

Titre: Quantification de l'immunomarquage spécifique par nanoparticules plasmoniques sur lignées cellulaires cancéreuses
Title:

Auteur: Guillaume Ortiz
Author:

Date: 2022

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Ortiz, G. (2022). Quantification de l'immunomarquage spécifique par nanoparticules plasmoniques sur lignées cellulaires cancéreuses [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/10717/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/10717/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michel Meunier, & Dominique Trudel
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Quantification de l'immunomarquage spécifique par nanoparticules
plasmoniques sur lignées cellulaires cancéreuses**

GUILLAUME ORTIZ

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Décembre 2022

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Quantification de l'immunomarquage spécifique par nanoparticules plasmoniques sur lignées cellulaires cancéreuses

présenté par **Guillaume ORTIZ**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Gregory DE CRESCENZO, président

Michel MEUNIER, membre et directeur de recherche

Dominique TRUDEL, membre et codirectrice de recherche

Louis GABOURY, membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes sans qui ce projet n'aurait pas pu être mené à bien : Pr. Meunier pour son accompagnement et sa bienveillance, Isabelle pour son aide et sa bonne humeur et bien sûr, Cécile pour son aide tout au long du projet, ses idées mais aussi sa patience ! Merci également à Dr. Trudel pour son aide et ses opinions très pertinentes pour le projet.

Merci à toutes celles et ceux qui participent à créer un lieu de travail accueillant et chaleureux, en particulier Jennyfer pour sa positivité et le trio Flavie, Jie et Justin pour leurs soirées endiablées.

Je tiens aussi à remercier mes amis de l'AÉCSP : Laura, Ivan, Émilie, Clémentine, Cat-Thy, Gaël pour n'en citer que quelques-uns. Par leur soutien tout au long de cette aventure et pour les belles amitiés qui se sont créées, ils et elles ont été un soutien inestimable.

Et bien entendu, un grand merci aux personnes qui me sont chères outre Atlantique et qui m'ont accompagné avant, pendant, et m'accompagneront après ce projet : mes parents et mon frère que j'ai hâte de retrouver, mais aussi Charles et Marion qui sont des amis en or.

Et à tous ceux que je n'ai pas cités.

RÉSUMÉ

Le cancer est une maladie extrêmement complexe et les traitements disponibles sont multiples. L'un d'eux, l'immunothérapie, cible spécifiquement certaines protéines surexprimées par les cellules cancéreuses pour les traiter avec des effets minimaux sur les cellules saines.

Pour prédire l'efficacité d'un tel traitement, le pathologiste a besoin de vérifier et de quantifier la surexpression des antigènes par les cellules cancéreuses du patient. Dès lors, l'usage de diagnostics « compagnons » est nécessaire. En clinique, l'étalon d'or pour ce type de marquage est l'immunohistochimie (IHC) réalisée sur biopsie, accompagnée d'une contre-coloration à l'hématoxyline ou à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E).

Cette technique repose sur l'utilisation de chromophores qui colorent les zones de l'échantillon exprimant l'antigène. L'information obtenue est double : l'intensité de la coloration fournit une information semi-quantitative alors que sa localisation, couplée à l'H&E, donne une information anatomique et spatiale. Pour autant l'IHC est limitée par son caractère semi-quantitatif bien qu'une mesure quantitative soit souhaitable. De plus, l'IHC permet difficilement le multiplexage alors qu'il accélérerait et améliorerait la précision des diagnostics.

L'immunoplasmonique (IP) se présente comme une alternative. Le recours à des nanoparticules plasmoniques (NPs) conjuguées à des anticorps permet un marquage spécifique, le décompte des nanoparticules attachées est relativement simple et renvoie un score quantitatif. Par ailleurs, il a déjà été démontré au Laboratoire de Plasmonique et de Procédés Lasers (LP2L) la compatibilité de quatre NPs de différentes couleurs avec la contre-coloration H&E, accentuant le potentiel de l'IP en clinique.

L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité de l'IP pour la quantification de plusieurs antigènes sur plusieurs lignées cellulaires. Les résultats d'IP sur quatre lignées cellulaires et six antigènes aux expressions variées sont comparés aux résultats d'immunofluorescence (IF). Une quantification de l'IF et de l'IP permet de démontrer la spécificité du marquage IP sur le CD44 et pourrait atteindre la limite de sensibilité sur le PDL1. Il a été observé que la sensibilité de l'IP peut être améliorée en optimisant le temps d'incubation. La spécificité de l'IP anti-CD44 a été confirmée par une coculture de deux lignées avec une expression très différente pour ce marqueur. Certains marqueurs ont été identifiés comme plus difficile à cibler par l'IP ; plusieurs explications possibles sont avancées même si les causes exactes n'ont pas encore été confirmées.

ABSTRACT

Cancer is an extremely complex disease with multiple treatment options. One of them, immunotherapy, specifically targets certain proteins overexpressed by cancer cells to treat them with minimal effects on healthy cells.

To predict the efficacy of such a treatment, the pathologist needs to verify and quantify the overexpression of antigens by the patient's cancer cells. Therefore, the use of "companion" diagnostics is necessary. In the clinic, the gold standard for this type of labeling is immunohistochemistry (IHC) performed on biopsies, accompanied by hematoxylin or hematoxylin and eosin (H&E) counterstaining.

This technique is based on the use of chromophores that stain the areas of the sample that express the antigen. The information obtained is twofold: the intensity of the staining provides semi-quantitative information while its localization, coupled with H&E, provides anatomical and spatial information. However, IHC is limited by its semi-quantitative nature when a quantitative measure is desirable to better guide the pathologist's choice. Moreover, IHC does not allow multiplexing that would accelerate and improve diagnoses accuracy.

Immunoplasmonics (IP) is an alternative. The use of plasmonic nanoparticles (NPs) conjugated to antibodies allows for specific labeling while counting of attached NPs is relatively simple and quantitative. Moreover, the compatibility of four NPs of different colors with H&E counterstaining has already been demonstrated at Laboratory of Laser Processing and Plasmonics (LP2L), emphasizing the potential of the IP in the clinic.

The goal of this project is to demonstrate the efficiency of IP for the quantification of several antigens on several cell lines. IP results on four cell lines and six antigens with various expressions are compared to immunofluorescence (IF) results. Quantification of IF and IP demonstrates the specificity of IP labeling on CD44 and might reach the limit of sensitivity on PDL1. It was observed that the sensitivity of IP can be improved by optimizing the incubation time. The specificity of the anti-CD44 IP was confirmed by co-culturing two lines with very different expression for this marker. Some markers were identified as more difficult to target by IP; several possible explanations have been put forward even if the exact causes have not yet been confirmed.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------|
| REMERCIEMENTS | III |
| RÉSUMÉ..... | IV |
| ABSTRACT | V |
| TABLE DES MATIÈRES | VI |
| LISTE DES TABLEAUX..... | VIII |
| LISTE DES FIGURES..... | IX |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS | XII |
| LISTE DES ANNEXES..... | XV |
| CHAPITRE 1 INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE | 3 |
| 2.1 Notions de biologie et contexte oncologique | 3 |
| 2.1.1 Caractérisation des échantillons biologiques | 3 |
| 2.1.2 Contexte et définitions cliniques en oncologie | 5 |
| 2.1.3 Diagnostics et traitements anticancéreux ciblés..... | 9 |
| 2.2 Nanoparticules plasmoniques et immunomarquages | 15 |
| 2.2.1 Nanoparticules plasmoniques et avantages | 15 |
| 2.2.2 Fonctionnalisation des nanoparticules | 16 |
| 2.2.3 Défis et limites de l'immunoplasmonique | 19 |
| 2.3 Quantification en immunofluorescence et sources de variabilité..... | 21 |
| 2.3.1 Méthodes de culture cellulaires <i>in vitro</i> | 21 |
| 2.3.2 Protocole d'immunofluorescence et imagerie..... | 26 |
| CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIES DE QUANTIFICATION EN IMMUNOPLASMONIQUE ET IMMUNOFLUORESCENCE | 31 |

| | | |
|------------|---|----|
| 3.1 | Matériel biologique et protocoles de préparation des échantillons | 32 |
| 3.1.1 | Lignées cellules adhérentes étudiées et protocoles de culture | 33 |
| 3.1.2 | Préparation de lames et fixation | 36 |
| 3.2 | Protocoles d'immunomarquages | 37 |
| 3.2.1 | Immunofluorescence et immunoplasmonique | 37 |
| 3.2.2 | Protocoles de pégylation et de fonctionnalisation | 40 |
| 3.2.3 | Imagerie des lames | 45 |
| 3.3 | Automatisation du traitement d'image | 49 |
| 3.3.1 | Identification des noyaux | 50 |
| 3.3.2 | Identification des cellules | 52 |
| 3.3.3 | Mesure des signaux | 53 |
| CHAPITRE 4 | RÉSULTATS ET DISCUSSIONS SUR LES IMMUNOMARQUAGES | 56 |
| 4.1 | Quantifications par immunofluorescence | 56 |
| 4.1.1 | Attachement non spécifique et autofluorescence | 56 |
| 4.1.2 | Quantification par immunofluorescence du panel d'anticorps | 57 |
| 4.2 | Spécificité de l'attachement immunoplasmonique | 67 |
| 4.2.1 | Évaluation qualitative de l'attachement | 67 |
| 4.2.2 | Quantification du marquage immunoplasmonique | 72 |
| 4.2.3 | Influence du temps d'incubation sur le marquage immunoplasmonique | 80 |
| CHAPITRE 5 | DISCUSSION GÉNÉRALE | 82 |
| 5.1 | Retour sur la spécificité de l'immunoplasmonique et comparaison avec l'immunofluorescence | 82 |
| CHAPITRE 6 | CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS | 84 |
| RÉFÉRENCES | | 86 |
| ANNEXES | | 95 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 3.1 – Informations générales sur les lignées cellulaires étudiées. | 34 |
| Tableau 3.2 – Liste des volumes utilisés pour la culture cellulaire. | 36 |
| Tableau 3.3 – Récapitulatif des conditions étudiées dans ce projet | 41 |
| Tableau 3.4 – Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages | 44 |
| Tableau 3.5 – Caractéristiques des filtres pour l’illumination des fluorophores. | 46 |
| Tableau 3.6 – Paramètres de prise d’image pour la quantification de l’immunofluorescence. | 48 |
| Tableau 4.1 – Modes, premiers et troisièmes quartiles des distributions relatives aux contrôles négatifs des quatre lignées étudiées. | 57 |
| Tableau 4.2 – Résultats d’immunofluorescence rapportés sur une échelle à quatre niveaux de positivité. | 60 |
| Tableau 4.3 – Coefficients de détermination des régressions linéaires entre taille cellulaire et nombre de NPs attachées non spécifiquement. | 74 |
| Tableau 4.4 – Résultats d’immunoplasmonique rapportés sur une échelle à quatre niveaux de positivité. | 80 |
| Tableau 5.1 – Récapitulatif des résultats qualitatifs d’immunofluorescence et d’immunoplasmonique au format [score IF/score IP]. En vert : accord des deux marquages. En rouge : désaccord des deux marquages. | 83 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 2.1 – Schéma simplifié de cellule animale. | 4 |
| Figure 2.2 – Structure d’une IgG de type 1. | 11 |
| Figure 2.3 – Les trois grands types d’IHC : IHC directe, IHC indirecte et IHC indirecte amplifiée. | 13 |
| Figure 3.1 – Les lignées H460 (A), H1975 (B), MDA-231 (C) et MDA-453 (D) en culture, visualisées en champ clair. | 35 |
| Figure 3.2 – Schéma récapitulant les protocoles d’immunomarquage (IF et IP). | 40 |
| Figure 3.3 – (a) Spectres de nanoparticules fonctionnalisées anti-CEA et anti-CD44 ; (b) échelle de dilution et régression linéaire du plateau selon la concentration en nanoparticules. | 45 |
| Figure 3.4 – (a) Mesure du signal signal perdu par photoblanchiment ; (b) croisement de la perte de signal par photoblanchiment avec l’intensité du bruit calculé pour deux intensités lumineuses. | 47 |
| Figure 3.5 – Immunofluorescence anti-CD44 sur H1975 après 0 (A), 10 (B) et 60 (C) minutes d’illumination. | 47 |
| Figure 3.6 – Dispositif d’illumination latéral (a) éteint et (b) allumé avec une lame de microscope. | 49 |
| Figure 3.7 – Schéma de la procédure suivi pour le traitement des images. | 49 |
| Figure 3.8 – Erreur absolue et erreur relative des trois filtres étudiés pour différents paramètres. | 51 |
| Figure 3.9 – Superposition d’une coloration membranaire sur MDA-231 avec l’identification des cellules réalisée par l’algorithme, avec en bleu foncé les noyaux, en cyan les cellules et en orange les cellules partiellement hors champ. | 52 |
| Figure 3.10 – Conditions avec (a) faibles agrégations des NPs (PDL1 sur H460) et (b) avec forte agrégations des NPs (CXCR4 sur H460). En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En rouge : les NPs fonctionnalisées. | 54 |
| Figure 3.11 – Distribution de la quantification IF anti-PDL1 sur H1975. | 55 |

| | |
|--|----|
| Figure 4.1 – Distributions de l’attachement non spécifique quantifié par immunofluorescence pour les quatre lignées étudiées. | 56 |
| Figure 4.2 – Distributions de l’attachement spécifique CD44, PDL1, CXCR4, EpCAM, CEA et CD70, quantifié par immunofluorescence pour les quatre lignées étudiées avec un minimum de trois répétitions pour chaque condition. | 59 |
| Figure 4.3 – Immunofluorescence (a) anti-CD44 sur H460 et (b) anti-EpCAM sur H1975. En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En vert : l’immunomarquage colorés à l’AF488. | 60 |
| Figure 4.4 – Distributions du signal spécifique en fonction de la taille cellulaire pour (a) CD44 et (b) CEA sur H460, et (c) EpCAM sur H1975 ; (d) et une image en fluorescence de l’immunofluorescence CEA sur H460. | 61 |
| Figure 4.5 – Distributions de l’expression de CD44 sur MDA231 pour les différentes répétitions. | 62 |
| Figure 4.6 – Immunofluorescence CD44 sur MDA231, (a) répétition 2 et (b) répétition 3. | 63 |
| Figure 4.7 – Distributions des répétitions du marquage CD44 sur (a) H460 et (b) H1975. | 64 |
| Figure 4.8 – Distributions des répétitions du marquage (a) PDL1 et non spécifique (b) rat sur MDA231. | 64 |
| Figure 4.9 – Comparaison des résultats d’immunofluorescence avec la base de données <i>Expression</i> de CCLE. | 67 |
| Figure 4.10 – Marquages immunoplasmoniques de (A et B) contrôles négatifs mPEG et (C) anticorps négatifs. En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En rouge : les nanoparticules. | 68 |
| Figure 4.11 – Marquages immunoplasmoniques (A) faiblement positifs, (B) positifs et (C) très positifs. En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En rouge : les nanoparticules. | 69 |
| Figure 4.12 – Immunoplasmonique sur H460 (a) anti-CD44 et (b) anti-CD70. | 71 |
| Figure 4.13 – Immunoplasmonique sur MDA-231, (a) premier lot de CXCR4 et (b) second lot. | 71 |
| Figure 4.14 – Marquage IP anti-CD44 sur cellules colorées H&E : (a) H460, (b) H1975, (c) H460 et H1975 en coculture. | 72 |

| | |
|--|----|
| Figure 4.15 – Distribution de l’attachement non spécifique des NPs mPEG et fonctionnalisées CEACAM5, marqueur négatif pour toutes les lignées. (a) – (d) ne sont pas normalisés selon la taille et (e) – (h) le sont. | 73 |
| Figure 4.16 – Comparaison de l’attachement au substrat des NPs mPEG et fonctionnalisées pour les 4 lignées, regroupées par fonctionnalisation..... | 75 |
| Figure 4.17 – Distributions de l’attachement non spécifique avec prise en compte de l’attachement au substrat..... | 76 |
| Figure 4.18 – Distributions de l’attachement spécifique IP avec prise en compte de l’attachement au substrat..... | 78 |
| Figure 4.19 – Moyennes d’attachement IP sur cellules après soustraction de l’attachement non spécifique au substrat. | 79 |
| Figure 4.20 – Marquage immunoplasmonique sur H460 anti-CD44 avec (a) 1h, (c) 3h et (e) 6h d’incubation ; et anti-PDL1 avec (b) 1h, (d) 3h et (f) 6h d’incubation. | 81 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|--------|---|
| 4-NPP | 4-nitrophenylphosphate |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AF | Alexa Fluor |
| ALP | Phosphatase alcaline <i>Alkaline phosphatase</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARCHS4 | <i>All RNA sequencing and ChIP sequencing sample and signature search</i> |
| BSA | Sérum-albumine bovin <i>Bovine serum albumin</i> |
| CCLC | Encyclopédie des lignées cellulaires cancéreuses <i>Cancer cell line encyclopedia</i> |
| CNB | Biopsie au trocart <i>Core needle biopsy</i> |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phénylindole |
| DPBS | Tampon de phosphate salin de Dulbecco <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> |
| EDC | 1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétra acétique <i>Ethylene-diamine tetracetic acid</i> |
| EGFR | Récepteur du facteur de croissance épidermique <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| ER | Récepteur d'œstrogène <i>Estrogen receptor</i> |

| | |
|-------|--|
| FBS | Sérum de veau foetal <i>Fetal bovine serum</i> |
| FFPE | Fixé au formol et enrobé de paraffine <i>Formaline-fixed paraffin-embedded</i> |
| FNAB | Biopsie par aspiration à l'aiguille fine <i>Fine needle aspiration biopsy</i> |
| FPKM | <i>Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments</i> |
| H&E | Hématoxyline et éosine |
| HER2 | Récepteur au facteur de croissance épidermique humain 2 <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| HRP | Peroxydase de raifort <i>Horseradish peroxydase</i> |
| ICC | Immunocytochimie |
| IF | Immunofluorescence |
| IG | Immunoglobuline |
| IHC | Immunohistochimie |
| IP | Immunoplasmonique |
| LP2L | Laboratoire de plasmonique et de procédés lasers |
| MES | Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique |
| NHS | N-hydroxysuccinimide |
| NP | Nanoparticule plasmonique |
| NSCLC | Cancer du poumon non à petites cellules <i>Non small cell lung cancer</i> |
| PBS | Tampon de phosphate salin <i>Phosphate buffered saline</i> |

| | |
|--------------------|---|
| PBST | Tampon de phosphate salin et 0.1% de Tween 20 <i>Phosphate buffered saline and 0.1% Tween 20</i> |
| PDL1 | <i>Programmed death ligand-1</i> |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PR | Récepteur de progestérone <i>Progesterone receptor</i> |
| PSG | Pénicilline-streptomycine-glutamine |
| PVP | Polyvinylpyrrolidone |
| RPKM | <i>Reads per kilo base of transcript per million mapped reads</i> |
| RPMI | Institut mémorial Roswell Park <i>Roswell Park memorial institute</i> |
| SCLC | Cancer du poumon à petites cellules <i>Small cell lung cancer</i> |
| SNR | Rapport signal sur bruit <i>Signal-noise ratio</i> |
| TCEP | Tris (2-carboxyethyl) phosphine |
| TFS | Thermo Fisher Scientific |
| TPM | <i>Transcripts per million</i> |
| UpH ₂ O | Eau ultrapure |
| VEGF | Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| WGA | Agglutinine de germe de blé <i>Wheat germ agglutinin</i> |

LISTE DES ANNEXES

| | | |
|----------|---|----|
| Annexe A | Échelle agrandie des distributions de l'attachement spécifique quantifié par immunofluorescence | 95 |
| Annexe B | Exemples de distributions du signal immunofluorescent selon la taille des cellules... | 96 |
| Annexe C | Répétabilité de l'immunofluorescence pour les marqueurs positifs | 97 |
| Annexe D | Distributions de l'attachement spécifique immunoplasmonique | 98 |

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Avec plus de 230 000 nouveaux diagnostics et 85 000 décès estimés en 2022 [1], le cancer est la première cause de décès au Canada [2]. Cette maladie représente un lourd fardeau économique et en perpétuelle augmentation pour la société, avec des coûts estimés à 7.5 milliards de dollars canadiens en 2012 [3] triplant à 26.2 milliards en 2021 [4].

La lutte contre cette épidémie passe par la sensibilisation de la population puisqu'il est estimé que plus de la moitié des cancers pourraient être évités en changeant ses habitudes de vie [5]. Néanmoins l'amélioration des thérapies et diagnostics oncologiques reste essentielle pour améliorer les pronostics et lutter contre une maladie aussi complexe que le cancer. L'une des grandes difficultés liées aux traitements est l'extrême variabilité de la maladie forçant la personnalisation des soins [6]. Dès lors, des diagnostics complémentaires sont nécessaires pour permettre aux pathologistes d'établir le profil moléculaire du cancer à traiter et de décider quel médicament employer.

Ces diagnostics complémentaires sont réalisés sur des prélèvements cancéreux. La méthode la plus commune est l'immunohistochimie (IHC) qui exploite des chromophores conjugués à des anticorps spécifiques à la protéine étudiée [7]. L'attachement des chromophores aux protéines ciblées permet à l'IHC de colorer l'échantillon selon le niveau d'expression de l'antigène ciblé et de fournir une information semi-quantitative selon l'intensité de la coloration et sa localisation.

Néanmoins l'IHC possède plusieurs limites. L'IHC est peu adaptée au multiplexage à cause du faible nombre de chromogènes disponibles, et laver l'échantillon pour le colorer à plusieurs reprises est excessivement chronophage et risque de le dégrader [8]. Pourtant le multiplexage serait une évolution pertinente afin d'observer plusieurs antigènes sur une même lame afin de comprendre les interactions de différentes protéines tout en réduisant la quantité de matériel biologique requis. Une autre limite est que l'IHC est une méthode au mieux semi-quantitative, ce qui introduit la notion de subjectivité et rend les diagnostics difficiles et parfois discordants, avec, sur un même échantillon, des taux d'accord entre pathologistes considérés comme acceptables à partir de seulement 85% [9, 10].

L'alternative étudiée et présentée dans ce mémoire, l'immunoplasmonique (IP), repose comme l'IHC, sur l'immunologie et l'attachement spécifique d'anticorps à des antigènes, mais remplace

les chromogènes par des nanoparticules plasmoniques (NPs). Leur importante diffusion de lumière visible permet de les observer au microscope conventionnel une fois illuminées latéralement avec une lumière suffisamment intense. Cette illumination est possible grâce à un dispositif compact et portable d'illumination latérale développé au sein du Laboratoire de Plasmonique et de Procédés Lasers (LP2L).

Le marquage IP est adapté au multiplexage, la couleur des NPs étant modulable en faisant varier leur composition, taille ou géométrie [11]. Il s'agit également d'un marquage purement quantitatif puisqu'il s'agit de compter le nombre de nanoparticules attachées par cellules, à la fois adapté à la pathologie digitale et à l'observation directe au microscope. Par ailleurs, des travaux précédents au LP2L ont démontré que le marquage IP multiplexé est compatible avec les colorations de routine en histologie [12], ce qui fait de l'IP un immunomarquage avec un potentiel important pour un usage en clinique.

Jusqu'à présent, l'IP a montré des résultats encourageants pour le ciblage spécifique de l'antigène CD44 sur des cellules MDA-MB-231 du cancer du sein. Cependant des travaux supplémentaires sont nécessaires pour assurer la reproductibilité de ce ciblage et la capacité de l'IP à cibler d'autres antigènes sur d'autres échantillons. De plus, de nombreux paramètres sont encore à explorer : la synthèse des NPs, leur concentration et leur temps d'incubation lors du marquage, la méthodologie de décompte des NPs, etc.

L'étude présentée dans ce mémoire porte sur la quantification de marquage IP pour le comparer aux résultats d'immunofluorescence (IF) quantifiée, une méthode relativement standard en recherche pour la quantification d'immunomarquage. Six marqueurs sont étudiés sur quatre lignées cellulaires de cancer du poumon et du sein afin d'évaluer la reproductibilité de la technique et d'identifier éventuellement ses limites. Un volet de l'étude porte également sur l'analyse de l'influence des concentrations et des temps d'incubation des NPs sur le marquage IP.

Après une revue approfondie de la littérature présentée au chapitre 2, les protocoles de culture cellulaires, d'immunomarquage et d'imagerie choisis sont expliqués au chapitre 3. Les résultats d'IF et d'IP sur six antigènes sont présentés aux chapitres 4 et 5 avant d'analyser les effets de différents paramètres du protocole d'IP au chapitre 6. L'ensemble des résultats est discuté au chapitre 7 avant de conclure au chapitre 8 avec diverses considérations pour le futur du projet.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Notions de biologie et contexte oncologique

2.1.1 Caractérisation des échantillons biologiques

Pour comprendre les mécanismes de l'immunologie, il est important de connaître des notions essentielles en biologie, notamment ce qu'est une cellule, comment elle est construite et comment elles s'agencent entre-elles.

2.1.1.1 Les cellules

Le Parker et McGraw-Hill Book Company [13] définit la cellule comme l'unité fonctionnelle et structurale microscopique de tout organisme vivant et comportant un noyau, un cytoplasme et est délimité par une membrane.

Les cellules sont généralement classées en deux types : les cellules procaryotes dont l'acide désoxyribonucléique (ADN) est en suspension dans le cytoplasme, et les cellules eucaryotes dans lesquelles il est généralement contenu dans un noyau [14]. Les cellules animales appartiennent à ce second type. Une représentation simplifiée d'une cellule animale est présentée en Figure 2.1. Celle-ci contient notamment un noyau (1) et ses nucléoles (2), est délimitée par une membrane plasmique semi-perméable (3) et est remplie de cytosol (4). La cellule contient divers organites (5) servant au bon fonctionnement de la chimie moléculaire intracellulaire et un cytosquelette constitué de nombreuses molécules. Leurs fonctions n'étant pas pertinentes pour le projet, elles ne seront pas détaillées ici ; cependant leur mention est nécessaire pour expliquer la granularité observée en imagerie cellulaire, notamment à cause des différents indices de réfraction des constituants cellulaires, variant de 1.36 pour le cytosol à 1.60 pour les lysosomes [15].

La taille typique d'une cellule eucaryote varie d'une dizaine de micromètres à environ une centaine [14].

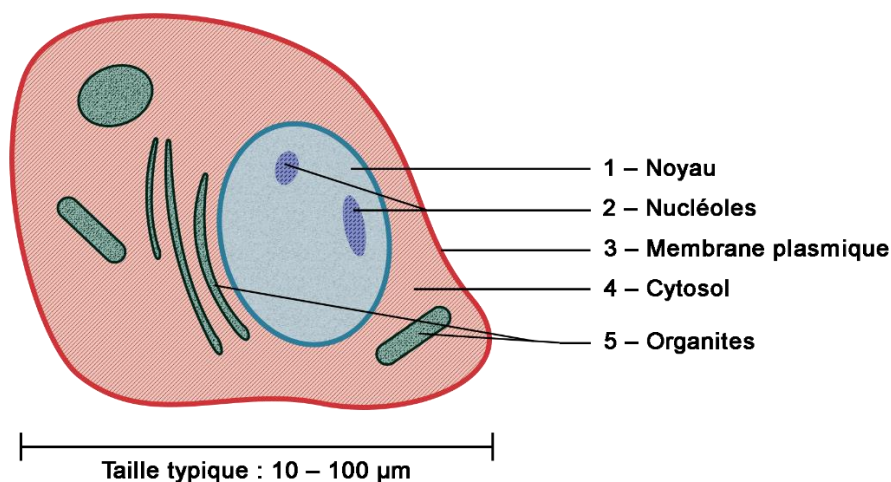


Figure 2.1 – Schéma simplifié de cellule animale.

2.1.1.2 Les tissus

À l'échelle supérieure, un tissu est un groupe de cellules spatialement disposées pour réaliser une ou plusieurs fonctions [16]. Un tissu peut être constitué de plusieurs types de cellules différents à l'image du tissu musculaire composé à la fois de cellules musculaires, assurant la contractilité, et de cellules nerveuses transmettant les signaux [17]. On distingue quatre grands types de tissus que Doll [16] décrit comme suit :

- les tissus épithéliaux qui forment une barrière pour protéger l'organisme grâce à leurs jonctions étanches, mais pouvant aussi posséder des récepteurs comme les récepteurs olfactifs responsables de l'odorat. Deux exemples de tissus épithéliaux sont l'épiderme (surface externe de la peau) et l'endothélium (surface interne des vaisseaux sanguins).
- les tissus conjonctifs qui servent de support aux autres tissus. Ils apportent une structure aux organes grâce notamment à leur matrice extracellulaire mais jouent aussi un rôle de transport et de défense via le sang et différentes cellules immunitaires.
- les tissus musculaires dont les caractéristiques principales sont leur élasticité et leur contractilité.
- les tissus nerveux, composés de cellules neuronales spécialisées dans la transmission de signaux électriques, et de cellules gliales supportant les neurones, notamment en les protégeant.

2.1.1.3 Les organes et systèmes d'organes

Enfin, un ensemble de différents tissus constitue un organe. Il s'agit d'une structure fonctionnelle de l'organisme dont il fait partie, comme la peau, le cœur ou les yeux [17].

Il est également possible de définir une échelle supplémentaire en décrivant des appareils, ou systèmes d'organes, qui sont des regroupements de différents organes fonctionnant de concert pour réaliser une tâche précise. Un exemple est le système digestif qui est constitué notamment de la bouche, de l'estomac et des intestins et qui assure l'ingestion des aliments, leur absorption puis leur élimination, mais aussi la sécrétion des différentes enzymes nécessaires à ce processus [18].

Les différents systèmes interagissent étroitement entre eux, à l'image du système digestif qui apporte au système sanguin les nutriments dont il a besoin pour remplir sa fonction, ou du système nerveux qui transmet ses instructions au système musculosquelettique.

2.1.2 Contexte et définitions cliniques en oncologie

Le cancer est une maladie complexe et présentant une pluralité de formes extrêmement importantes. Dès lors il est important de définir les termes propres à ce domaine d'étude pour comprendre les objectifs et retombées liés le développement de l'IP.

2.1.2.1 Définition du cancer et description des tumeurs

Le cancer est une maladie qui se manifeste par la multiplication incontrôlée de cellules. Cette anomalie peut être causée par des mutations génétiques des cellules malades mais les mécanismes en jeu sont multiples, complexes et encore mal compris. Les facteurs identifiés jusqu'à présent sont tant endogènes, via des erreurs lors de la réplication des quelques trois milliards de bases que possède le génome humain, qu'exogènes, par des facteurs comportementaux et environnementaux qui augmentent le risque de mutation cellulaire [19].

En l'essence, les cancers sont des maladies difficiles à diagnostiquer et à traiter car aucun cancer n'est semblable à un autre, ce qui explique la multiplicité des traitements et les pronostics très variables d'un patient à un autre. La conséquence directe est que l'oncologie clinique utilise une nosographie complexe propre à chaque type tumoral.

Une première distinction importante à faire est la différence entre le grade d'un cancer et son stade. Le grade est une échelle décrite par l'*American Joint Commission on Cancer* et l'Organisation Mondiale de la Santé qui classe les tumeurs sur une échelle allant généralement de 1 à 4, en plus d'un grade X lorsque les pathologistes ne parviennent pas à déterminer de nombre [20]. Le grade décrit le niveau de différenciation de la tumeur, un grade élevé désignant une tumeur dont les cellules sont indifférenciées et dont la multiplication rapide la rend très agressive. Plus un cancer a un grade élevé, et plus la taille du noyau cellulaire est importante par rapport à la taille de la cellule.

Le stade du cancer, en anglais *stage*, décrit quant à lui l'extension de la tumeur [21]. Il repose principalement sur la classification TNM qui décrit la taille de la tumeur (T), des ganglions lymphatiques qui lui sont voisins (N pour *nodes*) et des métastases (M). Cette classification peut ensuite être résumée par un chiffre allant de 0 à 4 et généralement noté en chiffres romains. Un cancer au stade 0 est très localisé et encore jeune alors qu'un cancer de stade IV est un cancer s'étant propagé dans le reste de l'organisme en créant des métastases [22].

2.1.2.2 Cancer du poumon non à petites cellules et cancer du sein

Ce projet portant sur l'analyse de lignées cellulaires de cancers du poumon et de cancer du sein, il est pertinent d'étudier plus en détail les spécificités de ces maladies.

2.1.2.2.1 Description des cancers du poumon

Le cancer du poumon est le cancer le plus mortel tout genre confondu et environ 97% de ces tumeurs sont des carcinomes, c'est-à-dire des tumeurs dérivées de cellules épithéliales [23]. Ces tumeurs sont généralement rangées sous l'une des quatre catégories histologiques : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes, les carcinomes neuroendocrines à cellules géantes et les carcinomes à petites cellules, qui comptent respectivement pour environ 50%, 25%, 10% et 15% des cas [24]. Ces trois premiers types sont souvent regroupés sous le terme de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC pour *Non Small Cell Lung Cancer*), par opposition à ce quatrième aussi appelé cancers du poumon à petites cellules (SCLC). Les 3% restants des cancers du poumon qui ne sont pas des carcinomes sont notamment des tumeurs carcinoïdes, des sarcomes ou encore des mésothéliomes, ces derniers étant particulièrement fatals et corrélés aux expositions à l'amiante [23, 24].

Le traitement des cancers du poumon repose sur le stade ainsi que sur son classement NSCLC ou SCLC. Les SCLC sont des maladies qui réagissent positivement aux chimiothérapies dans la majorité des cas, ce qui en fait le traitement standard contre cette maladie, parfois couplé à de la radiothérapie [24, 25]. Le traitement privilégié pour les NSCLC est l'ablation chirurgicale de la tumeur mais est limité aux cancers localisés et opérables ; dans les autres cas, des radiothérapies et chimiothérapies peuvent être entreprises mais ont un pronostic à long terme très défavorable [25].

Les traitements ciblés et l'immunothérapie semblent être une voie prometteuse pour combler cette lacune dans le traitement des NSCLC, avec des réponses très importantes observés aux traitements anti-récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptor*), par exemple le médicament cetuximab [24-26]. Un autre marqueur prometteur et qui génère beaucoup d'engouement pour le diagnostic et le traitement des NSCLC est *programmed death ligand-1* (PDL1) dont le clone 28-8 est utilisé dans ce projet [27, 28].

2.1.2.2.2 Description des cancers du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le deuxième plus mortel chez la femme, après le cancer du poumon [2].

De la même façon que pour les NSCLC de faible stade, le traitement privilégié des tumeurs invasives et d'une partie des tumeurs non invasives du sein diagnostiquées tôt est l'ablation, alors qu'aux stades plus avancés, la chirurgie est couplée à de la chimiothérapie, de la radiothérapie et/ou des thérapies hormonales [29]. À l'inverse, les tumeurs bénignes et l'autre partie des carcinomes non invasifs sont rarement traités, même si un suivi assidu est réalisé [30].

Une description plus complète des cancers du sein est donnée selon leur positivité ou négativité trois biomarqueurs traditionnellement utilisés en thérapie : les récepteurs d'œstrogène (ER), les récepteurs de progestérone (PR) et les récepteurs au facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) [31]. L'œstrogène est une hormone dont le récepteur est présent dans plus de 70% des cancers du sein et qui peut être bloqué pour limiter la prolifération cellulaire et donc la propagation de la maladie, ce qui fait de la présence d'ER un facteur positif de pronostic. *A contrario*, l'absence d'ER augmente la probabilité que le grade du cancer soit élevé ce qui, en plus de l'inefficacité des médicaments bloquant les ER, augmente l'agressivité du cancer et entraîne donc généralement des pronostics moins bons [31]. La progestérone est également une hormone dont le récepteur peut être ciblé de façon similaire à l'ER, et dont l'expression est associée à un meilleur pronostic. Enfin, le

récepteur HER2 est surexprimé dans environ 20% des cancers du sein et dont l'expression est associée à des tumeurs de plus haut grade et donc de moins bons pronostics, même si les immunothérapies ciblant HER2 ont démontré des effets bénéfiques sur l'évolution de la maladie [31]. Malgré tout, il reste environ 15% des cancers du sein qui ne possèdent ni ER, ni PR, ni HER2, c'est-à-dire aucune des trois cibles traditionnelles. Ces cancers sont dits « triples négatifs » et sont traités par chimiothérapie et immunothérapie en ciblant d'autres marqueurs, par exemple le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) via le médicament bevacizumab [32].

2.1.2.3 Prélèvements thoraciques usuels et colorations histologiques de routine

Connaître et comprendre les diagnostics cliniques des tumeurs est nécessaire pour comprendre où et comment le marquage décrit dans ce projet s'inscrit dans le cheminement des patients, et aide à faire un choix éclairé des modèles à utiliser.

Un cancer du poumon ou du sein est généralement détecté par examen physique et imagerie aux rayons X [24, 29]. Pour réaliser des examens plus précis de la masse anormale identifiée, un prélèvement appelé biopsie est réalisé. Pour les examens thoraciques, les deux biopsies minimalement invasives les plus pratiquées sont les biopsies au trocart (CNB pour *Core Needle Biopsy*) et les biopsies par aspiration à l'aiguille fine (FNAB pour *Fine Needle Aspiration Biopsy*) [33].

Les CNB sont adaptés aux prélèvements histologiques, c'est-à-dire de tissus. Elles sont réalisées à l'aide d'aiguilles dont le diamètre est de l'ordre du millimètre, ce qui est suffisamment élevé pour prélever des carottes de tissus ; celles-ci peuvent ensuite être fixées, notamment à la formaline, et mises en bloc de paraffine (FFPE pour *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) [33]. Ces blocs FFPE sont l'étalon d'or des échantillons de pathologie clinique et peuvent être sectionnés au microtome pour en obtenir des tranches d'une épaisseur de 2 à 10 μm adaptées au transfert sur lames de microscopes, lames préférablement chargées électriquement pour favoriser l'adhésion [34-36]. Ces échantillons peuvent être colorés à l'hématoxyline seule, ou à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), ce qui permet de mettre en relief la structure du tissu et permet de poser un diagnostic histologique et répondre à environ trois quart des questions de routine clinique, le quart restant relevant de tests complémentaires comme l'IHC [37].

Les FNAB sont réalisées à l'aide d'aiguilles de diamètres de quelques centaines de micromètres à travers lesquelles les cellules sont aspirées. En résultent des échantillons cytologiques, en

l'occurrence des liquides dans lesquels les cellules détachées sont en suspension individuellement ou par petits groupes. Ces prélèvements peuvent ensuite être étudiés comme frottis, aussi appelé *smear*, c'est-à-dire dispersés en couche mince sur une lame de microscope ou être préparés pour d'autres méthodes d'examen spécifiques comme la cytométrie en flux [33]. Il est également possible d'étudier des cellules tranchées en les fixant puis en recueillant un bloc cellulaire à l'aide d'histogel qui est ensuite traité de la même façon que les échantillons histologiques FFPE, bien que cette méthode ne soit pas standardisée à l'heure actuelle [27, 38].

Les CNB et FNAB ont chacun leurs avantages et limites, ce qui résulte parfois en leur usage combiné [33]. L'un des avantages des échantillons histologiques est la préservation de la structure de tissu là où l'agencement des cellules dans les échantillons cytologiques donne peu ou pas d'information. De plus, les CNB ont tendance à maintenir un profil moléculaire plus pertinent que les FNAB, tout en donnant davantage d'échantillons exploitables pour les essais moléculaires [27, 39]. Cependant, dans le cas des NSCLC les seuls échantillons disponibles sont souvent cytologiques, à l'image des épanchements pleuraux qui sont une accumulation de liquides dans la plèvre, la cavité séparant les poumons de la paroi interne du thorax [27]. De fait, le choix d'une étude histologique ou cytologique se fait davantage selon les contraintes propres aux patients et à sa maladie, plutôt que selon les préférences des pathologistes, ce qui justifie la nécessité de méthodes efficaces pour ces deux types d'échantillons plutôt que la spécialisation pour un seul d'entre eux.

2.1.3 Diagnostics et traitements anticancéreux ciblés

Les traitements anticancéreux sont variés mais sont aussi connus pour avoir des effets secondaires importants. Le traitement systémique qu'est la chimiothérapie en est un bon exemple avec un risque majoré d'apparition de nouveaux cancers dans les cinq à dix ans suivant le traitement [40]. La radiothérapie et la chirurgie sont des traitements ciblés aux effets secondaires beaucoup plus localisés, mais présentent des limites notables ; en l'occurrence, la radiothérapie guérit difficilement complètement la maladie malgré son efficacité palliative, et la chirurgie n'est pas toujours possible selon la localisation de la métastase. Il est alors courant de recourir à plusieurs modalités simultanément pour espérer de meilleurs résultats [41]. De nouveaux traitements sont en plein essor, ce qui est le cas de l'immunothérapie et des traitements ciblés qui sont d'intérêt pour ce projet.

2.1.3.1 Anticorps monoclonaux et polyclonaux

Avant d'expliquer ce qu'est l'immunothérapie et les traitements ciblés, il est important de comprendre ce que sont les anticorps et comment ils fonctionnent.

Les anticorps, aussi appelés immunoglobulines (Ig), sont des protéines synthétisées par le système immunitaire pour combattre les molécules étrangères grâce à leur capacité de se lier spécifiquement à un épitope [42]. Un épitope est la séquence d'un antigène (Ag) à laquelle se lie précisément l'anticorps et peut être de diverses natures. Il existe cinq types d'Ig différenciés par leur structure : les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE de poids moléculaires respectifs 150 kDa, 160 kDa, 900 kDa, 180 kDa et 180 kDa [43]. Les anticorps les plus présents naturellement dans le sérum humain sont les IgG qui représentent 80% des Ig secrétées, les IgA et IgM représentant 10% et 9% de ceux-ci et le pourcentage restant étant constitué d'IgD et d'IgE [42].

Les IgG sont les Ig les plus utilisées en clinique et existent sous quatre formes chez l'humain, appelées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 [43]. La Figure 2.2 représente une IgG1 classique et sa structure caractéristique en Y. La taille des IgG est d'environ 12 nm sur 14 nm [44]. Les IgG possèdent une structure symétrique composée de deux chaînes lourdes (HC) et de deux chaînes légères (CL) liées entre elles par des ponts disulfures dont le nombre et la structure varient selon l'isotype d'IgG. Les chaînes légères sont liées aux chaînes lourdes par un pont disulfure et les chaînes lourdes sont liées entre elles par un nombre variable de ponts dans la zone dite charnière de l'anticorps, variant de 2 pour les IgG1 et les IgG4 à 11 pour les IgG3, les IgG2 en possédant 4 [45]. Les chaînes lourdes et légères possèdent une extrémité variable responsable de l'attachement spécifique à l'épitope de l'antigène ciblé, et une partie constante ayant un rôle structurel et pouvant être reconnue par le système immunitaire pour engendrer une réponse [42, 43].

Deux types d'anticorps existent : les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux. Les anticorps monoclonaux sont des anticorps purifiés de façon à reconnaître un épitope précis, par opposition aux anticorps polyclonaux qui sont un mélange d'anticorps capables d'identifier différents épitopes d'un même antigène [43]. Les anticorps monoclonaux sont privilégiés en clinique car, malgré leur affinité potentiellement inférieure et leur sensibilité à la dénaturation des protéines pouvant se produire pendant la préparation des échantillons, leur homogénéité et leur monospécificité permettent une meilleure répétabilité [43].

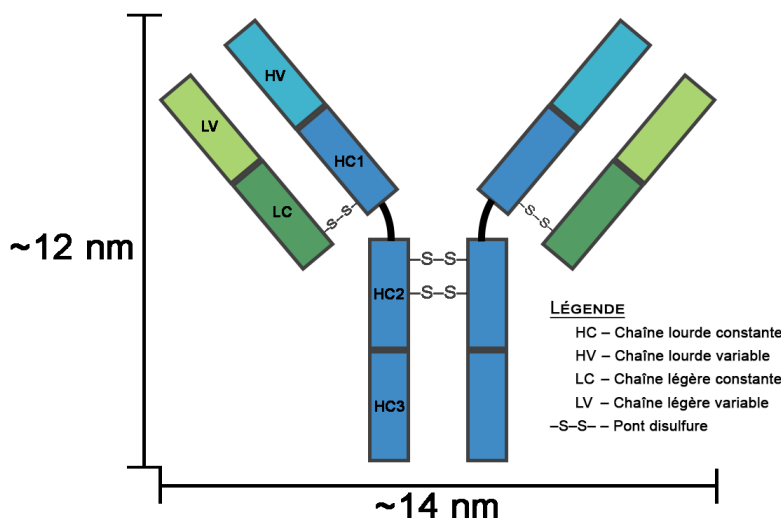


Figure 2.2 – Structure d'une IgG de type 1.

2.1.3.2 Immunothérapie et traitements ciblés

L'immunothérapie et les traitements ciblés se rejoignent par leur usage d'anticorps monoclonaux [46, 47]. La Société canadienne du cancer [46] définit l'immunothérapie comme l'ensemble des techniques qui stimulent le système immunitaire du patient pour qu'il soit capable de vaincre de lui-même la maladie ciblée, ici le cancer. Ces techniques peuvent être non spécifiques en stimulant et en renforçant l'ensemble du système immunitaire par l'emploi de cytokines par exemple, ou spécifiques en lui permettant de cibler des antigènes précis grâce à des anticorps. Les traitements ciblés vont eux perturber directement le cycle cellulaire et ralentir ou bloquer la progression de la maladie, à l'image des hormonothérapies décrites précédemment basées sur des bloqueurs d'ER et de PR [47]. L'emploi d'anticorps monoclonaux est donc une façon de contrer la multiplication cellulaire ou d'indiquer au système immunitaire les cellules à attaquer en ciblant directement une protéine surexprimée par les cellules malades.

Néanmoins, l'efficacité des traitements basés sur les anticorps monoclonaux repose sur l'hypothèse critique que les cellules cancéreuses surexpriment la protéine ciblée par rapport aux cellules saines. Avant de pouvoir administrer un traitement de ce type et puisque la variabilité des cancers est extrêmement importante, il est nécessaire de vérifier cette hypothèse sur une biopsie. Ce diagnostic préliminaire, parfois appelé « diagnostic compagnon », relève de la pathologie moléculaire et fait partie intégrante de la personnalisation des traitements anticancéreux [6, 7]. Pour réaliser ce diagnostic, un prélèvement histologique couplé à une IHC est l'étalon d'or [48]. Cependant,

lorsqu'il s'agit de travailler avec des échantillons cytologiques, aucun consensus ne semble se dessiner à l'heure actuelle avec des pratiques qui dépendent énormément du patient, des marqueurs à tester, mais aussi des instituts qui réalisent les examens [49-51]. Cette absence de consensus se justifie notamment par l'évolution rapide des techniques d'analyse des biopsies liquides [52].

2.1.3.3 Immunohistochimie et immunocytochimie

L'IHC et l'immunocytochimie (ICC) reposent sur des mécanismes semblables et diffèrent principalement selon le type d'échantillon étudié. Bien que cela implique des différences notables et des défis distincts pour l'interprétation, il est courant d'englober les deux termes sous celui d'IHC, quitte à préciser quand elle est réalisée sur échantillon cytologique comme le fait Miller [53].

L'IHC au sens large inclut un ensemble de techniques représentées à la Figure 2.3. Les techniques directes emploient des complexes d'anticorps conjugués à des marqueurs, typiquement un marqueur fluorescent ou une enzyme capable de réagir avec un chromogène. Les techniques indirectes ont recours à des anticorps primaires sans marqueur, qui après attachement à leur cible sont incubés avec un anticorps secondaire conjugué à un marqueur et ciblant spécifiquement l'anticorps primaire. Puisque plusieurs anticorps secondaires peuvent se lier à un même anticorps primaire, cette seconde étape permet une amplification du signal grâce à l'augmentation du nombre de marqueurs attachés aux sites positifs, ce qui permet finalement une amélioration de la sensibilité [54]. Pour amplifier encore davantage le signal, il est possible que l'anticorps secondaire soit conjugué à un autre vecteur intermédiaire, typiquement un polymère servant de support pour attacher davantage de marqueurs que ce qui aurait été possible s'ils avaient été conjugués directement au secondaire [8].

En clinique, les marqueurs fluorescents sont rarement utilisés car malgré leur meilleure sensibilité et leur compatibilité avec le multiplexage, les fluorophores ont une durée de vie limitée liée à leur photoblanchiment. Par ailleurs distinguer les cellules positives des négatives peut être difficile quand l'autofluorescence des cellules est forte, ce qui est parfois appelé phénomène de positivité focale [36]. Cela fait que la méthode d'IHC privilégiée en clinique est l'IHC basée sur des chromophores, en l'occurrence la peroxydase de raifort (HRP pour *Horseradish Peroxydase*) conjuguée à un polymère. Il existe différents couples enzymes/chromogènes utilisés en IHC, le plus courant étant l'HRP – (3,3'-diaminobenzidine) (DAB) et se basant sur l'oxydation du DAB

sous l'action de l'HRP pour former un précipité brun à l'endroit où se trouve l'enzyme sur l'échantillon [8, 55]. Un autre couple courant est la phosphatase alcaline (ALP) – 4-nitrophenylphosphate (4-NPP) qui colore en bleu foncé, mais il existe d'autres réactifs permettant des colorations roses, oranges, cyan, etc. [8, 36]

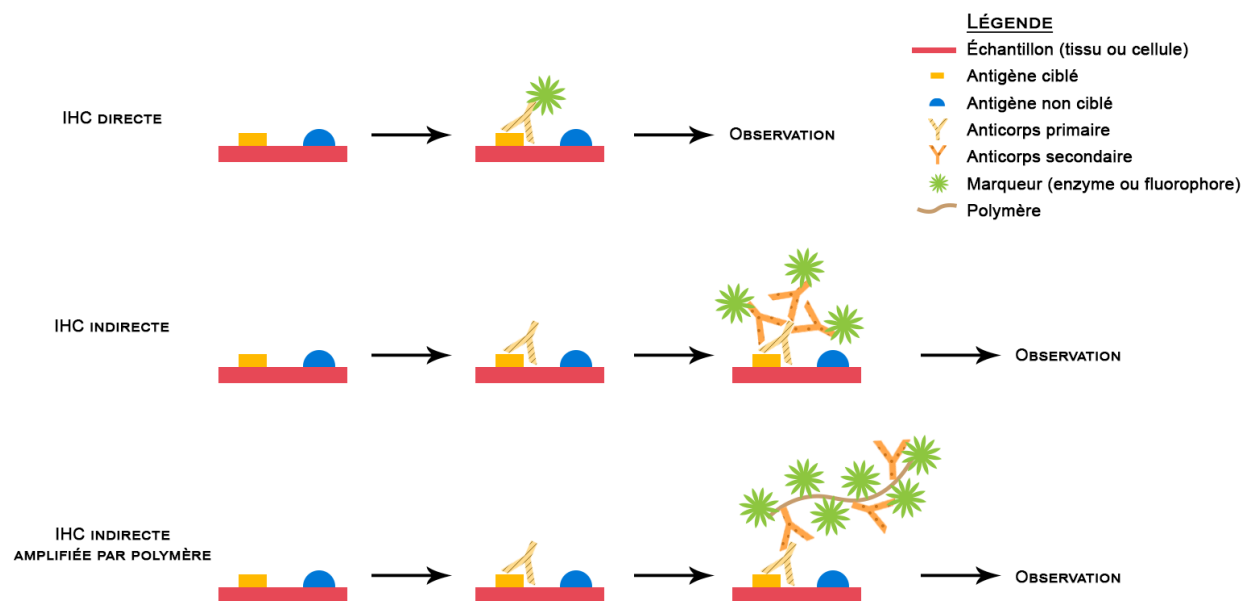


Figure 2.3 – Les trois grands types d'IHC : IHC directe, IHC indirecte et IHC indirecte amplifiée.

2.1.3.4 Limites de l'immunohistochimie

L'IHC souffre de plusieurs limites. La première est que, même s'il existe les réactifs pour réaliser de l'IHC multiplexée, le nombre de chromophores compatibles entre eux tout en produisant une coloration de qualité est très limité [8]. Tsutsumi [36] recommande même l'usage d'IF quand les antigènes à observer sont colocalisés, par exemple quand il s'agit d'observer deux protéines nucléaires. Le multiplexage serait pourtant une amélioration intéressante car il permettrait de réduire la quantité d'échantillons consommés en marquant plusieurs antigènes sur une même lame, amélioration pertinente quand la majorité des FNAB d'adénocarcinomes du poumon ne présente pas une quantité suffisante d'échantillon pour réaliser les marquages souhaités [56]. Le multiplexage permet également de comparer la localisation de plusieurs antigènes sur une même lame, ce qui peut faciliter l'interprétation des résultats et améliorer les diagnostics.

Une autre limite de l'IHC concerne sa standardisation car, même s'il s'agit d'une technique très répandue, il existe un nombre conséquent de variables à optimiser mentionnées par Tsutsumi [36]

et Miller [53]. Ces optimisations sont importantes pour limiter les artefacts et garantir un bon signal. Taube, et al. [8] rapportent également que les polymères employés en IHC sont des formulations propriétaires ce qui signifie qu'elles sont variables d'un kit à l'autre, sans que leur taille ni le nombre d'enzymes par polymère de ces complexes ne soient connus des pathologistes. Cela pose un défi de reproductibilité et de comparabilité des résultats d'autant plus critique que le parcours thérapeutique du patient repose sur un seuil quantitatif de positivité. Le diagnostic se base sur le nombre de cellules positives mais aussi sur leur intensité. La nécessité de quantifier aussi précisément que possible le signal IHC est exacerbée pour les échantillons qui sont manifestement proches du seuil d'administration du traitement, c'est-à-dire où le choix d'administrer le traitement ou non repose sur l'interprétation subjective du pathologiste.

De ces limites ressortent donc un besoin d'amélioration des techniques cliniques pour favoriser le multiplexage des échantillons, afin de limiter la quantité d'échantillons consommés et permettre la colocalisation des biomarqueurs, tout en introduisant une mesure davantage quantitative.

2.2 Nanoparticules plasmoniques et immunomarquages

Pour comprendre les avantages et les limites du marquage IP, il est important de connaître quels principes physiques décrivent le comportement des NPs. De même, le but de ce projet n'est pas d'étudier la chimie qui les entoure mais il est nécessaire de connaître les procédés employés puisque ceux-ci ont des répercussions importantes sur l'efficacité du marquage IP.

Schématiquement, le procédé employé se résume par l'ajout d'un polymère à la surface des NPs pour les stabiliser. Dans le cadre de ce projet, le polymère employé est le polyéthylène glycol (PEG) dont l'une des extrémité possède un groupe carboxyle activable par réaction avec du 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS). Cette réaction permet de conjuguer aux NPs des anticorps qui apportent la spécificité à l'attachement des NPs et permettent ce qui s'appelle la fonctionnalisation des NPs.

2.2.1 Nanoparticules plasmoniques et avantages

2.2.1.1 Plasmonique et théorie de Mie

L'échelle nanométrique qui s'étend de 1 à 100 nm (10^{-9} m) est une échelle intéressante car elle présente des propriétés qui lui sont propres : à mi-chemin entre les atomes individuels dont la taille est de l'ordre de l'angstrom (10^{-10} m) et les matériaux plus volumineux qui commencent à exprimer des propriétés macroscopiques [57]. Les NPs métalliques d'or et d'argent sont particulièrement intéressantes car elles interagissent avec la lumière visible de façon importante et, grâce à une oscillation des électrons à la surface des NPs, peuvent absorber et diffuser la lumière. Ce phénomène est connu sous le nom d'oscillation des plasmons de surface et est maximal à la pulsation de résonance, une variable qui dépend de plusieurs facteurs dont la taille, la forme, la constante diélectrique des métaux mais aussi de l'indice optique du milieu dans lequel les NPs sont suspendues [57, 58].

Il est possible de modéliser ces interactions avec la lumière grâce à la théorie de Mie. Cela permet de simuler numériquement et de prédire les interactions des NPs sous différentes conditions d'illumination [59]. Grâce à cette théorie, dans le cas de l'approximation dipolaire, pour des NPs de diamètre inférieur à 20 nm et suffisamment petites devant la longueur d'onde, il est possible

d'établir la condition de résonance des NPs qui prend la forme $\omega_r = \frac{\omega_p}{\sqrt{1+2\epsilon_m}}$ avec ω_r la pulsation de résonance, ω_p la pulsation plasma et ϵ_m la constante diélectrique du milieu [58].

Ces propriétés des NPs ont des usages qui sont actuellement en développement et tout particulièrement dans le cadre de ce projet, leur forte diffusion permet un usage en imagerie [12].

2.2.1.2 Atouts des nanoparticules plasmoniques en imagerie

Les NPs possèdent des avantages particuliers qui sont la raison de leur étude dans ce projet. Les deux atouts qu'elles possèdent en imagerie est leur quantitativité et leur capacité de multiplexage.

Le caractère quantitatif associées aux NPs est liée au fait que les NPs transparaissent comme des points en imagerie, ce qui est relativement plus simple à quantifier que des fluorophores ou des chromogènes qui se quantifient par l'intensité lumineuse qu'ils renvoient et qui sont très sensibles à de nombreux paramètres comme les conditions d'éclairage ou la manière de conserver l'échantillon. Il a été démontré que les NPs ont un certain potentiel pour le diagnostic de cancers, en particulier en fonctionnalisant les NPs à des anticorps, permettant ainsi un attachement important à certains marqueurs cancéreux et peu d'attachement aux cellules saines [57, 60].

Le second avantage des NPs est leur capacité de multiplexage. Cet atout est une conséquence directe de la relative simplicité de moduler les spectres de diffusion des NPs et donc leur couleur en variant notamment leur taille, forme et composition [11]. La combinaison d'or et d'argent dans la synthèse des NPs d'alliages qui possèdent des propriétés optiques à mi-chemin entre ces deux métaux plasmoniques, ce qui étend les possibilités de marquage multiplexé des NPs [12]. En l'occurrence, il a été démontré que quatre types de NPs, d'alliage or-argent ou d'or pur, de tailles et de formes diverses et illuminée latéralement, apparaissent de couleurs différentes en microscopie et sont compatibles avec la coloration H&E [12].

2.2.2 Fonctionnalisation des nanoparticules

2.2.2.1 Pégylation et stabilité des nanoparticules en milieu salin

Pour préserver leurs propriétés optiques, les NPs doivent conserver leur taille et leur composition, ce qui soulève l'enjeu de leur stabilité colloïdale. En l'occurrence, une façon de stabiliser les NPs d'or lors de leur synthèse est l'ajout de citrate qui aide à isoler les NPs les unes des autres grâce à

la répulsion électrostatique [11, 61]. Pour autant, cette couverture est assez fragile et disparaît relativement rapidement en augmentant la force ionique de la solution, ce qui ne permet pas une bonne stabilité en milieu salin [62]. La stabilité en milieu ionique est importante car les systèmes biologiques sont très sensibles au pH et l'emploi de solutions tampon est habituelle, à l'image du tampon de phosphate salin (PBS) largement utilisé en laboratoire de biologie.

Le PEG est connu pour être un bon stabilisateur de NPs et permet notamment de garder des propriétés optiques satisfaisantes, même dans les milieux salins [63]. Il s'agit d'un polymère qui peut être attaché aux NPs grâce notamment à un groupe fonctionnel sulfhydryle, contenant un atome de soufre et un atome d'hydrogène. Le constituant ainsi formé est un thiol qui peut, grâce à l'atome de soufre, créer une liaison covalente avec l'or relativement forte dont l'énergie varie autour de 3.5 à 4.1 eV selon la conformation [64]. Il est également possible d'employer des molécules possédant deux groupes sulfhydryles afin d'augmenter la force de l'attachement, ce qui s'est montré efficace jusqu'à présent en observant une meilleure stabilité des NPs avec l'emploi de polythiol-PEG ou d'acide lipoïque [62].

Pour autant, la pégylation n'est pas un procédé si simple en pratique qu'il l'est en théorie. Une première limite à noter est que le soufre est un atome qui est très réactif et qu'il a facilement tendance à créer des ponts disulfure. Cela oblige à ajouter une étape d'activation des soufres avant l'ajout du PEG grâce à un agent réducteur, par exemple le tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) [62]. Par ailleurs, la stabilité la couverture de PEG dépend de plusieurs paramètres dont la température, et même si cela ne semble pas être un défi pour un usage diagnostique des NPs, la stabilité semble encore avoir besoin d'être améliorée à des températures biologiques de l'ordre de 37 à 42°C [65].

D'autres paramètres influent sur la pégylation, notamment la taille du PEG mais aussi la quantité ajoutée qui semble présenter un optimum puisqu'un ajout excessif semble réduire l'efficacité de la stabilisation de la couronne de PEG [63]. Par ailleurs la pégylation n'est pas sans effet sur les propriétés optiques des NPs puisqu'un décalage du spectre vers le rouge est observé. Ce décalage est relativement faible, de l'ordre de quelques nanomètres pour le pic plasmon, et même s'il est efficacement prédit par les simulations numériques, il peut être important de considérer cette modification des propriétés optiques ; tout particulièrement lorsque l'objectif final est de réaliser du multiplexage et qu'il est nécessaire de vérifier la compatibilité des différents spectres [66, 67].

2.2.2.2 Fonctionnalisation et activation par EDC-NHS

Pour donner la capacité aux NPs de s'attacher à des antigènes pour les employer comme agents de contraste, il est nécessaire de parvenir à les conjuguer avec des anticorps. À l'heure actuelle, Lee, et al. [11] rapportent deux méthodes majoritaires pour réaliser une telle conjugaison grâce à des liens covalents : une méthode dite « directe » et une méthode « indirecte ». La méthode directe exploite les thiols présents dans certains anticorps pour attacher les anticorps aux NPs d'or sans intermédiaire. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide mais est moins efficace pour stabiliser les NPs. La méthode indirecte emploie quant à elle des polymères comme le PEG pour stabiliser les NPs, au bout duquel un groupe carboxyle est présent. Ce groupe carboxyle peut être activé grâce à la réaction EDC-NHS pour réagir avec des amines, typiquement présentes en grand nombre dans les anticorps qui sont constitués de plus d'une centaine d'acides aminés [11, 68, 69]. Il est à noter que même si seule la méthode EDC-NHS est discutée ici, il existe d'autres façons de conjuguer les NPs à des anticorps en faisant notamment varier le coupleur : biotine et avidine/streptavidine, protéine A et G, etc. [68]

Une conjugaison par EDC-NHS se produit en trois étapes : les groupes carboxyles sont d'abord transformés en ester sous l'action successive de l'EDC puis du NHS, les groupes ester peuvent ensuite se lier aux amines primaires contenus notamment dans les lysines des anticorps, avant de désactiver les esters qui n'ont pas réagi en les associant avec de petites molécules ayant une amine [70]. Une précaution notable à prendre en compte est l'influence du pH, puisque l'EDC et le NHS réagissent mieux à pH légèrement basique (autour de 8.5). Par ailleurs, une fois le groupe carboxyle transformé en ester, pour favoriser la probabilité de rencontre entre ce groupe et les amines, il est recommandé de garder un pH supérieur à 4 et inférieur de 0.5 à 1 au point isoélectrique de l'amine à coupler [70]. Dans le cas des vingt acides protéinogènes, seuls l'arginine¹ et la lysine possèdent une amine primaire disponible, de pKa respectifs 12.5 et 10.5 [71]. Cependant ces valeurs sont à comparer avec les points isoélectriques des anticorps entiers, prenant en compte également les

¹ En réalité l'arginine possède un groupe guanidine qui lui, contient une amine. Cette particularité fait que ce groupement réagit différemment et fait de la lysine le principal acide aminé protéinogène ayant une amine primaire disponible.

occurrences de groupes carboxyles disponibles, qui sont eux très variables, allant de 6.1 à 9.4 parmi les vingt-cinq anticorps étudiés par Goyon, et al. [72].

Enfin, l'une des faiblesses de la conjugaison EDC-NHS est qu'il s'agit d'une conjugaison non-orientée. Il est de cette façon impossible de garantir que les anticorps fonctionnalisés auront leur région variable accessible pour réagir avec les antigènes, de même qu'il est difficile d'assurer que les anticorps ont préservé leur spécificité après les étapes de fonctionnalisation qui auraient pu les dégrader. Cao, et al. [73] ont déterminé que, à la suite de leur fonctionnalisation EDC-NHS, environ un quart des anticorps conjugués ont perdu leur activité, ce qui laisse environ douze anticorps actifs par nanoparticules de 63 nm. En considérant que le nombre d'anticorps attachés est proportionnel à la surface de la NPs, cela correspond à environ 30 anticorps actifs par NPs de 100 nm.

2.2.3 Défis et limites de l'immunoplasmonique

2.2.3.1 Stabilité des nanoparticules

Même si les procédés décrits à la sous-section 2.2.2 sont assez classiques et communs dans la littérature, leur application aux solutions colloïdales présente des défis qui ne sont pas encore totalement résolus.

Une première limite notable concerne la notion de stabilité des NPs. La pégylation discutée précédemment permet une amélioration de la stabilité colloïdale, mais les NPs sont sujettes à un autre type d'instabilité : la sédimentation. Les NPs sont suffisamment denses pour sédimenter à des vitesses qui dépendent notamment des propriétés rhéologiques de la solution, ce qui provoque une augmentation locale de la concentration des NPs et peut avoir une influence sur leur stabilité colloïdale [11].

Une autre considération à prendre en compte est la chimie qui diffère entre l'or, l'argent, et les alliages de ces deux métaux. Le multiplexage s'en retrouve fortement impacté, notamment à cause de l'argent qui est connu pour être plus difficile à stabiliser [11]. Il semble que la dynamique d'oxydation des métaux diffère selon si les NPs sont constituées d'or pur, d'argent pur, ou d'alliage entre ces deux métaux ce qui complexifie l'étude de la stabilité des alliages [74]. Par ailleurs, l'argent a été identifié comme interagissant avec l'albumine de sérum bovin (BSA pour *Bovin Serum Albumin*), une protéine habituellement utilisée en laboratoire comme agent bloquant, en dégradant notamment ses résidus de tyrosine [75]. Des études supplémentaires sont nécessaires

pour vérifier que cette perturbation ne nuit pas à l'activité des anticorps et à leur spécificité. Malgré cela, plusieurs groupes rapportent réussir à stabiliser les NPs d'argent avec de la polyvinylpyrrolidone (PVP), ce qui peut donner espoir quant à la possibilité de stabiliser suffisamment ces NPs pour un usage diagnostique [67, 76].

2.2.3.2 Perturbations liées aux conservateurs d'anticorps

Les anticorps produits industriellement sont dilués dans des solutions contenant des conservateurs, notamment de la BSA pour stabiliser les anticorps, de l'azoture de sodium pour réduire les risques de contamination microbienne et/ou du glycérol pour conserver la solution à -20°C sans risque de dégradations lié aux cycles de congélation-décongélation [77].

Ces conservateurs peuvent nuire à la fonctionnalisation de diverses manières. La BSA est une protéine qui possède une soixantaine de lysines et peut donc se retrouver attachée à la surface des NPs à la place des anticorps [78]. L'azoture de sodium et le glycérol interfèrent quant à eux avec l'ester du NHS et réduisent globalement l'efficacité du procédé [79].

2.2.3.3 Tailles des nanoparticules et gêne stérique

La taille des NPs a également une influence notable qu'il est important de considérer pour comparer l'immunomarquage de différentes NPs. En l'occurrence, Contini, et al. [80] rapportent l'existence de deux diamètres critiques : en deçà de 10 nm les NPs subissent un phénomène d'adsorption groupé à la surface des membranes lipidiques, au-delà de 50 nm, les NPs perdent en efficacité à cause d'une plus faible probabilité de réaction entre les NPs et la membrane plasmique des cellules. Même si les observations de Contini, et al. [80] sont réalisées sur cellules vivantes, il est probable qu'une partie des observations reste valide ; en particulier l'efficacité diminuant à mesure que la taille des NPs augmente, en accord avec l'équation de Stokes-Einstein qui relie le coefficient de diffusion des NPs avec l'inverse de leur diamètre.

Par ailleurs, une limite notable des NPs est leur taille comparée à celle du PEG et des anticorps : les anticorps ont une taille de l'ordre de 10 nm quand les NPs employée dans ce projet sont de 100 nm. Sans même prendre en compte l'influence du PEG, la gêne stérique est notable et une NP attachée spécifiquement à un antigène risque de masquer les antigènes voisins, réduisant artificiellement l'attachement maximal possible.

2.3 Quantification en immunofluorescence et sources de variabilité

Pour évaluer l'efficacité du marquage IP, il est nécessaire de le comparer à une technique de référence. Cependant, dans les lignées cellulaires utilisées dans ce projet, certains antigènes sont connus pour être exprimés de façon relativement hétérogène, c'est-à-dire qu'au sein de la lignée, différentes cellules peuvent exprimer de façon significativement différente l'antigène étudié, ce qui notamment le cas du CD44 sur les cellules H460 [81]. Dès lors, l'étude de l'expression des antigènes étudiés à l'échelle de la cellule représente une information non négligeable par rapport à la même étude à l'échelle de la population de cellules. Dans l'optique de réaliser une quantification cellule par cellule, l'IHC standard avec chromogène est une option complexe à mettre en œuvre à cause de la déconvolution nécessaire à la séparation des informations d'intérêt comme rappelé par Ghahremani, et al. [82]. Dès lors le choix fait pour ce projet est de comparer l'IP avec l'IF, une méthode d'IHC intrinsèquement adaptée au multiplexage grâce à la facilité d'adapter l'excitation lumineuse pour sélectionner les fluorophores observés. Malgré tout, l'IF est actuellement considérée comme étant au mieux semi-quantitative, et il est nécessaire de prendre des précautions importantes pour maximiser la qualité du signal. Dans cette même optique, il est important de considérer un maximum de sources de variabilité pour minimiser leurs impacts, ou *a minima*, de les considérer dans l'interprétation des résultats.

2.3.1 Méthodes de culture cellulaires *in vitro*

2.3.1.1 Modèles de lignées cellulaires : hypothèses et limites

La culture cellulaire est une technique pour créer des échantillons biologiques en dehors d'un hôte, en l'occurrence ici un hôte humain. Il existe trois principaux types de cellules mises en culture : les cellules immortalisées, les cellules souches et les cellules primaires [83]. Les lignées utilisées dans ce projet sont issues de cellules immortalisées. Il s'agit de cellules qui ont subi une modification pour leur permettre une croissance et une multiplication continue. Cette propriété les rend intéressantes car elles peuvent aussi produire rapidement une quantité importante d'échantillons dont les individus sont, en théorie, génétiquement identiques [83].

L'usage de lignées cellulaires immortalisées s'accompagne de quelques précautions. Tout d'abord, il est commun de compléter les milieux de culture cellulaire avec des antibiotiques afin de réduire les risques de contamination, notamment bactérienne et fongique. Pour autant, les

antibiotiques sont connus pour altérer le protéome des lignées cellulaires ce qui rend importante la mention de ceux utilisés dans le cadre d'une quantification de l'expression protéique de cellules [84].

Par ailleurs, dans le cas des cellules adhérentes, il est nécessaire de suspendre les cellules afin de réaliser leur passage dans une nouvelle flasque et ensemercer des boîtes de Petri ou des lames de microscope. Il est commun pour cela d'avoir recours à une solution de trypsine à laquelle est ajoutée de l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA pour *Ethylene-Diamine Tetracetic Acid*) afin d'améliorer son action en capturant les ions calcium et magnésium [85]. Cependant, Huang, et al. [86] rapporte que la trypsine influence de façon relativement durable l'expression des protéines de lignées cellulaires, en identifiant une tendance de diminution du nombre de protéines influant sur le métabolisme cellulaire et la régulation de la croissance au profit d'une augmentation du nombre de protéines provoquant l'apoptose cellulaire. Cet effet est très dépendant du type de protéine mais peut prendre plus de vingt-quatre heures à s'estomper ce qui souligne la nécessité de laisser les cellules croître suffisamment longtemps après un passage pour limiter les effets de dégradations des protéines induits par la trypsine.

Enfin une dernière limite à mentionner parmi les nombreuses qui existent est le changement d'expression des lignées après avoir été repiquées un nombre important de fois. En effet, les lignées immortalisées ont subi des modifications qui altèrent leur comportement et limitent la comparaison avec des cellules appartenant à un organisme. Ces modifications de comportements et tout particulièrement de protéome peuvent perdurer et s'intensifier à mesure que la lignée est cultivée, ce qui rend important le contrôle des lignées après un certain nombre de passages, et de considérer l'âge des cellules comme une source de variabilité possible [83].

2.3.1.2 Influence de la fixation sur les protéines

La fixation est une étape de la préparation des échantillons histologiques et cytologiques qui consiste à arrêter l'activité biologique de l'échantillon, notamment pour éviter sa nécrose, tout en préservant son antigénicité. Jamur et Oliver [87] relèvent deux types de fixation utilisées : les fixations chimiques et les fixations physiques, consistant principalement en la congélation de l'échantillon ou son séchage à l'air libre. Les fixations chimiques les plus communes, qui sont celles d'intérêt pour ce projet, sont de deux types : les agents de réticulation comme le formaldéhyde, et les solvants, comme l'éthanol ou le méthanol.

Comme décrit dans la section 2.1, la fixation standard en clinique est la fixation à la formaline, employée notamment pour préparer les échantillons FFPE. La formaline est une solution aqueuse de formaldéhyde, aussi appelé méthanal et de formule chimique CH_2O . Le formaldéhyde a tendance à se polymériser en paraformaldéhyde, ce qui explique pourquoi est fréquemment ajouté du méthanol aux solutions de formaline dont le rôle est de stabiliser le formaldéhyde [87]. L'action fixatrice de la formaline provient de sa capacité à former des liaisons entre les acides aminés des protéines, ce qui entraîne également sa principale faiblesse puisque ces liaisons masquent les épitopes et changent donc l'antigénicité des échantillons [88]. Pour compenser cette dégradation, une étape de restauration de l'antigénicité est nécessaire. Il existe des méthodes de restauration d'antigénicité induites par des protéases, mais la méthode préférée dans la majorité des cas exploite la chaleur et un tampon pour atteindre un pH légèrement acide ou légèrement basique selon les cas [54, 89]. Malgré tout, cette étape de restauration d'antigénicité requiert à elle seule une optimisation à part entière puisqu'elle peut être inefficace ou à l'inverse provoquer un attachement non spécifique des anticorps primaires [89].

C'est notamment parce que la restauration d'antigénicité est une variable supplémentaire dans un protocole déjà complexe que la fixation à l'alcool suscite un certain intérêt. L'alcool exerce une action fixative en provoquant la précipitation des protéines, ce qui permet de conserver suffisamment leur conformation pour maintenir leur réactivité avec les anticorps [88]. Ce type de fixation préserve moins bien la morphologie des échantillons, ce qui est une information malgré tout importante en clinique, mais l'ajout d'acide acétique est connu pour aider à conserver leur structure [88, 90]. En pratique, ces fixations sont réalisées à -20°C contrairement aux fixations à la formaline qui sont réalisées à température ambiante, mais elles permettent également de perméabiliser les échantillons, ce qui peut constituer un gain de temps lorsqu'une telle étape est nécessaire [91].

2.3.1.3 Bases de données de lignées cellulaires et limites

L'un des principaux avantages d'avoir recours à des lignées cellulaires est le profil génétique supposé identique au sein du même lignée. Cela permet notamment de tabuler les caractéristiques des lignées et de supposer qu'elles seront identiques d'un laboratoire à un autre, dans les mêmes conditions de culture. C'est avec cet objectif que les instituts Novartis et Broad créent l'Encyclopédie des lignées cellulaires cancéreuses (CCLE pour *Cancer Cell Line Encyclopedia*).

La CCLE recense les résultats de caractérisations d'environ un millier de lignées cellulaires cancéreuses humaines pour plus de 1600 gènes ayant un intérêt oncologique [92]. Il existe d'autres bases de données qui recensent plusieurs études mais la CCLE est la base de données la plus complète qui ait été étudiée dans le cadre de ce projet. Les deux autres bases de données exploitées dans ce projet sont *All RNA sequencing and ChIP sequencing sample and signature search* (ARCHS4) et *Expression Atlas* [93, 94].

Une considération importante à souligner en travaillant avec des bases de données de génomique, en particulier celles de séquençage d'acides ribonucléiques (ARN), est la signification des unités utilisées. Bedre [95] explique que la multiplicité de ces unités est liée à la multiplicité des méthodes de normalisation, et donc des hypothèses sous-jacentes. Les unités normalisées les plus courantes sont les *reads per kilo base of transcript per million mapped reads* (RPKM), les *fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments* (FPKM) et les *transcripts per million* (TPM). Toutes trois se caractérisent par une normalisation selon la longueur du gène étudié et la profondeur du séquençage, pour autant elles sont limitées, notamment lorsqu'il s'agit d'étudier des gènes faiblement exprimés ou de comparer différents échantillons [95, 96]. Zhao, et al. [96] rapporte qu'à l'heure actuelle, aucun consensus de la communauté scientifique ne semble se dessiner quant à la méthodologie à adopter pour comparer différents échantillons grâce au séquençage ARN, malgré l'existence de normalisations plus performantes mais également plus complexes. De ce fait, les bases de données sont un outil intéressant mais ne donnant que des indications préliminaires sur les expressions attendues et il ne serait pas judicieux de se reposer exclusivement sur leurs résultats pour prédire l'expression génétique de lignées sans contrôle supplémentaire.

Un dernier type de métrique qui se retrouve dans les bases de données et pertinent à considérer est la protéomique. Nusinow, et al. [97] rapportent que les méthodes ARN et ADN échouent parfois à prédire l'expression réelle des protéines au sein des lignées cellulaires, par exemple pour les protéines BRAF ou HDAC3. Parmi les expressions protéiques que la quantification ARN parvient le mieux à prédire se retrouvent plusieurs protéines membranaires associées à l'épithélium. Ces protéines sont d'un intérêt important pour ce projet ce qui justifie la pertinence des bases de données ARN, malgré leurs limites.

2.3.1.4 Liste des marqueurs étudiés et caractéristiques

Six marqueurs sont étudiés dans ce projet, et pour interpréter correctement les résultats obtenus, notamment les résultats IP, il est important de considérer leur rôle dans la machinerie cellulaire, ainsi que leur localisation. Même si toutes ces protéines sont membranaires, elles peuvent être intra-membranaires, extra-membranaires ou trans-membranaires et il peut être attendu que cette variable soit pertinente pour des IP sur cellules entières compte tenu de la taille des NPs, avec une efficacité moins importante pour les marqueurs intra-membranaires à cause d'une accessibilité restreinte.

Les six marqueurs étudiés dans ce projet sont PDL1, CD44, EpCAM, CXCR4, CD70 et CEACAM5 :

- PDL1, aussi appelé CD274 ou B7H1, est un biomarqueur qui suscite un fort engouement pour le diagnostic et le pronostic des NSCLC. Il s'agit d'une protéine transmembranaire qui se lie à la protéine PD-1 et participe à l'évasion de la destruction des cellules cancéreuses par le système immunitaire [98-100].
- CD44 est une glycoprotéine transmembranaire qui possède un rôle important dans la communication entre cellules et dans l'adhésion et la migration cellulaire, en se liant notamment aux acides hyaluroniques [101, 102]. Il s'agit d'un marqueur pertinent dans le diagnostic et le traitement des cancers du sein dont les cellules ont tendance à surexprimer CD44, ainsi que pour établir le pronostic des cancers du poumon [102, 103].
- Le marqueur EpCAM, pour *epithelial cell adhesion molecule* est aussi appelé CD326. Il s'agit d'une protéine transmembranaire qui se retrouve principalement dans les jonctions occlusives des cellules épithéliales, et jouant donc un rôle important dans l'adhésion des cellules épithéliales entre elles [104]. EpCAM a également un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire et est utile pour établir le pronostic des métastases du poumon [102].
- CD70 est une cytokine qui se lie au marqueur CD27, et en tant que tel est parfois appelé CD27-L [105]. De la même façon que PDL1, CD70 joue un rôle dans l'évasion de la réponse immune [106].

- CXCR4, aussi appelé CD184, est une protéine membranaire réceptrice de la chimiokine CXCL12. CXCR4 possède un rôle dans la migration cellulaire ainsi que dans la réponse immunitaire, et a été identifiée comme cible permettant au virus d'immunodéficience humaine d'entrer dans les cellules [107].
- CEACAM5 est un marqueur de la famille des *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* et en tant que tel, possède notamment un rôle dans l'adhésion cellulaire [108, 109]. Ce marqueur, parfois appelé CEA ou CD66e, est étudié depuis plusieurs décennies et naturellement très présent dans les tissus du côlon, même s'il peut servir comme cible thérapeutique pour certains cancers comme le NSCLC [109].

2.3.2 Protocole d'immunofluorescence et imagerie

2.3.2.1 Normalisation des protocoles d'immunofluorescence

Les protocoles d'IF, comme la plupart des protocoles d'IHC, suivent un principe commun comme décrit à la sous-section 2.1.3.3. Néanmoins, les protocoles diffèrent sur plusieurs points, ce qui explique l'absence de protocole normalisé au sens strict du terme. Au contraire, les protocoles d'IF et d'IHC sont souvent accompagnés d'une étape préliminaire d'optimisation, afin de déterminer les temps d'incubation et les concentrations en anticorps optimales.

Cette absence de norme se retrouve largement dans la littérature : parmi les 303 références citées par Abcam comme exemple d'utilisation de leur anticorps PDL1[28-8] (ab205921), les trois premières décrivent déjà réaliser une IHC avec des conditions différentes. Mei, et al. [110] décrivent une incubation à 4°C pendant une nuit de l'anticorps primaire concentré à 2 µg/ml, Ozawa, et al. [111] réalisent une incubation du primaire de vingt-quatre heures à 4°C concentré à 5 µg/ml et [112] des incubations à température ambiante avec des anticorps concentrés à 5 µg/ml pour une durée qui n'est pas précisée.

Cette multiplication des variables dans des protocoles déjà relativement longs et complexes représente un enjeu non seulement pour comparer les expériences entre elles, mais aussi pour la répétabilité des expériences. L'étude *Reproducibility Project: Cancer Biology* met l'accent sur ce problème : parmi 193 expériences présentées dans les 53 articles à fort impact étudiés, seules 50 expériences issues de 23 articles ont pu être répétées, faute notamment de précision dans les protocoles décrits et de transparence de la part des auteurs [113]. Cet enjeu de répétabilité montre

que l'absence de normes est une question importante et qu'un maximum de transparence est nécessaire pour que les résultats de telles études soient compréhensibles et reproductibles.

2.3.2.2 Fluorescence à champ large et compromis en imagerie

Plusieurs précautions sont nécessaires lorsqu'il s'agit de réaliser une quantification grâce à des images, d'autant plus lorsque la technique employée est connue pour être semi-quantitative comme la fluorescence à champ large employée dans le cadre de ce projet. Comme le rappelle Waters et Wittmann [114], aucune quantification par fluorescence n'est parfaite ; et la difficulté réside dans l'équilibre à trouver dans l'ensemble des paramètres disponibles, et la compréhension des compromis à réaliser pour maximiser la qualité du signal.

Un exemple typique de compromis réside dans le choix du temps d'exposition pour la prise d'image : d'un côté augmenter le temps d'exposition permet de réduire les effets du bruit inhérents aux capteurs, de l'autre augmenter ce même temps d'exposition entraîne un plus grand photoblanchiment et donc une perte du signal.

Pour décrire plus précisément ces effets, le photoblanchiment est la perte définitive du signal fluorescent suite à la dégradation du fluorophore lorsque celui-ci est excité et émet un signal. Cet effet est une des grandes limites à l'usage des fluorophores, et la minimisation de son influence passe par la maximisation du rapport signal sur bruit (SNR pour *Signal-Noise Ratio*) qui permet de réduire l'intensité de la source lumineuse tout en gardant un signal acceptable [115]. Dans la plupart des cas, il est possible de modéliser la photoblanchiment des fluorophores comme une exponentielle simple de la forme $I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$ avec I l'intensité lumineuse émise par le fluorophore, I_0 l'intensité lumineuse émise initialement, et τ le temps caractéristique de photoblanchiment [116]. Il existe d'autres précautions qui peuvent être prises pour réduire l'influence du photoblanchiment, notamment réduire au maximum le temps d'illumination des échantillons en réduisant notamment l'observation via l'oculaire du microscope et le temps nécessaire à la mise au point.

Par opposition au photoblanchiment qui demande de limiter le temps d'exposition, le bruit des capteurs est quant à lui réduit par un temps d'exposition long. Les capteurs utilisés dans ce projet, les dispositifs à couplage de charge (CCD pour *Charge-Coupled Device*), sont soumis à plusieurs sources de bruit. Le SNR pour les capteurs CCD peut s'exprimer sous la forme [117-119] :

$$SNR = \frac{IQt}{\sqrt{IQt + N_d t + N_r^2}}$$

Avec I le flux de photons en photons/pixel/seconde, Q l'efficacité quantique du capteur à la longueur d'onde étudiée, t le temps d'exposition, N_d le courant noir en électrons/pixel/seconde et N_r le bruit de lecture en électrons. Le terme au numérateur représente le signal, et les termes au dénominateur proviennent de trois sources de bruit différentes.

Le terme en \sqrt{IQt} est appelé bruit de grenaille ou bruit photonique, et est lié à la nature corpusculaire de la lumière dont la statistique est généralement modélisée par une distribution de Poisson. Le terme en $\sqrt{N_d t}$ est appelé bruit noir ou bruit d'obscurité et est lié à la génération d'électrons dans le capteur en l'absence de lumière, la principale source étant l'excitation thermique du capteur. Enfin le terme $\sqrt{N_r^2}$ est appelé bruit de lecture et provient notamment de l'amplification électronique du signal [117-119].

De ces bruits ressortent deux types de régimes. Quand le temps d'exposition est trop faible, le bruit de lecture est prédominant et le SNR augmente proportionnellement au temps d'exposition : $SNR \propto t$. À l'inverse, lorsque le temps d'exposition est suffisamment grand, le bruit photonique devient le facteur limitant et le SNR devient proportionnel à la racine du temps : $SNR \propto \sqrt{t}$. En l'essence, cela signifie qu'augmenter le temps d'exposition est toujours bénéfique pour réduire l'influence du bruit dans l'acquisition d'images avec capteur CCD, mais que cette augmentation est plus efficace lorsque le signal lumineux est faible.

Une dernière variable qu'il est important de considérer en réalisant de l'imagerie concerne le choix de l'objectif. En effet, l'imagerie entraîne l'apparition d'aberrations optiques comme les aberrations chromatiques ou les distorsions. Il existe des objectifs capables de corriger ces aberrations mais il n'existe pas un seul objectif adapté à toutes les applications et donc un choix doit être réalisé en fonction de celles-ci. En l'occurrence, pour de la quantification en fluorescence, les objectifs Plan Fluor sont particulièrement adaptés grâce à leur correction des distorsions, des aberrations chromatiques et sphériques et leur bonne transmission dans l'ultraviolet [120, 121]. Les autres variables importantes pour le choix d'un objectif sont la magnification, l'ouverture numérique ainsi que la transmission aux longueurs d'ondes souhaitées. Par ailleurs, il existe également des objectifs avec un anneau de correction pour ajuster la distance de travail et adapter

le système optique à l'échantillon dont le chemin optique peut varier à cause de l'épaisseur des lamelles de verre, de la quantité de milieu de montage ajouté, etc. [120, 121]

2.3.2.3 Corrections numériques post-acquisition

Malgré toutes les précautions qu'il est possible de prendre lors de la prise des images, un certain nombre de corrections sont plus simples à réaliser numériquement.

La première correction est la soustraction du signal de fond. Ce signal provenant de l'arrière-plan a deux sources : la première est physique, la seconde est numérique. La source physique correspond à la fluorescence qui n'est pas directement reçue des fluorophores, celle-ci pouvant provenir de la fluorescence d'autres matériaux, par exemple le milieu de montage, ou provenir de la diffusion de la lumière émise par les fluorophores d'intérêt. La source numérique est quant à elle volontaire et sert à éviter l'écrêtage du bruit, notamment du bruit noir, puisqu'un pixel ne peut avoir une valeur inférieure à 0. Cette compensation est nécessaire pour conserver une moyenne nulle du bruit et donc éviter d'introduire un biais [114].

La seconde correction qu'il est possible de réaliser est une correction de non-uniformité (*Flat Field*). Hors saturation, le signal émis par les fluorophores est proportionnel à l'intensité de l'illumination, mais dans la plupart des cas et malgré un alignement de la source lumineuse, l'homogénéité de l'illumination reste loin d'être parfaite [114]. Il existe plusieurs protocoles pour réaliser une telle correction, plus ou moins simples et plus ou moins précis mais le principe reste généralement proche : il s'agit de préparer un échantillon à l'aide d'une solution spécifique, généralement une solution homogène et très concentrée d'un fluorophore stable pour limiter son photoblanchiment et de longueurs d'onde d'émission similaires à celle du fluorophore utilisé sur l'échantillon [122, 123]. Après la prise de l'image de cet échantillon de référence, un traitement numérique de l'image de l'échantillon est réalisé pixel par pixel pour normaliser selon l'intensité d'illumination de chaque pixel.

Il existe d'autres types de correction, Waters et Wittmann [114] citent par exemple la correction du photoblanchiment en quantifiant la perte de fluorescence pour redresser le signal. Cependant il faut prendre en compte que ce type de correction repose sur des hypothèses et que multiplier les corrections augmente la qualité des images mais aussi le risque de produire des aberrations. Il est par exemple possible d'augmenter numériquement la résolution des images en réalisant une déconvolution par la fonction d'étalement du point (*Point Spread Function*) [124].

Enfin une dernière précaution à prendre pour améliorer le traitement numérique des images et qui peut sembler évidente est de sauvegarder les acquisitions dans un format sans compression comme le format TIFF [114].

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIES DE QUANTIFICATION EN IMMUNOPLASMONIQUE ET IMMUNOFLUORESCENCE

L'un des avantages de l'IP est de permettre une quantification de l'immunomarquage. Cependant la validation de la justesse et de l'efficacité de ce marquage est complexe puisque les méthodes pouvant tenir la comparaison avec l'IP sont au mieux semi-quantitatives. De plus, les modèles utilisés ont beau être des lignées cellulaires immortalisées et censées être comparables les unes aux autres, ils restent des échantillons biologiques présentant une certaine variabilité intrinsèque à leur complexité. Il est important de décrire avec précision les procédures suivies pour assurer une reproductibilité maximale et expliciter leurs limites et les hypothèses qui les accompagnent.

Avant de décrire le matériel et les protocoles, il est pertinent de rappeler le point de départ du projet et quelles sont les questions que les méthodes décrites ci-dessous cherchent à élucider. Des preuves de concept de la spécificité de l'IP ont été réalisées au sein du LP2L en démontrant un attachement de NPs fonctionnalisées plus important que l'attachement de NPs non-fonctionnalisées, en ciblant CD44 sur la lignée MDA-231 et HER2 sur MDA-453, respectivement positives au marqueur CD44 et HER2 [60, 125]. Le but général de ce projet est de confirmer et d'étendre ces résultats à une variété d'autres marqueurs et d'autres lignées, avec divers niveaux d'expression pour, à terme, parvenir à quantifier la réponse IP.

Pour prouver que la spécificité IP est atteignable pour différentes lignées et différents niveaux d'expression d'antigènes, la multiplication des lignées est nécessaire et permet plus spécifiquement de répondre à quatre questions :

1. La spécificité de l'attachement des NPs fonctionnalisées est-elle liée à l'attachement spécifique d'un anticorps à un antigène ?
2. L'attachement non spécifique observé est-il dépendant de la lignée observée ?
3. L'efficacité de la fonctionnalisation se vérifie-t-elle pour plusieurs anticorps différents ?
4. Dans quelle mesure l'IP est-elle sensible à la variation d'expression des antigènes ?

La première question s'explique par le besoin de confirmer que l'attachement observé par C. Darviot est bien spécifique, et n'est pas lié à une dégradation des anticorps lors de la fonctionnalisation d'une façon à favoriser l'attachement non-spécifique des NPs. Autrement dit, il

s'agit de confirmer qu'une même fonctionnalisation peut engendrer des NPs capables d'avoir une réponse positive ou négative, dépendamment de l'échantillon.

La seconde question est semblable à la première, mais en remettant en cause cette fois les cellules plutôt que les NPs. Les cellules ont différentes morphologies et il est possible que différentes lignées aient différents niveaux d'attachement non spécifiques. Dit autrement et de façon vulgarisée, il est raisonnable de penser que les cellules peuvent être plus ou moins collantes selon la lignée dont elles sont issues, ce qui explique l'intérêt d'étudier l'attachement non spécifique de différentes lignées.

La troisième question s'explique plus simplement. La fonctionnalisation de NPs a été un défi par le passé et est certainement encore ouverte à plusieurs améliorations. L'ambition de l'IP étant d'évoluer vers des applications cliniques, il est important que la chimie sous-jacente soit maîtrisée et compatible avec les solutions et conservateurs utilisés industriellement, notamment ceux décrits à la sous-sous-section 2.2.3.2. Multiplier le nombre d'anticorps est une première étape pour assurer que, si la fonctionnalisation CD44 est efficace, ce n'est pas parce que l'anticorps est particulièrement adapté à la technique mais bien que la technique EDC-NHS est robuste et peut s'étendre à une multitude de clones.

Enfin la dernière question est fortement liée à quantification IP et sa capacité à détecter des variations plus ou moins faibles d'expression protéiques.

3.1 Matériel biologique et protocoles de préparation des échantillons

Dans la continuité de ce qui a été réalisé précédemment au LP2L en termes d'attachement spécifique IP, il a été choisi de travailler sur des échantillons cellulaires entiers. L'une des raisons de ce choix est que les échantillons tranchés, qu'ils soient histologiques ou cytologiques, sont mis en bloc de paraffine. Malgré plusieurs tentatives, la déparaffinisation manuelle s'est montrée difficile et un attachement non-spécifique au substrat très important a été observé. L'une des causes probables de cet attachement est la déparaffinisation imparfaite des échantillons, et il a été décidé de ne pas traiter cette question dans le présent travail en conservant des échantillons de cellules entières. Par ailleurs, il a été décidé de se concentrer sur l'étude de cellules adhérentes, par opposition de cellules dont le culture se fait en suspension.

3.1.1 Lignées cellules adhérentes étudiées et protocoles de culture

Les lignées étudiées dans ce projet sont au nombre de quatre. Les MDA-231 et les MDA-453 sont des lignées de cancer du sein sur lesquelles le LP2L possédait une expérience antérieure à ce projet. Les lignées H460 et H1975 sont des lignées de cancer du poumon acquises pour ce projet, notamment pour augmenter le nombre de lignées disponibles et pour diversifier le profil antigénique des cellules. Les quatre lignées proviennent d'ATCC et ont été achetées auprès de CedarLane. L'ensemble des informations pertinentes pour l'identification de l'origine de ces quatre lignées a été résumées dans le Tableau 3.1. La Figure 3.1 représente ces quatre lignées cultivées dans des boîtes de Petri et observées en champ clair. On y observe des morphologies relativement différentes d'une lignée à l'autre. Les H460 sont des cellules relativement petites, croissant par îlots denses, assez proches des MDA-453 qui sont elles aussi petites mais beaucoup plus rondes. Par opposition à ces deux premières, les H1975 et les MDA-231 sont des cellules relativement allongées, même si les H1975 présentent une morphologie plus hétérogène.

L'ensemble des manipulations cellulaires est réalisé sous hotte biologique stérilisée à l'éthanol diluée à 70% dans de l'eau ultrapure (UpH₂O). Les liquides stériles sont manipulés avec des pipettes sérologiques Fisher Scientific de 5 ml (#14955233), 10 ml (#14955234) ou 25 ml (#14955235) selon les besoins. Les contenants stériles utilisés pour réaliser les dilutions sont des tubes VWR en polypropylène compatibles avec la centrifugation de 15 ml (#10025-686) ou de 50 ml (#10025-698). Les solutions entrant en contact avec les cellules, notamment les milieux de culture, le PBS et la trypsine, sont chauffées au moins 15 minutes dans un bain à 37°C pour limiter le choc thermique.

Les H460 et H1975 sont cultivées selon les recommandations d'ATCC, dans un milieu de culture RPMI-1640 modifié selon la formulation d'ATCC, acheté chez Thermo Fisher Scientific (TFS) (#A1049101). Le milieu de culture utilisé pour les MDA-231 et MDA-453 est le DMEM (#10313021, TFS). Ces deux milieux sont supplémentés avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS pour *Fetal Bovine Serum*) (#12483020, TFS) pour favoriser la croissance cellulaire. Pour limiter les risques de contamination, le milieu est également supplémenté avec des antibiotiques concentrés à 1X d'un mélange de pénicilline-streptomycine-glutamine (PSG) (#10378016, TFS), et par de la *plasmocin prophylactic* (#ant-mpp, InvivoGen), un traitement préventif contre la contamination aux mycoplasmes, à une concentration finale de 4.5 µg/ml.

Tableau 3.1 – Informations générales sur les lignées cellulaires étudiées.

| | H460 [126] | H1975 [127] | MDA-231 [128] | MDA-453 [129] |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Nom complet | NCI-H460 | NCI-H1975 | MDA-MB-231 | MDA-MB-453 |
| Numéro de référence ATCC | HTB-177 | CRL-5908 | HTB-26 | HTB-131 |
| Espèce | Humain, <i>homo sapiens</i> | | | |
| Type | Cellules épithéliales | | | |
| Organe | Poumon Épanchement pleural | Poumon | Sein Glande mammaire | |
| Maladie | Carcinome | Adénocarcinome | Adénocarcinome métastatique | Carcinome métastatique |
| Patient | Homme | Femme non-fumeuse | Femme blanche de 51 ans | Femme blanche de 48 ans |

Les cellules sont cultivées en incubateur à 37°C sous atmosphère à base d'air ajusté à 5% de CO₂ dans des flasques T75 (#50-809-261, TFS), adaptées à la culture de cellules adhérentes.

Des inspections visuelles ont été réalisées régulièrement pour vérifier l'absence de contaminations visibles. En cas de doutes sur la présence d'une contamination aux mycoplasmes, des Petri contenant des cellules ont été préparés et incubés une vingtaine de minutes avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) concentré à 5 µg/ml. L'observation des échantillons est faite par microscopie en fluorescence pour détecter une coloration anormale des cellules.

Lorsque les cellules atteignent une confluence supérieure à 70%, un passage est réalisé. Les cellules sont d'abord rincées avec 5 ml de PBS de Dulbecco (DPBS) (#D8537, Sigma-Aldrich) avant d'être incubées 5 à 10 minutes dans 2 ml d'une solution de trypsine-EDTA concentrée à 0.25% (#T4049, Sigma-Aldrich). Après décollement des cellules, la trypsine est désactivée par l'ajout de 8 ml de

milieu de culture sous l'action du FBS contenu dans celui-ci. Les cellules en suspension dans un volume de 10 ml sont homogénéisées par plusieurs allers-retours dans une pipette sérologique puis transvasées dans un tube de 15 ml pour être vortexées quelques secondes (1 à 3 s) à vitesse maximale. Les cellules sont à nouveau homogénéisées par des allers-retours avant d'être utilisées pour ensemercer une nouvelle flasque et éventuellement, des lames de microscopes à huit puits.

Pour ensemercer une nouvelle flasque, 10 ml de milieu de culture y sont ajoutés avant d'introduire un volume variable de cellules, ajustés avec la pratique selon la vitesse de croissance des lignées et mentionnés à titre indicatif au Tableau 3.2. Ces volumes permettent un passage tous les 3 à 4 jours avec une confluence de 80%, même si des variabilités sont possibles notamment à cause de l'homogénéisation imparfaite des cellules en solution. Pour limiter les risques de mutations des cellules, le nombre de passages cellulaires est limité à 25, avant décongélation d'un nouveau lot.

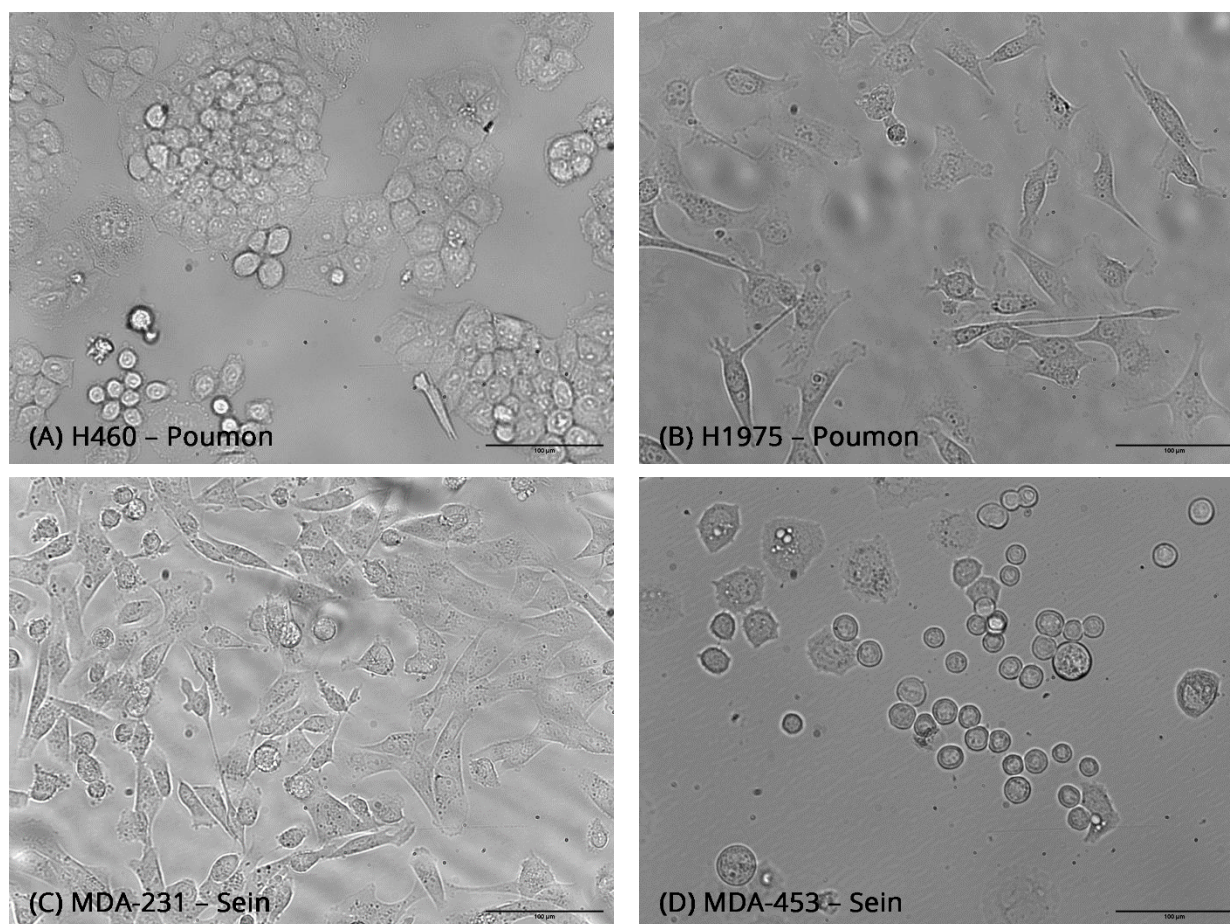


Figure 3.1 – Les lignées H460 (A), H1975 (B), MDA-231 (C) et MDA-453 (D) en culture, visualisées en champ clair.

Tableau 3.2 – Liste des volumes utilisés pour la culture cellulaire.

| | | H460 | H1975 | MDA-231 | MDA-453 |
|---|---|---------|-------|---------|---------|
| Suspension des cellules | Trypsine-EDTA ajoutée | 2 ml | | | |
| | Milieu de culture ajouté après décollement des cellules | 8 ml | | | |
| | Volume final de cellule suspendues | 10 ml | | | |
| Préparation d' une nouvelle flasque T75 | Volume de milieu de culture (nouvelle flasque) | 10 ml | | | |
| | Volume de cellules | 0.5 ml | 1 ml | 1 ml | 2 ml |
| | Volume final dans la flasque | 10.5 ml | 11 ml | 11 ml | 12 ml |
| Préparation des lames huit puits | Volume de milieu | 3.5 ml | 3 ml | 3 ml | 2 ml |
| | Volume de cellules | 0.5 ml | 1 ml | 1 ml | 2 ml |
| | Volume total | 4 ml | | | |

3.1.2 Préparation de lames et fixation

Pour préparer des cellules à marquer par IF ou IP, des lames de microscopes à huit puits amovibles de la marque Ibidi (#80841) sont utilisées. Ces lames sont privilégiées car l'amovibilité des puits permet un montage de la lame, mais il s'agit aussi et surtout d'une des rares marques à proposer des lames sans revêtement coloré entre les puits. Ce revêtement est nuisible pour l'observation du marquage IP puisqu'il provoque une forte diffusion de la lumière lorsque la lame est illuminée par le dispositif d'illumination latérale.

Pour ensemercer les lames, les cellules en suspension après trypsination sont diluées à nouveau dans un ratio adapté selon la vitesse de croissance de la lignée. Les volumes exacts sont précisés au Tableau 3.2. Cette solution est vortexée pour l'homogénéiser et à chaque puit est ajouté 400 μ l. Les lames sont placées dans l'incubateur entre 32 et 72 heures jusqu'à atteindre une confluence satisfaisante avant que les cellules ne soient fixées. Il est important de laisser incuber les cellules suffisamment longtemps pour réduire l'influence de la trypsine en laissant aux cellules suffisamment de temps pour guérir du choc chimique subi.

Lorsque les cellules sont suffisamment confluentes, elles sont rincées une fois avec 400 μ l de DPBS avant d'être fixées sans attendre pendant 10 minutes sur glace avec 200 μ l d'un mélange à 70% de méthanol et 30% d'acétone apporté préalablement à -20°C. Les cellules sont ensuite rincées trois fois 5 minutes dans 400 μ l de DPBS. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C au maximum une semaine, conformément aux recommandations de Lonic, et al. [130].

Une note importante est qu'un décollement des cellules a parfois été observé lors des manipulations, résultant en la perte des échantillons. Pour limiter ce phénomène, les puits sont vidés en retournant la lame au-dessus d'un réservoir, plutôt qu'en pipettant les volumes. Le recouvrement de la lame avec une protéine favorisant l'adhésion cellulaire a été évité pour réduire l'attachement non spécifique des NPs au substrat, phénomène qui a été observé par le passé au LP2L.

3.2 Protocoles d'immunomarquages

3.2.1 Immunofluorescence et immunoplasmonique

Les protocoles d'immunofluorescence et d'immunoplasmonique sont assez proches en ce sens qu'il s'agit de deux méthodes d'immunomarquage.

Une précision importante est que, mis à part la fixation et la conservation des échantillons après fixation, l'ensemble des étapes est réalisé à température ambiante ($19.5^{\circ}\text{C} \pm 2$). Aussi, dès la première incubation avec un fluorophore, les incubations sont réalisées dans une boîte fermée pour limiter le photoblanchiment.

Dans les deux cas, les cellules fixées sont incubées pendant 30 minutes dans 200 μ l de tampon bloquant constitué de PBST dans lequel de la BSA a été diluée à hauteur de 1%.

3.2.1.1 Immunofluorescence

Pour les immunofluorescences, après bloquage les cellules sont incubées avec les anticorps primaires pendant 1 heure avant de réaliser trois lavages de 5 minutes au PBST. Les anticorps secondaires sont alors incubés 1 heure avant de réaliser à nouveau trois lavages. Les cellules sont ensuite prêtes pour une coloration membranaire et nucléaire.

Une information notable est que tous les anticorps primaires sont incubés à 5 µg/ml et les secondaires à 4 µg/ml. Même si la concentration optimale peut varier d'un anticorps à l'autre, elle reste proche des 5 µg/ml, et il a été choisi de fixer une concentration pour tous les anticorps afin de faciliter la comparaison entre eux. De même, même si les hôtes des anticorps primaires sont différents, pour faciliter la comparaison les secondaires choisis font partie de la même gamme de produit, sont utilisés aux mêmes concentrations et sont conjugués au même fluorophore, à savoir de l'Alexa Fluor (AF) 488. Le détail concernant les anticorps utilisés est donné au Tableau 3.4.

3.2.1.2 Immunoplasmonique

Pour les immunoplasmoniques, sauf mention contraire les cellules bloquées sont incubées 3h avec les NPs fonctionnalisées² à une concentration estimée à $4.5 * 10^8$ NPs/ml. Trois lavages de 5 minutes sont ensuite réalisés au PBST avant de colorer les membranes et noyaux des cellules.

Ces lavages, contrairement à tous les autres, sont un peu plus minutieux en ce sens que la lame n'est pas retournée pour vider les puits mais les puits sont vidés à la pipette après avoir réalisé trois allers-retours. Ces lavages, un peu plus énergiques, semblent aider à détacher les NPs faiblement attachées (notamment attachées de façon non spécifique) et les agrégats, ce qui améliore la qualité du marquage IP. Les effets de ces lavages ont été constatés expérimentalement mais n'ont pas été étudiés en profondeur.

3.2.1.3 Colorations anatomiques et montage

Après immunomarquage, les cellules subissent une dernière étape de coloration visant à identifier leur noyau et membrane.

² Les protocoles de pégylation et de fonctionnalisation sont détaillés plus loin dans cette section.

La majorité du temps, les cellules sont colorées au DAPI concentré à 1 µg/ml et à l'agglutinine de germe de blé (WGA pour *Wheat Germ Agglutinin*) conjugué à de l'AF594 concentré à 5 µg/ml, colorant respectivement les noyaux et les membranes. Ces agents colorants sont dilués dans du PBST et 200 µl de cette solution est ajouté à chaque puit pour 10 minutes. Après trois lavages de 5 minutes au PBST, les puits amovibles sont finalement retirés et les lames sont montées avec du VectaShield (#VECTH170010, BioLynx Inc.), un milieu de montage adapté à l'imagerie en fluorescence. Les lames sont scellées par des lamelles de verre (#48404-455, VWR) maintenues en place par du vernis transparent. Cette méthode peut être utilisée pour les lames d'IF comme les lames d'IP.

Une autre coloration anatomique employée uniquement pour l'IP est la coloration H&E. Dans ce cas, les puits amovibles sont directement retirés avant de plonger la lame dans un bain d'hématoxyline de Gill II (#105175, Sigma-Aldrich) pendant 2 minutes. Les lames sont rincées 1 minute à l'eau distillée puis plongée 3 minutes dans un bain d'éosine B alcoolique (#115934, Sigma-Aldrich). La lame est rincée 30 secondes dans l'eau distillée puis déshydratée progressivement dans deux bains d'éthanol 70% 3 minutes puis 1 minute, deux bains d'éthanol 95% 1 minute chacun, deux bains d'éthanol 100% 1 minute chacun et deux bains de xylène 1 minute chacun. Du permount (#17986-05, Electron Microscopy Sciences), un milieu de montage compatible avec le xylène, est ajouté à la lame qui est ensuite scellés avec une lamelle de verre et du vernis transparent.

L'ensemble des étapes décrites ci-dessus est schématisé à la Figure 3.2.

Dans ce projet, quatre lots d'expériences ont été réalisés, à savoir un lot d'IF et trois lots d'IP. Ces expériences sont décrites au Tableau 3.4.

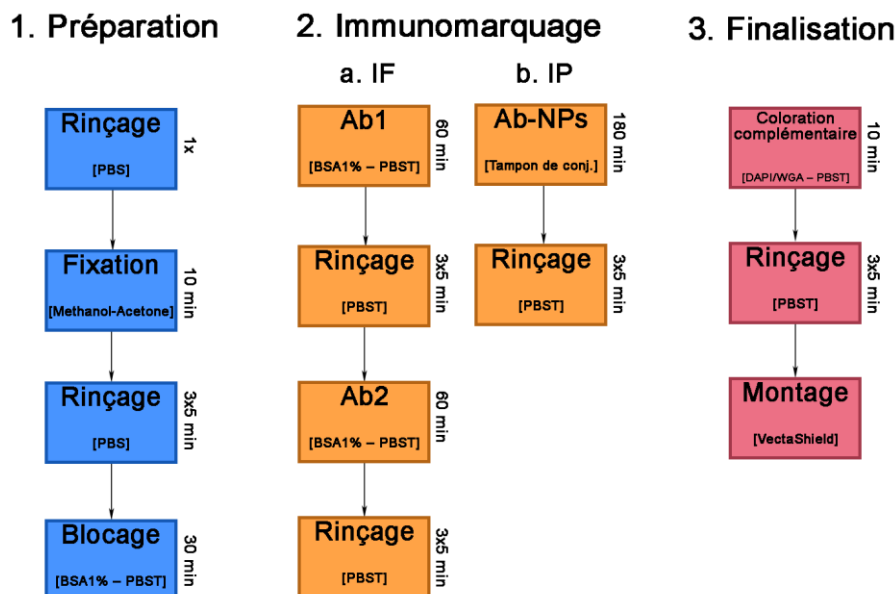


Figure 3.2 – Schéma récapitulant les protocoles d’immunomarquage (IF et IP).

3.2.2 Protocoles de pégylation et de fonctionnalisation

3.2.2.1 Pégylation

Les NPs utilisées dans ce projet sont des nanobilles d’or pur de diamètre 101.9 ± 5.7 nm concentrées à $4.8 * 10^9$ NPs/ml, provenant de la gamme NanoXact (#AUCN100) de NanoComposix. Ces NPs, initialement nues stabilisées dans du citrate de sodium aqueux concentré à 2 mM, ont été pegylées par C. Darviot, I. Largillière et G. Ortiz. Le processus se décompose en deux étapes : la réduction des thiols et l’incubation des NPs avec le PEG.

Deux types de pégylation sont réalisées : l’une au methyl-PEG (mPEG) (#PG1-TH-5k, Nanocs), l’autre au carboxyl-PEG (PEG-COOH) (#PG2-CATH-5k, Nanocs). Le groupe méthyle est un groupe relativement inactif faisant office de contrôle négatif dans ce projet, alors que le groupe carboxyle est dédié à être activé par réaction EDC-NHS pour y conjuguer des anticorps. Ces deux PEG sont d’un poids moléculaire de 5 kDa. Le PEG lyophilisé est dilué à 10 mg/ml dans de l’UpH₂O puis subit l’activation de ses thiols en rompant les ponts disulfure qui ont pu se former lors de la conservation. Pour cela, dans 506 µl de PEG est ajouté 44 µl de TCEP (#20491, TFS) dilué à 500 mM. Le mélange est laissé 15 minutes à température ambiante avant d’être filtré deux fois à l’aide de filtres Amicon 3 kDa (#UFC500324, TFS) et de centrifugations de vingt minutes à 14 000g, avec une re-suspension dans de l’UpH₂O.

Tableau 3.3 – Récapitulatif des conditions étudiées dans ce projet

| | |
|-------------------------------|---|
| Panel d' IF | <p><u>Objectif</u> : obtenir une base quantitative de comparaison pour l'IP</p> <p><u>Observations</u> : qualitatives et quantitatives</p> <p><u>Conditions</u> : pour les quatre lignées, étudier le marquage des six anticorps, un contrôle sans primaire ni secondaire et trois contrôles sans primaire mais avec secondaires</p> <p><u>Paramètres</u> : incubation du primaire 1h à 5 µg/ml ; incubation du secondaire 1h à 5 µg/ml</p> <p><u>Répétitions</u> : 3 fois minimum</p> |
| Panel d' IP | <p><u>Objectif</u> : étudier l'attachement IP pour une multitude de marqueurs et de lignées</p> <p><u>Observations</u> : qualitatives et quantitatives</p> <p><u>Conditions</u> : pour les quatre lignées, étudier le marquage des NPs fonctionnalisées avec les six anticorps et un contrôle négatif de NPs pégylées avec du mPEG</p> <p><u>Paramètres</u> : incubation des NPs de 3h concentrées à $4.5 \cdot 10^8$ NPs/ml</p> <p><u>Répétitions</u> : 3 fois minimum</p> |
| IP en coculture | <p><u>Objectif</u> : observer l'attachement IP avec marqueurs différenciant des cellules cocultivées</p> <p><u>Observations</u> : qualitatives</p> <p><u>Conditions</u> : pour les H460 et H1975, étudier le marquage des NPs CD44 et PDL1</p> <p><u>Paramètres</u> : incubation des NPs de 3h concentrées à $4.5 \cdot 10^8$ NPs/ml</p> <p><u>Répétitions</u> : 1 fois</p> |
| Effets du temps d' incubation | <p><u>Objectif</u> : observer l'attachement IP pour divers temps d'incubation</p> <p><u>Observations</u> : qualitatives</p> <p><u>Conditions</u> : pour les H460 et H1975, étudier le marquage des NPs CD44 et PDL1</p> <p><u>Paramètres</u> : incubation des NPs concentrées à $4.5 \cdot 10^8$ NPs/ml pendant : 1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 16h, 18h30 et 24h</p> <p><u>Répétitions</u> : 1 fois</p> |

Pour réaliser la pégylation, 10 ml de NPs concentrées à 5.10^9 NPs/ml sont incubées avec 300 μ l de PEG fraîchement activés. L'incubation est réalisée toute la nuit à 4°C. Après cela, 2 ml de PBST est ajouté, le Tween 20 permettant une réduction notable de l'attachement des NPs aux parois du tube, puis les NPs sont concentrées dix fois par rapport à leur concentration initiale grâce à une centrifugation de 30 minutes à 1 200g (volume final : 1 ml). Les NPs sont ensuite lavées trois fois avec de l'UpH₂O grâce à des centrifugations de 5 minutes à 1 200g.

Pendant tout le processus, les NPs sont vortexées et passées quelques secondes dans un bain à ultrasons après l'ajout d'un réactif pour homogénéiser le mélange. Les NPs pegylées de cette façon peuvent être conservées plusieurs semaines sans dégradation visible de leur qualité.

3.2.2.2 Fonctionnalisation des anticorps

La fonctionnalisation des NPs se fait en trois étapes : l'activation des groupes carboxyles par EDC-NHS, conjugaison des anticorps et saturation de la réaction par hydroxylamine.

Pour activer les groupes carboxyles, les NPs pegylées sont centrifugées 5 minutes à 1200 g puis resuspendues dans un tampon d'acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES) à pH 6. À 125 μ l de NPs concentrées à $5 * 10^{10}$ NPs/ml est ajouté 0.7 μ l d'EDC et 1.3 μ l de sulfo-NHS fraîchement mis en solution d'UpH₂O à 10 mg/ml. La solution de NPs est vortexée avant d'être incubée sur rotateur à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.

Les NPs sont ensuite lavées de l'excès d'EDC-NHS par une centrifugation de 5 minutes à 1 200g puis resuspendues dans un tampon de phosphate de potassium à 5 mM à pH 7.2, supplémenté avec 0.1% de Tween 20. C'est alors que sont ajoutés 2 μ g d'anticorps. La liste des anticorps utilisés dans ce projet est référencée au Tableau 3.4. S'ensuit une heure d'incubation sur rotateur à l'abri de la lumière.

Après incubation des anticorps, 1 μ l d'hydroxylamine (#467804, Sigma-Aldrich) est ajouté pour inactiver les groupes esters n'ayant pas réagi avec des anticorps. Après une incubation de 10 minutes sur rotateur à l'abri de la lumière, les NPs sont lavées trois fois avec le tampon de phosphate de potassium grâce à des centrifugations de 5 minutes à 1200 g.

Les NPs ainsi préparées sont caractérisées avant d'être utilisées, si possible au plus tard dans les jours suivants puisque la stabilité des NPs fonctionnalisation n'a pas été observée comme étant très

bonne. Pour être amenée à la concentration désirée, les NPs sont diluées dans un tampon constitué de PBS 0.1X, de 0.5% de BSA, 0.5% de Tween 20 et de 0.05% d'azoture de sodium.

3.2.2.3 Caractérisation des NPs

Pendant le processus de fonctionnalisation, un certain nombre de NPs peut être perdu, notamment à cause de l'agrégation ou de l'attachement aux parois des tubes utilisés. Pour cette raison, contrôler la concentration réelle des NPs est nécessaire pour se placer dans des conditions similaires et comparer différentes fonctionnalisations entre elles. Pour calculer les concentrations en NPs, le spectre d'extinction des solutions est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre EPOCH (BioTek). Les mesures sont réalisées à l'aide d'une plaque à microvolumes Take3 (BioTek) dont chaque puit est rempli de 2 μ l, et l'appareil mesure l'extinction entre 200 et 900 nm par pas de 1 nm.

Deux spectres typiques sont représentés à la Figure 3.3.a. Pour déterminer la concentration en NPs de la solution, il a été décidé de considérer la valeur moyenne du plateau situé entre 300 et 450 nm car ce plateau est *a priori* moins sensible à l'agrégation que les résultats relatifs au pic d'extinction, qui a tendance à s'élargir et à perdre en intensité en augmentant le taux d'agrégation. La concentration en NPs nues de la solution commerciale est donnée par la compagnie Nanocomposix et la valeur de $4.8e9$ NPs/ml est supposée juste. Une échelle de dilution a été réalisée et avec dix points, une régression linéaire permet de relier la valeur moyenne du plateau à la concentration en NPs, avec la relation : $\overline{Plateau} = \alpha C$ avec $\alpha \approx 5.19 * 10^{-12} ml/NPs$. Le coefficient de détermination vaut environ 0.986 ce qui est très bon et confirme la corrélation entre la concentration en NPs et la valeur moyenne du plateau.

Les concentrations sont mesurées de cette façon après pégylation et après fonctionnalisation pour ajuster la concentration des NPs et/ou des réactifs avant fonctionnalisation et avant incubation sur cellules respectivement. Par ailleurs, pour les NPs fraîchement pégyliées des mesures de diffusion dynamique de la lumière DLS sont réalisées mais celles-ci ne sont pas discutées dans ce projet.

Tableau 3.4 – Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages

| ANTICORPS PRIMAIRES | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Cible | CD44 | PDL1 | EpCAM | CXCR4 | CD70 | CEA |
| Clone | Hermes-1 | 28-8 | 1B7 | 12G5 | BU69 | CB30 |
| Référence | #MA4400 | #ab228413 | #14-9326-82 | #35-8800 | #MA5-17725 | #14-0669-82 |
| Fournisseur | TFS | Abcam | TFS | TFS | TFS | TFS |
| Concentration initiale | 1 mg/ml | 1 mg/ml | 0.5 mg/ml | 0.5 mg/ml | 1 mg/ml | 0.5 mg/ml |
| Hôte | Rat | Lapin | Souris | Souris | Souris | Souris |
| Isotype | IgG2a | IgG | IgG1 | IgG2a | IgG1 | IgG1 |
| BSA | Non | Non | Non | Non | Non | Non |
| Azoture de sodium | Non | Non | 0.09% | 0.1% | 0.02% | 0.09% |
| Glycérol | Non | Non | Non | Non | Non | Non |

| ANTICORPS SECONDAIRES | | | |
|------------------------------|------------|----------|----------|
| Cible | Rat | Lapin | Souris |
| Hôte/Isotype | Chèvre/IgG | | |
| Référence | #A-11001 | #A-11006 | #A-11034 |
| Concentration | 2 mg/ml | | |
| Fluorophore | AF488 | | |

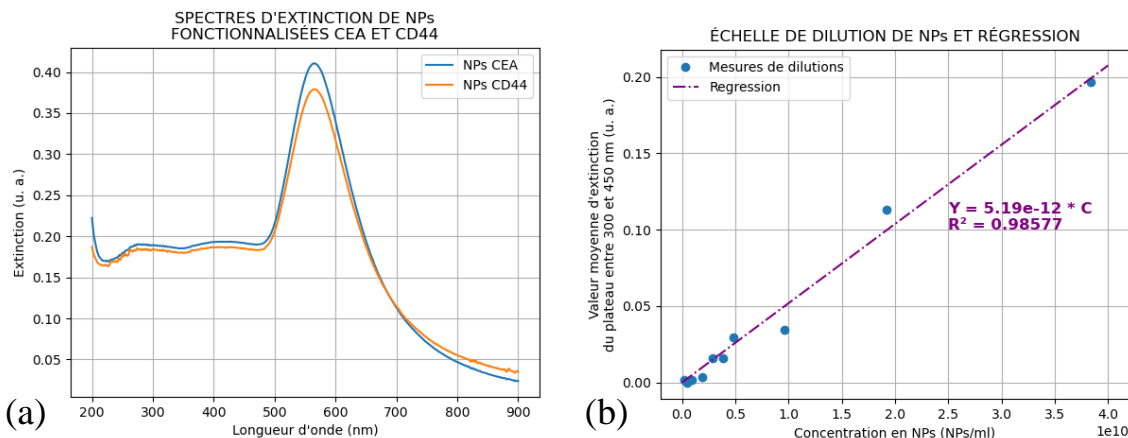


Figure 3.3 – (a) Spectres de nanoparticules fonctionnalisées anti-CEA et anti-CD44 ; (b) échelle de dilution et régression linéaire du plateau selon la concentration en nanoparticules.

3.2.3 Imagerie des lames

3.2.3.1 Lames d'immunofluorescence

Après marquage IF, les lames sont imagées dans les sept jours au maximum pour limiter l'influence du vieillissement des fluorophores et sont conservées en attendant dans une boîte close. Les échantillons sont observés à travers un microscope inversé Nikon Eclipse Ti-U, sur lequel est monté un objectif 20X à air de la série S Plan Fluor ELWD de Nikon, d'ouverture numérique 0.45. La technologie Plan Fluor de cet objectif permet une correction partielle des aberrations optiques et est adaptée à une application en fluorescence. Cet objectif possède un anneau pour ajuster la distance de travail afin de maximiser la lumière reçue et permet notamment de compenser l'épaisseur approximative des lamelles de verre. La source lumineuse pour l'excitation des fluorophores est une lampe X-Cite 120LED de Lumen Dynamics, modèle XT12CL. Elle est allumée 15 minutes au minimum avant la prise d'image pour permettre à la source de se stabiliser. Les filtres pour fluorophores sont montés sur des cubes dont les caractéristiques sont résumées au Tableau 3.5.

La caméra utilisée est une caméra QIClick équipée d'un capteur CCD digital 12 bit monochrome (#QIClick-F-M-12, QImaging), refroidie passivement.

Tableau 3.5 – Caractéristiques des filtres pour l’illumination des fluorophores.

| Fluorochrome | DAPI [131] | AF488 [132] | WGA/AF594 [133] |
|---|-------------------|--------------------|------------------------|
| Couleur | Bleu | Vert | Rouge |
| Constructeur | Chroma | | |
| Référence | #49000 ET-DAPI | #49002 ET-EGFP | #49005 ET-DSRED |
| Bande passante d’excitation (nm) | 325 – 375 | 450 – 490 | 530 – 560 |
| Bande passante d’émission (nm) | 435 – 485 | 500 – 550 | 590 – 650 |

Pour maximiser la qualité des images en AF488, qui est le fluorophore le plus important pour la quantification des marqueurs, une optimisation sommaire a été réalisée dont l’objectif est de déterminer un temps d’exposition pertinent. Pour rappel, le SNR d’un capteur CCD est donné par la formule : $SNR = \frac{IQt}{\sqrt{IQt + N_d t + N_r^2}}$. Pour la caméra utilisée autour de la longueur d’onde 488 nm :

$$Q \approx 55\%$$

$$N_d = 1.5 \text{ e/p/s}$$

$$N_r = 8 \text{ e}$$

Expérimentalement, pour les concentrations utilisées en IF et sachant que le signal est donné par la formule $S = IQt$, I varie numériquement entre 30 et 300 s^{-1} . Pour ces deux valeurs l’amplitude relative du bruit, valant l’inverse du SNR, sont tracées à la Figure 3.4. De façon assez cohérente, plus l’illumination est importante, moins le bruit influence le signal. À l’inverse, pour estimer le taux de photoblanchiment, une capture vidéo de ce phénomène sur IF anti-CD44 sur H1975 a été réalisée. Le signal mesuré est présenté à la Figure 3.4, ainsi que le signal photoblanchi calculé par la formule $S_{perdu} = \frac{|S(t) - S(t=0)|}{S(t=0)} = 1 - \frac{S(t)}{S(t=0)}$. $S(t)$ est déterminé comme étant la différence entre la valeur moyenne des pixels appartenant aux cellules et celle des pixels appartenant au substrat (signal de fond), toutes les deux variables dans le temps. À la Figure 3.5 se trouvent trois images

illustrant le phénomène de photoblanchiment en fonction du temps, le première étant prise au début de l'expérience, la seconde après 10 minutes d'illumination et la dernière après une heure.

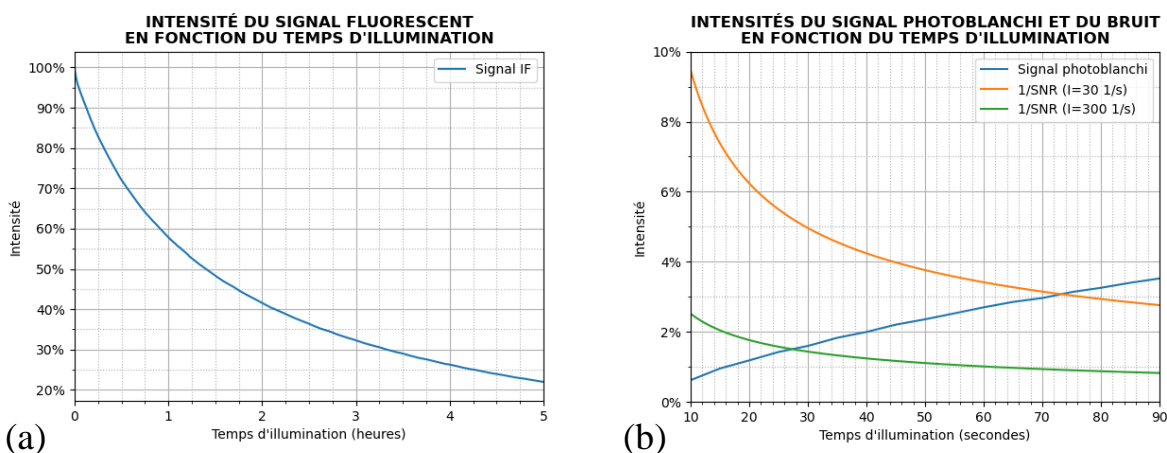


Figure 3.4 – (a) Mesure du signal signal perdu par photoblanchiment ; (b) croisement de la perte de signal par photoblanchiment avec l'intensité du bruit calculé pour deux intensités lumineuses.

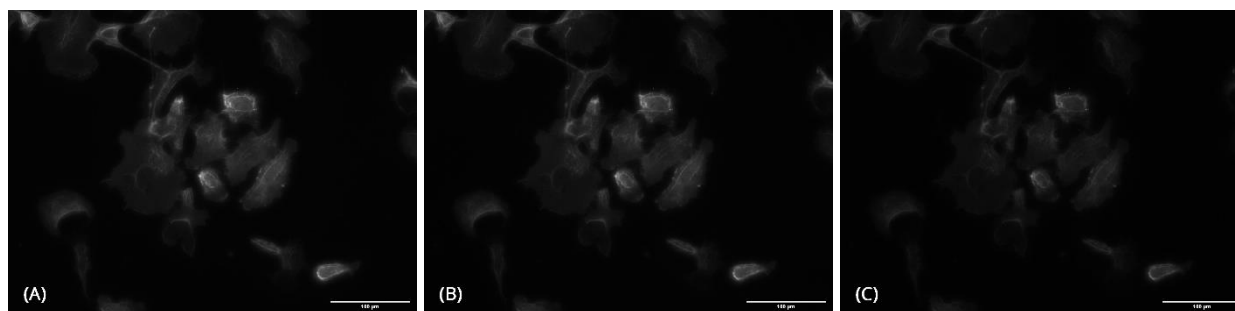


Figure 3.5 – Immunofluorescence anti-CD44 sur H1975 après 0 (A), 10 (B) et 60 (C) minutes d'illumination.

En croisant les effets de photoblanchiment et de maximisation du SNR, la Figure 3.4.b montre pour quels temps d'exposition la qualité du signal est optimale. Cet optimum varie entre 27 s et 73 s selon l'intensité lumineuse de l'échantillon et donc sa positivité au marqueur. Après plusieurs essais, le temps d'exposition pour imager l'AF488 a été fixé à 38.4 s. Avec ce temps d'exposition, il a été constaté que la plage de sensibilité du capteur était déjà relativement étendue sans pour autant saturer les pixels, ce qui fait que le gain a été laissé à 1. Si le signal perçu par les pixels avait été trop faible, le signal aurait perdu en qualité à cause de l'échantillonnage numérique.

Pour l'imagerie du DAPI et du WGA/AF594, le bruit exerce une influence moindre car aucune quantification précise de ces canaux n'est réalisée. Les temps d'exposition choisis à l'usage sont

respectivement de 50 ms et de 120 ms, avec un gain de 5. Pour réaliser une mise au point le plus rapidement possible, le canal rouge a été visualisé avec un temps d'exposition de 120 ms et un gain de 12, après quoi la prise d'image commence immédiatement par le vert.

Le Tableau 3.6 résume l'ensemble de ces paramètres pour la prise d'image d'IF.

Tableau 3.6 – Paramètres de prise d'image pour la quantification de l'immunofluorescence.

| | WGA/AF594 | AF488 | WGA/AF594 | DAPI |
|---------------------------|--|--------------------------------|---|---------------------------------------|
| Temps d'exposition | 120 ms | 38.4 s | 3.8 s | 1.6 s |
| Gain | 12 | 1 | 5 | 5 |
| Rôle | Faire la mise au point le plus rapidement possible | Photographier l'immunomarquage | Photographier la coloration membranaire | Photographier la coloration nucléaire |

3.2.3.2 Lames d'immunoplasmonique

L'IP étant moins sensible aux conditions d'illumination, les précautions à prendre pour l'imagerie sont moins importantes. Les paramètres d'acquisition pour le WGA et le DAPI sont les mêmes qu'en IF.

Pour l'imagerie, un dispositif d'illumination latéral conçu au LP2L par S. Patskovsky. La Figure 3.6 montre ce dispositif installé sur le microscope inversé utilisé, allumé et éteint. Ce dispositif possède des LEDs rouges, vertes et bleues et est contrôlé par ordinateur. Les images d'IP sont réalisées avec ce dispositif en allumant exclusivement les LEDs rouge comme la Figure 3.6.b et prises avec la caméra QIClick et le même filtre rouge que celui utilisé pour l'AF594. Le choix d'utiliser ce filtre a été fait à l'usage, en notant un meilleur contraste avec ce filtre que sans, possiblement dû à la diffusion relativement importante des échantillons biologiques dans le vert. Le temps d'exposition pour imager les NPs est de 100 ms pour un gain de 5.

En cas de coloration H&E, une caméra sCMOS PCO Panda 4.2 est utilisée pour prendre des images en couleur. Le temps d'exposition est fixé à 300 ms et aucun filtre n'est utilisé, afin d'imager l'anatomie cellulaire en même temps que la localisation des NPs.

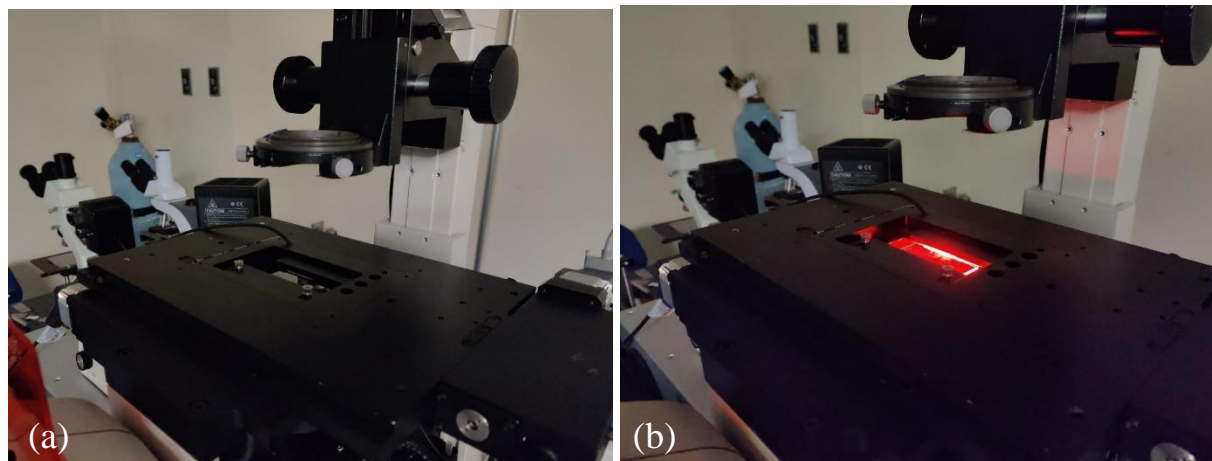


Figure 3.6 – Dispositif d'illumination latéral (a) éteint et (b) allumé avec une lame de microscope.

3.3 Automatisation du traitement d'image

Pour réduire le biais du traitement des images et faciliter leur traitement, automatiser le processus est une solution efficace. Pour autant, l'automatisation nécessite une optimisation et peut introduire des erreurs, même si ces dernières sont moyennement préoccupantes puisqu'elles sont répétées identiquement d'une image à l'autre.

Par ailleurs, l'objectif de cette automatisation est de travailler les images, cellules par cellules. Le logiciel CellProfiler est un logiciel d'analyse d'images cellulaires entretenu par le *Cimini Lab* [134]. L'exemple *Human Cells* a été utilisé comme base pour l'algorithme. Un schéma du procédé retenu est donné à la Figure 3.7. Chaque étape du processus est détaillée plus loin dans cette section.

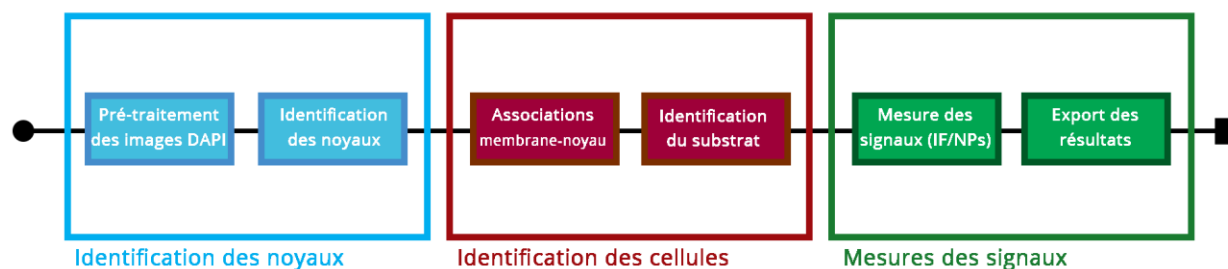


Figure 3.7 – Schéma de la procédure suivie pour le traitement des images.

3.3.1 Identification des noyaux

Les noyaux étant colorés au DAPI, l'identification est relativement simple, pour autant il s'agit d'une étape importante puisque la suite du traitement repose sur cette identification. L'identification des noyaux se fait par l'établissement d'un seuil global déterminé automatiquement par minimisation de l'entropie croisée avec les paramètres par défauts de *CellProfiler*, qui sont adaptés à cet usage.

Pour adapter les images à l'établissement de ce seuil, en particulier pour lisser les noyaux parfois granuleux à cause des nucléoles, une étape de traitement des images est réalisée. Cette étape est importante et a été optimisée par la méthode décrite ci-dessous.

Trois filtres ont été étudiés avec différents paramètres : un filtre gaussien, un filtre médian, et un filtre gaussien lissé (qui est un filtre gaussien avec un traitement particulier pour les bords de l'image). Ces trois filtres possèdent un paramètre à ajuster manuellement et qui correspondent typiquement au diamètre du filtre utilisé.

Pour établir une base de comparaison, cinq images par lignées ont été choisies aléatoirement, soit un total de vingt images au DAPI. Les noyaux ont été comptés manuellement pour un total de 1 806 noyaux. L'optimisation du filtrage correspond alors en la minimisation de l'écart entre le nombre de noyaux détectés et le nombre de noyaux comptés manuellement pour ces vingt images.

Deux types d'erreurs ont été considérés, à savoir une erreur dite absolue et une erreur dite relative :

$$\epsilon_{absolue} = \frac{\sum_i |N_{i,algorithme} - N_{i,manuel}|}{\sum_i N_{i,manuel}}$$

$$\epsilon_{relative} = \frac{\sum_i N_{i,algorithme} - N_{i,manuel}}{\sum_i N_{i,manuel}}$$

Sachant que $\sum_i N_{i,manuel} = 1\,806$.

L'objectif de minimiser $\epsilon_{absolue}$ correspond à la volonté de minimiser l'erreur faite à chaque image, peu importe si l'algorithme a compté des noyaux en trop ou en moins par rapport au décompte manuel.

Accompagner ce calcul avec la valeur $\epsilon_{relative}$ permet de déterminer quel type d'erreur l'algorithme réalise : en général, l'algorithme surestime ou sous-estime-t-il le nombre réel de noyaux ?

La Figure 3.8 présente ces deux erreurs pour le décompte des vingt images choisies. Avec une erreur absolue de 4.76%, inférieure à 5%, le filtre médian de paramètre 16 se présente comme le meilleur choix (avec les mêmes performances que pour un paramètre 17). L'erreur relative de ce filtre est de -0.44%, ce qui signifie que l'algorithme est, au global, légèrement en-deçà du nombre réel de noyau et le sous-comptage réalisé sur certaines images et compensé par le sur-comptage d'autres.

Même si ces résultats sont satisfaisants, il convient de préciser que cette méthode d'optimisation de filtre possède ses défauts. En particulier, la subjectivité du décompte manuel qui influence par exemple le décompte cellulaire pendant les mitoses peut influencer sur le choix du meilleur filtre.

QUANTIFICATION DE L'ERREUR DANS L'IDENTIFICATION DES NOYAUX CELLAIRES

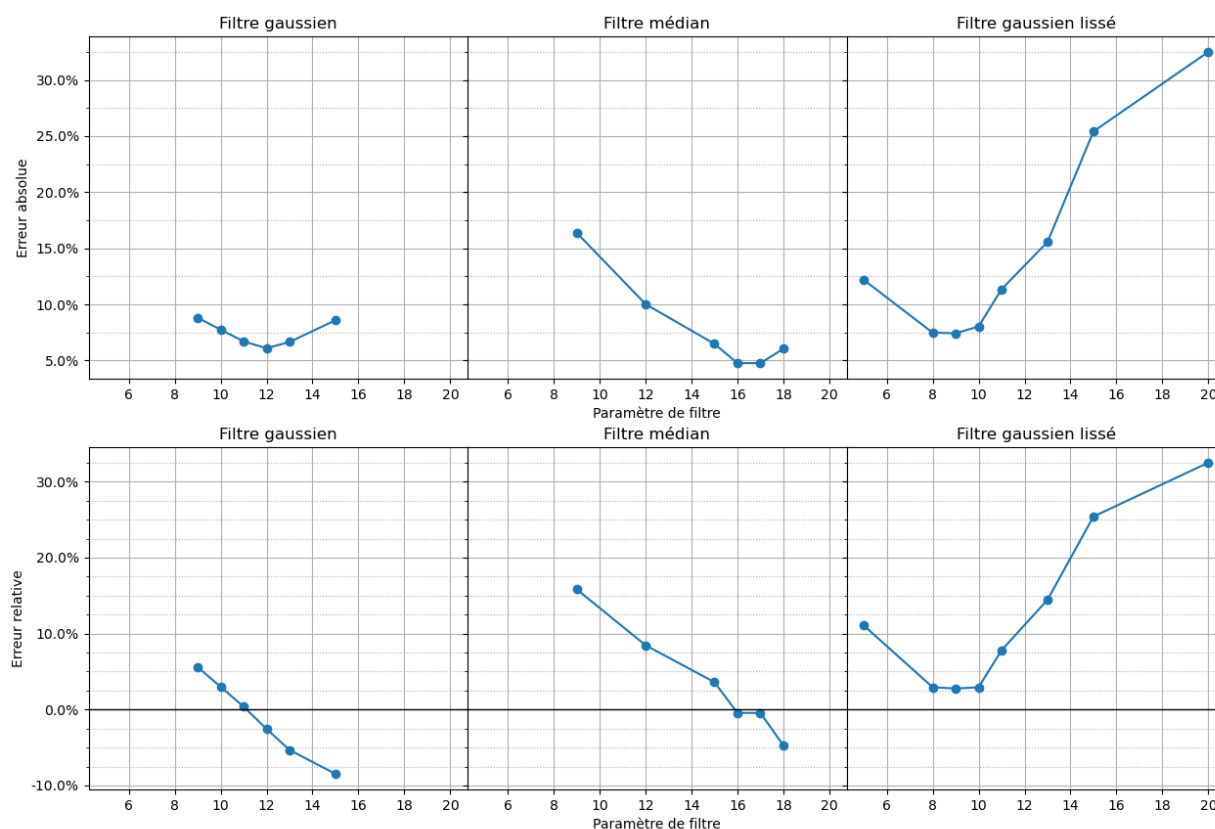


Figure 3.8 – Erreur absolue et erreur relative des trois filtres étudiés pour différents paramètres.

3.3.2 Identification des cellules

À cette étape, l'algorithme identifie les cellules en considérant que chaque cellule possède un noyau. Le principe de l'algorithme consiste alors, à partir de l'image membranaire WGA/AF594 et des noyaux, à « propager » les cellules selon l'intensité de la coloration membranaire. Pour faciliter l'identification du substrat, une transformation logarithmique est réalisée sur l'image membranaire avant d'appliquer un seuil basé sur la minimisation de l'entropie croisée. L'algorithme a désormais identifié les cellules indépendamment les unes des autres. En Figure 3.9 est présentée une image de membranes de cellules MDA-231 superposée à l'identification des cellules réalisée par l'algorithme. En bleu foncé sont délimités les noyaux cellulaires identifiés à la première étape, en cyan sont délimitées les cellules identifiées, et en orange sont les cellules partiellement hors de l'image qui ont été retirées du décompte pour le calcul du signal.

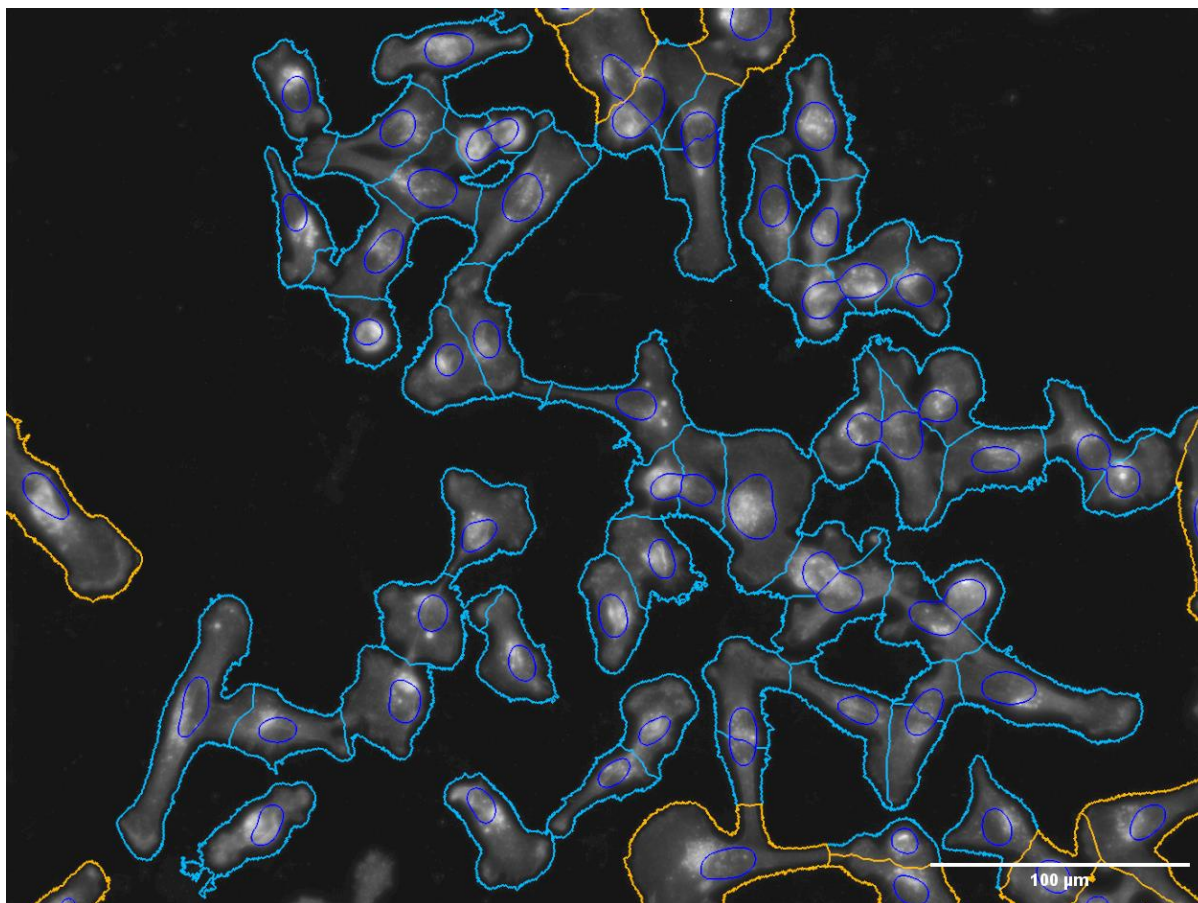


Figure 3.9 – Superposition d'une coloration membranaire sur MDA-231 avec l'identification des cellules réalisée par l'algorithme, avec en bleu foncé les noyaux, en cyan les cellules et en orange les cellules partiellement hors champ.

Il est possible de remarquer sur la Figure 3.9 plusieurs délimitations cellulaires questionnables. Pour autant le résultat obtenu reste très satisfaisant et ces erreurs de délimitations ne sont pas censées avoir un effet significatif sur les résultats finaux.

3.3.3 Mesure des signaux

3.3.3.1 Quantification des signaux d'immunomarquage

La dernière étape est de mesurer le signal pour chaque entité cellulaire et pour le substrat. Le traitement est, logiquement, assez différent pour l'IF et pour l'IP.

Le calcul du signal IF nécessite deux mesures : la mesure de la fluorescence moyenne de chaque cellule et la mesure du signal de fond. La fluorescence moyenne des cellules est mesurée individuellement comme une moyenne numérique c'est-à-dire comme la somme des valeurs des pixels appartenant à la cellule divisée par le nombre de pixels qu'elle contient. Pour le signal de fond, tous les pixels n'appartenant pas à une cellule sont considérés comme étant du substrat et un signal de fond est calculé par image avec la même formule que pour les cellules : $S = \frac{\sum_{px \in \text{substrat}} I_i}{N_{px \in \text{substrat}}}$.

Le signal fluorescent réel des cellules est la différence de ces mesures :

$$S_{réel} = S_{cellules} - S_{substrat}$$

Pour le calcul du signal IP, la méthode retenue exploite l'importante intensité lumineuses des NPs pour les compter : la fonction *Find Maxima* d'*ImageJ* permet de localiser les différents maxima locaux. Le programme exploite une variable appelée *Prominence* pour discriminer les variations trop faibles, liées par exemple à la diffusion lumineuse des cellules ou à des NPs hors focus. Ce paramètre a été fixé à 150 et a été déterminé visuellement par une succession d'essais. Idéalement, une démarche similaire à celle de l'identification des noyaux aurait dû être menée, en comparant l'efficacité d'un algorithme avec un décompte manuel sur un échantillon de référence. Cette optimisation n'a pas pu être réalisée car le décompte manuel des NPs est difficile sans introduire un biais trop important, notamment à cause du traitement des agrégats de NPs. Le nombre et la taille des agrégats varient énormément d'une condition à une autre et les prendre en compte correctement pour la quantification demanderait une étude approfondie et la création d'un programme dédié. La Figure 3.10 illustre ces différences importantes d'agrégations des NPs.

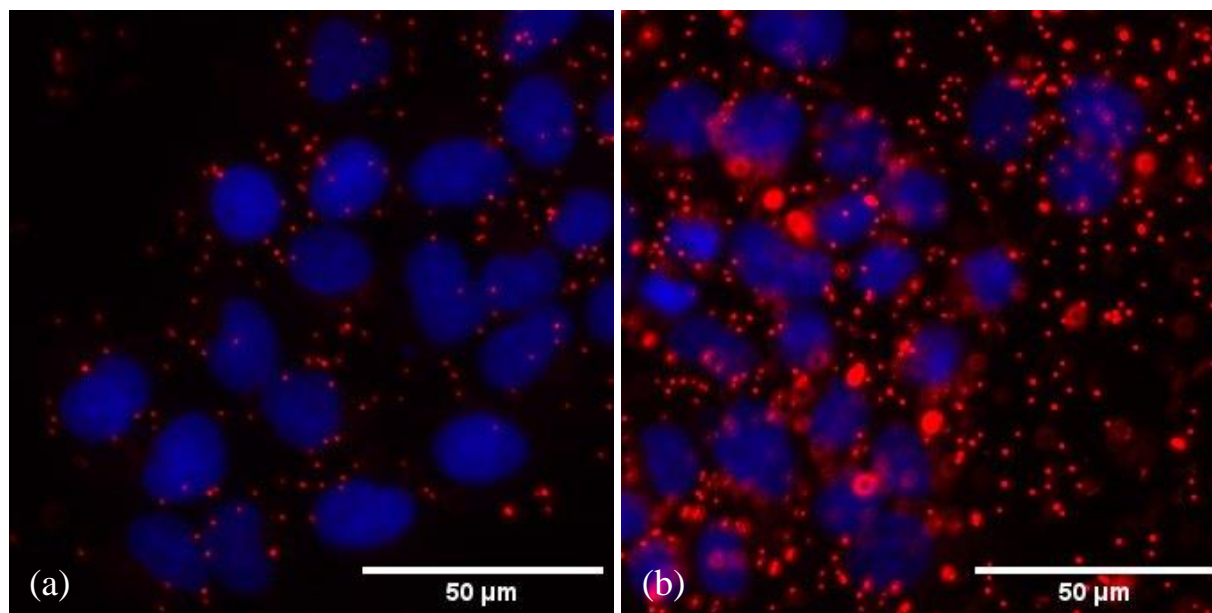


Figure 3.10 – Conditions avec (a) faibles agrégations des NPs (PDL1 sur H460) et (b) avec forte agrégations des NPs (CXCR4 sur H460). En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En rouge : les NPs fonctionnalisées.

3.3.3.2 Présentation et traitements résultats de quantification

Le protocole décrit et employé permet l'étude du marquage à l'échelle d'une cellule, et l'automatisation permet le traitement d'un grand nombre de cellules. Il devient nécessaire de présenter la méthode de traitement de données vu le nombre de données traitées, avec plus de 40 000 cellules étudiées en IF par exemple.

Les données ont été traitées à l'aide Python 3.9.13, en particulier les bibliothèques Pandas pour l'organisation des données, Numpy pour le calcul scientifique, Seaborn pour les statistiques et Matplotlib pour représenter graphiquement les données. En particulier, Seaborn a été utilisé pour réaliser les régressions linéaires et sa fonction *kdeplot* pour représenter les populations de cellules sous forme de densité de population.

Ce type de représentation sous forme de densité de population peut être difficile à comprendre et une grande partie de l'analyse repose dessus, dès lors expliciter un peu cette représentation peut être pertinent. L'estimation par noyau, aussi appelée *Kernel density estimation* est une méthode d'estimation de densité de probabilité à partir d'un ensemble d'observation. Une façon vulgarisée d'expliquer cet algorithme est qu'il transforme chaque observation, associé à une unique valeur,

en une gaussienne centrée sur ce point. En sommant chaque observation, puis en normalisant de façon à avoir $\int_{-\infty}^{+\infty} f(x)dx = 100\%$, la fonction f renvoyée est alors la densité de probabilité estimée.

La Figure 3.11 montre un exemple de distribution, en l'occurrence la quantification d'IF anti-PDL1 sur H1975. En l'occurrence, cette distribution possède une majorité de cellule exprimant entre 0 et 1.5 u. a. d'IF, mais certaines cellules sont au-delà de 1.5 u. a. même si elles sont très minoritaires. Pour comparaison, les contrôles négatifs ont un signal IF de l'ordre 0.3 u. a., ce qui signifie qu'une majorité de cellules H1975 expriment légèrement PDL1, mais qu'une minorité de cellules l'exprime plutôt fortement.

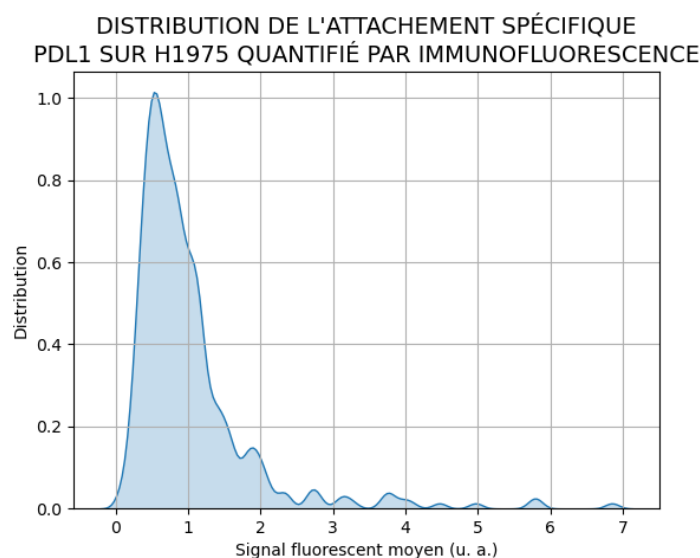


Figure 3.11 – Distribution de la quantification IF anti-PDL1 sur H1975.

Enfin il est important de mentionner que la quantification IF s'exprime en unités arbitraires puisque la variable mesurée est une valeur de pixels, proportionnelle à l'intensité lumineuse reçue par le capteur en négligeant l'influence du bruit et hors saturation. Un maximum de précautions ont été prises afin de rendre comparables les différentes mesures entre elles, en utilisant les mêmes concentrations pour les différents anticorps ou en fixant les paramètres d'acquisition d'images par exemple. Ces précautions sont supposées suffisantes pour pouvoir comparer les différentes IF entre-elles.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS SUR LES IMMUNOMARQUAGES

4.1 Quantifications par immunofluorescence

Pour rappel, l'IF a été choisie comme contrôle afin de servir de base de comparaison pour l'IP. Il s'agit d'une méthode semi-quantitative et les résultats, même s'ils sont numériques, ne devraient pas être considérés comme valeurs absolues.

4.1.1 Attachement non spécifique et autofluorescence

Avant de présenter les résultats d'IF, il est nécessaire de présenter et de discuter des contrôles négatifs. En effet deux types de contrôles négatifs sont réalisés : les contrôles d'autofluorescence, sans aucune incubation d'anticorps, et les contrôles d'attachement non spécifique, sans incubation de primaire mais avec incubation du secondaire. Cette distinction est particulièrement importante puisque les anticorps primaires utilisés sont de trois espèces hôte différentes, à savoir rat, lapin et souris.

La Figure 4.1 montre ces résultats d'attachement non spécifiques.

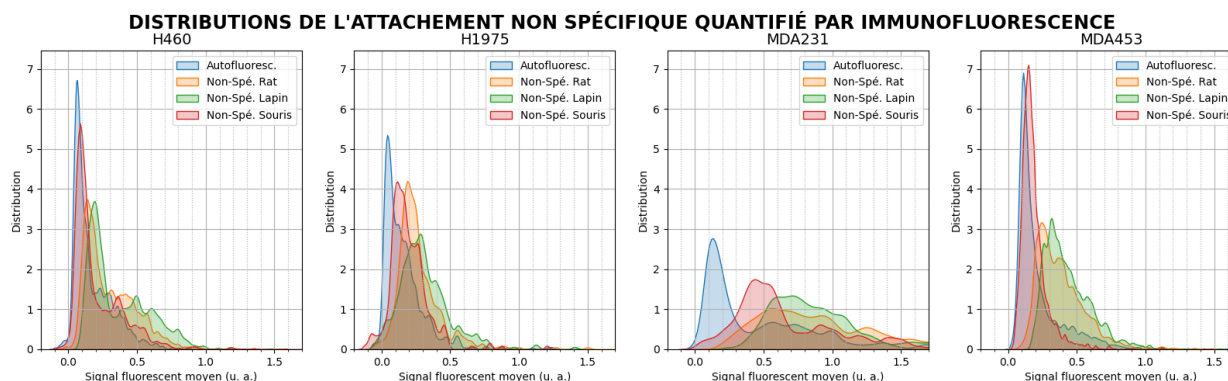


Figure 4.1 – Distributions de l'attachement non spécifique quantifié par immunofluorescence pour les quatre lignées étudiées.

Pour donner un point de comparaison, les marqueurs identifiés comme positifs ont un signal de l'ordre de 3 u. a. et plus. Ces résultats valident *a posteriori* la cohérence de la méthode employée pour la quantification de l'IF puisque les pics d'autofluorescence sont toujours inférieurs aux pics des contrôles d'attachement non spécifiques.

Globalement, l'attachement non spécifique est limité à un signal autour de 0.5 u. a. à l'exception de la lignée MDA-231 qui possède un seuil de négativité de 1.3 u. a. mais qui présente plus d'hétérogénéité, y compris en autofluorescence. Cela peut être dû au traitement numérique qui pourrait être moins efficace à détecter les limites des MDA-231 plutôt que des autres cellules. Dans tous les cas, les ordres de grandeur observés sont les mêmes mais il est opportun de garder cette différence en mémoire pour l'interprétation des résultats sur MDA-231.

Pour synthétiser les informations de ces distributions, le mode (c'est-à-dire la position du maximum), le premier et le troisième quartile de chaque distribution sont donnés au Tableau 4.1, au format « mode [quartile 1 ; quartile 3] ». Les informations données sont essentiellement les mêmes mais affichées sous un format moins graphique mais plus numérique.

Tableau 4.1 – Modes, premiers et troisièmes quartiles des distributions relatives aux contrôles négatifs des quatre lignées étudiées.

| | H460 | H1975 | MDA-231 | MDA-453 |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Autofluorescence | 0.06 [0.07 ; 0.25] | 0.04 [0.05 ; 0.21] | 0.13 [0.14 ; 0.72] | 0.11 [0.11 ; 0.26] |
| Non spécifique Rat | 0.13 [0.15 ; 0.42] | 0.19 [0.17 ; 0.33] | 0.57 [0.57 ; 1.24] | 0.24 [0.25 ; 0.47] |
| Non spécifique Lapin | 0.19 [0.19 ; 0.52] | 0.28 [0.19 ; 0.40] | 0.70 [0.64 ; 1.09] | 0.32 [0.31 ; 0.53] |
| Non spécifique Souris | 0.09 [0.08 ; 0.32] | 0.12 [0.11 ; 0.26] | 0.43 [0.41 ; 0.91] | 0.15 [0.13 ; 0.22] |

4.1.2 Quantification par immunofluorescence du panel d'anticorps

4.1.2.1 Distributions des signaux d'immunofluorescence quantifiée

Maintenant que les seuils de négativité ont été déterminés et que les contrôles négatifs ont démontré que les différents secondaires entraînent des attachements non spécifiques semblables, il est possible d'exposer et de discuter les distributions pour les six marqueurs étudiés.

La Figure 4.2 montre ces résultats. Pour mieux observer les distributions légèrement positives, ces résultats sont également affichés en Annexe A avec une échelle adaptée. Ces résultats seront plus longuement discutés au chapitre suivant dédié aux discussions, mais certaines observations ressortent immédiatement à l'observation de ces résultats. En particulier, il est possible de faire un parallèle qualitatif avec les scores habituellement en distinguant quatre types de niveau d'expression :

- a. Certains antigènes sont négatifs (-), comme le CEA sur toutes les lignées.
- b. D'autres sont légèrement positifs (+), comme le PDL1 sur H1975.
- c. Certains sont positifs (++), comme le CD70 sur H460.
- d. D'autres sont très positifs (+++), comme la EpCAM sur MDA453.

Pour synthétiser ces distributions, il est possible de poser arbitrairement des seuils³ ce qui permet de construire le Tableau 4.2 synthétisant les informations quantitatives d'IF.

Par ailleurs, la diversité d'expression attendue pour certains marqueurs se confirme et s'exprime par des distributions plus ou moins larges. Ce phénomène est particulièrement flagrant pour la EpCAM sur H1975 où deux populations ressortent assez distinctement mais se trouve aussi sur les H460 où une majorité de cellules exprime faiblement le CD44 mais une proportion non négligeable de cellules l'exprime plus fortement. Des images d'IF pour ces deux conditions sont présentées en Figure 4.3 et illustrent ce fait. Mis à part l'ajout de fausses couleurs, ces images n'ont subi aucun traitement numérique.

³ Définir rigoureusement ces seuils serait un travail long et sans réelle plus-value. En ce sens, les valeurs des seuils sont choisies arbitrairement et prennent en compte subjectivement le mode et la largeur des distributions.

DISTRIBUTIONS DE L'ATTACHEMENT SPÉCIFIQUE QUANTIFIÉ PAR IMMUNOFLUORESCENCE

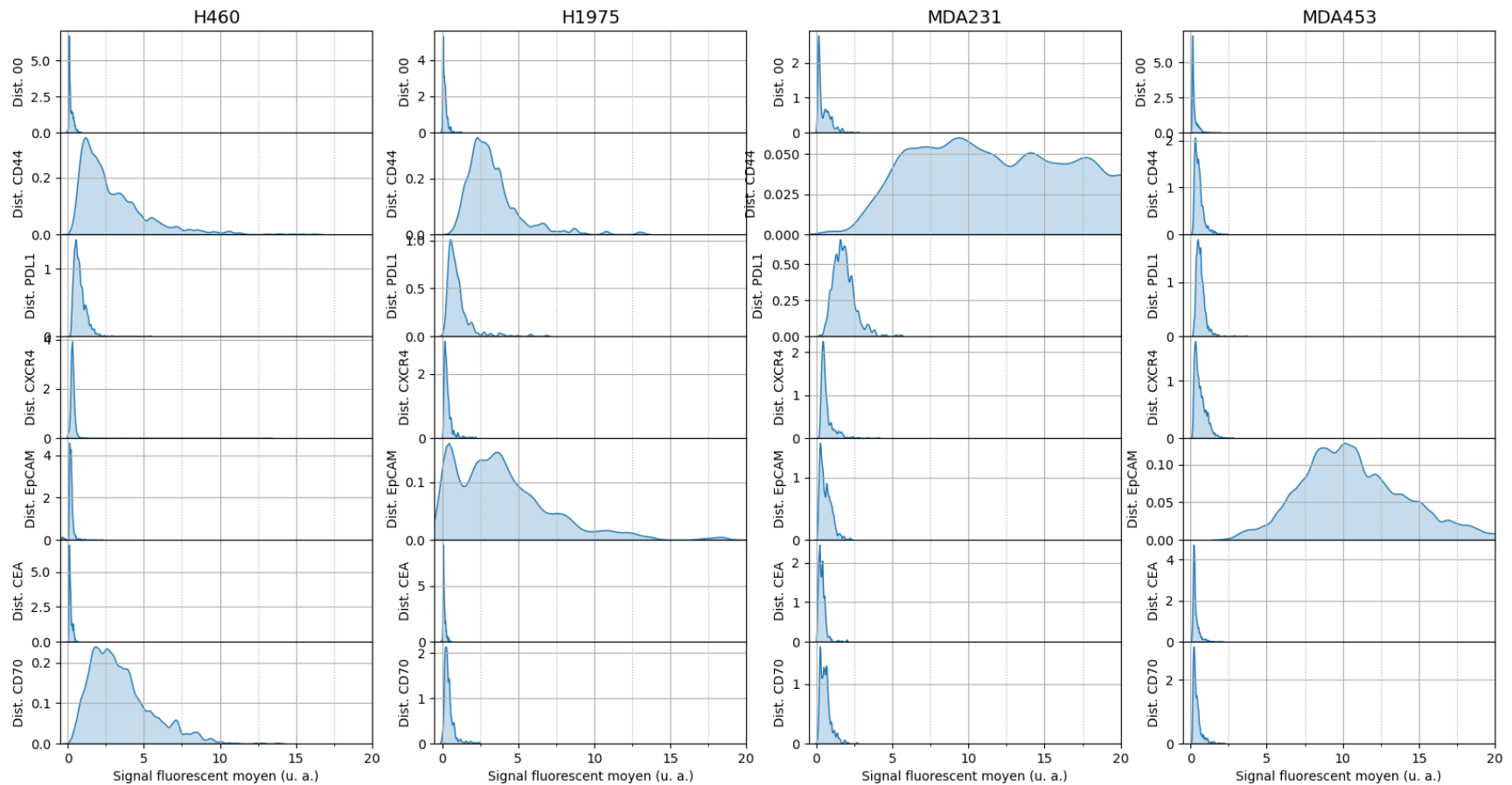


Figure 4.2 – Distributions de l'attachement spécifique CD44, PDL1, CXCR4, EpCAM, CEA et CD70, quantifié par immunofluorescence pour les quatre lignées étudiées avec un minimum de trois répétitions pour chaque condition.

Tableau 4.2 – Résultats d’immunofluorescence rapportés sur une échelle à quatre niveaux de positivité.

| Seuils | $S_- < 0.5$ | $0.5 < S_+ < 1.5$ | $1.5 < S_{++} < 4$ | $4 < S_{+++}$ |
|--------------|-------------|-------------------|----------------------------|----------------|
| | H460 | H1975 | MDA-231⁴ | MDA-453 |
| CD44 | + / +++ | ++ | +++ | - |
| PDL1 | + | + | + | - |
| CXCR4 | - | - | - | - |
| EpCAM | - | + / +++ | - | +++ |
| CEA | - | - | - | - |
| CD70 | ++ | - | - | - |

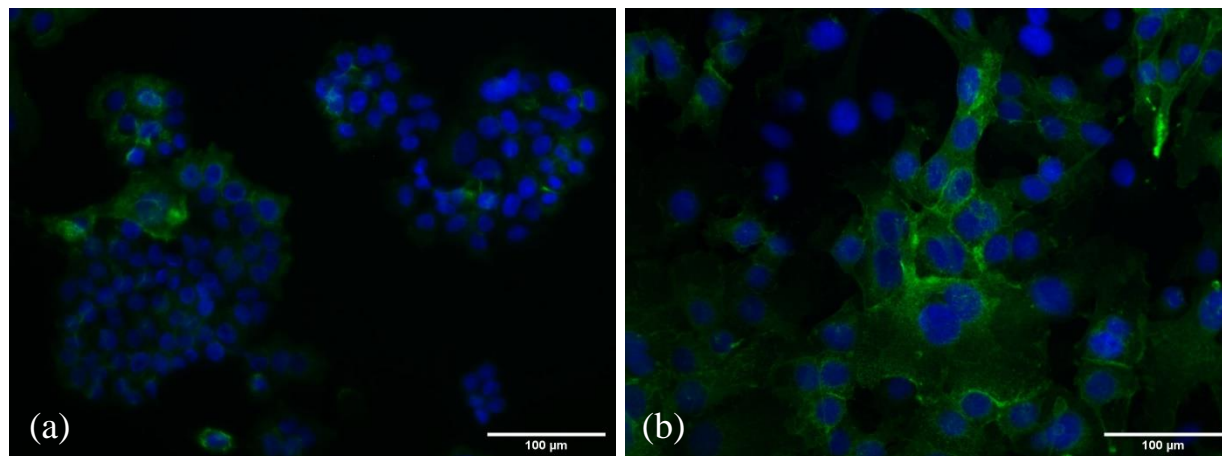


Figure 4.3 – Immunofluorescence (a) anti-CD44 sur H460 et (b) anti-EpCAM sur H1975. En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En vert : l’immunomarquage colorés à l’AF488.

⁴ Il a été pris en compte l’attachement non spécifique légèrement plus élevé pour MDA-231 que pour les autres lignées.

Pour comprendre davantage ce phénomène d'hétérogénéité, il est possible d'observer l'influence de la taille des cellules sur l'expression de ces marqueurs. C'est ce que représente la Figure 4.4. Sur les images (a) et (b) de la figure se trouvent les distributions de CD44 sur H460 et d'EpCAM sur H1975 en fonction de la taille des cellules. Pour servir de point de comparaison, les images (c) et (d) de cette figure montrent respectivement le même type de graphique pour un marqueur négatif plus homogène, à savoir CEA sur H460, et une image d'IF pour illustrer ce marquage.

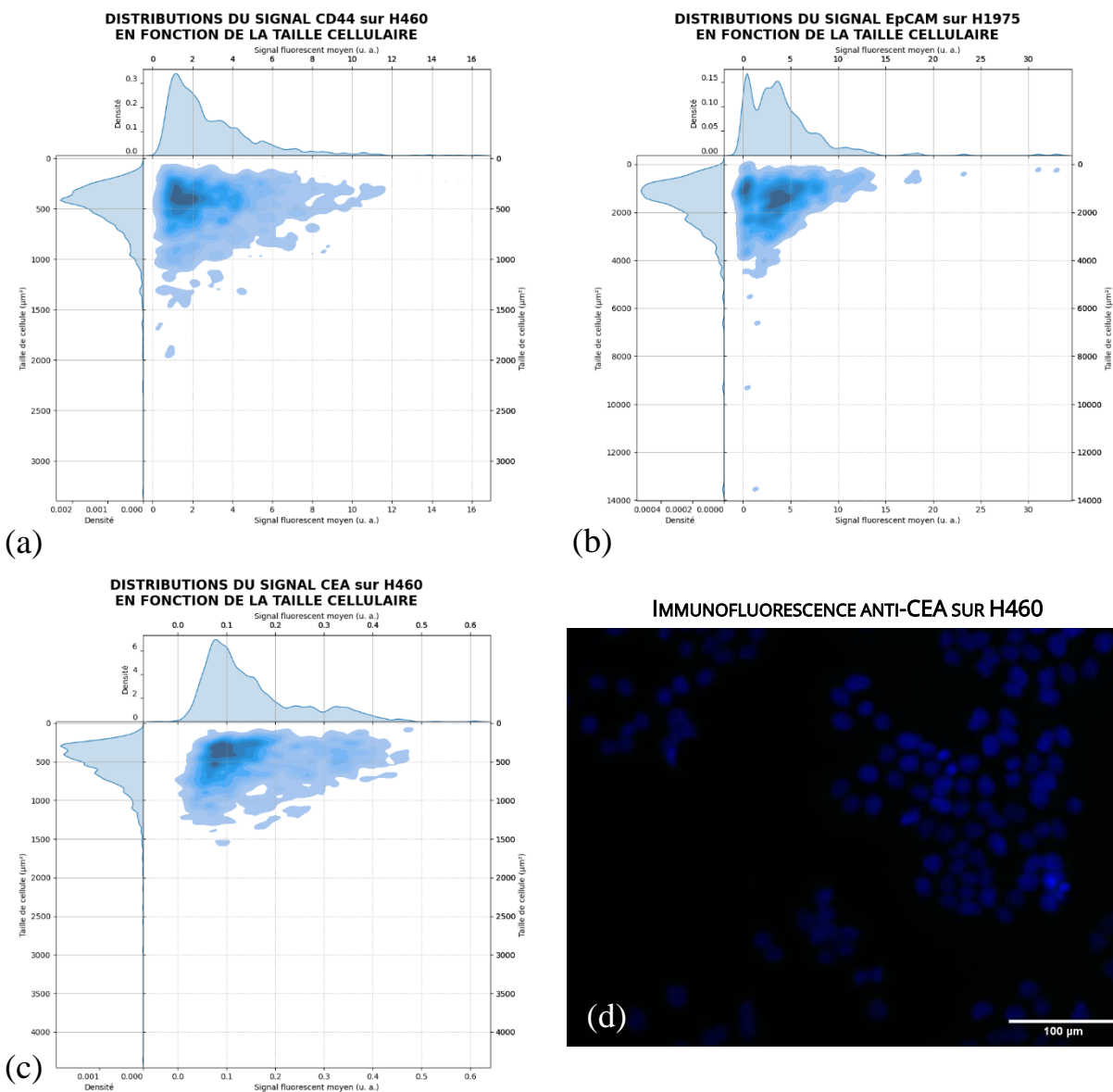


Figure 4.4 – Distributions du signal spécifique en fonction de la taille cellulaire pour (a) CD44 et (b) CEA sur H460, et (c) EpCAM sur H1975 ; (d) et une image en fluorescence de l'immunofluorescence CEA sur H460.

Sur ces graphiques peuvent être observés une tendance : les distributions forment un triangle rectangle et globalement, il est observé qu'il n'existe pas de cellules plus grosses que la moyenne qui expriment les marqueurs plus fortement que la moyenne. Cette dynamique est similaire pour l'ensemble des lignées et des marqueurs étudiés. Même si tous les graphiques ne sont pas présentés dans ce mémoire, l'Annexe B présente quelques autres distributions à titre d'exemple.

Sur le graphique représentant l'attachement de l'EpCAM sur H1975, il est possible d'identifier que les deux pics d'intensité se retrouvent pour des tailles de cellules similaires, ce qui amène à conclure que la taille cellulaire ne semble pas être une variable pertinente pour prédire le niveau d'expression des cellules, du moins pour les marqueurs étudiés.

D'autres variables auraient pu être considérées comme la forme des cellules pour tenter de corrélérer cette hétérogénéité à d'autres paramètres, mais cette étude sort du cadre du projet et n'a donc pas été réalisée.

4.1.2.2 Évaluation de la répétabilité des résultats

Sur les résultats d'IF présentés à la Figure 4.2, l'attachement du CD44 aux MDA231 présente une distribution extrêmement large. Pour comprendre davantage ce phénomène, il est possible de représenter les distributions de chaque répétition séparément, ce que représente la Figure 4.5.

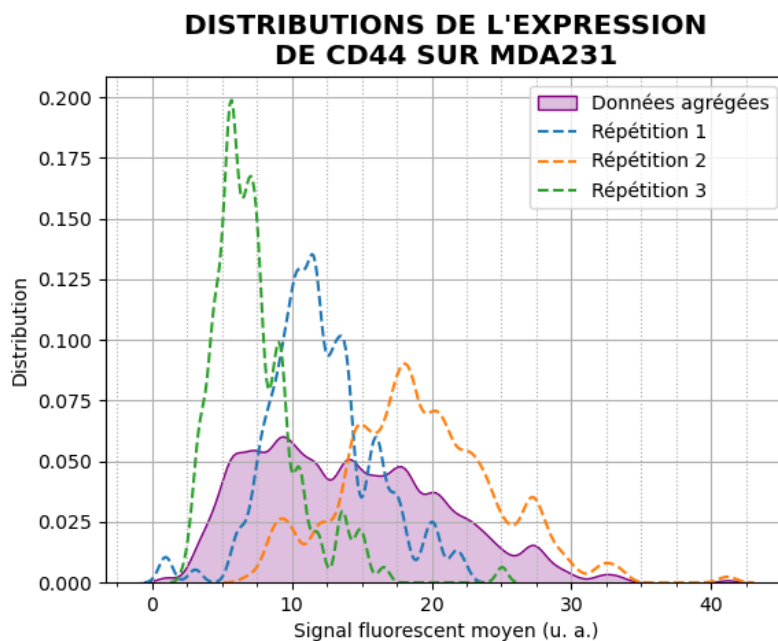


Figure 4.5 – Distributions de l'expression de CD44 sur MDA231 pour les différentes répétitions.

Le premier commentaire à faire sur ces distributions est la différence nette de résultats entre chaque répétition : tant la position du mode que la largeur de la distribution varient en fonction de la répétition, et cela amène à conclure qu'agrégier ces données n'est pas judicieux. Dans tous les cas, l'expression de CD44 sur MDA231 est très forte, ce qui est cohérent avec le comportement attendu, mais l'intensité de cette expression varie avec un facteur d'environ 4, ce qui est particulièrement important. Ce phénomène se confirme visuellement par les images IF présentées à la Figure 4.6.

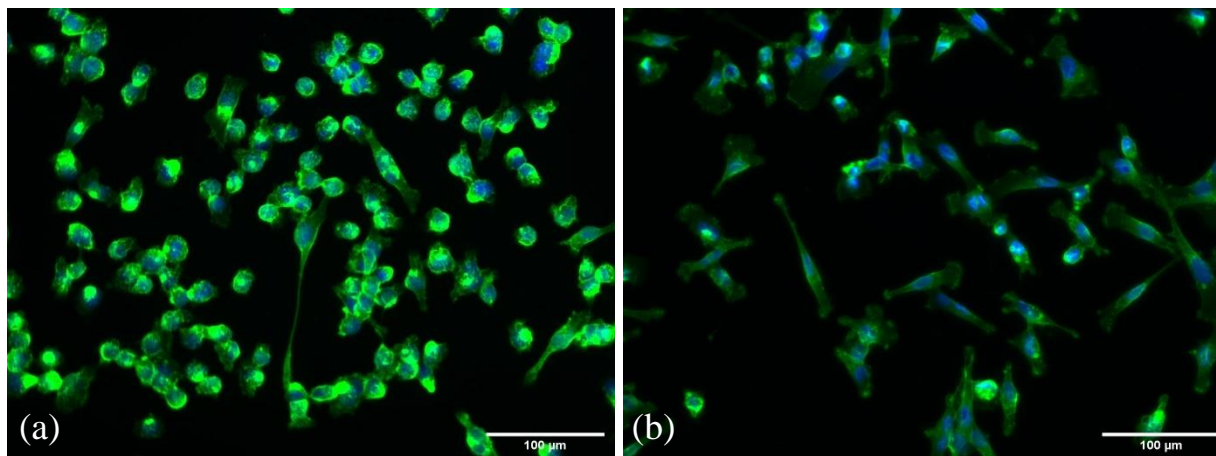


Figure 4.6 – Immunofluorescence CD44 sur MDA231, (a) répétition 2 et (b) répétition 3.

La cible CD44 et l'anticorps anti-CD44 ne semblent pas être en cause puisque ce marquage sur H460 et H1975 semble relativement répétable comme présenté à la Figure 4.7. Il est difficile d'attribuer directement la mauvaise répétabilité à la lignée puisqu'un seul autre marqueur étudié est positif et il ne serait pas judicieux d'étudier la répétabilité des résultats sur des marqueurs négatifs puisque, malgré les précautions prises pour réduire les sources de bruit, les variations sont minimales et pourraient être liées à une variation de l'attachement non spécifique. La Figure 4.8 représente les distributions des différentes répétitions des IF anti-PDL1 et de l'attachement non spécifique du secondaire anti-rat sur MDA231. Elle montre que l'IF anti-PDL1 est relativement reproductible avec un facteur d'environ deux entre le signal de la répétition la moins intense et celui de la plus intense, contre un facteur 4 pour CD44. De même, l'attachement non spécifique peut expliquer des variations de plus ou moins 1 u. a. de fluorescence, ce qui est bien inférieur aux variations observées pour CD44 à la Figure 4.5.

De même que précédemment, étudier la distribution du marquage CD44 en fonction de la taille des cellules ne permet pas d'aboutir à des conclusions pertinentes, de même qu'étudier les paramètres de cultures comme l'âge des cellules ou le délai entre l'ensemencement de la lame et la fixation. En l'état, la mauvaise répétabilité de l'IF CD44 sur MDA231 reste sans explication satisfaisante.

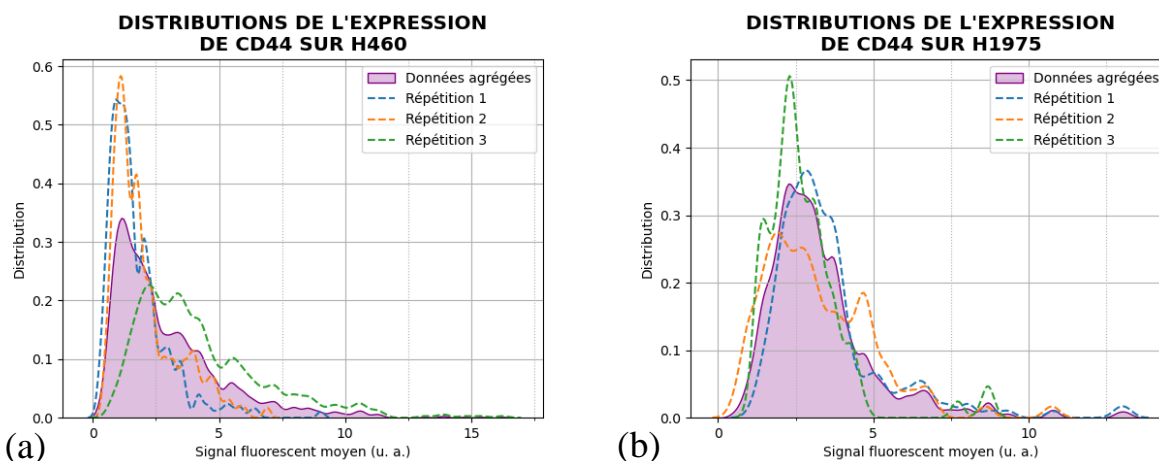


Figure 4.7 – Distributions des répétitions du marquage CD44 sur (a) H460 et (b) H1975.

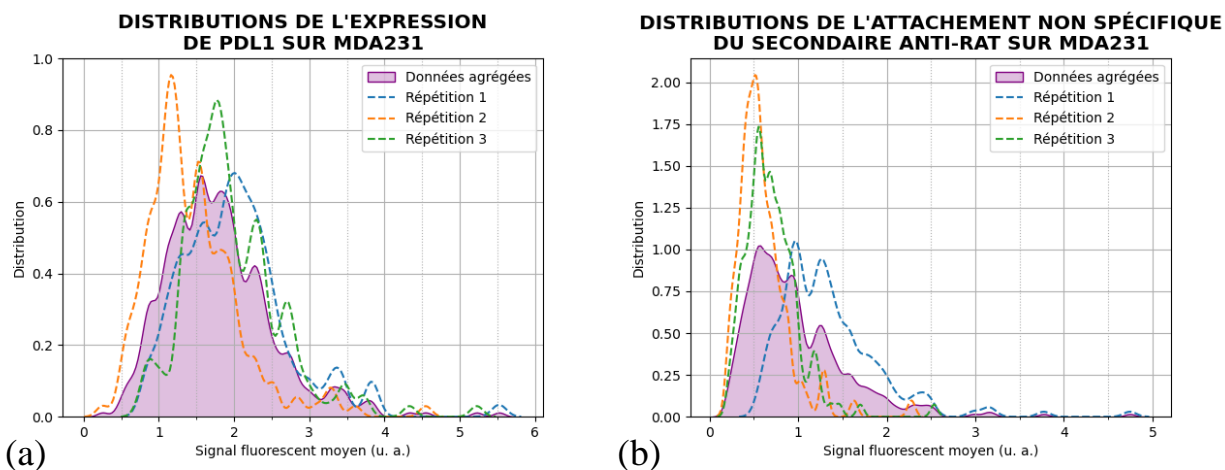


Figure 4.8 – Distributions des répétitions du marquage (a) PDL1 et non spécifique (b) rat sur MDA231.

Une dernière vérification concernant la répétabilité peut être réalisée sur les autres marqueurs ayant une distribution relativement large et de façon plus générale, sur tous marqueurs positifs. Ces résultats sont donnés en Annexe C et montrent une répétabilité satisfaisante pour tous les marqueurs à l'exception de CD44 sur MDA231. Une mention notable est le marquage EpCAM sur H1975 qui, à chaque répétition, présente la multimodalité discutée précédemment, ce qui justifie que la

bimodalité observée à la Figure 4.2 n'est pas un artefact dû à une agrégation de données pour des IF peu répétables. De façon générale, la répétabilité des IF semble relativement bonne dans le cadre de ce projet.

4.1.2.3 Agrégation des distributions et comparaison avec les bases de données

Pour vérifier la cohérence des résultats obtenus, il est pertinent de les comparer avec ce qui est connu de ces lignées et consignés dans les bases de données. Les bases de données sont privilégiées à la littérature car elles présentent une méthodologie plus homogène et donc une cohérence des données plus importante.

La base de données utilisée est *Expression 22Q2 Public*, une base de données de séquençage ARN exprimée en TPM et mise à disposition par la CCLE. Elle a été choisie car étant plus complète qu'ARCHS4 et que *Protein Atlas* qui ne recense pas tous les marqueurs étudiés pour toutes les lignées. *Proteomics* est une autre base de données de la CCLE mais la protéomique est plus sensible aux conditions de cultures ce qui peut provoquer des différences inattendues entre ces données et celles obtenues par IF. Par ailleurs Nusinow, et al. [97] ont constaté que l'ARN est efficace pour prédire l'expression de protéines membranaires, ce qui est le cas de tous les marqueurs étudiés ici.

Pour synthétiser et simplifier l'information IF, la moyenne du signal a été calculée et l'écart-type est donnée sous forme de barre d'erreur. Pour tenir compte de l'autofluorescence et de l'attachement non spécifique du secondaire, la moyenne du signal non spécifique a été retranchée en tenant compte des espèces hôte différentes selon l'anticorps. Il est important de rappeler que cette mise en forme de données n'est réellement pertinente que pour les données normalement distribuées, ce qui n'est habituellement pas le cas en expression protéique comme il a pu être observé à la Figure 4.2. Malgré tout, les expressions étudiées sont majoritairement unimodales ce qui donne un certain sens à cette visualisation.

La Figure 4.9 montre la comparaison entre la base de données *Expression* et les résultats d'IF. Globalement, la comparaison est satisfaisante.

- Pour H460, les marqueurs pour lesquels une expression était attendue, à savoir CD44, CD70 et dans une moindre mesure PDL1, sont bien exprimés et ont des expressions relatives cohérentes, même si une expression de PDL1 un peu plus importante aurait été attendue. Seul EpCAM se retrouve négatif alors qu'il était attendu une légère positivité.
- Pour H1975, mis à part CD70 qui était attendu positif, les autres marqueurs ont une expression cohérente.
- Pour MDA231, une expression de CXCR4 et d'EpCAM était attendue, ce qui n'a pas été observé.
- Pour MDA453, l'expression observée d'EpCAM est plus importante que prévue et CXCR4 est très peu exprimé par rapport à ce qui était attendu.

De façon générale, mis à part PDL1 qui est un moins exprimé qu'attendu pour toutes les lignées qui l'expriment, et CXCR4 qui se retrouve négatif alors qu'il était attendu positif pour les lignées de cancer du sein, les lignées ont une expression cohérente avec ce qui est décrit dans la base de données *Expression*.

COMPARAISON DE LA FLUORESCENCE MOYENNE AVEC UNE BASE DE DONNÉES

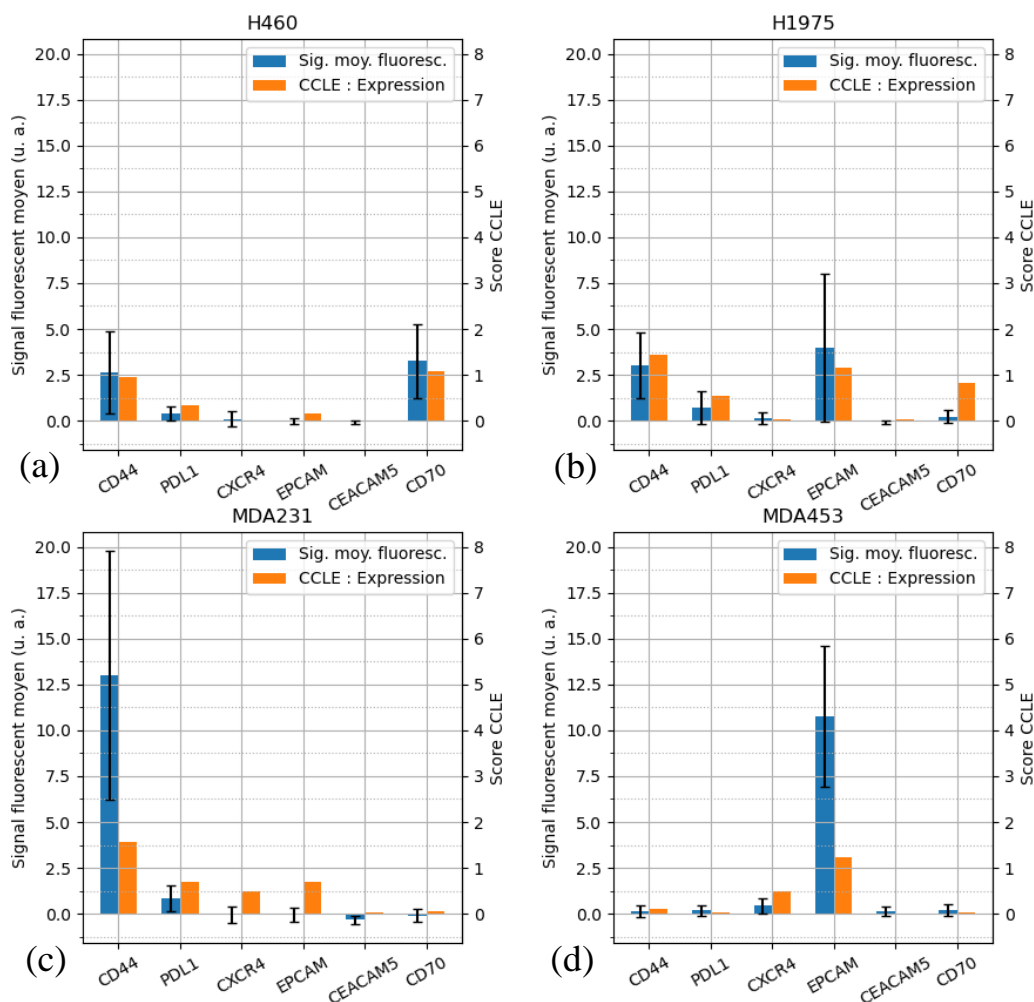


Figure 4.9 – Comparaison des résultats d’immunofluorescence avec la base de données *Expression* de CCLE.

4.2 Spécificité de l’attachement immunoplasmonique

4.2.1 Évaluation qualitative de l’attachement

Une première évaluation qualitative est utile pour observer des tendances avant de réaliser une quantification qui peut omettre certaines informations. Pour rappel, le Tableau 4.2 est une simplification des résultats d’IF, en ramenant les niveaux d’expression sur une échelle à quatre niveaux, du négatif au triplement positif. C’est cette échelle qui est utilisée pour juger la qualité de

l'attachement IP. À la Figure 4.10 et à la Figure 4.11 se trouve un échantillon d'images d'IP, respectivement négatives et positives, triées selon le niveau d'expression de la cible pour la lignée montrée.

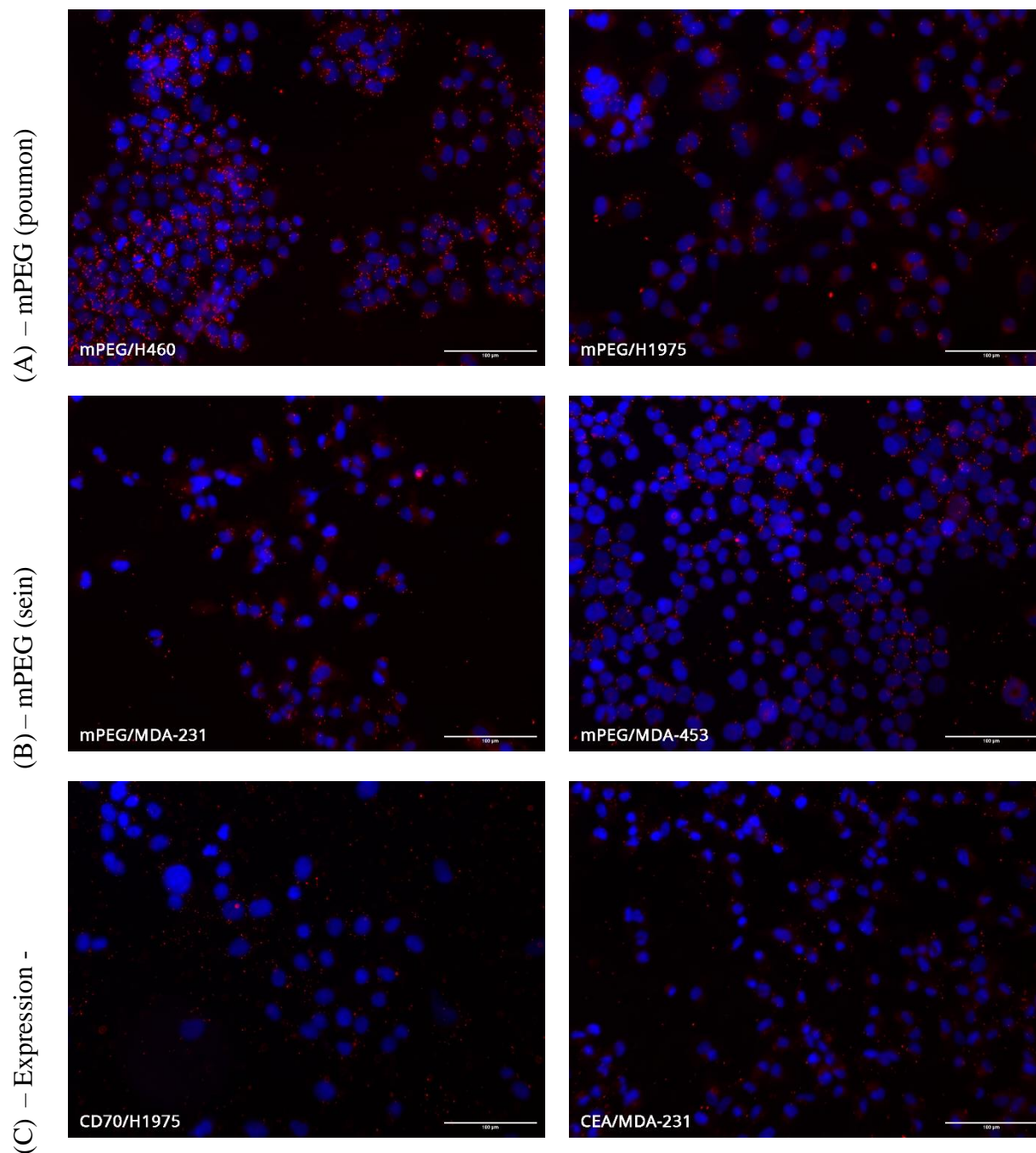


Figure 4.10 – Marquages immunoplasmoniques de (A et B) contrôles négatifs mPEG et (C) anticorps négatifs. En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En rouge : les nanoparticules.

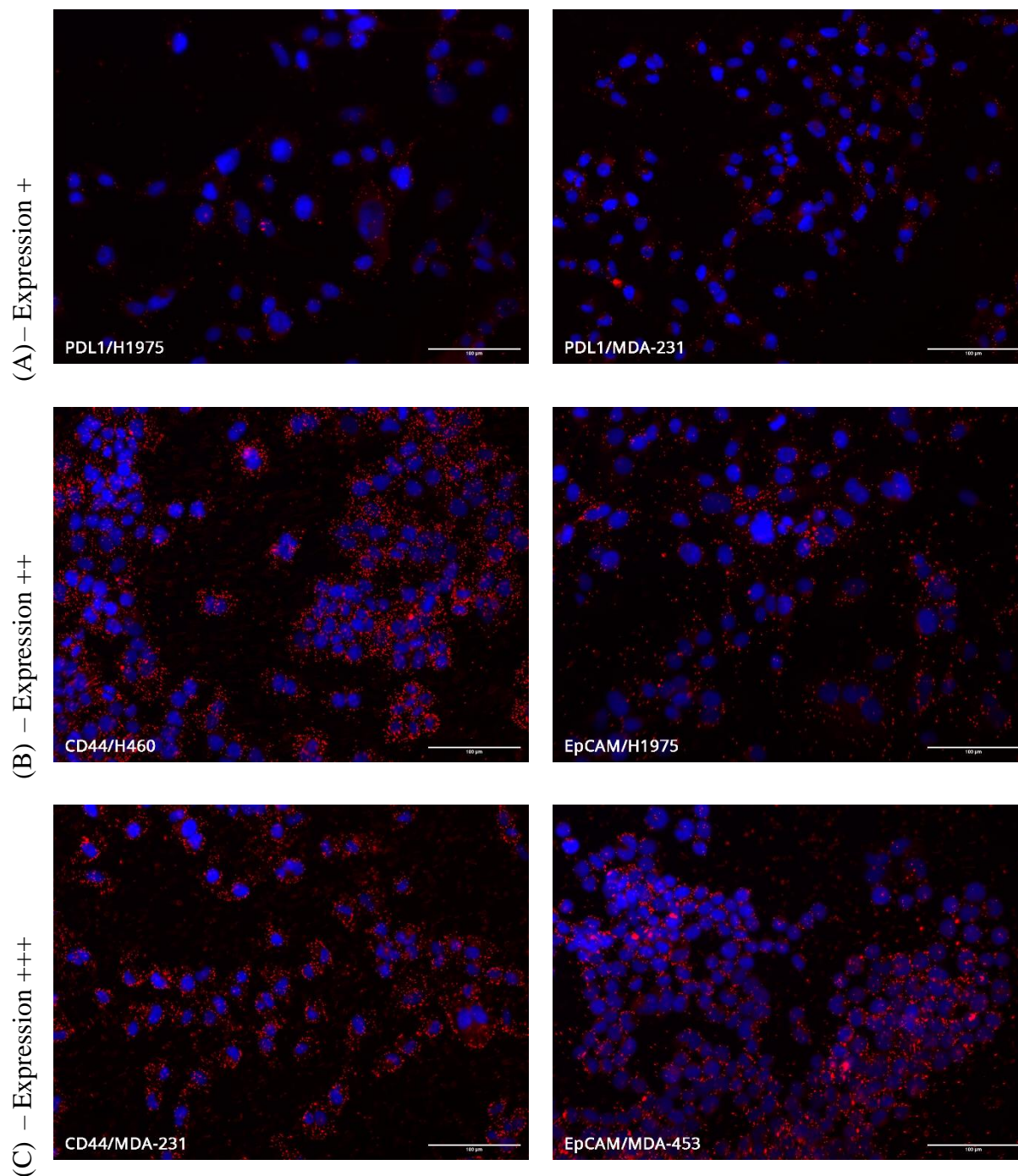


Figure 4.11 – Marquages immunoplasmoniques (A) faiblement positifs, (B) positifs et (C) très positifs. En bleu : les noyaux colorés au DAPI. En rouge : les nanoparticules.

Plusieurs déductions ressortent de ces IP :

1. La spécificité s'observe assez nettement : pour les expressions positives et très positives, les NPs sont largement colocalisées avec les cellules et contrastent bien avec le substrat, ce qui démontre un attachement spécifique. À l'inverse, les expressions négatives et les NPs-mPEG s'attachent peu, même si un attachement non spécifique non nul est observé.
2. Qualitativement, il est néanmoins difficile dans ces conditions de distinguer les niveaux d'expression proches (distinguer le – du + est difficile, comme distinguer le ++ du +++ par exemple), ce qui invite à une étude quantitative, décrite plus loin dans ce mémoire.
3. Les expressions inhomogènes semblent se refléter dans le marquage IP, en particulier l'EpCAM sur H1975. Cette tendance semble aussi se présenter pour le CD44 sur H460, même s'il reste difficile d'affirmer avec certitude cette hétérogénéité, ce qui rejoint la limite de sensibilité identifiée au point précédent.
4. Le niveau d'attachement non spécifique observé à la Figure 4.10 dépend de la lignée. Plus spécifiquement les lignées H460 et MDA-453, qui grandissent en groupes denses, présentent notablement plus d'attachement non spécifique que les H1975 et les MDA-231, qui sont plus grosses et qui grandissent en s'allongeant. Cette variabilité rend d'autant plus difficile la comparaison entre deux lignées distinctes puisque les seuils de positivité à poser sont alors différents.
5. Une limite forte de l'IP pour comparer différents marquages entre eux est la tendance des NPs à s'agréger différemment selon l'anticorps utilisé. La Figure 4.12 illustre ce propos avec CD44 et CD70 sur H460, tous deux d'expression similaire (++) mais avec un taux d'agréments visiblement plus important pour CD44, ce qui cause, une augmentation de l'attachement non spécifique (visible sur le substrat) et un signal lumineux plus puissant lié aux agrégats.
6. Dans la continuité du point précédent, une agrégation trop importante fait échouer le marquage. C'est notamment le cas pour le marquage CXCR4 qui, dès l'ajout des anticorps lors de la fonctionnalisation, a causé un rapide et important changement de couleur de la solution de NPs, passant d'un rouge laiteux à un bleu-violet plus transparent. La couleur a pu être partiellement récupérée lors des centrifugations et des lavages mais le marquage reste un échec. Ce constat a été fait pour deux lots d'anticorps CXCR4 distincts achetés à

plusieurs mois d'intervalle. Le résultat de ce marquage est présenté à la Figure 4.13 et est similaire entre chaque lignée. Les raisons de cet échec manifeste et répétable avec cet anticorps ne sont pas encore connues, même si plusieurs pistes peuvent être étudiées, notamment la formulation de l'anticorps, sa composition en acides aminés, etc.

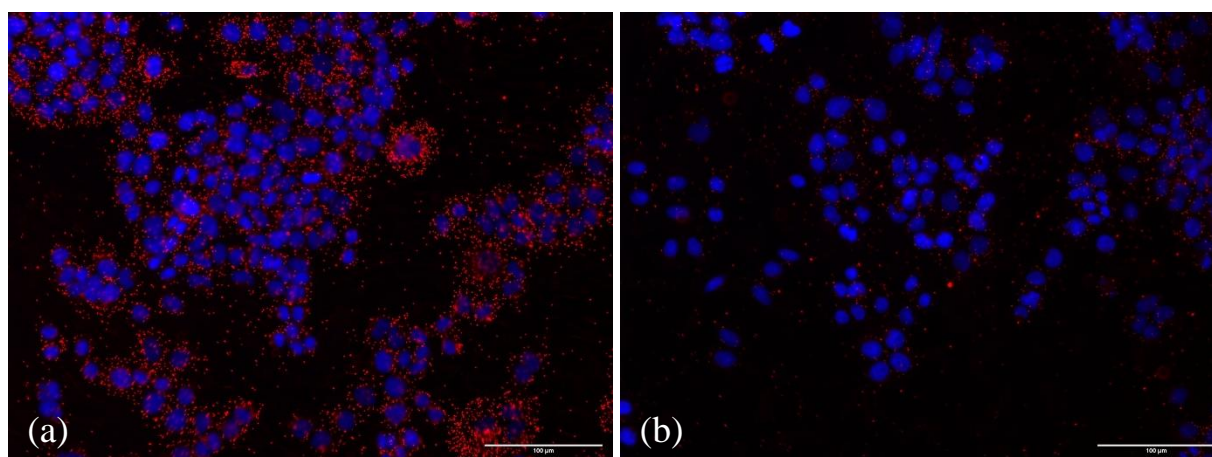


Figure 4.12 – Immunoplasmonique sur H460 (a) anti-CD44 et (b) anti-CD70.

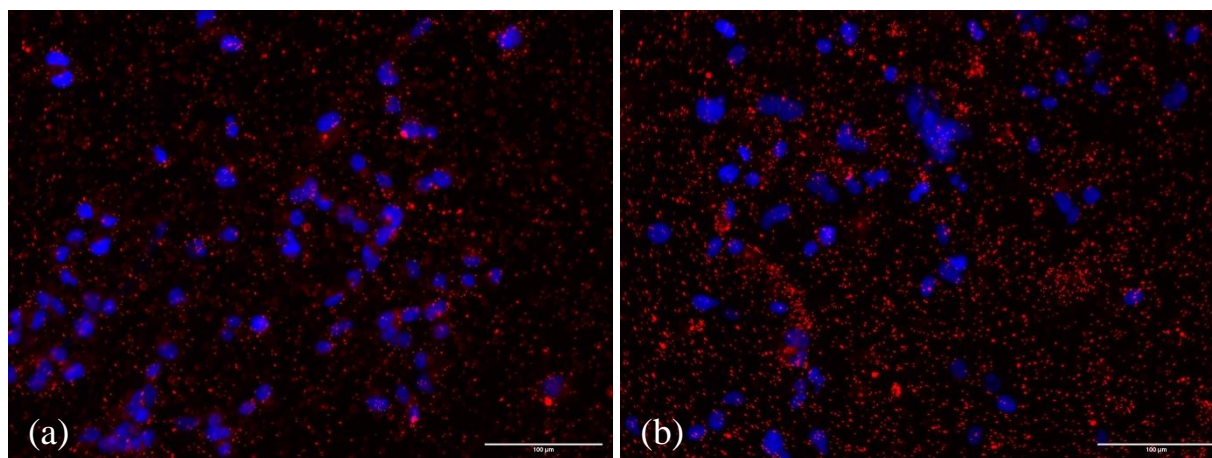


Figure 4.13 – Immunoplasmonique sur MDA-231, (a) premier lot de CXCR4 et (b) second lot.

La spécificité de l'attachement IP s'observe d'autant mieux sur des cellules en coculture. La Figure 4.14 montre en couleurs réelles les cellules H460 et H1975 cultivées individuellement ou en coculture, avec une IP anti-CD44 et une coloration H&E. Les cellules H1975 expriment plus fortement CD44 que les H460, ce qui ressort explicitement grâce au marquage IP.

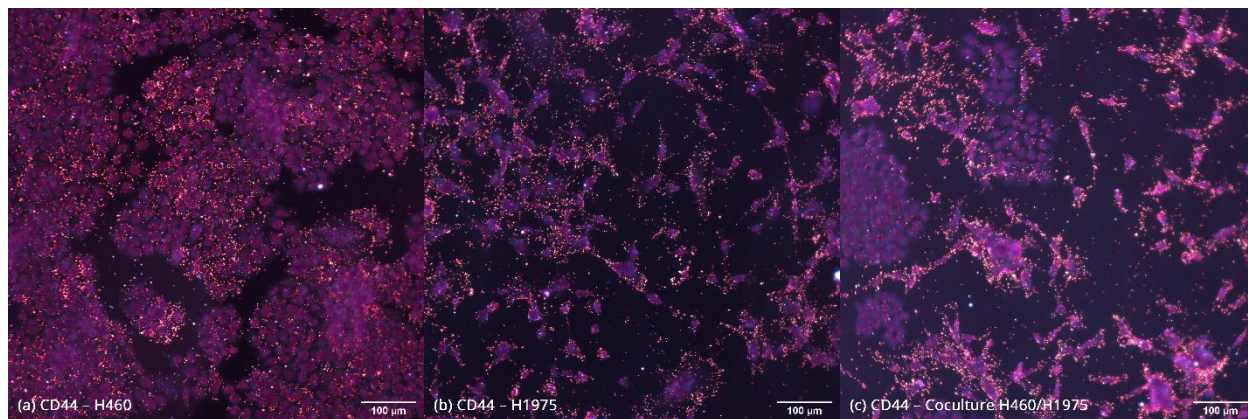


Figure 4.14 – Marquage IP anti-CD44 sur cellules colorées H&E : (a) H460, (b) H1975, (c) H460 et H1975 en coculture.

4.2.2 Quantification du marquage immunoplasmonique

Avant de présenter les résultats d'IP quantifiés, il est important de mentionner quelques limites de la méthode employée.

Tout d'abord il faut noter que les images sont prises sur un unique plan, c'est-à-dire qu'aucune pile en Z n'a été réalisée. Pourtant pour quantifier précisément l'IP et particulièrement pour des échantillons de cellules pleines dont l'épaisseur n'est pas négligeable, réaliser un tel balayage serait pertinent. Cela aiderait également à identifier les NPs hors focus, dont l'intensité lumineuse importante crée des halos qu'il est parfois difficile de traiter sur les images prises. En somme, réaliser de type de pile permettrait une quantification plus précise.

Par ailleurs et comme discuté précédemment, les agrégats sont difficiles à traiter car il est impossible de distinguer un agrégat attaché spécifiquement à une protéine ou un ensemble de NPs individuelles, localisées assez proches et toutes attachées spécifiquement. Les agrégats entraînent aussi un biais de l'algorithme en plus de la difficulté d'interprétation.

Ces limitations sont suffisamment importantes pour qu'actuellement, la quantification IP soit relativement peu précise. Les résultats présentés par la suite sont donc à considérer comme des tendances et des résultats au mieux semi-quantitatifs, plutôt que comme une quantification solide.

4.2.2.1 Attachement non spécifique aux cellules en immunoplasmonique

En IP, deux types d'attachement non spécifiques sont à considérer, à savoir l'attachement non spécifique au substrat et l'attachement non spécifique aux cellules. L'attachement non spécifique au substrat est important à considérer puisqu'un attachement au substrat faible participe à améliorer ce qui pourrait s'apparenter au contraste du marquage. L'attachement non spécifique aux cellules doit lui être considéré pour améliorer la qualité de la quantification.

Par ailleurs, l'unité à considérer pour quantifier l'IP est également une question importante. En l'occurrence, donner une quantification en nombre de NPs par cellule a l'avantage d'être relativement compréhensible, mais il s'agit d'une variable extensive dépendant de la taille cellulaire. Pour compenser cette dépendance par rapport à la taille cellulaire, une deuxième unité peut être considérée en divisant par la taille des cellules et donner les résultats en millier de NPs par mm^2 (kNPs/ mm^2).

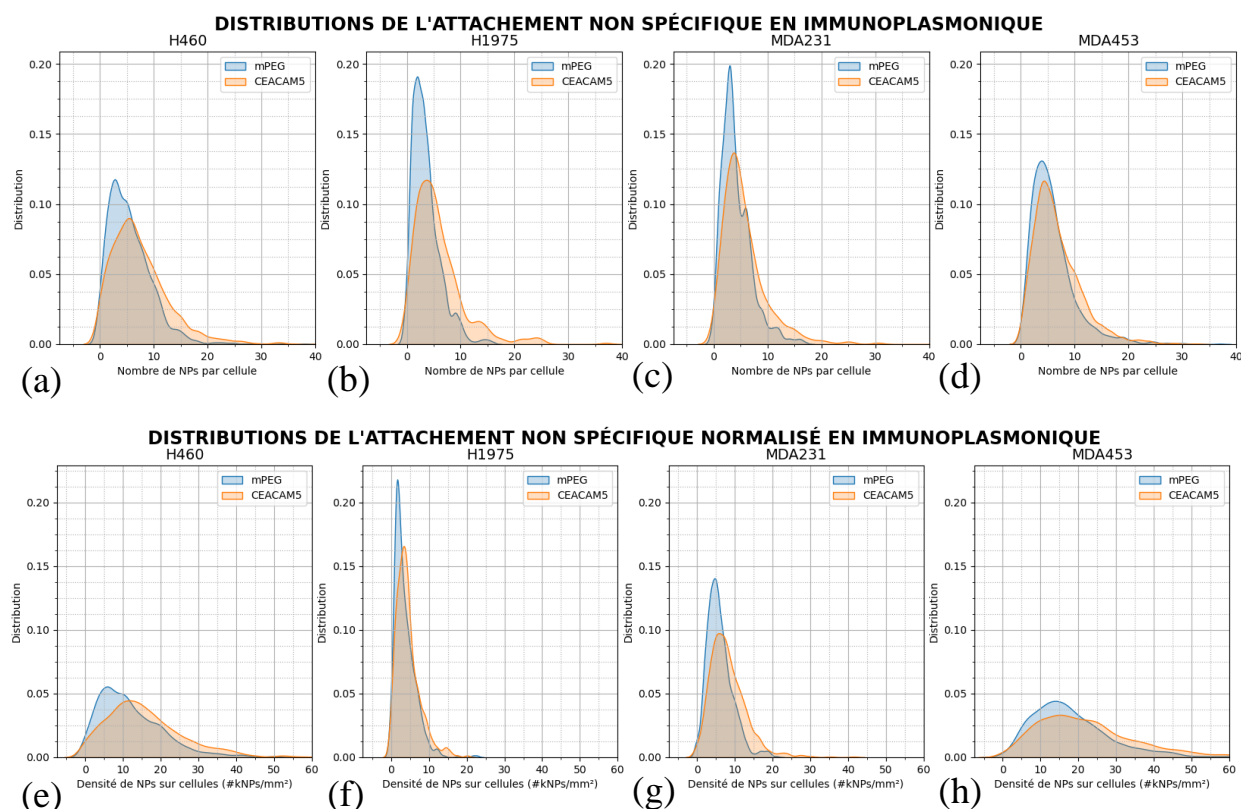


Figure 4.15 – Distribution de l'attachement non spécifique des NPs mPEG et fonctionnalisées CEACAM5, marqueur négatif pour toutes les lignées. (a) – (d) ne sont pas normalisés selon la taille et (e) – (h) le sont.

La Figure 4.15 montre les distributions de l'attachement non spécifique pour ces deux unités et montre bien que le choix de l'unité est important et peut amener à des conclusions différentes ; en l'occurrence le nombre de NPs par cellule attachées non spécifiquement est globalement le même pour toutes les lignées, avec environ 4 ou 5 NPs/cellule. Cependant en considérant que les H1975 et les MDA-231 sont globalement plus grosses que les H460 et que les MDA453, en normalisant par la taille cellulaire les valeurs globalement inférieures pour les cellules plus grosses. Avec ces résultats, il est possible de se poser la question sur la validité de l'hypothèse sous-jacente de la normalisation par la taille de la cellule, c'est-à-dire la linéarité entre la taille cellulaire et le nombre de NPs attachées.

Pour vérifier cette hypothèse, une régression linéaire de la forme $\#NP = \alpha S_{cell.Individuelle} + \beta$ a été réalisée pour les NPs mPEG et CEACAM5 pour les quatre lignées, en considérant chaque cellule individuelle comme une observation. Le Tableau 4.3 récapitule les coefficients de détermination R^2 pour ces corrélations. Tous les coefficients sont faibles, ce qui invalide la linéarité supposée entre la taille cellulaire et le nombre de NPs attachées non spécifiquement, de sorte que la normalisation du nombre de NPs selon la surface cellulaire n'a pas de sens dans ces conditions. L'unité à privilégier pour décrire l'attachement IP sur les cellules reste donc le nombre de NPs par cellule.

Tableau 4.3 – Coefficients de détermination des régressions linéaires entre taille cellulaire et nombre de NPs attachées non spécifiquement.

| | H460 | H1975 | MDA-231 | MDA-453 |
|---------|-------|-------|---------|---------|
| mPEG | 0.163 | 0.118 | 0.350 | 0.194 |
| CEACAM5 | 0.316 | 0.360 | 0.411 | 0.112 |

4.2.2.2 Attachement non spécifique au substrat en immunoplasmonique

L'attachement non spécifique au substrat est le deuxième indicateur d'attachement non spécifique et s'apparente au signal de fond en IF. La Figure 4.16 présente la densité d'attachement des sept différentes NPs au substrat, triées selon la lignée cellulaire ou selon la fonctionnalisation, avec en barre d'erreur les écart-types des valeurs observées. Pour rappel, les NPs sont considérées attachées

au substrat lorsqu'elles ne sont colocalisées avec aucune cellule lors du traitement d'image automatisé. Trois constats peuvent être faits à partir de ces résultats :

1. L'attachement au substrat est mieux expliqué par la fonctionnalisation que par la lignée. Cela pouvait sembler évident mais les lignées sécrètent des protéines ce qui aurait pu avoir un effet important.
2. Mis à part CD44 et CXCR4 qui présentent des taux d'agrégation importants, la lignée H1975 semble provoquer moins d'attachement au substrat que MDA231, qui elle-même semble provoquer moins d'attachement au substrat que H460 et MDA453.
3. Globalement les attachements au substrat sont assez hétérogènes, ce qui peut poser la question de la répétabilité.
4. Les anticorps qui présentent un taux d'agrégation fort ont davantage d'attachement au substrat, ce qui semble confirmer que cette variable est pertinente pour qualifier la qualité de l'attachement IP.
5. Il semble se dégager un seuil en-dessous duquel, l'attachement non spécifique peut être qualifié d'acceptable, ce seuil semblant se situer autour de 8 000 NP/mm².

Il est difficile de dégager davantage de certitudes sur ces données à cause de l'incertitude assez forte sur un certain nombre de conditions.

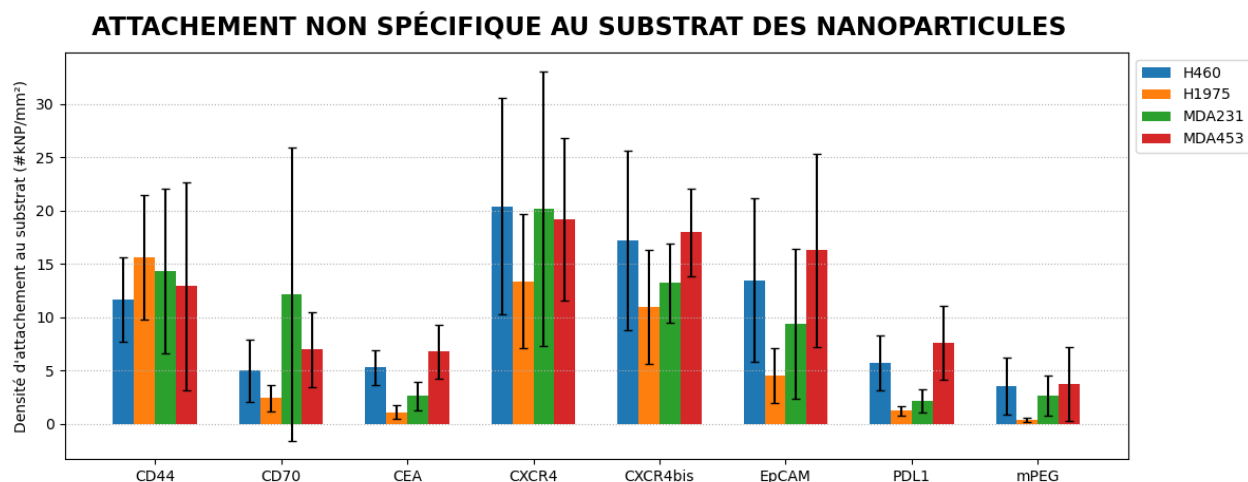


Figure 4.16 – Comparaison de l'attachement au substrat des NPs mPEG et fonctionnalisées pour les 4 lignées, regroupées par fonctionnalisation.

Pour réaliser un parallèle avec l'IF, il est possible de s'intéresser au signal IP auquel le bruit de fond a été soustrait, c'est-à-dire en effectuant l'opération :

$$\#NP_{\text{effectif}} = \#NP_{\text{cell}} - \text{Densité}_{NP/\text{Substrat}} * S_{\text{cell}} = \#NP_{\text{cell}} - \#NP_{\text{substrat}} * \frac{S_{\text{cell}}}{S_{\text{substrat}}}$$

Le terme soustrait correspond à une estimation du nombre de NPs qui seraient attachées au substrat à l'endroit où se trouve la cellule si la cellule n'avait pas été présente, en sachant que $\text{Densité}_{NP/\text{Substrat}}$ correspond à une densité surface de NPs (en $\#NP/\text{mm}^2$ par exemple). Cette opération permet de calculer le nombre de NPs attachées aux cellules de plus qu'au substrat, en émettant l'hypothèse que les processus qui mènent les NPs à s'attacher au substrat agissent de la même façon sur les cellules.

La Figure 4.17 montre l'attachement non spécifique par cellule présenté à la Figure 4.15 en réalisant la transformation susmentionnée avec les densités de NPs attachées au substrat présentées à la Figure 4.16.

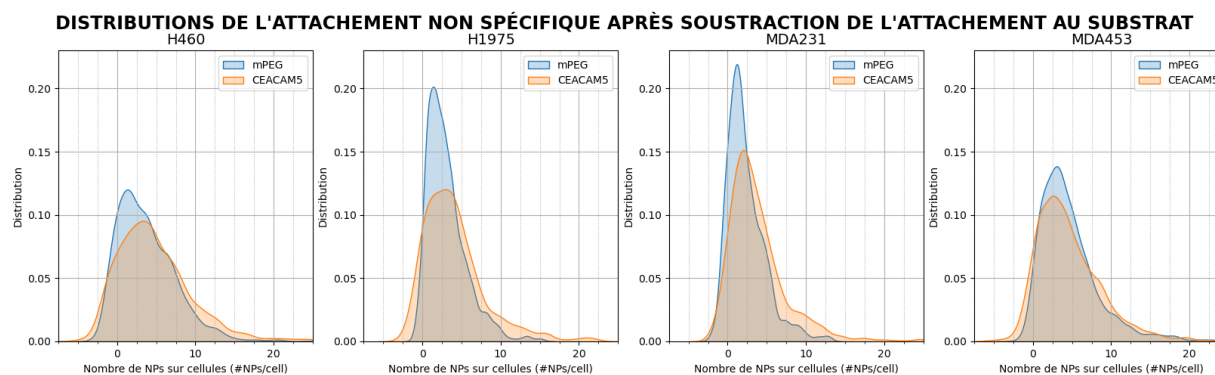


Figure 4.17 – Distributions de l'attachement non spécifique avec prise en compte de l'attachement au substrat.

Cette manipulation permet d'observer que dans le cas du mPEG et du CEACAM5, les NPs attachent légèrement plus aux cellules qu'au substrat, de l'ordre de 1 à 3 NPs/cellule de plus qu'au substrat, et ce dans les mêmes proportions que cela soit pour des NPs pégylée ou des NPs fonctionnalisées. Cela confirme par ailleurs que ces deux contrôles négatifs sont cohérents entre eux et que l'un ne donne *a priori* pas d'information supplémentaire par rapport à l'autre une fois pris en compte l'attachement au substrat légèrement supérieur pour les NPs fonctionnalisées. Dit autrement, fonctionnaliser des anticorps ne provoque pas plus d'attachement non spécifique aux

cellules. Cependant la Figure 4.16 montre que la fonctionnalisation augmente malgré tout l'attachement au substrat. Cela pourrait s'expliquer par la chimie de la fonctionnalisation et au risque d'agrégation plus élevé pour des NPs fonctionnalisées que pour des NPs simplement pégylées.

4.2.2.3 Attachement spécifique en immunoplasmonique

À la Figure 4.18 se trouve l'ensemble des résultats d'IP quantifiée avec soustraction de l'attachement au substrat. Ces mêmes résultats sans soustraction de l'attachement au substrat ne permettent pas d'aboutir à plus de conclusion et sont donnés en Annexe D.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette figure :

1. CXCR4 et CXCR4-bis présentent des distributions particulièrement larges et qui pour H460 et H1975 pourraient être considérées comme positives. Cela montre que même en prenant en compte l'attachement au substrat beaucoup plus important dans le cas de fonctionnalisation moins stables, cette instabilité provoque également de l'attachement non spécifique puisque CXCR4 est attendu négatif sur ces lignées.
2. La fonctionnalisation CD44 semble fonctionner correctement puisque les lignées attendues positives le sont (toutes sauf MDA453) et mis-à-part MDA-231 qui a démontré un comportement étrange en IF, les niveaux d'expression suivent la même tendance que l'IF, à savoir MDA-453 n'exprimant pas CD44, H460 exprimant CD44 (IF +/++) et H1975 exprimant plutôt fortement CD44 (IF ++).
3. La fonctionnalisation PDL1 ne semble pas donner de résultats significatifs. Les distributions d'IP anti-PDL1 pour H1975 et dans une moindre mesure pour MDA-231 semblent s'étendre légèrement plus étalées sur la droite que les contrôles négatifs mPEG et CEACAM5, mais il est difficile de statuer définitivement sur l'expression de PDL1 pour ces lignées avec l'IP. Une explication possible est que, comme l'expression de PDL1 est relativement faible, la sensibilité de l'IP dans les conditions actuelles n'est pas suffisante pour observer un attachement spécifique significatif.

**DISTRIBUTIONS DE L'ATTACHEMENT SPÉCIFIQUE QUANTIFIÉ PAR IMMUNOPLASMONIQUE
AVEC SOUSTRACTION DE L'ATTACHEMENT AU SUBSTRAT**

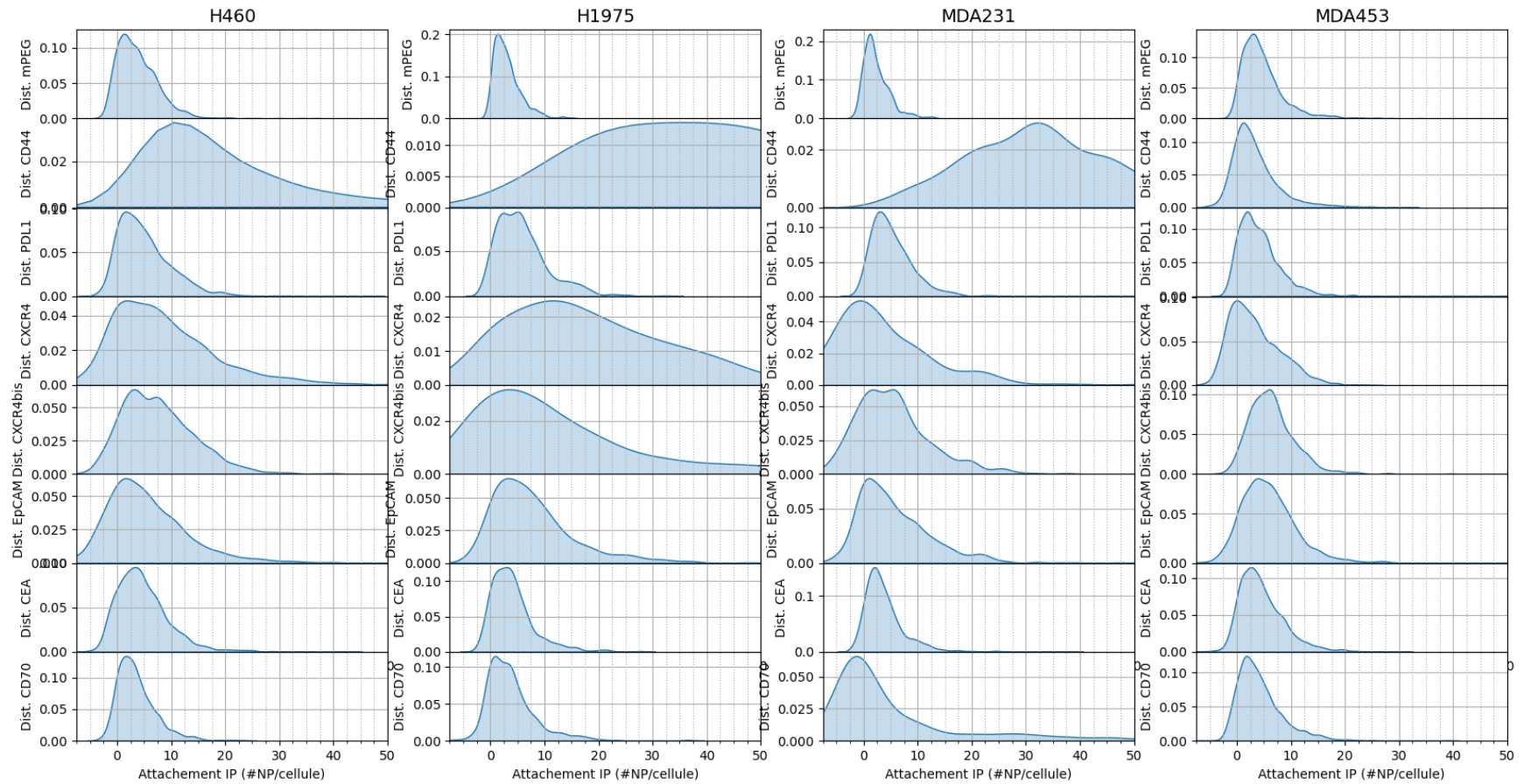


Figure 4.18 – Distributions de l'attachement spécifique IP avec prise en compte de l'attachement au substrat.

4. EpCAM et CD70 ressortent négatifs sur toutes les lignées alors que l'IF a démontré que les H460 expriment CD70 et que les H1975 et les MDA-453 expriment EpCAM. Ces conditions ont manifestement échoué à marquer spécifiquement les cellules.

Par ailleurs, en comparaison des contrôles négatifs, EpCAM présente des distributions visiblement plus larges que CD70. Cela peut se corrélérer avec le fait que l'attachement au substrat de CD70 est moindre que celui d'EpCAM et qu'EpCAM a produit beaucoup plus d'agrégats que CD70.

Pour simplifier la visualisation des résultats de la Figure 4.18, il est possible de calculer les moyennes d'attachement par cellule, ce que représente la Figure 4.19 avec les écart-types en barres d'erreur.

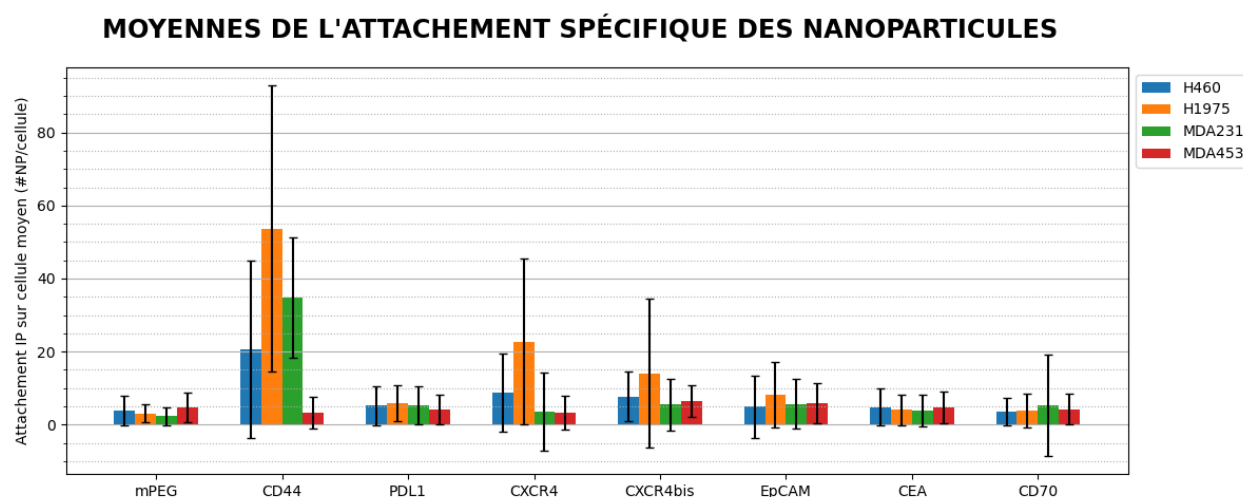


Figure 4.19 – Moyennes d'attachement IP sur cellules après soustraction de l'attachement non spécifique au substrat.

À partir de ces données, il est possible comme pour l'IF de construire un tableau récapitulant les niveaux d'expression sur une échelle à quatre niveaux en posant des seuils arbitraires. C'est ce que représente le Tableau 4.4.

Globalement, les anticorps ayant vraisemblablement échoué à produire une fonctionnalisation efficace sont CXCR4, EpCAM et CD70. Ces anticorps ont plusieurs points communs qui ne se retrouvent pas chez CD44 et PDL1 et qui peuvent donc être la source des difficultés observées.

Deux facteurs notables sont la présence d'azoture de sodium dans tous ces anticorps, ainsi que le fait que l'espèce hôte soit la souris. CEACAM5 qui semble avoir bien fonctionné présente aussi ces caractéristiques communes avec CXCR4, EpCAM et CD70, mais il est difficile d'affirmer que la fonctionnalisation CEACAM5 est capable d'attachement spécifique puisque, même si les observations sont cohérentes avec l'IF, il n'a été observé que des niveaux d'expression négatifs. En l'état, il est impossible d'affirmer que CEACAM5 a fonctionné correctement, contrairement à CD44 qui a démontré un attachement spécifique cohérent avec l'IF pour toutes les lignées.

Tableau 4.4 – Résultats d'immunoplasmonique rapportés sur une échelle à quatre niveaux de positivité.

| Seuils (#NP/cell) | $S_- < 10$ | $10 < S_+ < 20$ | $20 < S_{++} < 40$ | $40 < S_{+++}$ |
|-------------------|-------------|-----------------|--------------------|----------------|
| | H460 | H1975 | MDA-231 | MDA-453 |
| CD44 | ++ | +++ | ++ | - |
| PDL1 | - | - | - | - |
| CXCR4 | - | + / +++ | - | - |
| EpCAM | - | - | - | - |
| CEA | - | - | - | - |
| CD70 | - | - | - | - |

4.2.3 Influence du temps d'incubation sur le marquage immunoplasmonique

Afin d'explorer davantage le marquage PDL1 et en particulier l'explication de la sensibilité trop basse du protocole utilisé, un lot d'IP a été réalisé en incubant les NPs pendant un temps variable pour vérifier l'influence du temps. Les marquages CD44 et PDL1 sur H460 ont été étudiés pour des incubations de 1h, 3h ou 6h, ce qui est présenté à la Figure 4.20.

Qualitativement, l'influence du temps sur le marquage est remarquable puisque, pour CD44 qui est bien exprimé sur H460, un fort attachement est constaté après trois heures d'incubation alors que pour PDL1 qui est moins exprimé, l'attachement se constate mal après trois heures mais après six

heures, l'attachement est important. Par ailleurs, l'attachement au substrat, même s'il semble augmenter légèrement avec le temps d'incubation, reste relativement faible et croît moins rapidement que l'attachement spécifique aux cellules.

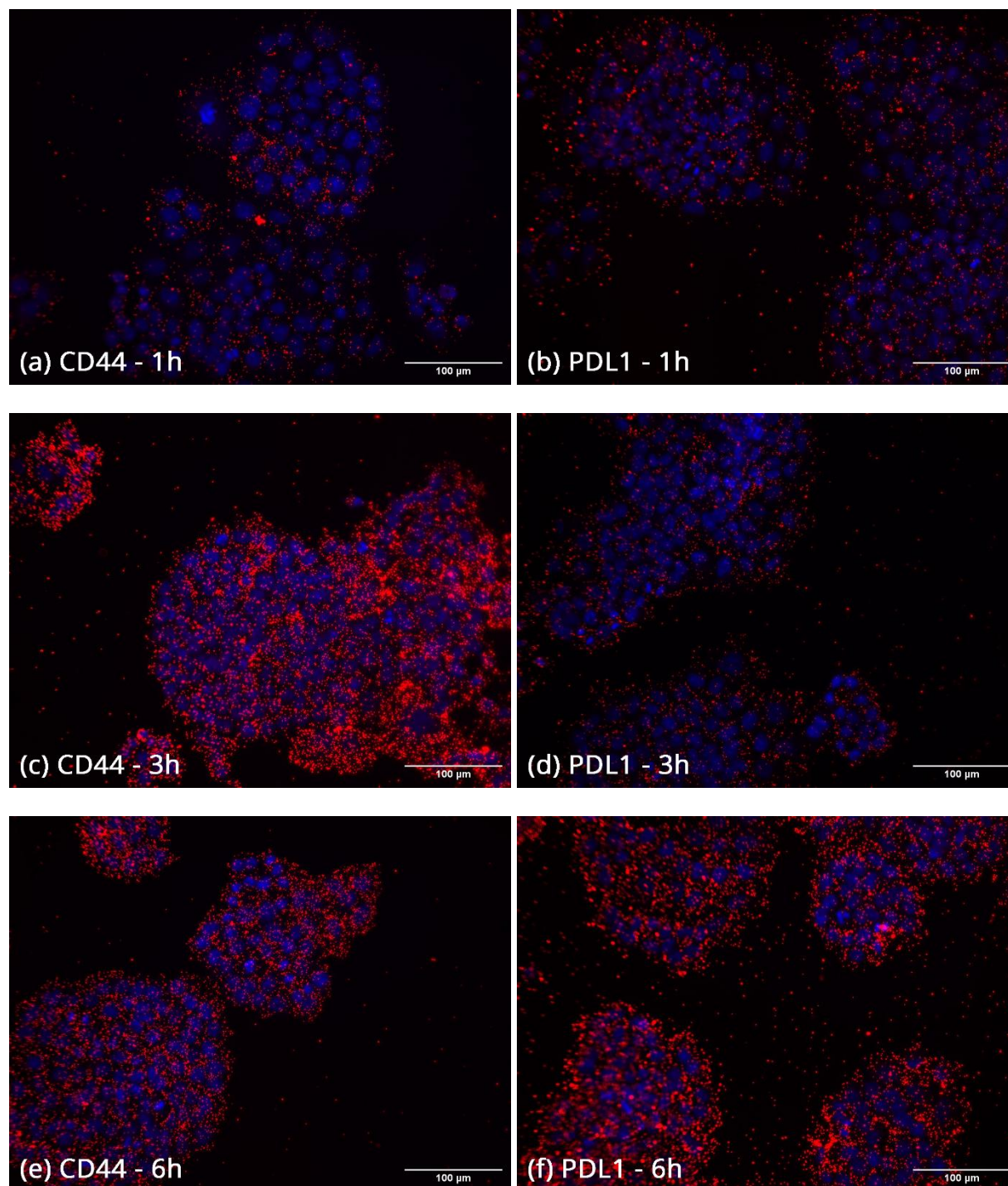


Figure 4.20 – Marquage immunoplasmonique sur H460 anti-CD44 avec (a) 1h, (c) 3h et (e) 6h d'incubation ; et anti-PDL1 avec (b) 1h, (d) 3h et (f) 6h d'incubation.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1 Retour sur la spécificité de l'immunoplasmonique et comparaison avec l'immunofluorescence

Un certain nombre d'observations ont pu être réalisées suite aux IF et aux IP présentées au chapitre précédent. Le but de ce chapitre est de prendre du recul et de mettre en ces résultats en perspective, tout en considérant les limites de chaque étude.

L'IF et l'IP ont permis d'établir pour chaque condition un niveau d'expression qualitatif, allant du négatif (-) au très positif (+++). Le Tableau 5.1 résume les scores identifiés pour ces deux marquages au format [score IF/score IP] et souligne les similitudes en vert et les différences en rouge.

Deux marquages ressortent concordants : CD44 et CEACAM5. Le résultat sur CD44 est très positif et confirme l'efficacité de la méthode IP puisque à la fois les lignées positives et négatives donnent des résultats cohérents. CEACAM5 est négatif pour les quatre lignées donc il n'a pas été possible de vérifier sa capacité d'attachement spécifique sur une lignée positive, pour autant les résultats restent cohérents avec ce qui était attendu et sont en ce sens encourageants.

Le marquage PDL1 possède également un certain potentiel car, même s'il n'a pas été identifié de positivité grâce à l'IP, l'étude sur le temps d'incubation montre qu'il s'agit d'une variable importante. En l'occurrence, puisque PDL1 possède une expression absolue faible sur toutes les lignées étudiées, la négativité observée en IP est probablement due à des paramètres d'incubation mal adaptés et une optimisation de l'IP, en augmentant la concentration en NPs ou le temps d'incubation par exemple, pourrait permettre d'observer l'expression de PDL1 grâce à l'augmentation de la sensibilité de la méthode.

Le marquage CXCR4 s'est montré particulièrement problématique à cause d'un taux d'agrégation très important. En soustrayant la part liée à l'attachement non spécifique au substrat, les résultats quantitatifs de ce marquage sont corrects par rapport à ce qui était attendu suite à l'IF, mais dans le sens où les agrégats sont difficiles à interpréter, un doute important subsiste quant à la validité de la quantification. Par ailleurs, l'instabilité causée par l'ajout d'anticorps CXCR4 lors de la fonctionnalisation a été constatée pour deux lots d'anticorps différents et a pu être répété, ce qui

laisse entendre qu'une caractéristique de cet anticorps perturbe l'efficacité de la méthode. La piste privilégiée est la présence d'azoture de sodium, connue pour réduire l'efficacité de la fonctionnalisation EDC-NHS, mais l'anticorps CEACAM5 possède également de l'azoture de sodium dans des proportions similaires et n'a pas présenté de taux d'agrégation élevés, au contraire.

Pour les marquages EpCAM et CD70, il a été observé un comportement similaire. Dans les deux cas, l'attachement IP a été quantifié négatif sur toutes les lignées alors qu'il était attendu relativement fort pour au moins une des quatre lignées suite à l'IF. Cela laisse entendre que le marquage spécifique pour ces cibles a échoué. Le taux d'agrégation observé est plus important que pour CD44 ou PDL1 notamment, mais reste faible devant le taux d'agrégation de CXCR4. Ces résultats mettent d'autant plus le doute sur l'efficacité du marquage CEACAM5 puisque les résultats d'EpCAM et de CD70 sont bons pour les lignées négatives, comme le sont ceux de CEACAM5.

Tableau 5.1 – Récapitulatif des résultats qualitatifs d'immunofluorescence et d'immunoplasmonique au format [score IF/score IP]. En vert : accord des deux marquages. En rouge : désaccord des deux marquages.

| | H460 | H1975 | MDA-231 | MDA-453 |
|--------------|-------------|--------------|----------------|----------------|
| CD44 | ++ / ++ | ++ / +++ | +++ / ++ | - / - |
| PDL1 | + / - | + / - | + / - | - / - |
| CXCR4 | - / - | - / ++ | - / - | - / - |
| EpCAM | - / - | ++ / - | - / - | +++ / - |
| CEA | - / - | - / - | - / - | - / - |
| CD70 | ++ / - | - / - | - / - | - / - |

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Durant ce projet, le travail a porté principalement sur deux axes de développement de la technique IP.

Le premier axe concerne l'établissement d'une quantification aussi précise que possible à l'aide d'IF indirecte, afin de connaître au mieux les quatre lignées cellulaires utilisées pour les six marqueurs étudiés. Une connaissance précise des niveaux d'expression du matériel biologique utilisé est nécessaire pour avoir une base de comparaison pour l'IP dont l'ambition finale est de réaliser un marquage quantifié. Le second axe s'est concentré sur l'étude du marquage IP pour ces lignées et ces anticorps, avec une validation d'abord qualitative de la spécificité du marquage puis une étude quantitative.

La méthodologie développée en IF s'est montrée concluante, en fournissant une information quantitative à l'échelle de la cellule et concordant avec les observations qualitatives sur une dizaine de conditions pour les quatre lignées étudiées. Elle a notamment permis d'observer la concordance avec la littérature et les bases de données, mais également démontré l'impossibilité de se fier uniquement à ces dernières pour établir le profil moléculaire d'une lignée. Le panel d'IF réalisé a permis d'identifier et de confirmer le choix de plusieurs antigènes pour la discrimination de lignées, notamment grâce à CD44 mais aussi EpCAM ou CD70.

Il a été démontré durant ce projet que l'IP est capable d'attachement spécifique, en particulier le marquage CD44 qui a été observé comme particulièrement performant, tant qualitativement que quantitativement sur des lignées positives et négatives. Des avancées notables sur la fonctionnalisation réalisées au LP2L ont permis d'observer un taux d'agrégation et d'attachement au substrat faible pour les NPs mPEG et CEACAM5, ce qui a permis de comparer le comportement de deux contrôles négatifs de l'IP, à savoir des NPs sans anticorps, et des NPs ciblant un antigène non exprimé. Ces contrôles négatifs ont permis d'identifier que l'attachement non spécifique aux cellules dépend de la lignée mais restent relativement similaires, et que la métrique qui semble actuellement la plus pertinente pour l'IP est le nombre de NPs par cellule, plutôt que le nombre de NPs par unité de surface.

Pour autant, deux défis importants ont été identifiés pour améliorer la technique IP :

- La chimie de la fonctionnalisation et de la pégylation ne semblent pas encore parfaitement maîtrisées : un taux d'agrégation relativement important est observé pour plusieurs anticorps et la fonctionnalisation semblent échouer à permettre un attachement spécifique pour trois des six anticorps étudiés. Comprendre pourquoi certains anticorps sont plus performants que d'autres serait une évolution réellement positive pour le projet et permettrait de faire évoluer la technique vers une plus grande reproductibilité et le travail sur des échantillons plus complexes. En particulier, comprendre les effets de l'azoture de sodium sur la fonctionnalisation et la dynamique de formation de agrégats seraient des avancées notables.
- La quantification IP et le décompte des NPs est relativement difficile car, même si le principe de compter les points brillants semble simple, en pratique les agrégats et les NPs hors focus complexifient le processus. Parvenir à élaborer un algorithme robuste pour le décompte des NPs serait un pas en avant vers une meilleure qualité de la quantification et donc vers des résultats plus significatifs, en identifiant des tendances plus fines.

La résolution de ces problèmes permettrait d'améliorer la robustesse de l'IP et une meilleure reproductibilité des résultats. Cela ouvrirait la voie vers des études plus complexes et plus poussées pour l'IP, en particulier l'étude des effets de différents paramètres du protocole comme la concentration des NPs ou les temps d'incubation afin d'optimiser la sensibilité du marquage.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étendre les résultats de quantification d'IP à d'autres échantillons pertinents en clinique, notamment des cellules en suspension, des cellules tranchées FFPE ou des tissus FFPE. Chaque échantillon possède ses propres spécificités et difficultés, et peuvent chacun faire l'objet d'une étude à part entière.

Pour conclure, malgré les hypothèses et limites de l'étude présentées ici, l'IP se présente comme une technique avec un potentiel certain. Même si du travail reste à effectuer pour améliorer la quantification et l'efficacité de certains marqueurs, la spécificité du marquage est claire.

RÉFÉRENCES

- [1] D. R. Brenner *et al.*, "Projection du fardeau du cancer au Canada en 2022," vol. 194, n^o. 23, p. E819-E826, Juin 2022.
- [2] Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer en collaboration avec la Société canadienne du cancer, Statistique Canada, et l'Agence de la santé publique du Canada, "Statistiques canadiennes sur le cancer 2021," Société canadienne du cancer, Toronto (Ontario), 2021. [En ligne]. Disponible: cancer.ca/Canadian-Cancer-Statistics-2021-FR
- [3] C. de Oliveira *et al.*, "The economic burden of cancer care in Canada: a population-based cost study," vol. 6, n^o. 1, p. E1-E10, Janvier 2018.
- [4] R. Garaszczuk *et al.*, "The Economic Burden of Cancer in Canada from a Societal Perspective," vol. 29, n^o. 4, p. 2735-2748, Avril 2022.
- [5] "Cancer Causes and Control," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 610-616.
- [6] S. J. Welsh et G. Powis, "Personalized Cancer Medicine," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2823-2828.
- [7] M. F. Evans et K. Cooper, "Molecular Pathology," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2358-2363.
- [8] J. M. Taube *et al.*, "The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation," vol. 8, n^o. 1, Mai 2020.
- [9] S. Nuti *et al.*, "High interobserver and intraobserver reproducibility among pathologists assessing PD-L1 CPS across multiple indications," Août 2022. [En ligne]. Disponible: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/his.14775>
- [10] S. Chang *et al.*, "Interobserver Reproducibility of PD-L1 Biomarker in Non-small Cell Lung Cancer: A Multi-Institutional Study by 27 Pathologists," vol. 53, n^o. 6, p. 347-353, Novembre 2019.
- [11] J. W. Lee, S.-R. Choi et J. H. Heo, "Simultaneous Stabilization and Functionalization of Gold Nanoparticles via Biomolecule Conjugation: Progress and Perspectives," vol. 13, n^o. 36, p. 42311-42328, Septembre 2021. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1021/acsami.1c10436>
- [12] P. Marcoux-Valiquette, "Marquage immunoplasmonique multiplexé sur échantillons histologiques pour le diagnostic du cancer," Mémoire de maîtrise, , Génie biomédical, Polytechnique Montréal, 2020. [En ligne]. Disponible: <https://publications.polymtl.ca/5525/>
- [13] S. P. Parker et S. McGraw-Hill Book Company, *McGraw-Hill Dictionary of Bioscience*. Blacklick, USA, UNITED STATES: McGraw-Hill Professional Publishing, 2002.
- [14] C. Jean-Claude et R. Perasso, "Plans d'organisation cellulaire," dans *Biologie cellulaire : Des molécules aux organismes*, 2e éd.^e éd., Dunod, Édité., 2005, p. 33 - 44.

- [15] B. Gul *et al.*, "Cell refractive index: Models, insights, applications and future perspectives," vol. 33, p. 102096, Mars 2021. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100020304506>
- [16] J. Doll. (2022) Tissue types. [En ligne]. Disponible: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/introduction-to-tissues-epithelial-connective-muscle-and-nervous-tissue>
- [17] A. Villa-Forte. (2022) Tissus et organes. [En ligne]. Disponible: <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/fondamentaux/le-corps-humain/tissus-et-organes>
- [18] A. Villa-Forte. (2022) Appareils. [En ligne]. Disponible: <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/fondamentaux/le-corps-humain/appareils>
- [19] "Cancer," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 605-607.
- [20] I. Damjanov, "Grading of Tumors," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 1591-1593.
- [21] "Stage," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 3499-3499.
- [22] Société canadienne du cancer. (2022) Stadification du cancer. [En ligne]. Disponible: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/what-is-cancer/stage-and-grade/staging>
- [23] R. Kratzke et M. J. Franklin, "Lung Cancer Epidemiology," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2100-2104.
- [24] S.-H. I. Ou, "Lung Cancer Clinical Oncology," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2095-2100.
- [25] A. F. Gazdar et J. D. Minna, "Lung Cancer," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2086-2088.
- [26] Y.-L. Wu, "Lung Cancer Targeted Therapy," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2111-2115.
- [27] M. S. I. Mansour *et al.*, "Factors Influencing Concordance of PD-L1 Expression between Biopsies and Cytological Specimens in Non-Small Cell Lung Cancer," vol. 11, n°. 10, Octobre 2021.
- [28] S. C. M. Lau *et al.*, "PD-L1 assessment in cytology samples predicts treatment response to checkpoint inhibitors in NSCLC," vol. 171, p. 42-46, Septembre 2022.
- [29] R. E. Harris, "Breast Cancer Epidemiology," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 503-507.
- [30] B. Gullick, "Breast Cancer," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 486-488.
- [31] B.-H. Bay et G. W.-C. Yip, "Breast Cancer Prognostic Biomarkers," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 533-537.

- [32] "Triple Negative Breast Cancer," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 3784-3784.
- [33] S. Roy-Chowdhuri *et al.*, "Collection and Handling of Thoracic Small Biopsy and Cytology Specimens for Ancillary Studies: Guideline From the College of American Pathologists in Collaboration With the American College of Chest Physicians, Association for Molecular Pathology, American Society of Cytopathology, American Thoracic Society, Pulmonary Pathology Society, Papanicolaou Society of Cytopathology, Society of Interventional Radiology, and Society of Thoracic Radiology," Mai 2020.
- [34] A. L. Sousa *et al.*, "Chapter 2 - The Histo-CLEM Workflow for tissues of model organisms," dans *Methods in Cell Biology*, vol. 162, T. Müller-Reichert et P. Verkade, Édité.: Academic Press, 2021, p. 13-37.
- [35] N. Parry. (2020) How Histology Slides are Prepared. [En ligne]. Disponible: <https://bitesizebio.com/13398/how-histology-slides-are-prepared/>
- [36] Y. Tsutsumi, "Pitfalls and Caveats in Applying Chromogenic Immunostaining to Histopathological Diagnosis," vol. 10, n°. 6, Juin 2021.
- [37] S. Suster, "Pathology," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 2792-2798.
- [38] L. Krogerus et I. Kholová, "Cell Block in Cytological Diagnostics: Review of Preparatory Techniques," vol. 62, n°. 4, p. 237-243, 2018.
- [39] A. Tamrazi *et al.*, "Clinical value of CT-guided biopsy of small (≤ 1.5 cm) suspicious lung nodules: Diagnostic accuracy, molecular characterization and long-term clinical outcomes," vol. 33, p. 100626, Janvier 2022. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468294222001174>
- [40] "Chemotherapy," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 793-796.
- [41] "Chemoradiotherapy," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 786-790.
- [42] M. Gandhi, P. Baum et C. B. Hare, "Immunology," dans *Blueprints notes & cases: microbiology and immunology* A. B. Caughey, Édité.: Blackwell Science Ltd, 2003, p. 160 - 188.
- [43] G. Moldenhauer, "Selection Strategies for Monoclonal Antibodies," dans *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 2014, p. 15-42.
- [44] J.-O. Lee *et al.*, "Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors," vol. 390, n°. 4, p. 1023-1032, Février 2008. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1643-y>
- [45] H. Liu et K. May, "Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function," vol. 4, n°. 1, p. 17-23, Février 2012.
- [46] Société canadienne du cancer. (2022) Immunothérapie. [En ligne]. Disponible: <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/immunotherapy>

- [47] Société canadienne du cancer. (2022) Traitement ciblé. [En ligne]. Disponible: <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/targeted-therapy>
- [48] I. Elouarith *et al.*, "Thyroid metastasis revealing a lung adenocarcinoma: A case report and review of the literature," vol. 98, p. 107525, Septembre 2022.
- [49] A. J. A. Freitas *et al.*, "Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer," vol. 23, n^o. 17, Septembre 2022.
- [50] D. Frankel *et al.*, "Comparison between Immunocytochemistry, FISH and NGS for ALK and ROS1 Rearrangement Detection in Cytological Samples," vol. 23, n^o. 18, Septembre 2022.
- [51] L. Jiang *et al.*, "Improving Selection Criteria for ALK Inhibitor Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pooled-Data Analysis on Diagnostic Operating Characteristics of Immunohistochemistry," vol. 40, n^o. 5, 2016. [En ligne]. Disponible: https://journals.lww.com/ajsp/Fulltext/2016/05000/Improving_Selection_Criteria_for_ALK_Inhibitor.14.aspx
- [52] P. van der Laan *et al.*, "Liquid Biopsies in Sarcoma Clinical Practice: Where Do We Stand?," vol. 9, n^o. 10, Septembre 2021.
- [53] R. T. Miller, "Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry—important technical aspects that every pathologist should know," vol. 36, n^o. 5, p. 312-335, Septembre 2019. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740257019300589>
- [54] M. Birkhahn, R. J. Cote et C. R. Taylor, "Immunohistochemistry," dans *Encyclopedia of Cancer*, M. Schwab, Édité. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 1820-1824.
- [55] Abcam. (s. d.) DAB straining. [En ligne]. Disponible: <https://www.abcam.com/kits/dab-staining>
- [56] F. Schneider *et al.*, "Adequacy of Core Needle Biopsy Specimens and Fine-Needle Aspirates for Molecular Testing of Lung Adenocarcinomas," vol. 143, n^o. 2, p. 193-200, 2015. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1309/AJCPLY8UI7WSFSYY>
- [57] S. Eustis et M. A. El-Sayed, "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes," vol. 35, n^o. 3, p. 209-217, 2006. [En ligne]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1039/B514191E>
- [58] L. Wang, M. Hasanzadeh Kafshgari et M. Meunier, "Optical Properties and Applications of Plasmonic-Metal Nanoparticles," vol. 30, Septembre 2020.
- [59] J.-M. Guay *et al.*, "Laser-induced plasmonic colours on metals," vol. 8, n^o. 1, p. 16095, Juillet 2017. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1038/ncomms16095>
- [60] E. Bergeron *et al.*, "Cell-specific optoporation with near-infrared ultrafast laser and functionalized gold nanoparticles," vol. 7, n^o. 42, p. 17836-47, Novembre 2015.
- [61] M. N. Martin *et al.*, "Charged Gold Nanoparticles in Non-Polar Solvents: 10-min Synthesis and 2D Self-Assembly," vol. 26, n^o. 10, p. 7410-7417, Mai 2010. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1021/la100591h>

- [62] H. Aldewachi, N. Woodroffe et P. Gardiner, "Study of the Stability of Functionalized Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Dipeptidyl Peptidase IV," vol. 8, n°. 12, p. 2589, 2018. [En ligne]. Disponible: <https://www.mdpi.com/2076-3417/8/12/2589>
- [63] J. Manson *et al.*, "Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media," vol. 44, n°. 2, p. 99-105, Juin 2011. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1007/s13404-011-0015-8>
- [64] H. Häkkinen, "The gold–sulfur interface at the nanoscale," vol. 4, n°. 6, p. 443-455, Juin 2012. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1038/nchem.1352>
- [65] M. Borzenkov *et al.*, "Thermal and Chemical Stability of Thiol Bonding on Gold Nanostars," vol. 31, n°. 29, p. 8081-8091, Juillet 2015. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01473>
- [66] M. Gordel-Wójcik, K. Piela et R. Kolkowski, "Monitoring the gold nanoshell growth mechanism: stabilizing and destabilizing effects of PEG-SH molecules," vol. 24, n°. 9, p. 5700-5709, 2022. [En ligne]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1039/D2CP00239F>
- [67] L. Mahmudin *et al.*, "The effect of the concentration of the stabilizer in the formation of a silver nanoparticle on the phenomenon of Surface Plasmon Resonance (SPR) as an active material for biosensor," communication présentée à 2nd International Seminar on Science and Technology 2020 (ISST-2) 2020, 16-17 Sept. 2020, UK, 2021, p. 012064 (6 pp.). [En ligne]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1763/1/012064>
- [68] M. H. Jazayeri *et al.*, "Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies," vol. 9, p. 17-22, Juillet 2016. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214180416300344>
- [69] M. L. Chiu *et al.*, "Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics," vol. 8, n°. 4, Décembre 2019.
- [70] M. J. E. Fischer, "Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach," dans *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, N. J. Mol et M. J. E. Fischer, Édité. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, p. 55-73.
- [71] D. J. Dietzen, "13 - Amino Acids, Peptides, and Proteins," dans *Principles and Applications of Molecular Diagnostics*, N. Rifai, A. R. Horvath et C. T. Wittwer, Édité.: Elsevier, 2018, p. 345-380.
- [72] A. Goyon *et al.*, "Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies," vol. 1065-1066, p. 119-128, Octobre 2017. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023217313880>
- [73] Y. Cao *et al.*, "Assessing the activity of antibodies conjugated to upconversion nanoparticles for immunolabeling," vol. 1209, p. 339863, Mai 2022.
- [74] B. J. Plowman *et al.*, "Electrochemical Behavior of GoldSilver Alloy Nanoparticles," vol. 3, n°. 7, p. 1039-1043, 2016. [En ligne]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1002/celc.201600212>
- [75] D. Karthiga, N. Chandrasekaran et A. Mukherjee, "Spectroscopic studies on the interactions of bovine serum albumin in presence of silver nanorods," vol. 232, p. 251-257, 2017. [En ligne]. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.096>

- [76] D. Kamarudin *et al.*, "Synthesis of silver nanoparticles stabilised by PVP for polymeric membrane application: a comparative study," vol. 37, n^o. 5, p. 289-301, Avril 2022. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1080/10667857.2021.1908768>
- [77] Abcam. (s. d.) Antibody storage guide. [En ligne]. Disponible: <https://www.abcam.com/protocols/antibody-storage-guide>
- [78] B. X. Huang, H.-Y. Kim et C. Dass, "Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry," vol. 15, n^o. 8, p. 1237-1247, Août 2004. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030504003393>
- [79] Thermo Fisher Scientific. (s. d.) Amine-Reactive Crosslinker Chemistry. [En ligne]. Disponible: <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/amine-reactive-crosslinker-chemistry.html>
- [80] C. Contini *et al.*, "Size dependency of gold nanoparticles interacting with model membranes," vol. 3, n^o. 1, p. 130, Septembre 2020.
- [81] M. Zhang *et al.*, "The Use of Porous Scaffold as a Tumor Model," vol. 2013, p. 396056, Septembre 2013. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1155/2013/396056>
- [82] P. Ghahremani *et al.*, "Deep Learning-Inferred Multiplex ImmunoFluorescence for Immunohistochemical Image Quantification," vol. 4, n^o. 4, p. 401-412, Avril 2022.
- [83] M. Carter et J. C. Shieh, "Chapter 13 - Cell Culture Techniques," dans *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, M. Carter et J. C. Shieh, Édité. New York: Academic Press, 2010, p. 281-296.
- [84] W. Mathieson *et al.*, "Antimicrobials and in vitro systems: antibiotics and antimycotics alter the proteome of MCF-7 cells in culture," vol. 112, n^o. 8, p. 2170-8, Août 2011.
- [85] MilliporeSigma. (2022) Trypsin-EDTA solution. [En ligne]. Disponible: <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/product/sigma/t4049>
- [86] H.-L. Huang *et al.*, "Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells," vol. 17, n^o. 1, p. 36, Mai 2010. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-36>
- [87] M. C. Jamur et C. Oliver, "Cell fixatives for immunostaining," vol. 588, p. 55-61, 2010.
- [88] M. A. Rahman *et al.*, "Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphological and molecular analysis of tissues," vol. 29, n^o. 1, p. 175-182, Janvier 2022.
- [89] P. C. Goodwin, B. Johnson et C. W. Frevert, "4 - Microscopy, Immuno-Histochemistry, Digital Imaging, and Quantitative Microscopy," dans *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*, P. M. Treuting, S. M. Dintzis et K. S. Montine, Édité. San Diego: Academic Press, 2018, p. 53-66.
- [90] Novus Biologicals. (2022) IHC/ICC Sample fixation (Formalin vs. Alcohol). [En ligne]. Disponible: <https://www.novusbio.com/sample-fixation-for-ihc-icc>
- [91] Abcam. (s. d.) Immunohistochemistry (IHC) fixation protocol. [En ligne]. Disponible: <https://www.abcam.com/protocols/ihc-fixation-protocol>

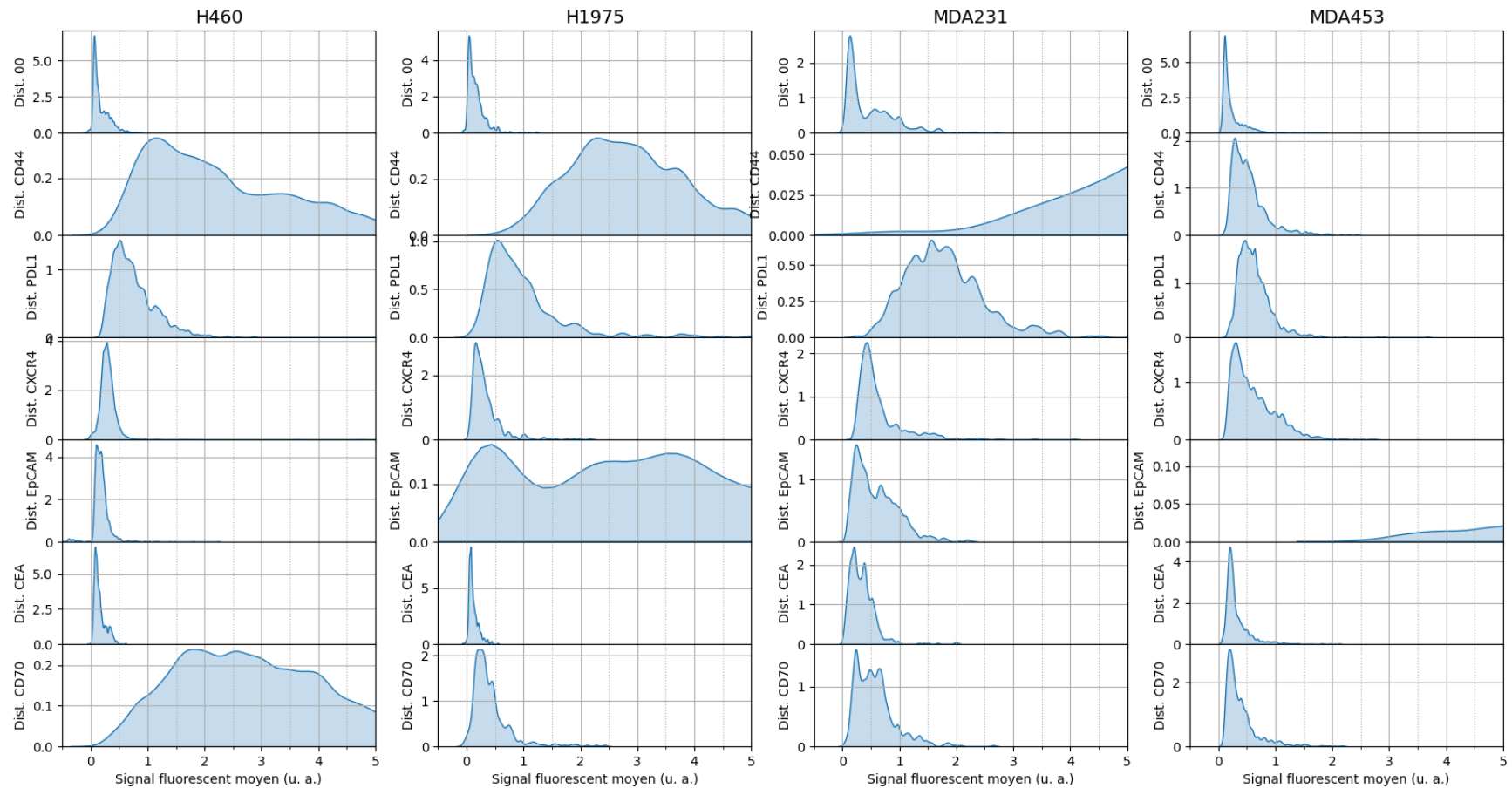
- [92] J. Barretina *et al.*, "The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity," vol. 483, n^o. 7391, p. 603-607, Mars 2012. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1038/nature11003>
- [93] I. Papatheodorou *et al.*, "Expression Atlas update: from tissues to single cells," vol. 48, n^o. D1, p. D77-D83, 2020. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz947>
- [94] A. Lachmann *et al.*, "Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse," vol. 9, n^o. 1, p. 1366, Avril 2018. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03751-6>
- [95] R. Bedre, "Gene expression units explained: RPM, RPKM, FPKM, TPM, DESeq, TMM, SCnorm, GeTMM, and ComBat-Seq," dans *Data science blog* vol. 2022, éd, 2022.
- [96] Y. Zhao *et al.*, "TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository," vol. 19, n^o. 1, p. 269, Juin 2021.
- [97] D. P. Nusinow *et al.*, "Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia," *Cell*, vol. 180, n^o. 2, p. 387-402.e16, 2020. [En ligne]. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978347>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339254/>
[https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(19\)31385-6.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(19)31385-6.pdf)
- [98] K. Takada *et al.*, "The Significance of the PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer: Trenchant Double Swords as Predictive and Prognostic Markers," vol. 19, n^o. 2, p. 120-129, Mars 2018. [En ligne]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S152573041730308X>
- [99] L. M. Sholl, "Biomarkers of response to checkpoint inhibitors beyond PD-L1 in lung cancer," vol. 35, n^o. 1, p. 66-74, Janvier 2022. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1038/s41379-021-00932-5>
- [100] UniProt. (s. d.) CD274 - Programmed cell death 1 ligand 1 - Homo sapiens (Human). [En ligne]. Disponible: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NZQ7/entry>
- [101] UniProt. (s. d.) CD44 - CD44 antigen - Homo sapeins (Human). [En ligne]. Disponible: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16070/entry>
- [102] Y. Zheng *et al.*, "Lung Cancer Stem Cell Markers as Therapeutic Targets: An Update on Signaling Pathways and Therapies," vol. 12, p. 873994, 2022.
- [103] Y. Jia *et al.*, "Hyaluronic acid-based nano drug delivery systems for breast cancer treatment: Recent advances," vol. 10, p. 990145, 2022.
- [104] UniProt. (s. d.) EPCAM - Epithelial cell adhesion molecule - Homo sapiens (Human). [En ligne]. Disponible: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16422/entry>
- [105] UniProt. (s. d.) CD70 - CD70 antigen - Homo sapiens (Human). [En ligne]. Disponible: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P32970/entry>
- [106] X. Y. Tang *et al.*, "The Proliferative Role of Immune Checkpoints in Tumors: Double Regulation," vol. 14, n^o. 21, Octobre 2022.

- [107] UniProt. (s. d.) CXCR4 - C-X-C chemokine receptor type 4 - Homo sapiens (Human). [En ligne]. Disponible: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P61073/entry>
- [108] UniProt. (s. d.) CEACAM5 - Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 - Homo sapiens (Human). [En ligne]. Disponible: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P06731/entry>
- [109] Z.-W. Han *et al.*, "The old CEACAMs find their new role in tumor immunotherapy," vol. 38, n^o. 6, p. 1888-1898, Décembre 2020. [En ligne]. Disponible: <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00955-w>
- [110] J. Mei *et al.*, "A comparability study of natural and deglycosylated PD-L1 levels in lung cancer: evidence from immunohistochemical analysis," vol. 20, n^o. 1, p. 11, Janvier 2021.
- [111] N. Ozawa *et al.*, "PD-L1 upregulation is associated with activation of the DNA double-strand break repair pathway in patients with colitic cancer," vol. 11, n^o. 1, p. 13077, Juin 2021.
- [112] H. M. B. Bolly *et al.*, "Analysis of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 Immunoexpression, Ki-67 and Programmed Death Ligand 1 in Diffuse Astrocytic Tumours : Study of Single Center in Bandung, Indonesia," vol. 64, n^o. 1, p. 100-109, Janvier 2021.
- [113] T. M. Errington *et al.*, "Challenges for assessing replicability in preclinical cancer biology," vol. 10, Décembre 2021.
- [114] J. C. Waters et T. Wittmann, "Concepts in quantitative fluorescence microscopy," dans *Quantitative Imaging in Cell Biology*, 1^e éd., vol. 123, J. C. Waters et T. Wittmann, Édité.: Elsevier, 2014, p. 1-18.
- [115] J. C. Waters, "Live-Cell Fluorescence Imaging," dans *Methods in Cell Biology*, vol. 114, G. Sluder et D. E. Wolf, Édité.: Academic Press, 2013, p. 125-150.
- [116] N. Watanabe, "Chapter twelve - Fluorescence Single-Molecule Imaging of Actin Turnover and Regulatory Mechanisms," dans *Methods in Enzymology*, vol. 505, P. M. Conn, Édité.: Academic Press, 2012, p. 219-232.
- [117] T. J. Fellers, K. M. Vogt et M. W. Davidson. (2022) CCD Signal-To-Noise Ratio. [En ligne]. Disponible: <https://www.microscopyu.com/tutorials/ccd-signal-to-noise-ratio>
- [118] Teledyne Photometrics. (2022) Signal-to-Noise Ratio. [En ligne]. Disponible: <https://www.photometrics.com/learn/imaging-topics/signal-to-noise-ratio>
- [119] T. J. Lambert et J. C. Waters, "Assessing camera performance for quantitative microscopy," dans *Methods Cell Biol*, 1^e éd., vol. 123, 2014, p. 35-53.
- [120] S. T. Ross, J. R. Allen et M. W. Davidson, "Practical considerations of objective lenses for application in cell biology," dans *Methods Cell Biol*, 1^e éd., vol. 123, 2014, p. 19-34.
- [121] M. W. Davidson. (2022) Microscope Objective Specifications. [En ligne]. Disponible: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/microscope-objective-specifications>
- [122] M. A. Model, "Intensity Calibration and Shading Correction for Fluorescence Microscopes," vol. 37, n^o. 1, p. 10.14.1-10.14.7, 2006. [En ligne]. Disponible: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142956.cy1014s37>

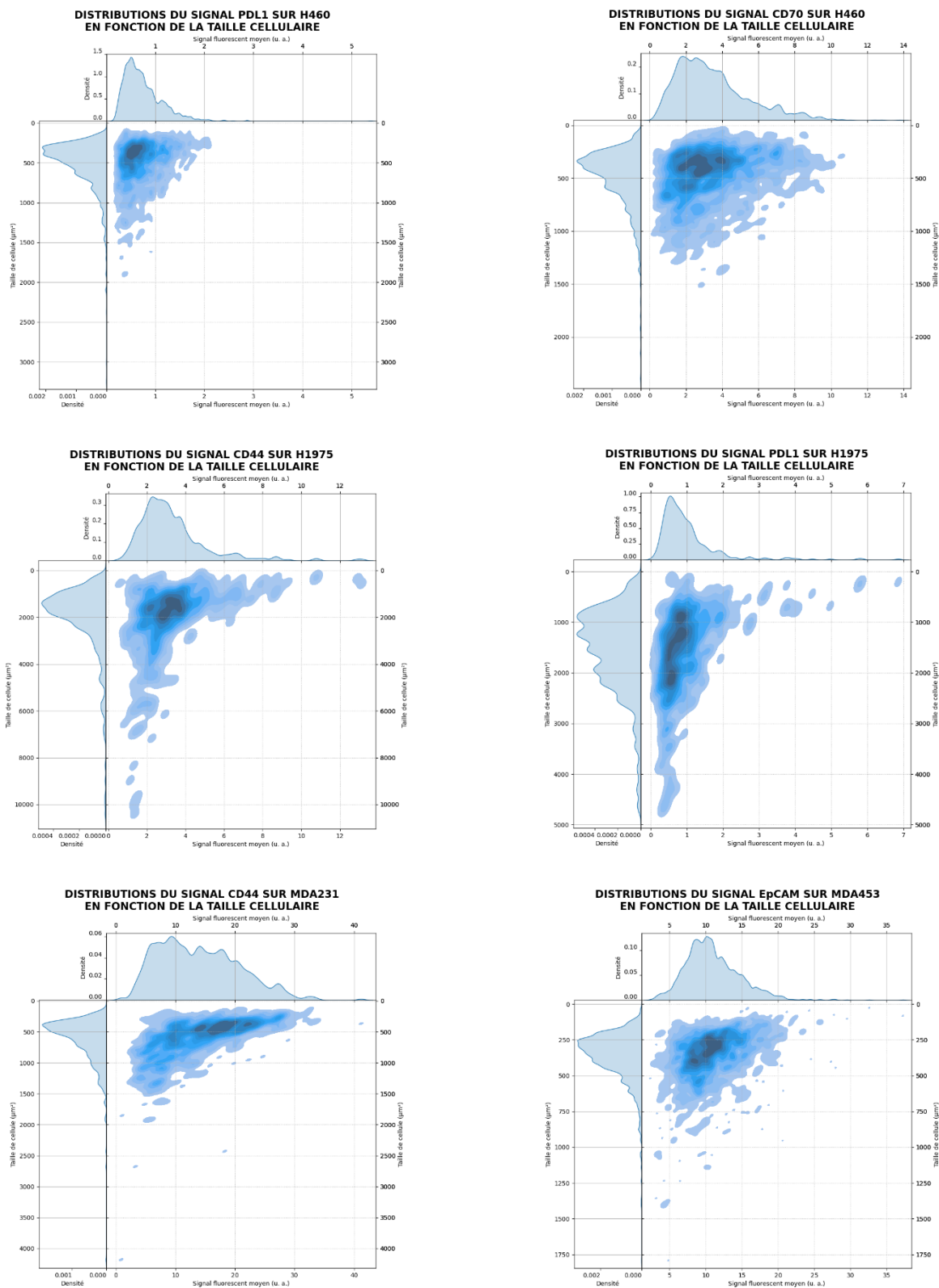
- [123] Center for Advanced Light Microscopy. (2022) How to acquire flat-field correction images. [En ligne]. Disponible: <https://calm.ucsf.edu/how-acquire-flat-field-correction-images>
- [124] ImageJ. (s. d.) Deconvolution. [En ligne]. Disponible: <https://imagej.net/imaging/deconvolution>
- [125] A. Nsamela Matombi, "Fonctionnalisation de nanoparticules plasmoniques pour le ciblage de cellules du cancer du sein *in vitro*," Institut de Génie biomédical, Polytechnique Montréal, 2019.
- [126] ATCC. (s. d.) NCI-H460 [H460] - HTB-177. [En ligne]. Disponible: <https://www.atcc.org/products/htb-177>
- [127] ATCC. (s. d.) NCI-H1975 [H-1975, H1975] - CRL-5908. [En ligne]. Disponible: <https://www.atcc.org/products/crl-5908>
- [128] ATCC. (s. d.) MDA-MB-231 - HTB-26. [En ligne]. Disponible: <https://www.atcc.org/products/htb-26>
- [129] ATCC. (s. d.) MDA-MB-453 - HTB-131. [En ligne]. Disponible: <https://www.atcc.org/products/htb-131>
- [130] A. Lonic, W. Onglao et Y. Khew-Goodall, "Quantifying EGFR endosomal recycling via immunofluorescence in breast cancer cells," vol. 3, n^o. 2, p. 101305, Juin 2022.
- [131] Chroma. (s. d.) 49000 - ET - DAPI. [En ligne]. Disponible: https://www.chroma.com/products/sets/49000-et-dapi#tabs-detail_page_plot-left-1
- [132] Chroma. (s. d.) 49002 - ET - EGFP (FITC/Cy2). [En ligne]. Disponible: <https://www.chroma.com/products/sets/49002-et-egfp-fitc-cy2>
- [133] Chroma. (s. d.) 49005 - ET - DSRed (TRITC/Cy3). [En ligne]. Disponible: <https://www.chroma.com/products/sets/49005-et-dsred-tritc-cy3>
- [134] Cell Profiler. (s. d.) About. [En ligne]. Disponible: <https://cellprofiler.org/about>

ANNEXE A ÉCHELLE AGRANDIE DES DISTRIBUTIONS DE L'ATTACHEMENT SPÉCIFIQUE QUANTIFIÉ PAR IMMUNOFLUORESCENCE

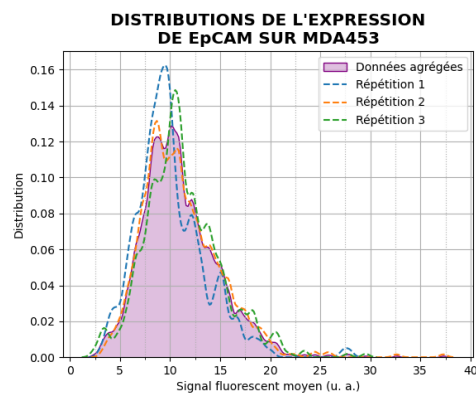
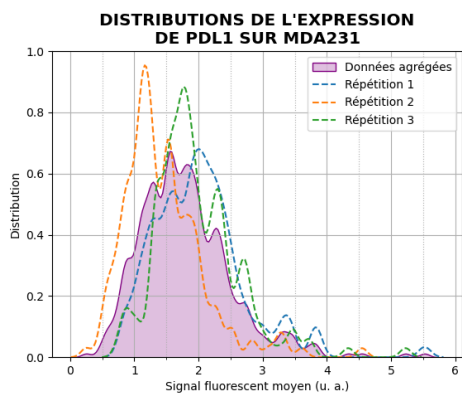
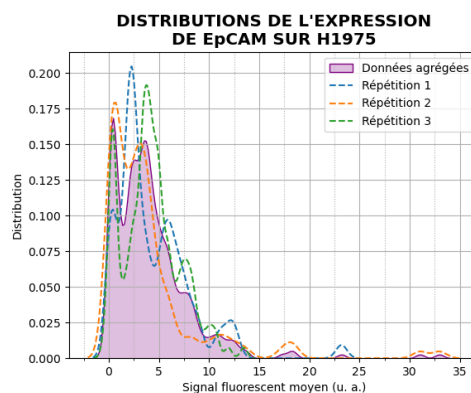
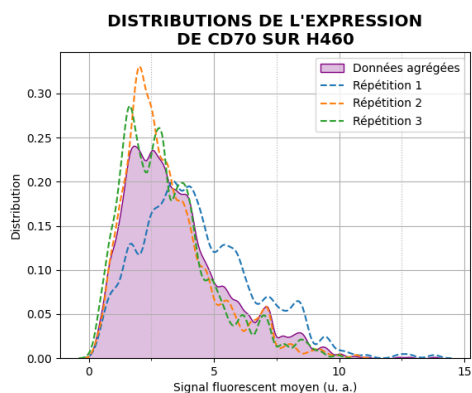
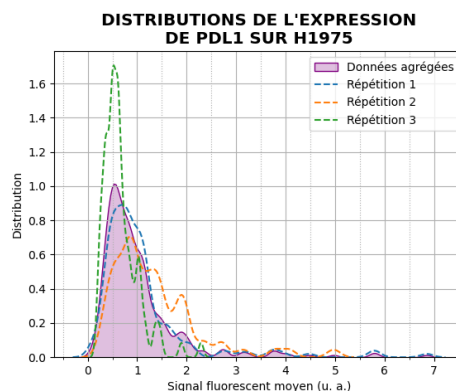
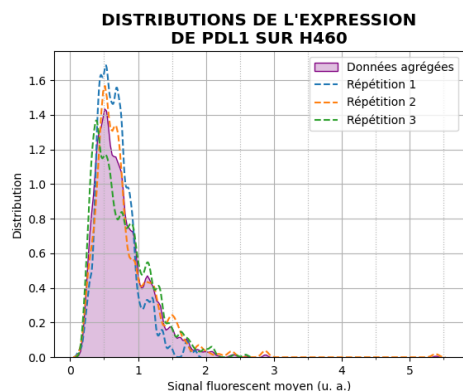
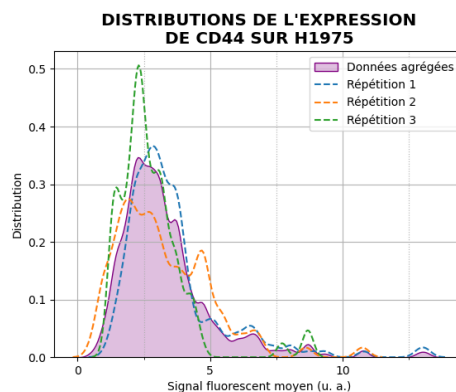
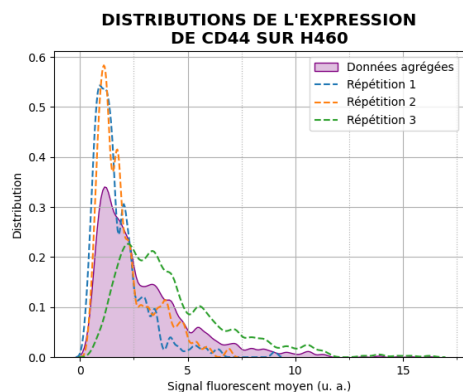
DISTRIBUTIONS DE L'ATTACHEMENT SPÉCIFIQUE QUANTIFIÉ PAR IMMUNOFLUORESCENCE - ÉCHELLE AGRANDIE



ANNEXE B EXEMPLES DE DISTRIBUTIONS DU SIGNAL IMMUNOFLUORESCENT SELON LA TAILLE DES CELLULES



ANNEXE C RÉPÉTIBILITÉ DE L'IMMUNOFLUORESCENCE POUR LES MARQUEURS POSITIFS



ANNEXE D DISTRIBUTIONS DE L'ATTACHEMENT SPÉCIFIQUE IMMUNOPLASMONIQUE

DISTRIBUTIONS DE L'ATTACHEMENT SPÉCIFIQUE QUANTIFIÉ PAR IMMUNOPLASMONIQUE SANS SOUSTRACTION DE L'ATTACHEMENT AU SUBSTRAT

