

ANALYSE DU MICRO- ENVIRONNEMENT TUMORAL : COMPARAISON CYTOMETRIE EN FLUX ET HISTOLOGIE

Sandrine COCHIN¹ et Caroline TOSCH²

cochin@transgene.fr

1. Laboratoire Essais et Imagerie

2. Laboratoire Immunologie Cellulaire

*Transgène, 400 Boulevard Gonthier d'Andernach
67400 Illkirch-Graffenstaden, France*

ANALYSIS OF THE TUMOR MICROENVIRONMENT: COMPARISON OF FLOW CYTOMETRY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

ABSTRACT

Analysis of tumor microenvironment (TME) is a key issue since the advent of immunotherapeutic products. The characterization of the TME is necessary to explain the mode of action of the products, to explain their possible toxicity and to better stratify patients populations to give access to these new therapies. The TME can be analyzed with different methods, each having advantages and drawbacks. Here, we will discuss the assets and the limits of Quantitative Multiplex Immunohistochemistry and Flow Cytometry. We compared these technologies starting with the same samples using different immune cell markers. We quantified tumor infiltrating lymphocytes, proportion of immune cells and their localization. The results showed that these technologies are complementary. The most appropriate technology will be chosen to answer the scientific questions and make headways in the different projects.

KEY WORDS

Immunotherapy, tumor microenvironment, immunohistochemistry, multiplex, cytometry, marker

RESUME

Avec l'avènement des produits d'immunothérapie, l'analyse du microenvironnement tumoral (TME) est devenue essentielle. Cette caractérisation est nécessaire pour expliquer le mode de fonctionnement de ces produits, pour éventuellement expliquer leur potentielle toxicité et surtout pour tenter de stratifier les patients qui auront accès à ces nouvelles thérapies. Pour cette analyse du TME, différentes techniques existent, avec leurs avantages et leurs inconvénients. Dans cette présentation, nous avons étudié les atouts et les limites des techniques que nous utilisons au quotidien : l'immunohistochimie multiplexe quantitative et l'analyse par cytométrie de flux. Nous avons comparé ces deux techniques sur des échantillons communs et sur différents marqueurs de cellules immunitaires. Les paramètres que nous avons étudiés sont : la quantification absolue de marqueurs intra-tumoraux, l'étude des proportions relatives des cibles par analyses multiplexes et la localisation de ces marqueurs. Nous avons également comparé les marqueurs utilisés dans ces deux techniques sur deux populations tumorales murines distinctes. Les résultats obtenus nous ont permis de comparer ces deux techniques qui restent complémentaires. Ces différences sont importantes à connaître, surtout dans le paysage de l'immunothérapie, pour déterminer la méthode la mieux adaptée aux questions scientifiques qui nous sont posées par nos clients chercheurs qui développent de nouvelles thérapies.

MOTS CLES

Immunothérapie, microenvironnement tumoral, immunohistochimie, multiplexe, cytométrie, marqueur

INTRODUCTION

L'étude du microenvironnement tumoral prend aujourd'hui en considération les différents éléments entourant la cellule tumorale et les interactions structurales et fonctionnelles entre ces partenaires [1]. Les techniques de microscopie fournissent une information sur la composition cellulaire de la tumeur, mais la visualisation et la quantification de sous-populations restent encore à approfondir. La cytométrie de flux, quant à elle, permet une analyse quantitative de différentes populations, au détriment de la localisation de ces populations au sein d'un tissu.

Dans cet article, nous comparons deux méthodes d'analyse, l'immunohistochimie (IHC) et la cytométrie en flux (CMF) [2]. Ces technologies sont toutes deux basées sur des marquages d'anticorps couplés ou non à des fluorochromes. Nous avons testé ces techniques sur des échantillons communs pour quantifier les lymphocytes infiltrants d'une tumeur. Nous avons également comparé les proportions de populations immunes détectées par les deux méthodes.

MATERIELS ET METHODES

1. Expérimentation animale

Ces expérimentations sur des modèles murins ont été réalisées suivant les recommandations sur l'expérimentation animale et avec l'accord du comité d'éthique local.

Lors d'une première expérience, des tumeurs implantées par voie sous cutanée chez des souris immunocompétentes ont été prélevées après injection d'un traitement viral par voie intra tumorale. La moitié de ces tumeurs ont été prélevées pour analyse IHC ou CMF (**Figure 1A**).

Lors d'une seconde expérience, selon le même schéma d'implantation que précédemment, les souris ont été traitées par différentes injections intra veineuses d'anticorps anti CD4, anti CD8 et Ly6G pour dépléter respectivement les cellules CD4+, les CD8+ ou les neutrophiles. Le sang, la rate et la tumeur de ces souris ont été prélevés pour analyse (**Figure 1B**).

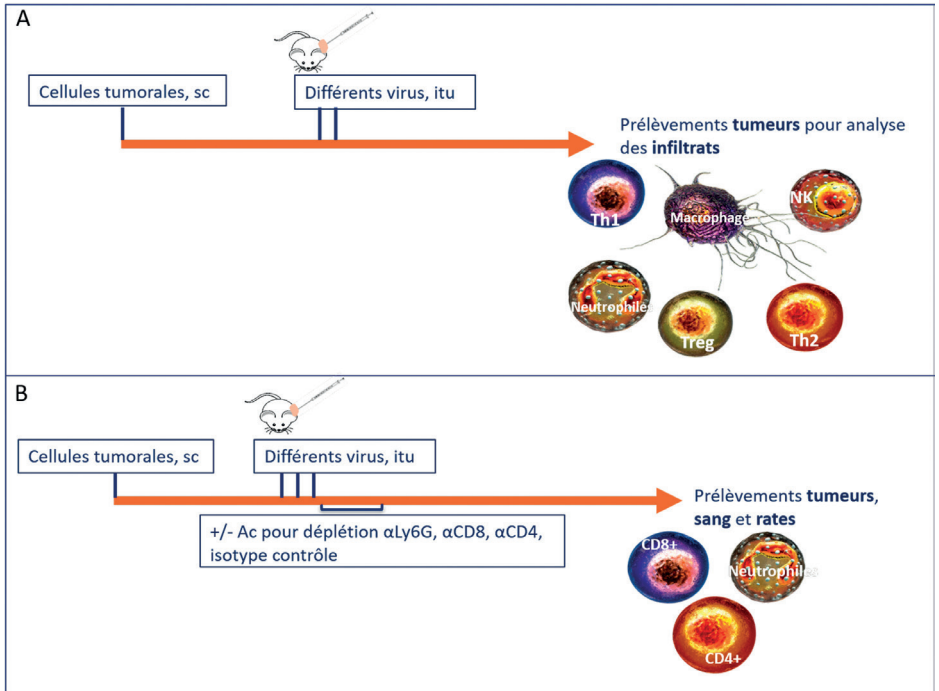


Figure 1 : Protocole des expériences *in vivo* : (A) les cellules tumorales sont injectées en sous cutanée. Lorsque les tumeurs sont palpables, différents traitements viraux sont injectés par voie intra tumorale. Les tumeurs sont prélevées un jour après la dernière injection de virus pour en analyser les infiltrats. (B) les cellules tumorales sont injectées en sous cutanée. Lorsque les tumeurs sont palpables, différents traitements viraux sont injectés par voie intra tumorale accompagné ou non d'anticorps pour dépléter différentes populations de cellules immunitaires comme les CD4+, les CD8+ ou les neutrophiles.

2. Immunohistochimie

Les tumeurs prélevées ont été fixées en formaldéhyde 4% puis déshydratées dans des bains successifs d'alcools de degrés croissants. Après inclusion en paraffine, des coupes de 3µm (microtome RM2255, Leica) ont été déposées sur lames (Superfrost® plus, ThermoScientific). Des immunohistochimies simplex et multiplex ont alors été réalisées sur automate (BOND RX™, Leica). Après déparaffinage et réhydratation des lames (protocole pré-traitements Leica), les sites antigéniques ont été démasqués à chaud (ER1 ou ER2, AR9961 et AR9640, Leica) pendant 30 minutes. Suivent alors des étapes de saturation au sérum de chèvre 10% (G6767,

Sigma) et à l'UltraVision Hydrogen Peroxide (TA-125-H2O2Q, Leica). Les coupes ont ensuite été incubées pendant une heure avec des anticorps de rat (anti-F4/80, MF48000, CaltagLab ; anti-Ly6CG, AM26331PU-N, Origene ; anti-FOXP3, 14-5573-82, eBioscience ; anti-CD45, 553076, BD Pharmingen) ou des anticorps primaires de lapin (anti-CD4, 25229, Cell Signaling Technology ; anti-CD8, 98941, Cell Signaling Technology ; anti-CD3, A0452, Dako ; anti-myeloperoxydase (MPO) RB-373-A1, Neomarkers). Après rinçage, les anticorps secondaires ont été déposés (anti-rat IgG, BA-4001, Vector Lab et/ou Novolink Polymer, RE7161, Leica) pendant 30 minutes. Enfin, les coupes ont été incubées 10 minutes à température ambiante avec les systèmes d'amplification : Tyramid System Amplification (TSA-FITC, FP1013, Perkin Elmer ; TSA-Cy5, FP1117, Perkin Elmer ; TSA-350*, B40952, Invitrogen), puis 10 minutes dans une solution DAPI (B-2883, Sigma) à 5µg/mL (*sauf pour les lames incubées avec la TSA-350). Les lames ont alors été montées au Mowiol® (4757904, Calbiochem). Pour les multiplex, une étape de « stripping » a été ajoutée après chaque révélation à la TSA en incubant les coupes 15 minutes à 100°C dans une solution ER1 ou ER2 (Leica).

Les lames ont alors été scannées (Nanozoomer 2.0 RS, Hamamatsu) puis la quantification des différents marqueurs a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Calopix, Tribvn).

3. Cytométrie en flux

Les tumeurs ont été dissociées mécaniquement puis de manière enzymatique (Tumor dissociation Kit, Miltenyi). La suspension cellulaire homogène générée a ensuite été enrichie en CD45, grâce à un kit de billes anti-CD45 aimantées (CD45 TILs MicroBeads mouse, Miltenyi).

Le sang a été prélevé sur héparine. Le marquage a été effectué sur sang total avant lyse des globules rouges en dernière étape, avant l'acquisition des échantillons.

La rate a été écrasée à travers un tamis cellulaire dans du milieu de culture. La suspension récupérée a été traitée pour lyser les globules rouges avant marquage avec les différents panels d'anticorps.

Les marquages de chacune de ces populations cellulaires ont été mis en place pour définir les populations de lymphocytes T CD4+ (anti-CD4 APC Vio770, 130-

109-417, Miltenyi), CD8 (anti-CD8 APC, 130-109-248, Miltenyi) et régulatrices Treg (anti-FoxP3 PE, 130-111-600, Miltenyi), les macrophages (anti F4/80 PerCP Vio700, 130-102-161) et les neutrophiles (CD11b, Ly6G). Les cellules, une fois en suspension, ont été incubées avec 100µL d'une solution d'anticorps à une concentration appropriée pendant 30min à +4°C. Après lavages au PBS, les échantillons ont été acquis sur un cytomètre MACSQuant10 (Miltenyi). L'analyse des résultats a été effectuée grâce au logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

RESULTATS

Analyse des populations lymphocytaires CD4+ et CD8+.

La **Figure 2** illustre les marquages obtenus avec chacune des deux méthodes.

Après analyse à l'aide des différents logiciels adaptés à chaque technique, le nombre de cellules CD4+ et CD8+ quantifié sur tissu (nombre de cellules positives / mm² de tumeur) et par CMF (nombre de cellules positives / g de tumeur) suivent la même tendance (**Figure 3**).

Les courbes de corrélation montrent une relation linéaire modérée mais positive avec des indices R² de 0.4 et 0.7 respectivement pour les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (**Figure 4**).

Analyse des neutrophiles par les deux méthodes

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les deux techniques en utilisant des stratégies et des marqueurs propres à chacune des méthodes. Par cytométrie, la population de neutrophiles se détache aisément du reste des cellules infiltrant les tumeurs et les marqueurs MPO et Ly6CG sont bien mis en évidence cependant, les analyses ne permettent pas d'obtenir des résultats similaires. Dans ce cas les deux techniques d'analyse ne sont pas comparables.

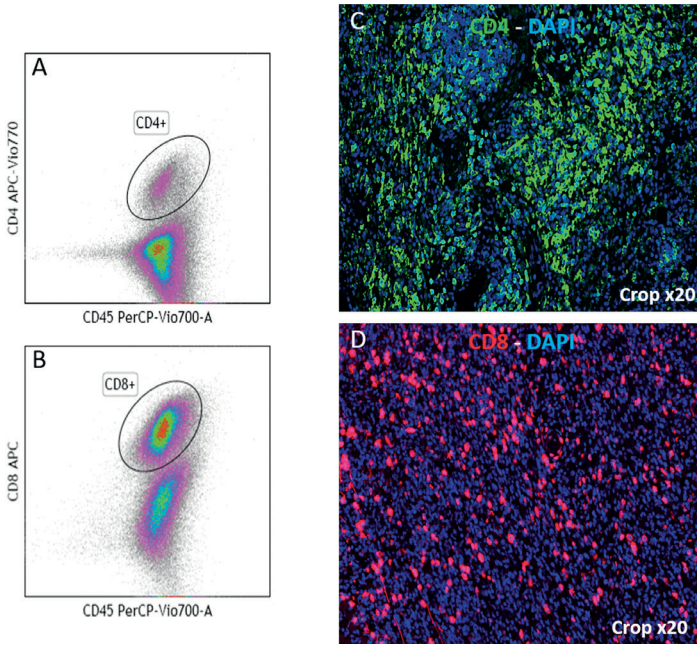


Figure 2 : Marquages de lymphocytes infiltrants la tumeur. (A et B) Dot Plots CD45-CD4 ou CD45-CD8. (C et D) IHC anti CD4 et anti CD8 simplex avec révélation en fluorescence.

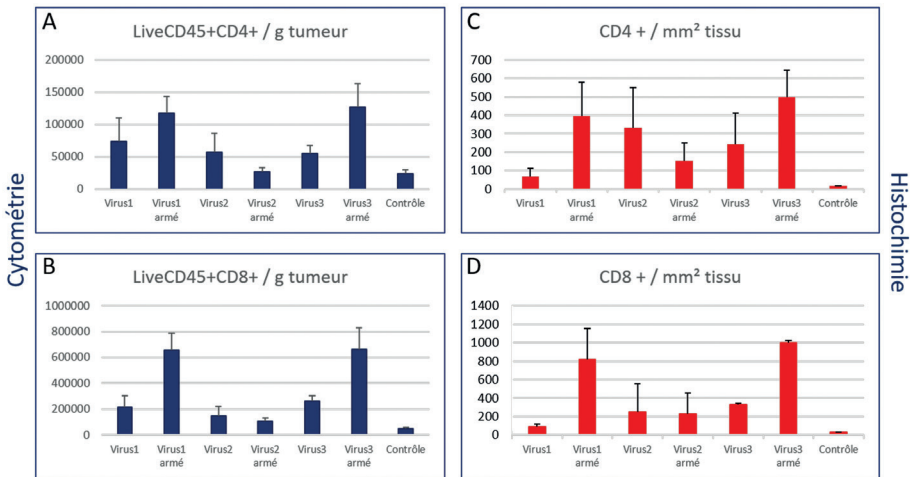


Figure 3 : Résultats de quantification de marquages de cellules CD4+ et CD8+ infiltrant les tumeurs, après analyse par CMF (A et B) et par IHC (C et D).

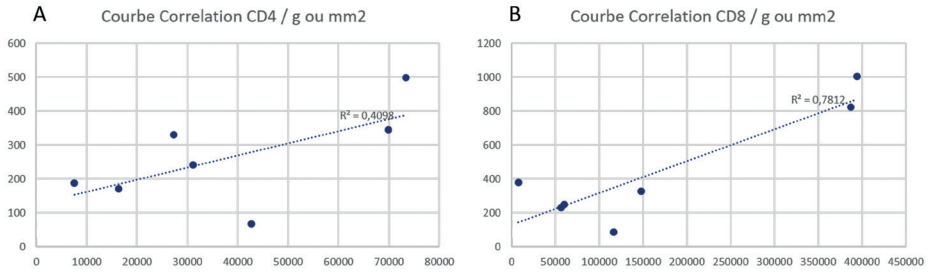


Figure 4 : Courbes de corrélation du nombre de cellules CD4+ (A) ou CD8+ (B) quantifié par CMF et par IHC. Les indices de corrélation (R^2) apparaissent sur la droite de chacun des graphiques.

Analyses comparatives des Treg et des macrophages

Le nombre de Treg et de macrophages évolue de manière équivalente quel que soit le type de méthode employée. L'IHC nous donne une information supplémentaire quant à la localisation en périphérie des tumeurs pour les macrophages (Figures 5 et 6).

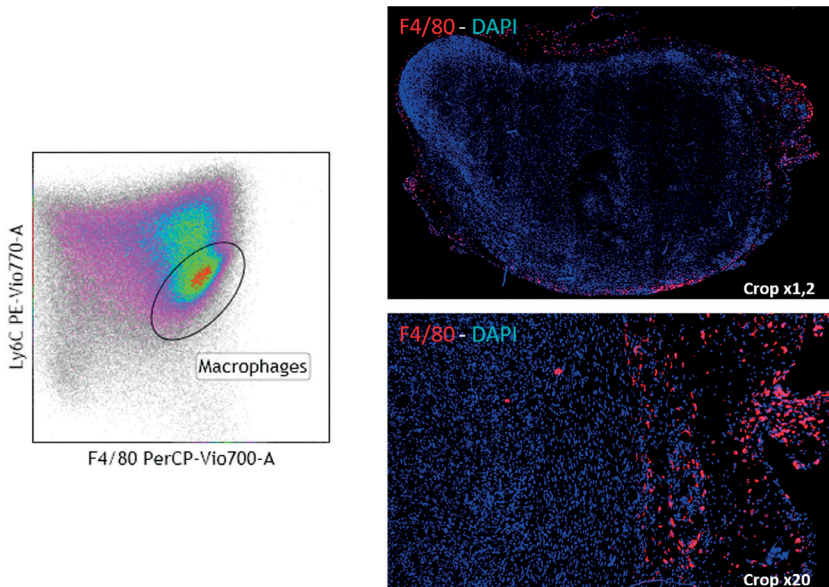


Figure 5 : Visualisation des marquages de macrophages F4/80 par CMF (A) et par IHC (B et C).

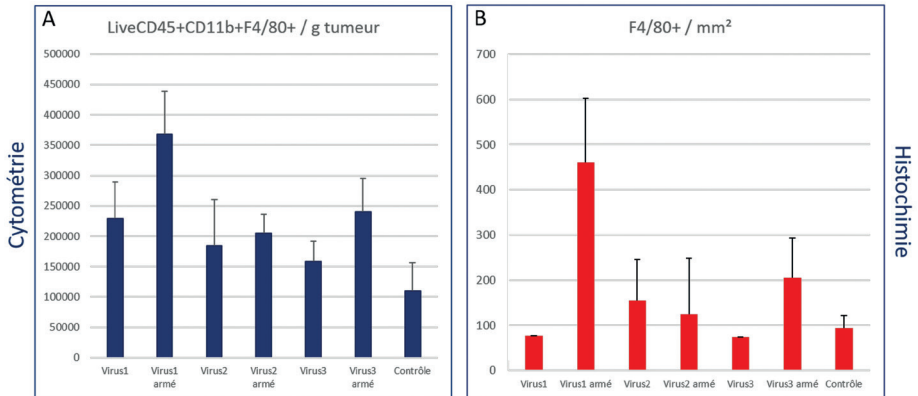


Figure 6 : Résultats de la quantification des macrophages F4/80 infiltrant les tumeurs, après analyse par CMF (A) et par IHC (B).

Etude de la déplétion des cellules immunitaires (CD4, CD8 et CD3)

Dans une dernière partie, nous avons utilisé les deux méthodes d'analyse pour mettre en évidence la déplétion de cellules immunitaires dans des organes différents.

Les triples marquages CD3-CD4-CD8 réalisés sur les différents groupes de souris montre une déplétion des populations correspondantes.

Quel que soit l'organe analysé et la technique utilisée, la déplétion est mise en évidence. Concernant les neutrophiles, l'analyse du sang montre une absence totale de cette population cellulaire, contrairement à l'analyse histologique du tissu tumoral où des cellules Ly6CG positives sont néanmoins révélées. Comme précédemment, l'analyse de cette population est plus problématique par manque de marqueur spécifique (**Figure 7** et **8**).

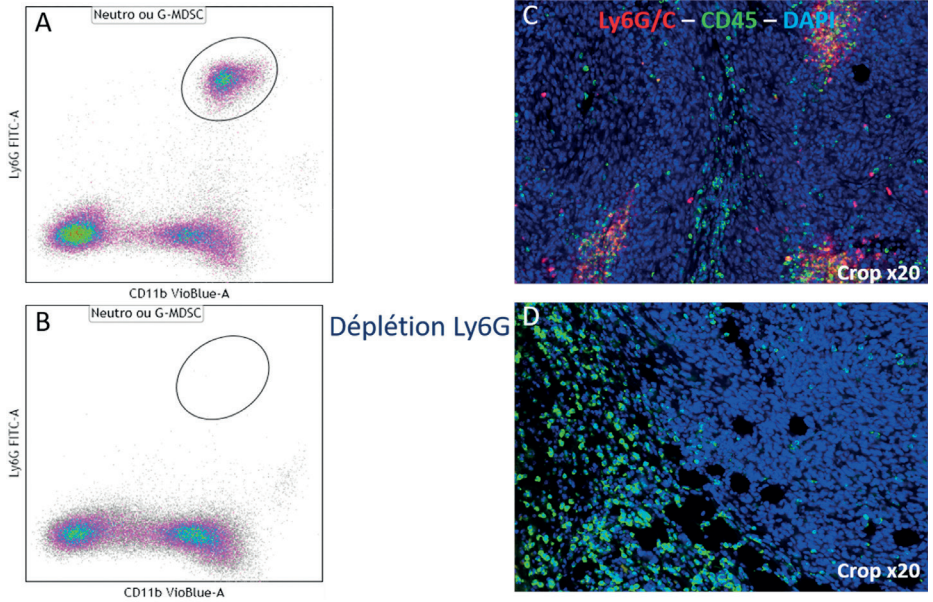


Figure 7 : Visualisation de la déplétion de neutrophiles dans le sang par CMF (A et B) et dans la tumeur par IHC (C et D) dans des souris déplétées (B et D) ou non (A et C).

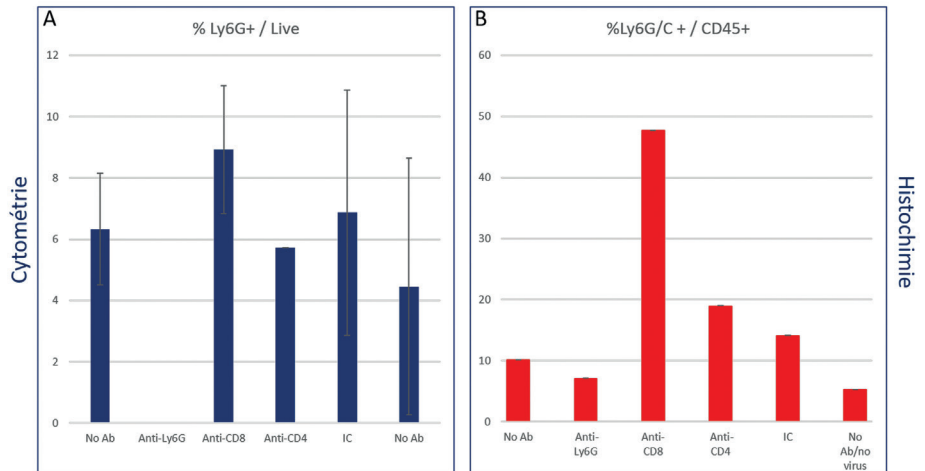


Figure 8 : Résultats de la quantification de marquages de neutrophiles dans le sang par CMF (A) et dans la tumeur par IHC (B).

CONCLUSION

Le microenvironnement tumoral regroupe les vaisseaux sanguins, les cellules immunitaires, les fibroblastes, les molécules de signalisation ainsi que la matrice extracellulaire. La tumeur et son micro-environnement sont étroitement liés et interagissent constamment. Parmi les nombreuses techniques d'analyse des infiltrats tumoraux, nous avons comparé deux de ces méthodes, la cytométrie et l'immunohistochimie, propices à la détection de ces populations infiltrantes [3].

Dans cet article, nous avons comparé la CMF et l'IHC, en utilisant des échantillons communs ou non, des anticorps communs ou des marqueurs différents pour identifier la même population de cellules immunitaires. La présence de cellules immunitaires au sein de tumeurs, dans le sang ou la rate de souris est détectée dans les mêmes proportions avec les deux méthodes (sauf pour les neutrophiles). La détection de macrophages par l'IHC, quant à elle, a mis en évidence la présence de ces marqueurs en périphérie des tumeurs. Cette information est bien entendu indisponible lors d'une analyse par CMF. Certaines populations sont plus complexes à étudier quand il n'existe pas de marqueurs spécifiques et dont les stratégies d'analyse sont propres à chaque méthode (cas des neutrophiles).

La CMF nécessite de dissocier les organes pour obtenir des cellules isolées, en suspension dans un flux de liquide. Il est possible d'acquérir un grand nombre d'évènements et chaque cellule peut être marquée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps couplés à des fluorochromes (jusqu'à 14). C'est une technique qualitative et quantitative, qui permet de caractériser plusieurs populations et sous populations cellulaires sur un même échantillon [4]. Cependant, pour réaliser ces marquages multi couleurs, les contrôles sont essentiels.

L'IHC permet de visualiser des protéines cellulaires sur coupe de tissu par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps spécifiques. Cette méthode nécessite des prétraitements assez longs mais offre la possibilité de réanalyser les échantillons (à partir des blocs ou des scans). Les contrôles positifs et négatifs ont été nécessaires pour valider les protocoles. C'est une méthode qui permet de localiser et d'étudier la répartition des différentes populations cellulaires en plus de les quantifier. Par des marquages multiples, différents marqueurs peuvent être observés et quantifiés simultanément au sein d'un même tissu ce qui pourrait nous amener à étudier par la suite des distances entre certains types cellulaires et leurs interactions.

Pour conclure, ces deux techniques présentent des spécificités bien particulières dont il faut tenir compte dans les analyses et qui n'en sont pas moins complémentaires.

REMERCIEMENTS

Nous remercions nos équipes respectives : Carine REYMANN, Caroline EBEL, Michèle KLEIN et Luc BARRAUD du laboratoire Essais et Imagerie et Christine THIOUDELLET, Marie-Christine CLAUDEPIERRE et Karola RITTNER du laboratoire Immunologie Cellulaire pour leur aide et leur soutien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. QUAIL DF. and JOYCE JA. : Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.*, **19**(11), 1423-1437.
2. GERNER M. : Histo-Cytometry: in situ multiplex cell phenotyping, quantification, and spatial analysis applied to dendritic cell subset micro-anatomy in lymph nodes. *Immunity*, 2012, **37**(2), 364-376.
3. TSUJIKAWA T. : Quantitative multiplex immunohistochemistry reveals myeloid inflamed tumor-immune complexity associated with poor prognosis. *Cell Rep.*, **19**(1), 203-217.
4. MAECKER T.: Flow Cytometry Controls, Instrument Setup, and the Determination of Positivity. *Cytometry Part A*, 2006, **69A**, 1037–1042.