

Un nouveau marqueur fluorescent pour l'imagerie *in vivo*

Benoît Dubertret

> Les *quantum dots* (QD) (boîtes quantiques) sont des cristaux de semi-conducteurs de forme sphérique dont les dimensions ne dépassent pas quelques nanomètres. Depuis 1993, date à laquelle ils ont été synthétisés pour la première fois [1], il a souvent été dit que ces nanoparticules apporteraient une révolution dans l'imagerie bio-médicale. Les QD ont en effet des propriétés optiques hors du commun [2] qui permettent de déplacer certaines limitations inhérentes aux marqueurs fluorescents organiques (fluorescéine, rhodamine, GFP, *green fluorescent protein*, etc.), comme la

faible résistance au photo-blanchiment (c'est-à-dire la perte d'émission de fluorescence après une certaine durée d'excitation), ou la difficulté de visualiser simultanément des colorants de couleur différente. Un QD unique peut être visualisé en fluorescence pendant plusieurs minutes, ce qui permet de pousser la détection jusqu'à la visualisation de molécules uniques. Par ailleurs, pour des raisons de confinement quantiques, la longueur d'onde d'émission des QD est directement reliée à leur taille. En effet, la « taille caractéristique » de l'onde associée à l'ex-

citon - responsable de l'émission de fluorescence - créée dans le cœur du QD est plus grande que le QD lui-même. Ainsi, dans le cas de *dots* formés de CdSe/ZnS, les particules de 2 nm de diamètre émettent dans le bleu (autour de 520 nm) alors que les plus grosses (6 nm) émettent dans le rouge (autour de

620 nm). Avec la même longueur d'onde d'excitation (par exemple, 450 nm), il est ainsi possible avec un seul jeu de filtres de visualiser quatre ou cinq couleurs différentes.

Malgré ces propriétés optiques attrayantes, les QD n'ont été que très peu utilisés comme marqueur fluorescent en biologie. Cela est dû aux difficultés de solubiliser les *dots* en milieu aqueux tout en conservant trois propriétés essentielles: une bonne fluorescence, une stabilité colloïdale et une faible adsorption non spécifique. Ce n'est que très récemment que ces conditions commencent à être satisfaites simultanément [3-5].

La difficulté vient du fait qu'après leur synthèse (obtenue par injection rapide sous atmosphère contrôlée d'un mélange de diméthyl cadmium, de sélénium et de trioctylphosphine dans une solution d'oxyde de trioctylphosphine chauffée à 350°C [1]), les QD sont recouverts de ligands hydrophobes. Pour les solubiliser dans l'eau, il faut les rendre hydrophiles tout en protégeant leur surface des charges présentes en solution (ces charges détruisent la fluorescence des QD). La stratégie employée jusqu'à présent consistait à échanger les ligands de surface avec des ligands ayant une partie hydrophile. Ces nouveaux ligands se greffent sur la surface du *dot* pour former une croûte monocouche [6] ou multicouche [7]. Ces méthodes permettent de rendre les *dots* solubles dans l'eau mais de nombreux problèmes d'adsorption non spécifique et d'agrégation apparaissent lors d'une utilisation *in vitro* [8]. Par ailleurs, aucune de ces méthodes ne permet d'utiliser les *dots in vivo*.

ESPCI, Laboratoire d'Optique Physique, Cnrs UPRA0005, 10, rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 10, France. benoit.dubertret@espci.fr

FABRICATION ET CARACTÉRISTIQUES D'UN QUANTUM DOT (QD)

Les boîtes quantiques de semi-conducteurs sont des cristaux de taille nanométriques (2-10 nm) dotés de propriétés physiques uniques et fort intéressantes.

La synthèse de QD peut être obtenue par deux méthodes: (1) en déposant quelques couches d'un matériau A sur un matériau B ayant avec A une forte différence de paramètre de maille, on obtient une relaxation de A (résultant d'une minimisation des contraintes) produisant des îlots de A sur B. Cette technique est très utilisée en physique du solide; (2) en introduisant rapidement un mélange de précurseurs (A+B) dans une solution de ligand (C), on arrive, en jouant sur les conditions expérimentales, à faire croître de façon contrôlée, en solution, des petits cristaux AB stabilisés par les ligands C. Cette technique est celle qui est utilisée pour produire les QD susceptibles d'être utilisés en biologie.

La fluorescence des QD résulte du phénomène suivant: lorsqu'on excite un QD avec une longueur d'onde donnée, on crée dans le cristal une paire électron-trou (un exciton) qui se déplace dans le nanocristal. Lorsque cette paire se recombine, elle émet un photon ayant une énergie plus faible que celle du photon absorbé. Le rayon de Bohr (la « taille caractéristique ») de la fonction d'onde associée à cette paire électron-trou est plus grand que les dimensions du QD. On a donc des effets de confinement qui sont responsables des changements de couleur d'émission des QD en fonction de leur taille. Plus le confinement est important (c'est-à-dire plus le QD est petit), plus l'énergie émise est grande (émission vers les ultraviolets). La magie des QD est donc de pouvoir modifier leurs propriétés optiques à loisir simplement en changeant leur taille, leur forme (pour obtenir de la lumière polarisée par exemple) ou leur composition.

À l'échelle du QD unique, on observe des clignotements de la fluorescence. Ce phénomène qui dépend de la nature de la particule, de son environnement et de la puissance d'excitation n'est pas encore complètement compris mais est lié à l'ionisation réversible du cœur du QD (obtenue par la combinaison d'effet Auger et d'effet tunnel). La fréquence caractéristique d'un QD est de l'ordre de 0,5 s.



Récemment, nous avons montré qu'en gardant les ligands hydrophobes à la surface des *dots*, il était possible de les encapsuler au cœur d'une micelle (c'est-à-dire une boule de polymères orientés radialement comme les épines d'un hérisson) de phospholipides composée d'un mélange de *n*-poly(éthylène glycol) phosphatidyléthanolamine (PEG-PE) et de phosphatidylcholine (PC) [3]. La stabilité de la micelle est très améliorée par la présence du QD en son cœur, probablement à cause des interactions hydrophobes entre les ligands à la surface du *dot* et la double chaîne hydrophobe du phospholipide. Sans QD, les micelles se dégradent au bout de quelques jours [9]. Avec QD, elles sont stables pendant plusieurs mois en solution aqueuse. Cette nouvelle méthode d'encapsulation permet d'obtenir rapidement (moins de 5 minutes) des QD-micelles régulières dont la taille, la forme et la structure sont homogènes. La présence d'une couche de PEG dense et

orientée vers l'extérieur de la micelle assure une adsorption non spécifique minimale avec les biomolécules. La densité de PEG ainsi que la taille des micelles peuvent être ajustées en fonction des applications. En mélangeant des PEG-PE avec des PEG-PE dont l'extrémité PEG porte un groupe réactif, on obtient des QD-micelles sur lesquelles on peut greffer des protéines ou de l'ADN. Nous avons montré que des QD-micelles sur lesquelles ont été attachées des molécules d'ADN (simple brin) s'accrochent spécifiquement à une séquence complémentaire d'ADN immobilisée dans des billes de 4 % d'agarose mais ne s'accrochent pas lorsque la séquence n'est pas appariée [3].

Nous avons ensuite testé la possibilité d'utiliser les QD-micelles comme traceur dans des expériences d'imagerie *in vivo*. Pour cela, deux critères doivent être remplis: les QD-micelles doivent être neutres d'un point de vue biologique (faible toxicité, absence d'activité biologique) et être stables dans le temps. Nous avons injecté des embryons de xénope à un stade précoce du développement avec des QD-micelles (Figure 1A). L'environnement embryonnaire, par sa sensibilité, est très bien adapté à l'analyse de l'activité biologique et de la toxicité des QD-micelles parce que les modifications qui seraient induites dans les cellules se traduisent en général par des phénotypes biologiques reconnaissables et mesurables. La Figure 1 montre des QD-micelles injectées dans des cellules individuelles d'un embryon à un stade précoce. Il faut souligner plusieurs points importants. (1) Les QD-micelles ne diffusent pas d'une cellule à l'autre: seules les cellules issues de la cellule injectée sont fluorescentes. (2) Les QD-micelles semblent avoir une activité et une toxicité très faibles. Pour des quantités injectées typiques (environ 2.10^9 QD-micelles/cellule), la lignée cellulaire peut être suivie par fluorescence pendant plu-

sieurs jours (absence d'activité biologique) et être stables dans le temps. Nous avons injecté des embryons de xénope à un stade précoce du développement avec des QD-micelles (Figure 1A). L'environnement embryonnaire, par sa sensibilité, est très bien adapté à l'analyse de l'activité biologique et de la toxicité des QD-micelles parce que les modifications qui seraient induites dans les cellules se traduisent en général par des phénotypes biologiques reconnaissables et mesurables. La Figure 1 montre des QD-micelles injectées dans des cellules individuelles d'un embryon à un stade précoce. Il faut souligner plusieurs points importants. (1) Les QD-micelles ne diffusent pas d'une cellule à l'autre: seules les cellules issues de la cellule injectée sont fluorescentes. (2) Les QD-micelles semblent avoir une activité et une toxicité très faibles. Pour des quantités injectées typiques (environ 2.10^9 QD-micelles/cellule), la lignée cellulaire peut être suivie par fluorescence pendant plu-

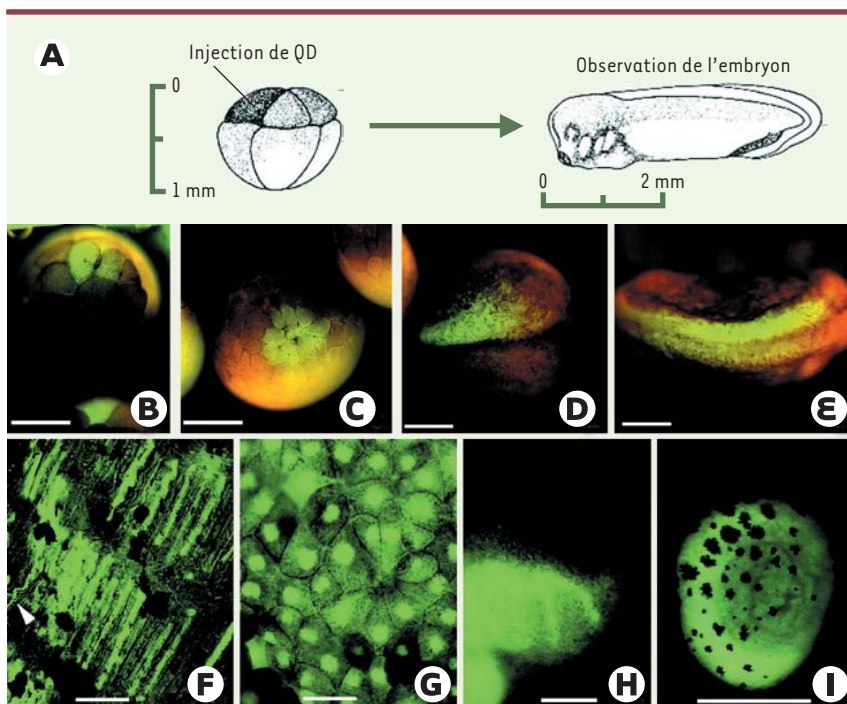


Figure 1. Marquage d'embryons de xénope à différents stades du développement avec des quantum dots (QD). Localisation cellulaire spécifique des QD. **A.** Schéma donnant la stratégie expérimentale. Des micelles de QD sont injectées dans une cellule d'un embryon de huit cellules. Entre 1,5 et 3 nl d'une suspension de QD ($2,3 \mu\text{m}$) sont injectés, ce qui correspond à 2.10^9 et 4.2×10^9 particules injectées dans une cellule. Les embryons sont ensuite cultivés et visualisés à différents stades du développement. **B-E.** Une image de transmission et une image de fluorescence ont été super-imposées. **B.** Injection d'une cellule d'un embryon de huit cellules permettant de marquer un seul blastomère. **C.** Même embryon une heure après. **D.** Embryon *neurula*. Ici aussi, une seule cellule d'un embryon à huit cellules a été injectée. **F.** Marquage intracellulaire d'un axone (flèche) et de somites d'un têtard au stade de développement 40. **G.** QD

localisés dans le noyau pendant les stades *mid-blastula*. Cette localisation s'atténue plus tard. **H.** Cellules marquées de la crête neurale migrant dans les branchies. **I.** Fluorescence des QD observées dans l'estomac de l'embryon. Barres: **B-E, H, I:** 0,5 mm; **F, G:** 30 μm . Les images fluorescentes sont obtenues avec le jeu de filtre 41015 Chroma (GFP sauvage, émission passe-haut et une excitation passe-bande de 50 nm de large centrée sur 450 nm) monté sur un microscope Zeiss. Les échantillons sont excités avec une lampe au mercure de 50 W. Les images sont enregistrées avec une caméra couleur digitale (AxioCam HR, Zeiss). Dans ces expériences, les QD ont un diamètre de 3,5 nm, leur cœur est en CdSe, leur croûte en Zn/S. Ces QD absorbent les radiations avec une longueur d'onde < 515 nm et émettent aux alentours de 550 nm.

sieurs jours, et les embryons traités ont un phénotype identique à celui des embryons qui n'ont pas reçu de QD. L'injection de quantités supérieures de QD (au-delà de 5.10^9 QD-micelles/cellule) entraîne des anomalies du développement embryonnaire. La cause de cette toxicité est pour l'instant inconnue, mais elle est probablement liée au changement de pression osmotique à l'intérieur de la cellule. (3) Les QD-micelles sont stables *in vivo*. Après quatre jours de développement embryonnaire, il n'y a pas d'agrégation détectable de QD et leur fluorescence reste stable. (4) Les QD-micelles peuvent être introduits dans tous les types de cellules embryonnaires incluant celles des somites, les neurones et les axones (Figure 1F), l'ectoderme (Figure 1G), la crête neurale (Figure 1H) et l'endoderme (Figure 1I) sans ségrégation visible. (5) La fluorescence des QD peut être observée très tôt pendant le développement (Figure 1B) malgré la pigmentation et la fluorescence intrinsèque importante des cellules. Cela contraste avec le temps limité pendant lequel la GFP, un traceur classique, peut être détectée après l'injection de l'ARN ou de l'ADNc codant pour cette protéine, une fois qu'elle est exprimée à des niveaux détectables *in vivo*. (6) L'examen d'embryons au stade du têtard montre qu'il est possible de détecter la fluorescence émise par les QD-micelles même dans des régions ayant une fluorescence intrinsèque élevée comme les intestins de l'embryon (Figure 1I). (7) Les QD micelles résistent beaucoup mieux au photoblanchiment que les autres fluorophores *in vivo*. La Figure 2 compare le photoblanchiment de QD-micelles avec celui du dextran-rhodamine-vert (D-Rv). Les QD-micelles et le D-Rv ont été injectés au même moment dans des embryons au même stade de développement. Après 80 minutes d'illumination constante (à 450 nm) sous le microscope, l'intensité de la fluorescence des QD n'a pas changé alors que celle du D-Rv a été complètement éteinte par photoblanchiment. Des résultats similaires ont été obtenus en comparant la fluorescence des QD-micelles avec celle des GFP membranaires. Ces résultats, combinés à ceux présentés

réemment [4, 5] semblent ouvrir la voie à l'utilisation des QD comme marqueur fluorescent à la fois *in vitro* et *in vivo*. ♦

In vivo imaging using quantum dots

RÉFÉRENCES

- Murray CB, Norris DJ, Bawendi MG. Synthesis and characterization of nearly monodisperse Cde ($E = S, Se, Te$) semiconductor nanocrystallites. *J Am Chem Soc* 1993; 115: 8706-15.
- Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 1996; 271: 933-7.
- Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002; 298: 1759-62.
- Wu X, Liu H, Liu J, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 41-6.
- Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, Simon SM. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 47-51.
- Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998; 281: 2016-8.
- Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281: 2013-6.
- Dahan M, Laurence T, Pinaud F, et al. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Optics Lett* 2001; 26: 825-7.
- Johnsson M, Hansson P, Edwards K. Spherical micelles and other self-assembled structures in dilute aqueous mixtures of poly(ethylene glycol) lipids. *J Phys Chem* 2001; 105: 8420-30.

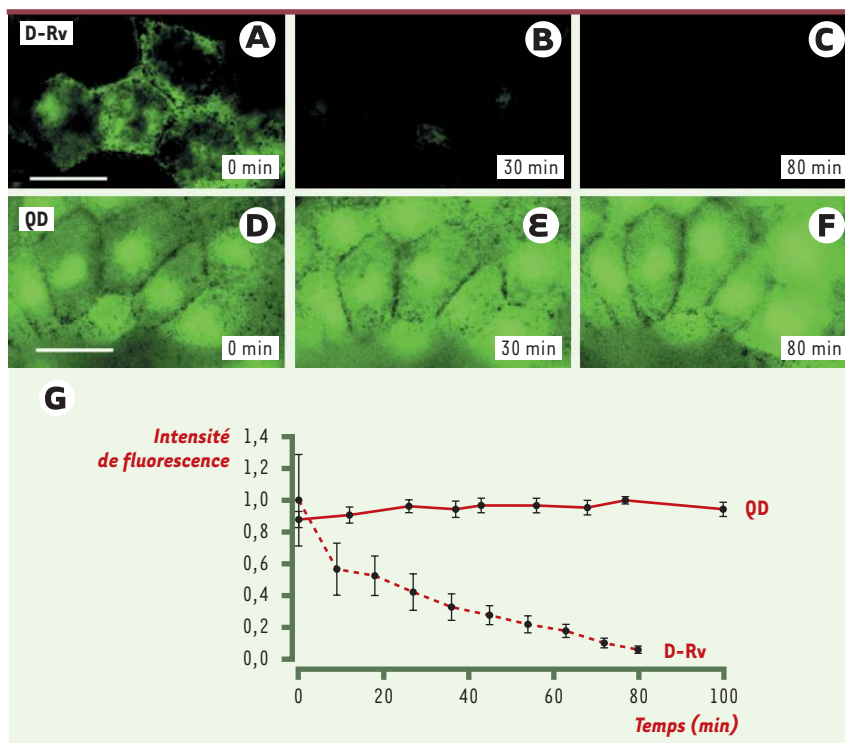


Figure 2. Comparaison *in vivo* de la résistance au photoblanchiment des QD et du dextran rhodamine vert (D-Rv). Les QD et les méthodes d'injection sont similaires à celles utilisées sur la Figure 1. Pour le D-Rv, 1 nl d'une solution à 25 mg/ml a été injecté. **A-C.** Images consécutives de blastomères injectés avec du D-Rv. **D-F.** Images consécutives de blastomères injectés avec des QD. Durant chaque expérience, les embryons sont éclairés continûment à 450 nm. **G.** Représentation graphique de la variation de l'intensité fluorescente d'une cellule de l'embryon injecté avec du D-Rv (pointillés rouges) ou injecté avec des QD (ligne rouge continue). Barre: 30 μ m. Le montage optique est similaire à celui décrit sur la Figure 1.