

Résumé des résultats personnels et conclusions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

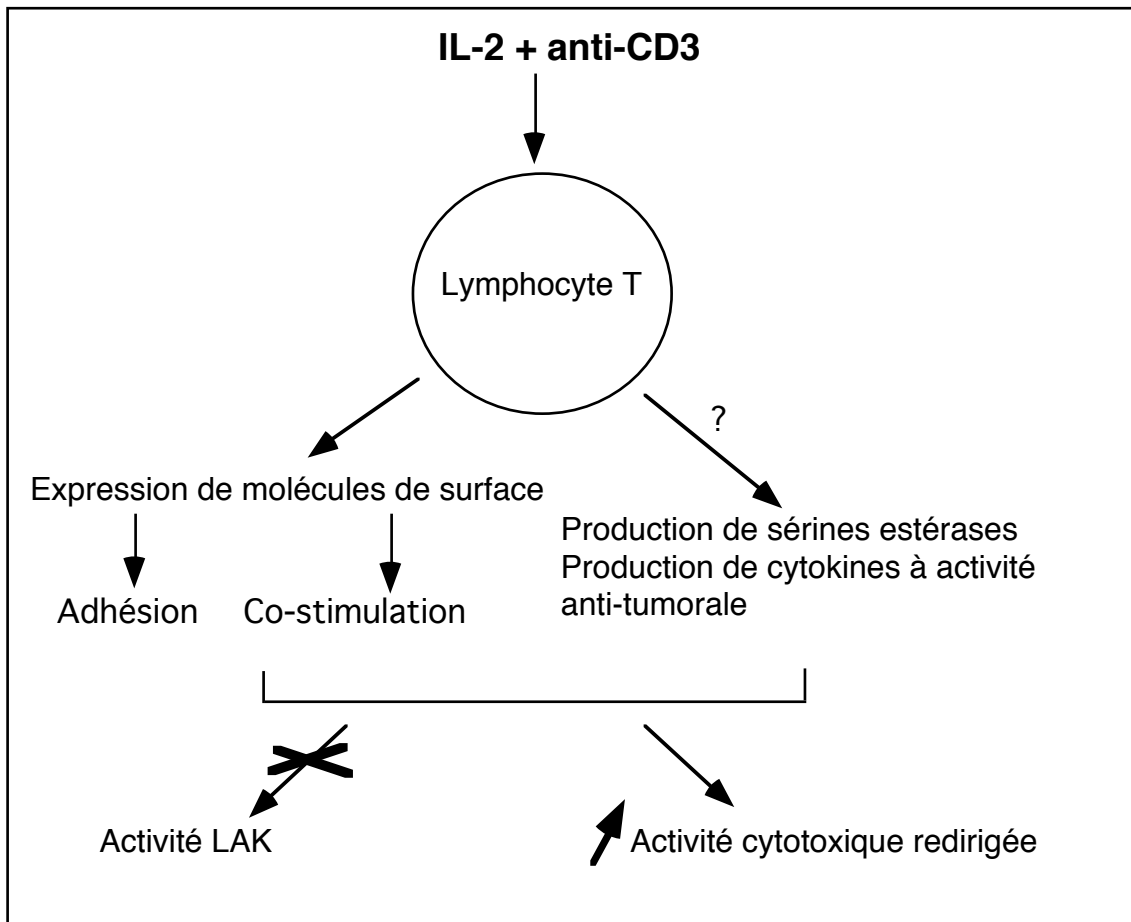


Figure C-1: Illustration de l'activation des lymphocytes T par l'IL-2 et un anticorps anti-CD3.

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

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

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

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

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

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

Le choix de l'anticorps anti-CD3 influence surtout la cinétique de la stimulation des lymphocytes T. De manière intéressante, l'anticorps humanisé α CD3 chimérique génère une activation des lymphocytes T comparable à son homologue murin (α CD3) tout en minimisant les possibilités d'une réaction immunitaire dirigée contre lui. La version bispécifique de cet anticorps (OC/TR, α CD3 X anti-MOV18) induit une réponse plus lente. Cependant, notons que cet anticorps ne provoque pas de modulation du complexe CD3 et persiste à la surface des cellules, contrairement à la plupart des autres anticorps testés. Il reste donc disponible pour son rôle de pont entre le lymphocyte T et la cellule tumorale.

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