

# MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL ET IMMUNOTHÉRAPIE

Luc BARRAUD

barraud@transgene.fr

*Laboratoire Essais et Imagerie, Transgene,  
400 Bvd Gonthier d'Andernach, 67400, Illkirch-Graffenstaden, France.*

[doi.org/10.25830/afh.rfh.2020.32.119.137](https://doi.org/10.25830/afh.rfh.2020.32.119.137)

# TUMOR MICRO-ENVIRONMENT AND IMMUNOTHERAPY

## ABSTRACT

We are currently experiencing a revolution in the therapeutic management of cancer with the development of immunotherapy. The first line of these new treatments are the "Immune Checkpoint Inhibitors" (ICIs), monoclonal antibodies that suppress the inhibition of the immune system by the tumor. From the design of these drugs, the need to highlight therapeutic targets appeared essential to stratify patients in clinical trials. That's why companion tests have been developed, and these tests are immunohistochemistry (IHC) techniques. Indeed, the therapeutic targets are within the tumors and it is necessary not only to put them in evidence, but increasingly contextualize the tumor microenvironment (TME). These studies of TME showed that its composition was predictive of therapeutic responses, even beyond immunotherapies. From these findings have been developed predictive IHC tests, such as Immunoscore® in colon cancer. But we are only at the beginning of this revolution, and the number of immunotherapies are increasing, and of course the number of targets as well. In the coming years, all these strategies will need *in situ* biomarkers to explain their modes of action, their potential toxicities, and also for patient stratification. The study of the complexity of TME and the diversity of immunotherapies under development will benefit from the use of new multiplexing immunohistochemistry techniques in full evolution.

## KEY WORDS

**Tumor MicroEnvironment, immunotherapies, multiplex IHC**

## RESUME

Nous vivons actuellement une révolution dans la prise en charge thérapeutique des cancers avec l'avènement de l'immunothérapie. La première ligne de ces nouveaux traitements sont les « Immune Checkpoint Inhibitor » (ICI), des anticorps monoclonaux qui suppriment l'inhibition du système immunitaire induite par la tumeur, comme les anti PD-1 et anti PD-L1. Dès la conception de ces médicaments, la nécessité de mettre en évidence les cibles thérapeutiques est apparue essentielle pour stratifier les patients. C'est pourquoi des tests compagnons ont été développés, et ces tests sont des techniques d'immunohistochimie (IHC). En effet, les cibles thérapeutiques sont au sein même des tumeurs et il faut non seulement les mettre en évidence, mais de plus en plus contextualiser globalement le micro-environnement tumoral (TME : « Tumor MicroEnvironment »). Ces études du TME ont montré que sa composition était prédictive des réponses thérapeutiques, même au-delà des immunothérapies. De ces constatations se sont développés des tests IHC prédictifs, comme l'Immunoscore® dans le cancer du côlon. Mais nous ne sommes qu'au début de cette révolution, et le nombre d'immunothérapies se multiplie, et bien sûr le nombre de cibles également. Toutes ces stratégies auront besoin dans les années à venir de biomarqueurs *in situ* pour expliquer leurs modes de fonctionnement, leurs potentielles toxicités, mais également de biomarqueurs de sélection des patients. L'étude de la complexité du TME et la diversité des immunothérapies en cours de développement vont bénéficier de l'utilisation des nouvelles techniques d'immunohistochimie multiplexes en pleine évolution.

## MOTS CLES

**Micro Environnement Tumoral (TME), immunothérapies, IHC multiplexe**

## INTRODUCTION

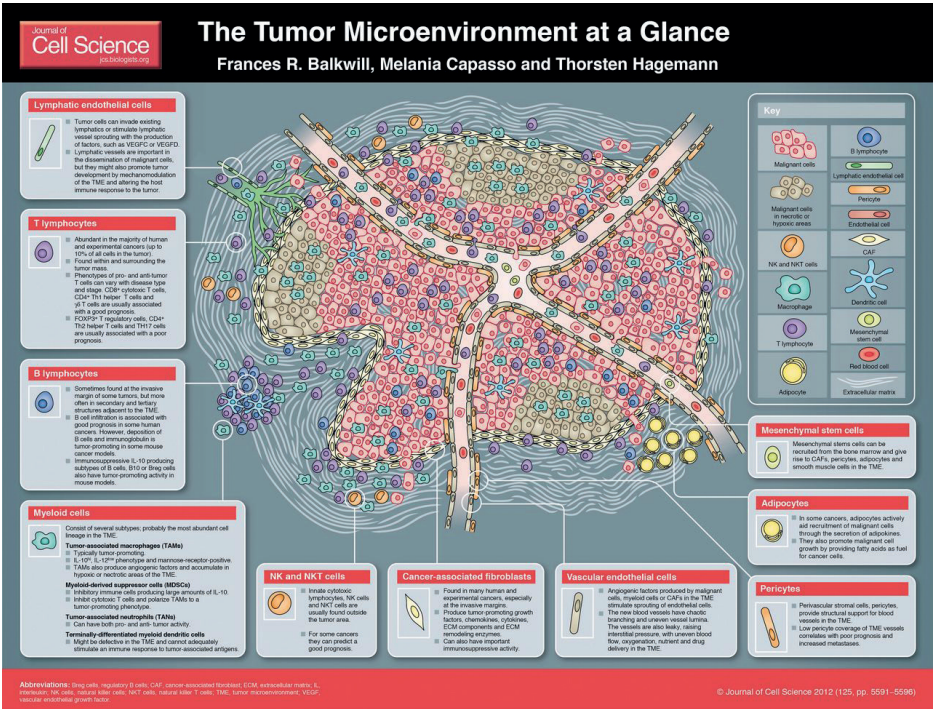
L'avènement de l'immunothérapie ces dernières années est concomitante avec l'accroissement de nos connaissances sur le développement tumoral et sur son microenvironnement. Ils mettent en exergue la relation étroite et ambiguë entre nos mécanismes de défense immunitaire et les différentes étapes qui vont conduire à la mise en place et à la persistance de cette pathologie. C'est sur la connaissance de cette relation que sont développées la plupart des stratégies immunothérapeutiques.

### Le microenvironnement tumoral

Depuis longtemps, sous nos microscopes, nous observons que les tumeurs ne sont pas de simples amas de cellules semblables, que ces tumeurs ne sont pas toujours identiques quelle que soit leur localisation. Il faut des années d'études et d'expertises aux pathologistes pour différencier les différents types de tumeurs dans les différents organes, leur nature primaire ou métastatique et leurs phylogénies cellulaires. Sur cette base histologique classique déjà complexe, l'avènement de nouvelles technologies d'immunohistologie ont permis d'entrer plus profondément dans cette complexité cellulaire.

Ainsi, comme le schématise Balkwill *et al.* [1], la masse tumorale peut être composée de nombreuses lignées cellulaires (**Figure 1**) :

- Les cellules tumorales, bien sûr, mais qui ne représentent pas forcément la majorité des cellules. Ces cellules cancéreuses peuvent être dans différents microenvironnements au sein même de la tumeur. La tumeur possède en effet des zones hypoxiques influençant le développement des cellules, mais aussi, dans des cas extrêmes induire leur lyse et conduire à des zones de nécrose.
- Un grand nombre de cellules immunitaires peuvent être observées, au sein même de la tumeur, ou dans sa périphérie :
  - Des lymphocytes : soit de l'immunité innée, comme les Natural Killer (NK) soit de l'immunité acquise, lymphocytes cytotoxiques CD8 ou régulateurs CD4, dont les T Reg mais aussi des lymphocytes B.
  - Des cellules myéloïdes : principalement des macrophages qui peuvent présenter différentes orientations phénotypiques : les macrophages M1



Figures 1 : Le micro-environnement tumoral

Le TME est constitué de nombreuses populations cellulaires. Les cellules tumorales sont entourées de différents types cellulaires, essentiellement immunitaires, mais également structurales comme les CAFs ou les cellules endothéliales. Dans cette architecture complexe, les cellules tumorales peuvent également être dans différentes conditions métaboliques, comme l'hypoxique, pouvant induire à des zones de nécrose.

- Les cellules de structure, comme les CAF (Cancer Associated Fibroblast), des cellules endothéliales vasculaires ou lymphatiques, potentiellement aussi des adipocytes.
- Les cellules tumorales, qui nous le verrons, sont plutôt antitumorales et les macrophages M2 qui sont pro-tumorales. On peut également trouver au sein des tumeurs des populations myéloïdes peu différenciées, les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells), dont l'implication dans la cancérogenèse n'est pas bien comprise [2], mais également, surtout en périphérie tumorale, des cellules dendritiques (DC).

Cette architecture déjà complexe peut également s'accompagner de structure pathologique comme de la fibrose ou de la stéatose suivant le type tumoral. Cette diversité cellulaire au sein des tumeurs, et notamment immunitaire, génère de nombreuses cibles thérapeutiques pour les produits d'immunothérapie.

## **Immunothérapie**

Ce concept d'immunothérapie est révolutionnaire dans la prise en charge thérapeutique des tumeurs actuellement et il est à la pointe de l'innovation dans la médecine actuelle, et pas seulement en cancérologie. Pourtant, ce concept d'immunothérapie date de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. En effet, W.B. Coley le « père de l'immunothérapie anti-cancéreuse » a observé, dès 1893 que l'activation de l'immunité, par exemple avec une infection bactérienne, induit des rémissions de certaines tumeurs [3]. Cette observation « antique » n'a malheureusement pas été suivie et complétée par la création de produits d'immunothérapie, sûrement par un manque de compréhension des mécanismes sous-jacents. Elle soulignait par contre le lien étroit qu'il existe entre l'immunité et le développement tumoral.

## **Système immunitaire et cancérogène**

Cette interaction immunité – cancérogène doit se concevoir comme une rupture d'équilibre, ou plutôt comme des ruptures d'équilibre.

La première rupture d'équilibre se situe entre les mécanismes d'immuno-surveillance et l'échappement des premières cellules tumorales. Dans les conditions normales, l'homéostasie cellulaire est maintenue par l'élimination de cellules lésées ou défectueuses par le système immunitaire. Ce dernier reconnaît ces cellules et les élimine par différents mécanismes, comme l'induction d'apoptose ou la phagocytose. À tout moment de notre vie des cellules subissent des événements, par exemple de type mutationnel, qui provoquent leurs dysfonctionnements, comme l'ont montré très récemment les travaux de Yizhak et *al.* dans Science [4].

Ce premier échappement permet l'implantation des premières cellules tumorales, mais il ne garantit pas forcément leur croissance sur un plus long terme. Pour cela une deuxième rupture d'équilibre est nécessaire, et cette rupture est plus étonnante car elle détourne le fonctionnement normal du système immunitaire.

Cette rupture peut se concevoir comme le déséquilibre des mécanismes d'inflammation et d'anti-inflammation. Lors d'une plaie ou d'une infection par exemple, le système immunitaire, d'abord innée (NK, macrophage ...) est activé en première ligne de défense et induit sur le site de la lésion un environnement inflammatoire. Cet environnement sera le lit des mécanismes suivant de l'immunité adaptative, spécifique des antigènes de l'intrus.

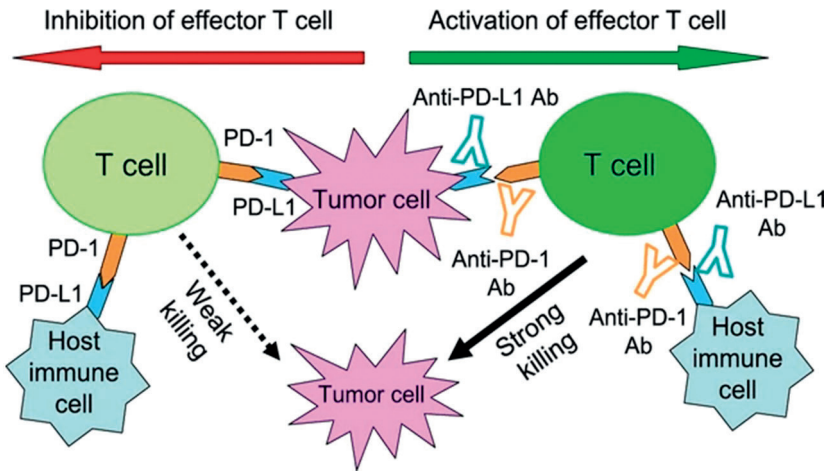
Cette première phase, inflammatoire est ensuite suivie par une phase anti-inflammatoire, pour calmer le système immunitaire, une fois l'intrus éliminé, ou la plaie en voie de guérison. Ce sont ces mécanismes anti-inflammatoires qui sont détournés de leurs fonctions dans cette deuxième rupture d'équilibre et qui permettent la persistance tumorale.

Les effecteurs de ce détournement sont nombreux, comme les macrophages, les neutrophiles, les Treg et des inhibiteurs membranaires comme les « Immune Checkpoint ». Les cellules tumorales génèrent certains de ces effecteurs et/ou des facteurs solubles qui vont maintenir cet état anti-inflammatoire, propice à leur développement en inhibant la réponse immunitaire dirigée contre elles. L'image qui décrit peut être le mieux cet état est « une plaie qui ne veut pas guérir », comme le décrit HF Dvorak [5], où les facteurs inflammatoires n'arrivent pas à « guérir le cancer ». La réponse immunitaire est bloquée par les effecteurs anti-inflammatoires. Le contrôle de cet environnement pro-tumoral peut faire intervenir différents mécanismes d'échappement et ces mécanismes sont désormais des cibles thérapeutiques pour les immunothérapies.

## Mécanismes d'échappement tumoral

### Les « Immune Checkpoint »

Les premières et plus connues de ces cibles sont les « Immune CheckPoint », avec le CTLA4 et le PD-1. Ces molécules sont des protéines membranaires que l'on retrouve sur les lymphocytes T et qui interagissent normalement avec des partenaires membranaires de cellules immunitaires anti-inflammatoires. Ces interactions inhibent la fonction cytotoxique de ces lymphocytes. Dans certains contextes tumoraux, les cellules tumorales et/ou des cellules immunitaires pro tumorales expriment les partenaires de ces molécules, le CD80 et le PD-L1. Il y a alors inhibition de la réponse immunitaire au sein de ces tumeurs (**Figure 2**, partie gauche) [6].



**Figure 2 :** Mode d'action des ICIs, inhibiteurs de l'interaction PD-1/PD-L1

Le PD-L1 est exprimé de manière constitutive dans certaines tumeurs et certaines cellules immunitaires de l'hôte. L'interaction PD-L1 avec le PD-1 exprimé par les lymphocytes CD8 entraîne le dysfonctionnement de ces cellules T et une plus faible capacité de destruction de la tumeur. Par conséquent, le blocage spécifique de la voie PD-1 / PD-L1 par les anticorps anti-PD-1 / PD-L1 peut renforcer l'immunité antitumorale.

Le mécanisme d'action des « Immune Checkpoint Inhibitors » (ICIs) est de bloquer par exemple l'interaction entre le PD-1 et le PD-L1 ; ces ICIs sont des anticorps spécifiques, soit anti PD-1, soit anti-PD-L1 [6]. Ce blocage permet de restaurer la réponse cytotoxique contre les cellules tumorales (**Figure 2**, partie droite).

Ce blocage n'est bien sûr possible que si ce mécanisme est réellement à l'œuvre dans la tumeur. Ceci explique que ces ICIs ne sont pas efficaces chez tous les patients, mais potentiellement seulement chez les patients dont les tumeurs expriment le PD-L1. Pour vérifier cette expression des tests d'immunohistochimie (IHC) ont été développés pour accompagner les essais cliniques des candidats médicaments anti PD-1 et anti PD-L1 (**Tableau 1**) [7].

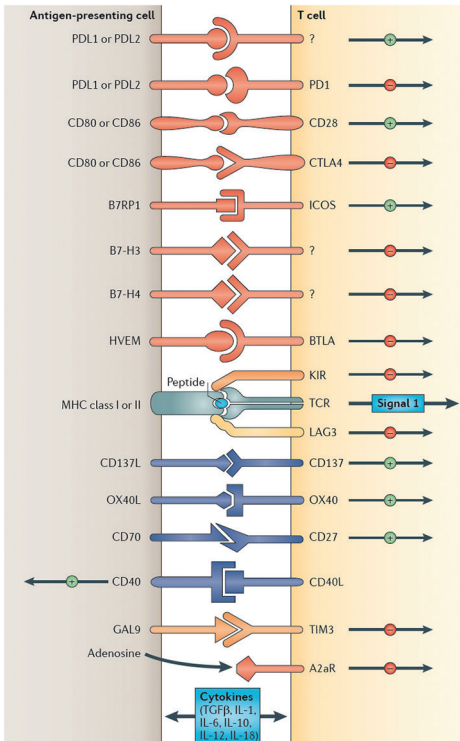
Sur ces indications thérapeutiques, nous pouvons donc souligner l'importance des analyses en immunohistochimie pour la sélection des patients susceptibles de bénéficier des thérapies par les ICIs. Et cette importance de l'IHC ne devrait pas faiblir dans les années à venir, car de nombreuses autres cibles de type ICIs sont déjà identifiées, et pourront faire l'objet de tests compagnons (**Figure 3**) [8].

Anti-PD-L1 Ab	Diagnostic Test	Primary Ab Clone	Staining Platform	Cell Component Score	PD-L1 Positivity Threshold
Nivolumab	PD-L1 IHC 28-8 pharmDx test (Complementary)	28-8	Autostainer Link 48	Tumor cell membrane (minimum 100 cells evaluated)	≥5%
Pembrolizumab	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx test (Companion)	22C3	Autostainer Link 48	Tumor cell membrane, tumor-infiltrating immune cells	≥1%
Atezolizumab	Ventana PD-L1 (SP142) assay (Complementary)	SP142	BenchMark ULTRA	Tumor cell membrane, tumor-infiltrating immune cells	Assigned a score based on expression level: - <1% - 1% to 4% - 5% to 49% - ≥50%
Durvalumab	Ventana PD-L1 (SP263) assay (Complementary)	SP263	OptiView/ BenchMark ULTRA	Tumor cell membrane	≥25%

Ab indicates antibody; PD-L1, programmed-cell death ligand-1.

**Tableau 1 : Tests de diagnostic pour l'analyse du PD-L1 en clinique**

Tests compagnons ou complémentaires développés pour la stratification des patients traités avec les différentes molécules immunothérapeutiques contre l'Axe PD-1 / PD-L1. Pour chaque produit en développement sont donnés le nom du test, le clone de l'anticorps utilisé, la plateforme d'immunostaining utilisée, les cellules cibles analysées et enfin les valeurs des seuils de positivité pour chaque test.



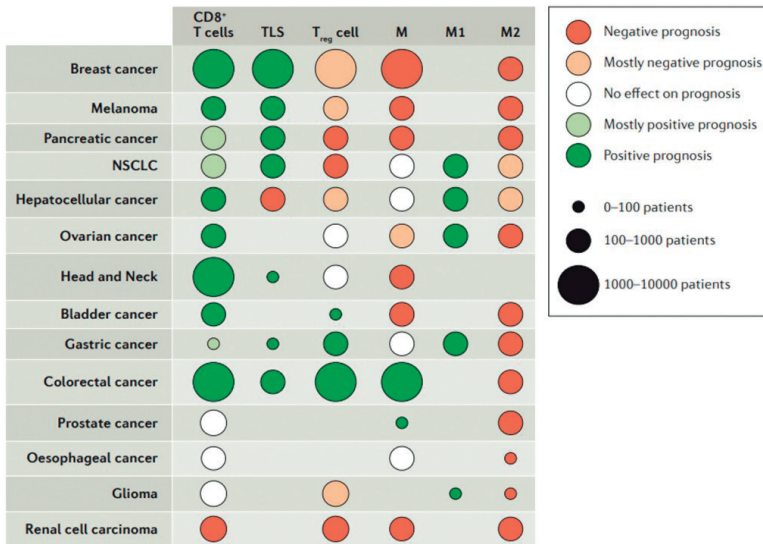
**Figure 3 : Autres « Immune-Check points » cibles thérapeutiques**

De multiples interactions co-stimulatrices et inhibitrices régulent les réponses des cellules T.

L'ensemble de ces effecteurs représentent des cibles thérapeutiques pour les immunothérapies anti-cancéreuses.

## Les effecteurs cellulaires

Mais les « Immune Checkpoints » de la réponse immunitaire ne représentent pas le seul mécanisme de résistance tumorale. En effet, il existe de nombreux autres effecteurs qui peuvent induire une persistance tumorale, comme les lymphocytes T régulateur (TReg) mais aussi et surtout les macrophages. La population de macrophage peut être très hétérogène au sein des tumeurs, elle reflète le rôle duel de ces cellules dans le processus inflammatoire et anti-inflammatoire. De ce fait, deux populations peuvent être identifiées, une antitumorale, les macrophages M1 et une autre pro tumorale, la population M2. Comme pour les ICs, la caractérisation de ces deux populations par des techniques d'IHC deviendra très importante pour le développement des immunothérapies [9].



**Figure 4 :** Effecteurs immunitaires impliqués dans le pronostic tumoral

Revue de 200 études incluant 25 000 patients. Les impacts sur la survie des patients des lymphocytes CD8, des « tertiary lymphoid structures » (TLSs), des lymphocytes T régulateurs (Treg), des macrophages CD68+ (M) et plus spécifiquement des macrophages M1 ou M2 ont été étudiés. La couleur verte indique un impact positif sur la survie, et la couleur rouge, un négatif; les couleurs orange et verte claire des impacts négatifs ou positifs moins marqués. La couleur blanche indique une absence d'impact. La taille des cercles indique le nombre de patients enrôlés dans les études : petit cercle : 0–100 patients ; cercle moyen : 100–1 000 patients et grand cercle : 1 000–10 000 patients.

## Autres mécanismes d'échappement tumoral

Outre les « Immune CheckPoint » et les effecteurs cellulaires, il existe d'autres mécanismes d'échappement des tumeurs aux thérapies. On peut par exemple noter que de nombreuses tumeurs perdent leur capacité à exprimer correctement le MHC I, élément essentiel de la reconnaissance du soi par le système immunitaire et donc aux stratégies d'immunothérapie ciblées [10]. Ces tumeurs deviennent ainsi « en-dehors » du système immunitaire, et quasiment invisible aux attaques par les lymphocytes CD8 cytotoxiques. Les tumeurs peuvent également exprimer des enzymes telle que l'IDO (indole déhydrogénase) amine qui induit une déprivation de tryptophane [11] ou l'ADA, qui favorise la formation d'inosine [12], deux conditions inhibitrices de l'activité des CD8.

## Rôle pronostique du TME dans le développement tumoral

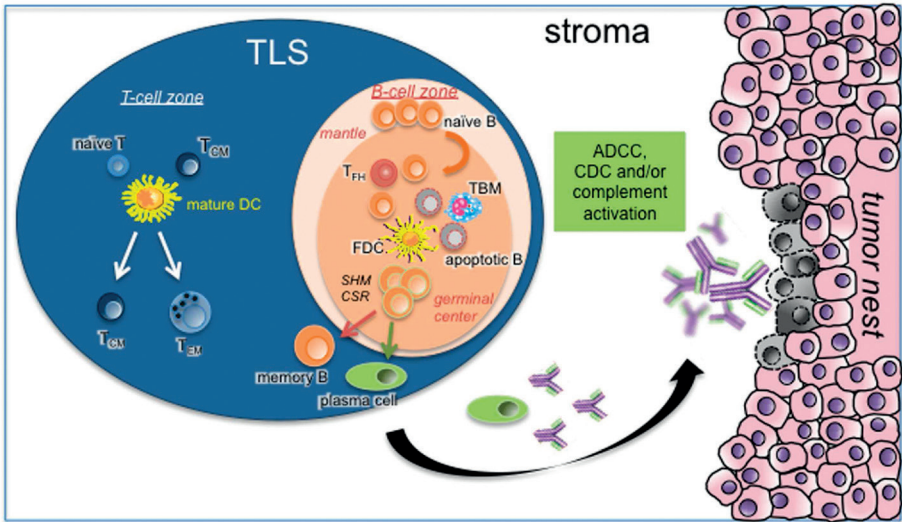
Le TME peut donc être composé d'effecteurs pro et/ou antitumoraux et cette composition peut être pronostique de l'évolution des tumeurs. Ainsi, Fridman *et al.* ont observé rétrospectivement sur de nombreuses études, que la présence de ces différents effecteurs est favorable ou défavorable au pronostic de la maladie cancéreuse (**Figure 4**) [13]. Dans ces effecteurs, la plupart cellulaires, on peut souligner également des entités supra cellulaires comme les TLS (Tertiary Lymphoid structure), qui sont de bon pronostic et qui semble, de par leur composition, participer à une réponse immunitaire acquise contre les tumeurs (**Figure 5**) [14].

En conclusion, nous voyons que le TME est complexe, avec de nombreux effecteurs immunitaires potentiellement anti ou pro tumoraux. La composition de ce TME, la localisation de ces effecteurs au sein de la tumeur, et les conditions d'accessibilité et/ou métaboliques particulières vont influencer le devenir de la croissance tumorale, mais également les réponses aux immunothérapies comme décrit par Galluzzi *et al.* (**Figure 6**) [15].

Pour accompagner les développements des produits d'immunothérapies, dirigées en grande partie sur les effecteurs décrits précédemment, il devient crucial de caractériser de manière exhaustive le TME.

## **Analyse du TME**

En effet, avec la multiplication des cibles thérapeutiques, et la connaissance accrue du TME et des effecteurs anti et pro tumoraux, il est nécessaire désormais d'avoir



**Figure 5 :** Structure d'un TLS : « Tertiary Lymphoid Structure »

Le TLS représente un site important où les lymphocytes T et B peuvent subir une différenciation terminale en cellules effectrices anti tumorales. Cette activation est réalisée en contact avec des cellules dendritiques folliculaires (FDC). Ces cellules effectrices induisent ensuite différents mécanismes antitumoraux comme l'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) ou le CDC (cytotoxicité dépendante du complément).

des outils performants pour comprendre le mode d'action des immunothérapies.

Dans ce cadre, et de l'expérience des premiers tests compagnons développés pour les ICLs de l'axe PD-1 / PD-L1, la place de l'immunohistochimie deviendra dans les années à venir prépondérante. Bien sûr, avec les nouveaux outils développés, et à venir, le multiplexage sera essentiel pour répondre à des questions multiples.

Le premier pas a déjà été franchi par l'Immunoscore® développé par l'équipe Jérôme Galon [16]. Ce duplex a été validé techniquement et cliniquement comme prédictif des réponses thérapeutiques dans le cancer du côlon. Dans ce test, les présences des lymphocytes CD3 et CD8 sont analysées mais également leurs localisations dans et en bordure de la tumeur (« invasive margine »). De ces paramètres (quantité et localisation) sont définis des scores de 1 à 4 associés au pronostic thérapeutique [17].

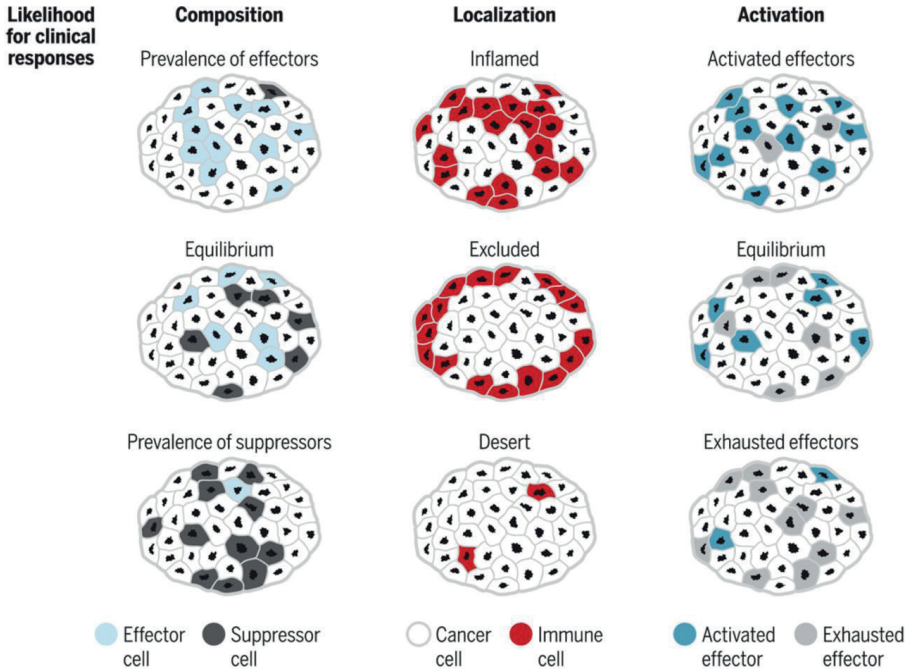


Figure 6 : Impact de l'organisation du TME sur la réponse clinique aux thérapies

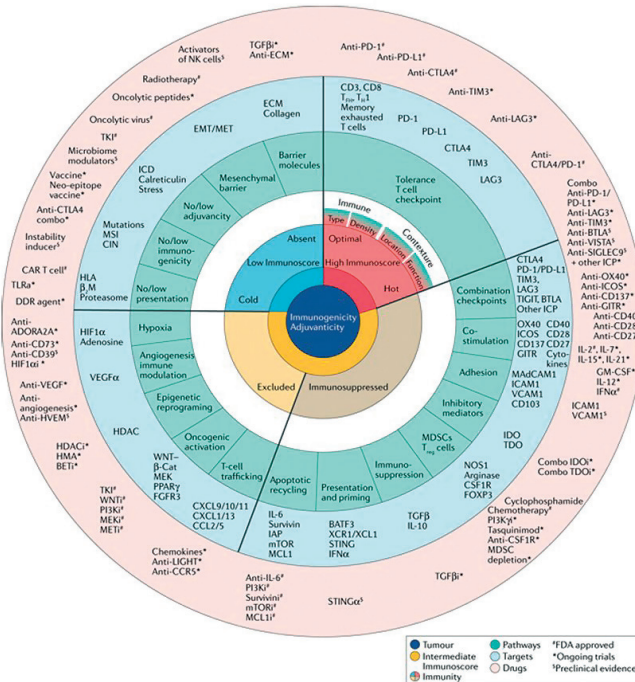
Schématisation de la probabilité de réponse clinique aux thérapies en fonction de la composition du TME en cellules immunitaires (pro ou anti tumorales), de leurs localisations au sein de la tumeur (ou en périphérie) et de leur état d'activation (ou de leur inhibition).

## Notion de température tumorale

Avec l'Immunoscore®, et les analyses d'immunophénotypage globales des tumeurs, la notion de « température » des tumeurs est apparue. Cette analogie médicale nous ramène à l'équilibre inflammation – anti-inflammation, et la présence des différents effecteurs cités précédemment. En fonction de sa composition le TME permet de classer les tumeurs selon plusieurs phénotypes comme l'a suggéré l'équipe de Galon [18].

On peut définir des tumeurs dites chaudes, à fort Immunoscore®, infiltrées par les effecteurs antitumorales comme les lymphocytes CD8, que l'on peut considérer comme inflammatoire. Les tumeurs dites froides possèdent un faible Immunoscore®

et sont non inflammatoires. Mais bien sûr la classification immunologique des tumeurs n'est pas binaire et des formes intermédiaires existent. Deux autres classes peuvent également être considérées, les tumeurs dites « immuno exclues », où le système immunitaire est totalement absent et les immuno-suppresseurs, où le système immunitaire est présent, donc inflammatoire, mais contraint par des phénomènes inhibiteurs. Avec la **Figure 7**, Galon et al. résumant ces différentes catégories, avec les effecteurs impliqués, et les immunothérapies potentiellement utilisables dans ces différents contextes.



**Figure 7 :** Cycle de classification immuno-tumorale comme outils de sélection des thérapies anticancéreuses

Représentation des différents profils immunologiques tumoraux. Le centre symbolise la tumeur, puis en partant vers l'extérieur nous avons les 4 types tumoraux associés avec l'ImmunoScore® : tumeur chaude (ImmunoScore® élevé), tumeur froide (faible ImmunoScore®), les tumeurs exclues et Immunosupprimées (ImmunoScore® intermédiaires). Les cercles successifs décrivent ensuite pour chaque type tumoral : les voies impliquées dans le phénotype, puis les cibles d'immunothérapies associées à ces voies et enfin, les stratégies d'immunothérapies qui peuvent être envisagées dans chaque circonstance.

## Stratégies d'analyse du TME par IHC multiplex

Pour appréhender cette complexité du TME, de nombreuses technologies d'histologie multiplexe existent. La plus fréquente est l'IHC multiplexe de type OPAL avec l'utilisation des TSA qui permet un bon multiplexage (jusqu'à 6/7 marqueurs maintenant) [19]. Mais de nombreuses autres technologies existent comme le NanoString [20], l'InSituPlex [21] et d'autres promettant un multiplexage très haut débit comme l'Imaging Mass Spectrometry (IMS), le MultiOmyx™ ou le CyTOF (voir pour revue [22]).

Mais quelles sont les stratégies à adopter pour répondre aux besoins des développements des immunothérapies ?

La première est dans la continuité de l'Immunoscore®, à savoir le développement de panels multiplex restreints, de 2 à 4 marqueurs. La seconde peut être plus apparentée aux technologies de type NGS pour le séquençage, très haut débit, avec une analyse multiparamétrique importante, et une recherche de très nombreux marqueurs.

### Analyse haut débit

L'analyse multiparamétrique haut débit a son intérêt sur les phases précoces de développement d'un produit d'immunothérapie, surtout si ce produit n'a pas un effet très ciblé. En effet, dans ce contexte, de nombreux paramètres peuvent être impactés par la thérapie, et une analyse exhaustive va permettre de déterminer des biomarqueurs qui seront ensuite d'importance pour la suite du développement. Cependant la limite de ces technologies haut débit est l'impossibilité de valider ces processus complexes techniquement. Ces méthodes multiplex ne pourront pas devenir des tests compagnons des développements des immunothérapies.

### Stratégies ciblées

La stratégie de panels ciblés, quoi que moins informative, a l'avantage d'une analyse simple, qui peut potentiellement être validée technologiquement, voire même cliniquement, comme pour l'Immunoscore®. La mise en œuvre de cette stratégie est applicable dans les laboratoires de routine d'histopathologie, moyennant un investissement réaliste. Ces panels simples qui permettent d'étudier le mécanisme d'action des immunothérapies pourront devenir des tests compagnons.

A l'heure de l'avènement de la médecine personnalisée, le développement de tests compagnons devient essentiel. Ces tests permettent de sélectionner les patients les plus à même de bénéficier des stratégies thérapeutiques mises en œuvre. Cette stratification est à la fois importante ; pour les patients traités qui ont plus de chance de répondre aux traitements ; pour les entreprises qui développent les traitements, en augmentant le taux de succès des essais cliniques ; et au final, pour les organismes de remboursement de ces thérapies onéreuses avec moins de remboursement à faire.

Dans la complexité du TME que nous avons décrite, ces deux stratégies peuvent être complémentaires et surtout séquentielles. Sur les premiers essais précliniques ou cliniques précoces, des analyses exhaustives par des technologies haut débit peuvent permettre de dégager des marqueurs potentiellement intéressants. Une deuxième phase avec des combinaisons restreintes de ces biomarqueurs peut alors être évaluée, puis validée analytiquement et cliniquement. Toutes ces technologies de multiplexage ont donc une place et un intérêt dans le processus de développement des immunothérapies.

## CONCLUSION

Nous avons donc vu que le TME est particulièrement complexe, et il peut être très variable en fonction du type tumoral, avec des tumeurs dites chaudes (inflammatoires), froides, immunodéprimées, immuno-exclues... Pour traiter ces tumeurs, de nombreuses stratégies d'immunothérapies sont en cours de développement, comme les ICIs avec de nombreuses cibles étudiées, les « CAR-T cell », la vaccinothérapie, les virus oncolytiques [18, 23].

Cette confrontation de complexité, TME *versus* stratégies immunothérapeutiques, s'accompagne du développement de nouveaux outils d'histologie, avec l'avènement de l'IHC multiplex et d'autres techniques très haut débit et également très complexes.

Cette nouvelle ère de l'histologie peut être comparable à l'avènement il y a quelques années de la biologie moléculaire puis de la génomique, d'abord avec des techniques simples, comme la PCR, puis avec l'explosion du séquençage

haut débit. Cette analogie peut se poursuivre sur la logistique nécessaire pour ces différentes technologies. En effet, dans les deux cas, de grandes quantités de données sont générées, ce qui pose d'une part une problématique de stockage, et d'autre part une complexité d'analyse multiparamétrique.

Cette nouvelle évolution de l'histologie, que nous avons décrite pour le moment en 2 dimensions, évolue également de plus en plus vers des modèles en 3 dimensions. Ces modèles sont déjà utilisés en préclinique sur des cultures d'organoïdes, mais les développements technologiques vont rapidement nous mener sur des modèles humains en 3D, par exemple sur l'utilisation directe d'exérèses ou de biopsies de patients [24, 25] ou des « organ on chips » [26] pour tester les produits en développement .

L'analyse de ces données complexes devrait dans les années à venir bénéficier de l'apport de l'intelligence artificielle avec le développement d'algorithmes spécifiques permettant non seulement de quantifier les effecteurs immunitaires, mais également d'étudier leurs interactions spéciales.

Enfin, ces nouvelles méthodes d'histologie, qui remettent nos métiers au cœur du développement des immunothérapies auront besoin d'étapes de validation technique et clinique, comme pour les tests compagnons des anti-PD-1/PD-L1 [7]. Mais ces validations seront d'une complexité croissante avec le multiplexage et ne pourront difficilement être réalistes au-delà de 4 à 5 biomarqueurs, ce qui semble amplement suffisant pour accompagner l'ensemble des stratégies d'immunothérapies.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BALKWILL F.R., CAPASSO M. & HAGEMANN T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* (2012), **125** (Pt 23): 5591-5596.
2. TESI R.J. MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends Pharmacol Sci* (2019), **40** (1): 4-7.
3. COLEY W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *American Journal of the Medical Sciences* (1893), **10**: 487-511.

4. YIZHAK K., et al. RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues. *Science* (2019),**364** (6444).
5. DVORAK H.F. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* (2015),**3** (1): 1-11.
6. TANG F. & ZHENG P. Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy? *Cell Biosci* (2018),**8**: 34.
7. GRIGG C. & RIZVI N.A. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *J Immunother Cancer* (2016),**4**: 48.
8. PARDOLL D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* (2012),**12** (4): 252-264.
9. EDIN S., et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One* (2012),**7** (10): e47045.
10. CHOWELL D., et al. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science* (2018),**359** (6375): 582-587.
11. KATZ J.B., MULLER A.J. & PRENDERGAST G.C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* (2008),**222**: 206-221.
12. ALLARD B., et al. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* (2013),**19** (20): 5626-5635.
13. FRIDMAN W.H., et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Nature reviews. *Clinical oncology* (2017),**14** (12): 717-734.
14. GERMAIN C., GNJATIC S. & DIEU-NOSJEAN M.C. Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol* (2015),**6**: 67.
15. GALLUZZI L., et al. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci Transl Med* (2018),**10** (459).
16. PAGES F., et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* (2018),**391** (10135): 2128-2139.
17. KIRILOVSKY A., et al. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int Immunol* (2016),**28** (8): 373-382.
18. GALON J. & BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* (2019),**18** (3): 197-218.

19. PARRA E.R., et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci Rep* (2017),**7** (1): 13380.
20. BLANK C.U., et al. Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat Med* (2018),**24** (11): 1655-1661.
21. TOKI M.I., et al. High-plex predictive marker discovery for melanoma immunotherapy treated patients using Digital Spatial Profiling. *Clin Cancer Res* (2019).
22. PARRA E.R., FRANCISCO-CRUZ A. & WISTUBA, II. State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues. *Cancers* (Basel) (2019),**11** (2).
23. TANG J., et al. Trends in the global immuno-oncology landscape. *Nat Rev Drug Discov* (2018),**17** (12): 922.
24. LEE S.S., et al. Nondestructive, multiplex three-dimensional mapping of immune infiltrates in core needle biopsy. *Lab Invest* (2018).
25. MAJUMDER B., et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. *Nat Commun* (2015),**6**: 6169.
26. NGUYEN M., et al. Dissecting Effects of Anti-cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments. *Cell Rep* (2018),**25** (13): 3884-3893 e3883.