Quantum Dots pour le Ciblage en Cellules Vivantes et la Microscopie HiLo Bi-couleur

Eleonora Muro

▶ **To cite this version:**

Eleonora Muro. Quantum Dots pour le Ciblage en Cellules Vivantes et la Microscopie HiLo Bi-couleur. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . pastel-00631485

HAL Id: pastel-00631485

https://pastel.hal.science/pastel-00631485

Submitted on 12 Oct 2011

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

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

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physique

École doctorale : « La physique, de la Particule à la Matière Condensée »

réalisée au

Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux

présentée par

Eleonora MURO

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Quantum Dots pour le Ciblage en Cellules Vivantes et la Microscopie HiLo Bi-couleur

soutenue le 12 mai 2011

devant le jury composé de :

M^{me}	Claire WILHELM	Rapporteur
M^{me}	Isabelle TEXIER-NOGUES	Rapporteur
M.	Hedi MATTOUSSI	Examinateur
M.	Axel BUGUIN	Examinateur
M^{me}	Sandrine LÉVÊQUE-FORT	Examinateur
M.	Benoit DUBERTRET	Directeur de thèse
M^{me}	Alexandra FRAGOLA	Invitée

« *Gutta cavat lapidem.* »
Lucrezio, De rerum natura

Quantum Dots pour le Ciblage en Cellules Vivantes et la Microscopie HiLo Bi-couleur

Résumé

Les Quantum Dots (QDs) sont des nanocristaux de semiconducteurs qui possèdent des propriétés optiques hors du commun. Leur utilisation comme sondes en biologie nécessite leur solubilisation dans l'eau, grâce à une chimie de surface adaptée, qui influence la taille finale du QD, ses propriétés optiques et son interaction avec l'environnement biologique.

Nous avons développé un nouveau ligand, l'acide dihydrolipoïque-sulfobétaïne (DHLA-SB), qui permet d'obtenir des QDs à la fois petits, stables dans une vaste gamme de pH, dans des solutions saturées en sel et dans le temps, et avec une très faible adsorption non spécifique sur les cellules.

Nous avons observé et caractérisé le comportement intracellulaire des QDs DHLA-SB au cours du temps et nous l'avons comparé à celui de deux autres classes de QDs : cette étude a clairement montré l'influence de la chimie de surface sur le devenir intracellulaire des nanoparticules et a révélé une stabilité accrue des QDs DHLA-SB.

Nous nous sommes également intéressés à la fonctionnalisation des QDs avec la streptavidine (SA) ou la biotine afin de marquer spécifiquement des cellules vivantes ou fixées. Les QDs-SA DHLA-SB obtenus ont permis de suivre un récepteur membranaire ou encore de marquer de façon spécifique une protéine biotinylée à l'intérieur de cellules vivantes, bien plus efficacement qu'avec les QDs-SA commerciaux (Invitrogen).

Enfin, nous avons proposé d'utiliser les QDs DHLA-SB pour améliorer une technique de microscopie à illumination structurée, la microscopie HiLo bi-couleur, et obtenir une coupe optique (type image confocale) d'échantillons biologiques épais en une seule image.

Mots clés

Quantum Dots, dihydrolipoïque - sulfobétaïne, biologie cellulaire, stabilité colloïdale, ciblage, microscopie HiLo bi-couleur

Quantum Dots for specific targeting in live cells and HiLo two-color microscopy

Abstract

Quantum Dots (QDs) are semiconductor nanocrystals with unique optical properties. Their use as probes in biology requires their water solubilization through an adapted surface chemistry which will determine the QD final size, its optical properties and its interaction with the biological environment.

We propose a new ligand for QD water solubilization, the dihydrolipoic acid - sulfobetaine (DHLA-SB), which combines simultaneously small size, good stability in a large pH range, in saturated salt solutions and during time and with very low non specific adsorption to cellular membranes.

Afterwards we analyzed the intracellular behavior of DHLA-SB QDs during time and we compared it to two other QD classes. This study clearly demonstrated the surface chemistry influence on the intracellular fate of the nanoparticules and also revealed an increased stability of DHLA-SB QDs.

We then functionalized the QDs with streptavidin (SA) or biotin to specifically label live and fixed cells. We demonstrated how DHLA-SB QDs-SA are able to efficiently stain a membrane receptor as well as an intracellular biotinylated protein into living cells, with a higher specificity than commercial QDs-SA (Invitrogen).

Lastly we proposed to use DHLA-SB QDs as probes for a new structured illumination imaging technique, two-color Hilo microscopy, which allows to obtain an optical section (similar to a confocal image) of a thick biological sample with only one image acquisition.

Keywords

Quantum Dots, dihydrolipoic acid - sulfobetaine, cellular biology, colloidal stability, targeting, two-color HiLo microscopy

Table des matières

Introduction **1**

1 Solubilisation des Quantum Dots dans l'eau **9**

1.1 Etat de l'art 9

1.2 Le ligand DHLA-Sulfobétaïne 15

1.2.1 Description générale et préparation des QDs DHLA-SB . 15

1.2.2 Caractérisation des QDs DHLA-SB 17

1.3 Conclusions et perspectives 20

2 Stabilité intracellulaire des Quantum Dots **25**

2.1 L'internalisation de QDs dans le cytoplasme de cellules vivantes 25

2.2 Étude de la stabilité colloïdale intracellulaire 29

2.2.1 Internalisation en cellules HeLa par électroporation . . . 32

2.2.2 Internalisation en cellules HeLa par pinocytose 35

2.2.3 Internalisation dans des embryons de *Xenopus Laevis* par microinjection 38

2.2.4 Des ligands dynamiques à la surface de QDs 41

2.2.5 Diminution de la fluorescence au cours du temps des QDs internalisés par pinocytose 46

2.3 Conclusions 50

2.4 Perspectives 50

3 Les Quantum Dots comme sondes spécifiques **53**

3.1 Méthodes de fonctionnalisation des QDs 53

3.2 Fonctionnalisation des QDs micelle 56

3.2.1 Conditions de réalisation du marquage immunofluorescent 57

3.2.2 Conclusions et perspectives pour le marquage immunofluorescent sur cellules fixées 65
3.3 Fonctionnalisation des QDs-DHLA-SB 67
3.3.1 Marquage sur cellules vivantes de récepteurs membranaires CB1 71
3.3.2 Marquage intracellulaire de la giantine en cellules vivantes 77
3.3.3 Conclusions et perspectives pour le marquage spécifique sur cellules vivantes 82

4 Les Quantum Dots pour la microscopie HiLo 85
4.1 Coupe optique : état de l'art 85
4.2 Microscopie à Illumination Hybride (HiLo) 90
4.2.1 Reconstruction de la coupe optique à partir des images HiLo : classique et bi-couleur 91
4.2.2 Mise en oeuvre expérimentale du microscope HiLo bi-couleur 94
4.3 Réalisation de coupes optiques sur des échantillons tests et des échantillons biologiques en mouvement. 96
4.3.1 Billes d'agarose marquées avec une sonde spécifique bi-couleur 96
4.3.2 Embryons de *Xenopus Laevis* marqués avec les deux fluorophores non liés 101
4.3.3 Avantages, limites et perspectives du microscope HiLo bi-couleur 105

Conclusion 109

Bibliographie 113

Remerciements 125

Introduction

Les Points Quantiques, ou Quantum Dots (QDs) en anglais, sont des cristaux de taille nanométrique composés de semiconducteurs qui présentent des propriétés optiques hors du commun. En particulier les QDs sont des fluorophores très brillants et sont extrêmement résistants au photoblanchiment. Ils présentent de plus un spectre d'absorption très large et un spectre d'émission de fluorescence très étroit dans le visible et le proche infrarouge. Toutes ces propriétés exceptionnelles réunies dans un seul objet ont généré ces 15 dernières années beaucoup d'études et d'efforts en vue d'utiliser les QDs comme sondes pour l'imagerie biologique. Dans ce chapitre, nous décrirons les propriétés des QDs qui ont permis de dépasser certaines limites liées aux caractéristiques des fluorophores organiques et qui ont rendu possibles de nouvelles applications en biologie. Pendant ma thèse, je me suis impliquée dans les travaux concernant la solubilisation dans l'eau, la fonctionnalisation des QDs et leur utilisation comme sondes intracellulaires. J'ai aussi utilisé les QDs pour la réalisation d'une sonde bi-couleur qui, couplée à l'utilisation d'une technique de microscopie à illumination structurée, a permis de réaliser des images de fluorescence 3D pour l'étude dynamique d'échantillons biologiques épais.

Qu'est-ce que c'est un Quantum Dot ?

Les QDs sont des nanocristaux de semiconducteur fluorescents : on peut observer leur structure cristalline sur la Figure 1 A qui représente une image de microscopie électronique à transmission à haute résolution. Ces nanoparticules sont synthétisées en milieu organique et sont composées d'un coeur, fait le plus souvent de Cadmium (Cd) et de Sélénium (Se) et qui émet dans le visible, [1][2] recouvert d'une coque, le plus souvent en Zinc (Zn) et Soufre (S), qui protège le coeur et permet d'obtenir de meilleurs rendements quantiques. [3][4]

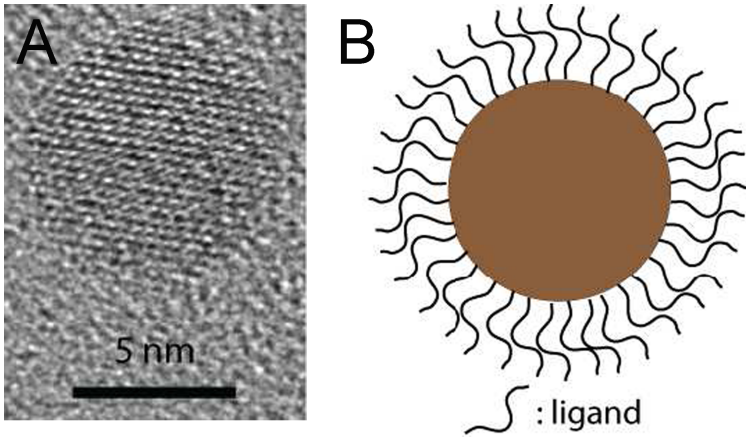


FIGURE 1 – Image de microscopie électronique à transmission (TEM) à haute résolution d'un nanocristal de semiconducteur (A). Schéma d'un quantum dot avec ses ligands de fin de synthèse (B).

Au cours de ma thèse, j'ai principalement utilisé des QDs multicoques (CdSe/CdS/ZnS) qui permettent d'atteindre des rendements quantiques encore plus élevés, jusqu'à 80-90%. [5] La coque est recouverte de ligands organiques qui passivent également la surface (Figure 1 B) et assurent la stabilité colloïdale des particules en solution. Les QDs peuvent être synthétisés avec différents matériaux (Figure 2) en fonction de la longueur d'onde, de la taille, de la biocompatibilité et du rendement quantique souhaités. Pour un matériau donné, la longueur d'onde d'émission des QDs dépend de la taille des nanocristaux pour des raisons de confinement quantique (Figure 4 A et B). [6] Le diamètre d'un QD est de l'ordre de quelques nanomètres et est comparable à la taille des protéines couramment utilisées en biologie, comme la Green Fluorescent Protein (GFP), la streptavidine et les anticorps, mais est au moins cinq fois plus gros que la plupart des fluorophores organiques, comme par exemple l'isothiocyanate de la fluorescéine (FITC) (Figure 3).

Propriétés optiques des QDs par rapport à celles des fluorophores organiques

Contrairement aux fluorophores organiques, les QDs présentent tous, quelle que soit leur taille, un spectre d'absorption large (avec une section efficace élevée dans le bleu et l'ultra-violet) qui permet de tous les exciter simultanément avec une seule source (Figures 4 A et C). De plus, dans le cas des synthèses de

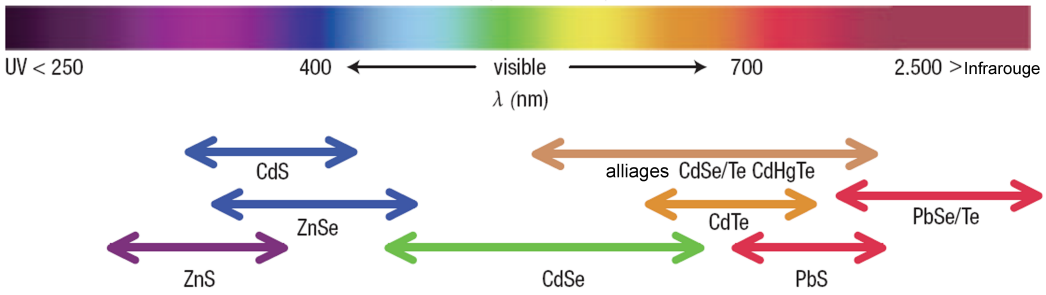


FIGURE 2 – Matériaux disponibles pour la synthèse de Quantum Dots et permettant d'obtenir des sondes dans l'ensemble des spectres visible et infrarouge. [7]

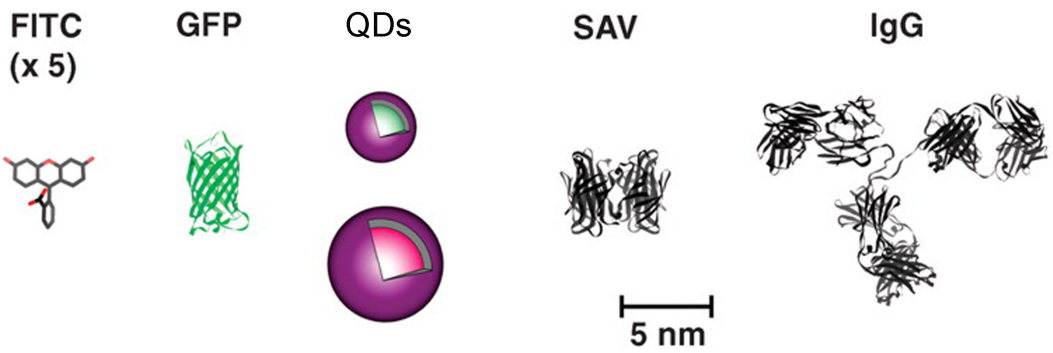


FIGURE 3 – Comparaison de la taille d'un QD (CdSe/ZnS vert = 4nm et rouge = 6,5 nm de diamètre) à celle d'autres fluorophores (isothiocyanate de la fluorescéine (FITC), Green Fluorescent Protein, (GFP)) et de protéines pour le ciblage (streptavidine (SAV) et anticorps (IgG)). [8]

QDs émettant dans le visible, ils présentent des spectres d'émission très fins (de l'ordre de 30 nm de largeur à mi-hauteur), symétriques et dont la longueur d'onde d'émission moyenne est directement reliée au diamètre (Figures 4 A et B) pour des raisons de confinement quantique. Il est donc aisé de séparer spectralement leurs émissions et ainsi réaliser une imagerie multi-couleur simultanée de 5 à 6 QDs de tailles et donc de couleurs différentes. [9][10] Ceci reste difficile avec les fluorophores organiques à cause de leurs spectres d'absorption trop étroits et de l'asymétrie et du recouvrement de leurs spectres d'émission (Figures 4D et E).

Les QDs sont aussi des sondes très brillantes, car ils possèdent des sections efficaces d'absorption plus grandes (environ deux ordres de grandeur) que les fluorophores organiques et de bons rendements quantiques (50 à 80%). Notons également que leurs sections efficaces d'absorption à deux photons sont plus élevées que celles des fluorophores organiques. [11]

Cela fait des QDs des sondes très prometteuses pour la détection de tumeurs : comme ils sont très brillants ils peuvent en effet être utilisés en très faible quantité ; ils peuvent également émettre dans le proche infrarouge, pour une imagerie en profondeur non invasive des tissus épais (∼2-3 cm). Les fluorophores organiques au contraire ont de très faibles rendements quantiques dans la fenêtre spectrale du proche infrarouge. De plus, les QDs possèdent de grandes sections efficaces d'absorption à deux photons, ce qui en fait des sondes particulièrement adaptées à la microscopie de fluorescence à deux photons pour l'imagerie en profondeur (∼0.5 mm) *in vivo*. Beaucoup d'études ont déjà démontré la faisabilité de telles expériences dans le petit animal et beaucoup de travaux actuels portent sur la synthèse de QDs avec des matériaux moins toxiques pour leur utilisation chez l'homme. [12]

De plus, grâce à leurs bons rendements quantiques et à leurs sections efficaces d'absorption très larges, les QDs sont aussi de bons donneurs pour le transfert résonant d'énergie (FRET pour Förster Resonance Energy Transfer en anglais, qui correspond à un transfert non radiatif d'énergie entre deux fluorophores) à un autre fluorophore. Cela a été beaucoup exploité et plusieurs applications ont été développées sur la base de ce mécanisme. [13][14] Par exemple, le FRET entre les QDs et la protéine fluorescente mCherry a été utilisé pour détecter l'activité de l'enzyme caspase-3. [15]

Un autre avantage fondamental des QDs par rapport aux fluorophores organiques est leur grande résistance au photoblanchiment (Figure 5) qui permet d'observer un QD unique pendant plusieurs minutes et d'étudier des phénomènes dynamiques avec des durées d'observation plus longues. [9][16] Cette propriété, couplée à leurs bons rendements quantiques et à leurs grandes sections efficaces d'absorption, a notamment permis l'utilisation de QDs dans le suivi de molécules uniques. Une belle étude menée par Zhang *et al.* en 2009 [17] a montré qu'il est possible de marquer des vésicules neuronales avec des QDs uniques pour distinguer différents mécanismes de sécrétion vésiculaire grâce au suivi de leur fluorescence en fonction du pH. Courty *et al.* ont, quant à eux, démontré pour la première fois en 2006 la possibilité de suivre des molécules uniques (dans ce cas la kinésine) marquées avec des QDs à l'intérieur du cytoplasme de cellules vivantes. [18]

Les QDs possèdent néanmoins une propriété, qui peut être un avantage tout comme un inconvénient en fonction de l'application : le clignotement. [19] Ces fluctuations de leur intensité de fluorescence entre un état «brillant» et un état «noir» au cours du temps peuvent permettre de les identifier comme particules individuelles mais sont aussi limitantes dans le cas du suivi de particule unique. Pour dépasser cette difficulté, des QDs quasi non clignotants ont été développés. [20]

Les QDs se distinguent des fluorophores traditionnels aussi pour leurs temps de vie qui sont plus longs et peuvent varier de 10 à quelques centaines de nanosecondes. Pour l'observation d'échantillons biologiques, cela permet par exemple de faire de l'imagerie résolue en temps pour s'affranchir de l'autofluorescence des tissus, caractérisée par des temps de vie très courts (quelques nanosecondes). [21][22]

Les QDs permettent également la réalisation de microscopie corrélative optique et électronique afin de visualiser la même nanoparticule et de combiner les informations obtenues par ces deux techniques de microscopie, optiques et structurales, et ainsi contourner les limites de chacune d'elles en termes de sensibilité et de résolution spatiale. [23]

Les QDs ont donc un très grand potentiel pour les applications biologiques. Néanmoins la taille de ces nanoparticules, en général plus grande que celle des fluorophores organiques, peut être limitante, non seulement d'un point

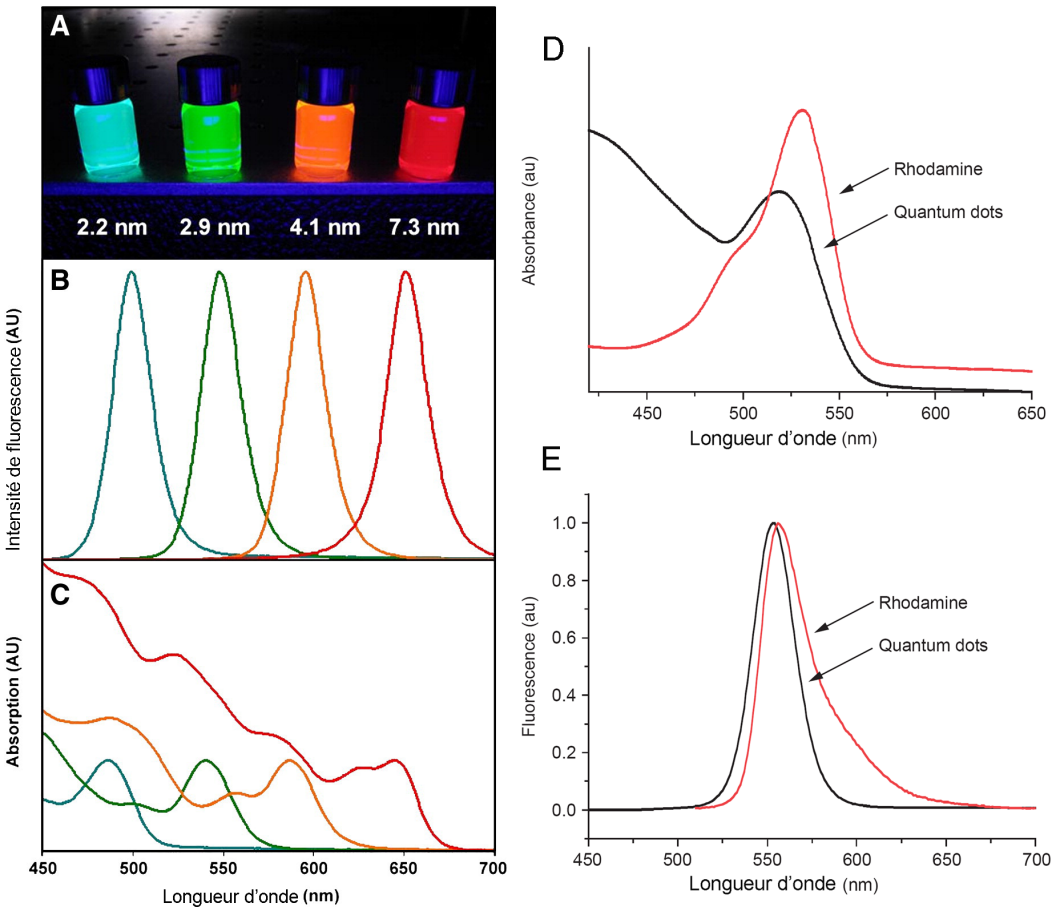


FIGURE 4 – Spectres d'absorbance (C et D) et d'émission de fluorescence (B et E) de Quantum Dots de même composition chimique et de tailles croissantes (A, B, C) et de Quantum Dots comparés à la Rhodamine. Les images A, B et C proviennent de la référence [24] et les images D et E de la référence [25].

de vue stérique mais aussi parce qu'une surface plus grande est exposée aux interactions avec le milieu biologique environnant, ce qui peut augmenter les problèmes d'adsorption non spécifique. C'est pour optimiser l'interaction de ces nanoparticules avec les systèmes biologiques que beaucoup d'études sont menées à ce jour (dont celles de notre laboratoire), notamment à travers le développement de chimies de surface adaptées à la solubilisation des QDs dans l'eau. Ces efforts permettront d'élargir et de faciliter leur utilisation pour les applications biologiques.

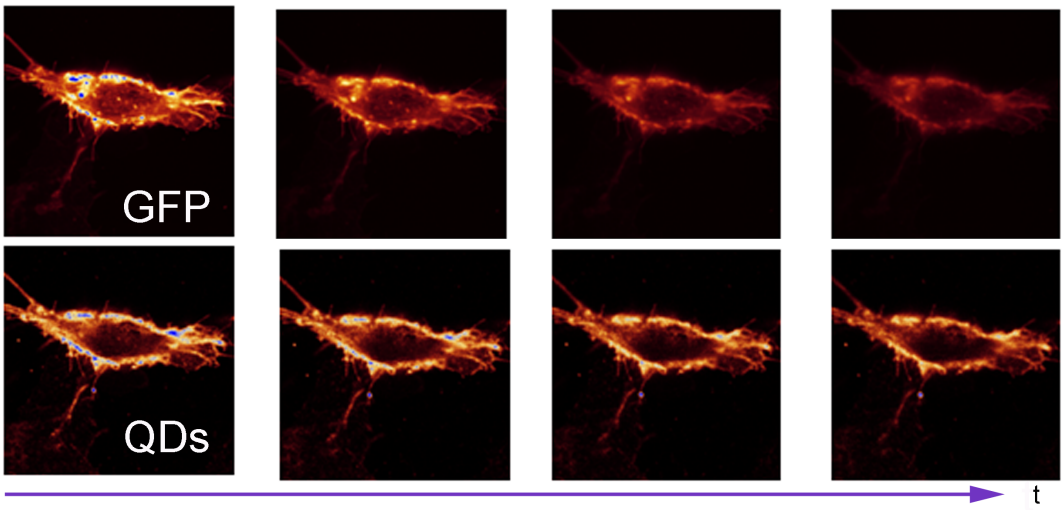


FIGURE 5 – Suivi au cours du temps de la chute du signal de fluorescence (photoblanchiment) de la GFP comparée à la persistence du signal des QDs.

L'équipe «Synthèse et imagerie de sondes inorganiques» en 2011

Dans l'équipe de Benoît Dubertret « Synthèse et imagerie de sondes inorganiques », il est possible d'étudier les nanocristaux de semiconducteurs depuis leur synthèse, en passant par la caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques et optiques, leur solubilisation dans l'eau et leur fonctionnalisation jusqu'à leur utilisation, notamment en imagerie cellulaire, avec des microscopes optiques originaux et développés au sein du groupe. Ceci est rendu possible grâce à la réunion de chercheurs et d'ingénieurs ainsi que d'étudiants d'horizons différents et complémentaires, et travaillant tous autour de ces sondes nouvelles et prometteuses que sont les QDs. C'est grâce à cet environnement d'exception et au travail d'équipe que mon projet pluridisciplinaire a abouti.

Plan du manuscrit

Dans le Chapitre 1 nous verrons comment solubiliser les Quantum Dots dans l'eau et nous décrirons l'approche que nous avons proposée : un ligand zwitterionique, l'acide dihydrolipoïque-sulfobétaïne (DHLA-SB), accroché directement sur le QD et qui permet d'obtenir des nanoparticules hydrosolubles de petite taille et avec une bonne stabilité.

Dans le Chapitre 2 nous résumerons les méthodes qui permettent d'intro-

duire des QDs à l'intérieur d'une cellule vivante. Nous exposerons ensuite une étude comparative de la stabilité cellulaire démontrant que les QDs DHLA-SB sont stables plus longtemps que les QDs dotés d'autres chimies de surface, quelle que soit la technique d'introduction intracellulaire utilisée.

Dans le Chapitre 3 nous décrirons les méthodes utilisées pour la fonctionnalisation des QDs et nous présenterons notre approche avec les QDs encapsulés dans des micelles de phospholipides-polyéthylène glycol (PL-PEG) et les QDs DHLA-SB. Nous montrerons aussi quelques exemples d'applications et nous détaillerons quelques protocoles que nous avons mis au point.

Dans le Chapitre 4, nous verrons quelles sont les techniques microscopiques qui permettent d'obtenir une image de type confocale, c'est-à-dire de s'affranchir de la lumière parasite provenant des plans hors du plan de mise au point. Nous décrirons enfin la technique de microscopie à illumination hybride (HiLo) bi-couleur que nous avons développée pour augmenter la cadence en réalisant une coupe optique plein champ à partir d'une seule acquisition d'image.

Chapitre 1

Solubilisation des Quantum Dots dans l'eau

1.1 Etat de l'art

Les synthèses de nanocristaux de semiconducteur permettant d'obtenir de bons rendements quantiques s'effectuent le plus souvent en solvant organique. L'utilisation des QDs comme sondes en biologie nécessite donc avant tout leur solubilisation dans l'eau, grâce à une chimie de surface adaptée. Celle-ci doit présenter au moins deux fonctionnalités : une partie qui garantit l'accrochage à la nanoparticule et une autre hydrophile qui permet la solubilisation dans l'eau. De leurs natures dépendent non seulement la stabilité de la nanoparticule dans l'eau mais aussi les propriétés optiques et d'adsorption non spécifique de la sonde. C'est pourquoi le choix de la chimie de surface est très critique pour les applications des QDs en biologie et en particulier du point de vue de :

1. la taille finale de la nanoparticule,
2. sa stabilité colloïdale et son interaction avec le milieu biologique environnant,
3. ses propriétés optiques.

La taille finale des QDs est un paramètre essentiel pour leur utilisation comme sondes en biologie car elle peut empêcher l'accès à des cibles cellulaires comme par exemple les récepteurs des synapses neuronales ou leur élimination rénale dans le cas d'applications *in vivo* chez le petit animal.

La stabilité colloïdale des nanoparticules traduit leur capacité à rester individuelles et libres de diffuser en solution. La chimie de surface hydrosoluble doit éviter l'agrégation des nanoparticules dans le milieux aqueux. Comme cela sera discuté en détail au Chapitre 2, les molécules qui constituent la chimie de surface sont très probablement en équilibre entre la forme accrochée à la surface de la nanoparticule et la forme libre en solution : cet équilibre, qui dépend fortement de l'affinité de ces molécules pour la surface du QD, est un concept fondamental pour comprendre et optimiser la stabilité colloïdale des nanoparticules *in vitro* et *in vivo*. Dans un milieu cellulaire, cette désorption des molécules de la surface du QD peut devenir irréversible car une fois détachées, elles peuvent elles-mêmes interagir avec l'environnement ou ne plus pouvoir accéder à la surface de la nanoparticule qui aura aussi interagi avec l'environnement biologique (schématisé en Figure 2.11). La mauvaise couverture de la nanoparticule ainsi générée peut entraîner à la fois de l'adsorption non spécifique et la formation d'agrégats. Les interactions non spécifiques des QDs en milieu biologique peuvent aussi être dues à d'autres facteurs. Par exemple la présence d'une charge sur la partie hydrosoluble du ligand à la surface des nanoparticules peut induire des interactions électrostatiques avec les biomacromolécules chargées de signe opposé ou avec la membrane plasmique. Une bonne chimie de surface garantit une grande «furtivité», qui dans ce manuscrit correspond à de très faibles interactions entre nanoparticules et biomacromolécules. L'adsorption non spécifique et la perte de stabilité colloïdale des QDs sont problématiques pour leur utilisation comme sondes, notamment parce que les nanoparticules constitueront alors un signal non spécifique qui «polluera» celui du marquage d'intérêt.

Les propriétés optiques des QDs peuvent subir des modifications en milieu aqueux. Par exemple, le rendement quantique des QDs peut diminuer après leur solubilisation dans l'eau pour plusieurs raisons, entre autres l'interaction de molécules, comme par exemple les radicaux libres, avec leur surface. Ce phénomène est très fortement lié à la méthode de solubilisation choisie et à la nature chimique de la nanoparticule. Une bonne chimie de surface permettra également de protéger les QDs dans l'échantillon et de limiter les phénomènes de photoblanchiment ou de photoactivation induits par l'environnement aqueux.

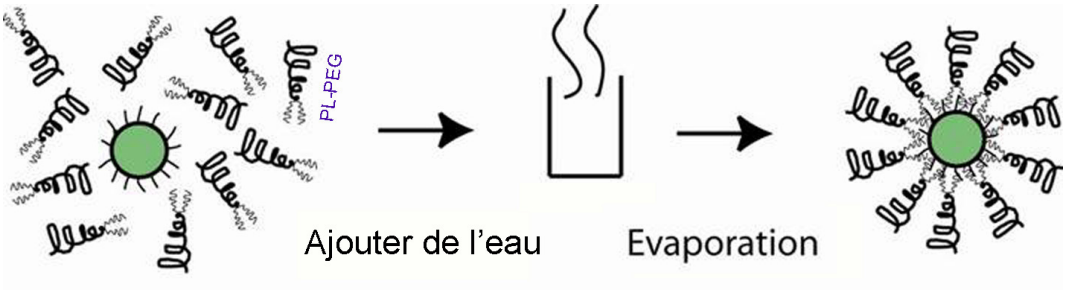


FIGURE 1.1 – Schéma de l'encapsulation des QDs dans des micelles de phospholipides - PEG : les QDs et les phospholipides PEG sont mélangés dans du chloroforme, auquel on ajoute de l'eau, le chloroforme est ensuite évaporé pour conduire à la formation de QDs-micelle.

Deux approches principales pour rendre les QDs solubles dans l'eau sont envisageables : l'échange des ligands qui se trouvent à leur surface après synthèse et l'encapsulation des QDs dans des polymères amphiphiles PEGylés (comme dans le cas des QDs commerciaux, Invitrogen) ou dans des surfactants de type phospholipides – polyéthylène glycol (PEG) (Figure 1.1, Figure 1.2 A), nommés «QDs-micelle». [26][27]

Les molécules amphiphiles utilisées pour l'encapsulation interagissent avec la couche de ligands organiques grâce à leur partie hydrophobe alors que leur partie hydrophile garantit la solubilité en milieu aqueux. Cette technique de solubilisation dans l'eau est simple et permet de préserver les propriétés optiques des QDs. En effet la couche hydrophobe constituée à la fois des ligands de synthèse et de l'unité hydrophobe des polymères est épaisse et constitue donc une barrière imperméable aux molécules d'eau. Toutefois les objets obtenus sont peu stables [1] car les interactions hydrophobes qui lient ces molécules aux QDs sont assez faibles. De plus l'importante couche de polymères ou de surfactants nécessaire à la solubilisation en milieu aqueux conduit à des particules dont le rayon hydrodynamique (R_H) est grand (typiquement $R_H > 15$ nm). On utilise le plus souvent du PEG comme groupement hydrophile, dont la longueur doit être suffisante pour assurer la furtivité des nanoparticules. Nous avons vérifié l'influence de la taille du PEG sur la furtivité des nanoparticules encapsulées dans des micelles de phospholipides – PEG sur des cellules fixées et perméabilisées. Pour ce test nous avons réalisé des mélanges de phospho-

1. Ce point sera traité plus précisément dans les Chapitres 2 et 3.

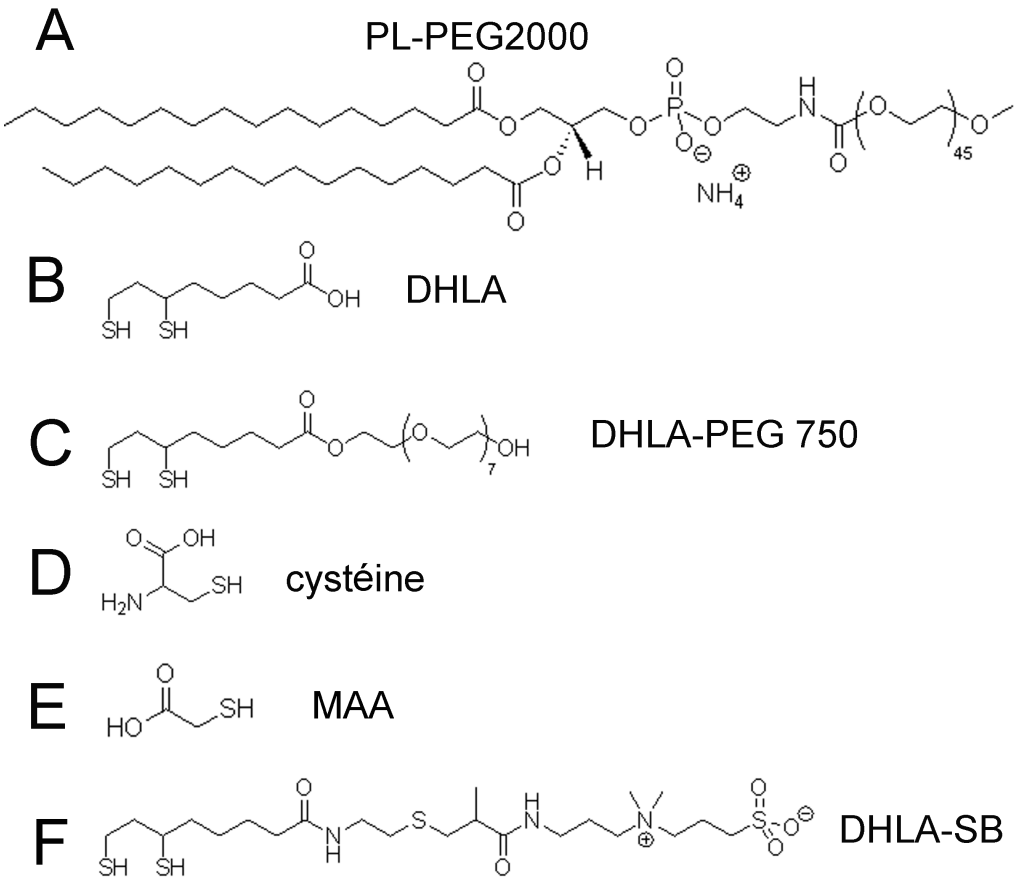


FIGURE 1.2 – Formules chimiques de certains des ligands présentés dans le texte : le phospholipide – PEG pour l'encapsulation en micelles (A), le DHLA (B), le DHLA-PEG750 (C), la Cystéine (D) et le DHLA-SB (E) pour l'échange de ligands.

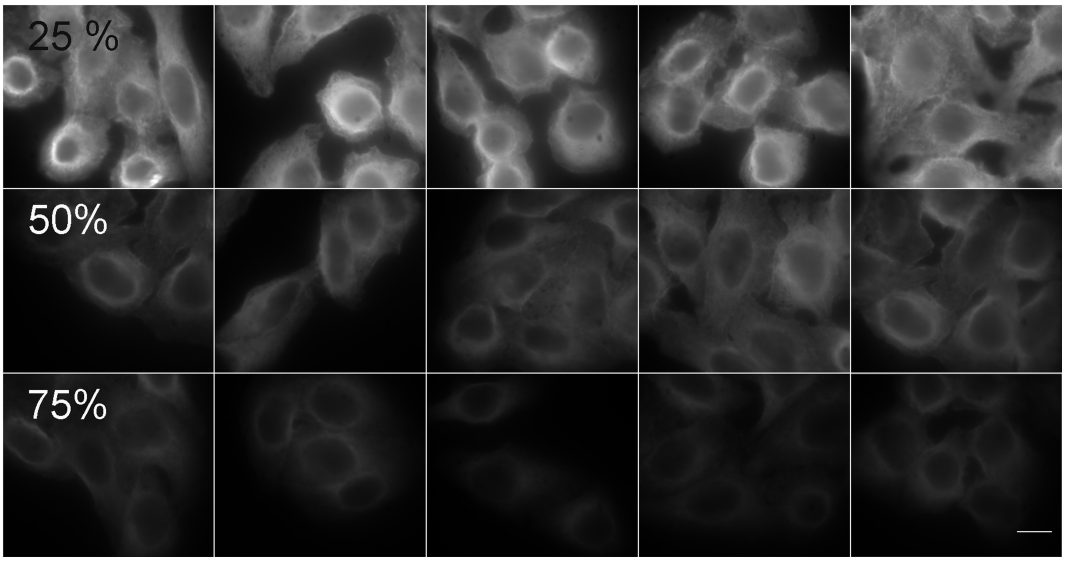


FIGURE 1.3 – Adsorption non spécifique des QDs micelle en fonction du pourcentage de PEG de différentes longueurs : 25% PEG 3000 (75% PEG 750), 50% PEG 3000 (50% PEG 750) et 75% PEG 3000 (25% PEG 750). Les images ont été acquises dans des conditions identiques et sont représentées avec le même contraste. La barre d'échelle vaut 10 µm.

lipides recouverts par des PEG courts (750 g/mol) [2] et des PEG longs (3000 g/mol) pour vérifier que les QDs encapsulés dans des micelles à pourcentage plus élevé en PEG long présentent une plus faible adsorption non spécifique, comme on peut l'observer dans la Figure 1.3.

La technique d'échange des ligands permet de remplacer les ligands de surface hydrophobes présents en fin de synthèse sur les QDs par des ligands dont une extrémité est hydrophile et donc soluble dans l'eau, l'autre assurant l'accroche sur le QD. Le choix des ligands a été beaucoup étudié ces dernières années et beaucoup d'efforts ont été faits pour obtenir des QDs solubles dans l'eau qui soient à la fois petits, furtifs et stables dans le sel et dans une large gamme de pH.

Le groupement d'accroche sur le QD le plus utilisé dans la technique d'échange de ligands est le thiol.

Les QDs peuvent être échangés avec des ligands terminés par un monothiol, comme par exemple la cystéine (voir Figure 1.2 D), [28] ou les acides mercaptoalcanoïques, comme l'acide mercaptoacétique (MAA, voir Figure 1.2 E). [29]

2. Nombre de motifs d'éthylène glycol ≈ 15.

Toutefois les QDs obtenus sont peu stables car l'accrochage du ligand au QD n'est pas suffisamment fort. [30] De plus ces ligands ont tendance à s'oxyder en dimères [3], ce qui provoque leur désorption des QDs et donc la perte de stabilité colloïdale des nanoparticules. Pour augmenter la stabilité de la cystéine sur les QDs, Liu *et al.* [28] ajoutent un réducteur (comme le borohydrure de sodium ou le dithiothréitol) à la solution pour éviter la formation de cystines (dimères de cystéines), mais ces réducteurs sont toxiques et s'hydrolysent rapidement en milieu biologique.

Pour résoudre le problème de la faible stabilité des ligands se terminant par des monothiols, il a été proposé un groupement d'accroche bidenté : l'acide dihydrolipoïque (DHLA, voir Figure 1.2 B). Le DHLA présente deux groupes thiols qui permettent un accrochage plus fort aux QDs alors plus stables.

La partie hydrophile des ligands garantit quant à elle la solubilisation dans l'eau des nanoparticules.

La solubilisation des petits ligands comme le MAA ou le DHLA est assurée par la présence d'une fonction terminale carboxylate. La stabilité colloïdale est due à la répulsion électrostatique entre les nanoparticules chargées négativement. Cette stabilité diminue fortement en milieu salin par écrantage électrostatique et en milieu acide par protonation des fonctions acides. De plus ces groupements anioniques peuvent interagir avec des biomacromolécules présentant des charges cationiques. [31][32]

Ces problèmes furent partiellement résolus par le couplage sur les groupements d'accroche de chaînes de polyéthylène glycol (PEG, voir Figure 1.2 C), connues pour limiter les interactions non spécifiques, [33] mais au prix d'un accroissement de la taille. Néanmoins il a été rapporté que le PEG est moins furtif à 37°C (la température utilisée pour la culture cellulaire humaine) [34] et qu'il s'adsorbe à certaines protéines comme l'apolipoprotéine E, l'albumine et les anticorps IgG. [35]

Les groupes zwitterioniques, qui possèdent à la fois une charge positive et une charge négative mais dont la charge globale est neutre, offrent une solution alternative au PEG pour limiter l'adsorption non spécifique tout en conservant une petite taille, de l'ordre de 5 nm de rayon hydrodynamique. Comme nous l'avons déjà mentionné, en 2007 l'équipe de Bawendi a proposé l'utilisation

3. Par formation de ponts disulfures.

de la cystéine comme ligand zwitterionique des QDs : cela permet d'obtenir des nanoparticules très petites mais présente des contraintes de pH. En effet la cystéine a une charge globale non neutre à pH <6 et >9 qui entraîne une augmentation des interactions non spécifiques. Ce groupe a néanmoins montré que la petite taille des QDs obtenus leur permet, une fois injectés dans le petit animal, d'être éliminés dans la vessie. [36]

De façon similaire, la D-pénicillamine, récemment proposée par Breus *et al.*, présente les mêmes problèmes. [37]

D'autres zwitterions biomimétiques ont été utilisés comme ligands des nanoparticules d'or : la sulfobétaïne [38] et la phosphorylcholine, [39] qui est un composant des membranes cellulaires. Les deux groupes chargés sont stables dans une large gamme de pH : en effet, l'ammonium quaternaire (présent dans les deux) reste stable quel que soit le pH et le sulfonate (pour la sulfobétaïne) et le phosphate (pour la phosphorylcholine) ont un $pK_{\mathrm{a}} < 2$. Les nanoparticules d'or ainsi obtenues sont stables [4] mais l'unité d'accrochage est un monothiol, donc ne sera pas un ligand suffisamment fort pour les QDs, comme nous l'avons indiqué ci-dessus.

Notre équipe a alors proposé d'utiliser un nouveau ligand hétérobifonctionnel, qui combine un groupe d'accroche stable, le DHLA, et une partie hydrophile de nature zwitterionique, la sulfobétaïne (DHLA-SB, Figure 1.2 F). [40]

1.2 Le ligand DHLA-Sulfobétaïne

1.2.1 Description générale et préparation des QDs DHLA-SB

Le ligand DHLA-SB présente à la fois un groupe zwitterionique qui garantit la solubilisation dans l'eau et un dithiol qui lui permet de s'accrocher sur le QD de façon plus stable qu'un monothiol. Les QDs DHLA-SB obtenus sont très petits (5-6 nm de rayon hydrodynamique) et très stables dans les solutions saturées en sel, dans une large gamme de pH (de 4 à 13) et au cours du temps (pendant au moins 8 mois). De plus, ils présentent très peu d'interactions non

4. L'affinité des thiols pour l'or est très forte.

spécifiques avec les membranes cellulaires, ce qui constitue un avantage décisif pour leur utilisation comme marqueurs spécifiques en biologie.

La synthèse du DHLA-SB a été développée au sein du laboratoire par Nicolas Lequeux et Thomas Pons. Cette synthèse est réalisée en trois étapes à partir d'un précurseur commercial (le propanesulfonate de 3-[N,N'-diméthyl (acrylamidopropyl) ammonium] , distribué par RASCHIG GmbH). Le précurseur a été modifié en ajoutant un groupe amine qui lui permet de réagir avec le groupe carboxyle de l'acide thioctique (TA) pour former un amide. Le ligand TA-sulfobétaïne ainsi obtenu est conservé à +4°C sous cette forme.

Pour l'échange de ligands (voir le schéma de la Figure 1.4), 50 mg de TA-sulfobétaïne sont dissous dans 2 mL d'une solution aqueuse 20 mM en NaCl, dans un bain de glace à 0°C. Une fois la solution refroidie, on ouvre le pont disulfure de la partie TA (pour obtenir la fonction dithiol de type DHLA) avec 20 mg de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) sous agitation pendant 30 minutes. On ajoute ensuite 8 nanomoles de QDs dans 1 mL de chloroforme et, après avoir bien mélangé, on met cette solution biphasique à 60°C pour la nuit. On observe le passage de QDs dans l'eau après seulement quelques heures à température ambiante, mais les QDs obtenus sont moins stables probablement parce que l'échange n'est pas complet.

Le lendemain, on récupère la phase aqueuse qui contient désormais les QDs et, après deux filtrations sur membrane 10kDa à 19 000 g (Vivaspin) avec une solution aqueuse 20 mM en NaCl, on la purifie par ultracentrifugation sur gradient de sucrose 20 mM NaCl. En général, une ultracentrifugation de 30 minutes à 200 000 g sur un gradient 10-40% permet de faire migrer suffisamment la bande contenant les QDs, mais ces paramètres doivent parfois être ajustés en fonction de la taille et de la composition des nanoparticules utilisées. On garde les QDs DHLA-SB dans de l'eau légèrement salée (20 mM NaCl) pour écranter le couplage dipolaire entre les groupes anioniques et cationiques (qui pourrait causer l'agrégation des nanoparticules). Il a en effet déjà été démontré [41] que le sel augmente la solubilité des polyzwitterions de sulfobétaïne grâce à la stabilisation des charges.

Les QDs DHLA-SB présentent de bons rendements quantiques dans l'eau et dans le tampon borate (à pH 8) : de l'ordre de 20 à 30 % pour des QDs CdSe/ZnS et de 50 à 60 % pour des QDs CdSe/CdS/ZnS multicoques (à

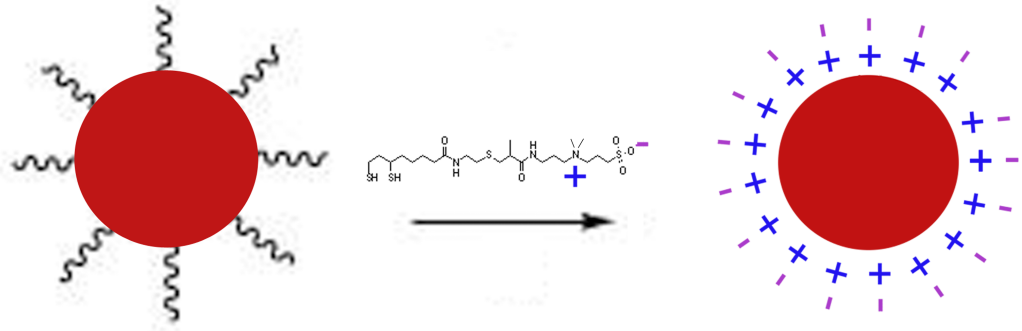


FIGURE 1.4 – Schéma de l'échange des ligands de synthèse avec le DHLA-SB.

comparer à un rendement quantique d'environ 70 % dans l'hexane). De plus, ces QDs sont stables pendant plusieurs mois s'ils sont conservés à +4°C ou -20°C.

1.2.2 Caractérisation des QDs DHLA-SB

Taille Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, l'avantage majeur de cette chimie de surface est l'obtention de QDs de petite taille (parmi les plus petites) tout en préservant les propriétés optiques et la stabilité. Nous avons effectué des analyses en Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering en anglais) qui ont permis de mesurer la taille de ces nanoparticules et de montrer qu'elle est comparable à celle des QDs échangés avec du DHLA. [30] En effet, pour des QDs CdSe/ZnS de 2,25 nm de rayon, mesuré au Microscope Électronique à Transmission (TEM), on obtient un rayon hydrodynamique (R_H, mesuré en DLS) d'environ 5 nm (Figure 1.5), ce qui augmente le rayon global de 2,75 nm. Pour les QDs CdSe/CdS/ZnS, R_H= 6 nm alors que le rayon mesuré en TEM est 3,5 nm, ce qui augmente le rayon global de 2,5 nm (Tableau 1.1). Il a déjà été démontré que des QDs échangés avec du DHLA-PEG 600 (une taille de PEG relativement petite pour des utilisations en biologie, voir Figure 1.3) présentent une augmentation de rayon d'environ 4,6 nm : soit 1,7 fois plus que pour le DHLA-SB. [30] Il y a actuellement peu de ligands qui permettent d'obtenir des QDs plus petits, comme par exemple la cystéine, également de nature zwitterionique, mais qui présente des problèmes de stabilité mentionnés plus haut.

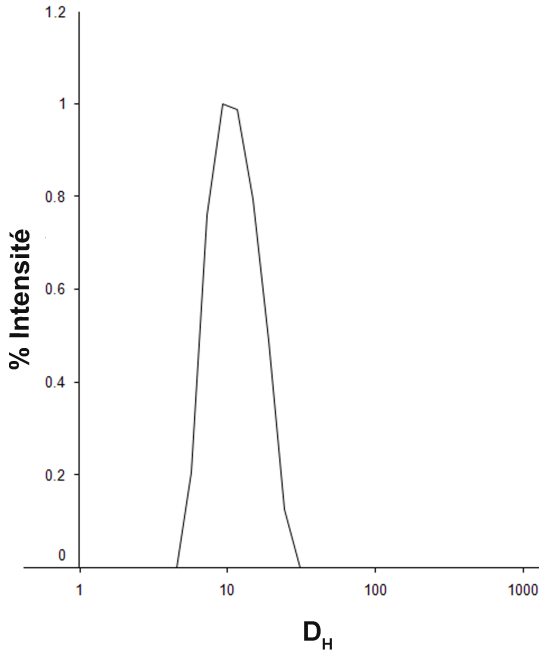


FIGURE 1.5 – Mesure du diamètre hydrodynamique des QDs DHLA-SB par Diffusion Dynamique de la Lumière. Les QDs CdSe/ZnS ici analysés présentent un diamètre au TEM de 4,5 nm.

Stabilité au pH et au sel Les charges présentes sur le groupe zwitterionique sont insensibles aux variations de pH et conduisent à des QDs DHLA-SB stables dans une large gamme de pH (4–13), (Figure 1.6), qui comprend les pH maximum et minimum rencontrés généralement dans un système biologique. A pH 3 on observe une perte de stabilité colloïdale de ces QDs probablement causée par la protonation du DHLA. En effet, à pH acide les thiolates qui interagissent avec la surface de la nanoparticule ont plus de probabilité d'être protonés et donc de se détacher de la nanoparticule. [42]

Les QDs DHLA-SB présentent également une grande stabilité dans des solutions saturées en sel (Figure 1.6), contrairement aux QDs DHLA.

Les mesures en DLS des tailles de QDs DHLA-SB à différents pH, dans une solution saturée en sel ou dans du milieu de culture cellulaire (Tableau 1.1), ont permis de vérifier que leur rayon hydrodynamique change peu et qu'il n'y a donc pas de formation d'agrégats non détectables à l'oeil nu. On observe une petite population ($<1\%$) de nanoparticules agrégées et présentant un R_H de 18 nm à pH 13. La taille calculée à partir du coefficient de diffusion dans la

Solution	R_H(nm)
pH 4	5,8
pH 7	6
pH 11	5,8
pH 13	6,4
saturée en NaCl	5,2
Opti-MEM	6,1

Tableau 1.1 – Rayons hydrodynamiques (R_H) des QDs DHLA-SB dans des solutions à différents pH, dans une solution saturée en sel et dans du milieu de culture cellulaire (Opti-MEM, Invitrogen). Le rayon de ces QDs (CdSe/CdS/ZnS) mesuré au TEM est de 3,5 nm.

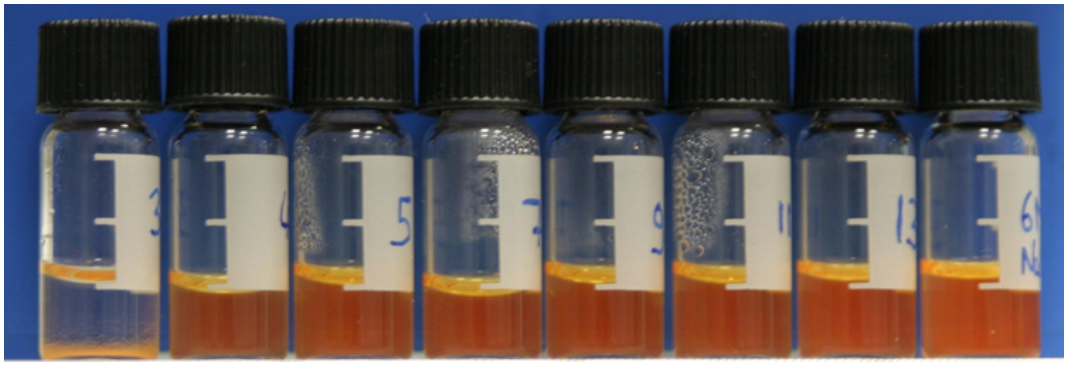


FIGURE 1.6 – QDs (CdSe/CdS/ZnS) DHLA-SB dans des solutions à pH 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13 et dans une solution saturée en NaCl (de gauche à droite).

solution de NaCl saturée est légèrement inférieure aux autres, probablement à cause d'une surestimation de la valeur de viscosité de la solution saturée.

Adsorption non spécifique sur cellules Un point fondamental pour l'utilisation des nanoparticules comme sondes en biologie est la limitation des interactions non spécifiques avec l'environnement.

Nous avons donc testé l'adsorption non spécifique des QDs DHLA-SB sur des cellules HeLa et vérifié qu'elle est comparable à celle des QDs de plus grosse taille, comme les QDs DHLA-PEG et inférieure à celle des QDs DHLA qui présentent environ le même R_H. [30] Pour observer les interactions non spécifiques des QDs avec les cellules, nous avons déposé les cellules HeLa dans des Lab-Tek (Nunc) la veille de l'expérience pour qu'elles soient adhérentes. Nous les avons incubées avec les différents QDs dilués à 0,1 µM ou 1 µM dans du milieu Opti-MEM (Invitrogen) pendant 10 minutes (Figure 1.7 A), 60 minutes (Figure 1.7 B) ou 360 minutes (Figure 1.7 C). Les cellules ont été rincées avec du milieu propre cinq fois puis observées au microscope à illumination structurée. [43] L'adsorption non spécifique sur les cellules des QDs DHLA-SB est comparable à celle des QDs DHLA PEG 750 dans la majorité des conditions et légèrement supérieure à 360 minutes. De plus les interactions avec la membrane cellulaire des QDs DHLA-SB à concentration élevée (1 µM) et avec un long temps d'incubation (360 minutes) étaient significativement inférieures à celles observées avec des nanoparticules de même taille comme les QDs DHLA incubés seulement 10 minutes, à concentration plus faible (0,1 µM).

1.3 Conclusions et perspectives

Nous avons proposé un nouveau ligand zwitterionique bidenté qui permet d'obtenir des QDs ayant à la fois une petite taille (une augmentation du R_H de 2,5 nm par rapport au nanocristal) et une très faible adsorption non spécifique sur les membranes cellulaires (de l'ordre de celle des QDs DHLA-PEG 750, un ligand avec un R_H 1,7 fois plus grand). De plus, les QDs DHLA-SB sont très stables dans une vaste gamme de pH (de 4 à 13) et dans des solutions saturées en sel. Néanmoins, et indépendamment de la protonation des thiolates à pH

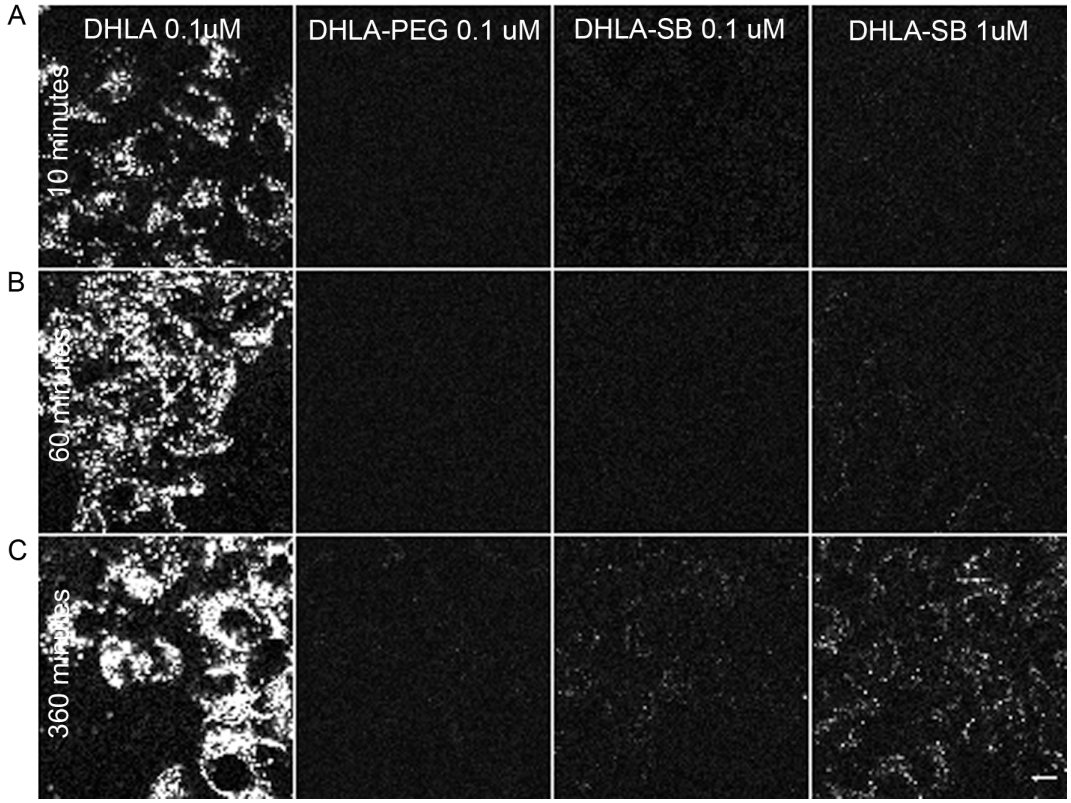


FIGURE 1.7 – Adsorption non spécifique des QDs (CdSe/CdS/ZnS) DHLA, DHLA-PEG 750 et DHLA-SB avec différents temps d'incubation : 10 minutes (A), 60 minutes (B) et 360 minutes (C). Les images ont été acquises dans des conditions identiques et sont représentées avec le même contraste. La barre d'échelle vaut 10 µm.

acide, le DHLA peut s'oxyder spontanément pour reprendre sa conformation native avec un pont disulfure (même à pH neutre) et par conséquent se décrocher de la surface du QD. Ce phénomène est d'autant plus probable que la solution est diluée (Chapitre 2.2.4). Afin d'augmenter la stabilité des QDs, on peut envisager de remplacer le DHLA par des unités d'accrochage plus fortes. Parmi les stratégies alternatives proposées, le groupe de H. Mattoussi a par exemple synthétisé un bis-DHLA(-PEG) [44] qui a permis d'étendre la stabilité colloïdale des QDs de pH 1,1 [5] à 13,9.

Une autre possibilité est d'utiliser des chaînes peptidiques avec plusieurs cystéines pour l'accroche. En 2009 le groupe de V. Marchi-Artzner [45] a proposé d'utiliser un ligand composé d'une courte chaîne peptidique avec un motif tricystéinique pour l'accroche (soit trois thiols), un espaceur composé d'un court PEG (n=6) et un aspartate comme groupe terminal. Ce ligand (nommé peptide ND) est stable dans une plus large gamme de pH que la cystéine seule (pH de 5 à 12) mais au prix d'une légère augmentation de la taille. En 2010, le groupe de M. Dahan a proposé une modification de cette chimie pour pouvoir coupler des biomolécules aux QDs de manière covalente. [46] Ce nouveau ligand est composé de chaînes peptidiques d'une vingtaine d'acides aminés avec un domaine riche en cystéines et se terminant soit par une lysine (30%) soit par une cystéine (30%) pour la fonctionnalisation, soit par du PEG (n=6) (40%) pour la furtivité. Il a aussi été proposé de solubiliser les QDs avec des chaînes de polyaspartate fonctionnalisées avec de la cystéine pour l'accrochage à la nanoparticule, mais la taille des objets obtenus avec cette méthode est encore plus importante qu'avec le peptide ND. [47]

Une autre approche consiste à copolymériser les unités d'accrochage et de solubilisation. Très récemment le groupe de Bawendi a proposé un copolymère d'imidazole (le groupe de l'histidine qui a une affinité pour les métaux), de PEG et des groupes fonctionnels pour la bioconjugaison (type PEG-NH_2 ou PEG-biotine). [48]

Une autre alternative consiste à copolymériser une molécule présentant un ou plusieurs groupes thiols avec une unité de solubilisation, comme par exemple la mercaptoéthylamine (MEA), qui fournit l'unité d'accroche (un monothiol), avec l'acide polyacrylique (PAA). [49] Les QDs obtenus sont très stables mais

5. Avec une diminution de la fluorescence à pH 1,1.

chargés négativement et présentent par conséquent beaucoup d'adsorption non spécifique. Cette limitation a été dépassée grâce à la copolymérisation de l'acide thioctique avec du PEG, mais au prix encore une fois d'une augmentation de la taille à cause du PEG (R_H de l'ordre de 10 à 15 nm). [50]

Afin d'améliorer le ligand DHLA-SB en augmentant la stabilité de l'unité d'accroche, il est possible de coupler l'unité de solubilisation, la sulfobétaïne, qui garantit une taille plus compacte que le PEG, avec une des unités précédemment citées. Emerson Giovanelli, Nicolas Lequeux et Thomas Pons sont actuellement en train de développer un copolymère de TA et de sulfobétaine. Les premiers résultats sont très prometteurs : la stabilité intracellulaire augmente de façon significative par rapport aux QDs DHLA-SB (Chapitre 2.2.4) pour un accroissement de la taille d'un facteur 1,3 seulement.

Chapitre 2

Stabilité intracellulaire des Quantum Dots en cellules vivantes

2.1 L'internalisation de QDs dans le cytoplasme de cellules vivantes

L'introduction de Quantum Dots dans le cytoplasme de cellules vivantes pour l'utilisation de ces nanoparticules comme sondes intracellulaires a été souvent limitée parce que les méthodes utilisées causent en générale l'agrégation des QDs ou leur confinement dans les compartiments lysosomaux. La stratégie la plus utilisée pour internaliser des QDs exploite la voie d'entrée endosomale de la cellule. L'introduction de QDs par les endosomes se fait par exemple en modulant la charge à leur surface ou en introduisant des agents qui jouent le rôle de médiateurs pour l'internalisation comme les «Cell Penetrating Peptides» (CPPs) [51][52][53][54] ou des protéines (comme certaines toxines de bactéries ou la transferrine par exemple). [55]

Les CPPs sont une classe de petits peptides qui ont la capacité de traverser la membrane plasmique et qui ont été beaucoup étudiés dans le cadre de l'internalisation de vecteurs de médicaments. [56] Les CPPs interagissent d'abord avec la membrane, le plus souvent par des interactions électrostatiques entre les amino-acides cationiques (comme la lysine ou l'arginine) contenus dans la plupart des CPPs et les protéoglycanes, des glycoprotéines localisées sur la membrane et chargées négativement. Le mécanisme d'internalisation des nano-

particules alors très proches de la membrane plasmique semble être spécifique au type de CPP et/ou à la nature ainsi qu'à la taille de leurs «cargos» : en particulier, les QDs-CPP semblent être amenés dans le cytoplasme par endocytose. [57] Le CPP le plus connu est probablement TAT, dérivé de la protéine homonyme de HIV-1, qui induit l'internalisation des QDs par macropinocytose. [52] Récemment, Delehanty et collaborateurs [58] ont montré l'utilisation du CPP amphiphile Palm-1, qui est composé d'un motif central d'acides aminés similaire à celui de la protéine K-Ras et qui établit probablement des interactions électrostatiques avec la membrane plasmique. La particularité de Palm-1 est de mimer la modification post-transcriptionelle de K-Ras avec un groupe palmitoyle qui permet à la protéine de rester associée à la membrane en s'insérant dedans. Dans le cas de Palm-1, le groupe palmitoyle est ancré sur un acide diaminopropionique synthétique. Il a été démontré que les QDs-Palm-1 sont internalisés par endocytose, mais sont aussi capables de sortir de ces vésicules par un mécanisme qui reste à élucider. Cependant, le temps requis pour une distribution cytoplasmique homogène est long puisque 48 heures sont nécessaires. Très récemment il a été proposé un nouveau CPP qui permet d'internaliser la nanoparticule par translocation directe, c'est-à-dire par endocytose indépendante : ce mécanisme est beacoup plus rapide et très prometteur. [59]

Une autre stratégie utilisée pour franchir la barrière membranaire des endosomes est basée sur l'effet «proton sponge» qui utilise un polymère polycationique (plus précisément riche en amines) comme le polyéthylènimine (PEI). Les charges cationiques favorisent non seulement les interactions avec la membrane plasmique et l'internalisation intracellulaire *via* l'appareil endosomal mais aussi l'adsorption des protons dans les organelles acides, ce qui provoque une forte pression osmotique et par conséquent leur lyse. Le PEI a été directement greffé sur les nanoparticules [60] et recouvert de PEG pour limiter la toxicité. Récemment des QDs-Streptavidine ont été associés à la surface d'un plus grand vecteur ($\approx$ 250 nm) de polymère cationique (*via* les interactions électrostatiques entre les charges positives du polymère et les chaînes acides de la streptavidine associée aux QDs). [61] Cette stratégie requiert toutefois un temps long pour libérer les nanoparticules des vésicules endosomales, 4 heures au minimum.

Il est également possible d'utiliser des polymères comme la Lipofectamine

ou le PULSin (qui sont habituellement utilisés comme agents de transfection) pour introduire les QDs dans le cytoplasme. [62][58]

Notons que pour la majorité des stratégies que nous venons de présenter, les QDs doivent avoir un groupe fonctionnel à la surface pour induire l'internalisation, et éventuellement un autre groupe pour la reconnaissance spécifique d'une cible d'intérêt intracellulaire, ce qui rend la réalisation de cette sonde plus laborieuse. De plus, ces stratégies sont basées sur l'interaction entre la nanoparticule et la membrane cellulaire, qui peut entraîner l'augmentation de la taille du QD parce que des portions de membrane peuvent rester collées à la nanoparticule, même après leur libération dans le cytoplasme. Cela pourrait aussi interférer avec leurs propriétés de ciblage pour des raisons d'encombrement stérique par exemple.

Il existe des méthodes d'introduction à l'intérieur des cellules plus simples à mettre en œuvre et qui ne requièrent pas de séquence supplémentaire sur la nanoparticule ou de temps longs pour obtenir une distribution cytoplasmique homogène. Parmi ces stratégies, il y a la pinocytose induite qui exploite un processus cellulaire pour délivrer massivement du matériel extracellulaire dans la cellule ainsi que l'électroporation et la microinjection qui sont basées sur une manipulation physique de la cellule.

Dans la pinocytose induite, le matériel extracellulaire traverse la membrane cellulaire grâce aux vésicules pinocytiques qui sont ensuite rompues grâce à un choc hypotonique, libérant ainsi les nanoparticules dans le cytoplasme (Figure 2.1). Cette technique a déjà été utilisée pour introduire des QDs dans le cytoplasme de cellules vivantes. Delehanthy *et al.* [58] ont obtenu en utilisant cette technique des nanoparticules qui avaient tendance à s'agréger dans le cytoplasme. Par contre, lorsqu'une concentration moins élevée est utilisée (1-10 nM par rapport à 800 nM dans l'étude précédente), combinée à une autre chimie de surface, les QDs intracellulaires ne s'agrègent pas et peuvent être utilisés pour des études de suivi de molécule unique. [63][64] Notons que Delehanty *et al.* ont utilisé des QDs DHLA-PEG, alors que dans les deux autres études, les auteurs ont utilisé des QDs-streptavidine commerciaux.

L'électroporation a elle aussi été utilisée par plusieurs équipes pour introduire dans les cellules des QDs avec différentes chimies de surface. L'électroporation est une technique qui permet d'augmenter transitoirement la perméa-

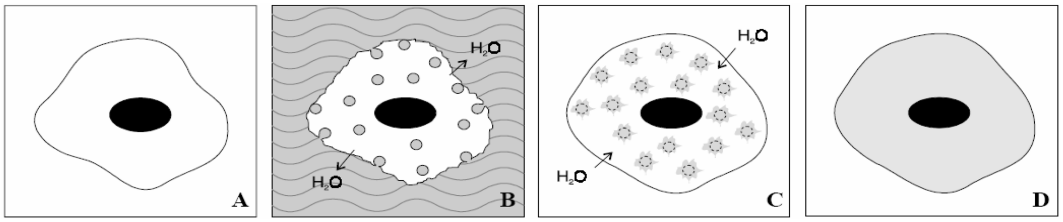


FIGURE 2.1 – Schéma de principe de la pinocytose induite : la cellule (A) est incubée dans la solution hypertonique contenant le matériel à introduire *via* les pinosomes (B) ; les pinosomes sont éclatés par le choc hypotonique (C) et le matériel est libéré dans le cytoplasme (D). Ce schéma provient de la notice de 'Influx' (Invitrogen).

bilité de la membrane cellulaire en appliquant un champ électrique pendant quelques dizaines de millisecondes (schéma Figure 2.3 E). Cette technique a été et est encore beaucoup utilisée pour introduire de l'ADN en vue de transfecter les cellules. Tous les groupes qui ont utilisé l'électroporation pour internaliser les QDs ont observé une agrégation massive dans le cytoplasme, quelque soit la chimie de surface choisie. [62][58][65]

Enfin, la microinjection permet d'introduire mécaniquement de petits volumes (de l'ordre du nL) d'une solution très concentrée contenant les QDs, grâce à un micro capillaire à pointe très fine qui est guidé par microscopie de fluorescence à l'intérieur de l'échantillon. Cette technique est moins toxique pour les cellules et ne semble pas interagir avec la chimie de surface de nanoparticules. Toutefois, comme chaque cellule doit être injectée individuellement, cette technique n'est pas adaptée à toutes les applications, mais a été utilisée avec succès en embryogénèse [26][66][67] et en biologie cellulaire. [62][68]

Comme l'ont démontré Derfus *et al.* [62] et Delehanty *et al.,* [58] la méthode d'internalisation joue un rôle central dans le comportement des nanoparticules dans l'environnement biologique et peut influencer le taux d'agrégation intracellulaire pour une même chimie de surface. De plus, il a déjà été montré qu'en modulant la charge nette [69][70][71] ou la forme [72] de la chimie de surface utilisée, on peut changer le comportement des nanoparticules par rapport à cet environnement. Il a également été mis en évidence que la taille des nanoparticules [72][73] et le type cellulaire utilisé [74] peuvent eux aussi influencer le comportement des nanoparticules dans le milieu biologique. La taille du PEG joue par exemple un rôle essentiel dans la biodistribution des nanoparticules

d'or [75] et des QDs [76] dans le petit animal.

En comparant les données bibliographiques on s'aperçoit finalement que la nature même d'une chimie de surface de charge neutre semble influencer la stabilité intracellulaire des nanoparticules. Il n'y a toutefois pas de preuve directe de cette corrélation à travers une étude systématique. C'est pourquoi nous avons essayé de mieux comprendre quels sont les facteurs qui influencent le devenir intracellulaire des QDs en étudiant leur stabilité colloïdale dans le cytoplasme au cours du temps en fonction de leur chimie de surface et de la méthode d'introduction utilisée. Nous avons ainsi voulu tester la stabilité intracellulaire de la nouvelle chimie de surface décrite dans le chapitre précédent (le DHLA-SB) et nous l'avons comparée à d'autres stratégies de solubilisation.

2.2 Étude de la stabilité colloïdale intracellulaire

Afin de comparer les comportements intracellulaires de QDs avec différentes chimies de surface, nous avons utilisé trois des méthodes d'internalisation intracellulaire de QDs précédemment décrites. Une bonne stabilité dans le cytoplasme est une condition *sine qua non* pour une utilisation efficace des QDs comme sondes en biologie. En effet, le marquage de cibles intracellulaires requiert l'introduction d'une concentration importante de sondes qui puissent non seulement garder leurs propriétés de ciblage mais aussi rester stables et brillantes pendant longtemps. Or la stabilité colloïdale des QDs peut être perturbée par des interactions avec le milieu cellulaire : nous avons essayé de mieux comprendre pourquoi et comment. Nous avons introduit dans le cytoplasme de cellules HeLa et dans des embryons de *Xenopus Laevis* des concentrations élevées de QDs grâce à trois techniques qui ne nécessitent pas de fonctionnalisation de la nanoparticule : l'électroporation, la pinocytose et la microinjection. Nous avons ensuite analysé le devenir intracellulaire des QDs en fonction de leur chimie de surface, ce qui nous a permis de comparer trois stratégies de solubilisation dans l'eau :

1. l'échange de ligands avec le DHLA-SB,
2. l'encapsulation en micelles de phospholipides PEG,

3. l'encapsulation en copolymères amphiphiles (Qtracker, Invitrogen).

Nous avons étudié la stabilité colloïdale de ces nanoparticules en les observant par microscopie de fluorescence. En effet, il est assez facile de distinguer les agrégats, qui se présentent comme des points très brillants, des QDs uniques qui bougent très vite dans tout le cytoplasme et qui clignotent. De plus, le fait que les QDs bougent suggère qu'ils ne sont pas adsorbés sur des structures subcellulaires. Cette étude ne nous donne néanmoins qu'une appréciation qualitative. Nous avons donc essayé d'estimer l'agrégation des QDs quantitativement. Un premier obstacle vient de la limite de résolution du microscope optique à épifluorescence, qui est environ 10 fois plus grande que la taille des nanoparticules. De plus, il est très difficile de mettre en œuvre une discrimination automatisée entre agrégats et QDs libres pour pouvoir en extraire un réel taux d'agrégation. En effet, la taille et l'intensité de fluorescence des agrégats varient entre les cellules d'un même échantillon, et en fonction de la méthode d'internalisation et du type de QDs. Une possibilité serait de définir un seuil sur la base de ces deux paramètres pour distinguer les nanoparticules uniques des agrégats, mais la grande variabilité entre les cellules et induite par les différentes conditions expérimentales rend impossible l'utilisation d'un seuil commun. Une autre caractéristique qui permet de différencier les QDs uniques des agrégats est le clignotement, comme cela a déjà été démontré. [77] Ce critère n'est toutefois pas exploitable dans notre cas à cause de la densité cytoplasmique de QDs trop importante et de leur diffusion trop rapide en 3D dans les cellules vivantes (diffusion sur des distances supérieures à la profondeur de champ de notre microscope). Il serait envisageable de discriminer les agrégats des QDs uniques par microscopie électronique à transmission, mais d'une part la préparation des échantillons est délicate (notamment la fixation et l'inclusion en résine) et pourrait altérer la distribution des nanoparticules, et d'autre part cela suppose une analyse très longue pour obtenir une bonne statistique.

Nous avons donc choisi d'exprimer l'agrégation des QDs en mesurant l'écart type des intensités de fluorescence des pixels d'une image du cytoplasme d'une cellule à un instant donné. Quand il n'y a pas d'agrégation, l'écart-type (Sd) est petit parce que les QDs individuels dans le cytoplasme donnent une répartition d'intensités quasi-homogène (exemple sur la Figure 2.2 A). Cet écart-type

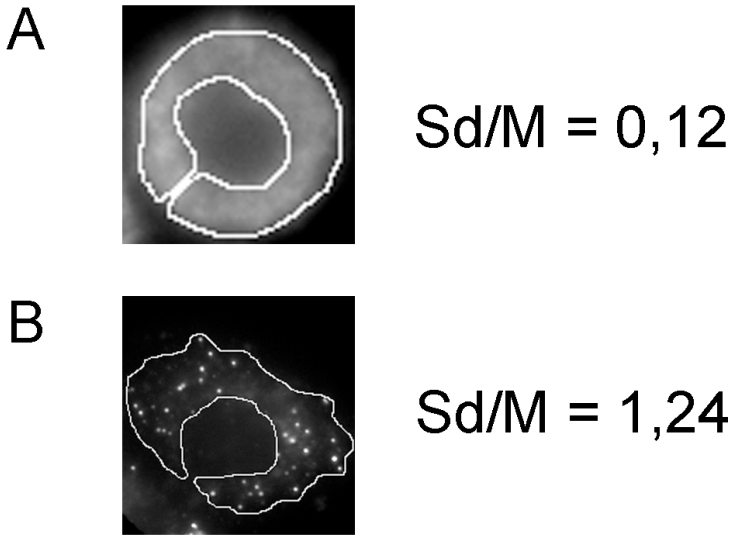


FIGURE 2.2 – Exemples de valeurs de Sd/M pour des taux d'agrégation de QDs différents. La région du cytoplasme (trait blanc) est sélectionnée à l'aide du signal d'autofluorescence et la valeur Sd/M est calculée dans cette région. Sd/M est petit quand le signal est uniforme (A, QDs DHLA-SB 1h après électroporation) et augmente avec l'agrégation (B, QDs micelle 24h après électroporation).

augmente lorsque des agrégats se forment et qu'il reste des nanoparticules uniques (Figure 2.2 B). Pour s'affranchir des différences de rendement quantique et de concentrations des QDs entre les échantillons, nous avons normalisé l'écart-type de l'histogramme des intensités par la valeur moyenne (M) mesurée dans la même région d'intérêt (ROI pour Region Of Interest) de l'image constituée par le cytoplasme (comme on peut le voir dans la Figure 2.2, le trait blanc représente la ROI correspondant au cytoplasme dans lequel Sd/M est calculé). L'indice d'agrégation des QDs peut alors être défini par «Sd/M». Sa valeur dépend de plusieurs paramètres, comme la taille et l'intensité des agrégats, mais n'est donc pas proportionnelle au taux d'agrégation (c'est-à-dire au rapport «nombre d'agrégats / nombre de QDs libres»). Par exemple, pour un même taux d'agrégation, Sd/M peut prendre plusieurs valeurs et sera d'autant plus faible que les agrégats seront petits et nombreux (donc moins brillants). Mais même si l'indice Sd/M n'est pas un véritable «taux» d'agrégation, il représente très bien l'évolution de cette agrégation et constitue donc un bon critère d'évaluation de la qualité du QD en tant que sonde spécifique. La taille des agrégats est aussi une information importante car les petits agrégats sont plus mobiles, donc plus susceptibles d'avoir encore accès à la cible. De plus, ils produisent un signal de fluorescence non spécifique moins fort que les gros agrégats et polluent donc moins le signal spécifique.

Nous avons mesuré l'indice Sd/M dans le cytoplasme d'au moins 20 cellules pour chaque échantillon et pour chaque instant de mesure, sur des images dont le signal de fond a été soustrait au préalable. Afin de comparer les évolutions au cours du temps de cet indice d'agrégation en fonction des chimies de surface des QDs, nous avons réalisé le test T de Student pour les échantillons non corrélés, deux à deux.

2.2.1 Internalisation en cellules HeLa par électroporation

Nous avons dans un premier temps utilisé l'électroporation pour internaliser dans le cytoplasme de cellules HeLa les QDs solubilisés avec les trois différents types de chimie de surface. Toutes les expériences d'électroporation ont été réalisées sur 500 000 cellules en suspension dans du milieu de culture DMEM complété avec 10% de FBS et 1% d'antibiotiques (noté DMEMc), avec une concentration en QDs de 1 µM (ou éventuellement 5 µM quand cela est

précisé). Ces cellules, placées dans une cuvette de 2 mm de large dans un électroporateur Gene Pulser (BioRad), sont soumises à une décharge électrique d'un condensateur (960 µF, 0,15 kV) pendant 30 ms environ suivant les échantillons. Les trois types de QDs diffusaient librement dans tout le cytoplasme (mais pas dans le noyau) tout de suite après leur internalisation, mais ont montré des comportements très différents au cours du temps.

En effet, les QDs micelle ont commencé à s'agréger seulement quelques heures après leur internalisation (Figure 2.3 B, 5h). En marquant les membranes intracellulaires avec du DiR (iodure de 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindotricarbocyanine (DiIC18(7), Invitrogen)), nous avons pu montrer que cette agrégation dépend uniquement de la stabilité des QDs et n'est pas le résultat d'un processus cellulaire actif. Ce colorant lipophile, qui émet dans le proche infrarouge, voit sa fluorescence augmenter de façon importante quand il est incorporé dans les membranes. Comme on peut le voir dans la Figure 2.4, il n'y a pas de colocalisation entre le marquage du DiR et les agrégats de QDs micelle formés 24 heures après l'expérience, ce qui montre bien que les agrégats ne sont pas confinés dans des vésicules et, par conséquent, qu'aucun processus cellulaire actif ne participe à leur formation.

Les QDs DHLA-SB ont un comportement complètement différent car, au moins jusqu'à 30h après leur internalisation, les QDs restent en majorité uniques (Figure 2.3 A). Même électroporés à plus forte concentration (5 µM), les QDs DHLA-SB diffusent pour la plupart librement, même à l'intérieur du pont mitotique entre deux cellules filles (Figure 2.5 C, flèche grise) : cela confirme qu'ils ne sont pas ségrégés dans un sous-compartiment cellulaire. Il est intéressant de noter que les QDs ne sont pas non plus associés à l'ADN même quand le noyau est désassemblé (Figure 2.5 A et B, flèches blanches).

Les Qtrackers ont un comportement très similaire à celui des QDs DHLA-SB jusqu'à 30h après électroporation. Ensuite, ils commencent à s'agréger plus rapidement. Une sous-population de QDs DHLA-SB s'agrège aussi au cours du temps mais en proportion réduite par rapport aux autres chimies de surface et avec une plus grande quantité de QDs uniques restants.

L'analyse des indices Sd/M des trois chimies de surface au cours du temps a confirmé ces observations. Les Sd/M des QDs DHLA-SB et des Qtrackers sont en effet significativement différents ($P<0{,}001$) de celui des QDs micelle

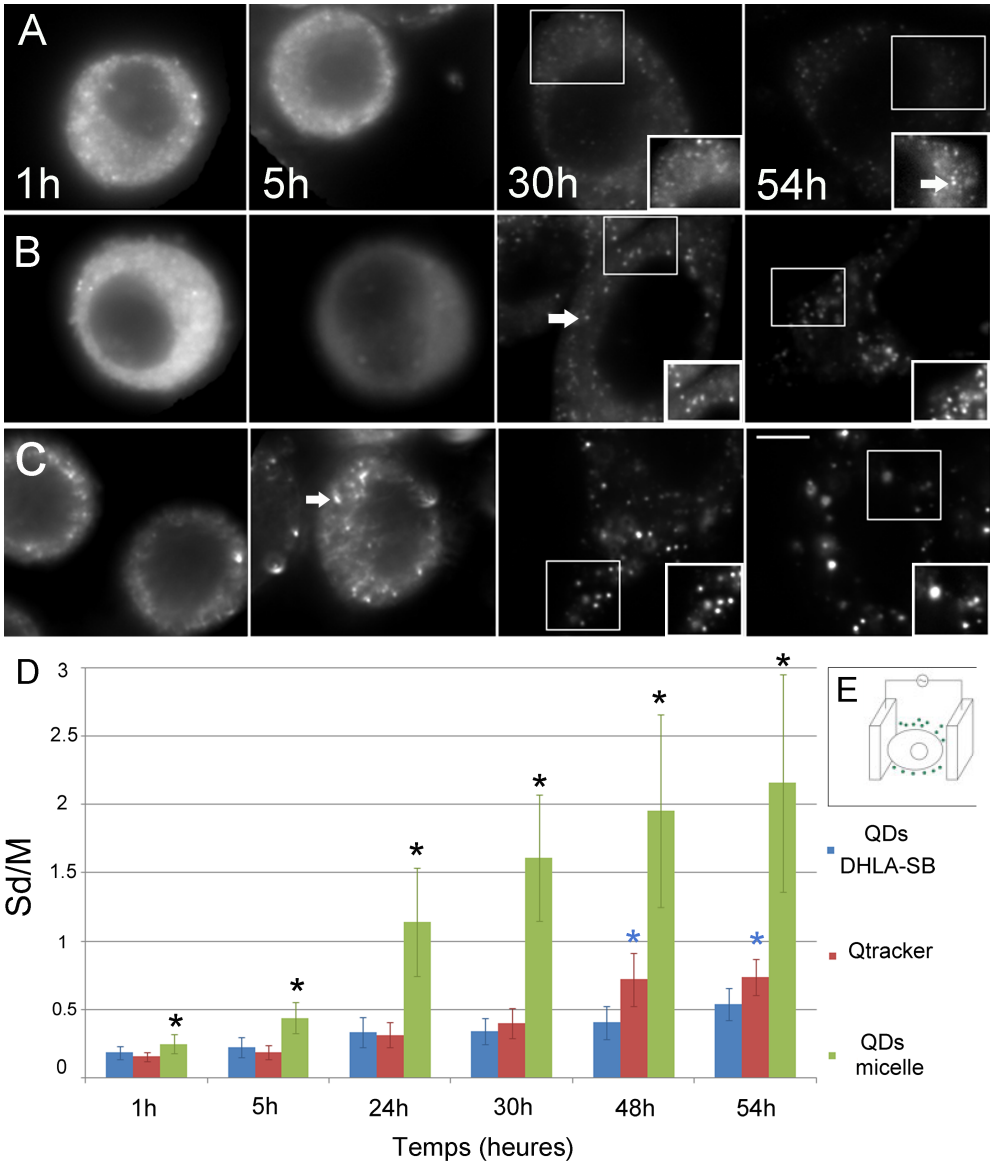


FIGURE 2.3 – Cellules électroporées avec une solution à 1 µM de QDs et observées 1h, 5h, 30h et 54h après l'expérience. A) QDs DHLA-Sulfobétaïne ; B) QDs commerciaux (Qtracker, Invitrogen) ; C) QDs micelle. Quelques agrégats sont indiqués avec les flèches. Les images dans les carrés blancs à bords épais (dans l'angle en bas à droite) sont affichées avec un contraste saturé pour mieux visualiser la présence éventuelle de QDs individuels. La barre d'échelle vaut 10 µm. D) Quantification de l'indice Sd/M au cours du temps pour les trois chimies de surface. Les astérisques noirs indiquent une valeur significativement plus grande que celle des deux autres chimies de surface, les astérisques bleues indiquent une valeur significativement plus grande que celle des QDs DHLA-SB (pour les deux $P<0{,}001$). E) Schéma de l'électroporation des cellules avec les QDs (référence [62]).

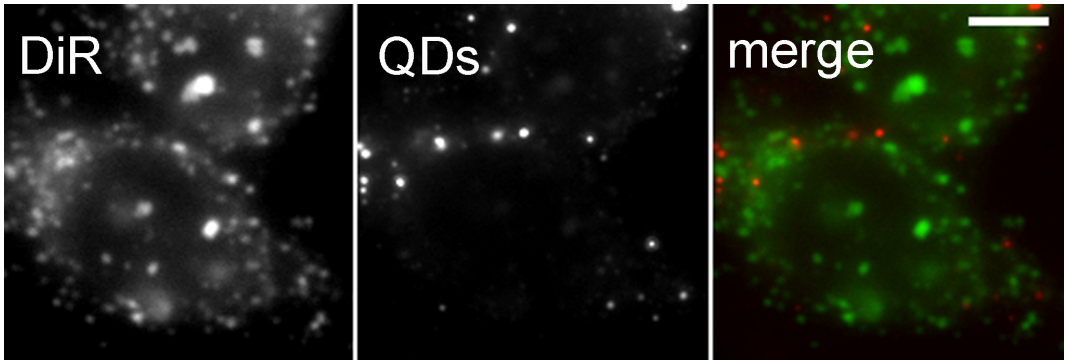


FIGURE 2.4 – Cellules électroporées avec des QDs micelle (en rouge) et marquées avec du DiR (en vert) 24h après l'expérience. La barre d'échelle vaut 10 µm.

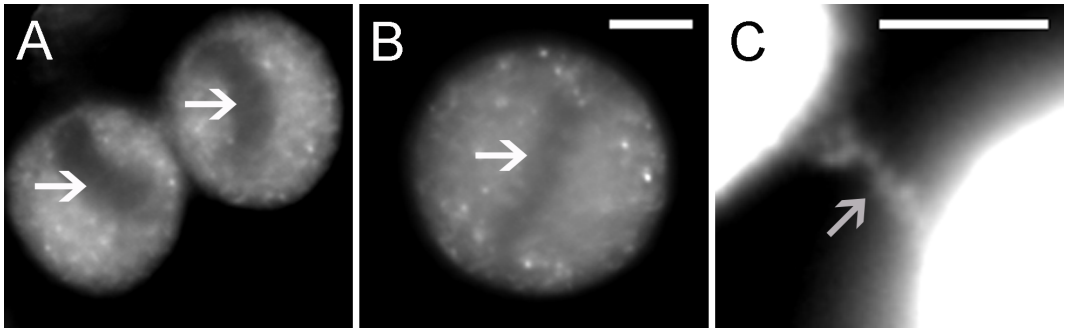


FIGURE 2.5 – Cellules en mitose électroporées avec les QDs DHLA-SB à 5 µM et observées 24h après l'expérience. Les QDs n'étaient pas associés à l'ADN (flèches blanches) ni dans les cellules en télophase (A) ni dans celles en métaphase (B). Les QDs diffusaient à travers le pont mitotique (flèche grise dans l'image C). La barre d'échelle vaut 10 µm.

pour tous les temps analysés : de 1h jusqu'à 54h. Les indices Sd/M des QDs DHLA-SB et des Qtracker sont quant à eux significativement différents l'un de l'autre à partir de 30h après l'électroporation (Figure 2.3 D).

2.2.2 Internalisation en cellules HeLa par pinocytose

Pour confirmer les précédentes observations sur le comportement des QDs introduits dans le cytoplasme cellulaire par électroporation, nous avons utilisé une autre technique d'internalisation : la pinocytose. Toutes les expériences de pinocytose ont été effectuées avec 150 000 cellules en suspension, et une concentration de QDs de 1 µM dans un mélange de DMEMc et de milieu hy-

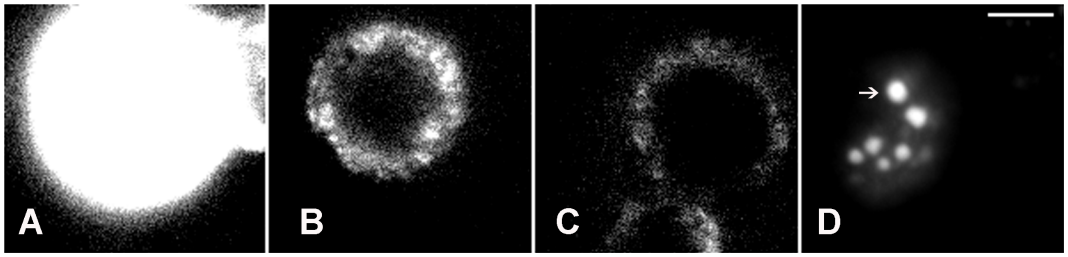
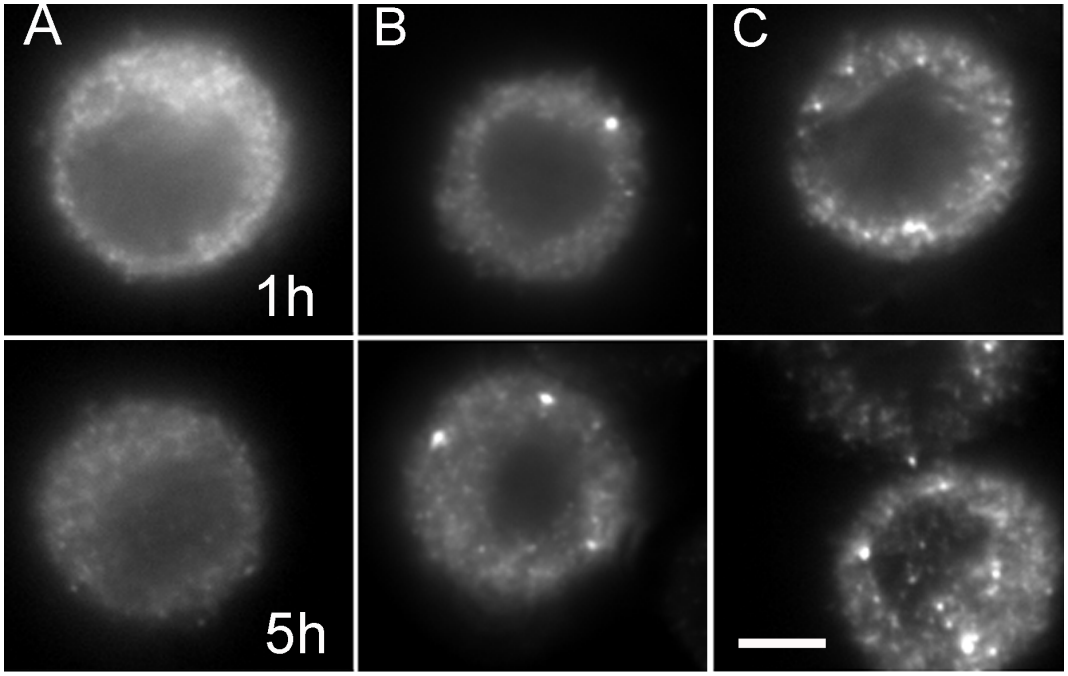


FIGURE 2.6 – Cellules pinocytées avec des QDs DHLA-SB (A) par rapport à l'endocytose passive à la même concentration (B) et l'autofluorescence (C). Les images ont le même contraste. L'image A est la même que celle dans la Figure 2.7 A (1h) mais avec un contraste différent. Image D : (qui n'est pas représentée avec le même contraste que celui des images A, B et C) macropinosomes remplis de QDs (flèche) juste après la charge des cellules dans le milieu hypertonique, donc sans le choc hypotonique. La barre d'échelle vaut 10 µm.

pertonique (Influx, Invitrogen). La même expérience sur cellules adhérentes s'est révélée moins efficace en ce qui concerne le taux de charge en nanoparticules. Nous avons optimisé le protocole fourni par Invitrogen afin de l'adapter à nos cellules et au matériel (les QDs) à introduire.

La technique de pinocytose fait d'abord rentrer massivement les QDs à travers les macropinosomes formés pendant l'incubation des cellules à 37°C pendant quatre minutes dans un mélange de QDs dans du DMEMc (30%) et de milieu hypertonique (70%) (Figure 2.6 B). Notons que les QDs restent uniques et libres pendant cette procédure : nous avons pu les observer bouger dans les macropinosomes (stade B avant le choc hypotonique), clignoter et diffuser dans tout le cytoplasme une fois libérés (stade D). Le choc hypotonique est réalisé en incubant les cellules contenant les macropinosomes chargés de QDs pendant 3 minutes à 37°C dans 2 mL d'une solution 80% eau déionisée 20% DMEM. Ce choc est très violent car la concentration en sel du mélange est faible. L'internalisation des QDs par pinocytose est beaucoup plus efficace que l'endocytose des QDs DHLA-SB comme on peut le voir dans la Figure 2.6 : si on affiche avec le même contraste les images de QDs internalisés par pinocytose (A) et par endocytose (B) à concentration et temps d'incubation égaux, l'image des premiers est alors complètement saturée, avec un rapport d'intensité d'environ trente. En effet le taux d'endocytose, qui dépend des interactions non spécifiques des QDs avec la membrane plasmique, est très



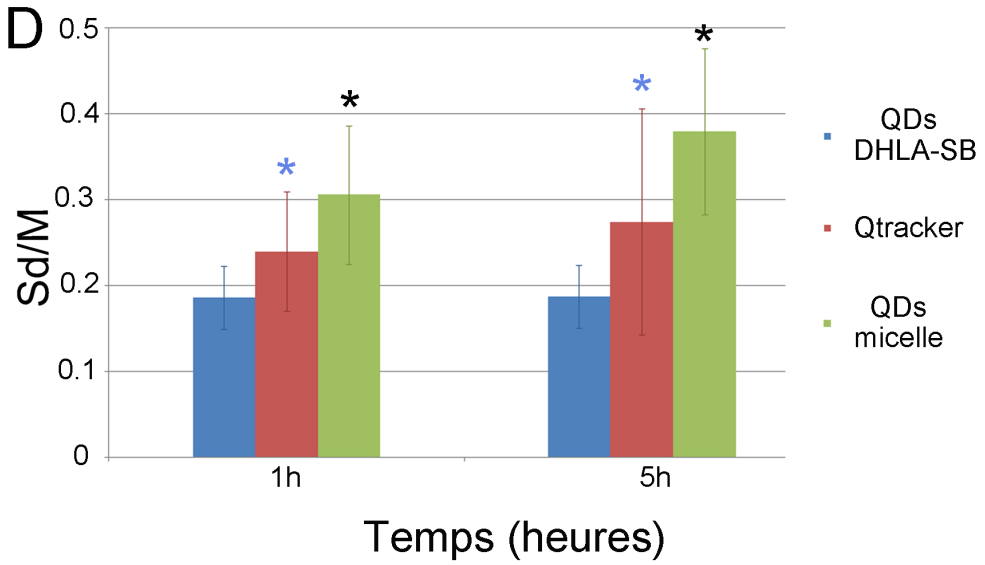


FIGURE 2.7 – Cellules pinocytées avec des QDs DHLA-SB (A), des QDs micelle (B) ou des QDs commerciaux (Qtracker, Invitrogen), observées 1h ou 5h après la pinocytose et représentées avec le même contraste (pour chaque classe de QD). La barre d'échelle vaut 10 µm. D) Quantification de l'indice Sd/M au cours du temps pour les trois chimies de surface. Les astérisques noires indiquent une valeur significativement plus grande que pour les deux autres chimies de surface, les astérisques bleues indiquent une valeur significativement plus grande que pour les QDs DHLA-SB.

faible, à peine plus important que l'autofluorescence de cellules.

Nous avons ensuite comparé le devenir intracellulaire des QDs-DHLA-SB avec ceux des QDs micelle et des Qtracker. Le graphe de la Figure 2.7 D montre que les QDs s'agrègent différemment en fonction de la chimie de surface dès la première heure après pinocytose.

Comme pour l'électroporation, la cinétique d'agrégation des QDs micelle est nettement plus rapide (Figure 2.7 C). Les QDs DHLA-SB semblent avoir une cinétique d'agrégation légèrement plus lente que les Qtracker (Figures 2.7 A et B). L'analyse des indices Sd/M au cours du temps a confirmé ces observations. En effet les valeurs de Sd/M des QDs micelle sont significativement plus grandes que celles des deux autres chimies de surface à 1h et à 5h ($P<0{,}001$ sauf pour les Qtracker 1h après pinocytose où $P<0{,}01$, Figure 2.7 D). De plus les valeurs de Sd/M des Qtracker sont significativement plus élevées ($P<0{,}01$) que celles des QDs DHLA-SB pour les deux temps analysés, même si la valeur de Sd/M des Qtracker calculée 5h après pinocytose présente une grande dispersion de mesures (même en analysant jusqu'à 35 cellules pour ce cas). L'étude au cours du temps du comportement des nanoparticules a révélé une diminution progressive de la fluorescence jusqu'à la perte quasi totale du signal 24 heures après leur internalisation, ce qui nous a empêchés de poursuivre l'analyse à des temps plus longs. Ce phénomène sera mieux décrit dans le paragraphe 2.2.5.

2.2.3 Internalisation dans des embryons de *Xenopus Laevis* par microinjection

Pour confirmer les observations obtenues en pinocytose et en électroporation dans les cellules HeLa, nous avons utilisé une dernière méthode d'internalisation, la microinjection, sur un autre système biologique : les embryons de *Xenopus Laevis*. Les embryons ont été microinjectés au stade de quatre cellules (voir Figure 2.8) par Andriani Ioannou, une doctorante de l'équipe du Dr Paris Skourides (Department of Biological Sciences, University of Cyprus, Nicosia) avec laquelle nous collaborons.

Les embryons injectés avec les QDs DHLA-SB se développent normalement au moins pendant deux semaines et demie sans qu'aucune agrégation n'ait pu

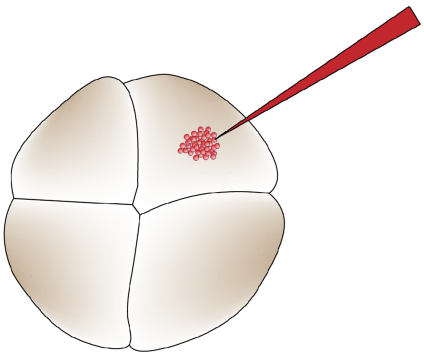


FIGURE 2.8 – Schéma de la microinjection d'un embryon de *Xenopus Laevis* avec des QDs. (Image de Sandrine Ithurria).

être détectée (Figure 2.9).

Ces expériences confirment que les QDs DHLA-SB sont très furtifs et ne perturbent pas les activités cellulaires, comme nous l'avons déjà observé avec la diffusion de QDs dans le pont mitotique entre deux cellules filles issues d'une cellule électroporée avec ces mêmes QDs. Par contre, les QDs commerciaux et les QDs micelle commencent à s'agréger seulement une semaine après l'injection (Figure 2.10). Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus lorsque les QDs étaient électroporés ou pinocytés, et confirme la corrélation entre la cinétique d'agrégation et la chimie de surface des nanoparticules. Nous n'avons malheureusement pas pu quantifier l'indice Sd/M dans les cellules de l'embryon microinjecté parce que le signal de fluorescence provenant des cellules contenues dans les plans hors du plan de mise au point varie trop en fonction de la zone de l'échantillon imagée et analysée. Ce signal de fond entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne mais pas de l'écart-type, et crée ainsi des artefacts dans les mesures de Sd/M. Toutefois les images montrent clairement l'absence d'agrégation pour les QDs DHLA-SB, contrairement aux deux autres chimies de surface.

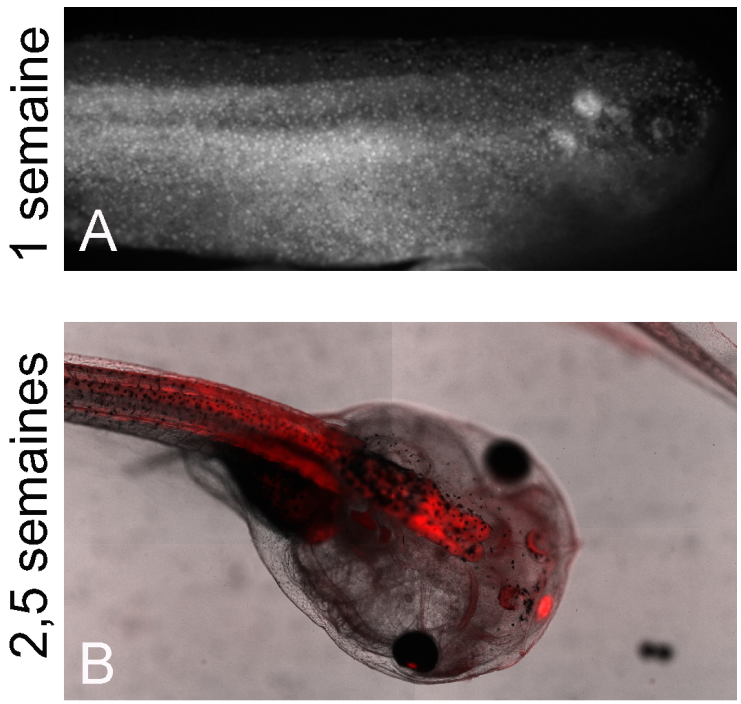


FIGURE 2.9 – Image de fluorescence (A) et image anatomique et de fluorescence (B) d'un têtard, une semaine après l'injection des QDs DHLA-SB. Le têtard mesure quelques millimètres.

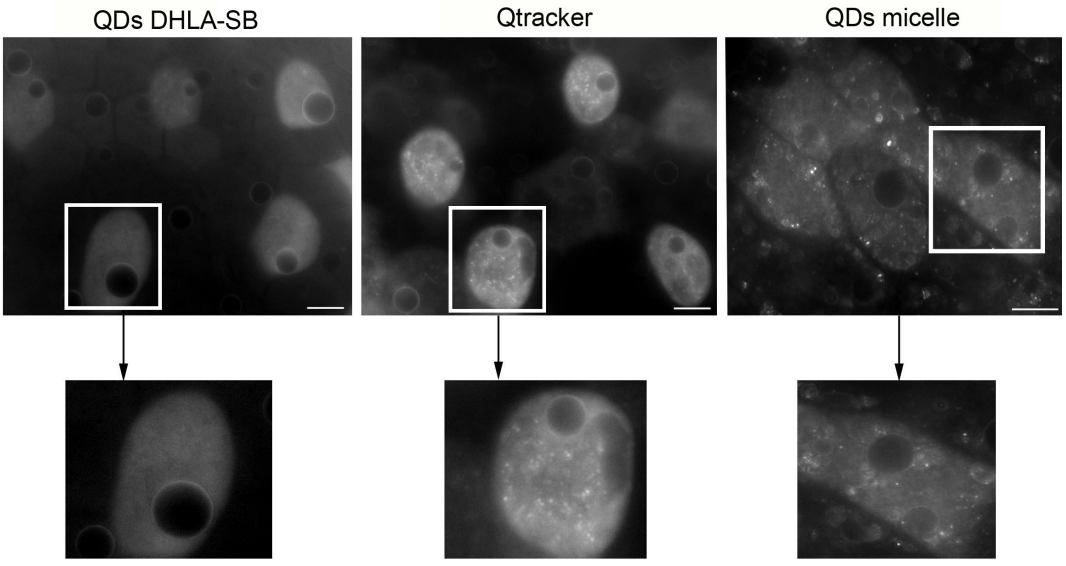


FIGURE 2.10 – Images de têtards de *Xenopus Laevis* prises une semaine après la microinjection de QDs DHLA-SB, de QDs commerciaux (Qtracker) ou de QDs micelle au stade de 4 cellules. La barre d'échelle vaut 10 µm.

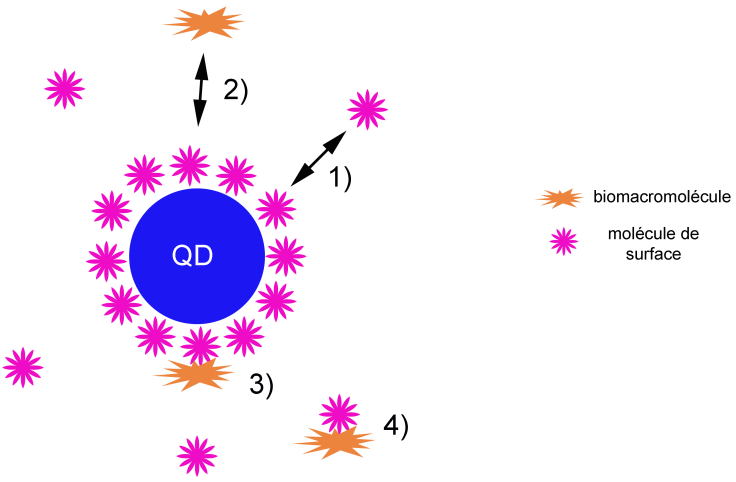


FIGURE 2.11 – Schéma de l'équilibre entre les molécules de surface adsorbées et désorbées (1), de l'interaction non spécifique de la nanoparticule avec une biomacromolécule une fois le ligand détaché (2) et de l'adsorption non spécifique de ligands avec des biomacromolécules sur la surface du QD (3) ou dans l'environnement biologique dans le cas de ligands en solution (4).

2.2.4 Des ligands dynamiques à la surface de QDs

Deux mécanismes peuvent être à l'origine de l'agrégation intracellulaire des QDs (Figure 2.11) :

1. l'adsorption non spécifique entre les biomacromolécules et la surface intacte des QDs,
2. l'aspect dynamique de l'accrochage des ligands à la surface des QDs.

L'utilisation de ligands zwitterioniques et d'autres unités de solubilisation neutres et furtives (comme le PEG), a permis de limiter efficacement l'adsorption non spécifique sur la surface des QDs. On ne peut toutefois pas exclure que ce mécanisme contribue à l'agrégation intracellulaire et nous ne disposons pas encore aujourd'hui d'outils qui permettent de le mesurer localement et de le distinguer d'une modification de la surface même du QD.

Le deuxième mécanisme suppose que les ligands se trouvant à la surface du QD sont en équilibre entre la forme accrochée à la nanoparticule et la forme libre. Cet équilibre peut être déplacé au cours du temps, par exemple à cause de l'oxydation du DHLA sous forme de l'acide thioctique qui pourrait l'empêcher

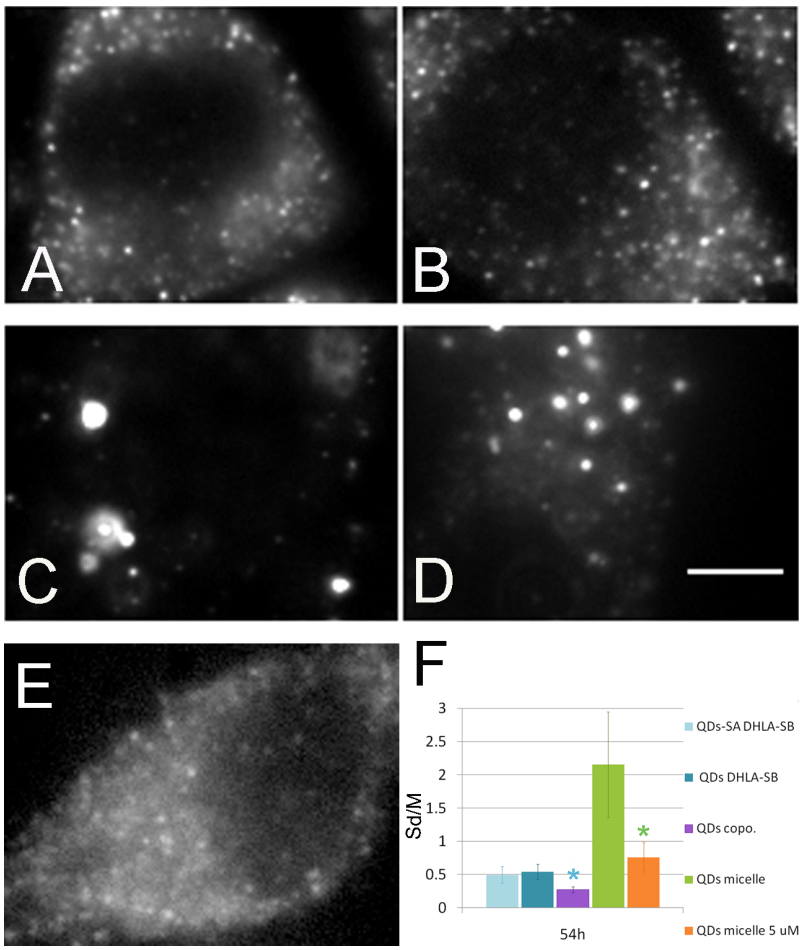


FIGURE 2.12 – Cellules électroporées avec une solution à 1µM de (A) QDs DHLA-SB , de (B) QDs-SA DHLA-SB, de (C) QDs micelle, de (D) QDs micelle à 5µM et de (E) QDs copolymère DHLA-SB à 1µM. Les cellules sont observées 54h après l'électroporation. La barre d'échelle vaut 10 µm. (F) Quantification de l'indice Sd/M pour les différentes chimies de surface pour au moins 25 cellules. L'astérisque bleue signifie «significativement plus petit que celui des autres chimies de surface», l'astérisque verte signifie «significativement plus petit que celui des QDs micelle à 1 µM» (pour les deux P<0,001).

de revenir s'accrocher à la surface de la nanoparticule. De plus, si dans une solution concentrée, on peut supposer que l'équilibre adsorption/désorption des molécules de surface est favorable à la stabilité des QDs, une fois dans la cellule, ces QDs sont très dilués et cet équilibre peut être déplacé. Cela pourrait donc induire des interactions des nanoparticules entre elles et/ou avec les biomacromolécules présentes dans le cytoplasme, et ainsi empêcher les ligands de s'adsorber de nouveau sur les QDs (Figure 2.11). Pour étayer cette hypothèse, nous avons introduit des solutions de QDs plus concentrées dans le cytoplasme de cellules vivantes et nous avons pu vérifier que l'agrégation était clairement réduite. Comme illustré dans la Figure 2.12 D, une partie des QDs micelle électroporés à une concentration 5 fois plus importante que dans les expériences précédentes restent uniques et libres dans le cytoplasme 54h après leur internalisation. Au contraire, quand les QDs micelle sont électroporés à une concentration plus faible, les QDs individuels et libres dans le cytoplasme ont quasiment disparu seulement 24h après électroporation (Figure 2.4). La quantification des indices Sd/M confirme ce résultat : la différence entre les QDs micelle à 1 µM et 5 µM 54h après électroporation est significative ($P<0{,}001$). Ces résultats soutiennent l'idée que la désorption des molécules de surface a un rôle important dans le mécanisme d'agrégation.

Cela peut expliquer les variations que l'on observe entre les chimies de surface analysées. En effet les différences entre les natures des ligands et le nombre de groupements d'accroche par molécule déterminent des affinités différentes pour la surface du QD. Une plus grande affinité des ligands déplace donc l'équilibre en faveur de la stabilité du QD.

Dans le cas des QDs micelle, les agrégats pourraient se former en partie à cause de l'instabilité de la couche de phospholipides-PEG qui enveloppe la nanoparticule. En effet, les liens entre les phospholipides et les ligands qui se trouvent à la surface du QD en fin de synthèse, sont de nature hydrophobe. Ce lien, non covalent et faible, peut venir à manquer, et perturber l'intégrité de la micelle et ainsi favoriser l'agrégation. Les Qtracker, comme les QDs micelle, sont recouverts de PEG et les interactions établies avec la surface du QD sont de même nature pour les deux types de QD. Les Qtracker présentent néanmoins plusieurs unités d'accrochage pour chaque molécule et par conséquent la stabilité augmente. Le gros inconvénient des QDs commerciaux vient de leur

taille qui reste importante.

Les QDs DHLA-SB présentent à la fois une petite taille et une stabilité intracellulaire importante. Cela est sans doute le résultat d'une faible adsorption non spécifique et d'une interaction stable entre l'unité d'accroche et la surface du QD.

Nous sommes actuellement en train de comparer la stabilité intracellulaire de nouveaux QDs copolymère DHLA/SB à celle des QDs DHLA-SB. Les QDs sont introduits dans les cellules par électroporation et observés en microscopie de fluorescence 54 heures après l'expérience. Les premières observations ont révélé pour ces nouveaux QDs un taux d'agrégation très faible (Figure 2.12 E) et ont montré qu'une grande quantité de QDs est encore libre 54h après et diffuse très rapidement dans le cytoplasme. Nous avons quantifié l'indice Sd/M pour ces cellules (Figure 2.12 F) et nous avons pu constater que la valeur moyenne de Sd/M pour les QDs copolymère est plus petite que celle des QDs DHLA-SB ($P<0{,}001$). Ces résultats préliminaires sont très prometteurs pour cette nouvelle chimie de surface.

Les QDs copolymère DHLA/SB sont donc encore plus stables que les QDs DHLA-SB, probablement parce que chaque ligand présente plusieurs unités d'accrochage à la surface du QD. La probabilité que tous les DHLA se détachent est donc réduite par rapport au cas du DHLA seul, de façon analogue au cas des QDs micelle et des Qtracker.

Nous avons également vérifié qu'une modification biochimique des QDs DHLA-SB, telle que par exemple la bioconjugaison avec la streptavidine, n'altérait pas le comportement intracellulaire des nanoparticules. Comme on peut le voir dans les Figures 2.12 A et B, les deux types de QDs se ressemblent beaucoup même 54 heures après leur électroporation dans les cellules Hela. La quantification de leurs indices Sd/M a confirmé l'absence d'une différence significative entre les deux types de QDs (Figure 2.12 F). Le comportement similaire de deux types de QDs, qui présentent une unité d'accroche identique mais une surface différente, confirme encore une fois l'idée que la désorption des molécules de surface a un rôle important dans le mécanisme d'agrégation.

Notons que la stabilité de l'interaction entre le ligand et le QD dépend non seulement du nombre d'unités d'accroche présentes sur chaque ligand, mais aussi de la surface même de la nanoparticule. Nous avons en effet observé

des variations de la stabilité intracellulaire des QDs DHLA-SB pour certaines lots de QDs, issus de synthèses differentes. [1] Cela est probablement dû à des variations de la structure et la composition de la surface inorganique des nanoparticules, qui pourraient induire des différences d'affinité pour les ligands de surface. Une diminution de l'affinité pour la surface du QD pourrait déplacer l'équilibre des ligands vers l'état désorbé et augmenter la probabilité d'agrégation des nanoparticules en milieu biologique.

Le modèle de «ligands dynamiques» pourrait aussi expliquer les différences observées entre les cinétiques d'agrégation pour une même chimie de surface en fonction de la technique d'internalisation utilisée. Par exemple, les QDs DHLA-SB montrent une agrégation plus rapide s'ils sont internalisés dans les cellules par électroporation (à 54h après électroporation, Figure 2.3 A dans les cellules HeLa) que s'ils sont microinjectés dans les embryons (pas d'agrégation détectable 2 semaines et demie après microinjection, Figure **??** B). Ce phénomène peut en partie être expliqué par le fait que les quantités intracellulaires initiales de QDs sont plus élevées dans les expériences de microinjection, ce qui déplacerait l'équilibre en faveur de la stabilité des QDs. De plus, dans les stades précoces du développement de l'embryon de *Xenopus Laevis*, la taille des cellules diminue lorsqu'elles se divisent, ce qui limite la dilution des nanoparticules par rapport à la dilution d'un facteur 2 après chaque mitose pour les cellules en culture (un cycle cellulaire de cellules HeLa a une durée d'environ 24h).

Une autre cause possible de l'agrégation plus rapide observée en électroporation pourrait être la décharge électrique appliquée lors de l'introduction des QDs. Nous avons néanmoins vérifié que l'électroporation de ces mêmes QDs dans du milieu de culture (DMEMc) à la concentration de 1 µM et en l'absence de cellules ne provoquait pas d'agrégation en soi. Il n'y a pas d'agrégation détectable (après centrifugation pendant 10 minutes à 19000 g) tout de suite après l'électroporation (Figure 2.13) ni pendant les 54h suivant l'électroporation (les QDs sont conservés à température ambiante et dans le DMEMc). De plus il n'y a pas de différence visible entre les différents types de QDs, contrairement aux différences d'agrégation observées dès la première heure après électroporation

1. Nous ne disposons pas aujourd'hui d'outil d'analyse qui nous permette de caractériser complètement la surface des QDs après synthèse, il est donc difficile de prévoir la qualité de l'échange en fonction de la synthèse du QD.

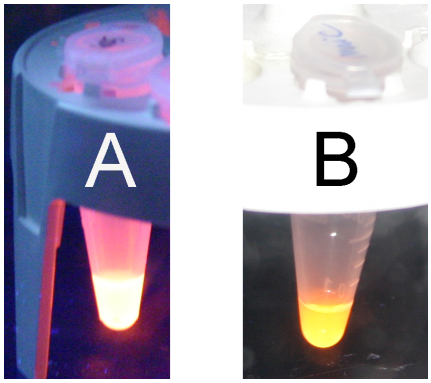


FIGURE 2.13 – Photographies des QDs ayant subi le protocole d'électroporation mais sans cellules dans du milieu de culture et éclairés avec une lampe UV tout de suite après électroporation : QDs DHLA-SB (A) et QDs micelle (B).

dans les cellules. On peut donc supposer que la formation des agrégats dans le cytoplasme des cellules est liée aux conditions intracellulaires, par exemple à la dilution et à la présence de biomacromolécules. On ne peut toutefois pas exclure une déstabilisation de la chimie de surface causée par la décharge électrique.

La différence d'efficacité d'introduction des QDs entre la pinocytose et l'électroporation, et donc la différence de concentration cytoplasmique initiale des nanoparticules peut également expliquer les différences de cinétiques d'agrégation des Qtracker entre ces deux méthodes d'internalisation.

2.2.5 Diminution de la fluorescence au cours du temps des QDs internalisés par pinocytose

La chute de l'intensité de fluorescence observée au cours du temps pour les QDs internalisés par pinocytose ne semble pas être liée à une diminution du rendement quantique. En effet les mêmes QDs internalisés par électroporation gardent leurs propriétés optiques pendant plusieurs jours (Figure 2.14). 24h après internalisation, l'intensité de fluorescence mesurée est égale à environ 15% de celle de départ pour la pinocytose, alors que pour l'électroporation, elle vaut environ 40% (quasiment 3 fois plus). Cette diminution correspond à une dilution des QDs d'un facteur 2 après une division cellulaire. De plus, les

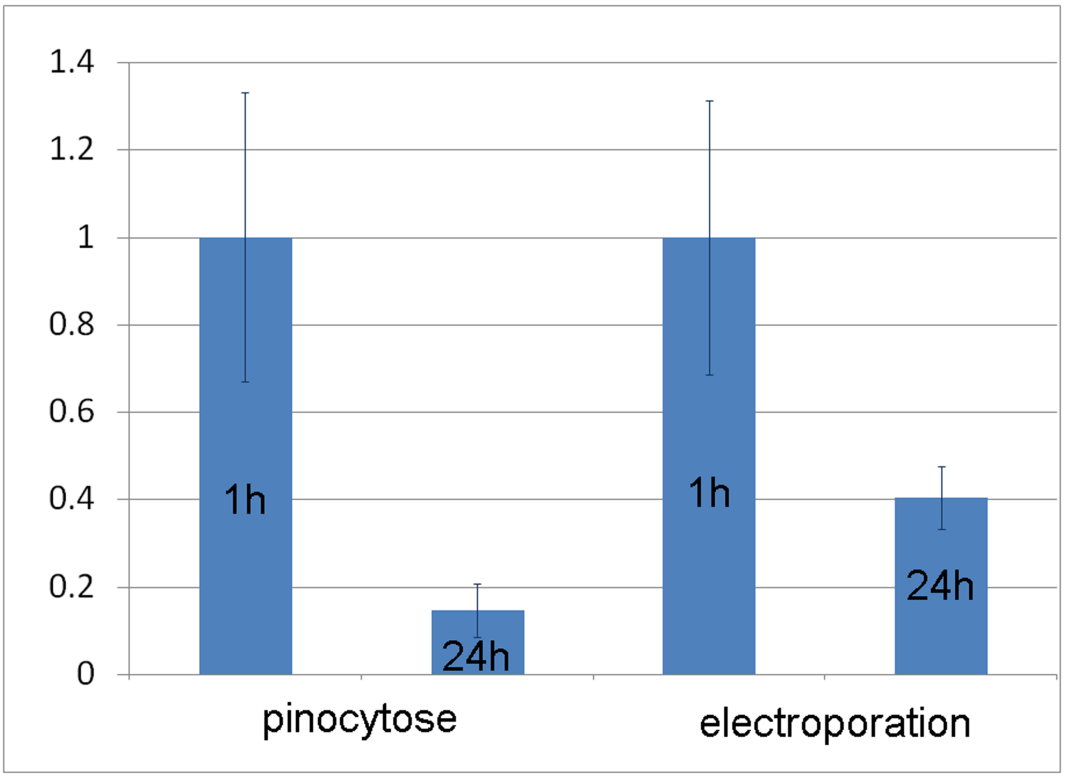


FIGURE 2.14 – Quantification de l'intensité de fluorescence des QDs DHLA-SB dans le cytoplasme d'au moins 15 cellules 1h et 24h après la pinocytose ou l'électroporation (normalisation par rapport au temps «1h»).

trois types de QDs analysés se comportent de la même façon, y compris les QDs DHLA-SB dont nous avons démontré la stabilité à pH 4 et dont la fluorescence résiste aussi dans les vésicules acides de recyclage d'un récepteur neuronal (CB1) [2]. En outre il a été démontré que la fluorescence des QDs solubilisés avec un autre ligand zwitterionique (la D-pénicillamine) était détectable dans les lysosomes. [78] Cela suggère que la diminution de fluorescence observée :

1. est liée à un processus cellulaire actif,
2. n'est pas due à un confinement dans les vésicules acides de la voie lysosomale.

Pour vérifier cela, nous avons incubé les cellules pinocytées avec les QDs DHLA-SB et les QDs micelle à +4°C une heure après leur internalisation et pendant 24 heures. A +4°C, tous les processus cellulaires actifs sont bloqués :

2. Voir chapitre suivant.

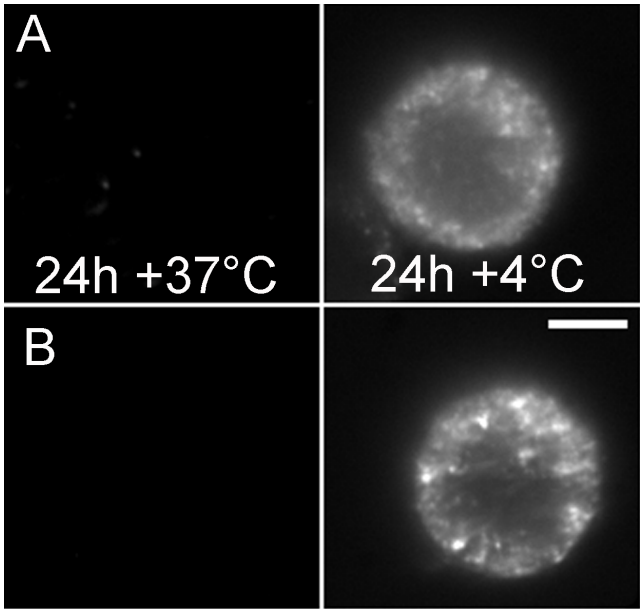


FIGURE 2.15 – Cellules pinocytées avec des QDs DHLA-SB (A) ou des QDs micelle (B), et conservées à +37°C ou à +4°C pendant 24h. Les images sont représentées avec le même contraste. La barre d'échelle vaut 10 μm.

la fluorescence des deux types de QDs reste inchangée au bout de 24 heures (Figure 2.15 A et B). On peut donc supposer que le processus cellulaire actif à l'origine de la chute de fluorescence est l'exocytose.

Une possibilité est que la «blessure» membranaire causée par le choc hypotonique provoque une réaction de la cellule similaire à l'exposition à certaines toxines, comme par exemple la toxine α de *Staphylococcus Aureus*. [79] La toxine α crée des pores dans la membrane et la cellule réagit d'abord avec l'endocytose pour isoler les portions de membrane endommagées et ensuite avec la progressive expulsion des exosomes (contenants la toxine). [79]

L'exocytose induite par un choc hyposmotique a déjà été démontrée pour d'autres types cellulaires. [80][81] En effet, lors du choc hyposmotique le volume de la cellule augmente et par conséquent les processus d'exocytose s'intensifient, probablement pour limiter les tensions sur la membrane plasmique induits par l'accroissement de la taille et pour rétablir le volume cellulaire initial. Cependant ces effets ont lieu quelques minutes après le choc, ce qui ne correspond pas à la cinétique de diminution de la fluorescence observée dans nos expériences de pinocytose. Toutefois on peut supposer qu'un mécanisme

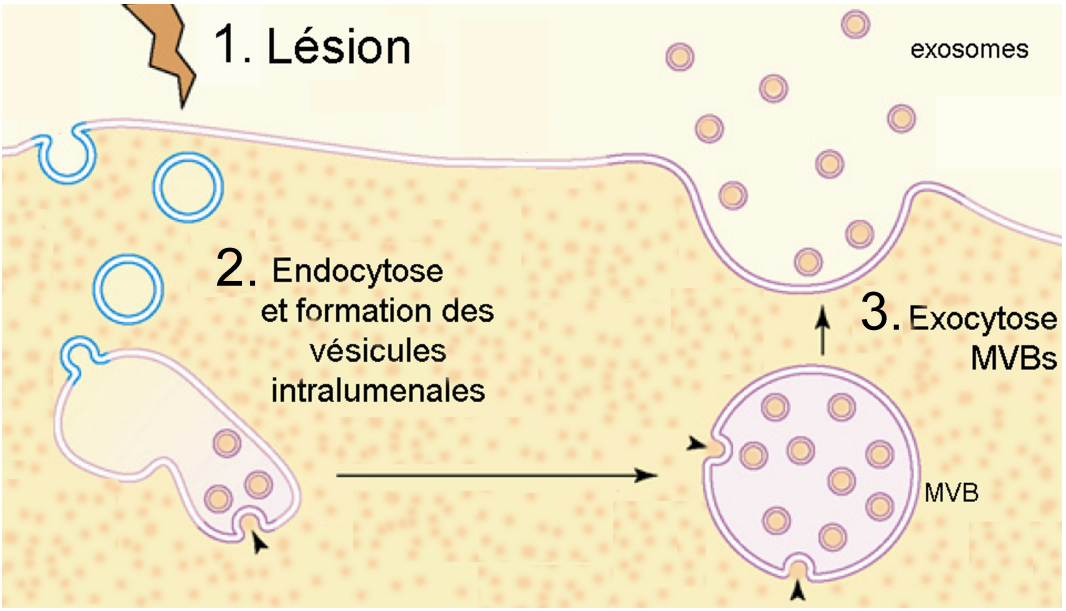


FIGURE 2.16 – Schéma du modèle proposé pour le mécanisme d'exocytose des QDs induit par le choc hypotonique. Notons que les QDs sont représentés par des disques oranges (modifié de [83]).

équivalent avec une cinétique plus lente existe, similaire à celui de la toxine α.

Un autre point à clarifier est la voie empruntée par les QDs pour sortir de la cellule. En effet, nous avons vu que les QDs sont libres dans le cytoplasme après pinocytose, alors que pour sortir de la cellule par exocytose, il faudrait qu'ils soient internalisés dans des vésicules.

Une possibilité est que les QDs soient progressivement incorporés dans les Multi Vesicular Bodies (MVBs), des corps intracellulaires qui contiennent dans leur lumen plusieurs vésicules (appelées microvésicules ou exosomes). Les exosomes sont des vésicules d'environ 50-100 nm de diamètre qui se forment par invagination des MVBs incluant une portion de cytosol. [82] Pendant la formation des exosomes, qui pourrait être intensifiée à cause du choc hypotonique, les QDs diffusent dans le cytoplasme et peuvent donc être incorporés de façon aléatoire dans leur lumen. La fusion avec la membrane plasmique des MVBs contenant les exosomes et donc les QDs permettraient l'expulsion des QDs de la cellule (voir schéma de la Figure 2.16).

Les expériences pour vérifier ce modèle sont en cours au laboratoire.

2.3 Conclusions

Nous avons étudié la stabilité des QDs dans le cytoplasme au cours du temps et nous avons proposé une méthode d'analyse qui permet de quantifier la cinétique d'agrégation par microscopie de fluorescence et donc de comparer les comportements intracellulaires des différents types de nanoparticules. La comparaison de la stabilité intracellulaire des QDs au cours du temps montre clairement l'influence de la chimie de surface dans le devenir intracellulaire des nanoparticules pour les trois techniques d'introduction utilisées. Les QDs micelle s'agrègent plus vite et les QDs DHLA-SB sont les plus stables. Les QDs DHLA-SB ne présentent pas d'agrégation deux semaines et demie après leur injection dans un embryon de *Xenopus Laevis* et ont accès à quasiment tous les compartiments cellulaires, même au pont mitotique entre deux cellules filles. Comme illustré par la Figure 2.4, le mécanisme d'agrégation ne semble pas impliquer de processus cellulaire actif, mais plutôt dépendre de l'affinité des ligands pour la surface des QDs et/ou de la furtivité de la nanoparticule. Les molécules de surface sont probablement en équilibre entre un état adsorbé et un état désorbé, et l'effet de la concentration intracellulaire des QDs sur la cinétique d'agrégation semble confirmer le rôle de la désorption des ligands dans l'agrégation. Cet équilibre dépend de l'affinité des ligands qui est déterminée par leur nature et par le nombre de groupements d'accroche par molécule.

2.4 Perspectives

Nous avons conçu une nouvelle chimie de surface qui garantit aux QDs une très bonne stabilité intracellulaire. Cela permet d'envisager différentes applications dont le marquage spécifique intracellulaire en cellules vivantes, qui sera traité dans le chapitre suivant. Nous pourrions sans doute encore améliorer cette stabilité en augmentant l'affinité entre les ligands et la surface du QD. Cela est possible soit en utilisant des ligands qui présentent plusieurs groupes d'accroche (comme par exemple le polymère DHLA/SB) soit en optimisant la synthèse des nanoparticules. Une étude pour clarifier les facteurs qui influencent les interactions entre les ligands et la surface inorganique de la nanoparticule en fonction de la synthèse sera nécessaire pour maîtriser la

qualité de l'échange.

Nous avions commencé à nous intéresser à l'électroporation et à la pinocytose comme méthodes d'internalisation des QDs parce que nous souhaitions produire des vecteurs viraux (Virus-Like Particles, VLPs) contenant les nanoparticules. En utilisant des cellules transfectées avec une partie du génome du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), nous espérions introduire de façon passive les nanoparticules dans les capsides pendant le bourgeonnement du virus (Figure 2.17). Cette stratégie aurait à la fois permis d'étudier les étapes précoces de l'infection de virus au niveau unique et de marquer des cibles cellulaires spécifiques avec les capsides virales contenant les nanoparticules. Celles-ci auraient notamment permis de marquer avec des nanoparticules des types cellulaires fragiles, comme les cellules souches, en choisissant une enveloppe de capside adaptée [3].

Nous avons seulement pu faire quelques essais qui n'ont pas donné de résultats concluants, probablement parce que nous utilisions la pinocytose comme méthode d'introduction (avec laquelle nous observons une diminution de la fluorescence au cours du temps, probablement due à l'exocytose des QDs) et l'encapsulation des QDs en micelles de phospholipides PEG comme chimie de surface. Les QDs micelle ne sont en effet pas très stables et les agrégats ont une taille qui les empêche d'être inclus dans les VLPs. De plus, nous avons utilisé une lignée stable de P4 SIV GAG (donnée par le Dr Pierre Charneau de l'Institut Pasteur à Paris) qui produisait des capsides GAG de SIV (Simian immunodeficiency virus) vides mais en quantité trop faible.

Avec les QDs DHLA-SB, qui sont stables dans le cytoplasme pendant au moins 30 heures lorsqu'ils sont internalisés par électroporation, il serait probablement possible de réaliser ce projet. Des virus marqués avec des QDs ont déjà été produits, [84][85] mais seulement en utilisant des marquages extracellulaires.

Une autre application possible de l'électroporation de QDs est le marquage de cellules tumorales afin d'étudier leur trafic *in vivo*. En collaboration avec le Laboratoire «Microenvironnement Immunitaire et Tumeurs» du centre de Recherche des Cordeliers, nous souhaitons caractériser les mécanismes de mi-

3. L'enveloppe est la partie du virus qui interagit avec la cible et qui détermine la méthode par laquelle se fait l'infection : fusion avec la membrane de la cible ou endocytose.

FIGURE 2.17 – Formation de vecteurs viraux contenant les QDs par électroporation. (A) Image au microscope électronique d'une cellule bourgeonnant une particule virale. (B) Schéma du vecteur viral contenant les QDs (noter que le vecteur viral et les QDs ne sont pas à la même échelle, le diamètre d'un virus de SIV est environ 100 nm).

gration métastatique par voie sanguine des cellules lymphomateuses B intraoculaires, à l'origine des métastases cérébrales qui apparaissent dans la quasi totalité des cas de lymphomes intraoculaires primitifs (PIOL). L'étude des cellules tumorales métastatiques circulantes dans un modèle murin de PIOL est aujourd'hui encore très difficile en raison du très faible nombre de cellules marquées avec la GFP détectables dans le sang. Une solution serait de marquer les cellules avec des sondes fluorescentes plus brillantes, comme les QDs. Le projet prévoit donc l'injection intraoculaire de cellules tumorales électroporées avec des QDs infrarouges, qui permettent une imagerie plus efficace dans le petit animal, et le suivi cinétique de leur dissémination sanguine.

Les expériences pour valider le modèle d'exocytose des QDs internalisés par pinocytose sont également une perspective de ce travail.

Chapitre 3

Les Quantum Dots comme sondes spécifiques

3.1 Méthodes de fonctionnalisation des QDs

L'utilisation des QDs pour le marquage spécifique requiert leur fonctionnalisation, c'est-à-dire l'accrochage à leur surface d'au moins une molécule capable de «reconnaître» une cible de façon spécifique. Plusieurs approches ont été utilisées et ont été décrites dans la littérature. On peut distinguer trois stratégies principales (voir schéma de la Figure 3.1) :

1. le QD est solubilisé à l'aide de molécules dont certaines présentent un groupe réactif, que l'on fera ensuite réagir avec la molécule de ciblage ;
2. le QD est solubilisé directement à l'aide de molécules dont certaines présentent une fonction de ciblage ;
3. le QD est solubilisé puis mélangé avec des molécules de ciblage contenant un groupe affin pour sa surface inorganique (par exemple le His TAG).

Le couplage le plus couramment utilisé pour la première méthode prévoit la formation d'une liaison peptidique entre le QD et la molécule de ciblage, à savoir une liaison covalente formée entre un carboxylate et une amine primaire qui correspond à une fonction amide.

L'avantage de la deuxième et de la troisième méthode est qu'il n'est pas nécessaire d'exposer les nanoparticules solubilisées à des réactions chimiques et aux lavages additionnels conséquents qui peuvent perturber la chimie de sur-

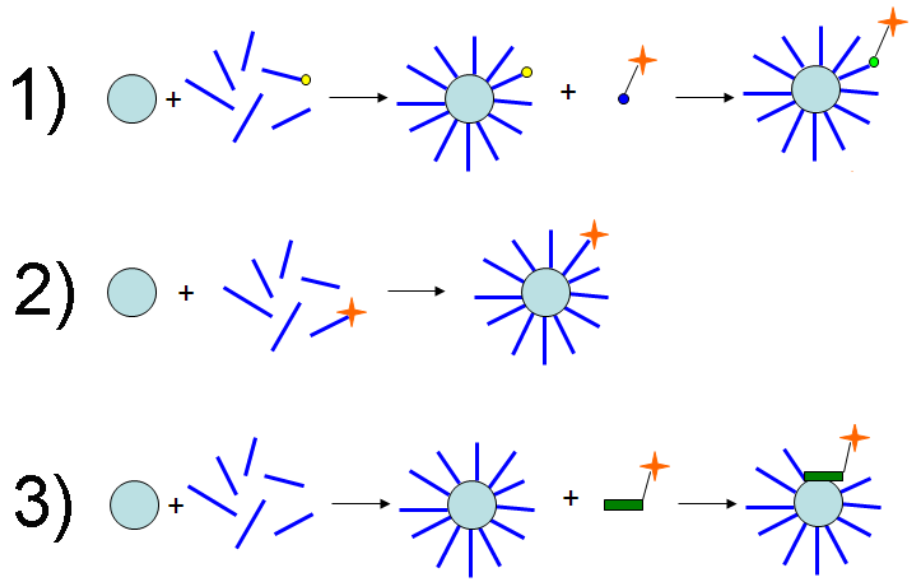


FIGURE 3.1 – Schéma des stratégies de fonctionnalisation des QDs. 1) Le QD est solubilisé à l'aide de molécules dont certaines présentent un groupe réactif, que l'on fera ensuite réagir avec la molécule de ciblage ; 2) le QD est solubilisé directement à l'aide de molécules dont certaines présentent une fonction de ciblage ; 3) le QD est solubilisé puis mélangé avec des molécules de ciblage contenant un groupe affin pour sa surface inorganique (par exemple le His TAG).

face et donc compromettre la stabilité des QDs. Toutefois, dans la deuxième méthode, le choix des molécules fonctionnelles est limité parce qu'elles devront souvent supporter des hautes températures pendant la solubilisation des nanoparticules. Par exemple, avec cette stratégie on peut insérer de la biotine, comme je le décrirai dans le prochain sous-chapitre. La troisième méthode utilise l'affinité de l'Histidine, un aminoacide contenant un groupe imidazole, pour la couche de ZnS des QDs. [86] Les His TAG contiennent une répétition en nombre variable de cet aminoacide et ont été historiquement utilisés pour la purification des protéines. Le His TAG se lie aux ions métalliques divalents comme le Nickel (Ni^{2+}), complexés à l'acide nitrilotriacétique (NTA). Cette méthode a été beaucoup utilisée pour la fonctionnalisation des QDs *in vitro* et aussi pour reconnaître des cibles présentant le motif His TAG en cellules vivantes. [87][45] Il a également été démontré que les acides carboxyliques présents sur la couche hydrosolubilisante des QDs se comportent de façon similaire

au NTA. Boeneman *et al.* [68] ont par exemple démontré que les ITK carboxyl QDs (Invitrogen) se lient efficacement aux His TAG en présence de Ni^{2+} et ont utilisé cette approche pour le ciblage intracellulaire.

Notons que la constante de dissociation du couple His TAG / QDs est de l'ordre du nanomolaire, ce qui peut être faible et donc limitant pour certaines applications. [86]

Plusieurs types de molécules de ciblage ont été utilisés avec des nanoparticules.

L'affinité la plus exploitée en matière de ciblage est sans doute celle qui existe entre la streptavidine et la biotine. Avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-15} M, elles forment un couple se classant parmi les plus fortes interactions non covalentes connues dans la nature. Leur utilisation pour des applications très nombreuses et diverses a conduit au développement de beaucoup d'outils désormais disponibles commercialement. De plus, on peut modifier génétiquement les protéines pour leur ajouter des séquences qui sont reconnues et biotinylées dans la cellule par l'enzyme biotine ligase. [88] Ce système a été utilisé pour marquer des cibles cellulaires spécifiques avec des QDs-streptavidine. [84]

L'utilisation du couple anticorps - haptène a également été démontrée à travers le couplage des deux molécules sur le QD. [89][10]

Une autre classe de molécules de ciblage exploite des réactions enzymatiques comme par exemple le Halo TAG, [90] une enzyme haloalcane déshalogénase, modifiée pour se lier de façon covalente et irréversible à de petits ligands synthétiques (les ligands Halo TAG) qui peuvent être déjà fluorescents ou couplés à une autre support, comme les QDs. [91]

D'autres molécules de ciblage de plus petite taille existent comme par exemple le couple FlAsH / TAG tétracystéine. L'avantage de ce dernier est que le FlAsH ne fluoresce que lorsqu'il est lié au TAG tétracystéine. Par contre, le TAG tétracystéine ne conduit pas à un marquage très spécifique car d'autres protéines dans la cellule peuvent présenter ce motif. Il a déjà été couplé sur les QDs après leur solubilisation. [92]

Nous avons mis au point des protocoles de marquage d'immunofluorescence sur cellules fixées avec les QDs micelle biotinylés. Les QDs micelle biotinylés représentent en effet une alternative intéressante aux QDs commerciaux (In-

vitrogen) pour certaines applications, car ils sont faciles et peu coûteux à préparer et présentent également une taille plus petite.

Nous avons ensuite conjugué de manière covalente des QDs DHLA-SB/DHLA-COOH à la streptavidine et nous avons démontré l'utilisation de la sonde ainsi obtenue pour le marquage de cibles extracellulaires et intracellulaires en cellules vivantes. L'utilisation des QDs pour le ciblage intracellulaire en cellules vivantes est à ce jour encore très limitée à cause de l'agrégation des nanoparticules qui a souvent lieu une fois introduites dans l'environnement biologique et de la difficulté de les introduire dans le cytoplasme. La très bonne stabilité des QDs DHLA-SB fonctionnalisés nous a permis d'obtenir des marquages intracellulaires d'excellente qualité.

3.2 Fonctionnalisation des QDs micelle

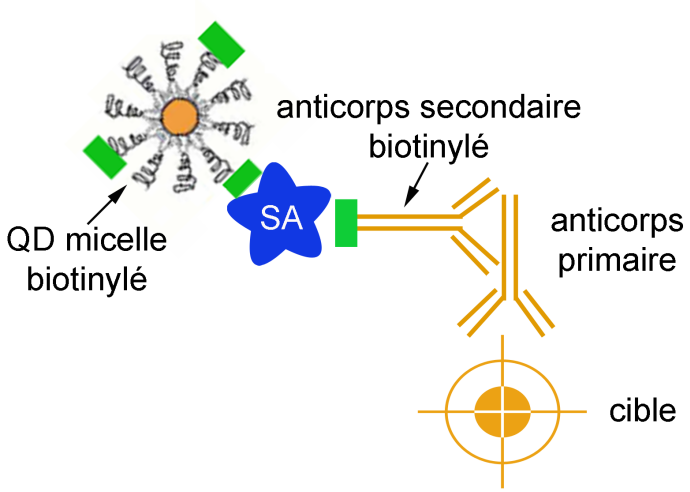


FIGURE 3.2 – Schéma du marquage d'immunofluorescence avec les QDs micelle biotinylés. SA=streptavidne.

Une des méthodes de fonctionnalisation les plus simples pour les QDs micelle consiste à produire des QDs biotine : il suffit en effet de mélanger aux phospholipides PEG 2000, des phospholipides modifiés avec la biotine (les deux sont disponibles commercialement) dans les proportions souhaitées. Après avoir bien mélangé au vortex, l'encapsulation est réalisée comme d'habitude (Figure 1.1). [27] Dans toutes les expériences rapportées ici, le pourcentage de

phospholipides PEG 2000-biotine est de 3%, ce qui permet d'avoir au moins une biotine sur chaque nanoparticule. Les QDs biotine ainsi obtenus ont été utilisés pour du marquage d'immunofluorescence dont le schéma est représenté sur la Figure 3.2.

Brièvement, le protocole comporte 7 étapes :

1. fixation (20 minutes, 2% formaldéhyde) des cellules HeLa déposées la veille sur une lamelle + 3 lavages ;
2. perméabilisation (5 minutes 0,5% Triton) + 5 lavages ;
3. incubation (30 minutes) avec un anticorps primaire spécifique pour la cible que l'on veut marquer [1] + 3 lavages ;
4. incubation (30 minutes) avec un anticorps secondaire biotinylé spécifique pour l'espèce de l'anticorps primaire + 3 lavages ;
5. incubation avec la streptavidine (30 minutes) + 3 lavages ;
6. incubation avec une solution à 50 nM de QDs micelle biotinylés (15 minutes) + 5 lavages ;
7. montage de la lamelle sur une lame (avec du Mowiol 4-88).

Toutefois les QDs micelle ne peuvent pas être directement utilisés sur des cellules fixées et perméabilisées car leur adsorption non spécifique est trop importante. Nous nous sommes donc attachés à mettre au point un protocole pour obtenir un marquage de bonne qualité, c'est-à-dire avec un rapport «signal spécifique / signal non spécifique» élevé.

3.2.1 Conditions de réalisation du marquage immunofluorescent

Bloqueurs La première étape pour utiliser des QDs micelle comme sondes pour marquer des cellules fixées en immunofluorescence a consisté à trouver le bon bloqueur pour saturer les sites non spécifiques. Nos premiers essais ont été réalisés avec une solution de PBS 3% albumine 0,5% Triton pour incuber les cellules pendant 15 minutes avant le marquage. Cette solution n'a jamais conduit à des marquages suffisamment spécifiques pour pouvoir les distinguer

1. Dans ce chapitre nous montrons des marquages d'immunofluorescence pour la ß-tubuline (cytosquelette), la lamine B1 (enveloppe nucléaire) et GM130 (appareil de Golgi).

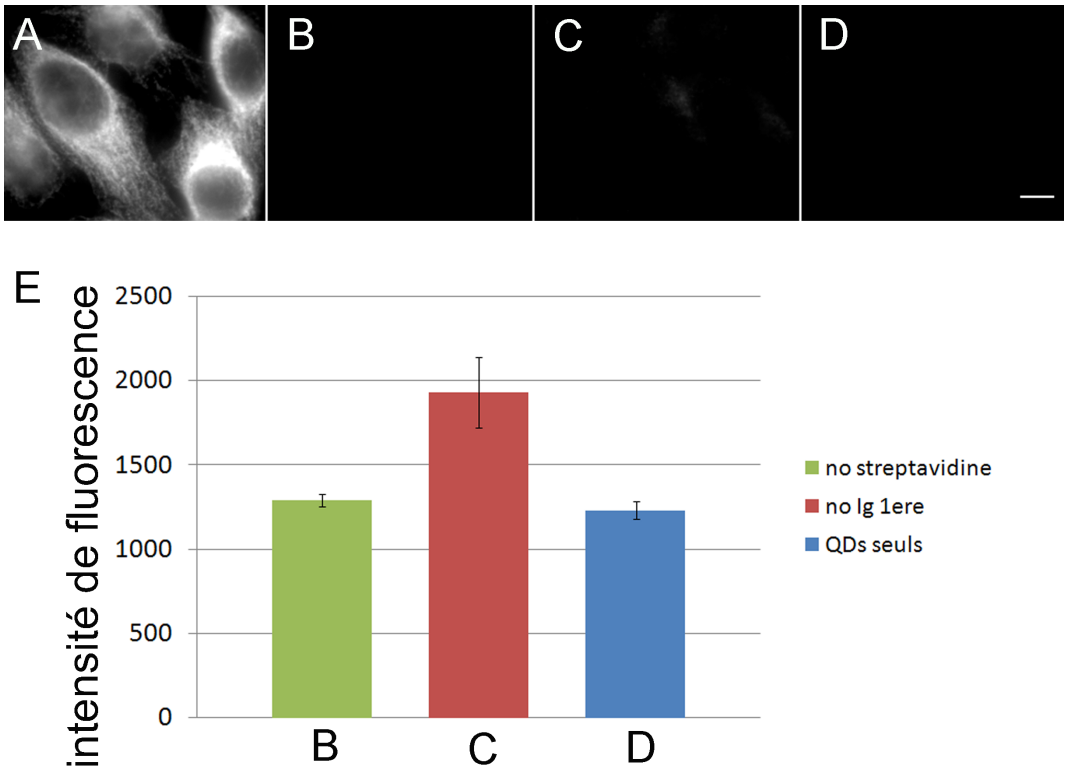


FIGURE 3.3 – β-Tubuline marquée par des QDs micelle biotinylés (A) et contrôles négatifs correspondants : sans la streptavidine (B), sans l'anticorps primaire (C), QDs seuls (D). Toutes les images sont représentées avec la même échelle de niveaux de gris. Les QDs ont été pré-incubés dans la caséine et les cellules dans une solution de PBS 10% sérum de chèvre. (E) Quantification de l'intensité de fluorescence sur les cellules témoins (au moins 7 cellules par cas) marquées sans la streptavidine (en vert), sans l'anticorps primaire (en rouge), et seulement avec les QDs (en bleu). Le schéma du marquage est donné en Figure 3.2. La barre d'échelle vaut 5 µm.

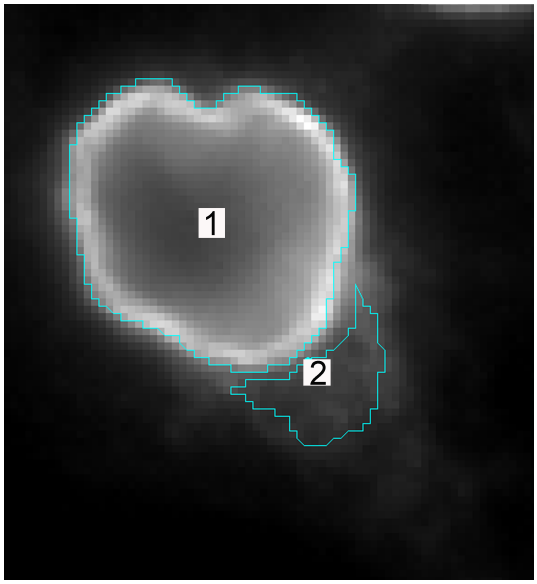


FIGURE 3.4 – Régions (ROIs) pour la quantification du rapport signal spécifique (1) / signal non spécifique (2) sur une cellule où la lamine B1 a été marquée par des QDs micelle biotinylés.

du signal non spécifique. Nous avons donc essayé un autre bloqueur couramment utilisé : la caséine. En incubant cette protéine du lait (diluée à 0,5% dans du PBS) avec les QDs micelle pendant 1h avant le marquage mais aussi pendant l'incubation, et en pré-incubant les cellules 30 minutes avec une solution de PBS 10 % sérum (S1), nous avons pu suffisamment réduire l'adsorption non spécifique pour révéler le signal spécifique, comme on peut le voir dans la Figure 3.3 A, où la β-tubuline, une protéine du cytosquelette, est marquée. Toutefois le signal non spécifique subsiste et, comme confirmé par la quantification présentée dans la Figure 3.3 E, c'est en l'absence de l'anticorps primaire que le signal non spécifique est le plus fort, supérieur à celui obtenu en l'absence de la streptavidine ou avec les QDs seuls. Or la réduction de l'adsorption non spécifique est essentielle, notamment pour la réalisation d'un marquage multicouleurs (voir paragraphe suivant), c'est pourquoi nous avons voulu la réduire encore, sachant qu'elle semble provenir en grande partie de la streptavidine.

Nous avons donc mesuré le rapport «signal spécifique / signal non spécifique» pour comparer les différentes conditions permettant de bloquer l'adsorption non spécifique sur un système qui permet, contrairement à celui de la β-tubuline, de distinguer les deux signaux : des cellules où la lamine B1 est

marquée.

La lamine B1 est une protéine qui se trouve dans la lamina nucléaire, qui borde le côté intérieur de l'enveloppe nucléaire. Nous avons donc défini deux régions : une spécifique, correspondant au noyau («ROI 1» dans la Figure 3.4) et une non spécifique dans le cytoplasme, donc en dehors du noyau marqué spécifiquement («ROI 2» dans la Figure 3.4). Les images étant prises avec un microscope à épifluorescence classique, l'intérieur du noyau, délimité par le marquage de la lamine, n'apparaît pas noir mais contient un signal de fluorescence lui aussi spécifique, provenant de l'ensemble de l'enveloppe du noyau contenue dans les plans hors du plan de mise au point. Cette analyse nous permet de quantifier le rapport « signal spécifique / signal non spécifique » pour une cellule marquée.

Les bloqueurs que nous avons testés sont :

1. Pré-incubation des QDs dans une solution de PBS 0,5% caséine pendant 1h avant utilisation et pendant le marquage : «C» ;
2. Pré-incubation des cellules avec le bloqueur des avidines et biotines (Invitrogen) : «Block A/B» ;
3. Pré-incubation de 30 minutes des cellules dans une solution de PBS 10 % sérum : «S1» ;
4. Pré-incubation des QDs dans une solution de PBS 10 % sérum : «S2».

Nous avons testé les combinaisons suivantes des bloqueurs cités ci-dessus :

1. C
2. C + block A/B
3. C + S1
4. S1 + S2
5. S1 + (C + S2) [2]

Le protocole qui permet d'obtenir le plus grand rapport « signal spécifique / signal non spécifique » (Figure 3.5) correspond à la pré-incubation des QDs avec la caséine seule (C). L'exemple dans la Figure 3.6 représente deux cas très différents : l'incubation dans la caséine (C) seule (image A) et les deux incubations dans le sérum (S1 + S2) sans caséine (image B). Le signal non spécifique

2. Pré-incubation des QDs avec une solution contenant le sérum et la caséine 1h avant utilisation et pendant le marquage.

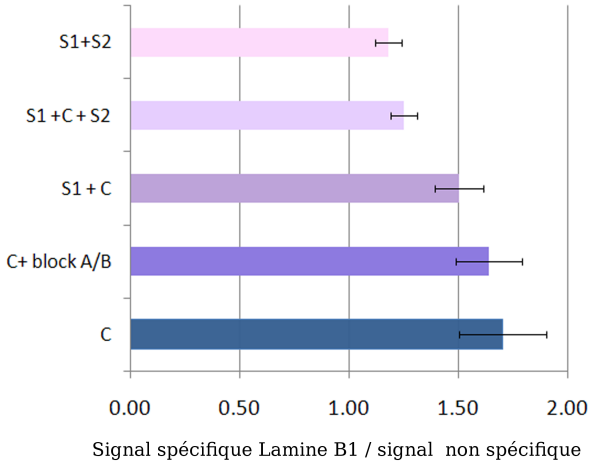


FIGURE 3.5 – Influence du bloqueur sur le rapport marquage spécifique / marquage non spécifique. C = pré-incubation des QDs avec la caséine ; block A/B = bloqueur des avidines et biotines (Invitrogen) ; S1 = pré-incubation des cellules pendant 30 minutes dans une solution de PBS 10% sérum de chèvre ; S2 = pré-incubation des QDs dans une solution de PBS 10% sérum de chèvre. La moyenne est calculée avec au minimum 40 cellules par cas.

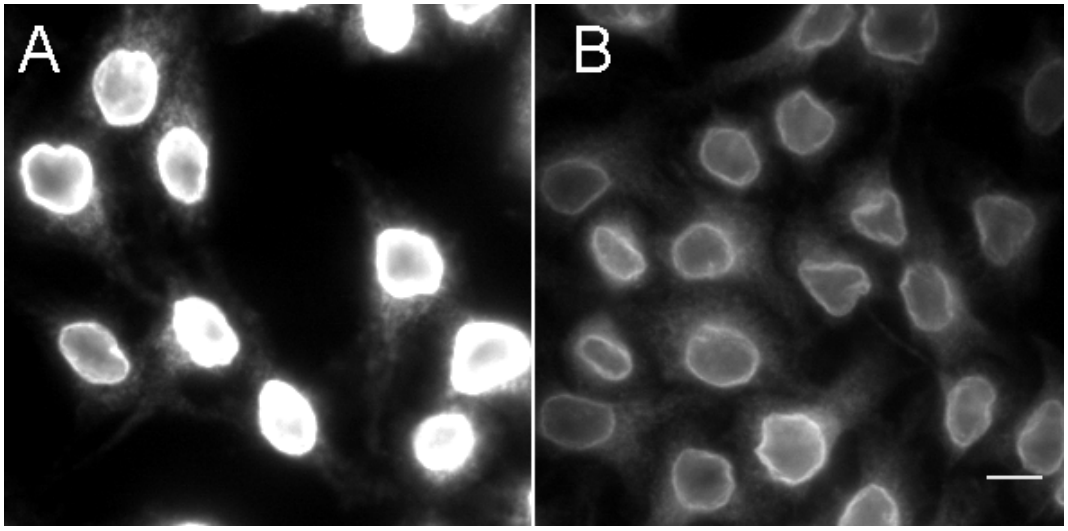


FIGURE 3.6 – Lamine B1 marquée avec des QDs micelle avec différents bloqueurs : A) avec pré-incubation des QDs dans la caséine, B) avec pré-incubation des cellules pendant 30 minutes dans une solution de PBS 10% sérum de chèvre et pré-incubation des QDs dans la même solution (sans caséine). Les deux images sont présentées avec la même échelle de niveaux de gris. Le schéma du marquage est donné Figure 3.2. La barre d'échelle vaut 5 µm.

	% diminution signal spécifique (noyau) par rapport à ref. (C)	% diminution signal non spécifique (cytoplasme) par rapport à ref. (C)
C+block A/B	15	12
S1 + C	26	12
S1 + C + S2	45	25
S1 + S2	37	9

Tableau 3.1 – Diminution de l'intensité des signaux spécifiques et non spécifiques lors de l'utilisation des différents bloqueurs par rapport au cas de la caséine seule (notée ref). C = pré-incubation des QDs avec la caséine ; block A/B = bloqueur des avidines et biotines (Invitrogen) ; S1 = pré-incubation des cellules pendant 30 minutes dans une solution de PBS 10% sérum de chèvre ; S2 = pré-incubation des QDs dans une solution de PBS 10% sérum de chèvre.

est comparable pour les deux échantillons mais le signal spécifique est plus important dans le premier cas (A). En effet la moyenne du signal non spécifique (dans le cytoplasme) dans le cas des deux incubations avec sérum et sans caséine ne diminue que de 9%, alors que le signal spécifique (noyau) diminue de 37% par rapport à l'incubation dans la caséine seule (Tableau 3.1). Le sérum semble donc réduire davantage le signal spécifique que le signal non spécifique. Quand on pré-incube les QDs avec les protéines jouant le rôle de bloqueurs, celles-ci s'adsorbent probablement sur la surface des nanoparticules : on peut alors supposer que l'affinité des protéines du sérum pour les QDs est plus forte que celle de la caséine. Les protéines ainsi adsorbées sur la surface de la nanoparticule au moment du marquage pourraient constituer un encombrement stérique et gêner l'accès à la cible. En effet le sérum est riche en albumine, dont il a été montré qu'elle peut s'adsorber sur le PEG. [35] De plus cette protéine contient six ponts disulfure qui, en milieu réducteur, pourraient s'ouvrir et interagir avec la surface du QD. La caséine quant à elle n'en contient aucun et établit probablement des interactions de nature hydrophobe avec la surface de la nanoparticule. Nous avons donc utilisé la caséine seule comme bloqueur en la pré-incubant 1h avec les QDs avant utilisation et pendant le marquage.

Tampon Le choix du tampon utilisé pendant le marquage avec les QDs micelle peut également influencer le marquage. En effet nous nous sommes aperçus que les QDs incubés avec des cellules fixées dans le PBS avaient beaucoup

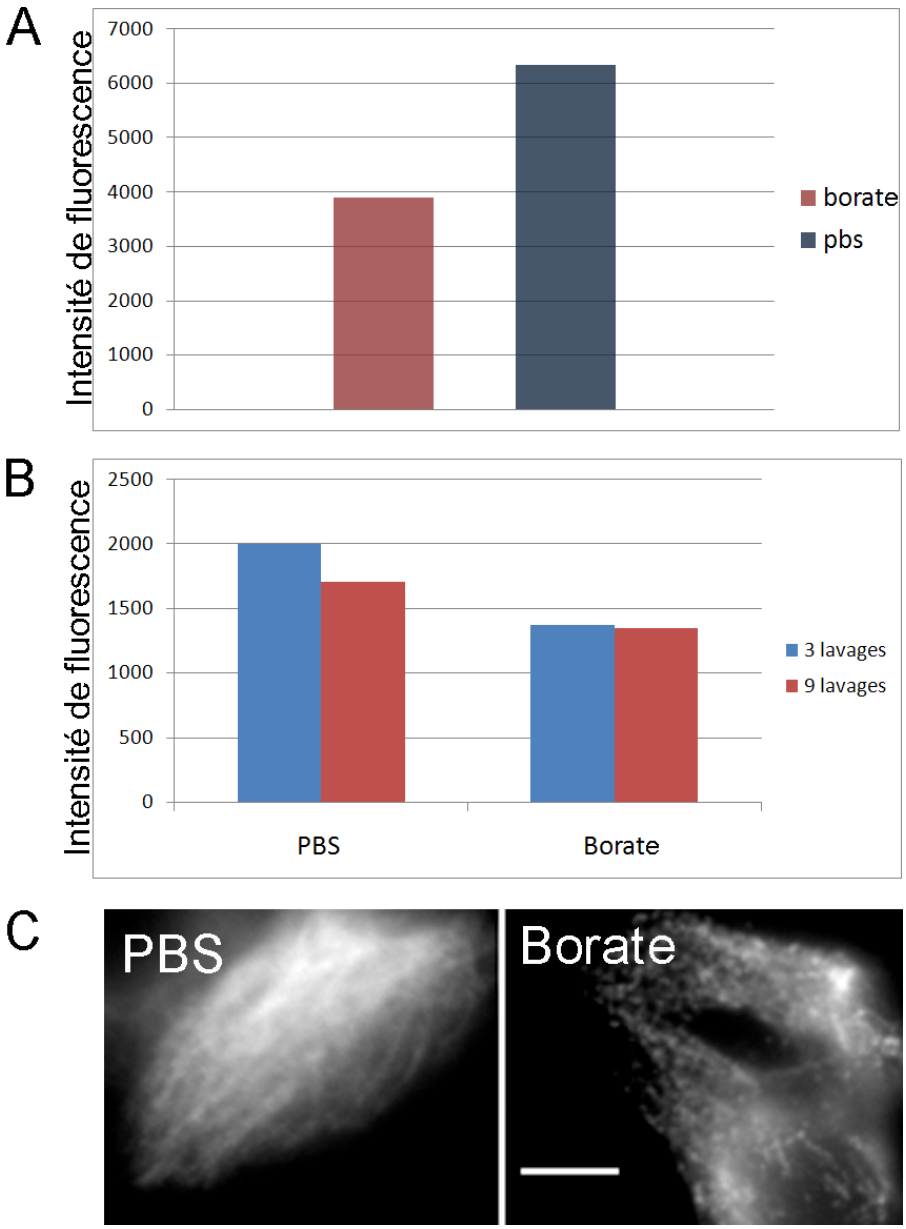


FIGURE 3.7 – Influence du tampon sur l'adsorption non spécifique (A), sur la stabilité (B) et sur le marquage spécifique (B et C). Pour B) après une incubation de 15 minutes des nanoparticules biotinylées avec les billes-streptavidine, nous avons lavé les billes trois ou neuf fois en les faisant précipiter par centrifugation et en changeant le tampon. Les quantifications ont été effectuées avec au moins 25 cellules par cas pour A) et avec au moins 30 billes par cas pour B). Le Test T de Student a révélé une différence significative avec $P<0{,}001$ pour A), avec $P<0{,}001$ entre PBS et borate « 3 lavages » en B) et avec $P<0{,}02$ entre « 3 lavages » et « 9 lavages » dans le PBS. La barre d'échelle vaut 5 µm.

plus tendance à s'adsorber de façon non spécifique que dans d'autres tampons. Nous avons donc quantifié l'adsorption non spécifique dans le PBS sur cellules fixées et nous l'avons comparée à celle obtenue dans le borate, un tampon légèrement plus basique et couramment utilisé pour les marquages avec les QDs (par exemple les QDs commerciaux Invitrogen sont fournis dans du borate). Comme on peut le voir dans la Figure 3.7 A, il y a une baisse du signal non spécifique des QDs incubés dans le borate (le test T de Student montre que cette différence est significative avec $P<0{,}001$). Nous avons également constaté que la stabilité du marquage de billes d'agarose streptavidine par des QDs biotine est accrue dans le tampon borate. En effet, si après le marquage spécifique sur ces billes d'agarose, nous augmentons le nombre de lavages dans le PBS (histogramme rouge « 9 lavages » par rapport à « 3 lavages » dans la Figure 3.7 B, test de Student significatif avec $P<0.02$) alors le signal spécifique décroît, ce qui n'est pas le cas si les lavages sont effectués dans le borate (Figure 3.7 B). La diminution du signal spécifique est probablement due au départ des QDs à la suite du décrochage des phospholipides biotine. En effet, les molécules à la surface du QD sont en équilibre entre un état adsorbé et un état désorbé donc les phospholipides biotinylés peuvent se détacher du QD tout en restant attachés aux billes d'agarose. Ainsi, comme dans le cas de la dilution, les lavages peuvent accentuer ce phénomène. Ce mécanisme est plus probable qu'un décrochage de l'ensemble du QD avec ses phospholipides biotinylés, étant donnée la très forte affinité de la biotine pour la streptavidine. De plus, nous avons aussi pu constater que les QDs encapsulés un mois avant le couplage avec les billes d'agarose streptavidine (et conservés dans l'eau) présentent une diminution de la fluorescence en fonction du nombre de lavages environ deux fois plus importante que celle observée avec des QDs fraîchement encapsulés. Cela suggère que ces objets vieillissent et confirme la faible stabilité des QDs micelle au cours du temps.

De façon surprenante, nous avons constaté que les marquages effectués dans le borate présentent un signal spécifique inférieur à celui des marquages réalisés dans le PBS. En effet, si l'on compare les filaments de β-tubuline marqués avec des QDs micelle incubés dans du borate ou dans du PBS (Figure 3.7 C), les premiers sont moins continus et le signal est moins fort. De plus cette différence a été confirmée par la quantification du marquage spécifique sur

des billes streptavidine (comparer les histogrammes bleus « 3 lavages » pour PBS et borate dans la Figure 3.7 B, P<0,001 avec le test T de Student). A ce jour, nous n'avons pas trouvé les raisons qui expliqueraient ce résultat. Pour contourner ces effets liés au tampon, nous conservons les QDs dans de l'eau, les pré-incubons avec la caséine dans de l'eau également et les diluons dans le PBS juste avant le marquage.

3.2.2 Conclusions et perspectives pour le marquage immunofluorescent sur cellules fixées

Le protocole que nous avons mis au point prévoit donc :

1. l'utilisation du PBS, plutôt que du borate, comme tampon d'incubation des QDs micelle mais avec une incubation brève,
2. l'utilisation de la caséine plutôt que de l'albumine (ou le sérum) comme bloqueur.

Ce protocole nous a permis d'obtenir des marquages d'immunofluorescence avec des QDs micelle sur cellules fixées de bonne qualité, et de réaliser des coupes optiques de ces échantillons en microscopie confocale (Figure 3.8 A) et en microscopie à illumination structurée (Figure 3.8 B).

Nous avons ensuite essayé de réaliser des marquages immunofluorescents bi-couleur de cellules en marquant deux protéines distinctes. L'utilisation de QDs permet de les imager simultanément avec une seule longueur d'onde d'excitation et de séparer spectralement les longueurs d'onde d'émission à la détection. Nous voulions fonctionnaliser les QDs micelle avec des anticorps, en introduisant dans la micelle des phospholipides se terminant par des groupes fonctionnels (comme des amines par exemple), mais nous n'avons jamais réussi cette expérience, probablement à cause de la faible stabilité de cette chimie de surface. En effet, ces nanoparticules peuvent être perturbées par les réactions chimiques et les lavages que le couplage comporte. Une autre possibilité est que les macromolécules couplées sur le QD interagissent avec la couche hydrophobe des micelles et deviennent alors difficiles d'accès pour les cibles. Nous avons donc essayé de mettre au point un protocole de marquage bi-couleur de la β-tubuline (Figure 3.8 C) et de GM130 (protéine de l'appareil de Golgi, Figure 3.8 D) avec les QDs micelle biotinylés. Ce protocole est très similaire

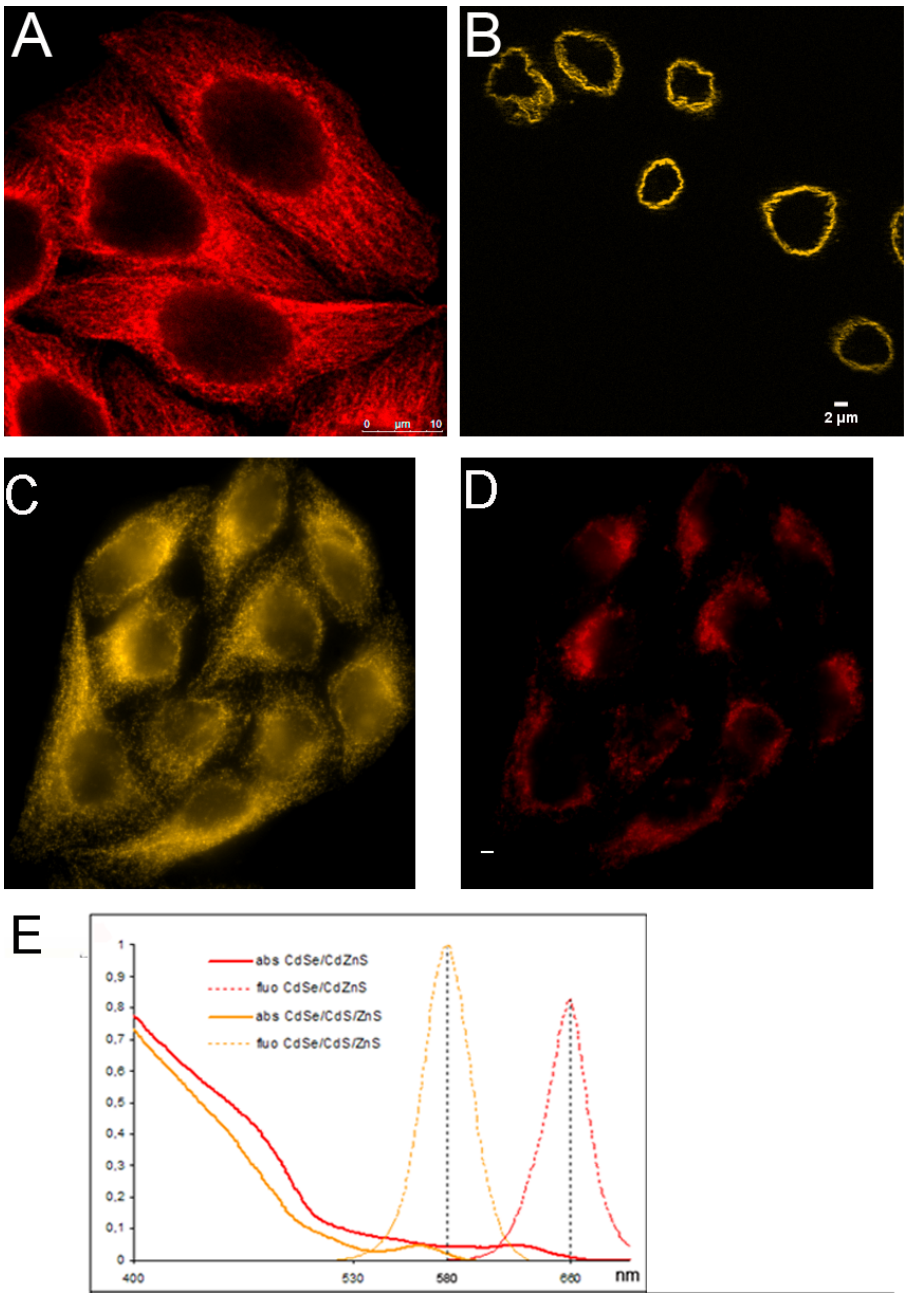


FIGURE 3.8 – Immunofluorescence sur cellules fixées et perméabilisées avec des QDs micelle 3% biotine. (A) β-tubuline marquée avec des QDs CdSe/CdS/ZnS à 580 nm (image acquise au microscope confocal par Paul Tchenio, Laboratoire Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire, ESPCI). (B) Lamine B1 marquée par les mêmes QDs (image obtenue en microscopie à illumination structurée). (C et D) Marquage bi-couleur avec des QDs à 580 nm pour la β-tubuline (C) et des QDs CdSe/CdZnS à 660 nm pour GM130 (D) (images en épifluorescence, la barre d'échelle vaut 2 µm). (E) Spectres d'absorption et de fluorescence des QDs utilisés.

à celui décrit dans les paragraphes précédents mais prévoit un marquage séquentiel des deux protéines (Figure 3.9), avec entre les deux, un traitement avec le bloqueur des avidines et biotines (Invitrogen). Ce bloqueur était en effet celui qui modifiait le moins le marquage spécifique (Figure 3.5 et Tableau 3.1) et nous a permis de bloquer les biotines et les streptavidines disponibles entre les deux marquages. Nous avons utilisé des QDs avec deux longueurs d'onde distinctes : des CdSe/CdS/ZnS à 580 nm pour la β-tubuline et des CdSe/CdZnS à 660 nm pour GM130 (Figure 3.8 E). La préparation de ces échantillons est très longue, et leur qualité est légèrement inférieure à celle d'un mono-marquage. On pourrait espérer l'améliorer avec des QDs-anticorps mais cela suppose la fonctionnalisation des QDs et donc l'utilisation d'autres chimies de surface (comme par exemple les ligands DHLA-SB, mélangés avec les DHLA-PEG-COOH).

La réalisation de ces échantillons sert actuellement à valider une technique de microscopie à super résolution développée au sein du groupe en collaboration avec l'équipe de J.C. Olivo-Marin (Laboratoire «Analyse d'images quantitative» à l'Institut Pasteur), et qui permet d'atteindre une résolution latérale de 100 nm. [93]

3.3 Fonctionnalisation des QDs-DHLA-SB

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le paragraphe précédent, nous avons essayé de fonctionnaliser les QDs micelle avec des biomacromolécules mais nous n'avons pas réussi cette expérience.

Nous avons donc essayé d'utiliser une chimie alternative plus stable, décrite dans le chapitre précédent : l'échange de ligands avec le DHLA-SB. Le ligand DHLA-SB est un bon candidat car il est inerte vis-à-vis des schémas de couplage les plus communs, puisqu'il ne contient ni amine primaire (NH_2), ni acide carboxylique (COOH). Cela permet donc de contrôler le nombre et la nature des groupes fonctionnels introduits en faisant des échanges avec des mélanges de ligands DHLA-SB et de ligands fonctionnels dans des proportions définies. Comme on peut le voir dans la Figure 3.10, si l'on compare des échanges avec le DHLA-SB seul ou avec un mélange contenant un pourcentage croissant de DHLA-PEG600-COOH, on observe une augmentation de la mo-

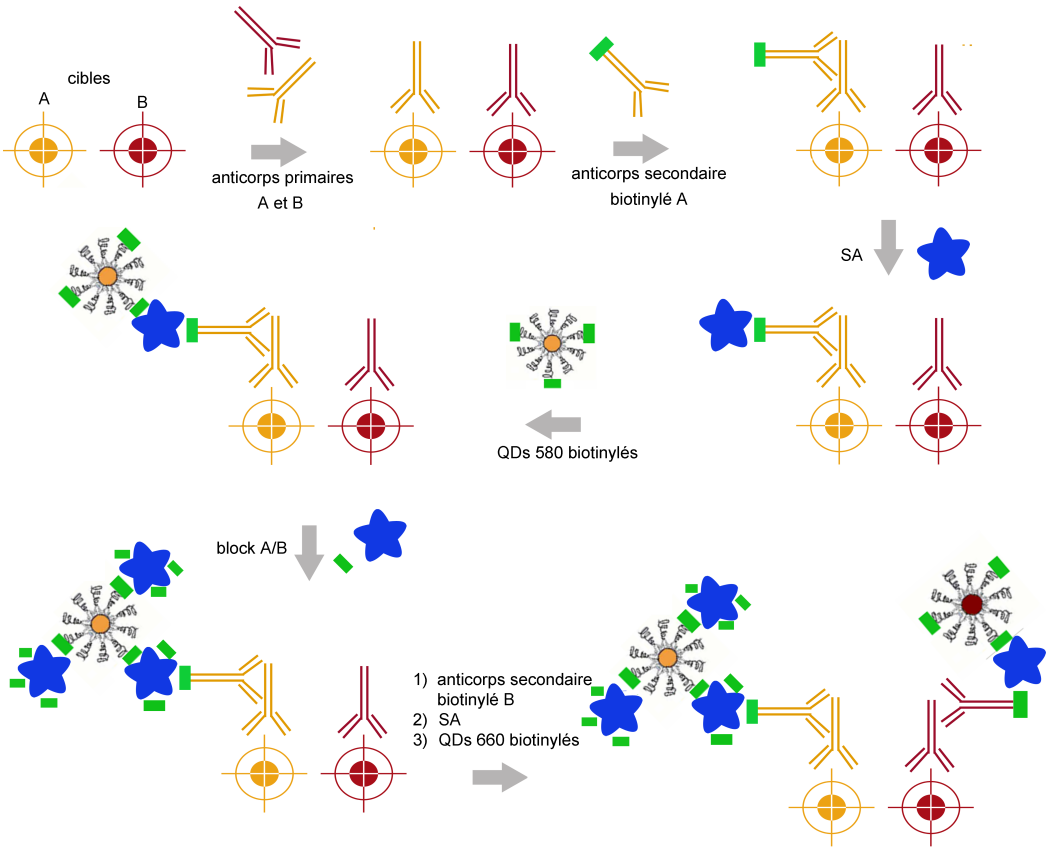


FIGURE 3.9 – Schéma du marquage bi-couleur. Notons que les étapes indiquées par la dernière flèche (en bas 1), 2) et 3)) sont successives et pas simultanées. SA = streptavidine ; block A/B = bloqueur des avidines et biotines (Invitrogen).

bilité en électrophorèse sur un gel 1% d'agarose cohérente avec l'augmentation des charges négatives présentes sur le DHLA-PEG600-COOH (à pH 7,2). Pour essayer d'estimer la quantité de groupes fonctionnels introduits, nous avons préparé des mélanges composés pour moitié de DHLA-SB et pour l'autre moitié de DHLA-PEG600-FITC et, après purification par ultracentrifugation, nous avons mesuré l'absorbance pour en déduire le nombre de ligands fluorescents. La quantification de l'absorbance du FITC a révélé une composition d'environ 10 molécules de DHLA-PEG600-FITC par QD. Notons que la proportion de molécules fonctionnelles ajoutées pendant l'échange de ligands sur les QDs ne correspond pas nécessairement à celle des molécules présentes sur la surface du QD après échange. Nous avons ensuite tenu compte de cette quantification

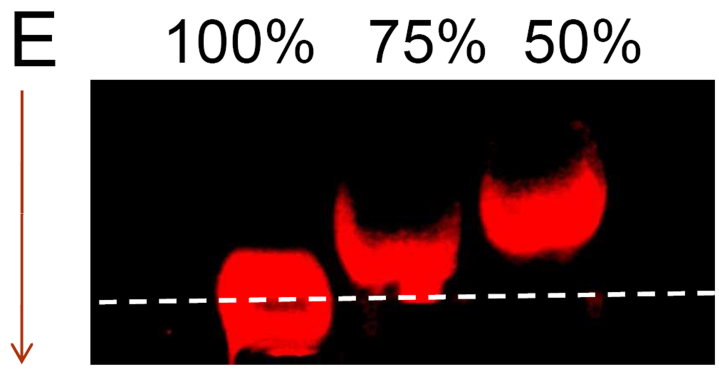


FIGURE 3.10 – Électrophorèse sur gel d'agarose de QDs échangés avec 100% DHLA-SB, 75 % DHLA-SB (25% DHLA-PEG-COOH) et 50% DHLA-SB (50% DHLA-PEG-COOH) (de gauche à droite). La ligne pointillée blanche représente la position des puits.

pour réaliser des couplages de QDs avec la streptavidine.

Nous avons pu coupler la streptavidine sur les QDs échangés avec 50% DHLA-SB - 50% DHLA-PEG600-COOH grâce à la bioconjugaison classique Chlorhydrate de 1-Ethyl-3- (3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) / N-hydroxysuccinimide (NHS). Ces QDs ont été activés avec 10000 équivalents de EDC et NHS dans du tampon acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique [3] (MES, 100 mM, pH 6,2) pendant 30 minutes. Les réactifs en excès ont été lavés par ultrafiltration sur membrane de 10 kDa (Vivaspin). Les QDs activés ont été incubés avec 50 équivalents de streptavidine dans du tampon sodium bicarbonate (200 mM, pH 8.1) pendant 1h. La réaction favorise la formation d'un lien amide entre le COOH des QDs activé sous la forme d'un ester et une fonction NH_2 de la streptavidine. Les QDs-SA DHLA-SB ainsi obtenus ont été concentrés par ultrafiltration et purifiés par ultracentrifugation à 200000 g pendant 30 minutes sur gradient de sucrose 20mM NaCl (10-40%). L'efficacité du couplage a été démontrée en mélangeant 6 pmol de QDs-SA avec des billes biotine pendant 15 minutes, ainsi qu'avec des billes streptavidine pour constituer un contrôle négatif. Ces billes ont été lavées quatre fois avant observation au microscope à épifluorescence (Figure 3.11 C et D).

3. Il faut noter qu'il est très important pour la réussite du couplage d'utiliser le MES et non pas un tampon phosphate au même pH. En effet, comme nous l'avons déjà observé pour les QDs micelle, le PBS peut déstabiliser les QDs.

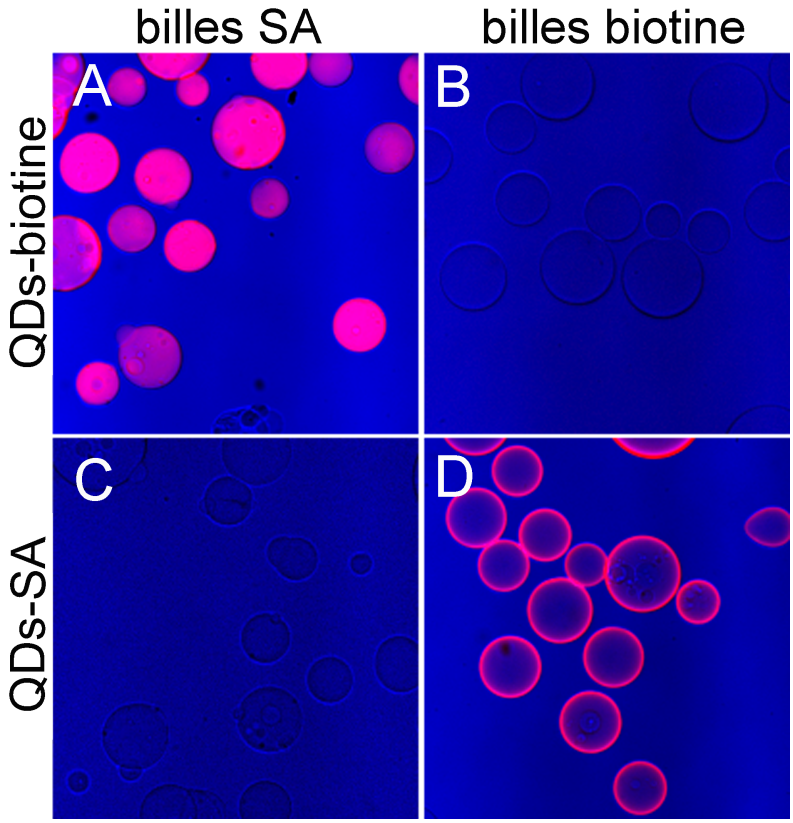


FIGURE 3.11 – Billes d'agarose streptavidine marquées avec des QDs-biotine (A) et son témoin avec des QDs-SA (B). Billes d'agarose biotinylées marquées avec des QDs-SA (D) et son témoin avec des QDs-biotine (C). Les images sont une superposition d'images de fluorescence (rouge) et de transmission (bleu).

Nous avons également pu obtenir des QDs-biotine DHLA-SB par échange avec un mélange de ligands 1 :1 DHLA-SB :DHLA-PEG600-biotine. Les QDs-biotine DHLA-SB ainsi obtenus ont été purifiés de la même façon que les QDs-SA DHLA-SB et leur spécificité a été testée sur des billes streptavidine (Figure 3.11 A) et sur des billes biotine pour le témoin (Figure 3.11 B). Les QDs fonctionnalisés présentent une affinité très forte pour les billes, comme le montre le rapport « signal spécifique / non spécifique » très élevé (de l'ordre de 3000). Ces QDs sont très stables (pendant au moins un an) s'ils sont conservés à -20°C.

Ces bons résultats de couplage ont été obtenus pour deux synthèses de QDs distinctes (QD CdSe/ZnS ou multicoques CdSe/CdS/ZnS). Toutefois, nous avons constaté des comportements variables pour d'autres lot de QDs. Ceci suggère que l'efficacité du couplage, comme la stabilité intracellulaire des nanoparticules, pourrait dépendre de l'affinité des ligands pour la surface inorganique des nanoparticules et donc varier en fonction de la synthèse de QDs. En effet, pendant le couplage, les nanoparticules sont exposées à des réactions chimiques et à de nombreux lavages qui peuvent compromettre leur stabilité si l'affinité entre les ligands et la surface des QDs n'est pas suffisament forte.

On peut imaginer utiliser d'autres ligands que le DHLA-PEG-COOH pour introduire des acides carboxyliques à la surface des QDs DHLA-SB. En effet, Park J. *et al.* [94] ont démontré la possibilité de conjuguer les QDs DHLA-sulfobétaïne avec des biomolécules en utilisant un mélange de ligands avec 50% de DHLA.

3.3.1 Marquage sur cellules vivantes de récepteurs membranaires CB1

Nous avons également démontré la possibilité d'utiliser les QDs-SA DHLA-SB comme sondes spécifiques en cellules vivantes, par exemple pour suivre le recyclage intracellulaire du récepteur Cannabinoïde 1 (CB1). CB1 est un des récepteurs membranaires couplés à la protéine G (GPCRs) les plus abondants dans le système nerveux central et constitue un bon modèle car son internalisation constitutive a lieu dans plusieurs types cellulaires. Grâce à cela, nous

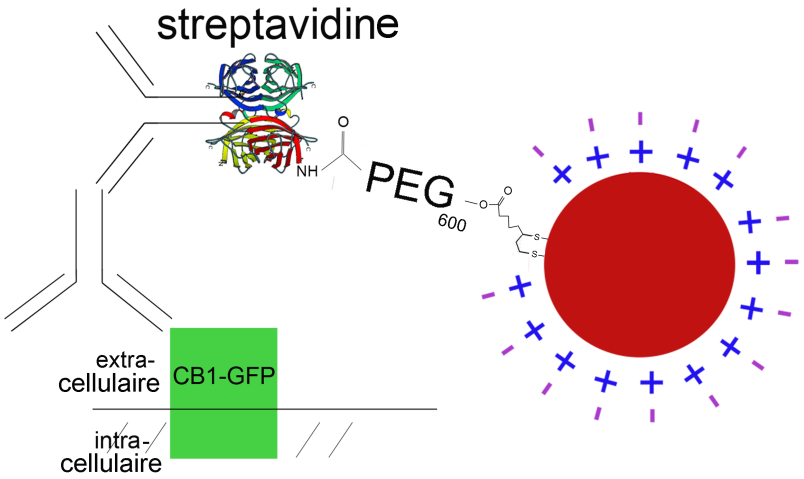


FIGURE 3.12 – Schéma du marquage extracellulaire du récepteur CB1 avec les QDs-SA DHLA-SB.

avons pu suivre son trafic intracellulaire dans une lignée de cellules de rein humain embryonnaire (HEK) exprimant de façon permanente FLAG-CB1-GFP. Cette lignée nous a été gentiment donnée par les Dr. Anne Simon et Dr. Zsolt Lenkei du Laboratoire de Neurobiologie à l'ESPCI. Comme schématisé dans la Figure 3.12, le protocole prévoit :

1. de bloquer le trafic des récepteurs (sur des cellules HEK FLAG-CB1-GFP posées la veille sur des lamelles) avec une incubation à +4°C pendant 5 minutes : une sous-population de récepteurs CB1 se trouve par conséquent bloquée sur la membrane plasmique ;
2. la poursuite de l'expérience sur glace avec une première incubation de 10 minutes avec un anticorps primaire anti-FLAG (de chez la souris) (dilué dans l'OptiMEM, Invitrogen), suivie par 3 lavages (OptiMEM) ;
3. une incubation de 10 minutes avec l'anticorps secondaire anti-souris biotinylé (dilué dans du milieu OptiMEM),
4. 3 lavages de 3 minutes chacun avec de l'optiMEM 0,5% caséine ;
5. une dernière incubation de 10 minutes avec les QDs-SA DHLA-SB à 0,1 µM, suivie par 5 lavages ;
6. l'observation en microscopie de fluorescence (Figure 3.13 A et B).

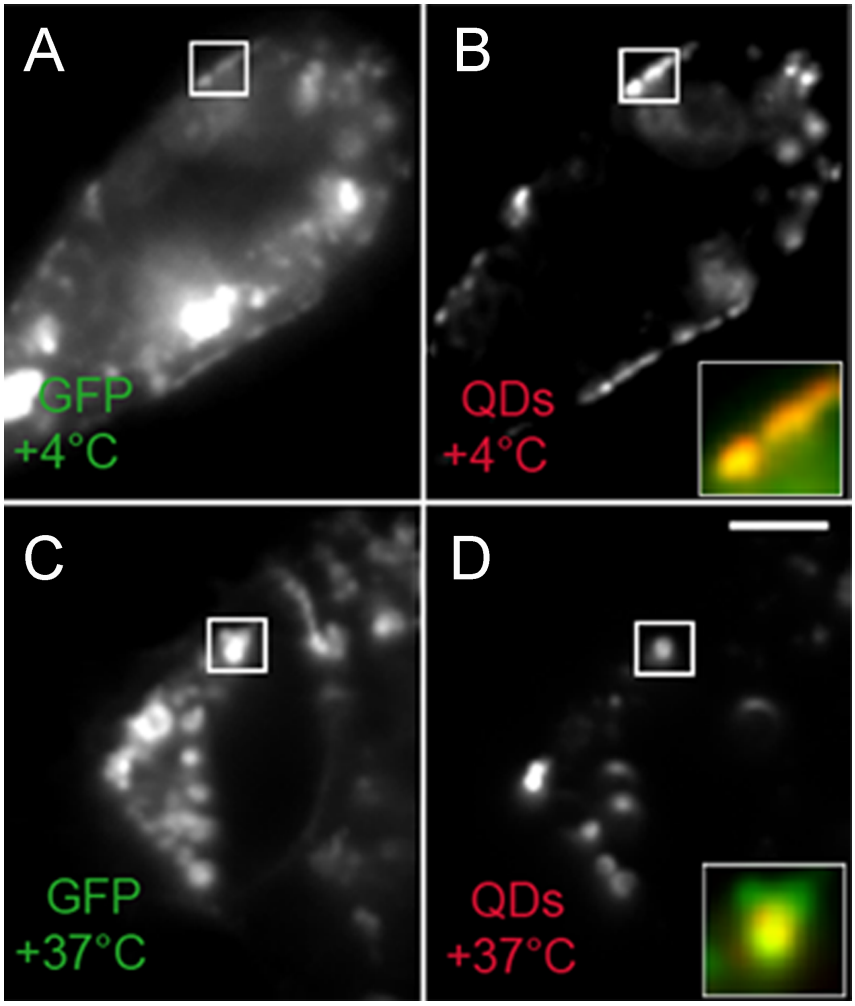


FIGURE 3.13 – Marquage du récepteur CB1 avec les QDs-SA DHLA-SB. (A) Tous les récepteurs CB1-GFP ; (B) tout de suite après le marquage réalisé à +4°C, les QDs-SA DHLA-SB reconnaissent la portion de récepteur CB1-GFP localisée sur la membrane plasmique de la cellule. A 37°C ces récepteurs sont internalisés. La colocalisation entre les QDs-SA DHLA-SB (D) et le signal GFP (C) est conservée. La barre d'échelle vaut 2 µm.

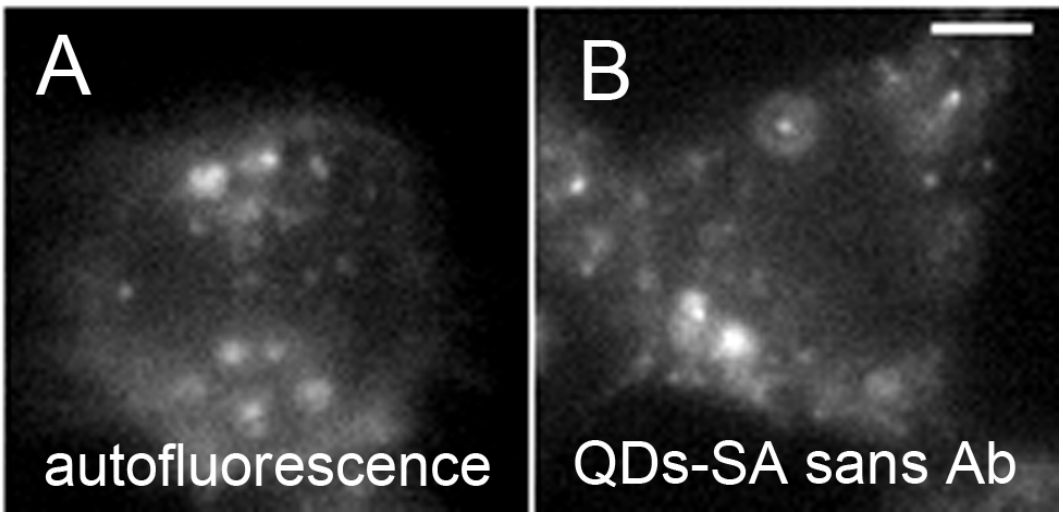


FIGURE 3.14 – Comparaison entre l'autofluorescence de la cellule (A) et l'adsorption non spécifique des QDs-SA sur les cellules HEK (B). L'image B est la même que celle de la Figure 3.15 B, mais représentée avec un autre contraste (le même que l'image d'autofluorescence A). La barre d'échelle vaut 2 µm.

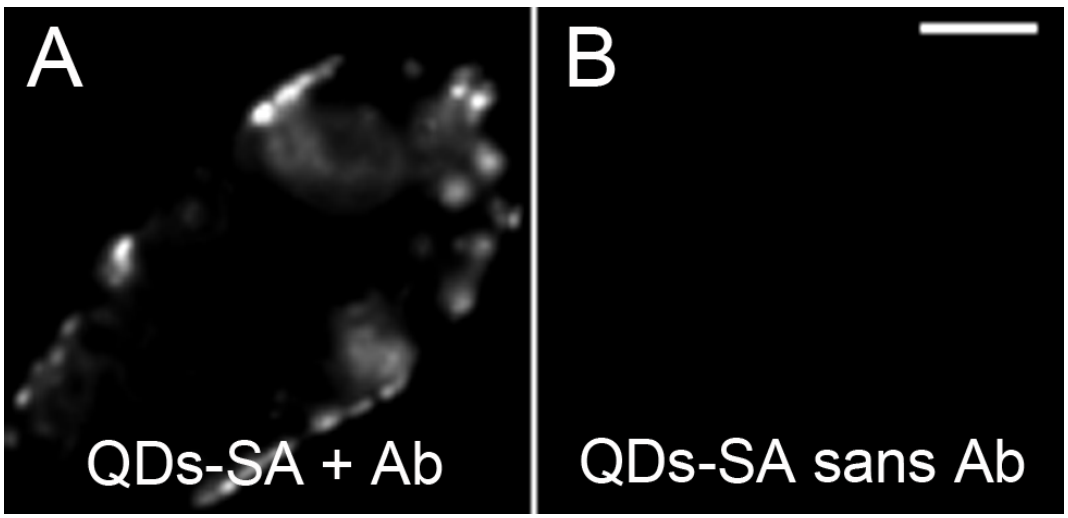


FIGURE 3.15 – Comparaison entre l'échantillon marqué avec l'anticorps (Ab) et les QDs-SA DHLA-SB (A) et l'adsorption non spécifique des QDs-SA en l'absence d'anticorps (B). Le deux images sont représentées avec le même contraste. La barre d'échelle vaut 2 µm.

Juste après ces incubations, les récepteurs marqués par les QDs-SA DHLA-SB sont encore localisés sur la membrane plasmique. Après environ 30 minutes à 37°C, on peut observer l'internalisation de ces récepteurs dans des vésicules de recyclage (Figure 3.13 C et D, carrés blancs et encarts en couleurs). Les QDs-SA DHLA-SB ont ainsi démontré leur résistance au pH dans un système biologique, car les vésicules de recyclages ont des pH acides. Ce résultat a été reproduit avec deux synthèses différentes de QDs : des CdSe/CdS/ZnS avec un maximum d'émission à 605 nm (images montrées) et des CdSe/ZnS à 620 nm.

De plus, ces QDs présentent une très faible adsorption non spécifique sur la membrane des cellules HEK FLAG-CB1-GFP, comme on peut le voir dans la Figure 3.14 B, qui est de l'ordre de l'autofluorescence (Figure 3.14 A). Cette adsorption non spécifique est comparable à celle des QDs DHLA-SB sur les cellules HeLa en l'absence de bloqueurs (Figure 1.7 et 2.6 B). Le signal non spécifique n'est pas détectable s'il est représenté avec le même contraste que le signal spécifique (Figure 3.15 B). Les échantillons tests pour l'adsorption non spécifique ont été réalisés en incubant les cellules 9 minutes à +4°C dans du milieu avec de la caséine, puis 10 minutes avec les QDs-SA DHLA-SB à 0,1 µM.

Dynamique de recyclage des vésicules et perspectives Le protocole de marquage que nous avons mis au point ne semble pas perturber la division cellulaire : les cellules sont encore vivantes 24 h après le marquage, qui est toujours détectable. Toutefois, ces manipulations ralentissent la dynamique de recyclage des vésicules : on peut observer, dans les cellules HEK, les vésicules de CB1 bouger si on les image à 0,33 image/s, [95] alors que les vésicules marquées par les QDs ne bougeaient presque pas. Nous avons donc essayé de réduire le temps d'incubation sur glace en couplant directement l'anticorps primaire anti-FLAG à la biotine, mais cela n'a rien changé. Nous nous sommes alors aperçu que l'incubation des cellules HEK FLAG-CB1-GFP avec la caséine seule (sans QDs) ralentit aussi le trafic. Nous avons donc essayé d'utiliser l'albumine à la place de la caséine, mais cela aboutissait à un rapport « signal spécifique / signal non spécifique » moins bon. Nous avons ensuite tenté d'incuber les cellules avec un mélange de deux bloqueurs, composé de 0,8% albumine et

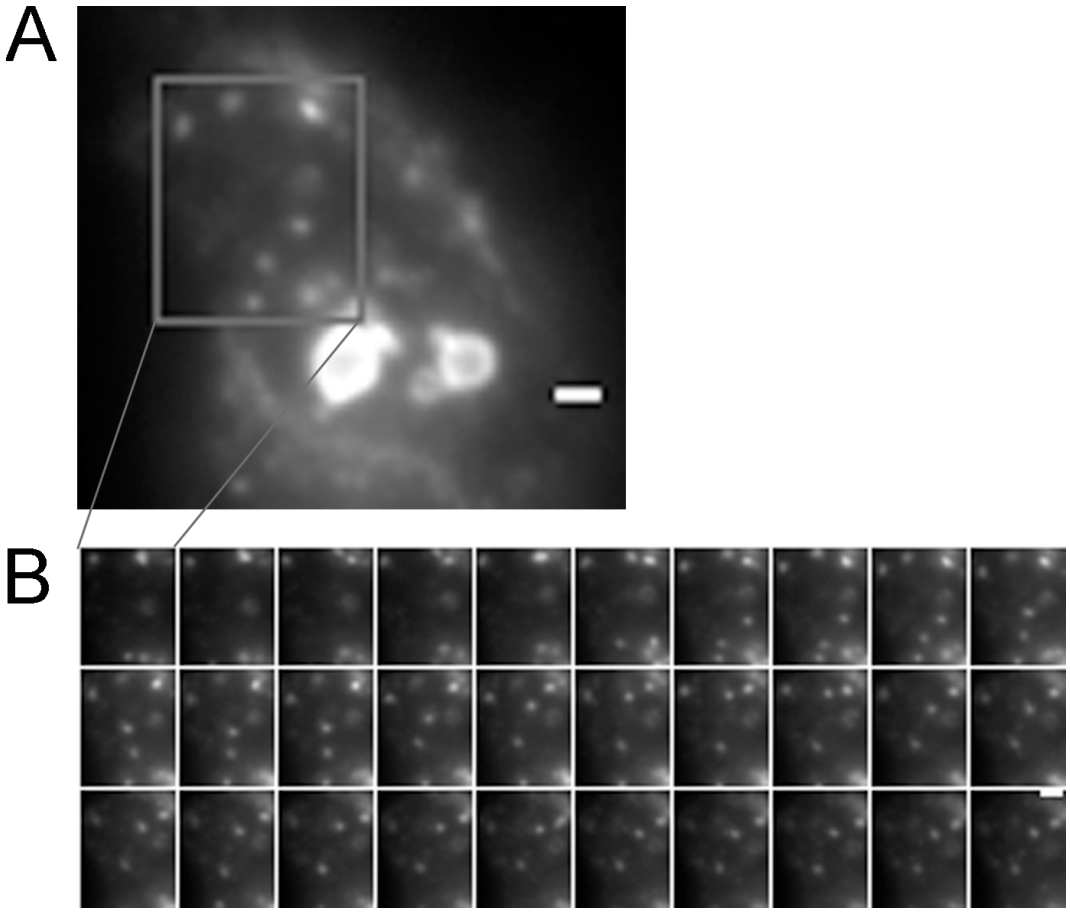


FIGURE 3.16 – Dynamique des vésicules de recyclage marquées avec les QDs sur une ROI du cytoplasme (montrée en A, cadre gris) et avec le protocole décrit dans le paragraphe 3.3.1. L'intervalle de temps entre deux images est de 3 secondes. La barre d'échelle vaut 2 µm.

0,2% caséine, dilués dans de l'OptiMEM. Le protocole comporte donc une incubation des cellules dans ce mélange pendant 10 minutes à 37°C, suivie d'une incubation de 5 minutes à température ambiante avec l'anticorps anti FLAG-biotine, de 3 lavages dans l'OptiMEM mélangé aux bloqueurs (le dernier lavage dure une minute), d'une incubation avec les QDs-SA DHLA-SB à 0,1 µM pendant 5 minutes (dilués dans de l'OptiMEM) et de 5 lavages dans de l'OptiMEM. Cette modification a permis de rétablir une dynamique de recyclage des vésicules quasi normale (Figure 3.16 B).

3.3.2 Marquage intracellulaire de la giantine en cellules vivantes

Nous avons poursuivi l'étude de la stabilité intracellulaire des QDs, discutée dans le chapitre 2, en vérifiant que les QDs-SA étaient également stables et spécifiques dans le cytoplasme de cellules vivantes. Pour cela nous avons utilisé une lignée stable de cellules HeLa qui exprime la giantine, une protéine de l'appareil de Golgi, modifiée avec la GFP et une séquence de biotinylation (BAP) reconnue par l'enzyme biotine ligase qui catalyse la biotinylation. Cette lignée cellulaire nous a été gentiment donnée par le Dr Perez de l'Institut Curie. Nous avons alors introduit les QDs-SA à l'intérieur de la cellule par pinocytose (décrite dans le chapitre 2).

La majorité des QDs-SA DHLA-SB, une heure après l'internalisation par pinocytose, diffusait librement à travers le cytosol. Nous avons observé au cours du temps, une diminution de la population de QDs libres et une augmentation du nombre de QDs associés au Golgi (Figure 3.17). Seulement deux heures après internalisation, le signal spécifique était déjà visible, avec un maximum à trois heures post-internalisation. Ce résultat a été reproduit avec deux synthèses de QDs différentes : des CdSe/CdS/ZnS avec un maximum d'émission à 605 nm (images montrées) et des CdSe/ZnS à 620 nm. Notons que les QDs-SA DHLA-SB étaient encore liés à la giantine 24 heures après leur internalisation, ce qui prouve la stabilité des propriétés optiques et fonctionnelles de nos sondes en milieu biologique au cours du temps. Pour confirmer ces résultats, nous avons quantifié le taux de colocalisation des QDs-SA-giantine avec la GFP-giantine en utilisant la routine d'ImageJ « Colorization Colormap ». Cette routine calcule l'indice de corrélation «I_{corr}» entre deux images. I_{corr} représente la fraction des pixels ayant un produit d'écart moyen normalisé ($nMDP$) positif. Les valeurs $nMDP$ sont définies pour chaque couple de coordonnées (x, y) par :

$$nMDP = \frac{(I_a - \overline{I}_a)(I_b - \overline{I}_b)}{(I_{amax} - \overline{I}_a)(I_{bmax} - \overline{I}_b)} \tag{3.1}$$

où I_a et I_b font référence à l'intensité mesurée pour chaque pixel (x, y) pour les images « a » et « b » ; $\overline{I}_{\mathrm{a}}$ et $\overline{I}_b$ sont les intensités moyennes calculées dans les images « a » et « b » respectivement ; I_{amax} et I_{bmax} sont les intensités

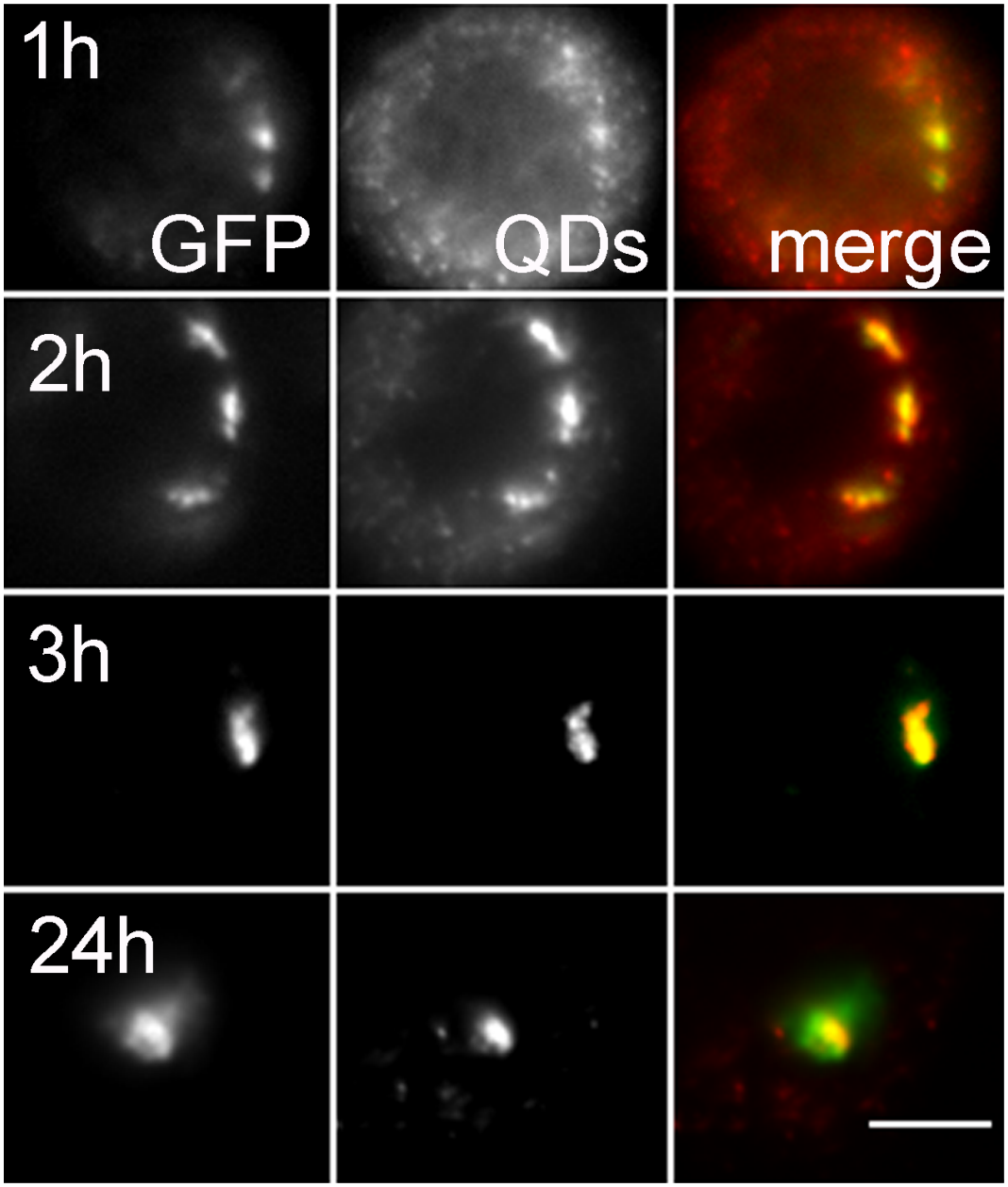


FIGURE 3.17 – Colocalisation entre la GFP-BAP-giantine et les QDs-SA DHLA-SB 1h, 2h, 3h et 24h après l'internalisation des nanoparticules par pinocytose. Les images ne sont pas représentées avec le même contraste. La barre d'échelle vaut 10 µm.

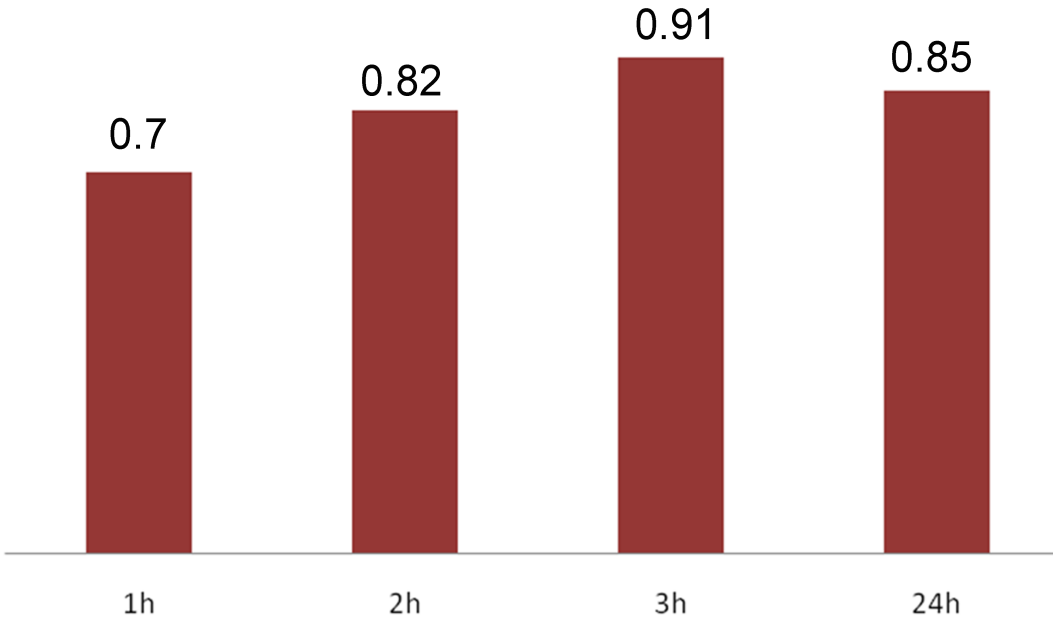


FIGURE 3.18 – Quantification de l'indice de corrélation (I_{corr}) entre le signal de la GFP-BAP-giantine et celui des QDs-SA DHLA-SB-giantine. La moyenne est calculée avec au moins 7 cellules par cas.

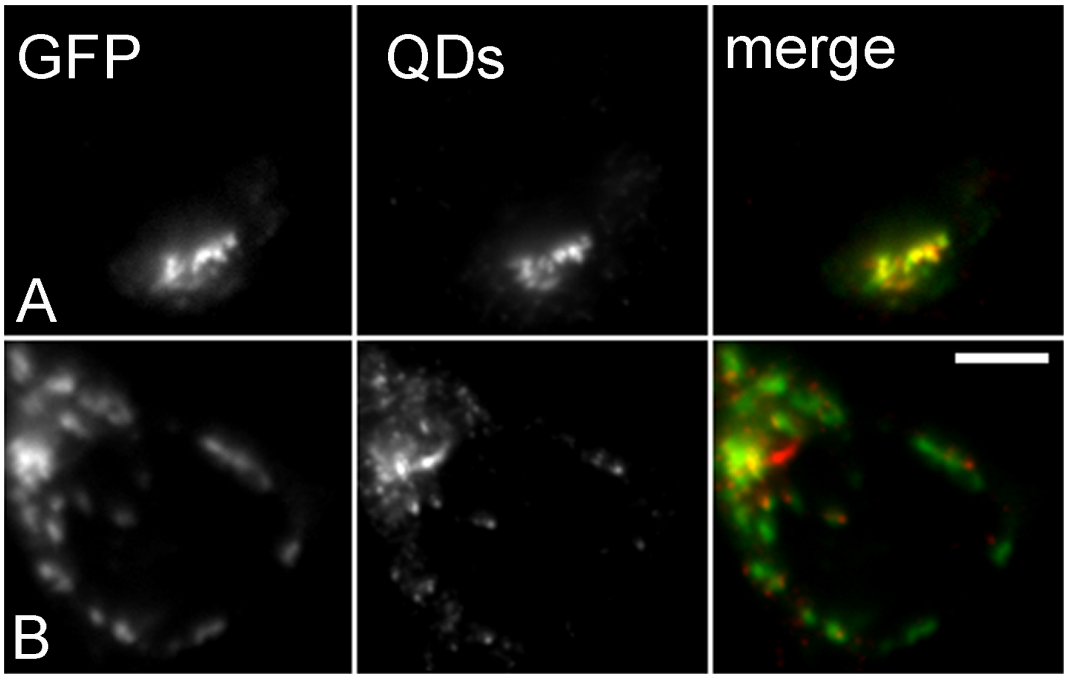


FIGURE 3.19 – GFP-BAP-giantine (en vert) et son marquage par les QDs-SA (en rouge) soit avec des QDs-SA DHLA-SB (A), soit avec des QDs-SA commerciaux (B) 3h après pinocytose. La barre d'échelle vaut 10 µm.

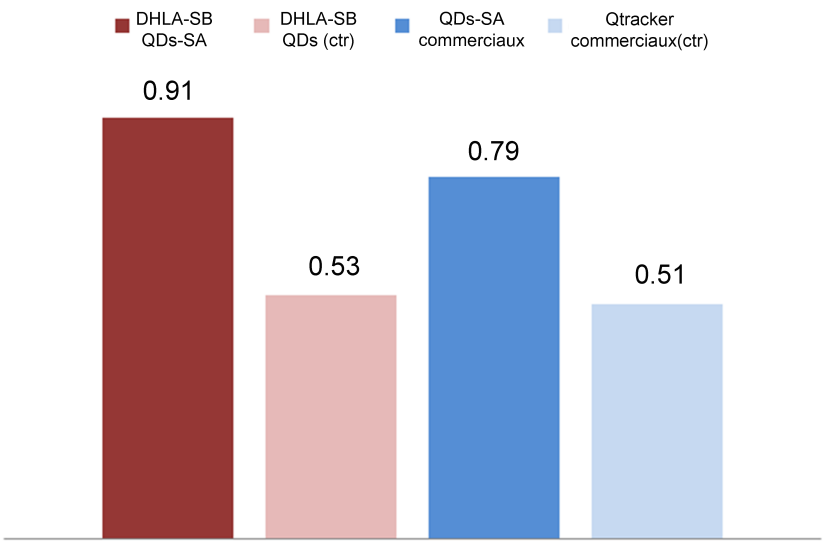


FIGURE 3.20 – Quantification de l'indice de corrélation (I_{corr}) entre le signal de la GFP-BAP-giantine et celui des QDs : i) les QDs-SA DHLA-SB sont en rouge ; ii) les QDs DHLA-SB (comme témoin) sont en rose ; iii) les QDs-SA commerciaux sont en bleu ; iv) les Qtracker commerciaux (comme témoin) sont en bleu clair. La moyenne est établie avec au moins 10 cellules par cas. L'analyse statistique, avec le test T, pour les deux types de QDs-SA a révélé une différence significative ($P<0,02$).

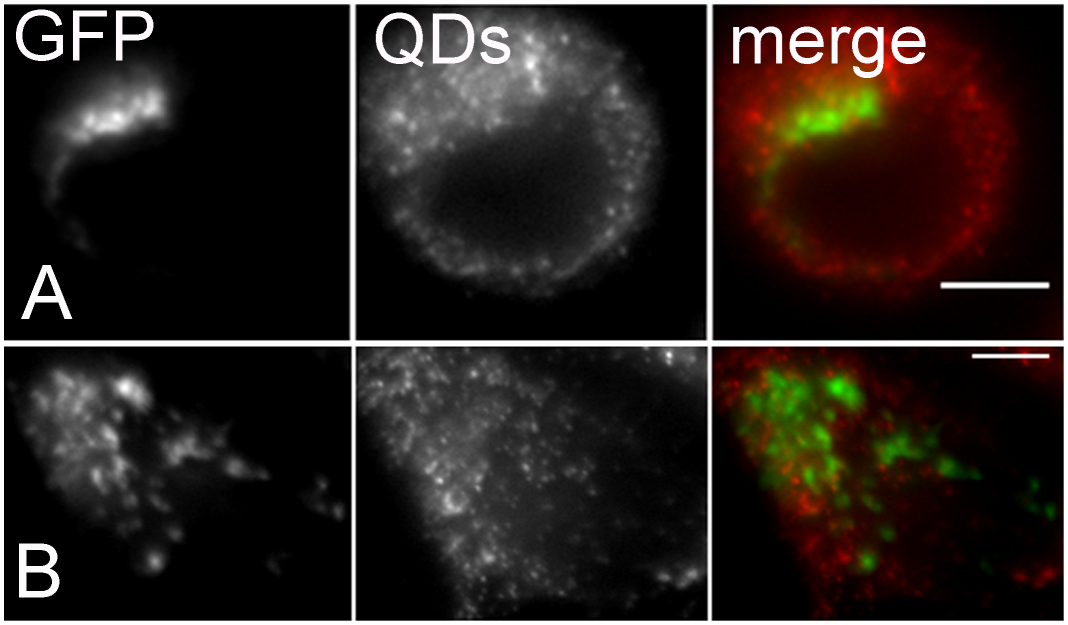


FIGURE 3.21 – Contrôle négatif de la colocalisation. La GFP-BAP-giantine (en vert) et les QDs DHLA-SB (en rouge) 1h (A) et 3h (B) après pinocytose. La barre d'échelle vaut 10 µm.

maximales dans les images « a » et « b » respectivement. $nMDP$ représente donc le produit de l'écart à l'intensité moyenne pour les deux images, normalisé en divisant par l'écart à l'intensité moyenne de l'intensité maximale. I_{corr} varie entre 0, qui représente l'absence de superposition entre les deux images, et 1, qui représente une colocalisation parfaite.

La quantification d'I_{corr} pour les QDs-SA DHLA-SB au cours du temps (Figure 3.18) a confirmé que le signal spécifique augmente (I_{corr} vaut 0,7 et 0,82 à 1h et 2h après pinocytose) avec un maximum de colocalisation 3 heures après internalisation (I_{corr}=0,92) et une légère chute à 24 heures (I_{corr}=0,85). Notons que pour les témoins, à savoir les QDs DHLA-SB sans streptavidine et internalisés dans les même cellules, I_{corr}=0,53 et non 0 (Figure 3.20). En effet les QDs témoins (comme décrit dans le chapitre 2) diffusent dans tout le cytoplasme cellulaire, y compris le Golgi, ce qui se traduit par deux images qui ne sont pas complètement anticorrélées (Figure 3.21).

Nous avons comparé ces résultats avec le marquage intracellulaire de la giantine avec des QDs-SA commerciaux (Invitrogen). Trois heures après internalisation, le bruit de fond cytoplasmique était plus élevé et la population

associée à la giantine moins importante que ceux observés avec les QDs-SA DHLA-SB (Figure 3.19). Ces observations ont été confirmées par la quantification d'I_{corr} pour les QDs-SA commerciaux à 3h, qui est significativement plus petite (P<0,02 avec le test T de Student) que l'indice I_{corr} des QDs-SA DHLA-SB (0,79 contre 0,91, Figure 3.20). La meilleure spécificité obtenue avec les QDs-SA DHLA-SB pourrait être expliquée par leur taille plus petite qui permet d'accéder plus efficacement aux sous-compartiments intracellulaires (le diamètre hydrodynamique des QDs-SA DHLA-SB CdSe/CdS/ZnS est de 13,3 nm : deux fois plus petit que les QDs-SA commerciaux). De plus, la réussite d'un marquage spécifique avec des QDs nécessite de minimiser les interactions non spécifiques avec le milieu biologique environnant ainsi que l'agrégation intracellulaire : cela suggère que la haute spécificité des QDs-SA DHLA-SB pourrait être corrélée à leur grande stabilité, révélée par les analyses de cinétique d'agrégation (Chapitre 2).

3.3.3 Conclusions et perspectives pour le marquage spécifique sur cellules vivantes

Nous avons fonctionnalisé les QDs DHLA-SB / DHLA-PEG-COOH avec la streptavidine et nous avons utilisé cette sonde pour marquer des récepteurs membranaires et des protéines intracellulaires en cellules vivantes. Ces expériences ont montré que ces QDs permettent d'obtenir un bien meilleur rapport « signal spécifique / signal non spécifique » qu'avec les QDs-SA commerciaux (Invitrogen).

Néanmoins il serait encore possible d'améliorer la conjugaison des QDs avec la streptavidine. La streptavidine est un tétramère : cela conduit à sonde fonctionnelle avec une taille assez importante (∼50 kDa), et qui comporte aussi jusqu'à 4 sites possibles d'interaction avec la biotine par streptavidine à sa surface. Cela pourrait perturber l'activité des cibles biotinylées. Les sites d'interaction biotine-streptavidine se trouvant à l'interface entre les monomères, la présence des quatre sous-unités sur la même protéine est donc importante pour l'affinité globale de la streptavidine pour la biotine. Il n'est donc pas possible de réduire le nombre de sous-unités sans réduire l'affinité. Cependant, une streptavidine monovalente a été developpée, dont la taille finale reste inchangée,

mais dont trois des sous-unités sont « désactivées ». [96] Cette streptavidine « monovalente » a été couplée à des QDs avec un ratio 1 : 1 grâce à une purification par migration en électrophorèse sur gel d'agarose. Ces QDs ont montré une meilleure efficacité que les QDs streptavidine commerciaux, plus gros et multivalents (Invitrogen), pour le ciblage de récepteurs biotinylés sur les synapses neuronales. Nous pouvons donc espérer améliorer encore plus l'efficacité de nos marquages avec une telle modification.

Pour le marquage des récepteurs CB1, nous avons aussi réalisé quelques essais prometteurs en incubant l'anticorps anti-FLAG biotinylé avec les QDs-SA DHLA-SB *in vitro*. La meilleure solution consisterait à coupler directement l'anticorps anti-FLAG sur le QD. Ces deux stratégies permettraient de suivre les récepteurs CB1 en utilisant des QDs de différentes couleurs et incubés à des temps différents. Cela permettrait d'étudier la dynamique des récepteurs en fonction de l'acidité des vésicules au cours du processus de recyclage.

Une autre utilisation intéressante des QDs DHLA-SB pour le marquage spécifique consisterait à les coupler à un petit TAG, comme par exemple le Halo TAG. Cela permettrait de préserver la petite taille de ces nanoparticules par rapport à l'utilisation de la streptavidine qui augmente le rayon d'au moins 2 nm. Cela serait intéressant d'utiliser cette sonde dans un échantillon biologique où la taille peut être un facteur limitant, comme par exemple dans le cas de synapses neuronales.

Chapitre 4

Les Quantum Dots pour la microscopie à illumination hybride

4.1 Coupe optique : état de l'art

Le but de la coupe optique est de s'affranchir de la lumière parasite provenant des régions de l'échantillon hors du plan de mise au point et d'isoler l'information provenant de ce dernier. Cela permet d'augmenter le contraste de l'image du plan de mise au point et de révéler des structures dont le niveau de contraste était auparavant noyé dans le fond constitué par le signal provenant du reste de l'échantillon. La réalisation de coupes optiques d'un échantillon épais est en particulier essentielle pour l'imagerie 3D. Plusieurs techniques ont été développées avec des approches très différentes. La microscopie confocale, développée en 1957, utilise un diaphragme qui, placé devant le détecteur (en général un photomultiplicateur), et conjugué optiquement avec le plan de mise au point, permet d'éliminer la lumière provenant du reste de l'échantillon (Figure 4.1). Une autre approche consiste à limiter axialement la lumière d'excitation, comme dans le cas des miscroscopies non linéaires (microscopie de fluorescence à deux photons, génération de seconde et de troisième harmonique) qui permettent d'exciter uniquement les molécules contenues dans un petit volume de l'échantillon, de l'ordre du micromètre cube. [97][98] Cette technique est plus coûteuse à mettre en oeuvre car elle nécessite une source impulsionnelle mais permet d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation dans le rouge et le proche infrarouge où l'absorption et la diffusion des tissus sont

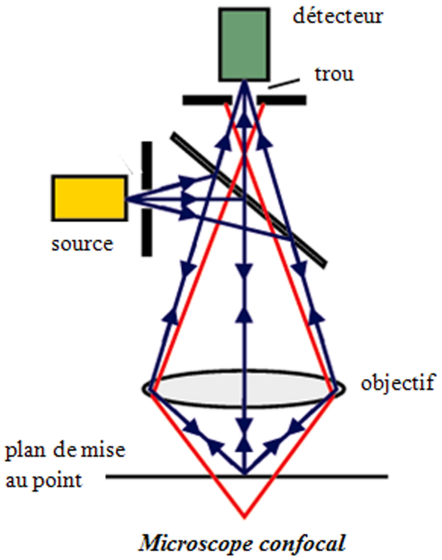


FIGURE 4.1 – Schéma du microscope confocal.

moindres, donc compatibles avec l'imagerie en profondeur tout en préservant mieux l'échantillon. Afin d'obtenir une image, ces deux méthodes nécessitent un balayage de l'échantillon point par point : le temps d'acquisition dépend alors non seulement du rapport signal à bruit mais aussi directement de la taille de l'image. Cela peut notamment générer des artefacts dans le cas où l'on observe un échantillon en mouvement. L'utilisation d'un disque de Nipkow permet d'imager plusieurs points de l'échantillon simultanément et ainsi d'augmenter considérablement la vitesse d'acquisiton d'une image confocale mais parfois au prix d'artefacts dus au processus de balayage et d'une perte de résolution axiale (la taille du diaphragme étant alors fixe).

La microscopie à « feuille de lumière » (Light Sheet Microscopy) consiste à illuminer un plan mince de l'échantillon perpendiculairement à l'axe optique et donc d'obtenir en une seule acquisition une coupe optique 2D de l'échantillon. Cette technique a démontré son efficacité [99][100] mais la qualité des résultats obtenus dépend fortement de l'échantillon. En effet les propriétés diffusantes et/ou aberrantes de l'échantillon peuvent dégrader la qualité de la « feuille » de lumière et donc de la section optique. De plus, l'échantillon doit être fixé et placé dans un gel d'agarose ou dans une chambre spécifique permettant le réglage de la feuille de lumière, ce qui rend cette technique incompatible avec

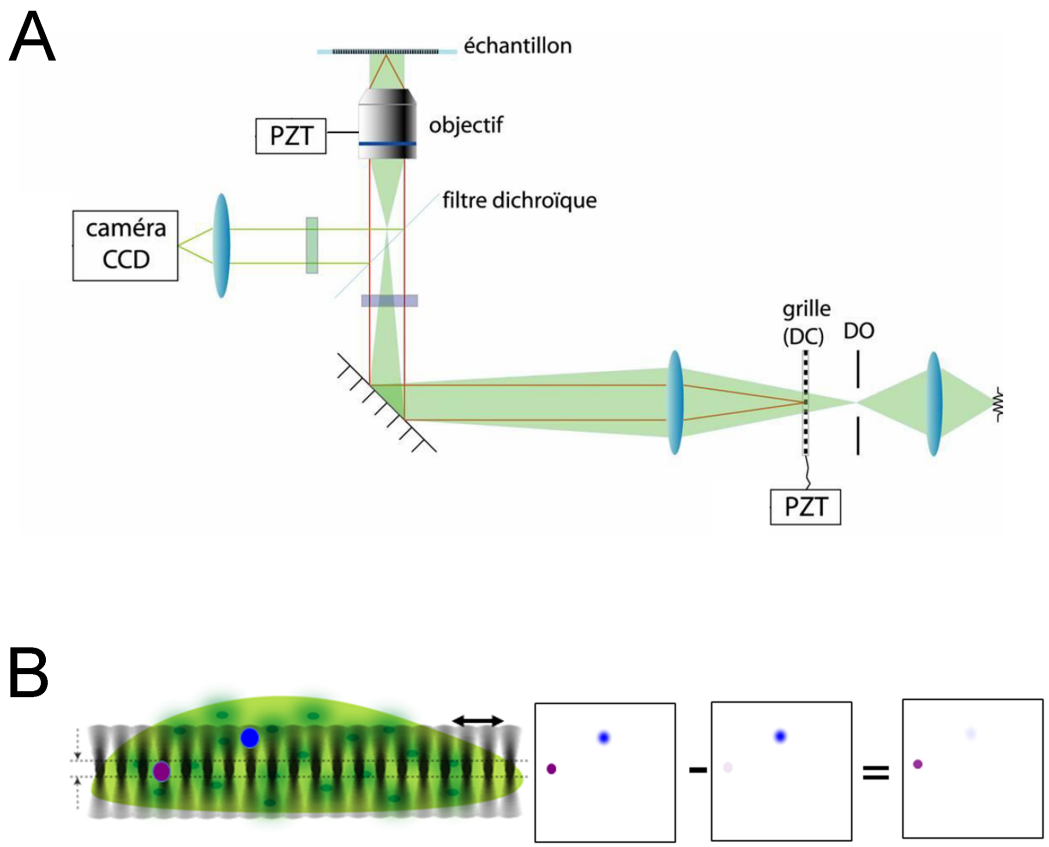


FIGURE 4.2 – (A) Schéma du microscope à illumination structurée utilisé (DO : Diaphragme d'Ouverture, DC : Diaphragme de Champ). (B) Image de la grille dans l'échantillon : l'image de la grille n'est nette que dans le plan de mise au point. et ne modulera donc le signal que des objets qui s'y trouvent. Les objets se trouvant hors du plan de mise au point ne seront pas modulés et pourront être supprimés lors de la reconstruction.

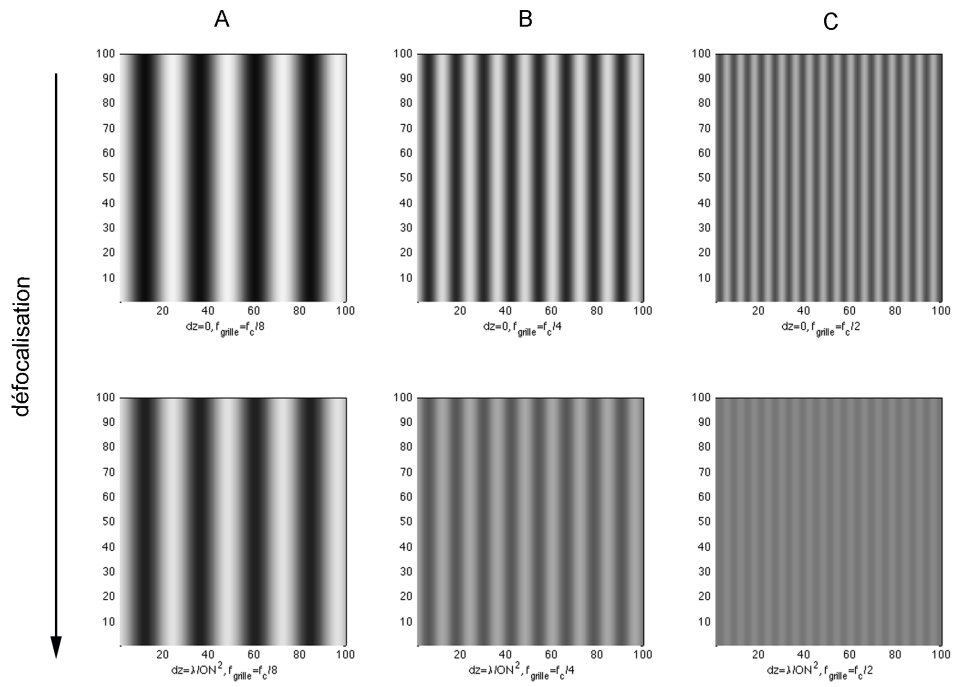


FIGURE 4.3 – Simulation de la perte de contraste d'une mire avec la défocalisation en fonction de sa fréquence : de A vers C la fréquence augmente et la perte de contraste aussi.

certaines applications.

Une autre famille de techniques permettant d'obtenir des coupes optiques d'échantillons épais consiste à illuminer en plein champ l'échantillon avec une lumière structurée spatialement dans les directions orthogonales à l'axe optique.

La microscopie à illumination structurée a été développée pour la première fois dans l'équipe de Tony Wilson. [101] Elle consiste à ne moduler spatialement l'illumination que dans le plan de mise au point, en y projetant l'image d'une grille physique placée dans le diaphragme de champ (Figure 4.2). Ainsi, la grille n'est nette que sur une faible épaisseur de l'échantillon (égale à la profondeur de champ) car son contraste chute avec la défocalisation, d'autant plus que sa fréquence est élevée, comme illustré sur la Figure 4.3. En enregistrant des images de fluorescence pour différentes positions de la grille et en les combinant judicieusement, il est alors possible de s'affranchir du signal de fluorescence issu des plans hors du plan de mise au point et de reconstruire une coupe optique de l'échantillon.

Cette technique de microscopie plein champ, aujourd'hui disponible commercialement (l'Apotome de Zeiss et l'Optigrid de Olympus), permet d'imager simultanément tous les points du plan de mise au point et donc de s'affranchir du balayage de l'échantillon. Elle nécessite néanmoins l'acquisition d'au moins trois images pour illuminer tous les points de l'échantillon et finalement obtenir une coupe optique après combinaison de ces images. Ces acquisitions séquentielles peuvent donc introduire des artefacts dus au mouvement de l'échantillon pendant l'enregistrement des images. Afin de dépasser cette limitation, Krzewina et Kim ont proposé de projeter des grilles fixes mais de couleurs différentes et d'utiliser une caméra couleur afin d'acquérir simultanément les trois images nécessaires à l'obtention de la coupe optique. [102] Cette technique ne peut cependant pas s'appliquer aux échantillons fluorescents. De façon similaire, les trois images peuvent être simultanément enregistrées en projetant trois grilles de polarisations différentes, mais cela ne s'applique qu'aux échantillons dont la réponse ne dépend pas de la polarisation et qui ne dépolarisent pas la lumière. [103]

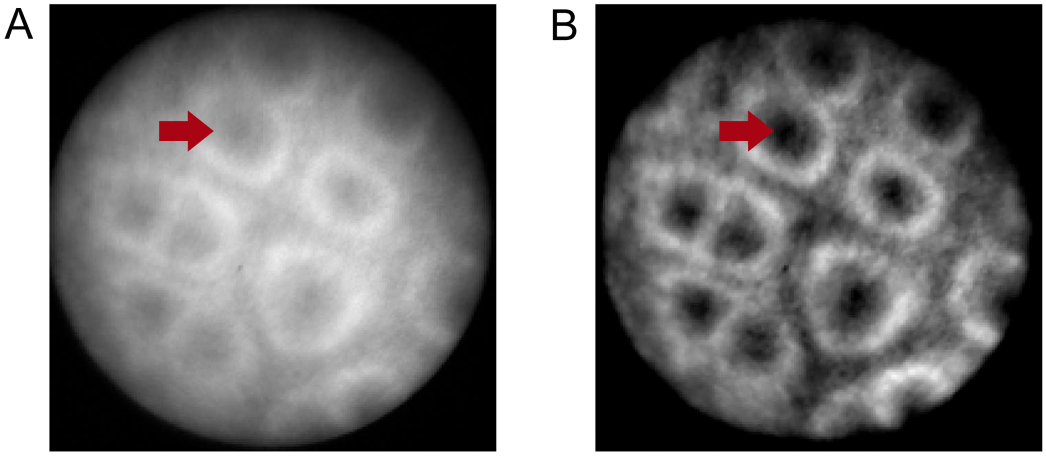


FIGURE 4.4 – Images acquises par endoscopie plein champ (A) et HiLo (B) de la mucose du colon de rat. [104]

4.2 Microscopie à Illumination Hybride (HiLo)

L'équipe de Jérôme Mertz a proposé en 2008 une évolution originale de la microscopie à illumination structurée qui ne nécessite l'acquisition que de deux images pour obtenir une coupe optique de l'échantillon : la microscopie à illumination hybride appelée « HiLo ». [105] Une des images est obtenue avec une illumination homogène de l'échantillon, comme dans un microscope classique, et fournit l'information haute fréquence. En effet, et comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les hautes fréquences spatiales ne peuvent provenir que du plan de mise au point car la fonction de transfert « s'écrase » rapidement aux fréquences élevées avec la défocalisation (Figure 4.3). Une seconde image est enregistrée en utilisant une illumination structurée (figure de speckle [105] ou grille [106][104]) qui modulera uniquement l'information provenant du plan de mise au point et permettra donc de la discriminer des basses fréquences constituées par la fluorescence issue des plans hors du plan de mise au point, c'est-à-dire du reste de l'échantillon. La coupe optique sera obtenue en recombinant hautes et basses fréquences issues de ces deux acquisitions d'image. La Figure 4.4 donne un exemple de l'efficacité de la réjection de la lumière parasite provenant des plans hors du plan de mise au point pour la technique HiLo (comparer A et B, flèches rouges). Même si le nombre d'images à acquérir est réduit à 2, ces deux images sont enregistrées séquentiellement et limitent donc

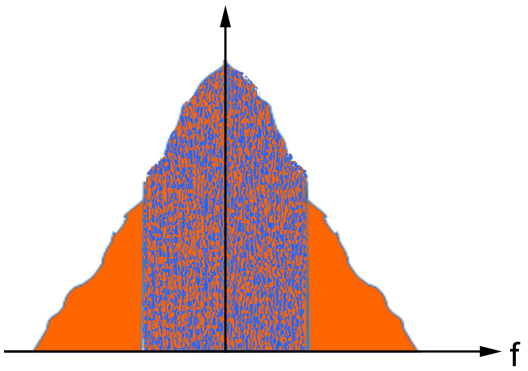


FIGURE 4.5 – Spectre schématique de l'image uniformément éclairée, où les fréquences provenant du plan de mise au point (I_{if} dans l'équation 4.1) sont représentées en orange et les fréquences provenant des plans hors du plan de mise au point (I_{of} dans l'équation 4.1) sont représentées en bleu.

la résolution temporelle de l'instrument.

Afin d'obtenir une coupe optique à partir d'une seule acquisition, nous avons proposé une méthode basée sur la microscopie hybride développée par Jérôme Mertz mais qui enregistre simultanément les deux images. Cela est possible si on utilise deux fluorophores spectralement séparés qui marquent le même objet et si on les éclaire l'un avec une illumination uniforme, l'autre avec une illumination structurée. Nous avons appelé cette nouvelle technique *HiLo bi-couleur.*

4.2.1 Reconstruction de la coupe optique à partir des images HiLo : classique et bi-couleur

Nous décrirons ici brièvement les principes de la reconstruction de l'image HiLo développés par le groupe de Jérôme Mertz dans le cas où l'illumination structurée est générée par une grille sinusoïdale et nous expliquerons comment les modifications proposées par Vincent Loriette ont permis de les adapter à notre système de HiLo bi-couleur.

Lorsque l'échantillon est éclairé uniformément, l'image sur la caméra peut s'écrire :

$$I_F = \alpha_F I_{if} + \beta_F I_{of} \tag{4.1}$$

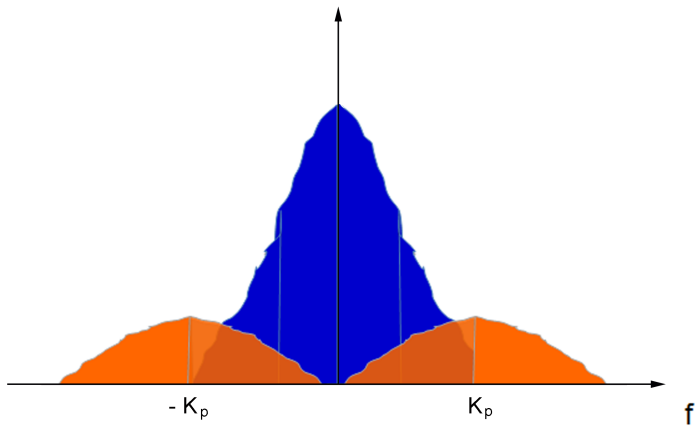


FIGURE 4.6 – Spectre schématique de l'image éclairée par une mire sinusoïdale de fréquence K_p : le spectre correspondant au plan de mise au point (I_{if} dans l'équation 4.2), modulé par la grille et représenté en orange, est alors décalé et centré autour de K_p alors que le spectre des plans hors du plan de mise au point, en bleu, est inchangé.

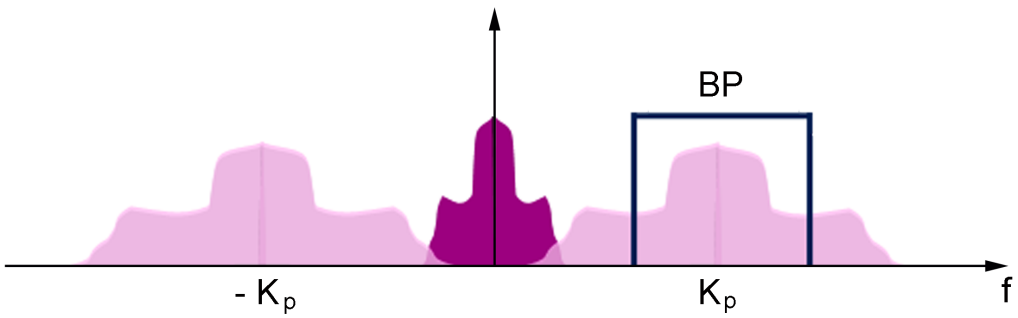


FIGURE 4.7 – Spectre schématique de l'image D (équation4.3) correspondant à la division de l'image structurée par l'image homogène : l'élément central dans notre cas n'est pas un Dirac comme dans le système de J. Mertz et peut avoir un poids important et ainsi « polluer » les spectres « satellites » centrés autour de K_p et qui nous intéressent.

où I_{if} est l'image du plan de mise au point et I_{of} correspond à l'intensité de fluorescence issue des plans hors du plan de mise au point, α_F et β_F étant les poids relatifs de ces deux composantes. Le spectre de Fourier de cette image peut être représenté comme schématisé sur la Figure 4.5.

La grille utilisée pour l'illumination structurée est une mire sinusoïdale de période p (20 lignes par mm en général dans nos expériences) avec un contraste C. L'image enregistrée par la caméra dans le cas de cette illumination structurée peut donc s'écrire :

$$I_S = \left[\alpha'_S + \alpha''_S \sin\left(2\pi\frac{x}{p}\right)\right] I_{if} + \beta_S I_{of}. \tag{4.2}$$

où α'_S=$\alpha_S/(1+C)$ et α''_S=$\alpha_S C/(1+C)$, et où α_S et β_S sont respectivement les poids relatifs de la composante provenant du plan de mise au point, modulée par la grille, et de la composante provenant des plans hors du plan de mise au point, qui n'est pas modulée (voir Figure 4.6).

Pour isoler les basses fréquences provenant du plan de mise au point on utilise une méthode astucieuse qui consiste à diviser l'image structurée par l'image uniforme :

$$D = \frac{I_S}{I_F} \tag{4.3}$$

La transformée de Fourier de D, notée $\mathcal{F}(D)$, présente alors trois composantes (Figure 4.7). Dans le cas où $\alpha'_S/\beta_S = \alpha_F/\beta_F$ (qui correspond au poids relatif des fréquences provenant du plan de mise au point par rapport à celles issues des plans hors du plan de mise au point) la partie centrale du spectre de D se réduit à un pic de Dirac δ en k =0, et les deux autres sont des spectres identiques centrés en $-k_p$ et $+k_p$, où $k_p = 2\pi/p$. On peut isoler un des deux spectres satellites avec un filtrage passe bande de $\mathcal{F}(D)$ comme représenté schématiquement sur la Figure 4.7 et en extraire les basses fréquences correspondant au plan de mise au point.

On récupère d'autre part les hautes fréquences du plan de mise au point avec un filtre passe-haut de l'image uniforme, obtenant ainsi la totalité des fréquences provenant du plan de mise au point.

Pour finalement obtenir la coupe optique de l'échantillon, il suffit de recombiner ces hautes et basses fréquences en pondérant la somme avec des

coefficients adéquats :

$$I_{if} = \frac{1}{\alpha_F} HF\left[I_F\right] + \left\| \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{I_F}{\alpha''_S} \mathcal{F}^{-1}\left\{BP\left[\mathcal{F}\left(D\right)\right]\right\} \right\|. \tag{4.4}$$

Comme nous l'avons mentionné plus haut, cette approche est efficace si $\alpha'_S/\beta_S = \alpha_F/\beta_F$, c'est-à-dire si le poids relatif des fréquences provenant du plan de mise au point et des plans hors du plan de mise au point est identique pour les deux images. En effet, dans ce cas, la composante du spectre de D centrée en 0 se réduit à un Dirac δ et ne « pollue » donc pas le spectre satellite que l'on souhaite isoler. Dans notre cas, cette condition n'est pas satisfaite parce que les deux images sont obtenues avec deux fluorophores différents, qui sont éclairés avec deux illuminations distinctes (géométriquement et spectralement). Cela aboutit à une composante centrale de $\mathcal{F}\left(D\right)$ étendue spectralement et dont le poids est trop important pour que l'on puisse extraire efficacement la composante en k_p qui nous intéresse. L'utilisation de cette méthode de reconstruction introduirait donc des artefacts dans l'image finale du HiLo bi-couleur. Vincent Loriette a donc mis en oeuvre deux autres méthodes pour résoudre ce problème et qui sont détaillées dans [107] et qui consiste à réduire l'influence de la partie centrale du spectre de D, avec un filtrage adéquat. Pour la reconstruction des images que nous présentons ici, nous avons utilisé les deux méthodes de reconstruction, où les paramètres ont été optimisés de manière empirique.

4.2.2 Mise en oeuvre expérimentale du microscope HiLo bi-couleur

Le montage optique a été réalisé à partir d'un statif de microscope inversé commercial Olympus IX-71 (voir le schéma du montage sur la Figure 4.8). La voie de l'illumination structurée utilise l'illuminateur du microscope avec sa lampe à mercure où l'on insère une mire sinusoïdale ou de Ronchi (mire carrée) de 20 ou 40 lignes/mm à la place du diaphragme de champ, afin qu'elle soit conjuguée avec le plan de mise au point. La grille est fixée sur une plateforme de positionnement qui permet de régler manuellement sa position et son orientation, afin que son image soit nette dans tout le champ avec un contraste maximal (ce réglage est effectué sur un miroir utilisé comme échantillon). La

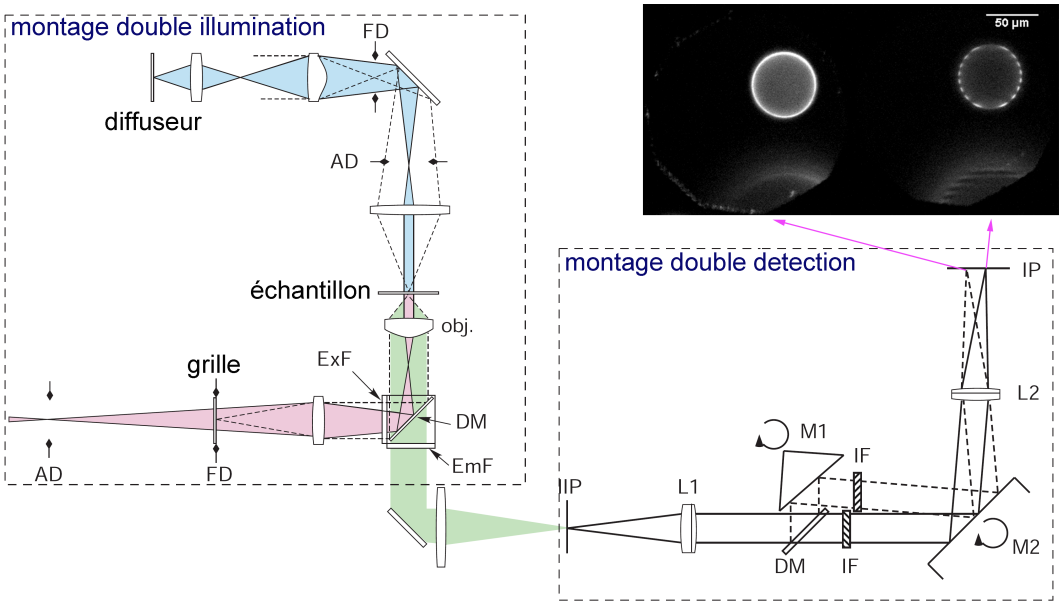


FIGURE 4.8 – Schéma du montage optique. La partie 'double illumination' utilise un statif de microscope commercial Olympus IX-71 et exploite à la fois les chemins d'épi-illumination et d'illumination en transmission. La partie 'double détection' est conçue pour séparer spectralement les deux images et les conjuguer sur la même caméra CCD. AD : diaphragme d'ouverture, FD : diaphragme de champ, obj. : objectif de microscope, ExF : filtre d'excitation, EmF : filtre d'émission, DM : miroir dichroïque, IIP : 'image intermédiaire, L1 et L2 : lentilles achromatiques, M1 and M2 : miroirs , IF : filtres interférentiels, IP : image sur la caméra.

voie d'illumination uniforme est réalisée en transmission : la source est un faisceau laser à 488 nm issu d'une fibre et traversant un diffuseur tournant pour s'affranchir de la cohérence spatiale du laser (et supprimer le speckle). Les deux images homogènes et structurées sont séparées spectralement à la détection grâce à un jeu de filtres adaptés et sont simultanément conjuguées sur la même caméra EMCCD (Roper Cascade 512B, 512×512 pixels), chacune sur une moitié de la surface sensible. Notez que le montage optique en sortie de microscope a été conçu pour permettre de placer les filtres interférentiels et le miroir dichroïque là où le faisceau est parallèle.

Un problème que nous avons rencontré est la pollution d'une des deux images par l'autre, causé par un transfert d'énergie résonant de type Förster (FRET). Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif entre deux molécules

fluorescentes qui dépend de la distance et du recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur. Afin de limiter les effets de ce transfert et donc les artefacts, nous avons choisi une configuration telle que l'accepteur de FRET corresponde à la voie d'illumination structurée. Ainsi, en cas de FRET entre les deux fluorophores, seul le contraste de la grille dans l'image structurée est dégradé (ce qui limite l'efficacité de coupe optique) mais l'image homogène est préservée, évitant donc les artefacts de reconstruction.

4.3 Réalisation de coupes optiques sur des échantillons tests et des échantillons biologiques en mouvement.

4.3.1 Billes d'agarose marquées avec une sonde spécifique bi-couleur

Une sonde spécifique bi-couleur "FRET-free" Pour le marquage spécifique de billes d'agarose, nous avons mis au point une sonde bi-couleur en liant deux fluorophores avec un espaceur d'ADN entre les deux pour réduire au minimum le FRET (Figure 4.9 A). Comme nous venons de la voir, le FRET dépend de la distance et du recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur. Le choix des fluorophores est donc essentiel puisque le FRET sera d'autant plus faible que le spectre d'émission du donneur sera disjoint du spectre d'absorption de l'accepteur. Nous avons choisi des Quantum Dots CdSe/CdS/ZnS dont le pic d'émission est à 575 nm et de l'Alexa Fluor 750 (Invitrogen) dont le pic d'émission est à 776 nm et le pic d'absorption à 750nm (Figure 4.9 C). L'utilisation des QDs permet de réduire le FRET grâce à leur pic d'émission très étroit. De plus, on peut ajuster la distance entre les fluorophores grâce à l'espaceur d'ADN. La longueur de ce dernier est déterminée à partir du calcul de l'efficacité du FRET :

$$E = \frac{\rho}{\rho + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}, \tag{4.5}$$

où r est la distance entre le donneur et l'accepteur, ρ le rapport entre le

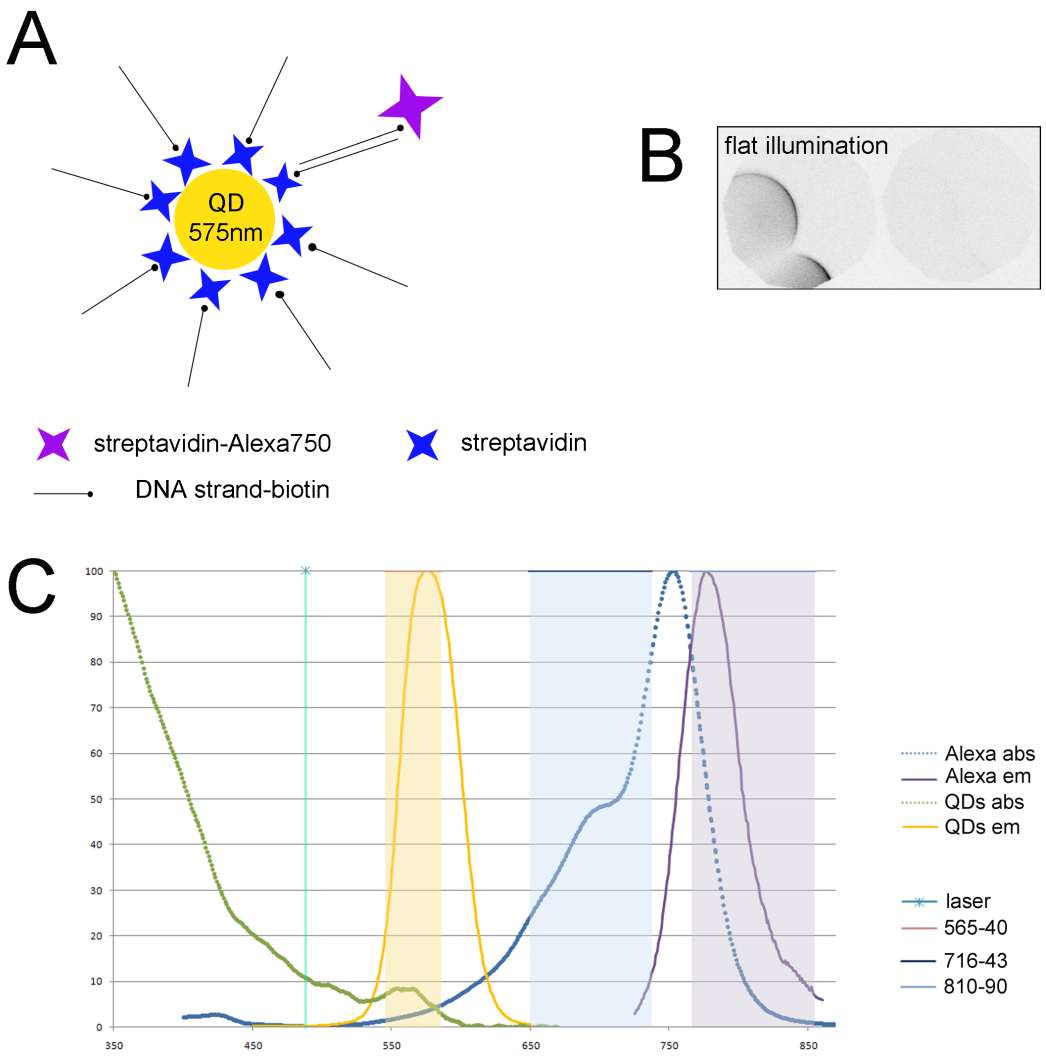


FIGURE 4.9 – Schéma de la sonde bi-couleur (A) ; absence de FRET grâce à l'espaceur d'ADN quand on éclaire seulement le donneur, soit les QDs (illumination uniforme) (B) ; spectres d'absorption et d'émission des deux fluorophores choisis (C).

nombre d'accepteurs et de donneurs et R_0 la distance de Förster définie par :

$$R_0^6 = \frac{9Q_0 \ln(10) \kappa^2 J}{128\pi^5 n^4 \mathcal{N}_\mathcal{A}}, \tag{4.6}$$

où Q_0 est le rendement quantique du donneur en absence de l'accepteur, κ le facteur d'orientation des dipôles, n l'indice de réfraction du milieu et $\mathcal{N}_\mathcal{A}$ le nombre d'Avogadro. Le recouvrement spectral est calculé comme suit :

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \tag{4.7}$$

où f_D est le spectre d'émission normalisé du donneur et ϵ_A le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. [108]

Pour les deux fluorophores choisis, nous avons calculé $R_0 = 50\,\text{Å}$ et, dans le cas où $\rho = 4$ (QD : Alexa = 1 : 4, voir le paragraphe suivant sur la préparation de l'échantillon), $E = 5\%$ à $r = 80$Å. Nous avons donc utilisé un oligonucléotide de 15 paires de bases, qui a une longeur de 50 Å (une paire de bases a une taille d'environ 3,3 Å). Le rayon du QD mesuré au microscope électronique à transmission vaut 33 Å et nous avons estimé que la présence des ligands de surface (DHLA-SB) et de la streptavidine sur le QD augmentent le rayon d'environ 30 Å. Ainsi $r = 113$ Å et le FRET devient négligeable, inférieur à $0,2\%$.

Préparation de la sonde spécifique bi-couleur Les QDs-Streptavidine (SA) ont été préparés comme décrit dans le chapitre précédent : 0.25 nmol de QDs-SA DHLA-SB ont été incubés avec 10 équivalents de l'oligonucléotide 1 - biotine pendant 30 minutes. La présence de l'oligonucléotide 1 sur les QDs a été vérifiée en les incubant avec des billes contenant l'oligonucléotide 2, complémentaire de l'oligonucléotide 1). Le rapport choisi entre les QDs-SA et l'oligonucléotide 1 -biotine permet de saturer partiellement les sites de la streptavidine, ce qui fut vérifié en constatant une diminution de l'affinité de ces QDs-SA traités pour les billes biotinylées. L'Alexa 750-Streptavidine a été obtenu en mélangeant 50 équivalents d'Alexa 750 ester de succinimide (Invitrogen) avec de la streptavidine (Biospa). La purification a été faite sur colonne Nap-5 Sephadex G-25 et ultra-filtration sur Vivaspin. La SA-Alexa 750 a été ensuite incubée avec 1 équivalent de l'oligonucléotide 2 - biotine pendant 30

minutes. La présence de l'oligonucléotide 2 sur la SA-Alexa a été vérifiée par incubation avec des billes contenant l'oligonucléotide 1.

Les deux complexes ont été mélangés dans un tampon Hepes 0, 1M, pH 7, 4, 200 mM NaCl, 200 mM $CaCl_2$, incubés d'abord 10 minutes à 37°C, puis toute la nuit à température ambiante et sous agitation pour favoriser l'appariement des deux brins complémentaires. Le jour suivant, la solution a été purifiée par migration sur gradient de sucrose en ultracentrifugation. Les quantités relatives on été mesurées par absorbance et valent QDs-SA : SA-Alexa = 1 : 1. Nous avons de plus estimé que les proportions relatives de SA et d'Alexa sont de l'ordre de 1 : 4.

Imagerie 3D de billes marquées avec la sonde spécifique bi-couleur
Pour cet échantillon, il a été nécessaire de lier ensemble les deux fluorophores pour limiter au minimum le FRET, mais aussi assurer leur colocalisation spatiale et le maintient de leurs proportions relatives dans tout l'échantillon. En effet, dans le cas d'un marquage spécifique, la localisation des deux fluorophores est souvent confinée dans une région de l'échantillon. Cela induit deux effets :

1. les fluorophores sont plus proches et donc le FRET augmente,
2. il peut y avoir des différences de signal dues aux morphologies différentes des deux sondes (la taille, l'accessibilité aux sites de liaison) et donc des inhomogénéités des 2 marquages, ce qui peut provoquer des artefacts dans l'image reconstruite.

La sonde bi-couleur a été incubée avec les billes d'agarose biotinylées pendant 15 minutes, les billes ont ensuite été lavées trois fois avant d'être imagées. Les sites libres de la SA-Alexa sont probablement ceux qui interagissent avec les billes, puisqu'une expérience précédente avait montré la saturation des sites de liaison de la streptavidine conjuguée sur les QDs.

L'efficacité de notre microscope à discriminer les basses fréquences au point de celles provenant des plans hors du plan de mise au point a été démontrée grâce aux images 3D des billes d'agarose marquées avec la sonde bicouleur et où le marquage a bien la forme d'une sphère creuse. Comme on peut le voir dans la Figure 4.10 A, C et D (en gris), la microscopie HiLo permet de reconstruire l'ensemble du volume 3D des billes, qui sont des sphères creuses , contraire-

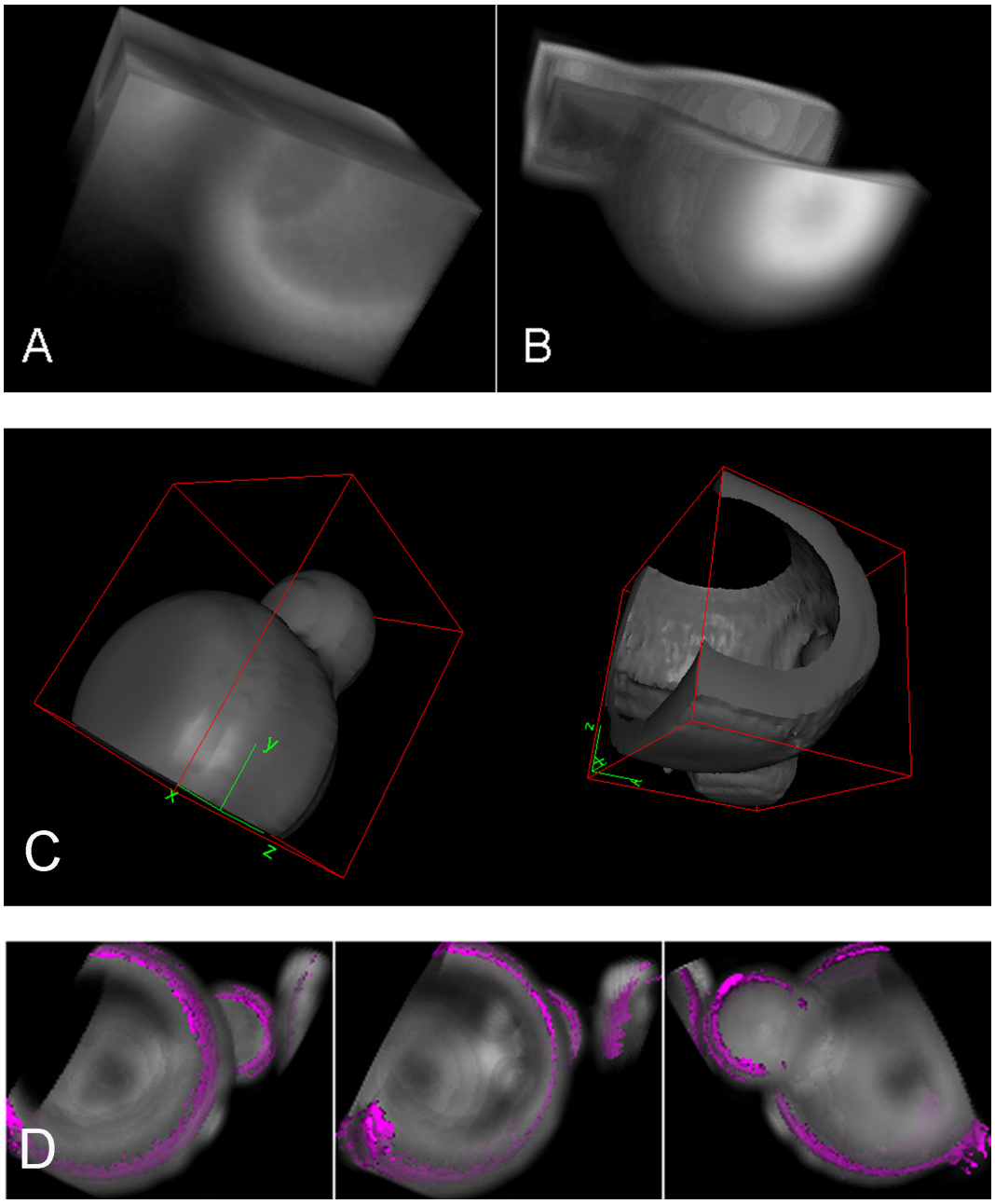


FIGURE 4.10 – Images 3D de billes marquées avec la sonde spécifique bi-couleur. (A) image obtenue par microscopie de fluorescence classique (B) coupe optique obtenue par microscopie HiLo bi-couleur. (C) Images 3D HiLo d'une bille, avec deux orientations différentes (D) Superposition de l'image HiLo (en gris) et de l'image obtenue avec filtrage passe-haut de l'image classique (en rose), avec trois orientations différentes. Les images ont été réalisées avec un objectif à eau x20 et, pour l'image HiLo avec une grille de 20 lignes/mm.

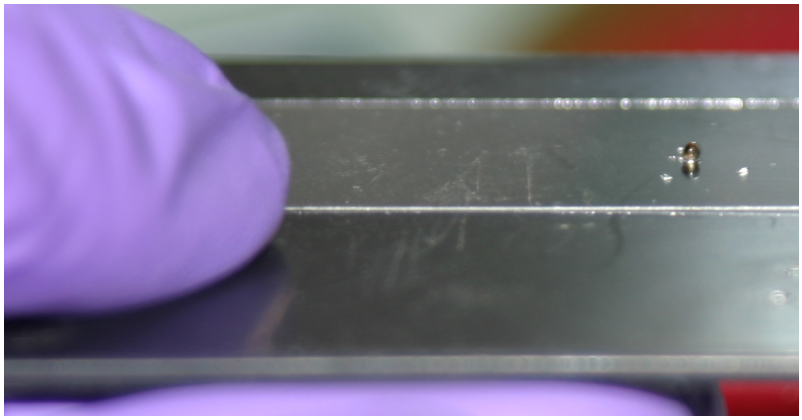


FIGURE 4.11 – Photo d'un embryon fixé et clarifié sur une lamelle.

ment aux images brutes (Figure 4.10 A) ou aux images obtenues après filtrage passe-haut (Figure 4.10 D, en fuchsia). Les images A et B sont le résultat de la combinaison de 120 images, avec un temps d'exposition de 200 msec/plan, une excursion en z de 60 µm, soit un temps d'acquisition (comprenant le déplacement de la platine piézo-électrique en Z) de 40 secondes au total. Les images C et D ont été obtenues avec 40 images, un temps d'exposition de 150 msec/plan, une excursion en z de 80 µm, soit une durée d'acquisition totale de 10 secondes.

4.3.2 Embryons de *Xenopus Laevis* marqués avec les deux fluorophores non liés

Les embryons de *Xenopus Laevis* ont été microinjectés au stade de 4 cellules avec les deux fluorophores (QDs 575 et AlexaFluor 750) et observés au stade de blastula (stade 6,5-7). Dans ce cas, il ne fut pas nécessaire de lier les deux fluorophores ensemble car ceux-ci demeuraient co-localisés au cours du développement de l'embryon, avec un signal FRET négligeable. Ceci fut possible car le marquage n'était pas réalisé avec une sonde spécifique : la colocalisation des fluorophores était sans doute plus simple à obtenir avec néanmoins une distance entre eux supérieure au rayon de Förster. Ce type de marquage évite donc la préparation de la sonde bi-couleur, qui est longue et chère. Les embryons ont été fixés et clarifiés dans une solution BB :BA (2/3 benzyl benzoate, 1/3 benzyl alcohol). La clarification était nécessaire car à ce stade du

dévelopement les embryons sont très diffusants et épais, ce qui empêche d'obtenir un bon contraste de la grille dans l'échantillon. Même après clarification, ces échantillons demeurent très diffusants et le contraste de la grille est très faible à l'intérieur de l'embryon, ce qui nous a limité à l'observation des cellules périphériques des embryons (Figure 4.11). Nous n'avons pas non plus pu imager des têtards à un stade de développement plus avancé (où ils sont moins épais et moins diffusants) car l'Alexa était toxique lorsqu'elle était injectée à une concentration permettant d'avoir un bon signal de fluorescence à ce stade (cette toxicité fut observée après injection des deux fluorophores séparément). Les injections dans les embryons de *Xenopus Laevis* ont été réalisées par Andriani Ioannou, de l'équipe du Dr Paris Skourides, au Département de Biologie à Nicosia, à Chypre. Comme nous le discuterons dans les perspectives, il est possible d'améliorer notre système d'imagerie en utilisant des fluorophores moins toxiques que l'AlexaFluor que nous avons utilisé et qui était couplé à un anticorps. Par exemple le IrDye 800, qui est recouvert par du PEG, serait probablement moins toxique.

Comme on peut le voir dans la Figure 4.12 A, on peut détecter la fluorescence des cellules à la surface de l'embryon avec un microscope à épifluorescence classique mais cette fluorescence est noyée dans un fort signal de fond qui provient des autres plans. De plus, la forme sphérique de l'embryon lui-même génère un anneau brillant autour de l'échantillon qui constitue un artefact dans l'image. La Figure 4.12 C montre l'image HiLo correspondant à la Figure 4.12 B : on peut vérifier que le fond est efficacement supprimé, ce qui permet d'augmenter le contraste des structures contenues dans le plan de mise au point. De plus, la comparaison entre les Figure 4.12 C et D démontre une fois de plus que la technique HiLo permet de préserver les basses fréquences du plan de mise au point, contrairement à l'utilisation d'un simple filtrage passe-haut. On observe également la suppression de l'anneau présent dans les images brutes ainsi qu'une augmentation du contraste dans les images HiLo de la partie périphérique de l'embryon (Figure 4.13). Cela est confirmé par les profils issus des deux images (Figure 4.13 C) : l'artefact correspondant à l'anneau brillant sur le profil de l'image brute (en rouge, à gauche) est bien supprimé dans le profil de l'image HiLo (en bleu). La suppression du fond permet de révéler des détails des structures contenues dans le plan de mise au point (flèche noire).

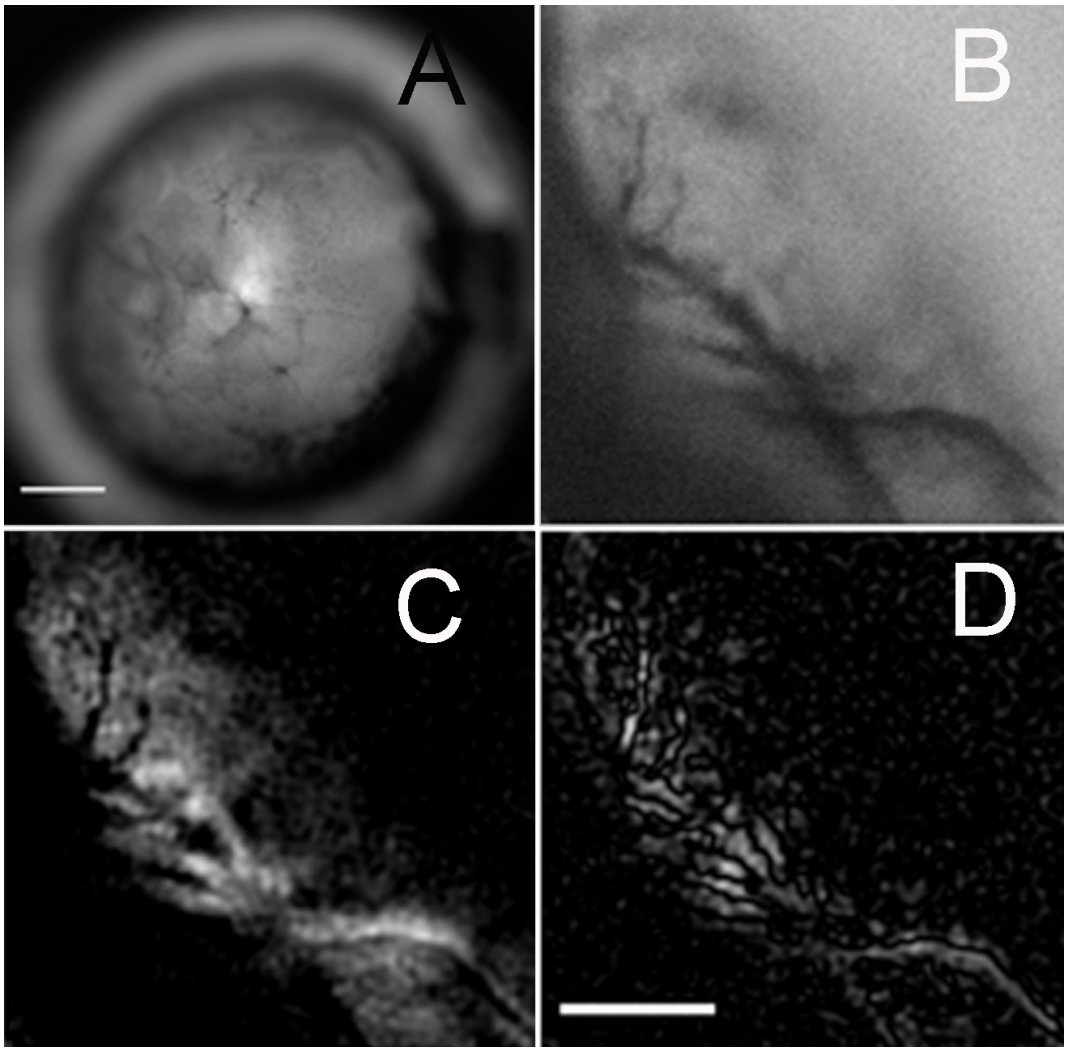


FIGURE 4.12 – Embryon entier imagé avec un microscope à épifluorescence standard (A). Image brute (B), image HiLo (C) et image obtenue avec un filtrage passe-haut des fréquences de l'image brute (D). La barre d'échelle vaut 500 µm dans A et 50 µm dans B, C et D. L'objectif utilisé est un objectif x5 à air pour A et un objectif x10 à air pour B. La grille utilisée a une période de 20 lignes/mm.

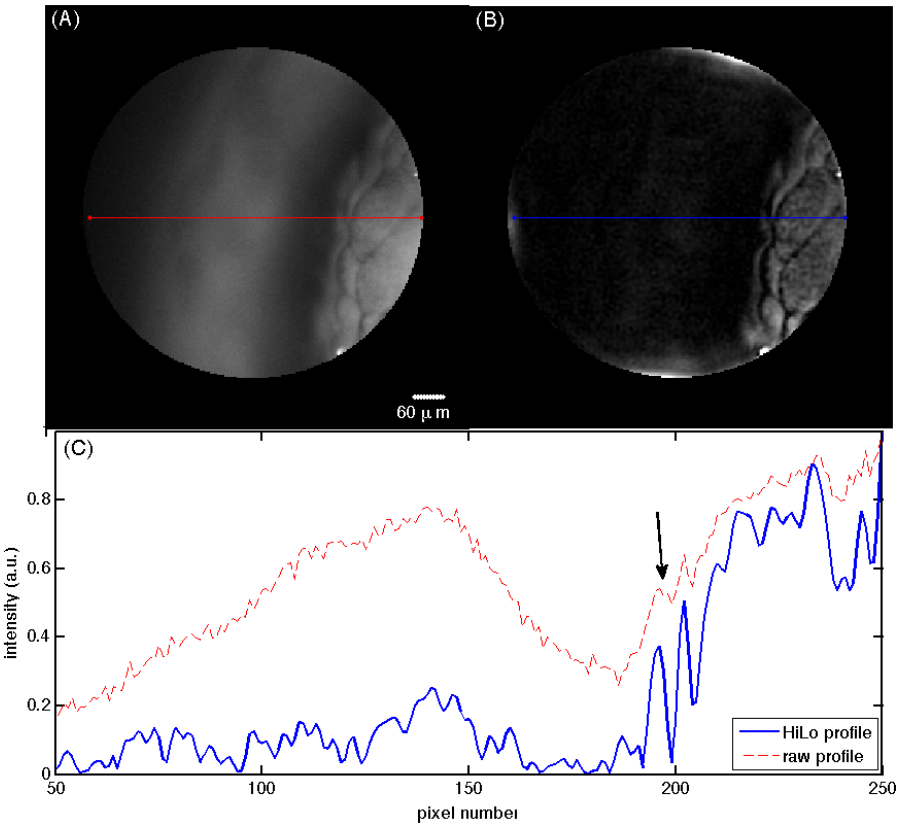


FIGURE 4.13 – Images brute (A) et HiLo (B) d'une région périphérique d'un embryon de *Xenopus Laevis*. Le graphe (C) montre deux profils issus des images brute A (rouge) et HiLo B (bleu). L'objectif utilisé est un objectif x5 à air et la grille a une période de 20 lignes/mm.

Echantillon en mouvement L'avantage majeur de la technique HiLo bi-couleur est de pouvoir réaliser des coupes optique à partir d'une seule acquisition d'image et ainsi augmenter la cadence d'un facteur deux par rapport au microscope HiLo initial. Nous avons donc voulu montrer que le microscope HiLo bi-couleur permet d'atteindre des cadences élevées, par exemple pour l'observation d'embryons en mouvement. Dans la Figure 4.14, les images sont acquises avec un temps d'exposition de 10 msec et une cadence de 25 images/seconde. La vitesse de l'embryon est de l'ordre de 220 μm/s. Le mouvement de l'échantillon ne gêne pas l'extraction des hautes fréquences et la discrimination des basses fréquences du plan de mise au point, tant que le déplacement pendant le temps d'acquisition est inférieur à la période de la grille. Dans notre cas, la cadence d'acquisition est principalement limitée par le temps de transfert des données de la caméra (30 msec par rapport à 10 msec de temps d'exposition) et le temps d'exposition. Le temps d'exposition minimum est déterminé par le rapport signal à bruit de l'image structurée (il faut que la grille ait un contraste suffisant pour la reconstruction). Enfin, la suppression du speckle de la source laser à 488 nm grâce à un diffuseur tournant à une vitesse de 5 tours par seconde impose en théorie un temps d'exposition minimum de 4 msec. Mais cette limite peut être facilement dépassée car il est possible d'augmenter la vitesse de rotation du diffuseur.

4.3.3 Avantages, limites et perspectives du microscope HiLo bi-couleur

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'avantage majeur du microscope HiLo bi-couleur réside dans l'obtention d'une coupe optique à partir d'une seule acquisition d'image : il est alors possible d'augmenter la cadence d'aquisition et ainsi améliorer la résolution temporelle pour des observations dynamiques. Cette cadence dépend essentiellement de la sensibilité et de la rapidité de la caméra mais aussi du rendement quantique des fluorophores utilisés. Un autre avantage important vient de l'acquisition simultanée des images nécessaires à la reconstruction de la coupe optique qui permet de limiter les artefacts liés au mouvement de l'échantillon pendant l'acquisition.

Il est important de noter que les différences d'intensité de fluorescence entre

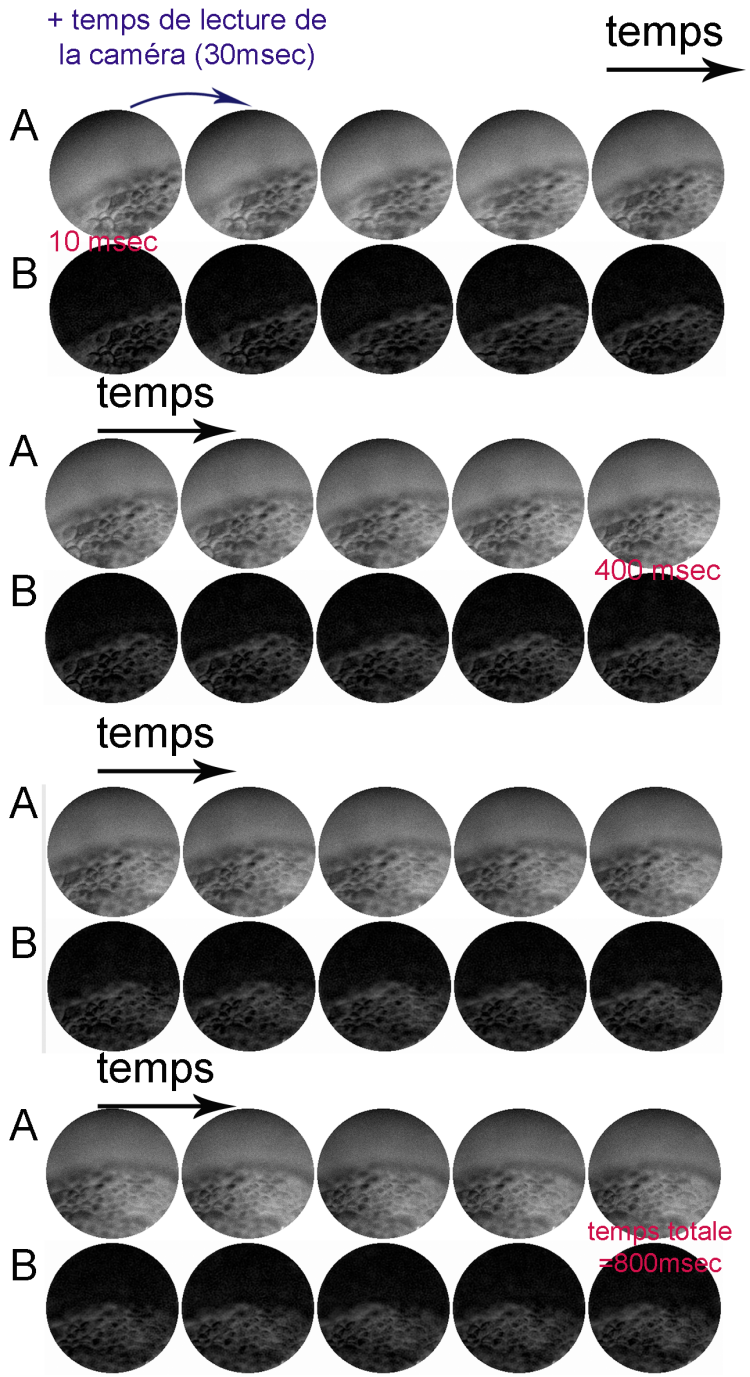


FIGURE 4.14 – Observation dynamique en microscopie standard (A) et HiLo (B) d'une région périphérique d'un embryon de *Xenopus Laevis*. La cadence d'acquisition est de 25 images/seconde (10 msec de temps d'exposition + 30msec de temps transfert caméra). La durée totale de cette série de 20 images vaut 800msec. L'objectif utilisé est un x5 à air et la grille a une période de 20 lignes/mm.

les deux fluorophores, issues du photoblanchiment, n'introduisent pas d'artefacts car elles sont corrigées dans la reconstruction en affectant des poids relatifs α''_S et α_F aux images structurée (AlexaFluor750) et uniforme (QDs 575). Le FRET ne constitue pas non plus une limitation importante grâce à la configuration du dispositif où le fluorophore qui correspond au donneur est utilisé pour réaliser l'image uniforme. De plus, le FRET est limité grâce au choix des fluorophores en fonction de leurs propriétés spectrales et à l'introduction d'un espaceur d'ADN entre eux. Un inconvénient de la microscopie HiLo bi-couleur vient de la nécéssité d'utiliser deux fluorophores qui marquent le même objet, ce qui la rend incompatible avec l'imagerie multicouleur.

Enfin, notons que l'efficacité de la microsopie HiLo dépend du contenu fréquentiel de l'échantillon à étudier. En effet, la taille de la structure à révéler doit nécessairement être plus grande que la période de la grille, sinon un simple filtrage passe haut de l'image suffirait à préserver les structures d'intérêt tout en supprimant le signal de fond provenant de l'ensemble du volume de l'échantillon.

Les perspectives de ce travail sont donc multiples mais dépendent fortement des caractéristiques de l'échantillon à étudier. Une possibilité serait, comme nous l'avons mentionné plus haut, d'utiliser un fluorophore infrarouge moins toxique que l'AlexaFluor afin de pouvoir imager des têtards vivants, qui sont moins diffusants et moins épais que les embryons au stade de blastula. Une autre application serait l'observation d'un modèle animal plus transparent comme par exemple le ver *Caenorabditis Elegans*, ou encore l'étude de phénomènes dynamiques dans des cellules, à condition que les structures à révéler soient plus grandes que la période de la grille utilisée. On peut aussi espérer réduire de moité le temps de lecture de la caméra si l'on souhaite augmenter la cadence d'acquisition. En effet, les deux images, qui sont dans notre cas centrées sur la caméra, pourraient être alignées dans la moitié inférieure de la surface active du capteur. Une fois le champ réduit à cette région d'intérêt, le temps de lecture de la caméra serait d'environ 15 msec. Des caméras encore plus rapides existent (les caméras CMOS), mais au prix d'une plus faible sensibilité. On peut toutefois espérer que dans les années à venir, le développement technologique de ces caméras nous permettra d'avoir un capteur à la fois très rapide et avec une sensibilité de l'ordre des EMCCD actuelles.

Conclusion

Dès les premières synthèses de solutions colloïdales de quantum dots, ceux-ci sont apparus comme des sondes très prometteuses pour la biologie car leurs propriétés optiques uniques permettent de dépasser certaines limites inhérentes aux fluorophores organiques et ouvrent ainsi de nouvelles voies d'application. Les quantum dots ne font néanmoins pas encore partie des outils classiques des biologistes, probablement parce que nous ne maîtrisons pas encore suffisamment leur synthèse et leur transformation en sonde biocompatible et fonctionnelle. Cela passe notamment par la maîtrise de la taille du quantum dot une fois solubilisé, de sa stabilité dans un environnement biologique et de sa fonctionnalisation.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette démarche en proposant un nouveau ligand zwitterionique bidenté, l'acide dihydrolipoïque - sulfobétaïne (DHLA-SB), pour solubiliser les QDs dans l'eau. Les QDs obtenus sont à la fois petits (avec une augmentation du rayon hydrodynamique due au ligand de $\sim$2,6 nm seulement), furtifs en milieu cellulaire et stables dans une vaste gamme de pH (de 4 à 13), dans des solutions saturées en sel et dans le temps.

Nous avons étudié et caractérisé le comportement intracellulaire des QDs DHLA-SB au cours du temps et nous l'avons comparé à celui de deux autres classes de QDs : des QDs encapsulés en micelles de phospholipides - polyéthylène glycol (PEG) et des QDs commerciaux encapsulés dans des copolymères amphiphiles (Qtracker, Invitrogen). Nous avons également comparé trois différentes techniques permettant d'introduire ces nanoparticules dans le cytoplasme : la pinocytose et l'électroporation de cellules Hela et la microinjection dans des embryons de *Xenopus Laevis*. Grâce à la quantification de la cinétique d'agrégation des QDs en microscopie de fluorescence, cette étude a clairement démontré l'influence de la chimie de surface sur le devenir des nanoparticules à

l'intérieur d'une cellule vivante, quelle que soit la technique d'introduction utilisée. Plus précisément, nous avons démontré que le nouveau ligand DHLA-SB permet d'obtenir des nanoparticules bien plus stables dans un environnement biologique que les autres QDs testés. En effet, les QDs DHLA-SB ne présentent pas d'agrégation deux semaines et demie après injection dans un embryon de *Xenopus Laevis* et ont accès à quasiment tous les compartiments cellulaires, même le pont mitotique entre deux cellules filles.

Nous nous sommes ensuite logiquement intéressés à la fonctionnalisation de ces nanoparticules afin de marquer spécifiquement des cellules vivantes. Nous avons mis au point des protocoles de marquage sur cellules fixées avec des QDs micelle biotinylés, mais que nous n'avons malheureusement pas réussi à conjuguer à des biomacromolécules, probablement à cause de leur faible stabilité. Pour le marquage de cellules vivantes, nous avons donc conjugué les QDs DHLA-SB, entre autres avec la streptavidine (SA), ce qui a permis de suivre le trafic de recyclage intracellulaire du récepteur neuronal CB1 dans des cellules HEK vivantes. Ces QDs-SA DHLA-SB peuvent aussi atteindre et marquer de façon spécifique une cible à l'intérieur d'une cellule vivante : une fois internalisés dans le cytoplasme par pinocytose, ils sont en effet capables de reconnaître une protéine biotinylée de l'appareil de Golgi, la gantine. Nous avons réalisé les mêmes expériences avec des QDs-SA commerciaux (Invitrogen) et nous avons ainsi pu clairement montrer que les QDs-SA DHLA-SB permettent d'obtenir un bien meilleur rapport «signal spécifique / signal non spécifique», sans doute grâce à leur petite taille qui leur permet de mieux accéder aux sous-compartiments intracellulaires. De plus, la réussite d'un marquage spécifique avec des nanoparticules est fortement corrélée à la minimisation des interactions non spécifiques avec le milieu biologique environnant et à la cinétique d'agrégation intracellulaire. Cela suggère que la grande spécificité des QDs-SA DHLA-SB est probablement liée à leur stabilité accrue dans les cellules, que nous avons mise en évidence dans l'étude de leur cinétique d'agrégation.

La perspective de ce travail est d'améliorer encore la stabilité des QDs en augmentant le nombre de groupes d'accroche à travers une nouvelle chimie de surface qui prévoit la copolymérisation du DHLA et de la sulfobétaïne. La taille de la sonde étant un paramètre crucial, il serait possible de la réduire en conjuguant les QDs avec des molécules de ciblage comme le TAG, bien plus

petit que la streptavidine.

Enfin, nous avons proposé d'utiliser les QDs DHLA-SB pour améliorer une technique de microscopie à illumination structurée, la microscopie hybride HiLo, et réaliser une coupe optique d'un échantillon biologique épais en une seule image. La microscopie hybride HiLo originelle permet d'obtenir une coupe optique (type image confocale) à partir de l'acquisition de deux images : la première image est obtenue avec une illumination uniforme et la seconde avec une illumination structurée spatialement. Nous avons associé à cette technique l'utilisation d'une sonde bi-couleur composée de deux fluorophores (dont les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont séparés spectralement), où chacun est éclairé avec un seul type d'illumination. A la détection, les deux images de fluorescence sont séparées spectralement puis enregistrées simultanément sur la même caméra avant d'être recombinées judicieusement pour obtenir la coupe optique. La cadence d'acquisition est alors améliorée d'un facteur 2 par rapport à la microscopie HiLo classique et ne dépend dans notre cas que de la sensibilité et de la rapidité de la caméra ainsi que du rendement quantique des fluorophores utilisés. L'avantage majeur de ce microscope HiLo bi-couleur vient de à l'acquisition simultanée des deux images qui limite les artefacts liés au mouvement de l'échantillon pendant l'acquisition. Enfin, nous avons démontré que ce microscope permet effectivement de réaliser des coupes optiques de billes fluorescentes et d'embryons de *Xenopus Laevis* à partir d'une seule image. Cette nouvelle technique d'imagerie 3D rapide devrait permettre l'étude dynamique d'échantillons vivants épais, marqués avec des QDs et des sondes infrarouges moins toxiques.

Bibliographie

[1] C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi, "Synthesis and characterization of nearly monodisperse cde (e = s, se, te) semiconductor nanocrystallites," Journal of the American Chemical Society **115**, 8706–8715 (1993).

[2] C. B. Murray, C. R. Kagan, and M. G. Bawendi, "Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies," Annual Review of Materials Science **30**, 545–610 (2000).

[3] M. A. Hines and P. GuyotSionnest, "Synthesis and characterization of strongly luminescing zns- capped cdse nanocrystals," Journal of Physical Chemistry **100**, 468–471 (1996).

[4] B. O. Dabbousi, J. RodriguezViejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, and M. G. Bawendi, "(cdse)zns core-shell quantum dots : Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites," Journal of Physical Chemistry B **101**, 9463–9475 (1997).

[5] R. G. Xie, U. Kolb, J. X. Li, T. Basche, and A. Mews, "Synthesis and characterization of highly luminescent cdse-core cds/zn0.5cd0.5s/zns multishell nanocrystals," Journal Of The American Chemical Society **127**, 7480–7488 (2005).

[6] A. L. Efros and M. Rosen, "The electronic structure of semiconductor nanocrystals," Annual Review Of Materials Science **30**, 475–521 (2000).

[7] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," Nature Materials **4**, 435–446 (2005).

[8] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," Science **307**, 538–544 (2005).

[9] X. Y. Wu, H. J. Liu, J. Q. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. F. Ge, F. Peale, and M. P. Bruchez, "Immunofluorescent labeling of cancer marker her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots," Nature Biotechnology **21**, 41–46 (2003).

[10] J. Liu, S. K. Lau, V. A. Varma, R. A. Moffitt, M. Caldwell, T. Liu, A. N. Young, J. A. Petros, A. O. Osunkoya, T. Krogstad, B. Leyland-Jones, M. D. Wang, and S. Nie, "Molecular mapping of tumor heterogeneity on clinical tissue specimens with multiplexed quantum dots," ACS Nano **4**, 2755–2765 (2010).

[11] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, and W. W. Webb, "Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo," Science **300**, 1434–1436 (2003).

[12] T. Pons, E. Pic, N. Lequeux, E. Cassette, L. Bezdetnaya, F. Guillemin, F. Marchal, and B. Dubertret, "Cadmium-free cuins2/zns quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity," ACS Nano **4**, 2531–2538 (2010).

[13] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, and H. Mattoussi, "Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors," Journal of the American Chemical Society **126**, 301–310 (2004).

[14] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, and J. M. Mauro, "Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot fret donors," Nature Materials **2**, 630–638 (2003).

[15] K. Boeneman, B. C. Mei, A. M. Dennis, G. Bao, J. R. Deschamps, H. Mattoussi, and I. L. Medintz, "Sensing caspase 3 activity with quantum dots-fluorescent protein assemblies," Journal of the American Chemical Society **131**, 3828–3829 (2009).

[16] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller, "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking," Science **302**, 442–445 (2003).

[17] Q. Zhang, Y. Li, and R. W. Tsien, "The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles," Science **323**, 1448–1453 (2009).

[18] S. Courty, C. Luccardini, Y. Bellaiche, G. Cappello, and M. Dahan, "Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging," Nano Letters **6**, 1491–1495 (2006).

[19] A. L. Efros and M. Rosen, "Random telegraph signal in the photoluminescence intensity of a single quantum dot," Physical Review Letters **78**, 1110–1113 (1997).

[20] B. Mahler, P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J.-P. Hermier, and B. Dubertret, "Towards non-blinking colloidal quantum dots," Nat Mater **7**, 659–664 (2008).

[21] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, M. Sauer, and S. Weiss, "Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots," Optics Letters **26**, 825–827 (2001).

[22] A. May, S. Bhaumik, S. S. Gambhir, C. Zhan, and S. Yazdanfar, "Whole-body, real-time preclinical imaging of quantum dot fluorescence with time-gated detection," Journal of Biomedical Optics **14**, 060504 (2009).

[23] R. Nisman, G. Dellaire, Y. Ren, R. Li, and D. P. Bazett-Jones, "Application of quantum dots as probes for correlative fluorescence, conventional, and energy-filtered transmission electron microscopy," Journal of Histochemistry & Cytochemistry **52**, 13–18 (2004).

[24] A. M. Smith, H. W. Duan, A. M. Mohs, and S. M. Nie, "Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging," Advanced Drug Delivery Reviews **60**, 1226–1240 (2008).

[25] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, and A. M. Seifalian, "Biological applications of quantum dots," Biomaterials **28**, 4717–4732 (2007).

[26] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, and A. Libchaber, "In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles," Science **298**, 1759–1762 (2002).

[27] O. Carion, B. Mahler, T. Pons, and B. Dubertret, "Synthesis, encapsulation, purification and coupling of single quantum dots in phospholipid micelles for their use in cellular and in vivo imaging," Nature Protocols **2**, 2383–2390 (2007).

[28] W. Liu, H. S. Choi, J. P. Zimmer, E. Tanaka, J. V. Frangioni, and M. Bawendi, "Compact cysteine-coated cdse(zncds) quantum dots for in vivo applications," Journal of the American Chemical Society **129**, 14530–14531 (2007).

[29] W. C. W. Chan and S. M. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection," Science **281**, 2016–2018 (1998).

[30] T. Pons, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, and H. Mattoussi, "Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots," Journal Of Physical Chemistry B **110**, 20308–20316 (2006).

[31] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi, "Self-assembly of cdse-zns quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein," Journal of the American Chemical Society **122**, 12142–12150 (2000).

[32] J. K. Jaiswal, E. R. Goldman, H. Mattoussi, and S. M. Simon, "Use of quantum dots for live cell imaging," Nature Methods **1**, 73–78 (2004).

[33] H. T. Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal, S. M. Simon, and H. Mattoussi, "Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores," Journal Of The American Chemical Society **127**, 3870–3878 (2005).

[34] N. V. Efremova, S. R. Sheth, and D. E. Leckband, "Protein-induced changes in poly(ethylene glycol) brushes : Molecular weight and temperature dependence," Langmuir **17**, 7628–7636 (2001).

[35] H. R. Kim, K. Andrieux, C. Delomenie, H. Chacun, M. Appel, D. Desmaële, F. Taran, D. Georgin, P. Couvreur, and M. Taverna, "Analysis of plasma protein adsorption onto pegylated nanoparticles by complemen-

tary methods : 2-de, ce and protein lab-on-chip® system," ELECTROPHORESIS **28**, 2252–2261 (2007).

[36] W. Liu, M. Howarth, A. B. Greytak, Y. Zheng, D. G. Nocera, A. Y. Ting, and M. G. Bawendi, "Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging," Journal of the American Chemical Society **130**, 1274–1284 (2008).

[37] V. V. Breus, C. D. Heyes, K. Tron, and G. U. Nienhaus, "Zwitterionic biocompatible quantum dots for wide ph stability and weak nonspecific binding to cells," ACS Nano **3**, 2573–2580 (2009).

[38] L. L. Rouhana, J. A. Jaber, and J. B. Schlenoff, "Aggregation-resistant water-soluble gold nanoparticles," Langmuir **23**, 12799–12801 (2007).

[39] Q. Jin, J.-P. Xu, J. Ji, and J.-C. Shen, "Zwitterionic phosphorylcholine as a better ligand for stabilizing large biocompatible gold nanoparticles," Chem. Commun. pp. 3058–3060 (2008).

[40] E. Muro, T. Pons, N. Lequeux, A. Fragola, N. Sanson, Z. Lenkei, and B. Dubertret, "Small and stable sulfobetaine zwitterionic quantum dots for functional live-cell imaging," Journal of the American Chemical Society **132**, 4556–+ (2010).

[41] P. Mary, D. D. Bendejacq, M.-P. Labeau, and P. Dupuis, "Reconciling low- and high-salt solution behavior of sulfobetaine polyzwitterions," The Journal of Physical Chemistry B **111**, 7767–7777 (2007).

[42] J. Aldana, N. Lavelle, Y. J. Wang, and X. G. Peng, "Size-dependent dissociation ph of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals," Journal Of The American Chemical Society **127**, 2496–2504 (2005).

[43] F. Chasles, B. Dubertret, and A. C. Boccara, "Full-field optical sectioning and three-dimensional localization of fluorescent particles using focal plane modulation," Optics Letters **31**, 1274–1276 (2006).

[44] M. H. Stewart, K. Susumu, B. C. Mei, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, and H. Mattoussi, "Multidentate poly(ethylene glycol) ligands provide colloidal stability to semiconductor and metallic nanocrystals in extreme conditions," Journal of the American Chemical Society **132**, 9804–9813 (2010).

[45] F. Dif, A.and Boulmedais, M. Pinot, V. Roullier, M. Baudy-Floc'h, F. M. Coquelle, S. Clarke, P. Neveu, F. Vignaux, R. Le Borgne, M. Dahan, Z. Gueroui, and V. Marchi-Artzner, "Small and stable peptidic pegylated quantum dots to target polyhistidine-tagged proteins with controlled stoichiometry," Journal of the American Chemical Society **131**, 14738–14746 (2009).

[46] S. Clarke, F. Pinaud, O. Beutel, C. You, J. Piehler, and M. Dahan, "Covalent monofunctionalization of peptide-coated quantum dots for single-molecule assays," Nano Letters **10**, 2147–2154 (2010).

[47] N. R. Jana, N. Erathodiyil, J. Jiang, and J. Y. Ying, "Cysteine-functionalized polyaspartic acid : A polymer for coating and bioconjugation of nanoparticles and quantum dots," Langmuir **26**, 6503–6507 (2010).

[48] W. Liu, A. B. Greytak, J. Lee, C. R. Wong, J. Park, L. F. Marshall, W. Jiang, P. N. Curtin, A. Y. Ting, D. G. Nocera, D. Fukumura, R. K. Jain, and M. G. Bawendi, "Compact biocompatible quantum dots via raft-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand," Journal of the American Chemical Society **132**, 472–483 (2010).

[49] L. Liu, X. Guo, Y. Li, and X. Zhong, "Bifunctional multidentate ligand modified highly stable water-soluble quantum dots," Inorganic Chemistry **49**, 3768–3775 (2010).

[50] I. Yildiz, E. Deniz, B. McCaughan, S. F. Cruickshank, J. F. Callan, and F. M. Raymo, "Hydrophilic cdse-zns core-shell quantum dots with reactive functional groups on their surface," Langmuir **26**, 11503–11511 (2010).

[51] J. B. Delehanty, I. L. Medintz, T. Pons, F. M. Brunel, P. E. Dawson, and H. Mattoussi, "Self-assembled quantum dot-peptide bioconjugates for selective intracellular delivery," Bioconjugate Chemistry **17**, 920–927 (2006).

[52] G. Ruan, A. Agrawal, A. I. Marcus, and S. Nie, "Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells : new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding," Journal of the American Chemical Society **129**, 14759–14766 (2007).

[53] I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty, K. Susumu, F. M. Brunel, P. E. Dawson, and H. Mattoussi, "Intracellular delivery of quantum dots protein cargos mediated by cell penetrating peptides," Bioconjugate Chemistry **19**, 1785–1795 (2008).

[54] B. Chen, Q. L. Liu, Y. L. Zhang, L. Xu, and X. H. Fang, "Transmembrane delivery of the cell-penetrating peptide conjugated semiconductor quantum dots," Langmuir **24**, 11866–11871 (2008).

[55] C. Tekle, B. van Deurs, K. Sandvig, and T. G. Iversen, "Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands," Nano Letters **8**, 1858–1865 (2008).

[56] B. Gupta, T. S. Levchenko, and V. P. Torchilin, "Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides," Advanced Drug Delivery Reviews **57**, 637 – 651 (2005). Protein- and Peptide-Mediated Transduction : Mechanisms and Implications for Drug Delivery.

[57] R. Sawant and V. Torchilin, "Intracellular transduction using cell-penetrating peptides," Mol. BioSyst. **6**, 628–640 (2010).

[58] J. B. Delehanty, C. E. Bradburne, K. Boeneman, K. Susumu, D. Farrell, B. C. Mei, J. B. Blanco-Canosa, G. Dawson, P. E. Dawson, H. Mattoussi, and I. L. Medintz, "Delivering quantum dot-peptide bioconjugates to the cellular cytosol : escaping from the endolysosomal system," Integrative Biology **2**, 265 (2010).

[59] B. R. Liu, Y. wern Huang, J. G. Winiarz, H.-J. Chiang, and H.-J. Lee, "Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich hr9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism," Biomaterials **32**, 3520 – 3537 (2011).

[60] H. W. Duan and S. M. Nie, "Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings," Journal of the American Chemical Society **129**, 3333–3338 (2007).

[61] A. R. Bayles, H. S. Chahal, D. S. Chahal, C. P. Goldbeck, B. E. Cohen, and B. A. Helms, "Rapid cytosolic delivery of luminescent nanocrystals

in live cells with endosome-disrupting polymer colloids," Nano Letters **10**, 4086–4092 (2010).

[62] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, and S. N. Bhatia, "Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking," Advanced Materials **16**, 961–+ (2004).

[63] S. Courty, C. Bouzigues, C. Luccardini, M. Ehrensperger, S. Bonneau, and M. Dahan, "Tracking individual proteins in living cells using single quantum dot imaging," Methods in Enzymology **414**, 211–228 (2006).

[64] P. Pierobon, S. Achouri, S. Courty, A. R. Dunn, J. A. Spudich, M. Dahan, and G. Cappello, "Velocity, processivity, and individual steps of single myosin v molecules in live cells," Biophysical Journal **96**, 4268–75 (2009).

[65] F. Q. Chen and D. Gerion, "Fluorescent cdse/zns nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells," Nano Letters **4**, 1827–1832 (2004).

[66] A. Charalambous, M. Andreou, and P. Skourides, "Intein-mediated site-specific conjugation of quantum dots to proteins in vivo," Journal of Nanobiotechnology **7**, 9 (2009).

[67] P. Stylianou and P. A. Skourides, "Imaging morphogenesis, in xenopus with quantum dot nanocrystals," Mechanisms of Development **126**, 828–841 (2009).

[68] K. Boeneman, J. B. Delehanty, K. Susumu, M. H. Stewart, and I. L. Medintz, "Intracellular bioconjugation of targeted proteins with semiconductor quantum dots," Journal of the American Chemical Society **132**, 5975–5977 (2010).

[69] A. Vincent, S. Babu, E. Heckert, J. Dowding, S. M. Hirst, T. M. Inerbaev, W. T. Self, C. M. Reilly, A. E. Masunov, T. S. Rahman, and S. Seal, "Protonated nanoparticle surface governing ligand tethering and cellular targeting," ACS Nano **3**, 1203–1211 (2009).

[70] E. C. Cho, L. Au, Q. Zhang, and Y. Xia, "The effects of size, shape, and surface functional group of gold nanostructures on their adsorption and internalization by cells," Small **6**, 517–522 (2010).

[71] Y. Xiao, S. P. Forry, X. Gao, R. D. Holbrook, W. G. Telford, and A. Tona, "Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake," Journal of Nanobiotechnology **8**, 13 (2010).

[72] A. Verma, O. Uzun, Y. Hu, Y. Hu, H.-S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine, and F. Stellacci, "Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles," Nature Materials **7**, 588–595 (2008).

[73] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, and W. C. W. Chan, "Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent," Nature Nanotechnology **3**, 145–150 (2008).

[74] S. Barua and K. Rege, "Cancer-cell-phenotype-dependent differential intracellular trafficking of unconjugated quantum dots," Small **5**, 370–376 (2009).

[75] G. Zhang, Z. Yang, W. Lu, R. Zhang, Q. Huang, M. Tian, L. Li, D. Liang, and C. Li, "Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice," Biomaterials **30**, 1928–1936 (2009).

[76] T. J. Daou, L. Li, P. Reiss, V. Josserand, and I. Texier, "Effect of poly(ethylene glycol) length on the in vivo behavior of coated quantum dots," Langmuir **25**, 3040–3044 (2009).

[77] G. Ruan and J. O. Winter, "Alternating-color quantum dot nanocomposites for particle tracking," Nano Letters **11**, 941–945 (2011).

[78] X. Jiang, C. Röcker, M. Hafner, S. Brandholt, R. M. Dörlich, and G. U. Nienhaus, "Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live hela cells," Acs Nano **4**, 6787–6797 (2010).

[79] M. Husmann, E. Beckmann, K. Boller, N. Kloft, S. Tenzer, W. Bobkiewicz, C. Neukirch, H. Bayley, and S. Bhakdi, "Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis," (2009).

[80] H. Ollivier, K. Pichavant-Rafini, E. Puill-Stephan, P. Calvès, L. Nonnotte, and G. Nonnotte, "Effects of hyposmotic stress on exocytosis in isolated turbot, scophthalmus maximus, hepatocytes," Journal of Comparative Physiology B **176**, 643–652 (2006).

[81] D. Gatof, G. Kilic, and J. G. Fitz, "Vesicular exocytosis contributes to volume-sensitive atp release in biliary cells," American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **286**, G538–G546 (2004).

[82] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brügger, and M. Simons, "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes," Science **319**, 1244–1247 (2008).

[83] E. Cocucci, G. Racchetti, and J. Meldolesi, "Shedding microvesicles : artefacts no more," (2009).

[84] K. I. Joo, Y. N. Lei, C. L. Lee, J. Lo, J. S. Xie, S. F. Hamm-Alvarez, and P. Wang, "Site-specific labeling of enveloped viruses with quantum dots for single virus tracking," Acs Nano **2**, 1553–1562 (2008).

[85] Y.-H. Chen, C.-H. Wang, C.-W. Chang, and C.-A. Peng, "In situ formation of viruses tagged with quantum dots," Integrative Biology **2**, 258 (2010).

[86] K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, S. Higashiya, F. M. Brunel, P. E. Dawson, and H. Mattoussi, "Kinetics of metal-affinity driven self-assembly between proteins or peptides and cdse-zns quantum dots," The Journal of Physical Chemistry C **111**, 11528–11538 (2007).

[87] V. Roullier, S. Clarke, C. You, F. Pinaud, G. Gouzer, D. Schaible, V. Marchi-Artzner, J. Piehler, and M. Dahan, "High-affinity labeling and tracking of individual histidine-tagged proteins in live cells using ni2+ tris-nitrilotriacetic acid quantum dot conjugates," Nano Letters **9**, 1228–1234 (2009).

[88] B. A. Tannous, J. Grimm, K. F. Perry, J. W. Chen, R. Weissleder, and X. O. Breakefield, "Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging," Nature Methods **3**, 391–396 (2006).

[89] G. Iyer, X. Michalet, Y.-P. Chang, F. F. Pinaud, S. E. Matyas, G. Payne, and S. Weiss, "High affinity scfv-hapten pair as a tool for quantum dot labeling and tracking of single proteins in live cells," Nano Letters **8**, 4618–4623 (2008).

[90] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, and K. V. Wood, "Halotag : A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis," ACS Chemical Biology **3**, 373–382 (2008).

[91] M. kyung So, H. Yao, and J. Rao, "Halotag protein-mediated specific labeling of living cells with quantum dots," Biochemical and Biophysical Research Communications **374**, 419 – 423 (2008).

[92] E. Genin, O. Carion, B. Mahler, B. Dubertret, N. Arhel, P. Charneau, E. Doris, and C. Mioskowski, "Crash quantum dot nanohybrids for smart targeting of proteins," Journal of the American Chemical Society **130**, 8596–8597 (2008).

[93] P. F. G. Rodríguez, E. Sepulveda, B. Dubertret, and V. Loriette, "Axial coding in full-field microscopy using three-dimensional structured illumination implemented with no moving parts," Opt. Lett. **33**, 1617–1619 (2008).

[94] J. Park, J. Nam, N. Won, H. Jin, S. Jung, S. Jung, S.-H. Cho, and S. Kim, "Compact and stable quantum dots with positive, negative, or zwitterionic surface : Specific cell interactions and non-specific adsorptions by the surface charges," Advanced Functional Materials pp. n/a–n/a (2011).

[95] C. Leterrier, D. Bonnard, D. Carrel, J. Rossier, and Z. Lenkei, "Constitutive endocytic cycle of the cb1 cannabinoid receptor," Journal of Biological Chemistry **279**, 36013–36021 (2004).

[96] M. Howarth, W. H. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, and A. Y. Ting, "Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells," Nature Methods **5**, 397–399 (2008).

[97] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," Science **248**, 73–76 (1990).

[98] P. J. Campagnola and L. M. Loew, "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms," Nat Biotech **21**, 1356–1360 (2003).

[99] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy," Science **305**, 1007–1009 (2004).

[100] P. A. Santi, S. B. Johnson, M. Hillenbrand, P. Z. GrandPre, T. J. Glass, and J. R. Leger, "Thin-sheet laser imaging microscopy for optical sectioning of thick tissues," Biotechniques **46**, 287–294 (2009).

[101] M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," Optics Letters **22**, 1905–1907 (1997).

[102] L. G. Krzewina and M. K. Kim, "Single-exposure optical sectioning by color structured illumination microscopy," Opt. Lett. **31**, 477–479 (2006).

[103] K. Wicker and R. Heintzmann, "Single-shot optical sectioning using polarization-coded structured illumination," (2010).

[104] S. Santos, K. K. Chu, D. Lim, N. Bozinovic, T. N. Ford, C. Hourtoule, A. C. Bartoo, S. K. Singh, and J. Mertz, "Optically sectioned fluorescence endomicroscopy with hybrid-illumination imaging through a flexible fiber bundle," Journal of Biomedical Optics **14**, 030502 (2009).

[105] D. Lim, K. K. Chu, and J. Mertz, "Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy," Optics Letters **33**, 1819–1821 (2008).

[106] J. Mertz and J. Kim, "Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with hilo background rejection," Journal of Biomedical Optics **15**, 016027 (2010).

[107] E. Muro, P. Vermeulen, A. Ioannou, P. Skourides, B. Dubertret, A. Fragola, and V. Loriette, "Single-shot optical sectioning using two-color probes in hilo fluorescence microscopy," Biophysical Journal **100**, 2810–2819 (2011).

[108] H. Mattoussi and J. Cheon, eds., *Inorganic Nanoprobes for Biological Sensing and Imaging* (Artech House, 2009). Chapter 4.

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mes deux rapporteurs :
ISABELLE TEXIER-NOGUES et CLAIRE WILHELM. Merci d'avoir eu la patience de lire en détail mon manuscrit et de la discussion enrichissante que nous avons eu lors de la soutenance.

Merci à HEDI MATTOUSSI qui est venu de très loin (Florida, USA) : j'étais honorée de pouvoir discuter avec vous de mon travail de thèse.

Merci à SANDRINE LEVEQUE-FORT et à AXEL BUGUIN pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'enthousiasme que vous avez démontré pour mon travail.

Merci beaucoup à BENOIT DUBERTRET, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans un environnement d'exception et de pouvoir bénéficier au même temps d'une grande autonomie.

Grazie mille à ALEXANDRA FRAGOLA, mon encadrante, pour m'avoir suivie dans toutes les étapes très variées de mon parcours de thèse. Merci pour les nombreuses conversations scientifiques et de ta bonne humeur !

Merci beaucoup aussi à JEROME LESUEUR, directeur du laboratoire et à DANIELE FOURNIER : merci pour votre gentillesse et bonne humeur.

Les gens qui ont contribué à mon travail sont beaucoup et je ne pense pas que les quelques lignes que je vais écrire ici suffiront pour vous remercier de l'aide que vous m'avez apporté et sans laquel je n'aurais pas pu réaliser un travail si multidisciplinaire : « grazie infinite » la Formule 1 !

Grazie mille THOMAS PONS, j'ai appris plein de choses en travaillant avec toi et j'ai beaucoup aimé toutes les discussions scientifiques (et non) toujours accompagnées par une très bonne humeur !

Un grand merci au PROFESSEUR NICOLAS LEQUEUX ! Merci pour ta merveilleuse idée, la Sulfobétaïne, qui m'a permis d'avoir ces jolis résultats ! Merci beaucoup aussi pour ta bonne humeur et tes bons conseils !

Merci beaucoup VINCENT LORIETTE de toute l'aide pour la partie optique et pour ta patience ! Merci aussi à PIERRE VERMEULEN, EDUARDO SEPULVEDA et IVAN MAKSIMOVIC pour l'aide dans la partie optique.

Merci à OLIVIER CARION et EMERSON GIOVANELLI qui ont travaillé sur l'aspect biochimique et qui ont, tous les deux, partagé avec moi le bureau !

Merci beaucoup Emerson pour tes re-lectures de thèse avec une précision surprenante.

Merci aussi à MOHAMED HANAFI pour ta bonne humeur et ton aide !

Merci à toutes les équipes avec lesquelles nous avons collaboré ! Merci à PARIS SKOURIDES et ANDRIANI IOANNOU à Chypre pour votre enthousiasme et pour les beaux résultats sur *X.Laevis*. Merci à PIERRE CHARNEAU et son équipe à l'Institut Pasteur : PHILIPPE SOUQUE, NATHALIE ARHEL et ANNE-SOPHIE BEIGNON, merci de m'avoir introduite à la virologie et de votre constante bonne humeur ! Merci à ZSOLT LENKEI, PAUL TCHENIO, ANNE SIMON, ALEXANDRE ROLAND et ANNE-LISE GAFFURI (du laboratoire de Neurobiologie de l'ESPCI) pour votre aide et pour votre gentillesse. Merci également à GAELLE BONCOMPAIN et FRANK PEREZ, de l'Institut Curie qui nous ont très gentiment donné leur lignée cellulaire. Merci aussi à ERIC LARQUET (IMPMC) pour ta patience et pour ta bonne humeur.

Et je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui ont permis de garder une très bonne ambiance au laboratoire (et dehors) : « un jour sans sourire est un jour perdu » (cit. Charlie Chaplin). Pour commencer SANDRINE -SASA'- ITHURRIA avec laquelle j'ai partagé le bureau pendant quasiment toute la thèse : merci merci pour tous les bons moments passés ensemble (avec EMMANUEL aussi). Merci BENOIT MAHLER, l'autre « ancien » du labo, pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. Merci à BRICE -BRIZIO- NADAL et GARY SIT-BON pour les réunions du vendredi soir pré-thèse. Merci SOPHIE -TOTO'- BOUCCARA : j'ai bien aimé partager avec toi mes derniers mois de thèse ! Merci à ma compagne de sport CLEMENTINE JAVAUX et à ELSA CASSETTE. Merci aussi aux « nouveaux » thésards : CECILE BOUET, ARJEN DIJKSMAN, SYLVAIN HELAS-OTHENIN, MICKAEL TESSIER et aussi WEI PAN, avec laquelle j'ai partagé le bureau pendant les derniers mois de thèse.

Je remercie encore SOPHIE DEMONCHAUX, CAROLE GRANGIER, JOSIANE RACINE et MARIE-CLAUDE THEME.

Merci aussi à tous les autres membres du LPEM et de l'Institut Langevin.

Je tiens à remercier YANNICK DE WILDE, DENIS BARTOLO et VALERIA MANZIN pour leur soutien post-thèse.

Dulcis in fundo, je tiens à remercier ma famille, mes amis et Moroso.

Mamma, Papà e Fede, mi siete sempre stati vicini anche se lontani, grazie di cuore.

Grazie a tutta la « cumpa » Parisienne pour les beaux moments ensemble : Kaska, Fulkior, Marco, Fra, Catouche, Emilie, Luca, Valé, etc..

Grazie agli amici di sempre ma lontani : Filuschia, Simer, Verow e Guidoz, The Nuccis..

Mais surtout je dois remercier “Moroso” pour m’avoir supporté pendant toute la thèse (mais dans les deux sens du mot supporter, eheh) :
come farei senza il moroso ?