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

Chapitre 13:

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

13.1. Introduction

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

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

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

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

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

13.2. Méthodologie

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

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

13.3. Résultats

13.3.1. Prolifération cellulaire

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

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

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

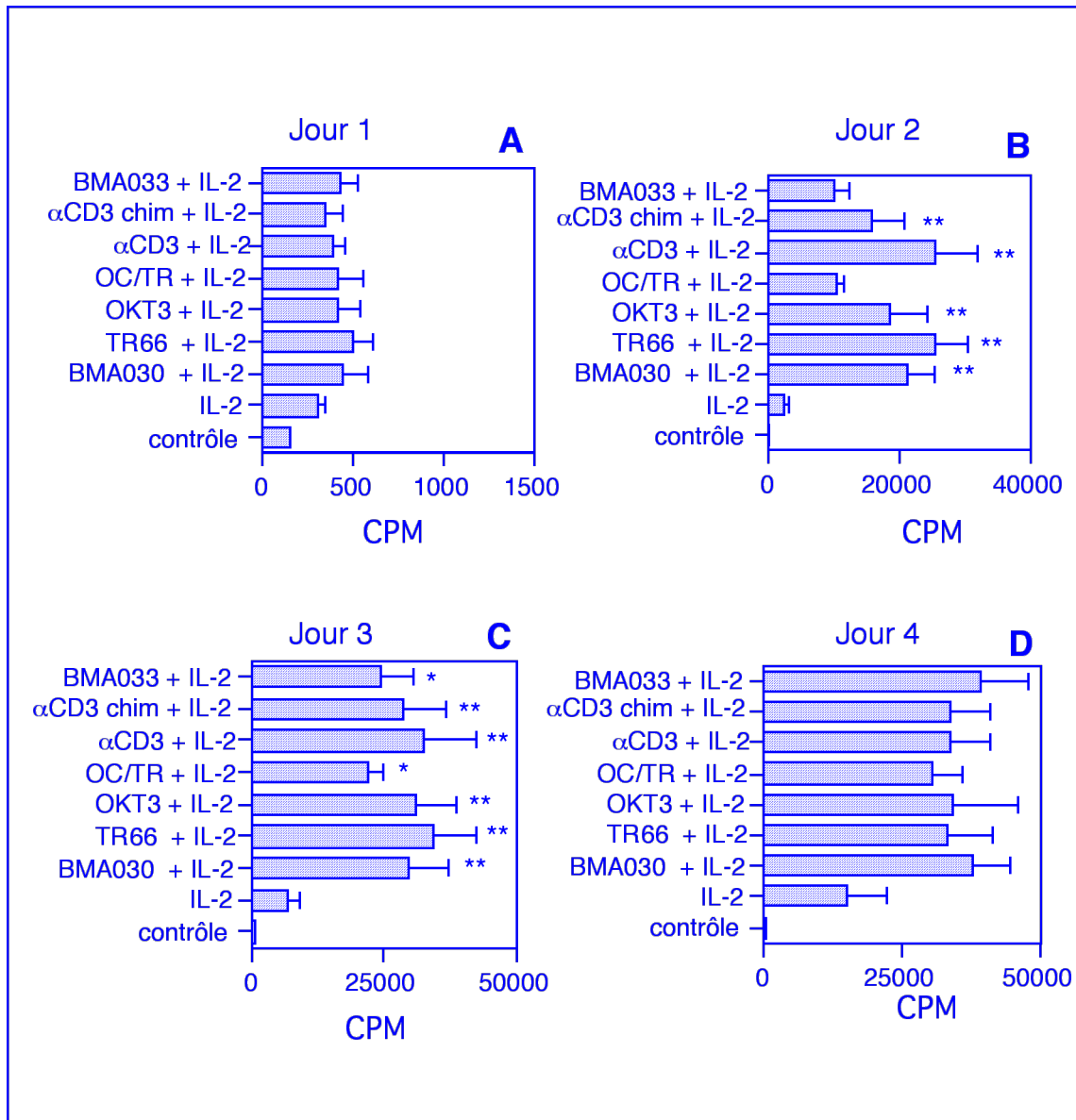


Figure 13-1: Induction de la prolifération au cours de la culture et dans les différentes conditions expérimentales.

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

13.3.2. Phénotype de surface

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

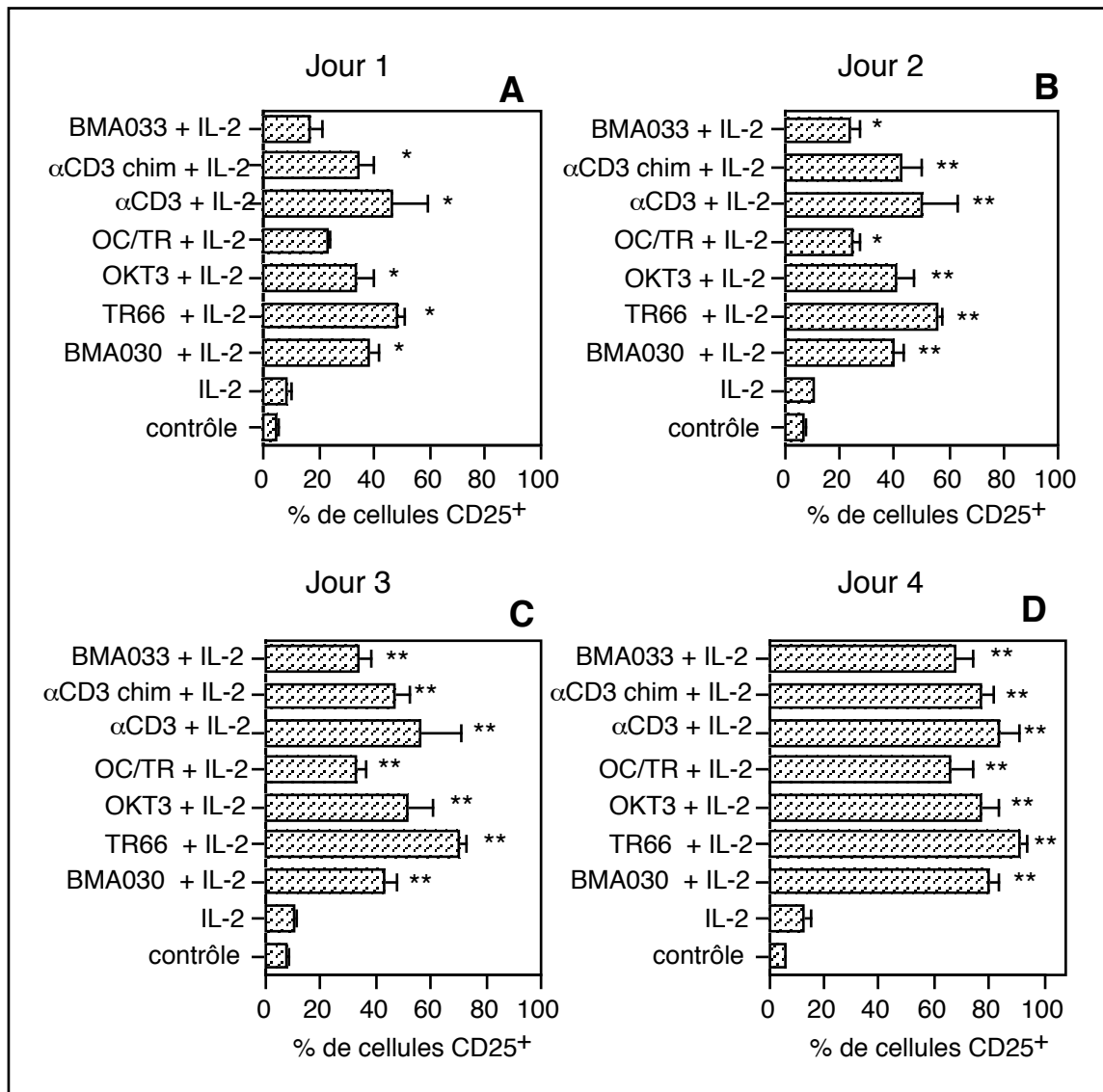


Figure 13-2: Pourcentage de cellules exprimant la chaîne α du récepteur pour l'IL-2 (CD25) au cours de la culture et dans les différentes conditions expérimentales.

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

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

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

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

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

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

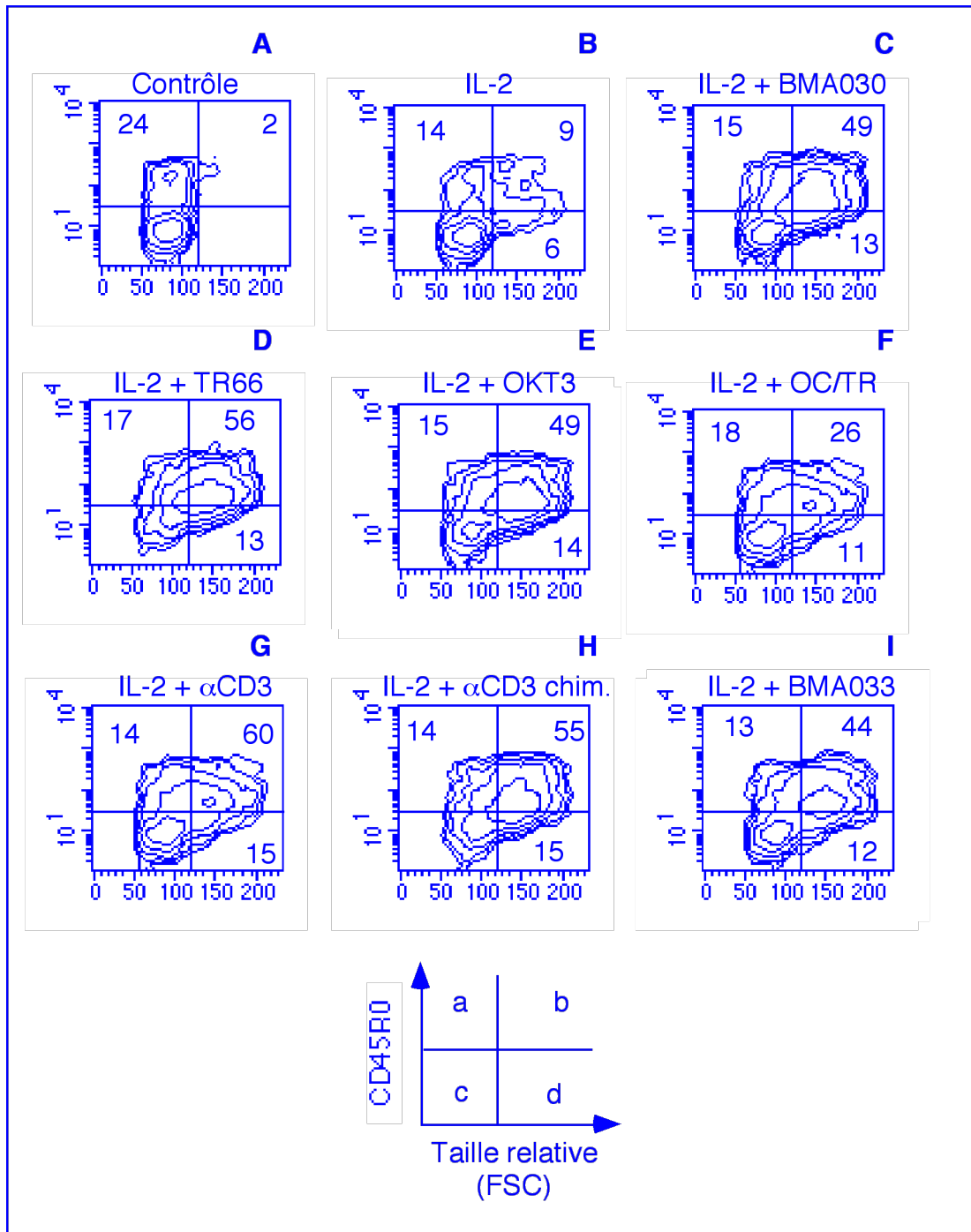


Figure 13-3: Expression du marqueur de CD45R0 en fonction de la taille (FSC) des cellules après une culture de quatre jours dans les différentes conditions expérimentales.

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

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

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

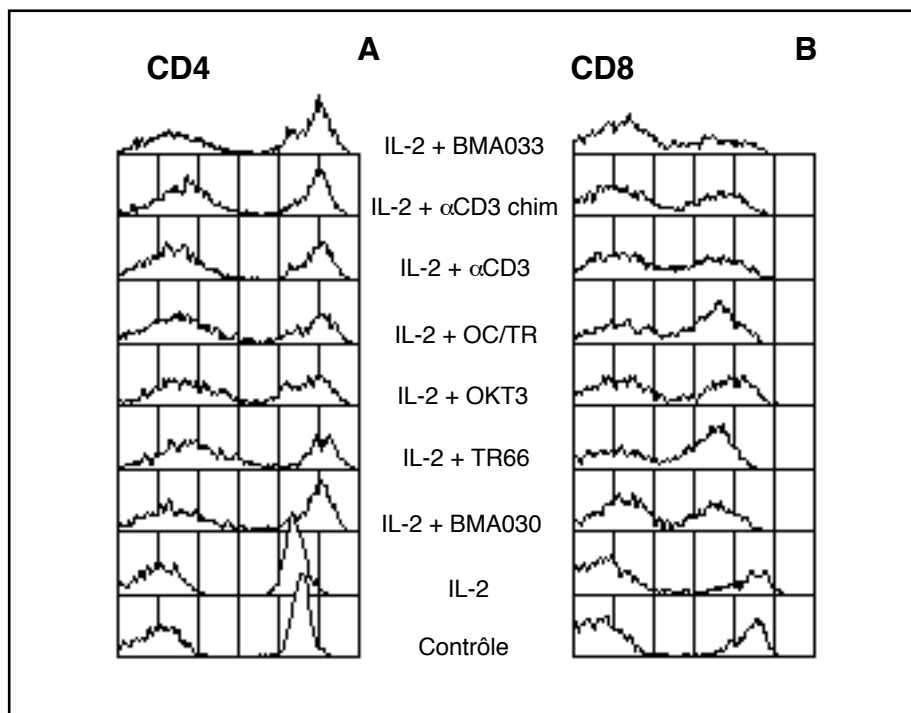


Figure 13-4: Expression des molécules CD4 (A) et CD8 (B) à la surface des lymphocytes après quatre jours de culture.

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

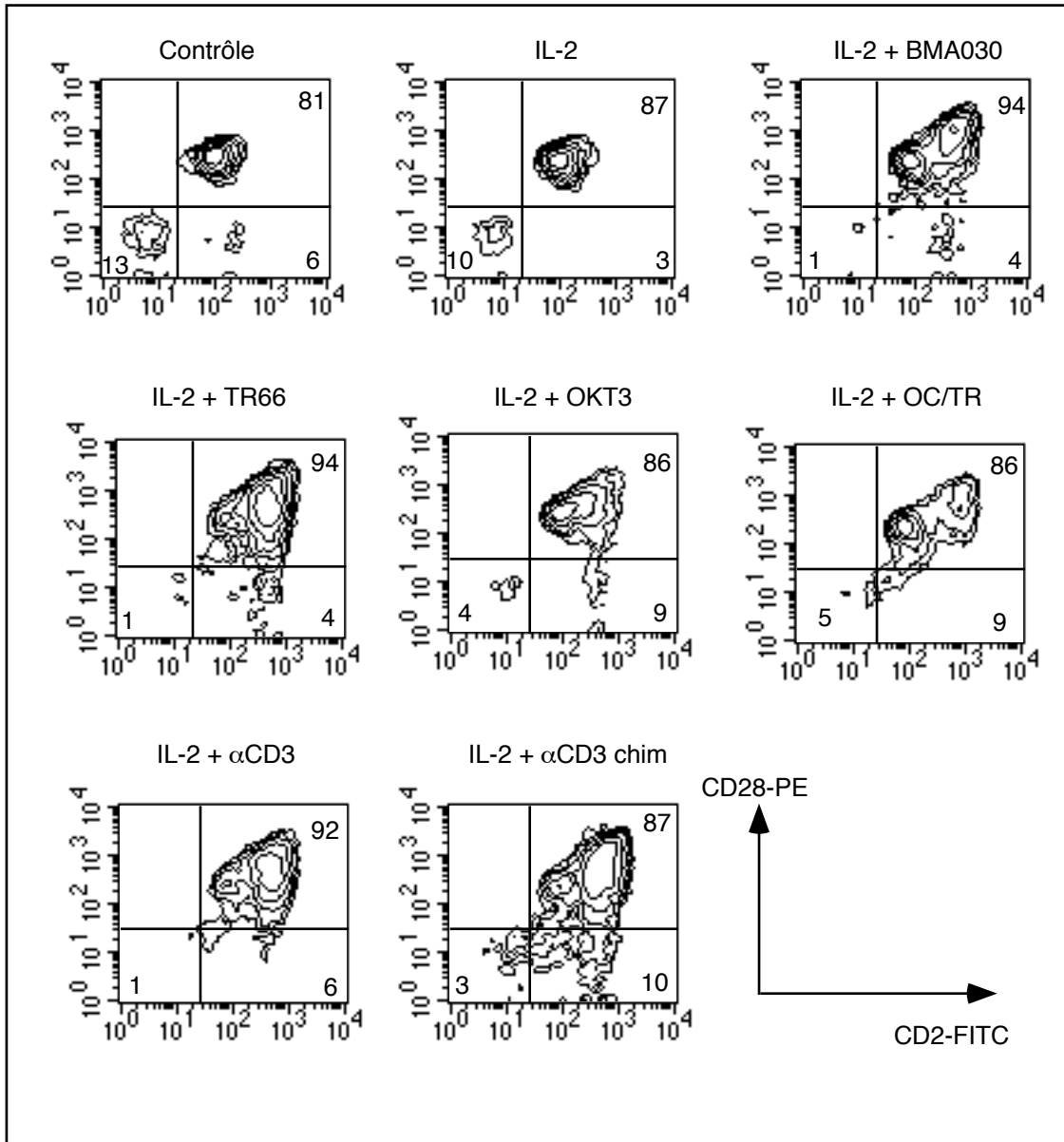


Figure 13-5: Expression des marqueurs de CD28 et CD2 après une culture de quatre jours selon les différentes conditions expérimentales.

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

13.4. Discussion

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

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

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

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

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

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

14.1. Introduction

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

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

14.2. Méthodologie

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

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

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

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

14.3. Résultats

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

L'inhibition de la croissance de la lignée OVCAR-3 vaut environ 25% en présence des PBL seuls (figure 14-1 A) et celle des cellules CK2 est inférieure à 15% dans cette condition (figure 14-1 B). L'apport d'un anticorps anti-CD3 durant le test d'inhibition de croissance des lignées OVCAR-3 et CK2 accroît l'inhibition générée par les PBL. L'inhibition est similaire pour tous les anticorps anti-CD3, mais des différences sont observées en présence de l'anticorps bispécifique OC/TR. En effet, l'inhibition de la lignée portant la molécule MOv18 (OVCAR-3) est plus importante en présence de cet anticorps (figure 14-1 A), tandis que l'inhibition de la lignée négative pour MOv18 (CK2) est plus faible dans cette condition expérimentale (figure 14-1 B). Ces expériences ont été réalisées pour un minimum de trois donneurs différents. Des résultats similaires à ceux observés pour les cellules CK2 ont été obtenus avec la lignée A431 (MOv18⁻). Un test de prolifération cellulaire a été réalisé en présence des différents anticorps anti-CD3 pour vérifier que les donneurs étudiés pouvaient répondre aux anticorps anti-CD3 IgG₁ (résultats non illustrés).

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

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

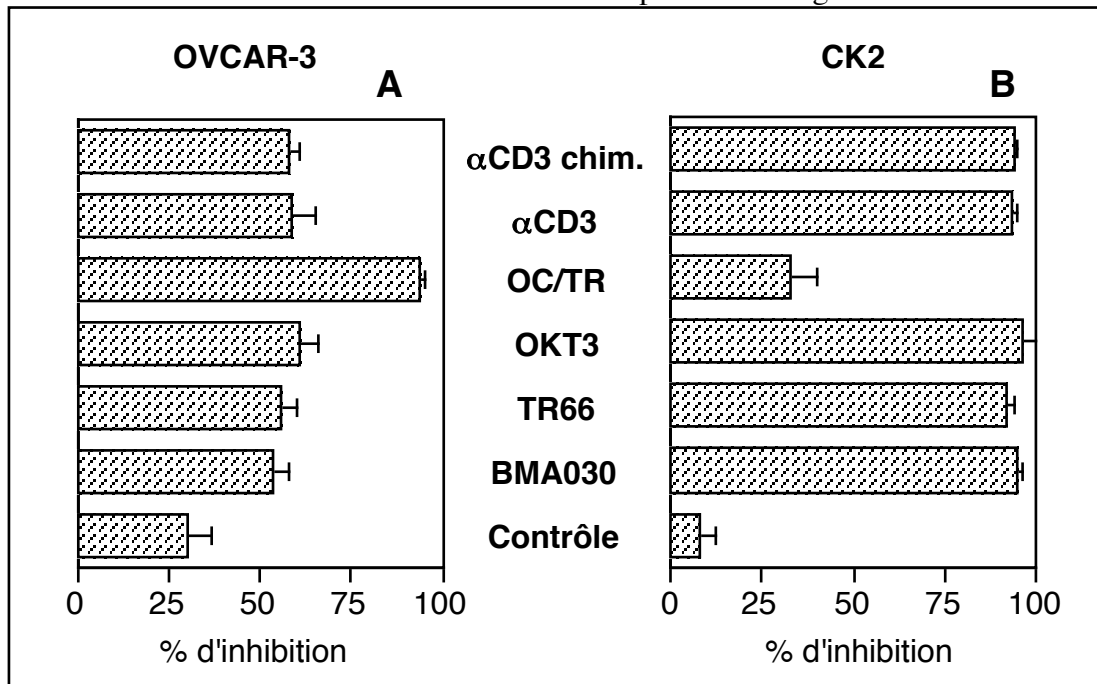


Figure 14-1: Inhibition de la croissance des lignées OVCAR-3 (A) et CK2 (B) par les PBL en présence des différents anticorps anti-CD3.

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

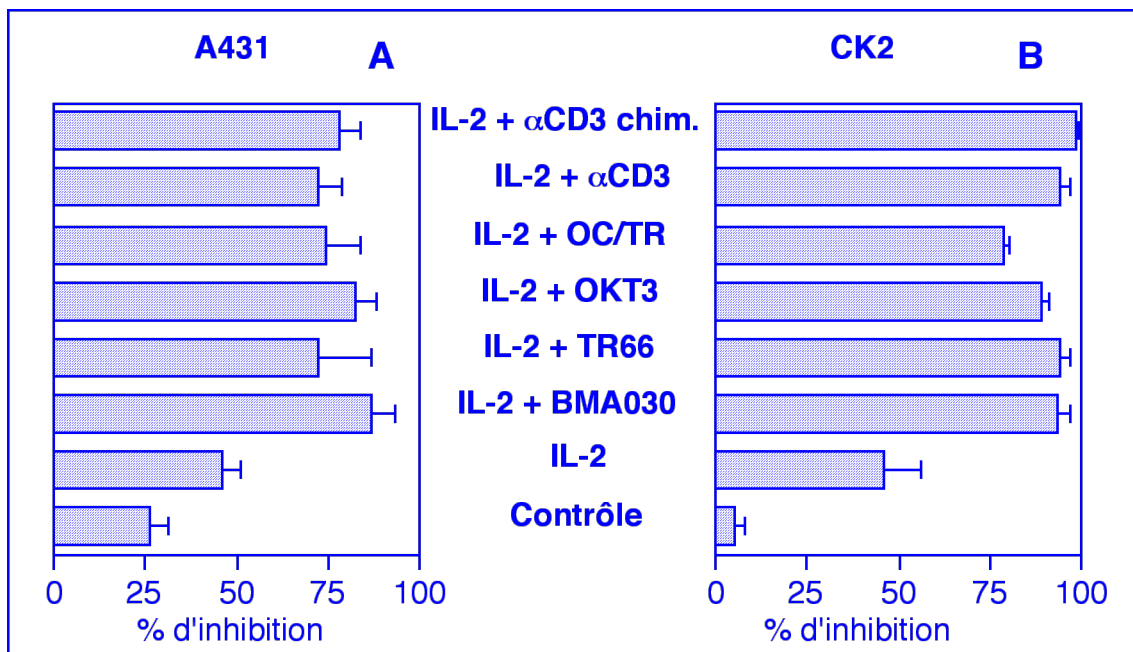


Figure 14-2: Inhibition de la croissance des cellules A431 (A) et CK2 (B) en présence de PBL pré-stimulés pendant quatre jours par les différents anticorps anti-CD3.

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

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

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

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

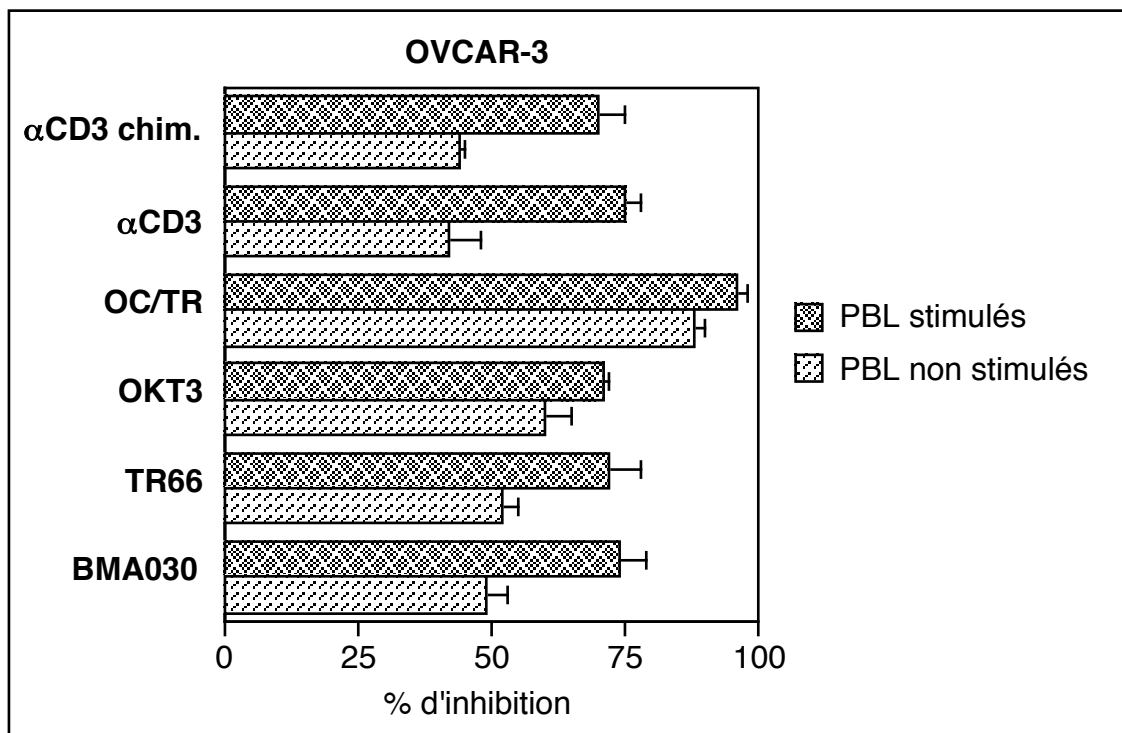


Figure 14-3: Inhibition de la croissance des cellules OVCAR-3 en présence de PBL stimulés ou non provenant du même donneur.

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

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

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

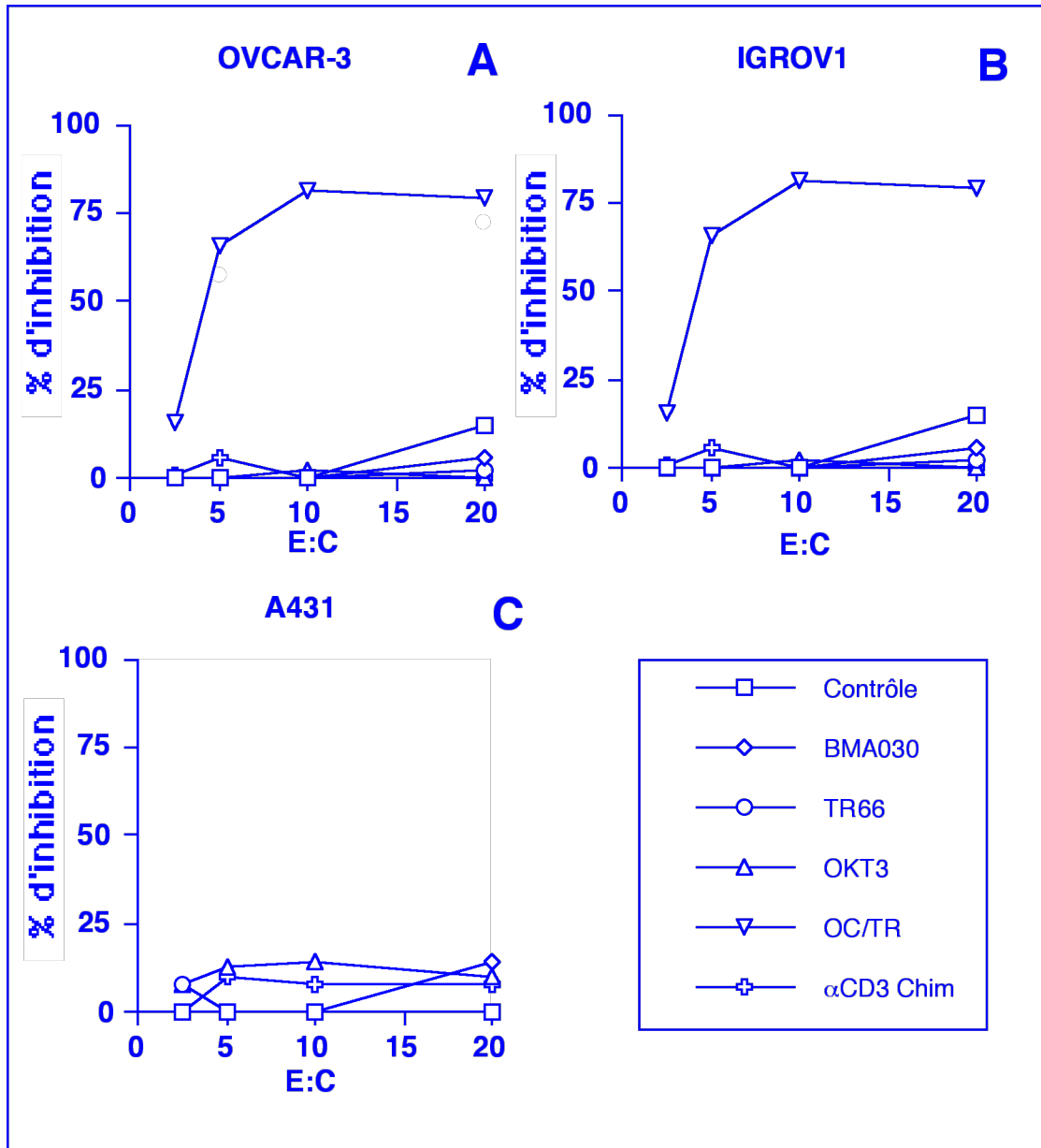


Figure 14-4: Inhibition de la croissance tumorale des cellules OVCAR-3 (A), IGROV1 (B) et A431 (C) en présence du clone de lymphocytes T CD4⁺ (DM13) et des différents anticorps anti-CD3.

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

14.4. Discussion

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

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

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

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

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

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

Discussion de la troisième partie

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

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

mais aussi par la fixation des anticorps anti-CD3 sur leur récepteur Fc, nous avons choisi de stimuler les lymphocytes en présence de monocytes. Comme les anticorps murins IgG₁ ne se lient pas aux monocytes de toute la population humaine, nous avons sélectionné les donneurs possédant des monocytes capables de les fixer. Nous avons précédemment démontré ainsi que d'autres (Tovar *et al.*, 1988) l'intérêt de la présence d'IL-2 lors d'une stimulation par un anticorps anti-CD3. Les cultures des lymphocytes ont donc été réalisées en présence d'IL-2.

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

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

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

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

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

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

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

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

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