

# LE MULTIPLEXING POUR UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DE L'ENVIRONNEMENT TISSULAIRE : PRESENTATION DE QUELQUES MÉTHODES

BLANDIN Stéphanie<sup>1</sup>, DOMENE Aurélie<sup>1</sup>, HULIN Philippe<sup>1</sup>,  
JOUSSAUME Aurélie<sup>1,2</sup>, NEDELLEC Steven<sup>1</sup>, PAUL-GILLOTEAUX Perrine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, Inserm, BioCore, US16, SFR Bonamy  
44000 Nantes - France

<sup>2</sup> CR2TI, 30 Boulevard Jean Monnet – 44000 Nantes - France

Auteur de correspondance : [stephanie.blandin@univ-nantes.fr](mailto:stephanie.blandin@univ-nantes.fr)

# MULTIPLEXING FOR A BETTER UNDERSTANDING OF THE TISSUE ENVIRONMENT: PRESENTATION OF SOME METHODS

## ABSTRACT

Immunostaining techniques allow the demonstration of the *in situ* localization of proteins, whether tissue or cellular, cytoplasmic, membrane or nuclear, and specific to a function or cell type. Recent advances in immunostaining have enabled the emergence of multiplexing. Conventional staining techniques (brightfield or fluorescence) allow the detection of only a limited number of biomarkers on the same tissue section, making it impossible to understand the complexity of the tissue microenvironment. Recent advances in immunostaining methods have enabled the emergence of tissue multiplexing: detecting several dozen-protein biomarkers on the same tissue section.

The growth of these technologies is associated with the evolution, on one hand, of the possibilities for revealing immunomarkers, of image acquisition systems that are more efficient in terms of detection sensitivity and resolution, and on the other hand with the development of approaches to bioinformatics analysis and artificial intelligence. Spatial proteomics techniques vary in their revelation strategy (by an enzyme, by an antibody coupled to a metal tag or to a fluorochrome, etc.). In all cases, multiplexing allows spatial analysis of the tissue. Whatever the method of revelation, it allows us to understand the organization of cell populations at the tissue level, for example for the study of the tumor or inflammatory microenvironment. By allowing spatial analysis of the tissue, different immunofluorescence multiplexing methods exist and the scientific questions asked guide the technological choice.

This article presents some of these methods: principle, steps and associated points of attention, image acquisition and analysis, on different projects and types of tissues:

- 1) The multiplex method with the tyramide signal amplification (TSA) system coupled to Opal™ fluorochromes, developed by the company Akoya Biosciences®. This method allows the simultaneous revelation of up to 9 markers.
- 2) The multiplex method using the VectaPlex™ system marketed by the company Vector Laboratories®. This method can also be combined with the previous one.
- 3) The Phenocycler™ method (formerly Codex® for Co-Detection by Indexing) distributed by the company Akoya Biosciences®. This method allows the revelation of several dozen of markers.

## KEY WORDS

Fluorescence, Image analysis, Labeling, Multiplexing, Photonic imaging, Spatial biology.

## RÉSUMÉ

Les techniques d'immunomarquages permettent la mise en évidence de la localisation *in situ* de protéines, qu'elles soient tissulaires ou cellulaires, cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, et spécifiques d'une fonction ou d'un type cellulaire. Les avancées récentes des immunomarquages ont permis l'émergence du multiplexing. Les techniques classiques de marquage (colorimétrie ou fluorescence) ne permettent la détection que d'un nombre restreint de biomarqueurs sur une même coupe de tissu ne permettant pas d'appréhender la complexité du microenvironnement tissulaire. Les avancées récentes des méthodes en immunomarquage ont permis l'émergence du multiplexing tissulaire : détecter sur une même coupe de tissu plusieurs dizaines de biomarqueurs protéiques. L'essor de ces technologies est associé à l'évolution d'une part, des possibilités de révélation des immunomarqueurs, des systèmes d'acquisition d'images plus performants en termes de sensibilité de détection et de résolution, et d'autre part au développement des approches d'analyses bio-informatiques et de l'intelligence artificielle. Les techniques de protéomique spatiale varient par leur stratégie de révélation (par une enzyme, par un anticorps couplé à un tag métallique ou à un fluorochrome, etc.). Dans tous les cas, le multiplexing permet une analyse spatiale du tissu. Quelle qu'en soit la méthode de révélation, il permet de comprendre l'organisation des populations cellulaires au niveau du tissu, par exemple pour l'étude du microenvironnement tumoral ou inflammatoire. En permettant une analyse spatiale du tissu, différentes méthodes de multiplexing en immunofluorescence existent et les questions scientifiques posées orientent le choix technologique. Cet article présente quelques unes de ces méthodes : principe, étapes et points d'attention associés, acquisition et analyse des images, sur différents projets et types de tissus :

- 1) La méthode multiplex avec le système d'amplification du signal à la tyramide (TSA) couplé à des fluorochromes Opal™, développée par la société Akoya Biosciences®. Cette méthode permet la révélation simultanée jusqu'à 9 marqueurs.
- 2) La méthode multiplex grâce au système VectaPlex™ commercialisé par la société VectorLaboratories®. Cette méthode peut également être combinée à la précédente.
- 3) La méthode Phenocycler™ (anciennement Codex® pour Co-Detection by IndeXing) distribuée par la société Akoya Biosciences®. Cette méthode permet la révélation de plusieurs dizaines de marqueurs.

## MOTS CLÉS

Analyse d'images, Biologie spatiale, Fluorescence, Imagerie photonique, Marquage, Multiplexing.

## INTRODUCTION

Le multiplexing permet la révélation simultanée de plusieurs marqueurs sur la même coupe de tissu. La technique s'est développée à partir de l'évolution des possibilités de révélation des immunomarqueurs et grâce aux systèmes d'acquisition d'images plus performants en sensibilité de détection et en résolution. Le multiplexing, quelle qu'en soit la méthode de révélation, permet de comprendre l'organisation des populations cellulaires au niveau du tissu, par exemple pour l'étude du microenvironnement tumoral ou inflammatoire. Il existe différentes méthodes de multiplexing en immunofluorescence dont la pertinence dépend de la question scientifique. L'analyse en aval des données multipléxées obtenues peut se réaliser de la même manière qu'elle que soit la méthode : segmentation des cellules uniques, classification en populations selon la présence de marqueurs prédéfinis, analyse des sous-populations en intensité et en relation de voisinage. De la même manière, la définition des étapes d'analyse dépend de la question scientifique posée.

Afin de mettre en œuvre une technique d'immunomarquages multiplexés, les laboratoires utilisent la plupart du temps des solutions commerciales, qui nécessitent toutefois des compétences et une expertise de la personne mettant au point la technique.

Cet article a donc pour objectif de comparer trois techniques de multiplexing ayant chacune leur propre principe de fonctionnement, d'identifier les points forts et faibles de chacune, afin d'évaluer la pertinence de l'une ou l'autre des techniques en fonction de la question scientifique et de l'échantillon utilisé.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. La technique à l'aide du système TSA (Tyramide Signal Amplification) Opal™

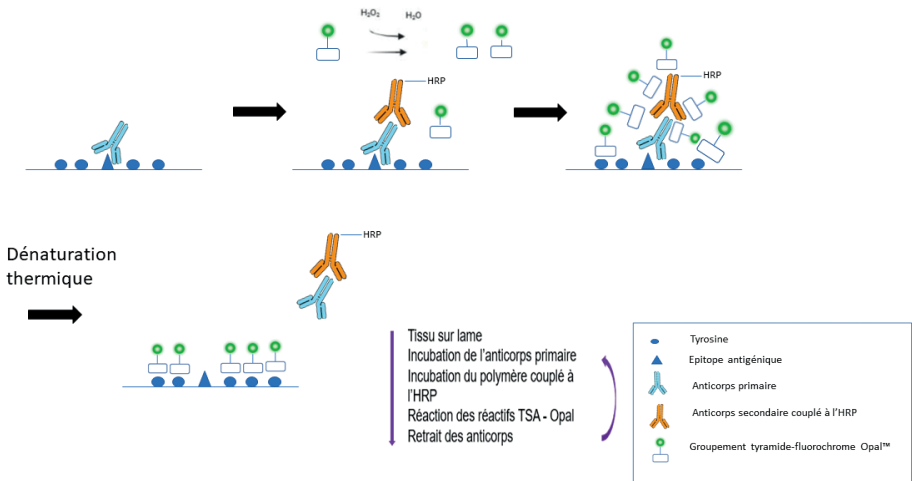
Cette technique permet de réaliser un multimarquage jusqu'à 9 marqueurs dont le marqueur nucléaire, simultanément sur la même coupe de tissu inclus en paraffine (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedding) ou congelé frais (FF, Fresh-Frozen).

#### 1.1. Principe

Le principe repose sur la succession de marquages amplifiés et révélés distinctement par des fluorochromes Opal™, avec la possibilité d'utiliser des anticorps de la même espèce sans risque de croisement non spécifique entre anticorps primaires et secondaires.

La technique est réalisée sur des coupes de tissus d'épaisseur de 3 µm (FFPE) à 5 µm (FF). Une fois la coupe déparaffinée (cas d'une coupe d'un échantillon FFPE)

et démasquée, le premier marquage mis au point peut être réalisé : la protéine « a » est reconnue spécifiquement par l'anticorps primaire A, lui-même reconnu par un anticorps secondaire A' ou plus particulièrement par un polymère couplé à la HRP (*Horseradish Peroxydase*). Le révélateur ou fluorochrome Opal™ est couplé à la tyramine, qui en présence de peroxyde d'hydrogène et de peroxydase couplée au polymère, est oxydée en tyramide active, laquelle a des affinités pour les molécules de tyrosine situées près des épitopes antigéniques de la protéine a. La liaison covalente à ces molécules est solide et ne peut donc être altérée par une étape de dénaturation - à la chaleur (stripping) à 96 °C pendant plusieurs minutes dans une solution de démasquage au bain-Marie dans la technique classique. La fluorescence est donc maintenue sur le tissu. Par contre, cette étape de dénaturation retire de la coupe de tissu le complexe anticorps primaire/secondaire dont la liaison à la protéine est non covalente. Seule reste sur le tissu la tyramide couplée au fluorochrome Opal™ révélant le premier marqueur (**Figure 1**).



**Figure 1 :** Principe de la technique TSA-Opal™ Akoya Biosciences® (figure inspirée de la documentation PhenOptics : Quantitative Pathology Solutions – Perkin Elmer®).

Le deuxième marquage mis au point peut ensuite être réalisé en utilisant si besoin un anticorps primaire B de la même espèce que le premier anticorps primaire A, sans risque de fixation croisée non spécifique de l'anticorps secondaire B' sur l'anticorps primaire A puisque ce dernier n'est plus présent sur la coupe. La protéine « b » est donc reconnue spécifiquement par l'anticorps primaire B, lequel est reconnu par l'anticorps secondaire ou polymère B' couplé à la HRP. Le principe de révélation est identique au premier marquage, mais le révélateur est un fluorochrome Opal™ de signature spectrale différente du premier Opal™ utilisé.

Une étape de dénaturation ou stripping est réalisée, le complexe primaire B/secondaire B' est alors retiré de la coupe, alors que la tyramide couplée au deuxième Opal™ est maintenue.

Le marquage suivant peut donc être réalisé, et ainsi de suite.

Il est possible aujourd'hui de réaliser jusqu'à 9 marquages dont le marquage nucléaire. Cette limitation à 9 marqueurs est due à la capacité de séparer les spectres d'émission lors de l'acquisition des images.

Cette technique peut également être réalisée sur coupe congelée, mais l'utilisation de lame traitée à la poly-lysine et la fixation des coupes au paraformaldéhyde à 4% en amont de la technique s'avèrent indispensables.

## 1.2 Acquisition des images

L'acquisition des images des coupes mono-marquées et multiplexées est réalisée à l'aide d'un microscope confocal équipé d'un détecteur spectral (A1 RSi™ Nikon®).

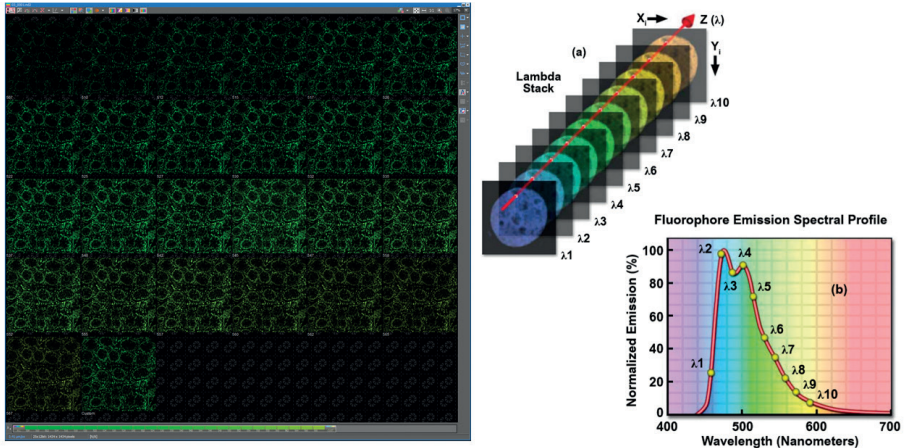
### 1.2.1. Principe

L'acquisition d'image d'échantillon fluorescent passe classiquement par une illumination spécifique (excitation) à une longueur d'onde, et une récolte de l'émission de fluorescence dans un intervalle plus ou moins large (émission). Dans ce cas particulier, il est impossible d'utiliser des sondes fluorescentes ayant la même longueur d'onde d'excitation et des longueurs d'onde d'émission très proches (par exemple, l'imagerie de sondes telles que Opal 520 ex: 488nm ém: 520nm et Opal 540 ex: 488 ém: 540nm). Nous utilisons alors la microscopie confocale en mode spectral. Ce mode permet de mesurer la signature spectrale de l'émission de fluorescence de l'échantillon pour une excitation donnée. Cette signature sera comparée à un ou plusieurs spectres de référence.

### 1.2.2. Méthode

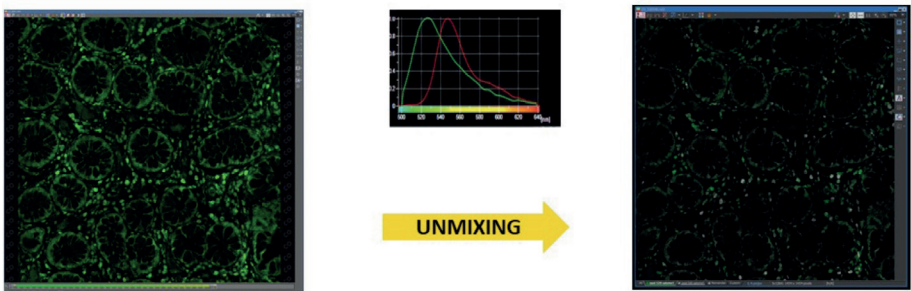
La méthode d'acquisition repose sur le principe que chaque fluorochrome présente une signature spectrale spécifique qui lui est propre. Pour chaque fluorochrome utilisé, une lame mono-marquée est visualisée en mode spectral. Le spectre mesuré de chaque fluorochrome est défini comme référence et enregistré dans le logiciel NIS Elements™ de Nikon®.

Sur la lame multiplexée, une acquisition spectrale est effectuée dans l'intervalle d'émission des fluorochromes recherchés (**Figure 2**). Cette acquisition sera comparée aux spectres de référence issus de l'acquisition des spectres des coupes mono-marquées.



**Figure 2 :** Image spectrale acquise à partir des signaux émis par des fluorochromes dans un intervalle de longueurs d'onde identifié. Chaque image de la mosaïque représente les signaux émis par les fluorochromes à séparer, à une longueur d'onde donnée comprise dans l'intervalle de longueurs d'onde d'émission des fluorochromes concernés. Cette image est réalisée à l'aide du logiciel NIS Elements™ de Nikon®.

La fonction *unmixing* (déconvolution spectrale) du Logiciel NIS Elements™ de Nikon® est utilisée pour n'afficher que les signaux émis correspondants aux signatures spectrales de chacun des fluorochromes concernés. Cette fonction applique un algorithme qui compare les signatures spectrales de référence à la signature spectrale de l'image multiplexée pour réattribuer à chaque pixel la présence des fluorochromes détectés. Ainsi, grâce à la signature spectrale de chacun des fluorochromes, il est possible de distinguer chaque marqueur (**Figure 3**).

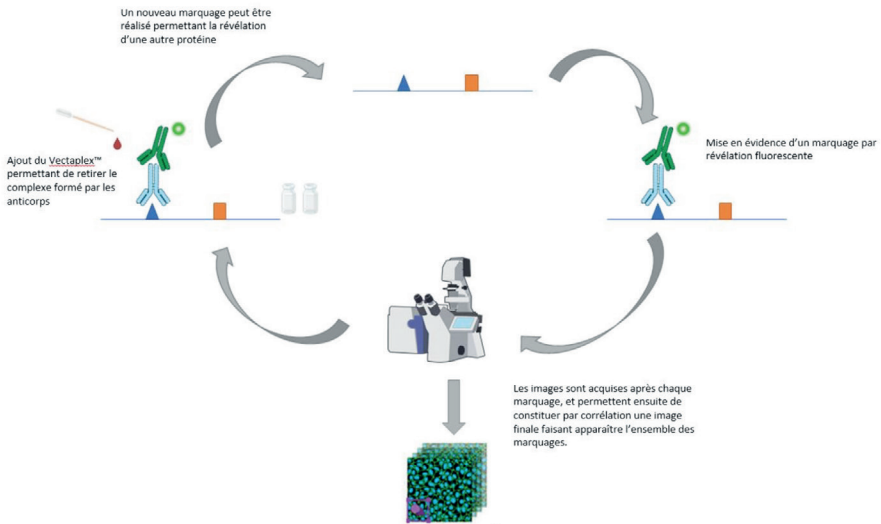


**Figure 3 :** Déconvolution spectrale réalisée à partir d'une image spectrale et des spectres d'émission des fluorochromes à séparer : deux marqueurs révélés par les Opal™ 520 et 540 sont mis en évidence distinctement grâce à la déconvolution spectrale réalisée à l'aide du logiciel NIS Elements™ de Nikon®.

La superposition des images acquises permet de révéler l'ensemble des marqueurs sur la coupe. Elle est réalisée en fusionnant simplement les images obtenues à l'étape de déconvolution spectrale, grâce à l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'images comme Fiji [1] ou NIS Elements™ Nikon®.

## 2. La technique classique à l'aide du système Vectaplex™ Vector Laboratories®

Cette technique commerciale est proposée afin de réaliser simplement des marquages multiplexés sans s'équiper de matériels spécifiques et onéreux comme une caméra spectrale. Le principe repose sur la réalisation successive de marquages fluorescents simples non amplifiés et acquis au fur et à mesure des marquages, un système chimique de *quenching* de la fluorescence Vectaplex Antibody Removal Kit™ (Vector Laboratories, référence #VRK-1000) retirant les signaux fluorescents du marquage  $n$  avant la réalisation du marquage  $n+1$  (Figure 4).



**Figure 4 :** Principe de fonctionnement du Vectaplex™ en immunofluorescence classique (figure inspirée de la documentation TrueView™ Vector Laboratories®).

La technique se réalise sur des coupes de tissus d'épaisseur de 3 µm (FFPE) à 5 µm (FF tissu congelé). Une fois la coupe déparaffinée (cas d'une coupe d'un échantillon FFPE) et démasquée, le premier marquage mis au point peut se réaliser : la protéine « a » est reconnue spécifiquement par l'anticorps primaire A, lui-même reconnu par un anticorps secondaire A' couplé à un fluorochrome (AlexaFluor™ par exemple).

Une contre-coloration des noyaux au DAPI est réalisée.

La lame est visualisée à l'aide d'un microscope confocal (LIPSI™ Nikon®) qui présente l'avantage de positionner parfaitement la lame sur un porte-lame. Une région d'intérêt affichant le marquage est sélectionnée et l'acquisition de l'image du monomarquage est réalisée selon le principe de fonctionnement d'un microscope confocal traditionnel, après avoir éventuellement retiré l'autofluorescence et/ou le bruit de fond.

Une fois l'image acquise, l'étape de retrait de la fluorescence spécifique liée au marquage est réalisée à l'aide du réactif Vectaplex™ (Vector Laboratories®, ref VRK-1000), par une simple application. Le phénomène produit est le décrochage du complexe anticorps primaire/anticorps secondaire couplé au fluorochrome.

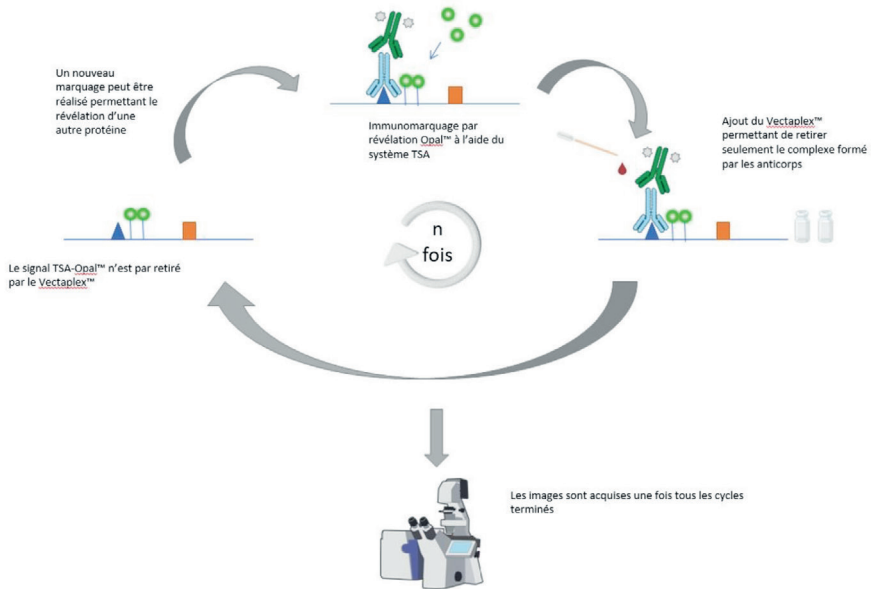
Une fois la coupe dépourvue de fluorescence, le second marquage peut être réalisé: la protéine « b » est reconnue spécifiquement par l'anticorps primaire B, lui-même reconnu par un anticorps secondaire B' couplé à un fluorochrome. Une contre-coloration des noyaux au DAPI est également réalisée.

L'image du marquage spécifique est acquise après avoir éventuellement retiré l'autofluorescence et/ou le bruit de fond, sur la même région. Une fois la coupe dépourvue de fluorescence, le troisième marquage peut être réalisé, et ainsi de suite. Toutes les images des marquages individuels acquises sont ensuite recalées sur la base du marquage DAPI des noyaux pour obtenir une image finale représentant l'ensemble des marquages, à l'aide du logiciel Fiji [1] ou de la fonction Align Channels du logiciel NIS Elements™ Nikon®.

### **3. L'utilisation du réactif Vectaplex™ VectorLaboratories® dans la technique TSA Opal™**

Le réactif Vectaplex™ peut également être utilisé dans le cadre d'un multiplexing à l'aide d'un système d'amplification TSA Opal™. Dans ce cas, les principes des deux méthodes présentées précédemment sont appliqués.

Les marquages sont réalisés successivement en utilisant comme anticorps secondaires des polymères couplés à la HRP. La révélation est possible grâce aux Opal™ couplés aux molécules de tyramide. Une application du réactif Vectaplex™ est effectuée entre chaque marquage. Comme expliqué précédemment (cf. §1.1. et 2)), le réactif Vectaplex™ décroche le complexe anticorps primaire/anticorps secondaire. Dans le cadre de la technique Opal™, le révélateur ou fluorochrome Opal™ n'est pas fixé au secondaire mais couplé aux molécules de tyramide, par une liaison plus solide. Le marquage fluorescent n'est donc pas retiré lors de l'application du réactif Vectaplex™. Seul le complexe anticorps primaire/anticorps secondaire ou polymère est élué. L'acquisition des images après chacun des marquages n'est donc pas nécessaire et l'ensemble des marquages peut être visualisé en fin de protocole, ce qui évite un recalage des images représentant les monomarquages (**Figure 5**).



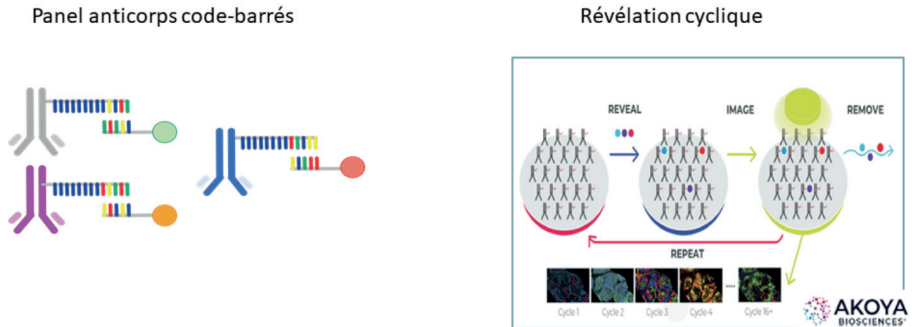
**Figure 5 :** Principe du fonctionnement du Vectaplex™ en immunofluorescence amplifiée par le système TSA (figure inspirée de la documentation Vectaplex™ Vector Laboratories®).

## 4. La technique Phenocycler™ Akoya®

### 4.1. Principe

Le principe de révélation de la technologie PhenoCycler™ est différente des deux techniques précédemment présentées. La technologie PhenoCycler™ distribuée par la société Akoya Biosciences® est basée sur une méthode de révélation utilisant des anticorps code-barrés couplés à des fluorochromes. Chaque code-barre est une courte séquence spécifique d'oligonucléotides complémentaire à une autre séquence couplée à un fluorochrome (appelée *reporter*). Trois fluorochromes spectralement distincts et le marqueur nucléaire DAPI sont utilisés par « run expérimental ». Pour les tissus FF, ce sont les fluorochromes AlexaFluor™488, Atto550 et Cy5/Alexa Fluor™647 qui sont utilisés, alors que ce sont les fluorochromes AlexaFluor™750, Atto550 et Cy5/Alexa Fluor™647 qui sont privilégiés pour les tissus FFPE. Le système PhenoCycler™ est une plateforme fluide couplée à un microscope à épifluorescence inversé. La préparation et le marquage du tissu sont réalisés manuellement avant une prise d'images cyclique et automatisée. À chaque cycle d'acquisition, 3 *reporters* PhenoCycler™ sont ajoutés pour révéler

3 marqueurs en même temps : chaque *reporter* s'hybride spécifiquement à sa séquence code-barre complémentaire et l'opération est répétée autant de fois que de nécessaire pour révéler tous les marqueurs d'intérêt de l'échantillon. À chaque cycle est également imagé le marqueur nucléaire DAPI (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Principe de fonctionnement de la technologie Phenocycler™ AkoyaBiosciences® (extrait de la documentation Phenocycler™ AkoyaBiosciences®).

#### 4.2. Plan expérimental

La technologie PhenoCycler™ est dépendante de l'utilisation d'anticorps code-barrés dédiés à la méthode. Il existe un catalogue fournisseur listant les références d'anticorps disponibles pour le tissu humain (FF ou FFPE) et murin (FF). Lorsqu'un anticorps cible n'est pas listé au catalogue il est possible de conjuguer à façon l'anticorps cible avec un code-barre PhenoCycler™ selon un protocole bien défini. La conjugaison à façon des anticorps nécessite alors des étapes de validation supplémentaires.

La première étape cruciale du plan expérimental PhenoCycler™ est le *design* expérimental représentatif de l'ensemble des questions scientifiques posées. Le panel d'anticorps final doit intégrer les biomarqueurs cibles (immunitaires par exemple) mais aussi des marqueurs structuraux (comme les cellules endothéliales, le collagène) ou fonctionnels (marqueurs de l'inflammation, de la prolifération). Dès cette étape, les défis liés à l'analyse des images (par exemple, il sera nécessaire d'adapter les marqueurs utilisés pour la segmentation) doivent être considérés. L'abondance antigénique attendue pour chaque cible protéique est aussi un critère de choix pour la sélection du fluorochrome de révélation.

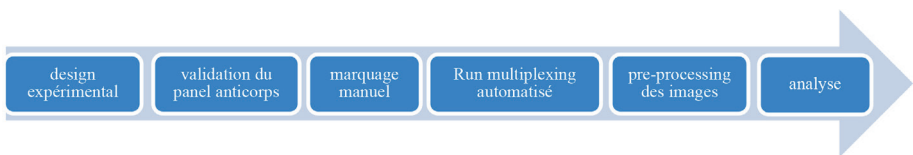
Avant l'étape du « run » multiplexing, chaque condition d'utilisation des anticorps est optimisée (concentration, démasquage antigénique dans le cas des tissus FFPE,

temps d'incubation, conditions d'excitation des fluorochromes). Le cas échéant, les anticorps conjugués à façon sont testés et validés en immunohistochimie classique sur des coupes de tissu contrôle positif ou contrôle négatif.

Ici, le tissu d'intérêt est préparé sur lamelle (24 x 24 mm) pré-coatées à la poly-L-Lysine. La totalité du panel d'anticorps est incubée en une seule étape sur le tissu traité au préalable selon le protocole fournisseur (fixation, déparaffinage et démasquage pour tissu FFPE, blocage, post-fixation des anticorps et tissu).

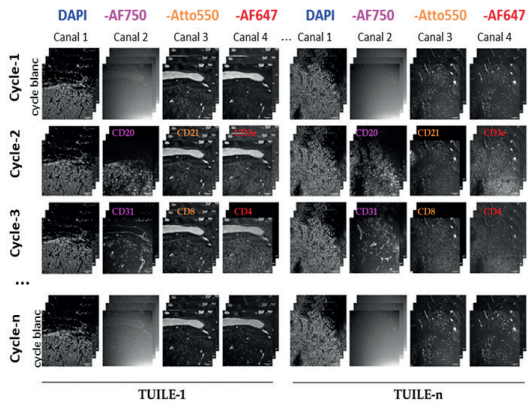
Une fois le marquage manuel réalisé, la révélation cyclique est automatisée par le duo PhenoCycler™/microscope. Chaque « run » est précédé d'une prise d'images du tissu au grossissement X5 dans le canal DAPI pour permettre de sélectionner les régions d'intérêt souhaitées. L'acquisition multiplexing est ensuite réalisée au grossissement X20.

À chaque cycle d'acquisition, 3 *reporters* sont ajoutés automatiquement sur le tissu. Chaque *reporter* s'hybride à sa séquence complémentaire et le fluorochrome associé est excité à sa longueur d'onde correspondante. Le signal émis est récolté par des détecteurs du système d'acquisition optique : 3 premiers biomarqueurs protéiques sont révélés. Un cycle de déshybridation des séquences oligonucléotidiques est opéré par l'ajout de DMSO (DiméthylSulfoxyde), agent chélateur avant une étape de lavage, puis un nouveau cycle de révélation est réalisé et ainsi de suite, jusqu'à la révélation de l'ensemble des biomarqueurs d'intérêt. Le premier et le dernier cycle d'acquisition du « run » PhenoCycler™ sont des cycles blancs avec une prise d'images dans chaque canal de fluorescence, ces valeurs d'autofluorescence sont soustraites aux valeurs d'intensité mesurées à chaque cycle lors de l'une des étapes de pré-processing des données (Figure 7).



**Figure 7 :** Plan expérimental Phenocycler™ AkoyaBiosciences®.

Les images acquises (Figure 8) sont pré-processées comme décrit dans [2] avant d'être analysées.



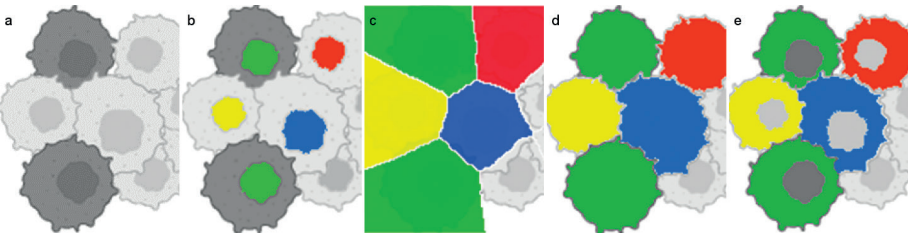
**Figure 8 :**  
Images brutes  
Phenocycler™  
obtenues avant  
les étapes de  
pré-processing

### 5. Analyse des images

L'ensemble de ces techniques donne un résultat similaire du point de vue de l'analyse d'image : un ensemble d'images (appelées canaux), chacune en niveau de gris, dont au moins une avec un marquage des noyaux. Chaque projet biologique peut présenter ses questions spécifiques, mais un élément commun est la définition et l'analyse des populations cellulaires.

Pour définir ces populations cellulaires, la première étape est de définir la zone de mesure adaptée suivant le projet, grâce aux outils de segmentation basés sur des modèles d'apprentissage profond récemment développés, par exemple Stardist [3] pour les noyaux, Cellpose [4] ou InstanSeg [5] pour les cellules entières.

Des zones de mesure cellulaires peuvent ensuite être définies en fonction du projet (Figure 9).

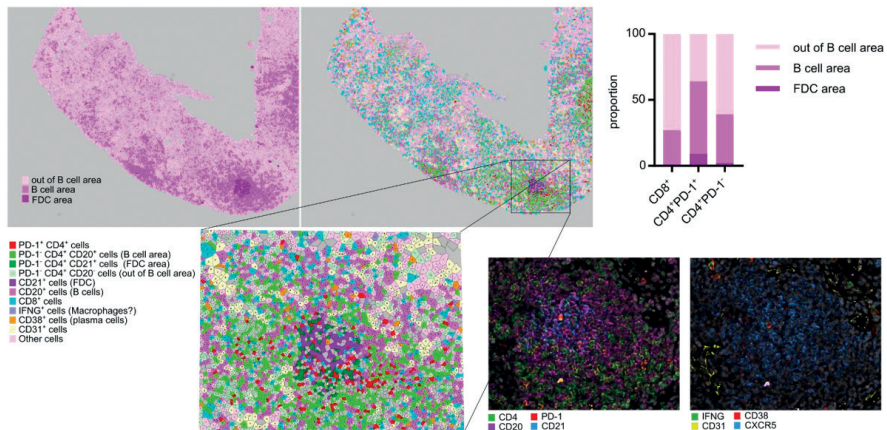


**Figure9 :** Description des différentes zones de mesure cellulaires. a) représentation schématique de cellules observées sur une coupe. b) Segmentation des noyaux à partir d'un marquage nucléaire par exemple avec Stardist c) Zones cellulaires délimitées par analyse des distances avec des algorithmes de type Voronoï. d) Segmentation des cellules à partir de combinaison de marquages nucléaires et membranaires par exemple avec CellPose ou InstanSeg. e) Exemple de zones cellulaires, ici cytoplasme, définies par combinaison des segmentations d) et b).

Des mesures d'intensité sont alors effectuées pour chaque cellule, par exemple la moyenne d'intensité par cellule dans chacun des canaux correspondant aux différents marquages. Les logiciels de segmentation et d'analyse génèrent ainsi des tableaux de données dans lesquels, au minimum, chaque cellule est caractérisée par sa position dans l'image et ses valeurs d'intensité moyenne pour chaque canal. Il est théoriquement possible d'enrichir ce tableau par l'ajout d'un nombre potentiellement très élevé de paramètres accessibles, tels que des caractéristiques morphologiques ou des mesures plus complexes, incluant notamment la localisation subcellulaire des signaux.

La définition des populations cellulaires (**Figure 10**) peut se réaliser de différentes manières :

- soit de manière supervisée en indiquant les seuils d'intensité de décision de positivité sur des cytofluorogrammes par exemple, ou par apprentissage de machine en montrant des exemples de cellules positives à un marquage.
- soit de manière non supervisée avec des techniques de clustering comme UMAP, qui vont regrouper les cellules en les rapprochant par des caractéristiques d'intensité proches.
- soit en combinant les deux approches et en définissant de manière supervisée quelques populations de premier niveau, et en définissant des sous-populations par clustering non supervisé pour potentiellement identifier des sous-types cellulaires et leur contenu en protéines marquées.



**Figure 10:** Exemple d'analyse de résultats de multiplex (ici obtenues par la méthode Phenocycler™). Illustration adaptée de [9]. Les populations ont été définies par un arbre de décision de l'analyse de l'intensité des différents marquages avec le MAV [8].

Une fois ces populations définies, on peut alors répondre à différentes questions comme des fréquences d'occurrence spatiale dans différentes zones d'intérêt biologiques (**Figure 10**), l'existence de relations de voisinages systématiques entre certaines populations, la distance de populations cellulaires données à des zones d'intérêts biologiques... Différents logiciels permettent de réaliser ces analyses : HistoCat [6], QuPath [7], le plugin MAV [8] pour Fiji [1]...

## RÉSULTATS

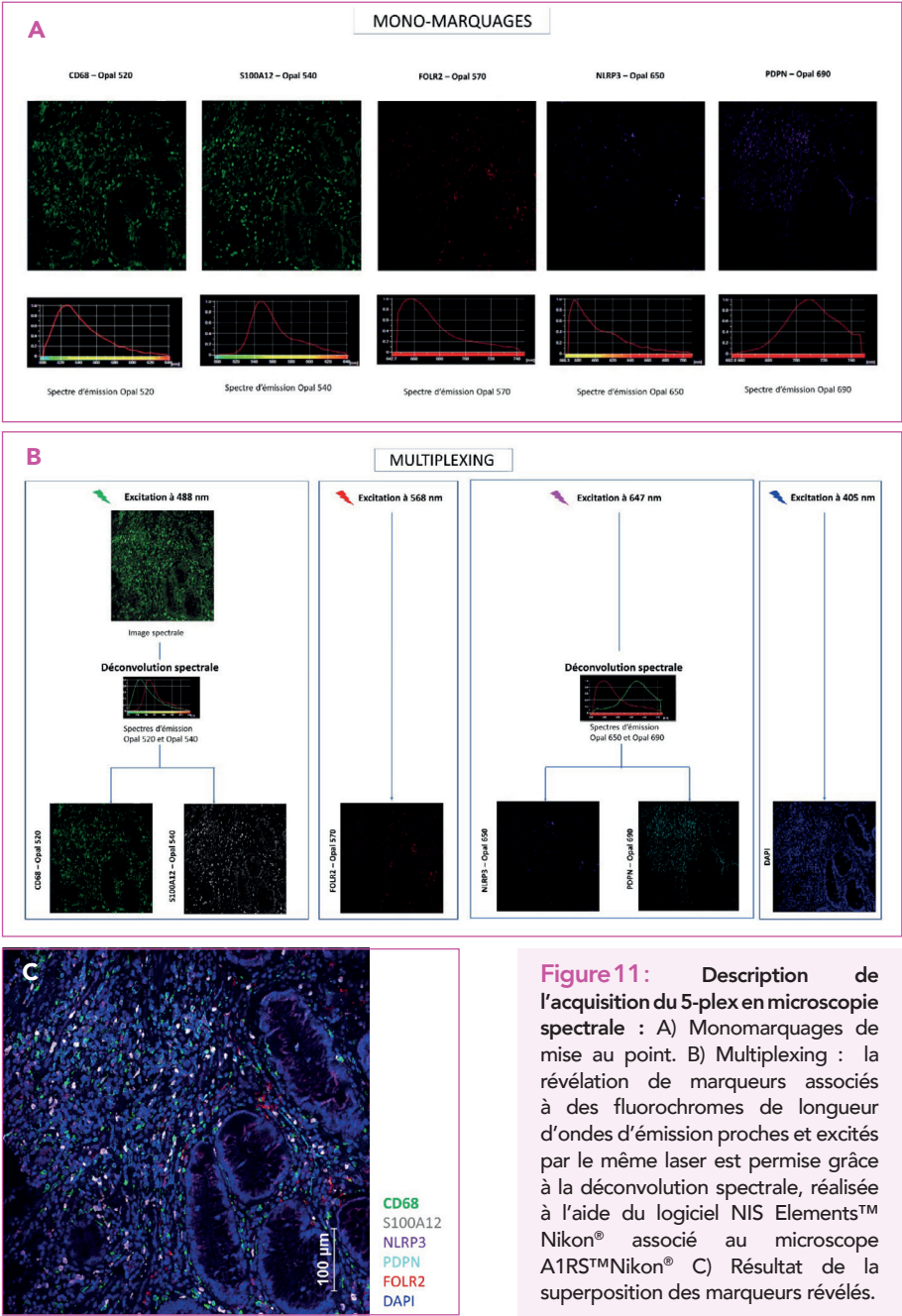
### 1. La technique à l'aide du système TSA (Tyramide Signal Amplification) Opal™

Elle est illustrée ici par le 5-plex CD68/S100A12/FOLR2/NLRP3/PDPN + DAPI sur coupe d'iléon humain FFPE, selon le principe expliqué précédemment.

Ces marqueurs, CD68 (Dako #M0814, 1/1000 1h), S100A12 (Abcam #ab196740, 1/1000 1h), FOLR2 (Thermo #MA5-26933, 1/200 1h), NLRP3 (Sigma #ABF23, 1/1000 1h), et PDPN (Santa Cruz #sc53388, 1/50 1h), déposés dans cet ordre, sont reconnus l'un après l'autre par le polymère couplé à la HRP (Stain MAX PO (MULTI) Universal Immuno-peroxydase Polymer anti-mouse and rabbit, NICHIREI #414151F, prêt à l'emploi, incubé 30 min) et révélés respectivement par les fluorochromes Opal™ 520 (Akoya #FP1487001KT), 540 (Akoya #FP1494001KT), 570 (Akoya #FP1488001KT), 650 (Akoya #FP1496001KT) et 690 (Akoya #FP1497001KT), dilués au 1/200 et incubés pendant 10 min. Les étapes de dénaturation à la chaleur (*stripping*) sont réalisées à l'aide de la solution de démasquage Target Retrieval Solution Low pH (K800521-2, Dako) 1X pendant 30 minutes à 96 °C.

Une déconvolution spectrale est nécessaire pour les marquages révélés par les Opal™ 520 (CD68) et Opal™540 (S100A12) puis les Opal™650 (NLRP3) et Opal™690 (PDPN), pour mettre en évidence distinctement chacun des marqueurs, puisque chacune des paires de fluorochromes de longueurs d'onde d'émission proches est excitée par le même laser, à la même longueur d'onde, et qu'il est alors impossible de distinguer chaque fluorochrome de chaque paire en microscopie traditionnelle.

Une fois les images de chacun des marquages obtenues, leur superposition peut être réalisée grâce au logiciel NIS Elements™ de Nikon® (**Figure 11**).



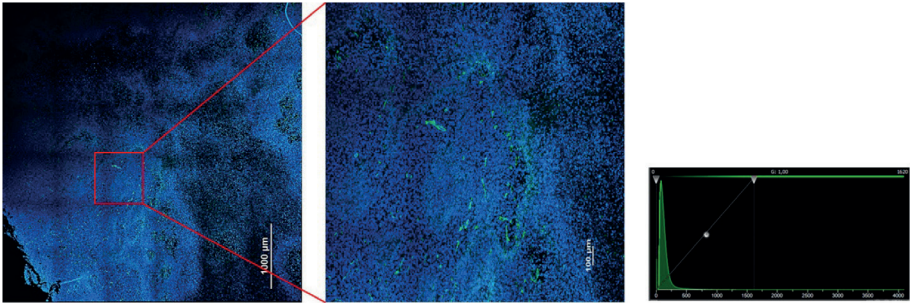
**Figure 11 :** Description de l'acquisition du 5-plex en microscopie spectrale : A) Monomarquages de mise au point. B) Multiplexing : la révélation de marqueurs associés à des fluorochromes de longueurs d'ondes d'émission proches et excités par le même laser est permise grâce à la déconvolution spectrale, réalisée à l'aide du logiciel NIS Elements™ Nikon® associé au microscope A1RST™Nikon® C) Résultat de la superposition des marqueurs révélés.

Cette technique présente de nombreux avantages, notamment l'amplification significative du signal rendue possible par l'utilisation de la tyramide, permettant ainsi de minimiser l'impact de l'autofluorescence potentiellement induite par le tissu. De plus, les fluorochromes Opal™ sont particulièrement brillants. Enfin, la dénaturation successive entre chaque marquage distinct permet l'utilisation d'anticorps primaires de la même espèce, sans risque de fixation croisée non spécifique d'un anticorps secondaire sur un anticorps primaire d'un marquage précédent, puisque ce dernier n'est plus présent sur la coupe. Toutefois, cette technique nécessite une longue mise au point car elle doit tenir compte de nombreux paramètres :

- Les conditions de chaque marquage (démasquage, concentration de l'anticorps primaire, temps d'incubation) doivent être mises au point avant de réaliser le multiplexing. Ces monomarquages sont réalisés en immunohistochimie et/ou en fluorescence.
- L'ordre des marquages est très important. En effet, certains épitopes peuvent être fortement altérés par les étapes de dénaturation répétées, et ne plus être révélés. Il est donc important de réaliser plusieurs tests pour s'assurer de la bonne résistance des épitopes aux étapes de dénaturation, c'est-à-dire déterminer le nombre maximal de dénaturations à la chaleur pour lequel l'épitope antigénique n'est pas dégradé et peut être révélé. Ces informations détermineront l'ordre des anticorps du protocole.
- L'attribution des fluorochromes Opal™ aux différents marqueurs doit être réfléchie. En effet, il est conseillé d'attribuer des fluorochromes Opal™ de longueur d'onde d'émission proches (ex. Opal™ 520 à 520 nm et Opal™ 540 à 540 nm), à des marqueurs dont le niveau d'expression est équivalent, de manière à ce que les spectres d'émission des fluorochromes choisis soient bien séparés et éviter le masquage d'un spectre par l'autre, ce qui rendrait la révélation de la protéine concernée impossible.

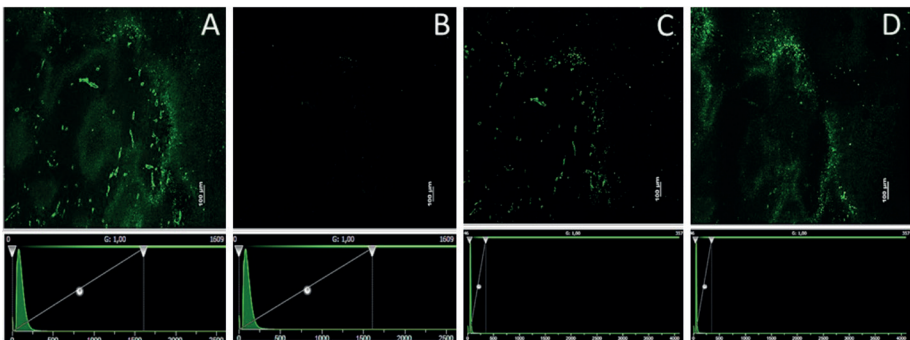
## **2. La technique classique à l'aide du système Vectaplex™ Vector Laboratories®**

Cette technique est illustrée ici par le 3-plex CD31/CD4/F4/80 sur coupe de tumeur mammaire murine FFPE, selon le principe de la méthode expliquée précédemment. Le premier marquage consiste à révéler les cellules endothéliales du tissu à l'aide d'un anticorps primaire anti-CD31 (Dianova, #DIA-310) dilué au 1/20 et incubé pendant 1h, reconnu par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome AlexaFluor™488 (Goat anti-rat IgG (H+L) Alexa 488, Invitrogen, réf. #A11006), dilué au 1/200 pendant 30 min. La contre-coloration des noyaux est réalisée à l'aide du DAPI. L'image du marquage est acquise sur une zone d'intérêt (**Figure 12**).



**Figure 12:** Marquage CD31 révélé par AlexaFluor™ 488+ DAPI (X60), puis grossissement 200%.

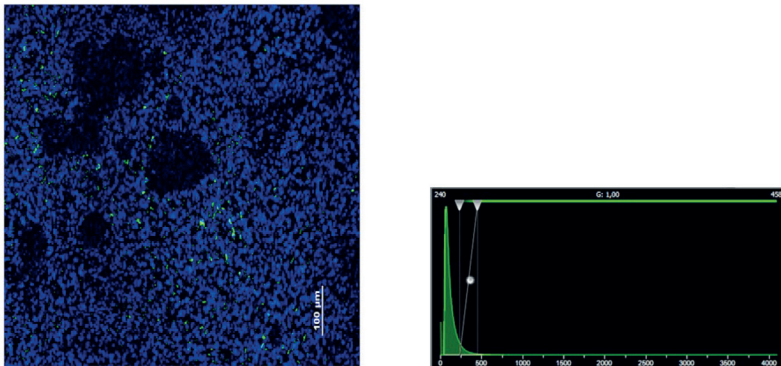
Il est constaté que, même si le marquage est spécifique et bien visible, il est nécessaire de retirer l'autofluorescence endogène présente et/ou le bruit de fond lié au marquage. La technique employée est l'utilisation du TrueView™ (Vector Laboratories, réf. #SP-8400) qui permet de s'affranchir de cette fluorescence non spécifique. Il est important de noter que certes, l'autofluorescence est retirée grâce à ce réactif, mais le signal spécifique présente une intensité moindre également (**Figures 13 A et B**), et qu'il est nécessaire d'intervenir sur le contraste et la luminosité pour afficher le signal (**Figure 13 C**).



**Figure 13:** A. Marquage CD31 révélé par AlexaFluor™ 488 avant Trueview™ (X60). L'image montre le marquage spécifique CD31 ainsi que de l'autofluorescence du tissu. B. Marquage CD31 révélé par AlexaFluor™ 488 après Trueview™ (X60). L'autofluorescence est bien retirée grâce au TrueView™ mais le signal spécifique lié au CD31 est devenu faible. C. Modification du contraste et de la luminosité pour observation du marquage spécifique CD31 révélé par AlexaFluor™ 488, après Trueview™ (X60) : le marquage spécifique CD31 est bien présent et l'autofluorescence est retirée. D. Retrait de la fluorescence liée au marquage spécifique CD31 révélé par AlexaFluor™ 488 et retour de l'autofluorescence du tissu, après Vectaplex™ (X60).

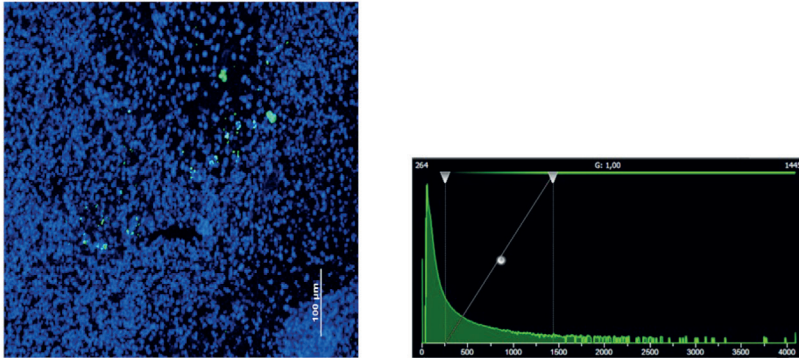
Le retrait du signal fluorescent spécifique du marquage CD31 est rendu possible par le Vectaplex™ et vérifié en réalisant une nouvelle acquisition de la région d'intérêt parfaitement ciblée grâce au positionnement maîtrisé et identique de la lame sur son porte-lame. Il est important de noter que le réactif Vectaplex™ retire certes le marquage spécifique, mais fait réapparaître l'autofluorescence du tissu (**Figure 13D**).

Le second marquage, CD4, marqueurs des lymphocytes T, est ensuite mis en évidence à l'aide d'un anticorps anti-CD4 (Invitrogen, réf. #14-9766-82) dilué au 1/50 et incubé pendant 12h à 4° C, lui-même reconnu par un anticorps secondaire lui aussi couplé à l'AlexaFluor™488 (Goat anti-rat IgG (H+L) Alexa 488, Invitrogen, réf. #A11006), dilué au 1/200 et incubé pendant 30 min. La contre-coloration des noyaux est réalisée à l'aide du DAPI. Il est également vérifié pour ce marquage la nécessité de retirer l'autofluorescence du tissu à l'aide du Trueview™, pour bien observer le marquage spécifique (**Figure 14**). Une fois l'image de ce second marquage acquise, le signal fluorescent spécifique est retiré à l'aide du Vectaplex™, avant de procéder au marquage suivant.



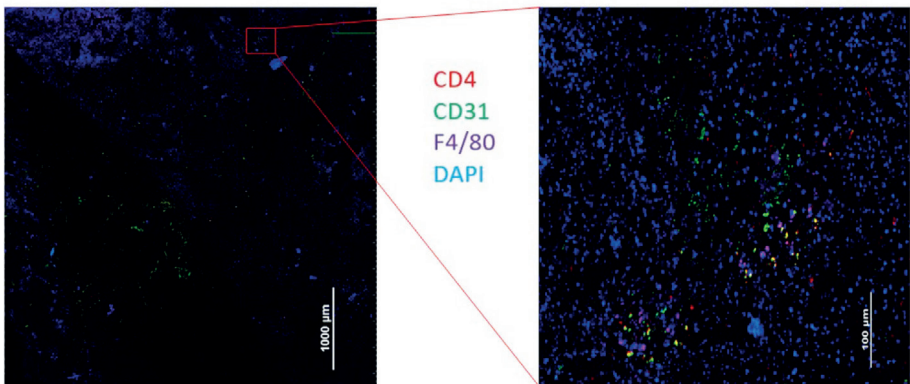
**Figure 14:** Marquage CD4 révélé par AlexaFluor™ 488+ DAPI (X60), puis grossissement à 200%.

Enfin, le troisième et dernier marquage est réalisé. Il s'agit ici du F4/80, marqueur de macrophages, révélé à l'aide d'un anticorps primaire anti-F4/80 (Abcam, réf. #ab300421), dilué au 1/5000 et incubé pendant 1h, reconnu par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome AlexaFluor™488 (Goat anti-rat IgG (H+L) Alexa 488, Invitrogen, réf. #A11006), dilué au 1/200 et incubé pendant 30 min. La contre-coloration des noyaux est réalisée à l'aide du DAPI, avant le retrait de l'autofluorescence par le Trueview™ qui s'avère nécessaire (**Figure 15**).



**Figure 15:** Marquage F4/80 révélé par AlexaFluor™ 488 + DAPI (X60), puis grossissement à 200%.

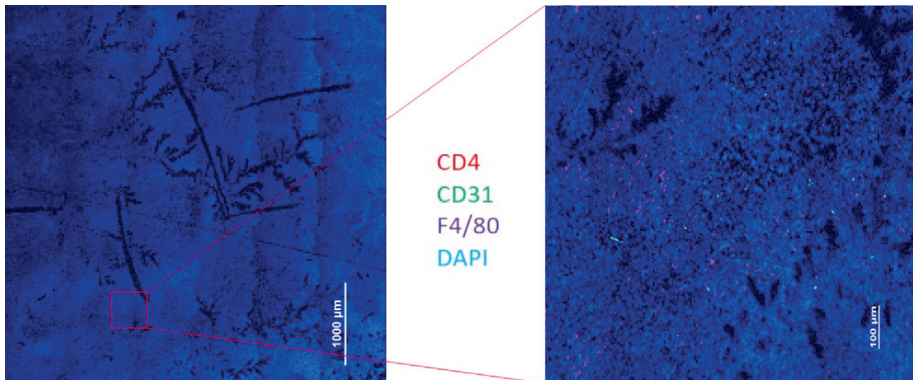
Une fois les images des simples marquages acquises dans la même zone d'intérêt grâce au système particulier du microscope LIPSI™ Nikon® permettant le repositionnement quasi identique de la lame, les images peuvent être corrélées et alignées à l'aide du mode Align Channels du logiciel NIS Elements™ de Nikon® sur la base du marquage des noyaux par le DAPI (**Figure 16**).



**Figure 16 :** Ensemble des marquages immunofluorescents du triple marquage, révélés par les AlexaFluor™. Les images des simples marquages sont alignées sur la base du marquage DAPI des noyaux à l'aide de la fonction Align Channels du logiciel NIS Elements™ Nikon®.

### 3. L'utilisation du réactif Vectaplex™ Vector Laboratories® dans la technique TSA Opal™.

Le 3-plex CD31/CD4/F4/80 peut être réalisé en révélant ces marqueurs à l'aide du système TSA Opal™, selon le principe de la méthode expliqué précédemment. Ce triple marquage est réalisé sur le même tissu que la technique décrite précédemment, sur tumeur mammaire murine. Ainsi, les cellules CD31 positives sont mises en évidence par l'Opal™ 520, le CD4 par l'Opal™ 570 et le F4/80 par l'Opal™ 650. Les noyaux sont quant à eux révélés par le DAPI. Contrairement à la technique d'immunofluorescence classique décrite précédemment, l'acquisition des images ne se réalise pas au fur et à mesure des marquages. Elle ne se fait qu'en fin de protocole, ce qui facilite la visualisation, puisque le recalage n'est pas nécessaire. Dans ce cas particulier, la déconvolution spectrale n'est pas nécessaire et l'acquisition est réalisée en microscopie traditionnelle (Figure 17).



**Figure 17 :** Ensemble des marquages immunofluorescents du triple marquage révélés par les Opal™. Cette image a été acquise en fin de protocole à l'aide du microscope LIPSI™ Nikon® (X60).

Par ailleurs, l'élimination de l'autofluorescence tissulaire et/ou du bruit de fond à l'aide du Trueview™ s'avère superflue, dans la mesure où les signaux sont fortement amplifiés par la tyramide et les fluorochromes utilisés présentent une brillance élevée. Les paramètres d'acquisition des images - tels que la puissance du laser, l'ouverture du pinhole ou la sensibilité des détecteurs - peuvent ainsi être maintenus à des niveaux faibles tout en permettant une détection claire et spécifique du marquage, indépendamment du bruit de fond.

De plus, l'application du réactif Vectaplex™ dans le cadre de la technique d'amplification du signal grâce à la technique TSA Opal™ permet de retirer le complexe anticorps primaire/anticorps secondaire après chaque marquage et de pouvoir utiliser des anticorps primaires de la même espèce.

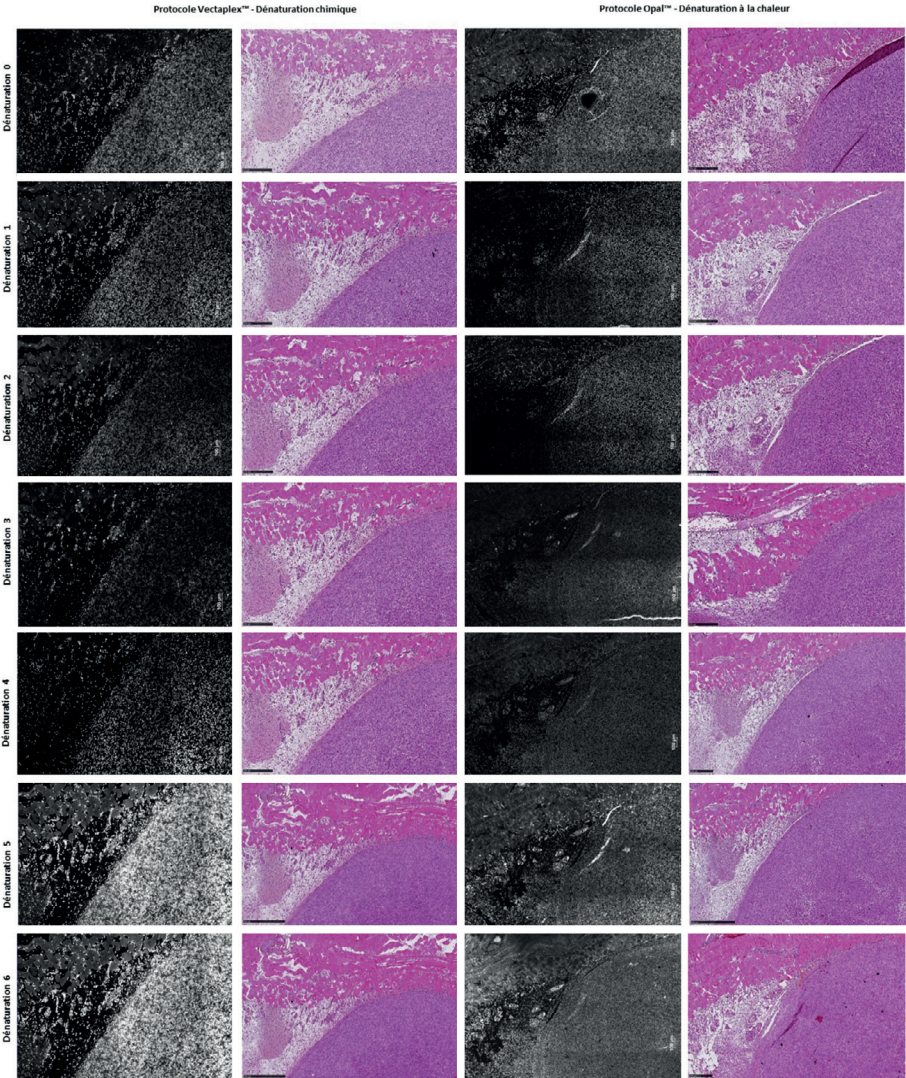
D'après la société Vector Laboratories®, l'utilisation de ce réactif présente aussi l'avantage de conserver une meilleure structure de l'échantillon, cette méthode de dénaturation chimique étant moins agressive que la dénaturation à la chaleur exposée précédemment. La société indique avoir testé l'effet potentiellement dégradant des dénaturations successives à l'aide de ce réactif. Elle affirme la bonne préservation de l'intégrité du tissu après 6 dénaturations chimiques.

Ces tests ont été réalisés ici (**Figure 18**) sur des coupes de tumeur mammaire de souris, ayant subi une ou plusieurs (jusqu'à 6) dénaturations chimiques ou à la chaleur. La révélation est réalisée d'une part par le marquage des noyaux en DAPI, et d'autre part, par une coloration Hématoxyline – Phloxine – Safran. Ces résultats montrent que le tissu testé ici conserve globalement bien sa structure et sa morphologie, que les dénaturations soient réalisées à l'aide du Vectaplex™ ou par la chaleur. Un nombre supérieur de dénaturations n'a pas été testé, et ne remet pas pour autant en question la possibilité de réaliser une telle technique. Il conviendra bien évidemment de vérifier la conservation de la structure du tissu et des épitopes antigéniques avec des tissus contrôles le cas échéant. De plus, ces tests ont été réalisés sur un seul tissu, la tumeur mammaire murine, et il serait pertinent de tester davantage de tissus de nature et d'espèces diverses pour confirmer ou non ces résultats observés.

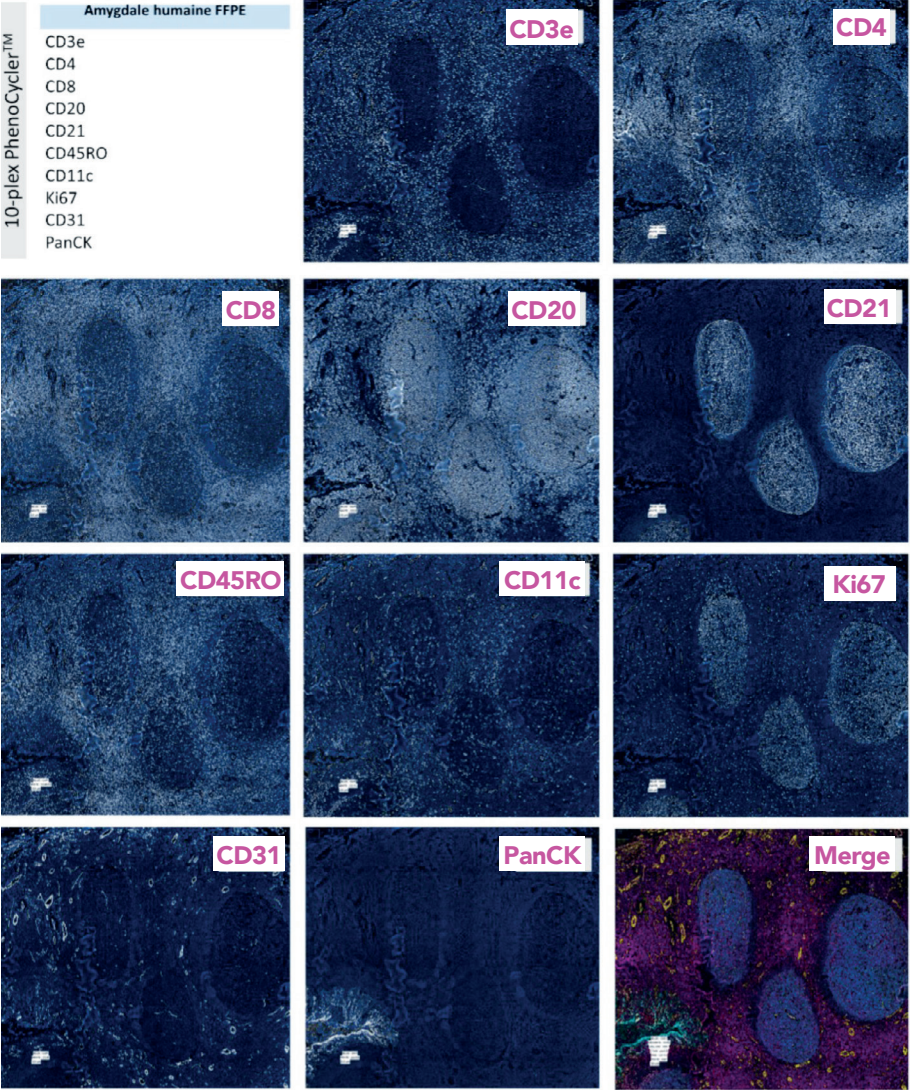
#### 4. La technique Phenocycler™ Akoya®\*

Un exemple d'images obtenues par la technologie PhenoCycler™ est illustré **Figure 22**, représentant un 10-plex sur une coupe d'amygdale humaine FFPE. Les anticorps utilisés sont des anticorps du catalogue Phenocycler™ Akoya®. Les conditions expérimentales utilisées (code-barre associé, fluorochrome, dilution et cycle d'acquisition) sont listées dans le **Tableau I**.

Les images pré-traitées sont ensuite analysées. En utilisant le plugin MAV (MultiAnalysis Viewer) [8] de Fiji [1], il est possible d'illustrer individuellement le marquage fluorescent obtenu pour chaque biomarqueur d'intérêt et de créer une image fusionnée de marqueurs sélectionnés (**Figure 19**).



**Figure 18 :** Tests de comparaison de dénaturations à l'aide du Vectaplex *versus* la chaleur.



**Figure 19 :** Exemples d’images acquises au cours d’une technique PhenoCycler™ (10-plex amygdale humaine FFPE).

| Cible           | Code-barre | Fluorochrome   | Dilution | Cycle d'acquisition |
|-----------------|------------|----------------|----------|---------------------|
|                 |            | reporter       |          |                     |
| CD21            | BX032      | Atto550        | 1/200    | 2                   |
| CD3e            | BX045      | Cy5            | 1/200    | 2                   |
| CD20            | BX007      | AlexaFluor™750 | 1/200    | 2                   |
| CD8             | BX026      | Atto550        | 1/200    | 3                   |
| CD4             | BX003      | Cy5            | 1/200    | 3                   |
| CD31            | BX001      | AlexaFluor™750 | 1/200    | 3                   |
| CD45RO          | BX017      | Atto550        | 1/200    | 4                   |
| CD11c           | BX024      | Cy5            | 1/200    | 4                   |
| Pan-Cytokeratin | BX019      | AlexaFluor™750 | 1/200    | 4                   |
| Ki67            | BX047      | Atto550        | 1/200    | 5                   |

**Tableau I :** Paramètres expérimentaux 10-plex PhenoCycler™ utilisés sur coupe FFPE d'amygdale humaine.

CONCLUSION

Les méthodes présentées ici ne représentent qu'un échantillon des méthodes de multiplexing existantes. Néanmoins, elles permettent de se rendre compte des nombreuses possibilités de révéler simultanément sur la même coupe de tissu plusieurs marqueurs, en fonction des moyens existants et de la question scientifique. Chaque méthode présente ses points forts et ses points faibles.

La technique basée sur l'utilisation du système TSA (Tyramide Signal Amplification) Opal™ Akoya Biosciences® permet de révéler jusqu'à 8 marqueurs (+ noyaux) sur coupe paraffinée comme sur coupe congelée. Elle présente l'avantage d'obtenir un signal très amplifié qui permet de négliger l'autofluorescence du tissu. Toutefois, même si l'acquisition des images se réalise en fin de protocole, elle nécessite un système optique particulier si le nombre de marqueurs révélés par les fluorochromes est supérieur au nombre de lasers ou filtres dont dispose le microscope, tel qu'une caméra multispectrale ou un microscope confocal à détection spectrale. De plus, il est important de bien tenir compte des contraintes liées à cette technique, telles que l'ordre des anticorps et l'association des fluorochromes aux différents marqueurs.

La méthode reposant sur le système Vectaplex™ de Vector Laboratories® permet de réaliser un multiplexage de manière simple, sans recourir à des ressources importantes en réactifs ou en équipements d'acquisition. De plus, le retrait des complexes anticorps primaires/secondaires à l'aide d'un produit chimique permet une meilleure conservation du tissu que l'usage de la chaleur. En revanche, la technique ne peut se réaliser que sur coupe paraffinée. Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps secondaires conventionnels ne permet pas d'obtenir un signal aussi intense qu'un système d'amplification, et peut entraîner l'apparition de bruit de fond.

Afin de limiter les interférences dues au marquage non spécifique et/ou à l'autofluorescence, l'emploi d'un réactif adapté s'avère nécessaire. L'utilisation d'un système de révélation amplifiée, tel que le TSA Opal™, permet toutefois de contourner ces artefacts, sous réserve d'une optimisation rigoureuse des conditions expérimentales comme indiqué dans notre étude. De plus, afin de visualiser l'ensemble des marqueurs sur la zone d'intérêt, une corrélation et un alignement des images doit être réalisé à l'aide d'outils de traitement des images.

La technologie Phenocycler™ d'Akoya Biosciences® offre l'avantage majeur de permettre la détection simultanée de plusieurs dizaines de marqueurs sur une seule et même coupe tissulaire. Le décrochage des *reporters* n'utilise pas la chaleur ce qui permet la conservation de la coupe dans son intégrité. Le tissu peut ensuite être utilisé pour être coloré par exemple en Hématoxyline Phloxine Safran. Toutefois, cette technique nécessite un système microfluidique particulier associé à un système d'acquisition. Le catalogue actuel d'anticorps PhenoCycler™ est dédié aux tissus humain (FFPE et FF) et murin (FF) et est limité. Bien que la conjugaison à façon d'anticorps cibles soit envisageable, cette approche peut s'avérer laborieuse et coûteuse.

Enfin, toutes ces méthodes présentent le point fort d'utiliser potentiellement des anticorps primaires issus de la même espèce, car les complexes anticorps primaire/anticorps secondaire sont retirés après chaque marquage par dénaturation, pour les techniques TSA Opal™ et Vectaplex™. Quant à la technique Phenocycler™, elle ne fait pas intervenir d'anticorps secondaire donc l'origine des anticorps primaires n'est pas une limite.

Tous ces points sont rassemblés dans le tableau de synthèse ci-après (**Tableau II**).

La technique de multiplexing permet d'obtenir des informations approfondies à partir d'une seule coupe tissulaire, évitant ainsi les biais liés à l'analyse de coupes sériées, auparavant utilisées pour réaliser des marquages multiples mais ne contenant pas nécessairement les mêmes cellules. Ces approches constituent ainsi un outil d'analyse protéique particulièrement puissant, permettant de définir l'identité cellulaire en associant des données obtenues à l'échelle unicellulaire à une localisation spatiale et à un contexte microenvironnemental. Cependant, plus le nombre de marqueurs analysés est élevé, plus le volume et la complexité des données générées augmentent.

| Systèmes                                                             | TSA Opal™<br>Akoya<br>Biosciences®                                                                                                                                                                                                                                                                               | Vectaplex™<br>Vector<br>Laboratories®<br>(IF classique)                                                                                                                                                                                                                                 | Vectaplex™<br>Vector<br>Laboratories®<br>(IF TSA Opal™)                                                                                                                                                                                                                                                                      | Phenocycler™<br>Akoya Biosciences®                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tissu paraffine                                                      | Oui                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Oui                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Oui                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Oui                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Tissu congelé                                                        | Oui                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Non                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Non                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Oui                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Nombre max.<br>de marqueurs                                          | 8<br>+ DAPI                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 6 ou plus<br>+ DAPI                                                                                                                                                                                                                                                                     | 6 ou plus<br>+ DAPI                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Plusieurs<br>10zaines                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Système<br>d'acquisition                                             | Microscope à<br>fluorescence avec<br>déconvolution<br>spectrale si le nombre<br>de marqueurs est<br>supérieur au nombre<br>de lasers/filtres<br><i>NB : le fournisseur<br/>propose des scanners<br/>et caméras optimisés</i>                                                                                     | Microscope à<br>fluorescence confocal<br>avec repositionnement<br>automatique de la<br>lampe                                                                                                                                                                                            | Microscope à<br>fluorescence<br>avec déconvolution<br>spectrale si le nombre<br>de marqueurs est<br>supérieur au nombre<br>de lasers/filtres                                                                                                                                                                                 | Microscope à<br>épifluorescence<br>pouvant être couplé à<br>un système fluidique<br>Phenocycler™                                                                                                                                                                                                                               |
| Réalisation<br>des immuno<br>marquages                               | Manuellement ou à l'aide d'un automate d'immunomarquages                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Système Phenocycler™<br>Akoya®                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Durée<br>approximative<br>d'une<br>technique<br>5-plex de<br>routine | Réalisation du<br>multimarquage : 16h/<br>coupe de tissu<br>Acquisition des images<br>: 3h/coupe de tissu                                                                                                                                                                                                        | Réalisation du<br>multimarquage<br>12h/coupe de tissu<br>Acquisition des images<br>: 3h/coupe de tissu                                                                                                                                                                                  | Réalisation du<br>multimarquage : 13h/<br>coupe de tissu<br>Acquisition des<br>images: 3h/coupe<br>de tissu                                                                                                                                                                                                                  | Réalisation du<br>multimarquage +<br>Acquisition : environ<br>4h30/coupe de tissu<br>(env. 1cm²)                                                                                                                                                                                                                               |
| Points forts                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification du signal</li> <li>• Pas ou peu d'autofluorescence</li> <li>• Utilisation d'anticorps primaires de la même espèce</li> <li>• Acquisition des images en fin de protocole</li> </ul>                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicité du protocole</li> <li>• Utilisation d'anticorps primaires de la même espèce</li> </ul>                                                                                                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification du signal</li> <li>• Pas ou peu d'autofluorescence</li> <li>• Utilisation d'anticorps primaires de la même espèce</li> <li>• Acquisition des images en fin de protocole</li> <li>• Dénaturation chimique : Meilleure préservation des épitopes et du tissu</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisation d'anticorps primaires de la même espèce</li> <li>• Pas de <i>stripping</i>: intégrité tissulaire préservée</li> </ul>                                                                                                                                                     |
| Durée<br>approximative<br>d'une<br>technique<br>5-plex de<br>routine | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Complexité dans la mise au point du protocole (ordre des marquages, attribution des fluorochromes)</li> <li>• Altération du tissu et des épitopes par les <i>strippings</i> à la chaleur répétés</li> <li>• Nécessité d'un système d'acquisition particulier</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d'amplification de signal</li> <li>• Autofluorescence du tissu, amplifiée par les étapes de dénaturation : nécessité de retirer l'autofluorescence</li> <li>• Acquisition des images après chaque marquage: recalage nécessaire</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Complexité dans la mise au point du protocole (ordre des marquages, attribution des fluorochromes)</li> <li>• Nécessité d'un système d'acquisition particulier</li> </ul>                                                                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conjugaison à façon des anticorps fastidieuse et onéreuse</li> <li>• Travail sur lamelle (ancienne version) et non sur lame: zone tissulaire limitée</li> </ul> <p><i>NB : le fournisseur propose désormais une nouvelle version du système qui permet de travailler sur lame</i></p> |

**Tableau II : Comparaison des caractéristiques principales des méthodes de multiplexing présentées.**

Ainsi, il est important de bien tenir compte de la problématique du stockage de ces données et de la possibilité de les interpréter grâce à des outils d'analyse d'images puissants et parfois complexes.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la plateforme MicroPICell, labellisée IBISA, appartenant au GIS Biogenouest, membre de l'Infrastructure Nationale France Biolmaging, soutenue par l'Agence Nationale de la Recherche française (ANR-10-INBS-04). Ils remercient également Elena Ishow (CEISAM, Nantes Université) pour son expertise au sujet du fonctionnement des sondes fluorescentes, ainsi que les porteurs des projets et/ou fournisseurs d'échantillons grâce auxquels ces travaux ont pu être réalisés : J. Martin (CR2TI, Nantes), M. Allard (CRCI2N, Nantes) et le service d'anatomie cytologie pathologiques du CHU de Nantes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SCHINDELIN J., ARGANDA-CARRERAS I., FRISE E., KAYNIG V., LONGAIR M., PIETZSCH T., PREIBISCH S., RUEDEN C., SAALFELD S., SCHMID B., TINEVEZ J.-Y., WHITE D.J., HARTENSTEIN V., ELICEIRI K., TOMANCAK P. & CARDONA A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 2012, **9** (7), 676-682.
2. POTIER G., DOMÉNÉ A. & PAUL-GILLOTEAUX P. A flexible open-source processing workflow for multiplexed fluorescence imaging based on cycles. *F1000Research*, 2022, **11**, 1121.
3. SCHMIDT U., WEIGERT M., BROADDUS C. & MYERS G. Cell Detection with Star-Convex Polygons., in Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018, Frangi AF, Schnabel JA, Davatzikos C, Alberola-López C, Fichtinger G, Vol11071, Springer International Publishing, Cham, 2018: 265-273.
4. STRINGER C., WANG T., MICHAELLOS M. & PACHITARIU M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, 2021, **18** (1), 100-106.
5. GOLDSBOROUGH T., O'CALLAGHAN A., INGLIS F., LEPLAT L., FILBY A., BILEN H. & BANKHEAD P. A novel channel invariant architecture for the segmentation of cells and nuclei in multiplexed images using InstanSeg. 2024. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.09.04.611150> (consulté le 14 novembre 2024).
6. SCHAPIRO D., JACKSON H.W., RAGHURAMAN S., FISCHER J.R., ZANOTELLI V.R.T., SCHULZ D., GIESEN C., CATENA R., VARGA Z. & BODENMILLER B. histoCAT:

analysis of cell phenotypes and interactions in multiplex image cytometry data. *Nature Methods*, 2017, **14** (9), 873-876.

7. BANKHEAD P., LOUGHREY M.B., FERNÁNDEZ J.A., DOMBROWSKI Y., MCART D.G., DUNNE P.D., MCQUAID S., GRAY R.T., MURRAY L.J., COLEMAN H.G., JAMES J.A., SALTO-TELLEZ M. & HAMILTON P.W. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 2017, **7** (1), 16878.

8. AKOYA CODEX® MAV. <https://help.codex.bio/codex/mav/overview>.

9. CARDON A., GUINEBRETIERE T., DONG C., GIL L., ADO S., GAVLOVSKY P., BRAUD M., DANGERR., SCHULTHEISS C., DOMÉNÉ A., PAUL-GILLOTEAUX P., CHEVALIER C., BERNIER L., JUDOR J.-P., FOURGEUX C., IMBERT A., KHALDI M., BARDOU-JACQUET E., ELKRIEF L., LANNES A., SILVAIN C., SCHNEE M., TANNE F., VAVASSEUR F., BRUSSELLE L., BROUARD S., KWOK W.W., MOSNIER J.-F., LOHSE A., POSCHMANN J., BINDER M., GOURNAY J., CONCHON S., MILPIED P. & RENAND A. The immune profile of circulating autoreactive CD4 T cells is imprinted through tissue activation during autoimmune liver diseases. 2024. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.03.26.586770> (consulté le 14 novembre 2024).

## RESSOURCES WEB

### Documents techniques (Accessibles auprès des fournisseurs)

- 1- PhenOptics : Quantitative Pathology Solutions – Perkin Elmer
- 2- PhenOptics Research Solutions – Perkin Elmer
- 3- Opal Staining Workflow – Perkin Elmer
- 4- Nikon A1R Simple Instructions Manuel – Version 4.10 - Nikon
- 5- Macro Functions NIS-Elements – Version 5.41.00 - Nikon

### Sites internet :

- 1- Akoya Biosciences : <https://www.akoyabio.com/phenoimager/assays/>
- 2- Vector Laboratories : <https://vectorlabs.com/products/vectaplex>
- 3- Vector Laboratories : <https://vectorlabs.com/trueview>
- 4- Akoya Biosciences : <https://www.akoyabio.com/phenocycler/>
- 5- Agilent : [https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/antibodies-controls/primary-antibodies/cd68-\(concentrate\)-76535#literature](https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/antibodies-controls/primary-antibodies/cd68-(concentrate)-76535#literature)
- 6- Abcam : <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/s100a12-cgrp-antibody-ab196740>
- 7- Thermo Fischer : <https://www.thermofisher.com/antibody/product/FOLR2-Antibody-clone-OTI4G6-Monoclonal/MA5-26933>
- 8- Sigma Aldrich : <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/mm/abf23>
- 9- Santa Cruz Biotechnologies : <https://www.scbt.com/fr/p/tbr-1-antibody-g-5>
- 10- Nichirei : <https://nichireibiosciences.com/wp-content/themes/nichirei/pdf/414151f%20MAX%20MULTI.pdf>
- 11- Dianova : <https://www.dianova.com/en/shop/dia-310-anti-cd31-mssw-from-rat-sz31-unconj-for-mouse-ffpe-tissue/>
- 12- Thermo Fischer : <https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD4-Antibody-clone-4SM95-Monoclonal/14-9766-82>
- 13- Abcam : <https://www.abcam.com/en-us/products/primary-antibodies/f4-80-antibody-epr26545-166-ab300421>
- 14- Thermo Fischer : <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Goat-anti-Rat-IgG-H-L-Cross-Adsorbed-Secondary-Antibody-Polyclonal/A-11006>