

Analyse complète de l'état des lymphocytes T après activation avec un panel d'immunophénotypage à 16 couleurs sur le cytomètre en flux NovoCyte Advanteon

Auteurs

Lauren Jachimowicz,
Ming Li, Peifang Ye, Yan Lu et
Garret Guenther
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Les lymphocytes T constituent un élément essentiel de la réponse immunitaire et sont capables de reconnaître et d'éliminer les agents pathogènes étrangers ainsi que les cellules tumorales. Il est toutefois nécessaire de contrôler étroitement la réponse des lymphocytes T pour empêcher les réactions auto-immunes et immunopathologiques. Un panel d'immunophénotypage des lymphocytes T à 16 couleurs a été développé pour que le Agilent NovoCyte Advanteon puisse analyser simultanément la différenciation, l'activation, l'exténuation et l'activité fonctionnelle des lymphocytes T liés à la dégranulation et l'expression de cytokines. En théorie, cette méthode devrait permettre d'analyser l'ensemble de la fonction des lymphocytes T dans le cadre d'une réponse immunitaire.

Introduction

Le rôle du système immunitaire est de combattre les agents pathogènes tout en limitant les réactions auto-immunes. Les lymphocytes T constituent un élément essentiel de la réponse immunitaire adaptative ; ils sont capables de reconnaître des antigènes spécifiques et d'éliminer les infections. Au cours d'une réponse immunitaire normale, les lymphocytes T sont activés pour se diviser rapidement et détruire l'ensemble des cellules infectées ou cancéreuses. L'activation par le récepteur des lymphocytes T (TCR) et les récepteurs de co-stimulation doit être contrebalancée par les récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 (« programmed cell death protein 1 » ou protéine 1 de mort cellulaire programmée), LAG-3 (« lymphocyte-activation gène 3 » ou gène 3 d'activation des lymphocytes), et TIM-3 (« T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 » ou immunoglobuline des lymphocytes T et molécule 3 contenant le domaine de la mucine). Cet équilibre est nécessaire pour empêcher le développement de réactions auto-immunes et immunopathologiques.

Le maintien de la stimulation des lymphocytes T entraîne une augmentation progressive de l'expression des récepteurs inhibiteurs et une baisse de la capacité à proliférer et de la fonction effectrice (épuisement) des lymphocytes T. C'est ce que l'on observe durant une infection chronique ou un cancer. Les récepteurs inhibiteurs sont devenus un sujet d'actualité dans la recherche sur l'immunothérapie contre le cancer, car l'inversion de l'expression des récepteurs inhibiteurs par blocage des inhibiteurs de point de contrôle a permis de restaurer la fonction des lymphocytes T et d'améliorer l'immunité antitumorale en milieu clinique. La gravité de l'épuisement des lymphocytes T est fortement corrélée à la co-expression de multiples récepteurs inhibiteurs, ce qui rend les polythérapies prometteuses car elles permettent de cibler de multiples récepteurs inhibiteurs, entraînant ainsi une amélioration de l'immunité antitumorale. L'analyse de l'expression des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T à elle seule ne fournit pas une vue d'ensemble de l'état de ces lymphocytes. La mesure d'autres marqueurs de la

différenciation, de l'activation, de l'exposition antérieure à un antigène, de la dégranulation et de la production de cytokines des lymphocytes T permet de mieux comprendre la situation globale.

Des études ont identifié des différences inhérentes dans l'expression des récepteurs inhibiteurs au sein des sous-ensembles des lymphocytes T mémoires, effecteurs et naïfs. Un panel d'immunophénotypage à 16 couleurs a été conçu pour le NovoCyte Advanteon (tableau 1) afin d'étudier l'état de différenciation et d'activation des lymphocytes T CD4 et CD8, et de mesurer les réponses fonctionnelles des lymphocytes T. L'utilisation du NovoCyte Advanteon dans l'analyse multiparamétrique a permis, à partir de ces données, de comprendre pleinement les modifications d'ordre cinétique dans les sous-populations de lymphocytes T ainsi que leur fonction après stimulation.

Analyse approfondie de l'état des lymphocytes T après stimulation par le TCR

Pour étudier en détail la réponse des lymphocytes T à l'activation par le TCR, nous avons examiné la différenciation, l'activation, les marqueurs d'inhibition, la dégranulation ainsi que la production de cytokines des lymphocytes T CD4 et CD8 (tableau 1). Des cellules mononuclées de sang périphérique

(PBMC) isolées ont été stimulées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ainsi que de l'interleukine-2 (IL-2) pour induire l'activation des lymphocytes T. Six heures avant l'analyse en cytométrie en flux, la sécrétion des cytokines a été bloquée à l'aide d'un inhibiteur du transport des protéines. Les échantillons ont été mesurés initialement, après deux et quatre jours en culture, puis à nouveau au 5^{ème} jour après une nouvelle stimulation.

La figure 1 illustre une stratégie de fenêtrage (« gating ») représentative pour l'échantillon du 4^{ème} jour. Pour commencer, les cellules mortes ont été exclues au moyen d'un marqueur de viabilité puis en examinant la fréquence des lymphocytes T CD4 et CD8 dans la population totale des lymphocytes T CD3. La différenciation des lymphocytes T a ensuite été évaluée en déterminant la fréquence relative des sous-populations de lymphocytes T sur la base de l'expression en surface de CD45RA et CCR7. Les lymphocytes T sont répartis en lymphocytes T de type naïf $T_{\text{type naïf}}$ (CD45RA+/CCR7+), en lymphocytes T de mémoire centrale T_{CM} (CD45RA-/CCR7+), en lymphocytes T effecteurs à mémoire T_{EM} (CD45RA-/CCR7-), et en lymphocytes T effecteurs à mémoire CD45RA+ T_{EMRA} (CD45RA+/CCR7+). En outre, les $T_{\text{type naïf}}$ sont séparés en lymphocytes T réellement naïfs ($T_{\text{naïf}}$) et en lymphocytes T mémoires de type cellule souche (T_{SCM}) par l'expression de CD95 sur les T_{SCM} .

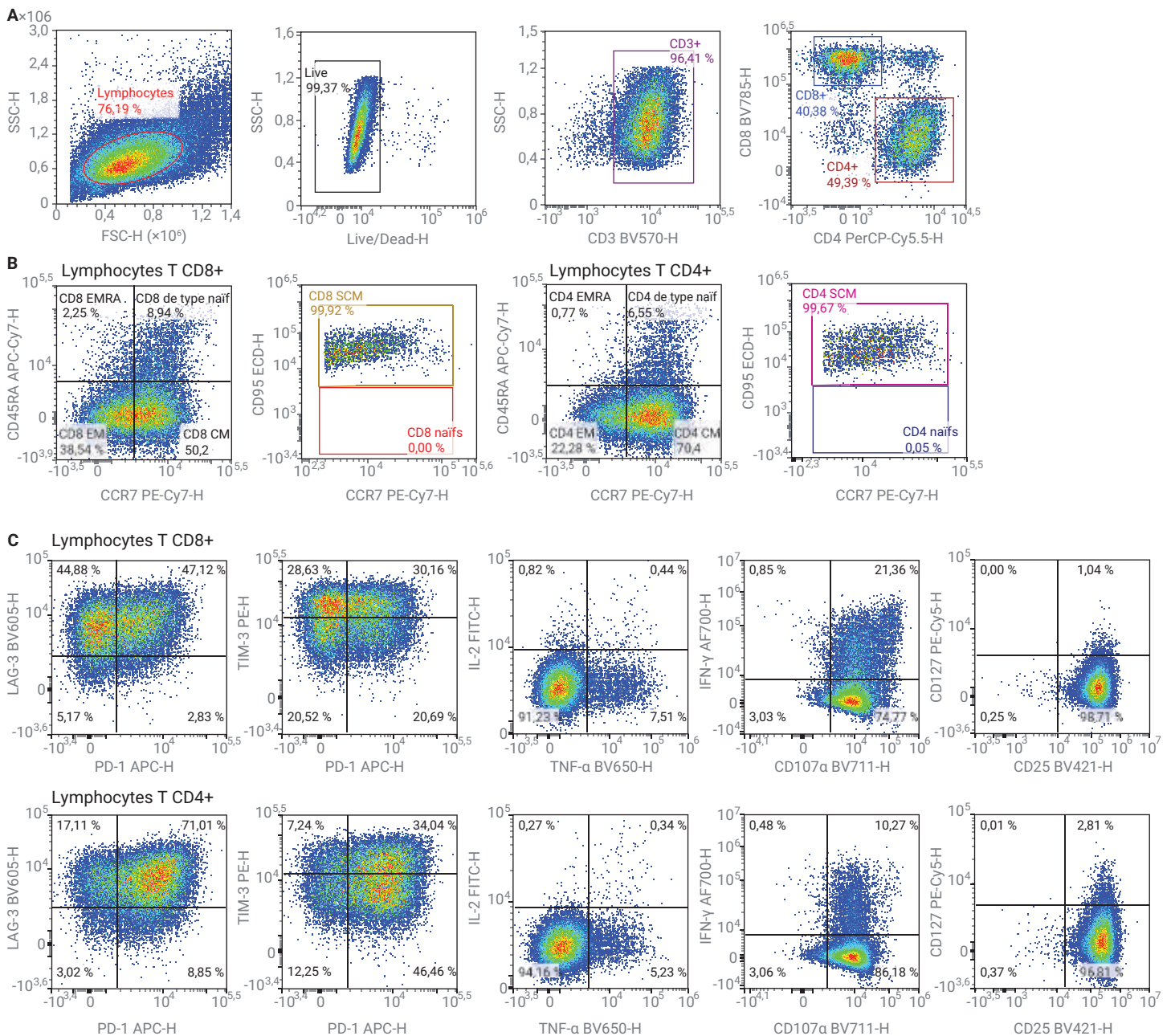
Tableau 1. Fluorochromes utilisés dans le panel d'immunophénotypage à 16 couleurs.

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fonction
« Live/Dead »	AVID		Viabilité
CD3	BV570	UCHT1	Lignée
CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	
CD8	BV785	SK1	
CD45RA	APC-Cy7	HI100	Activation/Différenciation
CCR7	PE-Cy7	G043H7	
CD25	BV421	M-A251	
CD127	PE-Cy5	A019D5	
CD95	PE-Dazzle594	DX2	
PD-1	APC	EH12.2H7	Récepteurs inhibiteurs
TIM-3	PE	F38-2E2	
LAG-3	BV605	11C3C65	
IL-2	FITC	MQ1-17H12	Cytokine
IFN- γ	AF700	B27	
TNF- α	BV650	MAb11	
CD107 α	BV711	H4A3	Dégranulation

Ensuite, l'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1, TIM-3 et LAG-3 a été recherchée, de même que les marqueurs d'activation CD25 et CD127. Ces marqueurs donnent des informations complémentaires sur l'état d'activation des lymphocytes T. Enfin, la production des cytokines IL-2, facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et interféron gamma (IFN γ) a été mesurée, de même que la dégranulation, en analysant l'expression de CD107 α qui démarque les lymphocytes T cytolytiques. Toutes les étapes de sélection (« gates ») ont été déterminées à l'aide de contrôles

de type FMO (« fluorescence minus one ») (figure 1D). Quatre jours après la stimulation, la plupart des cellules avaient subi une activation, et il ne restait plus aucun lymphocyte T_{naïf} dans les populations de lymphocytes T CD4 et CD8. Une augmentation importante de l'expression de CD25 et une diminution importante de l'expression de CD127 ont été observées parmi les lymphocytes T, ce qui également caractéristiques des lymphocytes T fortement activés. Les familles de lymphocytes CD4 et CD8 présentaient toutes deux une diminution de l'expression

des récepteurs inhibiteurs, bien que tous les lymphocytes ne présentaient pas d'expression positive. La production de TNF α et d'IFN γ était également présente, alors que seule une production minimale d'IL-2 a été notée. La plupart des lymphocytes T étaient également CD107 α +, indiquant leur potentiel cytolytique. Ce panel multi-couleur utilisé sur le NovoCyte Advanteon permet d'analyser en détail les lymphocytes T après stimulation. Ensuite, les variations cinétiques des paramètres mesurés ont été étudiées dans les lymphocytes T après activation par le TCR.



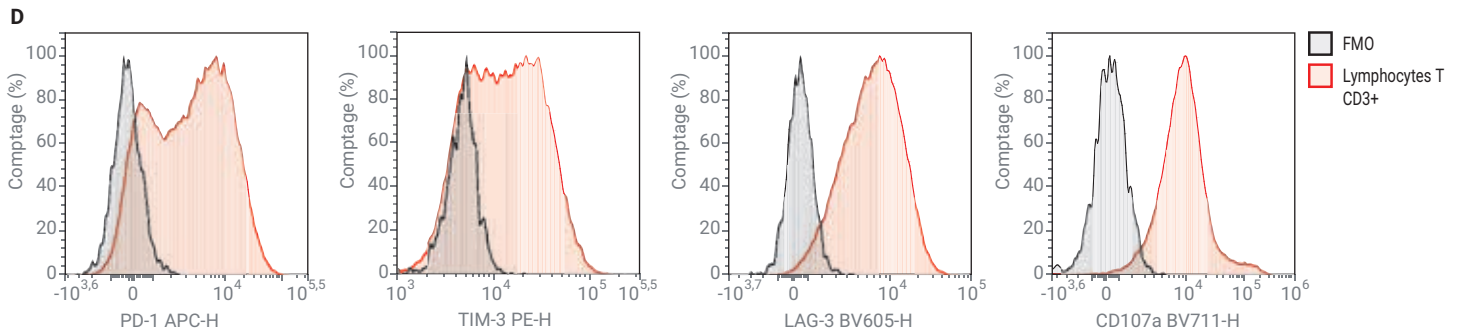


Figure 1. Immunophénotypage en 16 couleurs de PBMC stimulées en cytométrie en flux. Des PBMC isolées à partir du sang de donneurs ont été stimulées avec 5 µg/mL d'anticorps anti-CD3, 2 µg/mL d'anticorps anti-CD28 et 100 ng/mL d'IL-2. Les PBMC stimulées ont été marquées à l'aide du panel d'immunophénotypage à 16 couleurs (tableau 1) le 4^{ème} jour. Un cocktail d'inhibiteurs de transport protéique (2 µL/puits) et d'anticorps anti-CD107α BV711 (5 µL/mL) a été ajouté directement dans les puits six heures avant l'analyse. (A) Stratégie de fenêtrage (« gating »). FSC-H et SSC-H ont servi à identifier les cellules cibles parmi les débris, et les cellules mortes ont été exclues à l'aide d'un marqueur « Live/Dead ». CD3 a été utilisé pour identifier les lymphocytes T. Puis la sélection (« gating ») des lymphocytes CD3+ a permis d'identifier les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Après sélection des lymphocytes CD4+ et CD8+, les lymphocytes T_{CM'}, T_{EM} et T_{EMRA} ont été identifiés d'après l'expression différentielle de CD45RA et CCR7. Les T_{SCM} CD95+ et les lymphocytes T naïfs CD95- ont alors été détectés dans la population CD45RA+ CCR7+ (B). Le niveau d'expression de CD25 et de CD127, le niveau d'épuisement de PD-1, LAG-3 et TIM-3, le niveau de sécrétion d'IL-2, de TNF-α et d'IFN-γ et le niveau de dégranulation de CD107α ont également été examinés dans les sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les données présentées ici sont tirées de l'échantillon récupéré le 4^{ème} jour. (D) Contrôles FMO. Les étapes de fenêtrage (« gates ») ont été définies à l'aide de contrôles de type FMO. Les contrôles FMO de PD-1, TIM-3, LAG-3 et CD107α sont illustrés ci-dessus. Les échantillons ont été mesurés sur le cytomètre en flux NovoCyte Advanteon d'Agilent puis analysés avec le logiciel NovoExpress.

Présence de modifications continues de l'état de différenciation des lymphocytes T après stimulation

L'activation par le TCR induit des modifications rapides de la différenciation des lymphocytes T. L'état de différenciation a été examiné en identifiant chaque sous-ensemble : T_{naïfs}, T_{SCM'}, T_{CM'}, T_{EM} et T_{EMRA'} comme indiqué dans la section précédente. Des études préalables ont permis d'identifier des différences fonctionnelles entre les sous-ensembles de lymphocytes T ; les T_{naïfs} et les T_{CM} présentent une grande capacité de prolifération mais manquent de fonction effectrice rapide, tandis que les T_{EM} et les T_{EMRA} ont une plus faible

capacité de prolifération mais des capacités effectrices plus étendues. Les T_{SCM} ont déjà subi une stimulation par un antigène mais conservent les mêmes propriétés d'auto-renouvellement caractéristiques des cellules souches que les lymphocytes T_{naïfs}. Pour comprendre les modifications touchant la différenciation des lymphocytes T après la stimulation, la fréquence relative de tous les sous-ensembles de lymphocytes T a été étudiée sur des PBMC non stimulées et des PBMC stimulées après deux et quatre jours, ainsi que sur des PBMC à nouveau stimulées le 5^{ème} jour (figure 2). Comme prévu, la fréquence des lymphocytes T_{naïfs} chute considérablement après deux jours de stimulation par le TCR ; la plupart des

lymphocytes CD45RA+ CCR7+ sont des T_{SCM'} puisqu'ils expriment également CD95 (figure 2B). Ceci est typique de l'activation *ex vivo* par un anticorps anti-CD3/anti-CD28 puisque qu'il est censé activer tous les lymphocytes T présents. La proportion de T_{CM} augmente régulièrement au cours du temps après la stimulation, alors qu'elle diminue après la re-stimulation (échantillon du 5^{ème} jour). Ceci signifie que la re-stimulation induit une évolution des lymphocytes T vers un phénotype effecteur. Dans l'ensemble, la stimulation *ex vivo* des PBMC induit une différenciation rapide des lymphocytes T en multiples sous-populations de lymphocytes effecteurs et mémoires.

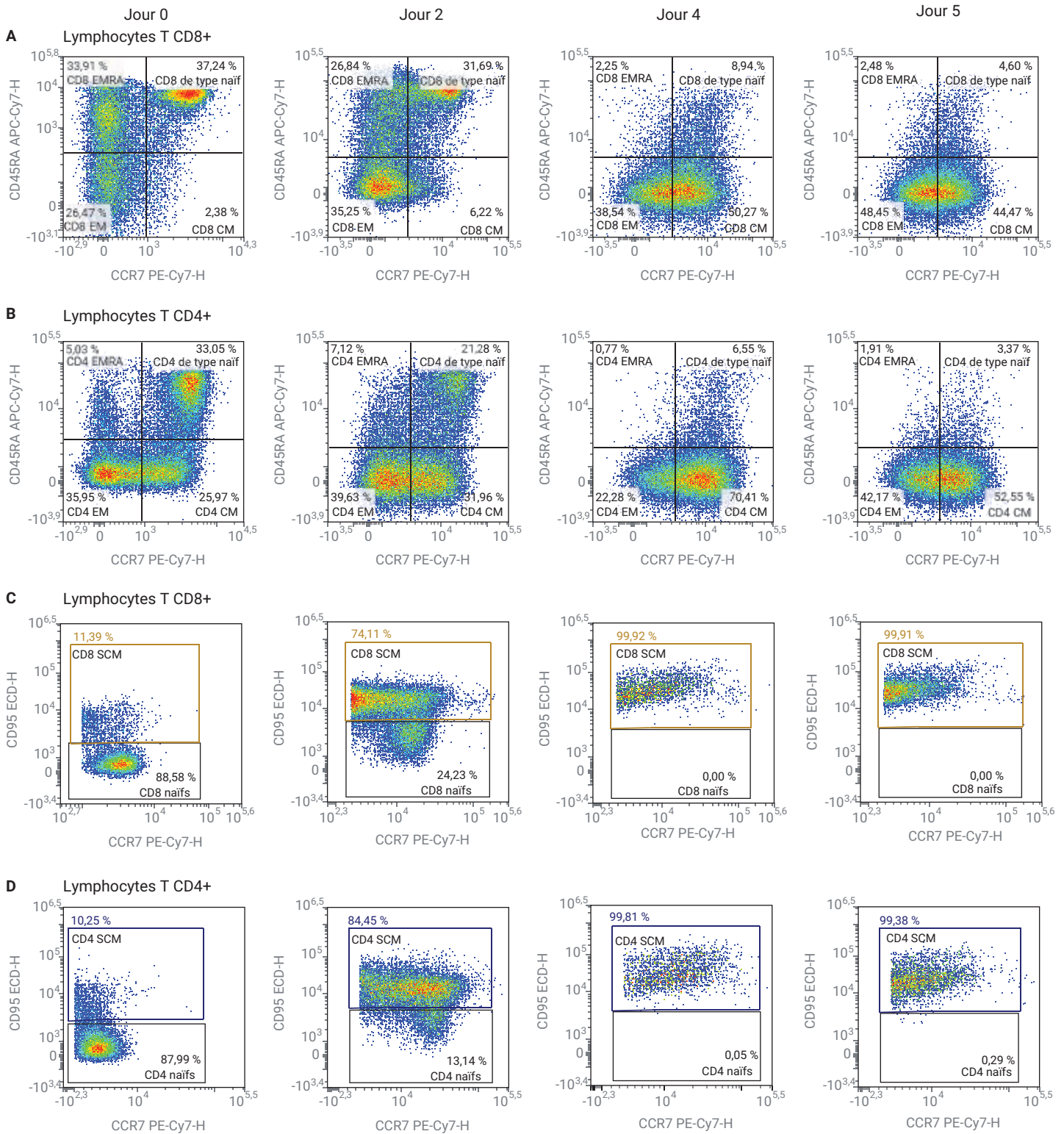


Figure 2. Les variations cinétiques des sous-populations de lymphocytes T sont continues. Des PBMC isolées à partir du sang de donneurs ont été stimulées avec 5 µg/mL d'anticorps anti-CD3, 2 µg/mL d'anticorps anti-CD28 et 100 ng/mL d'IL-2. Les PBMC stimulées ont été marquées à l'aide du panel d'immunophénotypage à 16 couleurs (tableau 1) initialement, le 2^{ème} jour et le 4^{ème} jour. Les lymphocytes ont subi une nouvelle stimulation le 4^{ème} jour, puis ont été analysés 24 h après (5^{ème} jour). L'expression de CCR7 et CD45RA a été étudiée à chaque instant avec les lymphocytes T CD8 (A) et les lymphocytes T CD4 (B) afin de déterminer la variation relative des sous-populations de lymphocytes T : de type naïf, de mémoire centrale (CM), effecteurs à mémoire (EM) et effecteurs à mémoire RA (EMRA). Les lymphocytes T : de type naïf CD8 et CD4 ont également fait l'objet d'une recherche de l'expression de CD95 pour distinguer les lymphocytes T mémoires de type cellule souche (SCM) et les lymphocytes T réellement naïfs. La proportion de lymphocytes T CD4+, de lymphocytes T CD8+ et de T_{SCM}, de T_{CM}, de T_{EM}, de T_{EMRA} et de T_{naïfs} a évolué au cours du temps.

Augmentation progressive des récepteurs inhibiteurs après stimulation par le TCR

Une stimulation continue provoque l'augmentation de l'expression des récepteurs inhibiteurs et constitue un indicateur clé de l'épuisement des lymphocytes T. La régulation négative efficace des récepteurs inhibiteurs aide à restreindre les réponses immunitaires trop exubérantes. Cependant les récepteurs inhibiteurs peuvent également entraver l'efficacité des réponses immunitaires visant à éliminer les agents pathogènes et les tumeurs. La définition de la façon dont l'action des récepteurs inhibiteurs diminue durant une stimulation aiguë et continue des lymphocytes T est essentielle au développement de manipulations thérapeutiques plus sûres et plus efficaces de ces voies.

Les marqueurs d'activation (CD25 et CD127) et les récepteurs inhibiteurs (PD-1, LAG-3 et TIM-3) ont été analysés initialement, le 2^{ème} jour, le 4^{ème} jour puis après une nouvelle stimulation le 5^{ème} jour (figure 3). La présence de CD25 a rapidement augmenté tandis que celle de CD127 a diminué dans les lymphocytes T CD8 et CD4, ce qui démontre une activation rapide des lymphocytes T. Aucun changement immédiat n'a été observé dans l'expression des récepteurs inhibiteurs après deux jours de stimulation. Cependant, après quatre jours de stimulation, la présence de PD-1, LAG-3 et TIM-3 a diminué dans les deux populations de lymphocytes T CD4 et CD8. Après re-stimulation le 5^{ème} jour par des anticorps anti-CD3/CD28,

la totalité des récepteurs inhibiteurs ont reculé. Ce phénomène a coïncidé avec la baisse de l'expression de CCR7 et celle du pourcentage des lymphocytes T_{CM} après la re-stimulation. Lorsque les lymphocytes T évoluent vers un phénotype effecteur, il est utile de réduire l'expression des récepteurs inhibiteurs. Ceci est en corrélation avec des études réalisées précédemment qui suggèrent que l'épuisement des lymphocytes T a lieu lorsque ceux-ci évoluent vers un phénotype mémoire, malgré la persistance de l'antigène. L'étude de l'expression des récepteurs inhibiteurs pour divers phénotypes et fonctions de lymphocytes T permet de comprendre comment les lymphocytes T sont modifiés dans le contexte d'une réponse immunitaire.

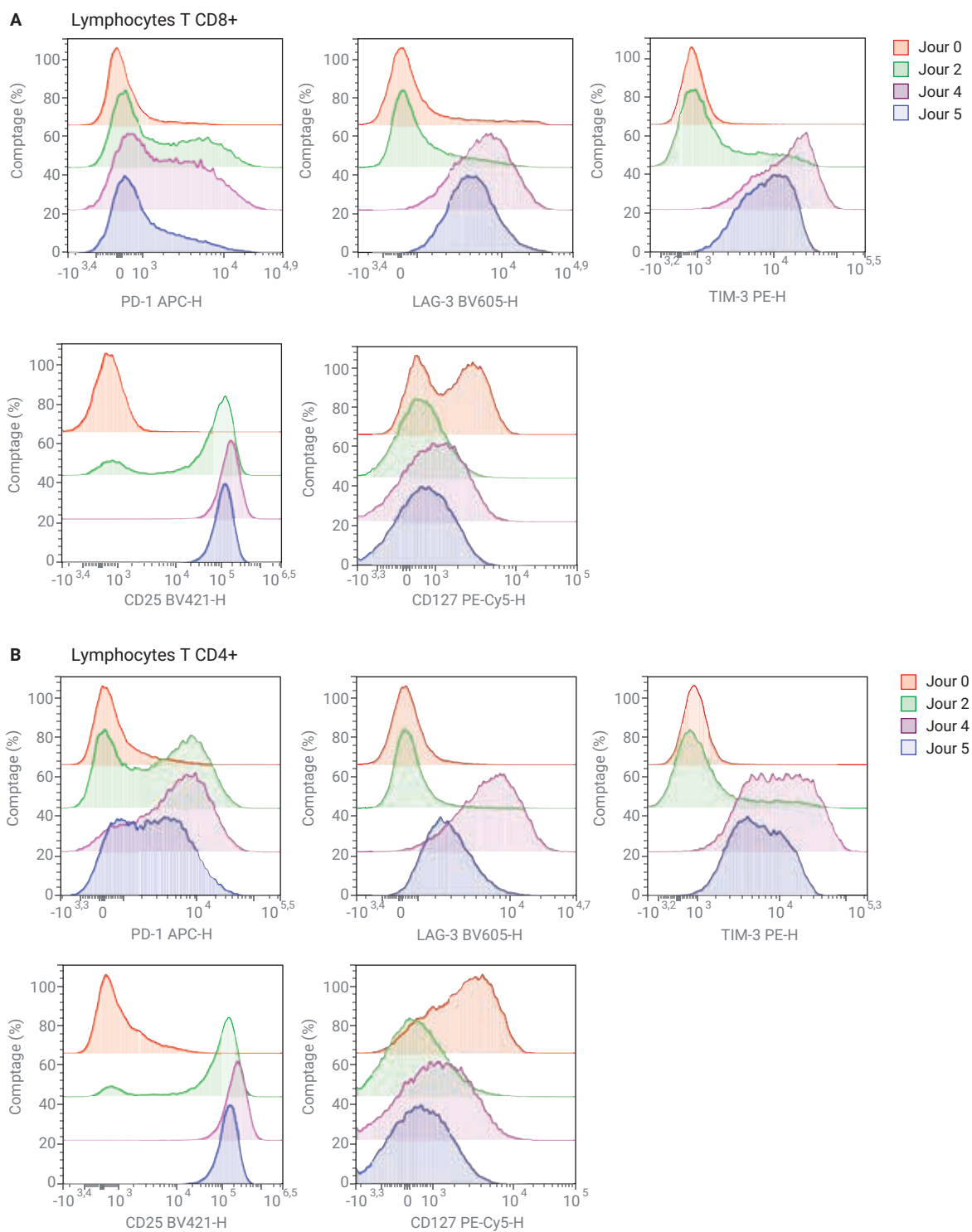


Figure 3. Évolution du niveau d'expression des récepteurs inhibiteurs et des récepteurs activateurs après stimulation. Des PBMC isolées à partir du sang de donneurs ont été stimulées avec 5 µg/mL d'anticorps anti-CD3, 2 µg/mL d'anticorps anti-CD28 et 100 ng/mL d'IL-2. Les PBMC stimulées ont été marquées à l'aide du panel d'immunophénotypage à 16 couleurs (tableau 1) initialement, le 2^{ème} jour et le 4^{ème} jour. Les lymphocytes ont subi une nouvelle stimulation le 4^{ème} jour puis ont été analysés 24 h après (5^{ème} jour). Les récepteurs inhibiteurs PD-1, LAG-3 et TIM-3 et les marqueurs d'activation CD25 et CD127 ont été analysés dans le temps.

Conclusion

Une analyse poussée des lymphocytes T permet de mieux comprendre leur réponse en étudiant simultanément leur différenciation, leur activation, leur production de cytokines et leur dégranulation. L'utilisation du NovoCyte Advanteon pour réaliser ce panel d'immunophénotypage à 16 couleurs peut également aider à élucider la réponse par les lymphocytes T en présence d'une immunité persistante face à une infection ou une tumeur.

Références

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889009/>
2. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177405>
3. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201343751>
4. <https://www.jimmunol.org/content/188/7/2957>
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481276/>
6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01215/full>
7. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.a.22938>

www.agilent.com/chem

**Destiné à la recherche uniquement.
Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.**

Ces renseignements peuvent être modifiés sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Imprimé aux États-Unis, le 9 octobre 2019
5994-1455FR