POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Marquage immunoplasmonique multiplexé sur échantillons histologiques pour le diagnostic du cancer

PAULE MARCOUX-VALIQUETTE

Institut de génie biomédical

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

Génie biomédical

Décembre 2020

© Paule Marcoux-Valiquette, 2020.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Marquage immunoplasmonique multiplexé sur échantillons histologiques pour le diagnostic du cancer

présenté par **Paule MARCOUX-VALIQUETTE**

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

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

Frédéric LEBLOND, président
Michel MEUNIER, membre et directeur de recherche
Dominique TRUDEL, membre et codirectrice de recherche
Roula ALBADINE, membre externe

DÉDICACE

Écris en temps de pandémie.

- *Covid-19*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes deux co-directeurs de recherche, Pr Michel Meunier et Dre Dominique Trudel pour leur confiance et pour cette belle opportunité de travailler sur un projet innovant et stimulant dans le domaine de la pathologie. J'aimerais également remercier Sergiy Patskovsky pour ses commentaires et ses recommandations ainsi que Mirela Birela pour son chaleureux accueil dans le laboratoire du CRCHUM et pour l'enseignement de sa super technique de coupe au microtome.

Un immense merci à Andrée-Anne Grosset pour ses précieux conseils et sa bonne humeur, je n'y serais pas arrivée sans son aide. Merci également à tous les étudiants des groupes de recherche de Polytechnique et du CRCHUM que j'ai eu le plaisir de côtoyer, tout particulièrement Morteza Hasanzadeh Kafshgari, Cécile Darviot, Audrey Nsamela, Lu Wang et Mame-Kany Diop pour leur collaboration.

J'aimerais souligner la contribution de la plateforme de pathologie moléculaire pour l'accès à leurs équipements et de l'IRIC pour la mise en bloc de paraffine de mes échantillons.

Je souhaite remercier mon copain, Maxime Gendron-Paul, qui est toujours là pour m'encourager et me supporter dans les hauts comme les bas. Il me pousse à me dépasser à chaque jour et je lui en suis totalement reconnaissante.

Je ne peux pas terminer mes remerciements sans mentionner ma mère qui m'a toujours encouragé à me dépasser, mon père, un conseiller et correcteur en or et ma confidente, ma grand-maman, une femme exceptionnelle.

RÉSUMÉ

Le cancer est un fléau grave et d'actualité, il suffit de consulter les statistiques pour le constater. Il s'agit maintenant de la principale cause de décès chez les canadiens et les canadiennes, devant les maladies cardiovasculaires. Le diagnostic précoce et précis du cancer permet d'améliorer le pronostic des patients. Bien que les méthodes diagnostiques actuelles aient permis d'améliorer la qualité des diagnostics de cancer, elles ne sont toujours pas optimales. En général, un échantillon de biopsie est prélevé afin d'être analysé microscopiquement par un pathologiste dans le but d'établir un diagnostic. La méthode la plus fréquemment utilisée est la combinaison de deux techniques, la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) et l'immunohistochimie (IHC). Cependant, cette procédure est subjective, semi-quantitative et permet peu de marquage multiplexé. C'est pourquoi l'immunoplasmonique (IP) offre une alternative intéressante. Il s'agit d'une technique basée sur l'observation au microscope d'échantillons biologiques contenant des nanoparticules plasmoniques (NPs) ayant des propriétés optiques uniques. Les NPs se démarquent puisqu'elles sont des biomarqueurs quantitatifs, multicolores pouvant être fonctionnalisées.

Les études précédentes sur le marquage IP n'ont pas abordé l'impact de la coloration H&E des échantillons sur l'observation des NPs dans l'environnement cellulaire. Il est primordial pour les pathologistes de pouvoir observer les résultats du marquage IP dans son contexte cellulaire puisque la présence d'une protéine peut avoir des significations différentes selon les cellules dans lesquelles elle est exprimée. Au total, 120 conditions ont été analysées au microscope en champ clair, puis en champ sombre à l'aide d'un dispositif d'illumination latérale (*Side-Illumination* ou SI) pour l'observation des NPs. Quatre couleurs de NPs (rouge, vert, bleu et jaune) ont été choisies afin de montrer les capacités de multiplexage de l'IP. Il sera démontré dans ce mémoire que la combinaison de coloration H&E optimale, suggérée pour l'implantation future de l'IP dans les laboratoires de pathologie, est l'utilisation de l'hématoxyline de Gill (ou Harris) avec l'éosine B. Cette coloration ne nuit pas à l'observation du marquage IP dans trois types d'échantillons: les cellules entières adhérées à la lame de microscope et les tranches de cellules ou de tissus fixés dans la formaline et enrobés de paraffine (cellules FFPE ou tissu FFPE). Enfin, l'utilisation de lames de microscope chargées positivement a mis en évidence la problématique de l'attraction électrostatique non-spécifique entre les NPs et la lame. Il a été déterminé que la fonctionnalisation des NPs (anticorps anti-HER2) permet de neutraliser, en grande partie, la charge de surface des NPs et donc de réduire significativement ($p<0,01$) l'adhésion non-spécifique des NPs au substrat.

ABSTRACT

Cancer is a serious and recurring disease, you just need to look at the statistics to be convinced. In fact, it is now the leading cause of death among Canadians, in front of cardiovascular disease. It has been shown that early and accurate diagnosis of cancer improves patient prognosis. However, although current diagnostic methods have improved the quality of cancer diagnoses, they still are not optimal. Usually, a biopsy sample is used for microscopic analysis by a pathologist to establish a diagnosis. The most frequently used method is the combination of two techniques: hematoxylin and eosin staining (H&E) and immunohistochemistry (IHC). However, this procedure is subjective, semi-quantitative and does not allow multiplexed labeling. That is why, immunoplasmonics (IP) offers an interesting alternative. It is a technique based on the microscopic observation of a biological sample that contains plasmonic nanoparticles (NPs) which have unique optical properties. NPs stand out because are quantitative and multicolored biomarkers that can be functionalized.

Previous studies on IP have not addressed the effect of H&E counterstaining on the observation of NPs in the cellular environment. However, counterstaining is central to the correct interpretation of immunolabeling, as different cells can express similar antigens with different significations. A total of 120 conditions were first analyzed under a bright field microscope, then in dark field using a Side-Illumination (SI) device for the observation of NPs. Four colors of NPs (red, green, blue and yellow) have been chosen to show the multiplexing capabilities of the IP. It will be demonstrated in this master's thesis that the optimal H&E staining combination suggested for future implantation of IP in pathology laboratories is the use of Gill (or Harris) hematoxylin with eosin B. This staining did not interfere with the observation of IP labeling in three types of samples: whole cells adhered to the microscope slide, slices of paraffin-embedded cells (FFPE cells) and slices of paraffin-embedded tissue (FFPE tissue). Finally, the use of positively charged microscope slides has emphasized the problematic of non-specific electrostatic attraction between the NPs and the slide. It was determined that the functionalization of the NPs (anti-HER2 antibodies) largely neutralizes the surface charge of the NPs and therefore significantly ($p < 0.01$) reduce the non-specific adhesion of the NPs to the substrate.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ V

ABSTRACT VI

TABLE DES MATIÈRES VII

LISTE DES TABLEAUX X

LISTE DES FIGURES XI

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XVI

LISTE DES ANNEXES XVII

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 3

2.1 Cellule eucaryote 3

2.2 Cancer 3

2.2.1 Développement du cancer 3

2.2.2 Modèle cellulaire du cancer 5

2.2.3 Techniques diagnostiques actuelles 6

2.2.4 Traitements actuels 14

2.3 Biomarqueurs optiques 14

2.3.1 Colorants 14

2.3.2 Fluorochromes 15

2.3.3 Points quantiques 16

2.3.4 Nanoparticules plasmoniques 16

2.3.5 Superposition de biomarqueurs optiques 18
2.4 Fonctionnalisation des nanoparticules 19
2.4.1 Anticorps et antigènes 20
2.4.2 Techniques de fonctionnalisation 20
2.5 Interactions des nanoparticules avec les cellules 21
2.6 Méthodes d'imagerie des nanoparticules 22
2.6.1 Rétrodiffusion 22
2.6.2 Microscopie en champ sombre 24
2.6.3 Microscopie en champ sombre avec illumination latérale 26
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIES EXPÉRIMENTALES DE PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS HISTOLOGIQUES AVEC MARQUAGE IMMUNOPLASMONIQUE 28
3.1 Échantillons 28
3.1.1 Choix de la composition des échantillons 29
3.1.2 Choix du type d'échantillons 30
3.2 Préparation des échantillons 31
3.2.1 Échantillons de cellules adhérées 31
3.2.2 Échantillons de cellules FFPE 32
3.2.3 Échantillons de tissu FFPE 34
3.3 Incubation avec les nanoparticules 34
3.3.1 Choix des nanoparticules 34
3.3.2 Protocoles d'incubation des nanoparticules 36
3.4 Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine 39
3.4.1 Colorants utilisés 39
3.4.2 Protocoles de coloration 40
3.5 Images 42

CHAPITRE 4 RÉSULTATS POUR LA SUPERPOSITION DE LA COLORATION À L'HÉMATOXYLINE ET À L'ÉOSINE ET DU MARQUAGE IMMUNOPLASMONIQUE .. 43

4.1 Échantillons de cellules adhérées 43

4.2 Échantillons de cellules FFPE 47

4.3 Échantillons de tissu FFPE 52

4.4 Spectres des nanoparticules sur échantillons colorés H&E 54

4.5 Tableau récapitulatif 58

CHAPITRE 5 EFFET DE LA FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES SUR L'ADHÉSION NON-SPÉCIFIQUE 60

5.1 Courbes de calibration 60

5.2 Fonctionnalisation des nanoparticules 61

5.3 Adhésion de nanoparticules sur lames de microscope chargées positivement 62

5.3.1 Préparation des échantillons 63

5.3.2 Résultats 64

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE 67

6.1 Variabilité de la couleur des NPs 67

6.2 Standardisation de la technique 68

6.3 Toxicité des nanoparticules 69

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 70

7.1 Synthèse des travaux 70

7.2 Travaux futurs 71

RÉFÉRENCES 72

ANNEXES 78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Caractéristiques des nanoparticules optimales et des nanoparticules utilisées expérimentalement lors de la préparation des échantillons. 35

Tableau 3.2 Concentration et volume des solutions de NPs en fonction de leur couleur en diffusion pour les échantillons de cellules adhérées. 38

Tableau 3.3 Concentration et volume des différentes solutions de NPs en fonction de leur couleur pour les échantillons FFPE. 39

Tableau 3.4 Temps des étapes de coloration à l'hématoxyline selon le type d'hématoxyline utilisée. 40

Tableau 3.5 Temps des étapes de coloration à l'éosine selon le type d'échantillon et le type d'éosine utilisée. 41

Tableau 4.1 Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour chacune des conditions testées pour les trois types d'échantillons et identification des meilleures combinaisons de colorants pour l'application de la technique d'immunoplasmonique. Vert : bon, Jaune : moyen, Rouge : mauvais. 58

Tableau 5.1 Caractéristiques des nanoparticules utilisées pour tester l'effet de la fonctionnalisation sur l'adhésion non-spécifique à la lame de microscope. 64

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Évolution des tumeurs cancéreuses : (a) apparition des premières cellules cancéreuses, (b) tumeur bénigne, (c) tumeur maligne et (d) formation de métastases [11]. 4

Figure 2.2 Étapes de préparation des échantillons FFPE pour l'analyse histologique : (I) fixation de l'échantillon de biopsie, (II) enrobage dans la paraffine, (III) coupe au microtome de tranches d'échantillon et (IV) dépôt de la tranche sur une lame de microscope chargée positivement. 8

Figure 2.3 Exemple de coloration H&E sur un échantillon FFPE de rein de porc. 9

Figure 2.4 Étapes de préparation des lames et principe de l'immunohistochimie : (I) lame avec échantillon déparaffiné et réhydraté, (II) processus de la réaction d'IHC, (III) cellules colorées par le précipité de la réaction enzymatique, (IV) contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline et (V) observation de l'échantillon au microscope. 10

Figure 2.5 Résultat d'IHC (a) négatif et (b) positif avec contre-coloration à l'hématoxyline sur échantillons de tissu prostatique FFPE (images fournies par le laboratoire du Dre Dominique Trudel). 10

Figure 2.6 Principe de l'immunofluorescence à l'aide d'anticorps primaires et secondaires. 15

Figure 2.7 Pics plasmon de (a) nanobâtons d'or (adaptée de [40]) et de (b) nanoparticules sphériques d'alliage or-argent [36]. 17

Figure 2.8 Schématisation du montage pour la microscopie en rétrodiffusion. 23

Figure 2.9 Exemple d'un échantillon de cellules adhérées avec NPs observé en rétrodiffusion (image fournie par Cécile Darviot). 24

Figure 2.10 Schématisation du montage pour la microscopie en champ sombre. 25

Figure 2.11 Exemple d'un échantillon de cellules adhérées avec NPs observé en microscopie en champ sombre (image fournie par Cécile Darviot). 25

Figure 2.12 Dispositif d'illumination latérale pour l'observation au microscope d'une lame de microscope rectangulaire et un exemple d'échantillon de cellules adhérées avec NPs observé en champ sombre avec illumination latérale. Adaptée de [6, 65]. 26

Figure 3.1 Allure des lignées cellulaires MDA-MB-231 [67] et MDA-MB-453 [68] en culture. 29

Figure 3.2 Disposition des culots de cellules dans le bloc de paraffine. 33

Figure 3.3 Spectres de diffusion simulés des nanoparticules dans le toluène qui sont optimisées dans l'article (lignes pointillées) [6] et utilisées dans ce projet (lignes pleines) en comparaison avec la position du maximum du spectre d'émission des LEDs du SI (lignes verticales en tirets). 36

Figure 4.1 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Gill et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 44

Figure 4.2 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 45

Figure 4.3 Différents plans selon la direction z d'une cellule adhérée (MDA-MB-231) avec coloration H&E incubée avec NPs vertes. 46

Figure 4.4 Cellules adhérées (MDA-MB-453) colorées avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules multiplexées rouges, vertes, bleues et jaunes (R-V-B-J)..... 47

Figure 4.5 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Gill et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). 49

Figure 4.6 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif

d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). 50

Figure 4.7 Tranches de cellules FFPE (MDA-MB-453) colorées avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules multiplexées rouges, vertes, bleues et jaunes (R-V-B-J). .. 51

Figure 4.8 Tissu FFPE coloré avec hématoxyline de Gill et éosine Y ou hématoxyline de Gill et éosine B et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 53

Figure 4.9 Spectres de diffusion des NPs bleues dans (a) le milieu *Sub-X* ou (b) le milieu *Permount*, avant (ligne pointillée) et après (ligne pleine) une exposition de 1 heure à la lumière des LEDs du dispositif d'illumination latérale. 55

Figure 4.10 Spectres de diffusion des nanoparticules sur (a) lame de microscope (sans échantillons biologiques), (b) cellules adhérées, (c) cellules FFPE et (d) tissu FFPE colorés H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B. 57

Figure 5.1 Courbes de calibration obtenues pour les nanoparticules rouges (nanobâtons d'or de 25x71 nm), vertes (nanoparticules d'alliage or-argent 50-50 de 74 nm), bleues (nanoparticules d'alliage or-argent 10-90 de 43 nm) et jaunes (nanoparticules d'or de 100 nm). 61

Figure 5.2 Histogramme du nombre moyen de NPs sans fonctionnalisation (Nues), recouvertes de PEG (PEG) ou fonctionnalisées avec l'anticorps anti-HER2 (HER2) adhérées à une lame de microscope chargées positivement (lame +) pour chacun des types de NPs avec une comparaison de l'adhésion des NPs sans fonctionnalisation (Nues) à une lame sans charge (lame neutre). 65

Figure A.1 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Harris et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 78

Figure A.2 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Harris et éosine B et observées en champ clair et avec le

dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 79

Figure A.3 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 sans coloration et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J)..... 80

Figure A.4 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Gill et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J)..... 81

Figure A.5 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Harris et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J)..... 82

Figure A.6 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Harris et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J)..... 83

Figure A.7 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Harris et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J)..... 84

Figure A.8 Tissu FFPE sans coloration et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 85

Figure A.9 Tissu FFPE coloré avec hématoxyline de Gill ou hématoxyline de Harris et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 86

Figure A.10 Tissu FFPE coloré avec hématoxyline de Harris et éosine Y ou hématoxyline de Harris et éosine B et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm. 87

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BAF	Biopsie à l'aiguille fine
CTAB	Bromure de cétrimonium
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
FFPE	*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*
FISH	Hybridation *in situ* en fluorescence
H&E	Hématoxyline et éosine
HER2	Facteur de croissance épidermique humain
HRP	Peroxydase de raifort
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochimie
IP	Immunoplasmonique
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NPs	Nanoparticules plasmoniques
NRs	Nanobâtons
PBS	Tampon de phosphate salin
PEG	Polyéthylène glycol
QDs	Points quantiques
SI	Illumination latérale (Side-Illumination)

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Superposition de la coloration H&E au marquage immunoplasmonique (Résultats supplémentaires) 78

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Près de la moitié des canadiens et des canadiennes recevront un diagnostic de cancer au cours de leur vie, et le quart en décèderont [1]. Il est donc d'une importance primordiale de développer des outils afin d'améliorer les traitements, certes, mais aussi le diagnostic de cette maladie. En effet, il a été démontré qu'une détection efficace, précise et précoce du cancer améliore grandement le pronostic du patient [2]. Les méthodes diagnostiques actuellement utilisées par les pathologistes comprennent l'observation au microscope d'échantillons de biopsie avec coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) et l'immunohistochimie (IHC). En général, un échantillon de biopsie est divisé sur plusieurs lames de microscope. Une première lame est colorée H&E où l'hématoxyline teint d'une couleur bleue le noyau, les ribosomes et le réticulum endoplasmique et l'éosine colore le cytoplasme, la membrane cellulaire et la matrice extracellulaire d'une couleur rose [3]. Les pathologistes peuvent alors observer la morphologie des cellules, confirmer la présence (ou l'absence) de cellules cancéreuses et déterminer l'évolution (stade) et l'agressivité (grade) de la tumeur. Ils peuvent ensuite choisir une série d'anticorps à tester avec l'IHC afin de détecter la présence ou la surexpression de récepteurs et de protéines permettant de confirmer l'origine et le pronostic de la lésion. Pour y arriver, les pathologistes observent le patron d'expression de la protéine (visible par l'apparition d'un précipité brunâtre sur les lames d'IHC) dans son contexte cellulaire et déterminent la positivité, soit de façon binaire, soit avec une échelle quantitative ou semi-quantitative. Les tumeurs cancéreuses étant hétérogènes, l'information additionnelle apportée par l'IHC permet de confirmer le diagnostic et de guider le choix du traitement prescrit au patient. Par contre, l'IHC est habituellement réalisée une protéine à la fois sur des lames subséquentes à celle avec la coloration H&E. Il est donc difficile de confirmer la présence de plusieurs protéines à un même endroit dans l'échantillon. Bien que la coloration H&E et l'IHC ont permis d'augmenter la précision des diagnostics de cancer, elles sont subjectives, semi-quantitatives et permettent peu de marquage multiplexé (plusieurs marqueurs en simultané) ce qui limite leurs précisions [4]. On cherche donc à remplacer l'IHC par l'utilisation de biomarqueurs quantitatifs multiplexés qui pourraient être superposés à la coloration H&E afin d'obtenir toute l'information nécessaire au diagnostic sur une seule et même lame.

Nous proposons donc une nouvelle technique, l'immunoplasmonique (IP), basée sur les propriétés uniques des nanoparticules plasmoniques (NPs). Les NPs composées de métaux, comme l'or et

l'argent diffusent beaucoup la lumière lorsqu'excitées à leur longueur d'onde de résonance. Ce phénomène permet d'observer des nanoparticules individuelles au microscope en champ sombre, une technique de microscopie qui récolte uniquement la lumière diffusée par l'échantillon. L'utilisation d'un dispositif de microscopie en champ sombre avec illumination latérale (SI) de la compagnie *VEGAPhoton* [5] permet d'augmenter le contraste entre les NPs et les cellules grâce à une illumination perpendiculaire à l'axe optique. Le dispositif se dépose simplement sur le plateau d'un microscope en champ clair et permet un passage rapide à la microscopie en champ sombre. En variant les caractéristiques (taille, forme, composition, etc.) des NPs utilisées, il est possible d'obtenir des biomarqueurs qui sont spectralement distincts et qui apparaitront de couleurs différentes. Les NPs peuvent également être fonctionnalisés (ajout d'anticorps sur leur surface) pour cibler spécifiquement une protéine exprimée par les cellules cancéreuses. L'utilisation de NPs comme outil diagnostic permet l'imagerie multicolore et l'immunomarquage spécifique et multiplexé [6]. La technique proposée a également le potentiel d'améliorer la sensibilité et la précision des résultats grâce à des seuils diagnostics quantitatifs et éventuellement l'analyse automatisée des lames basée sur l'intelligence artificielle. Enfin, très peu de modifications aux techniques de pathologie actuelles sont nécessaires pour l'intégration simple et rapide de l'IP dans les laboratoires de pathologie.

Jusqu'à présent, à notre connaissance, les travaux antérieurs sur l'IP n'ont pas abordé l'effet de la coloration H&E sur l'observation des NPs dans l'environnement cellulaire. Cependant, la coloration est primordiale pour l'interprétation correcte de l'immunomarquage, car différentes cellules peuvent exprimer des protéines similaires avec des significations distinctes. L'objectif principal de ce projet est donc de démontrer la possibilité de visualiser les NPs sur des échantillons colorés H&E et préparés selon les standards des laboratoires de pathologie. Ce mémoire débute avec une revue de littérature au chapitre 2, suivi de la méthodologie expérimentale au chapitre 3. Puis, au chapitre 4, on montre la possibilité de l'observation de quatre couleurs de NPs dans plusieurs types d'échantillons de cytopathologie (cellules adhérées et tranches de cellules enrobées de paraffine (cellules FFPE)) et d'histopathologie (tissu FFPE) colorés avec différentes combinaisons d'hématoxyline et d'éosine. Ensuite, le chapitre 5 étudie l'effet de la fonctionnalisation des NPs sur l'adhésion non-spécifique lors du marquage immunoplasmonique. Les résultats seront suivis d'une discussion au chapitre 6 et d'une conclusion incluant la suggestion d'étapes futures au chapitre 7.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Cellule eucaryote

Il est important, pour bien comprendre ce projet, de retourner aux bases et de faire un rappel sur la structure des cellules. Les cellules sont considérées comme étant les unités de base des organismes vivants. Le corps humain est constitué d'environ 10^{13} cellules [7]. Les cellules eucaryotes se différencient des cellules procaryotes par la présence d'un noyau défini qui contient l'information génétique de la cellule (ADN). La présence d'une membrane cellulaire permet de délimiter l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette membrane est composée d'une double couche de phospholipides à travers laquelle on retrouve, entre autres, des protéines. Ces dernières permettent de recevoir et d'envoyer des signaux aux cellules voisines et de réguler ce qui entre et sort de la cellule [8]. À l'intérieur de la membrane se trouve un environnement à base d'eau, appelé le cytoplasme, dans lequel flottent les différentes organelles qui assurent le bon fonctionnement de la cellule (mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique, vésicules, etc.).

2.2 Cancer

Responsable de 30% des décès, le cancer est la principale cause de mortalité au Canada. Selon les statistiques de 2019, près d'un Canadien sur deux sera atteint du cancer dans sa vie et un Canadien sur quatre en mourra [1]. Les cancers les plus souvent diagnostiqués sont, dans l'ordre, le cancer du poumon, du sein et colorectal [9]. Cette section a pour but d'expliquer plus en détail les étapes du développement d'une tumeur, ses modèles *in vitro* et de faire une revue des techniques permettant la détection, le prélèvement et l'analyse en laboratoires de pathologie des tumeurs. Les traitements actuels seront également brièvement présentés.

2.2.1 Développement du cancer

Dans la plupart des organes et des tissus, il existe un équilibre entre la régénération cellulaire et la mort cellulaire, c'est-à-dire qu'au fur et à mesure que les cellules meurent, de nouvelles cellules sont générées à partir de cellules souches. Il existe certaines exceptions comme les cellules de la rétine qui ne se régénèrent pas une fois que l'œil est rendu à maturité [10]. Des processus de régulation sont mis en place afin que le nombre de cellules d'un certain type reste relativement

constant. Les gènes impliqués dans ces processus produisent des protéines qui encouragent ou qui découragent la prolifération cellulaire. La perturbation de l'une de ces deux sortes de protéines favorise le développement de cellules cancéreuses qui ne respectent plus les mécanismes de régulation de la croissance cellulaire (figure 2.1.a). Lorsque ces cellules se mettent à proliférer de manière non-contrôlée, elles produisent une tumeur.

Il existe deux types de tumeurs : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes. Le premier type regroupe les tumeurs localisées qui n'envahissent pas les tissus sains adjacents et qui n'ont pas une croissance infinie (figure 2.1.b). Le deuxième type désigne les tumeurs qui deviennent progressivement de plus en plus invasives et ne cessent de croitre (figure 2.1.c). Dans ce cas, on parle alors de « cancer ». Les tumeurs malignes peuvent également faire des métastases, de petits amas de cellules cancéreuses qui se détachent de la tumeur principale et migrent vers les vaisseaux sanguins pour s'implanter ailleurs dans le corps (figure 2.1.d). Les cellules cancéreuses peuvent alors se mettre à proliférer sur un nouvel organe et former une tumeur secondaire [11]. Les tumeurs malignes sont classifiées en fonction du type de cellules dont origine la tumeur. La classe la plus commune est le carcinome (tissu épithélial), mais il en existe d'autres comme la leucémie (moelle osseuse), le lymphome (système lymphatique) et le sarcome (tissu conjonctif).

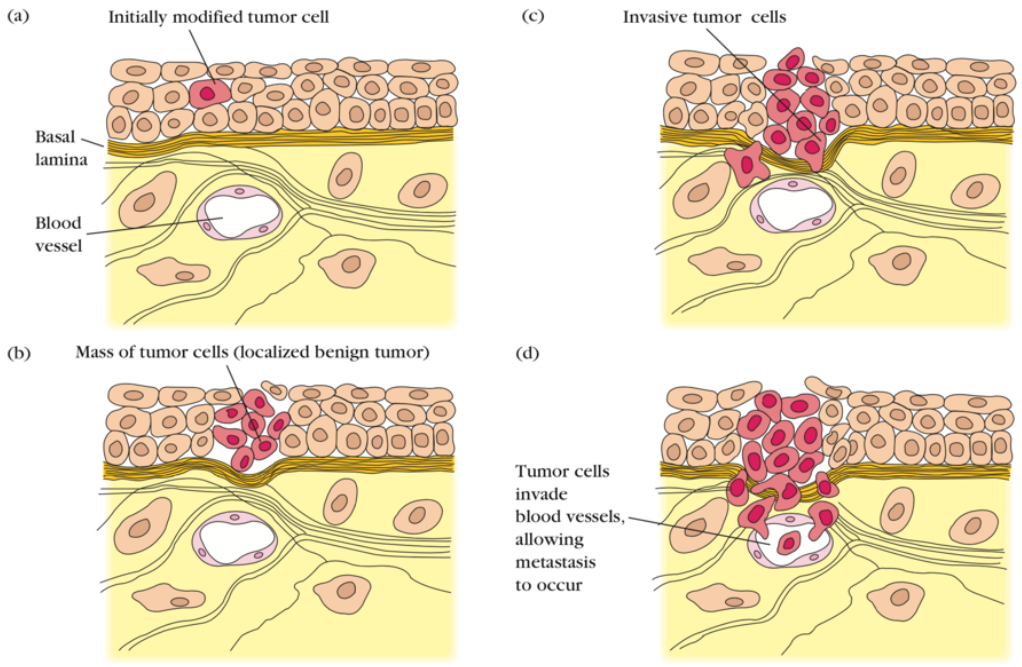


Figure 2.1 Évolution des tumeurs cancéreuses : (a) apparition des premières cellules cancéreuses, (b) tumeur bénigne, (c) tumeur maligne et (d) formation de métastases [11].

Les médecins décrivent l'évolution d'une tumeur en la classant en stades allant de 0 (cancer *in situ* : les cellules cancéreuses n'infiltrent pas les tissus voisins) à 4 (cancer métastatique : la tumeur s'est propagée à d'autres organes) [12]. En général, les stades 0 à 2 ont tendance à avoir un meilleur pronostic à long terme que les stades 3 et 4 [13].

Les grades de cancer aident aussi à établir le pronostic et guident le choix du traitement. Les grades représentent l'agressivité de la tumeur allant de 1 à 3 ou 4, du moins agressif au plus agressif [13]. Les pathologistes déterminent le grade à l'aide d'un système de pointage basé sur l'observation de différents facteurs qui varient d'un organe à l'autre.

2.2.2 Modèle cellulaire du cancer

Les tumeurs sont hétérogènes, c'est-à-dire qu'une même tumeur peut être composée de plusieurs types de cellules et la composition d'une tumeur varie d'une tumeur à l'autre. Ces variations expliquent la difficulté associée au diagnostic, au pronostic et au développement d'un traitement efficace pour toutes les tumeurs. Plusieurs années d'études et d'analyse des tumeurs ont permis d'identifier des protéines qui peuvent être associées à certains types de cancer. Par exemple, la surexpression du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) accélère la prolifération des cellules cancéreuses. Toutefois, certaines cellules cancéreuses n'expriment aucune de ces protéines. Le statut des différentes protéines aide les médecins à déterminer le traitement qui a les meilleures chances de réussite pour le patient.

La recherche sur les cancers requiert l'utilisation d'un modèle *in vitro* adéquat et représentatif des tumeurs afin que les résultats des expériences puissent être extrapolés pour une application clinique. Dans les domaines biomédicaux, l'utilisation de lignées cellulaires cultivées en laboratoire est très intéressante puisqu'elles ont la capacité de se reproduire de manière quasi-infinie générant ainsi un modèle cellulaire assez homogène sur lequel il est possible de se baser pour les expériences [14, 15]. Il existe présentement plus de 4000 lignées cellulaires humaines disponibles pour la recherche dont plusieurs proviennent de tumeurs cancéreuses. La première lignée cellulaire du cancer, les cellules HeLa, a été isolée en 1951et est encore fréquemment utilisée pour la recherche scientifique en oncologie [14].

Il est important de faire un choix judicieux des lignées étudiées dans le cadre de ce projet. En se basant sur l'expression des protéines ciblées, il est possible de sélectionner des lignées cellulaires

qui permettront de démontrer la spécificité de l'attachement des nanoparticules pour les diagnostics à l'aide de la technique d'immunoplasmonique (IP).

2.2.3 Techniques diagnostiques actuelles

La grande incidence du cancer explique l'importance primordiale de développer des outils afin d'améliorer le traitement, certes, mais aussi le diagnostic de cette maladie. Une détection efficace, précise et précoce du cancer améliore grandement le pronostic du patient [16]. La section suivante présente les différentes techniques actuellement utilisées pour le diagnostic du cancer.

Radiographie

La radiographie est une pratique connue qui consiste en l'envoi de rayons X à faible dose sur une partie du corps dans le but d'obtenir une image. Les organes, les os et les tissus graisseux n'absorbent pas la même quantité de rayonnement, plus le rayonnement est absorbé, plus la structure apparaitra avec un fort contraste. Il est possible d'augmenter artificiellement le contraste d'une structure anatomique qui serait difficilement visible à la radiographie par l'administration de produits de contraste (produits iodés ou barytés). La radiographie permet de visualiser certains types de tumeurs afin d'identifier leur emplacement, leur forme et leur taille et de déterminer le stade de la tumeur [17]. La radiographie est aussi utile pour le dépistage de certains types de cancer. Par exemple, la mammographie est un test de dépistage par radiographie bien connu pour le dépistage du cancer du sein, même en l'absence de symptômes [18]. Les radiographies sont rarement suffisantes pour faire un diagnostic, on doit alors avoir recours à d'autres tests pour rejeter ou confirmer un diagnostic de cancer [19].

Échographie

La réflexion des ondes sonores à haute fréquence permet de générer des images diagnostiques en temps réel grâce à l'écholocalisation. Elle permet de différencier les kystes qui sont remplis de liquide et les tumeurs solides. L'échographie peut également guider le chirurgien lors de biopsies ou de certains traitements. Il est également possible de vérifier la présence de métastase dans d'autres organes du corps [20]. Il se peut, dans certains cas, qu'une IRM (imagerie par résonance magnétique) soit conseillée pour détecter la présence d'autres métastases puisqu'elle permet d'obtenir une image du corps en entier. L'IRM n'est pas la méthode d'imagerie privilégiée pour le dépistage puisqu'elle peut facilement produire des faux positifs.

Biopsie

La biopsie est l'acte de prélever un tissu humain pour une analyse microscopique. Il s'agit de la seule technique qui permet de confirmer si une masse est cancéreuse ou non. Il existe plusieurs types de biopsies: la biopsie au trocart, la biopsie chirurgicale et la biopsie à l'aiguille fine (BAF). Le choix du type de biopsie est basé sur l'apparence, la taille, et l'emplacement de la masse.

Pour les cancers qui forment une masse ferme, les biopsies les plus souvent utilisées sont les biopsies au trocart et les biopsies chirurgicales. La biopsie au trocart est pratiquée pour retirer une petite portion de tissus à l'aide d'une aiguille creuse. Une échographie peut être utile pour aider le chirurgien à guider l'aiguille vers la région désirée. La biopsie chirurgicale consiste à retirer une partie ou l'entièreté de la masse par une incision de quelques centimètres. Il est possible que le chirurgien prélève un peu du tissu sain environnant afin de pouvoir faire une comparaison entre les deux types de tissus (cancéreux et sains) [21]. Ces deux types de biopsies permettent de prélever des échantillons pour des analyses en histopathologie (étude microscopique des tissus).

La BAF est une technique minimalement invasive qui permet de prélever des cellules par aspiration à travers une aiguille très fine et creuse. Cette technique peut être utilisée autant sur des masses palpables que non-palpables. Dans le second cas, une échographie ou un scan est utilisé pour guider le chirurgien pendant la procédure. La BAF est utilisée pour des analyses en cytopathologie (étude microscopique des cellules isolées) dans le but de faire un diagnostic [22]. Cette approche permet de faciliter le prélèvement, minimiser les risques pour le patient et diminuer les coûts. En général, il est préférable qu'un pathologiste soit sur place pour évaluer immédiatement l'échantillon afin de s'assurer de la qualité du prélèvement [23].

Les échantillons de biopsie sont envoyés au laboratoire où ils pourront être préparés et analysés par les pathologistes pour poser le diagnostic. Ces analyses sont basées sur la microscopie en champ clair qui permet de visualiser la morphologie des cellules grâce à l'utilisation de colorants. Les préparations des échantillons de biopsies et leurs analyses diffèrent légèrement pour les analyses histologiques et cytologiques, c'est pourquoi elles seront abordées dans des sous-sections différentes.

Analyses histologiques

Les échantillons de biopsie (chirurgicale ou au trocart) sont fixés dans la formaline 10 % lorsqu'ils arrivent au laboratoire de pathologie (figure 2.2.I.). La formaline est utilisée pour mettre fin aux processus cellulaires et prévient la dégradation des échantillons [24]. Ensuite, l'eau dans les cellules est remplacée par de la paraffine à l'aide de bains successifs et l'échantillon est complètement enrobé de paraffine pour former un bloc (figure 2.2.II.). Ce dernier est coupé au microtome en tranches de quelques micromètres d'épaisseur (figure 2.2.III.). Finalement, les coupes sont posées sur des lames de microscopes chargées positivement (voir figure 2.2.IV.). C'est ce qu'on appelle un « échantillon FFPE » (*formalin-fixed paraffin-embedded*).

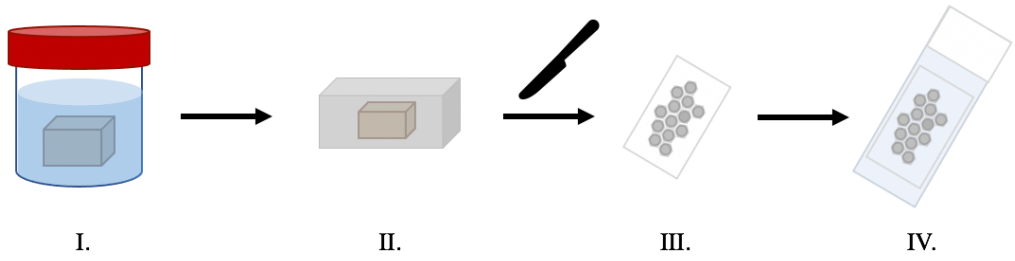


Figure 2.2 Étapes de préparation des échantillons FFPE pour l'analyse histologique : (I) fixation de l'échantillon de biopsie, (II) enrobage dans la paraffine, (III) coupe au microtome de tranches d'échantillon et (IV) dépôt de la tranche sur une lame de microscope chargée positivement.

Les échantillons de biopsie doivent être déparaffinés et réhydratés avec des bains de xylène (ou substitut de xylène), d'éthanol et d'eau avant d'être étudiés. Les cellules des tissus sont figées dans l'état où elles étaient au moment de la fixation et peuvent être colorées afin d'être analysées par un pathologiste [24]. Les deux méthodes d'analyses les plus courantes sont la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) et l'immunohistochimie (IHC).

La coloration H&E (voir figure 2.3) permet de mieux visualiser la morphologie des cellules en colorants différents composants des échantillons FFPE de couleurs différentes. En général, l'hématoxyline teint d'une couleur bleu-mauve le noyau, les ribosomes et le réticulum endoplasmique. Tandis que l'éosine colore, entre autres, le cytoplasme, la membrane cellulaire et la matrice extracellulaire (qui sert de support aux cellules qui forment le tissu) d'une couleur rose-rouge [3]. On note qu'il existe différents types d'hématoxyline (ex : Gill, Harris, Mayer) et d'éosine (ex : Y, B) qui permettent de varier la couleur des colorants pour l'application voulue ou en

fonction des préférences du pathologiste. Depuis plus de cent ans, la coloration H&E est le standard pour l'examen histologique et est nécessaire pour le diagnostic par le pathologiste [25]. Elle permet généralement de déterminer le type de cancer et le grade.

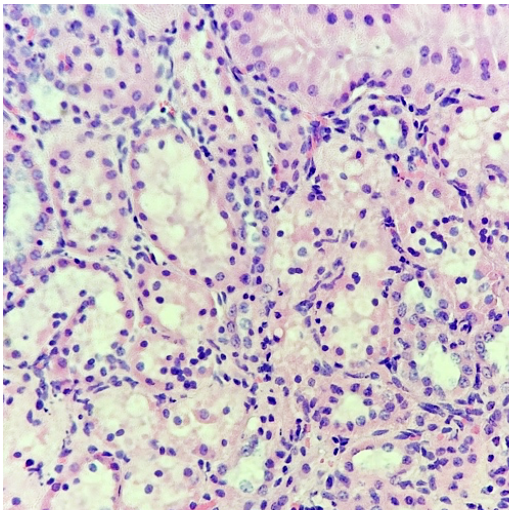


Figure 2.3 Exemple de coloration H&E sur un échantillon FFPE de rein de porc.

Suite à l'évaluation d'une lame avec coloration H&E, le pathologiste peut choisir une série d'anticorps à tester afin de détecter la présence ou la surexpression de protéines qui peuvent confirmer le type de cancer. C'est ce qu'on appelle l'immunohistochimie. L'IHC est utilisée pour obtenir plus d'information sur les protéines exprimées dans un échantillon. Cela permet d'augmenter la précision du diagnostic en identifiant certaines caractéristiques du cancer étudié et de guider le choix du traitement prescrit au patient.

La technique d'IHC est basée sur l'utilisation d'anticorps primaires et secondaires. Une lame avec une tranche d'échantillon FFPE déparaffinée et réhydratée est utilisée (figure 2.4.I). La solution d'anticorps primaire est ajoutée sur la lame afin que les anticorps se lient aux protéines exprimées par les cellules. Puis on ajoute un anticorps secondaire couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP). Les anticorps secondaires s'attachent spécifiquement aux anticorps primaires. Finalement, on ajoute de la 3,3' Diaminobenzidine (DAB), un substrat chimique qui réagit avec l'enzyme HRP pour produire un précipité brunâtre (figure 2.4.II) [24]. Le précipité colore les cellules à proximité pour signaler la position de la protéine détectée (figure 2.4.III). Une contre-coloration à l'hématoxyline (ou H&E [26]) de la lame d'IHC est effectuée pour mieux visualiser la morphologie de l'échantillon tout en gardant un bon contraste avec le signal brunâtre de l'IHC (figure 2.4.IV).

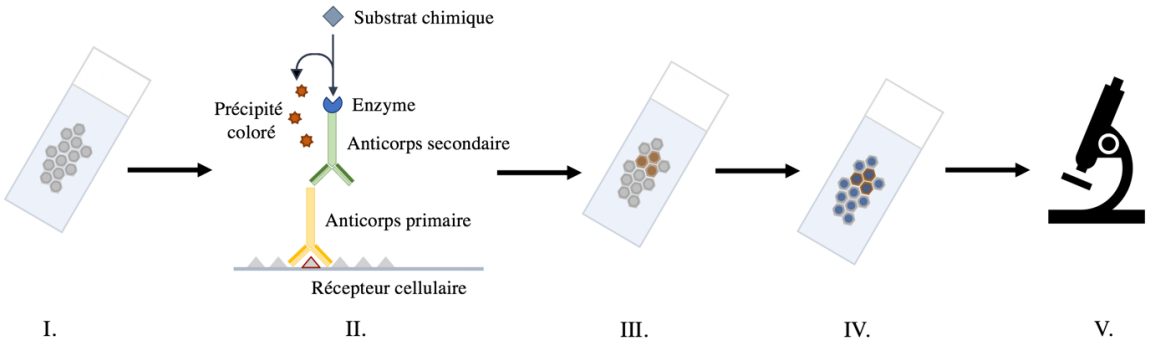


Figure 2.4 Étapes de préparation des lames et principe de l'immunohistochimie : (I) lame avec échantillon déparaffiné et réhydraté, (II) processus de la réaction d'IHC, (III) cellules colorées par le précipité de la réaction enzymatique, (IV) contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline et (V) observation de l'échantillon au microscope.

L'observation de la lame d'IHC au microscope en champ clair permet l'observation des patrons d'expression de la protéine visée dans la tumeur hétérogène afin de les situer et d'en déduire le niveau d'expression dans la tumeur (figure 2.4.V). Les pathologistes déterminent la positivité, soit de façon binaire, soit avec une échelle quantitative ou semi-quantitative. Un exemple d'IHC négative et positive est présenté à la figure 2.5, on observe la présence du précipité brun uniquement dans le cas positif.

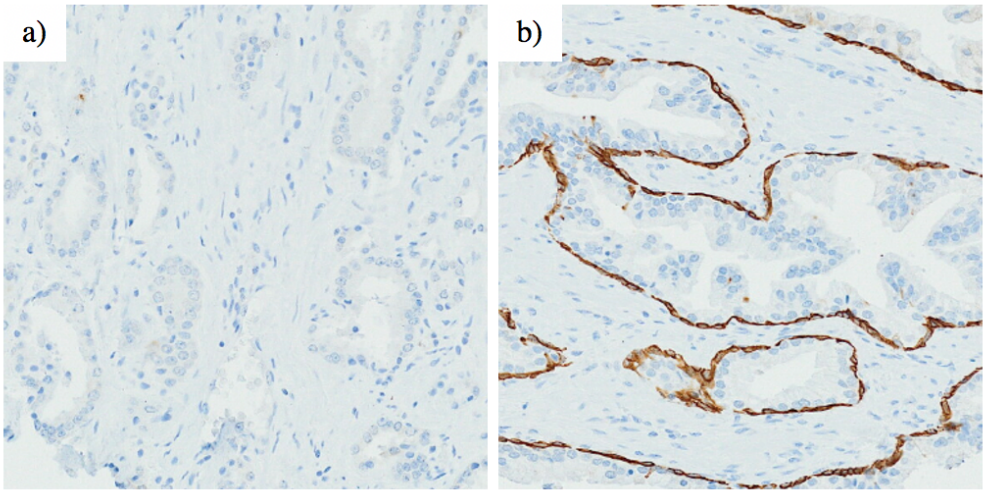


Figure 2.5 Résultat d'IHC (a) négatif et (b) positif avec contre-coloration à l'hématoxyline sur échantillons de tissu prostatique FFPE (images fournies par le laboratoire du Dre Dominique Trudel).

L'hématoxyline est très souvent utilisée comme contre-coloration sur des lames d'IHC pour faciliter leurs interprétations. Cela permet d'obtenir un bon contraste entre le signal (brun) et l'arrière-plan (blanc et bleu). La contre-coloration est essentielle à l'interprétation correcte de l'immunomarquage, car différentes cellules peuvent exprimer des antigènes similaires avec des significations différentes. Une contre-coloration à l'hématoxyline ne permet pas de fournir toutes les informations sur la morphologie de l'échantillon lors de l'interprétation du résultat de l'IHC. C'est pourquoi, le groupe de recherche du CRCHUM du Dre Trudel a récemment proposé de faire une contre-coloration H&E sur les lames d'IHC afin de permettre l'observation de la morphologie pour l'analyse des résultats de l'IHC dans leur contexte cellulaire sur une seule et même lame [26].

L'IHC est l'étalon-d'or actuel en pathologie, mais cette technique est subjective et semi-quantitative. En effet, il existe des zones grises, par exemple, entre un score 1+ fort et un 2+ faible ce qui peut entrainer une certaine variabilité entre les scores attribués par des pathologistes différents. L'utilisation d'échantillons contrôles permet de réduire la variabilité des résultats entre les différents laboratoires de pathologie qui appliquent différents protocoles pour l'IHC (et la coloration H&E).

Dans le cas du cancer du sein, l'IHC est fréquemment utilisée pour détecter l'expression de la protéine HER2 afin de considérer l'efficacité d'un traitement au *Trastuzumab* (médicament qui se fixe aux protéines HER2 en surplus pour interrompre la croissance du cancer) sur une tumeur. Toutefois, il a été démontré que ce médicament était associé à une cardiotoxicité [27, 28]. En effet, selon un rapport publié en 2008, jusqu'à 15% des patients traités avec ce médicament ont développé des problèmes au niveau de leur fonction cardiaque [27]. Lors de l'analyse de l'échantillon de biopsie le pathologiste attribue un score (0 (négatif), 1+, 2+ ou 3+) à l'échantillon basé sur le pourcentage approximatif d'aire couverte par le précipité brunâtre et son intensité (absent, faible, moyen ou fort). Par exemple, le score 2+ représente la présence faible du précipité sur plus de 10% des cellules tumorales. Ainsi, lorsque la tumeur reçoit un score de 0 ou 1+, le médicament n'est pas prescrit puisque la tumeur est considérée comme HER2 négative. Dans le cas d'un score 3+, il est prescrit puisque son efficacité sur les tumeurs HER2 positives surpasse les risques de cardiotoxicité. Par contre, dans le cas d'un score 2+, le médicament pourrait ou ne pourrait pas faire effet. Ainsi, on doit faire plus d'études sur la tumeur afin d'évaluer les avantages et les risques de la prise du médicament par le patient. La technique favorisée pour confirmer le statut HER2 en

ce moment est l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui évalue la quantité de copies du gène HER2 présentes dans les cellules cancéreuses et retourne un résultat positif si le nombre de copies du gène HER2 est supérieur à 4 dans les cellules sinon le test est négatif [12, 29]. Pour éviter cette étape supplémentaire, une technique d'IHC quantitative avec un seuil clair serait certainement préférable au système de score visuel pour la classification des tumeurs HER2 positives vs négatives.

De plus, il est important de mentionner que le protocole d'IHC est toujours appliqué sur des échantillons biologiques qui ont été préalablement fixés dans la formaline. Il n'est pas impossible que cette fixation réduise la détectabilité des protéines dans l'échantillon. Bien qu'une technique de récupération d'antigène soit utilisée pour réduire les modifications subies par l'échantillon, l'analyse de l'expression des protéines sur des échantillons non-fixés serait préférable [30].

Quatorze illusions d'optique ou pièges cognitifs qui peuvent influencer l'analyse des résultats d'IHC par les pathologistes sont présentés dans l'article « *The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis* » [31]. Les illusions d'optique sont des phénomènes qui font en sorte que l'image perçue diffère de l'image réelle. Les pièges cognitifs sont des tendances à penser de manière biaisée qui peuvent entrainer des écarts par rapport à la réalité, par exemple, la tendance à chercher des informations qui confirment l'hypothèse privilégiée au moment de l'analyse des lames d'IHC. Cet article met en lumière les difficultés rencontrées par les pathologistes qui découlent de la subjectivité de la technique.

En général, l'IHC permet d'identifier les protéines spécifiques dans une tumeur, une seule tranche FFPE de 4 µm à la fois. Ainsi, si le pathologiste désire avoir plus d'informations sur trois protéines différentes, l'IHC devra être faite sur trois coupes consécutives de la biopsie. Il est donc difficile d'extrapoler les résultats pour confirmer que ces trois protéines sont exprimées au même endroit en même temps. Il est donc possible que ces résultats induisent des faux positifs ou faux négatifs puisque cette information est parfois nécessaire pour faire un diagnostic juste. Un groupe de recherche a démontré en 2019 la possibilité de faire un marquage multiplexé avec l'IHC [32]. La technique proposée permet de visualiser la présence de deux protéines sur une même lame grâce à l'utilisation d'une seconde enzyme (Chromogène Fast Red) qui précipite d'une couleur rouge. Sachant qu'il est possible qu'il existe des différences importantes entre deux coupes consécutives

de l'échantillon, on comprend l'avantage d'avoir toute l'information sur la même lame grâce à cette technique. Toutefois, cette méthode est limitée par le choix des protéines ciblées puisqu'ils doivent être choisis en tenant compte de l'endroit où ils sont exprimés dans les cellules afin de minimiser la superposition des deux précipités.

L'IHC, bien qu'elle soit l'étalon d'or de pathologie, présente des inconvénients importants qui limitent son efficacité à diagnostiquer les cancers. Une méthode quantitative ou assistée par ordinateur qui permettrait un marquage multiplexé serait certainement préférable à l'IHC qui implique l'attribution d'un score par les pathologistes.

Analyses cytologiques

Le plus rapidement possible après la biopsie à l'aiguille fine (ou au moment de la BAF), une partie des cellules recueillies sont étalées par frottis sur des lames microscopiques chargées positivement, puis la lame est séchée à l'air libre. Les lames peuvent ensuite être plongées dans des bains de colorants à effet rapide, *Diff Quick* (DQ), qui sont très utiles pour l'étude préliminaire de l'échantillon [33]. Ces colorants permettent de mettre en valeur les microorganismes et le cytoplasme (un peu comme l'éosine). Le reste de l'échantillon qui n'a pas été utilisé pour les frottis est fixé dans une solution de formaline à 10 % et est centrifugé pour former un culot cellulaire. Ensuite, comme pour les échantillons histologiques, le culot est enrobé de paraffine [34] et coupé au microtome en tranche de quelques micromètres d'épaisseur. Les tranches FFPE sont placées sur des lames de microscope chargées positivement avant d'être colorées H&E (l'IHC peut aussi être demandée) [22]. Ensuite, l'analyse des lames d'échantillons FFPE est semblable et présente les mêmes problématiques que pour les analyses histopathologiques.

En général, les difficultés pour établir un diagnostic à partir d'échantillons cytologiques résultent des différentes étapes dans la manipulation des échantillons. Il est préférable qu'un pathologiste soit présent au moment de la biopsie pour valider que l'échantillon prélevé est adéquat et contient suffisamment de cellules. Il faut également s'assurer que le matériel et les agents de fixations sont correctement utilisés. Ensuite, différents phénomènes peuvent nuire à la qualité du diagnostic lors de l'analyse des lames. Les artéfacts de séchage causés par un séchage trop rapide des lames ou à une attente trop longue entre le dépôt des cellules par frottis et la coloration peuvent augmenter le l'incidence de faux positifs [22, 33]. L'inflammation peut aussi compliquer l'analyse du cytopathologiste puisque les détails cellulaires seront moins bien définis. Le pathologiste doit donc

tenir compte du contexte clinique et de l'historique du patient avant de tirer des conclusions et d'émettre son diagnostic. Il peut être préférable, dans certains cas, de traiter le patient pour diminuer l'inflammation, avant de répéter la biopsie. Les analyses cytologiques sont parfois plus complexes vu le manque de contexte architectural dans les échantillons puisqu'il existe certains types de cancer où les cellules saines et cancéreuses se ressemblent particulièrement. Il est alors préférable de procéder à une analyse histologique pour établir le diagnostic [22].

2.2.4 Traitements actuels

Ce projet se concentrera sur le diagnostic du cancer, mais il est tout de même pertinent de mentionner les traitements actuellement disponibles. Le choix du traitement repose grandement sur les résultats de l'IHC en fonction des protéines identifiées dans la tumeur. Les médecins se basent également sur le stade du cancer, le risque de récidive et l'état de santé global du patient. En prenant ces facteurs en compte, les tumeurs peuvent être traitées avec un ou une combinaison des traitements suivants : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie [12]. L'optimisation de la méthode de détection et d'analyse des tumeurs a le potentiel d'augmenter la fiabilité des diagnostics de cancer et ainsi faciliter le choix du traitement optimal.

2.3 Biomarqueurs optiques

Il existe actuellement plusieurs types de biomarqueurs optiques utilisés en biologie pour permettre de visualiser certains processus, structures et composants biologiques. Il est possible d'utiliser, entre autres, des colorants, des fluorochromes, des points quantiques ou des nanoparticules plasmoniques en fonction de ce que l'on veut observer. Cette section discute des avantages et des inconvénients des différents biomarqueurs mentionnés.

2.3.1 Colorants

Un chromophore est la partie d'une molécule qui interagit avec les photons ayant des longueurs d'onde dans le spectre du visible, ce qui donne à la molécule une certaine couleur. La combinaison de l'absorption et de la transmission ou de la réflectance de certaines longueurs d'ondes permet d'expliquer la couleur observée [35]. En pathologie, les chromophores sont utilisés pour préparer des solutions colorantes (colorants) comme l'hématoxyline et l'éosine qui permettront de visualiser certains composants des échantillons. Ces colorants constituent, aujourd'hui, la technique de

pathologie la plus populaire pour faire un diagnostic de cancer. Cela s'explique par le fait qu'ils sont facilement observables au microscope en champ clair et sont stables sur de très longues périodes. Cela permet de conserver les échantillons pour une seconde analyse ou de les archiver dans des banques d'échantillons pour la recherche [24].

Le signal observé lors de l'utilisation des colorants n'est pas quantifiable ce qui représente un désavantage important puisqu'il est possible de déterminer si une protéine est exprimée ou non, mais pas de quantifier son expression. De plus, le nombre de colorants pouvant être utilisé en simultanés sur un même échantillon est limité. Ils doivent être choisis avec précaution afin qu'ils colorent des zones différentes, par exemple, l'hématoxyline qui cible principalement le noyau et l'éosine qui colore le cytoplasme. Comme les colorants peuvent se mélanger entre eux, une trop grande superposition dans une même zone nuit à l'observation des échantillons [32].

2.3.2 Fluorochromes

Un fluorochrome est une molécule qui émet de la fluorescence lorsqu'excité par un faisceau lumineux. Normalement, les fluorochromes absorbent et émettent dans les longueurs d'ondes du visible et l'émission est décalée vers le rouge par rapport à l'absorption [35]. En biologie, des anticorps peuvent être combinés aux fluorochromes pour visualiser certains composants cellulaires, il s'agit de la technique d'immunofluorescence (IF). Une méthode couramment utilisée pour amplifier le signal est l'utilisation d'anticorps secondaires. Ces anticorps se lient aux anticorps primaires qui eux reconnaissent les composants cellulaires visés (comme pour l'IHC) (voir figure 2.6). Cela cause une amplification non-linéaire du signal affectant la linéarité et donc le caractère quantitatif de la fluorescence. Les capacités de multiplexage des fluorochromes sont plutôt bonnes puisqu'elles permettent d'observer jusqu'à cinq marqueurs dans un même échantillon.

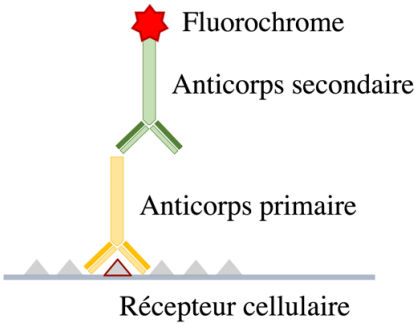


Figure 2.6 Principe de l'immunofluorescence à l'aide d'anticorps primaires et secondaires.

L'inconvénient principal de l'utilisation de fluorochromes est le photoblanchiment [36]. Après un certain temps d'exposition à la source lumineuse, les fluorochromes perdent de façon permanente leurs capacités d'émettre des photons. Cette technique n'est donc pas stable dans le temps, les échantillons doivent alors être analysés rapidement. Le photoblanchiment limite aussi la possibilité d'une deuxième analyse des échantillons (pratique courante en médecine) [35]. De plus, cette technique requiert l'utilisation de filtres ce qui complique son application clinique.

2.3.3 Points quantiques

Les points quantiques (QDs) sont une bonne option puisqu'ils sont brillants et ont une plage de longueurs d'onde d'excitation dans le visible [36]. Il s'agit de particules sphériques de 1 à 10 nm de diamètre à base de nanocristaux semi-conducteurs comme le Cadmium (Cd). Les QDs ont la caractéristique d'avoir un spectre d'absorption très large et un spectre d'émission très étroit. La longueur d'onde du maximum du spectre d'émission dépend de leur taille et de leur composition [37]. Cette caractéristique permet d'exciter plusieurs QDs différents sur un même échantillon avec une même source tout en étant en mesure de différencier le signal récolté pour chacun d'entre eux.

Les QDs sont intéressants pour certaines applications biomédicales puisque des anticorps peuvent être conjugués à leur surface pour cibler certaines protéines spécifiques. Toutefois, le cadmium est toxique pour les humains, même à faible dose. Il est possible d'améliorer leur biocompatibilité en les recouvrant de sulfure de zinc (ZnS), suivi d'une couche de passivation, puis d'un revêtement hydrophile [35]. Toutefois, toutes ces étapes complexifient grandement leur synthèse. De plus le clignotement des points quantiques (une interruption aléatoire du signal) a été observé à plusieurs reprises, ce qui les rend imprévisibles lors de leur application comme biomarqueurs [37]. Un autre désavantage est la photo-oxydation des QDs qui réduit de manière significative leur taille causant un décalage vers le bleu de la longueur d'onde d'émission entre les différentes mesures d'un même échantillon. La photo-oxydation est souvent suivie d'un photoblanchiment après quelques minutes d'exposition à la lumière [38]. Ces raisons font en sorte que les QDs ne sont pas les biomarqueurs optimaux pour l'application développée dans ce projet.

2.3.4 Nanoparticules plasmoniques

Nous proposons, dans ce projet, l'utilisation de nanoparticules plasmoniques (NPs) comme biomarqueurs optiques pour le diagnostic de cancer. Il est donc important de présenter certains

concepts spécifiques à ce type de nanoparticules pour saisir le potentiel de cette technique. Cette sous-section présente les propriétés optiques qui les rendent particulièrement intéressantes comme biomarqueurs.

En général, les nanoparticules ont une taille allant de 1 nm à environ 200 nm et peuvent être composées de métaux, de lipides, de polymères, etc. Les NPs sont des nanoparticules métalliques qui ont des propriétés optiques particulières lorsqu'elles interagissent avec la lumière. Le spectre des NPs présente un pic d'extinction (ou pic plasmon) à une longueur d'onde caractéristique. La présence de ce pic plasmon s'explique par la résonance des oscillations du gaz d'électrons libres à la surface des NPs avec l'onde électromagnétique incidente. C'est ce qu'on appelle résonance plasmonique de surface (SPR). Le phénomène de résonance fait en sorte que l'absorption et la diffusion de la lumière sont maximales à une longueur d'onde précise, ce qui crée le pic plasmon [39]. On note que pour certaines formes, comme les nanobâtons (NRs), le spectre est composé de deux pics d'extinction causés par le ratio de taille longitudinale et transversale des NRs. L'interaction des NRs avec l'onde électromagnétique génère un mode d'oscillation transverse et un mode d'oscillation longitudinal à des longueurs d'onde différentes (voir figure 2.7.a) [40]. La position du pic plasmon des NPs varie entre le visible et le proche infrarouge en fonction de différents paramètres dont la forme, la taille et la composition, l'indice de réfraction du milieu environnant, etc. [39] La figure 2.7.b [36] montre la modification de la position du pic plasmon pour différentes compositions de nanoparticules d'alliage or-argent (Au/Ag-NPs).

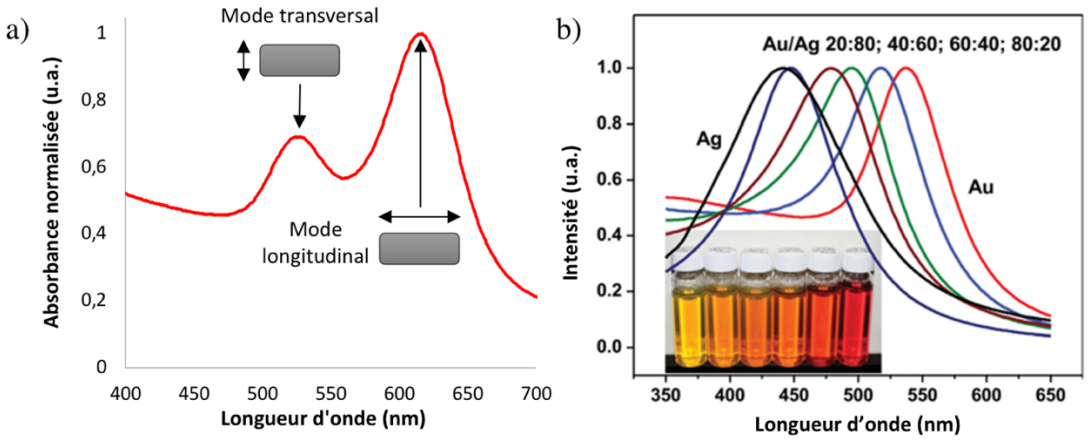


Figure 2.7 Pics plasmon de (a) nanobâtons d'or (adaptée de [40]) et de (b) nanoparticules sphériques d'alliage or-argent [36].

Il est ainsi possible de fabriquer sur mesure différentes NPs qui seront toutes spectralement différenciables [6], c'est-à-dire qui apparaitront de différentes couleurs lors de l'observation au microscope. Elles pourront ainsi servir de biomarqueurs pour les applications de biodétection pour le diagnostic de cancer par exemple. La théorie de Mie permet de modéliser l'influence de la taille et de la composition des NPs sphériques sur l'allure du pic plasmon (position, largeur et intensité). Elle permet également de déterminer les contributions de l'absorption et de la diffusion au spectre d'extinction.

La distance inter-particules moyenne a aussi une influence sur le pic plasmon [36]. En effet, son intensité est proportionnelle à la concentration de NPs dans la solution aqueuse. Il est donc possible de faire une courbe de calibration pour estimer le nombre de NPs utilisées pour une expérience afin d'assurer la reproductibilité des résultats.

Les nanoparticules ont généralement une bonne stabilité et sont résistantes au photoblanchiment ce qui est très pertinent dans le domaine médical puisque les échantillons sont souvent étudiés plus d'une fois et peuvent être entreposés plusieurs années. De plus, le signal associé à la diffusion d'une seule nanoparticule est cinq ordres de grandeur supérieur à l'émission d'un fluorochrome [36]. La diffusion de NPs individuelles est suffisamment importante pour être détectable au microscope, on peut donc recueillir de l'information quantitative sur l'échantillon. Le choix de différentes géométries, tailles et compositions de NPs permet d'obtenir des marqueurs spectralement différents qui peuvent être conjugués à des anticorps pour le marquage spécifique de plusieurs protéines en simultané [41]. Le multiplexage avec les NPs est limité par la différenciation spectrale des pics plasmon des NPs et l'inter-variabilité de la taille des NPs dans un même échantillon cause l'élargissement du pic plasmon ce qui nuit à la différenciation des spectres.

2.3.5 Superposition de biomarqueurs optiques

Des études réalisées par plusieurs groupes combinent différentes techniques à base de biomarqueurs optiques. À ma connaissance, nous sommes les premiers à étudier la possibilité d'observer en microscopie des biomarqueurs, comme les nanoparticules, dans le but d'obtenir plus d'informations sur les protéines présentes dans un échantillon avec coloration H&E.

L'IF qui est utilisée en biologie pour l'identification de certaines protéines n'est pas compatible avec la coloration H&E puisque l'éosine produit un fort signal de fluorescence en arrière-plan [42].

Ainsi, un peu comme pour l'IHC, certaines lames doivent être réservées pour l'observation de la morphologie avec la coloration H&E et l'IF est fait sur d'autres lames. Il n'est donc pas possible d'obtenir l'information sur les protéines et la morphologie à un même endroit dans l'échantillon. Il est parfois possible de faire l'analyse en IF, puis de retirer délicatement la lamelle pour procéder à la coloration H&E de l'échantillon. Le signal d'IF peut alors être superposé par ordinateur à l'image de l'échantillon avec la coloration. Cette technique n'est pas idéale puisque lorsque la lamelle est retirée, il est probable d'endommager l'échantillon.

Ensuite, plusieurs articles utilisent la coloration H&E pour démontrer l'efficacité d'un traitement à base de nanoparticules [43, 44]. Ils procèdent d'abord au traitement *in vivo* ou *in vitro* à l'aide des nanoparticules. Puis, ils observent au microscope les échantillons de contrôle et ceux traités qui ont tous deux été colorés H&E afin de détecter les différences entre les deux types d'échantillons. Dans ce type d'études, l'objectif n'est pas de visualiser les NPs, mais plutôt d'observer les modifications biologiques causées par le traitement. La coloration H&E est également souvent utilisée dans le cadre d'études sur la toxicité des nanoparticules dans l'environnement biologique [45, 46]. Encore une fois l'objectif n'est pas d'observer les NPs dans l'échantillon.

On retrouve également plusieurs articles qui rapportent l'utilisation de l'IHC avec contre-coloration à l'hématoxyline (l'étalon d'or actuel pour la détection de protéines dans un échantillon) pour valider des résultats de biodétection obtenus avec les nanoparticules ou les points quantiques [47, 48]. L'IHC est habituellement effectuée sur la même lame après la prise d'images des échantillons avec les nanoparticules (ou QDs) comme pour les échantillons d'IF. Ils ne combinent donc pas les deux techniques en même temps.

2.4 Fonctionnalisation des nanoparticules

Les cellules cancéreuses ont la caractéristique de surexprimer ou de sous-exprimer certaines protéines. Il existe différentes techniques permettant de positionner des anticorps à la surface de NPs afin de cibler ces protéines, c'est ce qu'on appelle la fonctionnalisation des nanoparticules. Les NPs fonctionnalisées peuvent être utiles pour différentes applications médicales, comme la biodétection et les traitements. Les nanoparticules utilisées dans un contexte biomédical sont souvent recouvertes de polyéthylène glycol (PEG), un polymère hydrophile qui permet

d'augmenter leurs solubilités et leurs biocompatibilités [49]. Dans le contexte de l'immunoplasmonique (IP), la fonctionnalisation nous permet d'utiliser différents types de nanoparticules pour cibler spécifiquement certaines protéines pour l'identification de cellules cancéreuses. Cette section permet de faire un court rappel sur ce que sont les anticorps et les antigènes avant de présenter les techniques de fonctionnalisation.

2.4.1 Anticorps et antigènes

Parmi les protéines membranaires des cellules, on retrouve des protéines qui peuvent être reconnues par des anticorps afin d'engendrer une réponse immunitaire. Dans ce contexte, ces protéines sont appelées antigènes [50]. Un anticorps est composé de protéines assemblées en forme de « Y » et reconnait spécifiquement la protéine [51]. Il existe des anticorps, dits primaires, qui se lient spécifiquement à un antigène présent à la surface d'une cellule. Les anticorps secondaires, quant à eux, se lient aux anticorps primaires pour détecter et amplifier le signal. Les anticorps secondaires sont souvent couplés à un marqueur optique comme une enzyme (exemple en IHC, figure 2.4) ou un fluorochrome (exemple en immunofluorescence, figure 2.6). L'utilisation d'anticorps secondaires permet d'augmenter la spécificité du marquage grâce à la détection indirecte des antigènes [24]. La modification de la conformation d'un antigène aura pour résultat de nuire à sa reconnaissance par un anticorps. Plusieurs facteurs peuvent influencer cette conformation dont l'exposition à une chaleur trop intense, la variation du pH et la fixation des cellules. Il est important de garder cette information en tête lors de la conception d'expériences et l'analyse des résultats d'immunomarquage.

2.4.2 Techniques de fonctionnalisation

Plusieurs protocoles de fonctionnalisation ont été étudiés par des étudiants du laboratoire LP^{2}L. Entre autres, dans un récent mémoire de maîtrise, Audrey Nsamela a testé trois protocoles de fonctionnalisation utilisant un agent de réticulation qui permet de faire le lien entre l'anticorps et la nanoparticule dans le cadre de sa maîtrise (protocole EDC-NHS, NHS et hydrazide) [52]. Les protocoles sans agents de réticulation sont plus simples à réaliser (moins longs, moins d'étapes), mais sont peu efficaces. Le protocole EDC-NHS est le protocole le plus utilisé et le mieux maitrisé dans notre laboratoire puisque les résultats obtenus sont reproductibles et il a la particularité de pouvoir être utilisé pour la conjugaison de n'importe quels anticorps. Par contre, il s'agit d'une

technique qui ne permet pas de contrôler l'orientation des anticorps à la surface des nanoparticules. Il est donc possible que certains anticorps soient fixés aux nanoparticules avec une orientation qui bloque leur site actif, réduisant ainsi la capacité des anticorps à reconnaitre la protéine cellulaire. De plus, il a été remarqué qu'une proportion importante de nanoparticules sont perdues lors de la réalisation des étapes de fonctionnalisation. Le développement d'un protocole de fonctionnalisation optimal est très complexe, c'est pourquoi certains étudiants travaillent à temps plein sur cette question. Dans le cadre de ce projet, la technique de fonctionnalisation EDC-NHS ne sera pas optimisée.

En bref, le protocole de fonctionnalisation EDC-NHS consiste en l'activation d'une molécule avec un groupe carboxylique (COOH-PEG-thiol), préalablement liée aux nanoparticules, par la molécule 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Le N-Hydroxysuccinimide (NHS) est ajouté à la solution de nanoparticules permettant de remplacer l'EDC du groupe intermédiaire par le NHS. Finalement, la fonctionnalisation des nanoparticules est complétée par l'ajout d'anticorps qui ont une forte affinité avec le NHS grâce à leurs acides aminés. Les nanoparticules recouvertes de PEG et couplées aux anticorps sont prêtes à être utilisées dans les expériences *in vitro* ou *in vivo* [49].

2.5 Interactions des nanoparticules avec les cellules

La fonctionnalisation des NPs permet l'interaction spécifique et ciblée des NPs avec les cellules grâce à la reconnaissance des antigènes par les anticorps. Par contre, il existe des mécanismes d'interaction non-spécifiques qui doivent être considérés lorsqu'on utilise les NPs dans un contexte diagnostique. Plusieurs recherches ont permis d'identifier les paramètres qui ont un impact significatif sur les interactions entre les NPs et les cellules. Tous ces paramètres doivent être pris en compte lors de l'élaboration du protocole expérimental pour l'immunomarquage.

Tout d'abord, dans le cas où l'incubation des NPs se fait avec des cellules vivantes, la taille et la forme des NPs jouent un rôle important sur l'internalisation des NPs par les cellules [53-55]. Les cellules utilisent différents modes d'internalisation [54], comme la phagocytose et l'endocytose, qui seront plus ou moins importants en fonction de ces paramètres. L'internalisation des NPs nuit au diagnostic à base de NPs puisqu'elles émettent un signal non-spécifique. Toutefois, il est difficile d'optimiser ces deux paramètres pour minimiser l'internalisation des NPs puisque chaque

type de cellules interagit différemment avec les NPs. Les recherches à ce sujet se concentrent souvent sur certaines lignées cellulaires en particulier et les résultats obtenus sont difficilement applicables à d'autres lignées cellulaires. L'interaction électrostatique des NPs avec les cellules est aussi importante à prendre en compte. En général, les NPs chargées positivement interagissent plus facilement avec les cellules, mais certains types de cellules ont une affinité accrue avec les NPs chargées négativement [56]. Cette différence peut avoir un impact sur l'efficacité et la spécificité du marquage immunoplasmonique. Ensuite, il a également été remarqué que la concentration des solutions de NPs et la température d'incubation sont des paramètres qui ont un plus grand impact sur l'interaction des NPs avec les cellules que le temps d'incubation [57]. La technique d'administration des NPs sur les cellules a aussi un impact sur l'interaction des NPs avec les cellules puisque toutes les cellules doivent avoir une opportunité similaire d'interagir avec les NPs [58]. Enfin, l'effet de la sédimentation des NPs doit être considéré lors de l'incubation surtout pour les grosses NPs qui sédimentent plus rapidement [59].

2.6 Méthodes d'imagerie des nanoparticules

Il est primordial de pouvoir adéquatement visualiser les cellules et les nanoparticules dans les différents échantillons préparés. En pathologie, les lames colorées (IHC et H&E) sont observées en microscopie en champ clair. Toutefois, ce type de microscopie ne permet pas de visualiser les nanoparticules. Le système utilisé pour la technique d'IP doit donc être compatible avec la microscopie en champ clair et permettre une transition simple et rapide entre les deux méthodes sur un même microscope. Cette section a donc pour but de présenter les différentes méthodes d'imagerie des NPs à considérer. Le principe derrière chacune de ces méthodes est d'éviter que l'illumination provenant de la source retourne à l'oculaire du microscope ou au capteur afin de pouvoir observer la diffusion des NPs. De plus, elles se basent sur le fait que les NPs diffusent la lumière de façon isotrope (de la même manière dans toutes les directions). Les trois méthodes d'imagerie discutées dans cette section sont la microscopie en rétrodiffusion, en champ sombre et en champ sombre avec illumination latérale.

2.6.1 Rétrodiffusion

Cette première méthode récolte le signal diffusé vers l'arrière par l'échantillon, c'est ce qu'on appelle la rétrodiffusion [60]. L'illumination passe à travers une lame séparatrice qui dirige le

faisceau vers l'objectif du microscope, puis la lame séparatrice permet de laisser passer la lumière rétrodiffusée par l'échantillon vers le capteur (voir figure 2.8).

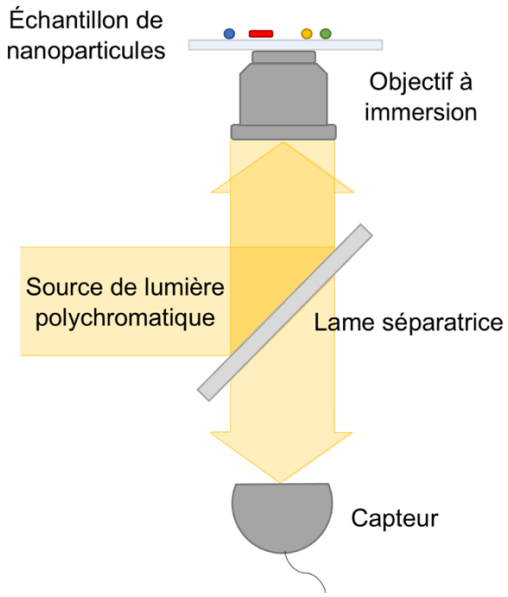


Figure 2.8 Schématisation du montage pour la microscopie en rétrodiffusion.

Cette technique requiert l'utilisation d'un objectif à immersion dans l'huile qui permet de limiter la réflexion du faisceau incident aux interfaces de l'échantillon (lame de microscope, milieu de montage et lamelle) et donc de diminuer le bruit causé par la source. Cela permet de réduire l'écart entre les indices de réfraction des différents milieux puisque l'indice de réfraction de l'huile est semblable à l'indice de réfraction du verre et du milieu de montage à base de toluène. On note que la réflexion à la deuxième interface de la lame est négligeable. De plus, l'huile permet d'augmenter l'ouverture numérique de l'objectif afin d'obtenir une meilleure résolution spatiale.

Il a été remarqué que les cellules diffusent beaucoup moins la lumière vers le bas que les NPs. Il est donc difficile de situer les NPs dans l'environnement cellulaire (voir figure 2.9) et de différencier les NPs sur les cellules des NPs sur le substrat (signal non-spécifique). C'est pourquoi une combinaison d'illumination en champ clair et de rétrodiffusion est souvent utilisée pour permettre l'observation des cellules dans l'échantillon. L'utilisation d'un objectif à immersion dans l'huile et la difficulté d'observer les NPs dans le contexte cellulaire font en sorte que cette méthode d'imagerie n'est pas favorable pour une application en pathologie.

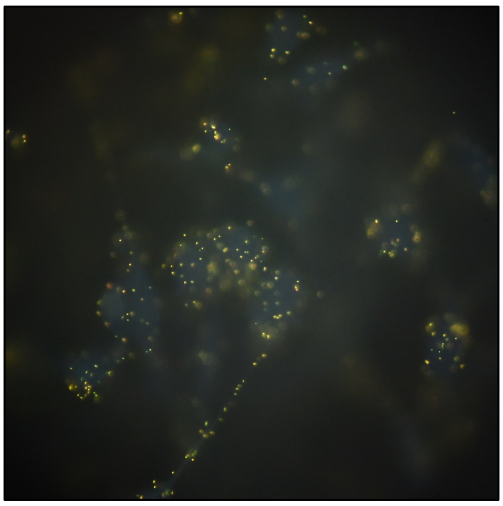


Figure 2.9 Exemple d'un échantillon de cellules adhérées avec NPs observé en rétrodiffusion (image fournie par Cécile Darviot).

2.6.2 Microscopie en champ sombre

La microscopie en champ sombre est une technique fréquemment utilisée dans le passé pour visualiser des nanoparticules dans un environnement cellulaire [61, 62] puisqu'elle est basée sur la diffusion de la lumière par l'échantillon observé. En effet, ce type d'illumination fait en sorte que même des particules, qui sont plus petites que le pouvoir de résolution du microscope, ont le potentiel de diffuser la lumière, et de devenir visibles. C'est le cas des nanoparticules plasmoniques puisqu'elles ont la caractéristique d'avoir une très grande section efficace de diffusion. Cette méthode utilise un faisceau de lumière blanche qui passe à travers un condenseur avant d'illuminer obliquement l'échantillon (voir figure 2.10). En choisissant correctement l'ouverture numérique de l'objectif, on récolte uniquement la lumière diffusée par l'échantillon [63]. Ce type de microscopie permet d'obtenir des images où les structures à observer apparaissent claires et l'arrière-plan est sombre.

La problématique principale de cette technique est que l'environnement cellulaire a une grande influence sur la qualité de la détection des nanoparticules, car les cellules ont un grand potentiel de diffusion [5, 64]. Ainsi, le contraste entre les nanoparticules et les cellules diminue (voir figure 2.11).

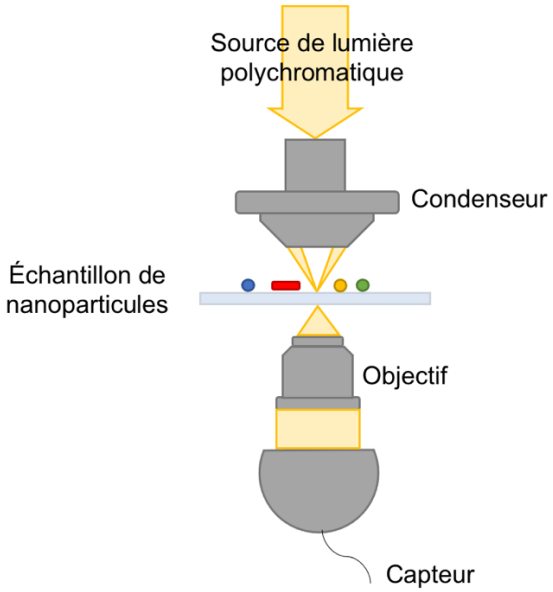


Figure 2.10 Schématisation du montage pour la microscopie en champ sombre.

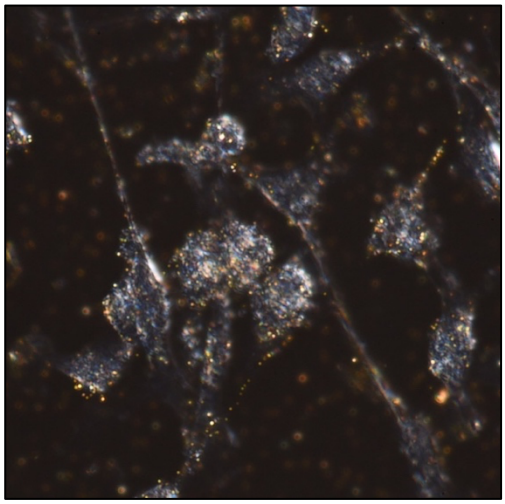


Figure 2.11 Exemple d'un échantillon de cellules adhérées avec NPs observé en microscopie en champ sombre (image fournie par Cécile Darviot).

De plus, cette technique est limitée par l'ouverture numérique qui doit être plus petite que celle du condenseur [5] et a une faible résolution latérale. Par contre, en général, on obtient une meilleure résolution spatiale en champ sombre qu'en rétrodiffusion. Enfin, cette technique n'est pas compatible avec la microscopie en champ clair à cause de l'utilisation d'un condenseur. Bien que la microscopie en champ sombre ait fréquemment été utilisée dans des expériences précédentes, on conclut qu'elle n'est pas la méthode idéale pour l'application proposée ici.

2.6.3 Microscopie en champ sombre avec illumination latérale

Cette méthode est en fait une variante à la microscopie en champ sombre grâce à l'utilisation d'un dispositif d'illumination latérale (*Side-Illumination* ou SI) qui permet d'exclure le signal de la source grâce à une illumination orthogonale à l'axe optique (voir figure 2.12). Ce dispositif, de la compagnie *VEGAPhoton*, s'installe en le déposant directement sur le plateau d'un microscope droit ou inversé. La bande d'illumination composée de LEDs de trois couleurs discrètes (rouge, bleu et vert) et d'intensité contrôlable indépendamment est installée de manière à optimiser l'illumination à l'intérieur d'une lame de microscope rectangulaire standard (dimension : 26 x 76 mm).

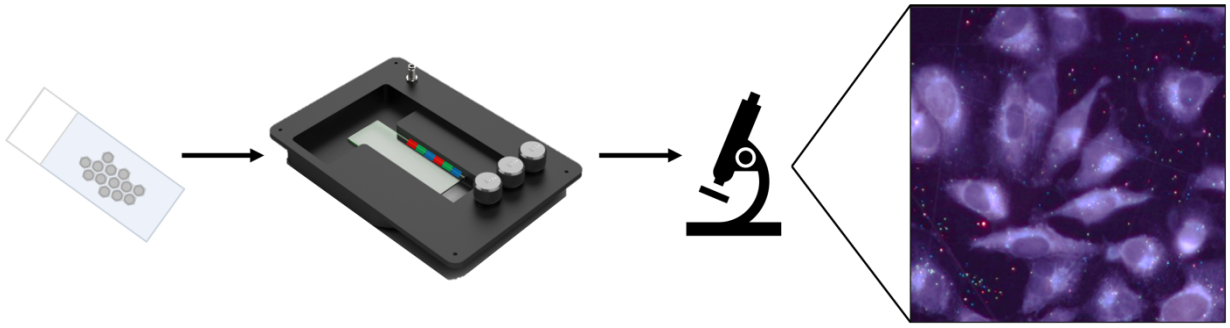


Figure 2.12 Dispositif d'illumination latérale pour l'observation au microscope d'une lame de microscope rectangulaire et un exemple d'échantillon de cellules adhérées avec NPs observé en champ sombre avec illumination latérale. Adaptée de [6, 65].

Le choix des LEDs a été fait de manière à améliorer la différenciation spectrale entre les nanoparticules, mais il limite la capacité de multiplexage des nanoparticules à trois (potentiellement quatre) types de marqueurs simultanés. De plus, les nanoparticules utilisées doivent avoir une taille suffisamment grande pour être en mesure de les visualiser au microscope et de les différentier puisque la section efficace de diffusion (σ_{scat}) des nanoparticules dépend de leur taille ($\sigma_{scat} \sim R^6$, où R est le rayon de la nanoparticule) [5].

Les avantages de cette technique sont qu'elle n'est pas limitée par l'ouverture numérique de l'objectif et qu'elle permet d'augmenter le contraste des nanoparticules plasmoniques par rapport aux autres éléments diffusants de l'échantillon (composants cellulaires, milieu de montage, etc.). Elle s'utilise facilement, s'intègre simplement, est peu couteuse et ne requiert pas l'utilisation d'un objectif à l'huile. De plus, elle est compatible avec les microscopes en champ clair qui sont utilisés pour l'analyse des échantillons de pathologie.

Il existe une variante circulaire au dispositif d'illumination latérale pour l'observation d'échantillons préparés dans des pétris de 25 mm de diamètre. La disposition des LEDs sur 360 degrés permet une illumination plus homogène de l'échantillon et minimise l'influence de l'orientation spatiale des nanoparticules non-symétriques comme les nanobâtons [6]. Toutefois, ce dispositif n'est pas compatible aux pratiques actuelles en pathologie qui utilisent des lames de microscope rectangulaires pour l'analyse des échantillons.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIES EXPÉRIMENTALES DE PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS HISTOLOGIQUES AVEC MARQUAGE IMMUNOPLASMONIQUE

Ce mémoire porte sur la preuve de concept de la possibilité de superposer la coloration H&E et le marquage immunoplasmonique. Tel que mentionné dans la revue de littérature, il existe plusieurs facteurs qui limitent les performances des techniques de diagnostics actuelles basées sur la coloration H&E et l'IHC. Il a été démontré que le marquage immunoplasmonique permet de faire un marquage spécifique, quantitatif et multiplexé afin d'identifier les protéines exprimées par des cellules cancéreuses [6, 36, 66]. Cette technique a donc le potentiel de remplacer l'IHC dans les laboratoires de pathologie. À notre connaissance, les travaux antérieurs sur l'IP ne traitaient pas de l'effet de la coloration H&E sur l'observation des NPs dans l'environnement cellulaire. Cependant, la coloration H&E est nécessaire pour l'interprétation adéquate de l'immunomarquage, car différentes cellules peuvent exprimer des antigènes similaires avec des significations différentes. Il est donc important de pouvoir analyser l'expression des protéines dans leur contexte cellulaire. La possibilité de superposer le marquage immunoplasmonique à la coloration H&E donnerait un net avantage à cette technique par rapport aux autres méthodes d'immunomarquage (IHC, IF, etc.).

Avant le début de ce projet, nous étions conscients que la coloration des cellules pourrait potentiellement nuire à la visualisation des NPs sur celles-ci. En effet, les colorants pourraient opacifier les cellules et bloquer l'illumination incidente ou le signal émis par les NPs lors de l'observation au microscope des échantillons. La diffusion causée par les différents colorants pourrait également produire trop de bruit au niveau de l'arrière-plan et empêcher l'observation de la diffusion des NPs ou modifier leur spectre de diffusion.

Dans ce chapitre, la description du matériel utilisé et l'explication méthodologie expérimentale pour la préparation des trois différents types d'échantillons avec superposition de la coloration H&E à quatre types de NPs seront abordés.

3.1 Échantillons

Les échantillons utilisés pour ce projet sont des cellules adhérées à la lame de microscope, des tranches de cellules FFPE et des tranches de tissu FFPE. Des échantillons à bases de cellules isolées

(cellules adhérées et cellules FFPE) provenant de deux lignées cellulaires différentes et des échantillons de tissu FFPE provenant d'un rein de porc ont été testés.

3.1.1 Choix de la composition des échantillons

Les études *in vitro* à base de lignées cellulaires sont très souvent utilisées pour l'étude des cancers [14]. Nous avons, dans notre laboratoire, plusieurs lignées cellulaires utilisées pour la recherche. Parmi celles-ci, on retrouve les MDA-MB-231 et les MDA-MB-453, deux lignées humaines du cancer du sein provenant de la compagnie *American Type Culture Collection* (ATCC) [67, 68]. Il s'agit de lignées cellulaires adhérentes qui sont facilement distinguables par leur morphologie très distinctive. En effet, les MDA-MB-231 ont une allure longue et effilée lorsqu'elles sont adhérées au substrat alors que les MDA-MB-453 sont petites et rondes (voir figure 3.1). Les conditions de culture similaires de ces deux types de cellules ont permis de facilement entretenir la culture des cellules en parallèle (voir section 3.2.1 pour les détails de la culture cellulaire). De plus, comme l'objectif principal de cette partie du projet est de visualiser les NPs sur des cellules (NPs non-fonctionnalisées) et non d'optimiser la spécificité du marquage immunoplasmonique, le niveau d'expression de différentes protéines par les cellules n'a pas d'importance. Ces raisons expliquent le choix de ces deux lignées cellulaires pour la préparation des échantillons à base de cellules isolées.

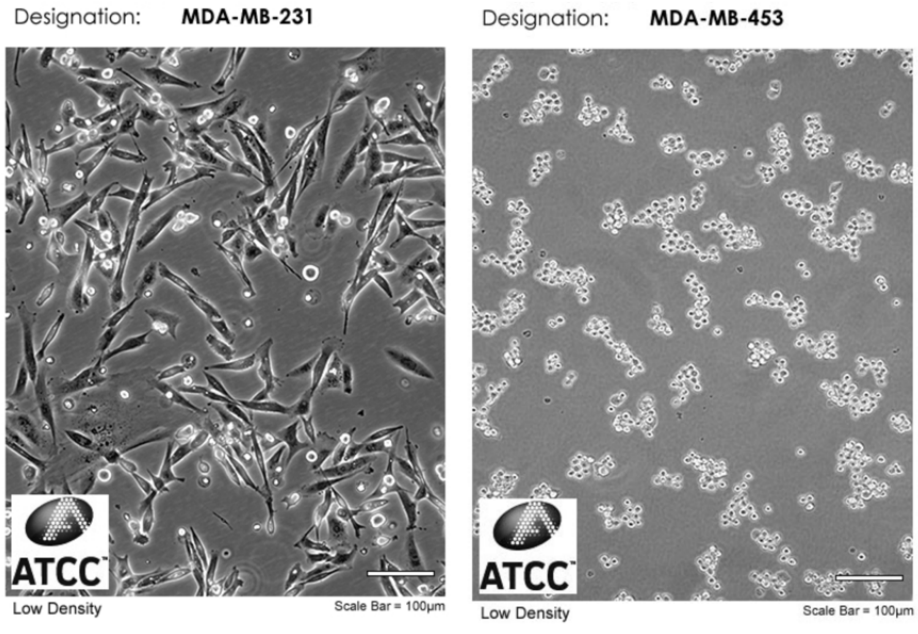


Figure 3.1 Allure des lignées cellulaires MDA-MB-231 [67] et MDA-MB-453 [68] en culture.

Pour les échantillons de tissu, tel que mentionné, comme le marquage étudié est non-spécifique, il n'est pas nécessaire d'utiliser des tissus cancéreux pour la réalisation des expériences. Ainsi, avec l'aide du Dre Dominique Trudel, nous avons déterminé que le rein de porc constituerait un bon échantillon pour les expériences sur les tranches de tissu FFPE. Cet organe est composé de structures visuellement intéressantes comme les glomérules rénaux et les vaisseaux sanguins qui apparaissent bien avec la coloration H&E lors de l'observation au microscope. Il s'agit également d'un tissu qui se manipule bien lors de la préparation des échantillons.

3.1.2 Choix du type d'échantillons

En pathologie, il existe différentes techniques pour la préparation des échantillons en fonction du type de biopsie effectuée et des analyses désirées. Nous avons donc sélectionné trois types d'échantillons à tester pour répliquer le plus fidèlement possible les conditions des analyses cytologiques et histologiques.

Les types d'échantillons les plus populaires en cytologie sont les frottis et les tranches de cellules FFPE [22, 33]. Tout d'abord, pour s'approcher des conditions d'un frotti de cytologie tout en maintenant les cellules vivantes durant l'incubation avec les NPs, nous avons opté pour un premier type d'échantillon soit les cellules adhérées à la lame de microscope. Celui-ci permet de tirer des conclusions quant à la possibilité de l'utilisation de l'IP sur les échantillons par frotti. Il permet également d'étudier la morphologie privilégiée par les cellules, c'est-à-dire lorsqu'elles sont adhérées à un substrat, et de faire l'incubation avec les NPs sur des cellules vivantes. La possibilité d'un marquage IP sur des cellules vivantes adhérées permet d'éviter les inconvénients des marquages sur les cellules fixées comme la dégradation des antigènes (tel que mentionnés dans la section 2.2.3), ainsi que de minimiser les effets de la trypsine sur l'expression des protéines [69, 70]. La trypsine est couramment utilisée lors des passages cellulaires et de la préparation de certains échantillons pour remettre en suspension les cellules adhérées. L'inconvénient principal de ce type d'échantillon est le fait que travailler avec des cellules entières limite le marquage aux protéines membranaires. Les protéines au niveau du noyau, par exemple, ne sont pas accessibles.

Ensuite, nous avons opté pour les échantillons de tranches de cellules FFPE. Les étapes de préparation de ces échantillons sont semblables à celles des laboratoires de cytologie. Ce type d'échantillon permet de produire rapidement une grande quantité d'échantillons (plus de 50 lames) dans les mêmes conditions. Il est alors plus facile de comparer les résultats entre eux puisque les

échantillons ont été préparés en même temps (même nombre de passage, mêmes étapes de fixation, mêmes conditions de mise en bloc de paraffine). De plus, comme les cellules sont coupées sur différentes tranches, les protéines membranaires et intracellulaires sont toutes les deux accessibles lors d'un éventuel marquage IP spécifique. Toutefois, puisque les cellules sont fixées au moment de la mise en bloc de paraffine, l'incubation avec les NPs n'est pas réalisée sur des cellules vivantes.

Pour ce qui est des échantillons d'histologie, nous n'avons jamais étudié la possibilité du marquage IP sur des tissus dans notre laboratoire de Polytechnique Montréal. Nous allons donc tester le potentiel de l'IP dans le contexte d'analyses histologiques. Les tranches de tissu FFPE constituent le troisième type d'échantillon utilisé dans le cadre de ce projet. Il sera alors possible, dans un premier temps, de confirmer la possibilité d'observer les NPs sur des échantillons de tissu sans coloration puis d'étudier l'effet de la coloration sur la visualisation des NPs.

3.2 Préparation des échantillons

Tous les types d'échantillons ont leurs propres étapes de préparation, cette section vise à présenter ces étapes pour chacun des types d'échantillons qui sont étudiés dans ce chapitre.

3.2.1 Échantillons de cellules adhérées

Cette sous-section porte sur les différentes étapes de préparations des échantillons de cellules adhérées, de la culture cellulaire jusqu'à l'adhésion des cellules sur la lame de microscope.

Culture cellulaire

Les deux lignées cellulaires (MDA-MB-231 et MDA-MB-453) requièrent les mêmes conditions de culture. Elles sont cultivées dans les flasques de culture en polystyrène de 25 cm^2 ou de 75 cm^2 en fonction du nombre de cellules nécessaire à la réalisation des expériences. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) auquel on ajoute 10 % de FBS (*Fetal Bovine Serum*) et 1 % d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). Un traitement préventif contre le mycoplasme a aussi été effectué sur les deux lignées pour s'assurer de leur santé avant de les utiliser pour les différentes expériences. Lors de la culture, les deux lignées cellulaires forment une monocouche de cellules adhérées au fond de la flasque.

Adhésion des cellules sur la lame de microscope

Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80-90 % à l'intérieur de la flasque, un lavage au PBS (tampon de phosphate salin) est effectué pour retirer les débris cellulaires en suspension dans le milieu de culture. Ensuite, une solution de 0.25 % de trypsine-EDTA est utilisée pour cliver les protéines membranaires d'adhésion afin de remettre les cellules en suspension. Les cellules sont centrifugées à 200xg pendant 5 minutes, puis elles sont remises en suspension dans le milieu de culture. Les lames de microscope avec 8-puits amovibles de la compagnie *Ibidi* sont très utiles puisqu'elles permettent d'étudier 8 conditions différentes sur une même lame. Par la suite, environ 150 000-200 000 cellules sont déposées dans chacun des puits et le volume des puits est complété avec du DMEM. Enfin, la lame avec les puits est incubée à 37 °C pendant 36 heures. Comme les MDA-MB-231 sont plus grosses, il est préférable d'en mettre légèrement moins que les MDA-MB-453 pour que tous les puits soient à une confluence semblable après l'incubation. Le temps d'incubation permet de réduire l'effet de la trypsine sur les cellules et de s'assurer que les cellules sont bien adhérées à la lame. La lame est prête à être utilisée pour l'incubation des cellules avec les NPs. Les cellules seront fixées après l'étape d'incubation des NPs (section 3.3.2).

3.2.2 Échantillons de cellules FFPE

La préparation des échantillons de cellules FFPE débute de la même façon que pour les échantillons de cellules adhérées, soit par la culture des deux lignées cellulaires. Cette sous-section portera donc sur les étapes de mise en bloc de paraffine et la coupe des blocs au microtome afin de déposer les tranches sur FFPE sur les lames de microscope.

Préparation du culot de cellules

Lorsque les cellules sont confluentes à environ 95 % dans la flasque de 25 cm^2, on procède à un lavage au PBS. Les cellules sont ensuite détachées du fond de la flasque avec la solution de trypsine-EDTA. Une centrifugation à 200xg pendant 5 minutes des cellules en suspension dans le milieu de culture permet de former un culot de cellules au fond d'un tube de 15 ml. Les cellules sont ensuite transférées dans un eppendorf de 1.5 ml et elles sont fixées à l'aide de 1mL de formaline 10 % pendant 10 minutes. Puisque les cellules sont fixées alors qu'elles ne sont pas adhérées, l'information sur leur morphologie est perdue dans ces échantillons. Ce phénomène est causé par l'utilisation de cellules adhérentes pour préparer ce type d'échantillon. En cytologie, les

échantillons de cellules FFPE sont utiles pour l'étude de cellules non-adhérentes, ainsi il n'est pas nécessaire d'utiliser la trypsine et la morphologie des cellules est conservée lorsqu'elles sont en suspension.

Une seconde centrifugation de 10 minutes à 200xg permet de se débarrasser de la formaline dans l'échantillon. Un volume d'*HistoGel* correspondant approximativement au double du volume du culot est réchauffé avant d'être ajouté à l'eppendorf contenant les cellules. Ensuite, le mélange est transféré dans l'un des puits d'une plaque de 96 puits afin que le culot final ait une belle forme cylindrique de 6.4 mm de diamètre. La plaque est laissée à 4°C pendant 30 min jusqu'à ce que l'*HistoGel* soit bien figé. Les morceaux d'*HistoGel* contenant les cellules sont démoulés et placé dans une cassette à l'intérieur d'un pot rempli de formaline 10 %.

Mise en bloc de paraffine

Les cassettes sont envoyées à *l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie* (IRIC) pour la mise en bloc de paraffine. Les deux culots de cellules contenant respectivement les cellules MDA-MB-231 et les MDA-MB-453 ont été montés sur la même cassette (voir figure 3.2). Ce choix permet de réduire le nombre de coupes à faire au microtome (une coupe permet de placer les deux échantillons sur la lame de microscope) et de réduire le nombre de lames utilisées pour les expériences. De plus, il sera plus simple de comparer les résultats obtenus pour chacune des lignées puisque l'incubation avec les NPs et le processus de coloration seront identiques pour les deux lignées cellulaires déposées sur une même lame.

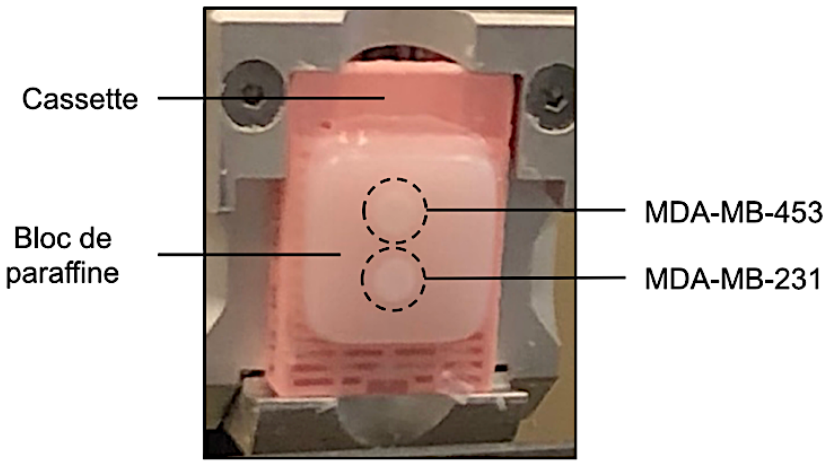


Figure 3.2 Disposition des culots de cellules dans le bloc de paraffine.

Préparation des lames

Le microtome de la *Plateforme de pathologie moléculaire* du CRCHUM est utilisé pour faire des tranches de 4 μm d'épaisseur dans le bloc de paraffine. Le ruban de paraffine est ensuite déposé dans un bain d'eau chaude avant d'être transféré sur des lames de microscope chargées positivement *Superfrost Plus* de *Fisherbrand*. Il s'agit de lames de microscope rectangulaires chargées positivement qui permettent d'augmenter l'attraction électrostatique entre la tranche FFPE et la lame. Cela permet de minimiser les pertes dues au décollement de l'échantillon lors des procédures de lavage, d'immuno-marquage et de coloration réalisées dans les laboratoires de pathologie. Finalement, les lames doivent sécher à la verticale pendant au moins 12 heures avant d'être utilisées pour effectuer des expériences.

3.2.3 Échantillons de tissu FFPE

Pour la préparation des échantillons de tissu FFPE, dans notre cas, un rein de porc avait déjà été acheté, disséqué en plusieurs sections, fixé dans la formaline et enrobé de paraffine pour former plusieurs blocs. Les seules les étapes à réaliser pour la préparation des lames sont la coupe au microtome et le transfert des tranches FFPE sur les lames chargées positivement *Superfrost Plus* de *Fisherbrand* en passant par le bain chaud. Le protocole pour ces étapes est le même que pour les échantillons de cellules FFPE. L'échantillon de tissu utilisé dans ce projet a une forme de losange et couvre une surface d'environ 1.5 cm par 2 cm. Le tissu recouvre donc une plus grande portion de la lame et a une composition plus dense en cellules que le que les culots de cellules.

3.3 Incubation avec les nanoparticules

Cette section porte sur les raisons qui ont motivé le choix des quatre types de NPs qui sont utilisés pour démontrer la possibilité du marquage IP multiplexé multicolore (rouge, vert, bleu et jaune). Ensuite, les différents protocoles d'incubation avec les NPs pour les échantillons de cellules adhérées et pour les échantillons FFPE (cellules isolées et tissu) seront présentés.

3.3.1 Choix des nanoparticules

Une étudiante au doctorat de notre groupe de recherche, Lu Wang, a publié, en 2019 un article qui étudie le design des NPs dans différents milieux (eau, PBS, toluène) [6]. L'objectif de l'article est

d'optimiser trois couleurs de NPs (rouge, vert et bleu) pour que les pics plasmon correspondent au maximum du spectre de chacune des LEDs du dispositif d'illumination latérale (SI). Celles-ci ont respectivement des pics d'émission à 638 nm (rouge), 526 nm (vert) et 468 nm (bleu). Les nanoparticules optimales dans un milieu à base de toluène sont présentées dans le tableau 3.1 sous la colonne *NPs théoriques*. En réalité, les NPs utilisées pour ce projet sont légèrement différentes du cas théorique puisqu'elles ont été sélectionnées en tenant compte des NPs qui sont disponibles commercialement ou dans le laboratoire. De plus, afin d'étudier la possibilité d'ajouter une quatrième couleur de biomarqueur (jaune) qui ne correspond pas directement à une des LEDs du SI, des nanosphères d'or de 100 nm de diamètre ont aussi été testées. Il s'agit d'un type de NPs fréquemment utilisé dans notre laboratoire pour les recherches en immunoplasmonique puisqu'elles ont une très grande section efficace de diffusion, elles sont donc bien visibles lors de l'observation au microscope en plus d'être biocompatibles [52, 62]. Les caractéristiques des NPs testées dans ce projet sont présentées au tableau 3.1 sous la colonne *NPs expérimentales*.

Tableau 3.1 Caractéristiques des nanoparticules optimales et des nanoparticules utilisées expérimentalement lors de la préparation des échantillons.

Couleur	**NPs théoriques** [6]			**NPs expérimentales**		
	Géométrie	**Composition**	**Taille (nm)**	**Géométrie**	**Composition**	**Taille (nm)**
Rouge	Bâton	Or	55 x 75	Bâton	Or *	25 x 71
Vert	Sphère	Alliage or-argent (50-50)	73	Sphère	Alliage or-argent ** (50-50)	74
Bleu	Sphère	Alliage or-argent (10-90)	52	Sphère	Alliage or-argent ** (10-90)	43
Jaune	-	-	-	Sphère	Or *	100

** De la compagnie Nanopartz Inc. ** Fabriquées par Lu Wang, une étudiante au doctorat du laboratoire LP²L, selon la technique présentée dans [71].*

Les variations entre les caractéristiques des NPs théoriques et expérimentales ne sont pas suffisamment importantes pour nuire significativement à leur observation au microscope. Puisque les pics d'émission des LEDs du SI et les pics plasmon des NPs expérimentales ont une largeur non-nulle, il y aura tout de même un chevauchement entre le spectre des LEDs et le spectre des

NPs. Le décalage entre les maximums des spectres aura pour impact de légèrement diminuer la section efficace de diffusion des NPs lorsqu'elles sont excitées par les LEDs puisqu'elles ne seront pas excitées exactement à leur fréquence de résonance. Les NPs expérimentales apparaitront donc potentiellement un peu moins brillantes, mais elles seront toujours bien visibles au microscope avec SI. La figure 3.3 montre les pics plasmon de diffusion simulés avec les logiciels de simulation *NFMie* (logiciel Matlab développé par le laboratoire LP^{2}L [72]) et *DDSCAT* [73] des NPs présentées dans le tableau 3.1. Les lignes verticales en tirets indiquent la position des maximums d'émission des LEDs du SI.

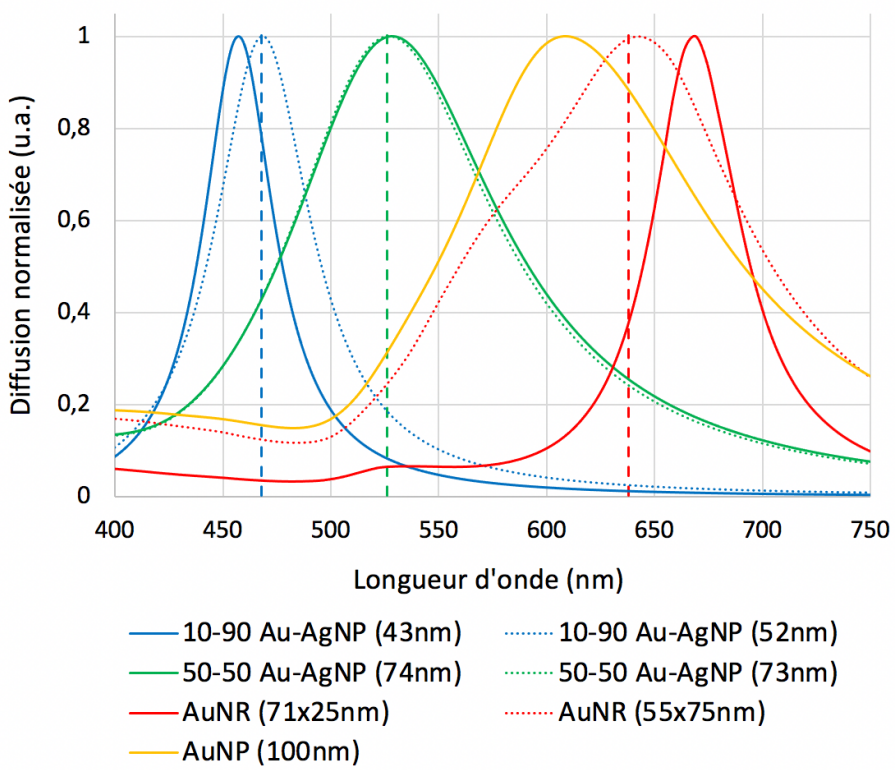


Figure 3.3 Spectres de diffusion simulés des nanoparticules dans le toluène qui sont optimisées dans l'article (lignes pointillées) [6] et utilisées dans ce projet (lignes pleines) en comparaison avec la position du maximum du spectre d'émission des LEDs du SI (lignes verticales en tirets).

3.3.2 Protocoles d'incubation des nanoparticules

Lorsque les échantillons sont prêts à être utilisés pour les expériences, on procède à l'incubation du matériel biologique avec les NPs. Dans ce chapitre, toutes les NPs utilisées sont non-fonctionnalisées, le marquage des cellules est donc non-spécifique (les NPs adhèrent aux cellules

grâce à une interaction électrostatique). Plusieurs raisons motivent ce choix, tout d'abord, il permet de faire une économie importante de temps et de matériel puisque le protocole de fonctionnalisation demande plusieurs réactifs et cause la perte d'une portion des NPs. Ensuite, comme mentionné dans la revue de littérature, l'optimisation du signal de la fonctionnalisation est un projet en soi, le marquage IP non-spécifique permet de maximiser le nombre de NPs qui interagissent avec l'échantillon sans avoir à se soucier du niveau d'expression des protéines ciblées par les NPs dans les lignées cellulaires utilisées. De plus, comme il n'est pas nécessaire qu'une protéine spécifique soit exprimée par les tissus, les expériences peuvent être faites sur un rein de porc plutôt que sur des tissus cancéreux humains.

La méthode d'incubation des nanoparticules diffère pour certains types d'échantillons. Cette sous-section sera donc divisée en deux parties : les échantillons de cellules adhérées et les échantillons FFPE puisque les techniques d'incubation des NPs pour les cellules FFPE et pour les tissus FFPE sont identiques.

Il est important de noter qu'une étape de sonication des NPs est nécessaire avant de les ajouter aux échantillons. La sonication est réalisée en plongeant les tubes de verre contenant les NPs dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes en brassant toutes les minutes. Cette étape permet de détruire les agrégats de NPs qui auraient pu se former lors de l'entreposage, de décoller les NPs adhérées aux parois et d'homogénéiser la solution.

Échantillons de cellules adhérées

On se rappelle que les cellules sont vivantes et adhérées à la lame à l'intérieur des puits remplis de DMEM depuis 36 heures. La première étape est donc de vider les puits et de laver les cellules avec 200 µl de PBS. Ensuite, les puits sont à nouveau remplis avec 200 µl de DMEM auquel on ajoute les NPs. Les différentes solutions de NPs utilisées n'ont pas toutes la même concentration, on doit donc ajuster les volumes de NPs à ajouter pour obtenir des proportions comparables dans les différents échantillons. Les concentrations des solutions de NPs et les volumes qui ont été ajoutés aux puits sont présentés au tableau 3.2.

Tableau 3.2 Concentration et volume des solutions de NPs en fonction de leur couleur en diffusion pour les échantillons de cellules adhérées.

Couleur	Concentration des solutions de NPs (NPs/ml)	Volume de solution de NPs (µl)
Rouge	$1.01x10^{11}$	15
Vert	$7.24x10^{9}$	60
Bleu	$3.69x10^{10}$	40
Jaune	$4.96x10^{9}$	60

La lame est placée dans l'incubateur à 37°C pendant 45 minutes. Les cellules conservent donc une activité cellulaire normale durant tout le temps d'incubation. Le surnageant est retiré et les puits sont lavés deux fois avec du PBS en prenant soin de ne pas détacher les cellules de la lame. Puis, les cellules, dans chacun des huit puits, sont fixées avec la solution de formaline 10 % pendant 10 minutes. Enfin, la grille de puits est retirée de la lame avant de procéder aux étapes de coloration.

Échantillons FFPE

On s'assure que les tranches de paraffine contenant l'échantillon (cellules isolées ou tissu) sont sèches et bien adhérées à la lame de microscope. Les échantillons doivent être déparaffinés et réhydratés avant l'incubation avec les nanoparticules. Pour y arriver, les lames sont placées dans 9 bains successifs de 5 minutes en brassant après chaque minute (substitut de xylène 1, substitut de xylène 2, substitut de xylène 3, éthanol 100 % 1, éthanol 100 % 2, éthanol 100 % 3, eau distillée 1, eau distillée 2, eau distillée 3). L'ajout des solutions de NPs se fait à l'aide d'une micropipette en déposant les NPs directement sur la lame afin de former une bulle qui recouvre l'échantillon. Un volume d'eau milli-Q est ajouté à certaines solutions de NPs afin que le volume total de liquide en contact avec l'échantillon soit le même dans tous les cas. Les volumes des solutions de NPs et d'eau à ajouter sont présentés dans le tableau 3.3. Les NPs sont incubées sur les échantillons pendant 30 minutes à température ambiante (car les échantillons sont fixés depuis la mise en bloc de paraffine). Ensuite, les lames sont plongées pendant 10 secondes dans deux bains d'eau distillée afin de retirer les NPs qui n'ont pas interagi avec l'échantillon.

Tableau 3.3 Concentration et volume des différentes solutions de NPs en fonction de leur couleur pour les échantillons FFPE.

Couleur	Concentration des solutions (NPs/ml)	Volume de solution de NPs (µl)	Volume d'eau milli-Q (µl)
Rouge	$1.01x10^{11}$	15	45
Vert	$7.24x10^{9}$	60	0
Bleu	$3.69x10^{10}$	40	20
Jaune	$4.96x10^{9}$	60	0

3.4 Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

Cette section présentera plus en détail chacun des colorants utilisés, puis le protocole de coloration sera expliqué. On note que le protocole de coloration est très semblable pour les différents types d'échantillons.

3.4.1 Colorants utilisés

Il existe une grande variété de colorants utilisés dans les laboratoires de pathologie. Afin de tester plusieurs colorations, deux sortes d'hématoxyline (Gill et Harris) et deux sortes d'éosine (éosine Y et B) ont été sélectionnées pour la réalisation de ce projet.

Hématoxyline

Il existe plusieurs types d'hématoxyline disponibles commercialement pour la coloration d'échantillons biologiques. Ce qui les différencie principalement est la teinte et l'intensité de la coloration bleu-mauve du noyau [3]. Le premier type d'hématoxyline utilisé dans ce projet est l'hématoxyline de Gill qui existe dans plusieurs formulations (I, II ou III) en fonction de leur intensité. Nous avons opté pour l'hématoxyline de Gill II d'intensité moyenne qui peut être utilisé autant en cytologie qu'en histologie. Il s'agit également du type d'hématoxyline qu'utilise la *Plateforme de pathologie moléculaire* du CRCHUM dans la machine automatisée pour coloration H&E. Le second type d'hématoxyline choisi est l'hématoxyline de Harris. Il s'agit du type d'hématoxyline identifié par Grosset et *al*. pour la coloration H&E optimale lors de la superposition

la coloration H&E à l'IHC [26]. Ces deux types d'hématoxyline vont permettre de tester l'impact de la contre-coloration la coloration H&E sur la visualisation des NPs, en plus de la coloration à l'hématoxyline seulement (comme pour l'IHC).

Éosine

Tout comme pour l'hématoxyline, il existe différents types d'éosine qui diffèrent par la teinte de la coloration. L'éosine Y permet d'obtenir une coloration rosée du cytoplasme et de la membrane extracellulaire tirant vers le jaune alors que la coloration à l'éosine B tire vers le bleu. L'éosine Y est utilisée à la *Plateforme de pathologie moléculaire* du CRCHUM pour la coloration H&E des lames histologiques et est le type d'éosine identifié par Grosset et *al.* pour la contre-coloration H&E des lames d'IHC [26]. L'éosine B est une alternative soluble à l'eau de l'éosine Y (qui est soluble à l'éthanol) qui permet tester la visualisation des NPs dans des conditions légèrement différentes.

3.4.2 Protocoles de coloration

Avant de procéder à la coloration des échantillons, toutes des solutions d'hématoxyline et d'éosine doivent être filtrées.

Hématoxyline

La première étape est la coloration à l'hématoxyline. Les lames sont plongées dans un bain rempli d'hématoxyline. Ensuite, elles sont placées sous l'eau courante pour arrêter le processus de coloration et pour rincer l'hématoxyline en excédent sur la lame afin de ne pas contaminer les bains suivants. Les temps associés à ces étapes sont présentés dans le tableau 3.4 pour chacun des types d'hématoxyline. Les temps sont les mêmes pour les trois types d'échantillons.

Si l'objectif est d'uniquement faire une coloration à l'hématoxyline, les étapes de la coloration à l'éosine sont ignorées et on passe directement aux étapes de fermeture de la lame.

Tableau 3.4 Temps des étapes de coloration à l'hématoxyline selon le type d'hématoxyline utilisée.

Étapes	Gill	Harris
Tremper dans l'hématoxyline	2 minutes	2 minutes
Laisser sous l'eau distillée	1 minute	5 minutes

Éosine

L'étape suivante pour la coloration H&E est la coloration à l'éosine. Les solutions d'éosine sont préparées à l'avance. L'éosine Y est diluée de moitié dans l'éthanol 100 %. L'éosine B est diluée dans l'eau distillée pour obtenir une solution aqueuse concentrée à 0.5 % en éosine B à laquelle on ajoute 0,16 % d'acide acétique. La durée du bain d'éosine varie grandement entre les échantillons de cellules adhérées et les échantillons FFPE (cellules isolées et tissu), c'est pourquoi le tableau 3.5 est divisé en deux sections.

Tableau 3.5 Temps des étapes de coloration à l'éosine selon le type d'échantillon et le type d'éosine utilisée.

Étapes	**Échantillon de cellules adhérées**		**Échantillon FFPE (cellules isolées et tissu)**	
	Éosine Y	**Éosine B**	**Éosine Y**	**Éosine B**
Tremper dans l'éosine	1 minute	3 minutes	3 secondes	2 minutes
Laisser sous l'eau distillée	-	30 secondes	-	30 secondes

Les échantillons dans l'éosine Y ne sont pas placés sous l'eau courante puisque l'éosine Y est diluée dans l'éthanol. Pour les échantillons dans l'éosine B, il est important de remplacer l'eau dans l'échantillon par de l'éthanol avant de procéder aux étapes de fermeture de la lame. Les échantillons sont donc placés dans un bain d'éthanol à 70 % pendant 3 minutes puis dans des bains progressifs d'éthanol (70 %, 95 %, 95 % et 100 %) pendant 1 minute chacun.

Fermeture de la lame

Ensuite, on procède aux étapes de fermeture de la lame avec la lamelle qui sont les mêmes pour tous les types d'échantillons, peu importe la combinaison de coloration H&E utilisée. Ces étapes doivent aussi être faites pour les lames sans coloration (directement après l'incubation avec les NPs) et pour les lames avec seulement une coloration à l'hématoxyline. Les lames sont placées dans deux bains d'éthanol 100 % pour 1 minute, puis elles sont plongées dans deux bains où elles sont entièrement recouvertes de substitut de xylène pour 5 minutes. La coloration à l'éosine est très sensible à l'éthanol, il est donc important de s'assurer qu'il ne reste plus d'éthanol dans

l'échantillon. Le cas échéant, l'éosine va sortir des cellules après la fermeture de la lame et nuire à l'analyse des résultats et la conservation à long terme des échantillons. Finalement, quelques gouttes de colle à base de toluène compatible avec le substitut de xylène (*Sub-X Mounting Medium* de la compagnie *Electron Microscopy Sciences*) sont ajoutées sur la lame avant de déposer la lamelle. Les lames doivent sécher à plat pendant au moins 16h avant d'être observées au microscope.

3.5 Images

Le dispositif d'illumination latérale s'installe directement sur le plateau du microscope. Les lames d'échantillons sont insérées dans le dispositif qui permet l'observation en champ clair de l'échantillon grâce à la source du microscope lorsque les LEDs du SI sont éteintes (le dispositif d'illumination latérale sert uniquement de support). L'observation des échantillons au microscope en champ clair permet la visualisation des cellules pour l'analyse de la morphologie. Puis, il suffit d'éteindre de l'illumination en champ clair du microscope et d'allumer les LEDs du SI pour visualiser les NPs présentes au même endroit dans l'échantillon. Il s'agit de la méthode d'imagerie qui s'intègre le plus facilement dans les pratiques des laboratoires de pathologie contrairement à la rétrodiffusion qui nécessite l'utilisation d'objectif à l'huile et la microscopie en champ sombre traditionnel qui requiert l'installation d'un condenseur lors du passage de champ clair à champ sombre.

Les échantillons ont été observés sur un microscope inversé de la compagnie *Nikon* (*Eclipse Ti*). Un objectif avec une magnification de 60x, une ouverture numérique de 0,7 et une distance de travail variable entre 1,8 mm et 2,6 mm a été utilisé pour tous les échantillons. On note qu'il est possible d'observer les NPs dans l'échantillon avec un objectif avec une plus petite magnification (40x, 20x, 10x et même 4x). Les images en couleur ont été prises avec la caméra SCMOS pco.panda 4.2. Finalement, le traitement des images est fait à l'aide du logiciel *ImageJ*.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS POUR LA SUPERPOSITION DE LA COLORATION À L'HÉMATOXYLINE ET À L'ÉOSINE ET DU MARQUAGE IMMUNOPLASMONIQUE

Passons maintenant à la présentation des résultats obtenus pour chacun des trois types d'échantillons avec différentes combinaisons de coloration H&E superposées aux quatre couleurs de NPs.

4.1 Échantillons de cellules adhérées

La possibilité d'observer, à l'aide du dispositif d'illumination latérale, les NPs sur des cellules adhérées non-colorées a été démontrée dans l'article de Wang et *al.* [6]. La possibilité de distinguer les NPs entre elles a également été démontrée. Toutefois, suite aux discussions avec des pathologistes, il a été déterminé qu'un marquage IP sur cellules non-colorées n'avait pas d'avantages cliniques puisqu'il est essentiel de pouvoir observer le marquage dans l'environnement cellulaire afin d'interpréter correctement les résultats. Nous avons donc voulu vérifier l'effet de la coloration H&E sur ce type d'échantillon. Des échantillons ont été préparés, incubés avec les NPs et colorés selon les méthodes présentées précédemment dans le chapitre. Quatre combinaisons d'hématoxyline et d'éosine ont été testées pour chacune des quatre couleurs de NPs (rouge, vert, bleu et jaune) le tout sur deux lignées cellulaires différentes (MDA-MB-231 et MDA-MB-453). Des images des échantillons ont été prises d'abord au microscope en champ clair puis à l'aide du dispositif d'illumination latérale. La figure 4.1 montre les résultats obtenus pour la combinaison d'hématoxyline de Gill et d'éosine Y. L'observation des cellules en champ clair montre que la coloration H&E est adéquate. En champ sombre avec illumination latérale, les NPs sont visibles et distinguables. Il a été déterminé que le bruit verdâtre (surtout observable dans les cellules MDA-MB-231) est causé par l'éosine Y qui diffuse la lumière dans les longueurs d'onde vertes ce qui cause un signal en arrière-plan lors de l'observation des échantillons avec le SI. L'hypothèse est que d'autres types d'éosine n'ont pas cette caractéristique, mais permettent tout de même d'obtenir une belle coloration H&E. La coloration H&E avec l'éosine B et son apparence en diffusion semblent confirmer cette hypothèse. On remarque que les deux solutions d'éosine ont une couleur corail-rouge en transmission, par contre l'éosine Y diffuse fortement dans les longueurs d'onde jaune-vert alors que l'éosine B diffuse très légèrement dans le bleu.

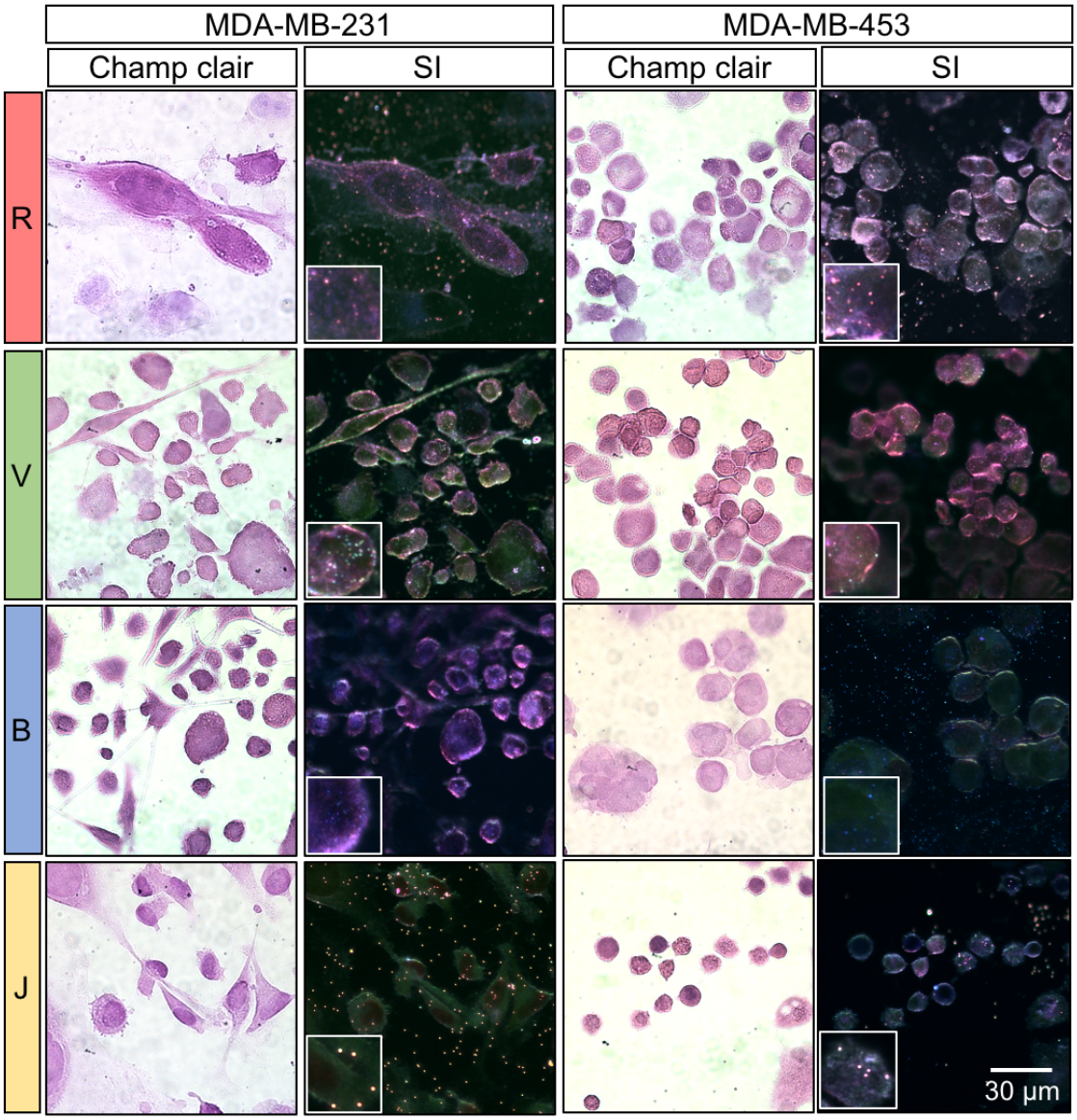


Figure 4.1 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Gill et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

Pour valider cette conclusion dans le contexte de l'immunoplasmonique, des échantillons de cellules adhérées ont été préparés et colorés H&E avec l'hématoxyline de Gill et en remplaçant l'éosine Y par l'éosine B. Des images de ces échantillons sont présentées à la figure 4.2.

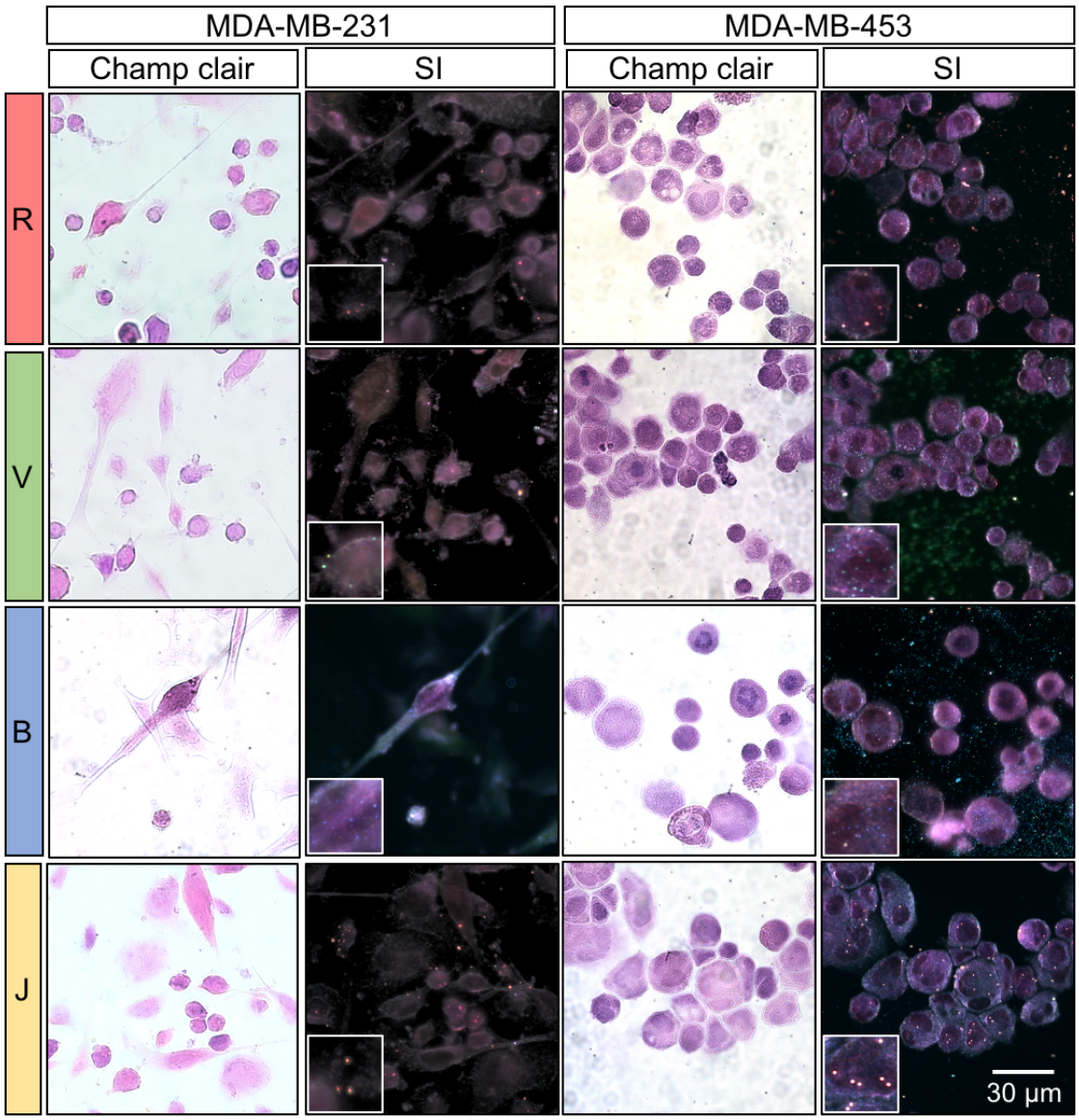


Figure 4.2 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

Encore une fois, on observe que la coloration H&E permet de bien visualiser la morphologie des cellules en champ clair. Les résultats avec illumination latérale montrent qu'il est possible d'observer et de distinguer les couleurs des NPs sur des cellules colorées. De plus, la légère diffusion des colorants permet de voir les cellules et donc de facilement situer les NPs dans le contexte cellulaire afin de ne pas tenir compte des NPs adhérées à la lame de microscope.

Pour ce type d'échantillon, les cellules sont des structures en trois dimensions avec une hauteur non-négligeable. Les images présentées précédemment montrent un seul plan contenant des NPs dans le but de démontrer la possibilité de bien visualiser les différents types de NPs. En réalité, les NPs dans l'échantillon qui se déposent à la surface des cellules peuvent être observés dans différents plans microscopiques. Il est nécessaire de faire un balayage selon la direction z sur une distance d'environ 20 µm pour visualiser toutes les NPs sur une cellule. La figure 4.3 illustre bien ce phénomène observé avec le dispositif d'illumination latérale.

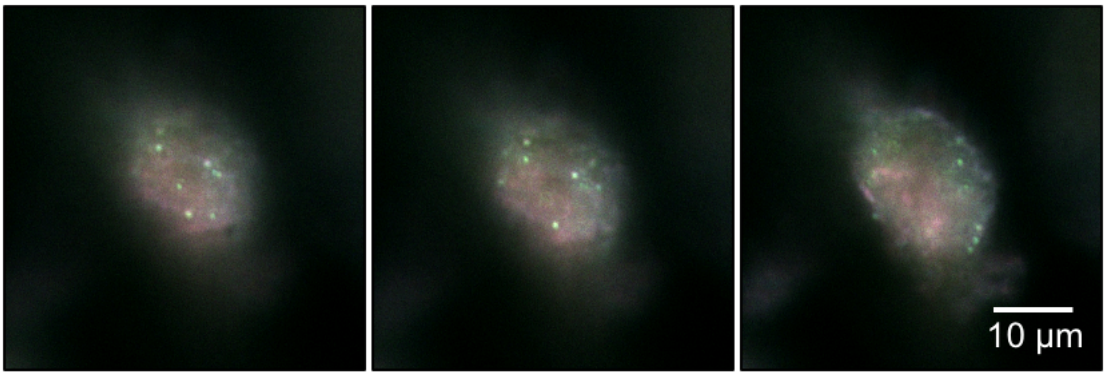


Figure 4.3 Différents plans selon la direction z d'une cellule adhérée (MDA-MB-231) avec coloration H&E incubée avec NPs vertes.

D'autres échantillons de cellules adhérées ont été préparés en combinant cette fois l'hématoxyline de Harris à l'éosine Y, puis à l'éosine B. Afin d'alléger le texte, les résultats obtenus pour ces conditions sont présentés respectivement aux figures A.1 et A.2 de l'annexe. Les résultats obtenus avec l'hématoxyline de Harris sont les mêmes que ceux avec l'hématoxyline de Gill, c'est-à-dire que l'éosine B offre une alternative satisfaisante à l'éosine Y qui cause de la diffusion et nuit à l'observation des NPs.

On conclut que pour les échantillons de cellules adhérées, le type d'hématoxyline utilisé (Gill ou Harris) n'influence pas la qualité des résultats obtenus. Toutefois, l'utilisation de l'éosine Y n'est pas recommandée vu sa diffusion en champ sombre avec illumination latérale. L'éosine B s'avère être une bonne option et permet de bien visualiser et différencier les quatre couleurs de NPs sur les cellules.

Pour confirmer la possibilité de distinguer les NPs sur une même cellule, des échantillons de cellules adhérées avec marquage multiplexé ont été préparé pour les cellules MDA-MB-453. Des

NPs de quatre couleurs différentes (rouge, vert, bleu et jaune) ont été ajoutées en proportion égale aux puits contenant les cellules adhérées. Les échantillons ont été colorés H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B puisque cette coloration a donné de bons résultats pour les échantillons non-multiplexés. Les images obtenues pour cet échantillon sont présentées à la figure 4.4 où une nanoparticule de chaque couleur est mise en évidence dans chacune des images. On peut alors confirmer la possibilité de distinguer une quatrième couleur de NPs qui ne correspond pas directement à l'illumination d'une LED du SI.

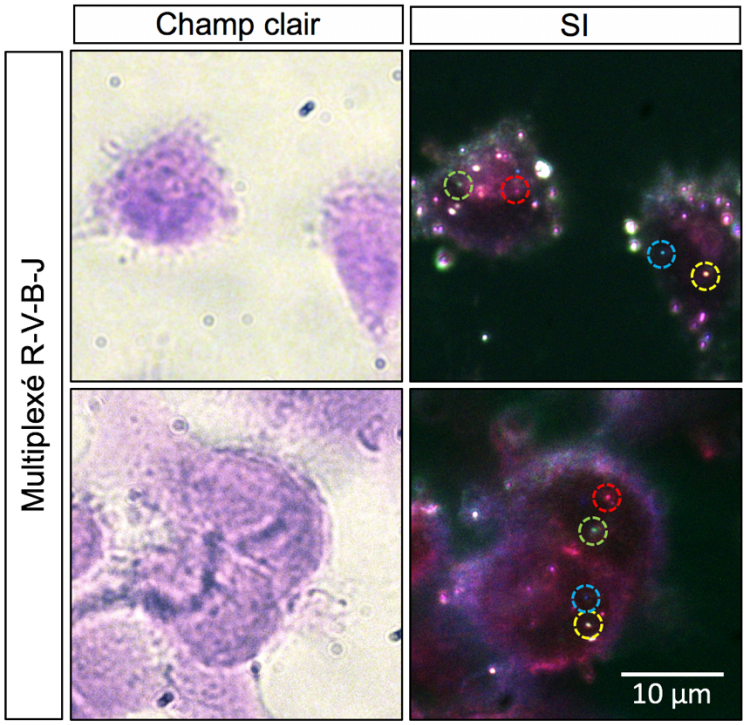


Figure 4.4 Cellules adhérées (MDA-MB-453) colorées avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules multiplexées rouges, vertes, bleues et jaunes (R-V-B-J).

4.2 Échantillons de cellules FFPE

Le marquage immunoplasmonique sur échantillon FFPE n'a jamais été étudié dans notre laboratoire. Une approche plus progressive a donc été choisie pour les échantillons de cellules FFPE. Il a été vérifié qu'il était possible de voir les quatre couleurs de NPs sur des échantillons de cellules FFPE de deux lignées cellulaires différentes (MDA-MB-231 et MDA-MB-453) sans coloration, avec coloration à l'hématoxyline Gill seulement et avec coloration à l'hématoxyline

Harris seulement. Les résultats obtenus sont présentés en annexe aux figures A.3, A.4 et A.5. Ces résultats préliminaires confirment la possibilité de visualiser et de distinguer les NPs sur les tranches de cellules FFPE. Comme mentionné précédemment, l'observation des NPs sur les cellules FFPE sans coloration ne permet pas aux pathologistes d'analyser le marquage dans son contexte cellulaire. De plus, on remarque que les cellules non-colorées diffusent beaucoup la lumière. La coloration à l'hématoxyline seulement (Gill ou Harris) permet de voir les cellules, mais comme dans le cas de l'IHC, cette coloration ne permet pas d'obtenir toute l'information sur la morphologie des cellules. Des échantillons de cellules FFPE avec coloration H&E ont alors été préparés.

Tout d'abord, comme pour les cellules adhérées, la combinaison d'hématoxyline de Gill et d'éosine Y a été testée en premier. Les images obtenues sont regroupées à la figure 4.5.

Les images en champ clair confirment la qualité de la coloration H&E des tranches de cellules. De plus, on remarque que pour ce type d'échantillon, contrairement aux cellules adhérées, la diffusion verte causée par l'éosine Y ne semble pas nuire à l'observation des NPs. Cela s'explique par le fait que la proportion des cellules colorées avec l'éosine est beaucoup plus faible puisque les cellules sont fixées dans leur forme en suspension. Les cellules adhérentes mises en suspension perdent leur morphologie puisque le cytoplasme se replie autour du noyau ce qui donne un aspect sphérique à la cellule.

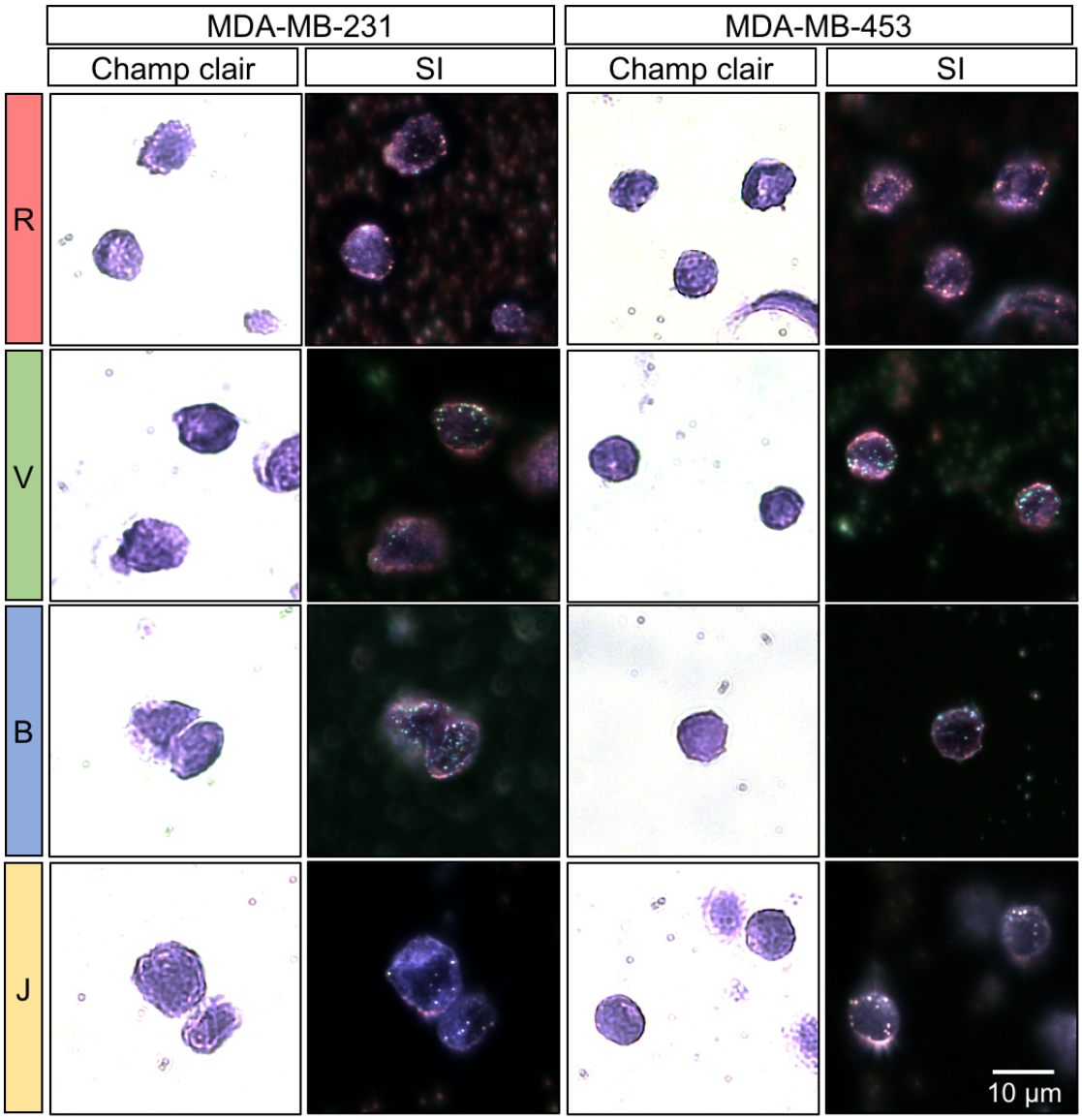


Figure 4.5 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Gill et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

La coloration H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B a ensuite été testée. Les images sont présentées à la figure 4.6. Les résultats obtenus pour cette combinaison de colorants sont semblables à ceux pour la coloration avec l'éosine Y à la figure 4.5. Les NPs sont facilement observables, leurs couleurs sont distinguables entre elles et la coloration permet l'observation des cellules en champ clair.

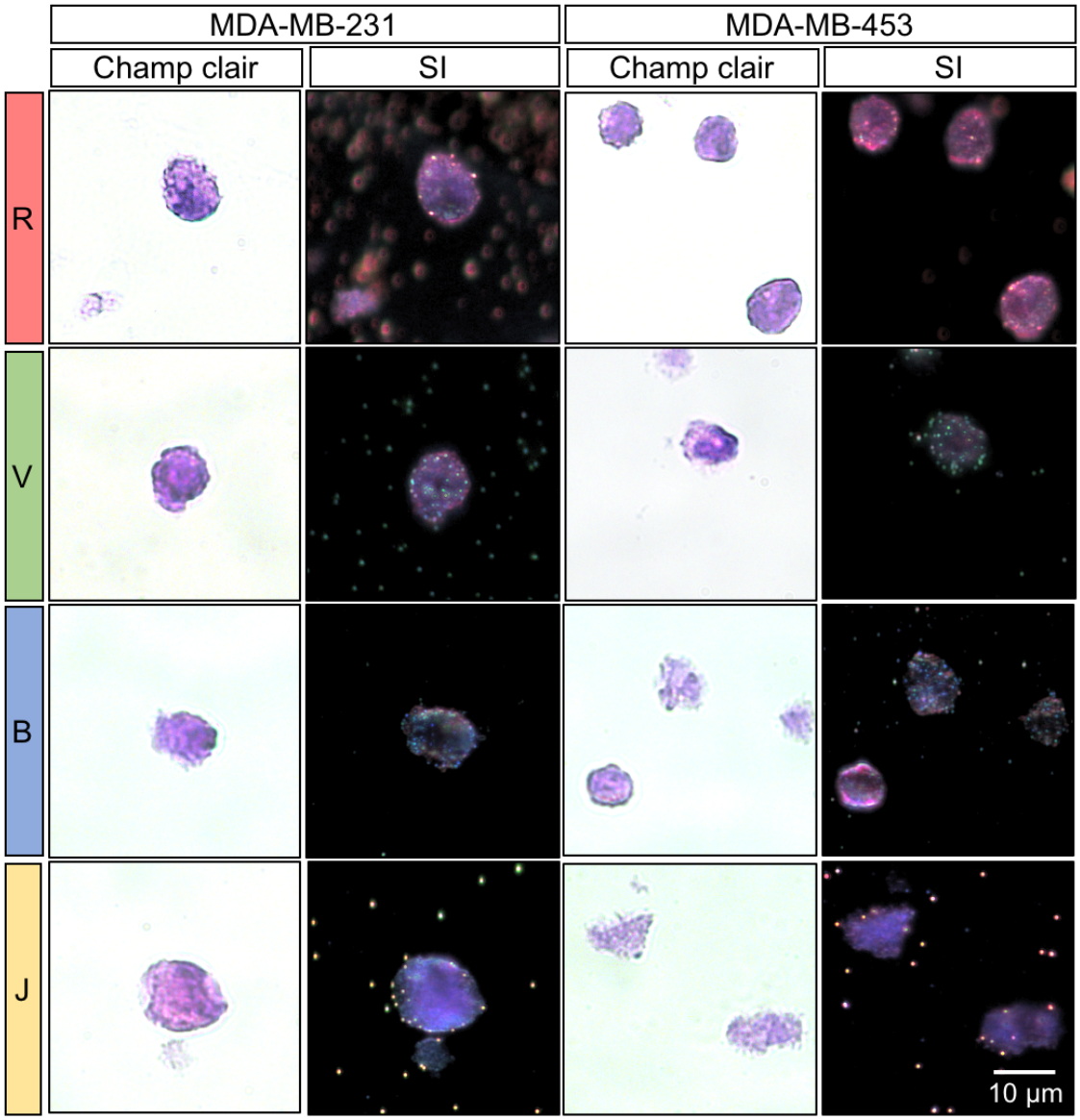


Figure 4.6 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

Enfin, des échantillons de cellules FFPE avec les combinaisons de coloration H&E avec hématoxyline de Harris et éosine Y ou B ont été préparés. Les résultats ont été mis en annexe aux figures A.6 et A.7 respectivement. Ils permettent de conclure que, comme pour les cellules adhérées, le type d'hématoxyline (Gill ou Harris) utilisé pour la coloration H&E n'a pas d'influence sur la qualité de la visualisation des NPs et la différenciation de leur couleur. De plus, pour les

tranches de cellules FFPE, le type d'éosine (Y ou B) n'a pas d'influence sur l'observation des NPs avec le dispositif d'illumination latérale ce qui n'était pas le cas pour les échantillons de cellules adhérées. Aussi, la diffusion provenant des colorants lors de l'observation des échantillons en SI permet de bien visualiser les cellules dans l'échantillon et de facilement distinguer les NPs sur les cellules des NPs adhérées à la lame de microscope.

Des échantillons de cellules FFPE avec marquage multiplexé ont été préparés pour, encore une fois, confirmer l'observation des différentes couleurs de NPs dans un même échantillon. Pour cette démonstration, un mélange en proportion égale de quatre types de NPs différentes (rouge, vert, bleu et jaune) a été incubé sur les tranches FFPE de cellules MDA-MB-453. L'échantillon a été coloré H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B. Les images obtenues sont présentées à la figure 4.7 sur lesquelles une nanoparticule de chaque couleur par image a été encerclée. On voit bien les capacités de multiplexage du marquage immunoplasmonique sur échantillon de cellules FFPE avec coloration H&E.

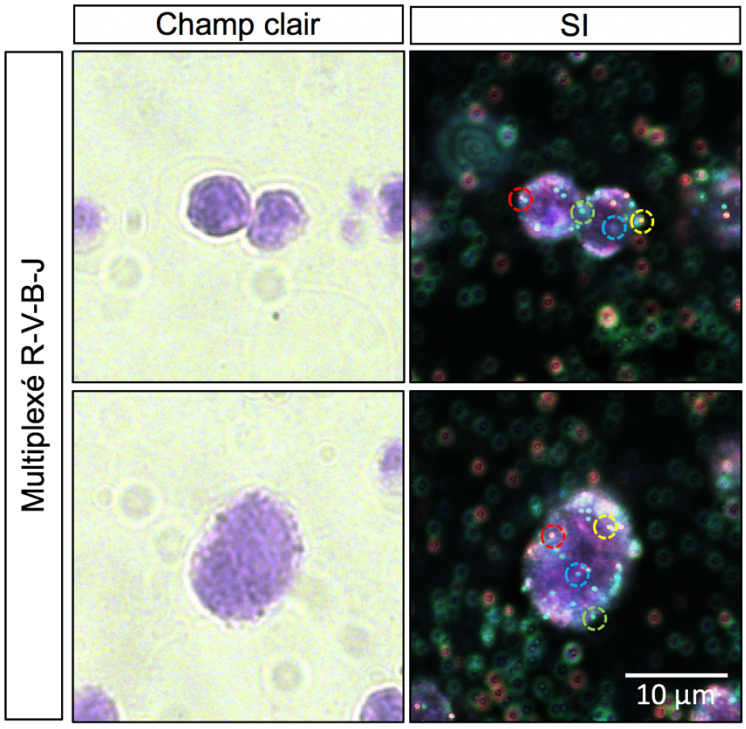


Figure 4.7 Tranches de cellules FFPE (MDA-MB-453) colorées avec hématoxyline de Gill et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules multiplexées rouges, vertes, bleues et jaunes (R-V-B-J).

Pour tous les échantillons de cellules FFPE, la technique d'observation avec le SI permet de distinguer une quantité importante de NPs qui sont adhérées à la lame de microscope malgré tous les lavages dus à l'incubation avec les NPs et au processus de coloration. Ce phénomène n'est pas observé dans les échantillons de cellules adhérées (sur lame de microscope neutre). Il est probablement causé par l'utilisation de lames microscopiques chargées positivement lors de la préparation d'échantillons FFPE. Les NPs étant généralement chargées négativement subissent donc une attraction électrostatique vers la lame ce qui rend les lavages inefficaces. Les résultats obtenus par Audrey Nsamela lors de sa maitrise [52, 66] suggèrent que la fonctionnalisation neutralise la charge des NPs et donc devrait réduire l'attachement non-spécifique des NPs sur la lame chargée positivement. Ce phénomène devrait donc être grandement diminué lors d'un marquage IP spécifique avec NPs fonctionnalisées. Cette hypothèse sera vérifiée au chapitre 5.

4.3 Échantillons de tissu FFPE

Pour le troisième et dernier type d'échantillon, les tissus FFPE, une approche similaire à celle pour les cellules FFPE a été choisie. Comme il s'agissait des premiers contacts dans notre laboratoire avec les tranches de tissu FFPE, nous avons débuté par nous assurer qu'il était possible de voir les NPs sur des échantillons de tissu sans coloration. En effet, on sait qu'en général un échantillon de tissu génère beaucoup de diffusion. Il est donc probable qu'il soit impossible de détecter la diffusion des NPs à cause du signal d'arrière-plan généré par le tissu. Ainsi, des échantillons de tissu FFPE de rein de porc ont été préparés sans coloration, et avec coloration à l'hématoxyline seulement (Gill ou Harris) pour l'observation de NPs de quatre couleurs (rouge, vert, bleu et jaune). Ces résultats initiaux sont présentés en annexe aux figures A.8 et A.9 et démontrent que les NPs sont visibles et différentiables sur les tranches de tissu FFPE sans coloration et avec coloration à l'hématoxyline. On observe bien le phénomène de diffusion des tissus pour l'échantillon sans coloration (figure A.8) où les tissus apparaissent blanc clair. L'ajout de la coloration à l'hématoxyline (figure A.9) semble aider à atténuer le bruit causé par la diffusion du tissu sans bloquer le signal des NPs (le même phénomène avait été observé pour les tranches de cellules FFPE). Par contre, la coloration à l'hématoxyline seule qui est la contre-coloration actuellement utilisée en IHC n'est pas optimale pour l'interprétation des résultats d'immunomarquage.

L'étape suivante est la préparation d'échantillons avec colorations H&E avec les mêmes quatre combinaisons de coloration H&E que pour les autres types d'échantillons. Les résultats obtenus

avec la coloration H&E avec hématoxyline de Gill et éosine Y et la coloration H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B sont regroupés dans la figure 4.8. Les résultats pour la coloration H&E avec hématoxyline de Harris et l'éosine Y puis avec hématoxyline de Harris et éosine B sont disponibles en annexe à la figure A.10.

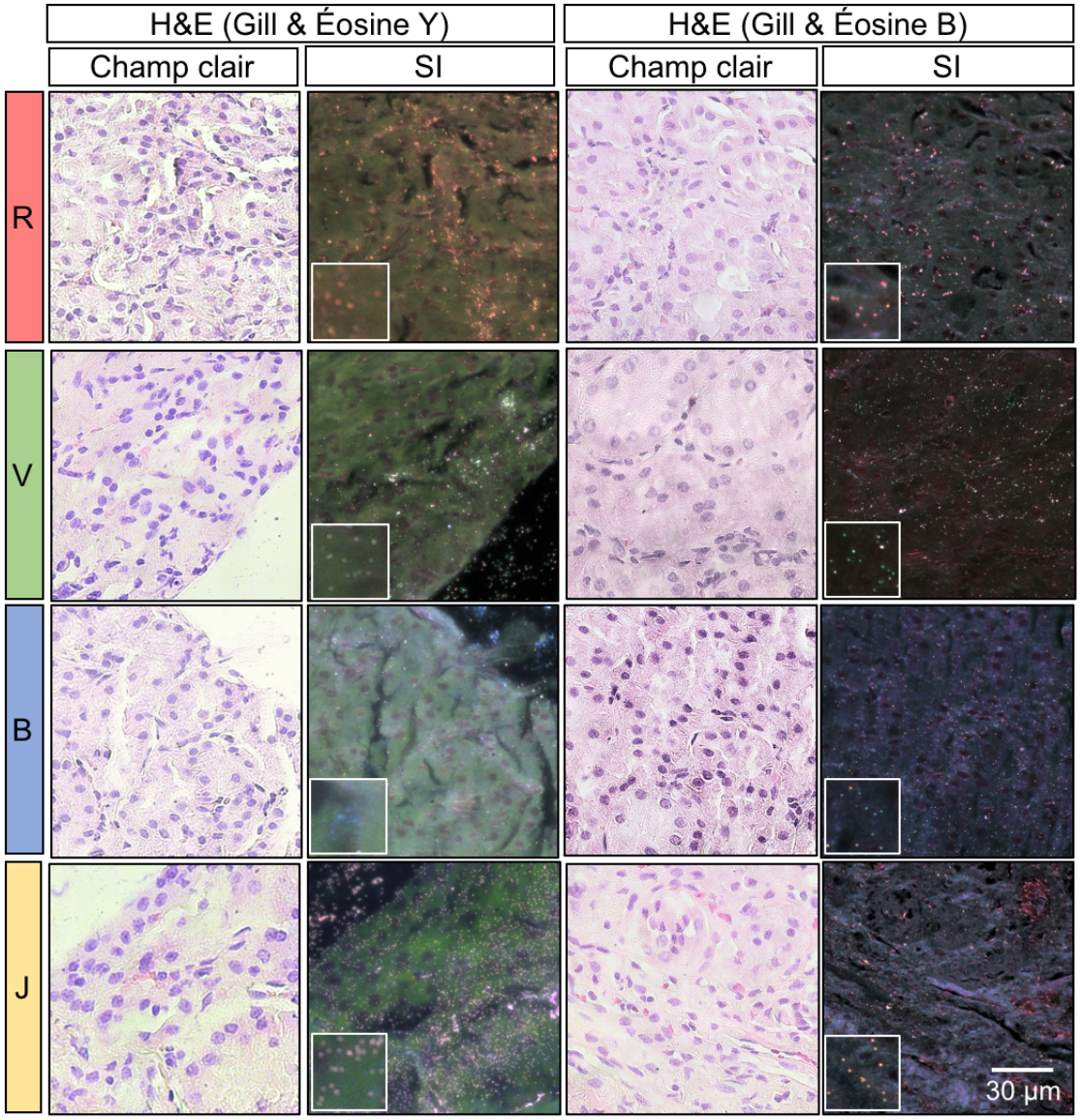


Figure 4.8 Tissu FFPE coloré avec hématoxyline de Gill et éosine Y ou hématoxyline de Gill et éosine B et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

On en déduit que pour les tissus FFPE, il est possible de voir et de distinguer les quatre couleurs de NPs sur les échantillons avec coloration H&E. Par contre, on observe que l'éosine Y cause beaucoup de diffusion lorsqu'on observe les échantillons avec le SI et que l'utilisation d'éosine B permet d'obtenir de meilleurs résultats. Les images en champ clair permettent de confirmer la qualité de la coloration H&E lors de l'observation des échantillons par le pathologiste.

4.4 Spectres des nanoparticules sur échantillons colorés H&E

Afin de confirmer que la coloration des échantillons n'empêche pas de distinguer la couleur des NPs lors de l'observation avec le SI, les spectres de diffusion des NPs dans l'échantillon ont été calculés. Cécile Darviot, étudiante au doctorat, a mesuré les spectres des échantillons en rétrodiffusion avec un objectif à immersion dans l'huile (magnification de 60x et ouverture numérique de 1.25) à l'aide de la caméra hyperspectrale *SpectraTurtle* de la compagnie *VEGAPhoton*.

L'observation des échantillons avec NPs bleues a révélé un problème de stabilité important des NPs dans le milieu Sub-X à base de toluène. Lors de l'observation des échantillons au microscope pour la prise des spectres, il a été remarqué que les NPs avaient changé de couleur passant du bleu au vert et même à l'orange. Ce phénomène est causé par la photo-oxydation des NPs, vu la proportion importante d'argent (90%) dans l'alliage, qui provoque un décalage vers le rouge du spectre de diffusion [74]. Il est intéressant d'étudier le décalage du spectre de diffusion des NPs bleues et de l'impact du milieu de montage sur leur stabilité. Les NPs bleues (nanoparticules d'alliage or-argent 10-90 de 43 nm) ont été séchées sur une lame de microscope avant de procéder à des bains progressifs d'éthanol (95% et 100%) pendant 1 minute et deux bains de substitut de xylène de 1 minute chacun. Ensuite, quelques gouttes du milieu *Sub-X Mounting Medium* de la compagnie *Electron Microscopy Sciences* ou du milieu *Permount Mounting Medium* de la compagnie *Fisher Chemical* (deux milieux à base de toluène) ont été déposées sur les lames avant de les couvrir avec une lamelle. Les premiers spectres sont obtenus en suivant la technique présentée au paragraphe précédent, puis les lames sont exposées à une source de lumière halogène fortement focalisée par l'objectif pendant 1 heure. Une seconde série de spectres est ensuite prise au même endroit. Il est ainsi possible de comparer les spectres avant et après l'exposition à la lumière et de calculer le décalage moyen causé par la photo-oxydation des NPs. La figure 4.9 montre le décalage observé dans les deux milieux testés.

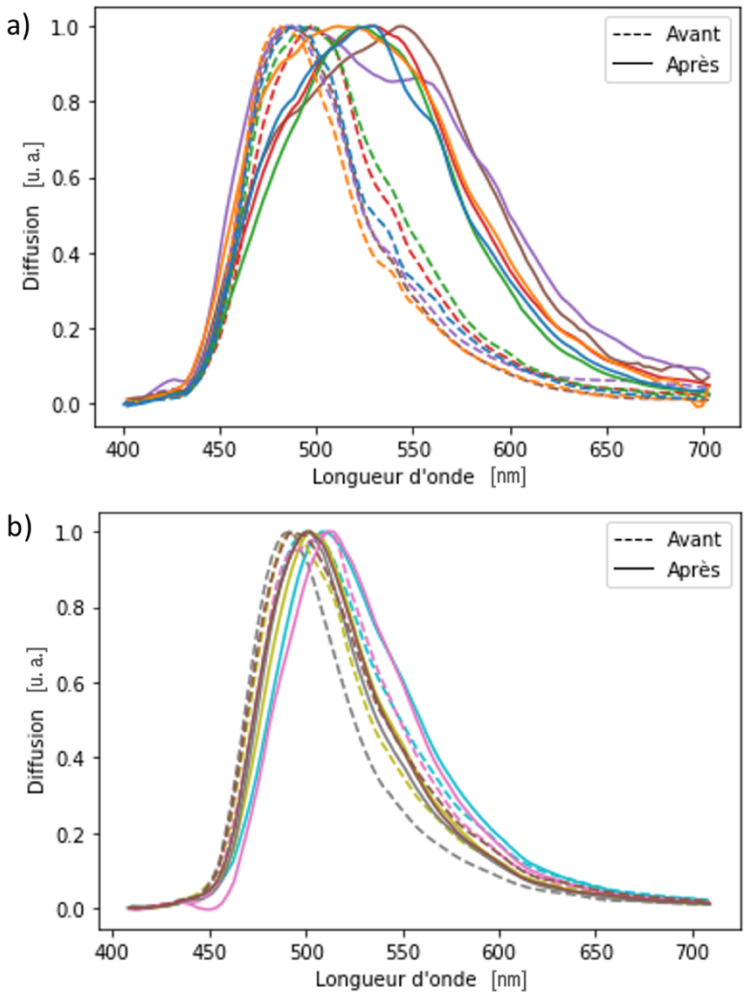


Figure 4.9 Spectres de diffusion des NPs bleues dans (a) le milieu *Sub-X* ou (b) le milieu *Permount*, avant (ligne pointillée) et après (ligne pleine) une exposition de 1 heure à la lumière des LEDs du dispositif d'illumination latérale.

On observe que le décalage moyen est moins important pour les NPs immergées dans le milieu *Permount* (7 nm) que dans le milieu *Sub-X* (34 nm). Cela suggère que l'utilisation d'un autre milieu de montage comme le milieu *Permount* pourrait permettre de réduire le problème de stabilité des NPs bleues dans les échantillons. Ce milieu à base de toluène est compatible avec le substitut de xylène, son utilisation n'implique donc pas de modification au protocole utilisé pour le milieu *Sub-X*. De plus, il ne nuit pas à l'observation des échantillons biologiques colorés en champ clair (n'altère pas la couleur des colorants). Ce résultat montre qu'il est nécessaire de porter une attention particulière lors du choix du milieu de montage. On note qu'une exposition des lames à la lumière

ambiante pendant quelques jours ne devrait pas causer ce type de décalage. Les conditions de cette expérience ont été choisies de manière à être plus extrêmes afin de bien démontrer le phénomène.

Suite à cette conclusion, il a été déterminé que les spectres des NPs bleues sur échantillons colorés (dans le milieu *Sub-X*) ne seraient pas représentatifs des images montrées dans à la section 3.6, ils ne seront donc pas présentés dans la prochaine figure. Ainsi, la figure 4.10 montre les spectres expérimentaux moyens des quatre couleurs de NPs sur lame de microscope (sans échantillons biologiques) et ceux des NPs vertes, jaunes et rouges tel qu'observées sur les échantillons colorés H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B, de cellules adhérées, de cellules FFPE et de tissu FFPE. Le spectre moyen de 40 à 120 NPs (dépendamment des échantillons) est calculé pour chaque couleur de NPs dans chacun des types d'échantillons. Les agrégats et les spectres qui ne correspondent pas à des NPs sont éliminés lors du traitement des données.

Au premier abord, on remarque que les spectres expérimentaux sont plus larges que les spectres théoriques présentés à la figure 3.3, ce phénomène est causé par la variation de la taille des NPs dans la solution de NPs. Malgré l'élargissement des spectres, on constate tout de même que les différents spectres, dans chaque type d'échantillon, sont bien distincts. De plus, la position des maximums des spectres varie peu d'un échantillon coloré à l'autre, ce qui confirme que les résultats ne sont pas affectés par le type d'échantillon. La position moyenne du maximum des NPs vertes, jaunes et rouges sont respectivement 556,7±0,6 nm, 595,0±6,2 nm et 647,7±4,0 nm. On observe toutefois un léger décalage vers le rouge des tous les spectres sur échantillons colorés par rapport aux spectres sur la lame de microscope. Ce décalage (entre 3 et 20 nm) peut être causé par la coloration H&E des échantillons. Cependant, le décalage n'empêche pas la différenciation spectrale des types de NPs et n'est pas suffisamment importante pour modifier la couleur perçue des NPs lors de l'observation au microscope (i.e. les NPs bleues apparaissent bleues).

On en déduit que la coloration H&E à l'hématoxyline de Gill et à l'éosine B des échantillons ne nuit pas à la différenciation spectrale des NPs dans l'échantillon ce qui confirme la conclusion obtenue lors de l'observation des échantillons au microscope. Ce résultat est encourageant pour le développement d'un système automatisé de détection et de classification des NPs sur échantillon coloré H&E basé sur l'intelligence artificielle.

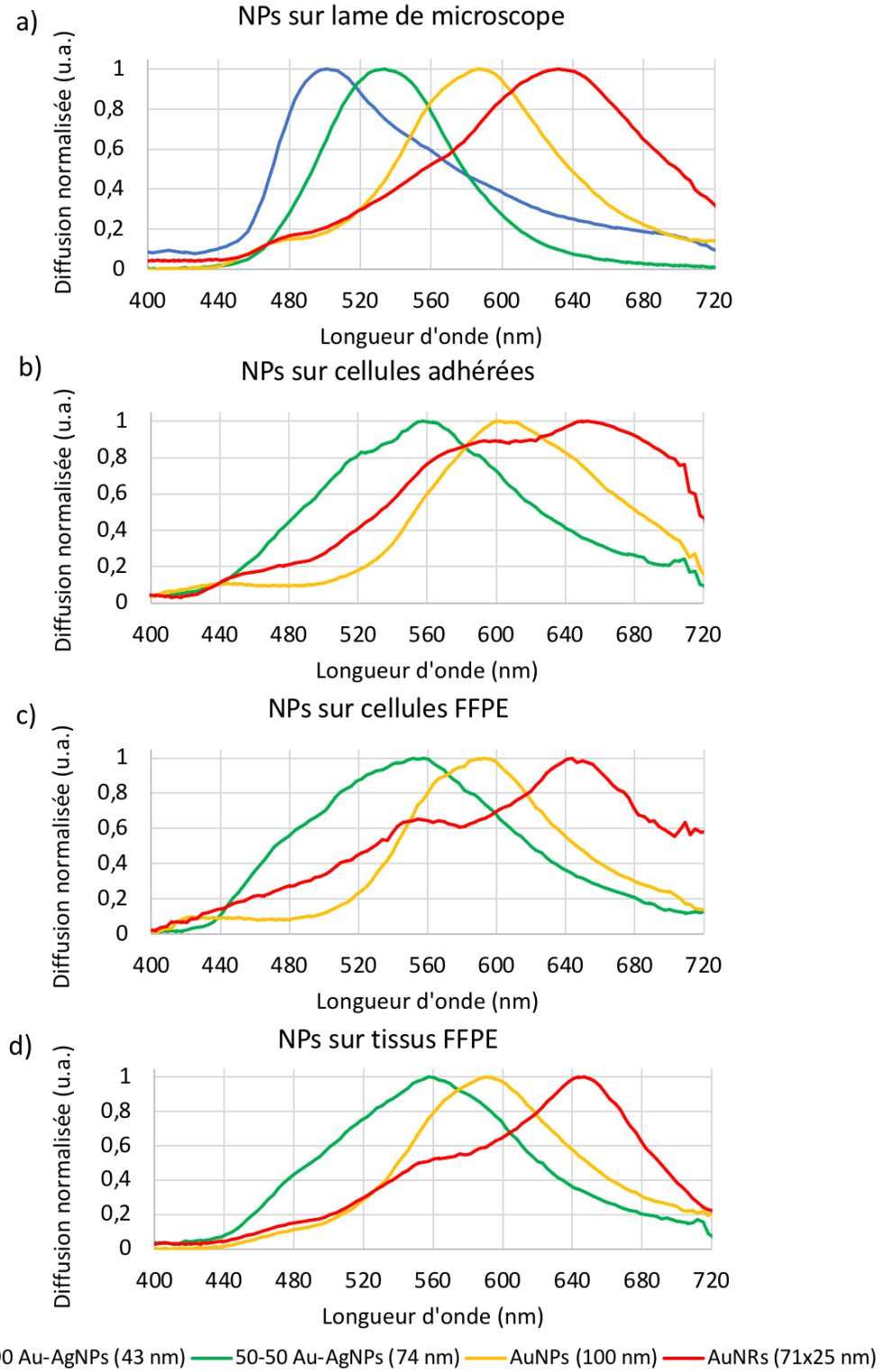


Figure 4.10 Spectres de diffusion des nanoparticules sur (a) lame de microscope (sans échantillons biologiques), (b) cellules adhérées, (c) cellules FFPE et (d) tissu FFPE colorés H&E avec hématoxyline de Gill et éosine B.

4.5 Tableau récapitulatif

Le tableau suivant regroupe les résultats obtenus pour chacune des colorations sur les trois types d'échantillons. La qualité des résultats est analysée en fonction de trois critères : la visualisation de NPs, la différenciation entre les couleurs des NPs et la visualisation des cellules en champ clair pour les pathologistes. La dernière colonne met en évidence le(s) type(s) de coloration qui permet(tent) d'obtenir les meilleurs résultats lors de l'application de l'IP sur échantillons colorés.

Tableau 4.1 Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour chacune des conditions testées pour les trois types d'échantillons et identification des meilleures combinaisons de colorants pour l'application de la technique d'immunoplasmonique. Vert : bon, Jaune : moyen, Rouge : mauvais.

Conditions		Visualisation des NPs	Différenciation entre les couleurs des NPs	Visualisation des cellules en champ clair	Meilleure(s) option(s)
Cellules adhérées	Sans coloration [6]	🟩	🟩	🟥	
	H&E (Gill & Éosine Y)	🟩	🟨	🟩	
	H&E (Gill & Éosine B)	🟩	🟩	🟩	X
	H&E (Harris & Éosine Y)	🟩	🟨	🟩	
	H&E (Harris & Éosine B)	🟩	🟩	🟩	X
Cellules FFPE	Sans coloration	🟩	🟩	🟥	
	Hématoxyline (Gill)	🟩	🟩	🟨	
	Hématoxyline (Harris)	🟩	🟩	🟨	
	H&E (Gill & Éosine Y)	🟩	🟩	🟩	X
	H&E (Gill & Éosine B)	🟩	🟩	🟩	X
	H&E (Harris & Éosine Y)	🟩	🟩	🟩	X
	H&E (Harris & Éosine B)	🟩	🟩	🟩	X

Tableau 4.1 (suite) Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour chacune des conditions testées pour les trois types d'échantillons et identification des meilleures combinaisons de colorants pour l'application de la technique d'immunoplasmonique. Vert : bon, Jaune : moyen, Rouge : mauvais.

Conditions		Visualisation des NPs	Différenciation entre les couleurs des NPs	Visualisation des cellules en champ clair	Meilleure(s) option(s)
Tissu FFPE	Sans coloration	🟩	🟩	🟥	
	Hématoxyline (Gill)	🟩	🟩	🟨	
	Hématoxyline (Harris)	🟩	🟩	🟨	
	H&E (Gill & Éosine Y)	🟨	🟨	🟩	
	H&E (Gill & Éosine B)	🟩	🟩	🟩	X
	H&E (Harris & Éosine Y)	🟨	🟨	🟩	
	H&E (Harris & Éosine B)	🟩	🟩	🟩	X

En conclusion, les résultats obtenus nous permettent de conclure que le type d'hématoxyline utilisée n'a pas d'influence sur l'observation des NPs avec le SI. De plus, la coloration H&E avec éosine B donne toujours de bons résultats avec le SI peu importe le type d'échantillons, contrairement à l'éosine Y qui est uniquement adéquate pour les échantillons de cellules FFPE. Le marquage IP sur échantillons colorés H&E avec hématoxyline de Gill (ou Harris) et éosine B sera donc la coloration idéale pour l'application de cette technique dans les laboratoires de pathologie puisqu'elle fournit aux pathologistes toute l'information nécessaire à l'analyse de l'échantillon en champ clair et permet l'observation du marquage IP multiplexé avec le SI.

CHAPITRE 5 EFFET DE LA FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES SUR L'ADHÉSION NON-SPÉCIFIQUE

Tous les échantillons présentés chapitre 4 contenaient des NPs non-fonctionnalisées, l'interaction entre les échantillons biologiques (cellules et tissus) et les NPs est donc non-spécifique. Un des avantages principaux de l'utilisation des NPs comme outils diagnostic en pathologie est la possibilité de lier des anticorps à leur surface pour l'obtention d'un marquage spécifique (ciblage d'une protéine précise exprimée par les cellules cancéreuses). L'optimisation de la fonctionnalisation n'est pas le but de ce projet, mais il faut savoir que la fonctionnalisation peut avoir un impact sur les résultats obtenus au chapitre précédent principalement sur l'attraction non-spécifique des NPs à la lame de microscope chargée positivement. Dans ce chapitre, les courbes de calibration des différentes solutions de nanoparticules seront présentées suivies du protocole de fonctionnalisation EDC-NHS. Ensuite, la méthodologie expérimentale sera détaillée et les résultats obtenus seront présentés pour la comparaison de l'adhésion de NPs fonctionnalisées ou non à la lame chargée positivement.

5.1 Courbes de calibration

Le protocole de fonctionnalisation des NPs entraine la diminution de la concentration des solutions de NPs (centrifugation et adhésion des NPs aux parois de l'eppendorf). Il est donc nécessaire de déterminer la concentration finale des solutions de NPs fonctionnalisées. La relation linéaire entre la concentration des solutions de NPs et le maximum du spectre d'absorbance permet d'obtenir une courbe de calibration qui sera un outil important pour assurer la reproductibilité des résultats lors du travail avec les NPs fonctionnalisées.

Pour chacun des quatre types de NPs utilisées au chapitre 4, on obtient une courbe de calibration en traçant le maximum du spectre d'absorbance en fonction de la concentration des solutions des NPs. On procède à une dilution en série de chacune des solutions de NPs non-fonctionnalisées dont les concentrations initiales (C) sont connues (voir tableau 3.2). Pour y arriver, 1 ml de solution est placé dans un eppendorf de 1,5 ml. Ensuite, 500 µl de la solution est pipetée vers un second eppendorf dans lequel on ajoute également 500 µl d'eau milli-Q. On obtient une nouvelle solution avec une concentration C/2. On procède ainsi avec des dilutions 1:2 pour obtenir les solutions de concentration C/4, C/8, C/16, C/32 et C/64. Chaque solution de NPs est bien homogénéisée à l'aide

d'un vortex, puis 200 µl de chacune des sept solutions sont pipetées et placées dans une plaque de 96 puits. Les spectres d'absorbance sont obtenus pour les longueurs d'onde allant de 300 à 800 nm avec un pas de 1 nm à l'aide du spectrophotomètre *Epoch* de la compagnie *Biotek*. Le spectre de l'eau milli-Q est soustrait aux spectres des solutions de NPs lors du traitement de données. Les courbes de calibration obtenues pour les quatre solutions de NPs sont présentées à la figure 5.1.

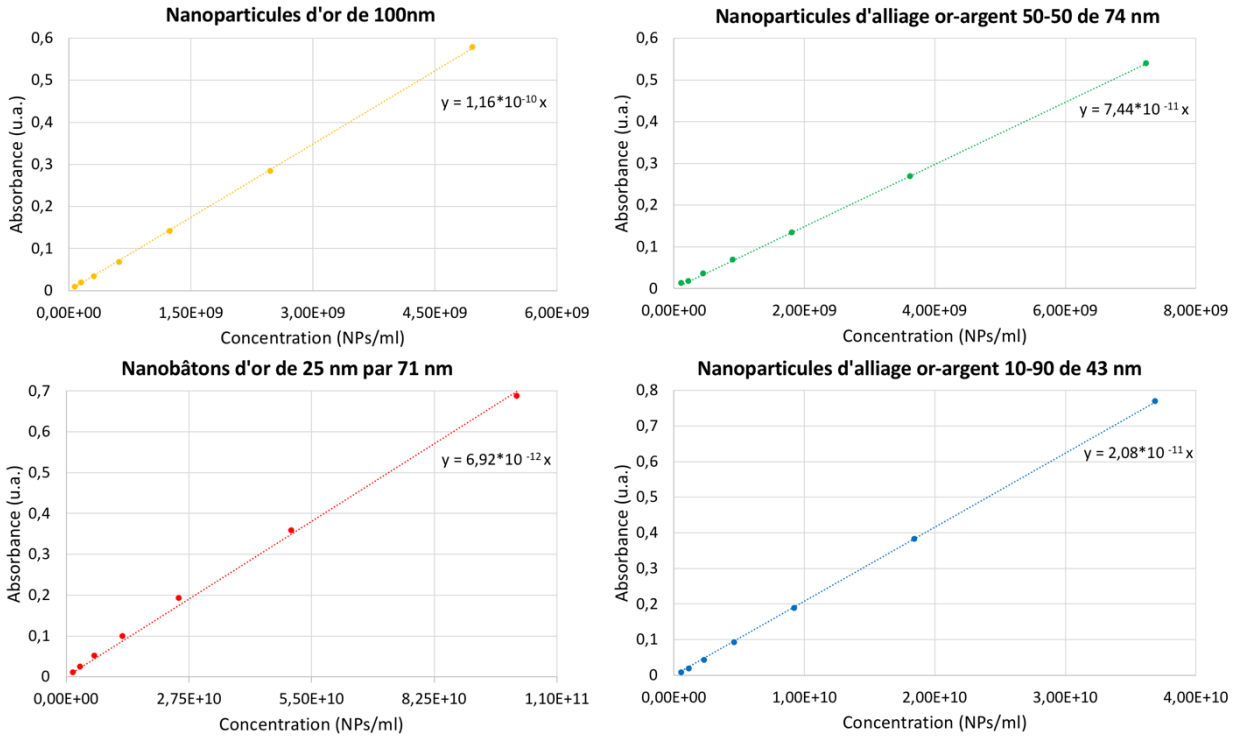


Figure 5.1 Courbes de calibration obtenues pour les nanoparticules rouges (nanobâtons d'or de 25x71 nm), vertes (nanoparticules d'alliage or-argent 50-50 de 74 nm), bleues (nanoparticules d'alliage or-argent 10-90 de 43 nm) et jaunes (nanoparticules d'or de 100 nm).

Il sera considéré que les courbes de calibration des NPs sans fonctionnalisation fournissent une bonne indication des concentrations des solutions de NPs avec PEG et fonctionnalisées lors des expériences.

5.2 Fonctionnalisation des nanoparticules

La fonctionnalisation des NPs permet de cibler une protéine spécifique grâce à l'attachement d'un anticorps à la surface des NPs. Tel que mentionné à la section 2.4, le protocole de fonctionnalisation EDC-NHS a été choisi pour ce projet. La première étape à réaliser est de recouvrir les NPs de

COOH-PEG-Thiol. Pour y arriver, 2 mg de ce composé est dilué dans 50 µl de DMSO, le tout est incorporé à 1 ml de NPs. La solution est incubée à température ambiante pour une nuit sur un plateau tournant dans un eppendorf à faible rétention de 1,5 ml. Le lendemain matin, les tubes sont centrifugés à 5000g pour 5 minutes afin de retirer le surnageant. L'étape suivante est de diluer 3 mg de EDC et 3 mg de NHS dans 1 ml de PBS. Le culot de NPs recouvertes de PEG-COOH est remis en suspension dans la solution contenant le EDC-NHS. Pour le contrôle négatif (NPs recouvertes de PEG seulement), le culot de NPs est remis en suspension dans 1 ml de PBS et placé au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation. Les autres tubes de NPs sont incubés sur le plateau tournant à température ambiante pendant 1 heure. Enfin, 5 µl d'anticorps (anti-HER2) sont ajoutés à la solution de NPs et incubés en rotation pour 2 heures de plus. Les NPs sont centrifugées à 7000g pour 10 minutes et le surnageant est remplacé par 1 ml de PBS.

On remarque que les NPs ont une forte affinité avec les parois des tubes eppendorf malgré l'utilisation de tubes à faible rétention. Il est donc primordial de mettre les tubes contenant les solutions de NPs dans un bain à ultra-son après chaque changement de solvant pour décoller un maximum de NPs adhérées à la paroi du tube. Cela permet de minimiser les pertes de NPs lors du protocole de fonctionnalisation.

5.3 Adhésion de nanoparticules sur lames de microscope chargées positivement

Toutes les expériences précédentes sur l'IP, réalisées dans le laboratoire LP^{2}L, utilisaient des lames de microscope standards sans charge. La charge négative des NPs n'était donc pas un facteur décisif puisque très peu d'adhésion non-spécifique à la lame était observée dans les échantillons. Toutefois, dès l'observation des premiers échantillons de cellules FFPE ou de tissus FFPE, l'attraction électrostatique entre la lame chargée positivement et les NPs (charge négative) a tout de suite été remarquée. En effet, une quantité importante de NPs restent adhérées au substrat malgré les multiples lavages et bains de coloration et de montage des lames. Il s'agit d'une problématique importante à étudier le plus rapidement possible puisque l'attachement non-spécifique des NPs peut fausser l'interprétation des résultats obtenus dans le cadre d'un test diagnostique à base de NPs. Les lames chargées positivement sont utilisées dans les laboratoires de pathologie pour favoriser l'adhésion des échantillons biologiques à la lame de microscope et ainsi réduire les

risques d'un décollement de l'échantillon lors de la préparation de celui-ci pour l'analyse par le pathologiste (déparaffinage, coloration et montage de la lame). Il est donc préférable de favoriser l'utilisation de ces lames lors du développement du protocole pour une technique d'immunoplasmonique pour la détection du cancer.

Comme mentionné dans la section 4.2, des résultats obtenus précédemment par ma collègue semblent indiquer que la fonctionnalisation des NPs aurait le potentiel de réduire l'adhésion non-spécifique remarquée au chapitre 4 des NPs aux lames chargées positivement. Dans son mémoire [52], Audrey Nsamela, a observé une différence significative entre le potentiel zêta des NPs d'or de 100nm non-fonctionnalisées et celles recouvertes de PEG ou de PEG-anti-HER2. En effet le potentiel zêta passe approximativement de -45mV pour les NPs sans fonctionnalisation à -7 mV (AuNPs-PEG) ou -8 mV (AuNPs-PEG-anti HER2), ce qui représente une augmentation d'environ 40 mV. On en déduit donc que la fonctionnalisation a le pouvoir de neutraliser une grande partie de la charge négative des NPs et devrait donc, par le fait même, réduire l'attraction entre les NPs et la lame avec une charge positive.

Afin de vérifier cette hypothèse, des NPs sans fonctionnalisation, des NPs recouvertes de PEG et des NPs avec PEG-anti-HER2 ont été incubées sur des lames sans charge ou chargées positivement afin d'étudier l'effet de la fonctionnalisation et de la charge de la lame sur l'adhésion non-spécifique des NPs au substrat.

5.3.1 Préparation des échantillons

Les quatre types de NPs utilisées sont les mêmes que celles présentées à la section 3.3.1, le tableau 5.1 fait un rappel des caractéristiques des NPs en spécifiant si elles sont recouvertes de citrate ou de bromure de cétrimonium (CTAB), des agents stabilisants.

Les lames utilisées pour la préparation sont des lames de microscope *Superfrost Plus* pour les lames chargées positivement et les lames de microscope *Premium Superfrost* toutes deux de la compagnie *Fisherbrand*.

La préparation des échantillons consiste à utiliser des NPs recouvertes de PEG et de PEG-anti-HER2 (voir protocole de fonctionnalisation à la section 5.2) pour chacun des quatre types de NPs. La concentration finale de chaque solution de NPs est déterminée en comparant l'intensité

maximale du spectre d'absorbance obtenu avec le spectrophotomètre *Epoch* de *BioTek* à la courbe de calibration associée à ce type de NPs.

Tableau 5.1 Caractéristiques des nanoparticules utilisées pour tester l'effet de la fonctionnalisation sur l'adhésion non-spécifique à la lame de microscope.

Couleur	Géométrie	Composition	Taille (nm)	Agent stabilisant
Rouge	Bâton	Or *	25 x 71	CTAB
Vert	Sphère	Alliage or-argent (50-50) **	74	Citrate
Bleu	Sphère	Alliage or-argent (10-90) **	43	Citrate
Jaune	Sphère	Or *	100	Citrate

** De la compagnie Nanopartz Inc. ** Fabriquées par Lu Wang, une étudiante au doctorat du laboratoire LP²L, selon la technique présentée dans [71].*

Un volume de NPs est calculé dans le but d'ajouter $1x10^9$ NPs à 30 ml d'eau milli-Q pour chacune des conditions. La lame de microscope est délicatement ajoutée dans chacun des bains contenant les NPs et incubée à température ambiante pour 30 minutes afin de laisser les NPs sédimenter. Les lames sont ensuite rincées deux fois dans un bain d'eau milli-Q. Puis, on procède au montage des lames avec deux bains progressifs de 1 minute dans l'éthanol (90% et 100%) et deux bains de 1 minute dans le substitut de xylène. Finalement, quelques gouttes de colle à base de toluène compatible avec le substitut de xylène (*Sub-X Mounting Medium* de la compagnie *Electron Microscopy Sciences*) sont ajoutées avant de couvrir la lame avec une lamelle. Les lames sont séchées à plat pendant au moins 16h avant d'être observées au microscope.

5.3.2 Résultats

Pour l'analyse des résultats, chaque lame est observée au microscope avec le dispositif d'illumination latérale et un objectif de 60x. Huit images par lames sont prises à une position aléatoire avec la caméra SCMOS pco.panda 4.2 et le décompte du nombre de NPs par image est fait avec le logiciel *Image J*. Le nombre moyen de NPs par surface de 216 μm^2 et l'écart-type sont présentés à la figure 5.2.

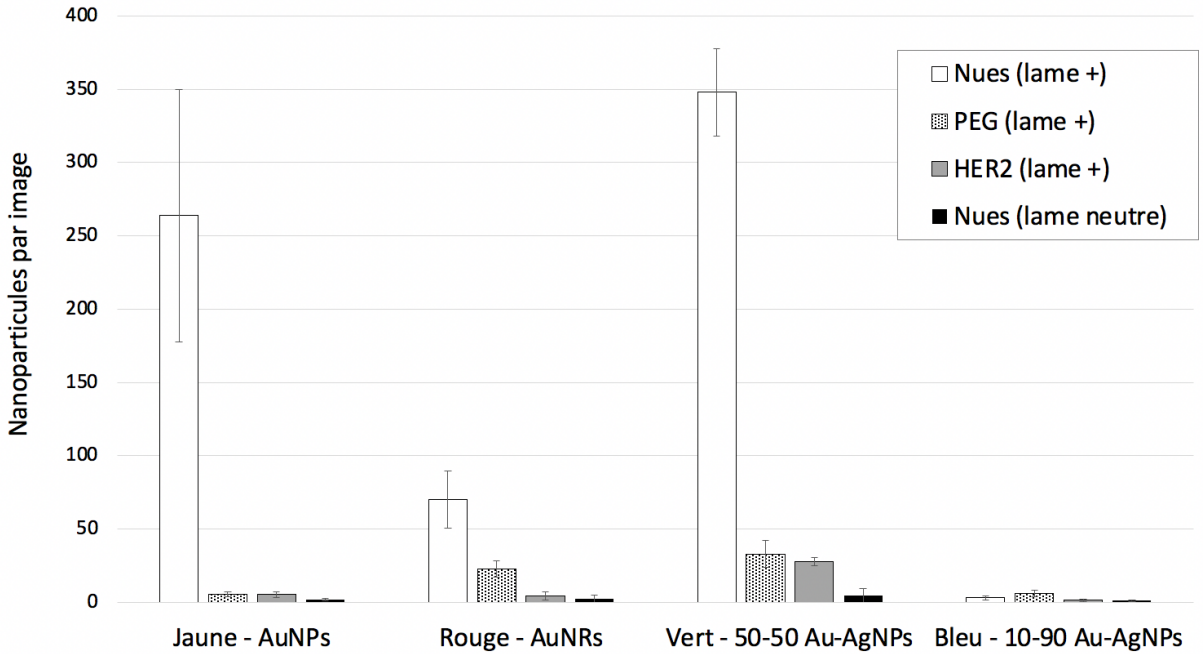


Figure 5.2 Histogramme du nombre moyen de NPs sans fonctionnalisation (Nues), recouvertes de PEG (PEG) ou fonctionnalisées avec l'anticorps anti-HER2 (HER2) adhérées à une lame de microscope chargées positivement (lame +) pour chacun des types de NPs avec une comparaison de l'adhésion des NPs sans fonctionnalisation (Nues) à une lame sans charge (lame neutre).

On remarque une réduction significative ($p<0,01$) entre l'adhésion des NPs jaunes, rouges et vertes sans fonctionnalisation et l'adhésion des mêmes NPs recouvertes de PEG ou fonctionnalisées (anti-HER2) sur lame chargées positivement. La faible adhésion de NPs sans fonctionnalisation à la lame sans charge confirme les résultats obtenus par le passé lors d'expériences *in vitro* où très peu d'attachement non-spécifique des NPs au substrat était observé.

Pour cette expérience, les NPs d'or (AuNPs) et d'alliage (Au-AgNPs) sont recouvertes de citrate. Le citrate est un agent stabilisant qui rend la surface des NPs très négative ce qui augmente la stabilité des NPs en milieu aqueux [75]. Les NRs, quant à elles, sont recouvertes de CTAB un agent stabilisant ayant une charge positive [76]. Lors de la fonctionnalisation, les agents stabilisants sont remplacés par les groupes thiols qui se lient plus fortement à la surface des NPs. La présence de CTAB à la surface des NRs peut expliquer pourquoi il y a significativement moins ($p<0,01$) de NRs sans fonctionnalisation adhérées à la lame positive que pour les NPs jaunes ou vertes sans fonctionnalisation. Par contre, les résultats obtenus confirment tout de même que le fait de recouvrir

les NRs de PEG ou de PEG-anti-HER2 permet de réduire significativement ($p<0,01$) la quantité de NRs adhérées à la lame chargée positivement.

Pour ce qui est des NPs bleues, on observe peu d'attachement à la lame en général. Cela peut être dû à leur petite taille ou à leur composition avec une grande proportion d'argent qui les rend plus instables. En effet, elles ont tendance à oxyder lors d'une exposition prolongée à la lumière comme c'est le cas lors de l'analyse des lames. L'oxydation réduit le diamètre des NPs ce qui les rend moins facilement observables au microscope [77]. Il est également possible que les NPs soient oxydées ce qui augmente la charge de surface vu la chimisorption d'ions Ag^{+} à la surface des NPs oxydées [74]. Les NPs oxydées seront donc moins attirées vers la lame chargée positivement lors de l'incubation.

Il serait pertinent d'éventuellement confirmer les résultats obtenus en déterminant la charge de surface des différentes NPs avec et sans fonctionnalisation par DLS (*Dynamic Light Scattering*). Toutefois, la pandémie et la récente quarantaine ne m'ont pas permis d'obtenir ces résultats à temps.

On conclut donc que, comme attendu, la fonctionnalisation des NPs permet de réduire significativement l'attachement non-spécifique des NPs aux lames chargées positivement. Il s'agit d'un résultat important pour la suite du développement de la technique d'immunoplasmonique en pathologie. D'autres stratégies devront être développées et jumelées à la fonctionnalisation afin de contrôler le mieux possible les interactions non-spécifique entre les NPs et les échantillons afin de ne pas nuire au diagnostic.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre porte sur la discussion des résultats obtenus et de leur implication dans le but de l'application de l'IP dans les pratiques standardisées en pathologie.

6.1 Variabilité de la couleur des NPs

Il a été démontré que les quatre types de NPs choisies pour réaliser les expériences présentées au chapitre 4 sont bien visibles lors de leur observation en champ sombre à l'aide du SI et leurs couleurs (rouge, vert, bleu et jaune) sont bien différenciables. Par contre, à mon avis, les résultats obtenus pour les échantillons avec NPs vertes sont souvent meilleurs que pour les autres types de NPs. Elles apparaissent très clairement sur tous les types d'échantillons et présentent peu de variation de couleurs dans un même échantillon. C'est pourquoi je prioriserais l'utilisation des NPs vertes pour les marquages IP non-multiplexé (un seul marqueur). Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'œil humain est plus sensible aux longueurs d'onde dans le vert. On doit également considérer la couleur de l'arrière-plan dans les échantillons. La diffusion causée par les cellules colorées avec la combinaison de colorant qui a été jugée comme optimale (hématoxyline de Gill (ou Harris) et éosine B) est bleue et rouge, les NPs vertes se distinguent donc plus facilement que les NPs rouges ou bleues. Les NPs vertes choisies pour ce projet ont également l'avantage d'avoir un grand diamètre (74 nm), elles diffusent donc plus de lumière que les NPs bleues (43 nm) qui sont à la limite de détection lors de l'utilisation du SI. En général, ces NPs bleues sont les moins facilement visibles dans les échantillons, surtout sur les tissus FFPE. Une observation prolongée des échantillons contenant ce type de NPs a révélé un problème de stabilité des NPs bleues dans le milieu de montage à base de toluène (*Sub-X Mounting medium*) causé par leur composition avec une grande proportion d'argent (90%). Les NPs sont ainsi prônes à la photo-oxydation. Une étude de stabilité a permis d'identifier un milieu de montage (milieu *Permount*) dans lequel les NPs d'alliage or-argent 10-90 sont plus stables. Une étude plus approfondie permettrait certainement d'optimiser le choix du milieu de montage pour favoriser la stabilité à long terme des NPs bleues. Ensuite, puisque les marqueurs rouges sont des nanobâtons, leur spectre de diffusion présente deux pics plasmon tel que mentionné dans la revue de littérature. Il en résulte donc que la majorité des NRs dans l'échantillon apparaissent rouges, mais certaines apparaissent jaune-blanches. Cela peut potentiellement nuire à l'analyse des résultats multiplexés avec marqueurs rouges et jaunes dans le même échantillon. Enfin, les NPs jaunes de 100 nm de diamètre sont probablement légèrement trop

grandes et diffusent trop fortement la lumière dans le vert et le rouge ainsi leur couleur varie entre le vert, le jaune et le rouge en fonction de la position du plan focal. L'utilisation de NPs de 80 nm ou de 90 nm permettrait de réduire cette variation tout en gardant une grande section efficace de diffusion puisque le pic plasmon de ces NPs est beaucoup plus étroit. La position du pic plasmon de ces NPs est aussi bien située entre les maximums des spectres des NPs vertes et rouges.

L'agrégation des NPs doit également être contrôlée puisqu'elle a un impact sur le spectre de NPs qui donne l'illusion d'observer une seule NPs de beaucoup plus grande taille. Dans le contexte d'un marquage IP multiplexé, il serait donc impossible de distinguer les NPs rouges d'un agrégat de NPs vertes (qui apparait rouge lors de l'observation au microscope). Il est donc important de contrôler le mieux possible l'agrégation des NPs, c'est pourquoi une sonication de chaque solution de NPs est effectuée avant chaque incubation. Le contrôle de l'inter-variabilité des tailles des NPs lors de leur synthèse sera également primordial pour minimiser le chevauchement des spectres des NPs et les ambiguïtés lors de l'observation d'un échantillon avec marquage multiplexé. De plus, il a été démontré que la fonctionnalisation des NPs diminue l'incidence des agrégats lors de l'incubation avec les échantillons [78, 79]. Finalement, l'observation des échantillons avec ou sans coloration n'a pas mis en évidence une tendance accrue des NPs à causer des agrégats lorsque les échantillons sont en contact avec les colorants.

6.2 Standardisation de la technique

Les différentes méthodes expérimentales utilisées lors de la réalisation de ce projet ont été sélectionnées dans l'objectif d'accélérer l'obtention de résultats satisfaisants pour la démonstration du potentiel de l'IP. La standardisation éventuelle des protocoles sera nécessaire dans l'optique d'une incorporation du marquage IP aux pratiques des laboratoires de pathologie.

Tout d'abord, la modification du SI pour ajouter un contrôle de l'intensité des LEDs par ordinateur va permettre d'assurer que l'illumination est la même pour tous les échantillons. Cela diminuerait la variabilité des résultats lors de l'analyse des échantillons. Pour ce projet, l'intensité de chacune des trois couleurs de LEDs est ajustée manuellement pour chacune des images (passage du champ clair au SI) de façon à obtenir une illumination blanche la plus stable possible.

Ensuite, la méthode d'incubation des NPs avec les échantillons FFPE n'est également pas optimale. La formation d'une bulle de solution de NPs sur la lame crée une tension de surface, on retrouve

donc plus de NPs en périphérie de la bulle qu'au centre. La concentration de NPs n'est donc pas uniforme dans tout l'échantillon. Par contre, le choix de cette méthode a permis de réduire au maximum la quantité de NPs nécessaire à la préparation des échantillons dans un contexte où il n'était pas primordial d'avoir un marquage uniforme dans tout l'échantillon. De plus, ce phénomène est négligeable si le pourtour de la bulle est suffisamment éloigné de l'échantillon. Une méthode optimale pour standardiser l'incubation serait probablement d'immerger complètement les lames dans des bains contenant les solutions de NPs comme il a été fait au chapitre 5 pour tester l'effet de la fonctionnalisation des NPs sur leur adhésion aux lames chargées positivement.

6.3 Toxicité des nanoparticules

Il est pratiquement impossible de faire un projet en nanotechnologie biomédicale sans aborder le sujet de la toxicité des NPs. L'utilisation des NPs dans les laboratoires de pathologie comme outil diagnostique implique un marquage *ex vivo*. Il n'est donc pas nécessaire d'administrer les NPs dans le corps humain. La question de la toxicité est donc moins significative. Toutefois, dans le cas de marquage sur cellules *ex vivo* non-fixées, il faudra se questionner si l'utilisation de NPs d'argent (toxique) altère les résultats du marquage IP en affectant la viabilité des cellules dans l'échantillon. A premier abord, les temps d'incubation ne sont pas suffisamment longs pour induire une réponse cellulaire significative, mais il est important de garder cet aspect en tête. Sinon, pour les marquages sur cellules fixées (comme pour les échantillons FFPE), la toxicité des NPs n'est pas un enjeu important.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 Synthèse des travaux

Vu la grande incidence du cancer au Canada, le développement d'une méthode de diagnostic ayant le potentiel d'augmenter la précision des diagnostics de cancer serait une avancée importante pour le domaine de la pathologie et de l'oncologie. L'IP a le potentiel d'être bénéfique pour le diagnostic et la sélection du traitement optimal contre le cancer afin d'améliorer la santé des patients canadiens.

Nous avons établi la preuve de concept de l'IP, superposable à la coloration H&E, sur des échantillons compatibles à la cytopathologie (échantillons de cellules cancéreuses adhérées à la lame microscopique et de cellules cancéreuses FFPE) et à l'histopathologie (échantillons de tissus FFPE). Les résultats obtenus pour le marquage immunoplasmonique sur échantillons colorés H&E sont très encourageants pour l'application future de cette technique dans les laboratoires de pathologie. Ils démontrent un réel avantage de l'IP par rapport aux autres techniques d'immunomarquage qui ne peuvent être utilisées sur des échantillons colorés ou qui sont limités par leur capacité de multiplexage. 120 combinaisons de coloration, de couleurs de NPs et de types d'échantillons ont été testées. Il a été démontré que la coloration des échantillons n'empêchait pas la visualisation et la différenciation des quatre couleurs de NPs choisies. Les résultats obtenus ont mis en lumière la possibilité d'observer facilement une quatrième couleur de NPs, ne correspondant pas directement à la couleur d'une des LEDs du SI. La capacité de multiplexage pour les échantillons d'immunoplasmonique est donc d'au moins quatre marqueurs. Il a été déterminé que la combinaison de colorant optimale est la même pour les trois types d'échantillons, c'est-à-dire, hématoxyline de Gill (ou Harris) avec éosine B.

L'utilisation, pour la première fois, de lames de microscope chargées positivement dans le cadre d'un marquage IP a révélé une attraction électrostatique accrue entre les NPs (charge négative) et les lames de microscope (charge positive). L'adhésion non-spécifique des NPs au substrat est un phénomène à ne pas négliger lors du développement de cette technique puisqu'elle pourrait facilement nuire à la qualité des diagnostics obtenus. Une étude préliminaire a permis d'établir que la fonctionnalisation des NPs permet de neutraliser, en grande partie, la charge des NPs et de réduire à un niveau plus acceptable l'adhésion des NPs à la lame.

7.2 Travaux futurs

La suite logique pour ce projet sera l'utilisation de NPs fonctionnalisées sur les échantillons FFPE colorés en commençant par le marquage spécifique des cellules FFPE. Cela permettra d'augmenter les options d'anticorps possibles pour l'IP puisque les protéines au niveau du noyau seront accessibles (en plus des protéines membranaires). Une fois la technique d'IP maitrisée pour les cellules FFPE, le passage aux tissus FFPE pourra être fait. Toutefois, on s'attend à rencontrer de nouveaux défis à cette étape vu la structure des tissus, entre autres, la présence d'une matrice extracellulaire.

Les protocoles d'incubation des NPs et d'observation des échantillons devront également être mieux standardisés, quelques pistes de solution ont été mentionnées au chapitre 6. Des stratégies devront aussi être élaborées afin de contrôler le signal non-spécifique causé par l'interaction non-spécifique entre les NPs et les échantillons biologiques ou les NPs et la lame de microscope.

Dans un autre ordre d'idées, il pourrait être intéressant de tester la possibilité de procéder au marquage IP des cellules vivantes avant la fixation et la mise en bloc de paraffine des échantillons FFPE. Pouvoir réaliser le marquage avant ces étapes serait très intéressant puisque ces étapes dénaturent potentiellement l'expression de certaines protéines. Toutefois, il est probable que les étapes de mise en bloc et de préparation des lames détruisent le marquage IP.

De plus, en lien avec la fonctionnalisation, il devra être vérifié que chaque type de NPs donne des résultats similaires en termes de NPs par cellules lorsque fonctionnalisées. La majorité des études sur la fonctionnalisation se concentrent sur un seul type de NPs. On sait donc qu'il est possible d'obtenir des résultats reproductibles avec un même type de NPs, mais qu'arrive-t-il lorsqu'on change les caractéristiques des NPs? Il est important de connaitre cette réponse puisque dans l'application future de cette technique, on imagine qu'un pathologiste pourrait choisir lui-même, selon ses préférences, l'anticorps qu'il souhaite conjuguer à la NPs de la couleur désirée. Il faut donc savoir si le signal sera le même au moment d'établir les seuils diagnostics quantitatifs.

Enfin, tout le processus d'identification et de classification des NPs pourrait être fait grâce à un algorithme basé sur l'intelligence artificielle. Le pathologiste pourrait alors interpréter les résultats fournis par l'ordinateur en fonction de la position des NPs dans l'environnement cellulaire et des seuils quantitatifs choisis.

RÉFÉRENCES

[1] Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer. "Statistiques canadiennes sur le cancer 2019." https://www.cancer.ca/~/media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2019-FR.pdf?la=fr-CA

[2] Cancer Research UK. "Why is early diagnosis important?" https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-symptoms/why-is-early-diagnosis-important.

[3] S. Renshaw, "Immunohistochemistry and Immunocytochemistry " in *The Immunoassay Handbook*, D. Wild Ed., 4th ed., 2013, ch. 4.2, pp. 357-377.

[4] A. E. Rizzardi *et al.*, "Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring," *Diagn Pathol,* vol. 7, p. 42, Jun 20 2012, doi: 10.1186/1746-1596-7-42.

[5] 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.

[6] L. Wang, C. Darviot, J. Zapata-Farfan, S. Patskovsky, D. Trudel, and M. Meunier, "Designable nanoplasmonic biomarkers for direct microscopy cytopathology diagnostics," *J Biophotonics,* vol. 12, no. 11, p. e201900166, Nov 2019, doi: 10.1002/jbio.201900166.

[7] E. Bianconi *et al.*, "An estimation of the number of cells in the human body," *Ann Hum Biol,* vol. 40, no. 6, pp. 463-71, Nov-Dec 2013, doi: 10.3109/03014460.2013.807878.

[8] Scitable by Nature Education. "Cells Are the Basic Units of Living Organisms." https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/118237871/

[9] Société canadienne du cancer. "Vue d'ensemble des statistiques sur le cancer." https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/cancer-statistics-at-a-glance/?region=on

[10] A. M. Wilson *et al.*, "In Vivo Laser-Mediated Retinal Ganglion Cell Optoporation Using KV1.1 Conjugated Gold Nanoparticles," *Nano Lett,* vol. 18, no. 11, pp. 6981-6988, Nov 14 2018, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02896.

[11] J. A. Owen, J. Punt, and S. A. Stranford, *Immunology*, 7th edition ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013.

[12] Société canadienne du cancer. "Qu'est-ce que le cancer du sein ?" https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/?region=on

[13] John Hopkins Medicine Pathology. "Staging & Grade." https://pathology.jhu.edu/breast/staging-grade/

[14] J. P. Gillet, S. Varma, and M. M. Gottesman, "The clinical relevance of cancer cell lines," *J Natl Cancer Inst,* vol. 105, no. 7, pp. 452-8, Apr 3 2013, doi: 10.1093/jnci/djt007.

[15] 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.

[16] Cancer Research UK. "Key signs and symptoms of cancer." https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-symptoms/why-is-early-diagnosis-important

[17] Société canadienne du cancer, "Radiographie," 2020. [En ligne]. Disponible: https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/tests-and-procedures/x-ray/?region=qc.

[18] L. Wang, "Early Diagnosis of Breast Cancer," *Sensors (Basel),* vol. 17, no. 7, Jul 5 2017, doi: 10.3390/s17071572.

[19] J. A. Dickinson *et al.*, "Dépistage: quand les choses tournent mal," *Canadian Family Physician | Le Médecin de famille canadien* vol. 64, pp. 299-306, 2018.

[20] Société canadienne du cancer. "Échographie." https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/tests-and-procedures/ultrasound/?region=on

[21] National Breast Cancer Foundation Inc. "Biopsy." https://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-biopsy

[22] M. A. Al-Abbadi, "Basics of cytology," *Avicenna J Med,* vol. 1, no. 1, pp. 18-28, Jul 2011, doi: 10.4103/2231-0770.83719.

[23] American Cancer Society. "Types of cytology tests used to look for cancer." https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/testing-biopsy-and-cytology-specimens-for-cancer/cytology-types.html

[24] The Human Protein Atlas. "Immunohistochemistry." https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry

[25] J. K. Chan, "The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology," *Int J Surg Pathol,* vol. 22, no. 1, pp. 12-32, Feb 2014, doi: 10.1177/1066896913517939.

[26] A. A. Grosset *et al.*, "Hematoxylin and Eosin Counterstaining Protocol for Immunohistochemistry Interpretation and Diagnosis," *Appl Immunohistochem Mol Morphol,* vol. 27, no. 7, pp. 558-563, Aug 2019, doi: 10.1097/PAI.0000000000000626.

[27] Gouvernement du Québec. (2008). *Performance diagnostique des techniques de détermination du statut HER-2 dans le cancer du sein* [En ligne] Disponible: https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/AETMIS/Rapports/Cancer/ETMIS2008_Vol4_No3.pdf

[28] N. Mohan, J. Jiang, M. Dokmanovic, and W. J. Wu, "Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers," *Antib Ther,* vol. 1, no. 1, pp. 13-17, Aug 31 2018, doi: 10.1093/abt/tby003.

[29] Breastcancer.org. "FISH Test (Fluorescence In Situ Hybridization)." https://www.breastcancer.org/symptoms/testing/types/fish

[30] J. A. Ramos-Vara and M. A. Miller, "When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique," *Vet Pathol,* vol. 51, no. 1, pp. 42-87, Jan 2014, doi: 10.1177/0300985813505879.

[31] F. Aeffner *et al.*, "The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth," *Arch Pathol Lab Med,* vol. 141, no. 9, pp. 1267-1275, Sep 2017, doi: 10.5858/arpa.2016-0386-RA.

[32] N. Sukswai and J. D. Khoury, "Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection," *Curr Hematol Malig Rep,* vol. 14, no. 5, pp. 368-375, Oct 2019, doi: 10.1007/s11899-019-00533-9.

[33] G. Kocjan, "FNAC Technique and Slide Preparation," in *Fine Needle Aspiration Cytology*, 1 ed.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

[34] A. E. Rader, A. Avery, C. L. Wait, L. S. McGreevey, D. Faigel, and M. C. Heinrich, "Fine-Needle Aspiration Biopsy Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors Using Morphology, Immunocytochemistry, and Mutational Analysis of c-kit," *Cancer Cytopathology,* vol. 93, no. 4, 2001.

[35] C. Boudoux, *Fundamentals of Biomedical Optics*, 1 ed. Pollux, 2017.

[36] S. Patskovsky, E. Bergeron, D. Rioux, M. Simard, and M. Meunier, "Hyperspectral reflected light microscopy of plasmonic Au/Ag alloy nanoparticles incubated as multiplex chromatic biomarkers with cancer cells," *Analyst,* vol. 139, no. 20, pp. 5247-53, Oct 21 2014, doi: 10.1039/c4an01063a.

[37] M. M. Barroso, "Quantum dots in cell biology," *J Histochem Cytochem,* vol. 59, no. 3, pp. 237-51, Mar 2011, doi: 10.1369/0022155411398487.

[38] W. G. J. H. M. van Sark, P. L. T. M. Frederix, A. A. Bol, H. C. Gerritsen, and A. Meijerink, "Blueing, Bleaching, and Blinking of Single CdSe/ZnS Quantum Dots " *ChemPhysChem,* vol. 3, pp. 871-879, 2002, doi: 1439-4235/02/03/10.

[39] P. F. Gao, Y. Fang Li, and C. Z. Huang, "Localized surface plasmon resonance scattering imaging and spectroscopy for real-time reaction monitoring," *Applied Spectroscopy Reviews,* 2019, doi: 10.1080/05704928.2018.1554581.

[40] S. Yamada and Y. Niidome, "Nanoplasmonics from Fundamentals to Applications," in *Nanoplasmonics*, vol. 2, 2004, ch. 14, pp. 255-274.

[41] H. Lee, X. Gao, and Y.-P. Kim, "Immuno-Nanoparticles for Multiplex Protein Imaging in Cells and Tissues," *The Korean BioChip Society,* vol. 12, 2018, doi: 10.1007/s13206-018-2201-8.

[42] A. H. Fischer, K. A. Jacobson, J. Rose, and R. Zeller, "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections," *CSH Protoc,* vol. 2008, p. pdb prot4986, May 1 2008, doi: 10.1101/pdb.prot4986.

[43] D. K. Chatterjee, P. Diagaradjane, and S. Krishnan, "Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy," *Ther Deliv,* vol. 2, no. 8, pp. 1001-14, Aug 2011, doi: 10.4155/tde.11.72.

[44] W. H. Roa, S. Azarmi, M. H. Al-Hallak, W. H. Finlay, A. M. Magliocco, and R. Lobenberg, "Inhalable nanoparticles, a non-invasive approach to treat lung cancer in a mouse model," *J Control Release,* vol. 150, no. 1, pp. 49-55, Feb 28 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.035.

[45] W. S. Cho *et al.*, "Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles," *Toxicol Appl Pharmacol,* vol. 236, no. 1, pp. 16-24, Apr 1 2009, doi: 10.1016/j.taap.2008.12.023.

[46] H. Nishimori, M. Kondoh, K. Isoda, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, and K. Yagi, "Silica nanoparticles as hepatotoxicants," *Eur J Pharm Biopharm,* vol. 72, no. 3, pp. 496-501, Aug 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2009.02.005.

[47] H. Chen, J. Xue, Y. Zhang, X. Zhu, J. Gao, and B. Yu, "Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of caveolin-1 and PCNA in the lung cancer tissue microarray," *J Mol Histol,* vol. 40, no. 4, pp. 261-8, Aug 2009, doi: 10.1007/s10735-009-9237-y.

[48] L. Zhou, J. Yan, L. Tong, X. Han, X. Wu, and P. Guo, "Quantum Dot-based Immunohistochemistry for Pathological Applications," *Cancer Translational Medicine,* vol. 2, 2015, doi: 10.4103/2395-3977.177562.

[49] G. T. Hermanson, "Microparticles and Nanoparticles," in *Bioconjugate Techniques*: Elsevier, 2013, ch. 14, pp. 549-587.

[50] Encyclopaedia Britannica, "Antigen", 2020. [En ligne]. Disponible: https://www.britannica.com/science/antigen.

[51] Encyclopaedia Britannica. "Antibody", 2020. [En ligne]. Disponible: https://www.britannica.com/science/antibody

[52] A. Nsamela, "Fonctionnalisation de nanoparticules plasmoniques pour le ciblage de cellules du cancer du sein in vitro," Maîtrise ès sciences appliquées, Département de génie physique, Polytechnique Montréal, Montréal, 2019.

[53] W. Wang, K. Gaus, R. D. Tilley, and J. J. Gooding, "The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us?," *Materials Horizons,* 2019, doi: 10.1039/c9mh00664h.

[54] S. Behzadi *et al.*, "Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell," *Chem Soc Rev,* vol. 46, no. 14, pp. 4218-4244, Jul 17 2017, doi: 10.1039/c6cs00636a.

[55] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. Chan, "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells," *Nano Lett,* vol. 6, no. 4, pp. 662-8, Apr 2006, doi: 10.1021/nl052396o.

[56] E. Frohlich, "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles," *Int J Nanomedicine,* vol. 7, pp. 5577-91, 2012, doi: 10.2147/IJN.S36111.

[57] O. Betzer *et al.*, "In-vitro Optimization of Nanoparticle-Cell Labeling Protocols for In-vivo Cell Tracking Applications," *Sci Rep,* vol. 5, p. 15400, Oct 28 2015, doi: 10.1038/srep15400.

[58] T. L. Moore *et al.*, "Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction," *Sci Rep,* vol. 9, no. 1, p. 900, Jan 29 2019, doi: 10.1038/s41598-018-36954-4.

[59] E. C. Cho, Q. Zhang, and Y. Xia, "The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles," *Nat Nanotechnol,* vol. 6, no. 6, pp. 385-91, Apr 24 2011, doi: 10.1038/nnano.2011.58.

[60] S. Patskovsky, E. Bergeron, D. Rioux, and M. Meunier, "Wide-field hyperspectral 3D imaging of functionalized gold nanoparticles targeting cancer cells by reflected light microscopy," *J Biophotonics,* vol. 8, no. 5, pp. 401-7, May 2015, doi: 10.1002/jbio.201400025.

[61] E. Bergeron *et al.*, "Cell-specific optoporation with near-infrared ultrafast laser and functionalized gold nanoparticles," *Nanoscale,* vol. 7, no. 42, pp. 17836-47, Nov 14 2015, doi: 10.1039/c5nr05650k.

[62] S. Patskovsky, E. Bergeron, and M. Meunier, "Hyperspectral darkfield microscopy of PEGylated gold nanoparticles targeting CD44-expressing cancer cells," *J Biophotonics,* vol. 8, no. 1-2, pp. 162-7, Jan 2015, doi: 10.1002/jbio.201300165.

[63] H. Wang, T. Zhang, and X. Zhou, "Dark-field spectroscopy: development, applications and perspectives in single nanoparticle catalysis," *J Phys Condens Matter,* vol. 31, no. 47, p. 473001, Nov 27 2019, doi: 10.1088/1361-648X/ab330a.

[64] Y. Cui, X. Wang, W. Ren, J. Liu, and J. Irudayaraj, "Optical Clearing Delivers Ultrasensitive Hyperspectral Dark-Field Imaging for Single-Cell Evaluation," *ACS Nano,* vol. 10, no. 3, pp. 3132-43, Mar 22 2016, doi: 10.1021/acsnano.6b00142.

[65] VEGAPhoton. "Side-illumination microscopy adaptor." https://vegaphoton.com/side-illumination-microscopy-adaptor/

[66] 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 Appl. Nano Mater.,* 2020, doi: 10.1021/acsanm.0c00375.

[67] ATCC. "MDA-MB-231." https://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#generalinformation

[68] ATCC. "MDA-MB-453." https://www.atcc.org/products/all/HTB-131.aspx#generalinformation

[69] G. E. Yan and T. Efferth, "Cell Harvesting Methods Affect Cellular Integrity of Adherent Cells During Apoptosis Detection," *Anticancer Res,* vol. 38, no. 12, pp. 6669-6672, Dec 2018, doi: 10.21873/anticanres.13034.

[70] H. L. Huang *et al.*, "Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells," *J Biomed Sci,* vol. 17, p. 36, May 11 2010, doi: 10.1186/1423-0127-17-36.

[71] D. Rioux and M. Meunier, "Seeded Growth Synthesis of Composition and Size-Controlled Gold-Silver Alloy Nanoparticles," (in English), *J Phys Chem C,* vol. 119, no. 23, pp. 13160-13168, Jun 11 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b02728.

[72] Laboratoire de Plasmonique et de Procédés Laser. "Outils de simulation." http://lp2l.polymtl.ca/ressources/outils-simulation

[73] B. T. Draine and P. J. Flatau, "Discrete-Dipole Approximation for Scattering Calculations," (in English), *J Opt Soc Am A,* vol. 11, no. 4, pp. 1491-1499, Apr 1994, doi: Doi 10.1364/Josaa.11.001491.

[74] C. N. Lok *et al.*, "Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities," *J Biol Inorg Chem,* vol. 12, no. 4, pp. 527-34, May 2007, doi: 10.1007/s00775-007-0208-z.

[75] NanoComposix. "Citrate Surface." https://nanocomposix.com/pages/citrate-surface#target

[76] R. Li, Z. Wang, X. Gu, C. Chen, Y. Zhang, and D. Hu, "Study on the Assembly Structure Variation of Cetyltrimethylammonium Bromide on the Surface of Gold Nanoparticles," *ACS Omega,* vol. 5, no. 10, pp. 4943-4952, Mar 17 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b03823.

[77] V. Sundaresan, J. W. Monaghan, and K. A. Willets, "Visualizing the Effect of Partial Oxide Formation on Single Silver Nanoparticle Electrodissolution," *The Journal of Physical Chemistry,* vol. 122, no. 5, pp. 3138-3145, 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b11824.

[78] F. Gambinossi, S. E. Mylon, and J. K. Ferri, "Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles," *Adv Colloid Interface Sci,* vol. 222, pp. 332-49, Aug 2015, doi: 10.1016/j.cis.2014.07.015.

[79] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery," *Adv Drug Deliv Rev,* vol. 99, no. Pt A, pp. 28-51, Apr 1 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.

ANNEXE A SUPERPOSITION DE LA COLORATION H&E AU MARQUAGE IMMUNOPLASMONIQUE (RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES)

A.1 Échantillons de cellules adhérées

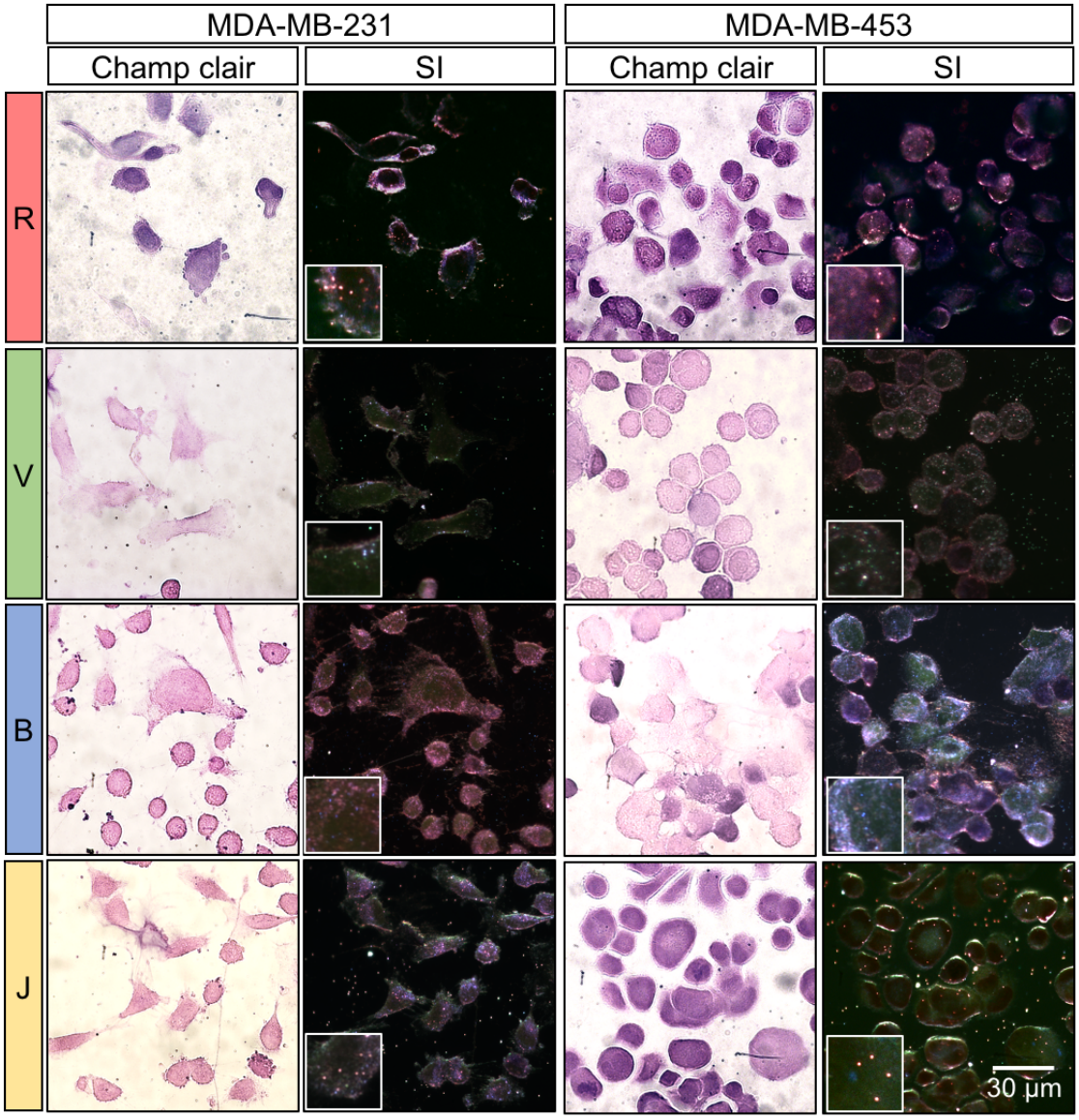


Figure A.1 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Harris et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

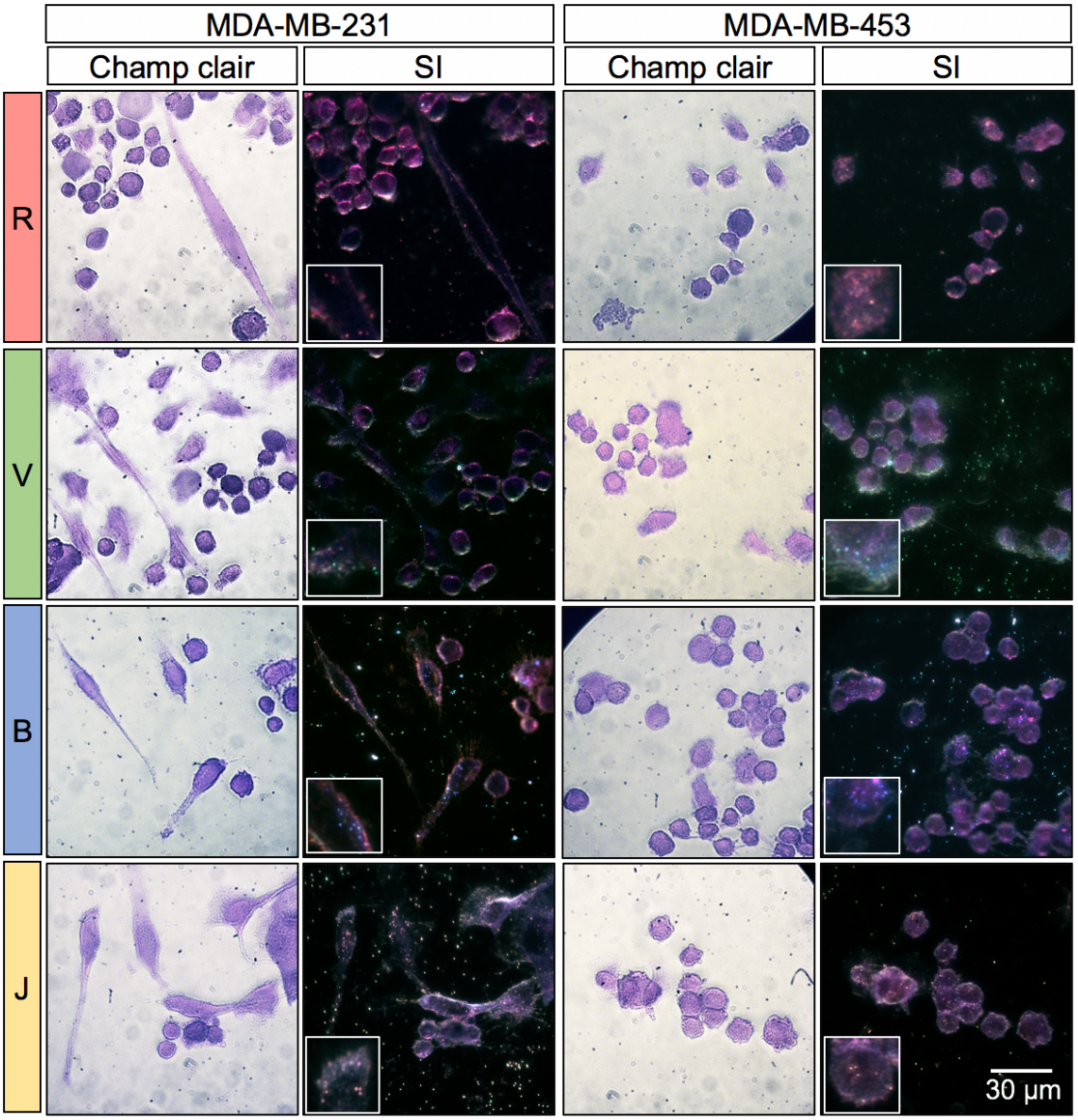


Figure A.2 Échantillons de cellules adhérées des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorés avec hématoxyline de Harris et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

A.2 Échantillons de cellules FFPE

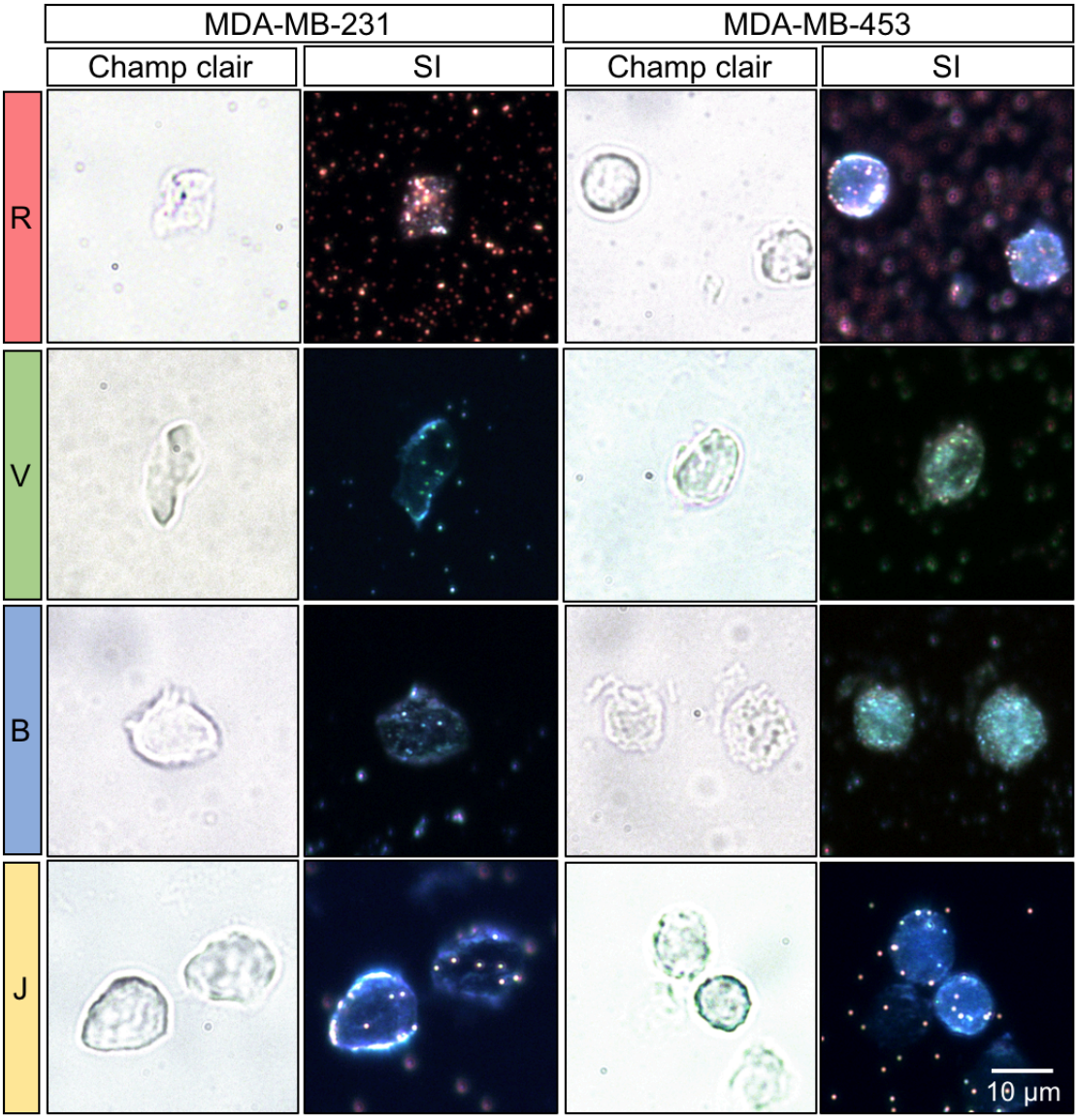


Figure A.3 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 sans coloration et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

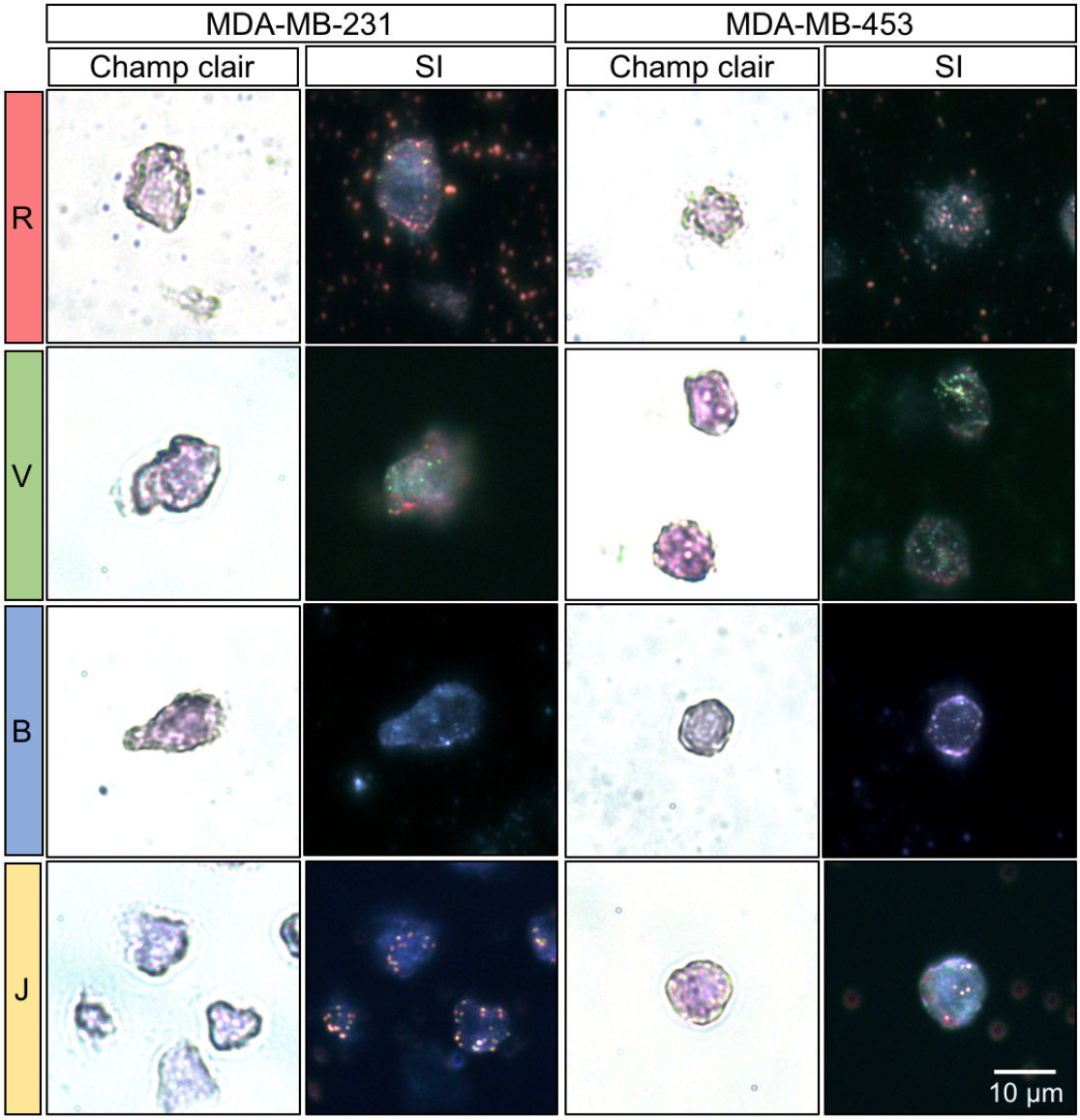


Figure A.4 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Gill et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

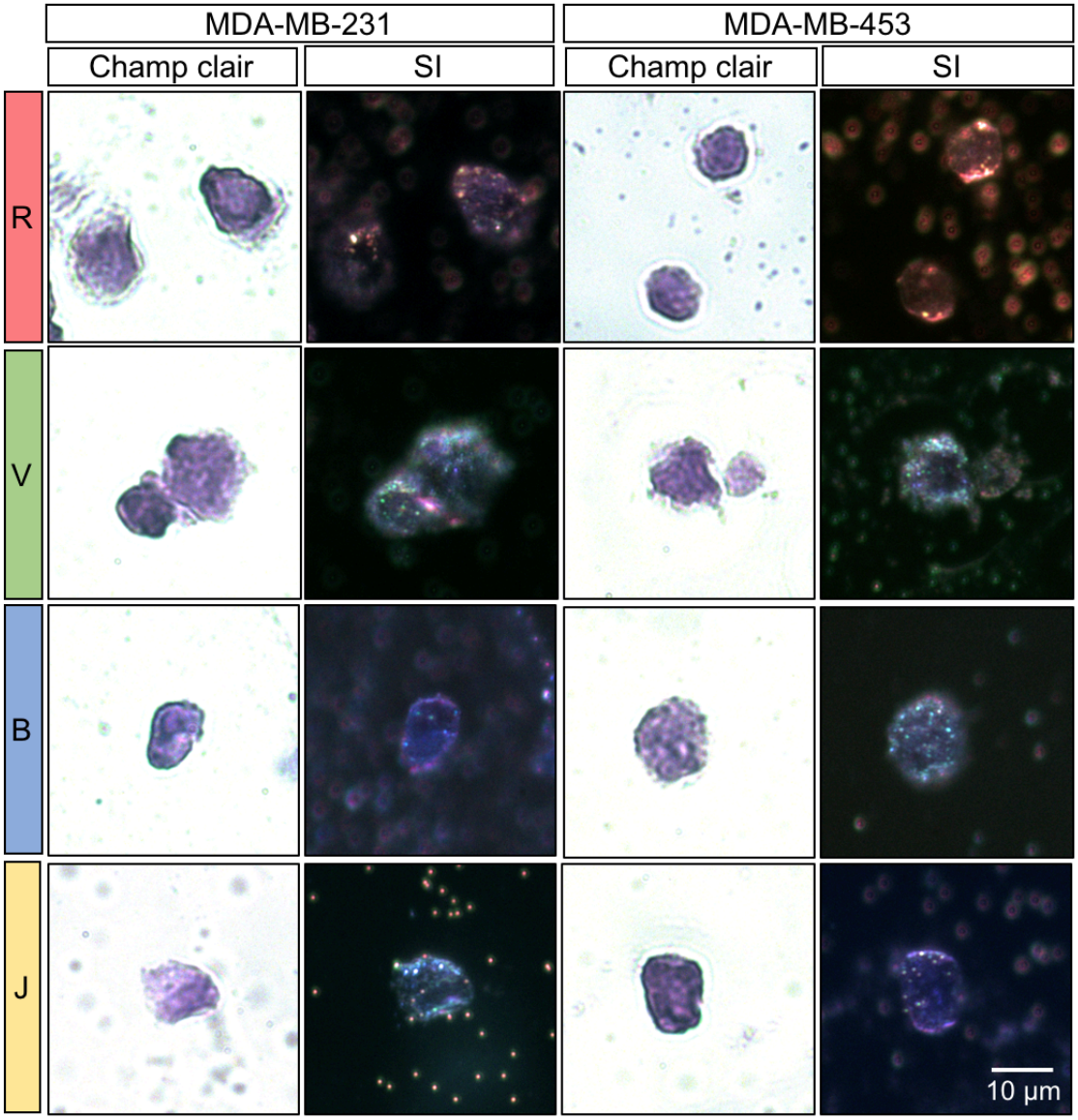


Figure A.5 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Harris et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

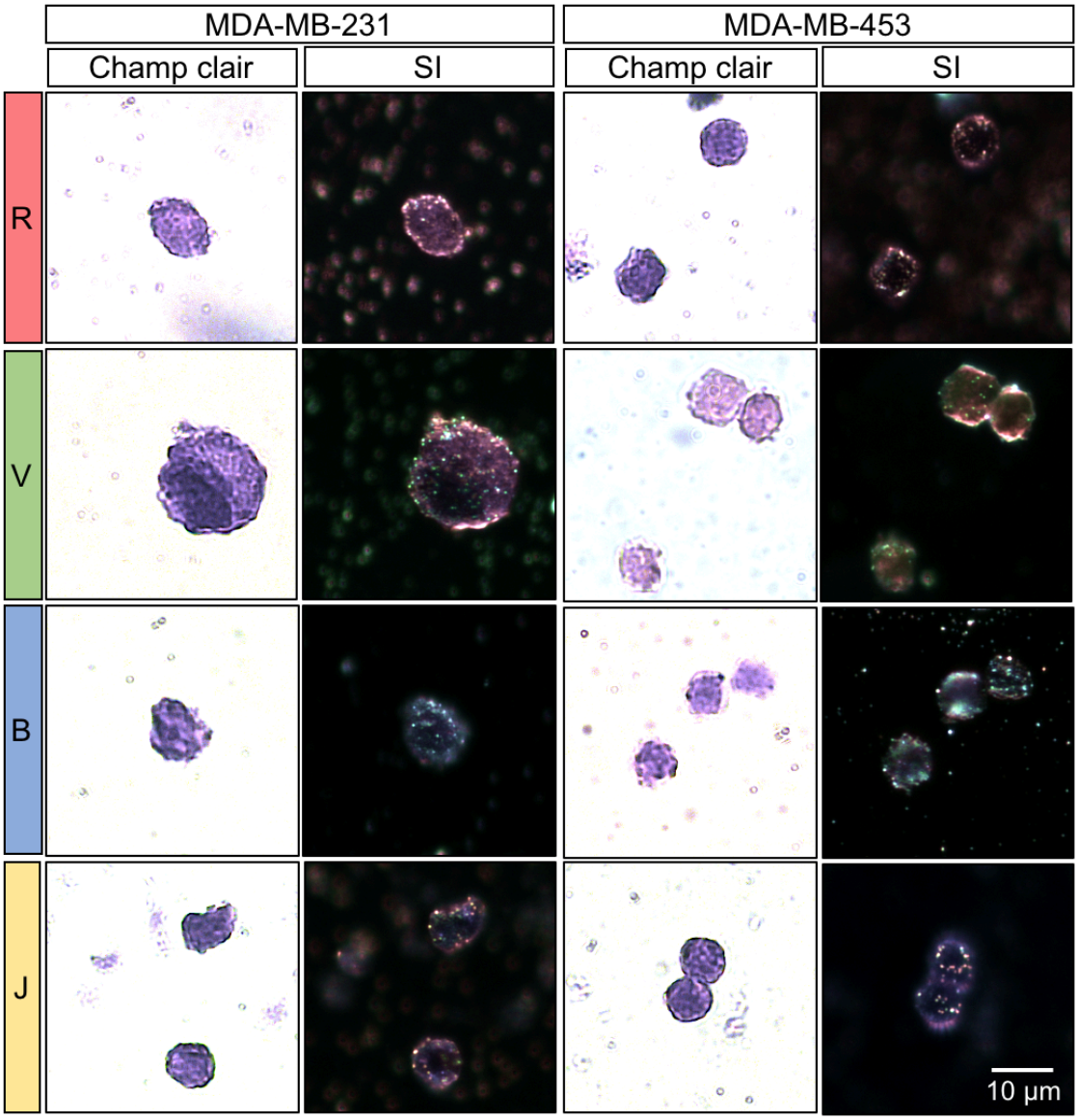


Figure A.6 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Harris et éosine Y et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

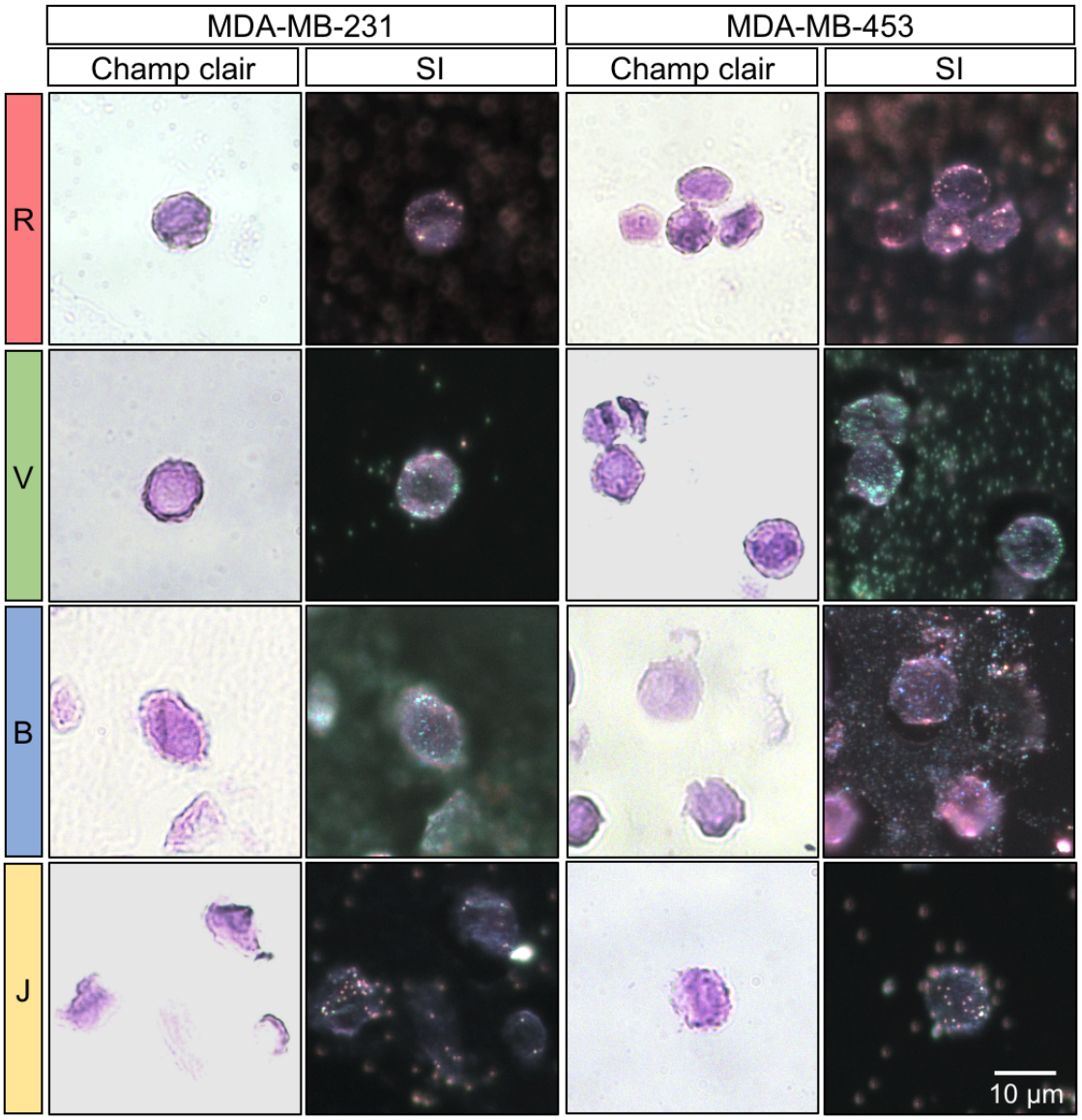


Figure A.7 Tranches de cellules FFPE des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MDA-MB-453 colorées avec hématoxyline de Harris et éosine B et observées en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J).

A.3 Échantillons de tissus FFPE

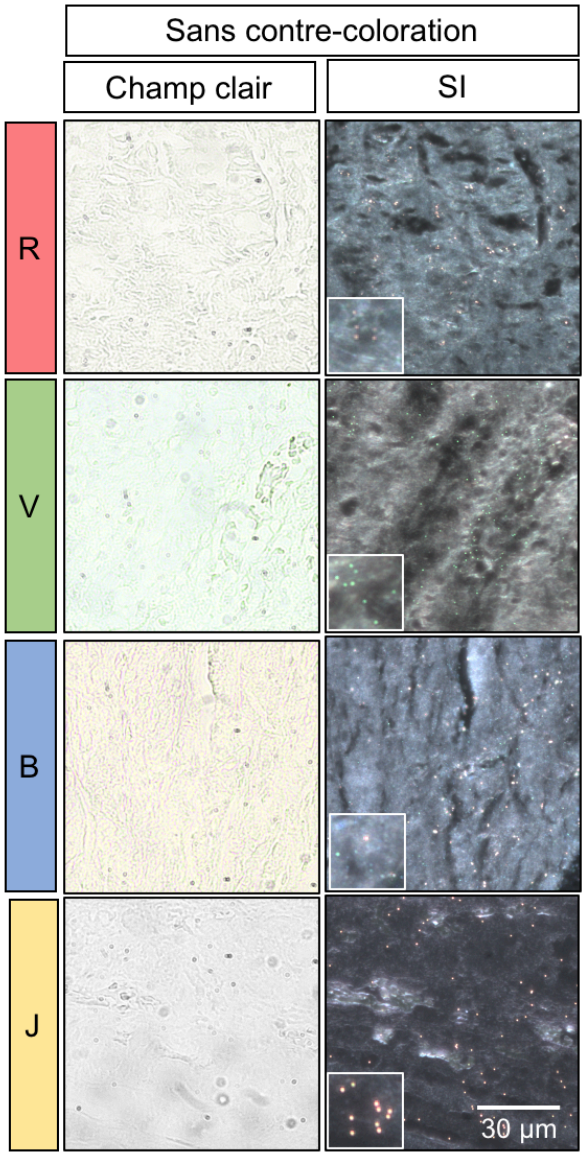


Figure A.8 Tissu FFPE sans coloration et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

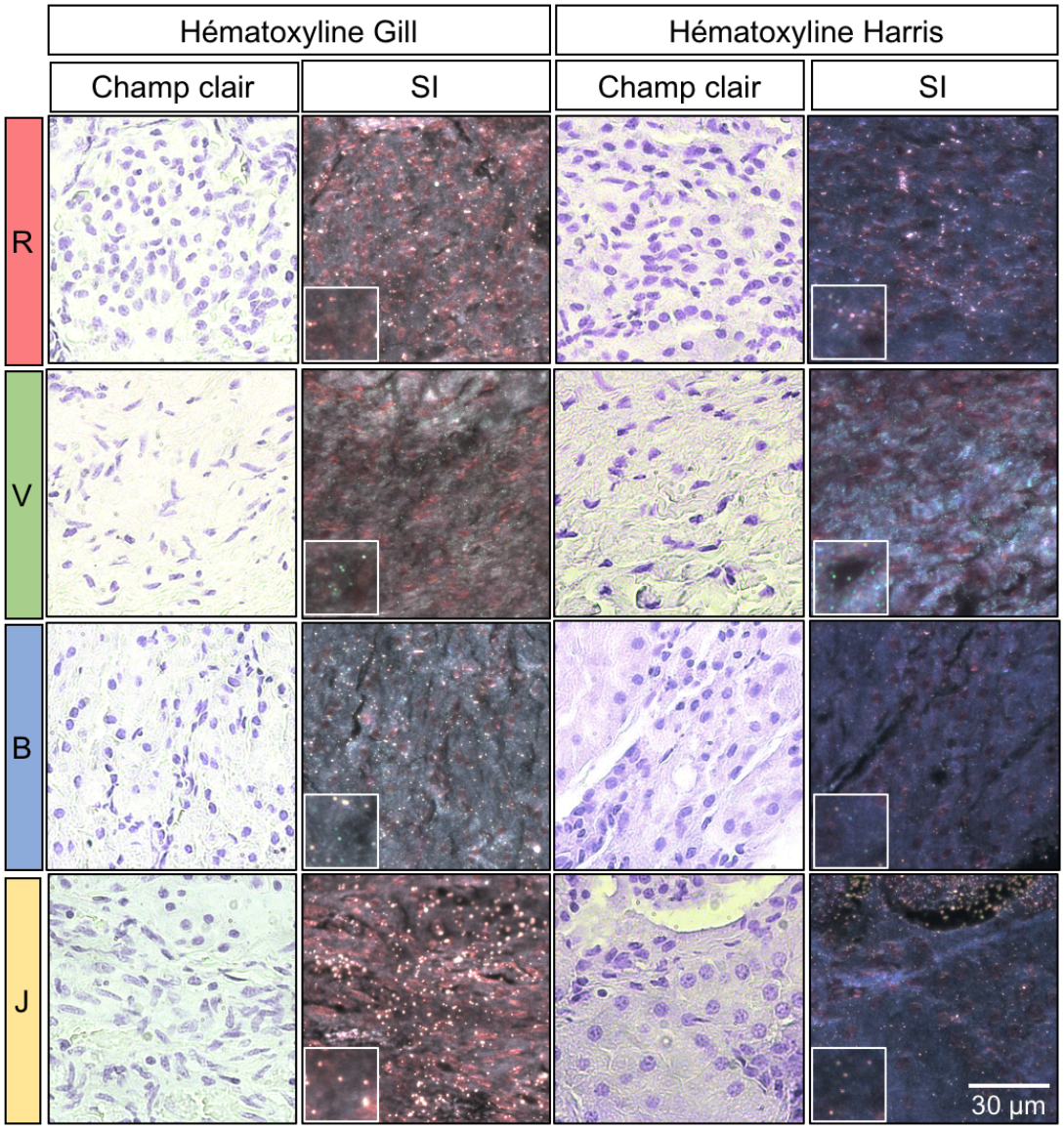


Figure A.9 Tissu FFPE coloré avec hématoxyline de Gill ou hématoxyline de Harris et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.

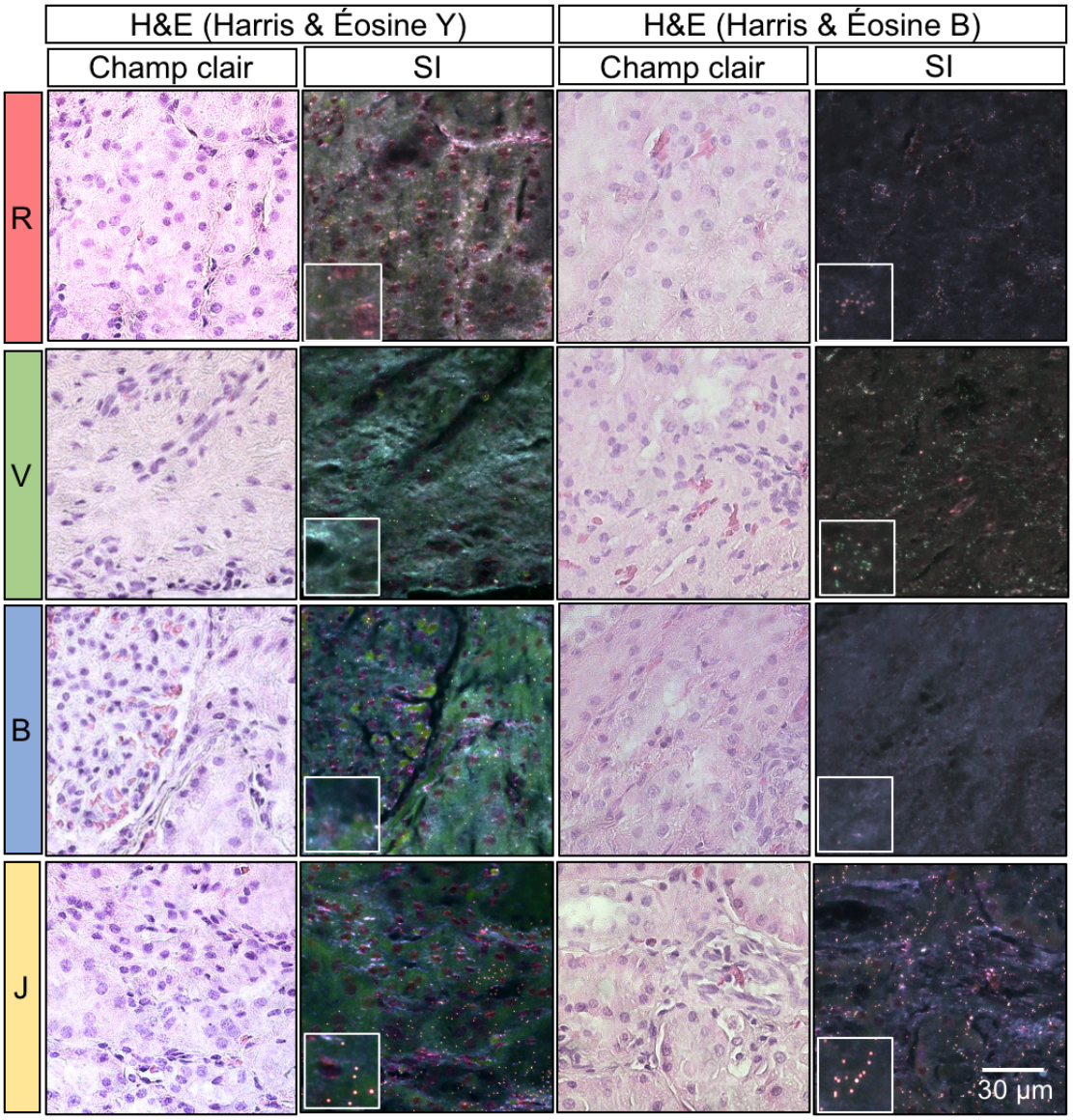


Figure A.10 Tissu FFPE coloré avec hématoxyline de Harris et éosine Y ou hématoxyline de Harris et éosine B et observé en champ clair et avec le dispositif d'illumination latérale (SI) pour la visualisation des nanoparticules rouges (R), vertes (V), bleues (B) et jaunes (J). En médaillon: 15µm x 15µm.