

Méthodologie générale .....	1
Cultures .....	1
Milieux de culture .....	1
Milieu de culture RPMI1640. ....	1
Milieu de culture DMEM.....	1
Mitogènes .....	1
Anticorps anti-CD3 .....	1
Interleukine-2 .....	2
Phytohémagglutinine A (PHA) et enterotoxine A de staphylocoque (SEA) .....	2
Cellules .....	2
Thymocytes .....	2
Lymphocytes deu sang périphérique (PBL).....	3
Lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL).....	4
Clones.....	4
Lignées tumorales .....	4
Prolifération cellulaire .....	5
Comptage cellulaire .....	5
Incorporation de thymidine tritiée .....	6
Marquage par l'actinomycine D .....	6
Phénotype de surface. ....	6
Cytométrie en flux .....	6
Marquage sur frottis cellulaires .....	7
Tests de cytotoxicité .....	7
Quantification de la production de sérines estérase (test BLT) .....	7
Test de cytotoxicité par relargage de chrome 51 radioactif .....	8
Inhibition de croissance tumorale (test MTT) .....	8
Tri cellulaire.....	9
Par champ magnétique .....	9
Par cytométrie en flux .....	9
Flux calcique.....	9
Phosphorylation des résidus tyrosine.....	9
Détermination des caractéristiques de liaison des anticorps au complexe CD3.....	9

# Méthodologie générale

## Cultures

### **Milieus de culture**

Deux milieux de culture ont été utilisés. La plupart des expériences ont été réalisées avec le milieu de culture RPMI 1640, le milieu de culture DMEM n'a été employé que lors des cultures supérieures à 6 jours.

#### Milieu de culture RPMI 1640.

Le milieu RPMI 1640 (GIBCO, Gent) contenant 300mg/ml de L-Glutamine est additionné de 1mM de pyruvate de sodium (GIBCO), 1% d'acides aminés non-essentiels (GIBCO), 30U/ml de péniciline (GIBCO) et de 30  $\mu$ g/ml de streptomycine (GIBCO). Suivant les expériences 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) (culture à long terme) ou 5% de sérum humain AB poolé et décomplémenté (SAB) sont ajoutés. Les sérums sont décomplémentés par la chaleur pendant 30 minutes à 56°C.

Ce milieu est appelé milieu RPMI complet.

#### Milieu de culture DMEM.

Le milieu Eagle (modification Dulbecco) DMEM (Flow laboratories) est additionné de 1mM de pyruvate de sodium (GIBCO), 1% d'acides aminés non-essentiels (GIBCO), 300 mg/ml de L-glutamine (GIBCO), 30U/ml de péniciline (GIBCO), de 30  $\mu$ g/ml de streptomycine (GIBCO) et de 10% SVF (GIBCO) décomplémenté par la chaleur .

Ce milieu est appelé milieu DMEM complet.

## **Mitogènes**

### Anticorps anti-CD3

Plusieurs anticorps anti-CD3 ont été utilisés dans les cultures, le tableau reprend leur différentes caractéristiques ainsi que les caractéristiques de deux anticorps bispécifiques .

Anticorps	Caractéristique	Isotype	Origine	Référence
BMA030	anti-CD3	IgG2a	Behring	
TR66	anti-CD3	IgG1	Milan	Van Waave <i>et al.</i> , 1980
OKT3	anti-CD3	IgG2a	Milan	
$\alpha$ CD3	anti-CD3 de l'anticorps bispécifique OC/TR	IgG1	Centocor	
$\alpha$ CD3 chimérique	anti-CD3 de l'anticorps bispécifique OC/TR	Fraction constante d'origine humaine	Centocor	Oi <i>et al.</i> , 1986 <sup>9</sup>
BMA033	anti-CD3	IgG3	Behring	
Leu-4	anti-CD3	IgG1	Becton Dickinson	
UCHT1	anti-CD3	IgG1	Immunotech	
SPVT3 F(ab') <sub>2</sub>	anti-CD3		Zymed	
OC/TR	anticorps bispécifique (CD3/MOv18)	IgG1	Centocor	Mezzanzanica <i>et al.</i> , 1988
TR/OC2	anticorps bispécifique (CD3/MOv18)	IgG1	Centocor	Lanzavecchia <i>et Scheidegger</i> 1987

**Tableau A-1: Liste des anticorps anti-CD3 utilisés pour la culture.**

Les anticorps TR66 et OKT3 ont été purifiés à partir de surnageant d'hydridome dans le laboratoire du Dr Canevari à Milan et les autres anticorps proviennent de firmes commerciales.

Les anticorps anti-CD3 ont été utilisés sous forme soluble à une concentration de 10ng/ml. Pour les besoins de certaines expériences, l'anticorps anti-CD3 a été immonbilisé sur le fond des boîtes de culture par une incubation à une concentration de 5 $\mu$ g/ml pendant une heure à 37°C. Une concentrations supérieure a été utilisée lorsque l'expérience le nécessitait, la concentration utilisée est alors reprise dans le texte.

### Interleukine-2

L'interleukine-2 (IL-2) employée est de IL-2 humaine recombinante gracieusement fournie par la firme Biogen. La solution stock est préparée avec une solution d'acide acétique de 50 mM, filtré sur des filtres de 0,2  $\mu$ m (Millipore) et conservée à -70°C. Elle est utilisée dans les cultures cellulaires à une concentration de 50 U/ml.

### Phytohémagglutinine et enterotoxine A de staphylocoque.

La phytohémagglutinine-M (PHA) provient de la firme Difco (MI, USA). La solution stock contenant diluée est conservée à -20°C. La PHA est utilisée dans les cultures cellulaires à une concentration de 0,1% (volume/volume).

L'enterotoxine A de staphylocoque (SEA) (Sigma, Allemagne) est utilisée dans les cultures à une concentration de 10 ng/ml. Elle est stockée à 4°C à une concentration de 100  $\mu$ g/ml dans une solution saline (composition, PBS).

## **Cellules**

### Thymocytes

Les thymocytes sont obtenus à partir de fragment de thymus normal prélevé stérilement chez deux enfants âgés respectivement de 8 mois et 3 ans, ayant subi une intervention chirurgicale.

Le fragment de thymus est placé dans une boîte de pétri contenant du milieu de culture RPMI 1640 complet. Il est découpé en petits morceaux à l'aide de scalpels. Ceux-ci sont alors transférés dans un tube de 50 ml (NUNC) contenant 5 ml de milieu de culture RPMI 1640 complet et découpés finement au moyen de ciseaux à bouts courbes. La suspension cellulaire est réalisée le même jour que le prélèvement. La deuxième culture de thymocytes a été réalisée après passage de la suspension cellulaire au travers d'un filtre Blutex de nylon (N°37 - ouverture 70 $\mu$ m - trypette et Renaud) de manière à éliminer les fragments tissulaires et les agrégats cellulaires. La concentration cellulaire initiale de cette culture est de 1.10<sup>6</sup> cellules/ml.

Les thymocytes sont placés dans des bouteilles Nunc (25 cm<sup>2</sup>) contenant 10 ml de milieu DMEM complet selon les conditions expérimentales suivantes:

- milieu DMEM complet (condition contrôle)
- milieu DMEM complet + IL-2 (50 U/ml)

- milieu DMEM complet + BMA030 (100 ng/ml)
- milieu DMEM complet + IL-2 (50 U/ml) + BMA030 (10 ng/ml).

Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture ainsi que l'IL-2 est renouvelé deux fois par semaine. Lorsque l'augmentation du nombre de cellules est importante, le nombre de cellules est adapté à 5.10<sup>5</sup> cellules/ml.

#### Lymphocytes du sang périphérique (PBL).

Les lymphocytes du sang sont isolés à partir de buffy coat provenant du centre de transfusion de Liège à partir de sang de donneurs sains.

Le sang est dilué de moitié dans du milieu de culture RPMI 1640. Trente ml de sang dilué sont déposés délicatement sur 15 ml de Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norvège) dans des tubes Falcon de 50ml. Les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 400g. L'anneau de lymphocytes, se trouvant à l'interface entre le lymphoprep et le plasma, est collecté à l'aide d'une pipette pasteur. Les lymphocytes sont lavés trois fois dans du milieu de culture RPMI 1640.

Pour les cultures à court terme (3 à 6 jours), les lymphocytes sont cultivés dans du RPMI 1640 complet (contenant 5% de sérum humain AB) à une concentration de 1,25.10<sup>6</sup> cellules/ml. Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les conditions de culture sont les suivantes:

- milieu RPMI complet (condition contrôle)
- milieu RPMI complet + IL-2 (50 U/ml)
- milieu RPMI complet + BMA030 (10 ng/ml)
- milieu RPMI complet + IL-2 (50 U/ml) + BMA030 (10 ng/ml).

Dans certaines expériences, les conditions de culture ont été modifiées, les changements sont rapportés dans la méthodologie du chapitre contenant ces expériences.

Trois cultures à long terme (plus de 6 jours de culture) ont été réalisées. Les lymphocytes sont cultivés à une concentration initiale de 5.10<sup>5</sup> cellules dans du milieu DMEM complet suivant les mêmes conditions expérimentales que les thymocytes. Le milieu de culture ainsi que l'IL-2 est renouvelé deux fois par semaine. Lorsque la prolifération cellulaire est importante, le nombre de cellules est adapté à 2.10<sup>5</sup> cellules/ml.

#### Lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL).

Les TIL proviennent d'une pièce de colectomie est prélevée chez un patient atteint d'un adénoarcinome du côlon.

Le jour du prélèvement, le fragment tumoral est immergé stérilement dans du milieu de culture DMEM complet. la tumeur est finement découpée au moyen de scalpel en petits explants cultivés dans des puits de 2 ml d'une plaque à 24 puits à fond plat. Cinq à six explants sont distribués dans chaque puit contenant 2 ml de milieu DMEM complet. Les conditions expérimentales sont identiques aux thymocytes et aux PBL cultivés à long terme. Lorsque la prolifération cellulaire est suffisante, les lymphocytes sont transférés dans des bouteilles Numc (25 cm<sup>2</sup>) à une concentration de  $2 \cdot 10^5$  à  $2,5 \cdot 10^5$  cellules/ml. Le milieu de culture ainsi que l'IL-2 est renouvelé deux fois par semaine. Lorsque l'augmentation du nombre de cellules est importante, le nombre de cellules est de nouveau adapté à  $2 \cdot 10^5$  cellules/ml.

#### Clones de lymphocytes T.

#### Lignées tumorales

Les différentes lignées tumorales cultivées en suspension et d'origine hématopoiétique sont reprises dans le tableau A-2. Ces lignées sont cultivés dans du milieu RPMI complet additionné de 10% de SVF. Les cellules sont diluées dix fois dans du nouveau deux fois par semaine.

Les lignées tumorales adhérentes sont reprises dans le tableau A-3. Les lignées A431, OVCAR-3 et IGROV1 sont cultivés dans du milieu RPMI complet additionné de 10% de SVF. Les lignées OVCAR-3 et IGROV1 expriment à leur surface la molécule MOv18 qui est reconnue par l'anticorps bispécifique OC/TR (Miotti et al 1987; Miotti et al 1992; Pupa et al 1988<sup>10</sup>).

Lignées	Origine	Provenance	Références
K562	Leucémie myéloïde		Lozio et Lozio (1975)
HL60	Leucémie pro-myéloïde		Collins et al, (1977)
U937	Lymphome Histiocytic		Sundström et al, (1976)
Daudi	Lymphome de Burkitt		Klein et al, (1968)
Cess	Cellules B Blastoïde transformées par le virus Epstein Bar		Muraguchi et al, (1981)
Ly Nalm-6	Leucémie pré-B		Hurwitz et al, (1979)
Molt-3	Leucémie T		Minowada et al, (1972)
Molt-4	Leucémie T		Minowada et al, (1972)
Jurkat	Leucémie T		Weiss et al, (1984)

Tableau A- 2: Liste des lignées tumorales utilisées.

Lignées	Origine	Provenance	Références
A431	Carcinome épidermoïde de la vulve	Dr Canevari	Giard et al 1973
OVCAR-3	Carcinome ovarien	Dr Canevari	Hamilton et al 1984
IGROV1	Carcinome ovarien	Dr Canevari	
SiHa	Kératinocytes provenant d'un carcinome du col de l'utérus.		Friedl et al 1970 <sup>11</sup>
Caski	Kératinocytes provenant d'un carcinome du col de l'utérus.		Pater et al 1985 <sup>12</sup>
CK2	Kératinocytes du col de l'utérus transformés par HPV	Dr Gilles ULG	Gilles et al 1993

Tableau A-3: Liste des lignées tumorales adhérentes utilisées.

### Viabilité des cellules



Pour estimer la mortalité cellulaire, nous avons utilisé deux techniques de coloration.

Le bleu Trypan est un colorant qui pénètre passivement dans les cellules mortes qui deviennent bleues.

L'iodure de propidium est un colorant de l'ADN qui pénètre également dans les cellules mortes. En présence de ce colorant l'ADN des cellules mortes acquiert une fluorescence rouge qui peut être détecté par cytométrie en flux.

## **Prolifération cellulaire**

### **Comptage cellulaire**

Les cellules sont comptées sur une plaque de Thoma et les cellules mortes sont exclues du comptage par une coloration au bleu Trypan. Les comptages sont effectués deux fois par semaine au moment du renouvellement du milieu. Pour calculer l'amplification, le nombre de cellules obtenues est divisé par le nombre de cellules du comptage précédent et les différentes amplifications ainsi calculées sont multipliées pour obtenir l'amplification maximale de la culture.

### **Incorporation de thymidine tritiée**

Le niveau de prolifération des cellules lymphoïdes peut être estimé par la mesure de l'incorporation d'un précurseur radiomarqué de l'ADN, la thymidine tritiée (3-H-Tdr). La thymidine tritiée est incorporée au brin d'ADN nouvellement synthétisé.

Au moment de la mise en culture, après 3 et 6 jours de culture,  $2 \cdot 10^5$  cellules sont incubées en présence de thymidine tritiée ( $0,4 \mu\text{Ci}$ , Amersham) dans une microplaque de 96 puits à fond rond. La microplaque est placée dans une étuve ( $37^\circ\text{C}$ , atmosphère humide, 5%  $\text{CO}_2$ ) pendant 4 heures. L'ADN des cellules est récupéré sur des filtres en fibre de verre à l'aide d'un collecteur semi-automatique (Combi cell Harvester Skatron). Les filtres sont séchés et ensuite déposés dans des fioles contenant 2 ml de liquide scintillant (Betafluor). La radioactivité de la thymidine incorporée est mesurée dans un compteur  $\beta$  à scintillation liquide (Liquid scintillation analyser-1500 Packard). Les résultats sont exprimés en coups par minute (CPM).

### **Marquage par l'actinomycine D**

Un antibiotique, la 7-amino-actinomycine D (7-AAD), permet de quantifier l'ADN grâce à son émission de fluorescence rouge après excitation par un laser à

l'argon (Zelenin et al 1984<sup>13</sup>). Pour discriminer les lymphocytes T des cellules NK, les cellules sont incubées en présence d'un anticorps anti-CD3 couplé à la fluorescéine (FITC) et d'un anticorps anti-CD16 couplé à la phycoérythrine (PE). Après fixation à l'éthanol, l'ADN est marqué par la 7-AAD ce qui permet la distinction des cellules en phases G0/G1 des cellules en phases S/G2/M. L'analyse des marquages est réalisée par cytométrie en flux.

Un programme informatique (CUBIC, Greimers et al 199<sup>14</sup>) permet de présenter les résultats dans un cube dont chaque axe représente une fluorescence déterminée.

## **Phénotype de surface.**

### **Cytométrie en flux**

La caractérisation des différentes populations présentes dans les cultures a été réalisée grâce à des marquages multiples (double ou triple). Nous avons utilisé trois fluorochromes indifféremment conjugués aux anticorps monoclonaux: la fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et un complexe "peridinine-chlorophylle- $\alpha$ -protéine" (PerCP) (qui émettent respectivement une fluorescence verte, orange et rouge. La technique consiste à incuber les cellules à 4°C pendant une demie heure en présence des différentes anticorps. Après lavage, les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

La présence des différents récepteurs Fc $\gamma$  sur les lignées tumorales a été déterminée par cytométrie en flux. Quatre anticorps ont été utilisés: l'anticorps anti-CD32 (IV.3, Fc $\gamma$ R II), l'anticorps anti-CD64 (32.2, Fc $\gamma$ R I) et deux anticorps anti-CD16 (Leu-11c et CD16 Ortho, Fc $\gamma$ R III).

Deux techniques ont été utilisées. La première consiste à incuber les cellules avec un anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de souris et couplé au FITC. Les cellules positives sont détectées par cytométrie de flux. Pour estimer la sensibilité de la technique, des marquages ont été réalisés en présence de différentes concentrations connues de BMA030 ajouté sur des cellules fraîchement prélevées.

### **Marquage sur frottis cellulaires**

La deuxième technique est effectuée sur des frottis de cellules réalisés par cyto-centrifugation. Les lames sont incubées en présence d'un anticorps de lapin dirigé contre les immunoglobulines de souris et couplé à la biotine. Cet anticorps est révélé

par un complexe amplificateur (AB complexe) couplé à la peroxydase et détecté par de la DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride).

## **Tests de cytotoxicité**

### **Quantification de la production de sérines estérase (test BLT)**

L'activité des sérines estérases peut être mesurée en utilisant l'ester de benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl (BLT) comme substrat et l'acide benzoïque comme chromogène (Pasternack and Eisen 1985). Ce test colorimétrique a été réalisé sur des lysats de cellules cultivés pendant 4 jours dans les différentes conditions expérimentales.

Les cellules sont lysées lysat des cellules est placé dans des puits de microplaque et mis en présence du substrat BLT et d'acide benzoïque pendant 30 minutes à 37°C. Le clivage de ce substrat par les sérines estérases induit un changement de coloration qui est mesuré à 405 nm par un lecteur de microplaque. Le bruit de fond est quantifié par la mesure de la densité optique (OD) de puits ne contenant que le tampon et le substrat. Les valeurs obtenues sont soustraites des valeurs expérimentales. L'expérience est réalisée en triplicata.

### **Test de cytotoxicité par relargage de chrome 51 radioactif**

Ce test, décrit par Brunner et ses collaborateurs (1968) mesure la capacité des cellules effectrices à lyser des cellules tumorales préalablement marquées par du chrome radioactif.

Pendant 1 heure, un à trois million de cellules cibles sont incubées en présence de 100  $\mu\text{Ci}$  de chrome 51 radioactif ( $^{51}\text{Cr}^*$ ), dans 125  $\mu\text{l}$  de milieu RPMI 1640 additionné de 30% de SVF. L'incubation est réalisée dans une étuve (atmosphère humide, 5% de  $\text{CO}_2$ ) à 37°C. Les cellules sont agitées toutes les 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du milieu RPMI complet (10% SVF) afin d'éliminer l'excès d'isotope radioactif non incorporé.

Les cellules effectrices sont réparties dans une microplaque à différentes concentrations et 5000 cellules cibles marquées au  $^{51}\text{Cr}^*$  sont ajoutées dans chaque puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le surnageant est récolté et la présence de  $^{51}\text{Cr}^*$  relargué par les cellules mortes est mesurée par un compteur  $\gamma$ .

Le pourcentage de lyse est déterminé par la formule suivante:

$$\% \text{ de lyse} = \frac{\text{CPM}_{\text{exp}} - \text{CPM}_{\text{spont}}}{\text{CPM}_{\text{max}} - \text{CPM}_{\text{spont}}} \times 100$$

où  $\text{CPM}_{\text{exp}}$  représente la radioactivité moyenne du surnageant des puits expérimentaux,  $\text{CPM}_{\text{spont}}$  est la radioactivité de puits où seules des cellules tumorales marquées sont présentes et  $\text{CPM}_{\text{max}}$  est la radioactivité des puits dans lesquels les cellules cibles marquées sont lysées par un détergent. L'expérience est réalisée en triplicata.

### **Inhibition de croissance tumorale (test MTT ou WTS1)**

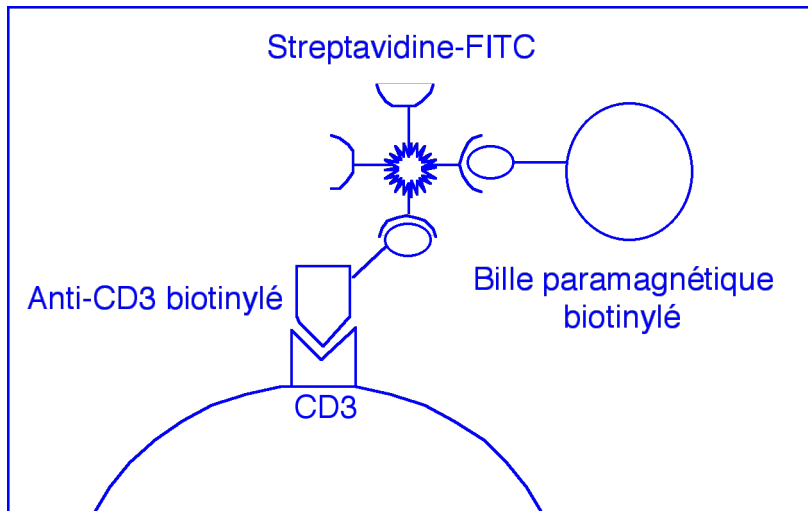
Le clivage par une enzyme mitochondriale, la succinate-déshydrogénase, du sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en un produit de couleur bleue-noire (formazan) est un outil intéressant pour mesurer la survie cellulaire. Ce clivage n'a lieu que dans les cellules vivantes et la quantité de formazan produit est proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Mosmann 1983, Heo et al 1990)

Après 4 jours de stimulation en présence d'IL-2 et d'IL-2 + BMA030, les cellules effectrices, à différentes concentrations, sont mises en présence des cellules tumorales adhérentes (dont les caractéristiques sont reprises dans l'annexe méthodologique (page A ), pendant 7 jours. Après le retrait des cellules effectrices, la densité optique est mesurée après clivage du MTT par les cellules vivantes. L'inhibition de la croissance tumorale est calculée en rapportant ces valeurs aux valeurs obtenues dans les cultures de cellules tumorales seules par la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de croissance} = 100 - \frac{\text{OD échantillon} - \text{OD milieu}}{\text{OD cellules tumorales seules} - \text{OD milieu}}$$

### **Tri cellulaire**

#### **Par champ magnétique**



Pour certaines expériences, les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont été sélectionnées. Dans ce cas, le marquage est réalisé soit avec un anticorps anti-CD4 biotinylé (IgG1) soit avec un anticorps anti-CD8 biotinylé (IgG1). La suite du marquage est identique au marquage décrit dans le chapitre 5. Pour obtenir les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, nous avons combiné un tri par le MACS et un tri par le FACS. Dans ce but, les cellules sont marquées simultanément avec un anticorps anti-CD3 biotine et un anticorps anti-CD8-PE, ensuite les cellules sont incubées en présence de streptavidine-FITC et des billes paramagnétiques dans les conditions de marquage pour le tri par le MACS. Les cellules sont d'abord triées par le système MACS en cellules CD3<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> et ensuite les cellules CD3<sup>+</sup> sont purifiées au FACS, grâce à la fluorescence de l'anticorps CD8-PE (IgG1), en cellules CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.

Le tri par le système MACS a été réalisé avec différents anticorps anti-CD3 couplé à la biotine: SPVT3 (IgG1), UCHT1 (IgG1) et SPVT3 F(ab)'2. Les autres paramètres du tri sont restés inchangés (voir page A ).

#### **Par cytométrie en flux**

Pour s'assurer que l'activité cytotoxique ne dépendait pas du marquage des cellules CD3<sup>+</sup>, les cellules ont été marquées par des marqueurs NK (anti-CD56-PE et anti-CD16-PE). Les cellules ont été séparées en cellules NK<sup>+</sup> et NK<sup>-</sup> par cytométrie en flux.

#### **Flux calcique**

#### **Phosphorylation des résidus tyrosine**

---

### Détermination des caractéristiques de liaison des anticorps au complexe CD3.

Pour une raison pratique, ces caractéristiques n'ont été étudiées que pour quatre anticorps anti-CD3 (BMA030, TR66, OKT3 et OC/TR). Suivant leur sensibilité aux procédures de marquage, Les anticorps BMA030, TR66 et OC/TR ont été couplés à  $^{125}\text{I}$  (Amersham) par une iodination catalysée par la lactoperoxidase (Marchalonis, 1969?) avec une moyenne d'activité spécifique de  $8,4 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  et l'anticorps OKT3 a été couplé par la méthode de Bolton-Hunter (ref?) avec une activité spécifique finale de  $4,4 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Afin de déterminer leur constante d'affinité et le nombre de sites reconnus par les anticorps une analyse Scatchard a été réalisée (ref?). Les PBL activés ( $2 \times 10^5$  cellules par puits dans  $50 \mu\text{l}$  de RPMI 1640 additionné 1% SVF) sont incubés en présence de dilutions sériées d'anticorps couplés à  $^{125}\text{I}$  pendant 3 heures à  $0^\circ\text{C}$ . Après 3 lavages avec un tampon froid (PBS + BSA 0,03%), la radioactivité des cellules marquées est mesurée directement dans un compteur  $\gamma$ . Le bruit de fond est déterminé en présence d'anticorps froids 100 fois en excès.

Les tests de compétition pour la liaison au complexe CD3 ont été réalisés en incubant  $2 \cdot 10^5$  de PBL activés par puits dans  $50 \mu\text{l}$  de RPMI 1640 additionné 1% SVF avec une quantité d'anticorps radioactifs fixe ( $5 \cdot 10^6$  cpm/puits) et différentes concentrations des autres compétiteurs non-radioactifs. Après une incubation de 3 heures à  $0^\circ\text{C}$ , les cellules sont lavées 3 fois et la radioactivité est mesurée dans un compteur  $\gamma$ . La dose nécessaire de compétiteur requise pour inhiber 50% de la liaison de l'anticorps anti-CD3 radioactif (IC50) est extrapolée d'une courbe dose réponse. Les résultats sont ensuite transformés en données relative où l'IC50 obtenu en incubant un anticorps radioactif avec le même anticorps non-radiactif est égal à 1.

Les cellules utilisées pour ces différentes expériences sont des lymphocytes T stimulés par de la PHA et de l'IL-2.

---

<sup>9</sup> voir article Milan

<sup>10</sup> transférer dans ref vérifier Pupa

<sup>11</sup> VOIR PHILIPPE

<sup>12</sup> VOIR PHILIPPE

<sup>13</sup> Cytometry 5, 348-354

<sup>14</sup> article roland