

Titre: Développement d'une stratégie de biofonctionnalisation de nanoparticules d'or à partir de peptides superhélices et d'anticorps pour la détection du cancer du sein
Title:

Auteur: Médéric Dégardin
Author:

Date: 2023

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Dégardin, M. (2023). Développement d'une stratégie de biofonctionnalisation de nanoparticules d'or à partir de peptides superhélices et d'anticorps pour la détection du cancer du sein [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/53344/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/53344/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Gregory De Crescenzo, Michel Meunier, & Olivier Henry
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Développement d'une stratégie de biofonctionnalisation de nanoparticules
d'or à partir de peptides superhélices et d'anticorps pour la détection du
cancer du sein**

MÉDÉRIC DÉGARDIN

Département de génie chimique

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

Génie chimique

Mars 2023

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Développement d'une stratégie de biofonctionnalisation de nanoparticules d'or à partir de peptides superhélices et d'anticorps pour la détection du cancer du sein

présenté par **Médéric DÉGARDIN**

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

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

Nick VIRGILIO, président

Gregory DE CRESCENZO, membre et directeur de recherche

Michel MEUNIER, membre et codirecteur de recherche

Olivier HENRY, membre et codirecteur de recherche

Dominique TRUDEL, membre

DÉDICACE

A mes parents.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de recherche, Gregory De Crescenzo. Merci d'avoir cru en moi tout au long de ce projet de recherche. Je n'aurais pas pu imaginer un cadre plus stimulant et enrichissant que par la liberté que tu m'as laissée pour explorer mes propres pistes de recherche, tout en m'encadrant avec tes précieux enseignements. Mais surtout merci de t'être rendu tant disponible dès que nécessaire.

Un énorme merci à Benoît Liberelle et Romane Oliverio pour avoir été présents au quotidien et pour m'avoir autant aidé tout au long de ma maîtrise, au laboratoire comme à l'extérieur. Merci en plus à Jimmy Gaudreault et Benjamin Serafin, vous avez été tous les quatre étés de formidables collègues et notre groupe m'est très cher.

Merci à mon codirecteur de recherche, Michel Meunier, ainsi qu'à Isabelle Largilière et Cécile Darviot pour toutes les ressources auxquelles vous m'avez donné accès et pour votre accompagnement. Ce projet n'aurait pas abouti sans votre aide.

Finalement, merci à ma famille pour leur soutien inconditionnel malgré la grande distance qui nous a séparés durant cette maîtrise. Loin des yeux, près du cœur.

RÉSUMÉ

Le cancer du sein représente aujourd'hui 25 % des cancers diagnostiqués chez les Canadiennes. Le diagnostic de la maladie et la caractérisation histologique de la tumeur sont effectués par immunohistochimie (IHC) sur des tissus mammaires prélevés chez des patientes par biopsie. L'IHC repose sur l'utilisation d'anticorps chromogènes afin de produire un signal colorimétrique si des cellules cancéreuses sont détectées dans les tissus étudiés. L'IHC est néanmoins limitée par l'existence d'une grande variabilité inter-observateur dans les diagnostics, due à la nature qualitative des analyses. Ceci peut influencer la caractérisation de la tumeur, voire provoquer des faux négatifs ou faux positifs. Afin de créer une alternative quantitative à l'IHC et en réduire la variabilité inter-observateur, des procédures immunoplasmoniques sont en développement dans le laboratoire du Pr. Meunier. Ces procédures reposent sur l'utilisation de nanoparticules métalliques pour remplacer les chromophores. En effet, les nanoparticules métalliques possèdent des propriétés uniques de résonance plasmonique stables qui permettent leur détection et leur quantification. Ainsi, biofonctionnaliser des nanoparticules métalliques avec des anticorps ciblant les cellules cancéreuses permettrait leur détection quantitative au sein de tissus mammaires, menant à un diagnostic plus fiable du cancer du sein.

Ce travail traite plus particulièrement du développement d'un système modèle à base de nanoparticules d'or (AuNPs) pour la détection de HER2, un biomarqueur du cancer du sein. Une nouvelle stratégie de biofonctionnalisation est présentée pour immobiliser de manière orientée du *Trastuzumab* (TZM), un anticorps monoclonal contre HER2, sur des AuNPs sphériques de 100 nm de diamètre. Cette nouvelle stratégie repose sur l'utilisation des peptides « Ecoil » et « Kcoil », capables de s'organiser en superhélice par hétérodimérisation avec une forte affinité et spécificité. Pour cela, le peptide Kcoil a été greffé à la surface des AuNPs alors que son partenaire Ecoil a été ajouté aux C-terminaux des chaînes lourdes de TZM lors de sa production en bioréacteur, assurant ainsi une interaction forte et spécifique entre les anticorps et les AuNPs. Cette nouvelle approche a été comparée à deux stratégies bien connues de biofonctionnalisation non-orientée, à savoir 1) l'adsorption non-spécifique de TZM sur la surface d'or, et 2) le couplage amine entre les chaînes latérales des lysines de TZM et des acides carboxyliques présents en bout de polyéthylène glycol préalablement immobilisé sur les AuNPs. Un procédé d'analyse a été mis au point afin de systématiquement comparer la stabilité macroscopique et nanoscopique des AuNPs

biofonctionnalisées, la quantité de TzM immobilisés à leur surface et leur capacité à détecter spécifiquement des cellules de cancer du sein HER2-positives.

Les résultats présentés ici montrent les avantages de la nouvelle stratégie de biofonctionnalisation orientée des AuNPs utilisant les peptides Ecoil et Kcoil. En effet, les deux stratégies non-orientées ont permis d'immobiliser des quantités similaires d'anticorps à la surface des AuNPs, quantité qui a été significativement augmentée par la nouvelle stratégie orientée dans les conditions expérimentales qui ont été explorées. De plus, la détection spécifique des cellules HER2-positives a été ici accomplie grâce aux stratégies d'adsorption non-spécifique des anticorps et d'immobilisation orientée avec les peptides superhélices. La quantité de nanoparticules attachées aux cellules HER2-positives était comparable pour ces deux stratégies, malgré les différences précédemment observées quant à la quantité d'anticorps immobilisés sur les AuNPs. Néanmoins, la stratégie orientée avec les peptides Ecoil et Kcoil a permis le plus faible niveau d'attachement aux cellules HER2-négatives ainsi qu'aux lames en verre utilisées pour les observations en microscopie optique. Ainsi, les nanoparticules biofonctionnalisées avec la stratégie utilisant les peptides Ecoil et Kcoil a permis de détecter les cellules de cancer du sein HER2-positives de manière qualitative et quantitative avec la meilleure fiabilité. Cette nouvelle stratégie pourra alors être utilisée pour biofonctionnaliser des AuNPs avec des anticorps ciblant d'autres biomarqueurs cellulaires, dans le but de développer de nouvelles plateformes immunoplasmoniques de diagnostic de cancer du sein.

ABSTRACT

Today, 25 % of cancers diagnosed in Canadian women are breast cancers. Diagnosis of the disease and histological characterization of tumors are performed by immunohistochemistry (IHC) on breast tissues sampled from the patients during a biopsy. IHC procedures use chromogenic antibodies to produce a colorimetric signal upon detection of cancer cells in the tissue samples. Nevertheless, IHC is limited by a certain inter-observer variability in the results due to the qualitative nature of the analyses, which can influence analyses and even result in false-negative or false-positive diagnoses. In order to create a quantitative alternative to IHC with a lower inter-observer variability, immunoplasmonic procedures are currently being developed in Pr. Meunier's lab. These procedures rely on metallic nanoparticles to replace chromophores. Metallic nanoparticles possess stable plasmonic resonance properties allowing for their detection and quantification over time. Biofunctionalization of metallic nanoparticles with antibodies specific to cancer cells will provide a tool for the quantitative detection of cancer cells in breast tissue samples, leading to a more reliable diagnosis.

This work focuses on the development of a gold nanoparticles (AuNPs)-based system for the detection of the HER2 breast cancer cell biomarker. A novel biofunctionalization strategy for the oriented immobilization of *Trastuzumab* (TZM), a monoclonal antibody against HER2, onto 100 nm spherical AuNPs is introduced. This new strategy relies on "Ecoil" and "Kcoil" peptides, which form a coiled-coil heterodimer with high affinity and specificity. The Kcoil was grafted onto the surface of AuNPs, while its partner Ecoil was bioengineered at the C-termini of TZM's heavy chains, allowing a strong and specific interaction between the antibodies and the nanoparticles. This novel approach was compared to two well-known non-oriented biofunctionalization strategies, namely the 1) non-specific adsorption of TZM on the gold surface and 2) amine coupling between the lysine side chains of TZM and carboxylic acid-functionalized polyethylene glycol grafted on AuNPs. An analysis workflow was developed to systematically compare the stability of all AuNPs at macroscopic and nanoscopic scale, the antibody immobilization levels on the surface of nanoparticles, and their applicability for the specific detection of HER2-positive cancer cells.

The disclosed results are still preliminary but demonstrate the advantages of the novel E/K coiled coil peptides-based biofunctionalization strategy. While the two randomly oriented strategies showed similar immobilization levels, immobilization was significantly higher with the

oriented coiled coil-based strategy in the experimental conditions that were explored. Furthermore, the specific detection of HER2-positive breast cancer cells was achieved with coiled coil- and non-specific adsorption-based strategies. The amount of AuNPs bound to HER2-positive cells was comparable with both strategies, despite the differences in antibody immobilization levels on nanoparticles. However, the coiled coil-based strategy exhibited the least binding to HER2-negative cells and to the background of the microscopy slides. Thus, the nanoparticles biofunctionalized with the coiled coiled-based strategy provided the most reliable qualitative and quantitative detection of HER2-positive breast cancer cells. This novel coiled coil-based strategy can be used to biofunctionalize AuNPs with antibodies targeting other cell-surface biomarkers, for the development of new immunoplasmonic platforms for breast cancer diagnosis.

TABLE DES MATIERES

DÉDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIERES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xv
LISTE DES ANNEXES.....	xviii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Diagnostiquer et soigner le cancer : des enjeux contemporains.....	1
1.2 Surveillance et détection du cancer du sein	1
1.3 Repousser les limites de l’immunohistochimie grâce aux nanoparticules d’or	2
1.4 Organisation du projet de recherche.....	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	6
2.1 Nanoparticules d’or et leurs applications biomédicales.....	6
2.1.1 Synthèse des nanoparticules d’or	6
2.1.2 Propriétés optiques des nanoparticules d’or.....	7
2.1.3 Applications biomédicales des nanoparticules d’or	9
2.2 Stratégies de biofonctionnalisation des nanoparticules d’or	12
2.2.1 La biofonctionnalisation pour un ciblage actif.....	12
2.2.2 Biofonctionnalisation des AuNPs par adsorption des anticorps	15
2.2.3 Biofonctionnalisation des AuNPs par greffage covalent des anticorps	17

2.2.4	Biofonctionnalisation des AuNPs par greffage non-covalent des anticorps	23
2.2.5	Biofonctionnalisation des AuNPs par des anticorps modifiés	28
2.3	Caractérisation des nanoparticules biofonctionnalisées	34
2.3.1	Caractérisation des propriétés physiques des AuNPs	34
2.3.2	Caractérisation de la surface des AuNPs biofonctionnalisées	38
2.3.3	Évaluation de la bioactivité des AuNPs biofonctionnalisées	41
CHAPITRE 3 PRÉAMBULE PRÉSENTANT LA DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET L'ORGANISATION DU DOCUMENT		45
3.1	Démarche du travail de recherche	45
3.1.1	Développer un procédé d'analyse des AuNPs	45
3.1.2	Comparer plusieurs stratégies de biofonctionnalisation des AuNPs.....	47
3.1.3	Détection de cellules de cancer du sein par microscopie optique	48
3.2	Organisation générale du document.....	49
CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIES EXPÉRIMENTALES		51
4.1	Réactifs chimiques et matériel biologique	51
4.2	Purification des nanoparticules : centrifugation et resuspension	52
4.3	Biofonctionnalisation des nanoparticules d'or.....	53
4.3.1	AuNPs PEGylées à haute densité : Adsorption Non-Spécifique de TZM et Couplage Amine.	53
4.3.2	AuNPs PEGylées à basse densité : Greffage de Ecoil-TZM par Interaction Superhélice E/K	54
4.4	Caractérisation des nanoparticules d'or	55
4.4.1	TEM	55
4.4.2	Spectroscopie UV-Vis.....	55
4.4.3	DLS	56

4.4.4	Quantification directe des anticorps immobilisés sur les nanoparticules.....	56
4.5	Imagerie cellulaire.....	57
4.5.1	Culture cellulaire.....	57
4.5.2	Incubation des nanoparticules avec les cellules sur des lames en verre.....	57
4.5.3	Imagerie.....	58
4.6	Analyse statistique.....	60
CHAPITRE 5 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....		61
5.1	Préparer la surface des AuNPs avant leur biofonctionnalisation	61
5.1.1	AuNPs PEGylées à haute densité pour les stratégies d'Adsorption Non-Spécifique de TzM et de Couplage Amine.....	62
5.1.2	AuNPs PEGylées à basse densité pour la stratégie de greffage de Ecoil-TzM par Interaction Superhélice E/K	65
5.2	Biofonctionnalisation des AuNPs avec du Trastuzumab	68
5.2.1	Immobilisation de TzM de type naturel sur les nanoparticules PEGylées à haute densité pour les stratégies d'Adsorption Non-Spécifique et de Couplage Amine	70
5.2.2	Immobilisation de Ecoil-TzM sur les nanoparticules PEGylées à basse densité pour la stratégie d'Interaction Superhélice E/K	71
5.3	Détection des cellules de cancer du sein avec les AuNPs biofonctionnalisées.....	74
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE		83
6.1	Développer un procédé d'analyse des AuNPs	83
6.2	Comparer plusieurs stratégies de biofonctionnalisation des AuNPs.....	85
6.3	Détection de cellules de cancer du sein par microscopie optique	87
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		89
RÉFÉRENCES.....		90
ANNEXES		108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Stratégies majeures pour la synthèse chimique des AuNPs	7
Tableau 2.2. Exemples d'applications biomédicales actuelles des AuNPs.....	11
Tableau 2.3. Techniques principales pour caractériser les propriétés physiques des AuNPs	38
Tableau 3.1. Démarche du travail de recherche et organisation du document.....	50
Tableau 5.1. Qualité de l'imagerie sur les cellules de cancer du sein avec les nanoparticules biofonctionnalisées.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique des stratégies principales d'IHC	3
Figure 1.2. Illustration du fonctionnement d'une procédure d'IHC indirecte (à gauche) et d'une procédure utilisant des AuNPs décorées d'anticorps par l'intermédiaire de PEG (à droite) pour la détection du même biomarqueur à la surface d'une cellule cancéreuse.....	4
Figure 2.1. Phénomènes de LSPR, diffusion et absorption par les AuNPs.....	8
Figure 2.2. Influence de la taille, géométrie et du milieu environnant sur le nombre et la position des longueurs d'onde LSPR des nanoparticules	9
Figure 2.3. Représentation des IgG1 et leurs fragments utilisés pour la biofonctionnalisation.....	14
Figure 2.4. Adsorption des anticorps sur les AuNPs et optimisation de l'immobilisation	15
Figure 2.5. Limites à la biofonctionnalisation des AuNPs par adsorption des anticorps.....	17
Figure 2.6. Structure du PEG utilisé pour le greffage covalent d'anticorps sur AuNPs	17
Figure 2.7. Greffage par les amines des anticorps avec NHS et EDC sur PEG-COOH	19
Figure 2.8. Clivage des anticorps et greffage sur AuNP par les thiols avec PEG-Maleimide.....	20
Figure 2.9. Oxydation des glycanes en aldéhydes et greffage sur AuNP avec PEG-Hydrazide....	22
Figure 2.10. Greffage des anticorps sur AuNPs par le système avidine – biotine	24
Figure 2.11. Greffage des anticorps sur AuNP par l'intermédiaire de protéine A/G	26
Figure 2.12. Greffage d'anticorps sur AuNPs par le site de liaison aux nucléotides	27
Figure 2.13. Glossaire des réactions de chimie click	30
Figure 2.14. Stratégies pour le greffage par chimie click d'anticorps modifiés	31
Figure 2.15. Représentations de motifs superhélices	32
Figure 2.16. Fonctionnement des techniques de microscopie électronique.....	35
Figure 2.17. Fonctionnement des mesures DLS	36
Figure 2.18. Fonctionnement des mesures de spectroscopie UV-Vis.....	37
Figure 2.19. Stratégies de quantification des anticorps immobilisés sur AuNPs.....	39

Figure 2.20. Bioactivité des AuNPs selon la stratégie de biofonctionnalisation employée.....	42
Figure 2.21. Procédure pour évaluer la bioactivité des AuNPs par méthode enzymatique	43
Figure 2.22. Observation des AuNPs liées aux cellules par microscopie en champ sombre.....	44
Figure 3.1. Procédé final de biofonctionnalisation et d'analyse des AuNPs	46
Figure 3.2. Stratégies de biofonctionnalisation ayant fait l'objet d'une étude complète	48
Figure 5.1. Analyse des AuNPs nues de 100 nm par TEM.....	61
Figure 5.2. Caractérisation des NPs PEGylées à haute densité.....	64
Figure 5.3. Caractérisation des NPs PEGylées à basse densité et du greffage de Kcoil.....	66
Figure 5.4. Rôle du tampon sur la stabilité des NPs après greffage du Kcoil.....	67
Figure 5.5. Polydispersité et propriétés optiques des NPs biofonctionnalisées avec du TzM	69
Figure 5.6. Analyse de l'immobilisation de TzM sur AuNPs PEGylées à haute densité	71
Figure 5.7. Analyse de l'immobilisation de TzM sur AuNPs PEGylées à basse densité	72
Figure 5.8. Niveaux d'expression de HER2 sur les cellules de cancer du sein par immunofluorescence avec du TzM de type naturel et du Ecoil-TzM.....	75
Figure 5.9. Exemple d'analyse d'image capturée sur le microscope par le logiciel CellProfiler, sur des cellules SK-BR-3	76
Figure 5.10. Quantification des nanoparticules attachées aux cellules de cancer du sein	79
Figure 5.11. Attachement des nanoparticules sur les cellules de cancer du sein	80

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AuNPs	Nanoparticules d'or
AuPEG _{HD}	AuNPs PEGylées à haute densité
AuPEG _{HD} -COOH _{5%}	AuNPs PEGylées à haute densité (incubation avec 5 % de PEG-COOH)
AuPEG _{HD} -COOH _{30%}	AuNPs PEGylées à haute densité (incubation avec 30 % de PEG-COOH)
AuPEG _{LD}	AuNPs PEGylées à faible densité
AuPEG _{LD} /Kcoil	AuNPs PEGylées à faible densité et du Kcoil
BSA	Albumine de sérum bovin
CD4	Protéine membranaire « critère de différenciation 4 »
CTAB	Bromure de cétrimonium
DAPI	4'-6-diamino-2-phenylindole
DDT	1-Dodécane-thiol
DLS	Spectroscopie par diffusion dynamique de la lumière
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Dithiothréitol
Ecoil	Peptide (EVSALEK) ₅
Ecoil-TZM	Anticorps recombinant (EVSALEK) ₅ -Trastuzumab
EDC	1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPR	Effet de perméabilité et rétention accrues
Fab	Fragment des anticorps liant les antigènes
FBS	Sérum de veau fœtal

Fc	Fragment cristallisable des anticorps
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GRP	Bombésine
HER2	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HRP	Peroxydase de raifort
^1H RMN	Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire du proton
IC	Immunocoloration
ICP-MS	Spectroscopie de masse par plasma à couplage inductif
IgG	Immunoglobuline de type G
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
Kcoil	Peptide (KVSALKE) ₅
LSPR	Résonance plasmonique de surface localisée
MNPs	Nanoparticules métalliques
mPEG	Méthoxy-PEG-Thiol, 5 kDa
NBS	Site de liaison aux nucléotides
NHS	N-hydroxysuccinimide
NPs	Nanoparticules
NTA	Analyse du suivi des nanoparticules
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Tampon de phosphate salin
PBST	PBS contenant 0.05 % de Tween 20
PEG	Polyéthylène glycol
PEG-COOH	Thiol-PEG-CH ₂ COOH

PES	Polyéthersulfone
PLB	Protéines de liaison à la biotine
RE	Récepteur à œstrogènes
RLS	Spectroscopie à diffusion de Rayleigh de la lumière
RP	Récepteur à progestérone
RT	Température ambiante
SEM	Microscopie à balayage électronique
SPR	Résonance plasmonique de surface
TEM	Microscopie en transmission électronique
TGA	Analyse thermogravimétrique
TNBS	Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
TOAB	Bromure de tétraoctylammonium
TZM	Trastuzumab
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Motivations pour l'abandon du potentiel zeta comme mesure de stabilité nanoscopique	108
Annexe B Motivations pour l'abandon de la quantification des anticorps immobilisés sur les nanoparticules après leur solubilisation par KI / I ₂	114
Annexe C Motivations pour l'abandon de la stratégie de couplage des anticorps clivés aux nanoparticules d'or par les thiols de leur région charnière	119
Annexe D Motivations pour l'abandon de l'utilisation des cellules MDA-MB-453 (HER2-positives) dans les manipulations d'imagerie.....	124

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Diagnostiquer et soigner le cancer : des enjeux contemporains

Le cancer est une maladie qui touche l'humanité entière avec 19.3 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2020 et 9.9 millions de décès enregistrés cette même année [1]. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer était en 2019 la première ou deuxième cause de décès non naturel avant l'âge de 70 ans dans 112 pays, incluant la majorité des pays développés et en voie de développement [2]. L'OMS estime que 28.4 millions de nouveaux cas seront diagnostiqués en 2040, soit une augmentation de 47% par rapport à 2020 [2]. Afin de garantir une prise en charge médicale efficace aujourd'hui et dans les années à venir, la recherche scientifique globale doit encore progresser afin de développer des thérapies et techniques de diagnostic toujours plus performantes.

Le « cancer » est en réalité un terme générique qui désigne la maladie due à la présence d'au moins une tumeur maligne dans le corps (i.e. un amas de cellules se multipliant de manière anarchique et pouvant se propager), peu importe son lieu d'origine. En 2020, les cancers les plus diagnostiqués dans le monde furent ceux du sein chez la femme (2.26 millions de cas), du poumon (2.21 millions de cas) et de la prostate (1.41 millions de cas); les cancers les plus mortels furent ceux du poumon (1.79 millions de décès), du foie (830,000 décès) et de l'estomac (769,000 décès) [1]. Étant donné la diversité des cancers existants, la difficulté principale de leur traitement réside alors dans la nécessité de développer des thérapies adaptées à chacun d'entre eux. De plus, le cancer est une maladie évolutive : elle s'aggrave avec le temps. Le développement de techniques de diagnostic fiables et sensibles est donc primordial afin de détecter tous les cancers le plus tôt possible et sans équivoque.

1.2 Surveillance et détection du cancer du sein

En 2022, la Société Canadienne du Cancer estime que le cancer du sein est la forme de cancer la plus répandue chez les Canadiennes (à l'exclusion des cancers de la peau autres que le mélanome) puisqu'il représente 25 % des diagnostics. Il s'agit également de la principale cause de décès par cancer chez elles [3]. Étudier le cancer du sein afin de développer de nouvelles techniques

de diagnostic et de nouvelles thérapies aura donc un impact important pour la santé des Canadiennes, et de toutes les femmes du monde.

La surveillance et le diagnostic du cancer du sein chez les femmes de plus de 40 ans se font principalement par mammographie, assistée ou non par ultrasons [4]. Lorsqu'un diagnostic positif est prononcé, la tumeur doit être caractérisée de manière histologique car il existe de nombreux sous-types de cancers du sein. Cette caractérisation est réalisée par des méthodes telles que l'immunohistochimie (IHC) et permet de personnaliser les thérapies proposées aux patientes [5]. Le sous-type précis de cancer du sein est alors identifié en réalisant une liste des biomarqueurs cellulaires exprimés par la tumeur, ce qui constitue sa « carte d'identité ». Les trois biomarqueurs cellulaires les plus caractérisés sont les récepteurs à œstrogènes (RE), à progestérone (RP) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) [5].

1.3 Repousser les limites de l'immunohistochimie grâce aux nanoparticules d'or

Comme mentionné précédemment, l'IHC est une technique permettant de détecter les biomarqueurs présents à la surface des cellules cancéreuses afin de caractériser les tumeurs. Pour cela, certaines de ces cellules seront prélevées chez la patiente par biopsie. Ensuite, des anticorps primaires spécifiques à ces biomarqueurs sont incubés *in vitro* avec les cellules : une interaction anticorps-biomarqueur aura lieu si ces derniers sont présents à la surface des cellules [6]. Une immunocoloration (IC) est ensuite réalisée grâce à un jeu de structures secondaires (anticorps, polymères, etc.) possédant des chromophores. Une représentation schématique du système complet est proposée sur la Figure 1.1. Grâce à ces méthodes, la présence ou non des biomarqueurs à la surface des cellules sera diagnostiquée par observation au microscope de la coloration à la surface des cellules. Il sera donc possible de déterminer tous les biomarqueurs cellulaires exprimés par la tumeur afin de caractériser son type. Ainsi, le traitement le plus adapté pour maximiser les chances de rémission puis guérison sera sélectionné : thérapies hormonales, immunothérapies, chimiothérapie, lumpectomie voire mastectomie [7].

Largement employée et bien connue des pathologistes, l'IHC est une technique de diagnostic pourtant imparfaite. Tout d'abord, il s'agit d'une technique qualitative puisque le diagnostic est rendu par simple observation au microscope afin de conclure sur la présence ou non des biomarqueurs cellulaires. Avec le temps, des méthodes expérimentales et numériques ont été développées pour rendre l'IHC semi-quantitative à partir des niveaux de coloration sur les tissus observés [8-10]. Cependant, le diagnostic par IHC repose toujours sur une interprétation humaine des observations et est donc sujet à de la variabilité inter-observateur. En effet, il est estimé que plusieurs pathologistes rendront des diagnostics identiques de cancer du sein dans seulement 1 cas sur 3 après l'observation des mêmes échantillons [11]. De plus, les antigènes (biomarqueurs cellulaires) sont soumis à des dégradations lors des analyses à cause des différents traitements nécessaires pour fixer les cellules cancéreuses *in vitro* [12], pouvant induire de la variabilité inter-échantillons.

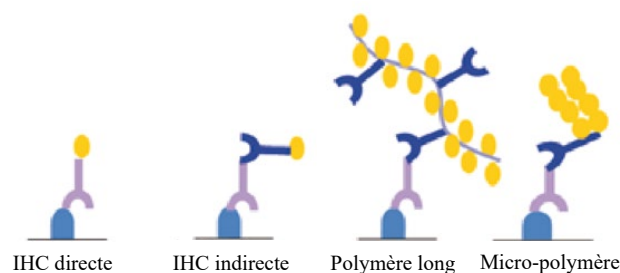


Figure 1.1. Représentation schématique des stratégies principales d'IHC

Les biomarqueurs cellulaires sont représentés en bleu clair, les anticorps primaires et secondaires en violet et bleu foncé respectivement, et les fluorophores ou chromophores nécessaires à l'observation au microscope sont représentés par les cercles jaunes. Figure adaptée de [13].

De nouveaux systèmes permettant de dépasser les limites de l'IHC sont aujourd'hui à l'étude. Ils reposent le plus souvent sur les nanotechnologies [14], et notamment sur les nanoparticules d'or (AuNPs), car l'or est inerte et ne présente pas de toxicité directe pour les tissus biologiques [15]. En effet, les AuNPs possèdent des propriétés physiques, optiques et électriques qui pourraient leur permettre de remplacer les fluorophores traditionnellement utilisés en IHC. Pour cela, les AuNPs peuvent être décorées avec les mêmes anticorps primaires que ceux utilisés en IHC, par

l'intermédiaire de divers polymères de liaison tels que le polyéthylène glycol (PEG) [16]. Ainsi, il suffirait d'incuber les AuNPs décorées d'anticorps avec les cellules cancéreuses *in vitro* pour reproduire un système de diagnostic semblable à l'IHC, comme illustré sur la Figure 1.2. Ce système conserverait les forces de l'IHC (spécificité de la détection, manipulations connues par les pathologistes, etc.) tout en capitalisant sur les avantages des AuNPs (propriétés physiques et optiques stables dans le temps, dénombrement possible des nanoparticules, etc.).

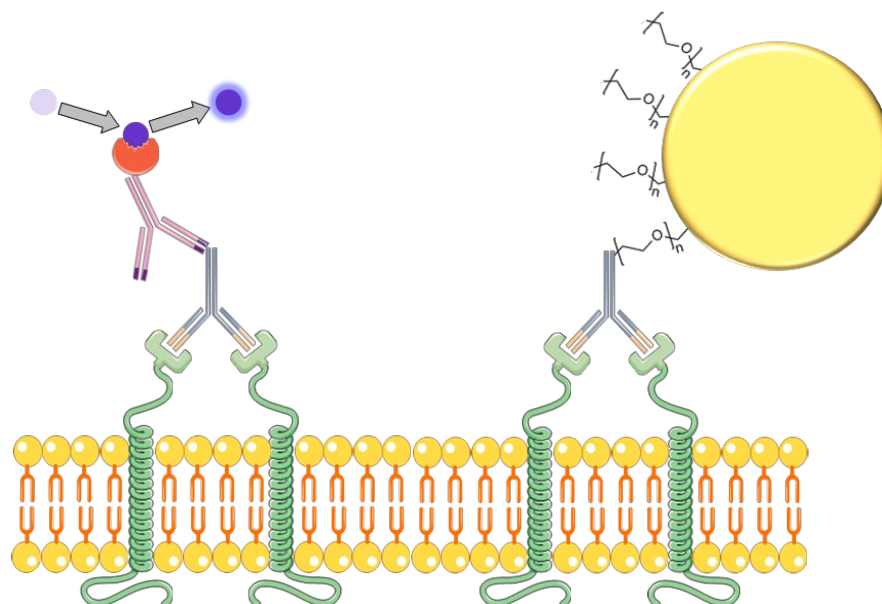


Figure 1.2. Illustration du fonctionnement d'une procédure d'IHC indirecte (à gauche) et d'une procédure utilisant des AuNPs décorées d'anticorps par l'intermédiaire de PEG (à droite) pour la détection du même biomarqueur à la surface d'une cellule cancéreuse.

1.4 Organisation du projet de recherche

Ce projet de recherche consiste en l'étude *in vitro* de différentes stratégies d'immobilisation d'anticorps sur des nanoparticules d'or (AuNPs) sphériques de 100 nm de diamètre, aussi appelé « biofonctionnalisation ». L'or a été choisi comme matériau constituant le cœur des nanoparticules, car, en plus d'être inerte face aux tissus biologiques, la synthèse des AuNPs ainsi que leur chimie de surface sont bien connues [17-19]. En outre, les propriétés optiques des AuNPs sont parfaitement adaptées pour les observations au microscope [20]. Ces AuNPs seront

biofonctionnalisées avec du *Trastuzumab* (TzM), un anticorps monoclonal ciblant le biomarqueur cellulaire HER2 [21]. TzM, dont le nom commercial est l'*Herceptin*, est approuvé par la *Food and Drug Administration* en tant que médicament pour le traitement des cancers du sein HER2-positifs [22, 23]. En réalité, seuls 25 % des cancers du sein présentent une surexpression de HER2 [5] et une caractérisation complète des cellules cancéreuses nécessiterait de biofonctionnaliser 3 populations d'AuNPs avec des anticorps contre HER2, RE et RP respectivement. Cependant, la biofonctionnalisation avec TzM permet d'établir un système modèle lié au cancer du sein afin de comparer différentes stratégies de greffage. La meilleure stratégie pourra être ensuite reproduite sur d'autres AuNPs avec des anticorps anti-RE et anti-RP pour effectuer des diagnostics complets.

Afin d'atteindre l'objectif de cette étude, le projet a été découpé en 3 sous-objectifs :

- 1) Développer un procédé d'analyse systématique permettant de caractériser les propriétés physicochimiques des AuNPs lors de leur biofonctionnalisation avec TzM
- 2) Comparer les caractéristiques physicochimiques des AuNPs biofonctionnalisées ainsi que le nombre de TzM greffés par AuNP selon plusieurs stratégies
- 3) Évaluer la capacité des AuNPs biofonctionnalisées selon les différentes stratégies de greffage à détecter des cellules modèles de cancer du sein *in vitro* par observation microscopique

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Nanoparticules d'or et leurs applications biomédicales

2.1.1 Synthèse des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs), aussi appelées « or colloïdal », sont connues des Hommes depuis l'Antiquité où elles furent premièrement utilisées à des fins artistiques [24]. Au Moyen-Âge, l'or colloïdal (alors sous forme de sels) fut étudié pour ses propriétés pseudo-médicinales [25, 26], bien que ces propriétés n'aient jamais fait l'objet d'un consensus scientifique. Ce n'est qu'à partir de 1857 que l'or colloïdal fut étudié pour ses propriétés optiques avec une approche scientifique moderne par Michael Faraday [27]. Il fut le premier à créer des nanoparticules d'or en réduisant du chlorure d'or AuCl_3 , bien qu'incapable de les visualiser à l'époque. Aujourd'hui on définit les AuNPs comme des objets en or dont les dimensions se situent entre 1 nm et 300 nm, et elles sont au cœur d'études pour des applications biomédicales *in vitro* voire *in vivo* [28].

Cinq stratégies majeures sont aujourd'hui utilisées pour synthétiser chimiquement des AuNPs de toutes tailles et formes (Tableau 2.1). De plus, de nombreuses variantes à ces stratégies existent aujourd'hui afin de varier les dimensions des AuNPs synthétisées par des protocoles similaires [18]. C'est le cas de la technique *Seeding-Growth*, qui permettait initialement de synthétiser des AuNPs allant jusqu'à 40 nm de diamètre [29], mais qui a été retravaillée afin d'atteindre 300 nm [30]. Il est également possible de fabriquer des AuNPs grâce à des synthèses assistées par laser [31-33] pour éviter l'utilisation de réactifs ou solvants toxiques qui empêchent d'habitude l'utilisation des AuNPs *in vivo*.

Les efforts de recherche sur la synthèse des AuNPs se concentrent aujourd'hui sur la synthèse verte en employant des extraits de plantes [34]. En effet, cette approche possède plusieurs avantages : elle permet de synthétiser des AuNPs de toutes dimensions en n'utilisant que peu de réactifs issus des industries polluantes, les solvants utilisés ne sont pas toxiques, et leur mise en œuvre ne nécessite pas des équipements coûteux comme les lasers femtoseconde.

Tableau 2.1. Stratégies majeures pour la synthèse chimique des AuNPs

Méthode	Source d'or	Réactifs	Forme des AuNPs	Taille des AuNPs
Turkevich [35]	HAuCl ₄	Citrate de sodium	Sphères	13 nm – 20 nm
Brust-Schiffrin [36]	HAuCl ₄	TOAB, DDT, NaBH ₄	Sphères	1 nm – 3 nm
<i>Seeding-Growth</i> [29]	HAuCl ₄	Citrate de sodium, CTAB	Sphères / Bâtonnets	5 nm – 300 nm
Acide ascorbique [37]	HAuCl ₄	Acide ascorbique, CTAB	Polyèdres	20 nm – 40 nm
Synthèse verte [38-40]	HAuCl ₄	Divers extraits de plantes	Sphères	2 nm – 300 nm

2.1.2 Propriétés optiques des nanoparticules d'or

Les structures à base d'or sont composées de nuages d'électrons qui peuvent rentrer en oscillation lorsque ceux-ci sont irradiés : ces nuages d'électrons sont alors appelés des plasmons. Ces plasmons peuvent entrer dans un état de résonance lorsque la fréquence de l'irradiation incidente est égale à la fréquence propre des plasmons : c'est la résonance plasmonique de surface (SPR). En particulier, les AuNPs sont des structures délimitées dans l'espace si bien qu'il faut tenir compte des effets de bords pour l'étude de leurs propriétés optiques : on définit alors le phénomène de résonance plasmonique de surface localisée (LSPR). Cet effet apparaît lorsque les plasmons oscillent jusqu'à créer des polarisations électriques différentes au sein même des AuNPs (Figure 2.2.A). Le comportement des champs électromagnétiques aux alentours des AuNPs est prédit par la théorie de Mie [41]. Celle-ci explique que l'aspect coloré des suspensions liquides d'AuNPs vient de leur propriété d'extinction de la lumière incidente, qui est en réalité l'addition de deux phénomènes : la diffusion et l'absorption. L'intensité de l'extinction dépend de la longueur d'onde de la lumière incidente, et est maximale à la longueur d'onde de résonance λ_{LSPR} (Figure 2.2.B/C).

Il est d'ailleurs intéressant de noter que toutes les nanoparticules sphériques métalliques (MNPs) sont soumises à la théorie de Mie et possèdent des propriétés de LSPR. Elles peuvent être composées d'éléments tels que des métaux nobles (Au, Ag, Pt, etc.) [35, 42, 43] ou des oxydes métalliques (Fe₂O₃, Fe₃O₄, TiO₂, etc.) [44, 45]. Les MNPs peuvent également être formées à partir de plusieurs métaux grâce à la formation d'alliages mixtes (Ni-Cu, Ag-Cu; Ni-Cr-Fe, etc.) [46-48]

ou de structures noyau-enveloppe comme Au-Ag [49]. Cependant, la majorité de ces MNPs ne pourront certainement jamais être approuvées pour des utilisations *in vivo* à cause de la toxicité de la plupart des métaux les composant [15]. Puisque l'or n'est pas directement toxique pour les tissus biologiques humains, il s'agit aujourd'hui du matériau de choix pour les études à vocations biomédicales.

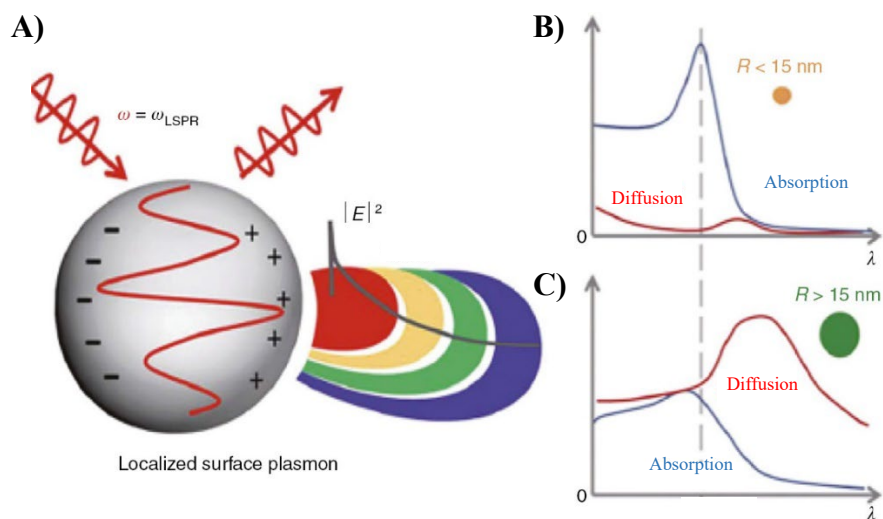


Figure 2.1. Phénomènes de LSPR, diffusion et absorption par les AuNPs

A) Représentation des polarisations électriques au sein des AuNPs et du champ électrique extérieur en résultant lors du phénomène de LSPR. B) Représentation des spectres UV-Vis de diffusion et absorption pour des petites AuNPs ($R < 15$ nm), avec une prédominance de l'absorption. C) Représentation des spectres UV-Vis de diffusion et absorption pour de grandes AuNPs ($R > 15$ nm), avec une prédominance de la diffusion. Figure adaptée de [50].

En ce qui concerne les AuNPs, λ_{LSPR} dépend de 3 paramètres [51-53]: leur taille, leur géométrie et la composition du milieu environnant leur surface. En effet, λ_{LSPR} augmente avec le diamètre des AuNPs (Figure 2.3.A). Ensuite, la géométrie des AuNPs influe sur le nombre de pics de résonance ainsi que leur position (Figure 2.3.B). Finalement, λ_{LSPR} dépend de l'indice de réfraction du milieu dans lequel les AuNPs sont suspendues : plus celui-ci est élevé, plus λ_{LSPR} augmentera (Figure 2.3.C).

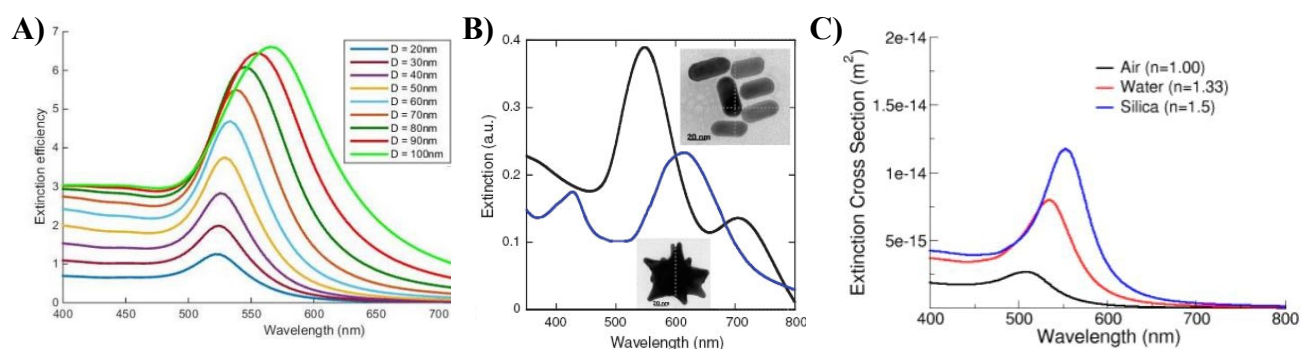


Figure 2.2. Influence de la taille, géométrie et du milieu environnant sur le nombre et la position des longueurs d'onde LSPR des nanoparticules

A) λ_{LSPR} augmente avec le diamètre des AuNPs. Figure adaptée de [53]. B) Le profil du spectre de résonance dépend de la géométrie des AuNPs (bâtonnets en noir, étoile en bleu). Figure adaptée de [52]. C) λ_{LSPR} augmente lorsque l'indice de réfraction du milieu environnant la surface des AuNPs augmente. Figure adaptée de [51].

2.1.3 Applications biomédicales des nanoparticules d'or

Grâce à leurs propriétés optiques, les AuNPs sont étudiées à des fins de diagnostic *in vitro*, imagerie, livraison de médicaments et thérapie photothermique ciblée [20, 54]. Des exemples précis d'applications sont donnés dans le Tableau 2.2. Les techniques de diagnostic et d'imagerie utilisent les propriétés de diffusion de la lumière des AuNPs : irradier les tissus les contenant permettra de les visualiser par microscopie ou toute autre technique d'imagerie (rayons X, etc.). Puisque la longueur d'onde diffusée par les AuNPs dépend de leur taille et géométrie (voir section 2.1.2.), il est théoriquement possible de discriminer plusieurs biomarqueurs au sein d'une même observation en utilisant plusieurs populations d'AuNPs, chacune ciblant un des biomarqueurs d'intérêt : c'est le « multiplexage » [55]. De leur côté, les techniques de livraison des médicaments reposent sur plusieurs stratégies, comme l'utilisation d'AuNPs creuses pouvant libérer leur cargaison au contact de la cible biologique, ou la fixation des médicaments à la surface des AuNPs puis leur libération au moment désiré. Finalement, la thérapie photothermique s'appuie sur les propriétés d'absorbance de l'énergie lumineuse des AuNPs. En effet, irradier des tissus contenant des AuNPs pourra créer une élévation locale de la température autour des nanoparticules et détruire

des tissus indésirables (comme des tumeurs) sans endommager les tissus sains avoisinants. La force des AuNPs est de pouvoir combiner simultanément toutes ces utilisations: il serait par exemple imaginable d'injecter des AuNPs reconnaissant des cellules cancéreuses à un patient afin de les visualiser dans son corps, de procéder à l'ablation des tumeurs par thérapie photothermique, puis de favoriser la reconstruction tissulaire locale grâce à un médicament qui aurait été préalablement chargé sur les AuNPs. On appelle cela un système *Théranostique*, car il permettrait de combiner diagnostic et thérapie avec un seul composé, et est un champ de recherche aujourd'hui très représenté.

Les applications biomédicales des AuNPs reposent donc sur leurs propriétés optiques : il faut donc à tout prix s'assurer de leur stabilité colloïdale en tout temps. Pourtant, les AuNPs s'agrègent rapidement dans des conditions salines telles que celles utilisées *in vitro* et *in vivo* [56]. De plus, les AuNPs utilisées *in vivo* sont en contact avec de nombreuses autres biomolécules qui peuvent s'adsorber à leur surface et provoquer leur agrégation en formant des ponts entre elles [57]. Pour éviter toute agrégation, il est possible de couvrir la surface des AuNPs avec des surfactants biocompatibles. Si plusieurs stratégies existent pour cela, comme le recouvrement couche-par-couche de polyélectrolytes et le recouvrement par silice mésoporeuse [58], la plus utilisée est le greffage de polyéthylène glycol (PEG) par chimie thiol-or [16, 59-61]. En effet, la synthèse de chaînes de PEG de toutes tailles avec une extrémité active pour la chimie thiol-or (simple thiol, acide lipoïque ou lipoamide, etc.) est bien connue et peu coûteuse. En plus d'empêcher leur agrégation, le PEG permet de protéger les AuNPs *in vivo* en les dissimulant du système immunitaire, et plus particulièrement des macrophages [59]. Il est tout de même important de noter que la couverture de PEG sur les AuNPs est souvent imparfaite à cause des irrégularités à leur surface, peu importe les efforts fournis pour maximiser la densité de greffage du PEG [16, 60, 62-64]. Ce phénomène est d'autant plus présent avec les grandes AuNPs, car elles possèdent plus d'irrégularités de surface que les petites [65]. De plus, il est nécessaire d'utiliser des chaînes de PEG d'au moins 5 kDa pour stabiliser les grandes AuNPs. Ces chaînes de PEG sont susceptibles d'adopter des conformations « champignon », diminuant encore plus la densité de greffage à la surface des nanoparticules [62]. Il est pourtant primordial de savoir couvrir tous types d'AuNPs avec du PEG pour des applications futures telles que le multiplexage.

Tableau 2.2. Exemples d'applications biomédicales actuelles des AuNPs

Application	Caractéristiques des AuNPs	Cible biologique	Référence
Diagnostic <i>in vitro</i>	Bâtonnets (68 nm × 30 nm)	Virus de l'Hépatite B	[66]
	Sphères (13 nm)	Parasite <i>P. falciparum</i> (paludisme)	[67]
	Sphères (20 nm)	Cellules HMy2 (cancer de la prostate)	[68]
Imagerie	Sphères (13 nm)	Cellules LNCaP (cancer de la prostate)	[69]
	Sphères (15 nm)	Cellules BT-474 (cancer du sein)	[70]
	Sphères (100 nm) et autres (multiplex)	Cellules MDA-453 (cancer du sein)	[55]
	Sphères (100 nm) Bâtonnets (40 nm × 92 nm)	Cellules MDA-231 (cancer du sein) Cellules 661W (cancer muridé)	[71]
	Sphères (50 nm, 60 nm et 80 nm) Bâtonnets (40 nm × 80 nm)	Cellules MDA-231 (cancer du sein) Cellules Y79 (cancer de la rétine)	[72]
	Sphères (100 nm)	Cellules MDA-231 (cancer du sein) Cellules MDA-453 (cancer du sein) Cellules Jurkat (leucémie)	[73]
Livraison de Médicaments	Sphères (14 nm) + Antibiotiques	Bactérie <i>Escherichia coli DH5α</i>	[74]
	Sphères (8 à 80 nm) + Méthotrexate	Cellules LL2 (cancer du poumon)	[75]
	Sphères (5 nm) + siRNA	Cellules PC-3 (cancer de la prostate)	[76]
	Cages cubiques (39 nm) + Doxorubicin	Cellules MCF-7 (cancer du sein)	[77]
Thérapie Photothermique	Sphères (30 nm)	Lymphocytes T CD8+ et CD45+	[78]
	Bâtonnets (50 nm × 12 nm)	Cellules HSC-3 (cancer de la peau)	[79]
	Bâtonnets (40 nm × 10 nm)	Cellules B16-BL6 (cancer de la peau)	[80]
	Noyau-enveloppe silice-or (150 nm)	Sarcome de Sticker (cancer canin)	[81]

2.2 Stratégies de biofonctionnalisation des nanoparticules d'or

2.2.1 La biofonctionnalisation pour un ciblage actif

Comme mentionné précédemment, les AuNPs utilisées à des fins de diagnostics et/ou thérapies doivent pouvoir cibler des éléments biologiques précis tels que des biomarqueurs cellulaires. Pour certaines applications *in vivo*, ce ciblage peut être passif. En effet, les AuNPs injectées dans l'organisme y circuleront jusqu'à s'accumuler dans des tissus où les membranes cellulaires ont une perméabilité accrue, favorisant ainsi la pénétration et/ou la rétention des nanoparticules. C'est notamment le cas des avec les tissus cancéreux, où des AuNPs chargées de Doxorubicin ont pu pénétrer grâce à l'effet EPR et induire une suppression de 81% des cellules cancéreuses [82]. Cependant, le ciblage passif ne garantit pas systématiquement l'accumulation des AuNPs dans les tissus ciblés. Il est possible qu'elles s'accumulent loin de leur cible si d'autres tissus possèdent également des propriétés de rétention, ce qui pourrait présenter un danger pour la santé des patients. De plus, ce mode de ciblage est spécifique aux applications *in vivo* et n'est pas adapté aux procédures *in vitro*.

C'est pourquoi la plupart des applications reposent sur un ciblage actif : afin de reconnaître des biomarqueurs cellulaires précis, les AuNPs sont fonctionnalisées avec les molécules complémentaires à ces biomarqueurs [83]. On dit alors que les AuNPs sont biofonctionnalisées. Ainsi, les AuNPs ne seront capturées que par les cellules portant les biomarqueurs cibles, et y resteront greffées jusqu'à accomplir leurs objectifs diagnostiques et/ou thérapeutiques. Pour cela, la biofonctionnalisation des AuNPs avec des petits peptides a été succinctement étudiée. Il a par exemple été montré que des AuNPs synthétisées à l'aide de peptides multi-domaines ciblent les récepteurs intégrines $\alpha v \beta_3$ des cellules MCF-7 (adénocarcinome du sein) [84]. Cependant, tous les biomarqueurs cellulaires ne se lient pas à des peptides ou protéines. C'est pourquoi des AuNPs ont aussi été biofonctionnalisées avec des polysaccharides. Cette stratégie a permis, entre autres, de prévenir l'infection de cellules dendritiques par le VIH [85], ou encore de réaliser des diagnostics présymptomatiques de l'inflammation des cellules épithéliales cérébrales [86]. En outre, la biofonctionnalisation des AuNPs avec des acides nucléiques a été étudiée plus en profondeur, car elle s'avère plus polyvalente que la biofonctionnalisation avec des polysaccharides [87]. En effet, leurs applications vont de la biodétection [88] aux thérapies par internalisation des AuNPs dans les cellules [89, 90], en passant par la livraison de médicaments [91].

Malgré l'existence de toutes ces stratégies, l'immobilisation d'anticorps sur les AuNPs [92] reste la voie de biofonctionnalisation la plus employée tant ces protéines ont une affinité et spécificité naturellement élevée pour leurs antigènes cibles. Chez l'humain, les anticorps sont des protéines appartenant à la famille des immunoglobulines et jouent un rôle central dans le système immunitaire adaptatif [93]. Les immunoglobulines de type G (IgG), d'environ 150 kDa, sont les plus nombreuses dans l'organisme et sont assemblées à partir de 4 chaînes protéiques : deux « lourdes » de 50 kDa et deux « légères » de 25 kDa (Figure 2.3.A). Il existe 4 sous-types d'IgG (IgG1 à 4), mais nous nous restreindrons dans ce travail aux IgG1 seulement. La structure quaternaire des IgG1 est assurée grâce à 4 ponts disulfures entre les différentes chaînes comme illustré sur la Figure 2.3.A. Une fois assemblées, les IgG comportent trois parties (Figure 2.3.B): une portion Fc qui est identique pour tous les IgG1 et permet leur reconnaissance par le système immunitaire, et deux portions Fab symétriques qui sont spécifiques à chaque anticorps et permettent de lier l'antigène contre lequel il a été sélectionné. De plus, les anticorps possèdent de nombreux sites de liaisons chimiques (principalement des groupes amines, amides, acides carboxyliques, thiols et carbonyles) et biochimiques (site de liaison aux protéines A et G, site de liaison aux nucléotides, et glycanes) permettant leur conjugaison à d'autres molécules [94] (Figure 2.3.C). Finalement, on sait à présent produire des anticorps monoclonaux recombinants (le plus souvent des IgG1) contre des biomarqueurs cellulaires à des fins thérapeutiques [95]. Par ailleurs, il est aujourd'hui possible de ne produire que des fragments d'anticorps (Figure 2.3.D) afin de conserver la bioactivité des protéines en réduisant leur taille [96], bien que nous nous restreindrons aux anticorps entiers dans ce travail. C'est donc pour toutes ces raisons que les anticorps sont le choix de prédilection pour biofonctionnaliser des AuNPs afin d'assurer un ciblage actif des biomarqueurs cellulaires, et de nombreuses stratégies pour immobiliser les anticorps sur les nanoparticules ont été développées.

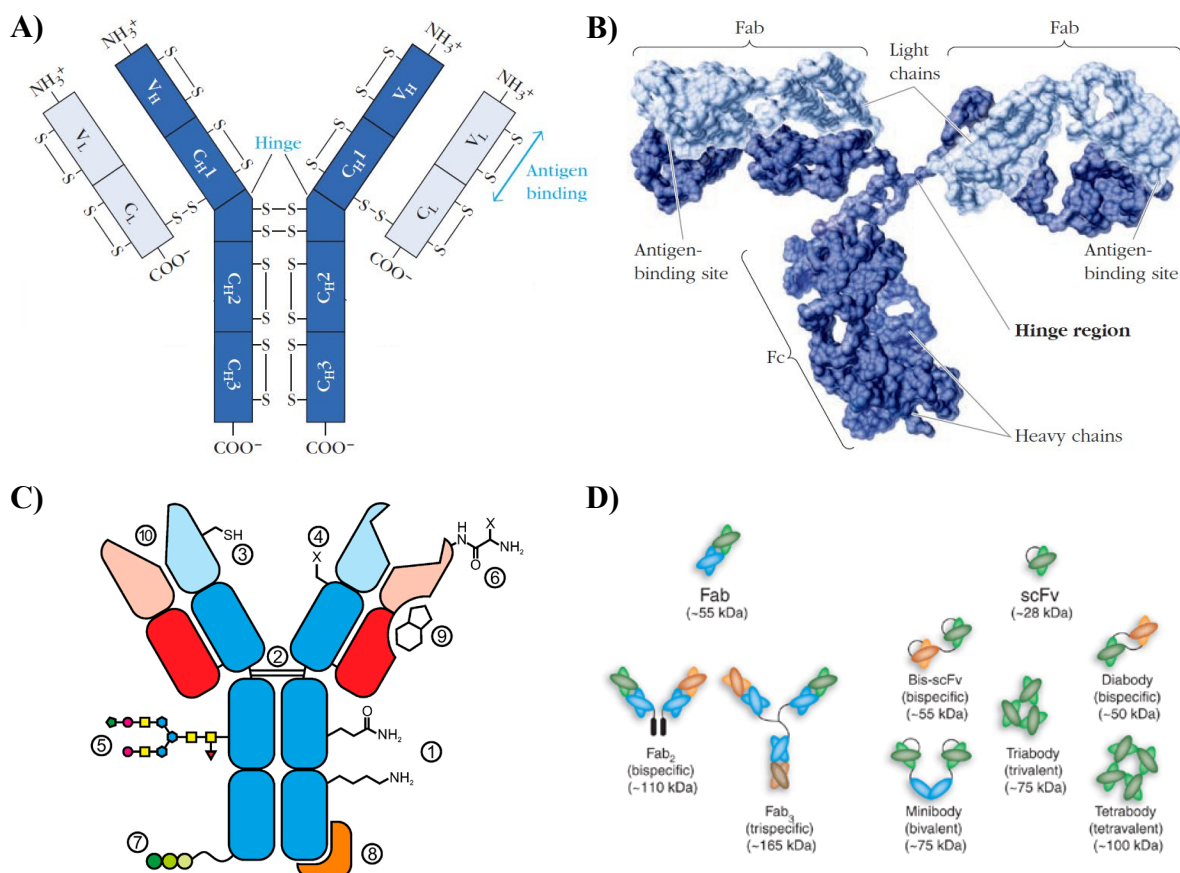


Figure 2.3. Représentation des IgG1 et leurs fragments utilisés pour la biofonctionnalisation

A) Structure schématique des IgG1, les chaînes lourdes et légères sont représentées en bleu foncé et clair respectivement. Figure adaptée de [93]. B) Représentation tridimensionnelle des IgG, les chaînes lourdes et légères sont représentées en bleu foncé et clair respectivement. Figure adaptée de [93]. C) Représentation schématique des sites de conjugaisons généralement disponibles sur les IgG : 1- Fonctionnalités chimiques sur les chaînes secondaires des acides aminés, 2- Ponts disulfures interchaînes, 3- Cystéines libres ajoutées génétiquement, 4- Acides aminés non-naturels ajoutés génétiquement, 5- Glycanes, 6- N-termini des chaînes lourdes et légères, 7- Étiquettes ajoutées chimiquement ou génétiquement, 8- Liaison aux protéines A et G, 9- Liaison aux nucléotides, 10- Sites d'activité catalytique. Figure adaptée de [94]. D) Fragments bioactifs d'anticorps étudiés dans la littérature. Figure adaptée de [97].

2.2.2 Biofonctionnalisation des AuNPs par adsorption des anticorps

La première stratégie pour biofonctionnaliser les AuNPs consiste à adsorber les anticorps à la surface des nanoparticules (Figure 2.4.A). Cette adsorption est garantie par les interactions électrostatiques qui ont lieu entre les résidus chargés négativement des anticorps et la surface chargée positivement des nanoparticules, et est assistée par des interactions hydrophobes supplémentaires [98]. Ainsi, il a été montré que l'adsorption des anticorps sur les AuNPs peut être favorisée en adaptant le pH du milieu d'incubation [99] (Figure 2.4.A). En étudiant la répartition des charges au sein des anticorps à un pH donné, il est théoriquement possible de prévoir quelles régions de l'anticorps auront de plus hautes probabilités d'interagir avec l'or, permettant ainsi d'anticiper leur orientation à la surface des AuNPs [100]. En outre, la quantité d'anticorps adsorbés sur les AuNPs augmente avec leur concentration lors de l'incubation selon des modèles dérivés de Langmuir [99-101] (Figure 2.4.B). Finalement, l'adsorption des anticorps peut être renforcée par l'ajout de cystéines libres à leur surface lors de leur production, afin de former des liaisons chimiques thiol-or avec les AuNPs [102].

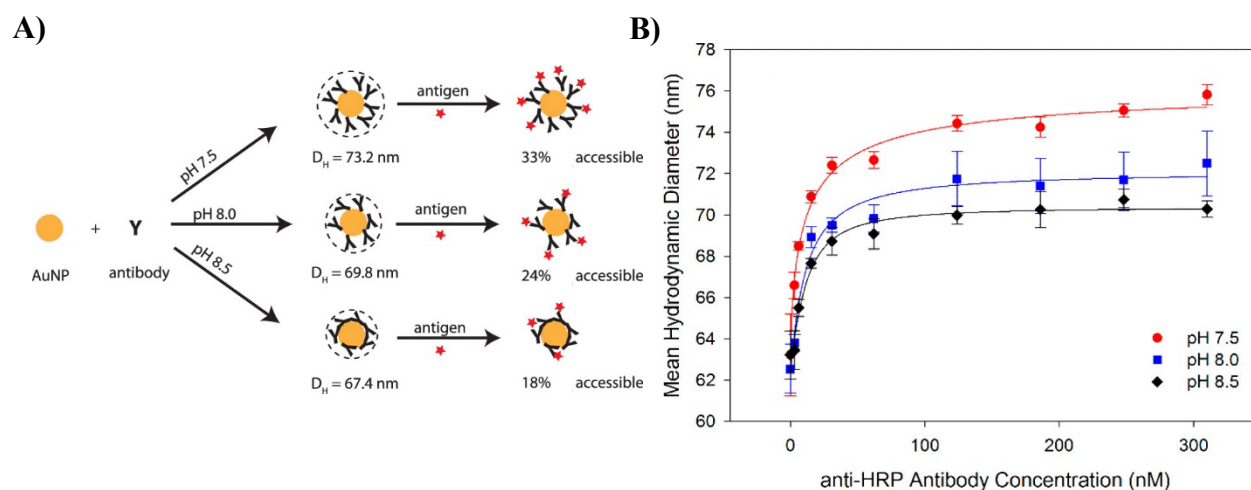


Figure 2.4. Adsorption des anticorps sur les AuNPs et optimisation de l'immobilisation

A) Représentation schématique de l'adsorption des anticorps sur les AuNPs dont l'orientation dépend du pH lors de l'immobilisation. Figure adaptée de [100]. B) La taille des AuNPs, liée à la quantité d'anticorps adsorbés à leur surface, suit un modèle de Hill avec la concentration des anticorps lors de l'incubation. La quantité maximale d'anticorps sur les AuNPs dépend également du pH lors de l'incubation. Figure adaptée de [100].

La biofonctionnalisation par adsorption des anticorps présente néanmoins plusieurs limites. Tout d'abord, la quantité d'anticorps adsorbés sur les AuNPs doit respecter un équilibre afin de garantir la stabilité des nanoparticules. Immobiliser trop d'anticorps mènera à la formation de ponts entre les AuNPs tandis que n'en immobiliser pas assez ne permettra pas d'assurer la stabilité des AuNPs face aux sels présents en milieu physiologique. Dans les deux cas, les AuNPs s'agrégeront [56]. Ensuite, certains anticorps forment une monocouche directement en contact avec la surface d'or et forment une couronne appelée « couronne dure » tandis que d'autres sont immobilisés dans des couches supérieures et forment la « couronne douce » (Figure 2.5.A). En connaissant l'aire de la surface des AuNPs, il est possible d'estimer, en ordre de grandeur, le nombre d'anticorps qui composeront les couronnes dure et douce car leurs dimensions sont connues (Figure 2.5.B). Si la couronne dure est adsorbée de manière irréversible sur les AuNPs [103], ce n'est a priori pas le cas de la couronne douce. Cette couronne douce peut progressivement se désorber, diminuant ainsi la qualité de la biofonctionnalisation dans le temps et pouvant perturber la stabilité des AuNPs. Finalement, la biofonctionnalisation par adsorption ne garantit pas un bon contrôle sur l'orientation de tous les anticorps immobilisés sur les AuNPs, malgré les efforts d'optimisation existants en contrôlant le pH du milieu d'incubation [100]. Puisque l'empreinte surfacique des anticorps immobilisés sur les AuNPs dépend de leur orientation (Figure 2.5.C), il n'est alors pas envisageable de prévoir avec précision le nombre d'anticorps qui seront immobilisés sur une nanoparticule. De plus, les sites de liaison aux antigènes de certains anticorps adsorbés à la surface des nanoparticules ne seront pas disponibles après leur immobilisation (Figure 2.5.C), et la bioactivité globale des AuNPs s'en retrouvera diminuée. Pour repousser les limites de la biofonctionnalisation par adsorption, d'autres stratégies de greffage des anticorps sur les AuNPs ont été développées.

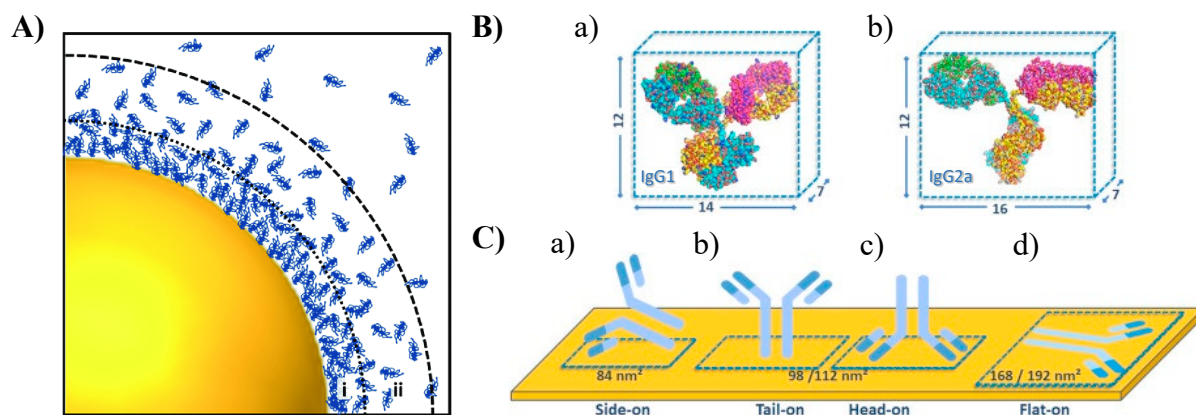


Figure 2.5. Limites à la biofonctionnalisation des AuNPs par adsorption des anticorps

A) Représentation schématique de la formation des couronnes i) dures et ii) douces de protéines (en bleu) sur une AuNP. Figure adaptée de [104]. B) Dimensions caractéristiques (en nm) des a) IgG1 et b) IgG2a. Figure adaptée de [92]. C) Représentation de toutes les orientations et empreintes surfaciques théoriques possibles des anticorps adsorbés sur les AuNPs, pouvant théoriquement se lier à a) 1, b) 2, c) 0 et d) un nombre imprévisible d'antigènes. Figure adaptée de [92]

2.2.3 Biofonctionnalisation des AuNPs par greffage covalent des anticorps

Lorsqu'elles sont synthétisées selon les stratégies classiques (voir section 2.1.1), les AuNPs ne présentent pas de fonctionnalités chimiques à leur surface pour y greffer des anticorps. C'est pourquoi le greffage covalent d'anticorps sur des AuNPs repose sur l'utilisation de polymères de liaison. En plus de stabiliser les AuNPs comme expliqué à la section 2.1.3, PEG peut être rendu bifonctionnel : un groupe thiol en bout de chaîne afin de se lier à l'or, et un autre groupe en tête de chaîne afin de réagir avec les anticorps (Figure 2.6).

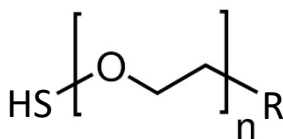


Figure 2.6. Structure du PEG utilisé pour le greffage covalent d'anticorps sur AuNPs

2.2.3.1 Greffage covalent par les amines libres de l'anticorps

La stratégie de greffage covalent d'anticorps sur AuNPs la plus répandue utilise les fonctionnalités amines libres de l'anticorps. Les IgG possèdent des amines primaires libres au N-terminus de chaque chaîne peptidique ainsi que le long de leur structure grâce aux chaînes latérales des résidus lysines situés à leur surface [94]. Ces amines primaires libres pourront ainsi réagir avec des acides carboxyliques en tête de PEG afin de créer des groupes amides, permettant ainsi un greffage des anticorps par liaison covalente. Cette réaction est connue pour être thermodynamiquement défavorisée en milieu aqueux en l'absence de composés intermédiaires et/ou catalytiques. On a donc recours à N-hydroxysuccinimide (NHS) et 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (Figure 2.7) pour assister la réaction [105]. Si la liaison amide ainsi formée est thermodynamiquement défavorisée et devrait s'hydrolyser, sa stabilité est néanmoins assurée par la cinétique très lente de cette hydrolyse [106].

Grâce à cette stratégie de greffage, des anticorps ont été immobilisés sur des AuNPs dans le cadre d'études sur le cancer du sein. Avvakumova *et al.* [107] ont conjugué l'anticorps Cetuximab sur des AuNPs (nanocages, côté 40.4 ± 2.8 nm) afin de cibler des cellules de cancer du sein triple négatif. De plus, Chattopadhyay *et al.* [108] ont immobilisé TzM sur des AuNPs (diamètre 35.6 ± 1.8 nm) et ont observé leur internalisation dans des cellules cancéreuses du sein HER2-positives. Finalement, Dziawer *et al.* [109] ont greffé TzM sur des AuNPs (diamètre 5 nm) portant le radioisotope astatine-211 (^{211}At), et ont observé un effet cytotoxique ciblé sur les cellules de cancer du sein grâce au rayonnement α émis par le radioisotope.

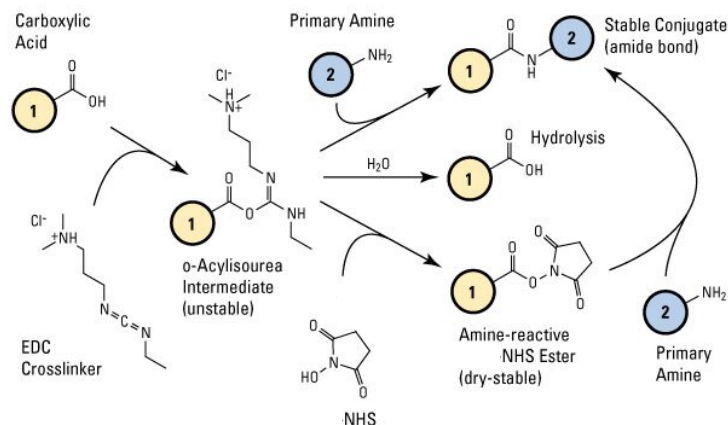


Figure 2.7. Greffage par les amines des anticorps avec NHS et EDC sur PEG-COOH

Ici, (1) représente HS-PEG-COOH sur les AuNPs, et (2) représente les anticorps à greffer chimiquement. Figure adaptée de [110].

Il n'est cependant pas possible de contrôler l'orientation de l'immobilisation des anticorps avec cette stratégie de greffage [111] puisque les amines réactives sont distribuées tout au long des anticorps. De manière similaire à la biofonctionnalisation par adsorption (voir section 2.2.2), une immobilisation non-orientée des anticorps peut diminuer leur bioactivité après greffage. De plus, la formation d'une liaison amide à partir d'une amine libre dans une région Fab peut altérer cette région et bloquer la reconnaissance des antigènes, inactivant alors totalement et définitivement cette région de l'anticorps. C'est pourquoi des stratégies ont été développées pour permettre un meilleur contrôle sur l'orientation des anticorps immobilisés et la localisation de leur liaison avec les nanoparticules.

2.2.3.2 Greffage covalent par les thiols de la région charnière

La première solution pour mieux contrôler l'orientation des anticorps immobilisés sur les AuNPs vise à les greffer par les fonctionnalités thiols portées par leurs cystéines dans la région charnière (Figure 2.3.A). De plus, aucune liaison covalente n'est alors formée dans les régions Fab de l'anticorps, assurant l'intégrité de la partie reconnaissant les antigènes. Puisque les thiols dans la région charnière sont naturellement présents sous forme oxydée en ponts disulfures, ils doivent

être réduits en thiols libres pour permettre le greffage. Cette réduction est réalisable chimiquement avec des réactifs classiques tels que dithiothréitol (DTT) ou 2-mercaptoéthanol, ou avec des réactifs plus « doux » tels que tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) et cystéamine [105] (Figure 2.8.A). L'utilisation de TCEP ou cystéamine est préférable pour cliver les anticorps en réduisant les thiols de la région charnière, car ces réactifs doux offrent un meilleur contrôle sur la réaction que les réactifs classiques [112].

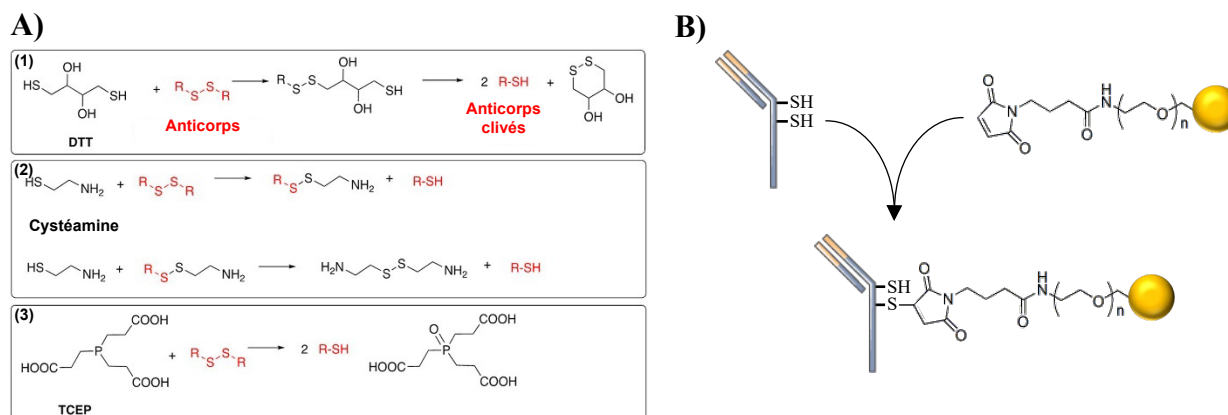


Figure 2.8. Clivage des anticorps et greffage sur AuNP par les thiols avec PEG-Maleimide

A) Réduction des anticorps par (1) DTT, (2) cystéamine et (3) TCEP. Figure adaptée de [92]. B) Greffage d'un anticorps clivé sur AuNP (jaune) PEGylée portant un groupe maleimide en tête de PEG. Les différents composants (IgG clivé, PEG et AuNP) ne sont pas à l'échelle.

Le clivage des anticorps a été utilisé par Sharma *et al.* [113] pour améliorer la sensibilité d'une microbalance à quartz (un biocapteur), montrant par la même occasion que les anticorps clivés conservent leur affinité et sélectivité pour leurs antigènes. D'autre part, Sun *et al.* [114] ont clivé des anticorps pour conjuguer un médicament aux thiols libres de la région charnière et développer un nouveau modèle de thérapie ciblée contre le cancer. En ce qui concerne l'immobilisation sur des nanoparticules, les anticorps clivés pourront y être greffés après une PEGylation bifonctionnelle préalable. PEG portera alors des groupes chimiques tels que maleimide [105] en tête de chaîne, permettant de former des liaisons covalentes avec les thiols des anticorps (Figure 2.8.B). Hu *et al.* [115] ont ainsi conjugué des anticorps clivés à des nanoparticules lipidiques contenant le médicament anticancéreux *Paclitaxel* afin de développer une nouvelle

plateforme de livraison ciblée de médicaments. Malgré ces applications prometteuses, aucune étude conjuguant des anticorps clivés à des AuNPs PEGylées (Figure 2.8.B) n'est parue à ce jour. Le défi principal de cette stratégie de greffage reste cependant d'éviter la réduction des autres ponts disulfures interchaînes dans les anticorps (entre les chaînes lourdes et légères). En effet, il a été montré que l'utilisation d'agents réducteurs sur les anticorps laisse place à une population hétérogène de fragments, dont certains ont été complètement réduits et ont perdu leur bioactivité [116].

2.2.3.3 Greffage covalent par les glycanes après leur oxydation chimique

La seconde stratégie de greffage covalent orienté des anticorps met en jeu leurs glycanes. En effet lors de leur production, les IgG subissent une modification post-traductionnelle appelée « glycosylation » qui leur conjugue des oligosaccharides, aussi appelés « glycanes », faisant des anticorps des glycoprotéines [117]. Ces glycanes sont systématiquement situés dans la région Fc, plus précisément sur le résidu Asparagine 297 de chaque chaîne lourde pour les IgG1 [118]. Ils sont donc une cible idéale pour greffer des anticorps sur des AuNPs de manière covalente avec une orientation garantissant leur bioactivité. Pour cela, les fonctionnalités diols des saccharides galactoses et acides sialiques sont oxydées en aldéhydes réactives par action de l'ion périodate (IO_4^-) [94] (Figure 2.9.A) selon une réaction de Malaprade [119]. Les aldéhydes ainsi formés peuvent servir au greffage des anticorps en réagissant avec des fonctionnalités amines [120] ou hydrazides [105] placées en tête de PEG sur des AuNPs. Afin de limiter les réactions croisées entre anticorps, le greffage se fera préférentiellement grâce à des fonctionnalités hydrazides en tête de PEG, qui formeront des liaisons hydrazones après réaction avec les aldéhydes des glycanes (Figure 2.9.B).

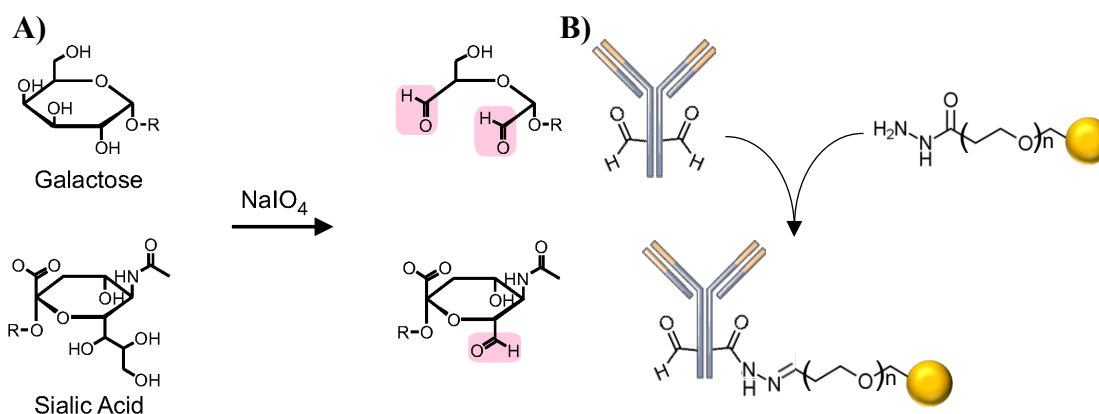


Figure 2.9. Oxydation des glycanes en aldéhydes et greffage sur AuNP avec PEG-Hydrazide

A) Oxydation des diols du galactose et de l'acide sialique pour former des aldéhydes réactives sur les glycanes des anticorps. Figure adaptée de [94]. B) Greffage d'un anticorps par ses glycanes oxydés sur AuNP portant un PEG-hydrazide. Les différents composants ne sont pas à l'échelle.

Récemment, Park *et al.* [121] ont conjugué des anticorps par leurs glycanes à des particules pseudovirales, bien que l'activation des glycanes fut réalisée par une méthode enzymatique et non chimique comme présenté précédemment. Dans ce travail, seule l'oxydation chimique des glycanes est considérée pour éviter d'introduire d'autres protéines (enzymes ici) dans le milieu réactionnel, qui pourraient ensuite s'adsorber sur les nanoparticules d'or et avoir des effets indésirables lors du ciblage de cellules de cancer du sein. Fisusi *et al.* [122] ont oxydé chimiquement les glycanes d'un autre anticorps ciblant HER2 (*Pertuzumab*) et y ont greffé des chaînes de PEG en formant des liaisons hydrazones comme précédemment décrit. Ils ont montré que ces anticorps chimiquement modifiés étaient toujours capables de cibler des cellules cancéreuses surexprimant HER2. Kubota *et al.* [123] ont greffé TZM sur des AuNPs (diamètre 50 nm) selon le protocole développé par Kumar *et al.* [124] reposant sur l'oxydation des glycanes afin de cibler des cellules de cancer de l'estomac. Ils ont observé un effet cytotoxique des nanoparticules sur les cellules cancéreuses après leur internalisation. A titre informatif, l'oxydation chimique des glycanes des anticorps est utilisée dans d'autres domaines, par exemple pour la conjugaison localisée de médicaments comme rapporté par Zhou *et al.* [125].

Il ne faut cependant pas perdre de vue que les profils de glycosylation des anticorps peuvent varier. Ces variations dépendent de plusieurs paramètres, notamment le mode de production (*in vivo* ou *in vitro*), le type de cellules les ayant produits, la composition en monosaccharides du milieu de culture lors de leur production, etc. [126]. Ainsi, le nombre de galactoses et acides sialiques portés par ses anticorps peut aisément changer d'un lot à l'autre. Les anticorps peuvent même être non-glycosylés selon leurs modalités de productions (production en cellules bactériennes par exemple). De plus, la dégradation chimique des anticorps par IO_4^- , menant à leur inactivation, a déjà été observée [127]. Le greffage covalent des anticorps par leurs glycanes est donc une stratégie permettant de contrôler leur orientation à la surface des AuNPs, mais est sujette à une grande variabilité en termes d'efficacité de greffage et d'activité des anticorps.

2.2.4 Biofonctionnalisation des AuNPs par greffage non-covalent des anticorps

Comme discuté à la section précédente, le greffage covalent des anticorps aux AuNPs permet une immobilisation permanente, mais les stratégies pour y parvenir sont imparfaites. Le couplage par les amines de l'anticorps est bien connu, mais n'offre aucun contrôle sur l'orientation de leur immobilisation, pouvant mener à une diminution de la bioactivité des nanoparticules. Le clivage des anticorps par réduction des ponts disulfures dans leur région charnière permet en théorie une immobilisation orientée, mais les protocoles de réduction doivent encore être optimisés pour ne pas réduire d'autres ponts disulfures menant à l'inactivation de la protéine. L'oxydation de leurs glycanes permet également une immobilisation orientée des anticorps sur les AuNPs, mais est sujette à de grandes variabilités voire à la dégradation des protéines. Ces différentes limites ont été contournées en développant des stratégies de greffage non-covalent des anticorps sur les nanoparticules. Ces stratégies tirent parti de la capacité des anticorps à former des interactions d'origine biochimique avec des groupes complémentaires (Figure 2.3.C), pourvu que ces interactions soient suffisamment fortes pour assurer une immobilisation quasi permanente sur les nanoparticules.

2.2.4.1 Greffage non-covalent par l'intermédiaire du système biotine - avidine

La biotine (Figure 2.10.A), appelée vitamine H dans l'industrie agroalimentaire, est une petite molécule essentielle à certaines réactions enzymatiques et voies de signalisation chez l'humain [128]. La biotine est capable d'interagir de manière non-covalente avec l'avidine, une protéine tétramérique présente naturellement dans le blanc d'œuf [129]. La biotine interagit de la même manière avec toutes les protéines de la famille de l'avidine, comme la streptavidine qui est produite naturellement par la bactérie *Streptomyces avidinii* [130]. Les protéines de cette famille sont d'ailleurs appelées les « protéines de liaison à la biotine » (PLB) et sont toutes tétramériques [131]. Chaque monomère des PLB peut se lier à une biotine de manière non-covalente avec une constante de dissociation $K_D = 1 - 100$ fM, formant ainsi les plus fortes interactions protéine – ligand parmi celles connues à ce jour [132]. La liaison PLB – biotine s'établit donc de manière quasi permanente, ce qui en fait un système de choix pour l'immobilisation des anticorps sur les AuNPs [133]. Avidine fait aujourd'hui partie des protéines les plus utilisées au sein de la famille des PLB pour la conjugaison aux anticorps. Pour immobiliser les anticorps sur les AuNPs à l'aide du système avidine – biotine, il est possible de préalablement i) conjuguer biotine aux anticorps et immobiliser avidine sur les AuNPs, ou ii) conjuguer avidine aux anticorps et immobiliser sur les AuNPs un polymère de liaison portant une biotine en tête de chaîne (Figure 2.10.B).

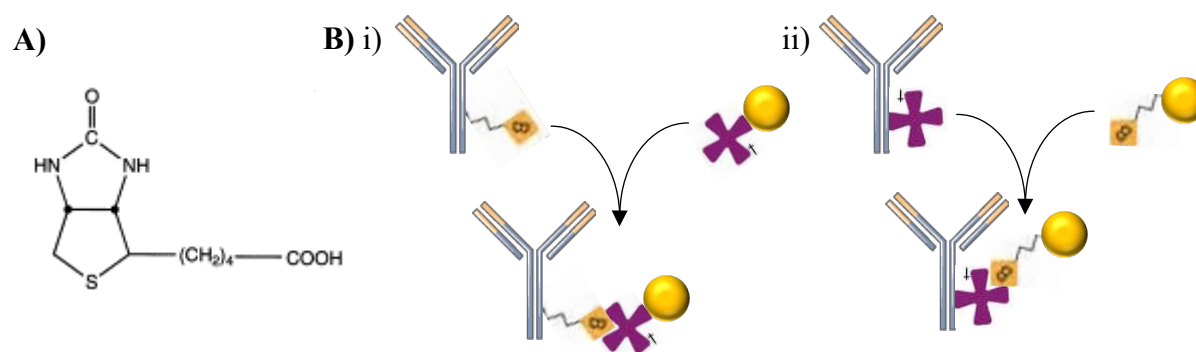


Figure 2.10. Greffage des anticorps sur AuNPs par le système avidine – biotine

A) Structure de la biotine. Figure tirée de [128]. B) Immobilisation d'anticorps sur AuNP après avoir préalablement i) conjugué biotine (losange jaune) à l'anticorps et immobilisé avidine (croix violette) sur l'AuNPs, ou ii) conjugué avidine à l'anticorps et immobilisé sur l'AuNP un polymère de liaison portant une biotine en tête de chaîne. Figure adaptée de [134]. Les différents composants de la figure ne sont pas à l'échelle.

Kang *et al.* [135] ont comparé l'immobilisation d'anticorps sur des MNPs ferromagnétiques (diamètre 2.8 μM) par les stratégies de greffage non-covalent avec avidine – biotine et greffage covalent par les glycanes de l'anticorps (voir section 2.2.3.3). En ce qui concerne la stratégie avidine – biotine, les MNPs portaient les avidines (immobilisées par greffage covalent amine comme décrit à la section 2.2.3.1) tandis que les anticorps étaient clivés afin de conjuguer les biotines sur les thiols de leur région charnière (de manière analogue à la stratégie de la section 2.2.3.2). Les auteurs ont conclu que les deux stratégies menaient à des nanoparticules dont la bioactivité était comparable : dans les deux cas, les anticorps immobilisés sur les nanoparticules pouvaient en moyenne se lier chacun à 1.4 – 1.7 antigènes. Fellows *et al.* [136] ont également utilisé le système avidine – biotine pour la biofonctionnalisation de AuNPs (diamètre 10.6 ± 1.8 nm) afin de cibler le récepteur cellulaire CD4. Ici, streptavidine fut immobilisée sur les AuNPs par adsorption sur l'or, et la biofonctionnalisation fut assurée par l'immobilisation d'aptamères (séquences d'ADN) biotinylés plutôt que par des anticorps. Wartlick *et al.* [137] ont ciblé des cellules cancéreuses HER2-positives avec des nanoparticules biodégradables biofonctionnalisées avec TZM, et ont observé l'internalisation de ces nanoparticules par les cellules. La biofonctionnalisation a été réalisée en greffant des biotines de manière covalente sur TZM et en immobilisant des PLB sur les nanoparticules de manière covalente également. A notre connaissance, aucune utilisation du système avidine – biotine pour le greffage non-covalent d'anticorps sur des AuNPs n'est rapportée dans la littérature scientifique.

Le système avidine – biotine comporte cependant deux inconvénients majeurs. Le premier inconvénient vient de la capacité qu'ont les avidines à lier 4 biotines. Ceci peut entraîner la formation de ponts entre les AuNPs lors de la biofonctionnalisation, menant à leur agrégation. Des avidines monomériques ont été produites afin d'éviter ce problème en ne liant qu'une biotine à la fois, mais l'affinité de la liaison avidine – biotine est alors réduite ($K_D = 40 - 120$ nM) [138]. Le second inconvénient vient du besoin de préalablement conjuguer avidine ou biotine aux anticorps pour assurer la biofonctionnalisation. Cette conjugaison aux anticorps s'effectue également par greffage covalent, la plupart des kits commerciaux de biotinylation des anticorps reposant d'ailleurs sur ces stratégies [139-141]. Ainsi, il est possible que cette conjugaison entraîne la dégradation et l'inactivation des anticorps (voir section 2.2.3).

2.2.4.2 Greffage non-covalent par l'intermédiaire de protéines A et G

Les protéines A et G sont des protéines membranaires produites naturellement par les bactéries *Staphylococcus aureus* [142] et *Streptococcus C & G* [143] respectivement. Ces deux protéines ont une bonne affinité pour la région Fc des IgG1 (entre autres anticorps) leurs constantes de dissociation valant respectivement $K_D \approx 10$ nM et $K_D \approx 30$ nM pour les interactions IgG1 – protéine A et IgG1 – protéine G [144]. Ceci leur a valu d'être produites artificiellement et utilisées pour la purification d'anticorps recombinants [145]. Des modifications génétiques leur ont été artificiellement apportées afin de créer des protéines chimères A/G encore plus polyvalentes [146]. Ainsi, ces protéines peuvent servir d'intermédiaires pour greffer des anticorps sur des AuNPs (Figure 2.11).



Figure 2.11. Greffage des anticorps sur AuNP par l'intermédiaire de protéine A/G

Figure adaptée de [147]. Les différents composants de la figure ne sont pas à l'échelle.

Cette stratégie de greffage a été employée par Elshafey *et al.* [148] pour fabriquer un biocapteur électrochimique détectant le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (EGFR), un biomarqueur de la même famille que HER2. Pour cela, des protéines G ont été greffées de manière covalente sur des AuNPs, puis des anticorps anti-EGFR immobilisés en se liant aux protéines G. Récemment, Khaniani *et al.* [149] ont développé un biocapteur électrochimique pour la détection d'anticorps anti-SARS-CoV-2, reposant sur le greffage covalent des protéine G par leurs amines libres sur des AuNPs (diamètre 11 ± 1 nm). En plus des biocapteurs, des protéines A et G ont été adsorbées sur des AuNPs (diamètre 32.8 ± 3.3 nm) par Liu *et al.* [150] à des fins d'extraction des IgG depuis un milieu de culture cellulaire. Finalement, Sun *et al.* [151] ont greffé des protéines G de manière covalente par leurs amines libres sur des AuNPs (diamètre 46.8 ± 4.0 nm) avant d'y immobiliser des anticorps anti-HER2 pour de la livraison de médicaments sur des cellules de cancer du sein.

Néanmoins, les IgG se dissocient des protéines A et G à bas pH ($\text{pH} \leq 3$) [145]. Or, le microenvironnement tumoral est souvent acide [152, 153]. La stratégie de biofonctionnalisation des AuNPs par l'intermédiaire des protéines A et G n'est donc pas adaptée pour toutes les applications liées au cancer. Un relargage des anticorps à proximité des tumeurs est en effet possible. Malgré cette limite, la biofonctionnalisation des AuNPs par l'intermédiaire de protéines A et G présente un avantage majeur par rapport aux stratégies de greffage covalent : il est certain que les régions Fab des anticorps resteront intactes, car le greffage s'effectuera par les régions Fc et aucun réactif chimique risquant d'endommager les protéines ne sera utilisé.

2.2.4.3 Greffage non-covalent par l'intermédiaire du site de liaison aux nucléotides

Tous les isotypes d'anticorps (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD) possèdent un site de liaison aux nucléotides (NBS) [154] situé entre les chaînes lourdes et légères de chaque région Fab (Figure 2.3.C). Il a été montré que le NBS peut interagir avec des dérivés de l'indole avec une exposition à des rayons UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) [155]. Le NBS peut donc être exploité afin de conjuguer des anticorps aux AuNPs par l'intermédiaire de polymères de liaison portant un dérivé d'indole en tête de chaîne (Figure 2.11). Il est intéressant de noter que les anticorps immobilisés par leur NBS montrent une plus grande sensibilité pour leurs antigènes que les anticorps immobilisés par adsorption ou par greffage covalent grâce à leurs amines [156].

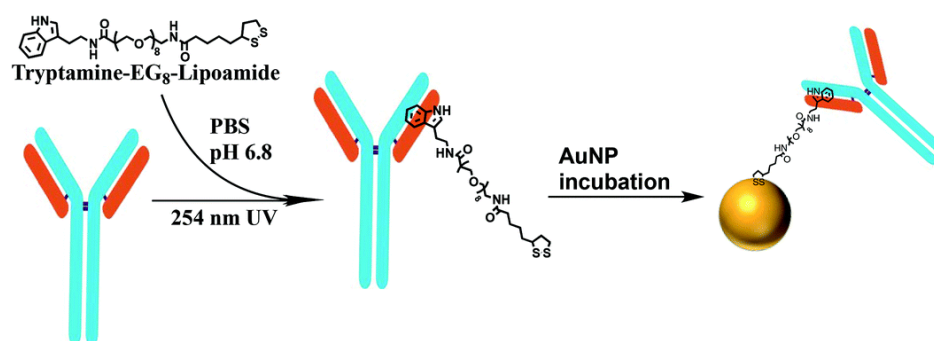


Figure 2.12. Greffage d'anticorps sur AuNPs par le site de liaison aux nucléotides

Figure tirée de [157]. Les différents composants de la figure ne sont pas représentés à l'échelle.

Mustafaoglu *et al.* [157] ont immobilisé des anticorps contre un antigène du cancer de la prostate par leurs NBS sur des AuNPs (diamètre 5 nm). Les auteurs sont parvenus à une limite de détection de l'antigène soluble beaucoup plus faible que lorsque les anticorps étaient immobilisés par adsorption ou greffage covalent. En effet, cette limite de détection valait 0.055 nM pour le greffage par NBS, contre 2.2 et 46.8 nM pour le couplage covalent par les amines et thiols des anticorps respectivement, et 323.0 nM lorsque les anticorps étaient immobilisés par adsorption. Malgré ces résultats encourageants, la stratégie de greffage non-covalent par le NBS des anticorps possède actuellement une limite majeure : l'affinité entre le NBS et le dérivé d'indole le plus employé (l'acide indole-3-butyrique) est moyenne, sa constante de dissociation valant $K_D = 1-10 \mu\text{M}$ [158]. Le greffage non-covalent entre anticorps et AuNPs devant être quasi-permanent pour éviter une dissociation lors des applications biomédicales, il serait préférable de trouver de nouveaux dérivés d'indoles possédant une meilleure affinité pour le NBS avant d'utiliser cette stratégie pour biofonctionnaliser les AuNPs.

2.2.5 Biofonctionnalisation des AuNPs par des anticorps modifiés

Toutes les stratégies de greffage covalent (section 2.2.3) et non-covalent (section 2.2.4) des anticorps sur AuNPs présentées jusqu'à présent sont imparfaites. Elles ne permettent pas de greffer les anticorps sur les AuNPs à la fois i) de manière permanente (ou très stable), ii) en contrôlant leur orientation, et iii) en assurant l'intégrité et la biodisponibilité de leurs régions reconnaissant les antigènes. Puisque les anticorps de type naturels semblent incompatibles à un greffage selon ces trois modalités simultanément, leur structure peut être modifiée au moment de leur production pour ajouter des motifs peptidiques permettant un greffage orienté sur les AuNPs.

2.2.5.1 Greffage d'anticorps modifiés pour la chimie click

La « chimie click » est une famille de réactions chimiques bioorthogonales¹ [159] irréversibles présentant d'excellents rendements et des cinétiques rapides dans des conditions de température et pression ambiantes [160]. La majorité des réactions de la chimie click sont biocompatibles, car réalisables dans des solvants aqueux (Figure 2.13). Ainsi, la chimie click est aujourd'hui utilisée dans de nombreux domaines proches du vivant tels que la chimie médicinale [161], la découverte de médicaments [162], la science des matériaux [163], l'ingénierie cellulaire et la livraison de médicaments [164], ainsi que de nombreuses autres applications biomédicales *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* [165]. Barry Sharpless (Scripps Research, La Jolla, CA, États-Unis d'Amérique) et Morten Meldal (Université de Copenhague, Danemark) ont d'ailleurs reçu le Prix Nobel 2022 de chimie pour leurs travaux qui ont posé les bases de la chimie click, qu'ils partagent avec Carolyn Bertozzi (Université de Stanford, CA, États-Unis d'Amérique) pour ses travaux sur les réactions bioorthogonales permises par la chimie click [166].

Étant donné les avantages qu'elle présente, il est envisageable d'employer la chimie click pour greffer des anticorps sur des AuNPs (Figure 2.14.A) par l'intermédiaire de polymères de liaison. L'ajout de fonctionnalités permettant la chimie click en tête de PEG est bien connue, et son utilisation a déjà été étudiée [167-169]. Sur les anticorps, l'ajout des fonctionnalités complémentaires à celles sur PEG pour la chimie click est possible par les voies covalentes mentionnées précédemment (voir section 2.2.3) [170-172]. Il faudra alors vérifier que les anticorps n'ont pas été endommagés, voire inactivés lors de cette conjugaison covalente (voir section 2.2.3). Ce risque peut être contourné en intégrant les fonctionnalités nécessaires à la chimie click dans l'anticorps dès sa production. Une méthode serait de remplacer certains acides aminés dans l'anticorps par des analogues non-naturels, comme l'homoazidoalanine à la place de l'alanine (Figure 2.14.B). Cette méthode a été utilisée avec succès par Agnew *et al.* [173] pour produire des peptides capables de greffage sur des nanoparticules polymériques par chimie click. Des méthodes permettant la production d'anticorps réagissant à la chimie click doivent à présent être développées.

¹ Une réaction bioorthogonale est une réaction chimique pouvant se produire en milieu biologique sans interférer avec les réactions biochimiques propres à ce milieu.

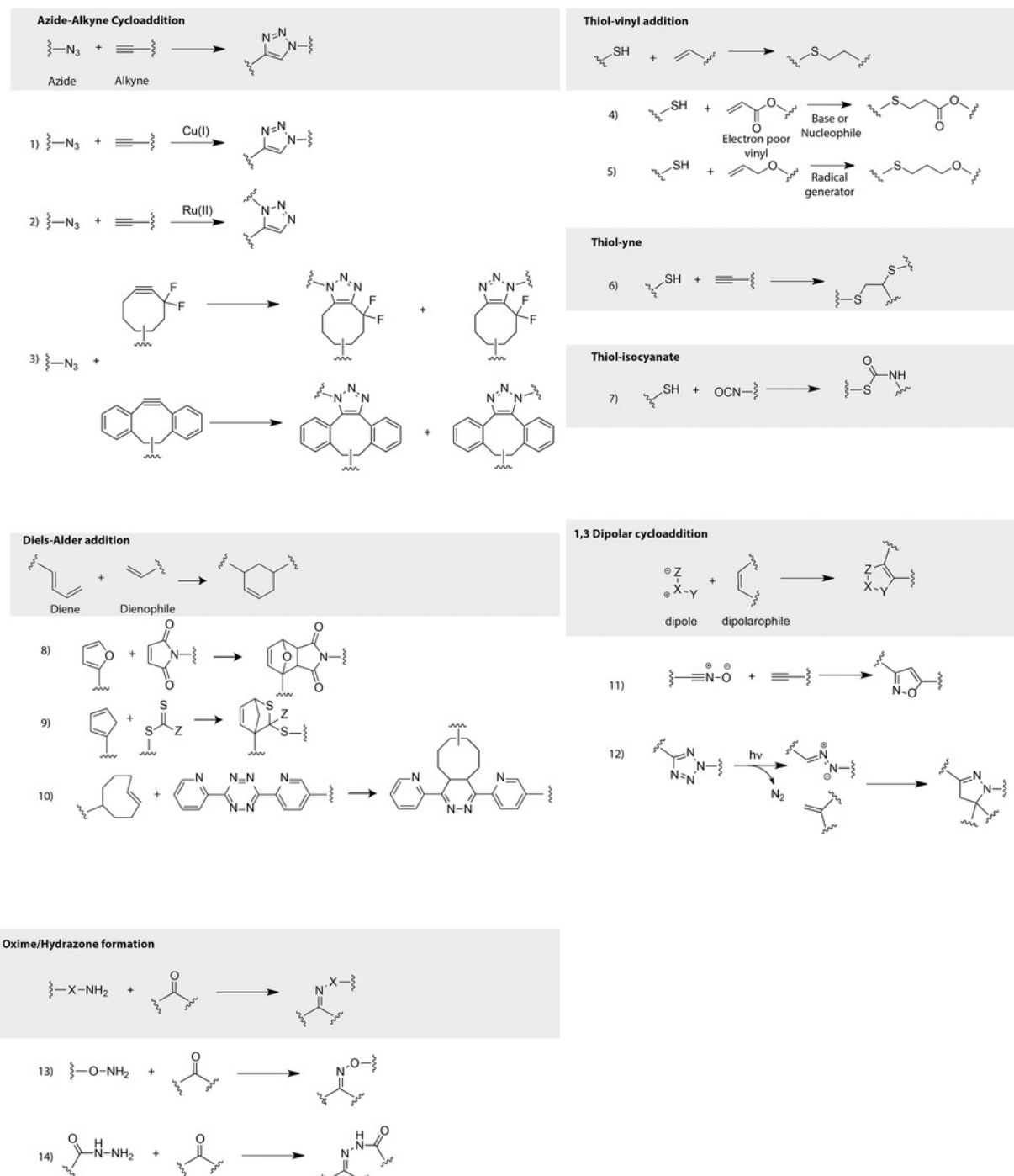


Figure 2.13. Glossaire des réactions de chimie click

Figure tirée de [163]

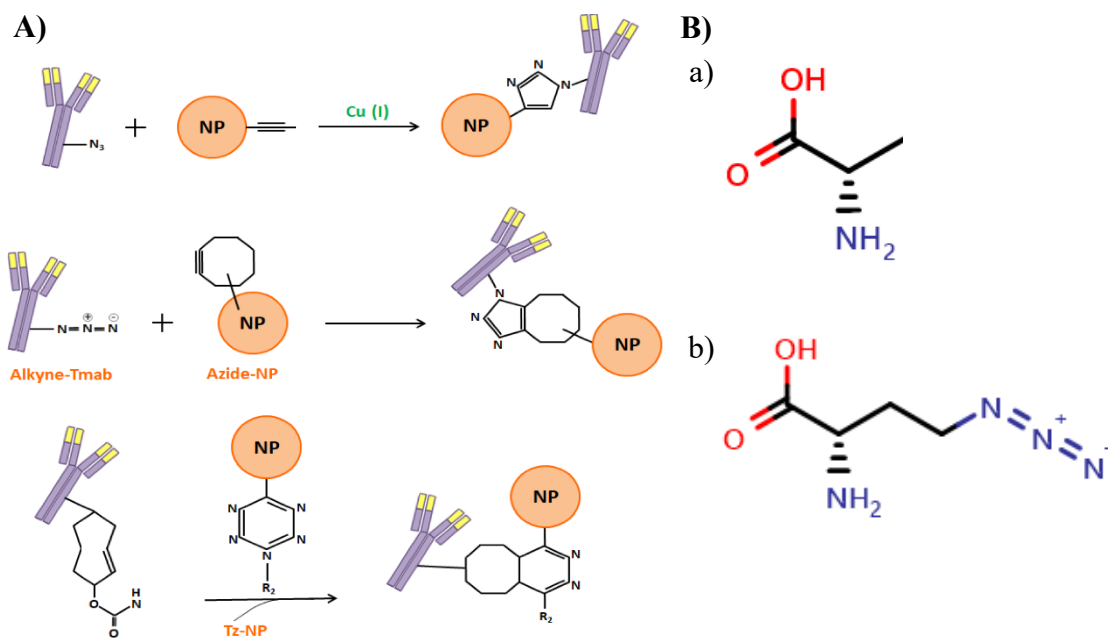


Figure 2.14. Stratégies pour le greffage par chimie click d'anticorps modifiés

A) Exemples de stratégies de greffage d'anticorps sur nanoparticules par chimie click. Figure tirée de [174]. B) Structures de a) l'alanine naturelle et de b) l'homoazidoalanine.

2.2.5.2 Greffage d'anticorps modifiés par le système de peptides E/K superhélices

Les superhélices, « *coiled coils* » en anglais, sont des motifs peptidiques caractérisés par l'enroulement hélicoïdal d'au moins deux hélices α dans des peptides ou protéines (Figure 2.15.A) grâce à des interactions non-covalentes comme les liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, et électrostatiques [175]. L'association entre plusieurs hélices α pour former une superhélice est très spécifique, et il est possible de modifier l'affinité de cette association en faisant varier la longueur des hélices α ainsi que les acides aminés les constituant. Ces caractéristiques ont valu aux peptides superhélices d'être utilisés dans des domaines tels que la formation de polymères hybrides [176], la fabrication d'hydrogels [177], la livraison contrôlée de médicaments [178], ainsi que la fonctionnalisation de surfaces [179] et de nanoparticules [180]. Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement aux superhélices formées par hétérodimérisation parallèle des peptides Ecoil et Kcoil [181]. Les peptides Ecoil et Kcoil sont chacun composés de 35 acides aminés placés dans un ordre très particulier : le peptide Ecoil est composé de l'heptade des acide aminés

E-V-S-A-L-E-K se répétant 5 fois tandis que le peptide Kcoil est composé de l'heptade des acides aminés K-V-S-A-L-K-E. Lorsqu'ils interagissent ensemble, Ecoil et Kcoil s'organisent en superhélice dont le cœur est formé des résidus valine (V) et leucine (L). La stabilité de la structure superhélice est renforcée par les interactions électrostatiques entre les résidus lysine (K) et glutamate (E). La structure des peptides Ecoil et Kcoil ainsi que de leur organisation en hétérodimère est fournie à la Figure 2.15.B.

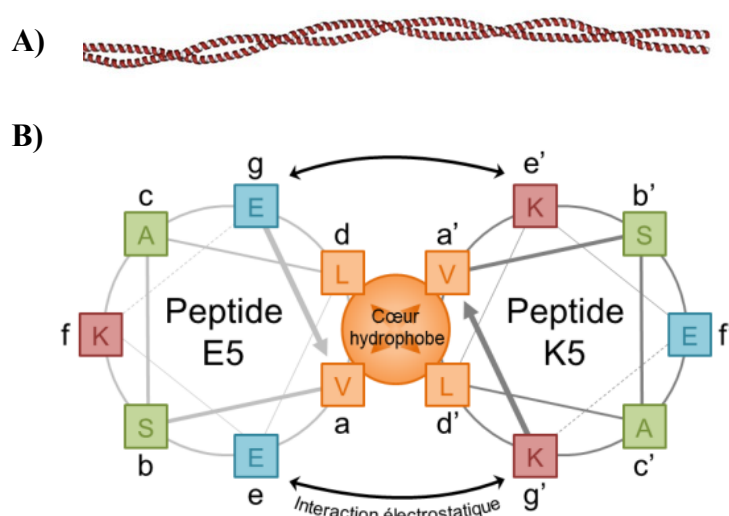


Figure 2.15. Représentations de motifs superhélices

A) Représentation générale d'un motif superhélice dimérique. Figure adaptée de [175]. B) Structure des superhélices formées par hétérodimérisation parallèle des peptides Ecoil (à gauche) et Kcoil (à droite) ainsi que les interactions électrostatiques et hydrophobes assurant cette association. Figure adaptée de [182].

La formation d'hétérodimères E/K en superhélice à partir des peptides Ecoil et Kcoil a permis de nombreuses applications en fonctionnalisation des surfaces et matériaux. En effet, les Ecoil et Kcoil sont des peptides : la séquence de nucléotides codant pour leur production peut être intégrée dans celle d'autres protéines. Ces protéines seront donc produites avec une étiquette Ecoil ou Kcoil, et pourront facilement se greffer à des surfaces où le peptide complémentaire aura déjà été immobilisé de manière covalente. En plus de permettre un greffage très stable dans des conditions

assurant l'intégrité des protéines, ce système permet de contrôler l'orientation des protéines immobilisées. Jacquemart *et al.* [183] ont utilisé ce système d'hétérodimère E/K dans des biocapteurs SPR pour caractériser la production de protéines produites à même un bioréacteur. Pour cela, la surface de détection du biocapteur SPR était fonctionnalisée avec Kcoil et permettait de détecter les protéines produites dans le bioréacteur avec une étiquette Ecoil. Liberelle *et al.* [184] ont développé une nouvelle approche pour les analyses ELISA à partir des hétérodimères E/K. Pour cela, des Kcoil ont été attachés de manière covalente aux puits d'une plaque 96 puits par un thiol ajouté à leur extrémité, permettant ensuite l'immobilisation de protéines produites avec une étiquette Ecoil, qui seront ensuite quantifiées. Oliverio *et al.* [185] sont parvenus à greffer des Kcoil au sein d'hydrogels macroporeux à l'aide de la chimie click afin d'y immobiliser ensuite des protéines produites avec une étiquette Ecoil, puis de contrôler la délivrance de ces protéines depuis l'hydrogel.

En ce qui concerne la biofonctionnalisation de nanoparticules, Roth *et al.* [186] ont greffé des protéines EGF portant des étiquettes Ecoil de manière orientée sur des AuNPs (diamètre 18 ± 2 nm) par chimie thiol-or entre la surface d'or et une cystéine placée à l'extrémité du Ecoil. Ainsi, les nanoparticules biofonctionnalisées ont pu être immobilisées au sein d'un hydrogel contenant des Kcoil préalablement greffés de manière orientée par chimie click, et leur relâche depuis l'hydrogel dans le temps a été étudiée. Récemment, Baniahmad *et al.* (manuscrit soumis) ont produit plusieurs variants de TZM présentant des étiquettes Ecoil aux C-termini de leurs chaînes peptidiques. Cela laisse entrevoir la possibilité d'immobiliser TZM de manière orientée sur des AuNPs présentant des Kcoil afin de cibler les cellules de cancer du sein HER2-positives. De manière générale, le système d'hétérodimères E/K peut donc permettre de biofonctionnaliser des nanoparticules avec des anticorps i) de manière très stable, ii) en contrôlant leur orientation, et iii) en assurant l'intégrité et la biodisponibilité de leurs régions reconnaissant les antigènes, pourvu que ces anticorps soient produits avec une étiquette Ecoil.

2.3 Caractérisation des nanoparticules biofonctionnalisées

Avant d'être utilisées à des fins biomédicales telles que la détection de cellules de cancer du sein, la qualité des AuNPs biofonctionnalisées avec des anticorps doit être contrôlée [187]. Pour cela, il est nécessaire de caractériser les propriétés physiques et chimiques des nanoparticules ainsi que leur bioactivité une fois biofonctionnalisées. La caractérisation de leurs propriétés physiques repose sur l'évaluation de leur taille, leur stabilité nanoscopique et leurs propriétés de résonance optique (LSPR, traduisant leur stabilité colloïdale). En ce qui concerne leurs propriétés chimiques, il s'agit d'analyser la composition de la couronne formée à la surface des AuNPs, notamment la quantité d'anticorps immobilisés afin d'attester de la biofonctionnalisation des nanoparticules. Finalement, l'étude de leur bioactivité consiste à vérifier la capacité des nanoparticules biofonctionnalisées à cibler activement et spécifiquement des biomarqueurs, afin de s'assurer que les anticorps n'ont pas été inactivés lors de leur immobilisation sur les AuNPs. Le contrôle de ces propriétés permettra de garantir que les AuNPs biofonctionnalisées seront détectables lors de leur utilisation, et que leur détection attestera de la présence des biomarqueurs ciblés avec un risque limité de faux négatifs ou positifs.

2.3.1 Caractérisation des propriétés physiques des AuNPs

La caractérisation des propriétés physiques des AuNPs consiste en la mesure de leur taille, stabilité nanoscopique et propriétés de résonance optique (LSPR). Les techniques les plus répandues pour effectuer de telles mesures [188] sont détaillées ci-après, et les paramètres à considérer pour chacune d'entre elles sont consignés dans le Tableau 2.3 à la fin de cette section.

Les techniques de microscopie électronique permettent de capturer des images d'objets nanoscopiques. Elles utilisent pour cela des faisceaux d'électrons, car ceux-ci possèdent des longueurs d'onde (de l'ordre des rayons X) nettement plus faibles que les photons [189]. Ainsi, il est possible d'atteindre des résolutions allant jusqu'à 50 pm [190], alors que les microscopes optiques classiques sont limités par le phénomène de diffraction de Rayleigh. On distingue deux techniques principales de microscopie électronique : la microscopie à balayage électronique (SEM), et la microscopie en transmission électronique (TEM). En SEM, un faisceau d'électrons incident est projeté sur un échantillon, et une image est reconstituée après analyse du signal

provenant d'un faisceau d'électrons secondaire issu de l'échantillon (Figure 2.16.A). En TEM, le signal permettant de reconstituer une image provient d'un faisceau d'électrons incident ayant traversé l'échantillon étudié (Figure 2.16.B). Puisque ces techniques permettent d'obtenir des images d'objets nanoscopiques, une analyse d'images contenant des AuNPs permet de déterminer la géométrie et les dimensions des nanoparticules contenues dans un échantillon (Tableau 2.3).

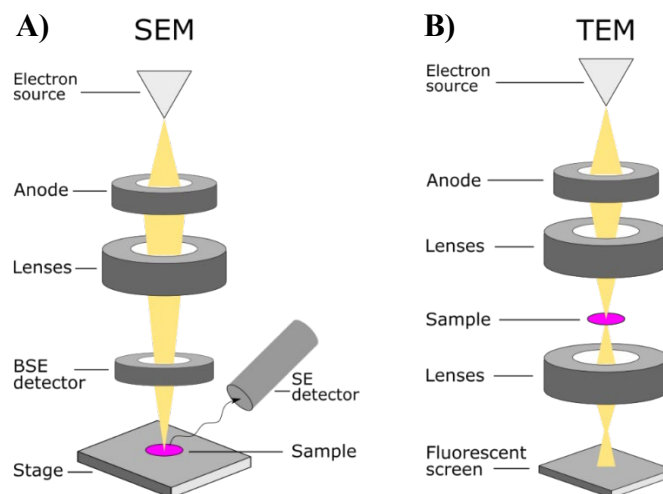


Figure 2.16. Fonctionnement des techniques de microscopie électronique

A) Illustration du fonctionnement de la SEM. B) Illustration du fonctionnement de la TEM.

Figures tirées de [191]

D'autre part, les techniques de spectroscopie par diffusion de la lumière permettent d'analyser les caractéristiques physiques d'objets nanoscopiques, la plus répandue pour l'analyse des AuNPs étant la spectroscopie par diffusion dynamique de la lumière (DLS) [192]. En DLS, un faisceau laser est envoyé sur un échantillon contenant des AuNPs. La lumière diffusée par cet échantillon est analysée dans le temps afin de mesurer le mouvement brownien des nanoparticules (Figure 2.17.A), fournissant ainsi une distribution de diamètre hydrodynamique (Figure 2.17.B) grâce à l'équation de Stokes-Einstein [193]. Cette mesure fournit également l'indice de polydispersité des nanoparticules, un indice qui permet de déterminer la stabilité nanoscopique des AuNPs au sein d'un échantillon [194]. On peut aussi évaluer la mobilité électrophorétique d'un échantillon en y appliquant une différence de potentiel pendant la procédure de DLS, permettant

ainsi de mesurer le potentiel ζ des nanoparticules. Ce paramètre traduit le potentiel électrique aux alentours des nanoparticules et permet aussi d'évaluer leur stabilité nanoscopique. Une autre technique permettant de mesurer la taille de nanoparticules dans un échantillon, similaire à la DLS, mais moins utilisée, est la spectroscopie par diffusion de Rayleigh de la lumière (RLS) [195]. Finalement, l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA) est une autre technique de spectroscopie par diffusion de la lumière permettant de mesurer la taille des nanoparticules à partir de leur mouvement brownien [196]. Contrairement à la DLS, la NTA repose sur le suivi de nanoparticules sur des images en 2 dimensions, ce qui peut permettre d'effectuer des mesures sur des nanoparticules individuelles plutôt qu'en considérant l'échantillon entier.

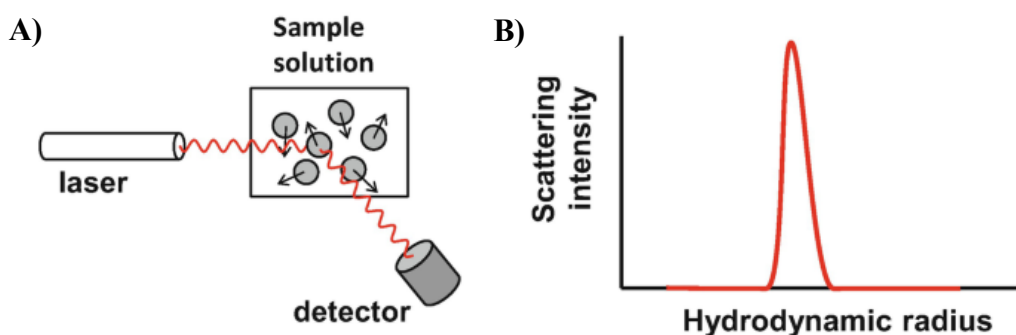


Figure 2.17. Fonctionnement des mesures DLS

A) Illustration du fonctionnement de la DLS. B) Exemple de distribution de rayon hydrodynamique d'un échantillon monodisperse obtenue par DLS. Figures adaptées de [197]

Finalement, la spectroscopie UV-Vis permet de mesurer les propriétés optiques d'un échantillon de AuNPs. Cette technique a été abordée dans la section 2.1.2. Pour rappel, elle mesure quantitativement l'extinction d'un faisceau lumineux à une longueur d'onde donnée après avoir traversé l'échantillon (Figure 2.18.A). En faisant varier la longueur d'onde du faisceau incident, on peut tracer le spectre d'extinction des nanoparticules, et mesurer la(es) longueur(s) d'onde(s) de résonance des nanoparticules (λ_{LSPR} , liée(s) à leur géométrie et taille) ainsi que la largeur du(es) pic(s) de résonance (liée à leur dispersion) (Figure 2.18.B).

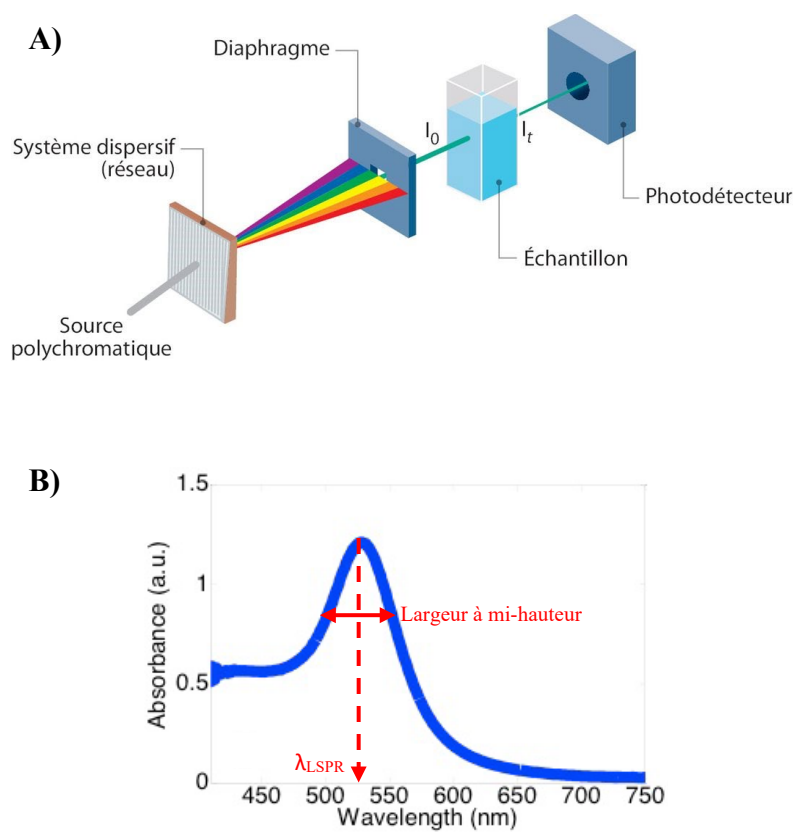


Figure 2.18. Fonctionnement des mesures de spectroscopie UV-Vis

A) Illustration du fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-Vis. B) Exemple de spectre d'extinction pour des AuNPs sphériques de 50 nm de diamètre.

Tableau 2.3. Techniques principales pour caractériser les propriétés physiques des AuNPs

Propriétés caractérisées	Techniques	Paramètres mesurés	Références
Taille des AuNPs	TEM / SEM	1) Dimensions moyennes (diamètre, largeur, etc.) 2) Distribution des dimensions 3) Circularité	[198] [199]
	DLS	1) Diamètre hydrodynamique	[200]
	UV-Vis	1) Longueur(s) d'onde(s) de résonance	[201]
Stabilité nanoscopique	DLS	1) Indice de polydispersité 2) Potentiel ζ	[202] [203]
Résonance optique	UV-Vis	1) Longueur(s) d'onde(s) de résonance 2) Largeur de chaque pic de résonance	[204]

2.3.2 Caractérisation de la surface des AuNPs biofonctionnalisées

La caractérisation de la surface des AuNPs après leur biofonctionnalisation est nécessaire afin d'évaluer et quantifier la composition de leur couronne. C'est cette couronne à la surface des AuNPs qui déterminera leur stabilité face à des perturbations (salinité, pH, etc.), leur bioactivité (qui dépendra à la fois de la quantité d'anticorps immobilisés sur les AuNPs ainsi que de leur disponibilité selon la stratégie de greffage utilisée), mais aussi leur immunogénicité en cas d'utilisations ultérieures *in vivo*. Pour commencer, il est possible de mesurer la taille des nanoparticules avant et après biofonctionnalisation selon les techniques présentées. En effet, un accroissement de la taille totale des nanoparticules signifiera que des composants chimiques ont été greffés à leur surface. Pour cela, les méthodes de spectroscopie par diffusion de la lumière (DLS et NTA) restent les plus adaptées, car elles font preuve d'une détection sensible de la taille des AuNPs [205]. Bien que l'évolution de la taille des AuNPs puisse attester qualitativement du greffage de composants à leur surface, cette stratégie est limitée : 1) il n'est pas possible d'identifier les différents éléments d'une couronne si sa composition est préalablement inconnue, 2) il n'est pas possible de quantifier les composants de la couronne, 3) une évolution significative de la taille des nanoparticules ne sera pas possible si la taille des composants de la couronne est négligeable devant celle des nanoparticules. D'autres stratégies de caractérisation sont donc nécessaires.

2.3.2.1 Techniques physicochimiques pour analyser le contenu de la couronne des AuNPs

Il est possible de caractériser la surface des AuNPs par des techniques d'analyse physicochimique classiques. Dasog *et al.* [206] ont mesuré les spectres RMN ^1H et FTIR de AuNPs (diamètre 2 nm) afin de connaître la structure des petites molécules greffées à leur surface. Sebby & Mansfield [207] ont calculé la densité de PEG greffé à la surface de deux populations d'AuNPs (diamètres 10 nm et 30 nm) à l'aide d'analyses thermogravimétriques (TGA). Hinterwirth *et al.* [208] ont eu recours à la spectroscopie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) afin d'étudier la densité de greffage de différents ligands à la surface d'AuNPs (diamètre allant de 13.2 ± 1.4 nm à 26.2 ± 4.4 nm). Ces techniques d'analyse permettent donc une caractérisation de la couronne des AuNPs beaucoup plus complète qu'en suivant l'évolution de la taille des nanoparticules.

2.3.2.2 Quantification des anticorps immobilisés sur les AuNPs

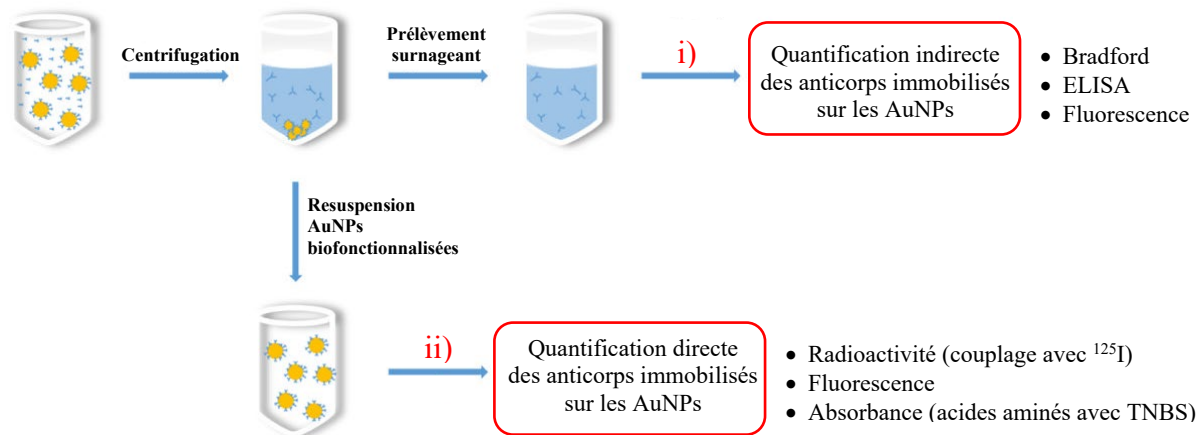


Figure 2.19. Stratégies de quantification des anticorps immobilisés sur AuNPs

Stratégies de quantification i) indirecte et ii) directe. Figure adaptée de [209]

a) Méthodes de quantification indirecte des anticorps immobilisés sur des AuNPs

Dans ce projet, les AuNPs seront biofonctionnalisées avec des anticorps. L'évaluation de leur greffage sur la surface des nanoparticules peut donc se faire par des techniques chimiques permettant de détecter et quantifier les protéines spécifiquement. Pour cela, des méthodes de quantification indirectes ont été mises au point (Figure 2.19, i)). Ces méthodes consistent en la quantification des anticorps dans la solution d'incubation avant et après la biofonctionnalisation : la quantité d'anticorps immobilisés sur les AuNPs correspond alors à la différence entre la quantité initiale et la quantité restante en solution après l'incubation. Raoof *et al.* [210] ont ainsi quantifié indirectement le greffage d'anticorps sur des AuNPs (diamètre 10 nm) grâce à la méthode de Bradford. Ben Haddada *et al.* [211] ont préféré une quantification indirecte par ELISA afin de s'assurer de ne détecter que les anticorps contenus dans leurs solutions et non l'ensemble des protéines comme avec la méthode de Bradford. García-Fernández *et al.* [212] ont conjugué leurs anticorps avec le colorant fluorescent AlexaFluor 488 avant l'incubation avec les AuNPs (diamètre 17 nm), et ont ainsi pu quantifier le greffage des anticorps à la surface des nanoparticules en mesurant la fluorescence des échantillons avant et après l'incubation. Cependant, la précision de ces méthodes de quantification indirectes est limitée. Zhang *et al.* [213] ont montré que l'utilisation de méthodes de quantification indirectes mène systématiquement à une surestimation du nombre d'anticorps immobilisés sur les AuNPs par un facteur 2 à 4. En effet, les méthodes indirectes font l'hypothèse que la diminution d'anticorps en solution après incubation avec les AuNPs est uniquement due à leur greffage, alors que des pertes peuvent également être observées par adsorption sur la verrerie ou lors des phases de lavage des nanoparticules.

b) Méthodes de quantification directes des anticorps immobilisés sur des AuNPs

Des méthodes de quantification directe des anticorps greffés sur les AuNPs ont été développées afin de remédier aux erreurs commises par les méthodes indirectes (Figure 2.19, ii)). Yoshimoto *et al.* [214] ont quantifié les anticorps immobilisés sur une surface plane d'or en les conjuguant préalablement à ^{125}I radioactif. Une stratégie similaire peut être envisagée pour la quantification sur des AuNPs, bien que l'emploi de matériel radioactif nécessite l'utilisation d'infrastructures adaptées pour protéger les opérateurs. Toutes les autres stratégies de quantification directes des anticorps nécessitent leur séparation des nanoparticules, car ces

dernières peuvent interférer avec les mesures [215, 216]. Yuan *et al.* [217] ont montré que les liaisons thiol-or pouvaient être brisées avec du tétrahydruroborate de sodium (NaBH_4), permettant ainsi de solubiliser les anticorps immobilisés sur les AuNPs par l'intermédiaire de PEG. Filbrun et Driskell [218] ont dissous les nanoparticules d'or en utilisant un mélange d'iodure de potassium (KI) et de diiode (I_2), et ont quantifié les anticorps solubilisés à l'aide de *NanoOrange*, un produit fluorescent commercial capable de quantifier les protéines. En revanche, ils ont mis en évidence la nécessité d'évacuer les produits indésirables (AuNPs intactes, produits colorés, etc.) avant de procéder à la quantification des anticorps par des méthodes optiques, ajoutant ainsi une étape de séparation entre l'incubation et la quantification pouvant être une source incontrôlée de perte d'anticorps. Pour contourner ce problème, Zhang *et al.* [213] ont dissous les AuNPs (diamètre 15 nm) par un traitement au cyanure de sodium (NaCN). Les anticorps avaient été préalablement conjugués avec le colorant fluorescent FITC pour permettre leur quantification après la dissolution des nanoparticules. Finalement, Oliverio *et al.* [219] ont placé leurs AuNPs biofonctionnalisées dans l'acide chlorhydrique (HCl) 6 N à 110°C pendant 24 h afin de digérer l'or et d'hydrolyser les anticorps en acide aminés. Ceux-ci ont ensuite été quantifiés par absorbance à 340 nm après incubation avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique. Cette méthode permet de quantifier les anticorps immobilisés sur les AuNPs sans les conjuguer préalablement à des colorants fluorescents, qui pourraient influencer les interactions anticorps-nanoparticules.

2.3.3 Évaluation de la bioactivité des AuNPs biofonctionnalisées

Après avoir vérifié la présence d'anticorps à la surface des AuNPs, la caractérisation des nanoparticules se termine avec l'évaluation de leur bioactivité, i.e., leur capacité à se lier à leur cible. En effet, des nanoparticules portant beaucoup d'anticorps dégradés et/ou mal orientés auront une bioactivité similaire à des nanoparticules portant peu d'anticorps intacts et correctement orientés (Figure 2.20).

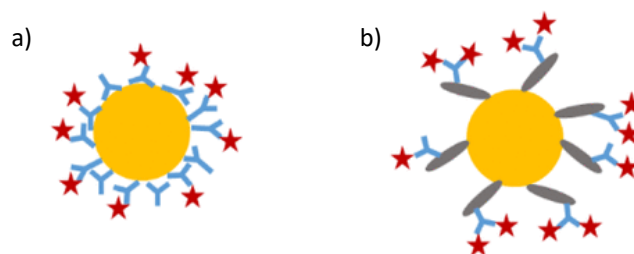


Figure 2.20. Bioactivité des AuNPs selon la stratégie de biofonctionnalisation employée

Les AuNPs biofonctionnalisées par a) adsorption non-orientée de beaucoup d'anticorps et b) greffage orienté de peu d'anticorps peuvent avoir une capacité similaire pour détecter leurs biomarqueurs (étoiles rouges). Figure adaptée de [209]

2.3.3.1 Impact de l'orientation des anticorps sur la bioactivité des nanoparticules

Des méthodes enzymatiques peuvent être utilisées afin de comparer la proportion d'anticorps bioactifs une fois immobilisés sur les AuNPs selon les stratégies de biofonctionnalisation. Ces études reposent le plus souvent sur l'utilisation de la peroxydase de raifort (HRP), une enzyme catalysant l'oxydation de certains substrats pour introduire des groupes chromophores dans leur structure [220]. Les substrats deviennent alors quantifiables par absorbance, et il est possible d'en déduire la quantité de HRP contenue dans les échantillons étudiés. Ruiz *et al.* [100] ont biofonctionnalisé des AuNPs (diamètre 60 nm) avec des anticorps contre HRP (Figure 2.21.a). Ils ont évalué la quantité d'anticorps immobilisés sur les AuNPs par adsorption non-spécifique selon le pH du milieu lors de l'incubation en mesurant le diamètre hydrodynamique des nanoparticules décorées avec les anticorps. Ils ont ensuite incubé les nanoparticules avec HRP (Figure 2.21.b), si bien que tous les anticorps immobilisés encore bioactifs se sont liés à HRP (Figure 2.21.c). Les auteurs ont ensuite quantifié le nombre de HRP attachées aux anticorps sur les AuNPs par la méthode d'oxydation des substrats décrite précédemment (Figure 2.21.d). Ce résultat, comparé au nombre d'anticorps immobilisés à la surface des AuNPs, a permis de déterminer la proportion d'anticorps bioactifs sur les nanoparticules : 33 %, 24 % et 18 % d'anticorps encore bioactifs lorsque le pH valait respectivement 7.5, 8.0 et 8.5 lors de l'incubation des anticorps. Tripathi et Driskell [209] ont utilisé un protocole similaire pour déterminer que 23 ± 6 % des anticorps adsorbés sur des AuNPs (diamètre 60 nm) étaient bioactifs tandis que 91 ± 19 % de ces anticorps

étaient bioactifs lorsqu'ils étaient immobilisés sur les mêmes AuNPs par l'intermédiaire de protéines A (voir section 2.2.4.2).

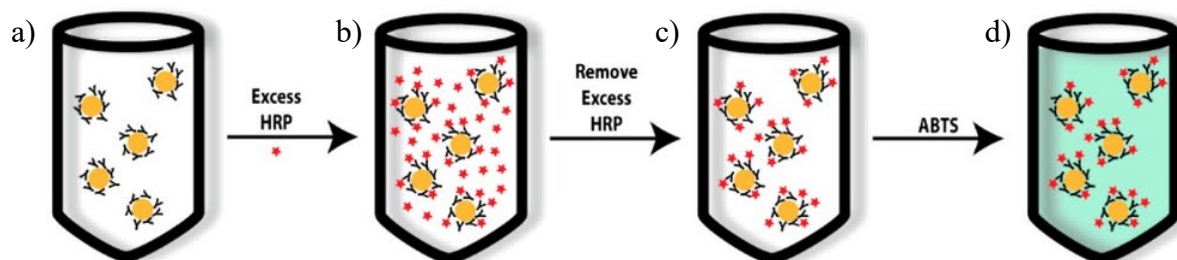


Figure 2.21. Procédure pour évaluer la bioactivité des AuNPs par méthode enzymatique

La Figure 2.21 illustre le protocole de Ruiz *et al.* [100] pour évaluer la bioactivité des AuNPs biofonctionnalisées avec des anticorps anti-HRP.

Les méthodes enzymatiques confirment donc que l'orientation des anticorps immobilisés à la surface des AuNPs exerce une grande influence sur leur bioactivité. Biofonctionnaliser les AuNPs par des stratégies orientant correctement les anticorps permet effectivement de maximiser la bioactivité des nanoparticules. Ainsi, ces nanoparticules auront une probabilité plus élevée de détecter leurs biomarqueurs cibles dans des applications biomédicales.

2.3.3.2 Évaluation de la bioactivité des nanoparticules par microscopie en champ sombre

La capacité des AuNPs biofonctionnalisées avec des anticorps à cibler des biomarqueurs cellulaires peut être évaluée sur des cellules modèles en microscopie en champ sombre. La microscopie en champ sombre est une technique de microscopie optique permettant d'observer des échantillons en illuminant leur contenu tout en obtenant un arrière-plan sombre [221]. Pour cela, des échantillons sont préparés en immobilisant des cellules exprimant un biomarqueur d'intérêt sur des lames de microscopie, puis en les incubant avec des nanoparticules biofonctionnalisées pour cibler ce biomarqueur. Ainsi, les nanoparticules bioactives se lieront aux cellules. En dénombrant les nanoparticules à la surface des cellules, il est même possible de comparer la bioactivité de nanoparticules biofonctionnalisées selon plusieurs stratégies. Qi *et al.* [72] ont développé la

technique de microscopie en champ sombre avec illumination latérale pour la détection des AuNPs (Figure 2.22.A). En effet, les AuNPs diffusent fortement la lumière à leur longueur d'onde LSPR : une illumination latérale permet une bonne observation des nanoparticules tout en conservant un arrière-plan sombre (Figure 2.22.B). Les auteurs ont montré que le système d'illumination latérale permet d'obtenir un meilleur contraste entre les AuNPs et les cellules qu'avec les techniques classiques de microscopie en champ clair et en champ sombre. Il est ainsi possible de dénombrer fidèlement les nanoparticules liées aux cellules afin de valider la bioactivité des AuNPs biofonctionnalisées.

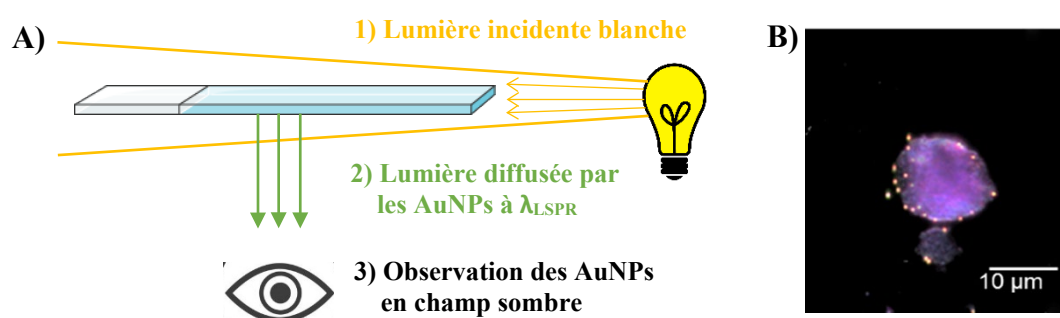


Figure 2.22. Observation des AuNPs liées aux cellules par microscopie en champ sombre

A) Schéma du fonctionnement de la microscopie en champ sombre avec illumination latérale pour observer les AuNPs liées à des cellules. B) Observation d'AuNPs (points jaunes) liées à une cellule MDA-MB-453 (cancer du sein, violet) en champ sombre. Figure adaptée de [55].

CHAPITRE 3 PRÉAMBULE PRÉSENTANT LA DÉMARCHE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET L'ORGANISATION DU DOCUMENT

3.1 Démarche du travail de recherche

Ce projet consistait en l'étude de plusieurs stratégies de biofonctionnalisation de nanoparticules d'or (AuNPs) avec l'anticorps monoclonal *Trastuzumab* (TZM) pour la détection *in vitro* de cellules modèles de cancer du sein. Afin d'atteindre cet objectif, le projet a été découpé en 3 sous-objectifs :

- 1) Développer un procédé d'analyse polyvalent permettant de caractériser les propriétés physicochimiques des AuNPs lors de leur biofonctionnalisation avec TZM.
- 2) Comparer les caractéristiques physicochimiques des AuNPs biofonctionnalisées ainsi que le nombre de TZM greffés par AuNP selon plusieurs stratégies.
- 3) Évaluer la capacité des AuNPs biofonctionnalisées selon les différentes stratégies de greffage à détecter *in vitro* des cellules modèles de cancer du sein par observation microscopique.

3.1.1 Développer un procédé d'analyse des AuNPs

La première étape de ce projet consistait à développer un procédé polyvalent permettant d'analyser les caractéristiques des AuNPs à chaque étape de leur biofonctionnalisation, indépendamment de la stratégie employée. Le procédé final retenu est présenté à la Figure 3.1.

Ce procédé d'analyse devait tout d'abord permettre de mesurer la taille ainsi que la stabilité optique et nanoscopique des AuNPs (voir section 2.3.1). Afin de sélectionner les paramètres les plus pertinents à mesurer pour rendre compte de ces caractéristiques, ceux présentés dans le Tableau 2.3 ont été expérimentés². Seule la mesure du potentiel ζ a été totalement écartée du

² La mesure de la largeur du pic de résonance en spectroscopie UV-Vis n'a pas été considérée car trop imprécise.

procédé final car il y avait une trop grande variabilité entre les mesures d'un même échantillon pour tirer quelque information de ces analyses (voir Annexe A).

Le procédé d'analyse devait ensuite pouvoir permettre de déterminer la quantité de TZM immobilisés sur la surface des AuNPs après leur biofonctionnalisation. Ici, deux méthodes de quantification directe des anticorps ont été comparées (voir section 2.3.2) : dissolution de l'or et solubilisation des anticorps par KI et I₂ avant leur quantification avec *NanoOrange* d'une part [218], et digestion de l'or et hydrolyse des anticorps par HCl 6 N avant leur quantification avec TNBS d'autre part [219]. L'évaluation de l'immobilisation des anticorps grâce aux mesures de diamètre hydrodynamique des nanoparticules par DLS a aussi été appréciée. Seule la méthode de solubilisation des anticorps avec KI et I₂ a été écartée car elle ne permettait pas une quantification fiable des anticorps, avant même que ceux-ci soient immobilisés sur les nanoparticules (voir Annexe B).

Finalement, le procédé d'analyse devait permettre d'évaluer la capacité des AuNPs biofonctionnalisées à détecter spécifiquement des cellules de cancer du sein HER2-positives par microscopie optique. L'organisation de cette partie du travail de recherche sera décrite à la section 3.1.3, car elle répond à un sous-objectif entier du projet.

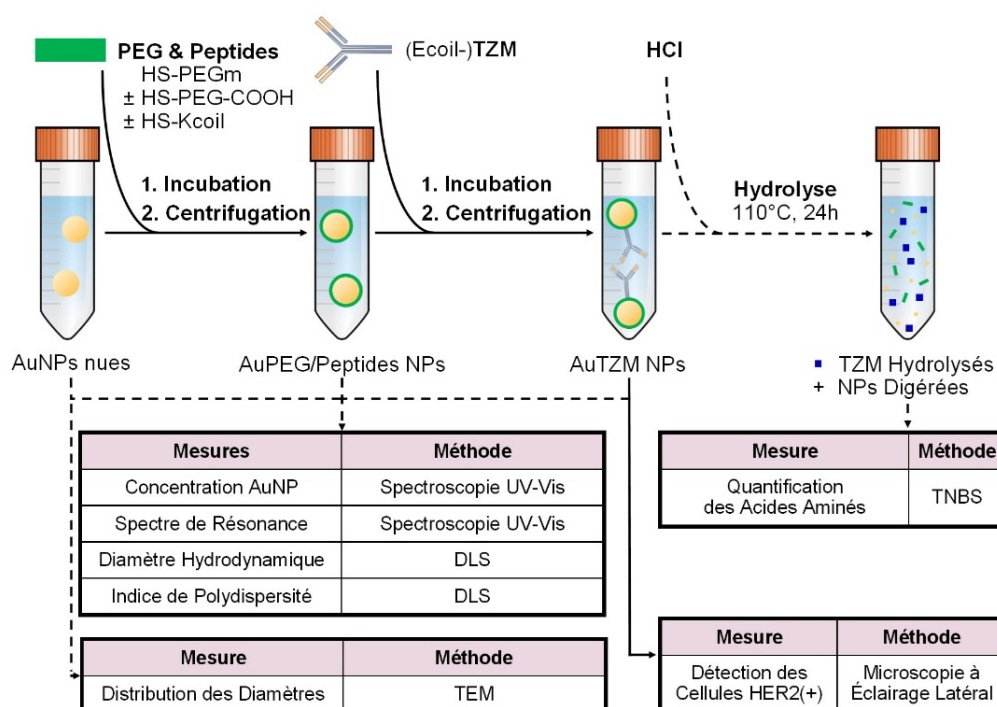


Figure 3.1. Procédé final de biofonctionnalisation et d'analyse des AuNPs

3.1.2 Comparer plusieurs stratégies de biofonctionnalisation des AuNPs

Une fois le procédé d'analyse des AuNPs développé, il a été employé pour comparer différentes stratégies de biofonctionnalisation. Les stratégies ayant fait l'objet d'une étude complète (i.e., de la caractérisation des AuNPs nues jusqu'à leur biofonctionnalisation et incubation avec des cellules cancéreuses) sont représentées à la Figure 3.2.

La première stratégie étudiée fut l'immobilisation des anticorps par Adsorption Non-Spécifique sur les nanoparticules (voir section 2.2.2). Bien que cette stratégie mène à une immobilisation imparfaite des anticorps sur les nanoparticules, elle a été étudiée, car le phénomène d'adsorption non-spécifique a lieu, peu importe la stratégie employée. Il semblait donc nécessaire d'évaluer la contribution de ce phénomène afin d'établir un niveau de base pour l'immobilisation des anticorps et pouvoir le comparer à celui obtenu avec les autres stratégies.

La deuxième stratégie de biofonctionnalisation étudiée fut le greffage covalent des anticorps par Couplage Amine (section 2.2.3.1). Cette stratégie étant la plus rapportée dans la littérature, il semblait important de l'inclure dans ce projet. De plus, si l'orientation des anticorps immobilisés sur les nanoparticules ne peut être contrôlée ici, il est probable que certains anticorps soient tout de même correctement orientés et permettent l'attachement des nanoparticules aux cellules de cancer du sein HER2-positives.

Ensuite, la stratégie de biofonctionnalisation orientée des AuNPs par les thiols de la région charnière des anticorps a été sélectionnée (section 2.2.3.2). Puisque cette stratégie reposait également sur le greffage covalent des anticorps, elle offrait la possibilité d'évaluer l'importance de leur orientation sur les nanoparticules en comparant les résultats obtenus avec ceux du Couplage Amine. Cette stratégie a cependant été écartée, car le clivage des anticorps préalablement à leur greffage sur les nanoparticules s'est en fait révélé être un défi majeur pour cette stratégie, et son étude n'a pas été poursuivie par manque de temps (voir Annexe C).

Finalement, la stratégie de biofonctionnalisation orientée des AuNPs par des anticorps modifiés avec le système de peptides E/K superhélices (section 2.2.5.2) a été employée, car il s'agissait de la stratégie la plus avantageuse parmi celles présentées dans la section 2.2.

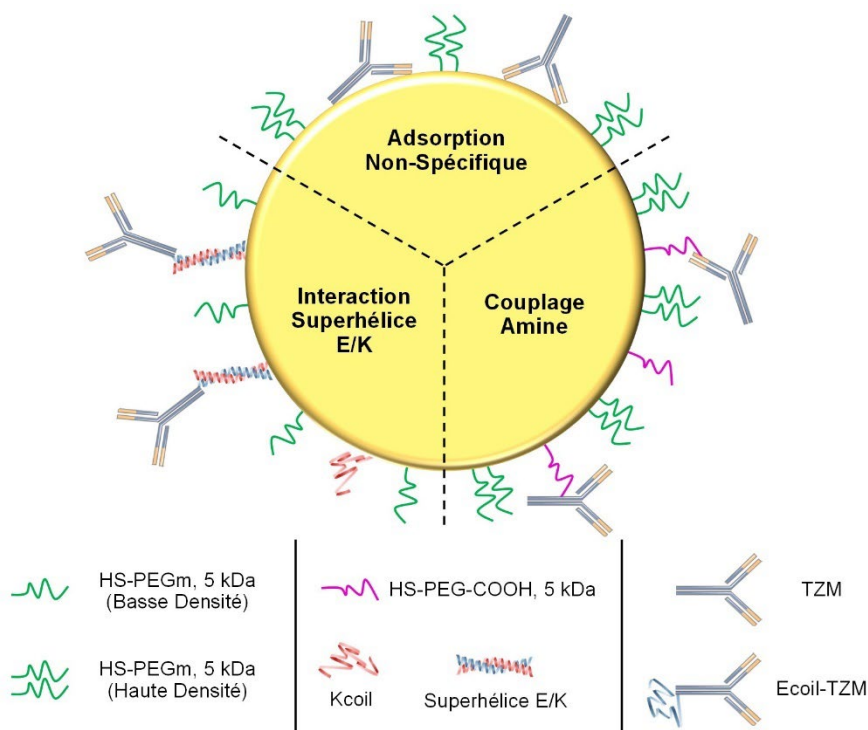


Figure 3.2. Stratégies de biofonctionnalisation ayant fait l'objet d'une étude complète

3.1.3 Détection de cellules de cancer du sein par microscopie optique

Dans ce travail, la détection de cellules de cancer du sein s'est faite à travers la détection du biomarqueur HER2 à leur surface, dans le but d'évaluer la capacité des AuNPs biofonctionnalisées avec TZM à cibler ce biomarqueur. Pour cela, trois lignées de cellules issues de cancers du sein ont été sélectionnées : MDA-MB-453 et SK-BR-3 qui sont caractérisées par une surexpression respectivement moyenne et élevée de HER2, ainsi que MDA-MB-231 qui possède une expression basale de HER2 [222, 223]. D'une part, les lignées MDA-MB-453 et SK-BR-3 ont été choisies afin d'éprouver les AuNPs biofonctionnalisées sur deux lignées surexprimant HER2 à des niveaux différents. D'autre part, la lignée MDA-MB-231 a été choisie afin d'évaluer l'attachement non-spécifique des AuNPs sur les membranes cellulaires, servant ainsi de contrôle négatif durant les observations microscopiques. La lignée MDA-MB-453 a cependant été écartée de l'étude, car les cellules poussaient en grappes superposées, ce qui complexifiait la quantification des nanoparticules attachées à leur surface par microscopie optique par rapport aux autres lignées car il aurait alors fallu faire cette étude en 3 dimensions (voir Annexe D).

Ces observations microscopiques ont été directement réalisées en mode champ sombre avec illumination latérale, puisque les avantages de ce mode sur les champs sombre et clair traditionnels ont été établis dans la littérature (voir section 2.3.3.2).

3.2 Organisation générale du document

Comme détaillé à la section précédente, plusieurs voies de recherche ont été explorées pour remplir chacun des sous-objectifs de ce projet. Le matériel et les méthodes employés pour l'étude complète des stratégies de biofonctionnalisation décrites à la Figure 3.2 sont rapportés dans le Chapitre 4, tandis que les résultats obtenus sont rassemblés dans le Chapitre 5. En revanche, certaines voies explorées pour répondre aux sous-objectifs ont été écartées, comme expliqué précédemment. Les motivations justifiées de ces écartements sont exposées dans les Annexes A à D. Le Tableau 3.1 propose un sommaire de toutes les voies de recherche explorées pour répondre aux sous-objectifs de ce projet ainsi que leur emplacement dans ce document.

Tableau 3.1. Démarche du travail de recherche et organisation du document

Sous-Objectifs	Voies de Recherches Explorées			Emplacement
(1) Développer un Procédé d'Analyse des AuNPs	Propriétés	Techniques	Paramètres Mesurés	
	Taille des AuNPs	TEM	Diamètres Moyens	Chapitres 4/5
			Distribution des Diamètres	Chapitres 4/5
			Circularité	Chapitres 4/5
		DLS	Diamètre Hydrodynamique	Chapitres 4/5
		UV-Vis	Longueur d'Onde de Résonance	Chapitres 4/5
	Stabilité Nanoscopique	DLS	Indice de Polydispersité	Chapitres 4/5
			Potentiel ζ	Annexe A
	Résonance Optique	UV-Vis	Longueur d'Onde de Résonance	Chapitres 4/5
	Quantité de TzM Immobilisés sur les AuNPs	KI / I ₂	Quantification par <i>NanoOrange</i>	Annexe B
		Hydrolyse	Quantification par TNBS	Chapitres 4/5
		DLS	Diamètre Hydrodynamique	Chapitres 4/5
(2) Comparer Plusieurs Stratégies de Biofonctionnalisation des AuNPs	Stratégies de Biofonctionnalisation			
	Adsorption Non-Spécifique sur les Nanoparticules			Chapitres 4/5
	Couplage Amine Covalent Non-Orienté			Chapitres 4/5
	Couplage Thiol Covalent Orienté			Annexe C
	Interaction Superhélice E/K Non-Covalente			Chapitres 4/5
(3) Détection de Cellules de Cancer du Sein par Microscopie Optique	Lignées Cellulaires			
	MDA-MB-453 (HER2-positives)			Annexe D
	SK-BR-3 (HER2-positives)			Chapitres 4/5
	MDA-MB-231 (HER2-négatives)			Chapitres 4/5

CHAPITRE 4 MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIES EXPÉRIMENTALES

4.1 Réactifs chimiques et matériel biologique

Les nanoparticules d'or sphériques de 100 nm de diamètre stabilisées dans du citrate (AuNPs nues) ont été achetées à NanoComposix (San Diego, CA, États-Unis d'Amérique). La suspension d'AuNPs à 0.05 mg/mL (i.e., 5×10^9 NP/mL) dans une solution de citrate de sodium à 2 mM (#AUCN100-500M) a été conservée à 4°C dès sa réception.

Le Méthoxy-PEG-Thiol (mPEG, pour stabiliser les AuNPs sans introduire de groupe chimique pouvant réagir avec les anticorps) 5 kDa (#A3029) a été acheté à JenKem Technology USA (Plano, TX, États-Unis d'Amérique). Le Thiol-PEG-CH₂COOH (PEG-COOH, pour greffer les anticorps sur les AuNPs par couplage amine) 5 kDa (#BP-23706) a été acheté à BroadPharm (San Diego, CA, États-Unis d'Amérique). Des aliquots de PEG ont été préparés dans de l'eau MilliQ et ont été conservés à -80°C, tandis que les restes de poudres ont été conservés à -20°C.

Les peptides (KVSALKE)₅-GGC (Kcoil) portant un groupe thiol sur leur cystéine en C-terminal ont été synthétisés à l'Université de Sherbrooke (QC, Canada). Des aliquots de Kcoil ont été préparés dans de l'eau MilliQ et ont été conservés à -80°C, tandis que les restes de poudres ont été conservés à -20°C.

Les anticorps Trastuzumab (TZM) de type naturel ont été produits selon le protocole de Cambay *et al.* [224]. Les anticorps Trastuzumab-(EVSALEK)₅ (Ecoil-TZM), du TZM recombinant portant un peptide (EVSALEK)₅ (Ecoil) au C-terminal de ses deux chaînes lourdes, ont été produits et purifiés par le Centre de Recherche en Thérapeutique en Santé Humaine du Conseil National de Recherches du Canada (Montréal, QC, Canada), en adaptant les protocoles développés par Cambay *et al.* Des aliquots d'anticorps ont été préparés dans du tampon phosphate salin (PBS) et ont été conservés à -80°C.

Les lignées cellulaires MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) et SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC HTB-30) ont été achetées à Cedarlane (Burlington, ON, Canada) et conservées dans l'azote liquide. Le milieu de culture cellulaire *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, #30-2002) a été acheté à Cedarlane, tandis que le milieu de culture cellulaire McCoy's 5A *Modified Medium* (#16600082) a été acheté à Thermo Fisher Scientific. Les deux milieux ont été conservés à 4°C.

Le sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur de Gibco (FBS, #A3840001) et la pénicilline-streptomycine (#15070063) ont été achetés à Thermo Fisher Scientific et conservés à -20°C. L'enzyme TrypLE Express de Gibco (#12604013) été achetée à Thermo Fisher Scientific et conservée à 4°C. La phalloïdine couplée à un Alexa Fluor 488 (#A12379) et le 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI, #D1306) ont été achetés à Thermo Fisher Scientific et conservés à -20°C dans l'obscurité. Un anticorps secondaire anti-humain de chèvre couplé à un Alexa Fluor 546 (#A-21089) a été acheté à Thermo Fisher Scientific et conservé à 4°C dans l'obscurité.

Le citrate de sodium (#A12274.36) a été acheté à Fisher Scientific et conservé à température ambiante (RT). L'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS, #BC86) à 1 % dans du méthanol a été acheté à G-Biosciences (St. Louis, MO, États-Unis d'Amérique) et conservé à -20°C. L'éthanol anhydre (#P016EAA) et le méthanol (#P016MEOH) ont été achetés à Greenfield Global Inc. (Mississauga, ON, Canada) et conservés à RT. L'acétone (#BPA18P4) a été acheté à Thermo Fisher Scientific et conservé à RT. Tous les autres réactifs chimiques ont été achetés à Sigma Aldrich et ont été conservés selon les recommandations du fabricant. De l'eau MilliQ a été utilisée pour préparer tous les tampons et toutes les solutions, qui ont ensuite été filtré avec des membranes de 0.22 µm en polyéthersulfone (PES).

4.2 Purification des nanoparticules : centrifugation et resuspension

Sauf mention contraire, les nanoparticules ont été systématiquement purifiées par trois cycles de centrifugation – resuspension après toute incubation avec des réactifs chimiques, PEG, peptides ou anticorps. Chaque cycle consistait en la centrifugation des échantillons à 1,300×g pendant 10 min, le retrait de 85 % du surnageant pour retirer les réactifs en excès sans perturber le culot, et la resuspension dans la solution désirée. Pour finir, les échantillons ont été ultrasoniqués pendant 10 sec pour resuspendre les nanoparticules adsorbées sur la verrerie sans endommager leur couverture de PEG [225].

4.3 Biofonctionnalisation des nanoparticules d'or

Avant chaque biofonctionnalisation, les AuNPs nues ont été lavées en réalisant un cycle de centrifugation – resuspension dans une solution de citrate de sodium à 2 mM, pH = 7, fraîchement préparée.

4.3.1 AuNPs PEGylées à haute densité : Adsorption Non-Spécifique de TZM et Couplage Amine.

La biofonctionnalisation avec du TZM de type naturel par Adsorption Non-Spécifique et Couplage Amine a été étudiée sur des AuNPs PEGylées à haute densité. Pour cela, un excès de PEG quatorze fois plus élevé que le nombre maximal greffable par nanoparticule a été utilisé pendant l'incubation. Les nanoparticules de 100 nm de diamètre ont une surface de $3.14 \times 10^4 \text{ nm}^2$ et les chaînes de PEG de 5 kDa ont une densité de greffage de 1 PEG.nm^{-2} [62], ce qui signifie que le nombre maximal de PEG greffable par AuNP est 3.14×10^4 . Par conséquent, la concentration totale en PEG a toujours été de 3.6 μM lors des incubations avec les AuNPs à 0.05 mg/mL.

Les AuNPs PEGylées à haute densité ont été produites en incubant les AuNPs à 0.05 mg/mL dans du citrate avec du PEG dans des proportions mPEG : PEG-COOH molaires de 100 : 0 (AuPEG_{HD}), 95 : 5 (AuPEG_{HD}-COOH_{5%}) et 70 : 30 (AuPEG_{HD}-COOH_{30%}) pendant 16 h à température ambiante (RT) dans l'obscurité. Les nanoparticules ont ensuite été purifiées et resuspendues dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant 0.05 % de Tween 20 (PBST). Les acides carboxyliques sur les AuPEG_{HD}-COOH_{5%} et AuPEG_{HD}-COOH_{30%} ont été activées avec des excès de 4,000× et 1,000× de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS), respectivement. Ainsi, EDC et NHS ont été incubés à des concentrations finales respectives de 60 μM et 15 μM avec les AuPEG_{HD}-COOH_{5%}, et à des concentrations finales respectives de 320 μM et 80 μM avec les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} pendant 30 min à RT. Les nanoparticules activées ont été purifiées avec un cycle de centrifugation – resuspension dans du PBST et ont été utilisées immédiatement.

Du TZM a ensuite été incubé à 0, 0.07 et 0.44 μM avec les AuNPs PEGylées à haute densité dans du PBST pendant 16 h à RT dans l'obscurité. Finalement, les nanoparticules décorées avec TZM ont été purifiées et resuspendues dans du PBST.

4.3.2 AuNPs PEGylées à basse densité : Greffage de Ecoil-TZM par Interaction Superhélice E/K

La biofonctionnalisation avec Ecoil-TZM par Interaction Superhélice E/K a été étudiée sur des AuNPs décorées d'une couche mixte composée de mPEG à basse densité et de peptides Kcoil (AuPEG_{LD}/Kcoil). Le protocole de production des AuPEG_{LD}/Kcoil a été adapté de celui de Roth *et al.* [186].

Les AuNPs à 0.05 mg/mL ont premièrement été incubées avec du mPEG à des concentrations finales de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.3 et 1.8 μ M dans du citrate pendant 16 h à RT dans l'obscurité. Les nanoparticules PEGylées à faible densité (AuPEG_{LD}) ont été purifiées et resuspendues dans du citrate. L'impact de Kcoil sur la stabilité de ces AuPEG_{LD} a d'abord été évalué en incubant Kcoil à une concentration finale de 0.35 μ M avec les AuPEG_{LD} dans du citrate pendant 16 h à RT dans l'obscurité, et en les resuspendant dans du citrate.

Afin d'optimiser le greffage de Kcoil sur la surface d'or des AuPEG_{LD}, des AuPEG_{LD} ont été produites en incubant les AuNPs à 0.05 mg/mL avec du mPEG à une concentration finale de 0.4 μ M dans du citrate pendant 16 h à RT dans l'obscurité et ont été resuspendues dans du citrate. Des peptides Kcoil ont ensuite été incubés à des concentrations finales de 0, 0.2, 0.35, 0.9 et 1.8 μ M dans du citrate pendant 16 h à RT dans l'obscurité. La stabilité de toutes les AuPEG_{LD}/Kcoil a été étudiée dans du citrate et du PBST en les resuspendant dans chacune des deux solutions.

Finalement, du Ecoil-TZM a été greffé sur les AuPEG_{LD}/Kcoil. Pour cela, des AuPEG_{LD}/Kcoil ont été produites en incubant AuPEG_{LD} (AuNPs et mPEG à 0.4 μ M) avec des peptides Kcoil à une concentration finale de 0.35 μ M dans du citrate pendant 16 h à RT dans l'obscurité, et ont été resuspendues dans du PBST. Du Ecoil-TZM a ensuite été incubé à des concentrations finales de 0.25 et 1.25 μ M avec AuPEG_{LD}/Kcoil dans du PBST pendant 16 h à RT dans l'obscurité. Du Ecoil-TZM a également été incubé dans ces mêmes conditions avec des AuPEG_{LD} pour apprécier le rôle des peptides Kcoil dans le greffage des anticorps sur les nanoparticules. En outre, du TZM de type naturel a également été incubé à des concentrations finales de 0.25 et 1.25 μ M avec des AuPEG_{LD}/Kcoil et AuPEG_{LD} dans du PBST pendant 16 h dans l'obscurité pour apprécier l'adsorption de TZM sans Ecoil sur ces nanoparticules. Toutes ces nanoparticules décorées avec des anticorps ont été purifiées et resuspendues dans du PBST.

4.4 Caractérisation des nanoparticules d'or

4.4.1 TEM

Des micrographies de microscopie en transmission électronique (TEM) ont été capturées avec l'instrument JEM-2100, commercialisé par Jeol (Tokyo, Japon). Les échantillons contenant les AuNPs nues ont été préparés sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone (#Cu-400CN, Pacific Grid-Tech, San Francisco, CA, États-Unis d'Amérique), puis trempée dans une dispersion d'éthanol et séchée à l'air.

Les micrographies de TEM ont été analysées avec le logiciel libre ImageJ. Un total de 295 AuNPs ont été analysées à partir de 16 micrographies différentes pour obtenir la distribution des tailles et le diamètre moyen des nanoparticules.

4.4.2 Spectroscopie UV-Vis

Les mesures en spectroscopie UV-Vis ont été réalisées avec un spectrophotomètre pour microplaques Epoch, commercialisé par Agilent (Santa Clara, CA, États-Unis d'Amérique). La concentration des nanoparticules dans tous les échantillons a été calculée comme la valeur moyenne entre trois mesures de l'extinction à 620 nm sur le même échantillon, mesures qui ont été effectuées dans trois puits différents d'une microplaque 96 puits transparente.

Les spectres bruts ont été obtenus en mesurant l'extinction des nanoparticules entre 400 nm et 800 nm avec un pas de 1 nm. Les spectres relatifs ont ensuite été obtenus en divisant l'extinction mesurée à chaque longueur d'onde par la valeur maximale d'extinction obtenue à la longueur d'onde de résonance LSPR (λ_{LSPR}).

La λ_{LSPR} de chaque échantillon a été déterminée par ajustement des spectres relatifs entre 500 nm et 650 nm avec une fonction Lorentzienne [226] :

$$L(\lambda) = \frac{1}{\pi} \frac{\frac{1}{2}\Gamma}{(\lambda - \lambda_{LSPR})^2 + (\frac{1}{2}\Gamma)^2} \quad \text{Équation 4.1}$$

L'ajustement consistait en l'inversion de l'Équation 4.1 puis la régression polynomiale du second ordre à partir des spectres relatifs pour extraire λ_{LSPR} des paramètres de la régression. Toutes les régressions réalisées se sont ajustées aux données expérimentales avec $R^2 > 0.99$ (données non fournies). Les valeurs de λ_{LSPR} pour chaque échantillon ont été calculées comme les valeurs moyennes entre trois mesures effectuées dans trois puits différents d'une microplaque 96 puits transparente puis ajustées.

4.4.3 DLS

Les mesures de spectroscopie par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été effectuées avec un instrument Zetasizer Pro Blue, commercialisé par Malvern Panalytical (Malvern, Royaume-Uni) dans une micro-cuvette en quartz Ultra-Micro (#ZEN2112). Les valeurs de diamètre hydrodynamique et indice de polydispersité obtenues pour chaque échantillon ont été calculées comme les valeurs moyennes de cinq mesures. Les valeurs obtenues à chaque mesure ont été directement extraites du logiciel ZS Xplorer (Malvern Panalytical).

4.4.4 Quantification directe des anticorps immobilisés sur les nanoparticules

La quantification des anticorps immobilisés sur toutes les nanoparticules a été réalisée d'après la méthode développée par Oliverio *et al.* [219]. Tout d'abord, les nanoparticules d'or ont été digérées et les anticorps précédemment immobilisés ont été hydrolysés. Pour cela, les nanoparticules biofonctionnalisées avec les anticorps ont été resuspendues dans de l'eau MilliQ. Elles ont été transférées dans des fioles en verre, et lyophilisées. Ensuite, les échantillons ont été resuspendus dans 200 μ L d'acide chlorhydrique (HCl) à 6 N, et chauffés à 110°C pendant 24 h. Finalement, les fioles ont été ouvertes et chauffées à 110°C sous une hotte chimique pendant 6 h pour permettre l'évaporation de HCl. Les échantillons secs ont été conservés pendant au plus une semaine à -20°C, jusqu'à leur caractérisation.

Les échantillons secs ont été resuspendus dans 550 μ L d'une solution de TNBS à 0.0025 % dans du carbonate de sodium (100 mM, pH = 8.5), et ont été incubés à 37°C pendant 2 h. Après être revenus à RT, 5 $\times$ 100 μ L de chaque échantillon ont été prélevés dans cinq puits d'une

microplaque 384 puits sombre. La concentration en amines libres dans chaque puits a été mesurée par absorbance à 340 nm (avec une correction à 630 nm) avec un lecteur de microplaques Infinite 200, commercialisé par Tecan (Männedorf, Suisse).

La concentration en anticorps dans chaque échantillon a été calculée comme la valeur moyenne de cinq mesures effectuées dans cinq puits différents de la microplaque 384 puits. Le nombre d'anticorps immobilisés par nanoparticule a ensuite été calculé comme le ratio entre le nombre d'anticorps et le nombre de nanoparticules avant leur digestion avec HCl (quantifié par spectroscopie UV-Vis, voir section 4.4.2) dans un même échantillon.

4.5 Imagerie cellulaire

4.5.1 Culture cellulaire

Les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 ont été cultivées dans des flasques T-75 achetées à Corning (#3290) avec les milieux de culture DMEM et McCoy's 5A, respectivement. Les deux milieux ont été enrichis avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline – streptomycine. Les deux lignées cellulaires ont été cultivées dans 10 mL de milieu enrichi à 37°C, avec un renouvellement des milieux toutes les 72 h, jusqu'à atteindre 90 % de confluence dans les flasques. Les cellules ont ensuite été détachées de leurs flasques en incubant 5 mL de TrypLE Express à 37°C pendant 10 min. Les cellules ont été récoltées dans du milieu enrichi pour neutraliser TrypLE Express, puis centrifugées à 100×g pendant 10 min, et resuspendues dans 10 mL de milieu enrichi. Finalement, les cellules ont été repiquées avec des ratios suspension de cellules : milieu de culture frais valant respectivement 1 : 5 et 1 : 2 pour les lignées MDA-MB-231 et SK-BR-3.

4.5.2 Incubation des nanoparticules avec les cellules sur des lames en verre

Tout d'abord, toutes les cellules ont été fixées sur des lames en verre pour microscope avec chacune 8 puits en silicone (#80841, Ibidi, Gräfelfing, Allemagne). Pour cela, 300 µL de cellules fraîchement repiquées ont été prélevées dans chaque puits des lames et ont été incubées à 37°C jusqu'à atteindre une confluence de 90 %. Les milieux de culture ont été retirés des puits, et les

cellules ont été fixées sur le verre en les incubant avec 100 μL d'un mélange glacial de 75 % méthanol – 25 % acétone pendant 10 min sur glace. Le mélange a ensuite été retiré des puits et les lames ont été laissées sous hotte chimique à RT jusqu'à être totalement sèches. Ensuite, l'espace résiduel sur le verre entre les cellules fixées a été bloqué en incubant 200 μL d'une solution de 10 % de BSA dans du PBS toute la nuit à 4°C. La solution de BSA a ensuite été retirée des puits, qui ont été ensuite lavés une fois avec du PBST.

Toutes les nanoparticules ont été produites selon les protocoles précédemment détaillés (sections 4.3.1 et 4.3.2) et ont été immédiatement utilisées pour les expériences d'imagerie. Elles ont été incubées avec les cellules fixées pendant 3 h à RT en ajoutant 200 μL des nanoparticules désirées à 5×10^8 NP/mL dans chaque puits. Des puits de contrôle ont également été réalisés en incubant 100 μL de solutions d'anticorps primaires (TZM de type naturel ou Ecoil-TZM) sur les cellules fixées pendant 1.5 h à RT. Tous les puits ont ensuite été lavés deux fois avec du PBST.

Toutes les cellules ont ensuite été colorées avec de la phalloïdine et du DAPI pour observer les membranes cellulaires et les noyaux, respectivement. Pour cela, une solution de coloration contenant 0.17 μM de phalloïdine et 0.30 μM de DAPI dans du PBST a été préparée selon les recommandations du fabricant, et a été incubée avec les cellules pendant 1.5 h dans l'obscurité à RT en ajoutant 100 μL dans chaque puits. La solution de coloration pour les puits de contrôle contenait aussi 10 $\mu\text{g/mL}$ de l'anticorps secondaire fluorescent. Tous les puits ont ensuite été lavés deux fois avec du PBST.

Finalement, tout liquide contenu dans les puits a été retiré et les puits en silicone ont été détachés des lames en verre. Les lames ont été montées et scellées en utilisant du milieu VECTASHIELD Vibrance *Antifade Mounting Medium* (#H-1700-10) acheté à Vector Laboratories (Newark, CA, États-Unis d'Amérique), et ont été mises à sécher pendant 24 h dans l'obscurité avant d'être utilisées.

4.5.3 Imagerie

Le matériel et la méthode utilisés pour observer les nanoparticules attachées aux cellules sur les lames ont été adaptés du protocole développé par Qi *et al.* [72]. Les lames ont été observées sur un microscope inversé Eclipse Ti-U, commercialisé par Nikon (Tokyo, Japon), avec un objectif

Nikon 60× (ouverture numérique 0.7). Les images ont été capturées avec une caméra RGB sCMOS PCO-Panda 4.2 achetée à PCO AG (Kelheim, Allemagne). Les nanoparticules ont été observées par microscopie en champ sombre avec illumination latérale grâce à un adaptateur VegaPhoton *Side-Illumination* de Vega Bioimaging (Montréal, QC, Canada). Les anticorps secondaires fluorescents dans les puits de contrôle ont été visualisés en fluorescence en champ sombre avec le filtre 540 ± 25 nm du microscope. Les colorations de DAPI et phalloïdine ont été visualisées en fluorescence en champ sombre avec les filtres 375 ± 28 nm et 480 ± 30 nm, respectivement.

Une fois capturées, les images ont été analysées avec le logiciel CellProfiler, développé par le Broad Institute (Cambridge, MA, États-Unis d'Amérique) [227] à partir d'un protocole simplifié par rapport à celui développé par Ortiz, G. [228]. Chaque mesure consistait en l'analyse interdépendante des images en fluorescence filtrées pour le DAPI et pour la phalloïdine, ainsi que les images de nanoparticules par illumination latérale, toutes capturant la même région de la lame étudiée. Premièrement, les noyaux des cellules ont été identifiés par le logiciel à partir des images filtrées pour le DAPI. Deuxièmement, les membranes cellulaires ont été identifiées en propageant le signal sur les images filtrées pour la phalloïdine à partir des régions contenant des noyaux (sauvegardées par le logiciel) jusqu'à ce que l'arrière-fond soit détecté. Le logiciel a ainsi calculé l'aire totale recouverte par les cellules dans chaque échantillon. Un masque démarquant les membranes cellulaires a été exporté et a été appliqué sur l'image de l'illumination latérale afin de répartir et dénombrer les AuNPs dans deux catégories : celles attachées aux cellules, et celles attachées sur la lame dans l'arrière-fond. Le logiciel a finalement procédé à la reconstruction des observations complètes en superposant les noyaux (canaux bleus), les membranes cellulaires (canaux verts) et les nanoparticules attachées aux cellules (canaux rouges, les nanoparticules ont été numériquement dilatées sur les figures pour des raisons de visibilité) sur une seule image. Les densités surfaciques de nanoparticules dans l'arrière-fond ont aussi été mesurées et ont été utilisées pour le calcul des ratios signaux-sur-bruit. Dans les puits de contrôle, les images d'illumination latérale ont été remplacées par les images filtrées pour les anticorps secondaires fluorescents (canaux rouges), et l'analyse a été conduite de manière analogue.

4.6 Analyse statistique

Les longueurs d'onde LSPR sont présentées sous la forme de moyennes $\pm$ écarts-types standards, calculées à partir des ajustements de spectres UV-Vis mesurés pour $n = 3$ échantillons indépendants.

Les indices de polydispersité sont présentés sous la forme de moyennes $\pm$ écarts-types standards, calculées à partir de 15 mesures effectuées avec $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois. Les diamètres hydrodynamiques sont présentés sous la forme de moyennes $\pm$ écarts-types standards, calculées à partir de 15 mesures effectuées avec $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois.

Les erreurs de mesure commise sur la concentration des nanoparticules étaient négligeables par rapport aux erreurs de mesure sur la quantification des anticorps (données non fournies). L'erreur de mesure sur le nombre d'anticorps par nanoparticule dans chaque échantillon a donc été considérée égale à l'erreur de mesure sur la quantification des anticorps. Ainsi, les nombres d'anticorps immobilisés par nanoparticules sont présentés sous la forme de moyennes $\pm$ écarts-types standards, calculées à partir de 15 mesures effectuées avec $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois.

Les densités surfaciques de nanoparticules attachées aux cellules ainsi que les ratios signaux-sur-bruit sont présentés sous la forme de moyennes $\pm$ écarts-types standards, calculées à partir de 9 mesures effectuées avec $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été observé dans 3 régions différentes.

Des t -tests bilatéraux de Student ont été réalisés pour évaluer les différences statistiquement significatives entre différentes conditions expérimentales pour toutes les données. Différents seuils de signification ont été sélectionnés : ($^{\circ}$) si $p < 0.1$, (*) si $p < 0.05$ et (**) si $p < 0.01$.

CHAPITRE 5 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 Préparer la surface des AuNPs avant leur biofonctionnalisation

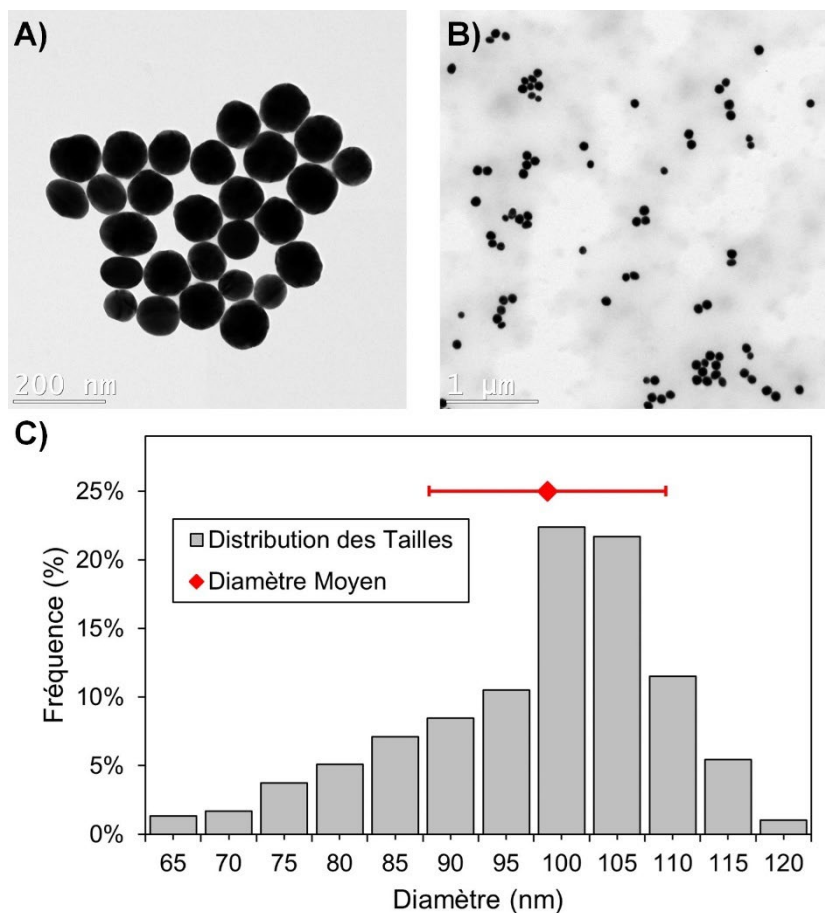


Figure 5.1. Analyse des AuNPs nues de 100 nm par TEM

A) et B) Micrographies TEM des AuNPs nues avec des échelles de 200 nm et 1 μ m, respectivement. C) Distribution réelle des tailles des AuNPs, déterminée à partir de la mesure de 295 AuNPs depuis 16 micrographies. La distribution des tailles est représentée par les barres grises tandis que le diamètre moyen $\pm$ écart-type standard mesuré est représenté en rouge.

Des nanoparticules d'or sphériques (AuNPs) commerciales de 100 nm de diamètre ont été utilisées dans ce projet, car leur diamètre important permettra d'obtenir un bon contraste par rapport aux cellules et tissus étudiés dans les applications d'imagerie. Les AuNPs utilisées dans ce projet n'étaient ni toutes de la même taille, ni parfaitement sphériques : certaines étaient elliptiques, voire

en forme de bâtonnets (Figure 5.1.A et 5.1.B). Par conséquent, les tailles réelles de ces AuNPs étaient distribuées entre 65 nm et 120 nm (Figure 5.1.C), avec 74.6 % d'entre elles à l'intérieur de l'intervalle 99 ± 11 nm, correspondant à la moyenne $\pm$ écart-type. Ce phénomène est commun avec les AuNPs de tailles importantes et a déjà été rapporté dans la littérature [200, 229]. En prenant en compte la distribution réelle des tailles de ces AuNPs, l'aire totale en or est de 1.6 cm² par mL de solution, ce qui est égal à l'aire totale en or de nanosphères théoriques parfaites de 100 nm de diamètre. A des fins de simplification, les AuNPs de ce lot seront donc considérées comme des nanosphères parfaites de 100 nm de diamètre pour le reste de cette étude.

5.1.1 AuNPs PEGylées à haute densité pour les stratégies d'Adsorption Non-Spécifique de TzM et de Couplage Amine.

Les AuNPs ont tout d'abord été recouvertes avec du polyéthylène glycol (PEG) de 5 kDa afin d'assurer la stabilité future des nanoparticules dans des milieux biologiques, où elles s'agrègent d'habitude à cause des sels et des protéines [56]. Des couronnes à haute densité de Méthoxy-PEG-Thiol (mPEG) ont été générées sur les AuNPs destinées à être biofonctionnalisées avec la stratégie d'Adsorption Non-Spécifique de TzM (Figure 3.2), bien que l'objectif ne fût pas de saturer la surface des nanoparticules avec le mPEG. Les AuNPs mPEGylées à haute densité seront à présent appelées les AuPEG_{HD}. Le phénomène d'adsorption non-spécifique des protéines sur la surface des nanoparticules est réduit grâce à la présence de mPEG [16], mais ne peut pas être totalement évité, surtout sur les AuNPs possédant de larges dimensions comme dans ce travail [230]. Les couronnes de mPEG à haute densité ici formées pourront donc stabiliser les nanoparticules tout en laissant des anticorps s'adsorber à leur surface pour la stratégie de biofonctionnalisation par Adsorption Non-Spécifique de TzM. Comme expliqué à la section 4.3.1, les AuPEG_{HD} ont été produites en incubant les AuNPs nues dans une solution de mPEG à 3.6 μ M pour obtenir un excès de PEG quatorze fois plus élevé que le nombre maximal greffable par nanoparticule lors de l'incubation. Après l'incubation, les AuPEG_{HD} ont été resuspendues dans du tampon phosphate salin contenant 0.05 % de Tween 20 (PBST) puisque ce tampon permettra d'incuber les anticorps dans de bonnes conditions et d'éviter l'adsorption des nanoparticules sur la verrerie.

Des couronnes à haute densité de PEG ont également été générées sur les AuNPs destinées à être biofonctionnalisées avec la stratégie de Couplage Amine (Figure 3.2). Ces couronnes étaient composées de mPEG et Thiol-PEG-CH₂COOH (PEG-COOH). Pour cette stratégie, l'objectif était de greffer les anticorps sur les nanoparticules de manière covalente par leurs amines primaires libres grâce à la chimie NHS-EDC (voir section 2.2.3.1). En plus de ce greffage covalent, il est anticipé que les anticorps s'adsorberont également ici de manière non-spécifique sur les nanoparticules. Les AuNPs nues ont été incubées avec des proportions de mPEG et PEG-COOH valant 95 : 5 et 70 : 30 afin de produire des AuPEG_{HD}-COOH_{5%} et AuPEG_{HD}-COOH_{30%}, respectivement. La concentration totale en PEG était toujours de 3.6 μ M lors des incubations avec les AuNPs afin de générer des couronnes de PEG possédant la même densité que les AuPEG_{HD}. Après l'incubation, les AuPEG_{HD}-COOH_{5%} et AuPEG_{HD}-COOH_{30%} ont aussi été resuspendues dans du PBST. Il est intéressant de noter que la véritable composition des couronnes de PEG sur les nanoparticules sera différente des compositions des mélanges utilisés lors des incubations puisqu'il a été montré que la présence de mPEG gêne le greffage de PEG-COOH sur les AuNPs [64]. La couverture des AuNPs avec 100 % de PEG-COOH n'a pas été étudiée. En effet, il a été imaginé que chaque anticorps se lierait alors à plusieurs PEG-COOH de manière covalente. Cette immobilisation rendrait l'anticorps non bioactif [231] tout en limitant la capacité de chargement des AuNPs pour des raisons stériques, diminuant ainsi l'avidité globale des nanoparticules.

Les propriétés optiques et physiques de toutes les nanoparticules PEGylées à haute densité ont ensuite été caractérisées par spectroscopie UV-Vis et DLS (Figure 5.2). Toutes les nanoparticules ont conservé des propriétés de résonance optique LSPR similaires aux AuNPs nues (Figure 5.2.A), ce qui était essentiel pour les futures applications en imagerie. La formation de couronnes de PEG à haute densité a provoqué un changement dans les longueurs d'onde de résonance λ_{LSPR} des nanoparticules par rapport à celle des AuNPs nues, où λ_{LSPR} a été calculée à 564 ± 1 nm. La λ_{LSPR} des AuPEG_{HD}, AuPEG_{HD}-COOH_{5%} et AuPEG_{HD}-COOH_{30%} ont toutes été calculées à 569 ± 1 nm, ce qui était prévisible puisque les chaînes de mPEG et PEG-COOH avaient toutes deux le même poids moléculaire, 5 kDa. Comme pour les AuNPs nues, l'indice de polydispersité de toutes les nanoparticules PEGylées à haute densité est de plus resté inférieur à 0.08 (Figure 5.2.B). Cela suggère que les nanoparticules n'ont pas été déstabilisées par la PEGylation puis la purification par centrifugation, et qu'elles sont restées hautement monodisperses (le seuil de 0.08 pour la monodispersité est indiqué par la norme ISO 22412:2017

[194]). Puisqu'une seule population a été détectée dans chaque échantillon, le paramètre *Z-average* de toutes les nanoparticules mesurées par DLS peut être interprété comme leurs diamètres hydrodynamiques moyens (Figure 5.2.C). Les diamètres hydrodynamiques de toutes les nanoparticules PEGylées à haute densité étaient significativement différents de celui des AuNPs nues, mesuré à 103 ± 1 nm. Il s'agit d'une forte preuve de la PEGylation des nanoparticules. Comme avec les calculs de λ_{LSPR} , il n'y avait aucune différence entre les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules incubées avec des proportions différentes de mPEG : PEG-COOH, qui ont tous été mesurés à 131 ± 1 nm.

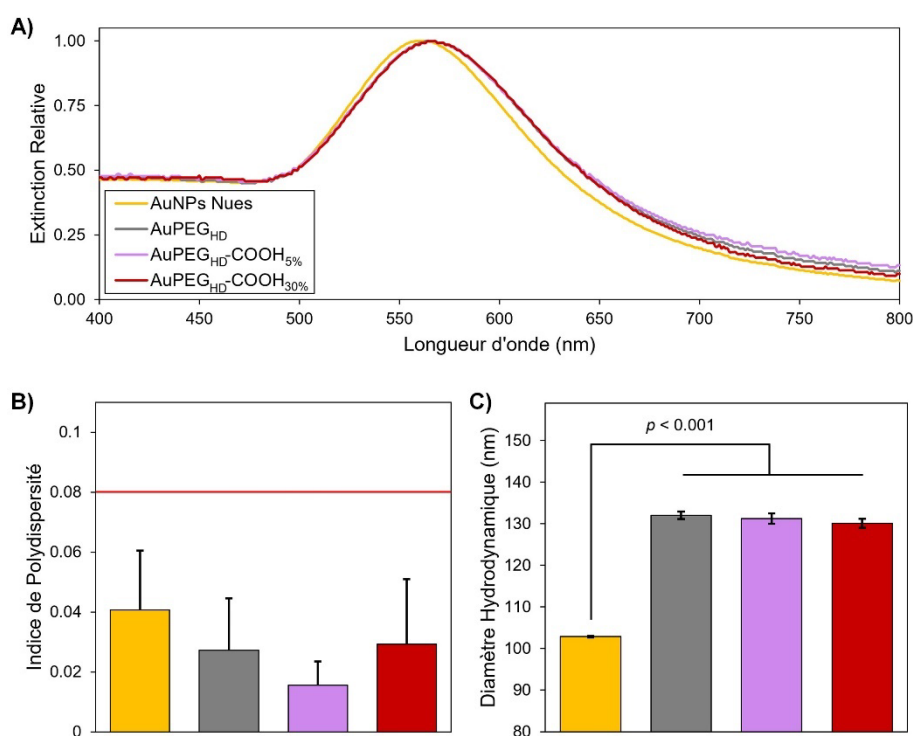


Figure 5.2. Caractérisation des NPs PEGylées à haute densité

A) Spectres d'extinction relative des nanoparticules. B) Indices de polydispersité des nanoparticules. La ligne rouge indique le seuil en dessous duquel les nanoparticules sont considérées comme étant hautement monodisperses. C) Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules. Les barres d'erreur représentent les écarts-types standards calculés à partir de $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois. La signification statistique des différences observées entre les échantillons a été évaluée par *t*-test bilatéral de Student.

5.1.2 AuNPs PEGylées à basse densité pour la stratégie de greffage de Ecoil-TZM par Interaction Superhélice E/K

Dans cette section, la stratégie dénommée Interaction Superhélice E/K dans la Figure 3.2 a été étudiée en greffant des peptides Kcoil sur les AuNPs avant de les biofonctionnaliser avec les anticorps Ecoil-TZM (Ecoil étant le peptide complémentaire à Kcoil). Les peptides Kcoil contiennent des résidus lysines, leur conférant ainsi une charge nette positive lorsque le pH est proche de 7.4 [181]. Au contraire, les molécules de citrate stabilisant les AuNPs nues sont chargées négativement à ce pH. Par conséquent, les peptides interagiront avec les molécules de citrate si les AuNPs nues sont directement incubées avec du Kcoil, ce qui provoquera alors l'agrégation des nanoparticules. C'est pourquoi les AuNPs ont ici été préalablement stabilisées avec du PEG avant d'être incubées avec les peptides Kcoil.

Les conditions de PEGylation les plus appropriées doivent être déterminées afin de former des couronnes de PEG à basse densité à la surface des AuNPs, afin de laisser assez de place pour le greffage des peptides Kcoil tout en stabilisant les nanoparticules. Pour cela, les AuNPs nues ont été incubées avec plusieurs concentrations en mPEG, allant de 0 à 1.8 μM . La polydispersité des nanoparticules ensuite resuspendues dans du citrate a été évaluée avec et sans leur incubation subséquente dans une solution de Kcoil à 0.35 μM (Figure 5.3.A). Après la PEGylation, toutes les nanoparticules sont restées hautement monodisperses avant l'ajout des peptides Kcoil. Comme anticipé, les nanoparticules insuffisamment recouvertes de mPEG (incubation à 0 et 0.1 μM) se sont agrégées après l'ajout des peptides. Les nanoparticules recouvertes avec beaucoup de mPEG (1.3 et 1.8 μM) ont également été déstabilisées, mais la raison de cette déstabilisation n'a pas été étudiée plus en détail. Par conséquent, l'incubation avec 0.4 μM de mPEG a été retenue comme condition définitive pour produire des AuNPs PEGylées à basse densité (AuPEG_{LD}), car cette condition a permis de produire des nanoparticules stables avec et sans l'ajout du Kcoil. Le diamètre hydrodynamique des AuPEG_{LD} a été mesuré par DLS et valait 125 ± 1 nm (Figure 5.3.D, barre bleue), indiquant que la PEGylation a effectivement eu lieu et que la densité de PEG dans la couronne était plus basse que sur les AuPEG_{HD}, pour qui le diamètre hydrodynamique valait 131 ± 1 nm (Figure 5.2.C, barres grises).

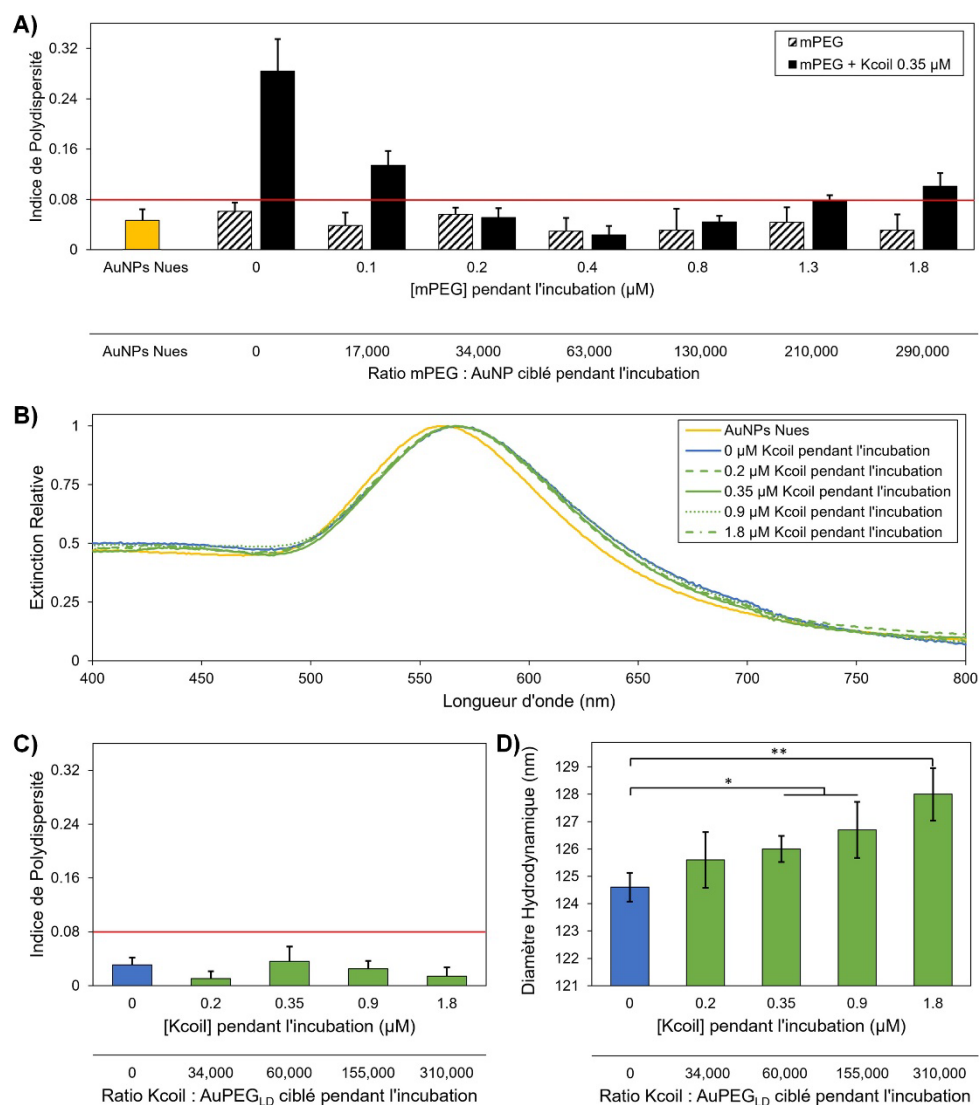


Figure 5.3. Caractérisation des NPs PEGylées à basse densité et du greffage de Kcoil

A) Indices de polydispersité des nanoparticules dans du citrate après la PEGylation à basse densité. La ligne rouge indique le seuil en dessous duquel les nanoparticules sont considérées comme étant hautement monodisperses. B) Spectres d'extinction relative des nanoparticules. C) Indices de polydispersité des AuPEG_{LD} après incubation avec du peptide Kcoil. D) Diamètres hydrodynamiques des AuPEG_{LD} après incubation avec du peptide Kcoil. Les barres d'erreur représentent les écarts-types standards calculés à partir de $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois. La signification statistique à (*) $p < 0.05$ et (**) $p < 0.01$ des différences observées entre les échantillons a été évaluée par t -test bilatéral de Student.

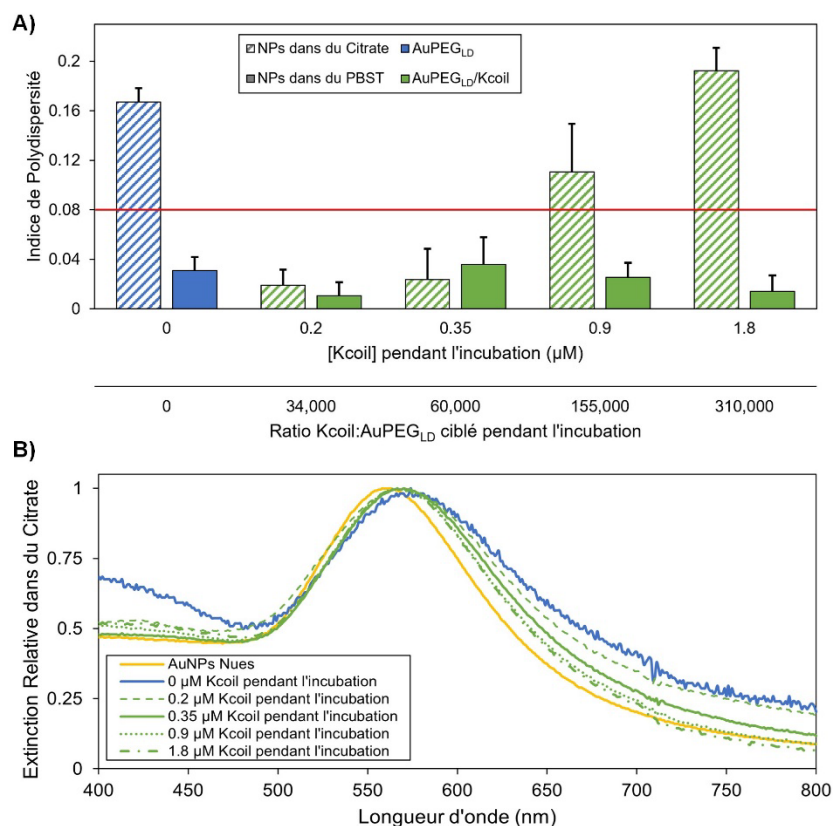


Figure 5.4. Rôle du tampon sur la stabilité des NPs après greffage du Kcoil

A) Indices de polydispersité des nanoparticules resuspendues dans du citrate (barres hachurées) et dans du PBST (barres pleines) après incubation avec du Kcoil. La ligne rouge indique le seuil en dessous duquel les nanoparticules sont considérées comme étant hautement monodisperses. B) Spectres d'extinction relative des nanoparticules resuspendues dans du citrate après incubation avec du Kcoil. Les barres d'erreur représentent les écarts-types standards calculés à partir de $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois.

Les conditions optimales pour le greffage du Kcoil sur les AuPEG_{LD} ont ensuite été recherchées en incubant ces nanoparticules avec du peptide Kcoil à plusieurs concentrations, allant de 0 à 1.8 μM. Après l'incubation, les nanoparticules resuspendues dans du PBST ont toutes conservé leurs propriétés de résonance optique LSPR et avaient des λ_{LSPR} différentes allant de 568 ± 1 nm à 569 ± 1 nm, mais sans différences significatives (Figure 5.3.B). Les nanoparticules étaient également toutes restées hautement monodisperses. Les diamètres hydrodynamiques moyens des AuPEG_{LD} incubées avec 0.35 à 1.8 μM de peptide Kcoil étaient significativement plus

grands que ceux des AuPEG_{LD} sans peptides, indiquant que du Kcoil a effectivement été greffé sur les nanoparticules dans ces conditions. Il est intéressant de noter que AuPEG_{LD} et AuPEG_{LD}/Kcoil doivent être resuspendues dans du PBST pour garantir leur monodispersité. En effet, les AuPEG_{LD} incubées avec 0, 0.9 et 1.8 μM de peptide Kcoil ont été déstabilisées et caractérisées comme polydisperses après avoir été resuspendues dans du citrate (Figure 5.4). En prenant tous ces résultats en considération, l'incubation des AuPEG_{LD} avec du Kcoil à 0.35 μM a été retenue comme condition définitive pour produire les AuPEG_{LD}/Kcoil.

5.2 Biofonctionnalisation des AuNPs avec du Trastuzumab

Ensuite, de l'anticorps Trastuzumab (TZM) a été incubé avec les cinq types de nanoparticules PEGylées évoquées à la section 5.1 : AuPEG_{HD}, AuPEG_{HD}-COOH_{5%}, AuPEG_{HD}-COOH_{30%}, AuPEG_{LD} et AuPEG_{LD}/Kcoil. Les conditions d'incubation de TZM ont été définies selon deux paramètres : i) la concentration des anticorps en solution, et ii) le nombre d'anticorps par nanoparticules. En effet, le nombre de nanoparticules en suspension variait selon les échantillons à cause des pertes observées durant les étapes de fabrication en amont. Afin d'avoir un bon contrôle sur les conditions d'incubation avec les anticorps selon les deux paramètres définis précédemment, la concentration en nanoparticules dans les échantillons a été systématiquement mesurée avant l'incubation pour ajuster la quantité d'anticorps à ajouter.

Une fois l'incubation avec les anticorps terminée et les nanoparticules resuspendues dans du PBST, leur monodispersité a été confirmée par DLS (Figure 5.5.A et 5.5.B). De même, la rétention de leurs propriétés de résonance optique LSPR a été vérifiée par spectroscopie UV-Vis (Figure 5.5.C et 5.5.D). Le diamètre hydrodynamique de ces nanoparticules tout juste biofonctionnalisées a été mesuré pour déterminer si la DLS était une technique assez sensible pour suivre l'immobilisation des anticorps. Le greffage de TZM sur les nanoparticules a également été apprécié par quantification des acides aminés avec du TNBS après digestion de l'or et hydrolyse des anticorps par HCl (voir Figure 3.1). Ces mesures ont permis d'évaluer l'immobilisation de TZM sur les nanoparticules de manière quantitative afin de comparer les stratégies de biofonctionnalisation.

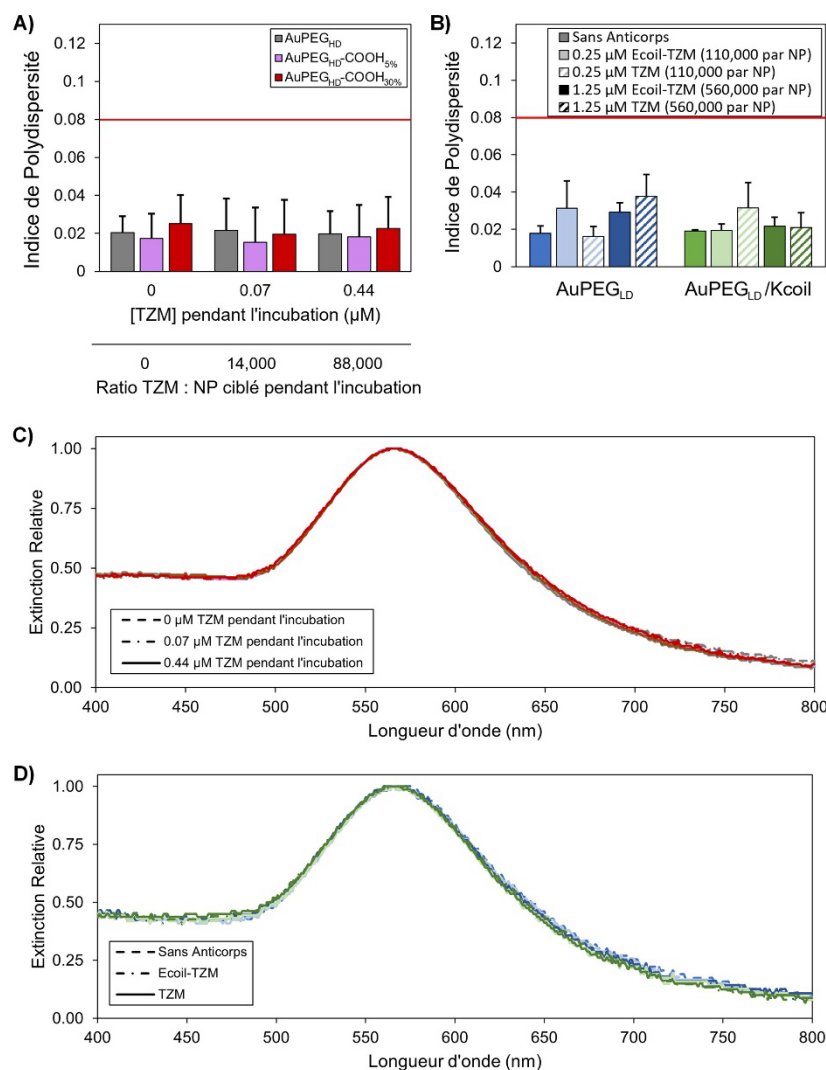


Figure 5.5. Polydispersité et propriétés optiques des NPs biofonctionnalisées avec du TBM

A) Indices de polydispersité des nanoparticules PEGylées à haute densité après leur incubation avec TBM de type naturel. La ligne rouge indique le seuil en dessous duquel les nanoparticules sont considérées comme étant hautement monodisperses. B) Indices de polydispersité des nanoparticules PEGylées à basse densité après incubation avec Ecoil-TBM et TBM de type naturel. C) Spectres d'extinction relative des nanoparticules PEGylées à haute densité après leur incubation avec TBM de type naturel. Le code couleur est identique à A). D) Spectres d'extinction relative des nanoparticules PEGylées à haute densité après leur incubation avec TBM de type naturel. Le code couleur est identique à B). Les barres d'erreur représentent les écarts-types standards calculés à partir de $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois.

5.2.1 Immobilisation de TZM de type naturel sur les nanoparticules PEGylées à haute densité pour les stratégies d'Adsorption Non-Spécifique et de Couplage Amine

La stratégie d'Adsorption Non-Spécifique a été mise en œuvre en incubant simplement du TZM de type naturel avec les AuPEG_{HD} (voir Figure 3.2). Pour cette stratégie, les mesures avec TNBS ont indiqué que TZM était effectivement greffé sur les AuPEG_{HD}, avec une augmentation statistiquement significative lorsque l'incubation était réalisée à 0.44 μM par rapport à 0.07 μM (Figure 5.6.A, comparer les deux barres grises). De son côté, la stratégie de Couplage Amine a nécessité l'activation des PEG-COOH sur les AuPEG_{HD}-COOH_{5%} et AuPEG_{HD}-COOH_{30%} avec la chimie NHS-EDC avant l'incubation avec du TZM de type naturel (voir Figure 3.2). Lors de l'incubation avec 0.07 μM de TZM, une augmentation significative de la quantité d'anticorps greffés sur les nanoparticules a été observée sur les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} par rapport aux AuPEG_{HD}-COOH_{5%} (Figure 5.6.A, comparer les barres d'abscisses 0.07 μM). Ce résultat confirme par la même occasion que suffisamment de PEG-COOH était accessible et activé sur les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} pour procéder au greffage covalent des anticorps.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer pourquoi une augmentation significative de la quantité d'anticorps immobilisés par Couplage Amine n'a été observée que sur les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} lorsque TZM de type naturel était incubé à 0.07 μM . Premièrement, cette condition est celle pour laquelle le plus de PEG-COOH a été immobilisé à la surface des AuNPs tandis que l'adsorption non-spécifique des anticorps était limitée par leur faible concentration pendant l'incubation. Deuxièmement, l'utilisation obligatoire de PEG à 5 kDa pour stabiliser les larges AuNPs peut avoir mené à un greffage des mPEG et PEG-COOH dans des conformations « champignon » sur les nanoparticules [61]. Dans cette conformation, la probabilité que l'acide carboxylique en tête de PEG-COOH soit en réalité enfoui dans le polymère est haute. Par conséquent, tous les acides carboxyliques ne seraient pas accessibles pour réagir avec les anticorps. Greffer 100 % de PEG-COOH sur les AuNPs aurait alors pu permettre le greffage covalent de plus de TZM sur les nanoparticules sans pour autant les immobiliser de manière inactive (voir section 5.1.1). Finalement, les acides carboxyliques sont chargés négativement à pH = 7.4 et pourraient avoir été attirés vers la surface chargée positivement des AuNPs, les empêchant de réagir avec TZM. Toutes ces hypothèses nécessiteront plus de travail pour être vérifiées.

Il est intéressant de noter que l'immobilisation des anticorps n'a exercé aucune influence significative sur les diamètres hydrodynamiques de toutes les nanoparticules (Figure 5.6.B). C'est pourquoi la quantification par TNBS reste essentielle pour caractériser l'immobilisation des anticorps sur les nanoparticules d'or, bien que les mesures de DLS restent cruciales pour évaluer la dispersité des échantillons.

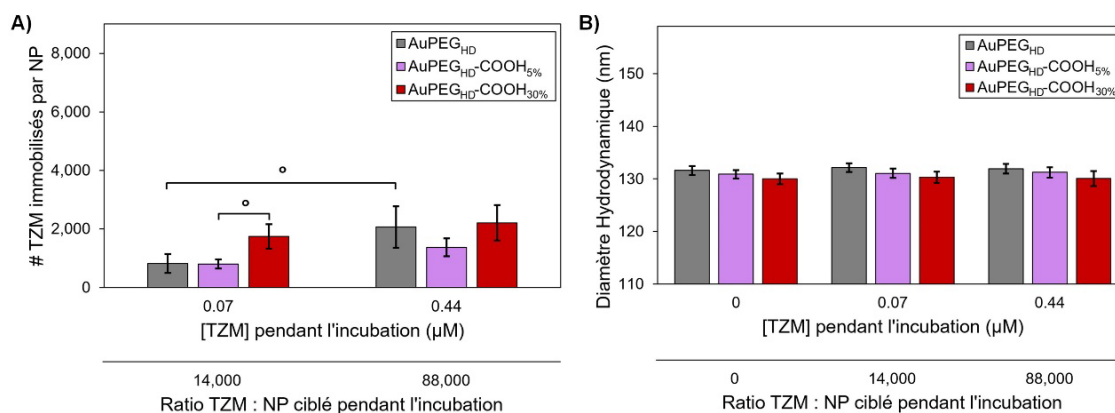


Figure 5.6. Analyse de l'immobilisation de TZM sur AuNPs PEGylées à haute densité

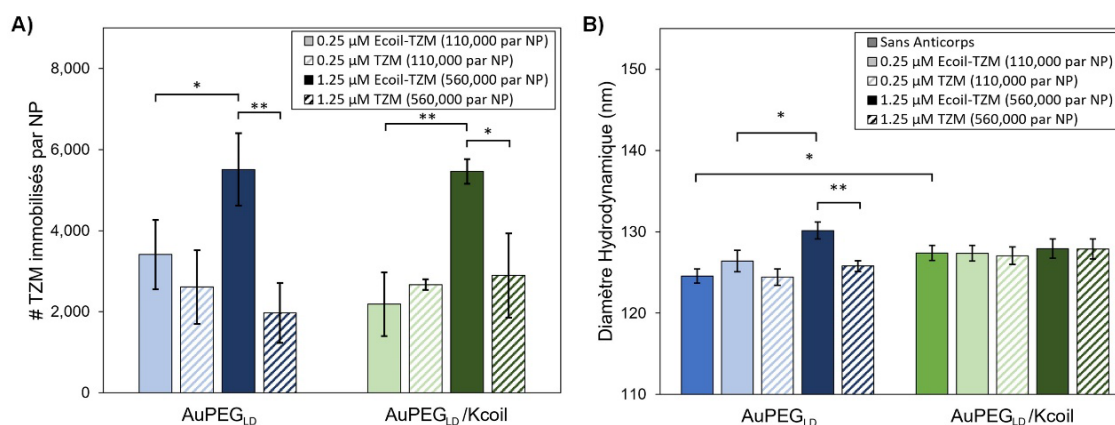
A) Nombre de TZM de type naturel immobilisés par NP avec les stratégies d'Adsorption Non-Spécifique et de Couplage Amine. B) Diamètres hydrodynamiques des NPs PEGylées à haute densité après immobilisation de TZM de type naturel. Les barres d'erreur représentent les écarts-types standards calculés à partir de $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré 5 fois. La signification statistique à $(^{\circ}) p < 0.1$ des différences observées entre les échantillons a été évaluée par t -tests bilatéral de Student.

5.2.2 Immobilisation de Ecoil-TZM sur les nanoparticules PEGylées à basse densité pour la stratégie d'Interaction Superhélice E/K

La stratégie d'Interaction Superhélice E/K (Figure 3.2) a été étudiée en incubant AuPEG_{LD}/Kcoil avec du Ecoil-TZM. Les peptides Ecoil sont situés au C-terminal des chaînes lourdes des anticorps, permettant donc une immobilisation orientée sur les nanoparticules. Afin d'évaluer l'adsorption non-spécifique des anticorps sur AuPEG_{LD}/Kcoil, du TZM de type naturel

a également été incubé avec ces nanoparticules. Du Ecoil-TZM et du TZM de type naturel ont aussi été incubés avec des AuPEG_{LD} pour évaluer leurs adsorptions respectives sur ces nanoparticules.

Comme illustré sur la Figure 5.7.A (comparer les deux barres vert foncé sur la droite), les mesures avec TNBS ont montré que l'incubation de 1.25 μ M de Ecoil-TZM sur les AuPEG_{LD}/Kcoil a mené à l'immobilisation de plus d'anticorps sur les nanoparticules par rapport à l'incubation avec 1.25 μ M de TZM de type naturel ($5,500 \pm 300$ Ecoil TZM ont été immobilisés sur les AuPEG_{LD}/Kcoil contre $2,900 \pm 1,000$ TZM de type naturels). Cependant, une quantité similaire de Ecoil-TZM et TZM de type naturel ont été immobilisés lorsque leurs incubations ont été réalisées à 0.25 μ M (Figure 5.7.A, comparer les deux barres vert clair). Cela signifie que le greffage des anticorps par Interaction Superhélice E/K n'a pu être vérifié qu'avec l'incubation à 1.25 μ M.



Il est intéressant de noter que les mêmes résultats ont été observés sur les AuPEG_{LD} sans peptide Kcoil à leur surface, i.e., une différence significative dans l'immobilisation des anticorps n'a été observée qu'avec l'incubation à 1.25 μ M (Figure 5.7.A, comparer les deux barres bleu foncé et les deux barres bleu clair). Puisqu'il n'y avait pas de Kcoil sur la surface de ces nanoparticules, l'immobilisation de Ecoil-TZM n'a pas pu être assurée par l'interaction entre Ecoil et Kcoil. Puisque les deux peptides Ecoil sur les anticorps sont chargés négativement à pH = 7.4 [181], l'interaction de Ecoil-TZM avec la surface chargée positivement des nanoparticules est très certainement assurée par ses peptides Ecoil. L'immobilisation de Ecoil-TZM sur les AuPEG_{LD} ne portant pas de Kcoil sera à présent définie comme une nouvelle stratégie de biofonctionnalisation, appelée l'Adsorption Spécifique des anticorps par leurs peptides Ecoil.

Lorsque les incubations ont été réalisées avec 1.25 μ M d'anticorps, deux fois plus de Ecoil-TZM ont donc été immobilisés par rapport aux TZM de type naturel avec les deux stratégies reposant sur les peptides Coils. Dans les deux cas, au moins la moitié des Ecoil-TZM sont donc immobilisés par des interactions impliquant leurs peptides Ecoil. Sur les AuPEG_{LD}, au moins la moitié des Ecoil-TZM immobilisés sont adsorbés par leurs peptides Ecoil. Sur les AuPEG_{LD}/Kcoil, au moins la moitié des Ecoil-TZM immobilisés sont soit adsorbés par leurs peptides Ecoil, soit greffés par des interactions superhélices E/K. Déterminer le mécanisme exact de l'immobilisation des Ecoil-TZM sur les AuPEG_{LD}/Kcoil a peu d'importance, car les anticorps sont greffés sur les nanoparticules de manière orientée dans les deux cas. En conclusion, les deux stratégies de biofonctionnalisation reposant sur les peptides Coils permettent une immobilisation de la majorité des anticorps avec leurs régions Fab bioactives orientées vers l'extérieur.

Finalement, obtenir ces mêmes conclusions sur AuPEG_{LD} aurait été possible grâce aux mesures en DLS (Figure 5.7.B, barres bleues). Cependant, elles n'auraient pas pu être obtenues sur les AuPEG_{LD}/Kcoil, car aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les diamètres hydrodynamiques de toutes ces nanoparticules (Figure 5.7.B, barres vertes).

5.3 Détection des cellules de cancer du sein avec les AuNPs biofonctionnalisées

La capacité des nanoparticules biofonctionnalisées avec du TZM à se lier au récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) sur des cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 a ensuite été évaluée. Ces deux lignées cellulaires proviennent de cancers du sein : les cellules MDA-MB-231 expriment des niveaux de base de HER2 tandis que les cellules SK-BR-3 le surexpriment [222]. C'est pourquoi les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 ont été considérées comme des cellules respectivement HER2(-) et HER2(+), et seront appelées de cette manière dans le reste de cette étude. La surexpression de HER2 par les cellules HER2(+) a tout d'abord été confirmée par immunofluorescence (Figure 5.8). L'immunofluorescence a été réalisée avec les TZM de type naturel et Ecoil-TZM (Figure 5.8.A et 5.8.B, images en bas à droite, respectivement) utilisés pour biofonctionnaliser les nanoparticules, démontrant ainsi la capacité de ces anticorps à se lier à HER2. Dans cette étude, le logiciel CellProfiler a en outre été utilisé pour analyser avec un haut débit les images issues des observations au microscope en champ sombre [227]. La capacité du logiciel à détecter les noyaux, membranes et nanoparticules sur les images, ainsi que sa capacité à dénombrer les nanoparticules, ont été vérifiées (Figure 5.9).

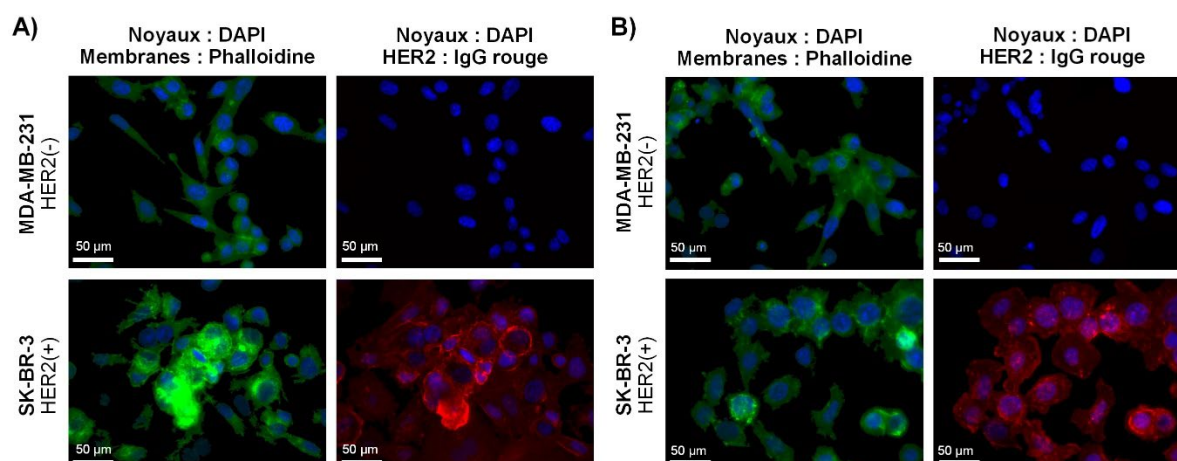


Figure 5.8. Niveaux d'expression de HER2 sur les cellules de cancer du sein par immunofluorescence avec du TZM de type naturel et du Ecoil-TZM

A) Études d'immunofluorescence avec du TZM de type naturel comme anticorps primaire sur les cellules MDA-MB-231 (HER2(-), images du haut) et SK-BR-3 (HER2(+), images du dessous).

B) Études d'immunofluorescence avec du Ecoil-TZM comme anticorps primaire sur les cellules MDA-MB-231 (HER2(-), images du haut) et SK-BR-3 (HER2(+), images du dessous). Sur toutes les images, les noyaux sont représentés en bleu (fluorescence de DAPI), les membranes sont représentées en vert (fluorescence de le phalloïdine), et les HER2 sont représentés en rouge (fluorescence de l'anticorps secondaire). Les trois colorations ont été réalisées simultanément sur les cellules, mais sont représentées deux par deux pour des raisons de visibilité. Les échelles indiquent toutes 50 μm .

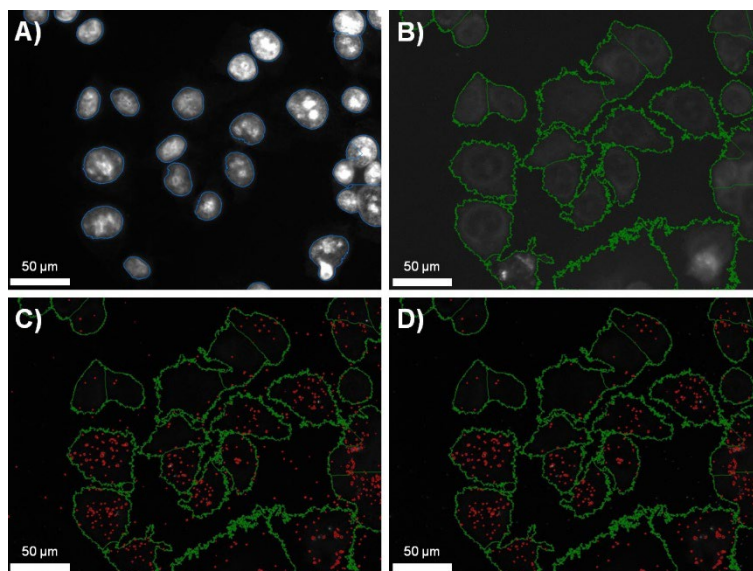


Figure 5.9. Exemple d'analyse d'image capturée sur le microscope par le logiciel CellProfiler, sur des cellules SK-BR-3

L'analyse de chaque image repose sur l'utilisation interdépendante de trois photographies de la même région de la lame de microscopie : fluorescence de DAPI (contours bleus), fluorescence de la phalloïdine (contours verts) et illumination latérale des nanoparticules (contours rouges). L'analyse de toutes les données utilisées dans cette étude a été réalisée de la même manière selon le procédé décrit ci-après. A) La photographie du DAPI a été analysée en premier afin de détecter les noyaux. B) Les membranes cellulaires ont ensuite été identifiées sur la photographie de la phalloïdine en propageant le signal autour de la position des noyaux, gardée en mémoire par le logiciel. C) Les nanoparticules (ici AuPEG_{LD}/Kcoil incubées avec du Ecoil-TZM à 1.25 µM) sont identifiées sur la photographie de l'illumination latérale et leur position a été superposée avec celle des membranes. D) Les nanoparticules dans l'arrière-fond ont été numériquement éliminées et celles sur les membranes ont été quantifiées par le logiciel. Les nanoparticules dans l'arrière-fond ont également été quantifiées par le logiciel avant leur élimination. Les échelles indiquent toutes 50 µm.

Les AuPEG_{HD} sans anticorps et les AuPEG_{HD} biofonctionnalisées avec 0.07 et 0.44 μM de TZM de type naturel par la stratégie d'Adsorption Non-Spécifique ont été incubées avec les cellules de cancer du sein HER2(+) et HER2(-) (Figure 5.10.A, barres pleines et hachurées, respectivement). L'attachement de ces trois types de nanoparticules était similaire pour les cellules HER2(-), et a donc été considéré comme leur niveau de base d'attachement non-spécifique (Figure 5.10.A, comparer les trois barres hachurées). Les AuPEG_{HD} sans anticorps et biofonctionnalisées avec 0.07 μM de TZM n'ont pas pu discriminer les cellules HER2(+) et HER2(-). En revanche, l'attachement des AuPEG_{HD} biofonctionnalisées avec 0.44 μM de TZM sur les cellules HER2(+) était significativement plus élevé que sur les cellules HER2(-), avec respectivement $16,000 \pm 4,000$ et $2,500 \pm 1,800$ nanoparticules attachées par mm^2 de membrane cellulaire. L'attachement sur les cellules HER2(+) était aussi significativement plus élevé pour les AuPEG_{HD} biofonctionnalisées avec 0.44 μM de TZM que pour les AuPEG_{HD} sans anticorps (dont l'attachement aux cellules est non-spécifique ; Figure 5.10.A, comparer les barres pleines). Tous ces résultats indiquent que les AuPEG_{HD} biofonctionnalisées avec 0.44 μM de TZM permettent effectivement une détection spécifique des HER2 sur les cellules de cancer du sein. Cette détection spécifique de HER2 peut être directement visualisée par microscopie en champ sombre par illumination latérale, comme illustré sur la Figure 5.11.A.

En ce qui concerne la stratégie de biofonctionnalisation par Couplage Amine, les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} incubées avec 0.44 μM de TZM, ainsi que toutes les AuPEG_{HD}-COOH_{5%}, ont été écartées des essais cellulaires, car l'adsorption non-spécifique des anticorps a probablement dominé le couplage par leurs amines sur les nanoparticules (Figure 5.6.A). Seules les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} sans anticorps et les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} incubées avec 0.07 μM de TZM de type naturel ont été étudiés lors des essais sur les cellules HER2(+) et HER2(-) (Figure 5.10.B). L'attachement des AuPEG_{HD}-COOH_{30%} sans anticorps sur les cellules a été d'abord étudié pour définir le niveau de base pour l'attachement non-spécifique sur les cellules. Cependant, un très haut niveau d'attachement non-spécifique des nanoparticules est observable ici, sur les cellules et sur l'arrière-fond de la lame (Figure 5.10.). Par exemple, cet attachement non-spécifique atteignait respectivement $66,000 \pm 3,000$ et $34,000 \pm 10,000$ nanoparticules par mm^2 de membrane cellulaire sur les cellules HER2(+) et HER2(-). Les nanoparticules préparées par Couplage Amine ont tout de même été quantifiées une fois attachées aux cellules (Figure 5.10.B), mais le très haut niveau d'attachement non-spécifique observé dans tous les cas ne permet pas une interprétation fidèle des

résultats. Pour cela, il sera nécessaire d'optimiser le protocole de biofonctionnalisation par Couplage Amine et d'incubation des nanoparticules avec les cellules afin de réduire l'attachement non-spécifique.

Ensuite, l'attachement des nanoparticules PEGylées à basse densité et biofonctionnalisées avec les deux stratégies reposant sur les peptides Coils (i.e., l'Adsorption Spécifique des anticorps par leurs peptides Ecoil, et Interaction Superhélice E/K) sur les cellules a été évalué. Ces stratégies ont été étudiées en incubant du Ecoil-TZM à $1.25 \mu\text{M}$ avec les AuPEG_{LD} et AuPEG_{LD}/Kcoil pour les biofonctionnaliser. L'attachement de ces AuPEG_{LD} et AuPEG_{LD}/Kcoil biofonctionnalisées avec Ecoil-TZM sur les cellules HER2(+) a été évalué à $12,000 \pm 1,900$ et $9,500 \pm 2,000$ nanoparticules par mm^2 de membrane cellulaire, respectivement. L'attachement de ces nanoparticules biofonctionnalisées aux cellules HER2(+) était significativement plus élevé que l'attachement de ces nanoparticules sans Ecoil-TZM aux mêmes cellules (Figure 5.10.C, comparer les barres foncées pleines et les barres claires pleines, respectivement), et était également significativement plus élevé que l'attachement sur les cellules HER2(-) (Figure 5.10.C, comparer les barres foncées pleines et les barres foncées hachurées, respectivement). Ainsi, les AuPEG_{LD} et AuPEG_{LD}/Kcoil biofonctionnalisées avec du Ecoil-TZM à $1.25 \mu\text{M}$ permettent la détection des cellules HER2(+).

Cependant, l'attachement des AuPEG_{LD} sans Ecoil-TZM sur les cellules HER2(-) était plus élevé que l'attachement des AuPEG_{LD} avec Ecoil-TZM sur ces mêmes cellules (Figure 5.10.C, barres bleu clair hachurées). Lorsque les AuPEG_{LD} ne portent pas de Ecoil-TZM, leur attachement non-spécifique sur l'arrière-fond de la lame est également plus élevé que lorsque des Ecoil-TZM sont immobilisés à leur surface (Figure 5.11.B). Ce phénomène est peut-être dû à la basse densité de la couronne autour de ces nanoparticules, qui ne contient ni anticorps ni Kcoil. Cette faible densité dans la couronne permet alors peut-être plus d'attachement non-spécifique entre la surface des AuNPs et les protéines membranaires sur les cellules ou la BSA bloquant la surface en verre des lames. C'est un problème critique pour les futures applications cliniques, car des diagnostics faux-positifs pourraient alors être obtenus si les Ecoil-TZM adsorbés par leurs peptides Ecoil venaient à se désorber des AuPEG_{LD} durant les procédures. En conclusion, seule la stratégie de biofonctionnalisation des AuPEG_{LD}/Kcoil par Interaction Superhélice E/K avec Ecoil-TZM permet la détection spécifique et fiable des cellules HER2(+) ainsi que leur discrimination des cellules HER2(-) avec des nanoparticules initialement PEGylées à basse densité.

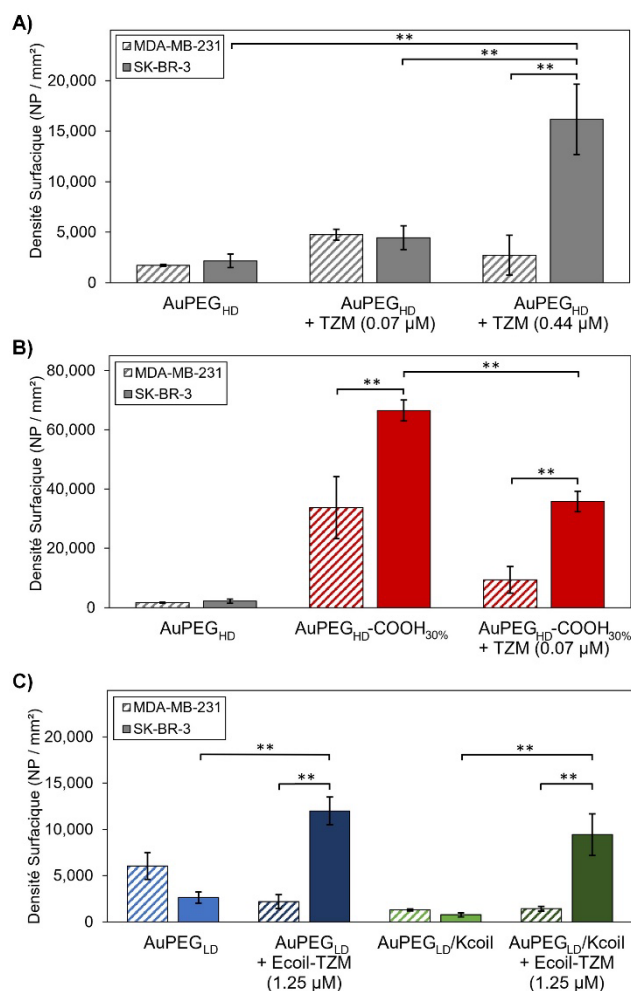


Figure 5.10. Quantification des nanoparticules attachées aux cellules de cancer du sein

A) Densité surfacique cellulaire de NPs biofonctionnalisées par Adsorption Non-Spécifique, les AuPEG_{HD} ont été incubées avec du TZM de type naturel à 0, 0.07 et 0.44 µM. A) Densité surfacique cellulaire de NPs biofonctionnalisées par Couplage Amine, les AuPEG_{HD}-COOH_{30%} ont été incubées avec du TZM de type naturel à 0 et 0.07 µM. A) Densité surfacique cellulaire de NPs biofonctionnalisées par les stratégies reposant sur les peptides Coils, les AuPEG_{LD} et AuPEG_{LD}/Kcoil ont été incubées avec du Ecoil-TZM à 0 et 1.25 µM. Dans toute la Figure, les résultats obtenus avec les cellules MDA-MB-231 (HER2(-)) et SK-BR-3 (HER2(+)) sont respectivement représentés par des barres hachurées et pleines. Les barres d'erreur représentent les écarts-types standards calculés à partir de $n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré dans 3 régions différentes. La signification statistique à (**) $p < 0.01$ des différences observées entre les échantillons a été évaluée par t -tests bilatéral de Student.

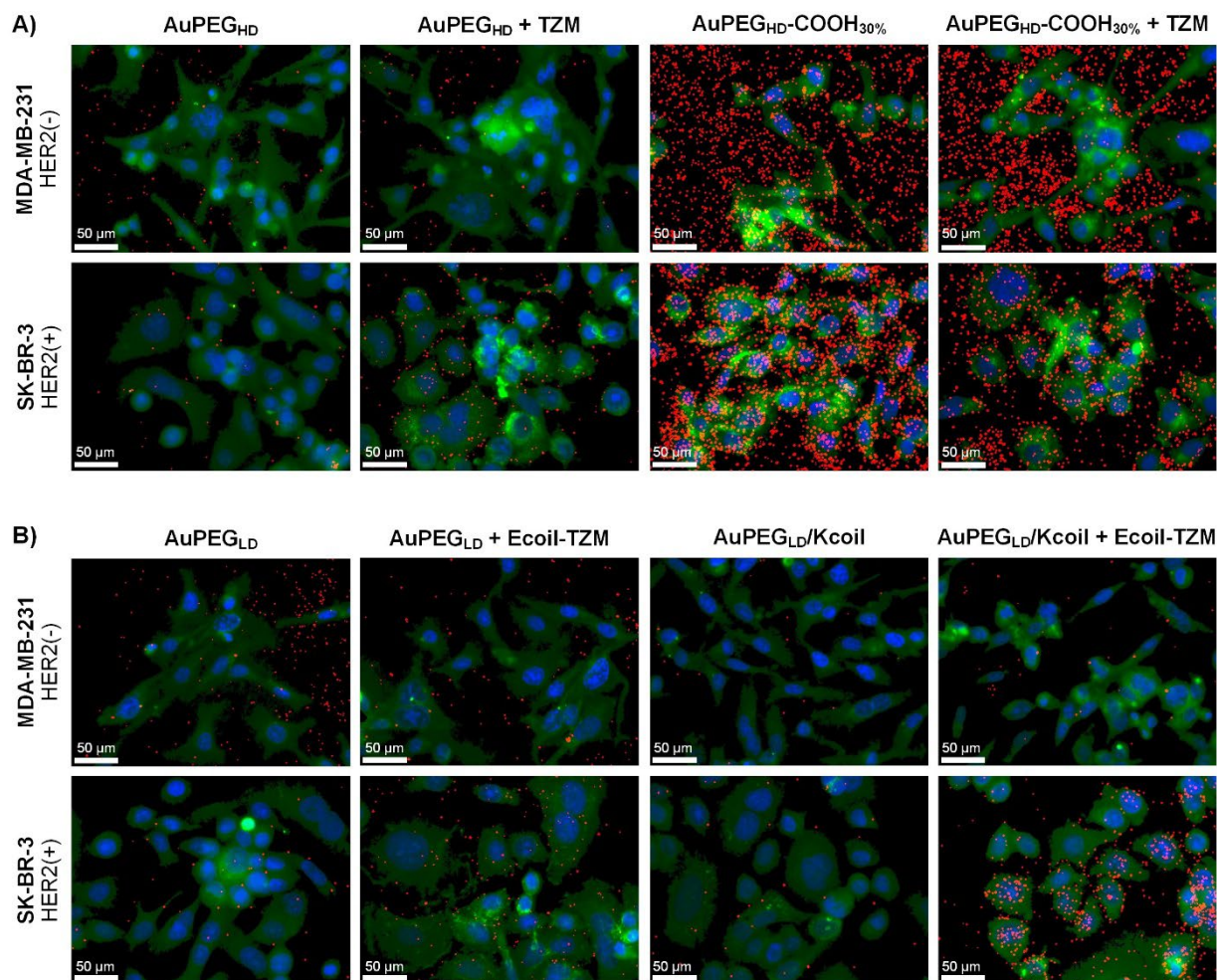


Figure 5.11. Attachement des nanoparticules sur les cellules de cancer du sein

A) Observation de l'attachement des nanoparticules PEGylées à haute densité sur les cellules MDA-MB-231 (HER2(-), images du haut) et SK-BR-3 (HER2(+), images du bas) (de gauche à droite : AuPEG_{HD}, AuPEG_{HD} incubées avec du TZM de type naturel à 0.44 μM, AuPEG_{HD}-COOH_{30%}, et AuPEG_{HD}-COOH_{30%} incubées avec du TZM de type naturel à 0.07 μM).

B) Observation de l'attachement des nanoparticules PEGylées à basse densité sur les cellules MDA-MB-231 (HER2(-), images du haut) et SK-BR-3 (HER2(+), images du bas) (de gauche à droite : AuPEG_{LD}, AuPEG_{LD} incubées avec du Ecoil-TZM à 1.25 μM, AuPEG_{LD}/Kcoil, et AuPEG_{LD}/Kcoil incubées avec du Ecoil-TZM à 1.25 μM).

Finalement, la capacité des nanoparticules biofonctionnalisées par les stratégies d'Adsorption Non-Spécifique de TZM et d'Interaction Superhélice E/K à permettre la détection qualitative des cellules HER2(+) a été évaluée par microscopie en champ sombre. Il faut noter ici que les deux autres stratégies (Couplage Amine et Adsorption Spécifique des anticorps par leurs peptides Ecoil) ont été écartées de cette dernière partie de l'étude à cause de la trop grande variabilité de l'attachement sur les membranes cellules des nanoparticules fabriquées avec ces stratégies (Figure 5.10). La densité de nanoparticules biofonctionnalisées par Adsorption Non-Spécifique de TZM et Interaction Superhélice E/K sur les cellules HER2(+) (SK-BR-3) était environ six fois plus élevée que sur les cellules HER2(-) (MDA-MB-231) (Tableau 5.1). De plus, le ratio entre les densités surfaciques de nanoparticules sur les cellules et les densités surfaciques de nanoparticules sur l'arrière-fond des lames a été calculé pour caractériser l'attachement non-spécifique des nanoparticules sur les lames de microscopie. Les ratios obtenus sur les cellules HER2(+) avec les nanoparticules biofonctionnalisées par les stratégies d'Interaction Superhélice E/K et d'Adsorption Non-Spécifique de TZM et valaient respectivement 7.2 ± 1.4 et 2.2 ± 0.5 . Le ratio le plus élevé, obtenu avec les AuPEG_{LD}/Kcoil incubées avec du Ecoil-TZM à 1.25 μ M, traduit le faible attachement des nanoparticules aux lames de microscopie (phénomène également observable sur la Figure 5.11.B). Ce faible attachement aux lames en verre est très certainement dû à la présence de peptides Kcoil dans la couronne à la surface des nanoparticules. En effet, le peptide Kcoil est connu pour avoir des propriétés anti-adhérentes [232], limitant ainsi l'attachement non-spécifique et non-contrôlé des nanoparticules AuPEG_{LD}/Kcoil sur les espaces libres entre les cellules sur les lames de microscopie.

Tableau 5.1. Qualité de l'imagerie sur les cellules de cancer du sein avec les nanoparticules biofonctionnalisées

($n = 3$ échantillons indépendants, chacun ayant été mesuré dans 3 régions différentes)

Stratégies	Nanoparticules Biofonctionnalisées	Ratio Densité NPs sur cellules HER2(+) / Densité NPs sur cellules HER2(-)	Ratio Densité NPs sur cellules / Densité NPs sur arrière-fond	
			MDA-MB-231 (HER2(-))	SK-BR-3 (HER2(+))
Adsorption Non-Spécifique	AuPEG _{HD} Pas de TZM	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.2
	AuPEG _{HD} 0.44 μ M TZM	5.9 ± 1.9	0.9 ± 0.3	2.2 ± 0.5
Interaction Superhélice E/K	AuPEG _{LD} /Kcoil Pas de Ecoil-TZM	0.5 ± 0.1^3	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.4
	AuPEG _{LD} /Kcoil 1.25 μ M Ecoil-TZM	6.6 ± 1.5	1.1 ± 0.3	7.2 ± 1.4

³ On attend ici un ratio valant 1 car les nanoparticules ne sont pas biofonctionnalisées avec les anticorps. La valeur aberrante obtenue s'explique par le faible nombre de nanoparticules immobilisées sur les cellules. En effet, quelques nanoparticules supplémentaires sur les cellules MDA-MBA-231 viennent augmenter artificiellement la densité surfacique par rapport aux cellules SK-BR-3 (Figure 5.10.C, barres vert clair) alors qu'aucune différence entre ces deux conditions n'est observable en réalité (Figure 5.11.B).

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet consistait en la comparaison de stratégies pour biofonctionnaliser des nanoparticules d'or (AuNPs) avec l'anticorps monoclonal *Trastuzumab* (TZM) dans l'objectif de détecter *in vitro* le biomarqueur HER2 à la surface de cellules modèles de cancer du sein. Pour parvenir à compléter ce projet, trois sous-objectifs avaient été définis. Les résultats obtenus et présentés au Chapitre 5 vont à présent être discutés selon ces trois axes.

6.1 Développer un procédé d'analyse des AuNPs

Afin de réaliser ce projet, il était essentiel de commencer par développer un procédé polyvalent permettant de caractériser les nanoparticules d'or à chaque étape de leur biofonctionnalisation. Ce procédé devait permettre de rendre compte de la stabilité nanoscopique des nanoparticules, de l'évolution de leurs propriétés optiques, ainsi que de la quantité et disponibilité des anticorps immobilisés à leur surface. De plus, sa polyvalence était nécessaire afin de pouvoir être appliqué indépendamment de la stratégie utilisée pour biofonctionnaliser les nanoparticules, permettant ainsi une comparaison fiable et complète des stratégies étudiées ici.

Cinq techniques d'analyses ont été retenues pour développer un tel procédé d'analyse (Figure 3.1). La microscopie en transmission électronique (TEM) a premièrement été utilisée pour obtenir la distribution réelle des tailles et la géométrie des AuNPs commerciales avant leur biofonctionnalisation (Figure 5.1). La spectroscopie UV-Vis a ensuite été employée à chaque étape de la biofonctionnalisation pour rendre compte de la stabilité colloïdale et des propriétés optiques des nanoparticules. En parallèle, la spectroscopie DLS a permis de mesurer l'indice de polydispersité des nanoparticules afin de vérifier leur stabilité nanoscopique à chaque étape de la biofonctionnalisation. La spectroscopie DLS a également permis de mesurer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules pour valider le greffage des différentes chaînes de PEG et/ou des peptides Kcoil sur l'or avant l'ajout des anticorps. La quantification des anticorps immobilisés sur les nanoparticules a quant à elle été réalisée par une méthode chimique : ces anticorps ont été hydrolysés en acide aminés par incubation avec de l'acide chlorhydrique (6M), puis ces acides aminés ont été quantifiés par des mesures d'absorbance grâce au réactif TNBS. Finalement, la capacité des nanoparticules biofonctionnalisées à détecter spécifiquement *in vitro* des cellules

modèles de cancer du sein (directement liée à la disponibilité des anticorps immobilisés sur les nanoparticules) a été vérifiée par microscopie en champ sombre à illumination latérale (voir section 6.3). Grâce à la combinaison de ces techniques d'analyse, les conditions expérimentales menant à la biofonctionnalisation des AuNPs ont pu être contrôlées. Cela a permis d'obtenir des résultats reproductibles à chaque étape du procédé de biofonctionnalisation pour toutes les stratégies. Ainsi, les stratégies de biofonctionnalisation étudiées dans ce projet ont effectivement pu être comparées.

Il est intéressant de noter que la spectroscopie DLS permet également d'estimer la stabilité des nanoparticules en mesurant leur potentiel ζ . Cette mesure n'a pas été intégrée dans le procédé final d'analyse développé dans ce projet car une trop grande variabilité a été observée dans les résultats avec le matériel utilisé au laboratoire (Annexe A). Bien que le procédé d'analyse finalement retenu permette une caractérisation complète des nanoparticules sans mesurer leur potentiel ζ , une piste d'amélioration pour ce projet serait de trouver le matériel et les conditions expérimentales appropriés pour renforcer le procédé d'analyse en y ajoutant cette mesure. D'autre part, une stratégie plus simple et rapide de quantification des anticorps immobilisés avait été envisagée pendant les premiers mois de ce projet. Elle reposait sur l'utilisation d'un mélange de KI et I₂ pour dissoudre les AuNPs, puis sur l'action de l'agent fluorescent commercial *NanoOrange* pour quantifier les anticorps alors relargués en solution. Cette stratégie de quantification a cependant été abandonnée car les conditions expérimentales permettant d'obtenir des résultats fiables et reproductibles n'ont pas été trouvées (Annexe B). Il serait cependant recommandé de développer une seconde méthode de quantification des anticorps immobilisés sur nanoparticules pour compléter ce projet (en optimisant la technique *NanoOrange* ou en appliquant une méthode tierce). En effet, cela permettrait de valider les résultats obtenus avec la méthode par hydrolyse des anticorps grâce à une seconde mesure indépendante, et éventuellement de remplacer cette méthode par hydrolyse avec une technique moins chronophage au laboratoire pour améliorer davantage le procédé d'analyse.

Malgré ces possibilités d'améliorations, le procédé d'analyse retenu dans cette étude est maintenant éprouvé et peut être facilement réutilisé dans de futures études sur la biofonctionnalisation de tous types de nanoparticules métalliques avec des anticorps ou autres protéines. En effet, il s'appuie sur des techniques de caractérisation physicochimiques polyvalentes, dont le matériel est facilement accessible dans des laboratoires de recherche.

6.2 Comparer plusieurs stratégies de biofonctionnalisation des AuNPs

Quatre stratégies pour produire des nanoparticules d'or biofonctionnalisées avec des anticorps et stables ont été étudiées dans ce projet. Plus particulièrement, deux stratégies reposant sur les peptides E/K superhélice, appelées 1) Interaction Superhélice E/K et 2) Adsorption Spécifique par les peptides Ecoil des anticorps, ont été comparées aux stratégies plus traditionnelles de 3) Adsorption Non-Spécifique et 4) Couplage Amine de TZM sur les nanoparticules. Avant l'immobilisation des anticorps, l'étude s'est concentrée sur la préparation de la surface des nanoparticules en y greffant respectivement 1) du mPEG à basse densité et des peptides Kcoil, 2) du mPEG à basse densité, 3) du mPEG à haute densité et 4) un mélange de mPEG et PEG-COOH à haute densité. En appliquant le procédé d'analyse développé pour satisfaire au sous-objectif précédent (voir section 6.1), le greffage des différentes chaînes de PEG et/ou de peptide Kcoil sur les AuNPs a été confirmé tout en validant la stabilité de toutes les nanoparticules fabriquées (Figures 5.2 et 5.3). Par la suite, de l'anticorps TZM a été immobilisé sur les nanoparticules selon les 4 stratégies de greffage, et la stabilité de toutes ces nanoparticules a encore une fois été validée (Figure 5.5). Après la quantification des anticorps immobilisés sur les nanoparticules, il a été montré que les deux stratégies reposant sur les peptides superhélice permettent de maximiser la quantité d'anticorps immobilisés sur les nanoparticules (Figure 5.7) par rapport aux autres stratégies (Figure 5.6) dans les conditions expérimentales qui ont été étudiées.

Les quantités d'anticorps mesurées dans cette étude sont cependant à considérer avec précaution. En effet, les IgG1 ont une empreinte surfacique approximative allant de 80 nm² à 200 nm² selon leur orientation sur les nanoparticules [92]. La surface d'une AuNP de 100 nm de diamètre sera donc théoriquement saturée après immobilisation d'environ 150 à 400 anticorps, ce qui est bien inférieur aux quantités mesurées ici (entre 1,000 et 6,000 anticorps par nanoparticule). Des contrôles ont alors été réalisés afin de vérifier si le surplus d'anticorps quantifiés à la surface des AuNPs par rapport à la théorie n'était pas dû à la présence d'anticorps solubles dans les échantillons, à cause d'un lavage insuffisant des nanoparticules après incubation. En l'occurrence, il a été déterminé que le lavage effectué (trois cycles de centrifugation-resuspension, voir section 4.2) permettait d'évacuer suffisamment d'anticorps encore solubles après incubation pour ne plus les détecter lors des mesures avec TNBS (données non fournies).

De plus, les nanoparticules développées ici ont déjà du PEG (et parfois du Kcoil) greffé à leur surface au moment de l'incubation avec le TZM, ce qui devrait diminuer la quantité d'anticorps immobilisables et non l'augmenter. Il est donc possible qu'une partie des anticorps quantifiés comme étant immobilisés sur les nanoparticules se trouvent en réalité dans leur couronne douce et ne soit pas définitivement greffés sur les AuNPs. De futures études devraient vérifier la stabilité de cette couronne dans le temps. Si les valeurs exactes obtenues en quantification des anticorps sont à considérer avec précaution sans validation par une méthode de quantification tierce (voir section 6.1), les conclusions obtenues en comparant les stratégies entre elles restent néanmoins valables puisque les mesures ont toutes été réalisées dans les mêmes conditions.

Il est intéressant de préciser que d'autres stratégies de greffage des anticorps sur les nanoparticules ont été envisagées pour cette étude parmi toutes celles existant dans la littérature (voir section 2.2). Le choix des 4 stratégies présentées dans ce travail a principalement été dicté par 2 paramètres : 1) la volonté d'étudier des stratégies provenant des différentes axes de recherche pour la biofonctionnalisation (i.e., adsorption, greffage covalent et greffage non-covalent avec des anticorps modifiés), et 2) la disponibilité rapide du matériel de laboratoire et des composants chimiques et biologiques dans le commerce. De plus, l'étude d'une cinquième stratégie de greffage avait été prévue pour ce projet, et reposait sur le greffage covalent d'anticorps clivés en deux fragments bioactifs par les thiols dans leur région charnière. Pour cela, des travaux préliminaires sur l'optimisation des conditions expérimentales permettant de cliver chimiquement les anticorps ont été réalisés. Ces travaux préliminaires se révélant plus complexes et chronophages que prévu (Annexe C), cette stratégie a été abandonnée afin d'avoir le temps de réaliser le projet en entier avec les 4 autres stratégies. Il serait néanmoins intéressant de reprendre ces travaux sur le clivage chimique des anticorps en deux fragments bioactifs, car il s'agit d'un réel défi de génie chimique avec des applications potentielles en biodétection.

6.3 Détection de cellules de cancer du sein par microscopie optique

Afin d'évaluer la capacité des AuNPs biofonctionnalisées avec du TZM à détecter spécifiquement le biomarqueur HER2, toutes les nanoparticules ont ensuite été incubées *in vitro* avec des cellules modèles de cancer du sein surexprimant ou non HER2. L'attachement des nanoparticules sur les cellules a été observé par microscopie en champ sombre à illumination latérale. Pour cela, les cellules ont été fixées sur des lames en verre pour microscope avant que les nanoparticules biofonctionnalisées y soient incubées.

Une attention particulière a été portée sur l'optimisation des conditions de blocage des espaces résiduels entre les cellules sur la lame avec de la BSA, afin de limiter l'attachement non-spécifique des nanoparticules dans ces espaces. En effet, ce point s'est révélé être un défi plus important que prévu dans le projet puisque toutes les nanoparticules s'attachaient initialement en trop grand nombre sur les lames, rendant une analyse de l'attachement sur les cellules impossible. Un autre défi pour cette partie de l'étude fut la sélection des lignées cellulaires permettant la meilleure analyse des résultats. Si les deux lignées MDA-MB-231 (expression normale de HER2) et SK-BR-3 (surexpression de HER2) ont été finalement retenues pour l'étude, la lignée MDA-MB-453 (surexpression de HER2) avait été initialement envisagée. Cette lignée a cependant été mise de côté car les cellules poussaient en plusieurs couches superposées sur les lames en verre, ce qui rendait nécessaire une étude de l'attachement des nanoparticules en 3 dimensions, alors qu'une étude en 2 dimensions suffisait pour les deux autres lignées dont les cellules formaient une monocouche (Annexe D). Face au manque de temps pour relever le défi que posait l'étude de l'attachement des nanoparticules sur les cellules en 3 dimensions, la lignée MDA-MB-453 a simplement été écartée. Il serait néanmoins intéressant de continuer les travaux dans cette directions car les résultats obtenus pourraient être comparés avec ceux obtenus sur la lignée SK-BR-3, surexprimant également HER2.

Malgré le travail préliminaire, le protocole de biofonctionnalisation par Couplage Amine et incubation sur les cellules n'a pas permis de produire des nanoparticules capables de détecter spécifiquement le biomarqueur HER2. En effet, ces nanoparticules se sont attachées en très grand nombre aux cellules et aux lames de microscopie malgré le blocage de la lame avec de la BSA, même lorsque TZM n'avait pas été immobilisé sur les nanoparticules (Figures 5.10.B et 5.11.A). En conséquence, le protocole de biofonctionnalisation par Couplage Amine et de leur incubation

sur les cellules reste encore à optimiser, et l'obtention d'un diagnostic fiable des cellules HER2-positives avec ces deux stratégies reste un défi à relever pour compléter ce projet. Des résultats similaires ont été obtenus avec les nanoparticules biofonctionnalisées par Adsorption Spécifique des TZM par leurs peptides Ecoil (Figures 5.10.C et 5.11.B). Il est donc nécessaire de continuer à optimiser les protocoles d'incubation des nanoparticules produites selon ces deux stratégies sur les cellules avant de pouvoir les comparer et décider de la meilleure stratégie de biofonctionnalisation.

En revanche, ce travail a effectivement permis de montrer que les stratégies d'Interaction Superhélice E/K (Figures 5.10.C et 5.11.B) et Adsorption Non-Spécifique (Figures 5.10.A et 5.11.A) sont efficaces pour produire des nanoparticules biofonctionnalisées détectant spécifiquement les cellules cancéreuses surexprimant HER2. Même si le protocole d'incubation de ces nanoparticules sur les cellules pourrait encore être optimisé, il a été montré que les deux stratégies permettent d'atteindre des densités surfaciques similaires de nanoparticules sur les cellules. En outre, la stratégie d'Interaction Superhélice E/K a permis de générer des nanoparticules montrant un très faible niveau d'attachement non-spécifique sur les cellules et les lames de microscopie (Tableau 5.1). Ainsi, un très bon contraste par rapport aux densités surfaciques de nanoparticules immobilisées a été observé entre les cellules surexprimant ou non HER2 d'une part, et entre les cellules surexprimant HER2 et les espaces entre les cellules sur les lames de microscopie d'autre part. Ces résultats font de la biofonctionnalisation par Interaction Superhélice E/K une stratégie adaptée pour développer de nouvelles procédures immunoplasmoniques permettant un diagnostic à la fois quantitatif et qualitatif de l'expression de HER2 sur les cellules de cancer du sein par simple observation au microscope optique.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les études menées dans ce projet ont permis de développer une nouvelle stratégie de biofonctionnalisation des nanoparticules d'or avec des anticorps par l'intermédiaire des peptides Ecoil et Kcoil, capables de former un hétérodimère superhélice avec une grande affinité et spécificité. Les nanoparticules ainsi biofonctionnalisées étaient stables et avaient conservé leurs propriétés optiques nécessaires à leur utilisation en imagerie biomédicale. Elles ont permis une détection fiable et reproductible des biomarqueurs HER2 à la surface de cellules de cancer du sein, tant qualitativement par simple observation en microscopie optique, que quantitativement par dénombrement des nanoparticules immobilisées sur les cellules.

Afin de poursuivre ce projet, il serait recommandé de s'assurer que les nanoparticules soient capables de détecter spécifiquement les biomarqueurs sur des échantillons de tissus biologiques véritables, pour réaliser une comparaison explicite avec l'immunohistochimie. De plus, il faudrait caractériser plus en profondeur les nanoparticules biofonctionnalisées afin d'évaluer la stabilité des anticorps immobilisés dans le temps. Finalement, il serait indiqué de développer un kit permettant aux pathologistes de biofonctionnaliser facilement les nanoparticules, en les préparant par exemple à l'avance pour n'avoir qu'à y ajouter les anticorps avant leur utilisation.

Tout au long de ce projet, la biofonctionnalisation des nanoparticules d'or a été réalisée avec l'anticorps monoclonal *Trastuzumab* pour cibler le biomarqueur HER2. Si le diagnostic histologique complet des cellules de cancer du sein nécessite également la caractérisation d'autres biomarqueurs, ce travail apporte la preuve de concept que le système de peptides Ecoil et Kcoil permet de produire des nanoparticules biofonctionnelles pour la détection de ces biomarqueurs par des procédures immunoplasmoniques. En effet, le protocole de biofonctionnalisation développé ici pourrait être utilisé pour produire des nanoparticules ciblant d'autres biomarqueurs, en recombinant génétiquement les anticorps contre ces autres biomarqueurs afin d'ajouter un peptide Ecoil sur leur région Fc. En outre, des modifications mineures à ce protocole pourraient permettre de biofonctionnaliser des nanoparticules avec des dimensions et compositions différentes. Pour toutes ces raisons, la nouvelle stratégie de biofonctionnalisation par Interaction Superhélice E/K est très prometteuse pour le développement d'une nouvelle plateforme de multiplexage immunoplasmonique pour améliorer les standards actuels de diagnostic du cancer du sein.

RÉFÉRENCES

- [1] J. Ferlay *et al.*, "Cancer statistics for the year 2020: An overview," *Int J Cancer*, Apr 5 2021, doi: 10.1002/ijc.33588.
- [2] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [3] S. C. d. Cancer. "Statistiques sur le cancer du sein." <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/breast/statistics> (accessed Septembre, 2022).
- [4] W. C. o. T. E. Board, *Breast Tumours*. World Health Organization, 2019.
- [5] D. C. Zaha, "Significance of immunohistochemistry in breast cancer," *World J Clin Oncol*, vol. 5, no. 3, pp. 382-92, Aug 10 2014, doi: 10.5306/wjco.v5.i3.382.
- [6] I. B. Buchwalow and W. Böcker, *Immunohistochemistry* (Basics and Methods). 2010, pp. 1-149.
- [7] A. G. Waks and E. P. Winer, "Breast Cancer Treatment: A Review," *JAMA*, vol. 321, no. 3, pp. 288-300, Jan 22 2019, doi: 10.1001/jama.2018.19323.
- [8] A. R. Crowe and W. Yue, "Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol," *Bio Protoc*, vol. 9, no. 24, Dec 20 2019, doi: 10.21769/BioProtoc.3465.
- [9] A. M. Bellizzi, "An Algorithmic Immunohistochemical Approach to Define Tumor Type and Assign Site of Origin," *Adv Anat Pathol*, vol. 27, no. 3, pp. 114-163, May 2020, doi: 10.1097/PAP.0000000000000256.
- [10] C. Fiore *et al.*, "Utility of multispectral imaging in automated quantitative scoring of immunohistochemistry," *J Clin Pathol*, vol. 65, no. 6, pp. 496-502, Jun 2012, doi: 10.1136/jclinpath-2012-200734.
- [11] C. Castera Redal and L. Bernet Vegue, "'HER2 immunohistochemistry inter-observer reproducibility in 205 cases of invasive breast carcinoma additionally tested by ISH" Answer to the statistical issue to avoid misinterpretation," *Ann Diagn Pathol*, vol. 48, p. 151566, Oct 2020, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151566.
- [12] T. Ezaki, "Antigen retrieval: its significance and drawbacks in immunohistochemistry," *Kaibogaku zasshi. Journal of Anatomy*, vol. 71, no. 6, pp. 615-628, 1996.
- [13] L. Venteo and A. Sutter, "Les différents systèmes d'amplification en immunohistochimie : avantages, inconvénients et optimisation," *Rev. Fr. Histotechnol.*, vol. 24, no. 1, 2011.
- [14] F. Sharifianjazi *et al.*, "Biosensors and nanotechnology for cancer diagnosis (lung and bronchus, breast, prostate, and colon): a systematic review," *Biomed Mater*, vol. 17, no. 1, Dec 24 2021, doi: 10.1088/1748-605X/ac41fd.
- [15] S. Medici, M. Peana, A. Pelucelli, and M. A. Zoroddu, "An updated overview on metal nanoparticles toxicity," *Semin Cancer Biol*, vol. 76, pp. 17-26, Nov 2021, doi: 10.1016/j.semcancer.2021.06.020.

- [16] J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare, and S. S. Gambhir. (2011, Jun) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 715-28. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718180>
- [17] Y. Chen, Y. Xianyu, and X. Jiang, "Surface Modification of Gold Nanoparticles with Small Molecules for Biochemical Analysis," *Acc Chem Res*, vol. 50, no. 2, pp. 310-319, Feb 21 2017, doi: 10.1021/acs.accounts.6b00506.
- [18] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, and M. E. C. M. Rostelato. (2019, Aug 25) Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*. 714-740. Available: <Go to ISI>://WOS:000471631300083
- [19] J. Zhang, L. Mou, and X. Jiang, "Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications," *Chem Sci*, vol. 11, no. 4, pp. 923-936, Jan 15 2020, doi: 10.1039/c9sc06497d.
- [20] X. Huang and M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *Journal of Advanced Research*, vol. 1, no. 1, pp. 13-28, 2010, doi: 10.1016/j.jare.2010.02.002.
- [21] M. M. Goldenberg, "Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer," *Clinical Therapeutics*, vol. 21, no. 2, pp. 309-318, 1999, doi: 10.1016/s0149-2918(00)88288-0.
- [22] K. McKeage and C. M. Perry, "Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2," *Drugs*, vol. 62, no. 1, pp. 209-43, 2002, doi: 10.2165/00003495-200262010-00008.
- [23] H. M. Shepard, P. Jin, D. J. Slamon, Z. Pirot, and D. C. Maneval, "Herceptin," *Handb Exp Pharmacol*, no. 181, pp. 183-219, 2008, doi: 10.1007/978-3-540-73259-4_9.
- [24] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, and C. Higgitt, "The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology," *Gold Bulletin*, vol. 40, no. 4, pp. 270-277, 2007, doi: 10.1007/bf03215599.
- [25] N. Culpeper, *Treatise of Aurum Potabile*. London: Mayden-Head, St. Pauls-Church Yard, 1656.
- [26] F. Anthony, *Panacea AUrea, sive tractatus duo de ipsius Auro Potabili*. 1618.
- [27] M. Faraday, "X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 147, pp. 145-181, 1857, doi: 10.1098/rstl.1857.0011.
- [28] F. Gatto and G. Bardi. (2018, Sep 22) Metallic Nanoparticles: General Research Approaches to Immunological Characterization. *Nanomaterials (Basel)*. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30248990>
- [29] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, "Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 17, no. 22, pp. 6782-6786, 2001, doi: 10.1021/la0104323.
- [30] C. Ziegler and A. Eychmüller, "Seeded Growth Synthesis of Uniform Gold Nanoparticles with Diameters of 15–300 nm," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, no. 11, pp. 4502-4506, 2011, doi: 10.1021/jp1106982.

- [31] A. V. Kabashin, M. Meunier, C. Kingston, and J. H. T. Luong, "Fabrication and Characterization of Gold Nanoparticles by Femtosecond Laser Ablation in an Aqueous Solution of Cyclodextrins," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 19, pp. 4527-4531, 2003, doi: 10.1021/jp034345q.
- [32] S. Besner, A. V. Kabashin, F. M. Winnik, and M. Meunier, "Ultrafast laser based "green" synthesis of non-toxic nanoparticles in aqueous solutions," *Applied Physics A*, vol. 93, no. 4, pp. 955-959, 2008, doi: 10.1007/s00339-008-4773-y.
- [33] F. Sahebi, M. Ranjbar, and M. T. Goodarzi, "Synthesis of gold nanoparticles by pulsed laser-assisted reduction of aqueous gold precursor," *Applied Physics A*, vol. 125, no. 12, 2019, doi: 10.1007/s00339-019-3138-z.
- [34] U. M. Muddapur *et al.*, "Plant-Based Synthesis of Gold Nanoparticles and Theranostic Applications: A Review," *Molecules*, vol. 27, no. 4, Feb 18 2022, doi: 10.3390/molecules27041391.
- [35] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, 1951, doi: 10.1039/df9511100055.
- [36] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, vol. 0, no. 7, pp. 801-802, 1994, doi: 10.1039/c39940000801.
- [37] Z. Khan, T. Singh, J. I. Hussain, and A. A. Hashmi, "Au(III)-CTAB reduction by ascorbic acid: preparation and characterization of gold nanoparticles," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 104, pp. 11-7, Apr 1 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.017.
- [38] J. Y. Song, H.-K. Jang, and B. S. Kim, "Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts," *Process Biochemistry*, vol. 44, no. 10, pp. 1133-1138, 2009, doi: 10.1016/j.procbio.2009.06.005.
- [39] A. Nazirov, A. Pestov, Y. Privar, A. Ustinov, E. Modin, and S. Bratskaya, "One-pot green synthesis of luminescent gold nanoparticles using imidazole derivative of chitosan," *Carbohydr Polym*, vol. 151, pp. 649-655, Oct 20 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.06.018.
- [40] C. Jayaseelan, R. Ramkumar, A. A. Rahuman, and P. Perumal, "Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity," *Industrial Crops and Products*, vol. 45, pp. 423-429, 2013, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.12.019.
- [41] W. Hergert and T. Wriedt, Springer, Ed. *The Mie Theory : Basics and Applications*. 2012.
- [42] T. S. Ahmadi, Z. L. Wang, T. C. Green, A. Henglein, and M. A. El-Sayed, "Shape-Controlled Synthesis of Colloidal Platinum Nanoparticles," *Science*, vol. 272, no. 5270, pp. 1924-6, Jun 28 1996, doi: 10.1126/science.272.5270.1924.
- [43] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, "Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches," *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 9, Sep 13 2016, doi: 10.3390/ijms17091534.
- [44] A. Ali *et al.*, "Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles," *Nanotechnol Sci Appl*, vol. 9, pp. 49-67, 2016, doi: 10.2147/NSA.S99986.

- [45] M. M. Viana, V. F. Soares, and N. D. S. Mohallem, "Synthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles," *Ceramics International*, vol. 36, no. 7, pp. 2047-2053, 2010, doi: 10.1016/j.ceramint.2010.04.006.
- [46] V. Bartůněk, P. Ulbrich, and I. Paterová, "Facile synthesis of the magnetic Ni-Cr-Fe alloy nanoparticles and its catalytic properties," *Materials Science and Engineering: B*, vol. 267, 2021, doi: 10.1016/j.mseb.2021.115117.
- [47] G. Ferik *et al.*, "The synthesis and characterization of nickel–copper alloy nanoparticles with a narrow size distribution using sol–gel synthesis," *Materials Letters*, vol. 124, pp. 39-42, 2014, doi: 10.1016/j.matlet.2014.03.030.
- [48] K. S. Tan and K. Y. Cheong, "Advances of Ag, Cu, and Ag–Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, no. 4, 2013, doi: 10.1007/s11051-013-1537-1.
- [49] M. P. Mallin and C. J. Murphy, "Solution-Phase Synthesis of Sub-10 nm Au–Ag Alloy Nanoparticles," *Nano Letters*, vol. 2, no. 11, pp. 1235-1237, 2002, doi: 10.1021/nl025774n.
- [50] S. Kasani, K. Curtin, and N. Wu, "A review of 2D and 3D plasmonic nanostructure array patterns: fabrication, light management and sensing applications," *Nanophotonics*, vol. 8, no. 12, pp. 2065-2089, 2019, doi: 10.1515/nanoph-2019-0158.
- [51] NanoComposix. "Gold Nanoparticles : Optical Properties." <https://nanocomposix.com/pages/gold-nanoparticles-optical-properties> (accessed Septembere, 2022).
- [52] J. Ou, Z. Zhou, Z. Chen, and H. Tan, "Optical Diagnostic Based on Functionalized Gold Nanoparticles," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 18, Sep 5 2019, doi: 10.3390/ijms20184346.
- [53] A. R. Shafiq, A. Abdul Aziz, and B. Mehrdel, "Nanoparticle Optical Properties: Size Dependence of a Single Gold Spherical Nanoparticle," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 1083, 2018, doi: 10.1088/1742-6596/1083/1/012040.
- [54] F. Y. Kong, J. W. Zhang, R. F. Li, Z. X. Wang, W. J. Wang, and W. Wang. (2017, Aug 31) Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules*. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28858253>
- [55] P. Marcoux-Valiquette *et al.*, "Multiplexed Plasmonic Nano-Labeling for Bioimaging of Cytological Stained Samples," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 14, Jul 13 2021, doi: 10.3390/cancers13143509.
- [56] R. Pamies, J. G. H. Cifre, V. F. Espín, M. Collado-González, F. G. D. Baños, and J. G. de la Torre, "Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 16, no. 4, 2014, doi: 10.1007/s11051-014-2376-4.
- [57] B. D. Johnston *et al.*, "Colloidal Stability and Surface Chemistry Are Key Factors for the Composition of the Protein Corona of Inorganic Gold Nanoparticles," *Advanced Functional Materials*, vol. 27, no. 42, 2017, doi: 10.1002/adfm.201701956.
- [58] N. D. Burrows *et al.*, "Surface Chemistry of Gold Nanorods," *Langmuir*, vol. 32, no. 39, pp. 9905-9921, Oct 4 2016, doi: 10.1021/acs.langmuir.6b02706.

- [59] D. Li *et al.*, "Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Shells for Nanoparticles: Enhanced Stealth Effect and Colloidal Stability," *Langmuir*, vol. 35, no. 26, pp. 8799-8805, Jul 2 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01325.
- [60] B. Thierry and H. J. Griesser, "Dense PEG layers for efficient immunotargeting of nanoparticles to cancer cells," (in English), *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, no. 18, pp. 8810-8819, 2012, doi: 10.1039/c2jm30210a.
- [61] J. Lin, H. Zhang, V. Morovati, and R. Dargazany, "PEGylation on mixed monolayer gold nanoparticles: Effect of grafting density, chain length, and surface curvature," *J Colloid Interface Sci*, vol. 504, pp. 325-333, Oct 15 2017, doi: 10.1016/j.jcis.2017.05.046.
- [62] K. Rahme, L. Chen, R. G. Hobbs, M. A. Morris, C. O'Driscoll, and J. D. Holmes, "PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions," (in English), *Rsc Adv*, vol. 3, no. 17, pp. 6085-6094, 2013, doi: 10.1039/c3ra22739a.
- [63] T. Liu and B. Thierry, "A solution to the PEG dilemma: efficient bioconjugation of large gold nanoparticles for biodiagnostic applications using mixed layers," *Langmuir*, vol. 28, no. 44, pp. 15634-42, Nov 6 2012, doi: 10.1021/la301390u.
- [64] M. Retout, E. Brunetti, H. Valkenier, and G. Bruylants, "Limits of thiol chemistry revealed by quantitative analysis of mixed layers of thiolated-PEG ligands grafted onto gold nanoparticles," *J Colloid Interface Sci*, vol. 557, pp. 807-815, Dec 1 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2019.09.047.
- [65] K. Kimura, S. Takashima, and H. Ohshima, "Molecular Approach to the Surface Potential Estimate of Thiolate-Modified Gold Nanoparticles," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 29, pp. 7260-7266, 2002, doi: 10.1021/jp014423e.
- [66] X. Wang *et al.*, "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma," *Biosens Bioelectron*, vol. 26, no. 2, pp. 404-10, Oct 15 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.07.121.
- [67] K. Zagorovsky and W. C. Chan, "A plasmonic DNAzyme strategy for point-of-care genetic detection of infectious pathogens," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 52, no. 11, pp. 3168-71, Mar 11 2013, doi: 10.1002/anie.201208715.
- [68] A. de la Escosura-Muniz, C. Sanchez-Espinel, B. Diaz-Freitas, A. Gonzalez-Fernandez, M. Maltez-da Costa, and A. Merkoci, "Rapid identification and quantification of tumor cells using an electrocatalytic method based on gold nanoparticles," *Anal Chem*, vol. 81, no. 24, pp. 10268-74, Dec 15 2009, doi: 10.1021/ac902087k.
- [69] D. Kim, Y. Y. Jeong, and S. Jon, "A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer," *ACS Nano*, vol. 4, no. 7, pp. 3689-96, Jul 27 2010, doi: 10.1021/nn901877h.
- [70] J. F. Hainfeld, M. J. O'Connor, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin, D. J. Adams, and H. M. Smilowitz, "Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions," *Br J Radiol*, vol. 84, no. 1002, pp. 526-33, Jun 2011, doi: 10.1259/bjr/42612922.

- [71] E. Bergeron, S. Patskovsky, D. Rioux, and M. Meunier, "3D multiplexed immunoplasmonics microscopy," *Nanoscale*, vol. 8, no. 27, pp. 13263-72, Jul 21 2016, doi: 10.1039/c6nr01257d.
- [72] M. Qi, C. Darviot, S. Patskovsky, and M. Meunier, "Cost-effective side-illumination darkfield nanoplasmonic marker microscopy," *Analyst*, vol. 144, no. 4, pp. 1303-1308, Feb 21 2019, doi: 10.1039/c8an01891j.
- [73] A. Nsamela Matombi, M. Hasanzadeh Kafshgari, L. Wang, S. Patskovsky, D. Trudel, and M. Meunier, "Sensitive and Rapid Cancer Diagnosis with Immunoplasmonic Assay Based on Plasmonic Nanoparticles: Toward Fine-Needle Aspiration Cytology," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 3, no. 5, pp. 4171-4177, 2020, doi: 10.1021/acsanm.0c00376.
- [74] B. Saha *et al.*, "In Vitro Structural and Functional Evaluation of Gold Nanoparticles Conjugated Antibiotics," *Nanoscale Research Letters*, vol. 2, no. 12, 2007, doi: 10.1007/s11671-007-9104-2.
- [75] Y. H. Chen *et al.*, "Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model," *Mol Pharm*, vol. 4, no. 5, pp. 713-22, Sep-Oct 2007, doi: 10.1021/mp060132k.
- [76] W. H. Kong, K. H. Bae, C. A. Hong, Y. Lee, S. K. Hahn, and T. G. Park, "Multimerized siRNA cross-linked by gold nanoparticles," *Bioconjug Chem*, vol. 22, no. 10, pp. 1962-9, Oct 19 2011, doi: 10.1021/bc200172p.
- [77] F. Hu, Y. Zhang, G. Chen, C. Li, and Q. Wang, "Double-walled Au nanocage/SiO₂ nanorattles: integrating SERS imaging, drug delivery and photothermal therapy," *Small*, vol. 11, no. 8, pp. 985-93, Feb 25 2015, doi: 10.1002/sml.201401360.
- [78] C. M. Pitsillides, E. K. Joe, X. Wei, R. R. Anderson, and C. P. Lin, "Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Microparticles and Nanoparticles," *Biophysical Journal*, vol. 84, no. 6, pp. 4023-4032, 2003, doi: 10.1016/s0006-3495(03)75128-5.
- [79] E. B. Dickerson *et al.*, "Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice," *Cancer Lett*, vol. 269, no. 1, pp. 57-66, Sep 28 2008, doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.026.
- [80] Y. Zhang *et al.*, "Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 8720, Jun 7 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26978-1.
- [81] J. A. Schwartz *et al.*, "Feasibility study of particle-assisted laser ablation of brain tumors in orthotopic canine model," *Cancer Res*, vol. 69, no. 4, pp. 1659-67, Feb 15 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2535.
- [82] D. Dhamecha, S. Jalalpure, K. Jadhav, S. Jagwani, and R. Chavan, "Doxorubicin loaded gold nanoparticles: Implication of passive targeting on anticancer efficacy," *Pharmacol Res*, vol. 113, no. Pt A, pp. 547-556, Nov 2016, doi: 10.1016/j.phrs.2016.09.037.
- [83] Z. R. Goddard, M. J. Marin, D. A. Russell, and M. Searcey. (2020, Dec 7) Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics. *Chem Soc Rev*. 8774-8789. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33089858>

- [84] H. Unal Gulsuner, H. Ceylan, M. O. Guler, and A. B. Tekinay, "Multi-Domain Short Peptide Molecules for in Situ Synthesis and Biofunctionalization of Gold Nanoparticles for Integrin-Targeted Cell Uptake," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 7, no. 20, pp. 10677-10683, 2015, doi: 10.1021/acsami.5b00093.
- [85] O. Martinez-Avila, L. M. Bedoya, M. Marradi, C. Clavel, J. Alcamí, and S. Penades, "Multivalent manno-glyconanoparticles inhibit DC-SIGN-mediated HIV-1 trans-infection of human T cells," *Chembiochem*, vol. 10, no. 11, pp. 1806-9, Jul 20 2009, doi: 10.1002/cbic.200900294.
- [86] S. I. van Kasteren, S. J. Campbell, S. Serres, D. C. Anthony, N. R. Sibson, and B. G. Davis, "Glyconanoparticles allow pre-symptomatic in vivo imaging of brain disease," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 1, pp. 18-23, Jan 6 2009, doi: 10.1073/pnas.0806787106.
- [87] B. W. Liu and J. W. Liu, "Interface-Driven Hybrid Materials Based on DNA-Functionalized Gold Nanoparticles," (in English), *Matter*, vol. 1, no. 4, pp. 825-847, Oct 2 2019, doi: 10.1016/j.matt.2019.08.008.
- [88] X. Wu *et al.*, "Environmentally responsive plasmonic nanoassemblies for biosensing," *Chem Soc Rev*, vol. 47, no. 13, pp. 4677-4696, Jul 2 2018, doi: 10.1039/c7cs00894e.
- [89] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, P. C. Patel, J. E. Millstone, N. L. Rosi, and C. A. Mirkin, "Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles," *Nano Lett*, vol. 7, no. 12, pp. 3818-21, Dec 2007, doi: 10.1021/nl072471q.
- [90] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. Lytton-Jean, M. S. Han, and C. A. Mirkin, "Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation," *Science*, vol. 312, no. 5776, pp. 1027-30, May 19 2006, doi: 10.1126/science.1125559.
- [91] Y. Ding *et al.*, "Gold nanoparticles for nucleic acid delivery," *Mol Ther*, vol. 22, no. 6, pp. 1075-1083, Jun 2014, doi: 10.1038/mt.2014.30.
- [92] L. Zhang, Y. Mazouzi, M. Salmain, B. Liedberg, and S. Boujday. (2020, Oct 1) Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. *Biosens Bioelectron.* 112370. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32729502>
- [93] J. A. Owen, J. Punt, S. A. Stranford, P. P. Jones, and J. Kuby, "Receptors and signaling: B and T-cell receptors," in *Kuby immunology, 7th Edition*, W. F. a. Company Ed. New-York, 2013, ch. Chapter 3, pp. 65-103.
- [94] P. Dennler, E. Fischer, and R. Schibli. (2015, Sep) Antibody Conjugates: From Heterogeneous Populations to Defined Reagents. *Antibodies*. 197-224. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4468/4/3/197>
- [95] J. R. Birch and A. J. Racher, "Antibody production," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 58, no. 5-6, pp. 671-85, Aug 7 2006, doi: 10.1016/j.addr.2005.12.006.
- [96] A. Alibakhshi *et al.*, "Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines," *J Control Release*, vol. 268, pp. 323-334, Dec 28 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.10.036.
- [97] P. Holliger and P. J. Hudson, "Engineered antibody fragments and the rise of single domains," *Nat Biotechnol*, vol. 23, no. 9, pp. 1126-36, Sep 2005, doi: 10.1038/nbt1142.

- [98] A. Wang, Y. R. Perera, M. B. Davidson, and N. C. Fitzkee, "Electrostatic Interactions and Protein Competition Reveal a Dynamic Surface in Gold Nanoparticle-Protein Adsorption," *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, vol. 120, no. 42, pp. 24231-24239, Oct 27 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b08469.
- [99] W. D. Geoghegan, "The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 36, no. 4, 1988, doi: <https://doi.org/10.1177%2F36.4.3346540>.
- [100] G. Ruiz, K. Tripathi, S. Okyem, and J. D. Driskell, "pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles," *Bioconjug Chem*, vol. 30, no. 4, pp. 1182-1191, Apr 17 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00123.
- [101] N. C. Bell, C. Minelli, and A. G. Shard, "Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement," *Analytical Methods*, vol. 5, no. 18, 2013, doi: 10.1039/c3ay40771c.
- [102] K. Siriwardana, A. Wang, K. Vangala, N. Fitzkee, and D. Zhang, "Probing the effects of cysteine residues on protein adsorption onto gold nanoparticles using wild-type and mutated GB3 proteins," *Langmuir*, vol. 29, no. 35, pp. 10990-6, Sep 3 2013, doi: 10.1021/la402239h.
- [103] G. Ruiz, N. Ryan, K. Rutschke, O. Awotunde, and J. D. Driskell, "Antibodies Irreversibly Adsorb to Gold Nanoparticles and Resist Displacement by Common Blood Proteins," *Langmuir*, vol. 35, no. 32, pp. 10601-10609, Aug 13 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01900.
- [104] J. Taylor, A. Huefner, L. Li, J. Wingfield, and S. Mahajan, "Nanoparticles and intracellular applications of surface-enhanced Raman spectroscopy," *Analyst*, vol. 141, no. 17, pp. 5037-55, Aug 15 2016, doi: 10.1039/c6an01003b.
- [105] G. T. Hermanson, "Antibody Modification and Conjugation," in *Bioconjugate Techniques*, 2008, pp. 783-823.
- [106] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, "The hydrolysis of amides can have termolecular kinetics," in *Organic Chemistry*. NY, USA: Oxford University Press Inc., New York, 2001, ch. Equilibria, rates, and mechanisms : summary of mechanistic principles, p. 325.
- [107] S. Avvakumova *et al.*, "Does conjugation strategy matter? Cetuximab-conjugated gold nanocages for targeting triple-negative breast cancer cells," *Nanoscale Advances*, vol. 1, no. 9, pp. 3626-3638, 2019, doi: 10.1039/c9na00241c.
- [108] N. Chattopadhyay *et al.*, "Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer," *Mol Pharm*, vol. 7, no. 6, pp. 2194-206, Dec 6 2010, doi: 10.1021/mp100207t.
- [109] L. Dziawer *et al.*, "Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with (211)At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer," *Nanomaterials (Basel)*, vol. 9, no. 4, Apr 18 2019, doi: 10.3390/nano9040632.

- [110] T. Scientific. "Sulfo-NHS + EDC (carbodiimide) crosslinking reaction scheme." <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/77149> (accessed January 23rd 2023, 2023).
- [111] A. Makaraviciute and A. Ramanaviciene, "Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors," *Biosens Bioelectron*, vol. 50, pp. 460-71, Dec 15 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.06.060.
- [112] M. Abdollahpour-Alitappeh *et al.*, "Evaluation of Factors Influencing Antibody Reduction for Development of Antibody Drug Conjugates," *Iran Biomed J*, vol. 21, no. 4, pp. 270-4, Jul 2017, doi: 10.18869/acadpub.ibj.21.4.270.
- [113] H. Sharma and R. Mutharasan, "Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity," *Anal Chem*, vol. 85, no. 4, pp. 2472-7, Feb 19 2013, doi: 10.1021/ac3035426.
- [114] M. M. Sun *et al.*, "Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides," *Bioconjug Chem*, vol. 16, no. 5, pp. 1282-90, Sep-Oct 2005, doi: 10.1021/bc050201y.
- [115] C. M. Hu *et al.*, "Half-antibody functionalized lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted drug delivery to carcinoembryonic antigen presenting pancreatic cancer cells," *Mol Pharm*, vol. 7, no. 3, pp. 914-20, Jun 7 2010, doi: 10.1021/mp900316a.
- [116] A. Makaraviciute, C. D. Jackson, P. A. Millner, and A. Ramanaviciene, "Considerations in producing preferentially reduced half-antibody fragments," *J Immunol Methods*, vol. 429, pp. 50-6, Feb 2016, doi: 10.1016/j.jim.2016.01.001.
- [117] B. A. Cobb. (2020, Mar 20) The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology*. 202-213. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31504525>
- [118] R. Jefferis. (2009, Jul) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci*. 356-62. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19552968>
- [119] L. Malaprade, "Action of polyalcohols on periodic acid. Analytical application," *Bull. Soc. Chim. Fr.*, no. 43, p. 683, 1928.
- [120] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, "Amines react with carbonyl compounds," in *Organic Chemistry*. NY, USA: Oxford University Press Inc., New York, 2001, ch. Nucleophilic substitution at C=O with loss of carbonyl oxygen, pp. 348-354.
- [121] J. Park, P. L. Chariou, and N. F. Steinmetz, "Site-Specific Antibody Conjugation Strategy to Functionalize Virus-Based Nanoparticles," *Bioconjug Chem*, vol. 31, no. 5, pp. 1408-1416, May 20 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00118.
- [122] F. Fisusi, N. Brandy, J. Wu, and E. O. Akala, "Studies on polyethylene glycol-monoclonal antibody conjugates for fabrication of nanoparticles for biomedical applications," *J Nanosci Nanomed*, vol. 4, no. 2, pp. 1-9, Jul 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33564752>.
- [123] T. Kubota *et al.*, "HER2-targeted gold nanoparticles potentially overcome resistance to trastuzumab in gastric cancer," *Nanomedicine*, vol. 14, no. 6, pp. 1919-1929, Aug 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.05.019.

- [124] S. Kumar, J. Aaron, and K. Sokolov, "Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties," *Nat Protoc*, vol. 3, no. 2, pp. 314-20, 2008, doi: 10.1038/nprot.2008.1.
- [125] Q. Zhou *et al.*, "Site-specific antibody-drug conjugation through glycoengineering," *Bioconjug Chem*, vol. 25, no. 3, pp. 510-20, Mar 19 2014, doi: 10.1021/bc400505q.
- [126] S. Boune, P. Hu, A. L. Epstein, and L. A. Khawli, "Principles of N-Linked Glycosylation Variations of IgG-Based Therapeutics: Pharmacokinetic and Functional Considerations," *Antibodies (Basel)*, vol. 9, no. 2, Jun 10 2020, doi: 10.3390/antib9020022.
- [127] C. A. Wolfe and D. S. Hage, "Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate," *Anal Biochem*, vol. 231, no. 1, pp. 123-30, Oct 10 1995, doi: 10.1006/abio.1995.1511.
- [128] J. Zemplen, S. S. Wijeratne, and Y. I. Hassan. (2009, Jan-Feb) Biotin. *Biofactors*. 36-46. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19319844>
- [129] M. Wilchek and E. A. Bayer, "Introduction to avidin-biotin technology," *Methods Enzymol*, vol. 184, pp. 5-13, 1990, doi: 10.1016/0076-6879(90)84256-g.
- [130] S. Freitag, I. Le Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, and R. E. Stenkamp, "Structural studies of the streptavidin binding loop," *Protein Sci*, vol. 6, no. 6, pp. 1157-66, Jun 1997, doi: 10.1002/pro.5560060604.
- [131] E. A. Bayer and M. Wilchek, "The Avidin–Biotin System," in *Immunoassay*, 1996, pp. 237-267.
- [132] N. M. Green, "Avidin," *Adv Protein Chem*, vol. 29, pp. 85-133, 1975, doi: 10.1016/s0065-3233(08)60411-8.
- [133] J. M. Montenegro *et al.* (2013, May) Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 677-88. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280372>
- [134] T. Scientific. "Avidin-Biotin Interaction." <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html> (accessed Janvier, 2023).
- [135] J. H. Kang, H. J. Choi, S. Y. Hwang, S. H. Han, J. Y. Jeon, and E. K. Lee, "Improving immunobinding using oriented immobilization of an oxidized antibody," *J Chromatogr A*, vol. 1161, no. 1-2, pp. 9-14, Aug 17 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.023.
- [136] T. Fellows, L. Ho, S. Flanagan, R. Fogel, D. Ojo, and J. Limson, "Gold nanoparticle-streptavidin conjugates for rapid and efficient screening of aptamer function in lateral flow sensors using novel CD4-binding aptamers identified through Crossover-SELEX," *Analyst*, vol. 145, no. 15, pp. 5180-5193, Aug 7 2020, doi: 10.1039/d0an00634c.
- [137] H. Wartlick, K. Michaelis, S. Balthasar, K. Strebhardt, J. Kreuter, and K. Langer, "Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells," *J Drug Target*, vol. 12, no. 7, pp. 461-71, 2004, doi: 10.1080/10611860400010697.
- [138] K. H. Lim, H. Huang, A. Pralle, and S. Park, "Engineered streptavidin monomer and dimer with improved stability and function," *Biochemistry*, vol. 50, no. 40, pp. 8682-91, Oct 11 2011, doi: 10.1021/bi2010366.

- [139] T. Scientific. "EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit." <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21425?SID=srch-srp-21425> (accessed Janvier, 2023).
- [140] T. Scientific. "EZ-Link™ NHS-PEG4 Biotinylation Kit." <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21455?SID=srch-srp-21455> (accessed Janvier, 2023).
- [141] T. Scientific. "EZ-Link™ Sulfo NHS-SS Biotinylation Kit." <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21445?SID=srch-srp-21445> (accessed Janvier, 2023).
- [142] T. Moks, L. Abrahmsen, B. Nilsson, U. Hellman, J. Sjoquist, and M. Uhlen, "Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains," *Eur J Biochem*, vol. 156, no. 3, pp. 637-43, May 2 1986, doi: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09625.x.
- [143] A. E. Sauer-Eriksson, G. J. Kleywegt, M. Uhlen, and T. A. Jones, "Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG," *Structure*, vol. 3, no. 3, pp. 265-78, Mar 15 1995, doi: 10.1016/s0969-2126(01)00157-5.
- [144] K. Saha, F. Bender, and E. Gizeli, "Comparative study of IgG binding to proteins G and A: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device," *Anal Chem*, vol. 75, no. 4, pp. 835-42, Feb 15 2003, doi: 10.1021/ac0204911.
- [145] B. Heelan, "Purification of monoclonal antibodies using protein a/g," *Methods Mol Med*, vol. 40, pp. 281-8, 2000, doi: 10.1385/1-59259-076-4:281.
- [146] M. Eliasson *et al.*, "Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 9, pp. 4323-4327, 1988, doi: 10.1016/s0021-9258(18)68928-8.
- [147] C. Bioparticles. "Schematic illustration of protein A/G/L-mediated antibody conjugation." https://www.cd-bioparticles.com/t/Protein-Isolation_48.html (accessed January, 2023).
- [148] R. Elshafey, A. C. Tavares, M. Siaj, and M. Zourob, "Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles-protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue," *Biosens Bioelectron*, vol. 50, pp. 143-9, Dec 15 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.05.063.
- [149] Y. Khaniani *et al.*, "A gold nanoparticle-protein G electrochemical affinity biosensor for the detection of SARS-CoV-2 antibodies: a surface modification approach," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 12850, Jul 27 2022, doi: 10.1038/s41598-022-17219-7.
- [150] S. Liu, E. Haller, J. Horak, M. Brandstetter, T. Heuser, and M. Lammerhofer, "Protein A- and Protein G-gold nanoparticle bioconjugates as nano-immunoaffinity platform for human IgG depletion in plasma and antibody extraction from cell culture supernatant," *Talanta*, vol. 194, pp. 664-672, Mar 1 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2018.10.079.
- [151] X. Sun, G. Zhang, R. S. Keynton, M. G. O'Toole, D. Patel, and A. M. Gobin, "Enhanced drug delivery via hyperthermal membrane disruption using targeted gold nanoparticles with PEGylated Protein-G as a cofactor," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 8, pp. 1214-22, Nov 2013, doi: 10.1016/j.nano.2013.04.002.

- [152] C. Ward *et al.*, "New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer," *Cancer Treat Rev*, vol. 39, no. 2, pp. 171-9, Apr 2013, doi: 10.1016/j.ctrv.2012.08.004.
- [153] C. M. Worsley, R. B. Veale, and E. S. Mayne, "The acidic tumour microenvironment: Manipulating the immune response to elicit escape," *Hum Immunol*, vol. 83, no. 5, pp. 399-408, May 2022, doi: 10.1016/j.humimm.2022.01.014.
- [154] K. Rajagopalan *et al.*, "Novel unconventional binding site in the variable region of immunoglobulins," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 12, pp. 6019-24, Jun 11 1996, doi: 10.1073/pnas.93.12.6019.
- [155] N. J. Alves *et al.*, "Selective photocrosslinking of functional ligands to antibodies via the conserved nucleotide binding site," *Biomaterials*, vol. 34, no. 22, pp. 5700-10, Jul 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.082.
- [156] N. J. Alves, T. Kiziltepe, and B. Bilgicer, "Oriented surface immobilization of antibodies at the conserved nucleotide binding site for enhanced antigen detection," *Langmuir*, vol. 28, no. 25, pp. 9640-8, Jun 26 2012, doi: 10.1021/la301887s.
- [157] N. Mustafaoglu, T. Kiziltepe, and B. Bilgicer, "Site-specific conjugation of an antibody on a gold nanoparticle surface for one-step diagnosis of prostate specific antigen with dynamic light scattering," *Nanoscale*, vol. 9, no. 25, pp. 8684-8694, Jun 29 2017, doi: 10.1039/c7nr03096g.
- [158] N. J. Alves, S. D. Stimple, M. W. Handlogten, J. D. Ashley, T. Kiziltepe, and B. Bilgicer, "Small-molecule-based affinity chromatography method for antibody purification via nucleotide binding site targeting," *Anal Chem*, vol. 84, no. 18, pp. 7721-8, Sep 18 2012, doi: 10.1021/ac300952r.
- [159] E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, "From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions," *Acc Chem Res*, vol. 44, no. 9, pp. 666-76, Sep 20 2011, doi: 10.1021/ar200148z.
- [160] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 40, no. 11, pp. 2004-2021, Jun 1 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
- [161] J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao, and P. G. Wang, "The impact of click chemistry in medicinal chemistry," *Expert Opin Drug Discov*, vol. 7, no. 6, pp. 489-501, Jun 2012, doi: 10.1517/17460441.2012.682725.
- [162] X. Jiang *et al.*, "Recent applications of click chemistry in drug discovery," *Expert Opin Drug Discov*, vol. 14, no. 8, pp. 779-789, Aug 2019, doi: 10.1080/17460441.2019.1614910.
- [163] W. Xi, T. F. Scott, C. J. Kloxin, and C. N. Bowman, "Click Chemistry in Materials Science," *Advanced Functional Materials*, vol. 24, no. 18, pp. 2572-2590, 2014, doi: 10.1002/adfm.201302847.
- [164] Y. Takayama, K. Kusamori, and M. Nishikawa, "Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery," *Molecules*, vol. 24, no. 1, Jan 4 2019, doi: 10.3390/molecules24010172.

- [165] E. Kim and H. Koo, "Biomedical applications of copper-free click chemistry: in vitro, in vivo, and ex vivo," *Chem Sci*, vol. 10, no. 34, pp. 7835-7851, Sep 14 2019, doi: 10.1039/c9sc03368h.
- [166] P. Wu, "The Nobel Prize in Chemistry 2022: Fulfilling Demanding Applications with Simple Reactions," *ACS Chem Biol*, vol. 17, no. 11, pp. 2959-2961, Nov 18 2022, doi: 10.1021/acschembio.2c00788.
- [167] X. M. Liu, A. Thakur, and D. Wang, "Efficient synthesis of linear multifunctional poly(ethylene glycol) by copper(I)-catalyzed Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 9, pp. 2653-8, Sep 2007, doi: 10.1021/bm070430i.
- [168] R. Kulbokaite, G. Ciuta, M. Netopilik, and R. Makuska, "N-PEG'ylation of chitosan via "click chemistry" reactions," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 69, no. 10, pp. 771-778, 2009, doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2009.06.010.
- [169] C. C. Lin, A. Raza, and H. Shih, "PEG hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell spheroids," *Biomaterials*, vol. 32, no. 36, pp. 9685-95, Dec 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.083.
- [170] S. H. Lee *et al.*, "Deep Tumor Penetration of Drug-Loaded Nanoparticles by Click Reaction-Assisted Immune Cell Targeting Strategy," *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 35, pp. 13829-13840, Sep 4 2019, doi: 10.1021/jacs.9b04621.
- [171] A. Maggi *et al.*, "Development of a novel antibody-tetrazine conjugate for bioorthogonal pretargeting," *Org Biomol Chem*, vol. 14, no. 31, pp. 7544-51, Aug 21 2016, doi: 10.1039/c6ob01411a.
- [172] S. Jeong *et al.*, "Highly robust and optimized conjugation of antibodies to nanoparticles using quantitatively validated protocols," *Nanoscale*, vol. 9, no. 7, pp. 2548-2555, Feb 16 2017, doi: 10.1039/c6nr04683e.
- [173] H. D. Agnew *et al.*, "Iterative in situ click chemistry creates antibody-like protein-capture agents," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 48, no. 27, pp. 4944-8, 2009, doi: 10.1002/anie.200900488.
- [174] C. Nieto, M. A. Vega, and E. M. Martín del Valle, "Trastuzumab: More than a Guide in HER2-Positive Cancer Nanomedicine," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 9, p. 1674, 2020. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/9/1674>.
- [175] J. Utterstrom, S. Naeimipour, R. Selegard, and D. Aili. (2020, Dec 27) Coiled coil-based therapeutics and drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 26-43. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33378707>
- [176] B. Apostolovic, S. P. Deacon, R. Duncan, and H. A. Klok, "Hybrid polymer therapeutics incorporating bioresponsive, coiled coil peptide linkers," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 5, pp. 1187-95, May 10 2010, doi: 10.1021/bm901313c.
- [177] C. Wang, R. J. Stewart, and J. Kopecek, "Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains," *Nature*, vol. 397, no. 6718, pp. 417-20, Feb 4 1999, doi: 10.1038/17092.

- [178] S. I. Lim, C. I. Lukianov, and J. A. Champion, "Self-assembled protein nanocarrier for intracellular delivery of antibody," *J Control Release*, vol. 249, pp. 1-10, Mar 10 2017, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.01.007.
- [179] P. Kongsuphol, S. K. Arya, C. Chung Wong, L. J. Polla, and M. K. Park, "Coiled-coil peptide based sensor for ultra-sensitive thrombin detection," *Biosens Bioelectron*, vol. 55, pp. 26-31, May 15 2014, doi: 10.1016/j.bios.2013.11.070.
- [180] M. M. Stevens, N. T. Flynn, C. Wang, D. A. Tirrell, and R. Langer, "Coiled-Coil Peptide-Based Assembly of Gold Nanoparticles," *Advanced Materials*, vol. 16, no. 11, pp. 915-918, 2004, doi: 10.1002/adma.200306430.
- [181] G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, and M. D. O'Connor-McCourt, "Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding," *Biochemistry*, vol. 42, no. 6, pp. 1754-63, Feb 18 2003, doi: 10.1021/bi0268450.
- [182] S. Noël, "Développement de revêtements polymériques bioactifs pour prothèses vasculaires synthétiques," Ph.D., Génie Biomédical, Polytechnique Montréal, 1844, 2015. [Online]. Available: <https://publications.polymtl.ca/1844/>
- [183] R. Jacquemart, N. Chavane, Y. Durocher, C. Hoemann, G. De Crescenzo, and M. Jolicoeur, "At-line monitoring of bioreactor protein production by Surface Plasmon Resonance," *Biotechnol Bioeng*, vol. 100, no. 1, pp. 184-8, May 1 2008, doi: 10.1002/bit.21725.
- [184] B. Liberelle *et al.*, "New ELISA approach based on coiled-coil interactions," *J Immunol Methods*, vol. 362, no. 1-2, pp. 161-7, Oct 31 2010, doi: 10.1016/j.jim.2010.09.027.
- [185] R. Oliverio, V. Patenaude, B. Liberelle, N. Virgilio, X. Banquy, and G. De Crescenzo, "Macroporous dextran hydrogels for controlled growth factor capture and delivery using coiled-coil interactions," *Acta Biomater*, vol. 153, pp. 190-203, Nov 2022, doi: 10.1016/j.actbio.2022.09.020.
- [186] A. Roth *et al.*, "Coiled Coil Affinity-Based Systems for the Controlled Release of Biofunctionalized Gold Nanoparticles from Alginate Hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 20, no. 5, pp. 1926-1936, May 13 2019, doi: 10.1021/acs.biomac.9b00137.
- [187] A. Fleming *et al.*, "Designing Functional Bionanoconstructs for Effective In Vivo Targeting," *Bioconj Chem*, vol. 33, no. 3, pp. 429-443, Mar 16 2022, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00546.
- [188] T. R. Ray, "Gold Nanoparticle Characterization : Improved Methods for Measuring Nanoparticles Surface Properties and Colloidal Stability," Ph.D DISSERTATION, University of California, Santa Barbara, ProQuest LLC, 10011408, 2015. [Online]. Available: <https://search.proquest.com/docview/1765692886?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true>
- [189] P. J. Goodhew, J. Humphreys, and J. Humphreys, *Electron Microscopy and Analysis*. 2000.
- [190] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski, and U. Dahmen, "Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe," *Phys Rev Lett*, vol. 102, no. 9, p. 096101, Mar 6 2009, doi: 10.1103/PhysRevLett.102.096101.

- [191] AnaPath. "Electron Microscopy." <https://anapath.ch/electron-microscopy-2/> (accessed Janvier, 2023).
- [192] U. Nobbmann and A. Morfesis, "Light scattering and nanoparticles," *Materials Today*, vol. 12, no. 5, pp. 52-54, 2009, doi: 10.1016/s1369-7021(09)70164-6.
- [193] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *J Control Release*, vol. 235, pp. 337-351, Aug 10 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [194] *ISO 22412:2017 Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS)*, I. S. Organization, 2017.
- [195] B. Zhang, H. Liu, X. Huang, C. Dong, and J. Ren, "Size Distribution of Nanoparticles in Solution Characterized by Combining Resonance Light Scattering Correlation Spectroscopy with the Maximum Entropy Method," *Anal Chem*, vol. 89, no. 22, pp. 12609-12616, Nov 21 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b04166.
- [196] D. Griffiths, P. Carnell-Morris, and M. Wright, "Nanoparticle Tracking Analysis for Multiparameter Characterization and Counting of Nanoparticle Suspensions," *Methods Mol Biol*, vol. 2118, pp. 289-303, 2020, doi: 10.1007/978-1-0716-0319-2_22.
- [197] T. Misono, "Dynamic Light Scattering (DLS)," in *Measurement Techniques and Practices of Colloid and Interface Phenomena*, 2019, ch. Chapter 10, pp. 65-69.
- [198] H. Hinterwirth *et al.*, "Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles," *J Sep Sci*, vol. 36, no. 17, pp. 2952-61, Sep 2013, doi: 10.1002/jssc.201300460.
- [199] B. D. Busbee, S. O. Obare, and C. J. Murphy, "An Improved Synthesis of High-Aspect-Ratio Gold Nanorods," *Advanced Materials*, vol. 15, no. 5, pp. 414-416, 2003, doi: 10.1002/adma.200390095.
- [200] B. N. Khlebtsov and N. G. Khlebtsov, "On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method," *Colloid Journal*, vol. 73, no. 1, pp. 118-127, 2011, doi: 10.1134/s1061933x11010078.
- [201] W. Haiss, N. T. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra," *Anal Chem*, vol. 79, no. 11, pp. 4215-21, Jun 1 2007, doi: 10.1021/ac0702084.
- [202] V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, B. N. Khlebtsov, and N. G. Khlebtsov, "Measurement of mean size and evaluation of polydispersity of gold nanoparticles from spectra of optical absorption and scattering," *Optics and Spectroscopy*, vol. 96, no. 1, pp. 128-135, 2014, doi: 10.1134/1.1643997.
- [203] J. D. Clogston and A. K. Patri, "Zeta potential measurement," *Methods Mol Biol*, vol. 697, pp. 63-70, 2011, doi: 10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- [204] Y. Chu, E. Schonbrun, T. Yang, and K. B. Crozier, "Experimental observation of narrow surface plasmon resonances in gold nanoparticle arrays," *Applied Physics Letters*, vol. 93, no. 18, 2008, doi: 10.1063/1.3012365.
- [205] A. E. James and J. D. Driskell, "Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light

- scattering (DLS)," *Analyst*, vol. 138, no. 4, pp. 1212-8, Feb 21 2013, doi: 10.1039/c2an36467k.
- [206] M. Dasog, A. Kavianpour, M. F. Paige, H.-B. Kraatz, and R. W. J. Scott, "Chemical functionalization and modification of surface-bound cystamine–glycine monolayers on gold nanoparticles," *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 86, no. 5, pp. 368-375, 2008, doi: 10.1139/v08-025.
- [207] K. B. Sebby and E. Mansfield, "Determination of the surface density of polyethylene glycol on gold nanoparticles by use of microscale thermogravimetric analysis," *Anal Bioanal Chem*, vol. 407, no. 10, pp. 2913-22, Apr 2015, doi: 10.1007/s00216-015-8520-x.
- [208] H. Hinterwirth, S. Kappel, T. Waitz, T. Prohaska, W. Lindner, and M. Lammerhofer, "Quantifying thiol ligand density of self-assembled monolayers on gold nanoparticles by inductively coupled plasma-mass spectrometry," *ACS Nano*, vol. 7, no. 2, pp. 1129-36, Feb 26 2013, doi: 10.1021/nn306024a.
- [209] K. Tripathi and J. D. Driskell, "Quantifying Bound and Active Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles: A Comprehensive and Robust Approach To Evaluate Immobilization Chemistry," *ACS Omega*, vol. 3, no. 7, pp. 8253-8259, Jul 31 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b00591.
- [210] M. Raoof *et al.*, "Stability of antibody-conjugated gold nanoparticles in the endolysosomal nanoenvironment: implications for noninvasive radiofrequency-based cancer therapy," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 7, pp. 1096-105, Oct 2012, doi: 10.1016/j.nano.2012.02.001.
- [211] M. Ben Haddada *et al.*, "Gold nanoparticle-based localized surface plasmon immunosensor for staphylococcal enterotoxin A (SEA) detection," *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, no. 26, pp. 6227-6234, Oct 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0563-8.
- [212] L. Garcia-Fernandez *et al.*, "Conserved effects and altered trafficking of Cetuximab antibodies conjugated to gold nanoparticles with precise control of their number and orientation," *Nanoscale*, vol. 9, no. 18, pp. 6111-6121, May 11 2017, doi: 10.1039/c7nr00947j.
- [213] L. Zhang, D. Hu, M. Salmain, B. Liedberg, and S. Boujday, "Direct quantification of surface coverage of antibody in IgG-Gold nanoparticles conjugates," *Talanta*, vol. 204, pp. 875-881, Nov 1 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.05.104.
- [214] K. Yoshimoto, M. Nishio, H. Sugawara, and Y. Nagasaki, "Direct observation of adsorption-induced inactivation of antibody fragments surrounded by mixed-PEG layer on a gold surface," *J Am Chem Soc*, vol. 132, no. 23, pp. 7982-9, Jun 16 2010, doi: 10.1021/ja910372e.
- [215] H. Liao and J. H. Hafner, "Gold Nanorod Bioconjugates," *Chemistry of Materials*, vol. 17, no. 18, pp. 4636-4641, 2005, doi: 10.1021/cm050935k.
- [216] P. P. Joshi, S. J. Yoon, W. G. Hardin, S. Emelianov, and K. V. Sokolov, "Conjugation of antibodies to gold nanorods through Fc portion: synthesis and molecular specific imaging," *Bioconjug Chem*, vol. 24, no. 6, pp. 878-88, Jun 19 2013, doi: 10.1021/bc3004815.
- [217] M. Yuan *et al.*, "A method for removing self-assembled monolayers on gold," *Langmuir*, vol. 24, no. 16, pp. 8707-10, Aug 19 2008, doi: 10.1021/la800287e.

- [218] S. L. Filbrun and J. D. Driskell, "A fluorescence-based method to directly quantify antibodies immobilized on gold nanoparticles," *Analyst*, vol. 141, no. 12, pp. 3851-7, Jun 21 2016, doi: 10.1039/c6an00193a.
- [219] R. Oliverio, B. Liberelle, F. Murschel, A. Garcia-Ac, X. Banquy, and G. De Crescenzo, "Versatile and High-Throughput Strategy for the Quantification of Proteins Bound to Nanoparticles," (in English), *Acs Applied Nano Materials*, vol. 3, no. 10, pp. 10497-10507, Oct 23 2020, doi: 10.1021/acsanm.0c02414.
- [220] N. C. Veitch, "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme," *Phytochemistry*, vol. 65, no. 3, pp. 249-59, Feb 2004, doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
- [221] P. F. Gao, G. Lei, and C. Z. Huang, "Dark-Field Microscopy: Recent Advances in Accurate Analysis and Emerging Applications," *Anal Chem*, vol. 93, no. 11, pp. 4707-4726, Mar 23 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.0c04390.
- [222] K. Subik *et al.*, "The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines," *Breast Cancer (Auckl)*, vol. 4, pp. 35-41, May 20 2010, doi: 10.1177/117822341000400004.
- [223] D. L. Holliday and V. Speirs, "Choosing the right cell line for breast cancer research," *Breast Cancer Res*, vol. 13, no. 4, p. 215, Aug 12 2011, doi: 10.1186/bcr2889.
- [224] F. Cambay, O. Henry, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, "Impact of N-glycosylation on Fcγ receptor / IgG interactions: unravelling differences with an enhanced surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions," *MAbs*, vol. 11, no. 3, pp. 435-452, Apr 2019, doi: 10.1080/19420862.2019.1581017.
- [225] H. Kawasaki, Y. Takeda, and R. Arakawa, "Mass spectrometric analysis for high molecular weight synthetic polymers using ultrasonic degradation and the mechanism of degradation," *Anal Chem*, vol. 79, no. 11, pp. 4182-7, Jun 1 2007, doi: 10.1021/ac062304v.
- [226] P. V. Tsalu, G. W. Kim, J. W. Hong, and J. W. Ha, "Homogeneous localized surface plasmon resonance inflection points for enhanced sensitivity and tracking plasmon damping in single gold bipyramids," *Nanoscale*, vol. 10, no. 26, pp. 12554-12563, Jul 9 2018, doi: 10.1039/c8nr03311k.
- [227] D. R. Stirling, M. J. Swain-Bowden, A. M. Lucas, A. E. Carpenter, B. A. Cimini, and A. Goodman, "CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability," *BMC Bioinformatics*, vol. 22, no. 1, p. 433, Sep 10 2021, doi: 10.1186/s12859-021-04344-9.
- [228] G. Ortiz, "Quantification de l'immunomarquage spécifique par nanoparticules plasmoniques sur lignées cellulaires cancéreuses," Maitrise ès sciences appliquées, Institut de génie biomédical, Polytechnique Montréal, 2022.
- [229] S. Link and M. A. El-Sayed, "Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 21, pp. 4212-4217, 1999, doi: 10.1021/jp984796o.
- [230] R. Nicoară, M. Ilieș, A. Uifălean, C. A. Iuga, and F. Loghin, "Quantification of the PEGylated Gold Nanoparticles Protein Corona. Influence on Nanoparticle Size and Surface Chemistry," *Applied Sciences*, vol. 9, no. 22, 2019, doi: 10.3390/app9224789.

- [231] S. Gao, F. Rojas-Vega, J. Rocha-Martin, and J. M. Guisan, "Oriented immobilization of antibodies through different surface regions containing amino groups: Selective immobilization through the bottom of the Fc region," *Int J Biol Macromol*, vol. 177, pp. 19-28, Feb 17 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.103.
- [232] B. Liberelle, C. Boucher, J. Chen, M. Jolicoeur, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, "Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response," *Bioconjug Chem*, vol. 21, no. 12, pp. 2257-66, Dec 15 2010, doi: 10.1021/bc1002604.
- [233] NanoFASE. "Zeta Potential." http://nanofase.eu/show/zeta-potential_1273/ (accessed Janvier, 2023).
- [234] E. Harrison *et al.*, "A comparison of gold nanoparticle surface co-functionalization approaches using Polyethylene Glycol (PEG) and the effect on stability, non-specific protein adsorption and internalization," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 62, pp. 710-8, May 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.02.003.
- [235] A. Davis and T. Tran, "Gold dissolution in iodide electrolytes," *Hydrometallurgy*, vol. 26, no. 2, pp. 163-177, 1991, doi: 10.1016/0304-386x(91)90029-l.
- [236] L. J. Jones, R. P. Haugland, and V. L. Singer, "Development and characterization of the NanoOrange protein quantitation assay: a fluorescence-based assay of proteins in solution," *Biotechniques*, vol. 34, no. 4, pp. 850-4, 856, 858 passim, Apr 2003, doi: 10.2144/03344pt03.

ANNEXE A MOTIVATIONS POUR L'ABANDON DU POTENTIEL ZETA COMME MESURE DE STABILITÉ NANOSCOPIQUE

A.1 Contextualisation

Le potentiel ζ représente le potentiel électrique existant autour d'une nanoparticule en suspension induit par la présence d'ions de charge opposée à sa surface (Figure A.1). Ainsi, le potentiel ζ mesure l'intensité de la répulsion électrostatique entre des nanoparticules en suspension, ce qui traduit leur stabilité nanoscopique (voir section 2.3.1). On considère qu'une suspension de nanoparticules est stable lorsque le potentiel ζ est inférieur à -30 mV ou supérieur à +30 mV [203].

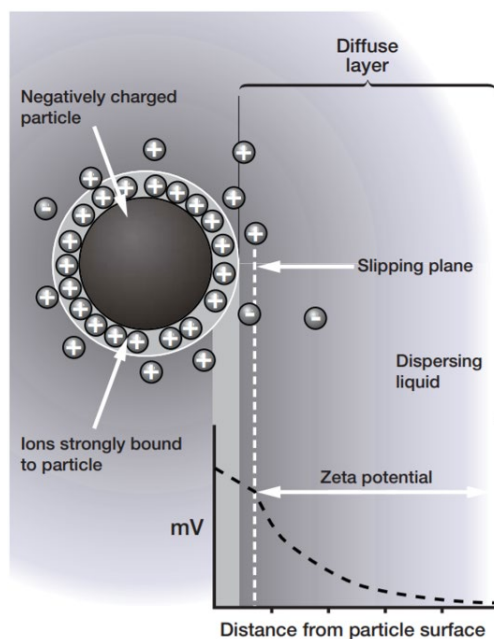


Figure A.1. Illustration de la Mesure du Potentiel ζ

Figure tirée de [233]

Ici, le potentiel ζ de AuNPs simplement PEGylées avec du mPEG va être mesuré afin d'évaluer la capacité de cette technique à rendre compte de la stabilité nanoscopique des AuNPs après greffage chimique à leur surface.

A.2 Matériel et méthodes Expérimentales

A.2.1 Réactifs chimiques

La provenance ainsi que les caractéristiques des AuNPs (diamètre 100 nm), du mPEG (5 kDa), et du citrate de sodium utilisés ici sont détaillées dans la section 4.1 de ce mémoire.

A.2.2 PEGylation à haute densité des AuNPs

Le protocole complet pour la fabrication de AuPEG_{HD} (i.e., PEGylation à Haute Densité des AuNPs avec mPEG) est détaillé dans la section 4.3.1 de ce mémoire. En résumé, les AuNPs à 0.05 mg/mL dans du citrate de sodium (2 mM, pH = 7) ont été incubées avec du mPEG (concentration finale 3.6 μ M) pendant 16 h à température ambiante. À la suite de cette incubation, les AuPEG_{HD} fabriquées ont été purifiées par 3 cycles de centrifugation – resuspension dans du citrate de sodium (2 mM, pH = 7).

A.2.3 Procédures de mesures DLS

Les mesures de DLS (potentiel ζ , indice de polydispersité et *Z-average*) ont été réalisées avec le Zetasizer Pro Blue de Malvern Panalytical (Malvern, Royaume-Uni).

Le potentiel ζ des AuPEG_{HD} a été mesuré dans la cuvette DTS 1070 (Malvern Panalytical). Un seul lot de AuPEG_{HD} a été préparé, et son potentiel ζ a été déterminé dans la cuvette DTS 1070 par trois mesures indépendantes en lavant la cuvette entre chaque mesure. Les valeurs de potentiel ζ obtenues pour chacune de ces mesures indépendantes correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type standard de trois mesures successives par l'appareil sans retirer l'échantillon de la cuvette.

L'indice de polydispersité et le *Z-average* des AuPEG_{HD} ont été déterminés dans les cuvettes DTS 1070 et ZEN 2112 (Malvern Panalytical). Ces mesures ont été effectuées avant celles de potentiel ζ . Un seul lot de AuPEG_{HD} a été préparé, et a été étudié dans chaque cuvette par trois mesures indépendantes en lavant les cuvettes entre chaque mesure. Les valeurs d'indice de polydispersité et de *Z-average* obtenues pour chacune de ces mesures indépendantes correspondent respectivement à la moyenne + écart-type standard et moyenne $\pm$ écart-type standard de cinq mesures successives effectuées par l'appareil sans retirer l'échantillon des cuvettes.

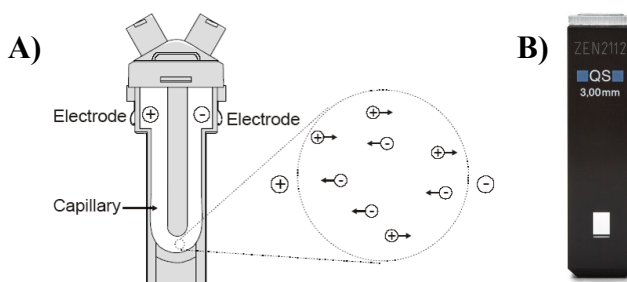


Figure A. 2. Représentation des cuvettes DTS 1070 et ZEN 2112 pour la DLS

A) Représentation de la cuvette DTS 1070 et de son fonctionnement pour mesurer le potentiel ζ des échantillons par mobilité électrophorétique. Cette cuvette, nécessitant au moins 800 μL par mesure, permet également de mesurer l'indice de polydispersité et le Z-average des nanoparticules en suspension. B) Représentation de la micro-cuvette ZEN 2112. Cette cuvette ne permet pas de mesurer le potentiel ζ des échantillons, mais ne requiert que 20 μL pour mesurer l'indice de polydispersité et le Z-average des nanoparticules en suspension.

A.3 Résultats

A.3.1 Potentiel ζ

Le potentiel ζ de AuPEG_{HD} dans du citrate de sodium (2 mM, pH = 7) en provenance d'un unique lot a été déterminé par trois mesures indépendantes dans la cuvette DTS 1070 (Figure A.3). On peut d'abord remarquer que la variabilité intra-échantillons est faible, les erreurs commises sur les trois mesures étant toutes inférieures à 8 % des valeurs moyennes. En revanche, la variabilité inter-échantillons est grande. Les mesures 1, 2 et 3, entre lesquelles la cuvette DTS 1070 a été lavée, fournissent des valeurs de potentiel ζ décroissantes : il y a une variation de 50 % entre les mesures 1 et 3. Ces trois mesures indépendantes proviennent cependant du même lot du AuPEG_{HD}. Une telle variabilité n'est donc pas satisfaisante pour évaluer précisément la stabilité des nanoparticules. De plus, toutes les mesures effectuées (3×3 mesures) indiquent un potentiel ζ négatif et supérieur à -30 mV, signe d'une suspension instable de nanoparticules. Or, le potentiel ζ des AuNPs nues avant PEGylation a été mesuré et valait -54.2 ± 0.31 mV, illustrant la stabilité des nanoparticules sans PEG. Puisque PEG est pourtant connu pour stabiliser les AuNPs, il est étrange de mesurer des valeurs de potentiel ζ supérieures à -30 mV pour AuPEG_{HD}.

Deux hypothèses peuvent donc être émises quant aux valeurs de potentiel ζ obtenues : 1) la PEGylation a déstabilisé les nanoparticules et 2) l'instabilité apparente est due à la cuvette DTS 1070. Ces deux hypothèses vont être testées en mesurant l'indice de polydispersité et le Z-average de ces mêmes AuPEG_{HD} avec la cuvette DTS 1070 ainsi que la microcuvette ZEN 2112.

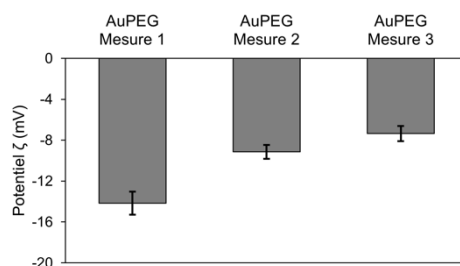


Figure A.3. Mesure du potentiel ζ de AuPEG_{HD} avec la cuvette DTS 1070

Les valeurs de potentiel ζ obtenues pour chacune de ces mesures indépendantes correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type standard de trois mesures successives par l'appareil.

A.3.2 Comparaison des cuvettes DTS 1070 et ZEN 2112

L'indice de polydispersité des AuPEG_{HD} a été mesuré dans les cuvettes DTS 1070 (Figure A.4.A) et ZEN 2112 (Figure A.4.B), en trois fois indépendantes dans chaque cuvette. Comme pour les mesures de potentiel ζ , on remarque une grande variabilité inter-échantillons lorsque les mesures sont effectuées avec la cuvette DTS 1070 (Figure A.4.A). De plus, les mesures 1 et 3 indiquent un indice de polydispersité supérieur à 0.08, traduisant une instabilité des AuPEG_{HD}. Au contraire, la variabilité inter-échantillons est très faible pour les mesures effectuées avec la cuvette ZEN 2112 (Figure A.4.B). L'indice de polydispersité est inférieur à 0.08, indiquant que les nanoparticules sont en réalité hautement monodisperses et stables.

Le Z-average des AuPEG_{HD} a également été mesuré dans les cuvettes DTS 1070 (Figure A.4.C) et ZEN 2112 (Figure A.4.D). Le Z-average correspond à la moyenne des diamètres hydrodynamiques mesurés dans un échantillon, pondérée par la distribution en intensité de ces diamètres. On remarque que le Z-average obtenu dans la cuvette DTS 1070 est plus élevé aux mesures 1 et 3 qu'à la mesure 2 (Figure A.4.C), certainement signe que les AuPEG_{HD} ont été déstabilisées au point de former une seconde population par agrégation. Cette observation est cohérente avec les mesures d'indice de polydispersité effectuées précédemment, où les échantillons

mesurés avec la cuvette DTS 1070 ont été caractérisés comme polydisperses pour les mesures 1 et 3 (Figure A.4.A). En revanche, la mesure du Z-average dans la micro-cuvette ZEN 2112 mène à une très faible variabilité inter-échantillons (Figure A.4.D). Puisque les AuPEG_{HD} sont systématiquement caractérisées comme hautement monodisperses dans cette cuvette (Figure A.4.B), les *Z-averages* mesurés correspondent au diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules. La cuvette ZEN 2112 permettant des mesures qui attestent de la monodispersité et stabilité des AuPEG_{HD}, l'hypothèse qui accusait la cuvette DTS 1070 de perturber les mesures est retenue.

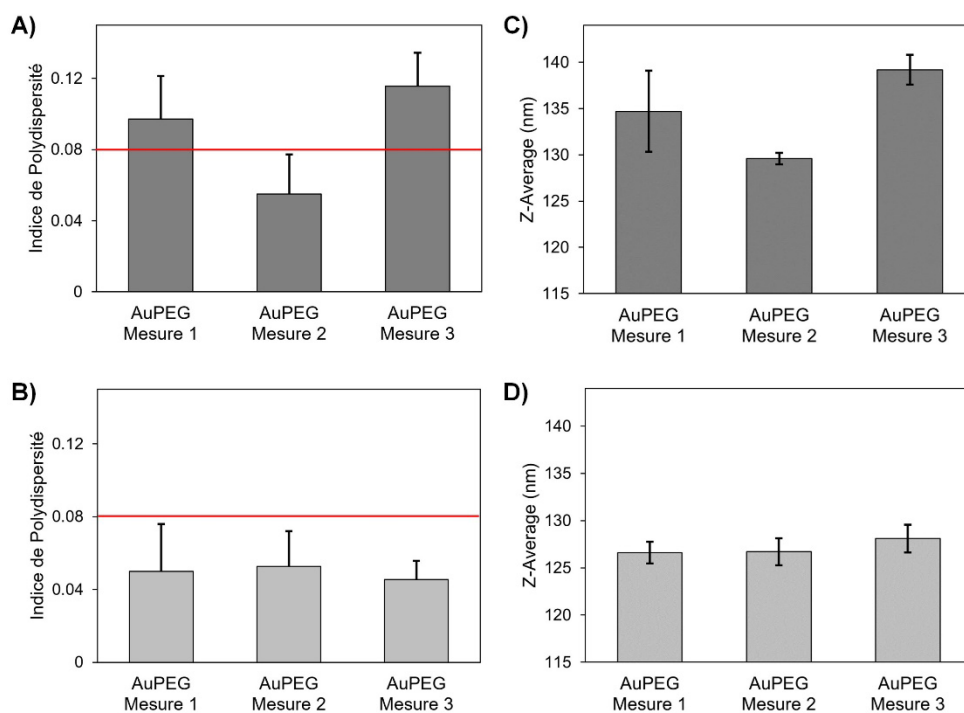


Figure A.4. Comparaison des indices de polydispersité et Z-average de AuPEG_{HD} obtenus dans les cuvettes DTS 1070 (barres foncées) et ZEN 2112 (barres claires)

A) Indice de polydispersité des AuPEG_{HD} mesuré par 3 fois indépendantes avec la cuvette DTS 1070. La ligne rouge indique la limite en dessous de laquelle les nanoparticules sont considérées comme hautement monodisperses. B) Indice de polydispersité des AuPEG_{HD} mesuré par 3 fois indépendantes avec la cuvette ZEN 2112. C) Z-average des AuPEG_{HD} mesuré par 3 fois indépendantes avec la cuvette DTS 1070. D) Z-average des AuPEG_{HD} mesuré par 3 fois indépendantes avec la cuvette ZEN 2112. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type sur 5 mesures successives effectuées par l'appareil sans retirer les échantillons des cuvettes.

A.4 Conclusion

Il a ici été montré que la cuvette DTS 1070, utilisée pour mesurer le potentiel ζ , peut interférer avec les mesures en déstabilisant les AuPEG_{HD}. La stabilité de ces nanoparticules, apportée par le greffage de PEG à leur surface, est pourtant connue [234]. En outre, la réalisation de ce projet de recherche repose sur l'immobilisation de peptides et/ou anticorps à la surface des AuNPs, introduisant plus d'instabilité qu'une simple monocouche de PEG. Il a donc été anticipé que toutes ces mesures seraient encore plus perturbées par la cuvette DTS 1070. C'est pourquoi il a été choisi de poursuivre le projet avec la micro-cuvette ZEN 2112 uniquement. Cette micro-cuvette ne permet pas la mesure du potentiel ζ des nanoparticules, mais permet de mesurer leur indice de polydispersité avec peu de variabilité inter-échantillons. Ainsi, la micro-cuvette ZEN 2112 permettra de caractériser la stabilité nanoscopique de toutes les nanoparticules par un paramètre fiable, plutôt que deux paramètres peu fiables avec la cuvette DTS 1070.

ANNEXE B MOTIVATIONS POUR L'ABANDON DE LA QUANTIFICATION DES ANTICORPS IMMOBILISÉS SUR LES NANOPARTICULES APRÈS LEUR SOLUBILISATION PAR KI / I₂

B.1 Contextualisation

Filbrun et Driskell [218] ont mis au point une stratégie pour quantification directe des anticorps immobilisés sur des nanoparticules d'or (voir section 2.3.2.2). Pour cela, des AuNPs biofonctionnalisées sont d'abord dissoutes par incubation avec un mélange de KI et I₂. Ce mélange permet la formation de l'ion I₃⁻ (Équation B.1), qui réagira ensuite avec les atomes d'or (Équation B.2) jusqu'à dissoudre entièrement les AuNPs [235]. Ainsi, les anticorps précédemment immobilisés à la surface des nanoparticules sont solubilisés et leur quantification est possible. Pour cela, Filbrun et Driksell ont utilisé *NanoOrange*, un nouveau composant permettant de quantifier les protéines en solution par fluorescence [236]. Les auteurs ont ajouté une étape de dessalage des échantillons pour évacuer I₂ avant la quantification des anticorps, car sa présence pourrait interférer avec la fluorescence induite par *NanoOrange*.



Ici, la capacité de *NanoOrange* à quantifier les anticorps TZM après leur incubation dans un mélange de KI et I₂ puis leur dessalage va être évaluée pour vérifier si ce système permet une quantification fiable des protéines avant même leur immobilisation sur des AuNPs.

B.2 Matériel et méthodes expérimentales

B.2.1 Réactifs chimiques et matériel

Les provenances des anticorps TZM et du tampon PBS utilisés ici sont détaillées dans la section 4.1 de ce mémoire.

Le réactif NanoOrange, sa solution de dilution ainsi que la solution standard de BSA ont été achetés à Invitrogen (ThermoFisher Scientific; #N10271, #N10272 et #N10273 respectivement). Ces trois composés ont été conservés à 4°C dans l'obscurité dès leur réception.

Le diiode solide I_2 a été acheté chez Fluka (#57652). L'iodure de potassium solide KI a été acheté chez J.T. Baker (#3165-01). La colonne de dessalage NAP25 utilisée pour séparer ces composés des anticorps a été achetée chez Cytiva (#17-0852-01)

B.2.2 Mélange KI / I_2 en solution

La solution de KI / I_2 a été préparée d'après le protocole de Filbrun et Driskell [218] : 221 mg de KI et 50.8 mg de I_2 ont été ajoutés à 4 mL d'eau MilliQ pour atteindre des concentrations de 333 mM et 50 mM respectivement. La solution a été ultrasoniquée jusqu'à dissolution complète des composés.

B.2.2 Préparation de la solution de travail NanoOrange

La solution de travail permettant la quantification des protéines avec NanoOrange a été préparée selon les recommandations du fabricant. Pour cela, 1 mL de solution et 20 μ L du réactif NanoOrange ont été mélangés à 9 mL d'eau MilliQ. Une solution fraîche a été préparée chaque jour et conservée dans l'obscurité jusqu'à utilisation.

B.2.2 Traitement des échantillons

Les échantillons ont tous été préparés dans de l'eau MilliQ ou du PBS. Les échantillons contenant 1.5 µg/mL de BSA ou 1.5 µg/mL de TzM ont été préparés d'après les solutions mères décrites à la section B.2.1. Les échantillons contenant du KI / I₂ ont été préparés en ajoutant 100 µL du mélange pour 1 mL d'eau MilliQ ou PBS.

Après 15 min d'incubation, tous les échantillons ont été dessalés avec les colonnes NAP25 préalablement équilibrées dans l'eau MilliQ.

Les échantillons pour quantification avec NanoOrange ont ensuite été préparés selon les recommandations du fabricant. Pour cela, 300 µL de chaque éluat de dessalage a été prélevé et mélangé avec 600 µL de solution de travail NanoOrange. Tous les échantillons ont ensuite été incubés 10 min à 90°C dans l'obscurité. Après retour à température ambiante, les échantillons ont été prélevés dans une plaque 96 puits sombre et analysés par fluorescence (excitation 485 nm, émission 590 nm) par le spectrophotomètre Victor V (Perkin Elmer). Les valeurs de fluorescence obtenues correspondent aux moyennes $\pm$ écarts types standards des échantillons mesurés en triplicatas.

B.3 Résultats

L'influence du passage à travers la colonne de dessalage sur la fluorescence émise par *NanoOrange* a d'abord été étudiée en comparant les niveaux de fluorescence émis par de l'eau MilliQ avant et après être passée à travers la colonne NAP25 (Figure B.1.A). On remarque que le niveau de fluorescence de l'eau MilliQ est plus élevé après son passage dans la colonne. Les raisons de cette augmentation inattendue n'ont pas été investiguées. Afin de tenir compte de cet effet dans l'analyse des échantillons suivants, il a été décidé que les solutions de référence (eau MilliQ ou PBS) seraient à présent également passées à travers la colonne.

La capacité de *NanoOrange* à détecter une solution de BSA (1.5 µg/mL) incubée avec ou sans KI / I₂ puis dessalée a été évaluée (Figure B.1.B). La BSA incubée sans KI / I₂ puis dessalée a effectivement été détectée par *NanoOrange*. En revanche, on remarque que la seule présence de KI / I₂ dans la solution d'incubation provoque une hausse de la fluorescence malgré le dessalage. Les raisons pour cette augmentation de fluorescence due à l'incubation avec KI / I₂ n'ont pas été

investiguées. Lorsque BSA et KI / I₂ étaient mélangés dans la solution d'incubation, les augmentations de fluorescence observées pour les deux composants individuellement se sont additionnées. En conséquence, il faut que les solutions de références pour la quantification des protéines dessalées contiennent également du KI / I₂ afin de tenir compte de son impact sur les niveaux de fluorescence.

Finalement, la capacité de *NanoOrange* à détecter une solution de TZM (1.5 µg/mL) incubée avec ou sans KI / I₂ puis dessalée a été évaluée (Figure B.1.C). Ici, *NanoOrange* n'a pas pu détecter les anticorps après leur dessalage. En effet, la fluorescence des échantillons contenant du TZM était plus faible que celle des solutions de référence, indépendamment de la présence de KI / I₂ lors de l'incubation. Les raisons de cette diminution de la fluorescence n'ont pas été investiguées.

B.4 Conclusion

Il a été montré que la quantification de BSA par *NanoOrange* après incubation avec KI / I₂ et dessalage nécessite de s'appuyer sur une solution de référence ayant subi exactement les mêmes conditions. Autrement, toute quantification fera l'objet d'un biais. En revanche, l'application de cette méthode avec TZM n'a pas permis de détecter les anticorps avant même leur immobilisation sur des AuNPs. C'est pourquoi il a été décidé d'abandonner cette stratégie de quantification au profit de la stratégie développée par Oliverio *et al.* [219].

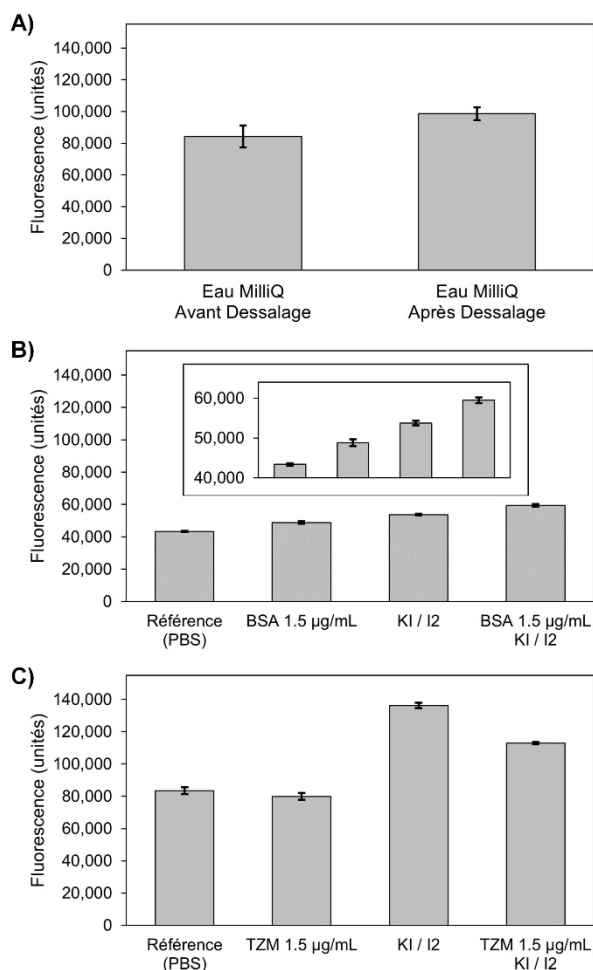


Figure B.1. Essais de quantification des protéines avec *NanoOrange* après dessalage

A) Niveaux de fluorescence émis par *NanoOrange* sur de l'eau MilliQ avant et après passage dans la colonne NAP25. B) Niveaux de fluorescence émis par *NanoOrange* sur des échantillons incubés avec 1.5 µg BSA et/ou le mélange KI / I₂ après passage dans la colonne NAP25. L'insert correspond à un agrandissement des mêmes données. C) Niveaux de fluorescence émis par *NanoOrange* sur des échantillons incubés avec 1.5 µg TZM et/ou le mélange KI / I₂ après passage dans la colonne NAP25

ANNEXE C MOTIVATIONS POUR L'ABANDON DE LA STRATÉGIE DE COUPLAGE DES ANTICORPS CLIVÉS AUX NANOPARTICULES D'OR PAR LES THIOLS DE LEUR RÉGION CHARNIÈRE

C.1 Contextualisation

La stratégie de couplage des anticorps clivés est une stratégie de biofonctionnalisation des AuNPs par greffage covalent des anticorps (voir section 2.2.3.2). Ce greffage est assuré par la formation d'une liaison covalente entre un groupe thiol de la région charnière de l'anticorps et un groupe complémentaire présent en tête d'un polymère de liaison, comme un groupe maleimide en tête de PEG, préalablement immobilisé sur une nanoparticule. Le défi principal de cette stratégie réside dans le clivage des anticorps en réduisant les ponts disulfures présents dans leur région charnière sans affecter les ponts disulfures présents entre les chaînes lourdes et légères afin de préserver la bioactivité des anticorps.

Ici, la capacité de TCEP et de cystéamine à cliver chimiquement les anticorps a été évaluée. Il était question de cliver les anticorps en deux fragments de 75 kDa, sans réduire davantage les protéines en fragments inactifs de 50 kDa et 25 kDa (chaînes lourdes et légères individuelles, respectivement).

C.2 Matériel et méthodes expérimentales

C.2.1 Réactifs chimiques et matériel

Les provenances des anticorps TzM, ainsi que celles du tampon PBS et du méthanol utilisés ici sont détaillées dans la section 4.1 de ce mémoire.

Le TCEP (tris(2-carboxyéthyl)phosphine) liquide a été acheté à Sigma Aldrich (#646547-10X1ML). Le TCEP en gel a été acheté à ThermoFisher Scientific (#77712). La cystéamine (2-mercaptoéthylamine) a été achetée à ThermoFisher Scientific (#111770250). Le mercaptoéthanol a été acheté à Sigma Aldrich (#M-6250) L'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) a été acheté à Fisher Scientific (#02793).

Les gels d'électrophorèse pré-coulés à gradient 4 – 20 % en polyacrylamide, le tampon de migration *Laemmli* 4×, et l'échelle de poids moléculaire pour SDS-PAGE (10 – 250 kDa) ont été achetés à BioRad (#456-1096, #161-0747 et #161-0394, respectivement). Le bleu de Coomassie *Brilliant Blue* pour la révélation des gels de SDS-PAGE a été acheté à Millipore Sigma (#112553). L'acide acétique glacial a été acheté à J.T. Baker (#14-650-233).

C.2.2 Réduction des anticorps

La réduction par TCEP liquide a été étudiée dans un tampon PBS contenant 5 mM d'EDTA en incubant les anticorps (dilués à une concentration finale de 6 µM) avec des quantités variables de TCEP, allant de 0 à 100 équivalents molaires par rapport aux anticorps. Cette incubation s'est faite sous agitation à température ambiante pendant 60 min.

La réduction par TCEP gel a été étudiée dans un tampon PBS contenant 5 mM d'EDTA en incubant les anticorps (dilués à une concentration finale de 6 µM) avec le gel de TCEP selon les recommandations du fabricant. Cette incubation s'est faite sous agitation à température ambiante pendant 60 min. A la suite de l'incubation, les échantillons ont été centrifugés pendant 1 min à $1000 \times g$ et les anticorps, dans le surnageant, ont été extraits du gel.

La réduction par cystéamine a été étudiée dans un tampon PBS contenant 5 mM d'EDTA en incubant les anticorps (dilués à une concentration finale de 6 µM) avec des quantités variables de cystéamine, allant de 0 à 100 équivalents molaires par rapport aux anticorps. Cette incubation s'est faite sous agitation à 37°C pendant 90 min.

Chaque condition de réduction a été effectuée en duplicata, pour des résultats identiques.

C.2.3 SDS-PAGE

Chaque échantillon d'anticorps réduit a été préparé pour la SDS-PAGE en prélevant 20 µL d'échantillon post-réduction et en y ajoutant 7.5 µL de tampon *Laemmli* 4× puis 2.5 µL d'eau MilliQ. Des contrôles positifs pour la réduction ont été préparés en diluant 3 µL d'anticorps non-réduits (solution mère à 62 µM) et 7.5 µL de tampon *Laemmli* 4× contenant 10 % v/v de mercaptoéthanol dans 19.5 µL d'eau MilliQ.

Les échantillons préparés pour l'analyse SDS-PAGE ont été plongés dans un bain-marie à 90°C pendant 10 min puis laissés à température ambiante 20 min pour refroidir avant que 15 µL de chaque échantillon ne soit prélevé dans les puits du gel de SDS. De plus, 10 µL d'échelle de poids moléculaire a été prélevé dans la première colonne de chaque gel de SDS-PAGE. L'électrophorèse a ensuite été menée avec alimentation de 100 V jusqu'à migration totale du front.

Les gels ensuite démoulés ont été plongés dans une solution de coloration (10 % v/v acide acétique, 40 % v/v méthanol, 50 % v/v eau MilliQ, 1 g/L bleu de Coomassie) pendant 30 min. Pour finir, les gels ont été plongés dans une solution de décoloration (10 % v/v acide acétique, 40 % v/v méthanol, 50 % v/v eau MilliQ) pendant 48 h puis ont été photographiés pour leur analyse.

C.3 Résultats

Sur le gel de SDS-PAGE illustrant l'état de réduction des anticorps après incubation avec TCEP (Figure C.1.A), une bande forte peut être observée à 150 kDa pour 0 à 3 équivalents molaires (eq. mol.) de TCEP, alors qu'une bande faible y est observable à 75 kDa (colonnes 2 à 6). Cette bande à 75 kDa est également observable sur le contrôle négatif (TZM sans agent réducteur ; colonne 2), indiquant que TCEP liquide n'était ici pas en quantité suffisante pour cliver les anticorps. Entre 10 et 30 eq. mol. de TCEP (colonnes 7 et 8), la bande à 150 kDa s'atténue alors que les bandes à 75, 50 et 25 kDa apparaissent. La réduction recherchée des ponts disulfures dans la région charnière des anticorps a donc eu lieu, mais la réduction non désirée entre les chaînes lourdes et légères a également eu lieu sur certains anticorps. A 100 eq. mol. en TCEP (colonne 9), les anticorps sont complètement réduits en chaînes lourdes et légères de 50 et 25 kDa, respectivement. Finalement, TCEP gel (colonne 10) a permis le clivage en fragments de 75 kDa de certains anticorps, mais la bande la plus intense reste celle de 150 kDa : la majorité des anticorps ne sont pas clivés.

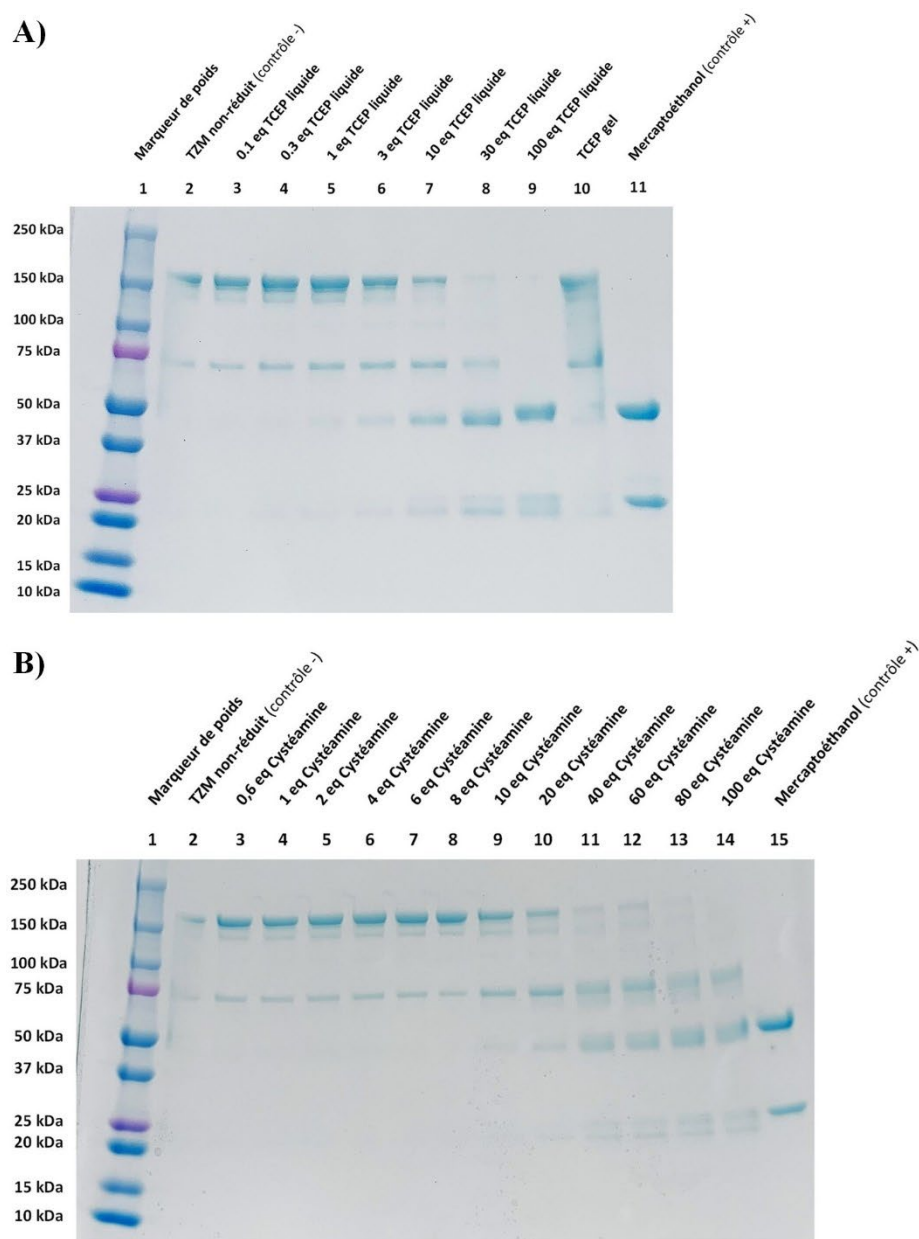


Figure C.1. Analyse des Conditions de Réduction des Anticorps avec TCEP et Cystéamine par SDS-PAGE

A) Gel de SDS-PAGE présentant la réduction des anticorps avec TCEP liquide (0 à 100 équivalents molaires par rapport aux anticorps) et TCEP gel. B) Gel de SDS-PAGE présentant la réduction des anticorps avec cystéamine (0 à 100 équivalents molaires par rapport aux anticorps).

Sur le gel de SDS-PAGE illustrant l'état de réduction des anticorps après incubation avec cystéamine (Figure C.1.B), une bande forte peut être observée à 150 kDa pour 0 à 8 eq. mol. de cystéamine alors qu'une bande faible apparaît à 75 kDa (colonnes 2 à 8). Encore une fois, cette bande à 75 kDa est également observable sur le contrôle négatif (colonne 2). Cystéamine n'était donc ici pas présent en quantité suffisante pour cliver les anticorps. Entre 10 et 20 eq. mol. de cystéamine (colonnes 9 et 10), la bande à 150 kDa s'atténue alors que les bandes à 75, 50 et 25 kDa apparaissent progressivement. La réduction recherchée des ponts disulfures dans la région charnière des anticorps a donc eu lieu, mais elle s'est aussi déroulée entre les chaînes lourdes et légères sur certains anticorps. Finalement, les bandes à 50 et 25 kDa continuent d'apparaître entre 40 et 100 eq. mol. de cystéamine alors que les bandes à 150 et 75 kDa disparaissent. Les anticorps sont donc progressivement réduits en fragments inactifs dans ces conditions.

On observe alors que l'utilisation de TCEP liquide et de cystéamine sur des anticorps permet effectivement de les réduire en fragment, mais aucune condition n'a été trouvée pour ne produire que des anticorps clivés en fragments de 75 kDa avec un bon rendement. Les meilleures conditions identifiées pour le clivage des anticorps sont la réduction avec 10 eq. mol. de TCEP liquide (Figures C.1.A, colonne 7), avec TCEP gel (Figures C.1.A, colonne 10) et avec 20 eq. mol. de cystéamine (Figures C.1.B, colonne 10). En effet, ces conditions permettent le clivage de quelques anticorps dans leurs régions charnières seulement. Il a été envisagé de concevoir un procédé itératif permettant d'augmenter la quantité d'anticorps clivés par des cycles successifs de réduction – séparation. Cependant, cette idée n'a pas été poursuivie dans ce projet.

C.3 Conclusion

Les tentatives de clivage des anticorps avec TCEP liquide, gel de TCEP et cystéamine n'ont pas permis de générer des fragments de 75 kDa avec un bon rendement. En effet, les anticorps étaient presque toujours laissés intacts ou complètement réduits en chaînes lourdes et légères de 50 et 25 kDa, respectivement. C'est pourquoi il a été décidé d'abandonner cette stratégie de greffage covalent orienté des anticorps sur les AuNPs au profit des autres ayant été explorées dans ce projet.

ANNEXE D MOTIVATIONS POUR L'ABANDON DE L'UTILISATION DES CELLULES MDA-MB-453 (HER2-POSITIVES) DANS LES MANIPULATIONS D'IMAGERIE

D.1 Contextualisation

Évaluer la capacité des AuNPs biofonctionnalisées à cibler le biomarqueur HER2 peut s'effectuer par observation de l'attachement des nanoparticules à la surface de cellules de cancer du sein HER2-positives (voir section 2.3.3.2). Les cellules MDA-MB-453 sont des cellules adhérentes issues du cancer du sein et surexprimant HER2 [223], et peuvent donc être employées dans ce but. Pour cela, les cellules sont immobilisées sur des lames de microscope et incubées avec des AuNPs biofonctionnalisées. Une fois l'incubation terminée, le surplus de nanoparticules est évacué et les lames sont scellées avant leur observation au microscope en champ sombre par illumination latérale.

Ici, l'utilisation des cellules MDA-MB-453 immobilisées sur des lames de microscope afin de détecter et quantifier les AuNPs attachées à leur surface est évaluée.

D.2 Matériel et méthodes expérimentales

D.2.1 Réactifs chimiques et matériel

Les cellules MDA-MB-453 (ATCC HTB-131) ont été achetées à ATCC et ont été conservées dans l'azote liquide dès leur réception. Le reste du matériel chimique et biologique utilisé ici est identique à celui présenté dans la section 4.1 de ce mémoire.

D.2.2 Amplification des cellules MDA-MB-453

Le protocole pour amplifier les cellules MDA-MB-453 est similaire à celui pour les cellules MDA-MB-231 présenté dans la section 4.5.1 de ce mémoire. En résumé, les cellules MDA-MB-453 sont cultivées à 37°C dans 10 mL milieu de culture DMEM enrichi avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline-streptomycine, dans de flasques T-75. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 72 h jusqu'à atteindre une confluence de 90 %. Les cellules sont ensuite détachées de la flasque

avec TrypLE Express, centrifugées et resuspendues dans 20 mL de DMEM (i.e., repiquage des cellules avec un ratio suspension de cellules : milieu de culture frais valant 1 : 2).

D.2.3 Biofonctionnalisation des AuNPs avec Kcoil et Ecoil-TZM

Le protocole pour biofonctionnaliser les AuNPs par la stratégie des peptides Ecoil et Kcoil est présenté dans la section 4.3.2 de ce mémoire. En résumé, les AuNPs ont été incubées avec mPEG (concentration finale de 0.4 μM) dans une solution de citrate (2 mM, pH = 7) pendant 16 h, centrifugées et resuspendues dans du citrate. Les AuPEG_{LD} ainsi produites ont ensuite été incubées avec des peptides Kcoil (concentration finale de 0.35 μM) dans du citrate pendant 16 h, centrifugées et resuspendues dans du PBST. Les AuPEG_{LD}/Kcoil ainsi produites ont été incubées avec du Ecoil-TZM (concentration finale 1.25 μM) pendant 16 h, centrifugées et resuspendues dans du PBST.

D.2.4 Imagerie

Le protocole pour l'imagerie cellulaire est présenté dans les sections 4.5.2 et 4.5.3 de ce mémoire. En résumé, 300 μL de cellules MDA-MB-453 repiquées (voir section D.2.2) ont été placés dans chaque puits en silicone sur les lames de microscopie, puis ont été incubés à 37°C jusqu'à atteindre une confluence de 90 %. Les cellules ont ensuite été fixées aux lames par un mélange de 75 % méthanol et 25 % acétone pendant 10 min, puis les lames ont été bloquées avec une solution de BSA (10 % dans PBS) pendant une nuit à 4°C. Après lavage des lames, 200 μL d'AuPEG_{LD}/Kcoil + Ecoil-TZM ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 3 h à température ambiante, puis une coloration des noyaux et membranes cellulaires a été réalisée avec DAPI et phalloïdine, respectivement. Les puits en silicone ont ensuite été retirés des lames et celles-ci ont été scellées. Les échantillons ont ensuite été observés au microscope en champ sombre par illumination latérale. Les images capturées ont été analysées avec le logiciel CellProfiler.

D.3 Résultats

Les images de noyaux, membranes cellulaires et nanoparticules ont été traitées et superposées avec le logiciel CellProfiler pour rendre compte des observations réalisables directement sur le microscope (Figure D.1). Ici, seule une observation de l'attachement des AuPEG_{LD}/Kcoil + Ecoil-TZM (1.25 μ M) sur les cellules MDA-MB-453 est proposée, car elle est représentative des conclusions obtenues avec toutes les autres nanoparticules biofonctionnalisées étudiées dans ce projet.

AuPEG_{LD}/Kcoil + Ecoil-TZM 1.25 μ M

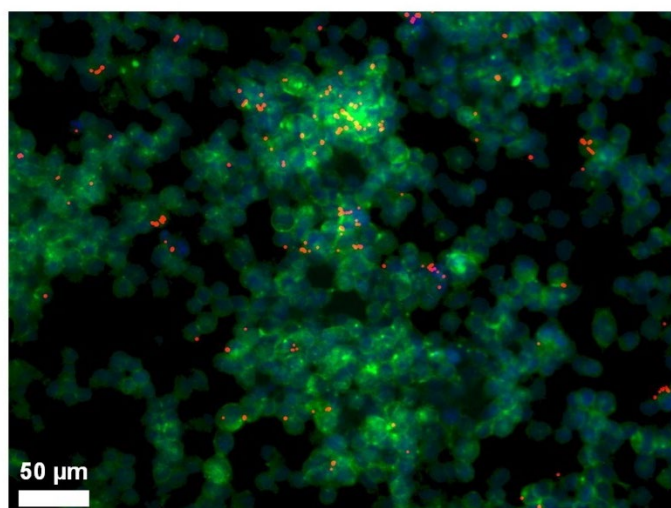


Figure D.1. Observation de l'attachement de AuPEG_{LD}/Kcoil + Ecoil-TZM (1.25 μ M) sur les cellules MDA-MB-453

Les noyaux, membranes cellulaires et nanoparticules attachées aux cellules sont représentés en bleu (fluorescence de DAPI), vert (fluorescence de phalloïdine) et rouge (diffusion de la lumière provenant de l'illumination latérale), respectivement. Cette image est reconstruction effectuée numériquement avec le logiciel CellProfiler à partir de trois photos capturées individuellement.

L'échelle indique 50 μ m.

Les cellules MDA-MB-453 utilisées ici ont toujours poussé en grappes, formant ainsi des multicouches superposées au moment de la fixation des cellules sur les lames de microscopie. Cet effet est visible sur la Figure D.1, où les zones apparaissant avec le plus d'intensité (fluorescences bleue et verte) correspondent à plusieurs couches de cellules superposées tandis que les zones moins intenses représentent des cellules non-recouvertes. Cette superposition complexifie la quantification des nanoparticules attachées aux cellules. Premièrement, il devient nécessaire de capturer plusieurs images des nanoparticules à différentes altitudes sur la lame en s'assurant que les mêmes nanoparticules n'apparaissent pas sur deux images différentes. D'ailleurs, les nanoparticules représentées sur la Figure D.1 ont été capturées avec une seule mise au point. Deuxièmement, certains récepteurs HER2 pourraient être inaccessibles aux nanoparticules à cause de l'empilement des cellules. Finalement, la représentation de l'attachement des nanoparticules en densité surfacique sur les membranes cellulaires n'est plus possible, car la surface occupée par les cellules empilées est difficilement mesurable. De plus, une densité surfacique ne permet pas de rendre compte de la répartition des nanoparticules selon l'altitude sur la lame.

D.4 Conclusion

L'analyse de l'attachement des nanoparticules aux cellules MDA-MB-453 doit se faire selon différentes modalités qu'avec les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3. En effet, les cellules MDA-MB-453 se superposent lors de leur croissance. La quantification des nanoparticules attachées sur les récepteurs HER2 des cellules doit donc tenir compte de leur hauteur sur la lame. Une optimisation de la quantification des nanoparticules en trois dimensions semble possible, mais n'a pas été explorée ici. En effet, la prise en compte de la hauteur sur la lame n'est pas nécessaire avec les lignées MDA-MB-231 et SK-BR-3, car ces cellules se sont ici propagées en monocouches (voir section 5.3, Figure 5.10). Ainsi, il a été possible d'analyser les nanoparticules attachées sur les cellules en mesurant leur densité surfacique sur les membranes, ce qui ne nécessite de capturer qu'une image de l'illumination latérale par échantillon. Puisque les cellules MDA-MB-231 et SK-BR-3 peuvent être respectivement considérées comme HER2-négatives et HER2-positives, elles ont suffi à créer un système complet pour l'étude du ciblage des récepteurs HER2 par les nanoparticules biofonctionnalisées dans ce projet. C'est pourquoi les cellules MDA-MB-453 n'ont finalement pas été retenues pour l'imagerie cellulaire dans ce projet.