

# VISUALISATION DE LA TOPOLOGIE DE LA NICHE TUMORALE DANS LES NIDS DE FIBROSE INTRA-TUMORAUX DU CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE HUMAIN PAR IMMUNOHISTOCHIMIE MULTIPLEX À PARTIR DE BLOCS DE TISSU CONGELÉ

VIEL Roselyne<sup>1</sup>, CANO Luis<sup>2</sup>, POINTU David<sup>5</sup>, FAUTREL Alain<sup>1,2</sup>, DESILLE Mireille<sup>4</sup>, TURLIN Bruno<sup>1,3</sup>, SEFFALS Marine<sup>1</sup>, SEBILLOT Anthony<sup>1\*</sup>, MUSSO Orlando<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Univ Rennes, CNRS, INSERM, Biosit UAR 3480 US18, France-Biolmaging, Plateforme H2P2, 35 000 Rennes, France.

<sup>2</sup>INSERM, Univ Rennes, INRAE, Nutrition Metabolisms and Cancer, 35033 Rennes, France.

<sup>3</sup>CHU de Rennes, Laboratoire d'Anatomie Pathologique.

<sup>4</sup>CHU de Rennes, Centre de Ressources Biologiques Santé.

<sup>5</sup>Leica Microsystems, Nanterre, France.

\*Auteurs correspondants :

orlando.musso@univ-rennes.fr & anthony.sebillot@univ-rennes.fr

# VISUALIZATION OF THE TOPOLOGY OF THE TUMOR NICHE IN INTRA-TUMOR FIBROUS NESTS OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA BY MULTIPLEX IMMUNOHISTOCHEMISTRY ON FROZEN TISSUE

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 800,000 deaths worldwide every year. HCC generally arises in patients with chronic fibro-inflammatory liver diseases. Despite advances against hepatitis B and C, the incidence of HCC is rising, notably due to the high prevalence of obesity, associating hepatic steatosis with metabolic dysfunctions. Because of its heterogeneity, HCC response to immune checkpoint inhibitors remains limited. Despite their highly cellular architecture, 30% of HCCs contain foci of intra-tumor fibrosis. These foci are enriched in cancer stem/progenitor cells, with poor cyto-architectural differentiation and high expression of markers of poor patient outcome. Following a quantitative proteomics study of the extracellular matrix (ECM) of HCCs, we used multiplex immunohistochemistry to investigate the topographical relationships between several molecular targets on unfixed archival frozen tissue (stored for  $\geq 15$  years at  $-80^{\circ}\text{C}$ ). We established a proof of concept on three HCCs. Out of the 13 proteins studied, 10 were ECM components chosen for their predictive value of tumor aggressiveness, and three were chosen as topographical landmarks identifying, respectively, cancer-associated fibroblasts (CAFs), endothelial cells and leukocytes. Image acquisition revealed nodules of tumor cells surrounded by a meshwork of elastin, fibrillin-1, periostin, type I and V collagens, and expressing chemokines and growth factors like CXCL13 or GDF15. Leukocytes and CAFs surrounded highly vascularized tumor nodules. In conclusion, multiplex immunohistochemistry enables correlative microscopy and proximity analyses that reveal the topographical organization of the tumor microenvironment.

## KEY WORDS

Extracellular matrix, Frozen tissue banking, Microenvironment, Tumor stroma.

## RÉSUMÉ

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), responsable de 800 000 décès annuels dans le monde, survient généralement chez des patients atteints de maladies hépatiques chroniques fibro-inflammatoires. Malgré les progrès contre les hépatites B et C, l'incidence du CHC augmente, notamment en raison de la forte prévalence de l'obésité, associant la stéatose hépatique aux dysfonctions métaboliques. En raison de son hétérogénéité, sa réponse aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaire reste limitée. Malgré une architecture très cellulaire, 30% des CHCs contiennent des foyers de fibrose intra-tumorale. Ces foyers sont enrichis en cellules cancéreuses souches et progénitrices, avec une faible différenciation cyto-architecturale et une expression de marqueurs d'évolution péjorative des patients. Après une étude de protéomique quantitative de la matrice extracellulaire (MEC) des CHCs, nous avons recouru à l'immunohistochimie multiplex pour étudier les relations topographiques entre plusieurs cibles moléculaires sur des tissus congelés non fixés d'archive ( $\geq 15$  ans à  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Nous avons établi une preuve de concept sur trois CHCs. Parmi les 13 protéines étudiées, 10 étaient des composants de la MEC choisis en raison de leur valeur prédictive de l'agressivité tumorale et trois en tant que repères topographiques identifiant, respectivement, les fibroblastes associés au cancer (CAFs), les cellules endothéliales et les leucocytes. L'acquisition d'images a mis en évidence des nodules de cellules tumorales entourés par une maille d'élastine, fibrilline-1, périostine, collagènes de type I et V, contenant la chimioquine CXCL13 ou le facteur de croissance GDF15. Les leucocytes et les CAFs s'associaient à ces assemblages, entourant les nodules tumoraux richement vascularisés. En conclusion, l'immunohistochimie multiplex permet des analyses corrélatives et de proximité qui révèlent l'organisation topographique du microenvironnement tumoral.

## MOTS CLÉS

Archives congelées, Matrice extracellulaire, Microenvironnement, Stroma tumoral.

## INTRODUCTION

### Le carcinome hépatocellulaire

Avec environ 800 000 décès par an dans le monde, le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le quatrième cancer le plus meurtrier. Il survient dans plus de 80 % des cas dans un contexte de maladie hépatique chronique fibro-inflammatoire, et son hétérogénéité complique la prise en charge des patients [1]. Malgré les progrès de la vaccination contre le virus de l'hépatite B et des antiviraux directs contre le virus de l'hépatite C, l'incidence du CHC augmente de façon exponentielle en Europe Occidentale, ainsi qu'en Amérique du Nord et du Sud, en raison de la pandémie d'obésité et de la maladie stéatosique du foie associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD) [2]. En effet, la MASLD est liée au surpoids, à la sédentarité et à la consommation chronique excessive d'alcool [3]. Le ciblage thérapeutique des points de contrôle immunitaires a élargi les options thérapeutiques pour le CHC; cependant, le taux de réponse limité à 30% souligne la nécessité de caractériser l'hétérogénéité de la tumeur pour mieux prédire la réponse à la prescription thérapeutique [4]. Bien que la caractérisation transcriptomique de l'hétérogénéité du CHC puisse prédire les réponses thérapeutiques dans le cadre de la recherche fondamentale [5, 6], l'applicabilité de ces résultats dans un contexte clinique nécessite une optimisation du rapport bénéfice/coût. Environ 70 % des CHCs récidivent cinq ans après la résection chirurgicale [1]. Étant donné que le CHC se développe en général sur un terrain de maladie hépatique chronique fibro-inflammatoire [1], de fréquentes lésions précancéreuses multifocales donnent naissance à de nouveaux CHCs. Ce phénomène a été appelé « l'effet de terrain » [7]. Il est admis de façon consensuelle que les récidives dans les 24 mois suivant la résection sont plus vraisemblablement liées à la tumeur réséquée. Il n'est pas exclu que les récidives survenant après cette période ne soient pas de nouveaux CHCs [8].

### La fibrose intra-tumorale

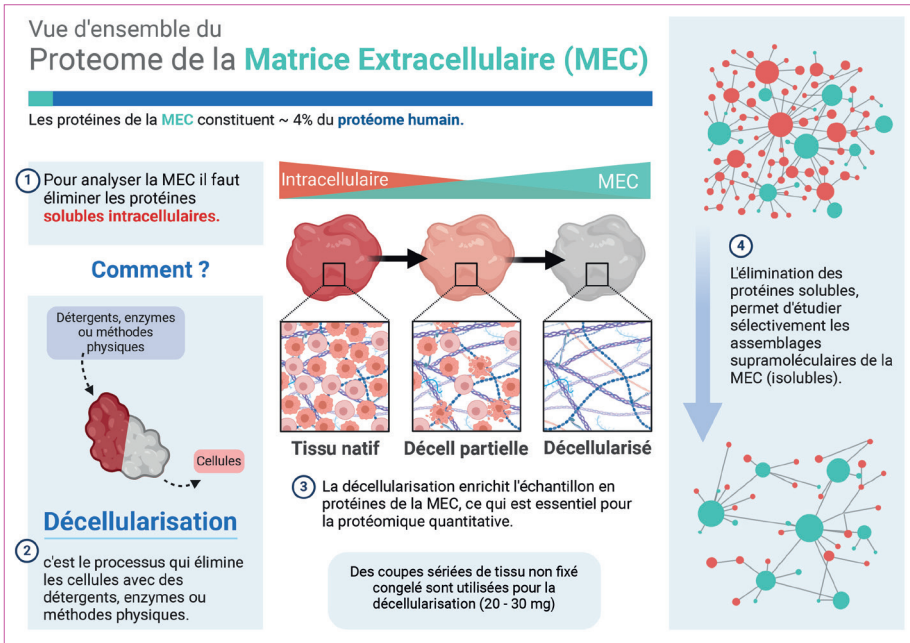
Après avoir construit une méta-base de données transcriptomiques (GSE237977) et analysé 1133 CHCs, nous avons révélé une distribution de l'hétérogénéité des CHCs en 2 dimensions [9-11] : la 1<sup>re</sup> dimension se caractérise par un continuum dans le rapport prolifération/différenciation, avec développement d'une fibrose intra-tumorale et un enrichissement en cellules souches cancéreuses; la 2<sup>de</sup> dimension explique notamment l'hétérogénéité des tumeurs les plus différenciées, qui préservent la zonation du métabolisme hépatique, typique du foie normal. Physiologiquement, cette zonation distribue certaines fonctions métaboliques comme le catabolisme des acides aminés et la gluconéogenèse au niveau des zones périportales et d'autres fonctions telles que la glycolyse ou la synthèse de glutamine, au niveau des hépatocytes entourant les veines centro-lobulaires [12-14].

Ainsi, quatre sous-classes, *PERIORTALE*, *PERIVEINEUSE*, *MATRICE EXTRACELLULAIRE (MEC)* et *SOUCHE*, forment un continuum de malignité croissante [9-11], avec des caractéristiques métaboliques spécifiques liées à leur chimiorésistance [15]. Les CHCs sont généralement des tumeurs très cellulaires, avec une consistance molle à l'examen macroscopique et peu de fibrose intra-tumorale [16]. Cependant, à l'examen microscopique, l'on peut observer dans 30 % des CHCs des foyers de fibrose intra-tumoraux, c'est-à-dire des dépôts de matrice extracellulaire (MEC), que nous avons appelés « nids fibreux » [17]. La présence de ces foyers dans les CHCs est associée à un enrichissement en cellules souches/progénitrices cancéreuses, en signaux WNT/TGFB et en fibroblastes associés au cancer [17, 4, 18]. La signature protéomique de ces CHCs suggère qu'ils appartiennent à la classe la plus agressive, connue sous le nom de MEC/SOUCHE, et que les nids fibreux sont des niches de cellules souches cancéreuses [19, 20]. Ce stroma fibro-inflammatoire pourrait favoriser la progression tumorale et favoriser l'émergence d'un microenvironnement immunosuppresseur [21] par des voies de signalisation activées par la mécano-transduction. Ces résultats encourageants [19, 20, 4] ont été obtenus à partir de 20 CHCs et de leurs foies non tumoraux correspondants, et les données protéomiques ont été validées au niveau transcriptomique avec la base de données publiques *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, n = 370 CHCs), ainsi qu'avec la méta-base précédemment décrite (GSE237977, n= 1133).

En termes histopathologiques, la fibrose intra-tumorale est nommée « *desmoplasie* » du grec *desmos* (lien) et *plasis* (formation). Elle décrit une réaction fibreuse du tissu conjonctif des tumeurs malignes, caractérisée par une prolifération importante de fibroblastes, infiltration inflammatoire et dépôt de matrice extracellulaire [22, 23]. La quantification histopathologique de la fibrose intra-tumorale pourrait devenir un outil prédictif de l'agressivité des CHCs [4]. Sa mise en œuvre serait simple, car elle pourrait être associée au rapport d'examen anatomopathologique de routine d'une pièce de résection. Aussi, la fibrose intra-tumorale pourrait-elle être quantifiée automatiquement sur des coupes de tissu colorées en routine à l'hémaroxyline-éosine-safran (HES), en utilisant des approches d'intelligence artificielle supervisées par des anatomopathologistes. À l'appui de cette hypothèse, nous avons récemment quantifié la fibrose intra-tumorale à l'aide du logiciel d'analyse d'image QuPath sur des coupes de CHC colorées au rouge Sirius et montré que la fibrose intra-tumorale de bas et de haut grade représentent (moyenne  $\pm$  SD)  $0,02 \pm 0,02$  et  $0,2 \pm 0,1$  de la masse tumorale, respectivement [20]. Ainsi, la quantification de la fibrose intra-tumorale pourrait contribuer à une meilleure évaluation des mécanismes moléculaires sous-jacents mis en jeu, afin d'orienter la prise en charge des patients [4].

## Étude de la matrice extracellulaire des tumeurs

La matrice extracellulaire (MEC) est composée de collagènes, glycoprotéines non-collagéniques et de protéoglycanes. Ces composants forment, ensemble, des assemblages supramoléculaires insolubles avec des rôles physiologiques structuraux et régulateurs des fonctions cellulaires [24]. Ils fonctionnent ainsi comme plateformes accueillant et stockant des facteurs de croissance, des cytokines et chimiokines, modulant les interactions cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire et l'homéostasie cellulaire [25]. Ces assemblages supramoléculaires de la MEC sont connus comme le « matrisome » [26]. Pour identifier et quantifier les protéines composant ces assemblages supramoléculaires (**Figure 1**), il est nécessaire d'enrichir l'échantillon en composants de la MEC. Ainsi, nous éliminons les protéines solubles intracellulaires par des étapes de décellularisation en présence de détergents, d'enzymes et par des méthodes physiques (agitation) [27].



**Figure 1** : Vue d'ensemble de la méthode pour l'étude du protéome de la matrice extracellulaire (le matrisome). Image conçue avec Biorender.com.

Pour ce faire, il est utile de préparer des coupes sériées (20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) de tissu frais congelé et d'optimiser la masse de tissu nécessaire selon le modèle et l'organe étudié. Dans notre cas, nous avons utilisé entre 20 et 30 mg de tissu hépatique tumoral ou non-tumoral, visant une analyse de protéomique quantitative [19]. L'étude protéomique [19] a porté sur 20 patients atteints de CHC, ayant subi une chirurgie hépatique à visée curative au CHU de Rennes, entre janvier 1992 et décembre 2007. Les CHCs fibro-lamellaires ont été exclus.

Par la suite, une fois des cibles protéiques d'intérêt clinique identifiées, nous avons souhaité savoir si ces marqueurs étaient colocalisés dans une sélection de tumeurs et quels étaient les rapports spatiaux avec les fibroblastes associés au cancer, l'infiltration leucocytaire et la vascularisation tumorale. En conséquence, nous avons sélectionné 10 anticorps identifiant des protéines de la MEC d'intérêt clinique et fonctionnel et trois repères topographiques.

## PATIENTS, MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Échantillons

Des échantillons d'archives congelés, conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant  $\geq 15$  ans, ont été obtenus auprès du Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Rennes (BB-0033-00056). La collecte des échantillons a été déclarée au Ministère de l'Education et de la Recherche (No. DC-2008-338). Dès réception au laboratoire d'Anatomie Pathologique, et après examen macroscopique par un médecin anatomopathologiste, les tissus frais dédiés à des fins de recherche ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans de l'isopentane refroidi au  $\text{N}_2$  liquide, et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , dans des conditions de qualité contrôlées. Le protocole de l'étude était conforme aux lois et règlements français et répondait aux exigences du Comité d'Évaluation Éthique de l'INSERM (numéro d'approbation 20-654). Après inclusion en paraffine de blocs miroirs des mêmes tumeurs fixées au formol tamponné (FFPE), les CHCs ont été diagnostiqués par un pathologiste spécialisé en hépatologie (BT). Pour ces tumeurs, les coupes issues des blocs miroirs non fixés et congelés ont été examinées par deux chercheurs spécialisés en anatomie pathologique (LC, OM) et comparées avec les lames d'archive issues des blocs FFPE. L'évaluation de la fibrose intra-tumorale des CHCs a été réalisée par LC et OM, appliquant un score de 0 à 3 sur des coupes colorées en HES, en aveugle de toute information clinique ou moléculaire, comme décrit précédemment [17]. Un score  $\geq 2$  était considéré comme une fibrose intra-tumorale de grade élevé. Cette méthode a été validée par une analyse quantitative [20].

## Immunohistochimie multiplex

Les analyses immunohistochimiques multiplexées ont été réalisées au laboratoire d'Histopathologie de Haute Précision (H2P2) de l'Université de Rennes, en utilisant la technologie Cell Dive™ (Leica Microsystems, Nanterre, France) et des anticorps primaires marqués (**Tableau I**).

Symbole	Fournisseur	Espèce	Référence	Clone	Dilution
VCAN-CF488	Clinisciences	Lapin	ORB13754-CF488A	polyclonal	1/35
ANXA1-DL680	Biotechne	Souris	NBP2-70174FR	OTI3A8	1/35
FBN1-A750	Clinisciences	Lapin	BS-1157R-A750	polyclonal	1/70
CXCL13-Y2	Novusbio	Lapin	NBP2-16041G	polyclonal	1/25
POSTN-Y7	Clinisciences	Souris	SC-398631 AF790	F-10	1/25
COL5A1-Y3	Novusbio	Souris	NBP1-05118R	1E2-E4/Col5	1/10
DPT-Y5	Santa Cruz	Souris	sc-376863 AF680	F-4	1/50
ELN-Y7	Biotechne	Souris	NBP3-08889IR	ELN/2069	1/25
COL1A1-Y2	Biotechne	Lapin	NBP1-77457G	polyclonal	1/25
CD45-Y3	Biotechne	Lapin	NBP3-08910R	PTPRC/1975R	1/20
ACTA2-Y5	Biotechne	Souris	NBP2-34522FR	1A4/asm-1	1/100
CD31-Y3	Abcam	Lapin	ab279331	EPR309	1/20
GDF15-A555	CliniSciences	Lapin	bs-3818R-A555	polyclonal	1/70

**Tableau I :** Anticorps utilisés en immunohistochimie multiplex

Des cryocoupes (7 µm) obtenues dans un cryostat Leica CM3050S, (température de l'enceinte : -20 °C ; température de l'objet : -19 °C), à partir de blocs de tissu non fixé, congelé dans l'isopentane refroidi à l' $N_2$  liquide et stockés à -80 °C, ont été fixées pendant 10 minutes dans du formol à 4 %, pH 7,4 à température ambiante, rincées dans du PBS et perméabilisées dans du Triton-X-100 à 0,1 % / PBS durant 15 minutes, puis rincées dans du PBS. Le traitement ultérieur a été effectué conformément aux instructions du manuel Cell Dive™. La réaction peut



avoir lieu entre lame et lamelle (volume réactionnel d'environ 100  $\mu\text{L}$ ) ou bien dans une chambre d'incubation fermée appelée « *clickwell* » (volume réactionnel d'environ 350  $\mu\text{L}$ ). Quel que soit le format, les étapes suivantes sont : blocage des liaisons non spécifiques, coloration au DAPI, imagerie du tissu entier, contrôle de la qualité et imagerie auto-fluorescente. Pour chaque cycle d'imagerie, les lamelles ont été ôtées. Les lames lavées avec un tampon de lavage Tween ont ensuite été marquées avec les anticorps appropriés, lavées et imagées. Des séries de quatre anticorps ont été appliquées au même bloc de tissu monté. Les images numériques ont été visualisées avec le logiciel d'imagerie HALO (*Indica Labs*) et le signal des fluorophores a été restitué à l'aide d'une palette RVB adaptée aux daltoniens. Le signal a été acquis par RV sans connaissance préalable des données cliniques ni protéomiques des échantillons. Les images ont été sélectionnées et traitées par RV et OM, assistés par NM et AS.

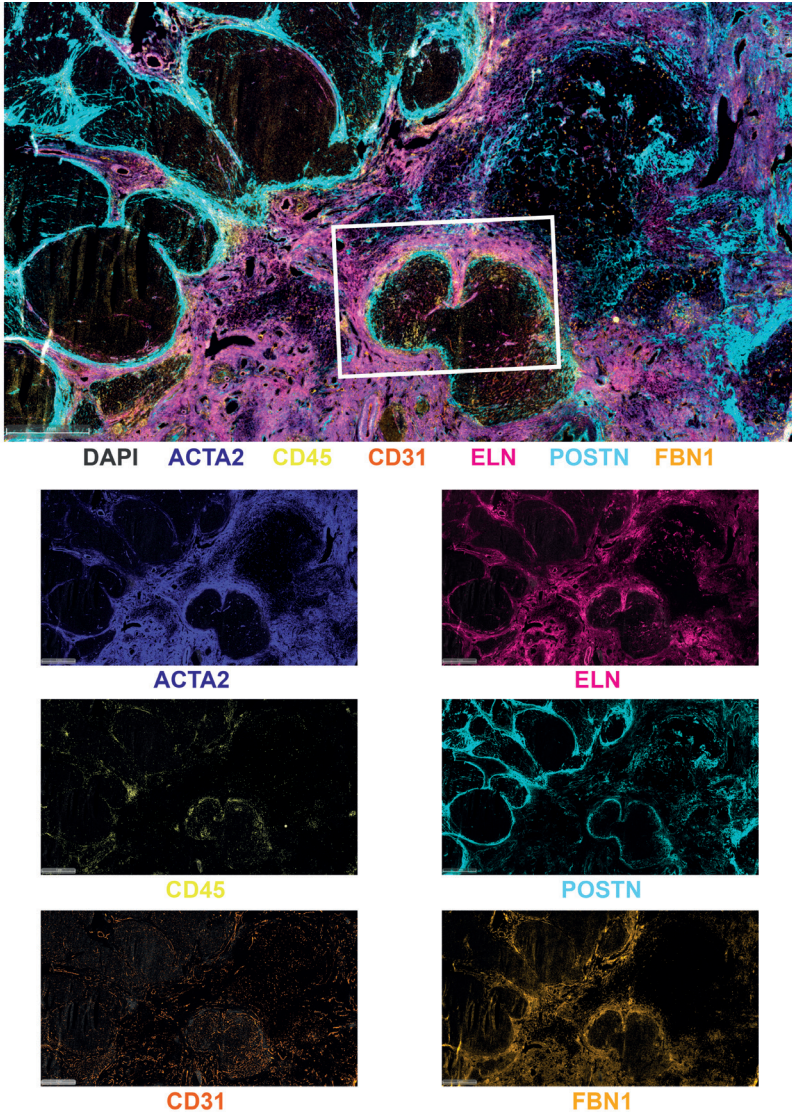
## RÉSULTATS

### Visualisation *in situ* des assemblages supramoléculaires de la matrice extracellulaire dans la fibrose intra-tumorale du CHC.

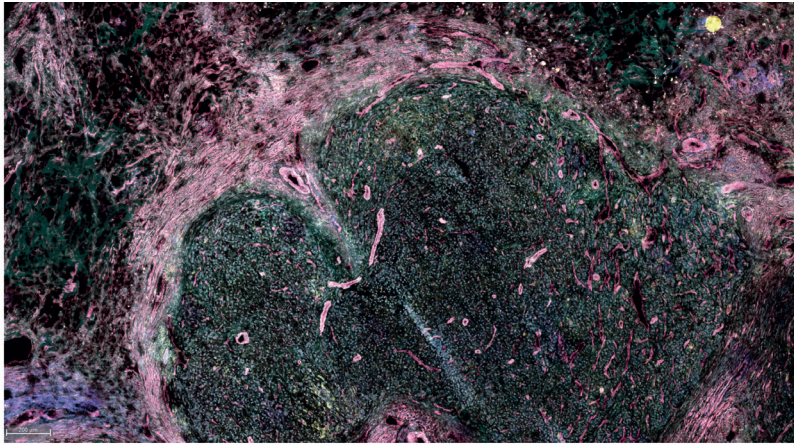
Nous avons complété l'analyse protéomique du matrisome avec une visualisation de certaines protéines matricielles d'intérêt en raison de leur valeur prédictive de l'agressivité tumorale, [19, 4] et de leurs rapports spatiaux avec les cellules tumorales et d'autres composants du microenvironnement tumoral comme les cellules immunitaires, les bourgeons capillaires angiogéniques et les myofibroblastes associés au cancer.

Ainsi, nous avons co-détecté 10 protéines de la MEC et trois protéines dites « repères topographiques » par immunomarquage multiplex dans la fibrose intra-tumorale de haut grade de trois CHCs humains. La détection de 13 protéines a été réalisée sur une même cryocoupe. Pour faciliter la visualisation du signal, les images individuelles et fusionnées sont présentées en 3 groupes (**Figures 2-4**). Dans toutes les images fusionnées, les repères topographiques des tissus sont établis par la détection de l'actine musculaire lisse alpha (ACTA2), du CD31 et du CD45, qui marquent respectivement les myofibroblastes, les cellules endothéliales des capillaires tumoraux et les leucocytes. Le DAPI marque les noyaux.

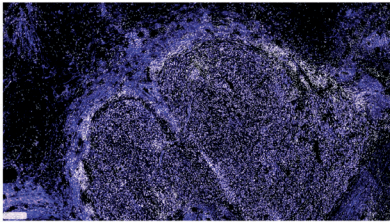
Des nodules tumoraux, d'un à trois millimètres dans leur grand axe, richement vascularisés, étaient entourés d'assemblages de protéines de la MEC, composés d'élastine, fibrilline, périostine, collagènes de type I et V, dermatopontine et versican (**Figure 3**). Il a été suggéré que les protéines synthétisées d'une part par les fibroblastes associés au cancer et, d'autre part, par les cellules tumorales en cours de transition épithélio-mésenchymateuse, peuvent agir comme une barrière. Cette barrière limiterait l'infiltration leucocytaire au sein des nodules tumoraux



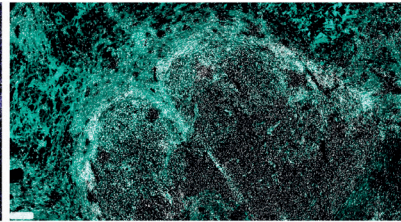
**Figure 2 :** Identification de protéines de la matrice extracellulaire (ELN, élastine ; POSTN, périostine ; FBN1, fibrilline-1) et de marqueurs topographiques (ACTA2, alpha actine de muscle lisse ; CD45, protéine tyrosine phosphatase récepteur de type C ; CD31, molécule d'adhésion des cellules plaquettaires et endothéliales ou PECAM-1). Les symboles des gènes des protéines détectées sont indiqués sous chaque image, avec leur code couleur respectif. Le masque blanc montre la région d'intérêt zoomée et montrée dans les Figures 3 et 4. Les barres d'échelle indiquent 1 millimètre. Images acquises avec un objectif Nikon 20X/NA 0.75.



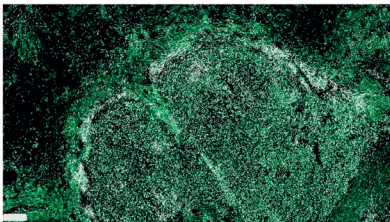
DAPI ACTA2 CD45 CD31 COL1A1 COL5A1 DPT VCAN



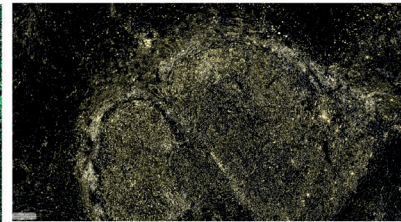
COL1A1



COL5A1



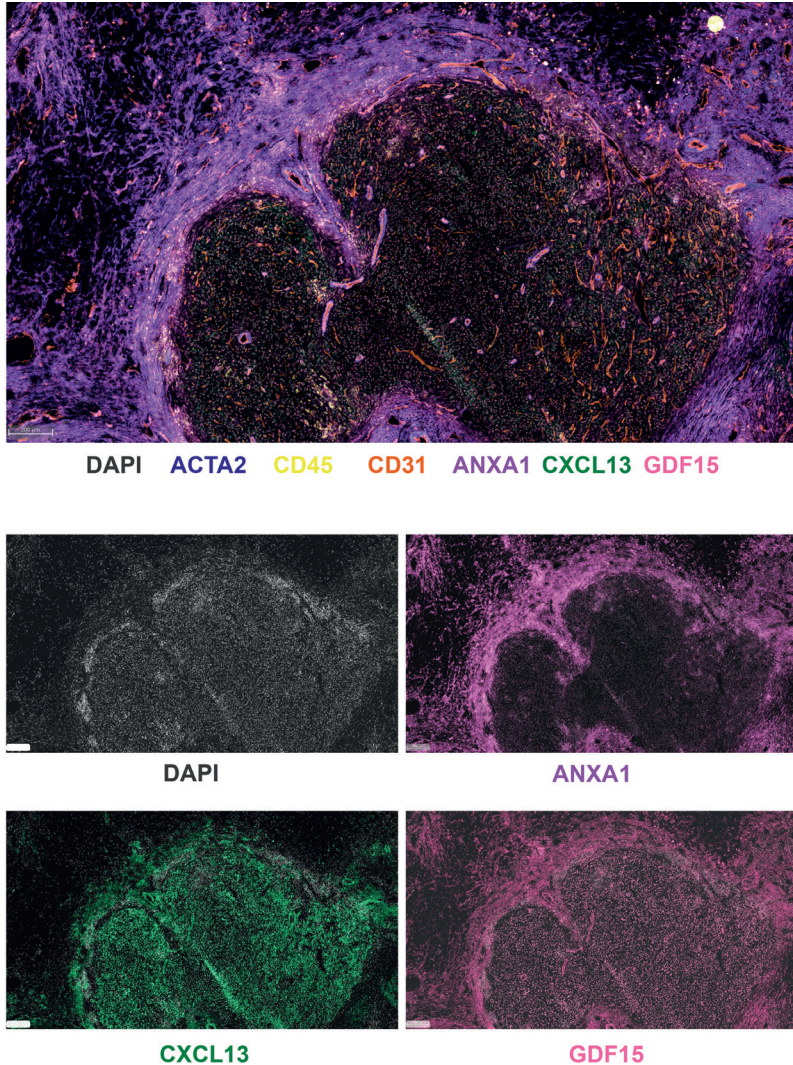
DPT



VCAN

**Figure 3 :** Gros plan de la région d'intérêt mise en évidence dans la Figure 2. Les symboles des gènes correspondant aux protéines détectées sont indiqués sous chaque image, avec leur code couleur respectif. COL1A1, collagène de type I ; COL5A1, collagène de type V ; DPT, dermatopontine ; VCAN, versican. Les barres d'échelle indiquent 200 µm. Images acquises avec un objectif Nikon 20X/NA 0.75.





**Figure 4:** Gros plan de la région d'intérêt mise en évidence dans la Figure 2. Les symboles des gènes des protéines détectées sont indiqués sous chaque image, avec leur code couleur respectif. ANXA1, annexine 1 ; CXCL13, C-X-C motif chemokine ligand 13 ou chemoattractant des lymphocytes B ; GDF15, facteur de croissance et différenciation 15. Les barres d'échelle indiquent 200  $\mu$ m. Images acquises avec un objectif Nikon 20X/NA 0.75.

et ainsi inhiberait l'immunité antitumorale [28]. A noter, par exemple, que nous avons identifié l'annexine A1 (**Figure 4**) dans la couche de myofibroblastes ACTA2 (+) entourant les nodules tumoraux (**Figure 1**). L'annexine A1 est une protéine immunomodulatrice qui se lie aux membranes cellulaires, étant associée à une infiltration de macrophages de type M2, générant un environnement immunosuppresseur, caractérisé par la suppression de l'activité cytotoxique des lymphocytes CD8<sup>+</sup> [29]. De façon concordante, la chimiokine CXCL13 (**Figure 4**) a des rôles immunomodulateurs positifs ou négatifs en fonction du microenvironnement tumoral [30]. Elle se lie, *via* des résidus basiques comme les lysines et les arginines, aux glycosaminoglycanes de la MEC [31]. A son tour, le GDF15 (**Figure 4**), est un membre de la superfamille du TGFβ. Il est exprimé à de faibles niveaux dans les tissus normaux, mais retrouvé à des niveaux élevés dans le microenvironnement tumoral, étant sécrété par des myofibroblastes et des cellules immunitaires. Dans ce contexte, il intervient dans l'épuisement immunitaire des tumeurs et promeut le phénotype souche des cellules cancéreuses [32]. A noter que, de façon concordante avec les rôles fonctionnels de ces molécules, les leucocytes CD45<sup>+</sup> restent majoritairement à l'interface entre les nodules tumoraux et le stroma (**Figure 1**), ce qui souligne l'intérêt de poursuivre l'immunophénotypage plus précis de ce microenvironnement fibrogénique. Au total, ces résultats, combinant la protéomique du matrisome avec l'immunohistochimie multiplex, ont non seulement permis la visualisation des protéines matricielles, mais aussi ils ont pu confirmer *in situ* la proximité topographique de la matrice extracellulaire avec certains facteurs solubles. Il peut paraître surprenant que la technique du matrisome, visant l'enrichissement en protéines de la matrice extracellulaire, mette en évidence des protéines non matricielles comme des facteurs de croissance. Toutefois, l'utilisation de détergents non dénaturants élimine une grande partie des protéines cytosoliques solubles, mais préserve une partie des membranes cellulaires et de leur glycocalyx, composé de protéoglycanes liant de nombreux facteurs de croissance, ainsi que des protéines matricielles [25, 26].

## DISCUSSION

L'immunohistochimie multiplex est non destructive et il n'y a pas de limitation concernant la surface d'acquisition sur une lame d'histologie, ce qui offre la possibilité de cartographier une coupe entière obtenue à partir d'un bloc de tissu. Selon la taille des blocs étudiés, l'immunohistochimie multiplex permet de réunir sur une même lame aux dimensions standard plusieurs blocs de tissu et ainsi étudier ensemble, par exemple, des tissus sains et pathologiques provenant d'une même pièce d'exérèse. Cet avantage offre une réponse approfondie aux questions du chercheur en comparant les données de plusieurs échantillons traités simultanément.

D'autre part, l'immunohistochimie multiplex offre la possibilité d'étudier plusieurs dizaines de cibles sur une même coupe de tissu [33].

La technologie que nous utilisons fonctionne avec des anticorps primaires couplés directement aux fluorophores. Des listes d'anticorps validés par des fournisseurs commerciaux sont disponibles et actualisées périodiquement. Plusieurs stratégies de sélection d'anticorps peuvent ainsi être appliquées. Premièrement, nous identifions des anticorps primaires commerciaux couplés aux fluorophores. Deuxièmement, si l'anticorps recherché n'est pas disponible, nous avons la possibilité de commander un couplage à façon au fluorophore de notre choix. Enfin, nous pouvons réaliser le couplage de l'anticorps primaire avec le fluorophore dans notre laboratoire en utilisant des kits de couplage commerciaux. Dans tous les cas, le rendement de la conjugaison du fluorophore à l'anticorps et la concentration de travail des anticorps conjugués sont des variables importantes, qui doivent être optimisées.

L'immunohistochimie multiplex décuple la puissance d'acquisition des données d'imagerie. Elle offre la possibilité d'effectuer des analyses de proximité entre marqueurs et ainsi d'inférer des interactions cellule-cellule ou cellules-MEC, ou encore d'étudier finement la micro-anatomie d'un tissu sain ou les niches de cellules cancéreuses en lien avec leur microenvironnement. Pour atteindre ces objectifs, un programme de travail bien maîtrisé est nécessaire. En effet, la validation des anticorps (spécificité, concentration de travail) et la mise en place du panel d'immunomarquage est un processus complexe et chronophage. La conception du panel d'immunomarquage est en général le fruit d'une collaboration étroite entre le chercheur et la plateforme technologique, en amont de la conception expérimentale. Le chercheur informera la plateforme sur la question scientifique posée, la localisation cellulaire et sous-cellulaire attendue des cibles, ainsi que de l'intensité de signal, si elle est connue. Ces éléments conditionnent notamment l'ordre d'application des cycles d'anticorps. Typiquement, une cible qui est exprimée à des taux très faibles, est identifiée par un anticorps placé dans le premier cycle. Toutefois, si malgré l'application d'un anticorps donné lors du premier cycle, le signal reste faible ou indétectable pour des cibles peu exprimées, l'alternative mise en place est de réaliser un marquage avec amplification aux tyramides [34] au dernier cycle.

Malgré sa puissance, le système de multiplexage que nous avons utilisé présente certains inconvénients : la chambre d'incubation, d'un volume de 350  $\mu\text{L}$  conduit à une consommation importante d'anticorps primaire marqué. Cette difficulté peut être contournée avec une incubation entre lame et lamelle, réduisant le volume à 100 – 150  $\mu\text{L}$ . Aussi, les étapes se répétant à chaque cycle (blocage des sites non spécifiques, incubation avec la solution d'anticorps, lavages, élimination du signal du cycle précédent, décollement de la lamelle) requièrent une disponibilité

et une quantité de travail manuel considérable. En conséquence, nous étudions actuellement le recours à une assistance robotisée. Enfin, l'interprétation et la quantification du signal requièrent une définition précise des seuils de détection basés sur le rapport signal/bruit de fond et sur la localisation attendue des cibles d'intérêt, ce qui rend l'optimisation de l'acquisition du signal une tâche chronophage. Toutefois, une fois les conditions de travail optimisées, le temps investi est compensé de façon avantageuse par la puissance apportée par le multiplexage. Aussi, l'économie de coupes de tissu facilite des approches complémentaires de microscopie corrélative, nécessitant des coupes sériées et contiguës.

## CONCLUSION

L'immunohistochimie multiplex permet des approches corrélatives avec la protéomique, comme indiqué plus haut. Il est important de souligner que nous avons utilisé des tissus d'archive non fixés et conservés à -80 °C pendant  $\geq 15$  ans. Malgré les quatre cycles de marquage comptant chacun plusieurs étapes, les coupes ont conservé une morphologie aisément exploitable au microscope. Dans notre cas, nous avons pu identifier *in situ* des cibles pour aider à comprendre l'organisation topographique de composants de la matrice extracellulaire dans la niche tumorale [19, 20, 4]. L'immunohistochimie multiplex facilite la conception d'approches de microscopie corrélative, en effectuant des coupes sériées et contiguës qui peuvent être analysées par d'autres technologies telles que l'hybridation *in situ* [35, 36], la transcriptomique spatiale, la génération de seconde harmonique pour l'étude des dépôts de collagène fibrillaire [37], la spectroscopie Raman ou encore la microscopie de force atomique pour la mesure des forces mécaniques *in situ* [38]. En conclusion, des traitements d'images spécifiques permettent de créer une vue composite d'un même spécimen grâce à des approches multimodales intégrant la microscopie corrélative et la pathologie moléculaire.

## REMERCIEMENTS

Financements : Univ Rennes ; INSERM ; ANR-10-INBS-04 ; INCa, N°12688; Ligue Contre le Cancer ; Comités Ille-et-Vilaine and Vendée ; Défis Scientifiques Univ Rennes (2022 ; 2024) ; Cancéropôle Grand Ouest & Région Bretagne (AAP Structurant, 2023 - 2025) ; Leica Microsystems France ; Biogenouest.

Nous remercions le Dr Cédric Ménard, Centre de Ressources Biologiques Santé, CHU de Rennes, pour la gestion d'échantillons de la bio-banque de tumeurs.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BROWN Z.J., et al. Management of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *JAMA Surg*, 2023, **158** (4): 410-420 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36790767>
2. SHAH P.A., PATIL R. & HARRISON S.A. NAFLD-related hepatocellular carcinoma: The growing challenge. *Hepatology*, 2023, **77** (1): 323-338 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35478412>
3. RINELLA M.E., et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol*, 2023, **79** (6): 1542-1556 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37364790>
4. KANZAKI H., KATZ C. & HOSHIDA Y. Matrisomic characterization of HCC to inform individualized patient management. *Hepatology*, 2023, **78** (3): 691-693 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37163234>
5. MONTIRONI C., et al. Inflamed and non-inflamed classes of HCC: a revised immunogenomic classification. *Gut*, 2023, **72** (1): 129-140 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35197323>
6. ZHU A.X., et al. Molecular correlates of clinical response and resistance to atezolizumab in combination with bevacizumab in advanced hepatocellular carcinoma. *Nat Med*, 2022, **28** (8): 1599-1611 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35739268>
7. HERNANDEZ-GEA V., et al. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2013, **144** (3): 512-527 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313965>
8. HOSHIDA Y., et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 2009, **69** (18): 7385-7392 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723656>
9. DESERT R., NIETO N. & MUSSO O. Dimensions of hepatocellular carcinoma phenotypic diversity. *World journal of gastroenterology*, 2018, **24** (40): 4536-4547 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30386103>
10. DESERT R., et al. Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection. *Hepatology*, 2017, **66** (5): 1502-1518 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28498607>



11. NG C.K.Y., PISCUOGLIO S. & TERRACCIANO L.M. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: The view from metabolic zonation. *Hepatology*, 2017, **66** (5): 1377-1380 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28599064>
12. BERASAIN C. & AVILA M.A. Deciphering liver zonation: new insights into the beta-catenin, Tcf4, and HNF4alpha triad. *Hepatology*, 2014, **59** (6): 2080-2082 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24407883>
13. GOUGELET A., et al. T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. *Hepatology*, 2014, **59** (6): 2344-2357 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24214913>
14. MUSSO O., LOYER P. & CORLU A. Structure et fonctions des hépatocytes. *EM Consulte*, 2020. Doi: 10.1016/S1155-1976(20)55956-1, consultable en ligne : <https://www.em-consulte.com/article/1355219/structure-et-fonctions-des-hepatocytes>
15. FEKIR K., et al. Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance. *Cancer research*, 2019, **79** (8): 1869-1883 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30837223>
16. SHIN S.H., et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma: Their clinical and prognostic significance. *Ann Diagn Pathol*, 2023, **64** 152134 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37004359>
17. DESERT R., et al. "Fibrous nests" in human hepatocellular carcinoma express a Wnt-induced gene signature associated with poor clinical outcome. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016, **81**(PtA) 195-207 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27545991>
18. MEBARKI S., et al. De novo HAPLN1 expression hallmarks Wnt-induced stem cell and fibrogenic networks leading to aggressive human hepatocellular carcinomas. *Oncotarget*, 2016, **7** (26): 39026-39043 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191501>
19. DESERT R., et al. Hepatocellular carcinomas, exhibiting intratumor fibrosis, express cancer-specific extracellular matrix remodeling and WNT/TGFB signatures, associated with poor outcome. *Hepatology*, 2023, **78** (3): 741-757 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36999534>

20. DESERT R., et al. Reply: Intratumor fibrotic HCC, a subtype matching the Hoshida S1 subclass? *Hepatology*, 2024, **79** (5): E141-E143  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38147310>
21. COSTA A., et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*, 2018, **33** (3): 463-479 e410  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29455927>
22. KUMAR V., ABBAS A.K. & ASTER J.C. Robbins & Cotran pathologic basis of disease. *Elsevier*, 2021.
23. MANCINI A., et al. Multiple aspects of matrix stiffness in cancer progression. *Front Oncol*, 2024, **14** 1406644 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39015505>
24. KARAMANOS N.K., et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J*, 2021, **288** (24): 6850-6912  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33605520>
25. NABA A. Mechanisms of assembly and remodelling of the extracellular matrix. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39223427>
26. TAHA I.N. & NABA A. Exploring the extracellular matrix in health and disease using proteomics. *Essays Biochem*, 2019, **63** (3): 417-432  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31462529>
27. KRASNY L., et al. Comparative proteomic assessment of matrisome enrichment methodologies. *Biochem J*, 2016, **473** (21): 3979-3995  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27589945>
28. LIU Y., et al. Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy. *J Hepatol*, 2023, **78** (4): 770-782 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36708811>
29. LI L., et al. The role of ANXA1 in the tumor microenvironment. *Int Immunopharmacol*, 2024, 131 111854 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38479155>
30. FLIPPOT R., et al. B cells and the coordination of immune checkpoint inhibitor response in patients with solid tumors. *J Immunother Cancer*, 2024, **12** (4): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38631710>
31. CHANTZIOU A., et al. HIV infection is associated with compromised tumor microenvironment adaptive immune reactivity in Hodgkin Lymphoma. *Blood Adv*, 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39116294>

32. LODI R.S., et al. Roles and Regulation of Growth differentiation factor-15 in the Immune and tumor microenvironment. *Hum Immunol*, 2021, **82** (12): 937-944  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34412918>
33. BOLLHAGEN A. & BODENMILLER B. Highly Multiplexed Tissue Imaging in Precision Oncology and Translational Cancer Research. *Cancer Discov*, 2024, **14** (11): 2071-2088 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39485249>
34. FAGET L. & HNASKO T.S. Tyramide Signal Amplification for Immunofluorescent Enhancement. *Methods Mol Biol*, 2015, **1318** 161-172  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160574>
35. MUSSO O., et al. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology*, 1998, **28** (1): 98-107  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?>  
<http://www.hepatology.org/cgi/content/full/28/1/98>
36. THERET N., et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes. *Am J Pathol*, 1997, **150** (1): 51-58
37. ROUEDE D., et al. Determination of extracellular matrix collagen fibril architectures and pathological remodeling by polarization dependent second harmonic microscopy. *Scientific reports*, 2017, **7** (1): 12197  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28939903>
38. PRIGENT L., et al. Analysis of biomechanical properties of mouse skin dermis through atomic force microscopy: Application to demonstrate a sexual dimorphism. *Exp Dermatol*, 2023, **32** (7): 1016-1027  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37029962>