

EVOLUTION VERS LA 3^{ÈME} DIMENSION POUR UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE DANS LES TUMEURS

Laïla LETAÏEF¹, Safa AZAR², Isabelle BRUNET², Hélène KAPLON³,
Jean-Luc TEILLAUD¹ et Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN^{1*}

1. Sorbonne Université UMRS1135, INSERM U1135, Laboratoire "Microenvironnement Immunitaire et Immunothérapie", Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Faculté de Médecine Sorbonne Université, 91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France
2. Centre interdisciplinaire de recherche biologique, Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France
3. Sorbonne Université UMRS 1138, INSERM U1138, Université Paris Descartes, Laboratoire «Cancer et Immunité anti-tumorale», Centre de Recherche des Cordeliers; 15 rue de l'école de Médecine, 75006 Paris, France.

**Correspondance :*

Dr. Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN, Ph.D.
Laboratoire "Microenvironnement Immunitaire et Immunothérapie",
Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris),
Sorbonne Université UMRS 1135, INSERM U1135,
Faculté de Médecine Sorbonne Université
91 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France
Téléphone : +33-1-40-77-81-01,
E-mail: marie-caroline.dieu-nosjean@inserm.fr

doi.org/10.25830/afh.rfh.2020.32.175.185

EVOLUTION TOWARDS THE 3RD DIMENSION FOR A BETTER UNDERSTANDING OF THE IMMUNE MICROENVIRONMENT IN TUMORS

ABSTRACT

The analysis of the tissue microenvironment provides an almost endless amount of information for researchers and clinicians. The very recent advances in immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) techniques have made it possible to better understand the complexity of the tissue microenvironment, particularly in cancers. Through several instances developed in lung cancer, the limits of IHC/IF have been pushed back, allowing to answer questions such as: is the level of *in situ* organization of the immune infiltrate related to patient survival? Have all the cellular dialogues been described at the tumor site? Is it possible to characterize the interactions between different major systems such as the nervous, vascular and immune systems in a tumor? IHC and IF have found their place by providing answers of primary importance in understanding the tumor microenvironment and its inter-patient heterogeneity. The histo-technology is in deep transformation since counterstaining was first developed, with now multiplex stainings in 2 dimensions on tissue section and more recently the 3rd dimension on whole samples. Other technological advances are already underway with the combination of the IHC/IF with other existing techniques, providing even more research data at the individual level, be it single patient or single cell for instance.

KEY WORDS

Tumor immunology, multiplex staining, 3D-imaging, tertiary lymphoid structure, innervation, vascularization

RESUME

L'analyse du microenvironnement d'un tissu fournit une manne d'informations quasiment illimitées pour les chercheurs et les cliniciens. Les avancées très récentes des techniques d'immunohistochimie (IHC) et d'immunofluorescence (IF) ont permis de mieux appréhender la complexité du microenvironnement tissulaire notamment dans les cancers. Au travers de plusieurs exemples développés dans les cancers du poumon, les limites de l'IHC/IF ont été repoussées pour mieux répondre à des questions comme : est-ce que le niveau d'organisation *in situ* de l'infiltrat immunitaire est relié à la survie des patients? Est-ce que tous les dialogues cellulaires ont été décrits au site tumoral? Quid des interactions entre différents grands systèmes tels que les systèmes nerveux, vasculaire et immunitaire dans une tumeur? C'est ainsi que l'IHC et l'IF ont trouvé toute leur place en apportant des éléments de réponses majeures dans la compréhension du microenvironnement tumoral et de son hétérogénéité inter-patient. L'histo-technologie est en pleine révolution depuis les colorations, les simples marquages aux multiplexages en 2 dimensions sur coupes puis vers la 3^{ème} dimension sur échantillons entiers. D'autres avancées technologiques sont déjà en marche avec la combinaison de l'IHC/IF à d'autres techniques existantes pour toujours plus de recherche d'informations à l'échelle individuelle.

MOTS CLES

Immunologie des tumeurs, marquage multiplexe, imagerie 3D, structure lymphoïde tertiaire, innervation, vascularisation

INTRODUCTION

Le microenvironnement des tumeurs est un milieu extrêmement complexe de par son hétérogénéité inter-individu et au sein d'une même tumeur et du fait de son perpétuel remodelage au cours du temps, sans compter l'impact des traitements sur son évolution. L'analyse du microenvironnement tumoral représente ainsi une source d'informations majeures pour mieux comprendre la nature des interactions et les communications entre les cellules qui le composent, qu'elles soient d'origine tumorale, immunitaire, stromale, vasculaire ou encore nerveuse. Dans une tumeur détectable macroscopiquement, la combinatoire d'interactions entre deux cellules quasi « statiques » est considérable, à laquelle s'ajoutent les contacts *de facto* « transitoires » avec des cellules en migration dans le tissu.

Un éventail très large de techniques comme la génomique, la transcriptomique, la cytométrie de flux multi-paramétrique et la protéomique, permet d'étudier la biologie des cellules du microenvironnement tumoral avec des résolutions allant aujourd'hui jusqu'à l'échelle unicellulaire. Ces techniques sont également complémentaires avec l'histologie, l'immunohistochimie (IHC) et l'immunofluorescence (IF), seules ces dernières permettant de rendre remarquablement compte de la localisation et donc des interactions existant entre les cellules du microenvironnement tumoral.

Au travers de différents exemples concrets, nous aborderons comment l'IHC et l'IF ont été d'un apport considérable pour mettre en évidence des communications intercellulaires jamais décrites auparavant.

RESULTATS/DISCUSSION

1. De la puissance des métadonnées à la simplicité de l'observation sur des coupes de tissus

Les bases de données représentent un outil exceptionnel pour obtenir la puissance statistique nécessaire à l'analyse simultanée de plusieurs paramètres. C'est ainsi que Gentles et ses collaborateurs ont analysé la valeur pronostique de 22 populations immunitaires infiltrant des tumeurs (de 25 types de cancers solides) sur environ

5 800 patients [1]. Cette méta-analyse a clairement mis en lumière que certaines populations immunitaires étaient très souvent associées au pronostic vital (soit bon, soit mauvais) des patients. Parmi les populations immunitaires intra-tumorales au pronostic favorable, se trouvent les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes B naïfs, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et les lymphocytes T CD4⁺ folliculaires-helper (Tfh). Il était ainsi surprenant d'observer ces populations au site de la tumeur étant donné qu'elles sont classiquement détectées dans les organes lymphoïdes secondaires. L'IHC nous a permis de détecter la présence de ces populations immunitaires dans les cancers du poumon non-à-petites cellules (NSCLC). Plus important encore, nous avons observé que chez certains patients, ces cellules immunitaires s'organisaient en structures lymphoïdes ectopiques encore appelées structures lymphoïdes tertiaires (TLS) par analogie structurale avec les organes lymphoïdes secondaires [2,3]. Avec la mise au point de doubles marquages immunohistochimiques sur des coupes sériées de tumeurs pulmonaires fixées et incluses en paraffine (FFPE), nous avons mis en évidence que les lymphocytes ségréuaient distinctement en deux zones au sein d'un TLS, une zone T riche en lymphocytes T CD3⁺ et en DC matures DC-Lamp⁺, adjacente à une zone B riche en lymphocytes B CD20⁺, en cellules Tfh CD4⁺PD-1⁺⁺ et en cellules folliculaires dendritiques CD21⁺ [4]. Grâce à cette analyse fine des TLS par IHC, nous avons pu démontrer que la seule différence entre les TLS et les ganglions en termes de composition cellulaire était l'absence de cellules NK au sein des TLS [5].

2. De l'observation à la valeur pronostique des TLS associées aux tumeurs

Sachant que les ganglions assurent une fonction essentielle dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives, la très forte similitude (composition et organisation cellulaire) des TLS avec les ganglions lymphatiques amenait la question de la fonction immunitaire des TLS dans un contexte tumoral. L'analyse d'un seul paramètre tel que l'expression de CD3, de CD20 ou encore de DC-Lamp par IHC ne permettait pas de quantifier respectivement les lymphocytes T, B ou les DC matures sélectivement présentes dans les TLS. Le développement de multi-marquages sur coupes FFPE de tumeurs, combiné à la quantification assistée par un logiciel d'analyse d'images, nous a permis de compter ces trois contingents immunitaires au sein des TLS et d'en déterminer une densité cellulaire (nombre de cellules rapporté par surface tumorale totale en lecture pleine lame) sur de grandes

cohortes de patients NSCLC. Il est incontestable que le développement de logiciels d'analyse d'images a représenté une avancée majeure en termes de reproductibilité des quantifications cellulaires faites ; cependant, il faut souligner que, même si c'est la machine qui travaille, cette étape est très critique et chronophage pour l'opérateur avec les phases « d'éducation » du logiciel puis du contrôle qualité post-analyse. L'ensemble de ces étapes est aujourd'hui automatisable sous l'œil avisé d'un anatomo-pathologiste, et la fiabilité des résultats en est encore meilleure. L'utilisation d'un ou plusieurs de ces marqueurs TLS (DC-Lamp et/ou CD20) nous a permis de stratifier les patients NSCLC en au moins deux groupes à savoir les patients riches en TLS (TLS^{fort}) et les patients pauvres en TLS (TLS^{faible}), et de montrer pour la première fois que l'espérance de vie des patients TLS^{fort} était beaucoup plus longue que celle des patients TLS^{faible}, même aux stades les plus avancés de la maladie [2,4,6].

Aujourd'hui, la molécule CD8 semble être l'un des biomarqueurs les plus prédictifs de la survie des patients dans la majorité des cancers solides. Nous avons confirmé la valeur pronostique de CD8 par IHC sur une large cohorte de patients NSCLC. Il est notable que la quasi-totalité des tumeurs TLS^{fort} présentent également un infiltrat T CD8⁺ fort suggérant que les TLS sont un site important pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ *in situ* [7]. En revanche, la réciproque n'est pas vraie, à savoir qu'il existe des tumeurs NSCLC présentant un (très) fort infiltrat de lymphocytes T CD8⁺ mais une faible densité de TLS. La présence de ce dernier groupe de patients CD8^{fort} TLS^{faible} nous a incité à comparer la valeur pronostique de l'infiltrat T CD8⁺ dans le contexte des TLS. La combinaison de ces deux marqueurs a mis en évidence qu'à densité de cellules T CD8⁺ égale et élevée, la survie des patients était bien plus longue chez ceux présentant une forte densité de TLS (CD8^{fort} TLS^{fort}) par rapport à ceux ayant une faible densité de TLS (CD8^{fort} TLS^{faible}) sur deux séries rétrospectives de 108 patients NSCLC de stades IIIb traités par chimiothérapie et de 140 patients opérés de métastases pulmonaires [7,8]. Ainsi, la valeur pronostique favorable des lymphocytes T CD8⁺ est conditionnée par la présence des TLS. L'une des hypothèses actuellement testées est que les TLS seraient un site clé pour « l'éducation » des cellules T CD8⁺ contre la tumeur. Les TLS présenteraient donc un avantage fonctionnel par rapport aux organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions drainant la tumeur. Des expériences chez l'animal seront nécessaires pour comprendre la contribution de chacune de ces organisations lymphoïdes au cours du processus tumoral.

3. De l'imagerie tissulaire pour découvrir de nouveaux dialogues cellulaires

L'essor récent des techniques multiplex en IHC et en IF sur tissus FFPE permet aujourd'hui d'étudier de nombreux paramètres sur une même coupe de tissu. C'est alors que des interactions jamais décrites ont pu être observées dans différentes régions du microenvironnement tumoral. A titre d'exemple, notre équipe a très récemment montré que, dans certaines tumeurs NSCLC, des lymphocytes T CD8⁺ pouvaient former des synapses immunologiques avec des plasmocytes (Kaplon *et al.*, manuscrit soumis pour publication). Par des triples marquages (CD8/Ki-67/IgA ou IgG) en IF sur des coupes de tumeurs pulmonaires FFPE, on peut visualiser des lymphocytes T CD8⁺ en prolifération, au contact de plasmocytes IgA⁺ et IgG⁺. Nous avons, par la suite, réussi à reproduire cette situation *ex vivo* à partir de cellules T CD8⁺ et de plasmocytes intra-tumoraux autologues. L'analyse approfondie du dialogue entretenu entre ces deux populations immunitaires au niveau du stroma tumoral permettra de définir sa nature et si ce dialogue ouvre la voie à une approche thérapeutique intéressante où il serait possible d'optimiser les fonctions cytotoxiques des cellules T CD8⁺ et, par voie de conséquence, l'efficacité de la réponse anti-tumorale.

4. Repousser les limites de l'imagerie : le passage de la 2^{ème} vers la 3^{ème} dimension

Le multiplexage des marquages sur des coupes uniques de tissus parfois très rares a de façon indéniable permis d'accroître nos connaissances fondamentales, comme illustré ci-dessous (**Figure 1**). Notre équipe a toutefois été confrontée aux limites des marquages en 2 dimensions lorsque nous avons voulu étudier l'interaction entre les systèmes nerveux, vasculaire et immunitaire chez les patients NSCLC. En effet, la détection des différents types de fibres nerveuses est très aisée dans un tissu qui en contient beaucoup. Cela devient beaucoup plus complexe, voire hasardeux dans un organe qui en contient potentiellement très peu et pour lesquelles l'orientation du plan de coupe aura un impact sur la lecture du marquage. Les marquages IF réalisés à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs neuronaux ont mis en évidence quelques cellules isolées de morphologie arrondie dans le stroma tumoral. Après avoir reproduit ces résultats dans plusieurs tumeurs NSCLC, nous avons conclu qu'il était justement impossible d'affirmer la présence de fibres nerveuses dont le plan

de coupe aurait été transversal plutôt que la présence de cellules d'origine non neuronale et positives pour ces marqueurs neuronaux. Pour pallier aux limitations des marquages en 2D, nous avons co-développé avec l'équipe du Dr. I. Brunet (Collège de France, Paris) une technique de multimarquages IF en 3D applicable à des blocs FFPE de fragments d'organe frais ou déjà FFPE, humains ou murins. Sur la base de la méthode i-DISCO (9), nous avons optimisé cette technique, nous permettant d'utiliser un plus large choix d'anticorps primaires et de raccourcir la durée de l'ensemble de la méthode (Azar *et al.*, manuscrit soumis pour publication). Brièvement, l'échantillon est déparaffiné puis réhydraté progressivement (J2) avant de suivre une étape de démasquage antigénique à la chaleur (J3, étape facultative dépendante de l'anticorps primaire). Les pré-traitements peuvent ensuite prendre entre 1 à 4 jours avant d'incuber l'échantillon avec les anticorps primaires (J8-11) puis secondaires (J12-15). L'échantillon est ensuite transparisé avant d'être imagé à l'aide d'un microscope de type feuille de lumière (lightsheet). Un traitement des images est alors nécessaire afin d'obtenir le meilleur ratio signal/bruit de fond.

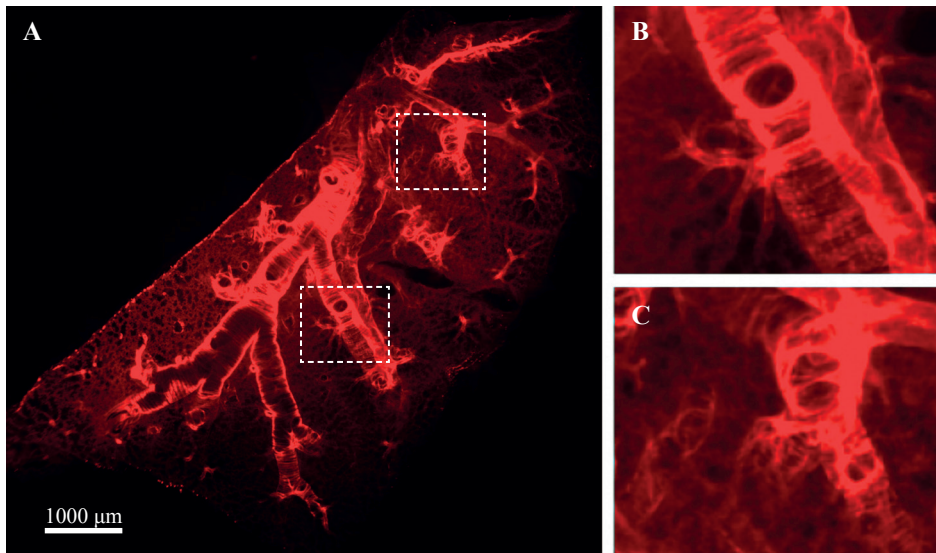


Figure 1 : Visualisation de la vascularisation pulmonaire à partir d'un poumon entier de souris

Le poumon frais d'une souris a été pré-traité, incubé en présence d'un anticorps anti-SMA (rouge) puis imagé via la nouvelle version de la technologie i-DISCO que nous avons développée. (B,C) sont des grossissements de (A).

Vient enfin le travail de reconstruction des images traitées pour visualiser le(s) marquage(s) de l'organe en 3D. Ce protocole a été validé dans différents organes de densités et de structures très différentes (ex. cerveau, amygdales, poumons, reins), chez l'homme comme chez la souris. Dans tous les cas, il a été possible de suivre des marquages sur plusieurs centaines de micromètres vers l'intérieur du bloc d'organe avec une résolution inférieure à l'échelle de la cellule (ex. marquage SMA pour la visualisation de l'arbre vasculaire allant jusqu'aux ramifications secondaires au niveau des alvéoles des poumons de souris, **Figure 1**). Grâce à ce développement technologique, nous avons pu visualiser simultanément en 3D l'innervation, la vascularisation et l'infiltrat immunitaire du poumon tumoral chez des patients et dans un modèle murin de tumeur pulmonaire (Letaïef *et al.*, article en préparation).

CONCLUSION

L'IHC et l'IF connaissent une grande révolution avec une accélération des avancées technologiques sur la dernière décennie. L'utilisation des anticorps dans quasiment tous les protocoles d'IHC/IF, a révolutionné notre compréhension de l'architecture tissulaire qui était jusqu'alors basée sur des colorations. Les simples marquages ont fait place aux multi-marquages. Mais la technologie ne s'arrête pas là. Parfois la technique, parfois la science, l'une et l'autre repoussent sans cesse les limites de l'histotechnologie pour répondre à des besoins toujours plus pressants. Le passage de la 2D vers la 3D des marquages IF peut dans certains cas être une alternative intéressante. D'autres stratégies sont actuellement en cours de développement. Elles visent surtout à combiner plusieurs technologies existantes comme par exemple la détection de molécules (protéines, lipides, sucres par IHC/IF), d'ARN et de phosphoprotéines par le moyen d'empreintes faites à partir d'une même et unique coupe de tissu.

L'analyse du microenvironnement d'un tissu, en particulier en situation physiopathologique représente une niche extraordinaire d'informations. Elle permet de mettre en évidence des interactions cellulaires jusqu'alors jamais observées par d'autres approches, de discriminer des biomarqueurs par sous-région d'un tissu (ex. l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales *versus* les cellules immunitaires) ou encore d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ainsi, l'analyse *in situ* d'un tissu continuera d'enrichir nos connaissances et d'être mise au service des patients.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les anciennes personnes de mon équipe à savoir Jérémy Goc, Claire Germain, Samantha Knockaert, Solène Fastenackels, Myriam Lawand ainsi que Christophe Klein (Centre d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) pour leur contribution dans les résultats cités dans cette présente revue. Nous remercions également K. Steele et S.A. Hammond (AstraZeneca, Gaithersburg, MD, USA) pour ce travail collaboratif. Nos remerciements vont également à l'ensemble des cliniciens (Institut Mutualiste Montsouris, hôpital européen Georges Pompidou, hôpital Tenon et hôpital Cochin ; Paris France) et des patients inclus dans ces études menées conjointement et présentées ici.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. GENTLES AJ, NEWMAN AM, LIU CL, BRATMAN SV, FENG W, KIM D, NAIR VS, XU Y, KHUONG A, HOANG CD, DIEHN M, WEST RB, PLEVITIS SK, ALIZADEH AA. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*, 2015, **21**, 938–945.
2. DIEU-NOSJEAN M-C, ANTOINE M, DANIEL C, HEUDES D, WISLEZ M, POULOT V, RABBE N, LAURANS L, TARTOUR E, CHAISEMARTIN L DE, LEBECQUE S, FRIDMAN W-H, CADRANEL J. Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *J Clin Oncol*, 2008, **26**(27), 4410–4417.
3. DE CHAISEMARTIN L, GOC J, DAMOTTE D, VALIDIRE P, MAGDELEINAT P, ALIFANO M, CREMER I, FRIDMAN W-H, SAUTES-FRIDMAN C, DIEU-NOSJEAN M-C. Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer. *Cancer Res*, 2011, **71**(20), 6391–6399.

4. GERMAIN C, GNJATIC S, TAMZALIT F, KNOCKAERT S, REMARK R, GOC J, LEPELLEY A, BECHT E, KATSAHIAN S, BIZOUARD G, VALIDIRE P, DAMOTTE D, ALIFANO M, MAGDELEINAT P, CREMER I, TEILLAUD J-L, FRIDMAN W-H, SAUTÈS-FRIDMAN C, DIEU-NOSJEAN M-C. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, **189**(7), 832–844.
5. PLATONOVA S, CHERFILS-VICINI J, DAMOTTE D, CROZET L, VIEILLARD V, VALIDIRE P, ANDRE P, DIEU-NOSJEAN M.-C., ALIFANO M., REGNARD J.-F., FRIDMAN W.-H., SAUTES-FRIDMAN C., AND CREMER I.. PROFOUND coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Research*, 2011, **71**(16), 5412-5422.
6. TEILLAUD J-L AND DIEU-NOSJEAN M-C. Tertiary lymphoid structures: an anti-tumor school for adaptive immune cells and an antibody factory to fight cancer? *Frontiers Immunol.*, 2017, **8**, 830.
7. GOC J, GERMAIN C, VO-BOURGAIS TKD, LUPO A, KLEIN C, KNOCKAERT S, DE CHAISEMARTIN L, OUAKRIM H, BECHT E, ALIFANO M, VALIDIRE P, REMARK R, HAMMOND SA, CREMER I, DAMOTTE D, FRIDMAN W-H, SAUTES-FRIDMAN C, DIEU-NOSJEAN M-C. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells. *Cancer Res*, 2014, **74**(3), 705–715.
8. REMARK R, ALIFANO M, CREMER I, LUPO A, DIEU-NOSJEAN M-C, RIQUET M, CROZET L, OUAKRIM H, GOC J, CAZES A, FLEJOU J-F, GIBAUT L, VERKARRE V, REGNARD J-F, PAGES O-N, OUDARD S, MLECNIK B, SAUTES-FRIDMAN C, FRIDMAN W-H, DAMOTTE D. Characteristics and Clinical Impacts of the Immune Environments in Colorectal and Renal Cell Carcinoma Lung Metastases: Influence of Tumor Origin. *Clin Cancer Res*, 2013, **19**(15), 4079-4091.
9. RENIER N, WU Z, SIMON DJ, YANG J, ARIEL P & TESSIER-LAVIGNE M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 2014, **159**(4), 896-910.