

L'IMAGERIE CELL DIVE™, UNE TECHNOLOGIE D'IMAGERIE MULTIPLEX INNOVANTE ADAPTÉE À L'ÉTUDE DU MICROENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE TUMORAL

DELAPORTE Margaux¹, LEBLOND-BOUILLETTE Leila¹, TURLIN Bruno²,
BELLAUD Pascale³, SEBILLOT Anthony³, SAMSON Michel¹,
RAGUENES-NICOL Céline¹

¹ Univ Rennes, INSERM, EHESP, Irset - UMR_S 1085, 9 Av. du Professeur Léon Bernard,
35000 Rennes, France.

² Univ Rennes, INRAE, INSERM, NUMECAN- UMR_S 1241 & Department of Pathology,
CHU, Rennes, 2 Rue Henri le Guilloux, 35000 Rennes, France

³ Univ Rennes, CNRS, Inserm, Biosit UAR 3480 US_S 018, France-BioImaging
(ANR-10- INBS-04), plateforme H2P2, 35000, Rennes, France

Auteur correspondant : margaux.delaporte.1@univ-rennes.fr

ORCID : 0009-0008-2286-2396

CELL DIVE™ IMAGING, A RELEVANT MULTIPLEX IMAGING TECHNOLOGY FOR THE STUDY OF TUMOR IMMUNE MICROENVIRONMENT

ABSTRACT

The global incidence of hepatic steatosis, or fatty liver disease, is rising sharply, particularly in industrialized countries, driven by the widespread consumption of high-calorie diets combined with sedentary lifestyles. In some cases, this steatosis evolves pejoratively into a more severe inflammatory stage, significantly increasing the risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC). Our research focuses on the impact of alcohol consumption in patients with HCC associated with metabolic disorders. Specifically, we investigate the presence and spatial distribution of immune cells in tumoral livers, as their localization may influence therapeutic strategies. To achieve this, we employ an innovative multiplex immunofluorescence (mIF) microscopy technology called Cell Dive™, which enables the simultaneous assessment of multiple protein markers within a single tissue section. This method utilizes iterative cycles of fluorescent antibody hybridization, followed by fluorescence quenching before the next cycle.

Currently, we have developed a mIF imaging panel with 24 markers on a single patient histological slide, allowing us to characterize immune cell subpopulations and their precise localization within the liver. This approach provides valuable insights that could guide personalized treatment strategies for HCC patients.

KEY WORDS

Cell Dive™, Immunofluorescence, Immune infiltrate, Hepatocellular carcinoma, Multiplex, Tumor microenvironment.

RÉSUMÉ

L'incidence de la stéatose hépatique, ou maladie du foie gras, augmente rapidement à l'échelle mondiale, en particulier dans les pays industrialisés, en raison de la consommation généralisée de régimes riches en calories et de modes de vie sédentaires.

Dans certains cas, cette condition évolue vers une forme inflammatoire plus sévère, la stéatohépatite, augmentant considérablement le risque de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC). Nos recherches portent sur l'impact de la consommation d'alcool chez les patients atteints de CHC associé à des troubles métaboliques. Plus précisément, nous étudions la présence et la distribution spatiale des cellules immunitaires dans les foies tumoraux, car leur localisation pourrait influencer les stratégies thérapeutiques. Pour cela, nous utilisons une technologie innovante de microscopie à immunofluorescence multiplex (mIF), appelée Cell Dive™, qui permet d'évaluer simultanément de nombreux marqueurs protéiques dans une seule section de tissu. Cette méthode repose sur des cycles itératifs d'hybridation d'anticorps fluorescents, suivis de l'extinction de la fluorescence avant le cycle suivant. Actuellement, nous avons développé un panel d'imagerie mIF de 24 marqueurs sur une seule lame histologique de patient, nous permettant de caractériser les sous-populations de cellules immunitaires et leur localisation dans le foie. Cette approche fournit des informations précieuses qui pourraient guider des stratégies thérapeutiques personnalisées pour les patients atteints de CHC.

MOTS CLÉS

Carcinome hépatocellulaire, Cell Dive™, Immunofluorescence, Infiltrat immunitaire, Microenvironnement tumoral, Multiplex.

INTRODUCTION

La stéatose hépatique associée à un dysfonctionnement métabolique (MASLD), auparavant désignée sous le terme de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est caractérisée par une accumulation de triglycérides dans le foie, associée à des facteurs de risques métaboliques tels que la résistance à l'insuline ou l'hypertension artérielle [1]. Du fait de l'augmentation importante des cas d'obésité et de diabète, la MASLD est aujourd'hui l'une des causes les plus courantes de maladie hépatique chronique, touchant actuellement 30 à 40 % de la population mondiale et constitue un facteur de risque majeur de carcinome hépatocellulaire [2]. Elle comprend un spectre de pathologies hépatiques débutant par la stéatose hépatique simple, correspondant à une accumulation de gouttelettes lipidiques. Cette forme peut évoluer en une forme inflammatoire chronique plus sévère appelée stéatohépatite (MASH) au cours de laquelle apparaît la fibrose, puis la cirrhose, évolution irréversible de la maladie. Dans certains cas, les remaniements du tissu hépatique consécutifs à cette inflammation chronique peuvent aboutir au développement d'une tumeur primitive, le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Ce type de cancer fait partie des cancers graves de mauvais pronostic et présente une agressivité élevée dans laquelle le microenvironnement immunitaire tumoral joue un rôle important [3]. En raison de l'hétérogénéité de cette maladie, il n'existe pas de traitements médicamenteux véritablement efficaces. En particulier, les thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, utilisés comme première ligne de traitement pour les formes avancées se heurtent aux réponses très variables observées selon les patients [4,5]. Pour comprendre cette hétérogénéité et offrir une thérapie plus adaptée à chaque patient, il est primordial de caractériser les différentes sous-populations immunitaires ainsi que leur disposition spatiale au sein de la tumeur.

Nous présentons ici une méthodologie de microscopie à immunofluorescence multiplex (mIF) permettant de localiser les différentes cellules immunitaires dans le foie des patients atteints d'un CHC grâce à une seule coupe de tissu. En effet, la caractérisation fine des cellules immunitaires demande le marquage de plusieurs dizaines de protéines. De façon remarquable, la technologie Cell Dive™ permet cette prouesse d'effectuer de nombreux marquages sur une seule et même coupe de tissu avec des anticorps directement couplés à des fluorochromes afin d'identifier et de localiser les cellules les unes par rapport aux autres [6].

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Principe de l'imagerie Cell Dive™

L'imageur Cell Dive™ (**Figure 1**) permet la réalisation d'expériences de mIF (multiplex immunofluorescence) par cycles itératifs de marquage avec quatre anticorps directement couplés à des fluorochromes de type cyanine, Alexa Fluor, DyLight ou CF® (**Tableau I**). Cette technologie est applicable aussi bien sur des tissus fixés au formol inclus en paraffine (FFPE) que sur des tissus congelés. Le protocole débute par une première acquisition d'image après marquage des noyaux au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), ce qui permet l'enregistrement de l'auto-fluorescence intrinsèque du tissu. Ensuite, après incubation avec quatre anticorps marqués, une nouvelle image est capturée avec soustraction du bruit de fond. À la fin de chaque cycle, une extinction des fluorochromes est effectuée par oxydation (**Figure 1**), garantissant une suppression efficace des signaux précédents. Chaque cycle associe des fluorochromes spécifiques aux canaux de détection correspondants (**Tableau I**). Le recalage des images repose sur la position des noyaux, ce qui assure une superposition précise des cycles successifs. Cette approche présente l'avantage de minimiser le chevauchement spectral et de réduire l'auto-fluorescence des tissus, garantissant ainsi une analyse plus fiable et précise.

Préparation des échantillons

Les échantillons proviennent de résections chirurgicales de tumeurs hépatiques humaines, fixées au formol et incluses en paraffine. Des coupes de 4 µm ont été réalisées et les lames placées à l'étuve 2 heures à 60 °C afin de maximiser l'adhérence du tissu sur la lame.

Le déparaffinage et le démasquage antigénique ont été effectués à l'aide de l'automate Ventana Discovery Ultra™. Le déparaffinage a été réalisé à 75 °C dans la Solution *Ez Prep* de Roche, suivi d'un démasquage en deux cycles successifs de 16 minutes à 100 °C à pH 8 dans du tampon Roche *Cell Conditioning* CC1, puis à pH 6 dans la solution tampon Roche *Cell Conditioning* CC2.

Ensuite, une perméabilisation membranaire a été effectuée par incubation des lames pendant 10 minutes (min) dans une solution à 0.3% Triton X-100. Cette étape a été suivie d'un blocage des sites aspécifiques, réalisé par incubation dans une solution à 3 % de Sérum Albumine Bovine (BSA) et 10 % *donkey serum* pendant 1 heure. Enfin, les noyaux ont été marqués par une incubation au DAPI (10 µg/mL) pendant 5 minutes.

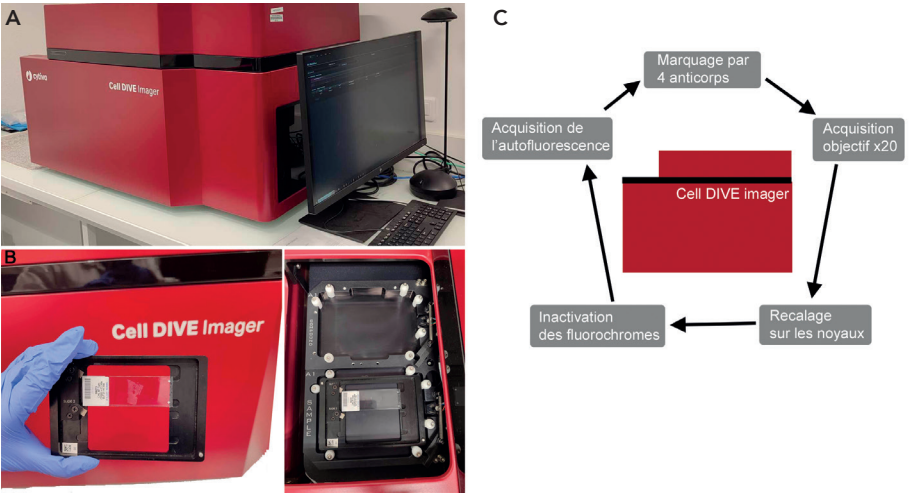


Figure 1 : Présentation du Cell Dive™.

A. L'imageur est un système compact couplé à un ordinateur.
B. L'appareil comporte deux portoirs pouvant accueillir deux lames.
C. L'enchaînement des étapes est le suivant: l'utilisateur place la lame dans l'automate qui analyse l'auto-fluorescence intrinsèque du tissu. Le cycle d'acquisition du marquage est ensuite réalisé et imagé à l'objectif 20X. Les images sont par la suite superposées grâce à un alignement sur les noyaux marqués au DAPI. Enfin, la fluorescence est inactivée pour permettre un nouveau cycle de marquages.

Canal	Excitation Band (nm)	Emission Band (nm)	Fluorochromes possibles
Blue	378-401	409-448	DAPI
Y2 - Green	457-483	493-515	Cyanine 2, Alexa Fluor® 488
Y3- Orange	526-558	571-603	Cyanine 3, Alexa Fluor® 555, DyLight 550
Y5- Far red	617-645	660-695	Cyanine 5, Alexa Fluor® 647, CF® 640R
Y7- Near IR	711-750	767-820	Cyanine 7, Alexa Fluor® 750, DyLight 755

Tableau I : Caractéristiques du système optique de l'imageur Cell Dive™ et exemples de fluorochromes utilisables.

L'imageur comprend un canal d'acquisition pour le DAPI, et 4 canaux correspondant aux cyanines 2, 3, 5 et 7. D'autres fluorochromes peuvent être utilisés s'ils sont inactivables par la méthode Cell Dive™ d'oxydation.

Méthode de validation des anticorps

La technologie Cell Dive™ repose sur des immunomarquages directs sans amplification. Pour le choix du fluorochrome associé à chaque anticorps, il faut tenir compte de l'abondance de la cible, de la brillance du fluorochrome et de l'auto-fluorescence du tissu dans chaque canal. Par exemple, le foie a une importante auto-fluorescence dans le canal vert. Pour valider les anticorps (clone + fluorochrome), nous avons procédé à un monomarquage direct en technologie Cell Dive™ sur un tissu contrôle positif suivi d'une amplification par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (marquage DAB (Diaminobenzidine)) sur la même lame (**Figure 2**). Ainsi nous avons pu discriminer les clones inefficaces dans nos conditions et ajuster les dilutions. Les marquages ont ensuite été validés par un anatomopathologiste.

La technologie Cell Dive™ conduit à déposer au final plus d'une vingtaine d'anticorps sur une même coupe de tissu. Pour éviter les problèmes d'encombrement stérique, il convient donc de mettre sur les premiers cycles les marquages des épitopes les plus rares et sur les derniers cycles les marquages des épitopes très abondants. Pour nous guider, nous avons utilisé les niveaux d'expression relatifs dans le foie rapportés par l'Atlas des protéines humaines (Human Protein Atlas) (<https://www.proteinatlas.org/>). Chaque cycle de marquage est suivi d'une inactivation de la fluorescence par oxydation, il faut donc aussi tenir compte de la fragilité des épitopes vis-à-vis de ces traitements.

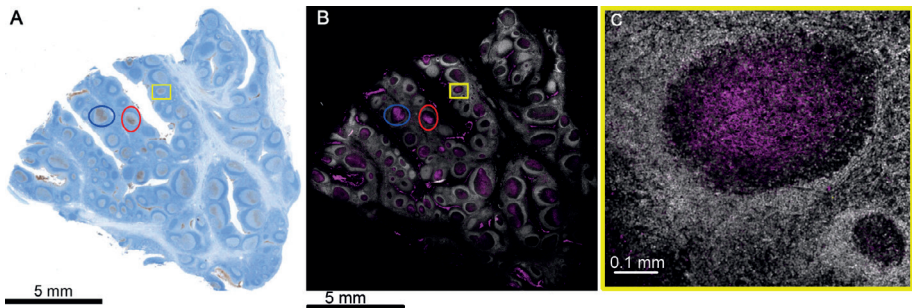


Figure 2 : Exemple de validation d'un clone d'anticorps.

Une lame de tissu d'amygdale humaine fixée au formol et incluse en paraffine a été incubée avec l'anticorps CD11b Alexa Fluor 647 (clone D6X1N, Cell Signaling) à la dilution 1/80^e, la fluorescence est détectée en Cell Dive™ puis un anticorps secondaire couplé à une peroxydase permet une révélation DAB. La barre d'échelle présente sur les panneaux A et B correspond à 5 mm. A. Résultat de la révélation DAB. B. Résultat en immunofluorescence directe Cell Dive™. Il existe une concordance entre les images A et B : les zones positives en DAB sont aussi positives en Cell Dive (cercles bleu et rouge). C. Zoom du cadre jaune de l'image B montrant le marquage des cellules dendritiques au sein des centres germinatifs. Barre d'échelle : 0,1 mm.

Cycle	Etape dans l'imageur	Etape hors de l'imageur	Durée approximative (h)
	Scan de l'auto-fluorescence		02:00
Cycle 1		Incubation anticorps run 1	01:00
	Scan run 1		02:00
	Recalage de l'image sur les noyaux		00:30
		Inactivation de la fluorescence	00:30
	Scan après inactivation		02:00
Cycle 2	Recalage de l'image sur les noyaux		00:30
		Incubation anticorps run 2	01:00
	Scan run 2		02:00
	Recalage de l'image sur les noyaux		00:30
		Inactivation de la fluorescence	00:30
Cycle N	Scan après inactivation		02:00

Tableau II: Exemple de temps d'acquisition et de manipulation pour l'ensemble du panel. L'exemple est donné pour une lame de ponction biopsie hépatique de dimensions 10 mm x 1 mm. L'obtention d'une image complète avec un panel 24 couleurs requiert une semaine de travail. Les étapes de scan dans l'imageur nécessitent un temps variable selon les dimensions du tissu à imager. Les étapes de dépôt de la solution d'anticorps et de la solution d'inactivation nécessitent l'intervention de l'expérimentateur et présentent quant à elles une durée fixe quelles que soient les dimensions du tissu.

Traitement de la lame et acquisition de l'image

Le mélange d'anticorps du cycle n est préparé dans du *Ab Diluent* (Roche) et un volume final de 150 µL est déposé sur la lame pendant 1 heure à 37 °C dans une chambre humide d'hybridation. Après lavage de la lame avec agitation dans du tampon de réaction (*Reaction Buffer*, Roche), les noyaux sont marqués au DAPI comme précédemment. Une lamelle est montée avec du milieu de montage DAPI Fluoromount-G (Southern Biotech) puis une image de la lame est prise avec le Cell Dive™ dans les 5 canaux de détection (4 anticorps + DAPI). A la fin du cycle, la lame est démontée et une solution d'inactivation contenant du bicarbonate de sodium et 3% de peroxyde d'hydrogène est appliquée 2 fois 15 min pour inactiver la fluorescence. Une image est prise une nouvelle fois, pour quantifier l'auto-fluorescence résiduelle et la soustraire au cycle suivant (Figure 3). Pour les cibles qui ne peuvent pas être mises en évidence par un marquage direct, il est possible de réaliser un dernier cycle de marquage avec amplification grâce à des anticorps secondaires en suivant le protocole Roche Discovery ultra™. Cela est réalisé après dénaturation thermique des anticorps précédemment fixés. Cette étape supplémentaire de quadruple marquage amplifié rajoute 2 jours supplémentaires à cette expérience.

Visualisation et traitement de l'image

La visualisation des cycles de marquage est possible en temps réel via le logiciel Leica MxWorkflow. La visualisation de l'image finale compilant tous les marqueurs est possible grâce au logiciel Aivia community fourni par le fabricant. Il est nécessaire de régler le niveau de signal et le seuil pour chacun des marquages.

L'analyse quantitative et l'identification des types cellulaires seront réalisées avec le logiciel open source QuPath. Pour cela, la création d'une image unique superposant tous les marquages est nécessaire en compilant les images au format .tif via l'extension Warpy (<https://github.com/BIOP/qupath-extension-warpy>). Nous allons ensuite étudier plusieurs images combinées afin de segmenter les cellules et annoter les différentes régions (fond, tissu, tumeur) et réaliser un modèle d'apprentissage pour la détection automatisée de nos sous-types cellulaires. Cette analyse appliquée à toutes nos lames de biopsies hépatiques fera le sujet de publications ultérieures.

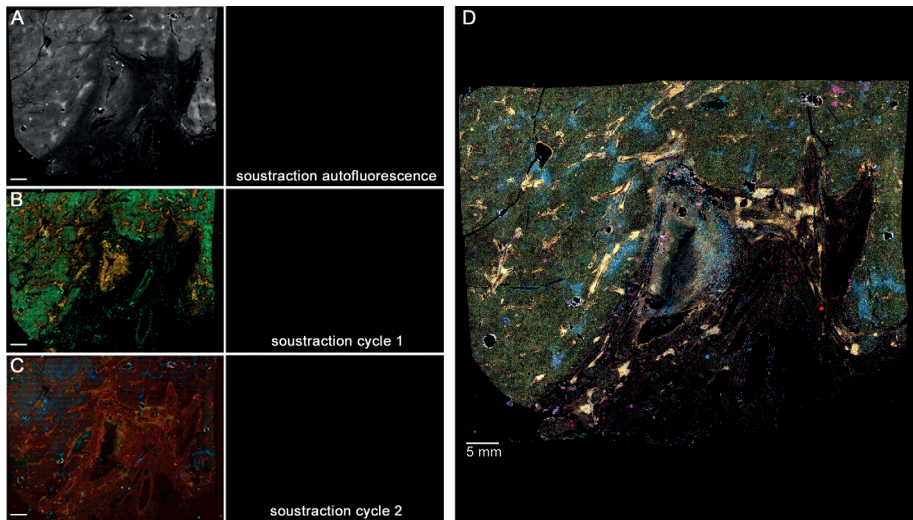


Figure 3 : Étapes dans l'obtention de l'image finale.

Une coupe de carcinome hépatocellulaire humain est imagée par la technologie Cell Dive™. A. La première étape est celle de la mesure puis de la soustraction de l'auto-fluorescence. B. et C. Cycles successifs d'acquisition avec 4 nouveaux anticorps fluorescents (colonne de gauche), puis soustraction de la fluorescence résiduelle après inactivation des fluorochromes. D. Image finale après superposition des images des six cycles correspondant à l'application du panel de 24 marqueurs. Les barres d'échelle (A-D) correspondent à 5 mm.

RÉSULTATS

Validation des anticorps

Pour établir un panel de marquages multiplex, chaque anticorps doit être validé individuellement. L'ensemble de cette mise au point a été réalisée sur des tissus proposés par un pathologiste comme étant positifs ou négatifs pour les marqueurs recherchés, ainsi que sur du foie tumoral. Nous avons validé un à un les anticorps du panel en réalisant des mono-marquages sur du tissu contrôle positif pour la cible avec un clone d'anticorps choisi d'abord par immunofluorescence directe Cell Dive™ puis en ajoutant un anticorps secondaire couplé à la peroxydase pour un marquage DAB. Ainsi, nous pouvons valider la spécificité du marquage dans les conditions Cell Dive™, indépendamment de la dilution et nous pouvons comparer la performance de la fluorescence en couplage direct avec une méthode avec amplification. La **figure 2** illustre la validation de l'anticorps CD11b sur une amygdale humaine : le marquage avec amplification (**Figure 2A**) ou en fluorescence directe (**Figure 2B**) est similaire. Le zoom (**Figure 2C**) témoigne d'un marquage de notre anticorps localisé au cœur du centre germinatif, mettant en évidence une population de cellules dendritiques (cellules dendritiques folliculaires (*follicular dendritic cells*, *FDCs*)). La liste des clones d'anticorps validés est présentée dans le **tableau III**.

Panel complet de 24 marqueurs

Nous disposons aujourd'hui d'un panel (**Tableau III**) permettant l'étude de l'infiltrat immunitaire dans le foie humain comprenant : des marqueurs de positionnement et de segmentation des cellules grâce au noyau (DAPI) et aux lectines de la membrane plasmique *wheat germ agglutinin* (WGA) ; des marqueurs structuraux du foie normal (HePar-1 et Pan-Cytokeratin) ou tumoral (Glypican-3) ; un marqueur vasculaire (CD31) ; des marqueurs de populations myéloïdes (CD11b, CD15 pour les neutrophiles, CD16 pour les macrophages infiltrés et Natural Killer, CD11c pour les cellules dendritiques, CD64 et CD68 pour les macrophages résidents) et des marqueurs lymphoïdes généraux (CD3 pour les LT, CD20 pour les LB, CD56 pour les NK et NKT). Nous sommes également capables d'identifier des sous-populations de lymphocytes T avec CD4 et CD8, FoxP3 pour les LT régulateurs, Va7.2 et CD161 pour les *Mucosal-Associated Invariant T cells* souvent présents dans le foie enflammé [7,8]. Nous avons aussi intégré des marqueurs d'activation (CD69) et d'épuisement des lymphocytes (CTLA4, LAG-3) ainsi que des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (PD-1, PD-L1).

Run 1	CD15 [SSEA-1] Alexa Fluor® 488	CTLA4 [CAL49] Alexa Fluor® 555	PD1 [EPR4877] Alexa Fluor® 647	PD-L1 [E1L3N] XP® 750
Run 2	CD11c [EP1347Y] Alexa Fluor® 488	CD16 [EPR16784] Alexa Fluor® 555	CD11b [D6X1N] Alexa Fluor® 647	CD69 [FN50] Alexa Fluor® 750
Run 3	CD64 [10.1] Alexa Fluor® 488	CD68 [KP1] CF® 555	CD8a [C8/144B] Alexa Fluor® 647	CD56 [123A8] Alexa Fluor® 750
Run 4	CD20 [EP459Y] Alexa Fluor® 488	CD31 [EPR3094] Alexa Fluor® 555	CD4 [EPR6855] Alexa Fluor® 647	CD3ε [C3e/1308] DyLight 755
Run 5	Pan-CytoKeratin Alexa Fluor® 488	LAG3 [D2G4O] XP® AF 555	Wheat Germ Agglutinin (WGA) CF® 640R	Glypican-3 [1G12] CoraLite® Plus 750
Run amplifié	Hepar-1 [OCH1E5]	FoxP3 polyclonal	TCR Vα.7.2 [3C10]	CD161 polyclonal

Tableau III : Panel pour l'étude de l'infiltrat immunitaire dans le carcinome hépatocellulaire humain. Chaque colonne correspond à un canal de détection de l'imageur Cell Dive™ (Y2, Y3, Y5 et Y7). Chaque ligne du panel correspond aux 4 anticorps du cycle correspondant. Le clone des anticorps monoclonaux est indiqué entre crochets.

Obtention de l'image composite finale et localisation des populations immunitaires dans le foie

Le principal intérêt de l'imageur Cell Dive™ réside dans sa capacité à soustraire efficacement l'auto-fluorescence et à recalcr automatiquement les images des cycles successifs d'acquisition. Pour des tissus hépatiques, l'auto-fluorescence est forte (**Figure 3A gauche**). Via le logiciel de pilotage de l'automate, il est possible de contrôler que la soustraction du bruit de fond est correcte (**Figure 3A droite**). Le premier cycle de marquage / acquisition peut avoir lieu, puis après inactivation des fluorochromes, l'automate mesure à nouveau le bruit de fond qui est soustrait (**Figure 3B**). Lors du deuxième cycle, c'est donc bien uniquement la fluorescence du deuxième mélange d'anticorps qui est enregistrée (**Figure 3C**), etc. L'image finale (**Figure 3D**) est calculée par l'imageur par superposition des noyaux des cellules et constitue ainsi un « tissu numérique » dont l'auto-fluorescence a été soustraite. Pour la visualisation finale, le niveau d'intensité de chaque fluorochrome de chaque cycle peut être ajusté.

Nous appliquons actuellement le panel de marqueurs sur lames entières de tissus hépatiques issus d'une biobanque de patients atteints de carcinomes hépatocellulaires (**Figure 3D et Figure 4**). L'ensemble des marqueurs étant détectés sur la même lame et non à partir de coupes sériées, il est possible d'avoir une très bonne définition anatomique comme présentée dans la **Figure 4A** avec une distinction du tissu sain ou tumoral, des structures vasculaires et des zones de fibrose.

L'accumulation des nombreux marqueurs sur la même coupe permet également de très bien définir les populations immunitaires comme on peut le voir pour des cellules lymphoïdes organisées en *tertiary lymphoid structure* (**Figure 4B**) ou pour la distinction de différents macrophages (**Figure 4C**). La quantification des cellules exprimant des *immune check-points* au cœur de la tumeur est également possible (**Figure 4D**). En effet, les images seront ensuite analysées sur le logiciel QuPath afin d'en extraire les données chiffrées concernant les différentes sous-populations immunitaires, leur nombre et leur disposition spatiale.

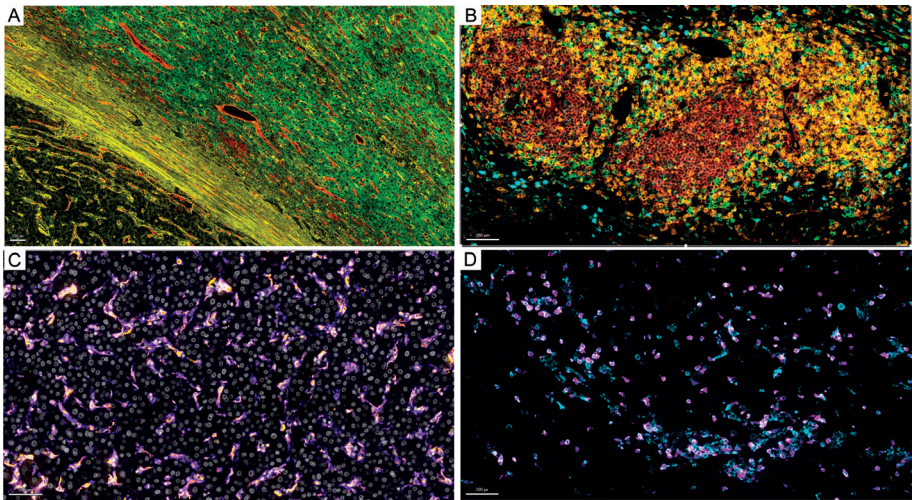


Figure 4 : Mise en évidence de différentes sous-populations et structures au sein du CHC
 A. Marqueurs de structure qui permettent la détection de la région tumorale et de l'organisation anatomique : Wheat Germ Agglutinin (jaune) - CD31 (rouge) - HePar1 (vert). B. Marqueurs lymphoïdes qui renseignent sur la localisation des lymphocytes infiltrés et la présence de structures lymphoïdes organisées : CD20 (rouge) - CD3 (cyan) - CD8 (vert) - CD4 (orange) C. Marqueurs des cellules de Kupffer et des macrophages infiltrants : CD68 (orange) - CD16 (violet). D. Lymphocytes T (CD3, cyan) et PD-1 (rose), un *Immune Checkpoint*. Les barres d'échelle correspondent à 200 μm.

DISCUSSION

L'analyse séquentielle d'un même échantillon de tissu grâce à la méthodologie Cell Dive™ permet d'obtenir des données précises sur la colocalisation des marqueurs, facilitant ainsi l'identification des sous-populations de cellules immunitaires. Cette approche se rapproche des panels classiquement utilisés en cytométrie de flux

et présente l'avantage d'un marquage direct des anticorps, réduisant l'incidence des signaux non spécifiques et améliorant la spécificité. De plus, les traitements chimiques doux utilisés pour l'inactivation de la fluorescence préservent l'intégrité du tissu, permettant non seulement l'observation de cibles fragiles comme les phosphoprotéines, mais aussi l'accumulation de cycles de marquage successifs sans altération significative de l'échantillon. Afin d'optimiser cette approche, il est essentiel d'éviter de marquer plusieurs fois la même cellule au sein d'un même cycle et de débiter l'analyse par les cibles les moins fréquentes, limitant ainsi les problèmes d'encombrement stérique des anticorps [6].

Un autre atout majeur de la technologie Cell Dive™ réside dans la superposition numérique des images, associée à une soustraction du bruit de fond à chaque cycle. Cette approche permet une visualisation plus précise des cibles moins abondantes, là où l'immunofluorescence conventionnelle peut être limitée dans des tissus présentant une forte auto-fluorescence, comme le foie. De plus, la quantification du signal de fluorescence s'avère plus linéaire que dans l'immunohistochimie chromogénique (IHC), telle que la révélation DAB, facilitant ainsi une mesure plus fiable des niveaux d'expression des biomarqueurs et des comparaisons inter-échantillons après standardisation [9].

Bien que d'autres approches récentes permettent une caractérisation multi-omique des tissus, chacune présente des avantages et des limitations. Les techniques non spatiales telles que la spectrométrie de masse, le séquençage de cellule unique (sc RNAseq) ou la cytométrie de masse (CyTOF), bien que très puissantes, ne conservent pas l'information spatiale et relationnelle entre cellules, un élément clé pour la compréhension de l'hétérogénéité tumorale et de l'organisation du microenvironnement immunitaire. D'autres méthodologies de protéomique spatiale permettent de contourner cette limitation, notamment la technologie PhenoCycler, (anciennement CODEX, Akoya Biosciences), qui repose sur l'utilisation de codes-barres d'oligonucléotides fluorescents pour détecter les anticorps. Cette approche offre une grande précision et une spécificité élevée, mais son principal inconvénient réside dans la complexité et la durée de développement des panels. À l'inverse, le cytomètre de masse en images Hyperion™ (Fluidigm) utilise des anticorps couplés à des ions métalliques, évitant ainsi les limitations inhérentes à la fluorescence. Cependant, cette technologie est plus adaptée à l'analyse de petites zones d'intérêt qu'à une imagerie sur lame entière. Enfin, l'imagerie par spectrométrie de masse permet la détection sans marquage (*label-free*) de protéines, lipides et autres molécules chimiques, offrant ainsi un outil particulièrement pertinent pour l'étude du métabolisme tissulaire. Toutefois, cette technique impose l'utilisation de coupes épaisses d'environ 12 µm et entraîne la destruction des échantillons lors du processus de vaporisation et d'ionisation du spécimen tissulaire.

La technologie Cell Dive™, appliquée ici à l'analyse de l'infiltrat immunitaire au sein de tumeurs hépatiques, présente quant à elle un compromis intéressant. Elle permet l'imagerie d'un panel de 24 marqueurs avec une résolution cellulaire sur une lame entière, tout en conservant l'intégrité du tissu pour des analyses complémentaires. Toutefois, comme pour toutes les approches multiplexes, la mise au point des panels reste un processus technique exigeant, nécessitant une optimisation préalable significative. Un autre défi réside dans la durée d'acquisition des images, chaque cycle prenant environ six heures, ce qui peut s'étendre sur plusieurs jours en fonction du nombre de cycles nécessaires. Pour minimiser cet obstacle, l'automatisation du dépôt des réactifs par robot est essentielle afin de libérer du temps expérimental et d'optimiser la durée des acquisitions.

CONCLUSION

Dans ce contexte, l'imagerie multiplex du foie développée avec Cell Dive™ constitue une approche robuste pour l'étude de l'infiltrat inflammatoire, permettant d'analyser simultanément des échantillons tumoraux et non tumoraux provenant d'un même patient sur une seule lame. L'association de l'immunofluorescence multiplexée tissulaire et d'une quantification cellulaire à haute résolution permet d'obtenir des données de colocalisation des marqueurs sur des milliers de cellules, ouvrant la voie à une exploration approfondie du microenvironnement tumoral et de son hétérogénéité intra- et inter-individuelle. Principalement utilisée aujourd'hui en recherche, cette technologie pourrait, à terme, s'imposer en analyse clinique, en contribuant au développement de nouveaux biomarqueurs prédictifs et à l'optimisation des stratégies thérapeutiques personnalisées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BAE, S.D.W., GEORGE, J. & QIAO, L. From MAFLD to hepatocellular carcinoma and everything in between. *Chinese Medical Journal*, 2022, **135** (5), 547-556.
- [2] WONG, V.W.-S., EKSTEDT, M., WONG, G.L.-H. & HAGSTRÖM, H. Changing epidemiology, global trends and implications for outcomes of NAFLD. *Journal of Hepatology*, 2023, **79** (3), 842-852.
- [3] LLOVET, J.M., KELLEY, R.K., VILLANUEVA, A., SINGAL, A.G., PIKARSKY, E., ROAYAIE, S., LENCIONI, R., KOIKE, K., ZUCMAN-ROSSI, J. & FINN, R.S. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2021, **7** (1), 6.
- [4] NGUYEN, P.H.D., et al.. Intratumoural immune heterogeneity as a hallmark of tumour evolution and progression in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 2021, **12** (1), 227.
- [5] CHEN, X., KOU, L., XIE, X., SU, S., LI, J. & LI, Y. Prognostic biomarkers associated with immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Immunology*, 2024, **172** (1), 21-45.
- [6] GERDES, M.J., et al.. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110** (29), 11982-11987.
- [7] BERTRAND, L. & LEHUEN, A. MAIT cells in metabolic diseases. *Molecular Metabolism*, 2019, 27S (Suppl), S114-S121.
- [8] MEHTA, H., LETT, M.J., KLENERMAN, P. & FILIPOWICZ SINNREICH, M. MAIT cells in liver inflammation and fibrosis. *Seminars in Immunopathology*, 2022, **44** (4), 429-444.
- [9] BORDEAUX JM., CHENG H., WELSH AW., HAFETY BG., LANNIN DR., WU X., SU N., MA XJ., LUO Y. & RIMM DL. Quantitative *in situ* measurement of estrogen receptor mRNA predicts response to tamoxifen. *PloS one*, 2012, **7**