



**HAL**  
open science

# Microenvironnement immunitaire et tumeurs hépatiques primitives

Cong Trung Nguyen

► **To cite this version:**

Cong Trung Nguyen. Microenvironnement immunitaire et tumeurs hépatiques primitives. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120003 . tel-04505698

**HAL Id: tel-04505698**

**<https://theses.hal.science/tel-04505698>**

Submitted on 15 Mar 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL**

**ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**INSERM U955-IMRB, Équipe 18 « Virus, Hépatologie, Cancer »**



Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de L'Université Paris-Est

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

# **Microenvironnement immunitaire et tumeurs hépatiques primitives**

Par **Cong Trung NGUYEN**

Présentée et soutenue publiquement le 11 janvier 2022

Dirigée par les Pr Julien CALDERARO et Pr Fouad LAFDIL

## **Membres du jury**

<b>Pr Vincent LEROY</b>	Président
<b>Pr Marianne ZIOL</b>	Rapportrice
<b>Dr Angélique GOUGELET</b>	Rapportrice
<b>Dr Jean Pierre COUTY</b>	Examineur
<b>Pr Julien CALDERARO</b>	Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Pr Vincent Leroy d'avoir accepté de présider ce jury de thèse, le Pr Marianne Ziol et le Dr Angélique Gougelet d'avoir accepté d'être rapportrices de ma thèse, et le Dr Jean Pierre Couty d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Pr Julien Calderaro, mon directeur de thèse, qui m'encadre depuis le master 2 puis tout au long de ma thèse, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Merci pour votre rigueur, votre passion scientifique et votre expertise. Je suis très honoré d'être votre premier doctorant dans l'équipe de recherche.

Je tiens à remercier le Pr Jean Michel Pawlotsky de m'avoir accueilli au sein de son équipe « Virus, Hépatologie, Cancer ». Merci pour vos conseils, votre soutien, votre encadrement qui contribuent à la réussite de l'ensemble des étudiants de votre équipe.

Je remercie également toutes les personnes de l'équipe 18, à mes amis thésards, Margot, François, Amel et les anciens thésards, pour leurs échanges, leurs encouragements et leurs sourires rendant l'environnement de travail très agréable. Bien sûr un grand merci à Alexandre, Rozenn pour votre gentillesse, pour votre soutien et pour les bons souvenirs partagés ensemble. Je n'oublie pas de remercier Alexandre pour les matchs de foot où j'ai pu vraiment me détendre.

Je remercie très chaleureusement Camilia et Aurélie, pour votre gentillesse et votre aide très précieuses. Je suis très content d'avoir été dans le même groupe que vous, d'avoir passé 4 ans de mon cursus d'études avec vous. Des challenges certes, des moments difficiles, mais nous avons su les surmonter ensemble grâce à une solidarité sans faille.

Je tiens à remercier vivement Pascale Maille, Stefano Caruso, le Dr Giuliana Amaddeo pour votre support, votre disponibilité et votre collaboration qui ont été très importants pour l'élaboration de ma thèse.

Je tiens à remercier toutes les équipes avec qui j'ai eu la chance de coopérer pendant ces 4 ans d'études en France. Je remercie le Pr Frank Pagès, Florence, Amos, Carine de la plateforme immunomonitoring de l'Hôpital Européen Georges Pompidou pour leur gentillesse et leur coopération.

Je remercie le Pr Philippe Gaulard pour m'avoir donné l'occasion de participer aux staffs et aux activités au sein de son service.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements sincères à l'ambassade de France au Vietnam de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes études en France via la bourse d'excellence.

Je remercie l'école doctorale Science de La vie et la Santé de l'Université Paris Est Créteil pour son accueil et ses soutiens importants.

Je tiens à remercier le Dr Dao Thu Ha, le Pr Ariane Mallat et l'ensemble des membres de la fédération Santé France Vietnam pour votre soutien et votre collaboration étroite avec les médecins vietnamiens.

Je tiens à remercier le Pr François Labrousse, le Pr Antoine De Mascarel, le Dr Geneviève Belleannée, le Dr Marion Marty, le Pr Patrick Bruneval pour leur gentillesse, leur soutien et leur collaboration avec les pathologistes vietnamiens. J'ai pu ainsi nourrir ma motivation pour poursuivre mes études en France.

Je remercie mes professeurs, mes collègues et mes amis au Vietnam qui m'accompagnent toujours avec une bienveillance sincère et une confiance indéfectible.

Merci à tous mes amis Ái, Hạnh, Thơm, Thanh, la famille d'Alice, la famille de Romain, Nico, Noëlle, Raymond qui m'ont apporté leur soutien très précieux au cours de mon séjour en France. Merci Jérémy pour les rendez-vous au café du relais et pour les cas intéressants sous le microscope.

Merci à ma famille au Vietnam, mes grands-parents, mes parents, mes oncles, mes tantes, pour leur confiance, leurs encouragements et leur soutien permanent.

Enfin, à ma petite famille. Merci à toi, Hoa mon épouse, pour ta confiance depuis notre rencontre au lycée et pour ton sacrifice au quotidien auprès de nos enfants, Alice et le petit Thomas. Merci pour votre amour et pour votre soutien sans faille.

## SOMMAIRE

<b>Liste des travaux et publications</b>	<b>6</b>
<b>Résumé en français</b>	<b>8</b>
<b>Résumé en anglais</b>	<b>9</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>10</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>15</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>15</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Le carcinome hépatocellulaire</b>	<b>16</b>
Epidémiologie	16
Diagnostic	20
Aspects anatomopathologiques	21
Aspects moléculaires	23
Traitement	26
<b>1.2 Cholangiocarcinome intra-hépatique</b>	<b>28</b>
Epidémiologie	28
Diagnostic	31
Aspects anatomopathologiques	31
Aspects moléculaires	32
Traitement	33
<b>1.3 Hépatocholangiocarcinome</b>	<b>34</b>
Epidémiologie	34
Diagnostic	34
Aspects anatomopathologiques	35
Aspects moléculaires	36
Traitement	37
<b>1.4 Microenvironnement immunitaire des tumeurs malignes primitives du foie et immunothérapie</b>	<b>39</b>
Lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK	39

Lymphocytes immunosuppresseurs	40
Macrophages	41
Cellules dendritiques	43
Lymphocytes B	45
Les polynucléaires neutrophiles	45
L'immunothérapie et les cancers primitifs hépatiques	47
<b>2 Contexte</b>	<b>49</b>
<b>3 Résultats</b>	<b>51</b>
<b>4 Discussion</b>	<b>62</b>
<b>5 Conclusions</b>	<b>118</b>
<b>Références</b>	<b>119</b>

## Liste des travaux et publications

### Publications

1. **Immune profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals distinct subtypes and activation of gene signatures predictive of response to immunotherapy.** Cong Trung Nguyen<sup>\*</sup>, Stefano Caruso<sup>\*</sup>, Pascale Maille<sup>\*</sup>, Aurélie Beaufrère, Jérémy Augustin, Loetitia Favre, Anaïs Pujals, Camille Boulagnon-Rombi, Rami Rhaïem, Giuliana Amaddeo, Luca di Tommaso, Alain Luciani, Hélène Regnault, Raffaele Brustia, Olivier Scatton, Frédéric Charlotte, Isabelle Brochériou, Daniele Sommacale, Patrick Soussan, Vincent Leroy, Alexis Laurent, Van Ky Le, Van To Ta, Hong Son Trinh, Thi Lan Tran, David Gentien, Audrey Rapinat, Jean Charles Nault, Manon Allaire, Sebastien Mulé, Jessica Zucman-Rossi, Jean-Michel Pawlotsky, Christophe Tournigand, Fouad Lafdil, Valérie Paradis, Julien Calderaro. *Clinical Cancer Research* (2021). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1219 <sup>\*</sup>Co-premiers auteurs
2. **Intrahepatic immune changes after hepatitis C virus eradication by direct-acting antiviral therapy.** Amaddeo G<sup>\*</sup>, Nguyen CT<sup>\*</sup>, Maillé P, Mulé S, Luciani A, Machou C, Rodrigues A, Regnault H, Mallat A, Laurent A, Lafdil F, Hézode C, Pawlotsky JM, Calderaro J. *Liver International* (2020). Doi :10.1111/liv.14226 <sup>\*</sup>Co-premiers auteurs
3. **Small-Molecule Inhibitors of Cyclophilins Block Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Protect Mice From Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury.** Panel M, Ruiz I, Brillet R, Lafdil F, Teixeira-Clerc F, Nguyen CT, Calderaro J, Gelin M, Allemand F, Guichou JF, Ghaleh B, Ahmed-Belkacem A, Morin D, Pawlotsky JM. *Gastroenterology* (2019). Doi : 10.1053/j.gastro.2019.07.026
4. **Immune changes linked to locoregional treatment of hepatocellular carcinoma.** Nguyen CT, Julien Calderaro. *Histopathology* (2021). DOI: 10.1111/his.14342

### **Communications orales**

1. **Caractérisation du microenvironnement immunitaire des tumeurs mixtes de type hépato-cholangiocarcinome.** Trung Nguyen Cong, S. Caruso, P. Maille, A. Beaufrère, J. Augustin, G. Amaddeo, C. Boulagnon Rombi, R. Rhaïem, O. Scatton, R. Brustia, J. Zucman-Rossi, D. Sommacale, F. Lafdil, V. Paradis, J. Calderaro. 87èmes journées scientifiques de l'AFEF, Octobre 2020, Montrouge.
2. **La neutralisation de l'IL-17 améliore la réponse aux traitements anti-angiogéniques du carcinome hépatocellulaire.** Aurélie Rodrigues, Camilia Machou, Julien Calderaro, Arthur Brouillet, Annemilai Tijeras-Raballand, Trung Nguyen Cong, Benoit Rousseau, Jean-Michel Pawlotsky, Alain Luciani and Fouad Lafdil, Société Française d'hépatologie (AFEF), Marseille (FRANCE), 2019
3. **IL-17 neutralization ameliorates the efficacy of antiangiogenic treatments of Hepatocellular Carcinoma.** Aurélie Rodrigues, Camilia Machou, Julien Calderaro, Arthur Brouillet, Annemilai Tijeras-Raballand, Trung Nguyen Cong, Benoit Rousseau, Jean-Michel Pawlotsky, Alain Luciani, Fouad Lafdil. National institutes of health (NIH/NIAAA), Bethesda Maryland (USA), 2019

### **Communications affichées**

1. **Immune profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma.** Trung Nguyen Cong, Stefano Caruso, Pascale Maille, Aurélie Beaufrère, Jérémy Augustin, Giuliana Amaddeo, Alain Luciani, Hélène Regnault, Olivier Scatton, Isabelle Brochériou, Daniele Sommacale, Patrick Soussan, Alexis Laurent, David Gentien, Audrey Rapinat, Sebastien Mulé, Jessica Zucman-Rossi, Jean-Michel Pawlotsky, Fouad Lafdil, Valérie Paradis, Julien Calderaro. International liver cancer association, virtual conference, September 2020.
2. **Loss of WSX-1 expression through mir 324-5p overexpression is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma.** Camilia Machou, Yéni Aït-Ahmed, Aurélie Rodrigues, Benoît Rousseau, Arthur Brouillet, Julien Calderaro, Trung Nguyen Cong, Etienne Audureau, Ismaïl Ben Mosbah, José Cohen, Christophe Rodriguez, Vanessa Demontant, Giuliana Amaddeo, Alain Luciani, Jean-Michel Pawlotsky, Fouad Lafdil. Journée Sciences de la Vie 2019 à Créteil, Octobre 2019, Paris.
3. **La combinaison de traitement associant un anti-PDL1 au Lenvatinib favorise le recrutement de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et réduit le développement du carcinome hépatocellulaire.** Aurélie Rodrigues, Trung Nguyen Cong, Camilia Machou, Julien Calderaro, Arthur Brouillet, Annemilai Tijeras-Raballand, Benoit Rousseau, Jean-Michel Pawlotsky, Alain Luciani, Fouad Lafdil. 87èmes journées scientifiques de l'AFEF, Octobre 2020, Montrouge.



## Résumé en français

Le cancer du foie est le 5<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent dans le monde et le 3<sup>ème</sup> en terme de mortalité. Ce type de cancer se développe le plus souvent dans un contexte de maladie chronique comme hépatiques B, C, la consommation excessive d'alcool ou les maladies métaboliques. Le microenvironnement immunitaire et l'inflammation jouent ainsi un rôle important dans le développement tumoral. Nous avons réalisé une étude de l'immunité pour répondre à deux problématiques importantes dans le domaine de l'immuno-cancérologie hépatique: **i) déterminer si le traitement de l'hépatite C chronique par des agents antiviraux directs (AAD) pourrait induire des modifications immunitaires pouvant favoriser le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC); ii) caractériser le profil immunitaire des tumeurs mixtes de type hépatocholangiocarcinome (CHC-CCA).**

Dans la première partie de notre travail, nous avons analysé le profil immunitaire intrahépatique d'une cohorte de patients atteints de VHC traités ou non par les AAD. Nos résultats ont uniquement montré des modifications mineures du microenvironnement immunitaire après traitement par AAD, (gènes régulés par l'interféron). Nos résultats suggèrent donc qu'il n'y a pas de modification majeure des systèmes d'immunosurveillance après éradication virale.

Nous avons ensuite réalisé l'analyse du profil immunitaire d'une série de 96 échantillons de CHC-CCA. Nous avons ainsi identifié un sous type "immune high" (IH) représentant environ 60% des cas et caractérisé par une surexpression de plusieurs voies immunitaires et important infiltrat immunitaire. De façon intéressante, les tumeurs de type IH surexprimaient les signatures immunitaires associées à la réponse à l'immunothérapie chez les patients atteints de CHC. Ces résultats suggèrent que les patients atteints de CHC-CCA de type IH pourraient bénéficier d'approches de type immunothérapie.

Mots clés: Carcinome hépatocellulaire, AAD, Microenvironnement immunitaire, Immunothérapie, Hépatocholangiocarcinome.

## Résumé en anglais

Liver cancer is the 5th most common cancer in the world and the 3rd in terms of mortality. This type of cancer most often occurs in the context of chronic liver diseases related to hepatitis B, C, alcohol consumption or metabolic diseases. The immune microenvironment thus plays an important role in tumor development. We conducted this study to address two important issues in the field of hepatic immune-oncology: **i) determine whether the treatment of chronic hepatitis C with direct-acting antivirals (DAAs) could induce intrahepatic immune changes that can promote the development of hepatocellular carcinoma (HCC); ii) characterize the immune profile of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma (HCC-CCA).**

In the first part of our work, we analyzed the intrahepatic immune profile of a cohort of HCV patients treated or not with DAAs. Our results only showed minor changes in the immune microenvironment after treatment with DAA (genes regulated by interferon). Our results suggest that there is no major modification of immunosurveillance processes after viral eradication.

In the second part, we performed the immune profile analysis of a multicenter cohort of 96 samples of HCC-CCA. We identified an “immune high” (IH) subset of HCC-CCA, representing approximately 60% of cases, characterized by an overexpression of several immune pathways and a significant immune infiltrate. Interestingly, the IH tumors overexpressed the immune signatures associated with the response to immunotherapy in patients with HCC. These results suggest that patients with IH HCC-CCA tumors could benefit from immunotherapy.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, DAA, Immune microenvironment, Immunotherapy, combined Hepatocholangiocarcinoma.

## Liste des abréviations

AAD	Agents Antiviraux Direct
ADCC	Antibody Dependant Cell Cytotoxicity
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFP	Alpha-foetoprotéine
AKT	Protein kinase B
APC	Adenomatous polyposis coli
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
AXIN1	Axis Inhibitor 1
BAP1	BRCA1 Associated Protein 1
BCLC	Classification Barcelona Clinic Liver Cancer
BRAC2	Breast Cancer 2
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma
CA19-9	Cancer Antigen 19-9
CCA	Cholangiocarcinome
CCL-2	Chemokine ligand 2
CCR2	C-C Motif Chemokine Receptor 2
CD	Cluster of differentiation
CCND1	Cyclin D1
CDKN	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CEUS	Echographie par contraste

CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHC-CCA	Hépatocholangiocarcinome
Chip-seq	Chromatin Immunoprecipitation followed bysequencing
CK	Cytokératine 19
CLIP	Cancer of the Liver Italian Program
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CTNNB1	Catenin (Cadherin Associated Protein), Beta 1
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDN1	Endothelin 1
EGF	Epidermal Growth Factor
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERBB	Erythroblastic oncogene B
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GRETCH	Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire
GZMA	Granzyme A
HES	Hématéine éosine safran
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HKLC	Hong Kong Liver Cancer
HLA	Human leukocyte antigen

IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IFIT	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats
IGF2	Insulin-Like Growth Factor-2
IRM	Image par Résonance Magnétique
ISG15	Interferon stimulated gene product 15
KDM	Lysine Demethylase
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
KLF4	Kruppel Like Factor 4
KMT	Lysine Methyltransferase
LAG3	Lymphocyte Activating 3
MAP	Mitogen-activated protein
MET	Mesenchymal Epithelial Transition
MLL2	Mixed lineage Leukemia 2
MML3	MYBMIXTA-like transcription factor 3
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MX1	Myxovirus resistance 1
NAFLD	Stéatose hépatique non alcoolique
NASH	Stéatohépatite non alcoolique
NCR1	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
NGS	Séquençage de Nouvelle Génération

NK	Natural killer
NKG2D	The Natural Killer Group 2D
NO	Nitric Oxide
OAS	Oligoadenylate Synthetase
OMS	Organisation mondiale de la santé
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PAS	Periodic Acid Schiff
PBRM1	Polybromo-1
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDL1	Programmed cell Death-1 ligand
PIK3	Phosphatidylinositole-4,5-bisphosphate- 3 kinase
PRF1	Perforin 1
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RB1	RB transcriptional corepressor 1
ROBO2	Roundabout Guidance Receptor 2
RORC	RAR Related Orphan Receptor C
RPS6KA3	Ribosomal Protein S6 Kinase A3
RSAD2	Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2
RVS	Réponse virologique soutenue

SLT	Structure lymphoïde tertiaire
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
STK11	Serine/threonine kinase 11
TAM	Macrophages associés aux tumeur
TDM	Tomodensitométrie
TAN	Tumor Associated Neutrophils
TAP1	Transporter associated with antigen processing 1
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TH	Transplantation hépatique
THBS1	Thrombospondin 1
TNF	Tumor necrosis factor
TNFAIP3	TNF Alpha Induced Protein 3
TP53	P53 tumor suppressor
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
WNT10A	Wnt Family Member 10A

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Incidence et mortalité des cancers primitifs du foie dans le monde	17
<b>Figure 2.</b> Histoire naturelle de l'infection virale par le VHC	18
<b>Figure 3.</b> Cycle virale du VHC et mécanisme d'action des antiraux à action directe	19
<b>Figure 4.</b> Aspects anatomopathologiques du CHC	22
<b>Figure 5.</b> Aspects cytologiques du CHC	23
<b>Figure 6.</b> Classification moléculaire du CHC	26
<b>Figure 7.</b> Prise en charge thérapeutique d'après la classification BCLC	27
<b>Figure 8.</b> Incidence mondiale du CCA	29
<b>Figure 9.</b> Aspects anatomopathologiques du CCA	32
<b>Figure 10.</b> Classification moléculaire du CCA	33
<b>Figure 11.</b> Aspects anatomopathologiques des CHC-CCA	36
<b>Figure 12.</b> Interactions entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales	41
<b>Figure 13.</b> Macrophages et microenvironnement immunitaire	43
<b>Figure 14.</b> Rôle anti tumoral des cellules dendritiques	44
<b>Figure 15.</b> Neutrophiles associées aux tumeurs (TAN) et microenvironnement immunitaire	46

## Liste des tableaux

<b>Table 1.</b> Facteurs de risque du cholangiocarcinome	30
--	----



## 1 Introduction

Il existe trois types histologiques principaux de cancers primitifs du foie. Le plus fréquent est le carcinome hépatocellulaire (CHC), qui se développe à partir des hépatocytes. Le cholangiocarcinome intrahépatique est la deuxième tumeur par ordre de fréquence et se développe à partir de l'épithélium biliaire (CCA). L'hépatocholangiocarcinome (CHC-CCA) est quant à lui une entité plus rare qui associe une double différenciation hépatocytaire et biliaire. Les autres tumeurs hépatiques primitives malignes sont extrêmement rares et comportent le carcinome fibrolamellaire, l'angiosarcome, l'hémangioendothéliome épithélioïde et le cystadénocarcinome. Nous nous focaliserons dans ce manuscrit sur les 3 cancers hépatiques les plus fréquents, en discutant leurs caractéristiques cliniques, anatomo-pathologiques et moléculaires et également le rôle joué par le microenvironnement immunitaire dans leur développement.

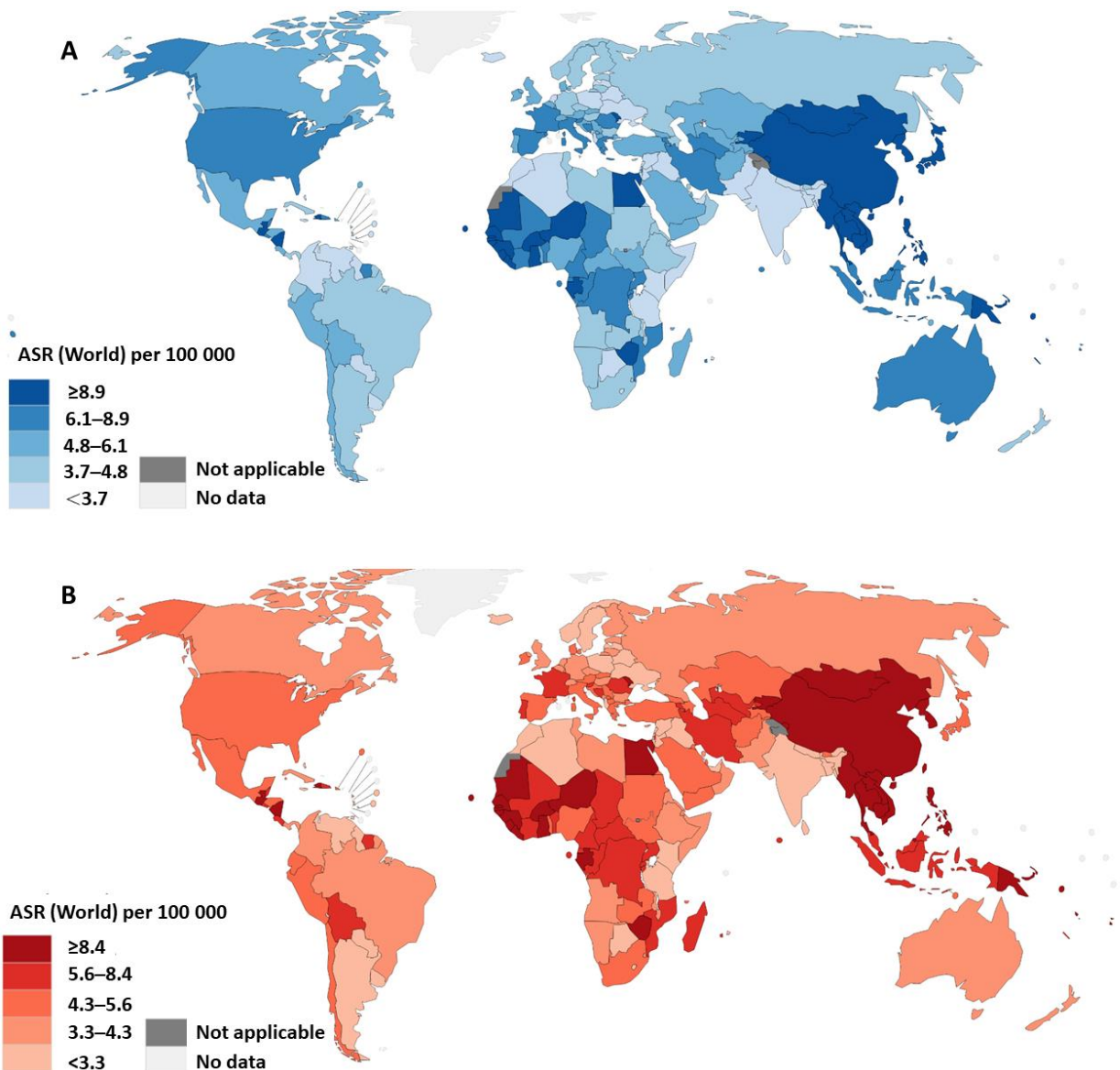
### 1.1 Le carcinome hépatocellulaire

#### Epidémiologie

A l'échelle mondiale, le CHC est le 3ème cancer en terme de mortalité et constitue donc un problème majeur de santé publique.(1) Les incidences les plus élevées sont observées en Asie et en Afrique qui sont des régions endémiques pour les infections par le virus de l'hépatite B (VHB) (**Figure 1**). (2–4) L'incidence du CHC augmente cependant de façon constante ces 10 dernières années dans les pays occidentaux en raison de l'épidémie d'obésité (syndrome métabolique).

L'incidence du CHC est 4 à 8 fois plus élevée chez l'homme que chez la femme. Cette prédominance masculine pourrait s'expliquer par une susceptibilité plus grande, génétique ou acquise, ou par une exposition plus fréquente aux facteurs environnementaux associés au CHC.(5)

En France, en 2020, le CHC était le 13ème cancer en terme d'incidence avec 11 504 nouveaux cas diagnostiqués et le 5ème en terme de mortalité. L'incidence annuelle est de 12.4/100 000 chez l'homme et 3.3/100 000 chez la femme.(2–6)



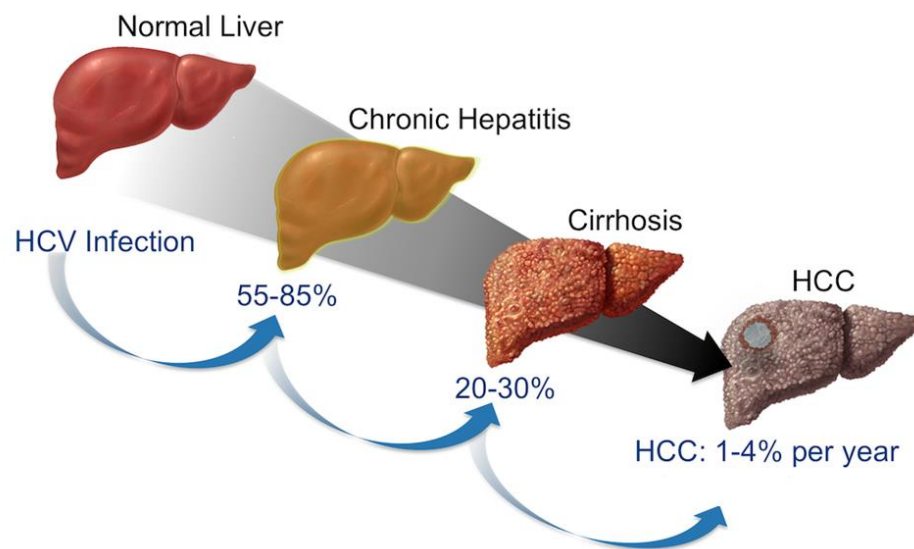
**Figure 1. Incidence (A) et mortalité (B) du cancer primitif du foie dans le monde en 2020.** Les taux sont standardisés pour 100 000 personnes. (D'après World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.GLOBOCAN 2020 (<http://globocan.iarc.fr>.) ASR: Age-Standardised Rate

Les étiologies du CHC se regroupent dans deux principales catégories : les hépatites virales et les facteurs de risque non infectieux. Leurs contributions dans le développement CHC sont différentes selon les régions géographiques.(7)

Au niveau mondial, les hépatites virales constituent un rôle majeur de survenue de CHC. En effet, on estime que le VHB est responsable d'un tiers de la mortalité liée au cancers primitifs hépatiques dans le monde.(4) Son rôle est plus important en Afrique et en Asie où environ 60%

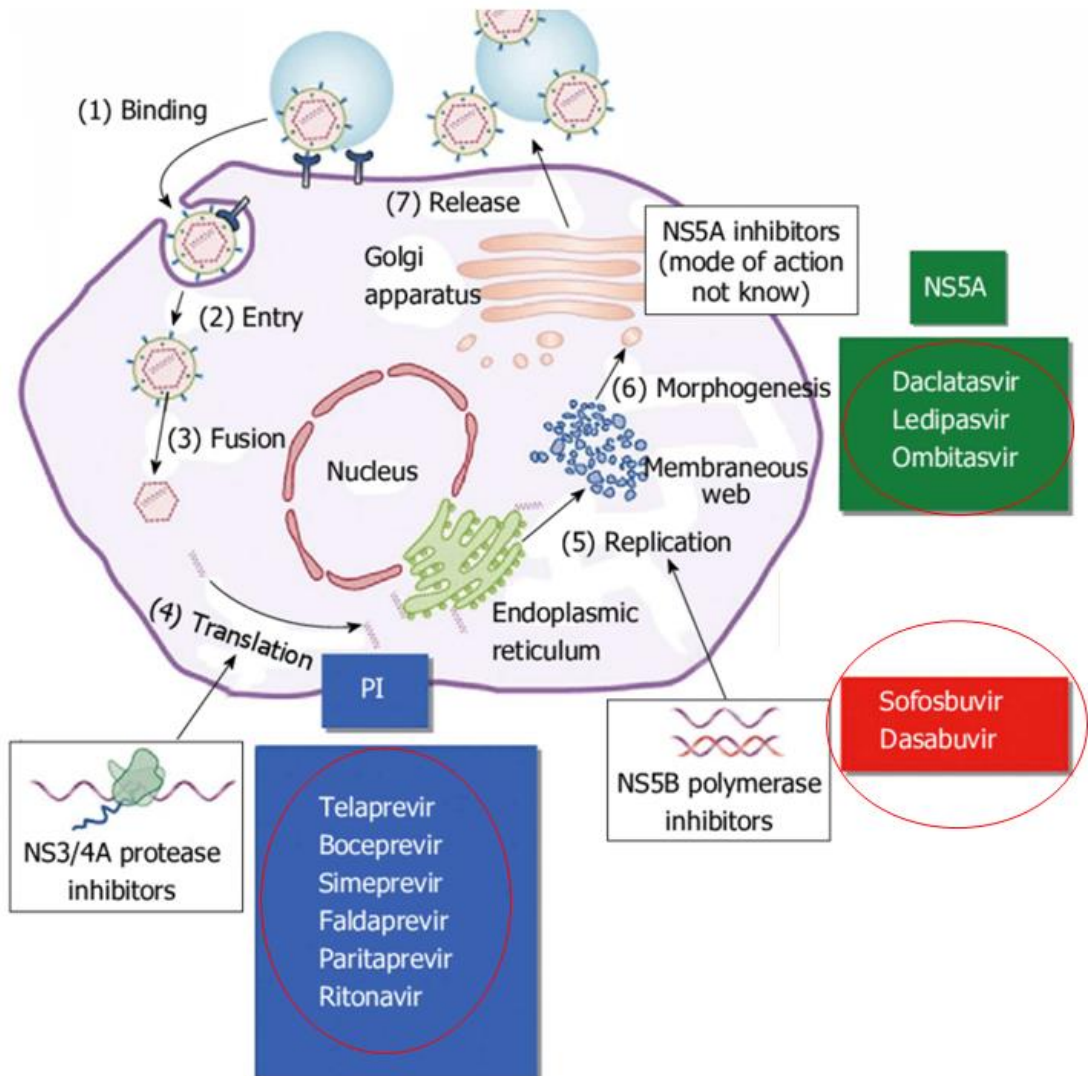
des CHC sont liés au VHB.(3) Parmi les patients infectés par le VHB, la séropositivité de l'Ag HBe, la charge virale élevée et le génotype C sont des facteurs prédictifs indépendants du développement de CHC.(8,9) La mise en œuvre de programmes de vaccination contre le VHB chez des nourrissons dans de nombreux pays d'Asie devrait heureusement faire baisser l'incidence du CHC dans ces régions. Cela a notamment été démontré à Taiwan, où l'incidence annuelle a considérablement diminué, passant de 0,92 chez les patients non vaccinés à 0,23 dans le groupe vacciné.(10)

L'infection chronique par le virus de l'hépatite C est une importante cause de survenue de CHC dans les pays développés, principalement par une inflammation chronique hépatique aboutissant à une cirrhose.(3,11,12) Après infection, ce virus hépatotrope conduit à une hépatite aigüe, asymptomatique dans la majorité des cas, et qui au cours du temps devient une hépatite chronique chez 55 à 85% des patients. Cette hépatite chronique, non contrôlée, entraîne une cirrhose dans environ 20-30% des cas. Le risque de survenue du CHC est d'environ 1-4% par an chez les patients cirrhotiques.(13) **(Figure 2)**



**Figure 2 : Histoire naturelle de l'infection virale par le VHC.** L'infection par le VHC conduit à une hépatite chronique (55-85% des cas), puis à une cirrhose (20-30%). Le risque de survenue du CHC sur foie cirrhotique est alors d'environ 1-4% par an.(<https://www.hepatitis.va.gov/>)

Il n'existe malheureusement pas de vaccin contre le VHC mais en 2014, les agents antiviraux directs (AAD) ont été approuvés pour la prise en charge des patients infectés. Leur mécanisme d'action est basé sur une inhibition du cycle viral du VHC. En effet, des AAD ciblent les protéines clés de la réplication du virus tels que les protéines NS3/4A, le NS5A ou NS5B.(14)(Figure 3)



**Figure 3 : Cycle viral du VHC et mécanisme d'action des antiraux à action directe :** les AAD (rouge) bloquent la réplication virale de VHC par l'inhibition directe les protéines virales.(14)

Ces nouvelles molécules sont considérées comme une révolution dans la prise en charge de cette pathologie car elles permettent d'obtenir une réponse virologique soutenue (RVS) chez plus 95% des patients et ce quel que soit le génotype du VHC.(15) De plus, il s'est avéré que la

majorité que ces traitements sont très bien tolérés. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a ainsi pour objectif d'éradiquer le VHC d'ici à 2030.(16) Au cours des années qui ont suivies l'introduction de ces traitements, certaines publications ont cependant rapporté un risque accru de récurrence ou développement du CHC chez les patients traités par AAD.(17,18) En 2016, une équipe espagnole a rapporté, dans une cohorte limitée de 58 patients traités, un taux de récurrence du CHC anormalement élevé (27.6%).(18) Une autre étude italienne a eu des résultats comparables.(19) Ces résultats étaient très controversés, et les mécanismes par lesquels les AAD pourraient être impliqués dans la carcinogenèse hépatique restent à identifier.

L'alcool et le syndrome métabolique sont les principaux facteurs de risque non infectieux de cancer du foie. Les données récentes montrent que le rôle de ce type de maladie devient de plus en plus important dans la survenue de CHC dans les pays développés.(4) En France, l'incidence annuelle estimée du CHC chez les patients atteints de cirrhose alcoolique était estimée à 2,9 pour 100 patients.(20) Parmi les maladies métaboliques, on identifie la stéatose hépatique non alcoolique (non alcoholic fatty liver disease - NAFLD) correspondant à de la stéatose isolée, et la stéatohépatite non alcoolique (non alcoholic steatohepatitis - NASH) qui correspond à de la stéatose associée à une activité nécrotico-inflammatoire significative. De manière intéressante, les CHC dus à la NASH se développent plus fréquemment sur un foie fibreux non cirrhotique comparé aux CHC d'autres étiologies en Europe.(21)

D'autres facteurs de risque plus rares, comme l'exposition à l'aflatoxine B1, la cirrhose biliaire primitive, les hépatites auto-immunes et certaines maladies génétiques héréditaires (hémochromatose notamment) prédisposent également à la survenue du CHC.(3,4)

## **Diagnostic**

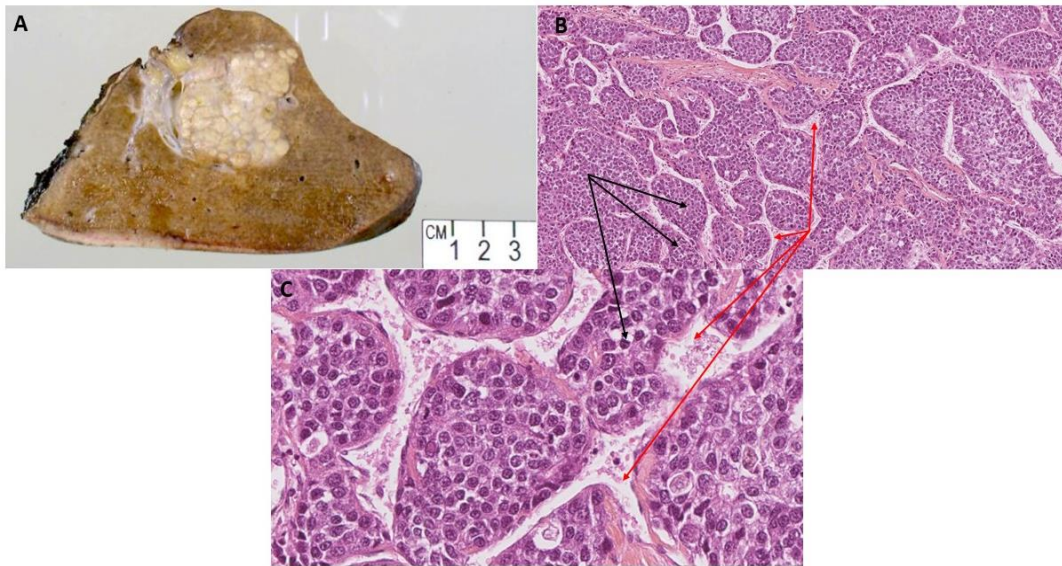
En Europe, la stratégie du diagnostic du CHC repose sur les recommandations actuelles de l'EASL (European Association for the Study of the Liver), établies en 2018.(22) Chez les patients non cirrhotiques, la biopsie est recommandée pour établir un diagnostic, tandis que les examens non invasifs tel que l'IRM et TDM sont suffisants pour diagnostiquer les CHC d'un diamètre supérieur à 1 cm sur foies cirrhotiques. L'IRM et/ou la TDM permettent notamment de mettre en

évidence la présence d'une "wash-in" en phase artérielle (hypervascularisation) et d'un "wash-out" (lavage) en phase portale. En l'absence de ces critères, la biopsie est recommandée.(21) Pour les nodules inférieurs à 1cm, une surveillance par échographie tous les 4 mois est conseillée. En l'absence d'évolution de la taille ou de la morphologie du nodule dans les 2 ans, une surveillance tous les 6 mois est par la suite recommandée.(22)

### **Aspects anatomopathologiques**

Les caractéristiques macroscopiques du CHC sont très diverses. Il peut s'agir de nodules uniques ou multiples. Leur taille peut aller de quelques millimètres à plus de 30cm. A la coupe, les CHC présentent souvent un aspect polychrome, blanc, beige, jaune, ou verdâtre. Des remaniements nécrotiques et hémorragiques ont été souvent observés en cas de tumeurs de grande taille (**Figure 4A**).<sup>(23)</sup>

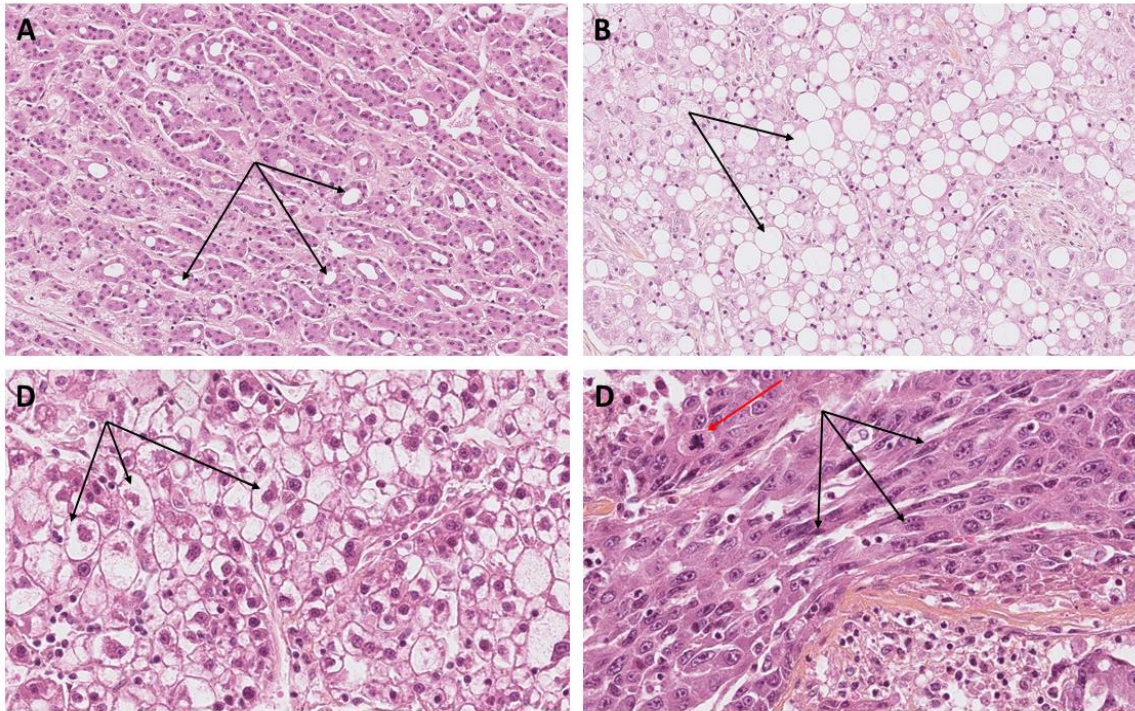
Les caractéristiques microscopiques architecturales et cytologiques du CHC sont également très diverses. Les tumeurs bien différenciées présentent une architecture trabéculaire ; les travées tumorales sont alors légèrement plus épaisses (épaisseur de 3 cellules ou plus) que celles que l'on peut observer dans le foie sain. Les CHC moyennement différenciés présentent le plus souvent une architecture pseudo-glandulaire et les CHC peu différenciés présentent une architecture compacte avec des massifs de cellules tumorales ou des nappes diffuses (**Figure 4B, C**).



**Figure 4. A)** Aspect macroscopique d'un CHC: tumeur multinodulaire, de couleur jaunâtre. **B)** Aspect microscopique d'un CHC: Cellules tumorales organisées en travées épaisses (flèches noires), séparées par des espaces vasculaires (flèches rouges) (HES 100X). **C)** A fort grossissement, présence d'atypies nucléaires et d'une importante augmentation de la densité cellulaire (HES 400X).

Différents aspects cytologiques peuvent être observés: cellules pléomorphes (atypies marquées avec noyaux multiples et/ou irréguliers, volumineux), cellules claires (cytoplasme clair en raison de la présence de glycogène) (**Figure 5**), aspect sarcomatoïde (cellules fusiformes) (**Figure 5**), ou encore inclusions cytoplasmiques éosinophiles.(23)





**Figure 5. Aspects cytologiques du CHC. A)** Structures pseudo-glandulaires (flèches noires) (HES 200X). **B)** Aspect stéatosique, avec volumineuses vacuoles optiquement vides intracytoplasmiques (flèches noires) (HES 200X). **C)** Cellules claires dues à l'accumulation intracytoplasmique de glycogène (flèches noires) (HES 400X). **D)** Aspect sarcomatoïde avec cellules fusiformes, allongées (flèches noires) et présence de mitoses atypiques (flèche rouge) (HES 400X).

### Aspects moléculaires

### Altérations génétiques dans le CHC

Au cours des dix dernières années, de nombreux travaux ont analysé les mécanismes initiateurs de la cancérogenèse hépatique et le profil mutationnel du CHC.(24,25) On identifie ainsi en moyenne 60 altérations somatiques fonctionnelles par tumeur et, parmi ces mutations, uniquement 2 à 6 concernent des gènes considérés comme des « drivers » de la carcinogénèse.(26)

Les mutations du promoteur du gène *TERT* sont l'altération génétique somatique la plus fréquente du CHC, et sont présentes dans environ 60% des tumeurs.(27) La télomérase est une polymérase qui permet le maintien de la longueur des télomères par ajout de nucléotides. *TERT*



code pour la sous unité catalytique de la télomérase et les mutations au niveau de la séquence promotrice créent un site consensus de fixation pour les facteurs de transcriptions, ce qui induit une forte expression du gène.(27)

La voie WNT/  $\beta$ -caténine est la deuxième voie la plus fréquemment altérée dans le CHC (environ 30% des cas).(24) Cette voie de signalisation est impliquée dans la prolifération, l'apoptose et la mobilité cellulaire.(24,28) L'activation de cette voie dans CHC est principalement due aux mutations activatrices de *CTNNB1*, gène codant pour la  $\beta$ -caténine. D'autres mutations impliquant les gènes *AXIN1* (10%) ou *APC* (1-2%) sont également identifiées de manière récurrente et ont pour conséquence une activation de la voie WNT/  $\beta$ -caténine.(24)

Les mutations de *TP53* sont identifiées dans environ 30% des CHC. Ces mutations sont associées à un mauvais pronostic et sont plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs peu différenciées développées chez les patients infectés par le VHB.(25) La protéine P53 joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire, et peut induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2.(24,29) Des altérations de d'autres gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, comme *CDKN2A* ou *RB1*, sont également retrouvée dans 2 à 4% des cas de CHC.(24,30,31)

La voie PIK3-AKT-mTOR, impliquée dans le métabolisme et la prolifération cellulaire, est quant à elle activée dans 10% des CHC par des mutations inactivatrices de *PTEN*, *TSC1* ou *TSC2* (3-8% des cas) ou activatrices de *PIK3CA* (1%).(32,33) Son activation est notamment associée à une mauvaise différenciation et à des taux de récurrence précoce après exérèse chirurgicale.(32)

D'autres voies de signalisation, comme celles impliquées dans le remodelage chromatinien (*ARID1A*, *ARID2*), les modifications épigénétiques (*G9a*, *EZH2*, *SUV39HZ*) ou le stress oxydatif (*NFE2L2*, *KEAP1*) sont également altérées de façon récurrente dans le CHC.(34–36)

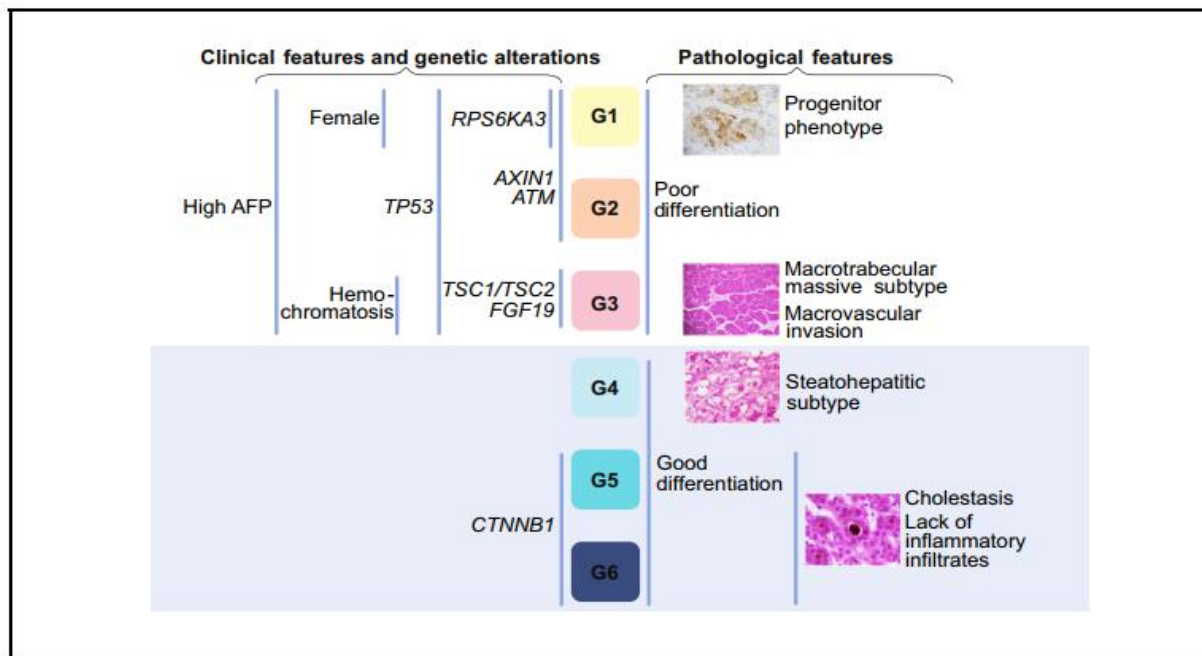
### **Classification moléculaire du carcinome hépatocellulaire**

Le CHC est une tumeur dont le pronostic, l'aspect histologique et profil d'expression génique sont très variables. Une classification moléculaire de CHC comprenant 6 sous-groupes (G1-G6) a été établie et se base sur des données génomiques et transcriptomiques (**Figure 6**). (37)

Ces sous-groupes moléculaires sont associées à des caractéristiques cliniques particulières, et notamment aux facteurs de risque de maladie hépatique.(37)

Les CHC appartenant aux groupes G1, G2 et G3 sont dits “prolifératifs” et sont globalement caractérisés par une forte instabilité chromosomique.(37) Les tumeurs du groupe G1 sont associées à l’infection par le virus de l’hépatite B, une surexpression de marqueurs progéniteurs hépatiques (EPCAM, AFP, IGF2) et aux mutations du gène *RPS6KA3*, qui sont responsables d’une activation de la voie des MAP/Kinases.(37) Le groupe G2 est associé aux mutations des gènes *TP53* et *PIK3CA*.(37) Les CHC du sous-groupe G3 sont associées à un phénotype histologique dit «macrotrabéculaire massif» et à un mauvais pronostic et sont caractérisés par des mutations fréquentes de *TP53* et la surexpression de gènes impliqués dans l’angiogenèse (**Figure 4**). (37)

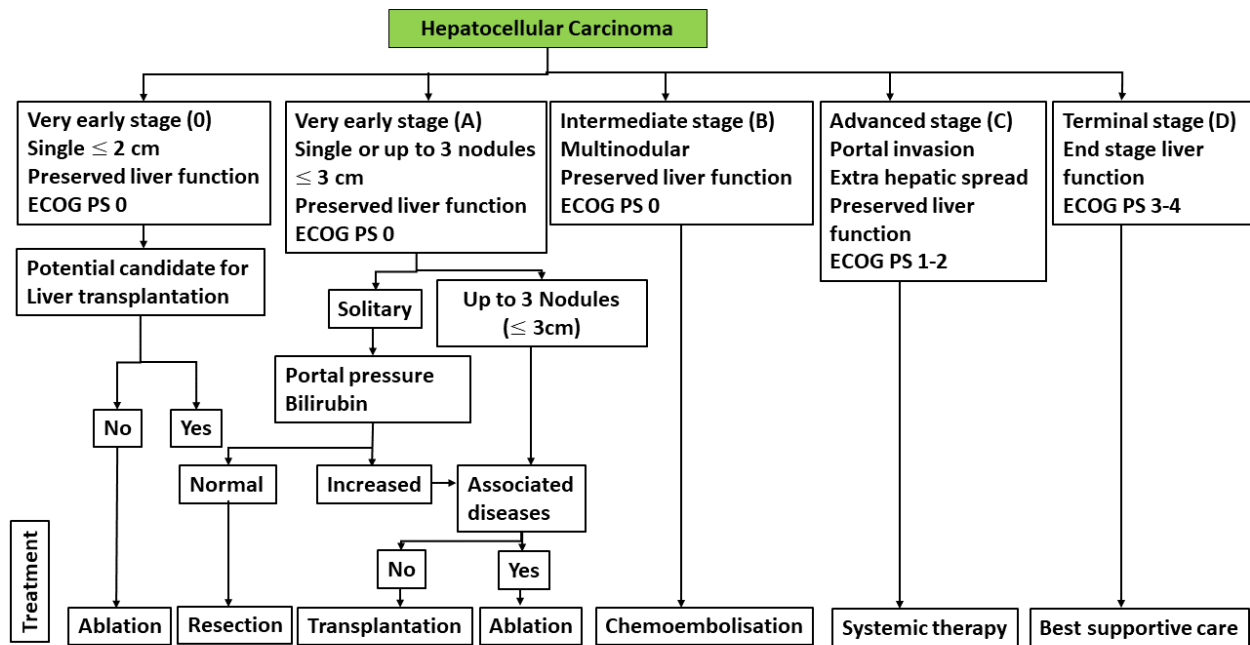
La tumeurs classées G4, G5 et G6 appartiennent à une sous classe particulière appelée non proliférative et présentent peu d’altérations chromosomiques (**Figure 4**). (37) Le sous-groupe G4 inclut des tumeurs dont le profil d’expression est relativement proche de celui d’hépatocytes matures non tumoraux.(37) Les groupes G5 et G6 sont fortement liés aux mutations de *CTNNB1* qui sont responsables d’une activation de la voie WNT/  $\beta$ -caténine. Ce sont le plus souvent des tumeurs bien différenciées, d’architecture microtrabéculaire et pseudoglandulaire avec présence de cholestase.(37) Les tumeurs du groupes G6 présentent une plus forte activation de la voie Wnt, et une sous-expression de la E-cadhérine.(37)



**Figure 6. Classification moléculaire du CHC:** Deux grandes classes moléculaires sont identifiées. La classe proliférative inclut les sous-groupes G1-G3 et est associée à des facteurs de mauvais pronostic (mauvaise différenciation, élévation de l'AFP). La classe non proliférative inclut les sous-groupes G4-G6 et est associée à un meilleur pronostic, une bonne différenciation, et à l'activation de la voie Wnt/bêta-caténine. (Calderaro et al, Journal of Hepatology, 2017)

### Traitement

En occident, la classification Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) s'est imposée comme l'arbre décisionnel thérapeutique principal du CHC (**Figure 7**). (38,39) Ce système a pour avantage d'être une classification à la fois pronostique et thérapeutique. Trois types d'informations sont intégrés dans la classification BCLC : les caractéristiques tumorales (taille, nombre, envahissement vasculaire, métastase), la gravité de la maladie du foie sous-jacente (score de Child Pugh) et l'état général du patient ("performance status") (**Figure 7**). (40) D'autres classifications (CLIP, HKLC, GRETCH) ont été proposées et parfois validées dans des études prospectives mais sont nettement moins utilisées en pratique. (41–43)



**Figure 7. Prise en charge thérapeutique d'après la classification BCLC.** Les patients au stade très précoce ou précoce (petites tumeurs, stade 0 ou A) peuvent être traités par une des trois thérapies potentiellement curatives: transplantation hépatique, résection chirurgicale, ou destruction percutanée. Pour les patients diagnostiqués au stade B, le traitement recommandé est la chimoembolisation. Enfin, pour les patients avec des tumeurs de stade avancé, la thérapie recommandée est un traitement systémique ou palliatif, en fonction de l'état général du patient. ECOG PS=Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status. (Forner et al, The Lancet, 2018)

Les traitements potentiellement curatifs comprennent la résection chirurgicale ou l'ablation percutanée. Il existe cependant des taux très élevés de récurrence tumorale après traitement (50-70%) et les taux de survie à 5 ans restent suboptimaux (30-40%).(44,45)

La transplantation hépatique est un autre traitement potentiellement curatif qui a pour avantage de traiter à la fois la lésion et la maladie hépatique sous-jacente. Elle se fait chez des patients qui respectent certains critères (critères dit de Milan, un CHC < 5 cm ou au maximum 3 nodules de moins de 3 cm). Les taux de récurrence sont faibles (5-10%) et la survie à 5 ans est excellente mais la pénurie de greffons rend difficile son utilisation chez tous les patients (75 % à 4 ans).(46,47)

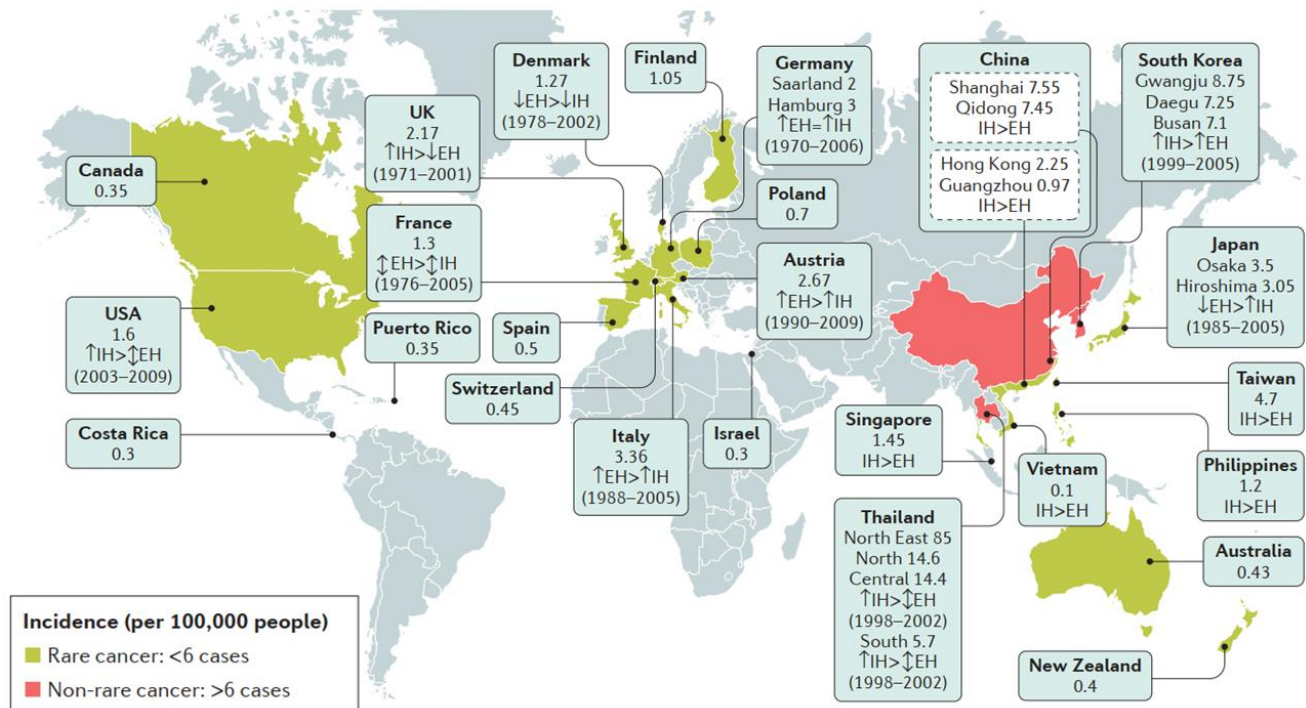
Pour les patients présentant une maladie plus avancée, les traitements sont alors dit palliatifs et comprennent des traitements locorégionaux et systémiques. La chimioembolisation intra-artérielle qui peut être réalisée chez les patients ayant une bonne fonction hépatique et un tronc porte perméable.(48) Elle associe l'embolisation d'une des branches de l'artère hépatique nourrissant la tumeur avec une injection dans le même temps d'une chimiothérapie (doxorubicine, cisplatine).(49–51) De nouvelles techniques comme la radioembolisation ont été développées ces dernières années mais leur intérêt n'est pas encore clairement validé.(52,53) Le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase anti *VEGFR*, *RAS*, *RAF* et *PDGFR*, est le premier traitement systémique ayant démontré son efficacité en termes de survie pour les patients diagnostiqués à un stade avancé. Les réponses objectives restent malheureusement très rares.(54,55) Les combinaisons de drogues immunomodulatrices avec des molécules ciblant la néoangiogénèse sont particulièrement prometteuses, et l'association atezolizumab (anti-PDL1) – bevacizumab (anti-angiogénique) a notamment montré une supériorité en comparaison avec le sorafenib pour les patients avec CHC avancés. C'est désormais le standard de traitement en première ligne.(56–59)

## **1.2 Cholangiocarcinome intra-hépatique (CCA)**

Après le CHC, le CCA est la deuxième tumeur maligne primitive la plus fréquente. Il représente entre 10 et 20% des tumeurs hépatiques primitives malignes.(60) Ces tumeurs se développent à partir des cellules de l'épithélium biliaire.

### **Epidémiologie**

L'incidence du CCA est très variable selon les zones géographiques (**Figure 8**). Elle est plus importante en Asie du Sud-Est (incidence atteignant 85/100 000 habitants dans le nord est de la Thaïlande). En occident, elle est plus faible (1.3/100 000 habitants en France) mais en constante augmentation au cours des dernières années.(60) Ceci s'explique par une répartition différente des facteurs de risque en fonction des régions.



**Figure 8. Incidence mondiale de CCA (cas pour 100 000 personnes).** Ces données se réfèrent à la période 1971–2009. La couleur verte correspond aux pays à plus faible incidence (<6 cas pour 100 000 cas), tandis que la couleur rose correspond aux pays à plus forte incidence (> 6 cas pour 100 000 cas). Les tendances temporelles sont également rapportées a été rapportée (↑tendance à la hausse; ↔ tendance stable; ↓ tendance à la baisse). (Banales et al, Nature Reviews, 2016)

En Asie du Sud Est, le principal facteur de risque est l'infection par le parasite *Opisthorchis Viverrini*, qui est due le plus souvent à la consommation de poisson cru. Les facteurs de risque classiques du CHC (hépatites virales chroniques B et C, cirrhose, obésité, diabète et alcool) sont également impliqués dans le développement du CCA.(59–62) Cependant, dans les pays occidentaux, on ne retrouve le plus souvent aucun facteur de risque connu chez la majorité des patients atteints de CCA. La **Table 1** résume l'ensemble des facteurs de risque de CCA identifiés à ce jour.(60)

**Table 1 : Facteurs de risque du cholangiocarcinome. (Adaptée de Banales 2016)**

***Généraux***

Âge >65 ans

Obésité

Diabète

***Maladies inflammatoires***

Cholangite sclérosante primitive

Lithiase hépatique (Cholangiohépatite orientale)

Calculs de l'arbre biliaire

Anastomose bilio-digestive

Cirrhose hépatique

***Maladies infectieuses***

*Opisthorchis viverrini* (douves hépatiques)

*Clonorchis sinensis* (douves hépatiques)

Hépatite C

Hépatite B

Infection VIH

***Drogues, toxines et produits chimiques***

Alcool

Tabac

Thorotraste

Dioxine

Vinyl chloride

Nitrosamines

Asbestose

Pilule contraceptive orale

Isoniazide

***Congénitaux***

Kystes du cholédoque (type I, solitaire, extrahépatique; type IV, extrahépatique et intrahépatique)

Maladie de Caroli

Fibrose hépatique congénitale

## Diagnostic

Le diagnostic de CCA est le plus souvent malheureusement tardif car les patients sont longtemps asymptomatiques. A un stade avancé, l'examen clinique peut retrouver : perte de poids, altération de l'état général, douleurs abdominales, hépatomégalie tumorale, fièvre, et plus rarement ictère. Les marqueurs tumoraux sériques (notamment CA19-9) ont une faible sensibilité.(63,64)

Les techniques d'imagerie, telles que l'échographie, l'échographie par contraste (CEUS), la tomodensitométrie et l'IRM, jouent un rôle important dans le diagnostic du CCA. L'aspect typique est une lésion hépatique prenant le contraste au temps artériel avec une augmentation du rehaussement au temps veineux en raison d'une prise de contraste lente du stroma fibreux.(65) Pour les tumeurs non typiques et/ou de petite taille (<2cm), la différenciation avec un CHC est parfois difficile voire impossible. Une biopsie est alors indispensable pour un diagnostic de certitude.(65–67)

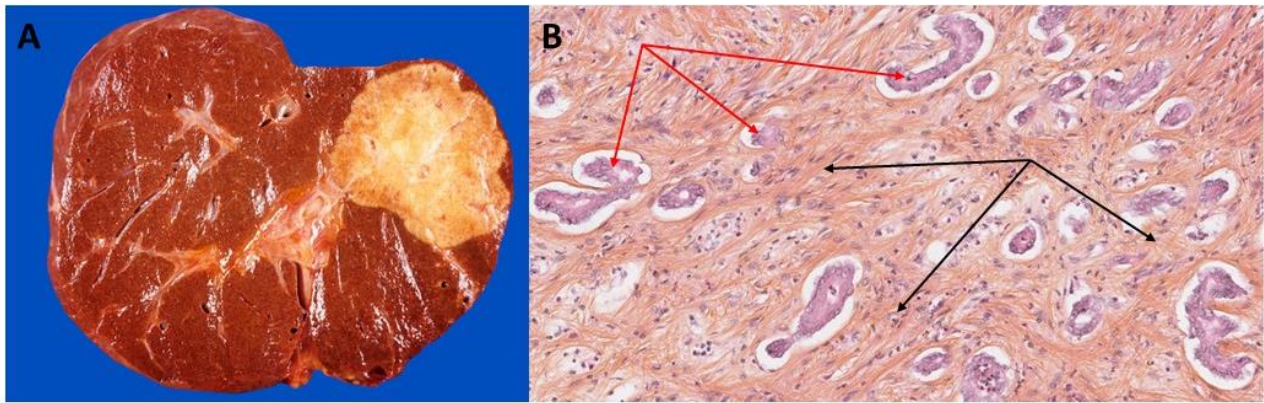
## Aspects anatomopathologiques

Il existe 3 types macroscopiques de CCA :

- Le type « Mass-forming » est caractérisé par une masse intra-parenchymateuse bien limitée, arrondie, polylobée.
- Le type « Periductal-infiltrating » présente une extension tumorale le long des parois des canaux biliaires.
- Le type « Intraductal growth » consiste en une prolifération polypoïde se développant essentiellement dans la lumière des canaux biliaires.(23)

Sur le plan histologique, les cellules tumorales du CCA peuvent avoir une architecture glandulaire, tubulaire ou encore pseudo-papillaire (**Figure 9**). Leur cytoplasme est le plus souvent éosinophile. Les engainements tumoraux périnerveux sont particulièrement fréquents.(23,64)



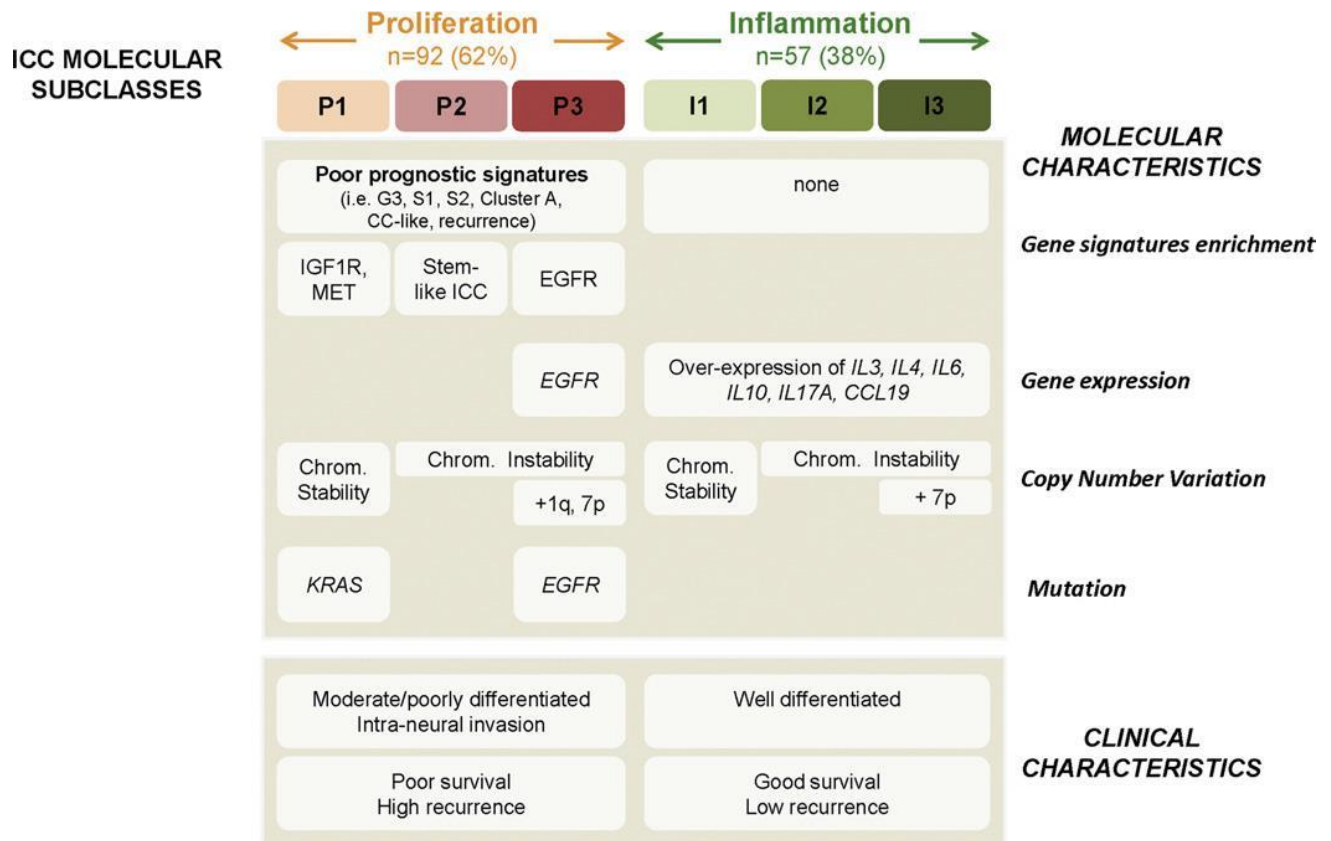


**Figure 9. Aspects anatomopathologiques du CCA.** **A)** Aspect macroscopique d'un CCA: Tumeur sous capsulaire, blanchâtre, développée sur du parenchyme non cirrhotique **B)** Aspect microscopique d'un CCA: Prolifération tumorale d'architecture glandulaire (flèches rouges) avec stroma fibreux abondant (flèches noires) (HES 200X).

### Aspects moléculaires

Des nombreuses études utilisant des techniques de séquençage haut-débit ont permis d'identifier les altérations moléculaires récurrentes et les voies de carcinogenèse impliquées dans le développement et la progression des CCA.(68,69) On retrouve ainsi des mutations dans des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation d'ADN (*TP53*, *CDKN2A*, *CCND1*, *ATM*, *ROBO2*, *MYC*, *BRCA1* et *BRCA2*), les mécanismes épigénétiques (*PBRM1*, *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID2*, *SMARCA2*, *SMARCA4* et *SMARCA1*), la méthylation des histones (*MLL2*, *MML3*, *KMT2C*, *KDM4A*, *KDM5D*, *KDM6A* et *KDM6B*), et l'activation et la transmission du signal intracellulaire (*KRAS*, *ERBB1-3*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN*, *STK11*, *SMAD4* et *FGFR1-3*). (68-71)

Différentes classifications basées sur le profil d'expression génique des CCA ont été proposées. Deux principaux groupes de tumeurs ont été identifiés par Sia et al (**Figure 8**). Le sous-groupe « prolifératif » est plus agressif et présente une activation des voies de signalisation oncogéniques *RAS*, *EGFR*, et *HGF/MET*. La sous-groupe « inflammatoire » est quant à lui caractérisé par une infiltration de cellules immunitaires et une surexpression de cytokines (notamment *IL4*, *IL10*) (**Figure 10**). (70)



**Figure 10. Classification moléculaire du CCA.** Les deux groupes moléculaires de CCA présentent des caractéristiques cliniques et pronostiques différents. Le sous-groupe inflammatoire présente un meilleur pronostic et une surexpression de diverses cytokines (*IL3, IL4, IL6, IL10, IL17A, CCL19*). Le sous-groupe prolifératif est quant à lui caractérisé par l'activation de voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire. Les mutations de *KRAS* et *EGFR* sont également plus souvent retrouvées dans ce sous type. (Sia et al, Gastroenterology, 2013)(72)

### Traitement

La résection chirurgicale est le seul traitement potentiellement curatif du CCA, mais uniquement 30 à 40% des patients sont éligibles à la chirurgie. Son but est d'obtenir une résection R0 tout en préservant un volume de foie restant suffisant. Malgré une résection complète, le taux de récurrence atteint cependant près de 50-60% avec une médiane de survie sans récurrence de 26 mois.(60)

Pour les patients diagnostiqués à un stade avancé et non éligibles à un traitement curatif, la chimiothérapie systémique actuellement approuvée associe gemcitabine et cisplatine.(73) Certaines altérations moléculaires, comme les fusions de *FGFR2* ou les mutations des gènes *IDH1*

et 2, sont potentiellement ciblables et plusieurs molécules sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques.(74) Le rôle des molécules immunomodulatrices reste à déterminer.

### **1.3 Hépatocholangiocarcinome**

Décrites pour la première fois par Allen et Lysa en 1949, les tumeurs mixtes de type hépatocholangiocarcinome (CHC-CCA) constituent un sous type rare de cancer du foie qui associe un double contingent de carcinome hépatocellulaire et de cholangiocarcinome.(75) Il représente entre 1% et 5% des cancers primitifs du foie.(76,77)

#### **Epidémiologie**

Cette entité étant particulièrement rare, les données épidémiologiques et démographiques restent limitées. Les études publiées sont en effet le plus souvent rétrospectives, monocentriques et incluent relativement peu de patients.(78–81)

Les facteurs de risque de CHC-CCA sont les mêmes que ceux du CHC et comprennent notamment les infections par le VHB, le VHC, le syndrome métabolique et la consommation d'alcool.(78) Dans les pays occidentaux, les CHC-CCA se développent chez des patients cirrhotiques dans environ la moitié des cas, les facteurs de risque les plus fréquents étant l'infection par le VHC en Espagne (43%) et aux USA (23%) et l'alcool en France (40%).(82)

#### **Diagnostic**

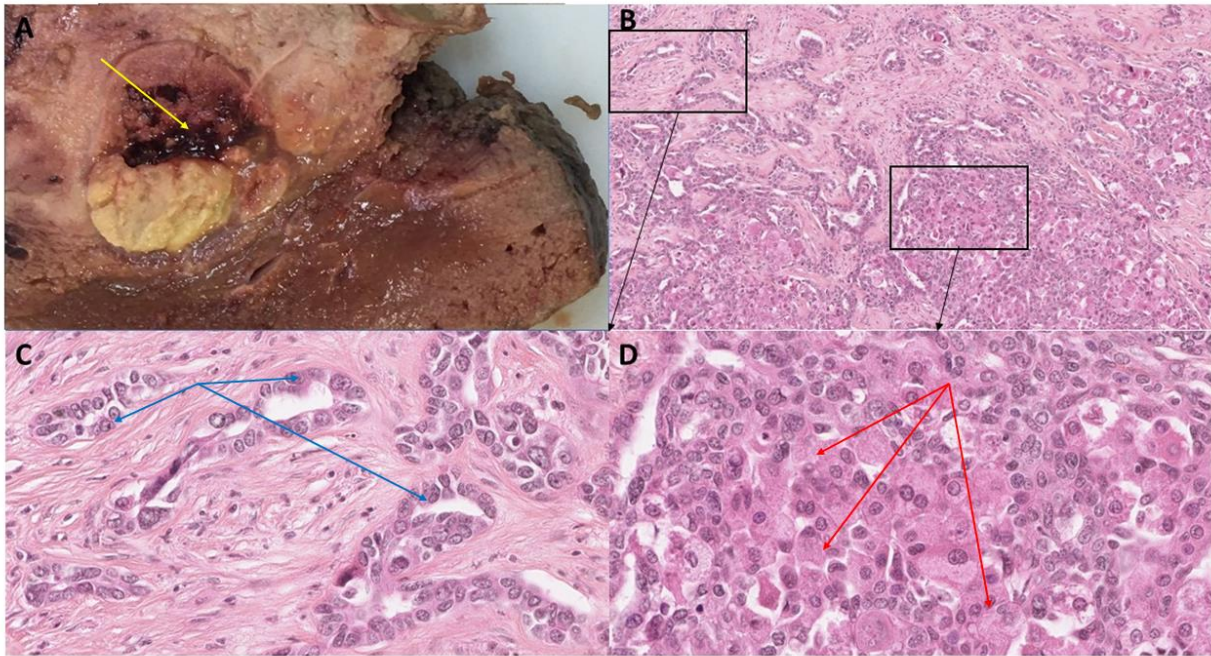
Le diagnostic de CHC-CCA repose sur l'examen histologique de prélèvements biopsiques ou chirurgicaux. Les marqueurs immunohistochimiques peuvent être utiles pour mieux caractériser le phénotype complexe de ces tumeurs : HepPar1, AFP et glypican 3 pour le contingent hépatocytaire; CK19 et CK7 pour le contingent biliaire.(81,83)

Un discordance entre l'imagerie et les marqueurs tumoraux sériques (imagerie suggérant un CHC avec augmentation de l'antigène glucidique sérique 19-9 (CA 19-9) ou un nodule hypovasculaire évocateur de CCA avec augmentation de l'AFP peut faire suspecter un CHC-CCA.(84)

## Aspects anatomopathologiques

Les caractéristiques macroscopiques de CHC-CCA sont intermédiaires entre celles du CHC et du CCA.(23) Sur le plan microscopique, les CHC-CCA présentent deux contingents histologiques hépatocytaires et biliaires distincts (**Figure 11**). Dans les secteurs de CHC, les cellules tumorales sont plus volumineuses, avec un cytoplasme le plus souvent éosinophile. Dans les zones de CCA, on retrouve une architecture glandulaire ou tubulaire, les cellules tumorales sont souvent de plus petite taille et la production de mucine peut être mise en évidence par des colorations spéciales (PAS ou Bleu Alcian). On peut également observer des contingents très indifférenciés dits de “cellules souches”. Il s’agit de cellules de petite taille, au noyau le plus souvent hyperchromatique. Le variant “cholangiolocellulaire”, qui correspond à tumeurs dont l’architecture est semblable à celle de ductules biliaires, était auparavant considéré comme un variant de CHC-CCA, mais l’OMS recommande dorénavant de le considérer comme un sous type de cholangiocarcinome.(23)

La proportion de ces différents contingents histologiques est très variable. Quelques études suggèrent que les tumeurs ayant un contingent cholangiocarcinomateux important seraient de plus mauvais pronostic, cependant cela reste à démontrer par l’analyse de larges séries.(85)



**Figure 11. Aspects anatomopathologiques des CHC-CCA.** **A)** Nodule tumoral polychrome avec remaniement hémorragique (flèche jaune) **B)** Aspect microscopique d'un CHC-CCA: deux contingents histologiques sont présents, un contingent de CCA situé en haut et un contingent de CHC situé en bas (HES 100X). **C)** Le contingent de CCA présente des cellules cubo-cylindriques organisées en formations glandulaires (flèches bleues) (HES 400X). **D)** Dans le contingent de CHC, les cellules ressemblent aux hépatocytes et l'architecture est compacte (flèches rouges)(HES 400X).

### Aspects moléculaires

En raison de la rareté de l'entité et des difficultés diagnostiques, les études moléculaires portant sur des échantillons de CHC-CCA sont relativement peu nombreuses. L'analyse d'une série de 133 patients asiatiques a montré que les altérations génétiques les plus fréquentes étaient les mutations des gènes *TP53*, *TERT* (promoteur), *AXIN1*, *KMT2D*, et *ARID1A* et les fusions du gène *FGFR2*. De manière intéressante, ces altérations peuvent s'identifier dans le CHC et/ou les CCA conventionnels.(86)

Il est désormais bien établi que ces tumeurs ont une origine monoclonale.(87) En effet, même si les deux contingents peuvent présenter des altérations différentes, les altérations dans les gènes "drivers" de la carcinogenèse sont présentes dans les deux secteurs hépatocytaires et biliaires des tumeurs.(88,89)



La cellule d'origine des CHC-CCA reste à déterminer. Plusieurs hypothèses ont été émises, et les CHC-CCA pourraient résulter de la transformation de cellules souches hépatiques ayant conservé une capacité de double différenciation ou de la dédifférenciation d'un CHC ou d'un CCA. Différents travaux ont validé, chez la souris, ces deux différentes hypothèses.(90–92) Il a été notamment montré dans différents modèles murins, que l'inactivation de *TP53* favorisait la différenciation des hépatocytes matures en cellules progénitrices via une surexpression de la protéine Nestin. Ces cellules peuvent ensuite donner naissance soit à un CHC ou à un CCA en fonction de l'activation des voies de signalisation de *Wnt* et *Notch*.(91,93) D'autre part, il a été montré que différents types de cellules incluant les cellules progénitrices hépatiques, les hépatoblastes ainsi que les hépatocytes matures pouvaient donner naissance à des tumeurs ayant un phénotype de CHC-CCA.(94) Ces résultats suggèrent que les CHC-CCA pourraient être issus de différents types cellulaires.

### **Traitement**

La résection hépatique est actuellement la seule thérapie potentiellement curative pour les patients atteints de CHC-CCA.(78) La survie moyenne sans récurrence et la survie globale après résection sont de 14,2 de 37 mois, respectivement.(82) Ces chiffres sont comparables à ceux obtenus chez les patients atteints de CCA et moins bons que ceux des patients atteints de CHC. Le rôle de la transplantation hépatique (TH) reste controversé. Une revue systématique des études rétrospectives sur la TH pour CHC-CCA a rapporté des taux importants de récurrence précoce (survie médiane sans maladie de 14,2 mois) et une survie globale de 37,1 mois.(95) Ces données expliquent que le CHC-CCA reste toujours très largement considéré comme une contre-indication à la TH.(95)

Quelques études rétrospectives récentes suggèrent cependant qu'en cas de tumeur de petite taille, la TH pourrait améliorer le pronostic des patients.(96,97) Cependant l'un des principaux inconvénients de ces études est que le CHC-CCA était identifié de manière fortuite sur les explants et il pourrait s'agir de tumeurs relativement indolentes qui ne reflètent pas l'agressivité de l'entité.

Pour les patients diagnostiqués à un stade avancé, il n'existe aucune thérapie systémique ayant fait la preuve de son efficacité. Les chimiothérapies associant gemcitabine et sels de platine sont les traitements les plus couramment utilisés mais leur efficacité reste très limitée.

## **1.4 Microenvironnement immunitaire des tumeurs malignes primitives du foie et immunothérapie**

L'immunothérapie a révolutionné le traitement de nombreux cancers solides ou hématologiques, comme l'adénocarcinome pulmonaire, le mélanome ou le lymphome de Hodgkin.(98–100) Le rôle du microenvironnement immunitaire dans l'initiation et la progression tumorale est ainsi de plus en plus étudié. Il a notamment été mis en évidence que ses caractéristiques quantitatives, qualitatives et spatiales avaient un important impact pronostique et permettaient également de prédire la réponse aux drogues immunomodulatrices.(101–103)

Les cancers du foie, et particulièrement le CHC, se développent dans des contextes d'inflammation chronique du foie et sont donc des modèles particulièrement intéressants pour étudier l'impact de l'activation immunitaire dans l'initiation et la progression tumorale.(104–106) De nombreux travaux ont ainsi porté sur l'impact des différentes populations immunitaires innées et adaptatives dans ces cancers.(106–109) Nous détaillerons ci-dessous le rôle des principaux sous types cellulaires rapportés comme impliqués dans le développement des tumeurs malignes du foie et la réponse immune anti-tumorale qui leur est associée.

### **Lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK**

Les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules Natural killer (NK) jouent un rôle essentiel dans la surveillance immunitaire et la prévention des cancers.(109–111) Les cellules T CD8 + sont le sous type cellulaire le plus abondant du microenvironnement intra-tumoral des cancers du foie.(112) Leur présence est associée à une amélioration de la survie sans récurrence et de la survie globale après résection chirurgicale.(112–114) Cet impact pronostique est particulièrement fort si ces lymphocytes sont dits fonctionnels, et qu'ils expriment des marqueurs de cytotoxicité comme le granzyme ou la perforine.(112–114)

Les cellules NK sont les cellules de l'immunité innée ayant le plus fort potentiel cytolytique et elles peuvent ainsi entraîner la mort des cellules tumorales sans sensibilisation préalable. Une diminution du nombre de cellules NK ou une altération de leur fonction a été mise en évidence dans de nombreuses tumeurs malignes et notamment les cancers du foie.(107) L'infiltration

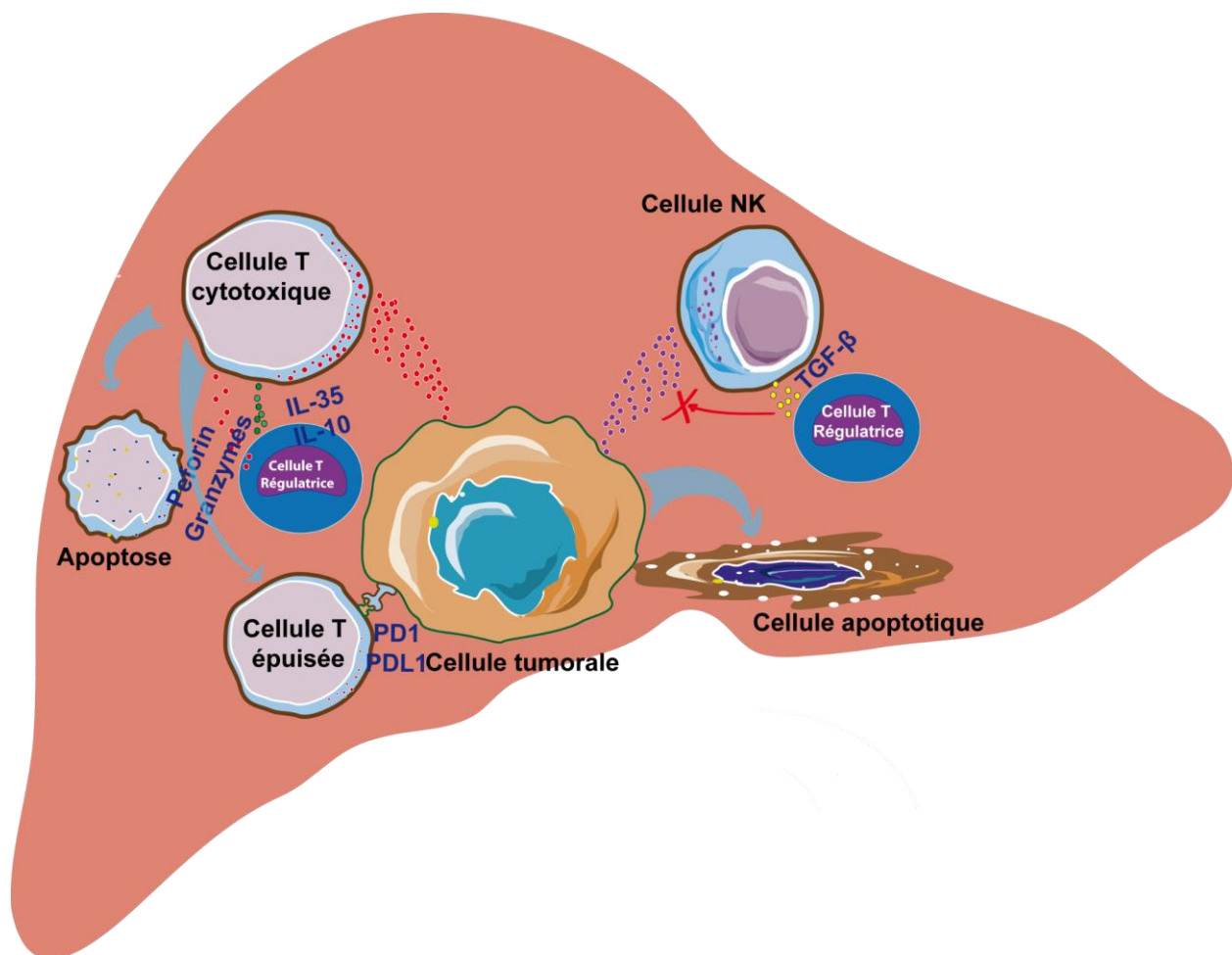


intratumorale par des cellules NK CD11bCD27- (phénotype immature associé à faible activité cytolytique) a été rapportée dans des échantillons de CHC et est associée à un mauvais pronostic.(115) Une expression élevée de NKG2D, récepteur activateur des cellules NK, prédit quant à elle une survie prolongée chez les patients atteints de CCA.(116) Des études précliniques *in vivo* basées sur des perfusions de cellules NK chez des souris portant des xénogreffes de CCA ont quant à elles démontré un important effet antitumoral.(117)

### **Lymphocytes immunosuppresseurs**

Les lymphocytes T régulateurs (Treg), de phénotype CD4+CD25+FoxP3+ ont des fonctions immunosuppressives et sont capables d'inhiber les fonctions des cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes T CD4, et CD8, lymphocyte B) et inné (macrophages, cellules dendritiques, cellules NK).(118) Leurs mécanismes d'action sont multiples et impliquent soit un contact direct avec la cellule présentatrice d'antigène ou le lymphocyte T effecteur soit la production de cytokines immunosuppressives comme le TGF- $\beta$  et l'IL10 (**Figure 12**).(118,119)

Dans les tumeurs hépatiques malignes, l'accumulation intratumorale de Treg est associée à un dysfonctionnement des lymphocytes T CD8+, et à des taux élevés de récurrence après résection chirurgicale pour CHC ou CCA.(120,121) Le TGF- $\beta$  a été impliqué dans la prolifération et la différenciation de Treg et il a été montré dans un modèle murin de CHC que son inhibition par un inhibiteur spécifique était capable d'induire une régression tumorale.(122)



**Figure 12. Interactions entre les cellules immunitaires (cellule T cytotoxique, T régulatrice, cellule NK ) et les cellules tumorales dans le cancer du foie.** Les cellules T cytotoxiques et les NK sont des populations antitumorales majeures tandis que les cellules T régulatrices favorisent l'échappement immunitaire. Les cellules T régulatrices inhibent les cellules T cytotoxiques en libérant des molécules suppressives telles que IL35, IL10, et d'autre part inhibent les cellules NK en libérant du TGF- $\beta$ .

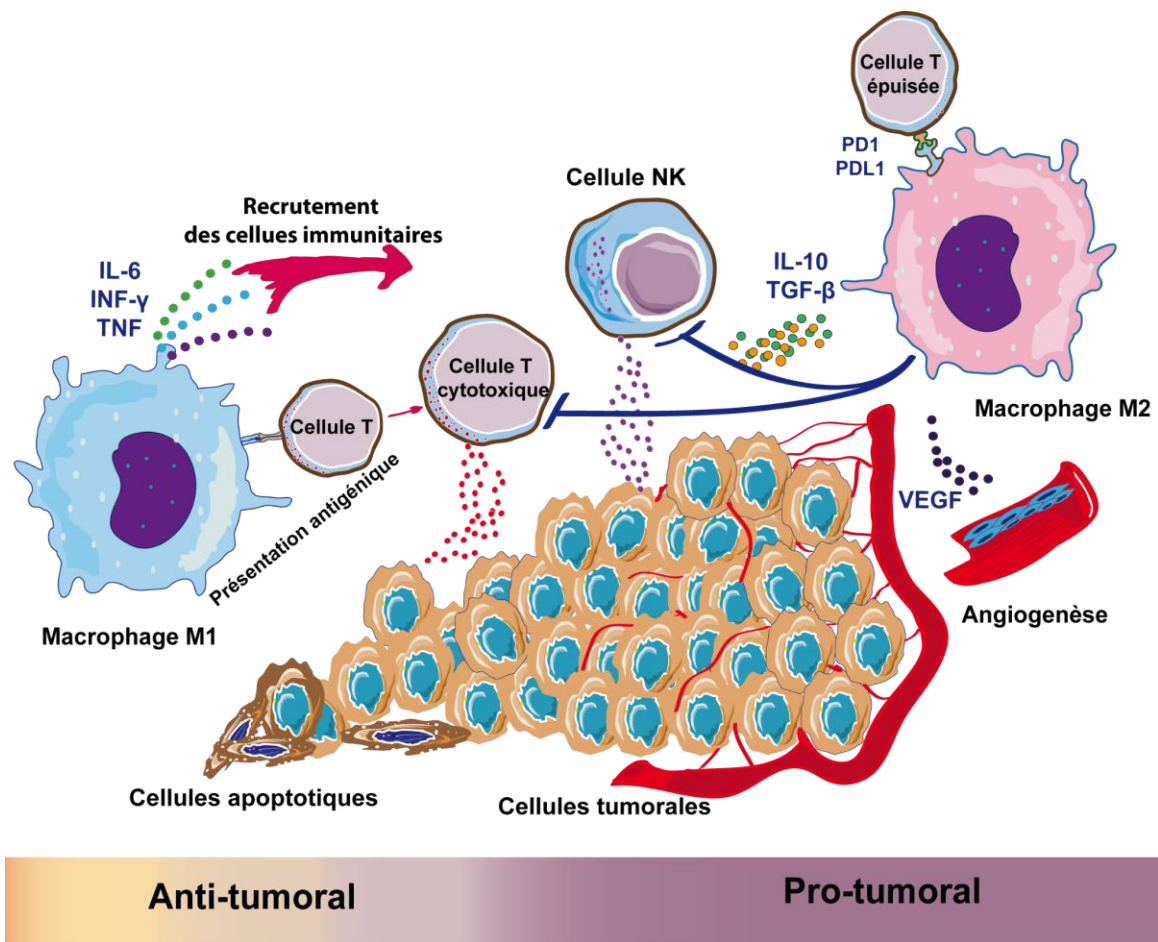
### Macrophages

Les cellules de Kupffer sont les macrophages propres du foie. Ce sont des phagocytes résidant dans la lumière des capillaires sinusoides ainsi qu'aux intersections de leurs ramifications. Ils sont au contact direct des cellules endothéliales. Ils sont impliqués dans le métabolisme de divers composés ainsi que dans les réponses immunologiques et inflammatoires. Suite à leur activation par des signaux de danger, les cellules de Kupffer modulent l'inflammation et recrutent diverses cellules immunitaires.(123)

Au sein des tumeurs, les macrophages présentent une plasticité particulière leur permettant d'adopter un profil pro ou anti-tumoral. Cette polarisation dépend du milieu cytokinique dans lequel évolue la cellule. Deux grands sous types de macrophage sont ainsi distingués: les macrophages M1 et les macrophages M2. Ces deux profils cellulaires diffèrent par leurs récepteurs membranaires, les cytokines qu'ils produisent et leurs fonctions. Les macrophages M1 sont stimulés par des produits microbiens comme les lipopolysaccharides ou des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF), et sécrètent en retour de nombreuses cytokines également pro-inflammatoires (IL1, IL6, et TNF $\alpha$  notamment).(124)

Les macrophages M2 sont induits par les cytokines Th2, IL4, IL10, IL13 et les glucocorticoïdes. Ils expriment PD-L1 et l'IL10, qui sont des molécules fortement immunosuppressives et anti-inflammatoires.(125) Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont majoritairement polarisés M2 et sont des modulateurs importants du microenvironnement tumoral.(126,127)

Alors que les macrophages M1 ont la capacité d'inhiber la carcinogénèse à des stades précoces en éliminant les cellules transformées, les macrophages M2 favorisent quant à eux la progression tumorale grâce à leur fonctions immunosuppressives et pro-angiogéniques (**Figure 13**).(122) Une infiltration importante en macrophage M2 est ainsi corrélée à un mauvais pronostic dans le CHC et le CCA.(126,128) Des approches thérapeutiques basées sur l'inhibition des macrophages M2 sont actuellement envisagées.(127)



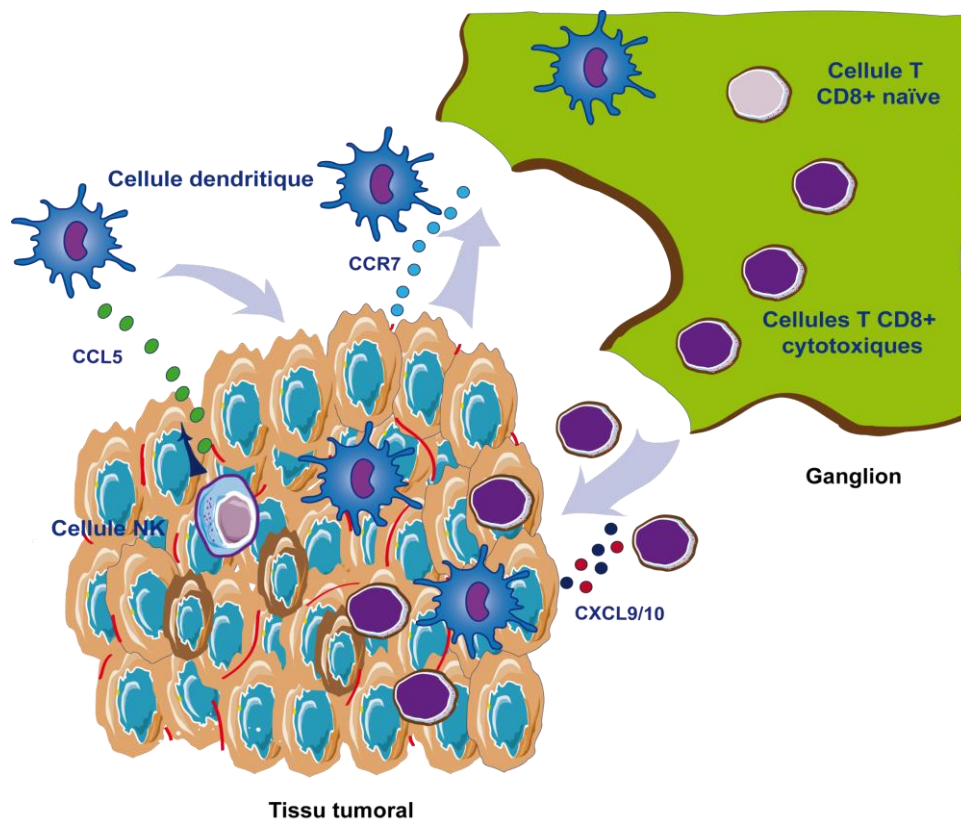
**Figure 13.** Les macrophages M1 exercent un rôle anti tumoral en présentant des antigènes aux cellules T. Elles recrutent des cellules immunitaires en produisant de l'IL6, du TNF- $\gamma$  et du TNF. En revanche, les M2 favorisent la croissance tumorale en sécrétant des molécules immunosuppressives (IL10, TGF- $\beta$ ) et inhibent l'activation et la prolifération des cellules T via le point de contrôle immunitaire PD1-PDL1. Ils favorisent également l'angiogenèse en libérant du VEGF.

### Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules immunitaires présentes dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Elles possèdent des expansions cytoplasmiques appelées dendrites et ont deux origines possibles (myéloïde ou lymphoïde). Elles présentent, comme les macrophages, des fonctions d'endocytose et de phagocytose et une de leur principale fonction est la présentation antigénique.(128)

Au cours d'une réponse immunitaire, les CD recrutées in situ par différentes chemokines sécrétées par les cellules immunitaires comme les cellules NK notamment. Elles internalisent les néoantigènes, puis migrent, sous l'influence de différents facteurs (CCR7, CCL21, CCL21), jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires et activent les lymphocytes T. Elles jouent ainsi un rôle principal dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative (**Figure 14**). (129,130)

Il a été montré que, dans le CCA et le CHC, la densité de cellules dendritiques CD83+ au niveau de la marge d'invasion tumorale était corrélée à une infiltration importante intra tumorale par des lymphocytes T et à un meilleur pronostic. (131,132) Il existe un sous-groupe de cellules dendritiques, les CD dites "plasmacytoïdes", qui exercent une fonction immunosuppressive en stimulant la production des IL10 par les Treg. (133)



**Figure 14. Rôle antitumoral des cellules dendritiques:** Les CD sont recrutées au niveau du tissu tumoral par les cellules NK grâce à la production de CCL5, et migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes T. Elles libèrent également les molécules CXCL9/10 pour recruter des lymphocytes T activées vers le tissu tumoral.

## **Lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont des cellules de la réponse immunitaire adaptative humorale.(134,135) Il existe différents mécanismes par lesquels les anticorps spécifiques des antigènes tumoraux induisent la mort des cellules tumorales. Le mécanisme principal est appelé cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody dependant cell cytotoxicity).(136,137)

L'impact pronostique des cellules B dans les tumeurs solides humaines reste discuté. Certaines études ont montré qu'une forte densité en cellules B était associée à un meilleur pronostic (cancer du sein, du poumon, de l'ovaire et mélanome).(138,139) Un certain sous type de lymphocytes B pourraient cependant exercer fonction immunosuppressive par la production d'IL10 et de TGF-  $\beta$ .(135,140,141)

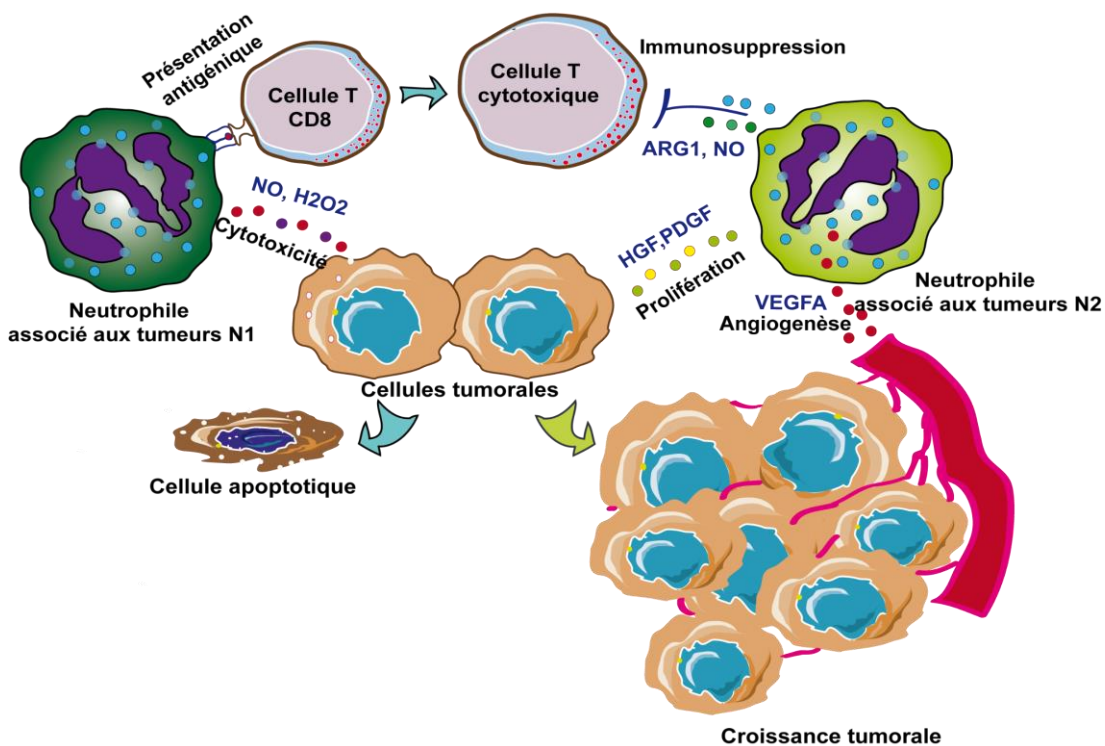
Dans les cancers du foie, l'infiltration intratumorale par des lymphocytes B est corrélée à un pronostic favorable que ce soit pour le CHC ou le CCA.(142,143) Néanmoins, un sous-groupe de cellules B exprimant PD-1 ont capables de favoriser la progression du CHC.(144) Des travaux récents ont mis que les structures lymphoïdes tertiaires (SLT), qui sont des agrégats de cellules immunitaires comportant notamment des lymphocytes B et des cellules dendritiques, reflétaient la présence d'une réponse immune anti tumorale effective et étaient associées à un très bon pronostic.(145)

## **Les polynucléaires neutrophiles**

Les polynucléaires neutrophiles (PN) jouent un rôle essentiel dans les défenses contre les infections par l'activation et la régulation de l'immunité innée et adaptative. Dans le cancer, les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) peuvent exercer des fonctions anti- (TAN de types N1) ou pro-(TAN de types N2) tumorales (**Figure 15**).(146,147) Les mécanismes de polarisation des TAN sont peu connus. Certains auteurs ont montré que les TAN sont polarisés en type N1 suite à l'exposition aux IFN de type I, tandis que TGF-  $\beta$  favoriserait la polarisation de type N2.(148,149) L'existence de ces deux sous types reste controversée et certains auteurs suggèrent que la

polarisation des neutrophiles ne serait qu'un reflet du spectre d'activation de ces cellules et non deux profils réellement distincts.(150)

Les TAN N1 exercent leur rôle anti tumoral en libérant des molécules (NO et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui entraînent l'apoptose des cellules tumorales. Elles pourraient d'autre part favoriser l'activation des cellules T cytotoxiques en stimulant la présentation antigénique (**Figure 12**). Les TAN N2 sont impliqués dans la promotion de la prolifération tumorale et l'angiogenèse notamment via la production de FGF22, d'HGF et de VEGF.(146) Dans le CHC, il a été montré que les TAN N2 pouvaient recruter des lymphocytes T régulateurs (Treg) dans le milieu intra tumoral, et ainsi stimuler les mécanismes d'échappement immunitaire.(151) La surexpression de PD-L1 dans les TAN contribue également à l'immunosuppression en inhibant l'activation des lymphocytes T (**Figure 15**). (152)



**Figure 15. Les neutrophiles associées aux tumeurs (TAN) et le microenvironnement immunitaire.** Les TAN N1 tuent directement les cellules tumorales en libérant des molécules pro-apoptotiques comme NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elles stimulent les cellules T CD8<sup>+</sup> en présentant les antigènes. En revanche, les TAN N2 favorisent la croissance tumorale en induisant la prolifération de cellules tumorales par la production d'HGF et de PDGF. Ils favorisent l'angiogenèse en sécrétant le VEGF et inhibent les cellules T cytotoxiques via des molécules immunosuppressives comme l'Arginase 1 (ARG1).

Le microenvironnement immunitaire du cancer du foie est un système complexe et très dynamique qui comprend des interactions entre les cellules tumorales, les cellules immunitaires, et les autres cellules du stroma via les cytokines/chimiokines et leurs récepteurs respectifs. Dans ce système, les cellules T cytotoxiques, les cellules NK, les macrophages M1, et les CD sont considérées comme les cellules anti-tumorales essentielles, tandis que les lymphocytes T régulateurs, les macrophages M2, et les neutrophiles N2 jouent un rôle pro-tumoral. Une même population cellulaire immunitaire peut également avoir des effets contraires et ainsi exercer des fonctions immunitaires à la fois pro et anti-tumorales.

La caractérisation du microenvironnement immunitaire des cancers du foie est donc indispensable pour mieux comprendre les mécanismes de progression tumorale et permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment pour les patients atteints de maladie de stades avancé.

### **Immunothérapie et cancers primitifs hépatiques**

L'immunothérapie, a été développée pour lutter contre les maladies cancéreuses en stimulant le système immunitaire sans directement cibler la tumeur. Parmi ces approches, les inhibiteurs des molécules de points de contrôle immunitaire tel que les inhibiteurs de PD1/PDL1 ou CTLA4, ont montré une importante efficacité dans plusieurs types de cancer.(98,100,101) Ces thérapies ont été fait l'objet de différents essais cliniques pour les patients atteints de cancer du foie.

Dans l'essai de phase III CheckMate 459 comparant, en première ligne, le nivolumab (anticorps monoclonal anti-PD1) au sorafenib (traitement de référence) chez 743 patients, médiane de survie était supérieure chez les patients traités par nivolumab cependant la différence n'était pas significaitve (survie médiane 16,4 contre 14,7 mois, HR 0,85 ; P=0,07).(153)

Un autre essai a testé la combinaison de l'atezolizumab (anticoprps monoclonal anti PDL1) et du bevacizumab (anti-angiogénique), et cette approche était associée à une survie prolongée en comparaison avec le sorafenib (19,2 mois vs 13,4 mois). C'est désormais le traitement de référence.(58,154)



D'autres combinaisons sont actuellement en cours d'investigation, comme l'association d'anti CTLA4 et d'anti PDL1. Les résultats ne sont pas encore publiés.(154) Concernant le cholangiocarcinome, des essais d'immunothérapie de phase I/II sur de faibles nombres de patients ont été réalisés, mais les données restent encore limitées.(155,156) Un essai a cependant récemment mis en évidence que l'association de molécules immunomodulatrices à la chimiothérapie conventionnelle entraînait une augmentation significative de la survie par rapport au traitement par chimiothérapie seule.(157) Un essai prometteur combinant le pembrolizumab (anti-PD-L1), le gemcitabine et le cisplatine (KEYNOTE-966) est en cours.(158) Pour les tumeurs mixtes, aucune étude n'a été publiée à ce jour.

## 2 Contexte

### **1<sup>ère</sup> partie : Modifications du microenvironnement immunitaire intra-hépatique après traitement du virus de l'hépatite C (VHC) par antiviraux à action directe**

Le rôle des médicaments antiviraux à action directe dans le traitement contre le virus de l'hépatite C est bien connu, avec une efficacité très élevée et une bonne tolérance. Cependant certaines études ont alerté une possible augmentation du risque de récurrence ou de survenue du CHC chez les patients qui ont bénéficié de ces traitements.

Parmi les hypothèses soulevées afin d'expliquer un effet du traitement par AAD sur l'histoire naturelle du CHC chez les patients infectés par VHC, celle d'une modification qualitative et quantitative du microenvironnement intrahépatique paraissait la plus plausible quand j'ai commencé mes travaux. Ces modifications pourraient en effet entraîner une diminution des mécanismes d'immunosurveillance antitumorales. Pour vérifier cette hypothèse, la première partie de mon projet a donc été d'analyser le profil immunitaire intrahépatique après traitement par AAD.

## **2<sup>ème</sup> partie : Microenvironnement immunitaire des tumeurs mixtes de type hépatocholangiocarcinome.**

Les tumeurs mixtes de type hépatocholangiocarcinome (CHC-CCA) représentent moins 5% des tumeurs primitives malignes hépatiques et leur pronostic est très sombre. Leur diagnostic s'établit le plus souvent aux stade avancés et il n'existe actuellement pas de traitement systémique pour ce type de cancer.

Si l'aspect du microenvironnement immunitaire intratumoral du CHC et CCA a été relativement bien étudié, il n'existe que très peu de données sur le rôle du microenvironnement immunitaire dans le CHC-CCA. Ainsi, l'objectif de la seconde partie de ma thèse a été de caractériser le profil immunitaire de ce cancer et déterminer son impact sur son pronostic.

### **3 Résultats**

#### **ARTICLE 1**



# Intrahepatic immune changes after hepatitis c virus eradication by direct-acting antiviral therapy

Giuliana Amaddeo<sup>1,2,3</sup> | Cong Trung Nguyen<sup>1,2</sup> | Pascale Maillé<sup>1,2,4</sup> | Sebastien Mulé<sup>1,2,5</sup> | Alain Luciani<sup>1,2,5</sup> | Camilia Machou<sup>1,2</sup> | Aurélie Rodrigues<sup>1,2</sup> | Hélène Regnault<sup>3</sup> | Ariane Mallat<sup>2,3</sup> | Alexis Laurent<sup>2,6</sup> | Fouad Lafdil<sup>1,2</sup> | Christophe Hézode<sup>1,2,3</sup> | Jean-Michel Pawlotsky<sup>1,2,7</sup> | Julien Calderaro<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>INSERM U955, Team 18, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France

<sup>2</sup>Université Paris-Est Créteil, Créteil, France

<sup>3</sup>APHP, Groupe Hospitalier Henri Mondor, Service d'Hépatologie, Créteil, France

<sup>4</sup>APHP, Groupe Hospitalier Henri Mondor, Département de Pathologie, Créteil, France

<sup>5</sup>APHP, Groupe Hospitalier Henri Mondor, Service d'Imagerie Médicale, Créteil, France

<sup>6</sup>APHP, Groupe Hospitalier Henri Mondor, Service de Chirurgie Digestive et Hépatobiliaire, Créteil, France

<sup>7</sup>APHP, Groupe Hospitalier Henri Mondor, Service de Virologie, Bactériologie-Hygiène, Mycologie-Parasitologie et unité Transversale de Traitement des Infections, Centre National de Référence des Hépatites Virales B, C et Delta, Créteil, France

Correspondence: Julien Calderaro, Département de Pathologie-Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France. Email: julien.calderaro@aphp.fr

Handling Editor: Gabriele Missale

## Abstract

**Background & aims:** The recent approval of direct acting anti-virals (DAA) has dramatically changed the landscape of hepatitis C virus (HCV) therapy. Whether viral clearance could promote liver carcinogenesis is debated. It has been hypothesized that changes in intrahepatic immune surveillance following viral cure could favour tumour growth.

This study aimed at characterizing the intrahepatic immune changes induced by HCV cure following DAA therapy.

**Methods:** Patients with compensated cirrhosis who underwent surgical resection for hepatocellular carcinoma (HCC) after sustained virological response (SVR) to DAA therapy were included. A control group of untreated HCV-infected patients with compensated cirrhosis was selected. RNA was extracted from tumoral and non-tumoral tissues and analysed using the Nanostring Immuno-Oncology-360 panel. Immune cells were quantified by immunohistochemistry.

**Results:** Twenty patients were included: 10 patients with a DAA-induced SVR and 10 untreated controls. All of them had a de novo BCLC 0/A HCC. Non-tumoral tissue profiling showed down-regulation of interferon-related genes (including *MX1*, *ISG15* and *IFIT1*) after DAA therapy. No other differences in immune profiles/immune cell densities were identified between the two groups. The intra-tumoral immune profiles of HCCs that occurred after DAA therapy were not qualitatively or quantitatively different from those of tumours occurring in untreated patients.

**Conclusion:** In conclusion, removal of HCV infection after DAA-based therapy results only in a down-regulation of interferon-stimulated genes in non-tumoral tissues from patients with cirrhosis who develop HCC. These minor changes in the liver immune microenvironment are unlikely to favour HCC occurrence or recurrence after DAA-induced SVR.

## KEYWORDS

direct acting antivirals, hepatitis c virus, hepatocellular carcinoma, immunity

Abbreviations: AFP, alpha-feto protein; BCLC, barcelona clinic of liver cancer; DAA, direct acting antivirals; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; PCA, principal component analysis; SVR, sustained virological response.

Amaddeo and Nguyen co-first authors.

## 1 | INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is one of the main causes of chronic liver disease worldwide.<sup>1</sup> HCV infection induces a chronic intrahepatic inflammatory state that may ultimately result in cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC).

Chronic HCV infection is associated with complex intrahepatic immune response patterns, characterized by the presence of different cell types involved in both innate and adaptive immunity.<sup>2-5</sup> HCV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells are thought to be a key player in host defence against the virus, as they have the ability to inhibit viral replication through both cytolytic and non-cytolytic mechanisms.<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells promote CD8<sup>+</sup> T-cells priming and effector functions, and Natural Killer (NK) and/or NK T-cells may also display antiviral activity by sensing and killing infected hepatocytes.<sup>6</sup> Other cell types, such as regulatory T-cells, are also involved in the intrahepatic immune homeostasis.<sup>6</sup>

The recent approval of direct acting anti-virals (DAAs) has drastically changed the landscape of HCV therapy. Indeed, sustained virological response (SVR), that corresponds to a definitive cure of the HCV infection, is now achieved in the vast majority of patients, including those with advanced liver disease and/or extra-hepatic manifestations, regardless of their HCV genotype.<sup>1,7,8</sup> Several countries are now aiming for HCV eradication, and the initial restrictions in DAA prescriptions are progressively removed.<sup>9</sup>

Although this success is considered a major breakthrough, there have been several alarming retrospective reports of increased incidence/recurrence of HCC in patients who achieved SVR with oral DAAs.<sup>10-13</sup> This hypothesis is however being currently invalidated by recent large-scale studies, some of which included prospective cohorts of treated patients.<sup>14-27</sup>

To explain a possible increase in HCC incidence and/or recurrence after successful DAA-based therapy, it has been hypothesized that removing HCV infection could induce major changes in the intrahepatic immune environment that would alter its ability to control and eliminate preneoplastic or neoplastic cells, that is, impact local anti-tumour surveillance.<sup>28-30</sup>

However, there is so far no data on tumour and non-tumour liver tissue samples after DAA therapy to fuel this hypothesis.

The aim of our study was to characterize the changes in the liver immune microenvironment induced by HCV cure following DAA therapy, in order to determine whether the SVR creates an environment favourable to tumour growth and progression.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Patients and samples

Patients with compensated cirrhosis and HCV infection cured by DAA-based therapy who underwent surgical resection for de novo HCC at Henri Mondor University Hospital between January 2015 and July 2018 were included. Surgical resection was chosen as an inclusion criterion in order to obtain tumoral and non-tumoral tissues

### Key points

Direct acting anti-virals have dramatically changed the landscape of HCV therapy, with sustained virological responses obtained in the vast majority of patients. We show in the present study that, despite viral eradication, intrahepatic inflammation and immune responses persist after treatment.

in sufficient amount for gene expression profiling and immunohistochemical analyses. The control group consisted of HCV-infected, untreated cirrhotic patients who underwent resection for HCC.

The study was approved by an institutional review board (CPP Ile de France 3).

Stringent inclusion criteria were applied in order to obtain a homogeneous series of patients and samples: (a) HCV as the sole risk factor of liver disease, (b) treatment by DAAs and SVR achieved before surgery (undetectable HCV RNA in serum 12 weeks after treatment completion) or no antiviral treatment and presence of HCV RNA in serum for the control arm, (c) compensated cirrhosis, (d) Barcelona Clinic of Liver Cancer (BCLC) score 0/A HCC, and (e) lack of anti-tumour treatment before surgery. The flow chart of the study is shown in Figure 1.

The following clinical and biological parameters were systematically recorded: age, gender, bilirubin, transaminases and alpha-feto protein (AFP) serum level.

Histological slides of surgical specimens were reviewed by two pathologists to assess non-tumoral (fibrosis, necroinflammatory activity according to the METAVIR staging system, steatosis) and tumoral (tumour size, differentiation, vascular invasion, satellite nodules, HCC histological subtypes) tissues.<sup>31,32</sup>

### 2.2 | RNA extraction

Five  $\mu$ m-thick sections were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks. Tumoral and non-tumoral areas were macrodissected after pathological reviewing of the corresponding haematoxylin-and-eosin slides, and mRNA was further extracted using a commercial kit (Ambion RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE, ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions.

RNA were quantified using a Qubit RNA assay (Invitrogen).

### 2.3 | Gene expression profiling

The Nanostring Immuno-Oncology 360 panel (NanoString Technologies, Seattle, Washington) was used to characterize the expression profiles of more than 700 genes including genes involved in the intrahepatic immune microenvironment and anti-tumoral immune responses.

Total RNA extracted from the formalin-fixed, paraffin-embedded samples was used as a template. A human Universal Reference RNA composed of 10 cell lines (Universal Reference RNAs, ref 740000,

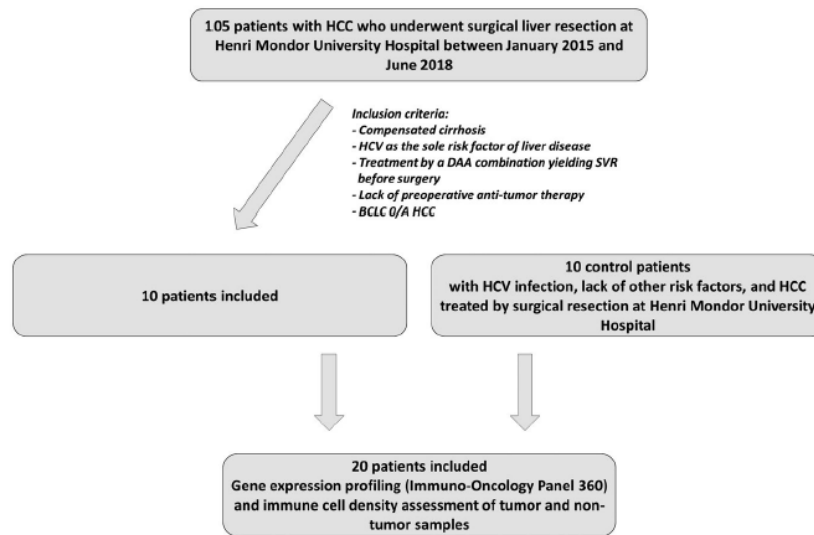


FIGURE 1 Flowchart of the study

Agilent, Santa Clara, CA, USA) and a no-template control (water) were also hybridized in parallel of samples of interest. All total RNAs were monitored to ensure their quality, purity and integrity by performing an electrophoresis on Agilent 2100 Bioanalyzer with Pico assays (Agilent).

Before hybridization, Nanostring positive and negative controls were also added to samples as spike in controls. Probes and mRNAs were hybridized overnight at 65°C. Hybridized samples were further processed on the NanoString nCounter preparation station (NanoString Technologies) to remove probes in excess and immobilize biotinylated hybrids on a cartridge coated with streptavidin. Cartridges were scanned at maximum scan resolution (555 fields of view [FOV]) on the nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) to count individual fluorescent barcodes and quantify RNA molecules. The Nanostring nSolver 4.0 software (NanoString Technologies) was used to control raw data, and to normalize data. Quality control of experiments was performed using nSolver software (NSolver Analysis 4.0, downloaded on November 2018).

## 2.4 | Immunohistochemistry

All immunohistochemical stainings were performed on whole tissue sections (3 µm-thick) from formalin-fixed, paraffin-embedded blocks. Slides were processed on an automated immunostainer (Leica Bond-Max; Leica Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Endogenous peroxidases were blocked using Peroxide Block (Bond Polymer Refine Detection Kit, Leica Biosystems). Antigen retrieval was performed with E1 (pH6) (CD20, CD68) and E2 (pH9) (CD3, CD8) reagents. The following primary antibodies were used: CD3 (Dako, Santa Clara, California, Clone F7.2.38, dilution 1/50), CD8 (Dako, Clone C8/1448, Dilution 1/200), CD20 (Dako, Clone L26, Dilution 1/500) and CD68 (Dako, Clone KP1, Dilution 1/5000). Immunodetection was performed using Polymer and 3,3' di-aminobenzidine (Bond Polymer Refine Detection Kit, Leica Biosystems).

## 2.5 | Quantification of immune cell populations

Slides were scanned using an Aperio device (Leica Biosystems). Tumoral and non-tumoral liver areas were manually annotated by a pathologist (CTN). Files encoded in SVS format were processed using Qupath digital software (<https://qupath.github.io/>). Cell densities of immune cells were expressed as the mean number of positive cells per mm<sup>3</sup>.

Tertiary lymphoid structures (TLS) were counted on haematoxylin-saffron-stained slides, as previously described.<sup>33-35</sup> TLS densities were expressed as the mean number of TLS per mm<sup>2</sup>.

## 2.6 | Statistical analysis

Correlations were assessed using chi square tests for qualitative/categorical features, and with Mann Whitney U tests for quantitative variables.

Statistical analysis of gene expression profiles was performed using Nanostring NSolver Software (NSolver Analysis Software 4.0, downloaded on November 2018) with R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 3.3.2). Files in RCC format were imported and processed using the advanced analysis module. Heatmap data were plotted by z-scores. Expression data were normalized according to that of 10 housekeeping genes (probes selected using the geNorm algorithm: *PUM1*, *SF3A1*, *ERCC3*, *TBP*, *TLK2*, *ABCF1*, *MRPL19*, *STK11IP*, *DNAJC14*, *TMUB2*).<sup>36</sup> Differential expression was analysed using the Optimal method from NSolver Differential Expression module. *p* values were corrected for multiple hypotheses testing using the False Discovery Rate method (Benjamini-Hochberg).

A Principal Components Analysis (PCA) was performed to reduce the dimensionality of gene expression data while minimizing the loss of information. The first two principal components were retained and 2D scatterplots of gene expression profiles projection on the first two principal components were used to visually depict sample clusters according to the viral status.



**TABLE 1** Clinical, biological and pathological features of the patients, the tumours and the non-tumour livers

Variables	Patients treated by DAA	Untreated patients	P-value
<b>Clinical features of the patients</b>			
Age, years (median, range)	61 (52-83)	69 (54-81)	.47
Gender: male	6/10	6/10	1
Bilirubin $\mu\text{mol/L}$ (median, range)	9 (7-24)	13 (9-25)	.40
ASAT UI/L (median, range)	35 (17-136)	56,5 (20-170)	.33
ALAT UI/L (median, range)	39 (26-180)	50 (27-119)	.61
HCV Genotype 1/2/3/4	6/1/1/2	5/1/2/2	.93
Viral load UI/mL (median, range)	945 355 (48 693-4 074 837)	–	–
AFP serum levels, ng/mL (median, range)	17 (2-87)	13 (5-4000)	.53
<b>Pathological features of the tumours</b>			
Tumour size, mm (median, range)	25 (10-50)	26 (15-50)	.78
Poor differentiation	1/10	2/10	.53
Vascular invasion	1/10	6/10	.02
Satellite nodules	1/10	3/10	.26
Macrotrabecular-massive subtype	1/10	3/10	.26
Steatohepatic subtype	2/10	1/10	.53
<b>Pathological features of non-tumour livers</b>			
METAVIR activity score A0/A1/A2	2/8/0	0/8/2	.13
Steatosis >5%	3/10	6/10	.18

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Patients and samples

Ten patients with compensated cirrhosis and HCV infection who achieved SVR after DAA-based therapy and 10 untreated control patients with compensated cirrhosis and HCV infection were included in the study. All underwent liver resection for BCLC 0/A HCC. Their clinical, biological and pathological features are shown in Table 1. Treatment regimens of treated patients were sofosbuvir plus daclatasvir ( $n = 6$ ), sofosbuvir/ledipasvir ( $n = 2$ ), sofosbuvir plus simeprevir ( $n = 1$ ) and ombitasvir/paritaprevir/ritonavir ( $n = 1$ ). Median time between SVR and surgery was 8 months.

There was no statistical difference between the two groups regarding age at surgery, gender, AFP serum levels, tumour differentiation, satellite nodules, histological subtypes and HCC genotype (Table 1). A lower frequency of vascular invasion was identified in tumours from patients treated by DAAs (1/10 vs 6/10,  $P = .02$ ).

Interestingly, a persistent necroinflammatory activity according to the METAVIR scoring system was observed in the majority of patients who achieved SVR after DAA-based therapy (Table 1).

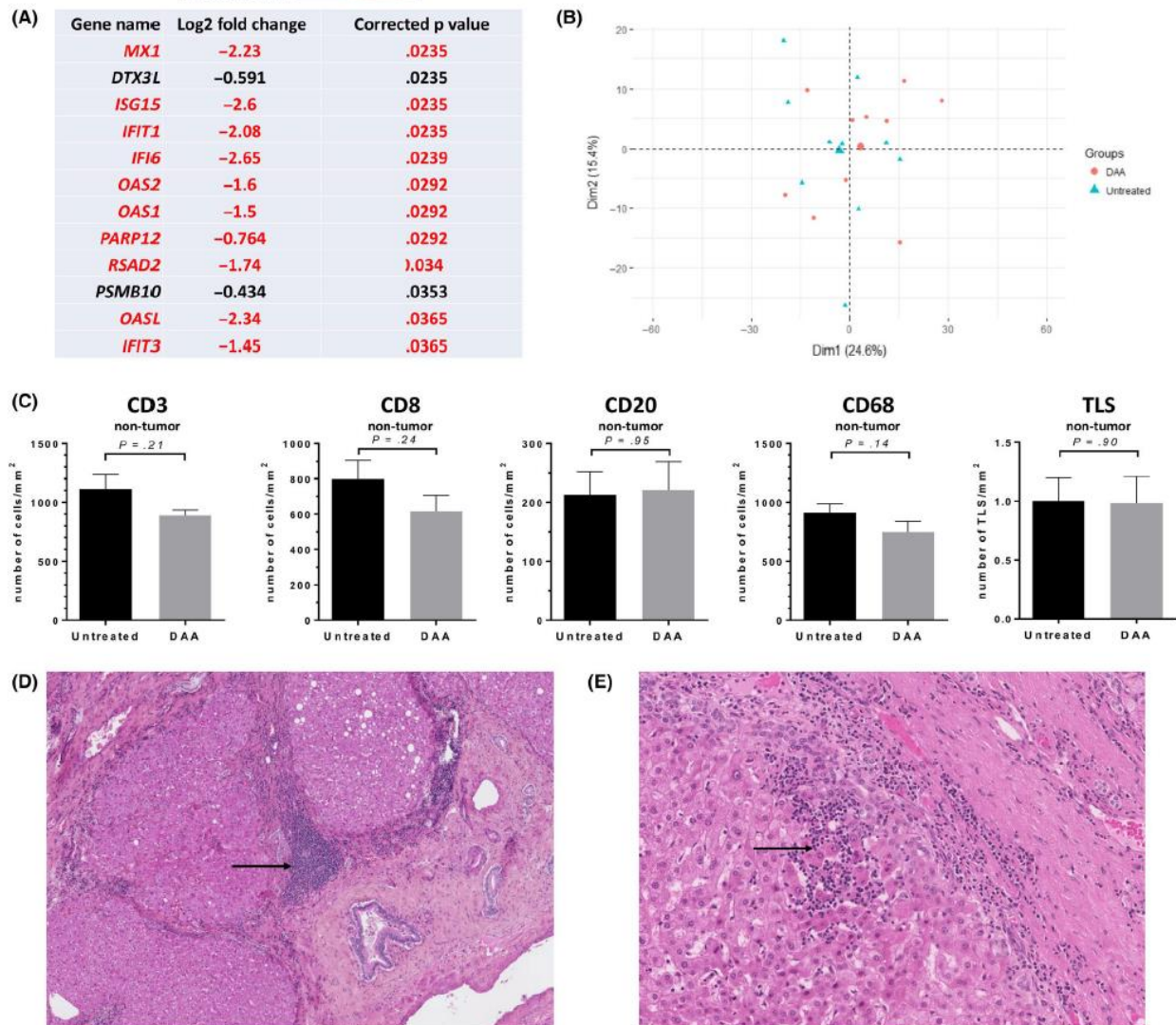
Non-tumoral livers of untreated patients all showed necroinflammatory activity.

#### 3.2 | Gene expression profiling of non-tumoral liver tissues

To determine whether viral eradication is associated with changes in the intrahepatic immune microenvironment, the gene expression profiles of non-tumoral liver tissues from patients with SVR after DAA therapy and from untreated control patients were compared. Twelve genes were significantly down-regulated in HCV-cured patients livers as compared to untreated ones, including 10 genes known to be regulated by interferon: *MX1*,  $P = .02$ ; *DTX3L*,  $P = .02$ ; *ISG15*,  $P = .02$ ; *IFIT1*,  $P = .02$ ; *IFI6*,  $P = .02$ ; *OAS2*,  $P = .03$ ; *OAS1*,  $P = .03$ ; *PARP12*,  $P = .03$ ; *RSAD2*,  $P = .03$ ; *PSMB10*,  $P = .03$ ; *OASL*,  $P = .04$ ; *IFIT3*,  $P = .04$  (Figure 2A). A trend towards down-regulation of other components of the interferon-induced pathway, such as *IRF7* ( $P = .08$ ), was also observed (Table S1).

No other significant changes in gene expression were observed between DAA-treated and untreated patients (Figure 2B). In particular, no differences were observed for genes involved in immune checkpoints (*PDL1*, *PD1*, *CTLA4*, *LAG3*, *HAVCR2*), cytotoxicity (*GZMA*, *GZMB*, *GZML*, *PRF1*), T cell orientation and function (*IFNG*, *IL4*, *IL10*, *IL6*, *IL17A*, *TBX21*, *RORC*, *FOXP3*), NK cells (*NCR1*, *KIR3DL2*, *KIR2DL1*, *KLRB1*), B cells (*CD19*, *CD27*, *CD80*, *IL11*), antigen presentation and processing (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DPA1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DRA*, *TAP1*, *THBS1*) or cytokines and chemokines (*CCL19*, *CCL21*, *CXCL10*, *CXCL13*).





**FIGURE 2** Gene expression profiling and pathological analysis of non-tumoral liver tissues from patients with HCV infection cured after DAA-based treatment and untreated controls. A, Genes significantly down-regulated in non-tumoral liver tissues from DAA-cured patients, as compared to untreated controls. Among the 12 genes identified, 10 were regulated by interferon (highlighted in red). *p* values have been corrected for multiple hypotheses testing using the False Discovery Rate method (Benjamini-Hochberg). B, 2D projection of gene expression profiles on the first two components provided by PCA shows that the samples do not cluster according to the viral status (larger points: mean values of the two components for each group). C, Quantification of immune cell densities showed no significant difference between DAA-cured and untreated control patients. D, Example of persistent tertiary lymphoid structures (arrows) in non-tumoral liver tissue from a patient who achieved SVR after DAA-based treatment (HES, X50). E) Example of residual necroinflammatory activity, characterized by lymphocytic infiltration of cirrhotic nodules (arrows), observed in non-tumoral tissues from patients who achieved SVR after DAA-based treatment (HES, X140). HES, haematin-eosin-saffron; PCA, principal component analysis; TLS, tertiary lymphoid structures

### 3.3 | Immune cell densities in non-tumoral liver tissues

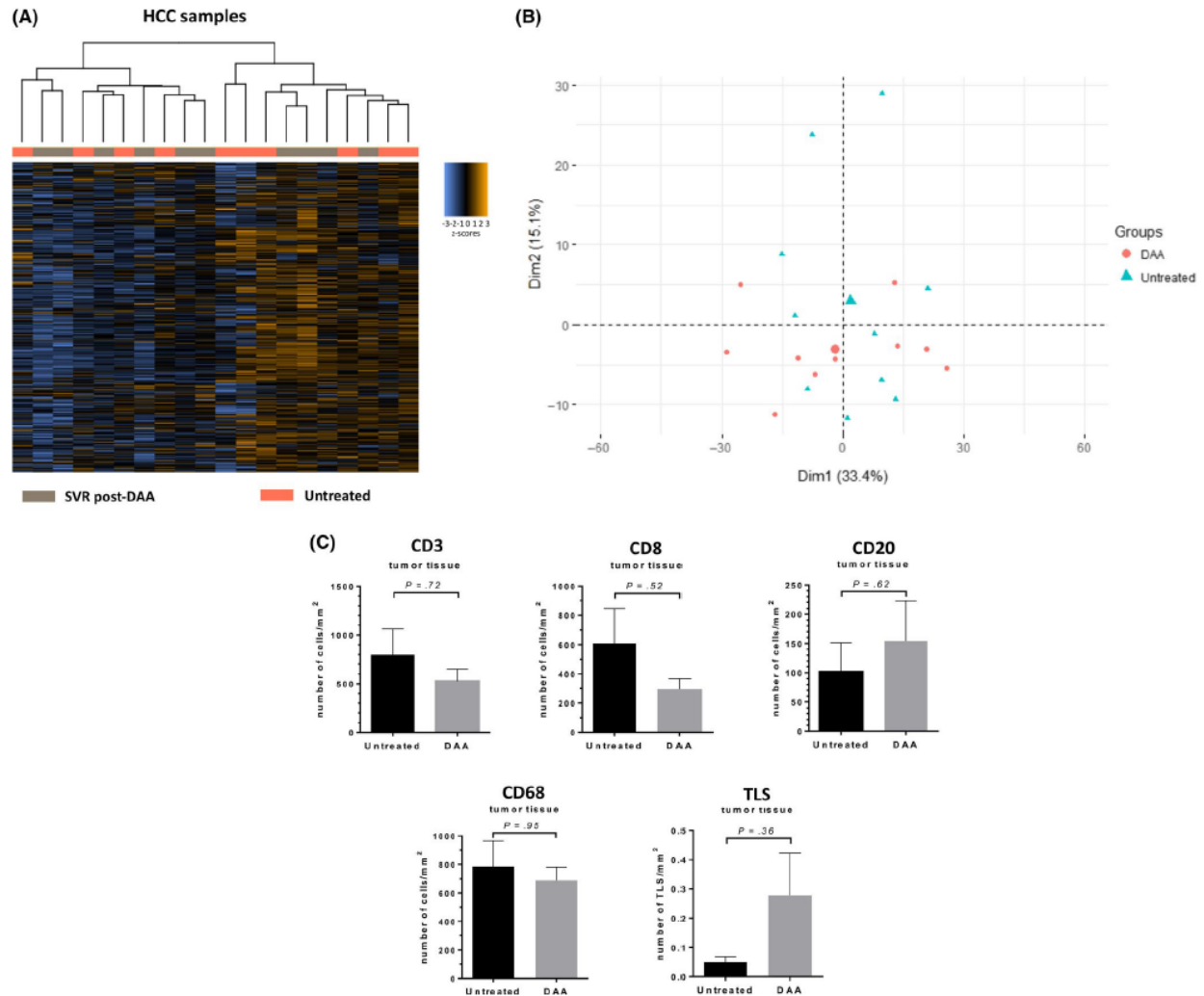
Immunohistochemical stainings against CD3, CD8, CD20 and CD68 were performed in all tissue samples from the two groups and quantified using digital pathology and dedicated software.

As shown in Figure 2C, no statistical difference was found between DAA-treated with SVR and untreated patients respectively. Tertiary lymphoid structures, a hallmark feature of HCV infection,

did not differ in density when comparing patients with SVR and untreated controls (Figure 2D,E).

### 3.4 | Gene expression profiling in tumoral tissues

We further aimed to determine if tumours developed in patients with DAA-induced SVR were characterized by a distinct, immunosuppressive microenvironment.



**FIGURE 3** Intra-tumoral immune microenvironment in patients who achieved SVR after DAA-based therapy and in untreated control patients. A, Unsupervised hierarchical clustering of tumour samples showing the lack of distinct clustering according to the treatment status. B, 2D projection of gene expression profiles on the first two components provided by PCA shows that the samples do not cluster according to the viral status (larger points: mean values of the two components for each group). C, No difference in intra-tumoral immune cells densities was observed, with comparable infiltration by total T cells (CD3), cytotoxic T cells (CD8), B cells (CD20), macrophages (CD68), and tertiary lymphoid structures (mean and standard error of mean). PCA, principal component analysis; TLS, tertiary lymphoid structures

We compared the different gene expression profiles of the tumours and did not find any statistically significant difference patients treated with DAA and untreated patients (Figure 3A,B).

### 3.5 | Immune cell densities in tumoral tissues

All tumours were investigated by immunohistochemistry for quantification of immune cells. A high degree of variability was observed among samples, however no differences in non-tumour or tumour cells densities were observed according to viral status (Figure 3C). We further compared densities of intra-tumoral TLS according to viral status but failed to demonstrate any difference (Figure 3C).

### 3.6 | Gene expression and cell densities in tumours compared to non-tumoral tissues

We further analysed the variations in gene expression/immune densities in tumours compared to adjacent cirrhotic tissues. In treated patients, we observed in HCC samples upregulation of genes involved in cell proliferation and survival (including *SPP1*, *RRM2*, and *MET*) (Table S2). Analysis of cell densities showed a decrease in intra-tumoral CD3+ lymphocytes, CD8+ lymphocytes and TLS densities compared to the adjacent liver ( $P = .048$  and  $P = .009$  respectively) (Figure S1). Tumour samples of untreated patients also showed over-expression of genes regulating cell proliferation and division (*BIRC5*, *SPP1*, *CCNB1*, *MKI67*, *RRM2* and *CCNE1*) (Table S3). Regarding cell



densities, we observed decreased densities for B cells and TLS in tumours compared with the corresponding non-tumoral tissues (Figure S2). No differences in T cells were identified.

## 4 | DISCUSSION

The approval of DAA combinations yielding excellent safety profiles and very high rates of SVR has revolutionized the treatment of patients with chronic HCV infection. However, retrospective, monocentric studies have reported increased rates of HCC recurrence and/or occurrence in cirrhotic patients achieving SVR after DAA-based therapy as compared to patients with SVR achieved on interferon-based treatment. Large-scale studies have however contradicted these observations and it is now widely considered that the use of DAA does not favour HCC development.<sup>15-24</sup>

It has been hypothesized that SVR could be associated with qualitative and/or quantitative changes in the immune microenvironment that may impair anti-tumour immune surveillance and favour neoplastic cells growth.

Changes in white blood cell counts or serum levels of various cytokines have been reported after DAA therapy. Increased peripheral amounts of CD4+ and CD8+ T-cells have been observed within the first 1-2 weeks of treatment, with a reduced proportion of activated cells.<sup>37</sup> These authors speculated that these cells could have left the liver and lost their activation status as a result of viral eradication.

HCV infection is known to induce both innate and adaptive responses. Innate immunity, the first defence against infections, is supported by interferons and triggers non specific antiviral responses. Adaptive immunity develops within weeks and comprises both cellular (CD8+ cells) and humoral (plasma cells) responses.

In the present study, we first show by pathological reviewing the presence of a residual necrotico-inflammatory activity in the majority (8/10) of patients who achieved SVR. This finding is consistent with the recent study by Putra et al, who performed a histological analysis of a series of liver explants of patients treated by DAAs.<sup>38</sup> Indeed, they also observed features of disease activity with persistent portal inflammation and interface hepatitis.<sup>38</sup>

The triggers of this persisting necrotico-inflammatory activity remain to be identified. Interestingly, two recent studies have showed that epigenetic alterations induced by HCV infection are not reverted after SVR.<sup>39,40</sup> They were also associated with global gene expression dysregulations and we hypothesize that they may contribute, at least in part, to our pathological findings.

Our gene profiling and immune cell density analyses in non-tumoral and tumoral tissue samples from treated and untreated patients showed very minor differences between these two groups. In particular, genes possibly involved in hepatocarcinogenesis did not differ in their expression. The main difference between DAA-cured and untreated patients was the down-regulation, in the non-tumoral liver, of a number of interferon-regulated genes. This result is in keeping with a previous assessment of liver biopsies from 8 patients

treated with DAA.<sup>41</sup> A decrease in the expression of interferon-stimulated genes has also been previously reported after treatment in peripheral blood mononuclear cells.<sup>42</sup>

Innate immunity, especially type I interferons, are known to mediate anti-tumour effects against several neoplasms.<sup>43</sup> Interferons are also known to be involved in cancer immunosurveillance/immunoediting, which consists in the elimination of pre-malignant/malignant cells by the immune system.<sup>44</sup> For example, tissue-specific deletion of *IFNAR1* from intestinal cells results in an increased tumour burden in mice treated by colitis inducing agents.<sup>45</sup> Type I Interferons also support the activity of cytotoxic T cells by promoting perforin 1 and granzyme B expression and can inactivate the suppressive function of regulatory T-cells.<sup>46,47</sup> Moreover, they have been shown to promote cross-priming of antigens by dendritic cells.<sup>48,49</sup>

Removal of interferon responses resulting from HCV cure might explain that some cirrhotic patients already harbouring tumoral cells in their liver at the time of DAA therapy more rapidly developed overt HCC than if they had been treated with interferon alpha. This might contribute to the recent observations of HCV recurrence after DAA-based therapy. In contrast, in keeping with gene expression data, there was no decrease of the density of any of the immune cell subtypes investigated. Overall, it has now been clearly demonstrated by large-scale studies that DAA treatment and the resulting SVR prevents the occurrence of HCC in patients without cirrhosis and more dramatically in patients with cirrhosis.<sup>15</sup>

Our gene expression profiling and pathological data support the lack of pro-carcinogenic effect of DAA therapy.

Interestingly, we also did not observe any difference in immunoprofile or immune cell infiltration of the tumoral samples.

The present study is, to the best of our knowledge, the first molecular and immune study performed in livers from patients who achieved SVR after DAA-based treatment and who developed HCC. One of the main limitations of our study is the relatively low number of cases investigated. We acknowledge that we may therefore lack statistical power to identify more subtle changes. However, our findings do not support the hypothesis of a massive and rapid pro-carcinogenic modulation of the intrahepatic immune microenvironment after viral eradication. High-throughput approaches, such as RNA-sequencing, will be required to identify potential alterations that may involve other biological pathways than those related to immunity. Larger number of patients are needed to determine if immune modulations are related to the time between SVR and surgery, and our observations regarding the cell densities modulations between tumour and adjacent non-tumoral liver (decrease in T cells for treated patients and in B cells for untreated patients) also require further validation.

In conclusion, this study based on careful pathological examination and gene expression profiling showed that viral eradication after DAA-based therapy is associated with persistent liver necroinflammation and down-regulation of interferon-regulated pathways, in the absence of any other alteration of the immune

microenvironment. Thus, DAA therapy is unlikely to increase the incidence of HCC after achieving SVR in patients with cirrhosis. On the contrary, recent large-scale trials demonstrate the effectiveness of DAA treatment in reducing HCC incidence, especially in this group of patients with advanced liver disease.

### CONFLICT OF INTERESTS

Pr Pawlotsky has received research grants from Abbott and Abbvie. He has acted as an advisor for Abbott, Abbvie, Gilead, Merck and Siemens Healthcare and a speaker for Abbott, Abbvie and Gilead. Dr Hezode advises for and is on the speakers bureau for AbbVie, Bristol-Myers Squibb, Gilead, and Merck. Dr Calderaro has received fees from Abbvie and research grants from Bristol-Myers Squibb. Dr Amaddeo has received fees from Abbvie.

### AUTHORS CONTRIBUTIONS

JC and GA involved in study design. GA, CTN, PM, AL, CM, AR, HR, AL, AM and SM involved in acquisition of data. GA, CTN, PM, JC and SM contributed to analysis of data. GA and JC drafted the manuscript. All authors contributed to the critical revision of the manuscript.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Audrey Rapinat, David Gentien and Laure Villoing-Gaude (Institut Curie), Tissutheque/Plateforme des Ressources Biologiques of Henri Mondor University Hospital, and all physicians from Hepatology, Liver Surgery and Virology departments.

### ORCID

Christophe Hézode  <https://orcid.org/0000-0002-6762-8033>

Julien Calderaro  <https://orcid.org/0000-0002-5370-0807>

### REFERENCES

- Manns MP, Buti M, Gane ED, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17006. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>.
- Knolle PA, Thimme R. Hepatic immune regulation and its involvement in viral hepatitis infection. *Gastroenterology*. 2014;146:1193-1207. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.036>.
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:215-229. <https://doi.org/10.1038/nri1573>.
- Horner SM, Gale M Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med*. 2013;19:879-888. <https://doi.org/10.1038/nm.3253>.
- Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*. 2009;119:1745-1754. <https://doi.org/10.1172/JCI39133>.
- Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*. 2014;61:S14-25. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.035>.
- van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA*. 2012;308:2584-2593. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.144878>.
- Pawlotsky JM. New hepatitis C therapies: the toolbox, strategies, and challenges. *Gastroenterology*. 2014;146:1176-1192. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.03.003>.
- Marshall AD, Pawlotsky J-M, Lazarus JV, Aghemo A, Dore GJ, Grebely J. The removal of DAA restrictions in Europe - One step closer to eliminating HCV as a major public health threat. *J Hepatol*. 2018;69:1188-1196. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.016>.
- Reig M, Mariño Z, Perelló C, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol*. 2016;65:719-726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.008>.
- Ravi S, Axley P, Jones D et al. Unusually high rates of hepatocellular carcinoma after treatment with direct-acting antiviral therapy for hepatitis c related cirrhosis. *Gastroenterology*. 2017;152:911-912. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.021>.
- Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *J Hepatol*. 2016;65:727-733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.015>.
- Mariño Z, Darnell A, Lens S, et al. Time association between hepatitis C therapy and hepatocellular carcinoma emergence in cirrhosis: relevance of non-characterized nodules. *J Hepatol*. 2019;70(5):874-884. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.005>.
- ANRS collaborative study group on hepatocellular carcinoma (ANRS CO22 HEPATHER, CO12 CirVir and CO23 CUPILT cohorts). Electronic address: stanislav.pol@aphp.fr. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2016;65:734-740. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.045>.
- Nahon P, Layese R, Bourcier V et al. Incidence of hepatocellular carcinoma after direct antiviral therapy for HCV in patients with cirrhosis included in surveillance programs. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1436-1450.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.015>.
- Nishibatake Kinoshita M, Minami T, Tateishi R, et al. Impact of direct-acting antivirals on early recurrence of HCV-related HCC: Comparison with interferon-based therapy. *J Hepatol*. 2019;70(1):78-86. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.029>.
- Minami T, Tateishi R, Nakagomi R, et al. The impact of direct-acting antivirals on early tumor recurrence after radiofrequency ablation in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2016;65:1272-1273. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.043>.
- Nagata H, Nakagawa M, Asahina Y, et al. Effect of interferon-based and -free therapy on early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2017;67:933-939. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.028>.
- Virlogeux V, Pradat P, Hartig-Lavie K, et al. Direct-acting antiviral therapy decreases hepatocellular carcinoma recurrence rate in cirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2017;37:1122-1127. <https://doi.org/10.1111/liv.13456>.
- Zavaglia C, Okolicsanyi S, Cesarini L, et al. Is the risk of neoplastic recurrence increased after prescribing direct-acting antivirals for HCV patients whose HCC was previously cured? *J Hepatol*. 2017;66:236-237. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.016>.
- Cabibbo G, Petta S, Calvaruso V, et al. Is early recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV cirrhotic patients affected by treatment with direct-acting antivirals? A prospective multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46:688-695. <https://doi.org/10.1111/apt.14256>.



22. Petta S, Cabibbo G, Barbara M, et al. Hepatocellular carcinoma recurrence in patients with curative resection or ablation: impact of HCV eradication does not depend on the use of interferon. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;45:160-168. <https://doi.org/10.1111/apt.13821>.
23. Calvaruso V, Cabibbo G, Cacciola I, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated cirrhosis treated with direct-acting antiviral agents. *Gastroenterology.* 2018;155(2):411-421.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.008>.
24. Singal AG, Rich NE, Mehta N, et al. Direct-acting antiviral therapy not associated with recurrence of hepatocellular carcinoma in a multicenter North American cohort study. *Gastroenterology.* 2019;156(6):1683-1692.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.027>.
25. Romano A, Angeli P, Piovesan S, et al. Newly diagnosed hepatocellular carcinoma in patients with advanced hepatitis C treated with DAAs: a prospective population study. *J Hepatol.* 2018;69:345-352. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.009>.
26. Carrat F, Fontaine H, Dorival C, et al. Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: a prospective cohort study. *Lancet.* 2019;393:1453-1464. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32111-1).
27. Piñero F, Mendizabal M, Ridruejo E, et al. Treatment with direct-acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2019;39:1033-1043. <https://doi.org/10.1111/liv.14041>.
28. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
29. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(12):717-734. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>.
30. Mlecnik B, Bindea G, Pages F, Galon J. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 2011;30:5-12. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9270-7>.
31. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol.* 2017;67(4):727-738. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.014>.
32. Ziolk M, Poté N, Amaddeo G, et al. Macrotrabecular-massive hepatocellular carcinoma: a distinctive histological subtype with clinical relevance. *Hepatology.* 2018;68:103-112. <https://doi.org/10.1002/hep.29762>.
33. Calderaro J, Petitprez F, Becht E, et al. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2019;70(1):58-65. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.003>.
34. Murakami J, Shimizu Y, Kashii Y, et al. Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1999;30:143-150. <https://doi.org/10.1002/hep.510300107>.
35. Finkin S, Yuan D, Stein I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2015;16:1235-1244. <https://doi.org/10.1038/ni.3290>.
36. Vandesompele J, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0034.
37. Meissner EG, Kohli A, Higgins J, et al. Rapid changes in peripheral lymphocyte concentrations during interferon-free treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Commun.* 2017;1:586-594. <https://doi.org/10.1002/hep4.1074>.
38. Putra J, Schiano TD, Fiel MI. Histological assessment of the liver explant in transplanted hepatitis C virus patients achieving sustained virological response with direct-acting antiviral agents. *Histopathology.* 2018;72:990-996. <https://doi.org/10.1111/his.13453>.
39. Perez S, Kaspi A, Domovitz T, et al. Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals. *PLoS Genet.* 2019;15:e1008181. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008181>.
40. Hamdane N, Jühling F, Crouchet E, et al. HCV-induced epigenetic changes associated with liver cancer risk persist after sustained virologic response. *Gastroenterology.* 2019;156(8):2313-2329.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.038>.
41. Meissner EG, Wu D, Osinusi A, et al. Endogenous intrahepatic IFNs and association with IFN-free HCV treatment outcome. *J Clin Invest.* 2014;124:3352-3363. <https://doi.org/10.1172/JCI75938>.
42. Holmes JA, Carlton-Smith C, Kim AY, et al. Dynamic changes in innate immune responses during direct-acting antiviral therapy for HCV infection. *J Viral Hepat.* 2019;26:362-372. <https://doi.org/10.1111/jvh.13041>.
43. Moschos S, Varanasi S, Kirkwood JM. Interferons in the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Res.* 2005;126:207-241.
44. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:836-848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>.
45. Tschurtschenthaler M, Wang J, Fricke C, et al. Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut.* 2014;63:1921-1931. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305863>.
46. Guillot B, Portales P, Thanh AD, et al. The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment. *Br J Dermatol.* 2005;152:690-696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06512.x>.
47. Bacher N, et al. Interferon-alpha suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Can Res.* 2013;73:5647-5656. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3788>.
48. Schiavoni G, Mattei F, Gabriele L. Type I interferons as stimulators of DC-mediated cross-priming: impact on anti-tumor response. *Front Immunol.* 2013;4:483. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00483>.
49. Spadaro F, et al. IFN-alpha enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood.* 2012;119:1407-1417. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363564>.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Amaddeo G, Nguyen CT, Maillé P, et al. Intrahepatic immune changes after hepatitis c virus eradication by direct-acting antiviral therapy. *Liver Int.* 2020;40:74–82. <https://doi.org/10.1111/liv.14226>

**ARTICLE 2**

## Immune profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals distinct subtypes and activation of gen signature predictive of response to immunotherapy

Cong Trung Nguyen<sup>1,2\*</sup>, Stefano Caruso<sup>3\*</sup>, Pascale Maille<sup>1,4\*</sup>, Aurélie Beaufrère<sup>5</sup>, Jérémy Augustin<sup>6</sup>, Loetitia Favre<sup>1,4</sup>, Anaïs Pujals<sup>1,4</sup>, Camille Boulagnon-Rombi<sup>7</sup>, Rami Rhaïem<sup>8</sup>, Giuliana Amaddeo<sup>1,2,9</sup>, Luca di Tommaso<sup>10</sup>, Alain Luciani<sup>1,2,11</sup>, Hélène Regnault<sup>9</sup>, Raffaele Brustia<sup>12</sup>, Olivier Scatton<sup>12</sup>, Frédéric Charlotte<sup>6</sup>, Isabelle Brochériou<sup>6</sup>, Daniele Sommacale<sup>1,2,13</sup>, Patrick Soussan<sup>14</sup>, Vincent Leroy<sup>1,2,9</sup>, Alexis Laurent<sup>1,13</sup>, Van Ky Le<sup>15</sup>, Van To Ta<sup>15</sup>, Hong Son Trinh<sup>16</sup>, Thi Lan Tran<sup>17</sup>, David Gentien<sup>18</sup>, Audrey Rapinat<sup>18</sup>, Jean Charles Nault<sup>3,19</sup>, Manon Allaire<sup>20</sup>, Sebastien Mulé<sup>1,2,11</sup>, Jessica Zucman-Rossi<sup>3,21,22</sup>, Jean-Michel Pawlotsky<sup>2</sup>, Christophe Tournigand<sup>1,23</sup>, Fouad Lafdil<sup>2,24</sup>, Valérie Paradis<sup>5,25</sup>, Julien Calderaro<sup>1,2,4</sup>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1219

*\*Co-first authors*

1. Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France.
2. INSERM, U955, Equipe 18 "Physiopathologie et Thérapeutiques des Hépatites Virales Chroniques et des cancers liés", Créteil, France.
3. INSERM UMR-1162, Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, Paris, France.
4. Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, Département de Pathologie, Créteil, France.
5. Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Beaujon, Service d'Anatomo-Pathologie, F-92110 Clichy, France.
6. Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Sorbonne Université, Paris, France.
7. Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Reims, France
8. Hôpital Robert Debré, Service de Chirurgie Digestive et Hépatobiliaire, Reims, France.
9. Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, Service d'Hépatologie, Créteil, France.
10. Department of Pathology, Humanitas University, Humanitas Clinical and Research Center, IRCCS, Rozzano, Milan, Italy.
11. Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, Service d'Imagerie Médicale, Créteil, France.
12. Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Service de Chirurgie Digestive, Hépto-Bilio-Pancréatique et Transplantation Hépatique, Paris, France.

13. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, Service de Chirurgie Digestive et Hépatobilio-pancréatique, Créteil, France.
14. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, ERL8255), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, UMR1135), Sorbonne Universités, Paris F-75013, France.
15. Department of Pathology, National Cancer Hospital, Hanoi, Vietnam.
16. Department of Surgical Oncology, Vietduc Hospital, Hanoi, Vietnam.
17. Department of Pathology, Hanoi Medical University, Hanoi, Vietnam.
18. Institut Curie, PSL Research University, Translational Research Department, Genomics platform, Paris, F-75248 France
19. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Jean Verdier, Service d'Hépatologie, Bondy, France.
20. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Service d'Hépatologie, Paris, France.
21. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'Oncologie Médicale, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.
22. Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, F-75010, France.
23. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, Service d'Oncologie Médicale, F-94010, Créteil, France.
24. Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France.
25. Université de Paris, Centre de recherche sur l'inflammation, Inserm, U1149, CNRS, ERL8252, F-75018 Paris, France.

**Corresponding author:**

Pr Julien Calderaro, MD, PhD  
Département de Pathologie  
Hôpital Henri Mondor  
51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny  
94010 Créteil, France  
tel +33149812732  
fax +33149812733  
[julien.calderaro@aphp.fr](mailto:julien.calderaro@aphp.fr)

**Conflict of interests:** None.

**Abbreviations:** AFP, Alpha-fetoprotein; cHCC-CCA, Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma; CI, Confidence Interval; HBV, Hepatitis B virus; HCC, Hepatocellular



Carcinoma; HCV, Hepatitis C Virus; H&E, Hematoxylin and Eosin; HR, Hazard Ratio; iCCA, Intrahepatic Cholangiocarcinoma; IH, Immune-High; IL, Immune-Low; IQR, Interquartile range; MANOVA, Multivariate Analysis Of Variance; NASH, Non Alcoholic Steatohepatitis; PC, Principal Component; PD1, Programmed Death 1; PDL1, Programmed Death Ligand 1; PLC, Primary Liver Cancer; TLS, Tertiary lymphoid structure.

**Funding:** With the support of Bristol-Myers Squibb Foundation for Research in Immuno-Oncology.

**Word count:** 4554

**Keywords:** Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, immunotherapy, liver.

**Authors contributions:**

Study design: JC

Data collection and generation: CTN, MA, LF, AP, AB PM, SC, JCN, JA, CBR, RR, VKL, VTT, HST, TLT, SM, AL, DS, RB, LdT, HR, AL, GC, IB

Data analysis: SC, CTN, PM, LF, AP

Critical revision of intellectual content/drafting the manuscript: All authors

**Statement of Translational Relevance**

Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma (cHCC-CCA) is a rare primary liver cancer associated with an overall poor prognosis. We identify two main immune subtypes of cHCC-CCA (Immune High and Immune Low). Tumors classified as Immune-High show overexpression of genes related to adaptive and innate immunity, antigen presentation, cytotoxicity, immune suppression, and inflammation. They are also associated with an improved overall survival and display activation of gene signatures that were recently shown to be associated with response to anti-PD1 blocking antibodies in patients with HCC. Our results may have important implications for the design of future clinical trials using immunomodulating agents and/or for the stratification of patients with this highly aggressive malignancy.

## **Abstract**

### ***Purpose***

Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma (cHCC-CCA) is a rare malignancy associated with an overall poor prognosis. We aimed to investigate the immune profile of cHCC-CCA and determine its impact on disease outcome.

### ***Experimental design***

We performed a multicenter study of 96 patients with cHCC-CCA. Gene expression profile was analyzed using nCounter PanCancer IO 360 Panel. Densities of main immune cells subsets were quantified from digital slides of immunohistochemical stainings. Genetic alterations were investigated using targeted next generation sequencing.

### ***Results***

Two main immune subtypes of cHCC-CCA were identified by clustering analysis: an "Immune High" (IH) subtype (57% of the cases) and an "Immune Low" (IL) subtype (43% of the cases). Tumors classified as IH showed overexpression of genes related to immune cells recruitment, adaptive and innate immunity, antigen presentation, cytotoxicity, immune suppression, and inflammation ( $p < 0.0001$ ). IH cHCC-CCAs also displayed activation of gene signatures recently shown to be associated with response to immunotherapy in patients with HCC. Quantification of immunostainings confirmed that IH tumors were also characterized by higher densities of immune cells. Immune subtypes were not associated with any genetic alterations. Finally, multivariate analysis showed that the IH subtype was an independent predictor of improved overall survival.

### ***Conclusion***

We have identified a subgroup of cHCC-CCA that displays features of an ongoing intra-tumor immune response, along with an activation of gene signatures predictive of response to immunotherapy in HCC. This tumor subclass is associated with an improved clinical outcome.

These findings suggest that a subset of patients with cHCC-CCA may benefit from immunomodulating therapeutic approaches.

**Keywords:** combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, immunity, immunotherapy, liver, cancer

## ***Introduction***

Primary liver cancer (PLC) is the third cause of cancer related deaths worldwide and consists in a heterogeneous group of malignant tumors with different clinical, histological and molecular features (1,2). Among these neoplasms, hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma (CCA) respectively demonstrate hepatocytic and biliary differentiation and thus represent the two ends of the spectrum of PLCs.

Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma (cHCC-CCA) is a rare subtype (incidence ranging from 1.0% to 4.7% of all PLCs) that shows histopathological features of both HCC and CCA (3–6). Its clinical outcome is considered to be poorer than that of HCC and equal to or worse than that of CCA (5,7–10). The biological mechanisms underlying this particular phenotype remain largely unknown, and they may indeed result from the malignant transformation of a progenitor cell or the dedifferentiation of a HCC or an CCA (11–13). Therapeutic strategies for patients with cHCC-CCA are limited. The mainstay of treatment is surgical resection with most series reporting a 3-year survival rate of 25–50% (3,6,9,14). No systemic treatment has so far demonstrated any significant anti-tumor activity for patients with recurrent and/or advanced disease.

Immunotherapy, hailed as a major breakthrough for the treatment of numerous solid or hematological malignancies, is now providing new approaches for the treatment of PLCs. Indeed, compared to sorafenib, the combination of a monoclonal anti-Programmed Death Ligand 1 (PDL1) antibody (atezolizumab) and an anti-angiogenic agent (bevacizumab) was recently shown to improve both overall and progression-free survival for patients with advanced HCC (15). Interestingly, Sangro et al. investigated tumor samples from patients with HCC treated with the anti-Programmed Death 1 (PD1) antibody nivolumab and showed a positive correlation between particular expression profiles and treatment response. Indeed, four immune/inflammatory gene signatures (Inflammatory, Gajewski 13-Gene Inflammatory, 6-Gene Interferon Gamma and T-cell Exhaustion) were associated with both objective response rate and overall survival (16). These signatures noticeably include immune checkpoint inhibitors (*CD274*, *LAG3*), cytolytic effectors (*GZMA*, *PRF1*), and molecules involved in the recruitment of immune cells subsets (*CXCL9*, *IFNG*, *CXCL10*) and antigen processing/presentation (*HLA-DMA*, *HLA-DMB*). Altogether with numerous

other studies in other human malignancies, these results strongly suggest that only certain subsets of “immune-hot” tumors show enhanced sensitivity to immunotherapy (17). In this line, a significant degree of inter-tumor heterogeneity regarding HCC microenvironment has been reported, with approximately 25% of HCCs belonging to a particular subclass characterized by a massive infiltration by immune cells (18,19).

There is unfortunately very limited data on the immunity of cHCC-CCA (20,21). In particular, the existence of an immune-high subtype similar to that reported in HCC remains to be determined. The impact of immunity on cHCC-CCA outcome is also unknown.

We therefore, aimed in the present study to investigate the immune characteristics of a large series of cHCC-CCA samples by means of gene expression profiling, gene sequencing and digital quantitative immunohistochemistry. This approach has allowed us to identify an immune-high subtype of cHCC-CCA characterized by an increased infiltration and activation of immune cells, an enhanced antigen presentation and cytolytic activity, and an improved clinical outcome. We also show an enrichment of gene signatures related to response to immunotherapy.

## ***Material and methods***

### ***Patients and samples***

We retrospectively included cHCC-CCA samples from patients who underwent surgical resection or liver transplantation in 5 University Hospitals (Henri Mondor, Créteil, France; Beaujon, Clichy, France; Pitié-Salpêtrière, Paris, France; Reims University Hospital, Reims, France; National Cancer Hospital, Hanoi, Vietnam) (**Table 1**). Inclusion criteria were as follows: 1) available baseline data and histological material, 2) unequivocal histological features of cHCC-CCA and 3) lack of pre-operative anti-tumor treatment.

The following clinical, biological characteristics were systematically recorded: age, gender, etiologies of liver disease (Hepatitis B (HBV) or hepatitis C (HCV) infection, alcohol intake, and metabolic syndrome), follow-up (overall survival), alpha-fetoprotein serum levels, tumor size, multinodularity, satellite nodules, vascular invasion (macrovascular/microvascular), and surgical margins. Fibrosis in the non-tumor liver was assessed using the METAVIR scale (F0: no fibrosis, F1: portal fibrosis without septa, F2: portal fibrosis with few septa, F3: portal fibrosis with many septa, F4: cirrhosis).

To confirm the diagnosis of cHCC-CCA, histological slides stained by hematoxylin and eosin were reviewed by 3 expert liver pathologists. Reviewing was performed according to the most recent consensus recommendations (12). The percentage of each morphological component was assessed: HCC, CCA, equivocal (histological appearance without clear-cut hepatocytic or biliary differentiation, or closely intermingled hepatocytic and biliary contingents) and cholangiolocellular (1). Cases with a cholangiolocellular morphological appearance throughout the whole tumor were not included in the study. Indeed, the cholangiolocellular pattern consists in tumor cells arranged in anastomosing cords reminiscent of cholangioles or canals of Hering and it has been clearly demonstrated that they are a distinct biliary-derived entity. They are therefore now classified as a cholangiocarcinoma subtype (22). Cases with intermediate features throughout the whole tumor (intermediate cell tumors) were also excluded as they are now classified as a distinct entity. The presence of so-called “stem cell features” (small cells with

hyperchromatic nuclei and a high nuclear-cytoplasmic ratio) was assessed using hematoxylin-eosin stained slides (1). A representative paraffin-embedded tissue block was further selected for each case. The study was performed according to the declaration of Helsinki and the local legal requirements of each center. It was approved by an institutional review board. All necessary written and signed informed consents were obtained from patients.

A total of 96 patients matched our inclusion criteria. They were predominantly male (73%) and had a median age at surgery of 59 years. Main underlying etiologies were alcohol intake (n = 37, 45%), HCV infection (n=22, 24%), HBV infection (n=20, 22%), and nonalcoholic steatohepatitis (n=11, 14%). High preoperative AFP levels ( $\geq 20$  ng/ml) were detected in 50% (27/54) of patients. A subset of patients had multinodular disease (n=23, 24%) (Table 1). The median size of the tumors was 45 mm. Satellite nodules, macrovascular invasion, microvascular invasion were observed in 29% (28/96), 13% (13/96), and 52% (50/96) of the cases, respectively. The vast majority of the tumors occurred in a background of significant fibrosis (METAVIR stage F2-F3 or F4, n=80, 83%) (Table 1). The predominant histological pattern of the lesions was hepatocellular, biliary and equivocal in 43%, 25% and 27% of the cases, respectively.

### ***Gene expression profiling***

For each case, 5  $\mu$ m-thick sections were cut from selected formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks. Tumor and non-tumor tissue were then macro-dissected. Total RNA was further isolated using the Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. All total RNAs were monitored to ensure their quality, purity and integrity by performing electrophoresis on an Agilent 2100 Bioanalyzer device with the Pico assay (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Gene expression profile was analyzed using the nCounter PanCancer IO 360 Panel (NanoString Technologies, Seattle, Washington) that includes more than 700 genes involved in the main biological pathways of human immunity. Experiments were performed at the Genomics platform of Institut Curie (Paris, France). For each sample, 500 ng of total RNA extracted from the formalin-fixed, paraffin-embedded tumor blocks was used as a template. A human Universal Reference

RNA including a no-template control (water) and 10 cell lines was also hybridized in parallel with the tumor samples of interest. Nanostring positive and negative controls were also added to samples as spikes in controls. Probes and mRNAs were hybridized overnight at 65°C, and samples were further processed on the NanoString nCounter preparation station (NanoString Technologies) to immobilize biotinylated hybrids on a cartridge coated with streptavidin and remove probes in excess. The nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) was used to scan the cartridges at maximum resolution (555 fields of view), count the individual fluorescent barcodes and quantify the RNA molecules. The Nanostring nSolver 4.0 software (NanoString Technologies) and “NanoStringNorm” package in R were used to control and normalize raw data. In particular, data was normalized against the geometric mean of 20 housekeeping genes in combination with a positive control normalization, which uses the geometric mean of six synthetic positive targets, to control technical sources of variability. The obtained gene expression values were then log<sub>2</sub>-transformed. Gene sets to investigate gene expression of different immune signatures and immune cell subsets were established based on gene annotations of nCounter PanCancer IO 360 Panel (NanoString Technologies, Seattle, Washington) and the web-based application Gorilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il>) (23).

### ***Gene sequencing***

DNA and RNA extractions were performed from FFPE tissue sections of cHCC-CCA blocks using the Maxwell RSC Plus DNA FFPE Kit IVD and the Maxwell RSC RNA FFPE Kit IVD (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer’s instructions. They were further quantified using a Qubit fluorimeter in combination with the Qubit™ dsDNA HS Assay Kit and Qubit™ RNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

RNA was further reverse transcribed to cDNA using SuperScript IV VILO Master Mix (ThermoFisher Scientific). Fifty nanograms of DNA and RNA (as measured by fluorimetry) were amplified using the Oncomine Comprehensive Library Assay v3C with IonChef (ThermoFisher Scientific), a multiplex PCR-based library-preparation method. Amplicons were then digested, barcoded and amplified by using Ion Ampliseq Library Kit Plus (ion ampliseq kit for chef DL8, ThermoFisher Scientific) and Ion Xpress barcode adapter kit (ThermoFisher Scientific). After DNA and RNA



quantification, 50 pM of each library was multiplexed and clonally amplified on ion-sphere particles (ISP) by emulsion PCR performed on Ion Chef (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. The ISP templates were loaded onto an Ion-540 chip and sequenced on an Ion S5 sequencer with the Ion 540™ Kit–Chef, according to the manufacturer's instructions. Run performance was assessed and data analyzed with the Ion Reporter™ Software (ThermoFisher Scientific) using specific stringent filters (allele frequency between 5 and 90%; only exonic location, read depth greater than 300X).

### ***Immunohistochemistry and in situ quantification of immune cells***

The formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were cut into 4 µm-thick slides, and all immunochemical stainings were further performed on an automated immunostainer (Leica Bond-Max; Leica Biosystems, Wetzlar, Germany), according to the manufacturer's instructions. Blocking endogenous peroxidases was performed using Peroxide Block (Bond Polymer Refine Detection Kit, Leica Biosystems). Antigen retrieval was performed with E1 (pH6) (CD20, CD68, MPO) and E2 (pH9) (CD3, CD8) reagents. The concentrations and sources of the antibodies used in this study were as follows: anti-CD3 (Dako, Santa Clara, California, Clone F7.2.38, dilution 1/50, ABCAAB17143-500), anti-CD8 (Dako, Clone C8/1448, Dilution 1/200, M7103), anti-CD20 (Dako, Clone L26, Dilution 1/500, M0755), anti-MPO (Dako, Polyclonal rabbit, Dilution 1/2000, A0398), anti-CD68 (Dako, Clone KP1, Dilution 1/5000, GA609), and PDL1 (Cell Signaling, rabbit monoclonal E1L3N, dilution 1/100, 13684S). Immunodetection was performed using Polymer and 3,3'-diaminobenzidine (Bond Polymer Refine Detection Kit, Leica Biosystems). PDL1 expression was evaluated on tumor cells as well as immune cells, as previously described (24). We also assessed the densities of tertiary lymphoid structures (TLS) by reviewing standard hematoxylin-eosin stained slides (25).

### ***Digital pathology and quantification of main immune cells subsets***

Slides were scanned in brightfield mode using the NanoZoomer HT scanning device (Hamamatsu Photonics, Japan) at a 20x magnification and a 0.45µm/pixel resolution. Whole slide images were further analyzed using the Qupath digital software 0.1.2 version (<https://qupath.github.io/>) (26).

Tumoral (CT) and non-tumoral (NT) liver areas were manually annotated by a pathologist (CTN). Optical density sum and Cytoplasm DAB OD mean were applied as parameters to detect positive cells in both CT and NT. Cell densities of immune cells were expressed as the mean number of positive cells per mm<sup>2</sup>.

### ***Statistical analysis***

Data visualization and statistical analysis were performed using R software version 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>) and Bioconductor version 3.4. Unsupervised hierarchical clustering was done using Cosine distance and Ward's linkage method. Principal component analysis (PCA) using the main two components was also performed in a series of matched tumor/non-tumoral sample pairs. Heatmaps were generated using the R packages "ComplexHeatmap" (27). Bioconductor limma package was used to test for differential gene expression between two groups (28). Differentially expressed genes were defined by a q-value threshold of  $\leq 0.05$  (according to the false discovery rate method from Benjamini-Hochberg) and a log fold-change  $> |1|$ .

Data were compared using Wilcoxon rank test or Fisher's exact test according to the type of variable. The comparison of multiple dependent variables in 2 groups was performed using a multivariate analysis of variance (MANOVA). In order to test the differences regarding the activated immune pathways and the specific gene signatures, we extracted gene lists from the nCounter® PanCancer IO 360™ Panel - Annotations and Sangro et al. (16), respectively. For each gene list, we then defined a score as the average gene expression. Scores in the two groups were compared using the Wilcoxon rank test.

To compare the gene expression profile of cHCC-CCA and HCC and CCA, we also included in an integrated analysis 355 HCC samples from TCGA-LIHC and 36 CCA samples from TCGA-CHOL (29). RNA sequencing data from TCGA were obtained using the "TCGAbiolinks" package in R (30). Then, we standardized gene expression separately to have mean 0 and standard deviation 1 per gene in each data set. Only genes in common between the three datasets were considered for the

analysis. Unsupervised hierarchical clustering of the integrated data was performed as described above.

Survival analysis was performed in patients treated by R0 liver resection with available survival data (n=73). Overall survival was defined by the interval between surgery (resection or liver transplantation) and death. Survival curves were represented using the Kaplan-Meier method compared with log-rank statistics. Univariate analysis was performed using the Cox proportional-hazards model and variables with a p-value < 0.05 were selected for multivariate analysis. All tests were two-tailed and *P*-values < 0.05 were considered significant.

## Results

### ***Identification of two main subtypes of cHCC-CCA using gene expression profiling***

We investigated the gene expression profile of all 96 cHCC-CCA samples by unsupervised hierarchical clustering analysis and identified two distinct immune subtypes of cHCC-CCA that we designated immune-low (IL) and immune-high (IH) (**Figure 1A**). Tumors classified as IH accounted for 57% of the cases (n=55). Significantly upregulated genes in the IH cHCC-CCA subclass included cytokines/chemokines and their receptors (e.g *IFNG*, *CCL19*, *CXCL9*, *IL1B*, *IL2*, *IL33*, *IL4*, *IL10*, *IFNA1*, *CXCR3*), markers of various subsets of immune cells (e.g *CD8A*, *CD79A*, *CD19*, *KIR2DL3*, *CD209*, *FOXP3*, *KLRK1*, *KLRD1*), immune modulators (e.g *PDL1*, *IDO1*, *LAG3*, *TIGIT*, *CTLA4*), cytolytic effectors (e.g *PRF1*, *GZMB*, *GZMM*), components of the Human Leukocyte Antigen system (e.g *HLA-A*, *HLA-DRB1*, *HLA-RB5*) and cancer-testis related antigens (e.g *MAGEA1*, *MAGEA4*) (**Figure 1B** and **Supplementary Table 1**). We further analyzed the association of cHCC-CCA immune subtypes and clinical, biological and pathological features, and observed very few correlations. The IH subclass was noticeably associated with the type of surgery (transplantation, p=0.05), the existence of cirrhosis in the adjacent liver (p=0.01), a lower frequency of microvascular invasion (p=0.01), and the predominance of a hepatocellular contingent (p=0.005) (**Supplementary Table 2**). No other statistical differences were identified (in particular no association with stem cell features) (**Figure 1A**, **Supplementary Table 2** and **Supplementary Figure 1**). Although unsupervised hierarchical clustering revealed two main cHCC-CCA subclasses we observed a certain degree of intra-cluster heterogeneity, with two subgroups being identified in the IH tumors: sub-cluster IH1 (left side of the main IH cluster) and subcluster IH2 (right side of the main cluster) (**Figure 1A**). IH1 cases accounted for approximately half of all IH cHCC-CCA (n 26/55, 47%) and, compared to sub-cluster IH2, showed overexpression of genes related to innate immunity and NK cells (*IFNA1*, *KIR3DL2*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*) (**Supplementary Table 3**). Comparison between the sub-clusters IL1 (left side of the main IL cluster) and subcluster IL2 (right side of the main cluster) showed overexpression of cancer-testis antigens (*MAGEA3/A6*, *MAGEA4* *MAGEC1*, *MAGEC2*) (**Supplementary Table 4**). Further understanding of this heterogeneity will however require the study of additional cases.

To compare the immune profile of cHCC-CCA to that of conventional HCC and CCA, we further performed an integrative transcriptomic analysis with two independent datasets from TCGA (TCGA-LIHC n=355 and TCGA-CHOL n=36) and showed that cHCC-CCA retained their immune class and clustered close to HCC and CCA with similar transcriptomic features (**Supplementary Figure 2**) (31,32).

We then aimed to validate our findings on a public dataset of 20 cases of cHCC-CCA (33). As observed in our series, unsupervised hierarchical clustering also showed 2 main immune clusters (high and low), with two subclusters of each main class (**Supplementary Figure 3**). We observed in the immune high subset upregulation of genes involved in various immune processes such as adaptive immunity or antigen processing (**Supplementary Table 5**), due to the low number of cases of this data set, differences remained significant in only 9 genes after adjustment for multiple tests). Compared to IH2, the IH1 cluster interestingly showed trends towards upregulation of genes related to NK cells, as identified in our series (**Supplementary Table 6**). We also observed trends towards dysregulation of cancer-testis antigens genes between IL1 and IL2 (**Supplementary Table 7**), due to the very low number of cases no difference remained significant after correction for multiple tests). Altogether these observations strengthen the results obtained in our series of tumors.

#### ***Activation of immune pathways and increased infiltration by immune cells in Immune-High cHCC-CCA***

To have a better understanding of the biology of IH tumors, we selected and annotated a series of 161 genes related to major immune pathways (**Figure 2**). We showed that gene signatures related to immune cells recruitment, adaptive and innate ( $p < 0.0001$ ) immunity, antigen processing and presentation ( $p < 0.0001$ ), cytotoxicity/killing of cancer cells ( $p < 0.0001$ ), immune suppression and regulation ( $p < 0.0001$ ), and inflammation ( $p < 0.0001$ ) were upregulated in IH cHCC-CCA subtype (**Figure 2**). However, there was no difference in the activation of these pathways between the two sub-clusters within each group. Nonetheless, these sub-clusters showed a different regulation of genes involved in cell proliferation (IL1 versus IL2,  $p = 0.003$ ; IH1 versus IH2,  $p = 0.004$ ) (**Supplementary Figure 4**).

We also aimed to confirm the increased immune infiltration in IH tumors by two distinct approaches: gene expression profiling and digital image analysis of immunohistochemical stainings. We first showed that gene sets related to T cells ( $p < 0.0001$ ), CD8 T cells ( $p < 0.0001$ ), B cells ( $p < 0.0001$ ), exhausted CD8 T cells ( $p < 0.0001$ ), macrophages ( $p < 0.0001$ ), dendritic cells ( $p < 0.0001$ ), neutrophils ( $p < 0.0001$ ) and NK cells ( $p < 0.0001$ ) were upregulated in IH cHCC-CCA (**Figure 3A**). Consistent with the intra-cluster heterogeneity described above, we observed that some IH cHCC-CCA show a lack of particular immune cell subsets, such B cells, neutrophils or NK cells (**Figure 3A**).

We further performed immunohistochemical stainings of main immune cells subsets in 67 randomly selected cases and quantified the densities using Qupath software on the scanned digital slides. In line with the results obtained by gene expression profiling, we showed that intra-tumoral densities of CD3+ T cells ( $p < 0.0001$ ), CD8+ T cells ( $p = 0.0052$ ), CD20+ B cells ( $p = 0.019$ ), and CD68+ macrophages ( $p = 0.015$ ) were higher in IH tumors (**Figure 3B** and **3C**), correlations between mRNA expression levels and immunohistochemistry are shown in **Supplementary Figure 5**. A trend was observed for an increased density of MPO+ cells but it did not reach statistical significance (**Figure 3B**). Given the associations between the IH subtype and the predominance of an HCC histological contingent, we quantified, for 30 cases, the *in situ* immune infiltration within each contingent, but failed to detect any significant difference (**Supplementary Figure 6**).

We finally quantified tertiary lymphoid structures (TLS) in intra-tumor tissues for all 96 cases. In line with our gene expression and immunohistochemical findings, we observed that the TLS densities were significantly higher in IH tumors ( $p = 0.0039$ ) (**Supplementary Figure 7**).

### ***Upregulation of gene signatures associated with hepatocellular carcinoma sensitivity to immunotherapy in Immune-High cHCC-CCA***

A recent study showed that several gene signatures were associated, in patients with advanced HCC treated by the anti-PD-1 monoclonal antibody nivolumab, with improved clinical outcome (16). We thus aimed to determine if cHCC-CCA belonging to the IH class showed upregulation of

the gene sets reported to be significantly related to overall survival and/or objective response rate.

We observed that IH tumors were characterized by a significant overexpression of all these gene signatures: 6-Gene Interferon Gamma signature ( $p < 0.0001$ ), Gajewski 13-Gene Inflammatory signature ( $p < 0.0001$ ), Sangro Inflammatory signature ( $p < 0.0001$ ), and T cell Exhaustion signature ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 4A**). They noticeably include various cytokines/chemokines (*CXCL10*, *CXCL9*, *CCL4*, *CCL2*), immune exhaustion/checkpoint inhibitors (*PDL1/CD274*, *LAG3*, *PDL2/PDCD1LG2*, *IDO1*) and components of the HLA system (*HLA-DMA*, *HLA-DMB*, *HLA-DOA*, *HLA-DOB*). Finally, as PDL1 is also recognized as a marker of response to immunotherapy, we also assessed its expression on tumor and immune cells in 50 randomly selected cases, but did not observe any difference according to the immune subtype of the samples (**Supplementary Figure 8**)

We also investigated the relationship of our immune groups with the gene signature of the formerly reported immune class of HCC (18); among 110 genes of this signature, 33 genes are available in our panel (Figure 4A). As expected, our IH group displayed a strong overexpression of these genes (Figure 4A). We further aimed to determine if our subgroups were related to active or exhausted subtypes. We compared the expression of key genes whose expression differs between these subclasses (*CD8A*, *CD3E*, *CD3G*, *IFNG*, *PRF1*, *CXCL9*, *CXCL10*, *TBX21*, *CXCL12*, *CCL2*) (18). Apart from an upregulation of *CXCL12* in IH2 compared to IH1 ( $p < 0.001$ ), none of them was differentially expressed between our 1) IH1 and IH2 and 2) IL1 and IL2 subgroups, suggesting that our subgroups do not align with these immune subsets of HCC (**Supplementary Figure 9**).

### ***Relationship of cHCC-CCA immune subtypes and underlying molecular alterations***

Using targeted next-generation sequencing (ThermoFisher Comprehensive Panel), we further screened 45 randomly selected samples for molecular alterations that are reported to recurrently occur in cHCC-CCA (20). Among the investigated samples, 29 belonged to the IH subclass and 16 to the IL subclass. The most frequent genetic defect was *TP53* mutations (58%) followed by *MYC* amplifications (18%), *TERT* promoter (16%), *BAP1* (9%) mutations and *FGF19* amplifications (**Supplementary Table 8**). These findings are consistent with former studies that investigated the

molecular profile of cHCC-CCA (20,22). We did not identify any significant association between the immune subtype and the molecular alterations (**Figure 4B**).

### ***The intra-tumoral immune microenvironment of cHCC-CCA is not related to that of the adjacent non-tumoral liver***

PLCs, including cHCC-CCA, most often develop in the context of chronic liver disease and inflammation that may impact the anti-tumor immunity (8,34,35). We therefore aimed to determine if the immune subtype of the tumors was linked to the immune infiltration of the surrounding non-tumor parenchyma. We first extracted, for 19 randomly selected cases, mRNA from the adjacent liver and performed gene expression profiling using the same gene expression Panel. Using principal component analysis, we investigated the relationships between the matched profiles. We observed that samples tended to cluster according to their tumor or non-tumor nature, and not according to the patient from whom they were obtained (**Figure 5A**). The 2D representation using Principal Components 1 and 2 also showed that the tumor samples were most often located far from their non-tumor counterparts (**Figure 5A**). We further quantified the immune cell densities in the 67 cases for which immunohistochemistry was performed and compared their value according to the immune subtype of the adjacent cHCC-CCA (**Figure 5B**). Consistent with the gene expression experiments, we failed to detect any significant difference between non-tumor immune cells densities according to the immune subtype of the tumor (**Figure 5B**). Altogether, these results support the hypothesis that the subtype of cHCC-CCA is not related to the immune infiltration of the adjacent liver parenchyma.

### ***Clinical impact of cHCC-CCA immune subtype***

Finally, we assessed the prognostic impact of the cHCC-CCA immune subtype. Survival data was available for 73 patients, the median follow-up was 25 months (IQR, 12.2-48). Patients with non-curative resection were excluded (R1 or R2). Twenty-one deaths were recorded. The overall survival rates at 24 months, 60 months were 90%, 80% for patients with the IH subtype and 71%, 67% for patients with the IL subtype, respectively. Kaplan-Meier curves of survival times according to the immune subtype are represented in **Figure 6**. Univariate analysis showed that IH subtype



(HR=0.37, CI 95%=0.14-0.96, p=0.04), satellite nodules (HR=2.96, CI 95%=1.08-8.10, p=0.034), and HBV infection (HR=2.97, CI 95%=1.06-8.34, p=0.039) significantly influenced overall survival times of cHCC-CCA patients (increased risk of death-**Table 2**). Multivariate analysis confirmed the IH was an independent prognostic factor (HR=0.17, CI 95%=0.05-0.53, p=0.002).

It has recently been shown that the immune infiltration in the non-tumoral liver may impact prognosis in HCC, and we also assessed if that could also be the case for cHCC-CCA. We however did not observe any significant association between survival and CD3+ T cells, CD8+ T cells, CD20+ B cells, CD68+ macrophages, and MPO+ cells densities (**Supplementary Figure 10**).

## Discussion

Accounting for approximately 1-5% of PLCs, cHCC-CCA remains an under-investigated tumor subtype and, given its composite and complex histological features, cHCC-CCA is also probably under-diagnosed (1,12). With its aggressive clinical behavior and the lack of guidelines for its management, cHCC-CCA pose greater challenges than HCC and iCCA for which promising therapeutic strategies are emerging (36,37). The vast majority of cHCC-CCA lack so-called actionable genetic alterations, and other strategies should be considered (20,38). Immunotherapy has shown impressive results in various solid tumors, and is now the standard of care ( in combination with bevacizumab) for patients with advanced HCC (12).

We show in the present study that approximately 60% of cHCC-CCA belong to a particular subclass characterized by a significant immune infiltration, with activation of various pathways related to both innate and adaptive immunity. Although it will have to be investigated by clinical trials, we may hypothesize that patients with this subclass of cHCC-CCA may benefit from immunomodulating agents. Indeed, in other solid tumors, immune infiltration is usually associated with enhanced sensitivity to immunotherapy and we observed, in the IH class of cHCC-CCA, enrichment in several gene signatures associated with response to nivolumab in patients with advanced HCC (16,17).

One important perspective is to identify the main determinants of this anti-tumor immunity. Increased infiltration by immune cells has been shown to occur in the stroma of hypermutated tumors (1). It is however unlikely the case in cHCC-CCA as these tumors do not display this particular phenotype (20). Also, our molecular screening did not identify any relationship between cHCC-CCA immune subtypes and the underlying molecular alterations. However, apart from *TP53* mutations, the frequency of each event appears to be very low and it will be difficult, given the rarity of the disease, to reach sufficient numbers of altered cases for adequate statistical analyses. Of note is that both *CTNNB1* mutated cases were classified as IH, whereas this alteration has been reported, in HCC, to suppress immune infiltration (2,18,39). Further studies will be needed to confirm that this is not the case for cHCC-CCA. Interestingly, cHCC-CCA are characterized by the expression of several progenitor/oncofetal genes that are usually only

expressed during the embryonic or fetal development of the liver (11,20,40). The proteins are no longer produced once the immune system is fully developed and thus self-tolerance may not develop against these antigens (41). In this line, we observed that IH tumors display a higher expression of cancer-testis related antigens, which may contribute to induce the observed intra-tumor immune response. Finally, although we observed an association between the IH subtype and the predominance of an HCC contingent, we did not observe any difference in the *in situ* immune cell densities between each histological contingent, suggesting that it does not have a direct impact on the intra-tumor immune infiltration.

It will also be important to have a better understanding of the potential intra-cluster heterogeneity. Indeed, although our analysis showed two main clusters, we also observed different “sub-clusters” in both IH and IL tumors. In particular, a subset of IH cHCC-CCA (IH1) with very high expression of markers related to NK cells and innate immunity was identified. NK cells have a well documented anti-tumor effect and their presence within the intra-tumor stroma has been associated with an improved outcome in various human malignancies (42–44). They notably recognize the absence of self Major Histocompatibility Class I molecules as a way to discriminate normal from transformed cells. We did not observe any downregulation of HLA genes in this particular subcluster, and studies with enrichment in this particular subgroup are needed to determine the triggers of this response.

Consistent with the existence of an effective anti-tumor immunity, we also showed that the IH of cHCC-CCA was associated with prolonged survival, whereas common pathological factors such as vascular invasion, tumor size or satellite nodules did not show any impact on clinical outcome. Importantly, in contrast with former reports on smaller series, the extent of the biliary contingent was not identified as a prognostic factor (45,46). The prognostic value of the IH subtype may thus have clinical implications for patients stratification and management. Indeed, due to its overall poor outcome, diagnosis of cHCC-CCA is currently a contraindication to liver transplantation. Provided validation in additional cohorts, our results suggest that this therapeutic strategy may be considered for the subset of patients with an IH cHCC-CCA. In this line, some authors have reported long term survival following liver transplantation for patients with cHCC-CCA (47,48).

The major limitation of our work is the relatively low number of cases that were investigated, in particular in the validation set. The collection of a large number of cHCC-CCA samples is challenging due to the rarity of the disease, and our results therefore need to be further validated by the investigation of additional cases. The predictive value regarding treatment and prognosis will also need to be determined on biopsy samples in patients with more advanced disease.

In conclusion, we identified a subset of cHCC-CCA characterized by a significant immune infiltration, a more favorable clinical outcome and an enrichment in gene signatures shown to be predictive of response to nivolumab in patients with HCC. We believe that our findings may have important implications for the design of future clinical trials and the stratification of patients with this highly aggressive malignancy.

## References

1. WHO Classification of Tumours of the Digestive System 5<sup>th</sup> Edition 2019.
2. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *Journal of Hepatology*. 2019;71:616–30.
3. Yoon Y-I, Hwang S, Lee Y-J, Kim K-H, Ahn C-S, Moon D-B, et al. Postresection Outcomes of Combined Hepatocellular Carcinoma-Cholangiocarcinoma, Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2016;20:411–20.
4. Portolani N, Baiocchi GL, Coniglio A, Piardi T, Grazioli L, Benetti A, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma and combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a Western experience. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:1880–90.
5. Lee W-S, Lee K-W, Heo J-S, Kim S-J, Choi S-H, Kim Y-I, et al. Comparison of Combined Hepatocellular and Cholangiocarcinoma with Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Surgery today*. 2006;36:892–7.
6. Liu C-L, Fan S-T, Lo C-M, Ng IO-L, Lam C-M, Poon RT-P, et al. Hepatic resection for combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Arch Surg*. 2003;138:86–90.
7. Lee J-H, Chung GE, Yu SJ, Hwang SY, Kim JS, Kim HY, et al. Long-term prognosis of combined hepatocellular and cholangiocarcinoma after curative resection comparison with hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:69–75.
8. Tang D, Nagano H, Nakamura M, Wada H, Marubashi S, Miyamoto A, et al. Clinical and pathological features of Allen's type C classification of resected combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: a comparative study with hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2006;10:987–98.
9. Koh KC, Lee H, Choi MS, Lee JH, Paik SW, Yoo BC, et al. Clinicopathologic features and prognosis of combined hepatocellular cholangiocarcinoma. *Am J Surg*. 2005;189:120–5.
10. Spolverato G, Bagante F, Tsilimigras D, Ejaz A, Cloyd J, Pawlik TM. Management and outcomes among patients with mixed hepatocholangiocellular carcinoma: A population-based analysis. *J Surg Oncol*. 2019;119:278–87.
11. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*. 2017;152:745–61.
12. Brunt E, Aishima S, Clavien P-A, Fowler K, Goodman Z, Gores G, et al. cHCC-CCA: Consensus Terminology for Primary Liver Carcinomas With Both Hepatocytic and Cholangiocytic Differentiation. *Hepatology*. 2018;68:113–26.

13. Wang A, Wu L, Lin J, Han L, Bian J, Wu Y, et al. Whole-exome sequencing reveals the origin and evolution of hepato-cholangiocarcinoma. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2018;9:894.
14. Jarnagin WR, Weber S, Tickoo SK, Koea JB, Obiekwe S, Fong Y, et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Cancer*. 2002;94:2040–6.
15. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *The New England journal of medicine*. United States: Massachusetts Medical Society; 2020;382:1894–905.
16. Sangro B, Melero I, Wadhawan S, Finn RS, Abou-Alfa GK, Cheng A-L, et al. Association of inflammatory biomarkers with clinical outcomes in nivolumab-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 10]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827820304797>
17. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2019;19:133–50.
18. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, et al. Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. *Gastroenterology*. 2017;153:812–26.
19. Kurebayashi Y, Ojima H, Tsujikawa H, Kubota N, Maehara J, Abe Y, et al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification. *Hepatology*. 2018;68:1025–41.
20. Xue R, Chen L, Zhang C, Fujita M, Li R, Yan S-M, et al. Genomic and Transcriptomic Profiling of Combined Hepatocellular and Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals Distinct Molecular Subtypes. *Cancer Cell*. 2019;35:932-947.e8.
21. Zheng B-H, Ma J-Q, Tian L-Y, Dong L-Q, Song G-H, Pan J-M, et al. The distribution of immune cells within combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma predicts clinical outcome. *Clinical and Translational Medicine*. 2020;10:45–56.
22. Moeini A, Sia D, Zhang Z, Camprecios G, Stueck A, Dong H, et al. Mixed hepatocellular cholangiocarcinoma tumors: Cholangiolocellular carcinoma is a distinct molecular entity. *J Hepatol*. 2017;66:952–61.
23. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:48.
24. Calderaro J, Rousseau B, Amaddeo G, Mercey M, Charpy C, Costentin C, et al. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features. *Hepatology*. 2016;64:2038–46.

25. Calderaro J, Petitprez F, Becht E, Laurent A, Hirsch TZ, Rousseau B, et al. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. Elsevier; 2019;70:58–65.
26. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports*. England: Nature Publishing Group; 2017;7:16878.
27. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 2016;32:2847–9.
28. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015;43:e47–e47.
29. <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-CHOL>
30. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Research*. 2016;44:e71–e71.
31. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu, Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017;169:1327-1341.e23.
32. Farshidfar F, Zheng S, Gingras M-C, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Rep*. 2017;18:2780–94.
33. Coulouarn C, Cavard C, Rubbia-Brandt L, Audebourg A, Dumont F, Jacques S, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas exhibit progenitor features and activation of Wnt and TGF $\beta$  signaling pathways. *Carcinogenesis*. 2012;33:1791–6.
34. Wakizaka K, Yokoo H, Kamiyama T, Ohira M, Kato K, Fujii Y, et al. Clinical and pathological features of combined hepatocellular–cholangiocarcinoma compared with other liver cancers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2019;34:1074–80.
35. Cazals-Hatem D, Rebouissou S, Bioulac-Sage P, Bluteau O, Blanché H, Franco D, et al. Clinical and molecular analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinomas. *Journal of Hepatology*. 2004;41:292–8.
36. Goodman ZD, Ishak KG, Langloss JM, Sesterhenn IA, Rabin L. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. A histologic and immunohistochemical study. *Cancer*. 1985;55:124–35.

37. Chok KS-H, Ng KKC, Cheung TT, Yuen WK, Poon RTP, Lo CM, et al. An Update on Long-Term Outcome of Curative Hepatic Resection for Hepatocholangiocarcinoma. *World J Surg.* 2009;33:1916–21.
38. Joseph NM, Tsokos CG, Umetsu SE, Shain AH, Kelley RK, Onodera C, et al. Genomic profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals similar genetics to hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2019;248:164–78.
39. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc J-F, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol.* 2017;67:727–38.
40. Zhang F, Chen X-P, Zhang W, Dong H-H, Xiang S, Zhang W-G, et al. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence. *Histopathology.* 2008;52:224–32.
41. Lanitis E, Dangaj D, Irving M, Coukos G. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors. *Annals of Oncology.* 2017;28:xii18–32.
42. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews Immunology.* 2016;16:112–23.
43. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1997;79:2320–8.
44. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88:577–83.
45. Aishima S, Kuroda Y, Asayama Y, Taguchi K, Nishihara Y, Taketomi A, et al. Prognostic impact of cholangiocellular and sarcomatous components in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Human Pathology.* 2006;37:283–91.
46. Park SH, Lee SS, Yu E, Kang HJ, Park Y, Kim SY, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: Gadoteric acid-enhanced MRI findings correlated with pathologic features and prognosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* Wiley Subscription Services, Inc.; 2017;267.
47. Park Y-H, Hwang S, Ahn C-S, Kim K-H, Moon D-B, Ha T-Y, et al. Long-Term Outcome of Liver Transplantation for Combined Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. *Transplantation Proceedings.* 2013;45:3038–40.
48. Groeschl RT, Turaga KK, Gamblin TC. Transplantation versus resection for patients with combined hepatocellular carcinoma–cholangiocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology.* 2013;107:608–12.

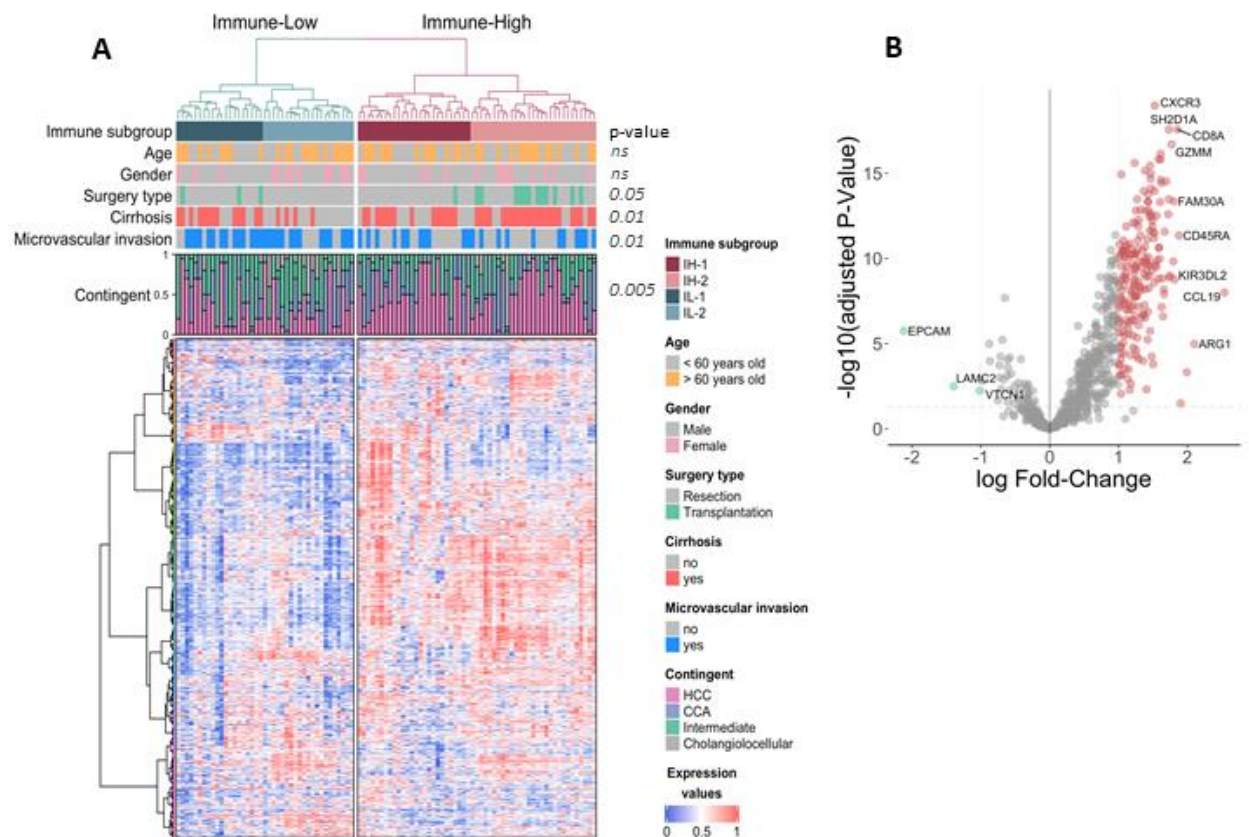


**Table 1: Baseline clinical, biological and pathological features of the patients and tumors**

<b>Variables</b>	<b>Available data</b>	<b>n (%)</b>
Gender (Male)	96	70(72.9)
Age at surgery [median (min - max)]	96	59(22-84)
<b><i>Underlying etiologies</i></b>		
Alcohol	82	37 (45.1)
HCV	93	22 (23.6)
HBV	90	20 (22.2)
NASH	80	11 (13.7)
AFP level $\geq$ 20 mg	54	27 (50)
<b><i>Pathological features</i></b>		
Largest nodule diameter [median (min - max)]	96	45 (10-250)
Metastasis at time of surgery	96	8 (8.3)
Satellite nodules	96	28 (29.1)
Multinodular tumor	96	23 (23.9)
Positive surgical margin	96	13 (13.5)
Macrovascular	96	13 (13.5)
Microvascular	96	50 (52.1)
<b><i>Non-tumor liver fibrosis</i></b>		
F0-F1	96	16 (16.7)
F2-F3	96	26 (27.0)
F4	96	54 (56.3)

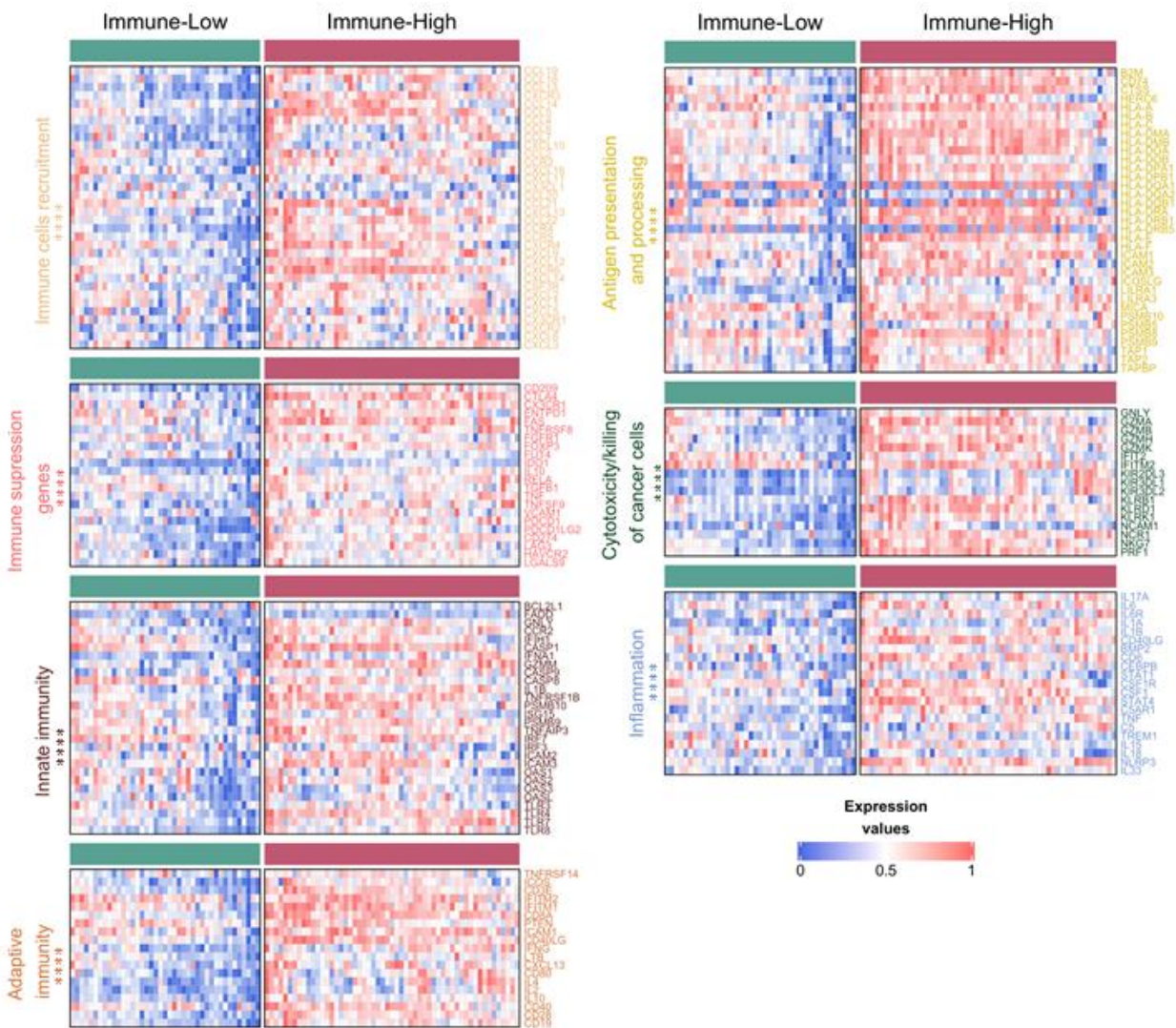
**Table 2. Univariate and multivariate Cox regression analysis for overall survival.**

Variable	Available data	Univariate analysis				Multivariate analysis			
		Hazard ratio	95% CI (lower)	95% CI (upper)	p-value	Hazard ratio	95% CI (lower)	95% CI (upper)	p-value
Age (> 60 years old)	73	0.44533	0.17507	1.13279	0.08947	-	-	-	-
Cirrhosis	73	1.42254	0.50311	4.02218	0.50630	-	-	-	-
Etiology (Alcohol)	62	0.83412	0.31003	2.24415	0.71945	-	-	-	-
Etiology (Hepatitis B)	68	2.97232	1.05907	8.34191	0.03855	5.1984	1.72374	15.6771	0.00343
Etiology (Hepatitis C)	71	1.21478	0.39574	3.72889	0.73385	-	-	-	-
Etiology (NASH)	68	1.63295	0.46000	5.79673	0.44806	-	-	-	-
Gender (Female)	73	0.37376	0.10798	1.29373	0.12031	-	-	-	-
Immune-High group	73	0.37040	0.14342	0.95658	0.04020	0.1655	0.05161	0.5306	0.00248
Largest nodule diameter	73	1.00338	0.99135	1.01556	0.58312	-	-	-	-
Macrovascular invasion	73	2.26810	0.65385	7.86762	0.19689	-	-	-	-
Microvascular invasion	73	1.95695	0.76283	5.02033	0.16249	-	-	-	-
Multinodular tumor	73	1.5870	0.6114	4.119	0.343	-	-	-	-
Preoperative AFP	43	0.99983	0.99934	1.00033	0.50762	-	-	-	-
Satellite nodules	73	2.96274	1.08364	8.10029	0.03430	6.7656	2.09553	21.8436	0.00139
Surgery type (Transplantation)	73	0.62324	0.17924	2.16714	0.45711	-	-	-	-



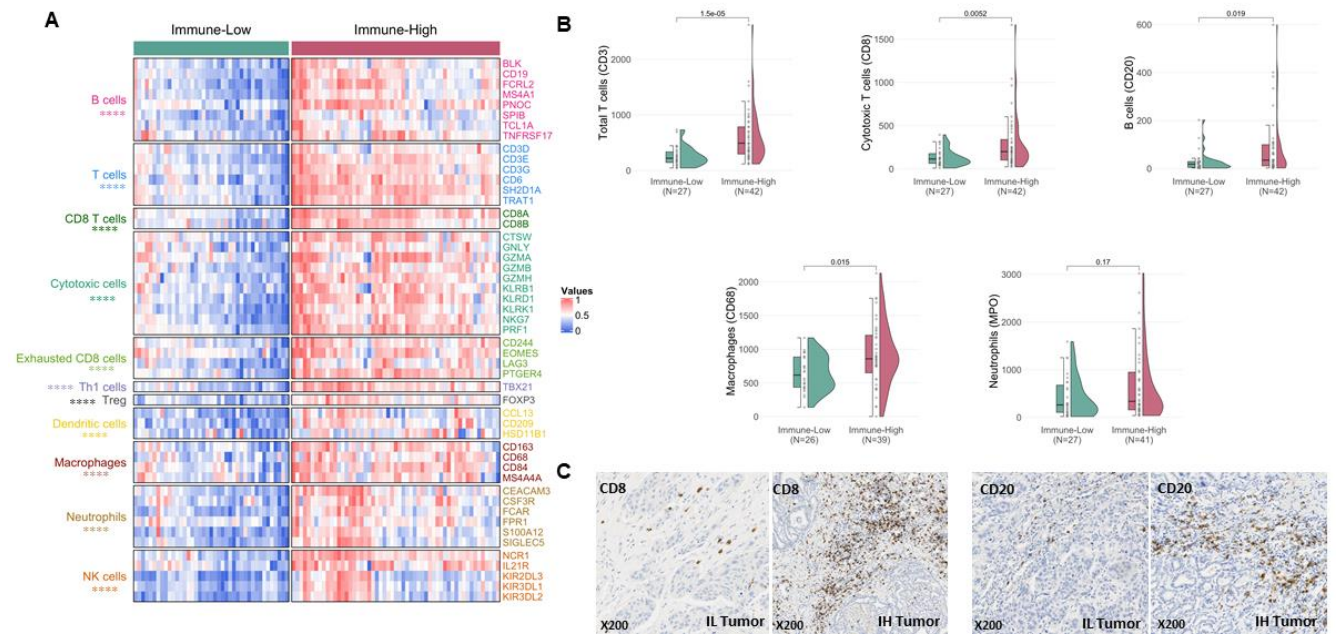
**Figure 1. Gene profiling of cHCC-CCA identifies two distinct immune subtypes.**

**A)** Hierarchical unsupervised clustering of 96 cHCC-CCA samples reveals two main subgroups characterized by different expression levels of immune-related genes (Immune High-IH, Immune Low-IL). The IH subtype is associated with cirrhosis ( $p=0.01$ ), liver transplantation ( $p=0.05$ ) and lack of microvascular invasion ( $p=0.01$ ) (Fisher's exact test) as well as the amount of different histological contingents ( $p=0.005$ ) (MANOVA). We did not observe any association with other clinical, biological and pathological features. **B)** Volcano plot showing differentially expressed genes between IH and IL cHCC-CCA subtypes. Fold changes and p value of the full list of genes investigated are presented on Supplementary Table 1. HCC: Hepatocellular carcinoma, CCA: cholangiocarcinoma, ns: no significance.



**Figure 2. Activation of various immune pathways in Immune-High cHCC-CCA subtype.**

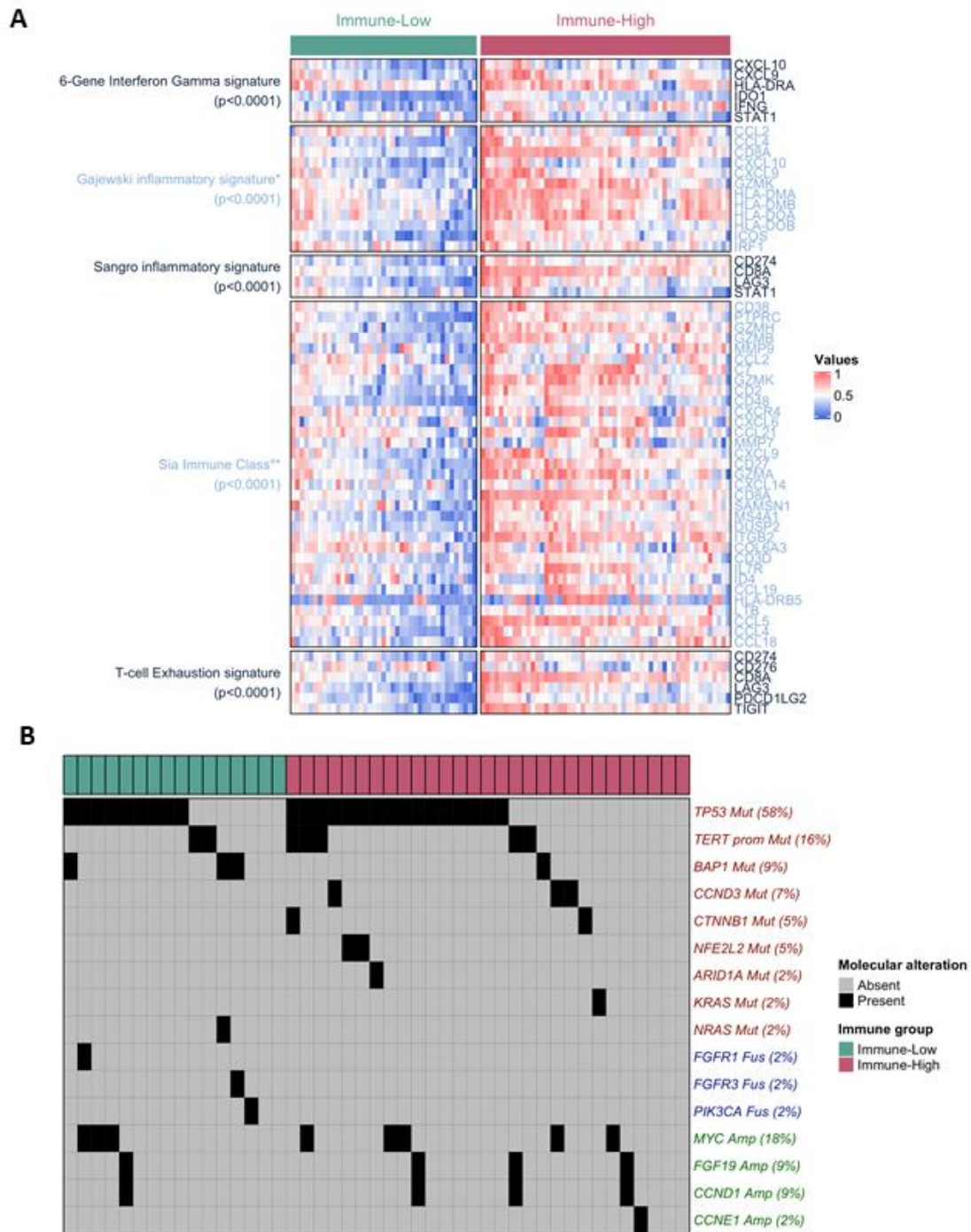
Tumors classified as cHCC-CCA shows overexpression of genes involved in innate and adaptive immunity, immune cells recruitment, immune suppression, antigen presentation, cytotoxicity and inflammation. (\*\*\*\*, p value < 0.0001), Statistical test: Wilcoxon.



**Figure 3. Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas classified as Immune-High display higher densities of intra-tumoral immune cells.**

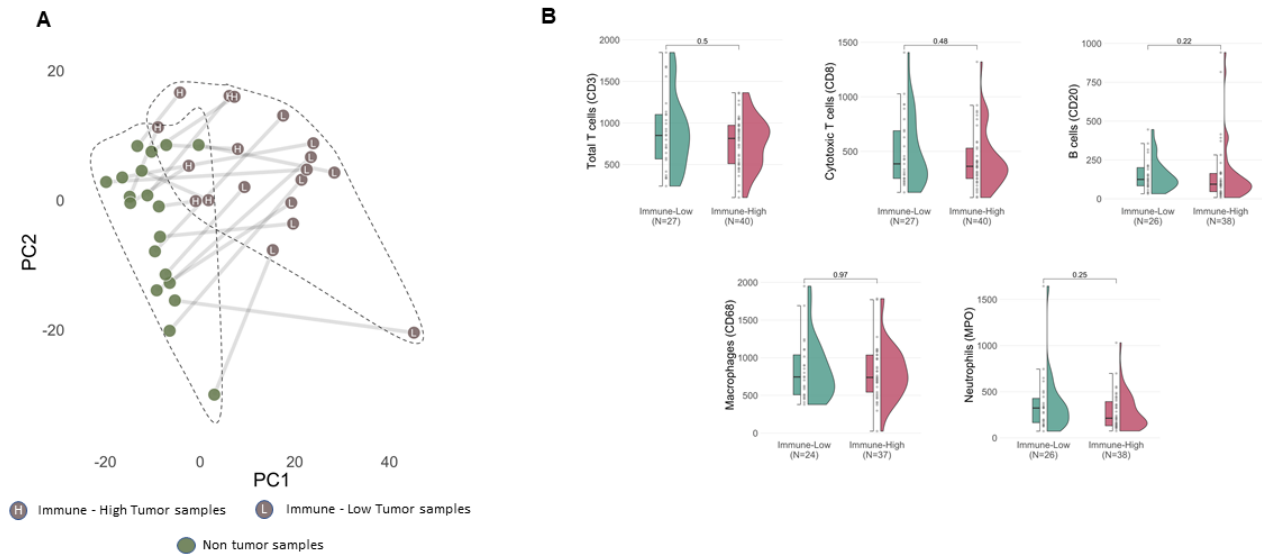
**A)** Heat maps showing overexpression of genes related to various immune cells subset in IH cHCC-CCA. B cells, T cells, CD8 T cells, Cytotoxic T cells, Exhausted T cells, Th1 cells, Treg cells, Dendritic cells, Macrophages, Neutrophils, NK cells. (\*\*\*\*, p value < 0.0001), Statistical test: Wilcoxon **B)** Quantification of immune cells densities by immunohistochemistry and image analysis software shows higher infiltration by CD3 T cells (p = 1.5e-05), CD8 T cells (p = 0.0052), B cells (p = 0.019) and macrophages (p = 0.015) in IH tumors. No difference was observed for neutrophils (p = 0.17). Densities are expressed as cell number/mm<sup>2</sup>. Statistical test: Wilcoxon **C)** Examples of anti-CD8 and anti-CD20 stainings in IH and IL cHCC-CCAs (X200, positive cells are displayed in brown).





13-Gene Inflammatory signature ( $p < 0.0001$ ), Sangro Inflammatory signature ( $p < 0.0001$ ), and T cell Exhaustion signature ( $p < 0.0001$ ). Immune-high samples also feature overexpression of 33 genes from Sia's et al immune Class of HCC ( $p < 0.0001$ ) (18). Statistical test: Wilcoxon. **B)** We did not observe any association between cHCC-CCA immune subtypes and their underlying molecular alterations.

Mut: Mutation, Fus: Fusion, Amp: Amplification \*12 out of 13 genes of the original published signature were available \*33 genes of the original published signature were available.

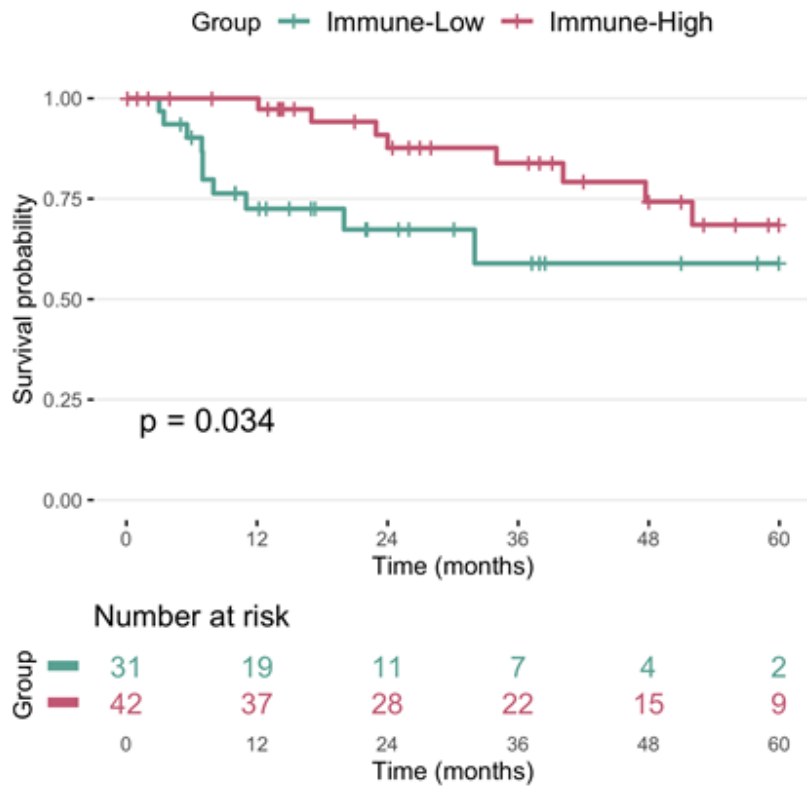


**Figure 5. The immune subtype of cHCC-CCAs is not related to the immune infiltration of the surrounding non-tumoral liver.**

**A)** For 19 cases, we performed gene expression profiling on both the tumor and the adjacent liver parenchyma. Principal component analysis with 2D representation shows that the tumoral samples do not cluster next to their non-tumoral counterpart. Each pair of samples is connected by a gray line. **B)** There is no difference in immune cells densities in the non-tumoral liver according to the immune subtype of the tumor. Total T cells ( $p = 0.5$ ), Cytotoxic T cell ( $p = 0.48$ ), B cells ( $p = 0.22$ ), Macrophages ( $p = 0.97$ ), Neutrophils ( $p = 0.25$ ). Statistical test: Wilcoxon

H: Immune-High, L: Immune-Low





**Figure 6. Prognostic impact of cHCC-CCA immune subtype.**

Kaplan-Meier Survival curves according to the immune subtype of cHCC-CCA: patients with IH tumors display a significantly prolonged overall survival ( $p = 0.034$ ) (Log-rank statistics).

**Supplementary Table 2. Immune subgroups and clinical, biological, and pathological features of the patients and tumors.**

Parameter	Immune-Low (n=41)		Immune-High (n=55)		p-value
	Available data	n (%)	Available data	n (%)	
Gender (Female)	41	12 (29.3)	55	14 (25.5)	0,854
Age at surgery [median (min - max)]	41	60 (22-84)	55	60 (30-79)	0,953
<b><i>Underlying etiologies</i></b>					
Alcohol	34	13 (38.2)	48	24 (50.0)	0,407
HCV	38	9 (23.7)	55	13 (23.6)	1
HBV	37	8 (21.6)	53	12 (22.6)	1
NASH	37	4 (10.8)	43	7 (13.2)	0,988
AFP level $\geq$ 20 ng/ml	27	12 (44.4)	27	15 (55.6)	0,586
Surgery type (Resection)	41	38 (92.6)	55	42 (76.4)	<b>0,05</b>
Largest nodule diameter [median (min - max)]	41	60 (10-160)	55	35 (10-250)	0,13
Metastasis at time of surgery	41	4 (9.8)	55	4 (7.3)	0,95
Satellite nodules	41	13 (31.7)	55	15 (27.3)	0,806
Multinodularity	41	5 (12.2)	55	18 (36.0)	<b>0,018</b>
Positive surgical margin	41	9 (22.0)	55	4 (7.3)	0,075
<b><i>Vascular Invasion</i></b>					
Macrovascular	41	7 (17.1)	55	6 (10.9)	0,568
Microvascular	41	28 (68.3)	55	22 (40.0)	<b>0,011</b>
<b><i>Non-tumor liver fibrosis</i></b>					
F0-F1	41	10 (24.4)	55	6 (10.9)	<b>0,036</b>
F2-F3	41	14 (34.1)	55	12 (21.8)	
F4	41	17 (41.5)	55	37 (67.3)	

**Supplementary Table 8: Molecular alterations identified in cHCC-CCA**

<b>Genes</b>	<b>Coding</b>	<b>Amino Acid Change</b>
TP53	c.817C>A	p.Arg273Ser
TP53	c.515T>A	p.Val172Asp
TP53	c.832C>T	p.Pro278Ser
TP53	c.451C>T	p.Pro151Ser
TP53	c.536A>G	p.His179Arg
TP53	c.527G>T	p.Cys176Phe
TP53	c.739A>C	p.Asn247His
TP53	c.298delC	p.Gln100fs
TP53	c.378_391delC	p.Tyr126Ter
TP53	c.511G>T	p.Glu171Ter
TP53	c.747G>T	p.Arg249Ser
TP53	c.686_687delGT	p.Cys229fs
TP53	c.358A>T	p.Lys120Ter
TP53	c.389T>G	p.Leu130Arg
TP53	c.380C>T	p.Ser127Phe
TP53	c.725G>A	p.Cys242Tyr
TP53	c.858A>C	p.Glu286Asp
TP53	c.481G>A	p.Ala161Thr
TP53	c.838A>T	p.Arg280Ter
TP53	c.832C>A	p.Pro278Thr
TP53	c.542_543delGC	p.Arg181fs
TP53	c.404G>A	p.Cys135Tyr
TP53	c.707A>G	p.Tyr236Cys
TERT	c.-57A>C	Unknow
TERT	c.-124C>C	Unknow
TERT	c.-124C>T	Unknow
BAP1	c.634G>T	p.Glu212Ter
BAP1	c.1185_1186insA	p.Asp396fs
BAP1	c.1098_1099insT	p.Ala367fs
CCND3	c.506C>T	p.Ser169Phe
CCND3	c.759G>T	p.Glu253Asp
CTNNB1	c.100G>C	p.Gly34Arg
CTNNB1	c.1004A>C	p.Lys335Thr
NFE2L2	c.88C>T	p.Leu30Phe
ARID1A	p.Gly914fs	c.2740_2741insCCAG
KRAS	c.35G>T	p.Gly12Val
NRAS	c.182A>G	p.Gln61Arg
NRAS	c.181C>A	p.Gln61Lys

**Fusion****Genes**

FGFR1

FGFR3

PIK3CA

**Locus**

chr8:38239317 - chr8:38315052

chr4:1808661 - chr4:1739325

chr3:176914909 - chr3:178916538

**Genes (Exon)**

WHSC1L1-FGFR1.W1F2

FGFR3(17) - TACC3(10)

TBL1XR1(1) - PIK3CA(2)

**Amplification****Genes**

FGF19

MYC

CCNE1

CCND1

**Locus**

11q13.3

8q24.21

19q12

11q13.3

**Chromosomal location**

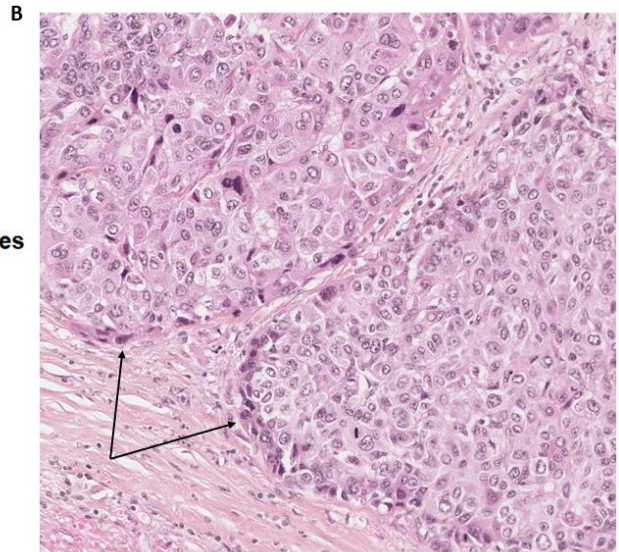
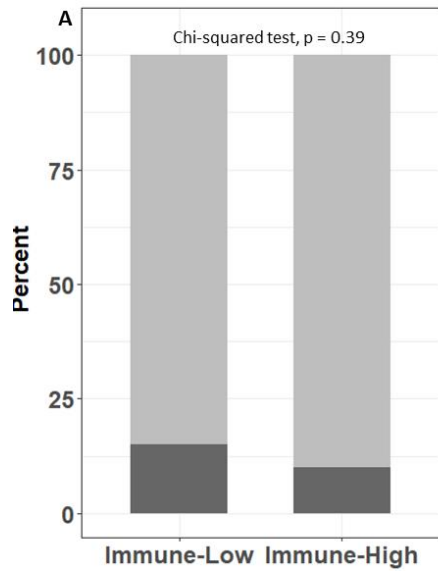
11q13.3(69513954-69518740)

8q24.21(128748724-128753198)

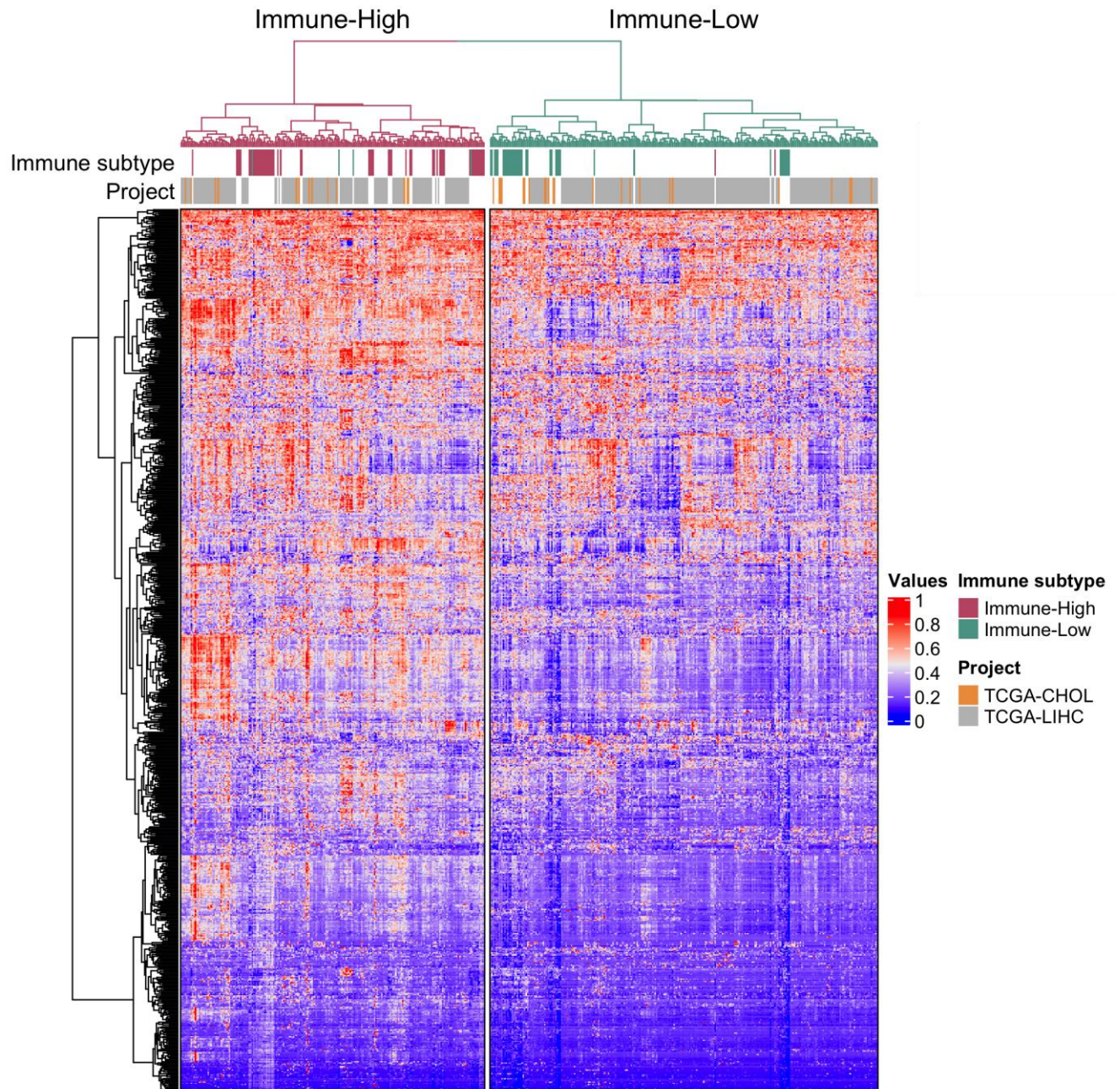
19q12(30303882-30314693)

11q13.3(69455972-69466035)

**Supplementary Figure 1. Stem cell features according to cHCC-CCA immune subtype.** A) Stem cell features were observed in a small subset of cHCC-CCAs cases (11/96), no difference was observed between IH and IL subtypes ( $p = 0.39$ ). Chi-squared test **B)** Example of stem cell features (arrows) in cHCC-CCA (H&E X400). cHCC-CCA: Combined Hepatocholangiocarcinoma

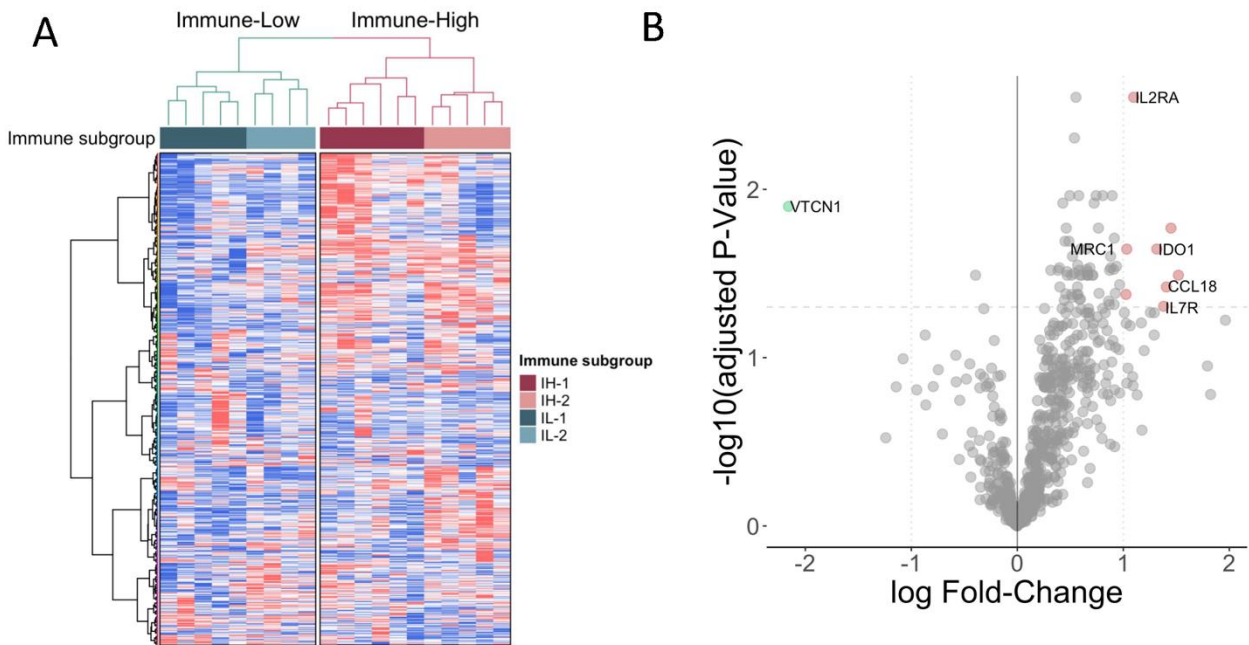


**Supplementary Figure 2. Integrative analysis of our cHCC-CCA samples (n=96) and HCC (n=355) and CCA (n=36) samples from The Cancer Genome Atlas database (31,32). cHCC-CCA retains their immune class and cluster close to HCC and CCA with similar transcriptomic features.**

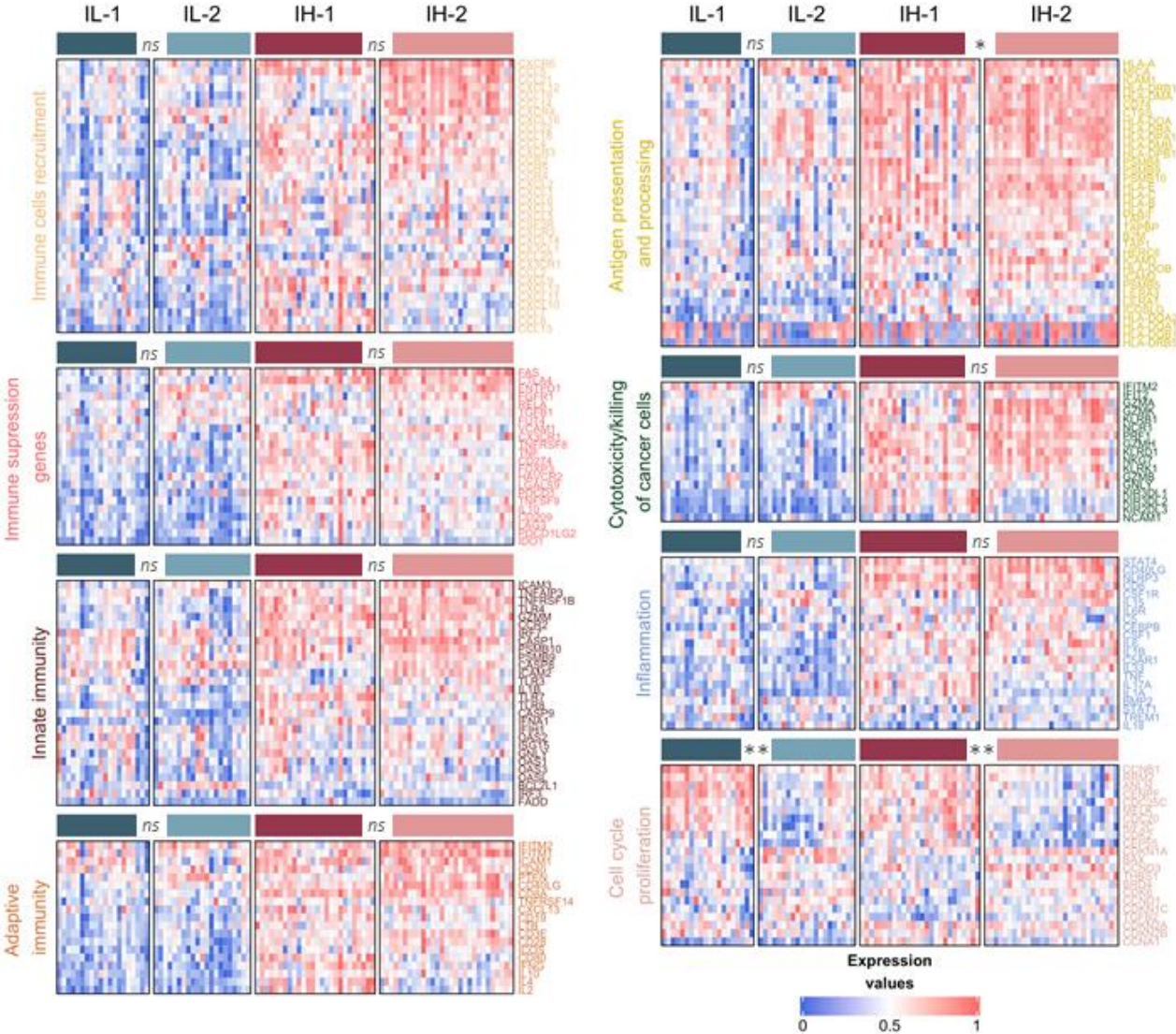




**Supplementary Figure 3. Validation of cHCC-CCA immune subtypes in a microarray public dataset consisting of 20 samples** (Coulouarn et al, Carcinogenesis, 2012) (33). A) Unsupervised hierarchical clustering showed 2 main immune clusters (high and low), with two subclusters of each main class. B) Volcano plot of dysregulated genes between the two main clusters. Genes also upregulated or downregulated in our series are highlighted. cHCC-CCA: Combined Hepatocholangiocarcinoma.

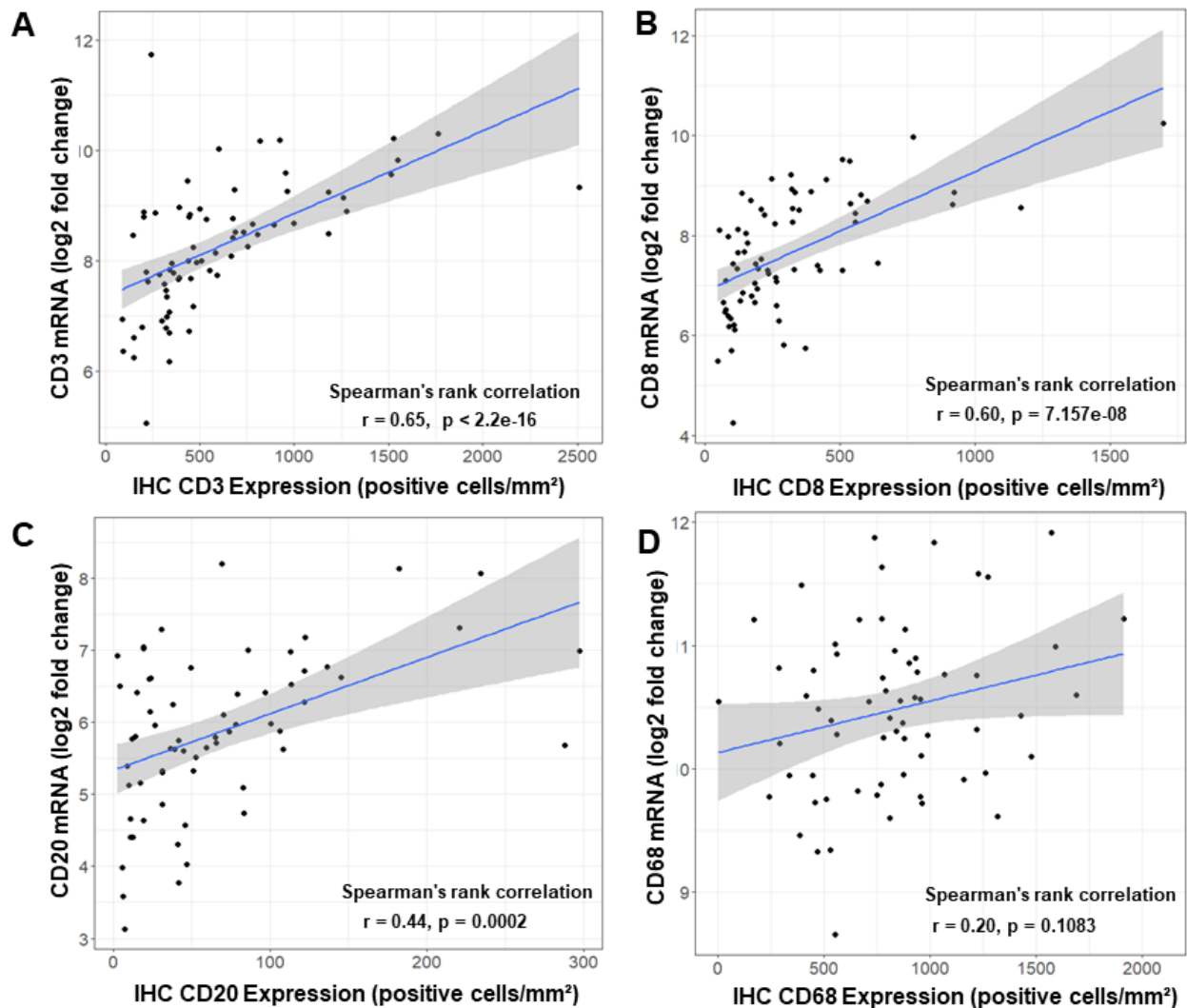


**Supplementary Figure 4. Expression of gene signatures according to cHCC-CCA subclusters (\*, p-value < 0.05; \*\*, p-value < 0.01), Statistical test: Wilcoxon. cHCC-CCA: Combined Hepatocholangiocarcinoma, ns: not significant. IL: Immune Low, IH: Immune High**

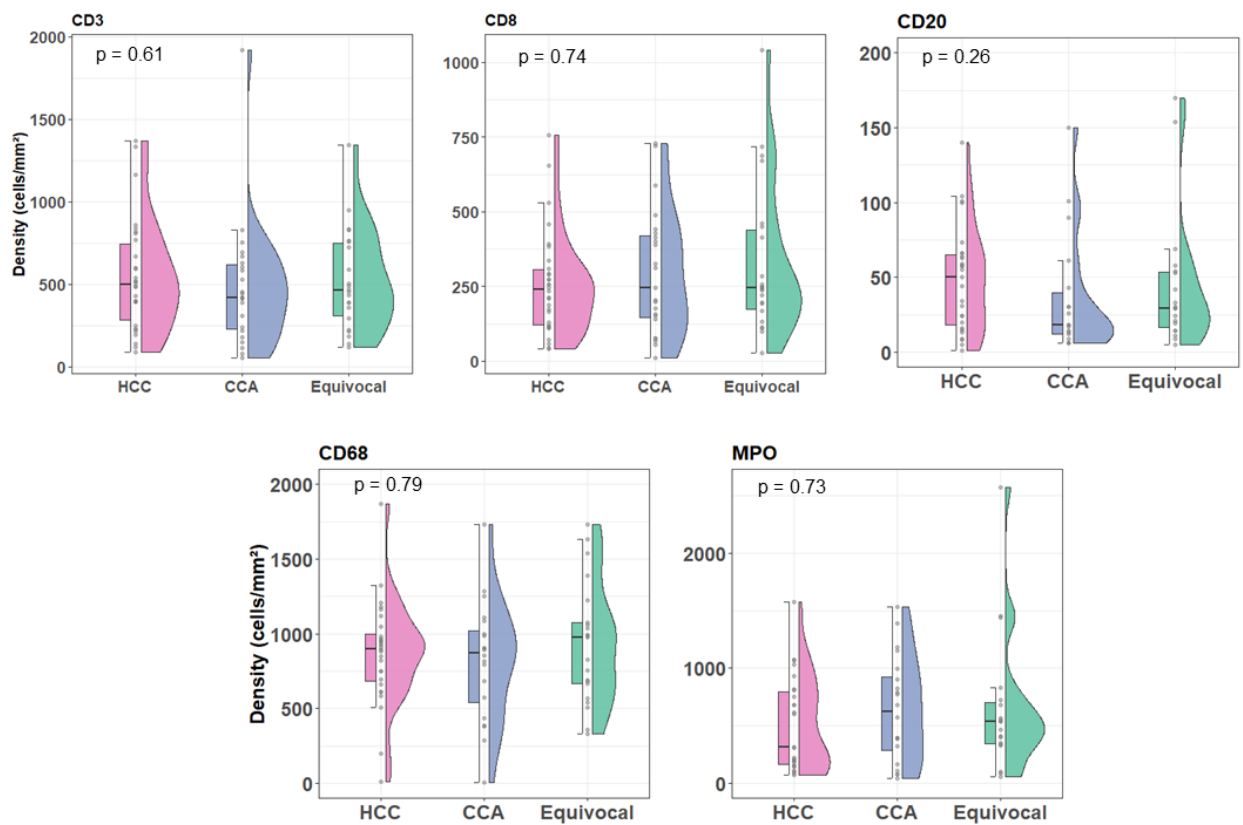




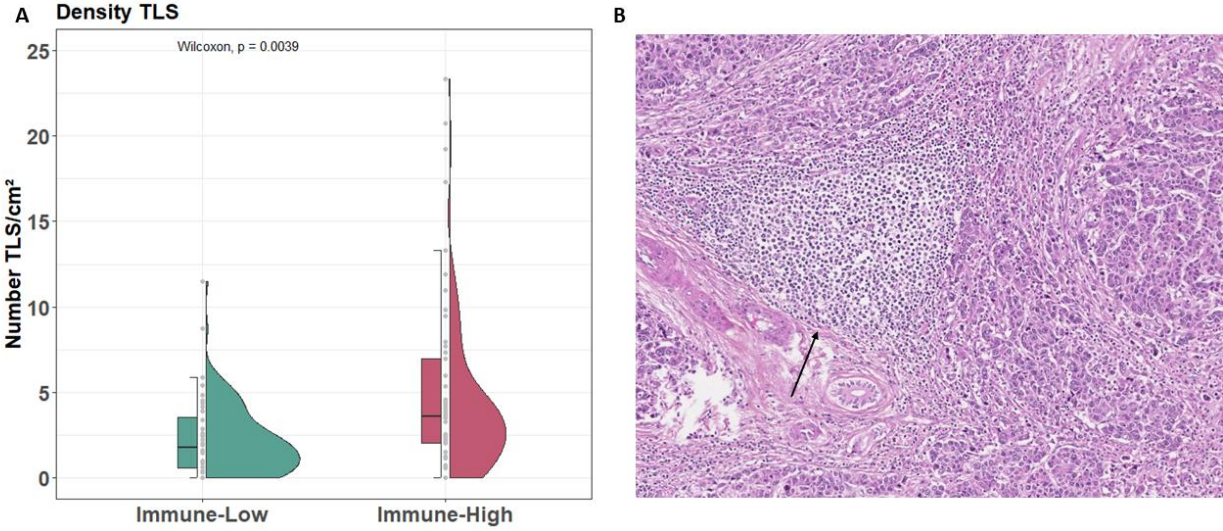
**Supplementary Figure 5. Correlations between genes expression and immunohistochemical markers.** A) CD3D mRNA and CD3 immunohistochemistry ( $r = 0.65$ ,  $p < 2.2e-16$ ). B) CD8A mRNA and CD8 immunohistochemistry ( $r = 0.60$ ,  $p = 7.157e-08$ ). C) CD20 mRNA and CD20 immunohistochemistry ( $r = 0.44$ ,  $p = 0.0002$ ). D) A trend towards a weak positive correlation was observed for CD68 ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.1083$ ). IHC: Immunohistochemistry



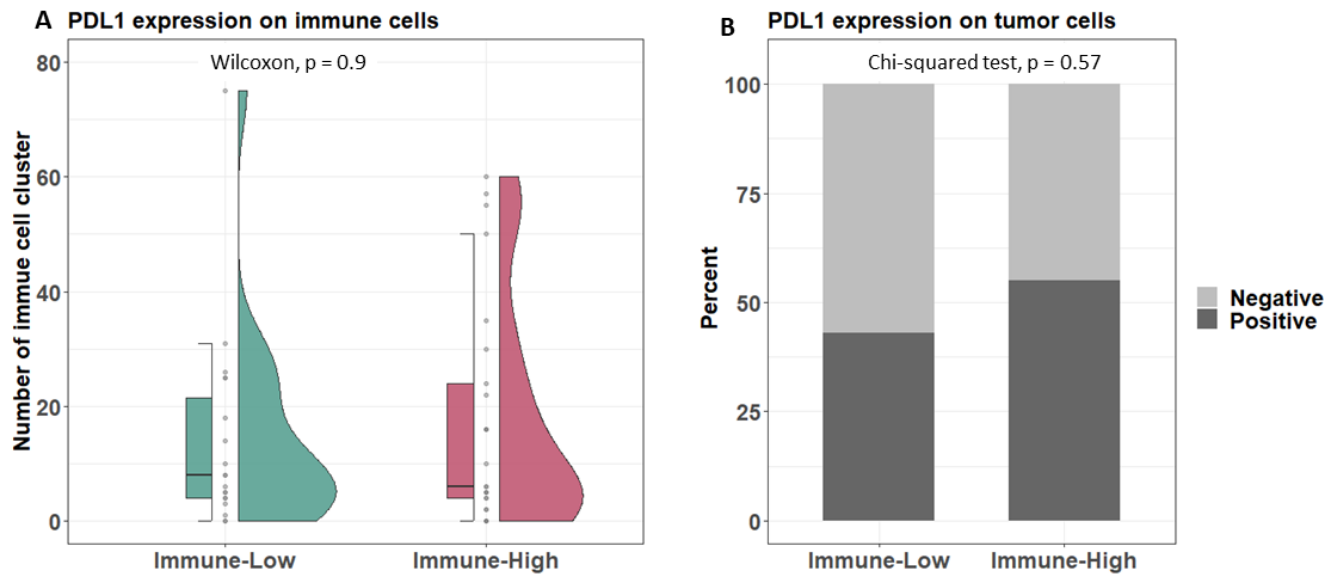
**Supplementary Figure 6. Immune cells densities according to histological components.** No difference in intra-tumoral immune cell densities between the different histological components was observed: CD3 T cells ( $p = 0.61$ ), CD8 T cells ( $p = 0.74$ ), CD20 B cells ( $p = 0.26$ ), CD68+ macrophages ( $p = 0.79$ ), MPO+ neutrophils ( $p = 0.73$ ). Kruskal – Wallis test. HCC: Hepatocellular carcinoma, CCA: Cholangiocarcinoma.



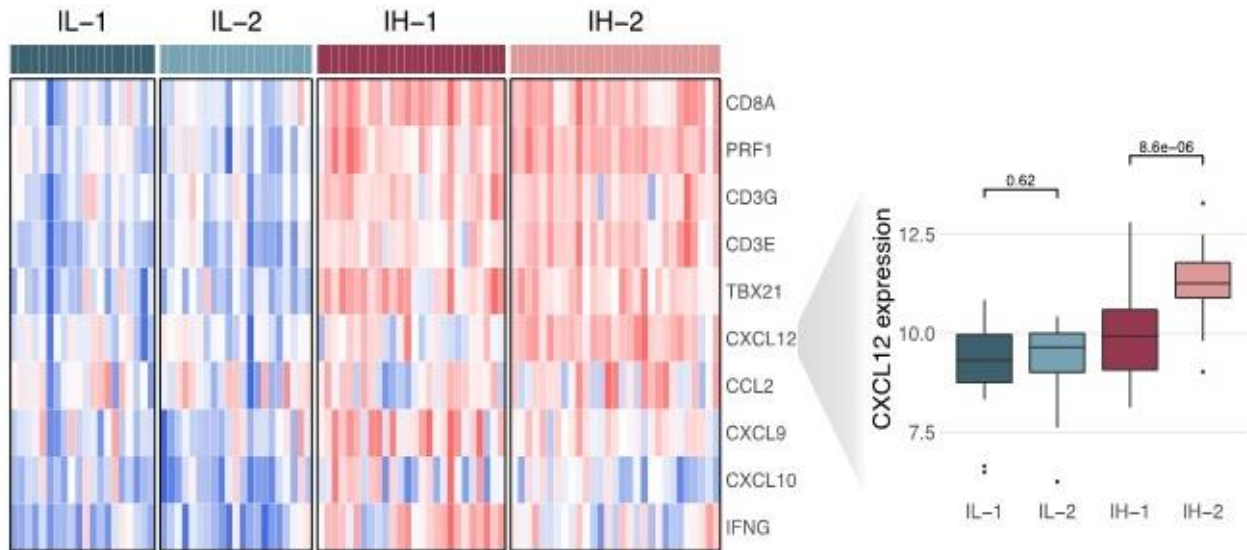
**Supplementary Figure 7. Tertiary lymphoid structures according to immune subtype.** A) Quantification of TLS density shows an increase of TLS in IH subtype, (median,  $p = 0.0039$ . Wilcoxon test. B) An Example of TLS (arrow) is shown (H&E X100). TLS: Tertiary lymphoid structure



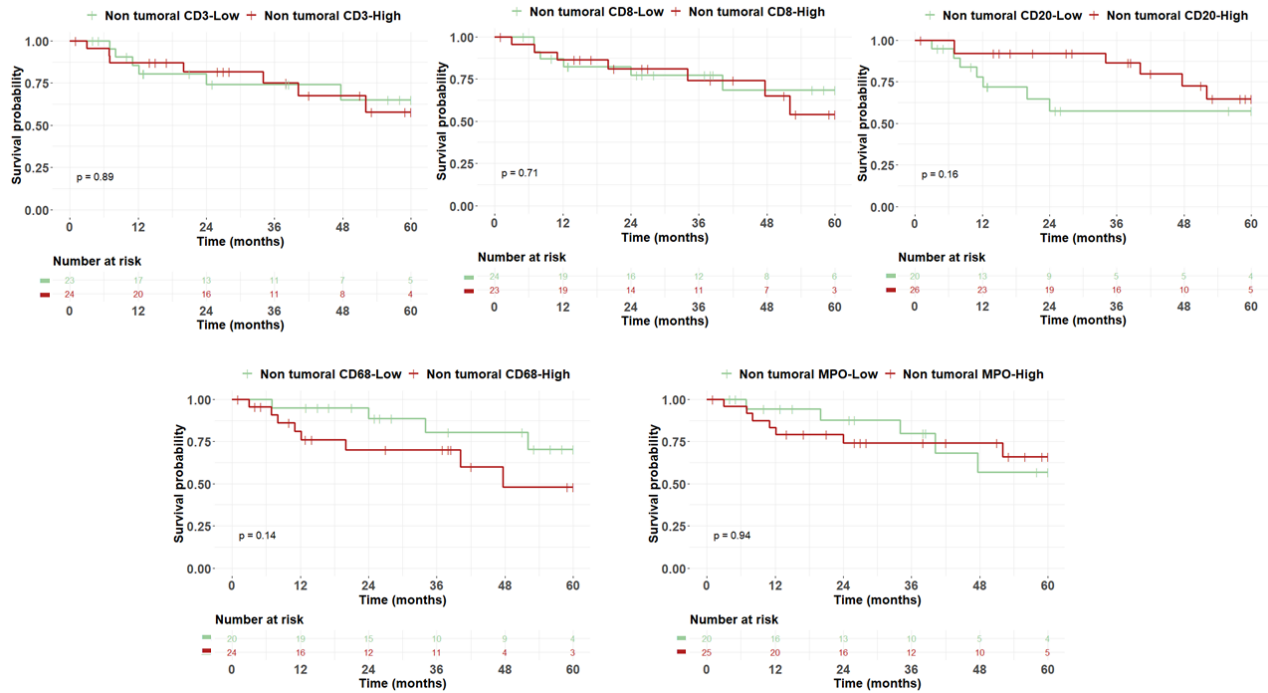
**Supplementary Figure 8. PDL1 expression according to immune subtypes.** A) No difference regarding PDL1 expression on immune cells was observed between IH and IL subtype ( $p = 0.9$ , Wilcoxon test). B) There was also no significant difference regarding expression PDL1 on tumor cells ( $p = 0.57$ , Chi-squared test) IHC: Immunohistochemistry, PDL1: Programmed death ligand 1



**Supplementary Figure 9. Expression of genes linked to the immune exhausted and active subtypes (Sia et al, Gastroenterology, 2017), according to cHCC-CCA subclusters (18). The only significant statistical difference was observed for CXCL12 expression, between IH-1 and IH-2 subclusters ( $p=8.6e-06$ ), statistical test: Wilcoxon. IL: Immune Low, IH: Immune High**



**Supplementary Figure 10. Immune cell densities in non tumoral tissue and overall survival time of HCC-CCAs:** There is no impact of CD3 T cells ( $p = 0.89$ ), CD8 T cells ( $p = 0.71$ ), CD20 B cells ( $p = 0.16$ ), CD68+ macrophages ( $p = 0.14$ ), and MPO+neutrophils ( $p = 0.94$ ) densities on overall survival of patients with cHCC-CCAs. Median values of immune cell densities were selected as cut-off values to determine low and high groups. Log-rank statistics



## 4 Discussion

Le rôle majeur du microenvironnement immunitaire a été mis en évidence dans plusieurs types de cancer y compris dans les cancers primitifs du foie.(159–162) En effet, les tumeurs malignes développent des mécanismes leur permettant de progresser, tel que l'échappement à l'immunité antitumorale et le recrutement de populations pro-tumorales. La caractérisation du microenvironnement immunitaire et des mécanismes associés est ainsi indispensable à la compréhension de la progression tumorale et au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons étudié les caractéristiques du microenvironnement immunitaire intra hépatique et intra tumorale au cours de deux projets distincts. L'un a porté sur l'impact éventuel des AAD sur les mécanismes d'immunosurveillance et l'autre sur la caractérisation des profils immunologiques des CHC-CCA, un tumeur primitive hépatique particulièrement agressive et encore peu étudiée.

L'arrivée des AAD en 2014 a révolutionné la prise en charge des patients atteints par le VHC, avec une très bonne tolérance et des taux de RVS de plus de 95% quel que soit le génotype viral.(17) Cependant, quelques publications ont rapidement rapporté que l'éradication virale brutale induite par les AAD était susceptible de favoriser la carcinogenèse de novo ou la récurrence tumorale chez les patients chez qui un CHC a été diagnostiqué avant le début du traitement antiviral.(18,19) L'hypothèse principale des auteurs était celle d'une modification brutale de l'environnement immunitaire intrahépatique induite par l'éradication rapide du VHC.(163) Au cours de la première partie de ma thèse, nous avons analysé ces éventuelles modifications pour déterminer si elles étaient susceptibles de favoriser le développement tumoral. Nous avons ainsi comparé le profil d'expression génique et les densités des principales cellules immunitaires dans les tissus hépatiques tumoraux et non tumoraux de patients traités ou non par AAD. Nos résultats indiquent qu'il n'existe pas de modifications importantes du microenvironnement immunitaire intra hépatique pouvant expliquer un potentiel sur-risque de carcinogenèse ou de récurrence. Nous n'avons en effet observé des modifications significatives de l'expression d'uniquement 12 gènes après traitement par AAD. De manière intéressante, la majorité (10/12) de ces gènes sont connus pour être régulés par la voie de l'IFN.

Ces résultats sont en accord avec les données précédemment décrites dans la littérature. Holmes et al. ont ainsi montré une diminution de l'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISGs) dans les cellules mononuclées périphériques de patients atteints du VHC, après 2 et 4 semaines de traitement par AAD.(164) Meissner et ses collaborateurs ont validé ces données dans échantillons de tissu hépatique, mais n'avaient pas inclus dans leur étude de patients ayant développé de CHC.(165) Notre étude, menée chez des patients atteints du VHC, traités et ayant développé un CHC a confirmé ces résultats. En effet, nous avons mis en évidence une diminution d'expression de 10 gènes liés à l'IFN (*MX1, ISG15, IFIT1, IFIT3, IFI6, OAS2, OAS1, PARP12, RSAD2, OASL*) dans les tissus non tumoraux de patients traités. De façon intéressante, dans les tissus tumoraux, aucune modification significative n'a été observée. Cette diminution d'expression des ISGs est ainsi probablement la conséquence de la disparition rapide des antigènes viraux suite au traitement.(164,165)

L'interféron joue un rôle important dans le système immunitaire inné et les ISGs sont connus pour stimuler le processus de surveillance immunitaire anti-tumorale dans différents types de cancer.(165,166) De plus, les interférons de type I favorisent également l'activité des lymphocytes T cytotoxiques en augmentant l'expression de la perforine 1 et du granzyme B, et d'autre part peuvent également inactiver la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs.(166–168) Certaines publications ont également montré qu'une réduction de l'expression de l'IFN-I est associée à un pronostic défavorable et une réponse thérapeutique plus faible dans différents cancers.(169,170)

Malgré ces données, il nous paraît peu probable que cette modulation puisse contribuer de manière significative à la carcinogène chez les patients traités. En effet, aucune autre modification n'a été identifiée dans les autres voies connues pour jouer un rôle majeur dans les réponses immunes: points de contrôles immunitaires (e.g *PD1, PDL1, CTLA4, LAG3*), cytotoxicité (e.g *GZMA, PRF1*), cellules T régulatrices (*RORC, FOXP3*), cellules NK (*NCR1, KIR3DL2, KIR2DL1, KLRB1*), cellules B (*CD19, CD27, CD80, IL11*) ou encore présentation antigéniques (*HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DQA1, HLA-DRA, TAP1, THBS1*).



Meissener et al ont montré que le traitement par les AAD induisait une diminution des lymphocytes T activés CD4+ ou CD8+ périphériques, et Il a été d'autre part mis en évidence que les AAD entraînaient une réduction de l'expression de *CXCL10* dans le foie, une cytokine clé pour le recrutement in situ des cellules immunitaires.(171,172) Nos analyses immunohistochimiques, en accord avec nos résultats de profil d'expression, n'ont cependant pas détecté de modifications dans les densités des populations immunitaires que nous avons étudiées. Il n'y avait pas non plus de différence dans les densités de structures lymphoïdes tertiaires. Enfin, les analyses du microenvironnement intra-tumoral n'ont montré aucune différence significative.

De manière intéressante, nous avons retrouvé chez une majorité de patients en RVS après traitement par AAD, des lésions nécro-inflammatoires persistantes avec présence de cellules immunitaires au contact des hépatocytes. Cela avait été déjà précédemment décrit, et les mécanismes impliqués dans le maintien de cette inflammation résiduelle restent encore mal compris.(173) Pour tenter d'expliquer ces phénomènes, Hamdane et ses collaborateurs ont analysé, par des techniques de RNA seq et de Chip-Seq, une série d'échantillons de patients atteints par le VHC traités ou non par AAD ou IFN. Leur hypothèse était que les modifications épigénétiques induites par le virus pouvait expliquer la persistance de lésions parenchymateuses. Ils ont ainsi observé que l'infection chronique par le VHC entraînait une acétylation du résidu lysine à la position N-terminale 27 de la protéine histone H3, et que cette modification persistait chez patient guéris après traitement par AAD ou interféron. De manière intéressante, cette altération induit une activation de plusieurs voies moléculaires comme la voie PIK3/AKT ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse Ces données pourraient expliquer que les patients infectés ont toujours un risque important de développer un CHC, même après éradication virale.(174) Perez et al. ont eu des résultats comparables en identifiant d'autres altérations épigénétiques (l'acétylation du résidu lysine à la position N-terminale 9 de la protéine histone H3) induites par le VHC et persistantes après éradication du virus. Cette altération induisait une surexpression d'une signature incluant 8 gènes (*TNFAIP3*, *FOSL2*, *WNT10A*, *KLF4*, *EDN1*, *JUNB*, *MYCN*, *PCSK9*) et qui était associé à un risque accru de développer un CHC après traitement.(175) Même si des travaux complémentaires sont nécessaires pour conclure sur les mécanismes précis, l'ensemble de ces données montre que des lésions induites par le virus sont toujours présentes

même après éradication et qu'elles pourraient expliquer, au moins en partie, les lésions nécro-inflammatoires persistantes.

En conclusion, au cours de ce premier travail, nous avons mis en évidence que l'éradication virale brutale induite par les AAD n'entraînait pas de changement majeur du microenvironnement immun intrahépatique. Nos résultats ne soutiennent donc pas les hypothèses formulées par les auteurs ayant rapporté un sur risque de développer un CHC après traitement. Il convient d'ajouter que depuis notre travail, de nombreuses publications dont certaines provenant de cohortes prospectives ont également infirmé ces hypothèses.(176,177)

La principale limite de notre étude est le faible nombre d'échantillons examinés. En effet, il est possible que des variations fines de l'expression de certains gènes n'aient pu être mises en évidence en raison d'un manque de puissance statistique. L'impact du temps écoulé entre RVS et le prélèvement pourrait également avoir une importance qu'il faudra déterminer en analysant de larges séries d'échantillons (ils restent cependant très difficiles à obtenir). Le risque de développement du CHC causé par le VHC est décrit comme étant différent en fonction des génotypes viraux.(178,179) Nous n'avons en effet pas pu analyser en détail la diversité du génotypage du VHC sur cette cohorte. Il serait donc intéressant de mener le même type d'expériences sur une plus large cohorte pour confirmer et valider nos résultats. Par ailleurs, une investigation plus approfondie des altérations épigénétiques après traitement par AAD pourrait permettre de mieux expliquer les lésions inflammatoires persistantes après éradication virale.

Pour la deuxième partie de ma thèse, j'ai caractérisé le microenvironnement immunitaire d'un type particulier des cancers primitifs du foie, les tumeurs mixtes de type hépatocholangiocarcinome (CHC-CCA).

Les CHC-CCA constituent un sous-type plus rare de cancer primitif du foie (moins de 5% de cas).(76,78) Elles sont caractérisées par la présence d'un double phénotype hépatocellulaire et cholangiocellulaire.(23) Les difficultés de diagnostic, l'hétérogénéité histologique, et la rareté de ces lésions expliquent qu'il n'y ait à l'heure actuelle aucun traitement systémique ayant fait la preuve de son efficacité. Ces tumeurs sont notamment fortement radio- et chimio-résistantes, et un certain nombre d'études de séquençage à haut débit ont été menées à la découverte d'anomalies génétiques potentiellement "ciblables". Malheureusement, en dehors de ces rares avec fusion de *FGFR2* (6%) ou une mutation d'*IDH1/2* (<10%), la plupart des tumeurs ne comportent aucune altération pouvant constituer une cible thérapeutique.(86) Nous nous sommes donc intéressés à leur microenvironnement immunitaire, pour déterminer si un sous-groupe de patients atteints de ces cancers pourraient être candidats à des thérapies immunomodulatrices.

Nous avons identifié deux groupes de tumeurs en fonction de leur niveau d'expression de gènes impliqués dans les principales voies immunitaires. Les résultats ont montré que le groupe IH présentait une forte infiltration immunitaire avec surexpression de gènes associés aux cellules T et B, cellules NK, macrophages, et neutrophiles. Nous avons ensuite vérifié ces résultats en quantifiant les densités des cellules immunitaires sur des lames immunohistochimiques digitales. Comme attendu, les résultats étaient en accord avec ceux observés par étude du profil d'expression génique. De plus, en quantifiant les structures lymphoïdes tertiaires (SLT) dans les tissus tumoraux, nous avons trouvé que la densité de SLT est plus importante dans les tissus tumoraux de groupe IH par rapport au groupe IL. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous ont permis de conclure que le sous-groupe IH présentait une infiltration immune intratumorale accrue.

Nous avons ensuite analysé l'impact du groupe immunitaire sur le pronostic pour les patients atteints de CHC-CCA. En utilisant le modèle à risque proportionnel (régression de Cox),

nous avons observé que les caractéristiques classiques comme la taille tumorale, l'invasion vasculaire, et le taux sérique d'AFP n'étaient pas liés à la survie globale. De manière intéressante, nos résultats ont montré que le groupe immunitaire IH était un facteur indépendant associé à un bon pronostic. Notre résultat met une nouvelle fois en évidence l'impact du microenvironnement immunitaire sur le pronostic du cancer du foie, cette fois-ci dans le CHC-CCA, et comme précédemment établi dans le CHC et CCA.(180,181)

Nous avons ensuite cherché à déterminer si ces groupes immunitaires étaient associées à des altérations génétiques particulières. En utilisant des techniques ciblées de séquençage nouvelle génération (NGS) pour 45 cas sélectionnés aléatoirement dans la cohorte, nous avons ainsi montré que les altérations du gène *P53* (58% des cas) et du promoteur de *TERT* (16% des cas) étaient les événements moléculaires les plus fréquentes dans ce type de cancer. Nos résultats sont cohérents avec les résultats d'autres auteurs.(182,183) Les autres mutations n'étaient observées que dans très peu de cas (*BAP1* 9%, *CCND3* 7%, *CTNNB1* 5%, *ARID1A* 2%, *KRAS* 2%), et sous cette réserve, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre sous-groupe immunitaire et altération génétique.

Cette hétérogénéité immunitaire inter-tumorale a été précédemment observée dans plusieurs autres types de cancer. Ainsi, Guinney et ses collaborateurs ont rapporté un sous-groupe immunitaire de cancer colorectal représentant environ 15% des cas caractérisés par une infiltration lymphocytaire importante et par un bon pronostic.(184) Il a été également montré que cet infiltrat avait une valeur pronostique plus importante que les critères cliniques et anatomopathologiques classiques.(185) Dans les autres cancers primitifs hépatiques (CHC et CCA), l'existence de tels sous-types immunitaires a également été mise en évidence. Sia et al ont ainsi analysé le profil d'expression de près de 1000 tumeurs et ont identifié un sous-groupe immunitaire de CHC corrélé à un meilleur pronostic et caractérisé par l'absence de mutations du gène *CTNNB1*.(180) Un groupe français a récemment mis en évidence 4 sous-groupes immunitaires de cholangiocarcinome intrahépatique, nommés de I1 à I4. Les auteurs ont démontré que le groupe I2, qui correspond aux tumeurs « inflammatoires », était caractérisée par une activation, de diverses voies immunitaires . De manière intéressante, il était également associé à une meilleure survie globale.(181)

Les patients qui présentent le sous-type “immune-high” de CHC-CCA pourraient constituer des candidats à l’immunothérapie. En effet, il est bien établi que les réponses après traitement par immunomodulateurs sont essentiellement observées quand les tumeurs présentent un important infiltrat immunitaire. Ainsi, même si les essais thérapeutiques basés sur l’immunothérapie chez les patients atteints de CHC ont été négatifs, il a ensuite été montré, en analysant le profil d’expression de prélèvements biopsiques, que les réponses s’observent en cas d’activation de certaines signatures géniques.(186) Dans notre étude nous avons également analysé ces signatures et avons constaté, dans les tumeurs de groupe IH, une surexpression de ces signatures.

Notre étude a porté sur des échantillons obtenus par résection chirurgical. L’immunothérapie est cependant envisagée pour les patients au stade avancé de la maladie, qui ne sont donc plus éligibles aux traitements curatifs comme la résection ou la transplantation hépatique. Il est donc nécessaire de valider ces résultats sur prélèvement biopsique. Une technique de séquençage d’ARN à haut débit (RNA seq) des échantillons pourrait compléter notre étude par l’analyse de l’ensemble du transcriptome. Nous pourrions ainsi identifier certaines voies biologiques potentiellement associées aux sous-groupes immunitaires. Il serait également particulièrement intéressant d’étudier les séquences du TCR afin d’évaluer la réponse spécifique des cellules T aux différents antigènes.

Enfin, nous avons ensuite comparé le profil des CHC-CCA avec celui du CHC ou du CCA décrits dans la littérature. Nous avons ainsi intégré une analyse transcriptomique intégrative comprenant nos échantillons de CHC-CCA, 355 cas de CHC et une série de 36 cas de CCA (publiés sur la plateforme de TCGA).(187,188) Nous avons identifié deux groupes immunitaires principaux et de manière intéressante les CHC-CCA de groupe IH et IL restaient répartis dans leur sous type respectif.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre en évidence un groupe immunitaire de tumeurs mixte de type CHC-CCA, le groupe IH, qui est caractérisé par la surexpression de plusieurs voies immunitaires et associée à un meilleur pronostic de la maladie. De plus, ce groupe de tumeurs exprime fortement les signatures immunitaires qui ont été démontrées comme étant

prédictives d'une réponse à l'immunothérapies chez les patients atteints de CHC. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'immunothérapie pourrait constituer une approche prometteuse dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de ce sous-groupe de CHC-CCA.

## 5 Conclusions

Les travaux réalisés ont ainsi porté sur la caractérisation du microenvironnement immunitaire des cancers primitifs du foie dans deux contextes différents : 1) les modifications du microenvironnement immunitaire pouvant survenir après éradication virale brutale par AAD et 2) le microenvironnement immunitaire de tumeurs hépatiques primitives rares et peu caractérisées, les tumeurs mixtes de type CHC-CCA.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que les foies non tumoraux et les tumeurs des patients ayant reçu un traitement par AAD présentaient un profil immunologique similaire aux tumeurs et aux foies non tumoraux des patients n'ayant pas reçu de traitement antiviral. En effet la densité des populations immunitaires ainsi que le profil d'expression génique était similaire entre les deux populations de patients. De façon intéressante, seules des modifications mineures du système immunitaire ont été notées dans le parenchyme non tumoral avec une diminution notable des gènes régulés par l'IFN chez les patients ayant reçu un traitement par AAD. Ces résultats montrent que les patients ayant reçu un traitement AAD ne semblent pas présenter pas de dysfonction majeures de l'immuno-surveillance intrahépatique. Nos résultats sont concordants avec les récents travaux menés sur de larges cohortes qui ont démontré que le traitement par les AAD n'entraînait pas d'augmentation du taux de survenue ou de récurrence du CHC

Dans un second temps, notre caractérisation des tumeurs mixtes de type CHC-CCA a permis de mettre en évidence un profil immunitaire hétérogène. Deux sous-groupes ont été observés, les CHC-CCA « immune high » (IH) et les CHC-CCA « immune low » (IL). De façon intéressante, le groupe immunitaire IH, qui représente environ 60% des cas, était associé à un meilleur pronostic. Si ces patients pourraient être des candidats potentiels à l'immunothérapie, cela devra être démontré par des essais cliniques prospectifs.

## Références

1. 11-Liver-fact-sheet.pdf [Internet]. [cited 2021 Jul 29]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>
2. Cancer today [Internet]. [cited 2021 Jul 29]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>
3. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:6.
4. Singal AG, Lampertico P, Nahon P. Epidemiology and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: New Trends. *J Hepatol*. 2020;72:250–61.
5. Borie F, Trétarre B, Bouvier A-M, Faivre J, Binder F, Launoy G, et al. Primitive liver cancers: epidemiology and geographical study in France. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2009;21:984–9.
6. Trinchet J-C, Ganne-Carrié N, Nahon P, N'kontchou G, Beaugrand M. Hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2455–60.
7. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003;362:1907–17.
8. Tan Y-J. Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17:4853–7.
9. Yang H-I, Lu S-N, Liaw Y-F, You S-L, Sun C-A, Wang L-Y, et al. Hepatitis B e Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa013215>. Massachusetts Medical Society; 2009 [cited 2021 Jul 30]. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa013215>
10. Chang M-H, You S-L, Chen C-J, Liu C-J, Lai M-W, Wu T-C, et al. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. *Gastroenterology*. Elsevier; 2016;151:472-480.e1.
11. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142:1264-1273.e1.
12. El-Serag HB, Kanwal F. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the United States: Where Are We? Where Do We Go? *Hepatology*. 2014;60:1767–75.
13. Group TRHCPOCTA. Natural History of Hepatitis C - Viral Hepatitis and Liver Disease [Internet]. [cited 2021 Dec 21]. Available from: <https://www.hepatitis.va.gov/hcv/background/natural-history.asp>



14. Bertino G, Ardiri A, Proiti M, Rigano G, Frazzetto E, Demma S, et al. Chronic hepatitis C: This and the new era of treatment. *World Journal of Hepatology*. Baishideng Publishing Group Inc.; 2016;8:92–106.
15. Asselah T, Marcellin P, Schinazi RF. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? *Liver International*. 2018;38:7–13.
16. Muriel D. Haute Autorité de santé. 2019;86.
17. Ravi S, Axley P, Jones D, Kodali S, Simpson H, McGuire BM, et al. Unusually High Rates of Hepatocellular Carcinoma After Treatment With Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Related Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2017;152:911–2.
18. Reig M, Mariño Z, Perelló C, Iñarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *Journal of Hepatology*. 2016;65:719–26.
19. Conti F, Buonfiglioli F, Scuteri A, Crespi C, Bolondi L, Caraceni P, et al. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *Journal of Hepatology*. 2016;65:727–33.
20. Ganne-Carrié N, Chaffaut C, Bourcier V, Archambeaud I, Perarnau J-M, Oberti F, et al. Estimate of hepatocellular carcinoma incidence in patients with alcoholic cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2018;69:1274–83.
21. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49:851–9.
22. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2018;69:182–236.
23. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, editors. Digestive system tumours. 5th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2019.
24. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149:1226-1239.e4.
25. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *Journal of Hepatology*. 2019;71:616–30.
26. Caruso S, O'Brien DR, Cleary SP, Roberts LR, Zucman-Rossi J. Genetics of Hepatocellular Carcinoma: Approaches to Explore Molecular Diversity. *Hepatology*. 2021;73 Suppl 1:14–26.

27. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun.* 2013;4:2218.
28. Vilchez V, Turcios L, Marti F, Gedaly R. Targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. *World J Gastroenterol.* 2016;22:823–32.
29. Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics.* 2013;102:74–83.
30. Khemlina G, Ikeda S, Kurzrock R. The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. *Molecular Cancer.* 2017;16:149.
31. Ahn S-M, Jang SJ, Shim JH, Kim D, Hong S-M, Sung CO, et al. Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology.* 2014;60:1972–82.
32. Zhou L, Huang Y, Li J, Wang Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2010;27:255–61.
33. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008;135:1972–83, 1983.e1-11.
34. Oba A, Shimada S, Akiyama Y, Nishikawaji T, Mogushi K, Ito H, et al. ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol.* 2017;66:942–51.
35. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. New Insights into the Epigenetics of Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International.* Hindawi; 2017;2017:e1609575.
36. Haque E, Karim MR, Salam Teeli A, Śmiech M, Leszczynski P, Winiarczyk D, et al. Molecular Mechanisms Underlying Hepatocellular Carcinoma Induction by Aberrant NRF2 Activation-Mediated Transcription Networks: Interaction of NRF2-KEAP1 Controls the Fate of Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21:E5378.
37. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouzé E, Blanc J-F, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol.* 2017;67:727–38.
38. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19:329–38.
39. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, Sirlin CB, Abecassis MM, Roberts LR, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma: Heimbach et al. *Hepatology.* 2018;67:358–80.

40. Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2018;29:iv238–55.
41. Levy I, Sherman M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut*. 2002;50:881–5.
42. Yau T, Tang VYF, Yao T-J, Fan S-T, Lo C-M, Poon RTP. Development of Hong Kong Liver Cancer Staging System With Treatment Stratification for Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014;146:1691-1700.e3.
43. Chevret S, Trinchet J-C, Mathieu D, Rached AA, Beaugrand M, Chastang C. A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 1999;31:133–41.
44. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*. 2018;391:1301–14.
45. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, et al. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. *Journal of Hepatology*. 2013;58:724–9.
46. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis [Internet]. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJM199603143341104>. Massachusetts Medical Society; 2009 [cited 2021 Aug 2]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199603143341104>
47. Polat KY, Acar S, Gencdal G, Yazar S, Kargi A, Donmez R, et al. Hepatocellular Carcinoma and Liver Transplantation: A Single-Center Experience. *Transplantation Proceedings*. 2020;52:259–64.
48. Ahrar K, Gupta S. Hepatic artery embolization for hepatocellular carcinoma: technique, patient selection, and outcomes. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003;12:105–26.
49. de Baere T, Arai Y, Lencioni R, Geschwind J-F, Rilling W, Salem R, et al. Treatment of Liver Tumors with Lipiodol TACE: Technical Recommendations from Experts Opinion. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2016;39:334–43.
50. Lo C-M, Ngan H, Tso W-K, Liu C-L, Lam C-M, Poon RT-P, et al. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002;35:1164–71.
51. Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, et al. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;359:1734–9.

52. Raoul J-L, Edeline J, Pracht M, Boucher É, Rolland Y, Garin É. Traitement des carcinomes hépatocellulaires par injection intra-artérielle de radio-isotopes. *Cancer/Radiothérapie*. 2011;15:64–8.
53. Coldwell D, Sangro B, Salem R, Wasan H, Kennedy A. Radioembolization in the treatment of unresectable liver tumors: experience across a range of primary cancers. *Am J Clin Oncol*. 2012;35:167–77.
54. Llovet JM, Montal R, Sia D, Finn RS. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15:599–616.
55. Field-practice study of sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma: a prospective multicenter study in Italy - PubMed [Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/21898496/>
56. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, Cattan S, Ogasawara S, Palmer D, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:940–52.
57. ESMO. Clinical Benefit with First-Line Immunotherapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma [ESMO 2019 Press Release] [Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from: <https://www.esmo.org/newsroom/press-office/esmo-congress-hepatocellular-carcinoma-cancer-checkmate459-yau>
58. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, et al. IMbrave150: Updated overall survival (OS) data from a global, randomized, open-label phase III study of atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) versus sorafenib (sor) in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *JCO*. Wolters Kluwer; 2021;39:267–267.
59. Vogel A, Rimassa L, Sun H-C, Abou-Alfa GK, El-Khoueiry AB, Pinato DJ, et al. Clinical value of atezolizumab + bevacizumab for first-line unresectable hepatocellular carcinoma (HCC): A network meta-analysis. *JCO*. Wolters Kluwer; 2020;38:4585–4585.
60. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13:261–80.
61. Burak K, Angulo P, Pasha TM, Egan K, Petz J, Lindor KD. Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:523–6.
62. KOBAYASHI (M.), KOBAYASHI (M.), IKEDA (K.), SAITOH (S.), SUZUKI (F.), TSUBOTA (A.), et al. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. 2000;

63. 751.pdf [Internet]. [cited 2021 Aug 2]. Available from: <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/751.pdf>
64. Lendvai G, Szekerczés T, Illyés I, Dóra R, Kontsek E, Gógl A, et al. Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis. *Pathol Oncol Res.* 2020;26:3–15.
65. Vidili G, De Sio I, D’Onofrio M, Mirk P, Bertolotto M, Schiavone C. SIUMB guidelines and recommendations for the correct use of ultrasound in the management of patients with focal liver disease. *J Ultrasound.* 2018;22:41–51.
66. Rimola J, Forner A, Reig M, Vilana R, de Lope CR, Ayuso C, et al. Cholangiocarcinoma in cirrhosis: absence of contrast washout in delayed phases by magnetic resonance imaging avoids misdiagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009;50:791–8.
67. Lo EC, N Rucker A, Federle MP. Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Imaging for Diagnosis, Tumor Response to Treatment and Liver Response to Radiation. *Semin Radiat Oncol.* 2018;28:267–76.
68. Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet.* 2013;45:1470–3.
69. Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, et al. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet.* 2012;44:690–3.
70. Sia D, Tovar V, Moeini A, Llovet JM. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene.* 2013;32:4861–70.
71. Yokoyama M, Ohnishi H, Ohtsuka K, Matsushima S, Ohkura Y, Furuse J, et al. KRAS Mutation as a Potential Prognostic Biomarker of Biliary Tract Cancers. *Jpn Clin Med.* 2016;7:33–9.
72. Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, et al. Integrative Molecular Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals 2 Classes That Have Different Outcomes. *Gastroenterology.* 2013;144:829–40.
73. Otani T, Sakata J, Kameyama H, Otani A, Hirose Y, Tamura H, et al. [Surgical Resection after Gemcitabine plus Cisplatin Chemotherapy for Intrahepatic Cholangiocarcinoma with Multiple Lymph Node Metastases - Report of a Case]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2016;43:1764–6.
74. Rizvi S, Wang J, El-Khoueiry AB. Liver Cancer Immunity. *Hepatology* [Internet]. [cited 2020 Dec 20];n/a. Available from: <http://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.31416>
75. Allen RA, Lisa JR. Combined liver cell and bile duct carcinoma. *Am J Pathol.* 1949;25:647–55.

76. Goodman ZD, Ishak KG, Langloss JM, Sesterhenn IA, Rabin L. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. A histologic and immunohistochemical study. *Cancer*. 1985;55:124–35.
77. Jarnagin WR, Weber S, Tickoo SK, Koea JB, Obiekwe S, Fong Y, et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: demographic, clinical, and prognostic factors. *Cancer*. 2002;94:2040–6.
78. Schizas D, Mastoraki A, Routsis E, Papapanou M, Tsapralis D, Vassiliu P, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: An update on epidemiology, classification, diagnosis and management. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2020;19:515–23.
79. Ramai D, Ofosu A, Lai JK, Reddy M, Adler DG. Combined Hepatocellular Cholangiocarcinoma: A Population-Based Retrospective Study. *Am J Gastroenterol*. 2019;114:1496–501.
80. Wang J, Li E, Yang H, Wu J, Lu H cheng, Yi C, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a population level analysis of incidence and mortality trends. *World Journal of Surgical Oncology*. 2019;17:43.
81. Beaufrère A, Calderaro J, Paradis V. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: An update. *Journal of Hepatology*. Elsevier; 2021;74:1212–24.
82. Jarnagin WR, Weber S, Tickoo SK, Koea JB, Obiekwe S, Fong Y, et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Cancer*. 2002;94:2040–6.
83. Brunt E, Aishima S, Clavien P-A, Fowler K, Goodman Z, Gores G, et al. cHCC-CCA: Consensus Terminology for Primary Liver Carcinomas With Both Hepatocytic and Cholangiocytic Differentiation. *Hepatology*. 2018;68:113–26.
84. Li R, Yang D, Tang C-L, Cai P, Ma K, Ding S-Y, et al. Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma (biphenotypic) tumors: clinical characteristics, imaging features of contrast-enhanced ultrasound and computed tomography. *BMC Cancer*. 2016;16:158.
85. Gentile D, Donadon M, Lleo A, Aghemo A, Roncalli M, di Tommaso L, et al. Surgical Treatment of Hepatocholangiocarcinoma: A Systematic Review. *Liver Cancer*. 2020;9:15–27.
86. Xue R, Chen L, Zhang C, Fujita M, Li R, Yan S-M, et al. Genomic and Transcriptomic Profiling of Combined Hepatocellular and Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals Distinct Molecular Subtypes. *Cancer Cell*. 2019;35:932-947.e8.
87. Enomoto M, Ikura Y, Tamori A, Kozuka R, Motoyama H, Kawamura E, et al. Short-term histological evaluations after achieving a sustained virologic response to direct-acting antiviral treatment for chronic hepatitis C. *United European Gastroenterol J*. 2018;6:1391–400.
88. Genomic and Transcriptomic Profiling of Combined Hepatocellular and Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals Distinct Molecular Subtypes - PubMed [Internet]. [cited 2021

Aug 2]. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/31130341/>

89. Zhao Q, Yu W-L, Lu X-Y, Dong H, Gu Y-J, Sheng X, et al. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma originating from the same clone: a pathomolecular evidence-based study. *Chinese Journal of Cancer*. 2016;35:82.
90. Piscaglia AC, Shupe TD, Pani G, Tesori V, Gasbarrini A, Petersen BE. Establishment of cancer cell lines from rat hepatocholangiocarcinoma and assessment of the role of granulocyte-colony stimulating factor and hepatocyte growth factor in their growth, motility and survival. *J Hepatol*. 2009;51:77–92.
91. Katz S-F, Lechel A, Obenauf AC, Begus-Nahrman Y, Kraus JM, Hoffmann EM, et al. Disruption of Trp53 in livers of mice induces formation of carcinomas with bilineal differentiation. *Gastroenterology*. 2012;142:1229-1239.e3.
92. Yano H, Iemura A, Haramaki M, Momosaki S, Sachiko O, Koichi H, et al. A human combined hepatocellular and cholangiocarcinoma cell line (KMCH-2) that shows the features of hepatocellular carcinoma or cholangiocarcinoma under different growth conditions. *Journal of Hepatology*. 1996;24:413–22.
93. Tschaharganeh DF, Xue W, Calvisi DF, Evert M, Michurina TV, Dow LE, et al. p53-Dependent Nestin Regulation Links Tumor Suppression to Cellular Plasticity in Liver Cancer. *Cell*. 2014;158:579–92.
94. Holczbauer A, Factor VM, Andersen JB, Marquardt JU, Kleiner D, Raggi C, et al. Modeling Pathogenesis of Primary Liver Cancer in Lineage-Specific Mouse Cell Types. *Gastroenterology*. 2013;145:221–31.
95. Vilchez V, Shah MB, Daily MF, Pena L, Tzeng C-WD, Davenport D, et al. Long-term outcome of patients undergoing liver transplantation for mixed hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: an analysis of the UNOS database. *HPB (Oxford)*. 2016;18:29–34.
96. Garancini M, Goffredo P, Pagni F, Romano F, Roman S, Sosa JA, et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: a population-level analysis of an uncommon primary liver tumor. *Liver Transpl*. 2014;20:952–9.
97. Gupta R, Togashi J, Akamatsu N, Sakamoto Y, Kokudo N. Impact of incidental/misdiagnosed intrahepatic cholangiocarcinoma and combined hepatocellular cholangiocarcinoma on the outcomes of liver transplantation: an institutional case series and literature review. *Surg Today*. 2017;47:908–17.
98. Corrales L, Scilla K, Caglevic C, Miller K, Oliveira J, Rolfo C. Immunotherapy in Lung Cancer: A New Age in Cancer Treatment. *Adv Exp Med Biol*. 2018;995:65–95.

99. Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, Chen L, et al. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res.* 2019;25:4592–602.
100. Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, Timmerman J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphomas. *Hematology.* 2001;2001:221–40.
101. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:275–87.
102. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016;17:e542–51.
103. Duffy MJ, Crown J. Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. *Clinical Chemistry.* 2019;65:1228–38.
104. Keenan BP, Fong L, Kelley RK. Immunotherapy in hepatocellular carcinoma: the complex interface between inflammation, fibrosis, and the immune response. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2019;7:267.
105. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006;43:S54-62.
106. Kurebayashi Y, Ojima H, Tsujikawa H, Kubota N, Maehara J, Abe Y, et al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification. *Hepatology.* 2018;68:1025–41.
107. Sun C, Sun H, Xiao W, Zhang C, Tian Z. Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell-based immunotherapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36:1191–9.
108. Zhang Z, Ma L, Goswami S, Ma J, Zheng B, Duan M, et al. Landscape of infiltrating B cells and their clinical significance in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology.* 2019;8:e1571388.
109. Li K-K, Adams DH. Antitumor CD8+T cells in hepatocellular carcinoma: Present but exhausted. *Hepatology.* 2014;59:1232–4.
110. Nishida N, Kudo M. Immunological Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Implication. *Oncology.* 2017;92 Suppl 1:40–9.
111. Mikulak J, Bruni E, Oriolo F, Di Vito C, Mavilio D. Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Frontiers in Immunology.* 2019;10:946.
112. Parmiani G, Anichini A. T cell infiltration and prognosis in HCC patients. *Journal of Hepatology.* 2006;45:178–81.



113. Bian J, Lin J, Long J, Yang X, Yang X, Lu X, et al. T lymphocytes in hepatocellular carcinoma immune microenvironment: insights into human immunology and immunotherapy. *Am J Cancer Res.* 2020;10:4585–606.
114. Zhang Y, Chen S, Li J, Dai W, Qian Y. Immune infiltrating cells in cholangiocarcinoma may become clinical diagnostic markers: based on bioinformatics analysis. *World Journal of Surgical Oncology.* 2021;19:59.
115. Zhang Q-F, Yin W-W, Xia Y, Yi Y-Y, He Q-F, Wang X, et al. Liver-infiltrating CD11b-CD27- NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with hepatocellular carcinoma and are associated with tumor progression. *Cell Mol Immunol.* 2017;14:819–29.
116. Tsukagoshi M, Wada S, Yokobori T, Altan B, Ishii N, Watanabe A, et al. Overexpression of natural killer group 2 member D ligands predicts favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 2016;107:116–22.
117. Jung IH, Kim DH, Yoo DK, Baek SY, Jeong SH, Jung DE, et al. In Vivo Study of Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity Against Cholangiocarcinoma in a Nude Mouse Model. *In Vivo.* 2018;32:771–81.
118. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:523–32.
119. Xia Z-W, Xu L-Q, Zhong W-W, Wei J-J, Li N-L, Shao J, et al. Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor- 1. *Am J Pathol.* 2007;171:1904–14.
120. Wang Y, Liu T, Tang W, Deng B, Chen Y, Zhu J, et al. Hepatocellular Carcinoma Cells Induce Regulatory T Cells and Lead to Poor Prognosis via Production of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38:306–18.
121. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. [cited 2021 Aug 3]; Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31410>
122. Chen J, Gingold JA, Su X. Immunomodulatory TGF- $\beta$  Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Trends in Molecular Medicine.* 2019;25:1010–23.
123. Tian Z, Hou X, Liu W, Han Z, Wei L. Macrophages and hepatocellular carcinoma. *Cell Biosci* [Internet]. 2019 [cited 2020 Dec 21];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761725/>
124. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11:889–96.

125. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.* 2016;39:1588–96.
126. Hasita H, Komohara Y, Okabe H, Masuda T, Ohnishi K, Lei XF, et al. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Science.* 2010;101:1913–9.
127. Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology.* 2013;138:93–104.
128. Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu L-Y, Li L, Zheng L. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2009;125:1640–8.
129. Seyfizadeh N, Muthuswamy R, Mitchell DA, Nierkens S, Seyfizadeh N. Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2016;107:100–10.
130. Böttcher JP, Sousa CR e. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in Cancer.* Elsevier; 2018;4:784–92.
131. Takagi S, Miyagawa S-I, Ichikawa E, Soeda J, Miwa S, Miyagawa Y, et al. Dendritic cells, T-cell infiltration, and Grp94 expression in cholangiocellular carcinoma. *Hum Pathol.* 2004;35:881–6.
132. Cai X-Y, Gao Q, Qiu S-J, Ye S-L, Wu Z-Q, Fan J, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132:293–301.
133. Pedroza-Gonzalez A, Zhou G, Vargas-Mendez E, Boor PP, Mancham S, Verhoef C, et al. Tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression by Tr1 cells in human liver tumors. *Oncoimmunology.* 2015;4:e1008355.
134. Rivera A, Chen CC, Ron N, Dougherty JP, Ron Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int Immunol.* 2001;13:1583–93.
135. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol.* 2017;14:662–74.
136. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res.* American Association for Cancer Research; 2018;24:6125–35.
137. Chiaruttini G, Mele S, Opzoomer J, Crescioli S, Ilieva KM, Lacy KE, et al. B cells and the humoral response in melanoma: The overlooked players of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2017;6:e1294296.

138. Wang S, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cell Mol Immunol*. 2019;16:6–18.
139. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Have an Atypical CD27– Memory Phenotype and Together with CD8+ T Cells Promote Favorable Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res. American Association for Cancer Research*; 2012;18:3281–92.
140. Martinez-Rodriguez M, Thompson AK, Monteagudo C. A significant percentage of CD20-positive TILs correlates with poor prognosis in patients with primary cutaneous malignant melanoma. *Histopathology*. 2014;65:726–8.
141. Lundgren S, Berntsson J, Nodin B, Micke P, Jirström K. Prognostic impact of tumour-associated B cells and plasma cells in epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2016;9:21.
142. Brunner SM, Itzel T, Rubner C, Kesselring R, Griesshammer E, Evert M, et al. Tumor-infiltrating B cells producing antitumor active immunoglobulins in resected HCC prolong patient survival. *Oncotarget*. 2017;8:71002–11.
143. Goepfert B, Frauenschuh L, Zucknick M, Stenzinger A, Andrulis M, Klauschen F, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *British Journal of Cancer. Nature Publishing Group*; 2013;109:2665–74.
144. Xiao X, Lao X-M, Chen M-M, Liu R-X, Wei Y, Ouyang F-Z, et al. PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. *Cancer Discov. American Association for Cancer Research*; 2016;6:546–59.
145. Calderaro J, Petitprez F, Becht E, Laurent A, Hirsch TZ, Rousseau B, et al. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology. Elsevier*; 2019;70:58–65.
146. Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, Santoni A, Bonecchi R, Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2020;20:485–503.
147. Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 2012;33:949–55.
148. Pylaeva E, Lang S, Jablonska J. The Essential Role of Type I Interferons in Differentiation and Activation of Tumor-Associated Neutrophils. *Front Immunol*. 2016;7:629.
149. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009;16:183–94.
150. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*. 2016;37:41–52.

151. Zhou S-L, Zhou Z-J, Hu Z-Q, Huang X-W, Wang Z, Chen E-B, et al. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology*. 2016;150:1646-1658.e17.
152. He G, Zhang H, Zhou J, Wang B, Chen Y, Kong Y, et al. Peritumoural neutrophils negatively regulate adaptive immunity via the PD-L1/PD-1 signalling pathway in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:141.
153. Yau T, Park JW, Finn RS, Cheng A-L, Mathurin P, Edeline J, et al. CheckMate 459: A randomized, multi-center phase III study of nivolumab (NIVO) vs sorafenib (SOR) as first-line (1L) treatment in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC). *Annals of Oncology*. Elsevier; 2019;30:v874–5.
154. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:1–28.
155. Klein O, Kee D, Nagrial A, Markman B, Underhill C, Michael M, et al. Evaluation of Combination Nivolumab and Ipilimumab Immunotherapy in Patients With Advanced Biliary Tract Cancers: Subgroup Analysis of a Phase 2 Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6:1405–9.
156. Kim RD, Chung V, Alese OB, El-Rayes BF, Li D, Al-Toubah TE, et al. A Phase 2 Multi-institutional Study of Nivolumab for Patients With Advanced Refractory Biliary Tract Cancer. *JAMA Oncol*. 2020;6:888–94.
157. Feng K, Liu Y, Zhao Y, Yang Q, Dong L, Liu J, et al. Efficacy and biomarker analysis of nivolumab plus gemcitabine and cisplatin in patients with unresectable or metastatic biliary tract cancers: results from a phase II study. *J Immunother Cancer*. 2020;8:e000367.
158. Vogel A, Finn R, Kelley R, Furuse J, Edeline J, Ren Z, et al. P-99 Pembrolizumab in combination with gemcitabine and cisplatin for the treatment of advanced biliary tract cancer: phase 3 KEYNOTE-966 trial in progress. *Annals of Oncology*. Elsevier; 2020;31:S122.
159. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24:541–50.
160. Cariani E, Missale G. Immune landscape of hepatocellular carcinoma microenvironment: Implications for prognosis and therapeutic applications. *Liver Int*. 2019;39:1608–21.
161. Kurebayashi Y, Kubota N, Sakamoto M. Immune microenvironment of hepatocellular carcinoma, intrahepatic cholangiocarcinoma and liver metastasis of colorectal adenocarcinoma: Relationship with histopathological and molecular classifications. *Hepatol Res*. 2021;51:5–18.

162. Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:681–700.
163. Rinaldi L, Nevola R, Franci G, Perrella A, Corvino G, Marrone A, et al. Risk of Hepatocellular Carcinoma after HCV Clearance by Direct-Acting Antivirals Treatment Predictive Factors and Role of Epigenetics. *Cancers (Basel)*. 2020;12:1351.
164. Holmes JA, Carlton-Smith C, Kim AY, Dumas EO, Brown J, Gustafson JL, et al. Dynamic changes in innate immune responses during direct-acting antiviral therapy for HCV infection. *Journal of Viral Hepatitis*. 2019;26:362–72.
165. Meissner EG, Wu D, Osinusi A, Bon D, Virtaneva K, Sturdevant D, et al. Endogenous intrahepatic IFNs and association with IFN-free HCV treatment outcome [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2014 [cited 2021 May 2]. Available from: <https://www-jci-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/view/75938/pdf>
166. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:836–48.
167. Chen J, Cao Y, Markelc B, Kaeppler J, Vermeer JAF, Muschel RJ. Type I IFN protects cancer cells from CD8+ T cell-mediated cytotoxicity after radiation. *J Clin Invest*. 129:4224–38.
168. Hashimoto H, Ueda R, Narumi K, Heike Y, Yoshida T, Aoki K. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. *Cancer Gene Ther*. 2014;21:532–41.
169. Slaney CY, Möller A, Hertzog PJ, Parker BS. The role of Type I interferons in immunoregulation of breast cancer metastasis to the bone. *Oncoimmunology*. 2013;2:e22339.
170. Song S, Peng P, Tang Z, Zhao J, Wu W, Li H, et al. Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Sci Rep*. 2017;7:39858.
171. Meissner EG, Kohli A, Higgins J, Lee Y, Prokunina O, Wu D, et al. Rapid changes in peripheral lymphocyte concentrations during interferon-free treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Commun*. 2017;1:586–94.
172. Burchill MA, Golden-Mason L, Wind-Rotolo M, Rosen HR. Memory re-differentiation and reduced lymphocyte activation in chronic HCV-infected patients receiving direct-acting antivirals. *Journal of Viral Hepatitis*. 2015;22:983–91.
173. Putra J, Schiano TD, Fiel MI. Histological assessment of the liver explant in transplanted hepatitis C virus patients achieving sustained virological response with direct-acting antiviral agents. *Histopathology*. 2018;72:990–6.
174. HCV-Induced Epigenetic Changes Associated With Liver Cancer Risk Persist After Sustained Virologic Response - ScienceDirect [Internet]. [cited 2021 May 3]. Available from:

<https://www.sciencedirect-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/science/article/pii/S0016508519325065?via%3Dihub>

175. Perez S, Kaspi A, Domovitz T, Davidovich A, Lavi-Itzkovitz A, Meirson T, et al. Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals. *PLoS Genet.* 2019;15:e1008181.
176. Carrat F, Fontaine H, Dorival C, Simony M, Diallo A, Hezode C, et al. Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: a prospective cohort study. *Lancet.* 2019;393:1453–64.
177. Piñero F, Mendizabal M, Ridruejo E, Herz Wolff F, Ameigeiras B, Anders M, et al. Treatment with direct-acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2019;39:1033–43.
178. Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology.* 1997;25:754–8.
179. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology.* 2002;36:s74–83.
180. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, et al. Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. *Gastroenterology.* 2017;153:812–26.
181. Job S, Rapoud D, Santos AD, Gonzalez P, Desterke C, Pascal G, et al. Identification of Four Immune Subtypes Characterized by Distinct Composition and Functions of Tumor Microenvironment in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2020;72:965–81.
182. Joseph NM, Tsokos CG, Umetsu SE, Shain AH, Kelley RK, Onodera C, et al. Genomic profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals similar genetics to hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2019;248:164–78.
183. Wang A, Wu L, Lin J, Han L, Bian J, Wu Y, et al. Whole-exome sequencing reveals the origin and evolution of hepato-cholangiocarcinoma. *Nature Communications.* Nature Publishing Group; 2018;9:894.
184. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21:1350–6.
185. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* 2012;10:205.

186. Sangro B, Sarobe P, Hervás-Stubbs S, Melero I. Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2021 [cited 2021 May 31]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41575-021-00438-0>
187. Projects [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-CHOL>
188. Farshidfar F, Zheng S, Gingras M-C, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Rep*. 2017;18:2780–94.