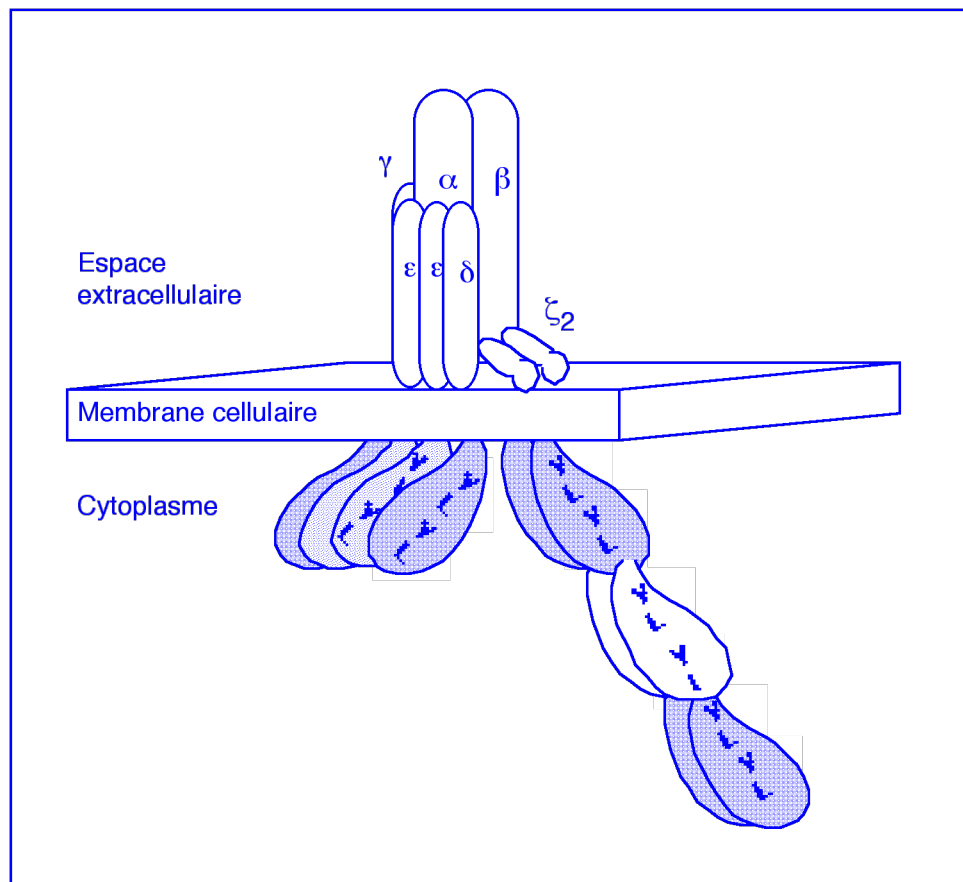


Figure 10-1: Représentation schématique des différentes chaînes composant le complexe CD3/TCR.

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

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

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

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

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

10.2. Méthodologie

L'affinité a été étudiée pour les quatre anticorps BMA030, TR66, OKT3 et OC/TR. Ces anticorps ont été couplés à de l'iode¹²⁵ radioactif. Les PBL ont été incubés en présence de dilutions sériées d'anticorps anti-CD3 radioactifs et la radioactivité a été mesurée. Afin de déterminer la constante d'affinité et le nombre de sites reconnus par les anticorps, une analyse Scatchard est réalisée.

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

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

10.3. Résultats

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

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

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

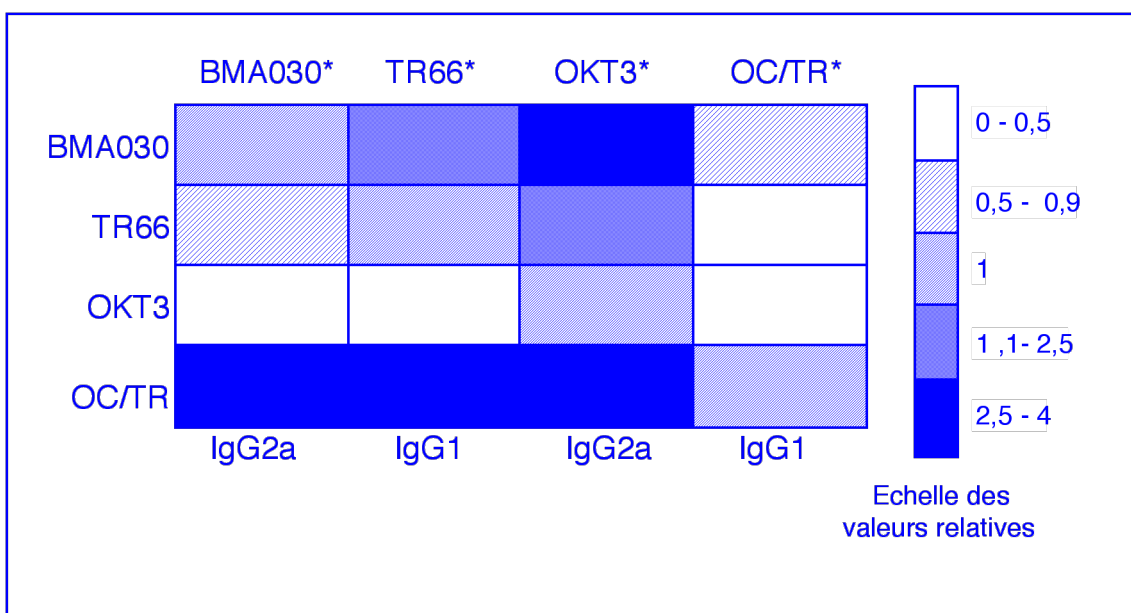


Figure 10-2: Détermination des caractéristiques de liaison au complexe CD3 de trois anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66 et OKT3) et d'un anticorps bispécifique (OC/TR, anti-CD3 X anti-MOv18).

Les PBL sont incubés en présence d'une quantité déterminée d'anticorps marqués à l'iode radioactif (*). Ils sont ensuite incubés en présence de doses croissantes d'anticorps homologues ou hétérologues froids. Pour chaque anticorps radioactif, la concentration de l'anticorps homologue capable d'induire une inhibition de marquage de 50% (IC₅₀) est considérée comme égale à 1 et les autres IC₅₀ sont calculées en les rapportant à cette valeur.

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

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

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

10.4. Discussion

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

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

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

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

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

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

Chapitre 11:

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

11.1. Introduction

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

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

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

ITAM $\epsilon < \text{ITAM } \zeta 2 \leq \text{ITAM } \zeta 1$). La cascade de phosphorylation aboutit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ intervient dans la libération du calcium du réticulum endoplasmique (pour revues: Berridge, 1993; 1995), tandis que le DAG active la protéine kinase C (Crabtree, 1989) (figure 11-1).

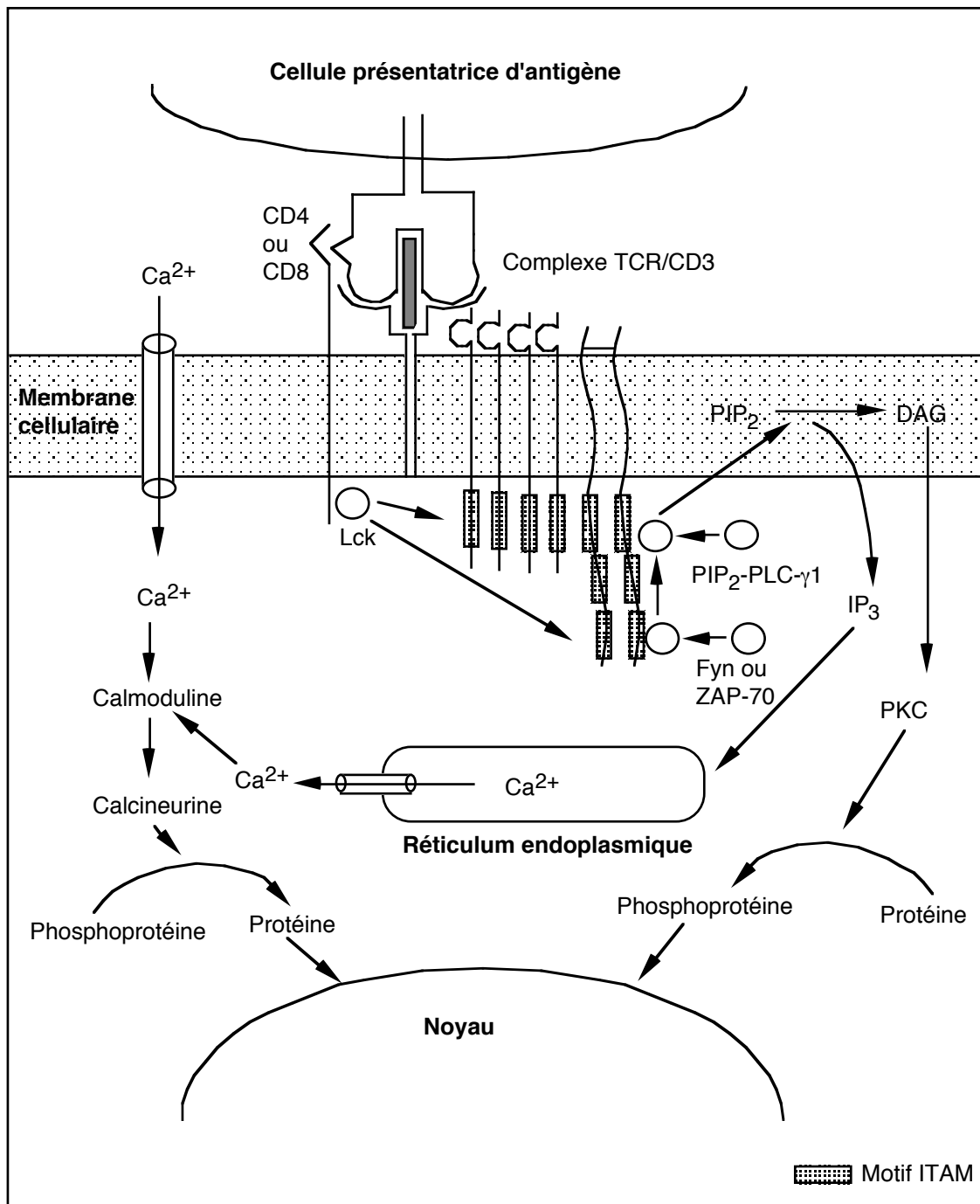


Figure 11-1: Signaux intracellulaires intervenant après une activation des lymphocytes T. Les principaux événements biochimiques qui suivent la liaison de l'antigène sur le TCR et qui conduisent à la transcription de gènes dans le noyau sont représentés.

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

L'induction de flux calciques et de phosphorylations des acides aminés tyrosines après une stimulation des lymphocytes T par des anticorps anti-CD3 a déjà été décrite (Finkel *et al.*, 1987; Vandenberghe et Ceuppens, 1990; Rigley *et al.*, 1995). Nous avons tenté de déterminer si ces observations étaient dépendantes ou non des caractéristiques de l'anticorps anti-CD3 utilisé pour la stimulation. Outre les différents anticorps anti-CD3 et l'anticorps bispécifique OC/TR, nous avons aussi étudié la stimulation par un anticorps anti-CD3 chimérique (αCD3 chim) dont la région de reconnaissance d'origine murine a été placée dans un contexte d'immunoglobulines humaines. Cette construction permet une "humanisation" de l'anticorps (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Woodle *et al.*, 1992). Ce type d'anticorps est réalisé afin de minimiser les problèmes dus à l'injection d'anticorps d'origine murine chez l'homme. En effet, ces derniers provoquent une réaction immunitaire appelée HAMA pour "Human Anti-Murine Antibodies" (Jaffers *et al.*, 1983; 1986; Hammond *et al.*, 1990). Signalons également qu'il est actuellement possible d'obtenir des anticorps entièrement humains et reconnaissant des molécules humaines, notamment par clonage de l'ADN d'un anticorps dans un phage et expression de cet ADN par des bactéries (Esposito *et al.*, 1995) ou grâce à des souris transgéniques exprimant des immunoglobulines humaines (Lonberg *et al.*, 1994).

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

11.2. Méthodologie

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

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

La détection de résidus tyrosines phosphorylés est réalisée sur des lymphocytes fraîchement prélevés. Après une incubation de trois minutes en présence d'anticorps anti-CD3 (2 $\mu\text{g/ml}$), les lymphocytes sont lysés et les protéines cytoplasmiques sont récupérées. Les profils de phosphorylation des protéines sont mis en évidence, après "Western blot" et transfert sur une membrane de nitrocellulose, à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine couplé à l'iode¹²⁵ radioactif. Ces expériences ont été réalisées avec quatre anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3 et αCD3 chimérique) et avec l'anticorps bispécifique OC/TR.

11.3. Résultats

11.3.1. Flux calciques

Quatre anticorps (BMA030, TR66, αCD3 et αCD3 chimérique, groupe 1) induisent une augmentation de fluorescence de la sonde fluo-3 supérieure à 150% de la valeur du niveau de base (tableau 11-1). Par contre, les flux calciques observés en présence des quatre autres anticorps (OKT3, BMA033, Leu-4, OC/TR, groupe 2) sont faibles ou non détectables (tableau 11-1). Parallèlement, la proportion de cellules répondant à la stimulation par un anticorps anti-CD3 est plus faible pour les anticorps du groupe 2 (OKT3, BMA033, Leu-4 et OC/TR). Par exemple, à un temps déterminé (trois minutes après la stimulation), environ 50% des cellules du clone CD8^+ possèdent une intensité de fluorescence élevée en réponse à la stimulation par un anticorps anti-CD3 du groupe 1 contre 13% de cellules après stimulation par un anticorps du groupe 2.

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

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

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

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

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

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

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

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

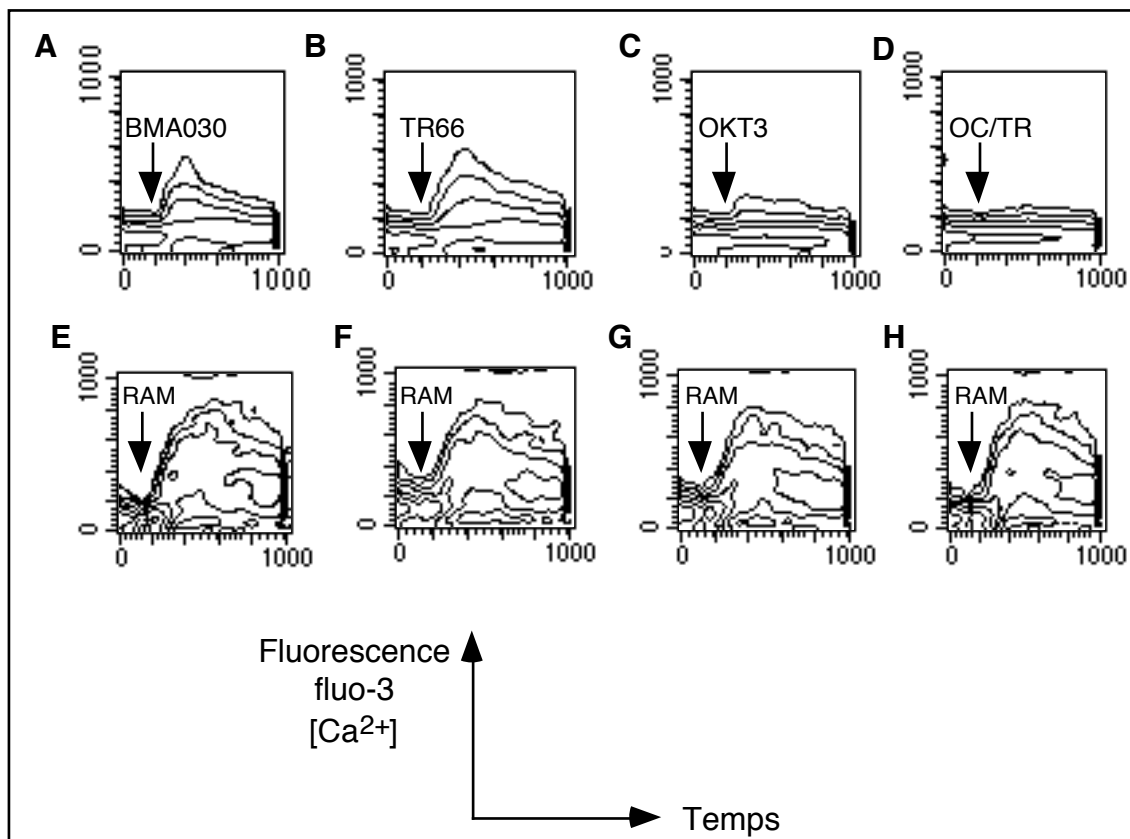


Figure 11-2: Intensité de la réponse calcique des lymphocytes du sang périphérique après stimulation par quatre anticorps anti-CD3 seuls ou après liaison croisée.

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

11.3.2. Phosphorylations des résidus tyrosines

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

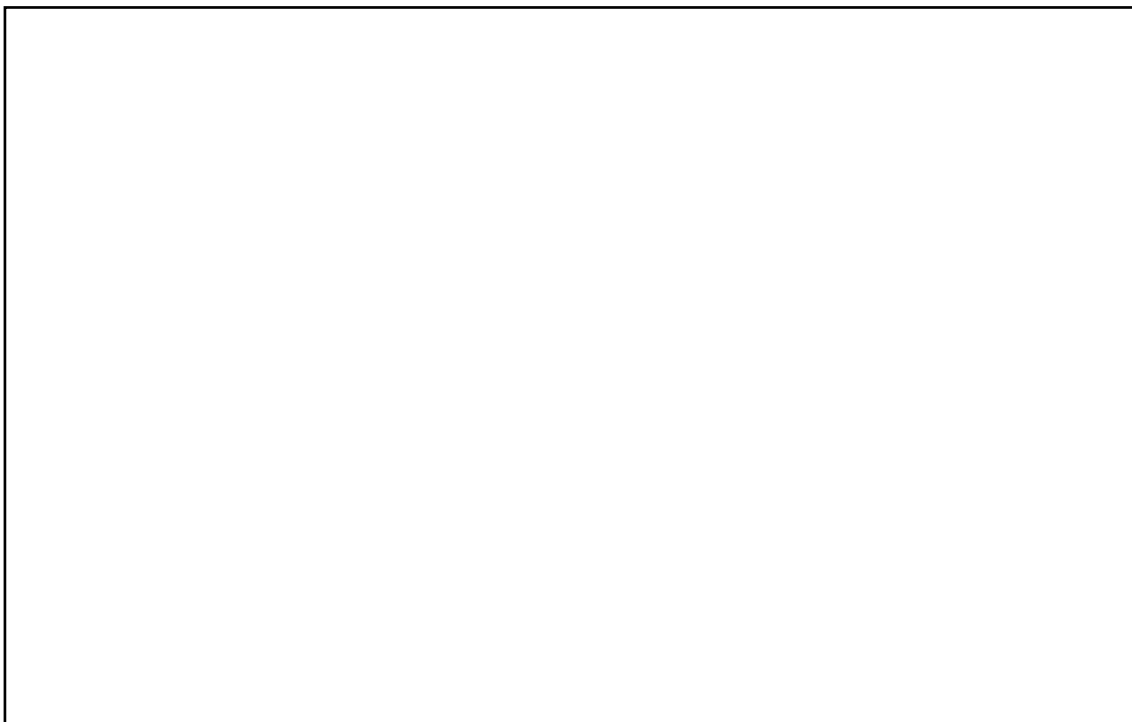


Figure 11-3: Phosphorylations de résidus tyrosines après stimulation de PBL par différents anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3 et α CD3 chim) et par l'anticorps bispécifique OC/TR.

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

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

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

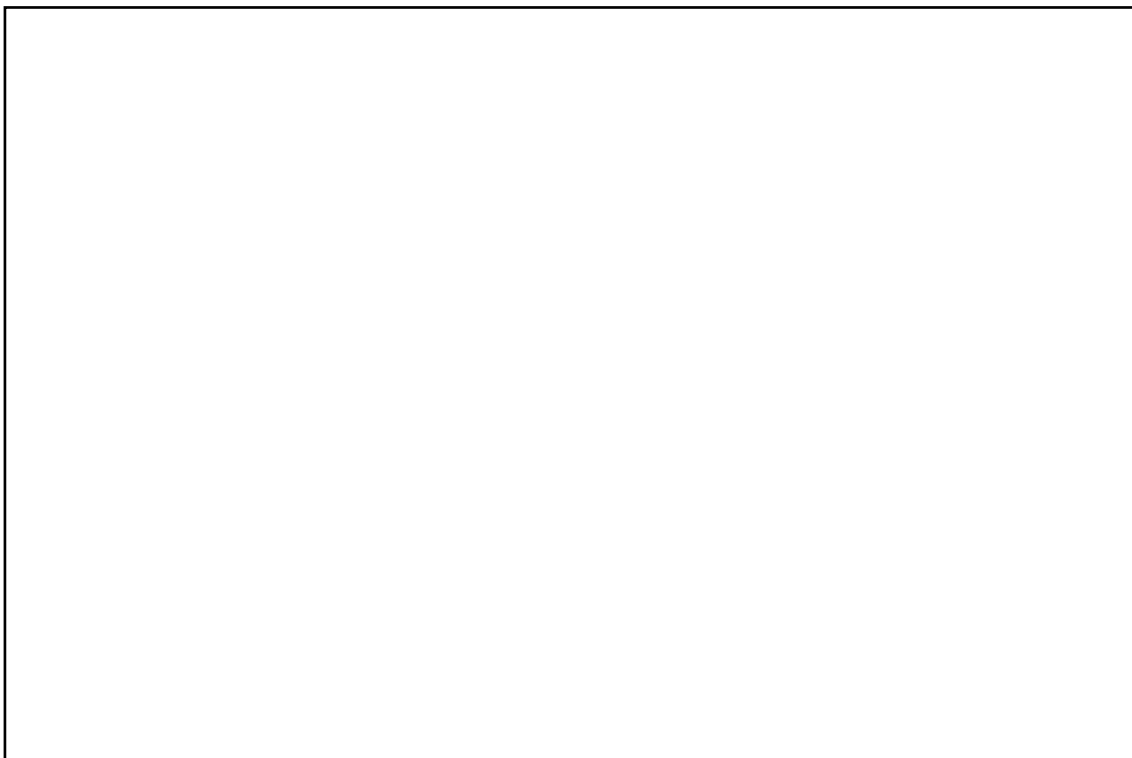


Figure 11-4: Induction de phosphorylation des résidus tyrosines après stimulation de PBL par différents anticorps anti-CD3 en présence ou non d'anticorps anti-immunoglobulines de souris (RAM).

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



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

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

11.4. Discussion

L'induction de flux calciques d'intensités différentes selon le type d'anticorps anti-CD3 utilisé a déjà été rapportée (Roosnek *et al.*, 1987; Ledbetter *et al.*, 1987). Signalons que ces auteurs ont employé des anticorps anti-CD3 différents des nôtres. Dans notre étude, les anticorps anti-CD3 peuvent être divisés en deux groupes suivant leur capacité (groupe 1) ou non (groupe 2) d'induire seuls un flux calcique important. Les anticorps BMA030, TR66, αCD3 et αCD3 chimérique font partir du groupe 1, tandis que les anticorps OKT3, OC/TR, BMA033 et Leu-4 appartiennent au groupe 2.

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

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

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

En résumé, d'après les expériences que nous avons réalisées, les anticorps anti-CD3 peuvent être divisés en deux groupes. Les premiers (BMA030, TR66, αCD3 , αCD3 chim.) induisent des flux calciques importants seuls tandis que les seconds (OKT3, OC/TR, BMA033, Leu-4) ne génèrent des flux calciques importants qu'en

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

Chapitre 12:

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

12.1. Introduction

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

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

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

monocytes présentent l'avantage de produire de l'IL-1 nécessaire pour une stimulation complète des lymphocytes T (Palacios, 1985). Cependant, une proportion de la population humaine (30% des Caucasiens), possède des monocytes n'exprimant pas le récepteur Fc adéquat pour lier les anticorps murins d'isotype IgG₁. Chez ces personnes, on ne constate pas de réponse à un anticorps anti-CD3 IgG₁ (Tax *et al.*, 1983; Kaneoka *et al.*, 1983; Ceuppens et Van Vaeck, 1987).

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

12.2. Méthodologie

Pour cette étude, nous avons sélectionné des donneurs répondant à une stimulation par un anticorps anti-CD3 d'isotype IgG₁. Cette sélection s'est faite sur base de la capacité proliférative des lymphocytes de ces donneurs, en présence d'un anticorps anti-CD3 IgG₁.

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

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

12.3. Résultats

12.3.1. Détection du complexe CD3

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

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

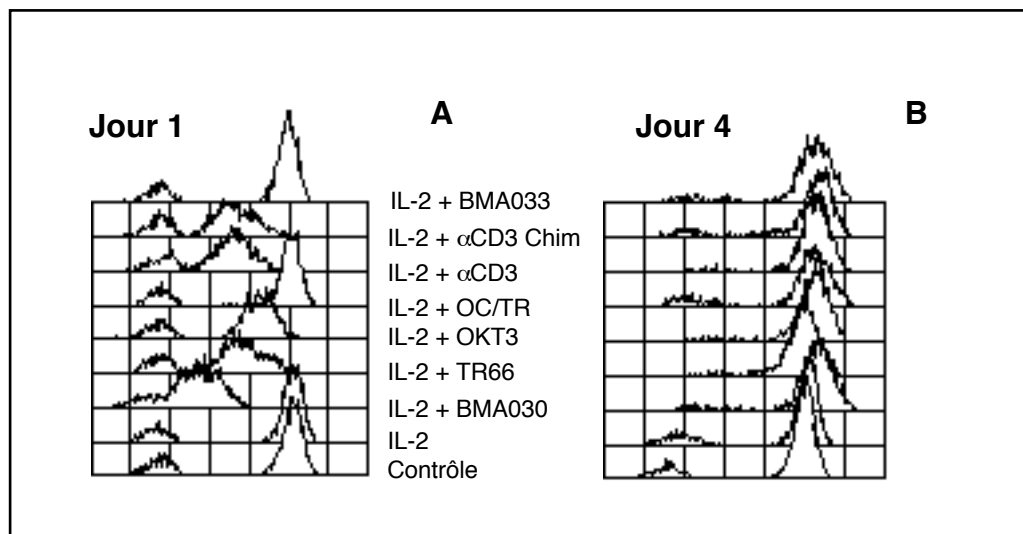


Figure 12-1: Expression du complexe CD3 après un jour (A) ou 4 jours de culture (B) en présence des différents anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) et d'IL-2.

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

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

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

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

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

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

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

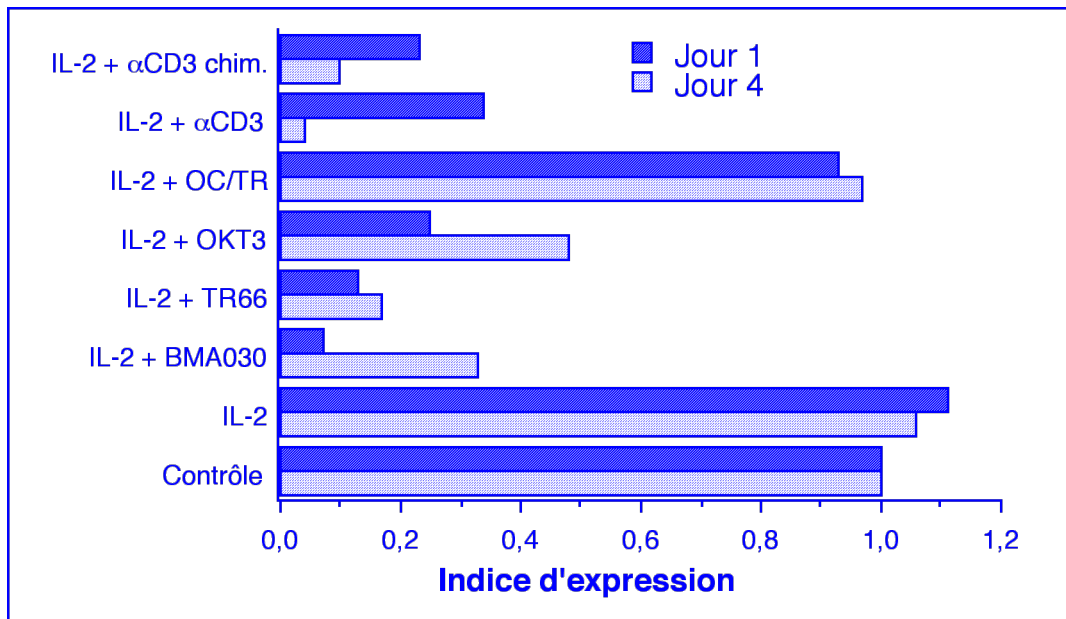


Figure 12-2: Expression du complexe CD3 après culture des cellules en présence d'anticorps anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) fixés sur le fond des puits de culture.

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

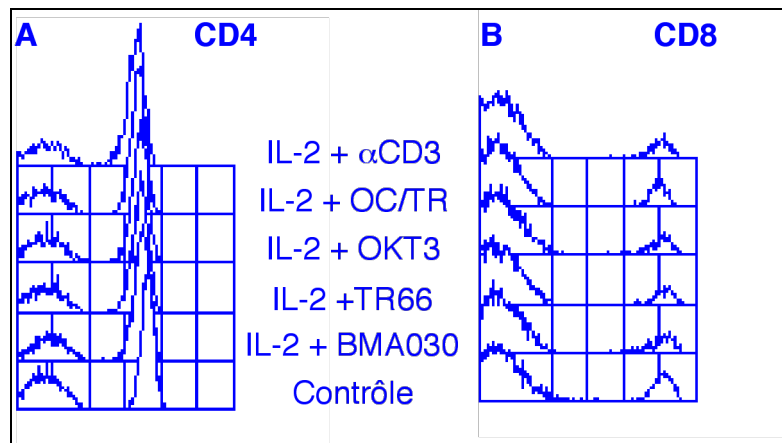


Figure 12-3: Expression des marqueurs CD4 (A) et CD8 (B) à la surface de lymphocytes cultivés 24 heures en présence d'anticorps anti-CD3 (10 ng/ml) et d'IL-2. La détection des marqueurs CD4 et CD8 a été réalisée par cytométrie en flux après incubation des cellules en présence d'anticorps anti-CD4-FITC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

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

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

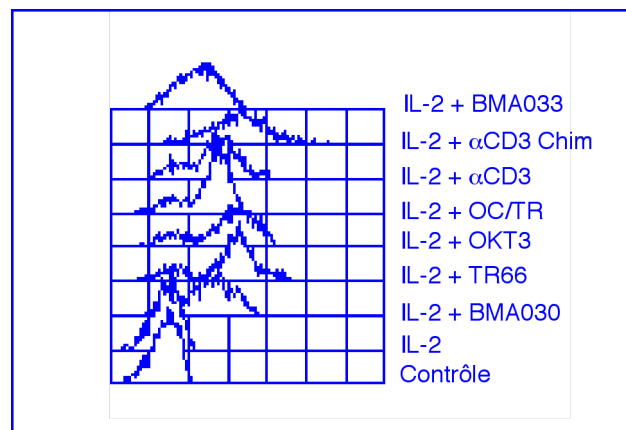


Figure 12-4: Détection des anticorps anti-CD3 après 24 heures de culture.

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

Afin de s'assurer que la diminution de l'intensité de fluorescence de l'anticorps anti-immunoglobulines de souris est le reflet de la modulation du complexe CD3 et non la conséquence d'un détachement de l'anticorps, les cellules ont été incubées à 4°C et à 37°C (figure 12-5). En effet, la modulation étant un phénomène actif, elle ne peut avoir lieu qu'à 37°C. Après 24 heures de culture à 37°C en présence des anticorps BMA030 et αCD3 l'intensité du marquage par l'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris-FITC (figure 12-5 C) diminue par rapport au marquage obtenu 30 minutes après addition des anticorps anti-CD3 dans les cultures (figure 12-5 A). Par contre, à 4°C, aucun changement important de l'intensité du marquage n'est observé après 24 heures de culture (figure 12-5 D) par rapport aux résultats obtenus après 30 minutes (figure 12-5 B). Signalons que le profil de marquage de l'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris est similaire à 4°C et à 37°C après 24 heures d'incubation en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR (figure 12-5 C et D).

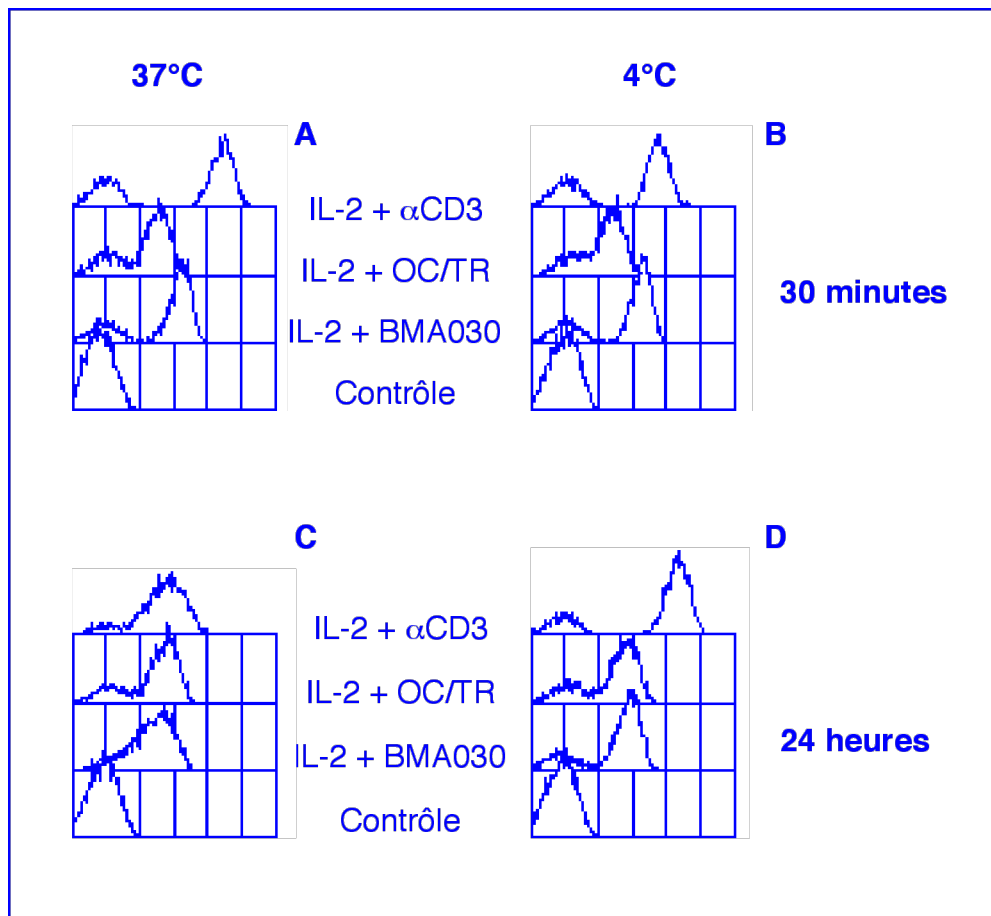


Figure 12-5: Détection des anticorps anti-CD3 après 24 heures de culture à 37°C ou à 4°C.

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

12.4. Discussion

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

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

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

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

La cinétique de la modulation du complexe CD3 est variable suivant le donneur. Cette variation n'est pas due à l'absence de monocytes porteurs de récepteurs Fc γ adéquats puisque les donneurs ont été préalablement sélectionnés pour leur capacité d'induire une prolifération en présence d'anticorps anti-CD3 IgG₁ sous forme soluble. L'induction de la prolifération par un anticorps anti-CD3 IgG₁ est corrélée à la présence de récepteurs Fc γ capables de lier des immunoglobulines de souris IgG₁ (Fc γ R II).

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

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