

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'IMMUNOHISTOCHIMIE MULTIPLEX QUANTITATIVE POUR L'ANALYSE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE TUMORAL

Sandrine COCHIN ^{1,*}, Carine REYMANN ^{1,*},
Nadine KEHRER ², Luc BARRAUD ^{1,**}

cochin@transgene.fr

reymann@transgene.fr

kehrer@transgene.fr

barraud@transgene.fr

1. Transgene, Laboratoire Essais et Imagerie, 400 bvd Gonthier d'Andernach, 67400 ILLKIRCH GRAFFENSTADEN, France.
2. Transgene, Département des maladies infectieuses, Centre d'Infectiologie : 321 Avenue Jean Jaurès, 69007 LYON, France.

**Ont contribué de façon égale à ce travail.*

***Auteur correspondant*

RESUME

Le contexte immunitaire influence la progression tumorale et le devenir des patients sous thérapies antitumorales. Plus précisément, le microenvironnement tumoral (TME) influence la progression des tumeurs et est désormais la cible des nouvelles immunothérapies. L'étude de cet environnement est désormais indispensable pour accompagner les traitements des patients.

L'objectif de cette étude est de développer et d'évaluer des panels d'immunohistochimie (IHC) multiplex pour analyser le TME. L'IHC multiplex peut permettre d'analyser la complexité du TME et d'étudier directement *in situ* les interactions entre les nombreuses populations cellulaires qui le composent. Dans cette étude préliminaire, nous avons développé un panel pour l'analyse des lymphocytes infiltrants la tumeur (TIL), et réalisé une évaluation de la méthode d'analyse des images.

La méthode utilisée est une IHC multiplex révélée en immunofluorescence (IF) avec le système d'amplification du signal à la tyramide (TSA) développé par Perkin Elmer sous le nom de système Opal suite à un partenariat. Cette technologie a été notamment adaptée sur l'automate Leica BOND RX^m utilisé pour cette étude. Pour l'analyse des TIL, nous avons développé un panel CD4, CD8 et CD20 permettant de cibler respectivement les lymphocytes T helper, T cytotoxiques et B. Après l'IF multiplex et le scan des lames, les marqueurs ont été quantifiés par analyse d'image en utilisant le logiciel CaloPix de Tribvn. La méthode d'analyse a été évaluée en étudiant la justesse des résultats quantitatifs obtenus en multiplex par rapport aux analyses simples et la reproductibilité du process, réalisé par plusieurs opérateurs. Ces analyses ont été faites sur plusieurs types tumoraux : cancer du poumon (NSCLC), du sein (BC) du pancréas (PC), du cerveau, un glioblastome (G) et un cancer du foie (HCC). La variabilité induite par la nature de l'échantillon a également été adressée. Résultats : Nous avons observé que la justesse de l'analyse multiplex est impactée par le type tumoral étudié. Une bonne correspondance entre les simplex et le multiplex est observée pour les BC, PC et NSCL, mais est plus difficile à obtenir pour le Glioblastome et le HCC.

La reproductibilité est également impactée par la nature du tissu. Ces premiers résultats montrent que la standardisation de la méthode d'analyse reste à parfaire pour diminuer ces variations.

En conclusion, le développement de nouveaux biomarqueurs *in situ* est fondamental pour comprendre le fonctionnement du microenvironnement tumoral et des nouveaux produits d'immunothérapie. Nous décrivons ici un exemple de développement d'IHC multiplex quantitative, outil qui sera essentiel pour analyser le système immunitaire *in situ* et pour accompagner les traitements des patients. Nous soulignons également que les méthodes d'analyses de ces IHC nécessiteront des process de validations à ne pas négliger avant une utilisation automatisée.

MOTS CLES

Immunophénotypage tumoral, OPAL, IHC multiplex quantitative, immunothérapie, TIL (Tumor infiltrating Lymphocyte).

ABSTRACT

Immune background influences cancer progression and clinical outcome of patients. The tumor microenvironment (TME) is the bed of cancer progression and the target of developing drugs.

The objective of this work is to develop and evaluate multiplex ImmunoHistoChemical (IHC) panels to analyze the immuno-phenotype of human cancer TME. Multiplex IHC can be used to analyze the complexity of TME and to study directly *in situ* the interactions between the many cellular populations that compose it. We describe here the preliminary work on the analysis of the Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL), and the evaluation of the process we performed on image analysis. Methods of labelling are based on a Tyramide Signal Amplification (TSA) fluorescence (IF) coupled developed by PerkinElmer (Opal® technology) and realized on Leica BOND RX^m system. For TIL analysis, we developed a panel composed of CD4, CD8 and CD20 markers allowing to respectively detect T helper, T cytotoxic and B lymphocytes. After multiplex OPAL labelling and slide scanning, quantifications of all markers were performed using CaloPix software from Tribvn. These analyses were performed on human tumors: Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC), Breast carcinoma (BC), Pancreatic carcinoma (PC), Glioblastoma (G) and Hepatocellular Carcinoma (HCC). Results: We observed that accuracy of the image analysis method

for TIL quantification was variable depending of the tumor. We observed globally a good concordance between simplex and multiplex quantification in BC, PC and NSCLC. This concordance was more difficult to obtain with G and HCC and further improvements need in the formalization of the analysis process. In conclusion, the development of new *in situ* biomarkers is fundamental to understand the influence of TME on tumor progression for immunotherapeutic development. We describe here the development of multiplex IHC panel for TIL analysis that will allow the immune "phenotyping" of this TME. We highlight also that the analysis process of these multiplex IHC will need to be correctly validated before use in an automatic way.

KEY WORDS

Tumor immunophenotyping, OPAL, quantitative multiplex IF, immunotherapy, TIL (Tumor infiltrating Lymphocytes)

INTRODUCTION

Les thérapies anticancéreuses sont actuellement en pleine révolution avec l'arrivée des produits d'immunothérapie (« Breakthrough of the year 2013 ») [1]. Ces nouveaux traitements mettent également en lumière l'importance du système immunitaire dans la cancérogenèse. En fait, le paradigme de la cellule tumorale dérégulée échappant à tout contrôle biologique par modifications successives (lésion nucléique inhibant l'apoptose, perte de l'inhibition de croissance par contact etc...) [2] et envahissant ensuite le corps est remise en cause par les découvertes sur la relation entre la tumeur et le système immunitaire [3, 4].

Bien évidemment, nous savions de longue date que la tumeur devait également échapper au système immunitaire pour croître. Les très anciens travaux du Dr W.B. Coley à la fin du XIX^{ème} siècle montrait qu'une activation du système immunitaire, par exemple par une infection bactérienne ou virale permettait, dans certains cas, des régression tumorales [5], travaux malheureusement un peu oubliés. Il est à noter que ces connaissances ont conduit à des thérapies à base de pathogènes inactivés comme le BCG (vaccin Bilié de Calmette et Guérin), toujours utilisé pour traiter le cancer de la vessie [6].

Mais nous savons désormais que les choses sont beaucoup plus complexes et intriquées qu'il n'y paraissait d'un point de vu macroscopique. Les mécanismes sont multiples et variés, et le système immunitaire participe finalement à la croissance tumorale, il est détourné de son rôle : comme « essayer de guérir une plaie qui ne se cicatrise jamais » [7]. Une fois la pathologie installée, la croissance des tumeurs n'est possible, que si le système immunitaire du patient, l'« hôte », ne réagit pas de façon adéquate.

La notion de plaie sans guérison souligne bien que l'inflammation s'avère être le lit de la cancérogenèse et parler d'« hôte » pour un patient fait référence à l'immunotolérance qui s'installe entre ce « corps étranger » et l'organisme [8, 9].

Cette relation d'équilibre est particulièrement illustrée au sein même de la tumeur. En effet, une tumeur n'est en fait constituée que de peu de cellules tumorales à proprement parlé. On l'estime souvent à 50% des cellules, le reste étant constitué de cellules immunitaires : macrophages, MDSC, neutrophiles, lymphocytes ; mais aussi des cellules de structures, CAF (« Cancer Associated Fibroblast »), épithélium divers, vaisseaux.

Dans ce TME, tous ces types cellulaires deviennent désormais des cibles thérapeutiques potentielles, soit à activer et/ou à désinhiber comme les CD8 via la voie PD-1/PD-L1, soit à reprogrammer, comme les TAM (Tumor Associated Macrophages) M2 en M1, soit à détruire comme les Treg ou les CAF [10, 11].

Dans ce contexte, on comprend rapidement que l'étude et la caractérisation de la composition du TME deviennent un enjeu majeur dans le domaine du traitement anticancéreux. Cette analyse du microenvironnement tumoral influencera fortement la prise en charge thérapeutique des patients avec l'avènement des futures immunothérapies encore en développement [12].

Dans cette étude, nous avons développé un panel pour étudier plus précisément la composition de l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs, les TILs. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la variabilité de la méthode d'analyse réalisée par différents opérateurs ainsi qu'à l'impact de la nature des échantillons étudiés en termes de spécificité (analyse multiplex versus analyse simplex) et de reproductibilité.

MATERIELS ET METHODES

Nature des tissus

Pour étudier l'impact de la nature des tissus sur la méthode d'analyse des TIL, nous avons réalisé les marquages Immunohistochimiques multiplex en fluorescence (IHC-F) sur 5 types tumoraux : un cancer du poumon (Non Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC), du sein (Breast Carcinoma, BC) du pancréas (Pancreatic Carcinoma, PC), une tumeur du cerveau, (Glioblastome, G) et du foie (Hepatocellular Carcinoma, HCC). La société Indivumed GmbH nous a fourni ces blocs de tumeurs humaines en FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded). Cette société garantit l'obtention des échantillons selon les législations sur la protection des personnes (consentements éclairés...) mais également que les prélèvements sont réalisés selon les protocoles standardisés certifiés ISO et le plus tôt possible après l'acte chirurgical, ce qui permet d'optimiser la qualité des échantillons.

Pour chaque bloc, des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica, RM2255) et déposées sur lames (Thermo Scientific™ SuperFrost® Plus).

Immunohistochimie

Les IHC-F ont été effectuées sur automate BOND RX^m (Leica). Le déparaffinage des lames ainsi que le démasquage antigénique chimique à chaud en Bond ER solution 2 ont été réalisés selon le protocole Leica.

Le process OPAL (Kit Opal 3-plex, Perkin Elmer) permet la réalisation séquentielle de plusieurs marquages via des anticorps, quelles que soient leurs espèces d'origine (**Figure 1**). Le principe repose sur la révélation d'anticorps couplés à l'HRP (Horse Raddish Peroxydase) par la TSA Plus (Tyramide Signal Amplification Plus) couplée elle-même à un fluorochrome [Fluorescein isothiocyanate (FITC) ou Cyanine 3 (Cy3) ou Cyanine 5 (Cy5)]. La tyramide est activée par l'HRP et se lie aux résidus tyrosine, riches en électrons présents autour du site de reconnaissance antigénique. Après la révélation du premier anticorps, une étape de « démasquage », ou cycle de chauffe, permet d'éliminer les anticorps de la première réaction et d'éviter ainsi les cross-réactions entre anticorps (primaires et secondaires) tout en conservant la fluorescence. En effet, les liaisons covalentes entre les tyramides et les tyrosines du tissu ne sont pas impactées par ces cycles de chauffe. Le cycle suivant peut ensuite être réalisé de la même façon à l'aide d'une TSA Plus couplée à un fluorochrome différent.

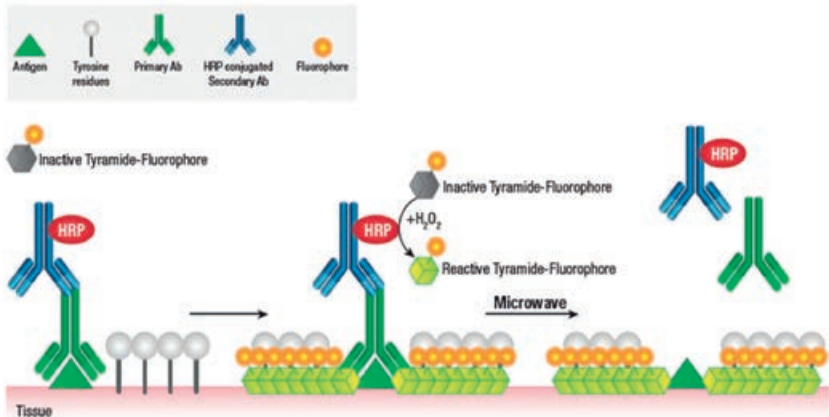


Figure 1 : Descriptif simplifié de la procédure d'immunofluorescence multiplex OPAL. Le signal est amplifié via l'activation de la TSA par le HRP sur le site de reconnaissance Ag/Ac. La TSA activée se fixe ensuite sur les résidus tyrosine environnants, puis le complexe anticorps primaire/anticorps secondaire est éliminé par le cycle de chauffe pour permettre le marquage suivant avec un autre fluorochrome.

Dans notre étude, 3 marquages successifs ont été réalisés, les cellules étudiées sont :

- les lymphocytes régulateurs CD4+ (pouvant être positifs ou négatifs sur la progression tumorale et/ou sur les traitements d'immunothérapie).
- les lymphocytes cytotoxiques CD8+ (effecteurs positifs de la réponse immunitaire)
- les lymphocytes B CD20 + (effecteurs de la réponse humorale).

Ces populations lymphocytaires sont marquées de façon indirecte, respectivement, par les fluorochromes FITC, Cy5 et Cy3.

Lors du développement de ces marquages multiplex, l'ordre des marquages a été étudié (résultats non montrés), pour déterminer la meilleure séquence de réalisation. En effet, il a été montré que la sensibilité des épitopes aux démasquages multiples influence les résultats du système OPAL [13] et qu'il faut donc bien optimiser l'ordre des marquages.

Parallèlement, des contrôles isotypiques (de même isotype, à la même position et à la même concentration pour chaque anticorps primaire) ont été effectués pour valider la spécificité de chaque marqueur. En effet, la validation du triplex nécessite de tester toutes les combinaisons possibles entre les différents isotypes contrôles et les divers anticorps primaires utilisés. Cela permet de s'assurer de l'absence de cross-réaction entre anticorps et de la spécificité des marquages. Pour cela, 8 lames contrôles sont nécessaires et les résultats attendus sont récapitulés dans le **Tableau I**. Ces essais contrôles ont été effectués sur amygdales et tissus cancéreux. Le marquage multiplex (CD4-CD8-CD20) ainsi que les simples détections (CD4, CD8 et CD20) ont été réalisés par un seul opérateur sur les différents échantillons de tissus.

Anticorps

Les anticorps commerciaux suivants ont été utilisés : anti-CD4 à 0,135 µg/mL (Novocastra, NCL-CD4-368), anti-CD8 à 0,04 µg/mL (Dako, M 7103) et anti-CD20 à 0,025 µg/mL (Dako, M 0755) ainsi que le système de détection de polymère (Leica, RE7260-K).

1 ^{er} marquage	2 ^{ème} marquage	3 ^{ème} marquage	Observations
TSAPlus-FITC	TSAPlus-Cy5	TSAPlus-Cy3	
IC _{CD4}	IC _{CD8}	IC _{CD20}	Aucun marquage
CD4	IC _{CD8}	IC _{CD20}	Marquage vert uniquement
IC _{CD4}	CD8	IC _{CD20}	Marquage magenta uniquement
IC _{CD4}	IC _{CD8}	CD20	Marquage orange uniquement
CD4	CD8	IC _{CD20}	Marquage vert et magenta
IC _{CD4}	CD8	CD20	Marquage magenta et orange
CD4	IC _{CD8}	CD20	Marquage vert et orange
CD4	CD8	CD20	Marquage vert, magenta et orange

Tableau I : Résultats attendus sur les lames contrôles pour la validation des isotypes de l'IHC multiplex (IC : isotype contrôle).

Analyse d'images

Les lames ont été observées au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 90i) et les prises de vue effectuées avec le logiciel NIS-Elements (Nikon). Elles ont ensuite été scannées à l'aide d'un scanner de lames (Hamamatsu NanoZoomer, 2.0RS) et la quantification des cellules CD4 positives, CD8 positives et CD20 positives a été réalisée grâce au logiciel CaloPix 3.2.0 (Tribvn Healthcare).

Trois opérateurs différents ont analysé ensuite indépendamment les images en utilisant le programme Immuno Objet By Learning (IOBL) (du logiciel CaloPix). Chaque utilisateur a créé son propre algorithme d'analyse, déterminé ses propres seuils de détection et ses images de référence. Cet algorithme, basé sur des techniques d'apprentissage, permet au logiciel, une fois paramétré, de réaliser des analyses standardisées sur les échantillons.

RESULTATS

Les marquages simples CD4, CD8 et CD20 ont été mis au point et révélés avec les fluorochromes suivants : CD4 : TSAPlus FITC, CD8 : TSAPlus Cy5 et CD20 : TSAPlus Cy3. Les différents tests de combinaisons d'anticorps primaires nous ont permis de valider le marquage triple avec l'anticorps anti-CD4 révélé par la TSAPlus FITC dans un premier temps, suivi de l'anticorps anti-CD8 révélé par la TSAPlus Cy5 puis l'anticorps anti-CD20 révélé par la TSAPlus Cy3. En effet, certains anticorps nécessitent plusieurs démasquages antigéniques pour une révélation optimale (ex : CD20) alors que d'autres ne supportent pas toutes ces étapes (ex : CD4) (résultats non présentés). L'observation de la conformité des 8 lames contrôles a permis de valider le multiplex (**Tableau I**) (images non présentées).

A l'issue de ces mises au point, l'ensemble des immunodétections a été réalisé sur les cinq modèles tumoraux (**Figure 2**). Pour l'illustration des marquages CD8 TSAPlus Cy5 et CD20 TSAPlus Cy3 qui sont visibles en couleur rouge, d'autres couleurs leurs ont été attribuées sous ImageJ, respectivement en magenta et orange.

Une observation non quantitative au microscope montre des différences d'intensité et de finesse de marquage pour une même détection selon la nature du tissu. De ce fait, l'analyse des images sous CaloPix, par IOBL a nécessité l'utilisation de protocoles de quantification différents selon les tissus et le type d'IHC (simplex ou triplex).

Les résultats des 3 analyses réalisées par des opérateurs différents sur les cinq tumeurs sont représentés dans le **Tableau II**. Concernant le Glioblastome et le HCC, le nombre de cellules marquées est souvent différent entre les simplex et les triplex alors qu'elle est du même ordre pour les tissus de cancer du sein, du poumon (NSCLC) et du pancréas. Les valeurs obtenues par différents opérateurs sont hétérogènes pour le Glioblastome, le HCC et le Cancer du Pancréas principalement pour le marqueur CD4. Ces résultats variables sont concordant avec les observations microscopiques. Ils démontrent l'impact d'un marquage bien défini sur le process de quantification via l'analyse d'image, pour une quantification optimale.

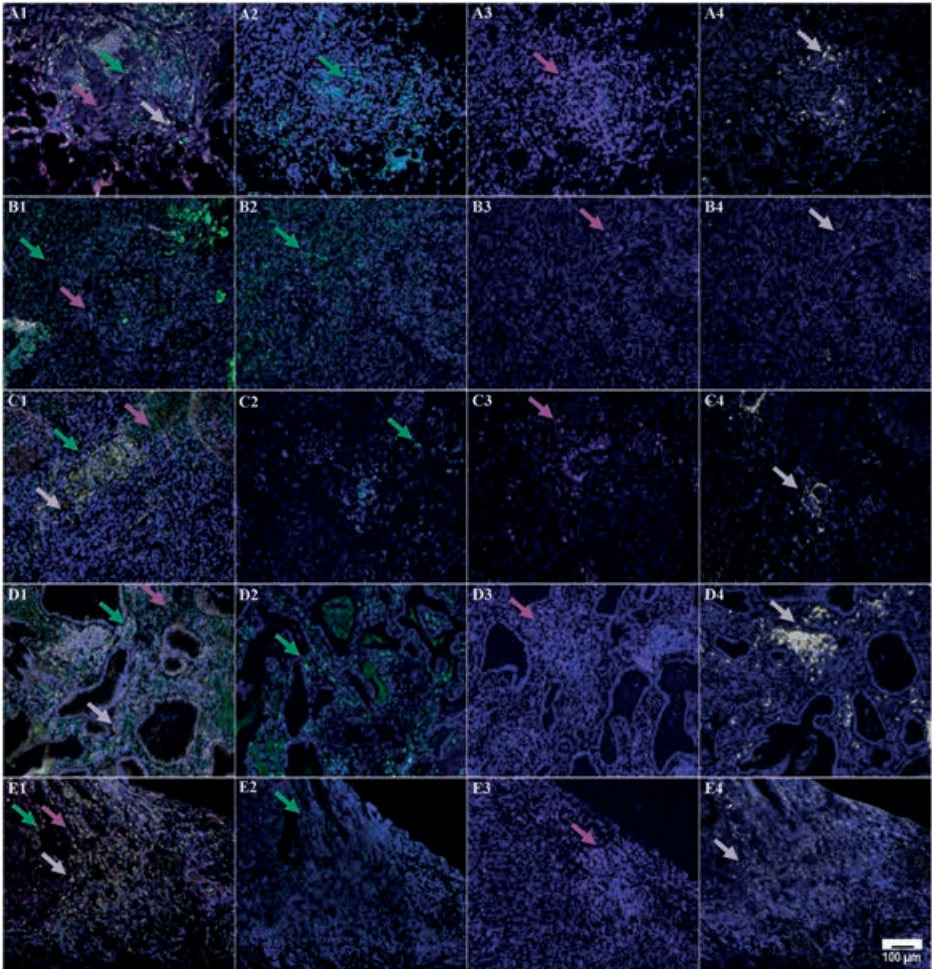


Figure 2 : Immunodétections des marqueurs CD4, CD8 et CD20 en multiplex et simplex sur différents tissus cancéreux.

Immunodétections des marqueurs CD4, CD8 et CD20 en multiplex (1) et simplex, respectivement (2), (3) et (4) sur différents tissus cancéreux :

Breast Carcinoma (A), Glioblastoma (B), Hepato Cellular Carcinoma (C), NSCLC (D), Pancreatic Carcinoma (E).

Multiplex CD4 (FITC) / CD8 (Cy5) / CD20 (Cy3) / DNA (Dapi) (1); Simplex CD4(FITC) / DNA (2), simplex CD8(Cy5) / DNA (3), simplex CD20(Cy3) / DNA (4).

Marqueurs	Breast Carcinoma		Pancreas Carcinoma		Glioblastoma		Hepato Cellular Carcinoma		Non Small Cell Lung Carcinoma		
	Triple Cells/mm ²	Simple Cells/mm ²	Triple Cells/mm ²	Simple Cells/mm ²	Triple Cells/mm ²	Simple Cells/mm ²	Triple Cells/mm ²	Simple Cells/mm ²	Triple Cells/mm ²	Simple Cells/mm ²	
Opérateur 1	CD4	621,09	689,95	300,43	236,37	214,07	364,89	23,03	72,71	993,03	862,33
	CD8	306,38	296,69	343,00	280,13	37,14	5,61	60,33	85,70	383,50	355,77
	CD20	122,41	98,02	62,74	51,08	24,90	16,13	45,93	52,98	231,26	174,64
Opérateur 2	CD4	410,35	881,59	95,59	288,57	179,12	711,51	106,48	274,38	882,12	856,32
	CD8	380,77	370,50	468,00	399,36	30,31	9,34	135,57	68,64	400,85	312,06
	CD20	167,87	135,63	147,37	38,80	130,06	23,69	306,45	38,35	251,90	148,38
Opérateur 3	CD4	744,23	886,75	171,19	263,12	178,49	359,64	94,05	91,99	845,01	817,01
	CD8	385,89	373,73	410,68	420,55	16,01	7,21	51,50	89,62	399,98	383,42
	CD20	154,55	125,30	33,37	36,05	8,92	9,61	32,89	39,82	259,42	245,64

Tableau II : Résultats, multi-opérateurs, du process de quantification des IHC simplex et triplex. Analyses réalisées par 3 opérateurs sur les images issues d'un marquage triple et de 3 marquages simples.

Pour poursuivre l'évaluation de notre méthode, une étude de répétabilité des analyses est en cours : réalisation des IHC plusieurs fois par le même opérateur, mais également des études de robustesse par la réalisation des IHC et des analyses quantitatives par plusieurs opérateurs.

Un autre axe de développement est la mise en commun des méthodes d'analyse d'image entre les différents opérateurs pour établir un process commun standardisé par CaloPix de nos images. D'autre part, l'amélioration continue du logiciel CaloPix par Tribvn nécessite également de faire évoluer nos process pour optimiser au mieux ces quantifications.

DISCUSSION

Avec l'avènement des nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses basées sur l'immunothérapie, il devient essentiel de caractériser le microenvironnement tumoral [12]. Cette caractérisation doit pouvoir répondre à différentes questions, par exemple définir la présence des cibles, comme pour les thérapies ciblant les immune check point inhibiteur (ICI), comme l'axe PD-1 / PD-L1 ou le CTLA-4 [10]. Mais dans un avenir très proche, il faudra aussi mettre en évidence les autres cibles en cours de développement, comme le GITR, TIM-3 ou le CD73 qui participe à

l'immuno- résistance, via la voie des ADA (Adénosine désaminases) [14].

Au-delà de la mise en évidence des cibles, l'analyse du microenvironnement tumoral doit aussi permettre de réaliser l'immunophénotypage de la tumeur, de définir son « état immunologique ». En effet, il émerge dans le monde de l'immunothérapie la notion de tumeurs dites « chaudes ». Ces dernières sont réceptives aux thérapies car elles sont infiltrées par des TIL, plus précisément les effecteurs cytotoxiques comme les lymphocytes CD8+, mais également caractérisées par la présence de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) de bon pronostic. Ces tumeurs expriment également le CMH de classe I qui permet la présentation des antigènes cibles et donc une bonne efficacité des thérapies [15, 16].

A contrario, certaines tumeurs sont dites froides. Elles apparaissent comme hors du système immunitaire, n'expriment plus ou mal le CMH de classe I [17, 18], ne sont pas infiltrées par des TIL, mais plutôt par des macrophages de type M2 [19], des neutrophiles et/ou des lymphocytes T régulateurs [20], tous des effecteurs très négatifs sur le pronostic des patients et potentiellement sur les immunothérapies.

Nous voyons que le nombre d'effecteurs à analyser pour réaliser l'immunophénotypage de la tumeur devient vite important. Il se pose donc clairement la question de la quantité de matériel nécessaire pour réaliser toutes ces analyses. Dans le suivi des patients, ne sont disponibles en général que des biopsies (à l'inclusion et éventuellement durant le suivi de la pathologie) ne générant que peu de matériel disponible pour des immuno- analyses, après les analyses d'histopathologie obligatoires.

Sur ce matériel, il n'est pas envisageable de réaliser 5, 6 voire 10 analyses en mono couleur, et c'est ainsi que l'IHC multiplex représente une alternative intéressante pour étudier plusieurs cibles sur une même lame [21]. La technologie OPAL de Perkin Elmer permet ce multiplexage, avec l'avantage de pouvoir utiliser des anticorps primaires d'espèces identiques, ce qui facilite les mises au point [22]. Cette multiplicité de marqueurs sur une même lame complexifie de ce fait les analyses des marquages obtenus. C'est dans ce cadre qu'il est important de coupler ces technologies multiplex avec des logiciels d'analyse d'image. D'immenses progrès dans ce domaine sont en cours pour aider ces analyses, par exemple par le développement d'algorithmes de e-learning, c'est-à-dire des logiciels qui apprennent à reconnaître les différents tissus, les différents marquages et d'interpréter par exemple des co-

marquages. Ces évolutions rapides, à la fois sur les technologies de marquage et sur les logiciels d'analyses ouvrent des perspectives insoupçonnées jusque-là pour l'étude du microenvironnement tumoral.

Mais il faut rester encore prudent sur la maîtrise de ces outils, par exemple la technique OPAL peut éventuellement permettre d'analyser jusqu'à 8, voire plus, cibles différentes sur une même lame [22, 23]. Ceci n'est possible que si cette méthode est bien validée techniquement, comme par exemple de bien vérifier la stabilité des antigènes aux différents cycle de démasquage, en privilégiant les antigènes sensibles sur les premières étapes et les antigènes robustes sur les derniers marquages. Sur 2 ou 3 marquages, cela reste assez simple, mais sur 5, 6 et au-delà, le processus de validation de toutes les étapes risque de devenir très vite ingérable. Une autre limitation au multiplexage « massif » est l'analyse. Dans ces techniques, la révélation est généralement faite en IF, et il se pose rapidement la problématique des recouvrements de spectres d'émission. Les développeurs de la technologie, la société Perkin Elmer, ont une solution intéressante pour éviter ce problème, l'analyse multi spectrale. Chaque émission de fluorophore est analysée séparément, il n'y a donc pas d'interférence entre les spectres [22, 24]. Malheureusement, pour le moment, l'appareillage pour ce type d'analyse, bien qu'optimal, reste assez difficilement accessible en termes de coût.

Pour nos travaux sur l'analyse du micro-environnement tumoral, nous avons pris le parti de travailler par « thème » en développant des analyses multiplex en OPAL, sur seulement 2 ou 3 marqueurs. L'idée est de répondre à des questions simples comme l'analyse de la nature des TIL (CD4, CD8 et CD20), de la population des macrophages (M1 versus M2, avec les marquage CD68, CD163), de la présence de TLS (DC-Lamp, CD3 et CD20) [25, 26] et de la proportion relative des effecteurs positifs versus les effecteurs négatifs (ratio CD8 / T Reg par exemple) [27] etc ... L'objectif est de pouvoir analyser le microenvironnement tumoral sur 3 à 5 lames par échantillon avec des marquages OPAL à 2 ou 3 couleurs. Avec cette stratégie, nous pensons qu'il est plus facile de valider nos combinaisons multiplex et que les outils nécessaires sont plus facilement disponibles dans les laboratoires sans investissement supplémentaire (scanner classique à 3 ou 4 couleurs, en incluant un DAPI pour les noyaux) sans risque d'interférence spectrale.

Il reste néanmoins beaucoup de travail à réaliser pour valider de façon satisfaisante ces technologies. Nos résultats préliminaires nous montrent la variabilité induite par

la méthode d'analyse par différents opérateurs. Le travail actuel est d'uniformiser les pratiques d'analyse pour obtenir un algorithme optimal et automatisable. Un important travail d'évaluation reste également à faire sur la partie purement technique de marquage. Afin de standardiser toutes les étapes des IF, nous avons opté pour l'utilisation d'un automate d'immunomarquage BOND RX^m Leica.

Enfin, et surtout, une fois la validation technique effectuée, il sera bien évidemment essentiel de valider cliniquement l'utilité de ces technologies pour répondre au besoin d'accompagnement des nouvelles stratégies thérapeutiques d'immunothérapie. Dans ce cadre, il est important de ne pas omettre que ces analyses ne seront faites que sur un échantillon ne représentant pas systématiquement la totalité de la tumeur (biopsie).

CONCLUSION

Nous avons décrit ici l'utilisation de la méthode OPAL qui nous permet d'envisager l'étude du microenvironnement tumoral, avec une analyse quantitative par analyse d'image multiparamétrique. Ces outils seront essentiels dans le contexte de l'immunothérapie pour comprendre le mode de fonctionnement de ces produits et pour permettre éventuellement de déterminer des profils de patients susceptibles de mieux répondre aux traitements. Nous avons observé que le process d'analyse des résultats n'est pas simple à réaliser et que des variations peuvent être induites par différents opérateurs. Ce process est également impacté significativement par la nature des échantillons, plus ou moins difficile à analyser.

REMERCIEMENTS

Pour ces travaux, nous tenons à remercier particulièrement les membres des équipes des sociétés Leica et Tribvn qui nous ont accompagnés dans ces développements. Ils ont été attentifs à nos attentes et ont répondu aux défis techniques que nous leur avons posés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. COUZIN-FRANKEL J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* (2013), **342** (6165): 1432-1433.
2. HANAHAN D. & WEINBERG R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000), **100** (1): 57-70.
3. HANAHAN D. & WEINBERG R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011), **144** (5): 646-674.
4. HANAHAN D. & COUSSENS L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* (2012), **21** (3): 309-322.
5. COLEY W.B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* (1910), **3** (Surg Sect): 1-48.
6. FUGE O., et al. Immunotherapy for bladder cancer. *Research and reports in urology* (2015), **7**: 65-79.
7. SINGEL K.L. & SEGAL B.H. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunological reviews* (2016), **273** (1): 329-343.
8. BALKWILL F. & MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* (2001), **357** (9255): 539-545.
9. YAGUCHI T. & KAWAKAMI Y. Cancer-induced heterogeneous immunosuppressive tumor microenvironments and their personalized modulation. *International immunology* (2016), **28** (8): 393-399.
10. PITT J.M., et al. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* (2016), **27** (8): 1482-1492.
11. TANG H., QIAO J. & FU Y.X. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer letters* (2016), **370** (1): 85-90.
12. FRIDMAN W.H., et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature reviews. Clinical oncology* (2017), **14** (12): 717-734.
13. GORRIS M.A.J., et al. Eight-Color Multiplex Immunohistochemistry for Simultaneous Detection of Multiple Immune Checkpoint Molecules within the Tumor Microenvironment. *Journal of immunology* (2018), **200** (1): 347-354.
14. MAHONEY K.M., RENNERT P.D. & FREEMAN G.J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature reviews. Drug discovery* (2015), **14** (8): 561-584.
15. TENG M.W., et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer research* (2015), **75** (11): 2139-2145.

16. OCK C.Y., et al. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (2016), **22** (9): 2261-2270.
17. GARRIDO F., et al. The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines* (2017), **5** (1).
18. PEREA F., et al. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *International journal of cancer* (2017), **140** (4): 888-899.
19. NOY R. & POLLARD J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* (2014), **41** (1): 49-61.
20. LODDENKEMPER C., et al. *In situ* analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *Journal of translational medicine* (2006), **4**: 52.
21. YUAN J.X. & MUNSON J.M. Quantitative Immunohistochemistry of the Cellular Microenvironment in Patient Glioblastoma Resections. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2017),(125).
22. STACK E.C., et al. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* (2014), **70** (1): 46-58.
23. 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. *Scientific reports* (2017), **7** (1): 13380.
24. VASATURO A., et al. Multispectral imaging for highly accurate analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in primary melanoma. *Histopathology* (2017), **70** (4): 643-649.
25. TEILLAUD J.L. & DIEU-NOSJEAN M.C. Tertiary Lymphoid Structures: An Anti-tumor School for Adaptive Immune Cells and an Antibody Factory to Fight Cancer? *Frontiers in immunology* (2017), **8**: 830.
26. SAUTES-FRIDMAN C., et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Frontiers in immunology* (2016), **7**: 407.
27. SEMERARO M., et al. The ratio of CD8+/FOXP3 T lymphocytes infiltrating breast tissues predicts the relapse of ductal carcinoma *in situ*. *Oncoimmunology* (2016), **5** (10): e1218106.