

Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Notions préliminaires.....	4
1.1 Diffusion de récepteurs synaptiques à la membrane de neurones.....	4
1.1.1 L'équilibre dynamique de la synapse.....	5
1.1.2 Sonder la mobilité de protéines.....	7
1.1.3 Stimulation neuronale et effet sur les propriétés de diffusion des récepteurs.....	7
1.2 Marquage de récepteurs uniques et imagerie des synapses.....	10
1.2.1 Imagerie de synapses à travers l'accumulation de protéines fluorescentes.....	11
1.2.2 Stratégies pour imager des récepteurs uniques.....	12
1.2.3 Utilisation de protéines hameçons et de cibles génétiquement modifiées pour lier spécifiquement la sonde à la cible.....	13
1.3 Biofonctionnalisation de nanocristaux fluorescents.....	16
1.3.1 Propriétés optiques et cristallines des QDs.....	17
1.3.2 Enrobage des QDs avec des molécules hydrophiles.....	19
1.3.3 Conjugaison de protéines hameçons pour marquer des récepteurs synaptiques.....	22
1.4 Objectifs du projet.....	24
Chapitre 2: Suivi de récepteurs synaptiques uniques.....	25
2.1 Matériel et méthodes.....	25
2.1.1 Transfert de gènes sur modèle de neurones en culture.....	25
2.1.2 Marquage des récepteurs avec des QDs fonctionnalisés.....	28
2.1.3 Imagerie.....	32
2.1.4 Reconstitution hyper-résolutive des trajectoires et identification des synapses.....	33
2.2 Analyse des résultats.....	37
2.2.1 Quantification du coefficient de diffusion et de la résidence synaptique.....	37
2.2.2 Comparaison de l'utilisation de QDs-SAV vs QDs-AB en condition contrôle.....	41
2.2.3 Effet de l'application d'un protocole de stimulation neuronale sur les dynamiques des récepteurs.....	49
2.3 Discussion sur le suivi de récepteurs synaptiques.....	59

2.3.1 Comparaison QDs-SAV et QDs-AB	59
2.3.2 Effet de la stimulation neuronale sur les dynamiques des récepteurs	62
2.3.3 Combiner des méthodes hyper-résolutives pour les trajectoires des récepteurs et la localisation des synapses	64
Chapitre 3: Biofonctionnalisation de points quantiques	66
3.1 Matériel et méthodes	66
3.1.1 Échanges de ligands	66
3.1.2 Conjugaison de la streptavidine (SAV)	72
3.1.3 Électrophorèse sur gel d'agarose	75
3.1.4 Marquage des cellules avec les QDs	77
3.2 Analyse des résultats	77
3.2.1 Biofonctionnalisation de QDs DHLA et PEG-DHLA	77
3.2.2 Biofonctionnalisation de QDs avec des peptides	82
3.3.3 Marquage d'échantillons biologiques	89
3.3 Discussion sur la biofonctionnalisation de QDs	96
3.3.1 Problème de spécificité des petites sondes fonctionnalisées pour marquer des neurones	96
3.3.2 Retour sur les techniques de biofonctionnalisation abordées	100
Conclusion	103
Bibliographie	107
ANNEXES	112
ANNEXE 1: Algorithmes pour la détection des QDs et des synapses	112
Annexe 1.1 : Corrélation d'un filtre gaussien pour la détection des QDs	112
Annexe 1.2 : Application d'un seuil adaptatif pour localiser les synapses	114
ANNEXE 2: préparation du PEG-DHLA à partir d'acide lipoïque et de amino-PEG ₄ -t-butyle-ester	116
ANNEXE 3 : Biofonctionnalisation de QDs-peptides enrobés de streptavidine (SAV)	125
Annexe 3.1 Échanges de ligands pour enrober les QDs de peptides	125
Annexe 3.2 Conjugaison de la streptavidine	129
ANNEXE 4 : Mesures au Zeta-sizer de diamètres hydrodynamiques de QDs commerciaux	132

Liste des tableaux

Tableau 1: Pourcentage de récepteurs synaptiques* par rapport au nombre de récepteurs total.....	48
Tableau 2: Tableau des réactifs pour la conjugaison de la streptavidine avec les QDs-DHLA.....	79
Tableau 3: Tableau des réactifs pour la conjugaison de la streptavidine avec les QDs PEG-DHLA.....	81
Tableau 4: Description des différents échantillons de QDs cœur-coquille enrobés de peptides	86

Liste des figures

Figure 1 : Récepteurs immobilisés à la synapse	6
Figure 2 : Comparaison des sondes commerciales utilisées pour marquer des récepteurs synaptiques.....	15
Figure 3 : Propriétés optiques d'émission et d'absorption de QDs en fonction de la composition et de la taille des nanocristaux	19
Figure 4 : Molécules hydrophiles utilisées pour la solubilisation des QDs.....	21
Figure 5 : Augmentation de la taille des QDs lors des étapes de bio fonctionnalisation.....	23
Figure 6 : Expression d'un marqueur synaptique fluorescent et de récepteurs avec l'étiquette HA.....	27
Figure 7 : Expression d'un marqueur synaptique fluorescent et de récepteurs biotinylisés	28
Figure 8 : Marquage des cellules en utilisant un micro-injecteur	30
Figure 9 : Contrôle de la spécificité du marquage par la colocalisation du signal de la GFP et du signal de QDs	31
Figure 10 : Filtre gaussien pour la localisation des PSF de QDs uniques	34
Figure 11 : Seuillage des synapses et superposition des trajectoires reconstituées	36
Figure 12 : Dilatation des synapses et fractionnement de la trajectoire	38
Figure 13 : Paramètres de pénétration synaptique	40
Figure 14: Pointages synaptiques des récepteurs en fonction du type de marquage	42
Figure 15: Coefficients de diffusion des récepteurs en fonction du type de marquage	44
Figure 16: Histogrammes des coefficients de diffusion synaptiques des récepteurs QDs-SAV.....	45
Figure 17 : Évolution dans le temps de la fraction de récepteurs immobilisée	46
Figure 18: Effet du protocole de stimulation neuronale sur les pointages synaptiques.....	51

Figure 19 : Effet du protocole de stimulation sur les coefficients de diffusion des récepteurs marqués avec des QDs-AB	52
Figure 20 : Effet du protocole de stimulation sur la fraction immobile synaptique des récepteurs-QDs-AB.....	53
Figure 21: Temps de résidences synaptiques pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB	55
Figure 22 : Comparaison des paramètres de pénétration synaptique pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB	57
Figure 23: Réduction de l'acide lipoïque en acide dihydrolipoïque	67
Figure 24 : Préparation du PEG-DHLA avec l'acide lipoïque et l' amino-PEG ₄ -t-butyle ester	69
Figure 25: Utilisation du SMCC pour lier la streptavidine aux QDs-peptides	72
Figure 26: Agrégation d'échantillons de QDs-DHLA conjugués à la streptavidine	79
Figure 27: Migration des QDs PEG-DHLA conjugués à la SAV en utilisant de l'EDC.....	81
Figure 28 : Gel pour isoler les QDs selon le nombre de protéines attaché	84
Figure 29 : Migration sur gel des différents échantillons de QDs enrobés de peptides.	86
Figure 30: Gel de QDs CdSe/CdS/Cd _{0,5} Zn _{0,5} S/ZnS couplés à la streptavidine	89
Figure 31 : Liaisons non spécifiques des QDs PEG-DHLA sur les neurones en culture	91
Figure 32: Liaisons non spécifiques des QDs-peptides sur les neurones en culture	93
Figure 33 : Marquage spécifique de récepteurs sur cellules HeLa avec des QDs-polymères	94
Figure 34: Liaisons non spécifiques des QDs-polymères sur les neurones en culture	95
Figure 35 : Ligands amphiphiles composés d'un thiol, d'un alcane de 11 carbones et d'un PEG ₄	99

Liste des abréviations

Abréviations	Définitions
Alexa	Fluorophore synthétique commercialisé par <i>Invitrogen</i>
Atto	Fluorophore synthétique commercialisé par <i>Sigma-Aldrich</i>
CaMKII	Protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline dépendante
CdS	Sulfure de cadmium
CdSe	Séléniure de cadmium
DHLA	Acide dihydrolipoïque
EDC	1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
GFP	Protéine fluorescente verte
Homer	Protéine spécifique qui s'accumule aux synapses
NHS	N-hydroxysulfo-succinimide
PEG	Polyéthylène glycol
QDs	Points quantiques
QDs-SAV	Points quantiques enrobés de streptavidine
QDs-AB	Points quantiques enrobés d'anticorps
SMCC	Succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate
SAV	Streptavidine
Stargazin	Protéine spécifique impliquée dans la signalisation cellulaire
TOPO	Trioctylphosphine
ZnS	Sulfure de zinc

Introduction

Historiquement, les domaines de l'optique, la chimie et la biologie cellulaire ont été étroitement liés à travers le développement de la microscopie. L'élaboration et l'amélioration d'outils permettant d'accéder au tout petit ont permis de révéler l'existence de la cellule et de ses microstructures. La découverte et l'utilisation d'agents de contrastes ont pour leur part offert un regard plus net sur ces structures. Par la suite, l'utilisation de la fluorescence et les avancés spectaculaires en génie génétique ont ouvert la voie à de nombreuses études où le contraste entre quelques populations précises de molécules et tout l'environnement cellulaire est rendu possible par le jeu des couleurs.

Plus récemment, l'arrivée de caméras ultra-sensibles, le développement de sondes très brillantes et l'utilisation de lasers ont permis, selon différentes approches, la localisation de molécules fluorescentes uniques à un très haut taux de répétition [1,2]. Ces développements techniques ont deux incidences pratiques. Premièrement, le fait de détecter une source de lumière ponctuelle et de projeter son image sur de multiples pixels permet la localisation de cette source avec une précision dépassant la limite de diffraction de la lumière. Deuxièmement, en acquérant la position d'une molécule rapidement, il est possible de suivre ses dynamiques.

Ces deux caractéristiques ont été mises à profit pour étudier la diffusion de protéines uniques à la membrane cellulaire de neurones avec une résolution spatiale de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres [1,2]. Ces études ont confirmé un concept émergent en biologie, à savoir que la membrane cellulaire est un environnement très dynamique. Qui plus est, cette membrane étant «compartmentalisée», la diffusion latérale des protéines joue un rôle important dans la localisation et l'ajustement des populations aux compartiments clés où elles doivent effectuer leurs fonctions. En étiquetant des récepteurs synaptiques (protéines membranaires) avec des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (points quantiques : QDs), il a pu être observé de nombreux échanges spatiaux entre les synapses (compartiments) et le reste du neurone pour un même récepteur, et ce puisque les QDs sont des sondes très brillantes qu'il est possible d'imager sur de longues périodes.

Ce sont des qualités qui font du QD un marqueur fluorescent très performant pour le suivi de molécules uniques. Par rapport aux fluorophores organiques, qui n'émettent de la fluorescence que sur une courte période avant de s'éteindre (photoblanchiment) et dont la détection au niveau de la molécule unique nécessite l'utilisation de lasers excitateurs, les QDs permettent d'imager leurs cibles beaucoup plus longtemps en requérant un dépôt d'énergie excitatrice inférieur sur le tissu cellulaire. Cependant, leur taille (de 25 à 40 nm pour les QDs commerciaux fonctionnalisés) représente un inconvénient majeur en ce qui concerne leur accessibilité dans des compartiments cellulaires spatialement restrictifs.

C'est principalement le cas de la synapse, qui est une jonction de communication entre deux neurones. Cette jonction est un environnement très dense, et la fente synaptique, dans laquelle peut pénétrer le QD attaché à la protéine membranaire à partir de l'extérieur d'un de ces deux neurones (milieu extracellulaire), est très mince (environ 20 nm [3]).

Un autre inconvénient associé à l'utilisation de QDs pour le marquage de protéines membranaires est lié à leur multivalence. Le fait qu'une même sonde puisse lier deux protéines peut être problématique pour l'étude de la diffusion de molécules uniques, et les nanocristaux commerciaux utilisés en biologie sont tous munis de multiples sites de liaisons. Il est possible de s'affranchir de ce problème en couplant les QDs à un hameçon intermédiaire. Cela peut être fait en utilisant, par exemple, des nanocristaux enrobés d'anticorps secondaires qui se lient à des anticorps primaires (ce sont ces derniers qui reconnaissent la cible) selon la stoechiométrie adéquate. Cette stratégie limite considérablement les risques de liaisons multiples, mais au prix de l'augmentation de la taille de la sonde.

Bien que de multiples efforts aient été déployés pour le design de petits (≈ 15 nm de diamètre) QDs monovalents [4,5], aucune étude poussée n'a encore comparé l'utilisation de telles sondes à celle de QDs commerciaux pour le suivi de protéines uniques diffusant au travers de synapses. De plus, on en connaît encore peu sur le biais réel que la multivalence des QDs peut introduire dans de telles expériences. Le travail présenté dans cet ouvrage a donc été poussé par le désir d'acquérir l'expertise permettant la préparation de petits

nanocristaux biofonctionnalisés (idéalement monovalents) et de systématiquement tester et comparer ces sondes dans des expériences étudiant la diffusion membranaire de neurones.

L'objectif général du projet est de comprendre en quoi l'information issue de trajectoires de récepteurs uniques diffusants à la membrane de neurones permet de sonder les mécanismes de recrutement et d'ajustement des populations de récepteurs aux synapses. Au niveau expérimental, l'objectif est de pouvoir imager des cultures de neurones vivants en utilisant différentes couleurs de fluorescence pour obtenir (1) un contraste des synapses et (2) un contraste des PSF de QDs uniques attachés à des récepteurs synaptiques. En parallèle, il faut maîtriser différentes techniques d'échange de ligands, de purifications, et de conjugaison de protéines pour tester de nouvelles approches de biofonctionnalisation de QDs. Finalement, il est important d'analyser le comportement des récepteurs marqués avec différents types de sonde, et tenter d'évaluer comment la taille, la valence et le niveau d'interactions non spécifiques des QDs biaisent ou non la représentativité biologique de l'échantillon de trajectoires. Les notions de base pour atteindre ces objectifs sont présentées au chapitre 1.

Au chapitre 2, les trajectoires de récepteurs synaptiques uniques échangeant entre les synapses et le reste de la membrane sont comparées selon différentes stratégies de marquage utilisant des QDs commerciaux déjà fonctionnalisés, de tailles variables et ayant différents degrés de multivalence. Dans cette étude, l'accent est porté sur l'accessibilité aux synapses des récepteurs marqués ainsi que sur leurs propriétés de diffusion à l'intérieur et à l'extérieur des synapses.

Au chapitre 3, nous présentons diverses techniques pour fonctionnaliser des QDs plus petits que les QDs commerciaux et pour contrôler la valence de ces QDs. Nous avons adressé ces QDs contre des récepteurs synaptiques et vérifié leur spécificité. Malheureusement, ces QDs lient sans distinctions la cible d'intérêt ainsi que de nombreux sites indésirables sur les échantillons de neurones, alors qu'ils sont suffisamment spécifiques sur d'autres types de cellules [5,6]. Pour ces raisons, il a été impossible d'étudier la diffusion membranaire de cibles spécifiques avec ces QDs.

Chapitre 1 : Notions préliminaires

Dans ce chapitre, nous abordons les notions de base associées au projet. La première partie introduit le rôle joué par les récepteurs synaptiques pour assurer la communication entre les neurones. De plus, il est question des avantages associés au suivi des dynamiques de récepteurs uniques pour mieux comprendre les mécanismes d'ajustement de leurs populations aux synapses. Par la suite, nous mettons l'accent sur les techniques d'imagerie par fluorescence pour (1) obtenir une image contrastée des synapses et (2) obtenir un marquage, en utilisant des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (QDs), qui est spécifique aux récepteurs à la membrane de neurones. Finalement, il est question des caractéristiques physiques et optiques des QDs ainsi que des modifications de chimie de surface que l'on peut effectuer pour transformer des QDs hydrophobes en sondes fonctionnalisées.

1.1 Diffusion de récepteurs synaptiques à la membrane de neurones

La communication entre neurones se fait aux synapses par le biais de signaux chimiques. La jonction qu'est la synapse est constituée d'une partie présynaptique associée à l'axone d'un premier neurone ainsi que d'une partie postsynaptique appartenant à la dendrite d'un autre neurone. Lorsqu'un premier neurone est animé par un potentiel d'action (vague ionique qui se propage du corps cellulaire jusqu'au bout de l'axone), il y a relâchement, à partir des boutons présynaptiques associés à ce neurone, de neurotransmetteurs. Ces neurotransmetteurs en circulation libre peuvent se lier à un type précis de protéines membranaires qui peuplent les dendrites des neurones connectés, engendrant ainsi l'activation de ces protéines appelées récepteurs synaptiques. En s'activant, les récepteurs permettent à la membrane cellulaire des neurones sollicités d'être perméables aux mouvements d'ions, ce qui engendre une dépolarisation locale de la cellule qui peut mener à la propagation de nouveaux potentiels d'actions.

On retrouve plusieurs types de récepteurs synaptiques, dont l'accumulation à la synapse résulte en l'organisation de microdomaines fonctionnels [7]. Ces domaines coïncident spatialement avec la densité postsynaptique (PSD), qui est une région riche en protéines qui fait face au bouton présynaptique [8]. L'efficacité des transmissions synaptiques dépend donc fortement du nombre de récepteurs à la synapse ainsi qu'à leur organisation à proximité des sites de relâchement de neurotransmetteurs.

1.1.1 L'équilibre dynamique de la synapse

Le développement de nouvelles synapses et le changement de la sensibilité d'une synapse aux potentiels d'action qui la sollicitent (plasticité synaptique) engendrent généralement une phase d'augmentation ou de diminution du nombre de récepteurs à la synapse. À l'état de stabilité de la synapse cependant, les populations de récepteurs sont relativement stables, et on a longtemps cru qu'ils formaient des amas figés. En fait, cette vision est en partie erronée, car une proportion importante des récepteurs à la membrane est en tout temps très mobile. On a ainsi démontré que les récepteurs diffusent parallèlement à la membrane entre les régions synaptiques et extra-synaptiques [1,2], et que le réservoir de récepteurs diffusant à la membrane est constamment recyclé par endocytose et exocytose. L'idée selon laquelle les récepteurs sont stabilisés à la synapse sur de longues périodes a donc progressivement laissé la place à un modèle d'équilibre dynamique: la synapse est constituée de populations de récepteurs mobiles et immobiles, les récepteurs mobiles pouvant quitter la synapse ou être stabilisés sur des périodes allant de la seconde à l'heure [9].

Pour expliquer la stabilisation des récepteurs aux synapses et l'organisation de familles de récepteurs en microdomaines, un modèle de diffusion-trappes a été introduit [7]. Il propose que le recrutement des récepteurs soit en partie assuré par les interactions transitoires entre les récepteurs diffusants dans la membrane et des protéines d'hameçonnages présentes dans la PSD. On a ainsi souligné l'importance des interactions moléculaires entre différents types de récepteurs et une ou plusieurs protéines localisées à la PSD, comme la liaison entre le récepteur sensible à la glycine (GlyR) et la gephyrin [10], ou l'interaction entre le complexe formé par le récepteur au glutamate de type AMPA (AMPA) et la Stargazin avec PSD-95 [11] (figure 1).

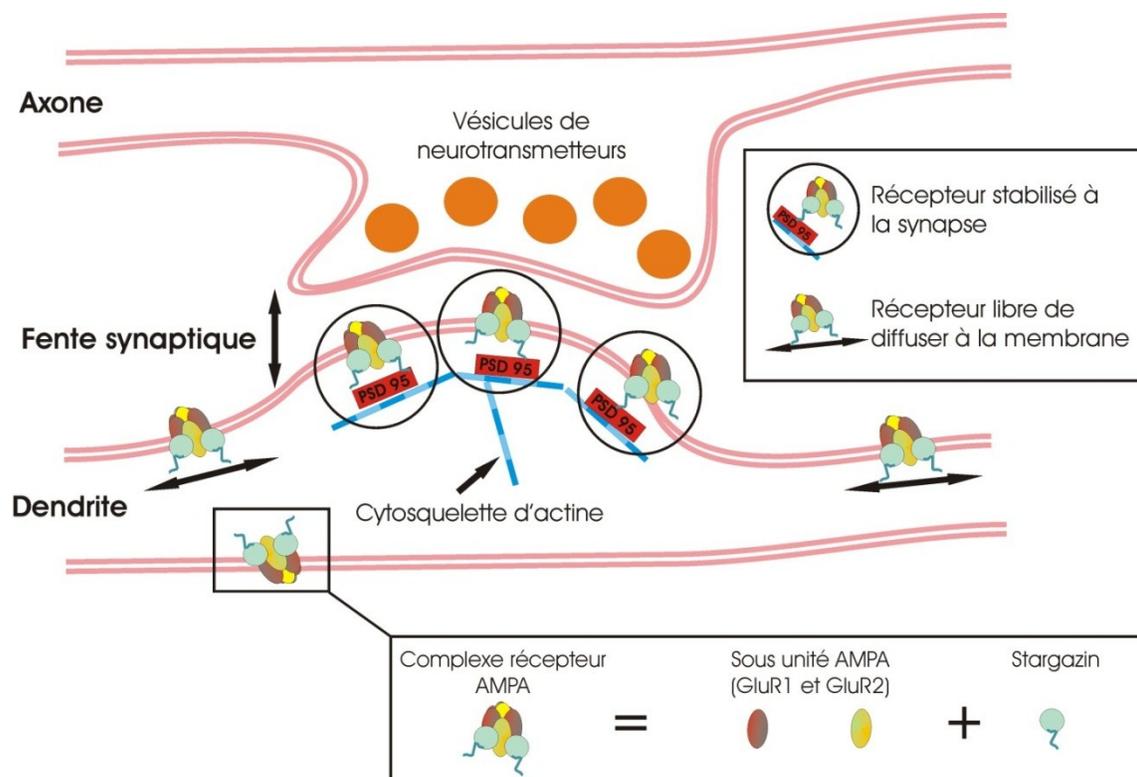


Figure 1 : Récepteurs immobilisés à la synapse

Schéma de récepteurs synaptiques diffusants à la membrane ou immobilisés à la synapse. Exemple d'immobilisation entre un échafaudage moléculaire lié au cytosquelette et le récepteur. L'immobilisation des récepteurs AMPA implique l'interaction entre la protéine d'échafaudage PSD95 et une protéine intermédiaire, la Stargazin.

La probabilité qu'un récepteur diffusant dans la synapse soit recruté et stabilisé par une protéine d'hameçonnage dépend principalement (1) du nombre de sites de liaisons disponibles, (2) du nombre de récepteurs diffusant dans la synapse ainsi que de (3) la vitesse de diffusion de ces récepteurs. Le nombre de récepteurs diffusant à la synapse est régulé par les taux d'entrées et de sorties des récepteurs dans la synapse. Bien que l'endocytose et l'exocytose de récepteurs à la membrane soient des mécanismes essentiels au recyclage de récepteurs, à ce jour aucune étude n'a souligné l'apparition d'exocytose/endocytose directement à la synapse. Ces phénomènes sont plutôt localisés à la périphérie extra-synaptique ou ailleurs dans la dendrite [12,13], proposant ainsi que la diffusion membranaire des récepteurs entre les compartiments synaptiques et extra-synaptiques occupe un rôle fondamental dans la régulation du nombre de récepteurs à la synapse. Porter un regard sur les dynamiques des récepteurs permet donc d'adresser des

questions intéressantes sur les mécanismes menant aux ajustements de populations de récepteurs à la synapse.

1.1.2 Sonder la mobilité de protéines

Pour étudier les dynamiques des récepteurs synaptiques, plusieurs stratégies ont été développées. Certaines se concentrent sur la mobilité moyenne de populations de multiples récepteurs, comme la récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) [14] ou la spectroscopie par corrélation de fluorescence [15]. Ces techniques, qui présentent l'avantage d'évaluer instantanément la mobilité de larges populations, offrent d'un seul coup une vue globale de cette mobilité. Cependant, le comportement individuel de chaque molécule est inaccessible, car le signal de fluorescence recueilli correspond à la superposition de plusieurs centaines de sources confondues.

Le développement de caméras ultra-sensible et de nano sondes très brillantes a permis, plus récemment, de suivre la trajectoire de molécules uniques. Bien qu'il faille recenser les dynamiques de plusieurs dizaines à quelques centaines de molécules individuelles avant de pouvoir conclure quoi que ce soit sur les mécanismes à l'étude, cette approche permet de visualiser les différents types de dynamiques d'une même population de molécules. Pour les populations de récepteurs diffusant à l'extérieur et à l'intérieur de la synapse, il a été possible de distinguer des individus plus lents et d'autres plus rapides. À la synapse, on a remarqué des récepteurs immobilisés sur de longues périodes, d'autres plus libres de diffuser et certains, subissant des périodes d'immobilisations plus courtes et échangeant à plusieurs reprises entre les compartiments cellulaires, qui visitaient plus d'une fois une même synapse [10].

1.1.3 Stimulation neuronale et effet sur les propriétés de diffusion des récepteurs

Il a été observé que la stimulation d'un neurone, c'est-à-dire l'apparition ou la succession de potentiels d'actions à travers ce dernier, peut engendrer un changement de la sensibilité de ses synapses [3]. Ces changements peuvent être d'ordre présynaptique (par exemple, une variation des doses de neurotransmetteurs libérées à la suite de la propagation d'un

potentiel d'action) ou d'ordre postsynaptique (par exemple, un changement du nombre de récepteurs à la membrane pouvant traduire l'arrivée de neurotransmetteurs en perméabilité ionique plus ou moins importante). Plusieurs évidences suggèrent que cette plasticité synaptique dépendante de l'activité neuronale est essentielle au bon fonctionnement de l'apprentissage et la mémoire.

L'intérêt sera ici porté sur la plasticité postsynaptique, plus précisément sur les changements au niveau de la diffusion membranaire des récepteurs qui favorisent une augmentation de leur population à la synapse.

Pour stimuler un neurone ou une population de neurones, plusieurs options sont envisageables. Il est par exemple possible de cibler un neurone en particulier en y introduisant une électrode qui peut imposer des potentiels électriques variables au milieu intracellulaire de ce neurone. De manière moins invasive, une autre possibilité consiste à jouer avec les solutions salines d'imagerie et d'exciter une culture de neurones en la faisant baigner dans une solution déséquilibrée en ions et en ligands. C'est cette dernière option qui a été utilisée dans notre protocole expérimental. Plus précisément, nous avons utilisé une solution saline contenant de la glycine (molécule qui active une population précise de récepteurs au glutamate, les récepteurs NMDA) et ne contenant pas de magnésium afin d'induire une potentialisation des synapses.

Au niveau du comportement de récepteurs uniques à la membrane, il a été observé qu'une plus grande proportion de récepteurs au glutamate de type AMPA (AMPA) était immobilisée à la synapse suivant l'application d'un bain stimulant [2,16]. La corrélation entre l'immobilisation accrue de récepteurs à la synapse et la potentialisation des synapses a été contrôlée de manière électrophysiologique [2,16,17,18]. En utilisant le génie génétique et des fusions entre un récepteur et une protéine fluorescente pH sensible (cette dernière n'est presque pas fluorescente à l'intérieur de la cellule), on a aussi confirmé optiquement que la stimulation chimique entraînait une augmentation du nombre de AMPAR à la synapse [16].

Cette dernière étude a démontré que l'immobilisation à la synapse des récepteurs nécessite l'activité normale de la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CaMKII) via la

phosphorylation d'un partenaire (Stargazin) impliquée dans l'hameçonnage de AMPAR à la synapse. Cela est cohérent avec le fait que les niveaux de concentration du calcium intracellulaire s'élèvent suite à la propagation de potentiels d'action. L'activité de la CaMKII étant dépendante de la présence de calcium, cette protéine peut traduire une variation ionique en relais de cascades biologiques.

Bien que l'hameçonnage de récepteurs à la synapse soit un mécanisme essentiel pour accumuler les récepteurs et en contrôler le nombre, d'autres interactions affectent la diffusion des récepteurs et participent à l'équilibre dynamique de la synapse. Des barrières formées par différentes protéines membranaires peuvent par exemple confiner des récepteurs libres de diffuser près des synapses et ainsi les obliger à passer plusieurs courtes périodes à la synapse, et ce même s'ils ne subissent aucune immobilisation soutenue. Des travaux ont montré que les zones d'endocytose qui sont à la périphérie de la PSD permettent de maintenir un réservoir de récepteurs synaptiques rapides. En empêchant ces zones d'adhérer près de la PSD, on se retrouve avec une plus grande proportion de récepteurs immobiles à la synapse, mais un nombre net de récepteurs inférieur [18]. Le même résultat de perte de récepteurs rapides est observé si l'on empêche AMPAR d'interagir avec la machinerie responsable de l'endocytose, avec les mêmes incidences sur le nombre de récepteurs à la synapse.

Toutes ces observations renforcent le concept d'une synapse très dynamique où le recyclage et l'apport constant de nouveaux récepteurs sont essentiels au fonctionnement normal et aux ajustements plastiques de cette dernière. Le piégeage plus actif et plus soutenu des récepteurs est le principal mécanisme qui permet une augmentation de leurs populations synaptiques en réponse à l'activité neuronale. Cependant, d'autres mécanismes, comme le confinement et le ralentissement de récepteurs libres aux frontières des synapses, favorisent un meilleur recrutement synaptique.

Pour toutes ces raisons, il est important d'analyser les dynamiques des récepteurs sous plusieurs angles. Il est possible d'obtenir les distributions des coefficients de diffusions et comparer, selon différentes conditions (avant ou sans l'application d'un protocole de stimulation chimique par exemple), si une plus ou moins grande proportion de récepteurs

est immobilisée à la synapse. Certains récepteurs ne sont toutefois pas immobilisés sur de suffisamment longues périodes, mais puisqu'ils reviennent souvent à la synapse, ils participent de manière non négligeable à la population synaptique malgré le fait qu'ils diffusent rapidement. Pour ces récepteurs, qui expérimentent parfois de nombreux courts séjours synaptiques, c'est la possibilité de suivre leurs mouvements membranaires sur une longue période qui permet de recenser leurs multiples passages à la synapse. Cette habileté permet d'extraire de l'information pertinente sur les temps de passage synaptique et sur le nombre de visites synaptiques par unité de temps. En comparaison aux autres sondes fluorescentes nanoscopiques, les QDs sont à ce jour les sondes les plus appropriées pour avoir accès à ces paramètres de pénétration synaptique, parce qu'ils sont photostables.

1.2 Marquage de récepteurs uniques et imagerie des synapses

Pour étudier la plasticité synaptique à travers la diffusion de récepteurs uniques à la membrane de neurones, il faut, en un premier temps, localiser la position des récepteurs à un haut taux de répétition. En deuxième lieu, il est essentiel de déterminer si ces récepteurs diffusent à l'intérieur ou à l'extérieur des synapses, donc d'obtenir une image contrastée entre les synapses et le reste de la membrane du neurone. Dans le premier cas, on cherche à étiqueter les récepteurs à très faible densité, de manière à imager des sources ponctuelles distinctes. Sur le détecteur, les dimensions des taches (PSF) associées à ces sources uniques sont limitées par la limite de diffraction de la lumière. En s'assurant que les PSF soient bien distinctes les unes des autres, il est possible de dériver mathématiquement, à partir du profil gaussien de chaque tache, les positions des cibles étiquetées avec une précision dépassant d'un ordre de grandeur la limite de diffraction de la lumière. En ce qui concerne l'imagerie des synapses, on tire profit de la force du nombre. C'est en étiquetant des milliers de protéines confondues qui s'accumulent prioritairement aux synapses que l'on obtient le contraste nécessaire à l'identification de ces dernières.

1.2.1 Imagerie de synapses à travers l'accumulation de protéines fluorescentes

On peut classer en deux catégories les options pour étiqueter des protéines avec un marqueur fluorescent. L'option qui vient peut-être le plus naturellement à l'esprit est celle qui consiste à attacher une molécule fluorescente sur la protéine après que celle-ci ait été produite. Pour se faire, on doit faire appel à un intermédiaire qui se lie spécifiquement à la population cible. Cependant, les «hameçons» utilisés pour la reconnaissance des protéines ciblées ne sont jamais parfaitement spécifiques, et leur insertion à l'intérieur de la cellule est pénible si l'on cherche à marquer des populations intracellulaires tout en gardant un neurone vivant et en santé.

L'autre catégorie d'étiquetage consiste à modifier le code d'ADN d'une protéine et à insérer une séquence telle que la cellule produit elle-même la molécule fluorescente attachée à la protéine. Pour ce faire, il faut insérer, par transfert de gènes, des milliers de copies de ce nouveau code dans notre échantillon de cellules. C'est la découverte de la protéine fluorescente verte (GFP) [19] qui a ouvert la voie à cette technique pour observer des populations de protéines. En isolant le code associé à la GFP et ainsi sa séquence en acides aminés, ces chercheurs ont ouvert la voie à toute une gamme de constructions génétiques qui codent la production de fusions entre un marqueur fluorescent génétiquement encodé et une protéine d'intérêt. Aujourd'hui, la gamme des marqueurs fluorescents génétiquement encodés est diversifiée en couleurs, allant du bleu au rouge, et en sensibilités, certaines versions étant sensibles au pH [20], ou d'autres, sensibles au rayonnement électromagnétique [21] (versions photo-convertibles).

Bien que le transfert de gènes (transfection) permette d'avoir la certitude que la source de fluorescence est bel et bien la protéine à l'étude, le fait de surexprimer une protéine, qui n'est normalement pas codée dans la cellule (protéine exogène), altère l'équilibre normal de cette cellule. Malgré tout, l'observation sous le microscope des neurones transfectés se fait de 1 à plusieurs jours après le dépôt de nouveau matériel génétique, ce qui signifie qu'ils ont survécu à ce dépôt et qu'ils sont viables malgré l'expression continue des protéines exogènes. Pour l'imagerie de neurones vivants, la transfection offre l'avantage de marquer des structures intracellulaires à travers l'accumulation progressive de molécules

directement produites par la cellule. La protéine Homer, qui fait partie de l'échafaudage stabilisateur à la densité postsynaptique (PSD), s'y accumule et permet d'obtenir un excellent contraste des synapses, lorsque fusionné à un fluorophore génétiquement encodé. C'est la construction Homer-GFP qui a été utilisée dans cette étude pour la localisation des synapses.

1.2.2 Stratégies pour imager des récepteurs uniques

Pour le suivi de molécules uniques, la transfection de protéines fluorescentes a longtemps été une technique inappropriée, puisqu'elle induit la production de milliers de sources confondues. Récemment, la conception de constructions photo-convertibles, qui ont, par exemple, la particularité de passer d'une émission verte à une émission rouge à la suite de leur activation optique dans le bleu-UV, a changé la donne. Pour un observateur équipé d'un filtre d'émission ne sélectionnant que le rouge, il est possible de faire allumer les protéines une par une en appliquant un flux lumineux activateur approprié [22]. Le principal problème avec ces fluorophores est qu'ils photoblanchissent très rapidement. Ainsi, si l'on considère le nombre maximum de photons qu'une telle molécule peut émettre et le nombre de photons minimum à récolter pour obtenir une PSF adéquate, on peut rarement imager ces protéines durant plus de 20 images consécutives. Pour observer un récepteur échanger à plusieurs reprises entre la synapse et son entourage, on doit échantillonner sa position sur une période totale de l'ordre des dizaines de secondes [10]. De son côté, la fréquence d'échantillonnage (20-40 Hz) est adaptée aux vitesses de diffusion des récepteurs, de telle sorte que le suivi approprié des récepteurs sur une période de 10 secondes requiert l'acquisition de quelques centaines d'images.

L'avantage de marquer des protéines membranaires, par rapport aux protéines intracellulaires, est qu'elles sont accessibles par l'extérieur de la cellule. Cela facilite de beaucoup l'attache d'un traceur synthétique, lequel peut présenter des performances de fluorescence supérieures à celles des protéines fluorescentes. C'est le cas des fluorophores organiques synthétiques (Atto, Alexa, CY,..), mais malgré le fait qu'ils puissent émettre de la lumière à une plus grande intensité sur une plus longue période, on peut rarement les utiliser pour suivre un récepteur avec une précision hyperrésolutive pour plus de 50 images.

Malgré leur taille supérieure, les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents ne sont pas affectés par le photoblanchiment, du moins pas à l'échelle du temps de survie d'un neurone sous le microscope. Cet avantage majeur fait en sorte que l'on peut suivre la diffusion membranaire d'un échantillon de protéines étiquetées individuellement sur de longues périodes. De plus, sur un même neurone, il est possible de répéter l'acquisition autant de fois que nécessaire, pour ainsi évaluer l'évolution des dynamiques du même échantillon de protéines dans le temps. On peut ainsi provoquer des réponses cellulaires à l'aide de drogue ou de bain stimulant et comparer la diffusion des mêmes récepteurs avant et après l'application de tels protocoles.

1.2.3 Utilisation de protéines hameçons et de cibles génétiquement modifiées pour lier spécifiquement la sonde à la cible

Afin d'étiqueter une protéine à la membrane à partir de l'extérieur de la cellule, il faut avoir un complexe sonde-hameçon qui vient lier spécifiquement un segment extracellulaire de la protéine. Les anticorps (AB) sont sans contredit le type de molécule intermédiaire liant la sonde à la cible le plus répandu pour le suivi de molécules uniques. Par exemple, les premières démonstrations de récepteurs synaptiques diffusants à la membrane de neurones ont été réalisées en utilisant des microbilles de latex enrobées d'AB dirigés contre les récepteurs (2002) [23]. La taille de ces microbilles empêchant les récepteurs d'atteindre la synapse, on a par la suite raffiné la technique de suivi de récepteurs uniques en utilisant des AB couplés à un ou quelques fluorophores organiques (2003) [24], ou encore des QDs enrobés d'AB (2003) [1,2].

La qualité et surtout la spécificité des anticorps varient beaucoup d'un anticorps à l'autre, et donc certains anticorps, qui lient sans problème l'antigène qui leur est associé, ont la désagréable propension à lier d'autres cibles. Il y a aussi le problème de la disponibilité commerciale des anticorps, ce qui fait en sorte que, parfois, pour une cible donnée, il faille développer soi-même son propre anticorps. Ces difficultés ont ouvert la voie à l'utilisation du génie génétique pour équiper les cibles d'une étiquette facilement reconnaissable par des anticorps robustes et répandus. Il suffit de connaître le code génétique de la protéine que l'on veut étiqueter et d'y ajouter le code associé aux acides aminés de l'étiquette. On peut

par exemple utiliser une GFP comme étiquette, ou encore une étiquette HA, qui sont des séquences d'acides aminés pour lesquelles il existe d'excellents anticorps. Pour le suivi de protéines membranaires, cette étiquette doit être exposée au milieu extracellulaire, ce qui doit être pris en compte lors du design génétique.

Les échantillons biologiques sont composés d'une très grande variété de molécules, et retrouver une cible précise au travers de toute cette complexité est un défi de taille. Il n'est donc pas étonnant de faire appel à dame nature pour se procurer des hameçons spécifiques, comme pour le cas des anticorps, dont la fonction normale est de retrouver et lier l'antigène au travers du tissu biologique. C'est aussi dans la nature que l'on retrouve la molécule qui lie sa cible avec la plus grande affinité répertoriée pour les liens non covalents : la streptavidine (SAV). Cette protéine, qui a été isolée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*, présente 4 sites de liaison pour la biotine [25], qui est une vitamine nécessaire à la croissance cellulaire. En plus de créer un lien fort avec la biotine, ce lien est très spécifique, ce qui fait de la SAV le parfait candidat pour agir d'intermédiaire entre un QD et un récepteur synaptique.

Puisque la biotine est une vitamine et non une séquence d'acides aminés, on ne peut modifier génétiquement un récepteur pour que ce dernier soit produit avec l'étiquette. Il est cependant possible de fusionner au récepteur une petite séquence de 15 acides aminés, appelée *biotin acceptor peptide* (BAP), sur laquelle peut se greffer une biotine libre via l'activité de la biotine ligase [26]. Dans les neurones, il n'y a pas de protéines présentant le BAP, de telle sorte que seuls les récepteurs exogènes offriront une biotine comme cible. Le greffage de la biotine sur le BAP se faisant à l'intérieur de la cellule avant l'acheminement des protéines à la membrane, cette technique est équivalente à celle de récepteurs exogènes produits directement avec une étiquette spécifique, à la différence près qu'il faille transférer un plasmide de plus, celui de la biotine ligase, puisque les neurones n'expriment pas cette ligase normalement. Une fois de plus, pour ce qui est de la conception génétique du récepteur exogène, le BAP doit être inséré à un endroit stratégique afin que la biotine greffée soit disponible à partir de l'extérieur de la cellule.

Dans ce projet, deux stratégies de marquage, utilisant respectivement des QDs enrobés d'anticorps (dirigés contre l'étiquette HA) et de SAV, ont été comparées pour étudier les dynamiques de récepteurs synaptiques exogènes diffusants à la membrane de neurones. Ces QDs sont produits par des fournisseurs commerciaux, et ils sont toujours fonctionnalisés avec plusieurs protéines par QD. Pour l'instant, il n'est pas possible d'acheter des QDs enrobés d'anticorps anti-HA, de telle sorte qu'il faille incubier l'anticorps primaire avec des QDs recouverts d'anticorps secondaires. En contrôlant le ratio de cette incubation, il est possible de se retrouver avec une majorité de sondes monovalentes, mais bien sûr, le fait d'avoir un échafaudage d'anticorps augmente sensiblement la taille de la sonde. En contrepartie, les QDs SAV sont utilisés tel qu'on les reçoit, ce qui en fait une sonde plus compacte, mais multivalente (figure 2).

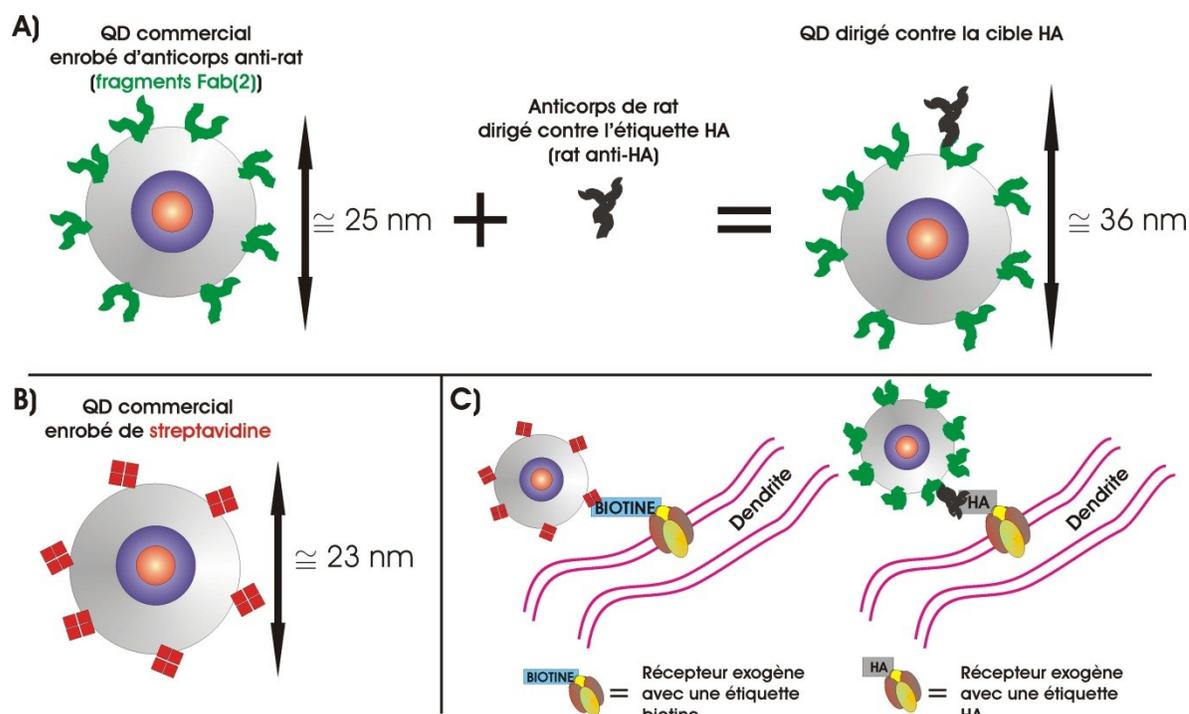


Figure 2 : Comparaison des sondes commerciales utilisées pour marquer des récepteurs synaptiques

A) QD enrobé d'anticorps secondaires. Ces QDs sont multivalents, mais en les incubant avec la quantité appropriée d'anticorps primaires (ceux qui se lie à la cible), la majorité des QDs sont monovalents (1 seul anticorps primaire par QD). **B)** QD enrobé de streptavidine. La sonde est multivalente, mais elle est plus compacte : diamètre d'environ 23 nm, contre 36 nm pour les QDs avec des anticorps primaires et secondaires (mesures au *Zeta-sizer*, voir annexe 4). **C)** Schéma des liaisons entre des récepteurs exogènes (nous utilisons le génie génétique pour exprimer ces cibles) et les différents QDs commerciaux qui ont été utilisés pour comparer les dynamiques des récepteurs en fonction du type de marquage utilisé.

1.3 Biofonctionnalisation de nanocristaux fluorescents

Les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (QDs, de l'anglais *quantum dots*) ont des propriétés optiques uniques, qui les distinguent des fluorophores synthétiques ou génétiquement encodés très répandus en microscopie de fluorescence. Parmi ces propriétés, nous notons un large spectre d'excitation et un étroit et symétrique spectre d'émission qui peut être centré entre 400 nm et 2000 nm selon les matériaux semi-conducteurs utilisés et la taille des nanocristaux [27]. Pour le suivi de molécules uniques, c'est principalement la photostabilité des QDs ainsi que leur brillance supérieure qui nous permettent de suivre les cibles sur de plus longues périodes, et ce avec une meilleure précision de localisation. Entre la synthèse des nanocristaux et leur utilisation en biologie, certaines étapes de modification de chimie de surface sont nécessaires. Malheureusement, ces dernières occasionnent inévitablement une augmentation de la taille des QDs, et elles mènent souvent à une diminution de leurs performances de fluorescence.

On peut considérer le QD en suspension colloïdale comme un hybride composé d'une partie centrale inorganique entourée d'une surface organique. Alors que l'intérieur cristallin est principalement responsable des propriétés optiques des QDs, la couche de molécules de surface, appelées ligands, permet surtout aux nanocristaux de se disperser dans des solvants dont la polarité est compatible avec celle de ces molécules. Puisque la majorité des protocoles de synthèse implique une croissance cristalline dans des solvants apolaires, les ligands qui entourent les QDs à leur sortie de la rampe de synthèse ne permettent pas à ces derniers d'être solubles en milieu aqueux. Une première étape d'échange de ces ligands ou d'encapsulation des QDs est donc nécessaire pour disperser les QDs dans un solvant polaire.

Ensuite, pour cibler les QDs contre une population précise de molécules, la surface des nanocristaux doit être équipée de groupes fonctionnels ayant l'habileté de lier spécifiquement la cible. Pour le suivi de récepteurs à la membrane de neurones, l'utilisation de protéines hameçons greffées de manière covalente à l'enrobage des QDs a déjà fait ses preuves [5,6]. C'est cette stratégie que nous avons retenue.

Après une brève introduction sur la nature cristalline des QDs, nous passerons en revue les différentes stratégies de solubilisation. Par la suite, nous mettrons l'accent sur les trois choix d'échanges de ligands que nous avons testés et sur les différentes options envisageables pour coupler l'extrémité libre de ces nouveaux ligands avec des protéines hameçons.

1.3.1 Propriétés optiques et cristallines des QDs

Une propriété unique des QDs est liée à la modification du spectre d'émission qui accompagne une variation de la taille des nanocristaux. Ce changement est dû à la diminution de l'écart entre les niveaux d'énergie qu'occasionne une augmentation de la taille des nanocristaux. En termes de longueurs d'onde, cela signifie que, pour un même matériau, la synthèse de nanocristaux plus gros entraîne un déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde moins énergétiques, donc plus rouges (voir figure 3A). On peut d'ailleurs contrôler la taille des nanocristaux en jouant sur la durée et la température de synthèse, ainsi que sur le type de ligands utilisés lors de la réaction [28].

Une caractéristique importante associée au petit nombre d'atomes qui forme le QD est leur rapport surface/volume élevé. Le grand nombre d'atomes de surface est stabilisé électroniquement par la formation de complexes avec les ligands. Cependant, la passivation avec les ligands n'est pas complète laissant des sites libres, ce qui favorise l'apparition de pièges pour les charges, qui agissent comme des voies de relaxation non radiatives et occasionnent ainsi une diminution du rendement quantique. Les QDs formés uniquement d'un cœur cristallin ont ainsi une fluorescence très sensible aux changements d'environnement, au choix de molécules de surface et à la photo-oxydation [29].

Pour améliorer le rendement quantique et assurer une meilleure photostabilité, il est possible de faire croître une coquille cristalline sur le cœur. Elle est aussi formée d'un matériau semi-conducteur, mais ayant une largeur de bande interdite supérieure à celle du cœur. La présence de cette coquille a comme fonction principale de confiner les porteurs de charge à l'intérieur du cœur, et ainsi d'éviter de capturer ces porteurs dans des pièges de surface. Il en résulte un QD avec un meilleur rendement quantique et qui est moins sensible

aux modifications de chimie de surface, modifications qui sont essentielles à la biofonctionnalisation des QDs.

Pour le choix du matériau, il faut certes considérer la largeur de la bande interdite, mais il faut aussi un paramètre de maille compatible avec celui du cœur. Des paramètres de maille qui ne sont pas égaux à ceux du cœur engendrent des contraintes, ce qui peut mener à des défauts dans les nanocristaux, et ainsi affecter leur rendement quantique. L'épaisseur de la coquille peut aussi être critique, car une coquille trop mince entraîne une mauvaise passivation du cœur, tandis qu'une coquille trop large introduit plus de contraintes, donc plus de défauts. Le premier exemple de QD cœur-coquille publié est celui des QDs composés de CdSe/ZnS [30]. Ce type de cœur/coquille a déjà fait l'objet de nombreuses optimisations, et c'est d'ailleurs le type de nanocristaux biofonctionnalisés commerciaux utilisés dans le cadre de ce travail. Il est aussi possible de synthétiser des nanocristaux avec de multiples coquilles, ce qui permet de trouver des combinaisons où les paramètres de maille s'adaptent progressivement et où le confinement des charges est très efficace. Il faut cependant garder à l'esprit que de telles stratégies augmentent de manière significative la taille des QDs.

En ce qui concerne le spectre d'excitation des QDs, leur probabilité d'absorption augmente avec l'énergie des photons excitateurs. Cela se traduit par un long spectre d'excitation débutant aux environs du pic d'émission du QD et qui croît dans la direction de l'UV (figure 3B). Cette tendance offre à l'expérimentateur une grande liberté pour le choix de la source d'illumination. Nous pouvons donc exciter les QDs avec une plage de longueurs d'onde très éloignée du spectre d'émission, ou même exciter plusieurs populations de QDs de différentes couleurs de fluorescence avec une même plage de longueurs d'onde.

Si l'on porte un regard sur la composition et la taille des QDs commerciaux fonctionnalisés qui ont été utilisés en neuroscience, on remarque que c'est l'enrobage hydrophile qui constitue la plus grande partie du diamètre. Nous avons donc concentré nos efforts sur le choix de cet enrobage afin de fonctionnaliser des QDs entre 10-20 nm, au lieu des 20-40 nm [32] qui caractérisent les sondes commerciales, alors que le diamètre du QD cœur-coquille au centre est de moins de 10 nm.

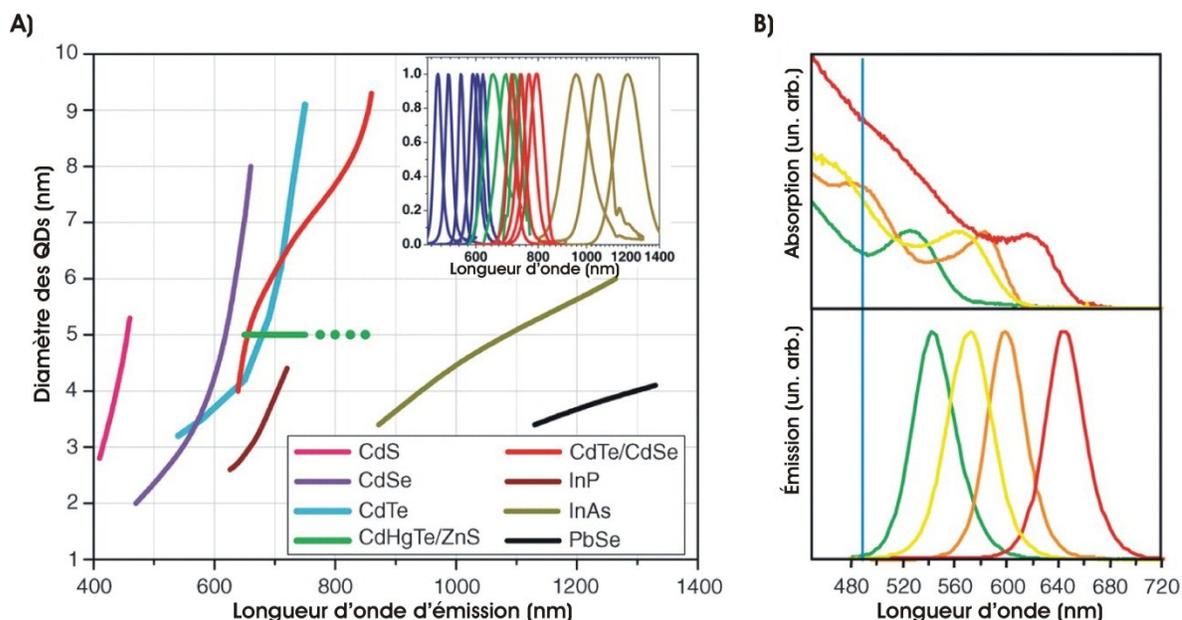


Figure 3 : Propriétés optiques d'émission et d'absorption de QDs en fonction de la composition et de la taille des nanocristaux

A) Longueur d'onde du pic d'émission en fonction du diamètre du QD et des matériaux semiconducteurs utilisés. En haut à droite, on voit différents spectres d'émission à titre d'exemple. La courbe du CdHgTe/ZnS a été extrapolée jusqu'au pic d'émission maximal obtenu pour cet alliage. B) Spectres d'absorption et d'émission pour des QDs de différentes tailles, mais tous composés de CdSe/ZnS. Une augmentation de la taille du cœur des QDs a pour effet d'augmenter la longueur d'onde d'émission. La ligne bleue représente la longueur d'onde d'émission à 488 nm du laser argon que l'on peut utiliser pour exciter les 4 populations de QDs en même temps. Figure tirée de [33].

1.3.2 Enrobage des QDs avec des molécules hydrophiles

On peut regrouper les stratégies de solubilisation des QDs en deux classes : celle où l'on échange les ligands de synthèse par de nouveaux ligands, et celle où l'on encapsule les QDs sans avoir à se débarrasser des ligands de synthèse [33]. Cette encapsulation se fait par le biais de molécules présentant un groupe apolaire, qui s'oriente de manière préférentielle vers les ligands hydrophobes du QD, et un groupe polaire, qui s'oriente vers l'environnement aqueux. Parmi les exemples d'encapsulation, on dénombre l'utilisation de polymères amphiphiles [34,35], ou encore la formation de micelles de phospholipides [36]. Bien que les techniques utilisant des polymères soient très efficaces pour bien passiver la surface des QDs, ils ont le défaut d'ajouter beaucoup de matériel autour des QDs.

Une voie très prometteuse consiste à former une coquille de silice autour du QD. On a ainsi réussi à encapsuler des QDs dans des coquilles de silice d'une épaisseur variant entre 1 nm et 5 nm [37]. Pour l'instant, les points quantiques subissent malheureusement une grande perte de rendement quantique lors de leur enrobage en silice [27,37]. De plus, les protocoles sont complexes et nécessitent une bonne expérience avec ce genre de chimie.

Les techniques qui consistent à échanger les ligands de surface pour de nouveaux ligands hydrophiles sont celles qui mènent aux enrobages les moins épais. Wenhao Liu *et al.* ont fonctionnalisé des QDs avec un diamètre hydrodynamique entre 10-15 nm [6] en utilisant un échange de ligands, comparativement aux 15-20 nm associés aux QDs en micelles de phospholipides [38]. Pour adhérer à la surface des QDs, on utilise la plupart du temps des molécules dont l'une des extrémités se lie par liens de coordination aux ions positifs des matériaux semi-conducteurs (Zn^{2+} dans le cas d'une coquille ZnS, et Cd^{2+} dans le cas d'une coquille CdS).

Pour ce faire, l'utilisation de groupements thiols (SH^+) est très répandue. Les monothiols sont labiles, *i.e.* ils sont instables sur la surface des QDs, et leur détachement progressif mène à l'agrégation des QDs. En utilisant des dithiols, comme on en retrouve dans l'acide dihydrolipoïque (DHHLA, figure 4A) [39], la stabilité des QDs est grandement améliorée. Certains acides aminés, comme les cystéines, sont munis de thiols. Ainsi, l'utilisation de peptides avec des séries de cystéines est une option qui mène à un lien très stable entre les peptides et les QDs [40] (voir figure 4C). Il est aussi possible d'utiliser des séquences peptidiques qui incluent une série d'histidines [41], mais le lien électrostatique réversible entre histidine et semi-conducteur occasionne des problèmes de stabilité colloïdale des QDs.

Pour assurer la solubilisation, le reste du ligand doit être suffisamment polaire. De plus, dans l'éventualité où nous voulons y greffer une protéine hameçon, ce ligand doit être muni d'au moins un groupement fonctionnel pour la conjugaison. Il est possible d'utiliser des molécules avec une extrémité libre chargée, comme l'acide carboxylique du DHHLA, qui assure ces deux fonctions à la fois. Cependant, la réactivité de ce type de groupement peut introduire des problèmes de spécificité pour la sonde fonctionnalisée. L'utilisation de

polyéthylène glycol (PEG) permet de réduire ces interactions non spécifiques [42], et il est possible d'intégrer le PEG entre les extrémités fonctionnelles du ligand (figure 4B). À elle seule, la chaîne d'éthylène glycol permet au QD enrobé d'être soluble dans l'eau, ce qui ouvre la porte à plus de flexibilité sur le choix du groupement fonctionnel [6]. Au chapitre 3 ainsi qu'en annexe, nous présentons les techniques d'échange de ligands pour solubiliser des QDs à partir (1) de DHLA et (2) d'un dérivé de cette molécule contenant un PEG, soit le PEG-DHLA. Le protocole de préparation du ligand à partir de PEG et d'acide lipoïque est aussi présenté en annexe.

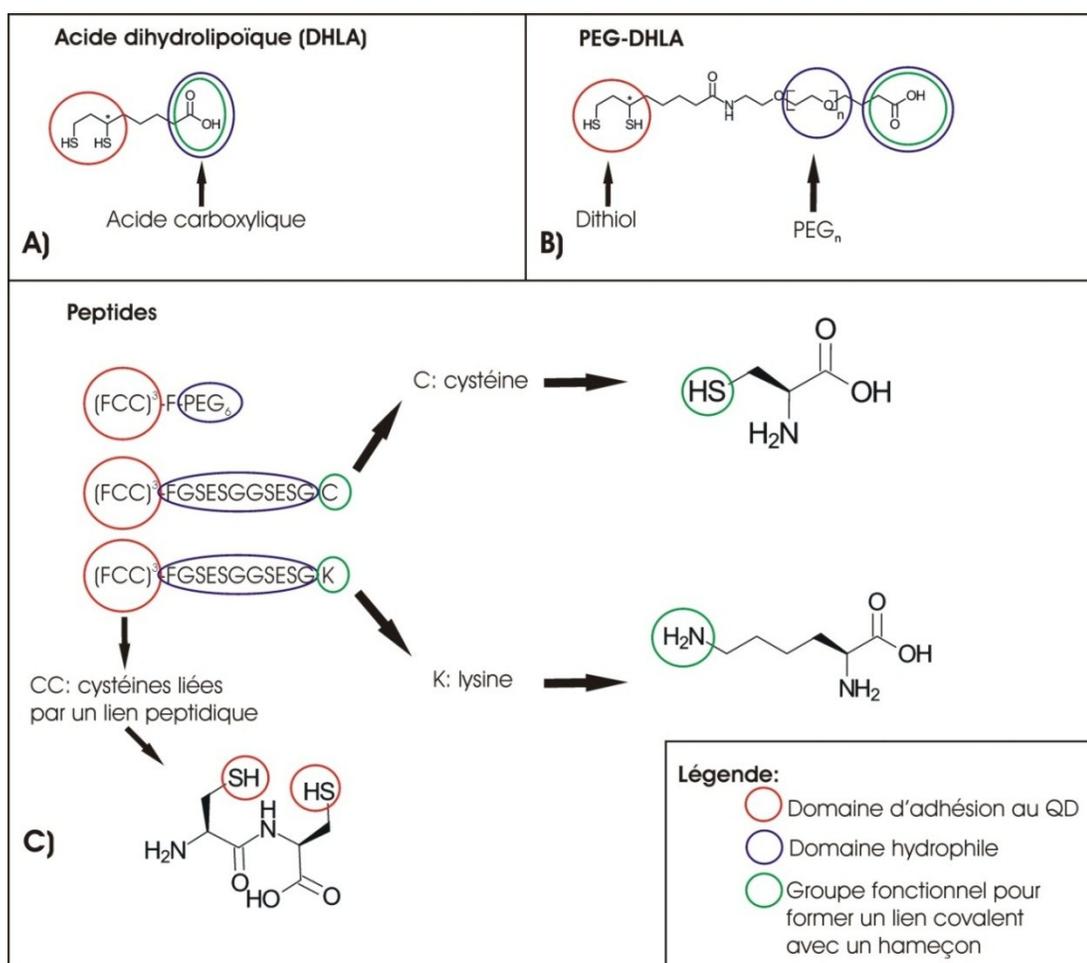


Figure 4 : Molécules hydrophiles utilisées pour la solubilisation des QDs

A) Acide dihydrolipoïque (DHLA) : les thiols forment des liens covalents avec les ions 2^+ du nanocristal, alors que le carboxyle rend le nanocristal hydrophile en plus de permettre la bioconjugaison de protéines hameçon. **B)** PEG-DHLA : l'ajout de n répétitions de PEG, où $n=4$, allonge la molécule d'environ 1.6 nm, et évite la formation de liaisons indésirables avec l'échantillon biologique. **C)** Peptides d'environ 20 acides aminés : en combinant 3 séquences peptidiques qui ont le même domaine d'adhésion aux nanocristaux, on peut combiner les attributs complémentaires de ces molécules.

1.3.3 Conjugaison de protéines hameçons pour marquer des récepteurs synaptiques

Pour la bioconjugaison de protéines à partir de la formation de liens covalents, les groupements visés pour la réaction sont souvent les carboxyles, les amines ou les thiols. Le choix de la chimie de conjugaison dépend principalement du type de groupement accessible sur la protéine et de la composition du ligand. Il est possible de former un lien direct entre la protéine et le ligand ou d'utiliser une molécule intermédiaire dont l'une des extrémités lie le ligand alors que l'autre lie la protéine.

Le point de départ, pour établir un protocole de biofonctionnalisation, est de choisir le type de protéine hameçon à conjuguer avec les QDs. Comme mentionné à la section 1.2.3, il est possible de lier spécifiquement des récepteurs synaptiques en utilisant des QDs enrobés d'anticorps ou de streptavidine (SAV). Pour fonctionnaliser des QDs ciblés contre des récepteurs endogènes, l'idéal est d'utiliser des anticorps. Cependant, les anticorps efficaces qui lient directement les cibles endogènes sont très rares. De plus, nous cherchons à contrôler facilement la spécificité des sondes fonctionnalisées. À cette fin, il est plus facile de cibler les QDs contre des cibles exogènes, car le génie génétique nous permet de colocaliser les cibles exogènes marquées avec des protéines fluorescentes d'une autre couleur, tel que décrit plus en détail à la section 2.1.2, figure 9.

Puisque nous sommes intéressés au marquage de cibles exogènes, l'utilisation de la SAV est un choix avantageux. En comparaison aux anticorps, la SAV est une protéine plus compacte ayant un poids moléculaire de 52KDa contre 150KDa pour les anticorps. De plus, lors de la bioconjugaison avec un QD, il est possible d'abîmer ou d'encombrer le site d'interaction de la protéine avec sa cible. La SAV présente 4 sites d'adhésion à la biotine contre 2 pour un anticorps, d'où les probabilités de conserver la fonctionnalité de l'hameçon après la conjugaison sont plus grandes. Finalement, en référence aux types d'enrobages utilisés avec DHLA, PEG-DHLA ou peptides, il existe déjà des exemples publiés de conjugaisons avec la SAV [5,6]. À la figure 5, nous présentons les augmentations de diamètre des QDs qu'occasionnent les étapes d'enrobage hydrophile et de conjugaison de streptavidine pour les différents types de QDs étudiés dans ce travail.

Pour conjuguer une protéine avec une espèce fluorescente, cette dernière doit généralement former des liens chimiques avec les acides aminés éloignés du centre actif et des sites d'adhésion de la protéine. Les amines primaires et les carboxyles terminaux, qui appartiennent aux acides aminés des extrémités de la séquence, sont souvent de bonnes cibles de conjugaison. La SAV est composée de 4 sous-unités, elle a donc 4 amines primaires et 4 carboxyles terminaux disponibles pour la conjugaison. Il est possible de conjuguer cette protéine par la formation d'un lien amide entre une de ses amines primaires et un carboxyle à la surface du QD: c'est la stratégie que nous avons retenue pour lier la SAV aux QDs enrobés de DHLA et de PEG-DHLA. Pour bioconjuguer la SAV avec les QDs enrobés de peptides, une molécule intermédiaire liant les amines de la SAV et les thiols des peptides a été utilisée.

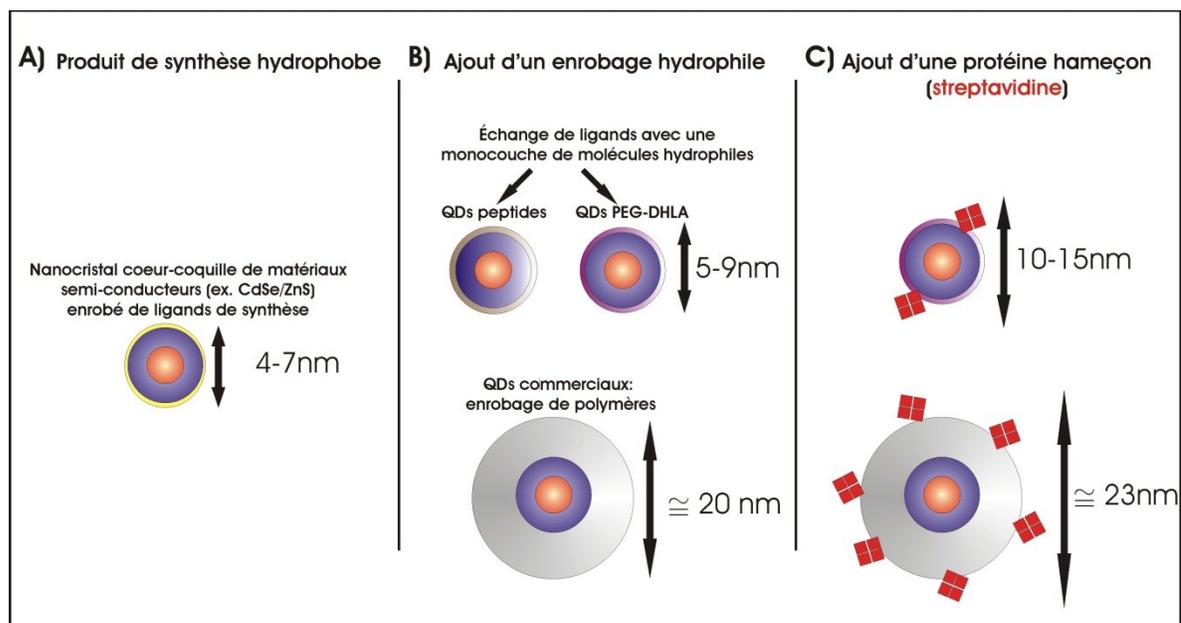


Figure 5 : Augmentation de la taille des QDs lors des étapes de biofonctionnalisation

A) Taille du QD directement après la synthèse. **B)** L'enrobage hydrophile avec des polymères est beaucoup plus épais qu'avec une monocouche de molécules. **C)** Le greffage d'une protéine hameçon augmente la taille de la sonde fonctionnalisée.

1.4 Objectifs du projet

Les deux objectifs principaux du projet sont (1) de valider l'utilisation de différents types de QDs fonctionnalisés pour marquer des récepteurs synaptiques à la membrane de neurones et (2) de comparer l'utilisation de ces sondes, selon leur spécificité, leur taille et leur valence, pour suivre les dynamiques des récepteurs. La motivation principale derrière cette étude est d'évaluer à quel point les récepteurs marqués avec des QDs ont accès à la fente synaptique, et de minimiser la taille des QDs pour optimiser cet accès.

Pour la biofonctionnalisation des QDs, le but est de tester différents échanges de ligands pour solubiliser des QDs de moins de 10 nm de diamètre, et différentes chimie de conjugaison pour greffer la streptavidine à la surface de ces QDs hydrophiles. Toutes les stratégies présentées ont en commun de solubiliser les QDs à partir d'une monocouche de ligands de surface. Pour ces molécules, la stabilité du ligand en fonction du groupement qui lie la surface du QD, l'efficacité de la passivation de la surface des QDs, la réactivité du groupement hydrophile, la réactivité du groupement réactif pour conjuguer une protéine hameçon et la qualité de la conjugaison en fonction du choix du groupement sont autant de sujets qui seront explorés

Pour déterminer si les différentes sondes testées sont adéquates pour marquer les récepteurs, il faut d'abord s'assurer de leur spécificité. Pour ce faire, une option est de cibler les QDs contre des récepteurs exogènes qui sont co-exprimés sur une minorité de neurones avec des protéines fluorescentes d'une autre couleur que celle de l'émission des QDs, et ainsi vérifier que les deux signaux colocalisent. En ce qui a trait à la comparaison des sondes spécifiques, le but est d'exécuter et d'analyser des expériences de suivi de récepteurs uniques sur des neurones en santé pendant plus de 20 minutes. L'interprétation de ces résultats permettra de faire des liens entre la pénétration synaptique des récepteurs liés aux QDs et l'évolution des dynamiques de ces récepteurs, avec ou sans l'application d'un protocole chimique de stimulation neuronale.

Chapitre 2: Suivi de récepteurs synaptiques uniques

L'expérience présentée dans ce chapitre cherche à évaluer si les dynamiques de récepteurs synaptiques diffusant entre les compartiments synaptiques et extra-synaptiques à la membrane de neurones sont affectées par le type de sonde avec lesquelles ils sont étiquetés. Pour ce faire, deux stratégies de marquage, utilisant respectivement des QDs enrobés d'anticorps (AB) et de streptavidines (SAV), sont comparées. La première section présente les protocoles de transfection des neurones et de marquage de ces derniers avec des QDs fonctionnalisés, ainsi que les méthodes d'acquisition et d'analyse de données permettant de quantifier la diffusion et la résidence synaptique des populations de récepteurs. Pour les résultats, on distingue les trajectoires reconstituées en 2 catégories, celles associées aux récepteurs n'ayant pénétré aucune synapse (trajectoires extra-synaptiques), et celles associées aux récepteurs ayant atteint la synapse (trajectoires synaptiques). Des séries de films séparées par intervalles réguliers ont été effectuées pour évaluer l'effet de protocoles de stimulations neuronales sur les dynamiques des récepteurs. Ces mêmes expériences ont été répétées sans l'application de protocoles de stimulation pour évaluer le simple effet du temps sur ces mêmes dynamiques.

2.1 Matériel et méthodes

2.1.1 Transfert de gènes sur modèle de neurones en culture

L'imagerie a été réalisée sur des cultures de neurones issus d'hippocampes de rats post-nataux. Après l'extraction des neurones du cerveau de l'animal, ces derniers sont déposés sur des lamelles de verre, lamelles qui baignent dans des puits remplis d'une solution qui permet aux neurones de se maintenir en vie et de régénérer en formant de nouvelles connexions. Les cultures peuvent être maintenues en vie durant des semaines, et l'accès direct aux solutions nutritives permet de réaliser facilement l'étape de transfert de gènes.

Nous utilisons le transfert de gènes pour obtenir un contraste des synapses et pour avoir un contrôle des étiquettes spécifiques qui sont fusionnées aux récepteurs synaptiques. Cette technique consiste à insérer dans les cellules de multiples copies de boucles d'ADN (plasmides), qui permettront à la cellule de produire des protéines avec des propriétés uniques. L'incubation des plasmides se fait avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat no 1 1 668-027), et ainsi le matériel génétique, en étant enrobé de lipofectamine, peut pénétrer dans la cellule.

Deux protocoles de transfection (voir référence [44] pour les détails) ont été appliqués sur les cultures âgées de 11 à 13 jours, et l'imagerie a été effectuée de 1 à 2 jours suivant la transfection. Ces deux protocoles partagent un plasmide codant la fusion Homer-GFP, qui est une protéine fluorescente qui s'accumule prioritairement aux synapses. Dans un cas, on utilise, de concert avec Homer-GFP, un plasmide qui code une fusion entre la sous-unité GluR2 du récepteur au glutamate de type AMPA et l'étiquette HA (figure 6). Dans l'autre cas, le GluR2-HA est remplacé par un GluR2 fusionné au *biotin acceptor peptide* BAP (GluR2-BAP), et il faut ajouter un plasmide qui code la biotine ligase (BiRA). Les cultures étant maintenues en vie dans le neurobasal (Gibco, Invitrogen, Cat no 21103-049), ce milieu de culture contient déjà de la biotine, et il n'est donc pas nécessaire d'en rajouter. Ainsi, entre le moment de la transfection et le moment de l'imagerie, les ligases BiRA produites par les cellules transfectées lient de la biotine sur le BAP des GluR2-BAP. Au moment du marquage, plusieurs GluR2-BAP-biotine sont donc insérés à la membrane des neurones transfectés (figure 7). Les transfactions ont été effectuées sur des lamelles de 18 mm insérées dans des plaques de 12 puits. Les quantités de plasmides utilisées sont les suivantes. Homer-GFP : 0.1 ug/lamelle, GluR2-HA: 1 ug/lamelle, GluR2-BAP: 0.25 ug/lamelle, BiRA: 0.25 ug/lamelle.

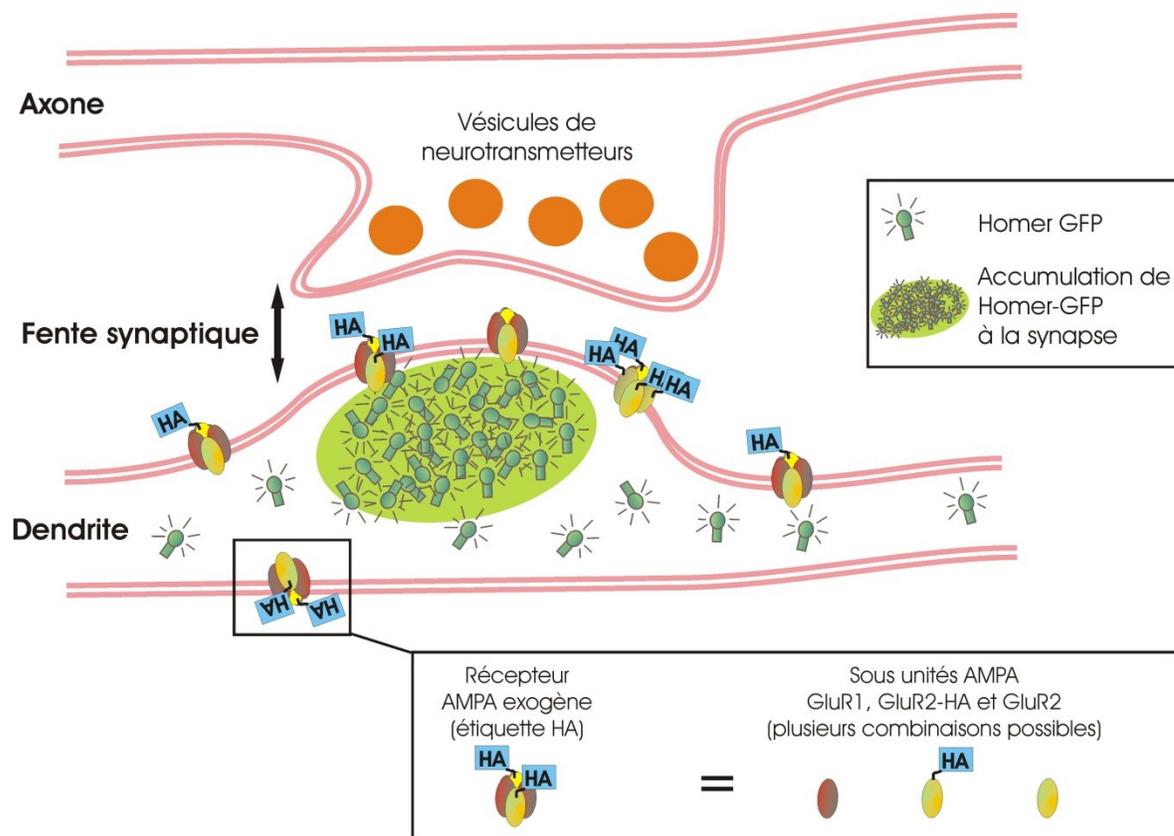


Figure 6 : Expression d'un marqueur synaptique fluorescent et de récepteurs avec l'étiquette HA

L'accumulation de Homer-GFP aux synapses permet d'obtenir le contraste de ces dernières. Les récepteurs exogènes avec l'étiquette HA sont produits par la cellule. Lorsqu'ils sont insérés à la membrane, ils exposent à l'environnement extracellulaire une étiquette spécifique pour le marquage avec des QDs enrobés d'anticorps anti-HA.

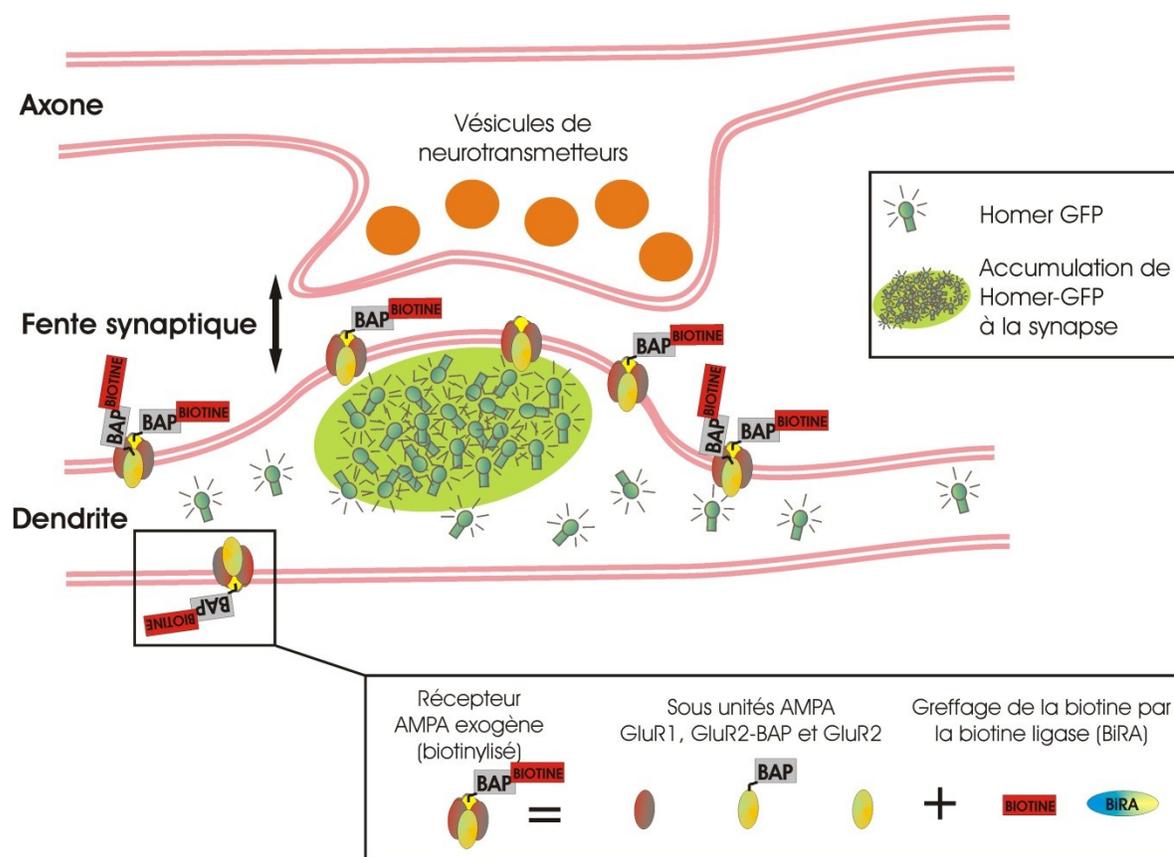


Figure 7 : Expression d'un marqueur synaptique fluorescent et de récepteurs biotinylés

L'accumulation de Homer-GFP aux synapses permet d'obtenir le contraste de ces dernières. Les récepteurs exogènes avec la séquence d'acides aminés *biotin acceptor peptide* (BAP) sont produits par la cellule. Dans le réticulum endoplasmique, la biotinylation ligase (BiRA) greffe de la biotinylation sur le BAP. Lorsqu'ils sont insérés à la membrane, les récepteurs exogènes exposent à l'environnement extracellulaire une étiquette spécifique pour le marquage avec des QDs enrobés de streptavidine.

2.1.2 Marquage des récepteurs avec des QDs fonctionnalisés

Nous avons exploré deux stratégies de marquage pour étiqueter des récepteurs uniques. Une de ces stratégies consiste à incuber les QDs avec les cellules durant un certain temps et à une certaine concentration, pour ensuite laver l'échantillon par le biais de rinçages. C'est une méthode simple, qui présente cependant quelques désavantages. Principalement, les rinçages sont stressants pour les cellules, et l'incubation globale induit une variabilité, de neurone en neurone, au niveau de la quantité de récepteurs étiquetés. En incubant tous les neurones en même temps, il se peut que le neurone le plus en santé et ayant les plus belles synapses soit trop marqué ou pas assez.

L'autre méthode, que nous avons retenue pour l'expérience présentée dans ce chapitre, utilise un micro-injecteur relié à une micropipette que l'on achemine à proximité du neurone d'intérêt pour «l'arroser» localement avec la solution de QDs (figure 8). L'utilisation d'une perfusion permet de rincer le surplus de QDs qui n'a pas adhéré aux cibles. En contrôlant la durée de l'arrosage, on peut lentement étiqueter le neurone jusqu'à atteindre le niveau optimal.

Dans les deux cas, on prépare des QDs dilués dans la solution d'imagerie à une concentration de 5 nM. Cette solution est enrichie d'un agent bloquant, la caséine (Vector Laboratories, 10x Casein Solution, Cat no SP-5020), à une concentration finale de 1x, et ce pour éviter les liaisons non spécifiques des QDs aux membranes cellulaires. La solution de QDs à 5 nM est directement insérée dans la micropipette. Pour la stratégie d'incubation globale, il faut diluer ce stock intermédiaire à une concentration finale entre 0.05 nM et 0.5 nM, incuber durant 2 minutes et procéder à 4 rinçages.

Pour marquer les récepteurs avec une étiquette biotine, nous utilisons des QDs enrobés de streptavidine avec une longueur d'émission à 655 nm (Invitrogen, Qdot 655 streptavidin conjugate 1 μ M solution, cat no Q10121MP). Ces derniers peuvent être directement dilués avec la caséine dans la solution d'imagerie.

Pour marquer les récepteurs fusionnés à l'étiquette HA, il est nécessaire de préincuber un anticorps de rat dirigé contre le HA (Roche, anti-HA high affinity clone 3F10, cat no 1867423) avec des QDs enrobés d'anticorps de chèvre dirigés contre les anticorps de RAT (Invitrogen, Qdot 655 goat F(ab)₂ anti-rat IgG conjugate 1 μ M solution, cat no Q11621MP). Cette étape permet d'avoir un rapport stœchiométrique principal d'environ 1 anticorps anti-HA par QD (en réalité ce rapport suit une distribution de Poisson pour toute la population de QDs), en mélangeant 1 μ L de QDs à 1 μ M avec 1.5 μ L d'anti-HA à 100 μ g/mL dans 8 μ L de PBS durant 45 minutes sur glace. Ensuite, nous ajustons le volume total à 200 μ L, en utilisant 20 μ L de caséine et la balance de solution d'imagerie (ce qui donne la solution à 5 nM de QDs).

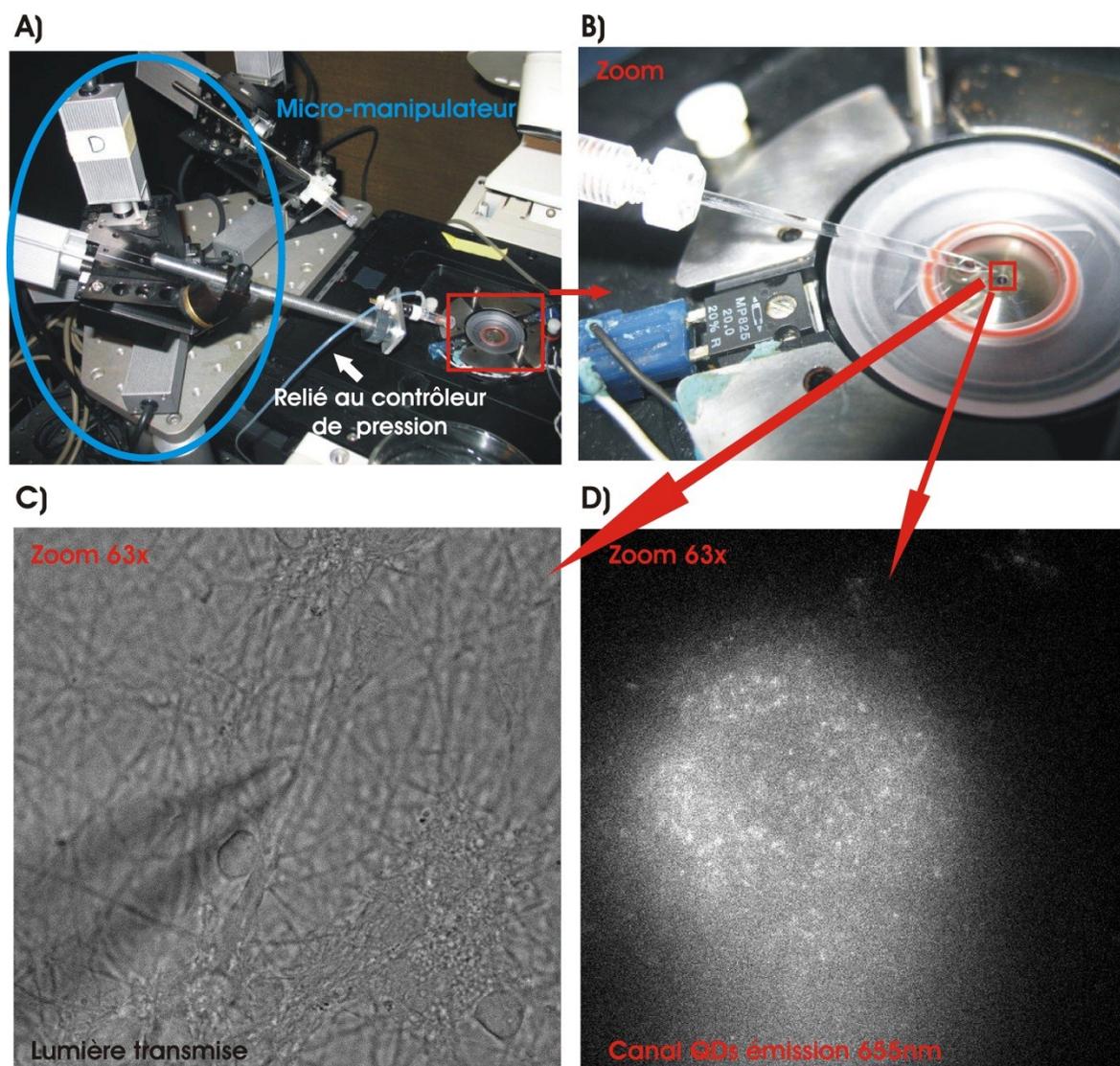


Figure 8 : Marquage des cellules en utilisant un micro-injecteur

A) Vue globale du micro-manipulateur (contrôlant le positionnement de la micropipette) et du tube reliant la micropipette au contrôleur de pression pour la gestion du débit de QDs sortant de la micropipette. **B)** Zoom de la micropipette immergée dans l'échantillon. **C)** Vue au microscope de la micropipette positionnée à quelques micromètres au-dessus des neurones. **D)** Nuage de QDs diffusant juste après leur éjection de la micropipette. De ces QDs, seule une infime proportion se liera aux cibles, le reste étant emporté par la perfusion.

Le fait de cibler des récepteurs exogènes permet de valider facilement la spécificité du marquage. Puisque la transfection de neurones en culture a un faible taux d'efficacité, seule une minorité des neurones auront une membrane présentant ces cibles. Une culture âgée de 12 à 15 jours est très dense, et alors qu'en lumière transmise, on observe un champ de vue complètement recouvert de neurones, en fluorescence, seul le fin profil du neurone

transfecté apparaît. En vérifiant que les QDs qui demeurent présents, après perfusion de 30-60 secondes, sont localisés sur le neurone transfecté (fluorescent) et non pas sur les voisins non transfectés, nous pouvons conclure que les QDs n'adhèrent pas de manière non spécifique à des cibles autres que ce qui a été transfecté dans le neurone fluorescent (figure 9).

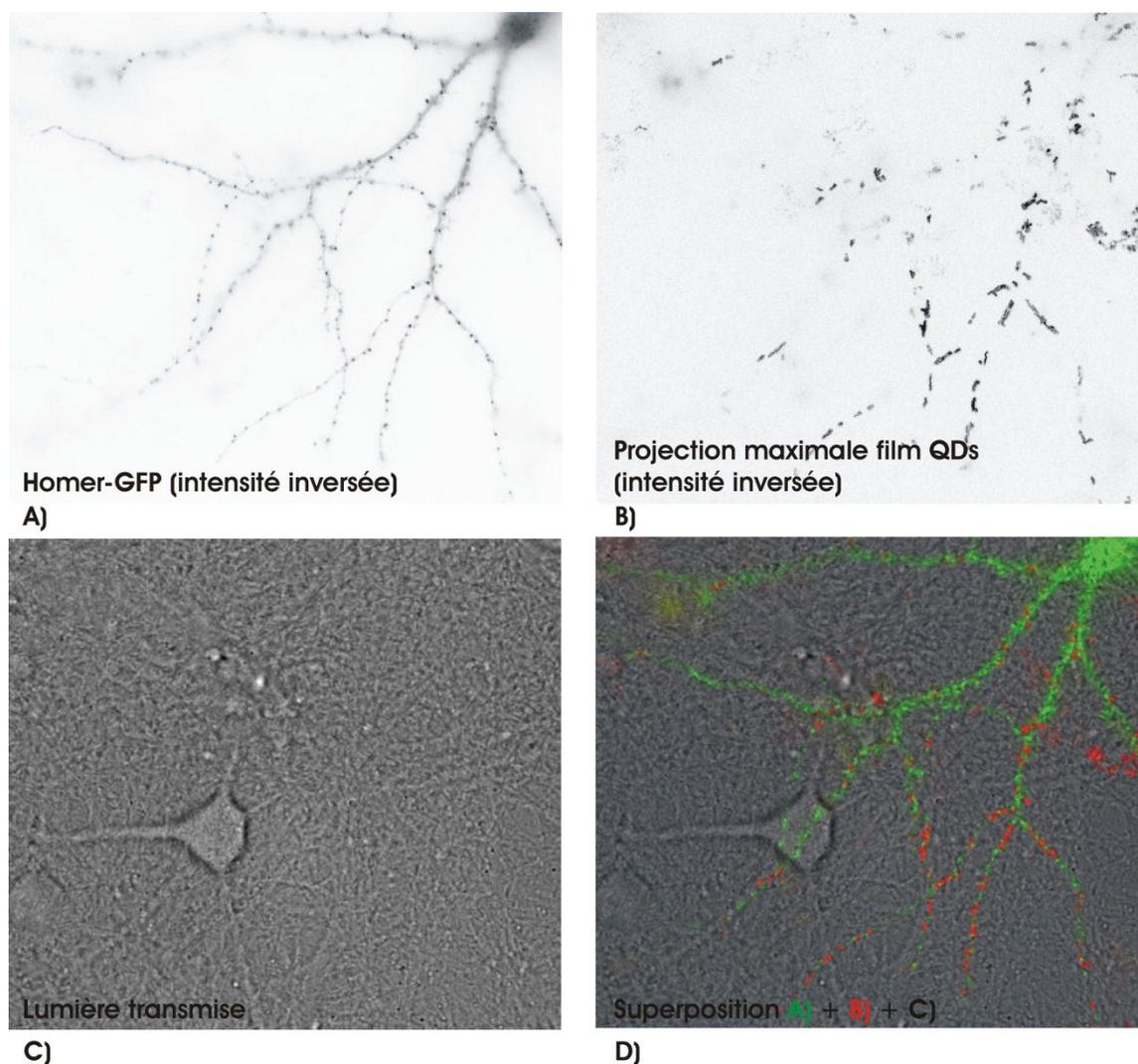


Figure 9 : Contrôle de la spécificité du marquage par la colocalisation du signal de la GFP et du signal de QDs

A) Profil du neurone transfecté à partir de la fluorescence de Homer-GFP. **B)** Projection maximale du film de QDs dirigés contre l'étiquette HA. **C)** Champs de vue en lumière transmise. On remarque bien la silhouette d'un neurone non transfecté. **D)** Les traces des QDs colocalisent seulement avec le neurone transfecté, qui est par le fait même le seul dans ce champs de vue à exprimer des récepteurs avec l'étiquette HA.

2.1.3 Imagerie

Les expériences ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence inversé (Olympus) équipé d'un objectif à huile 63x à grande ouverture numérique (NA=1.4). Les cellules ont été imagées à une température de 35-37 °C sur une chambre ouverte à perfusion (Warner Instruments) à raison de 0.2-0.5 ml/min de perfusion. Le système de perfusion est équipé d'un pistolet chauffant, et l'apport constant de nouvelle solution chauffée aide à stabiliser la température et conserver l'osmolarité de la solution d'imagerie qui couvre l'échantillon. De plus, le flux de solution permet de rincer l'échantillon de l'excès de QDs non liés suite au marquage local utilisant le micro-injecteur. L'imagerie a toujours été réalisée dans les 30 premières minutes suivant l'insertion des lamelles dans la chambre d'imagerie.

Nous utilisons une caméra ultra-sensible (Roper Scientific, Photometrics Cascade 512B) pour l'acquisition des données. Le contrôle de la caméra et de l'illumination se fait à partir du logiciel *Métamorph*. Pour le suivi de récepteurs marqués avec des QDs, nous avons réalisé des films de 300 images avec un temps d'intégration de 50 ms/image et un gain de caméra élevé, près du maximum. En ce qui concerne les synapses, les paramètres de la caméra ont été ajustés suivant l'expression de la protéine Homer-GFP, l'objectif étant d'optimiser le contraste entre les synapses et le reste du neurone. Tant pour les QDs que pour les images de Homer-GFP, l'illumination se fait à partir d'une lampe au xénon. Pour imager la GFP, nous utilisons un filtre d'excitation passe-bande laissant passer la lumière entre 450 nm et 490 nm et un filtre d'émission passe-bande entre 515 nm et 565 nm, filtres insérés dans un cube avec un dichroïque à 510 nm. Pour les QDs, les filtres utilisés sont, pour l'excitation, un passe-bande de 435-485 nm, et pour l'émission, un passe-bande de 635-675 nm, avec un dichroïque à 605 nm.

Nous avons respecté une certaine séquence pour l'imagerie des neurones. Suite au marquage des QDs, nous attendons approximativement 1 minute pour laisser la perfusion rincer l'excédent de QDs non liés. De plus, certains QDs peuvent s'être liés non spécifiquement après l'arrosage local, mais ceux-ci ne resteront pas liés très longtemps, et après la minute d'attente, ils sont la plupart du temps emportés par la perfusion. Après cette attente, une première image des synapses est prise, et tout de suite après, un premier film des dynamiques des récepteurs. En tout, 4 films, tous précédés d'une image de Homer-GFP

et séparés les uns des autres d'un intervalle de 5 minutes, sont effectués. Dans la condition contrôle, la perfusion pourvoit l'échantillon en solution saline régulière durant toute la durée de l'expérience. Lors du protocole de stimulation neuronale, la perfusion passe d'une solution saline régulière à une solution de stimulation durant les 5 minutes suivant l'acquisition du premier film, et après le second film, elle distribue à nouveau de la solution saline régulière.

2.1.4 Reconstitution hyper-résolutive des trajectoires et identification des synapses

Nous utilisons le logiciel *Matlab* pour l'analyse des données. L'algorithme d'analyse a été développé par Simon Labrecque au centre de recherche Université Laval Robert-Giffard (CRULRG).

Concernant le traitement des films de récepteurs diffusants à la membrane, l'analyse de reconstitution des trajectoires se fait en 3 étapes. En premier lieu, on applique un seuillage à chacune des images pour déterminer la position, image par image, de tous les objets correspondants à la PSF de QDs. Pour ce faire, nous avons développé un code, intégré à l'algorithme, qui utilise la corrélation d'un filtre gaussien avec les images. Cette corrélation permet de déterminer, sur chacune des images, quels sont les pixels associés à la PSF d'un QD. La fonction *fspecial(gaussian)* de matlab est utilisée pour générer le filtre ajustable, de dimension 7×7 . Le seuillage se fait ainsi : nous appliquons une translation négative au filtre, de telle sorte que les éléments centraux de la matrice sont positifs et les éléments périphériques sont négatifs. En sélectionnant l'amplitude de la soustraction ainsi que la largeur à mi-hauteur appropriées, le résultat de la corrélation sera positif pour les pixels associés aux QDs et négatifs pour les autres pixels. La figure 10 montre une représentation 3D de ce filtre, avec les paramètres standards adaptés à la détection des QDs. L'utilisation d'une caméra à amplification engendre des rapports signal/bruit variables selon l'étiquetage, et ainsi, d'une expérience à l'autre, l'utilisateur peut être appelé à modifier les paramètres du filtre pour optimiser les localisations. Nous utilisons une interface utilisateur pour visualiser le type de détection et adapter les paramètres avant de lancer l'algorithme.

Selon la sensibilité du seuillage, il est possible de minimiser les faux positifs et d'éliminer les détections de sources qui ne sont pas au foyer de l'objectif.

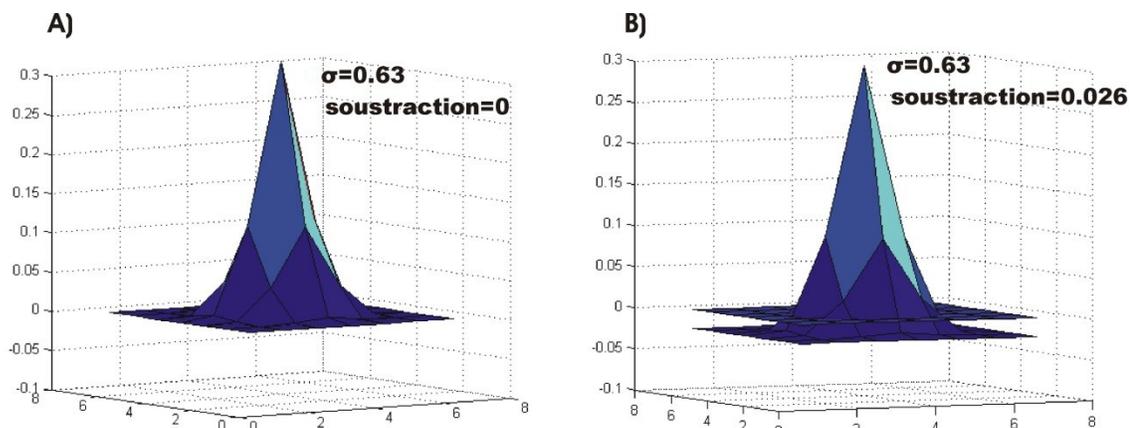


Figure 10 : Filtre gaussien pour la localisation des PSF de QDs uniques

A) Représentation 3D de la matrice 7×7 créée par la fonction *fspecial*('gaussian') du logiciel *Matlab*. L'écart type, de 0.63, est adapté pour le seuillage de PSF de QDs émettant à 655 nm et dont le signal est magnifié par un objectif 63x sur des pixels de $16 \mu\text{m}$ par $16 \mu\text{m}$. **B)** Allure du filtre après la translation négative qui permet d'ajuster la sensibilité du seuillage. Les paramètres sont ceux qui ont été utilisés pour la majorité des seuillages visant à identifier automatiquement les QDs. À noter que ces paramètres sont adaptés à l'utilisation d'un filtre 7×7 .

La deuxième étape, qui est la plus exigeante en termes d'unités computationnelles, est celle du lissage gaussien. Pour chaque objet, l'algorithme trouve, par itérations, la position et la largeur à mi-hauteur d'une gaussienne parfaite pour laquelle la différence avec l'intensité réelle des pixels est minimale. Tout dépendant du rapport signal/bruit, cette étape permet de localiser le centre de la PSF avec une précision de pointage entre 10 et 70 nm. C'est la fonction *lsqcurvefit* qui est utilisée pour le lissage.

Lorsque la localisation hyper-résolutive de tous les objets sur chaque image est terminée, il ne reste plus qu'à associer les objets d'image en image pour reconstituer les trajectoires. Cette étape s'appuie sur l'association des objets les plus rapprochés entre 2 images successives. Nous nous basons sur les caractéristiques des récepteurs pour imposer un déplacement maximal au-delà duquel l'association est interdite. Puisque les QDs sont des sondes qui scintillent, l'algorithme est muni d'une mémoire, en nombre d'images, qui correspond à l'intervalle maximal pour lequel la reconstitution d'une trajectoire que l'on a perdue est en attente. Cette mémoire est essentielle pour éviter les dédoublements de

trajectoires pour un même récepteur, mais en abuser peut occasionner des erreurs où deux objets distincts sont associés. Nous utilisons un déplacement maximal de 3 pixels (ce qui, pour notre montage, correspond à un déplacement du récepteur de 750 nm) ainsi qu'une mémoire de 10-15 images. Pour les petites densités de récepteurs étiquetés, l'utilisation d'une grande mémoire est moins problématique.

La dernière étape de l'analyse consiste à identifier les synapses pour y superposer les trajectoires. Le contraste entre les synapses et le reste du neurone est issu de l'accumulation de Homer-GFP à la synapse, et ce contraste est très variable, de neurone en neurone, et aussi pour les synapses d'un même neurone. Puisque les synapses correspondent à des pixels plus intenses que les pixels voisins, le seuillage est une méthode appropriée pour leur identification. Encore une fois, l'approche de l'interface utilisateur est favorisée pour visualiser le résultat du seuillage au fur et à mesure que l'on adapte les paramètres, ce qui permet de s'adapter à la variabilité du signal. Une description plus détaillée de ce seuillage adaptatif est présentée en annexe. En combinant l'information sur les positions des récepteurs et l'information sur les positions des synapses, on attribue à chaque position d'un récepteur le statut synaptique ou extra-synaptique. À la figure 11, nous présentons une image brute de Homer-GFP, le résultat du seuillage des synapses ainsi que les superpositions de trajectoires synaptique et extra-synaptique sur cette image.

La reconstitution des trajectoires et la détection des synapses n'étant pas parfaites, nous vérifions les trajectoires une par une pour éliminer celles qui sont erronées. Les associations entre différents récepteurs pour une même trajectoire, les mauvaises précisions de pointage dues à un faible signal/bruit et l'attribution d'un mauvais statut pour un récepteur (synaptique ou extra-synaptique) sont les erreurs les plus communes.

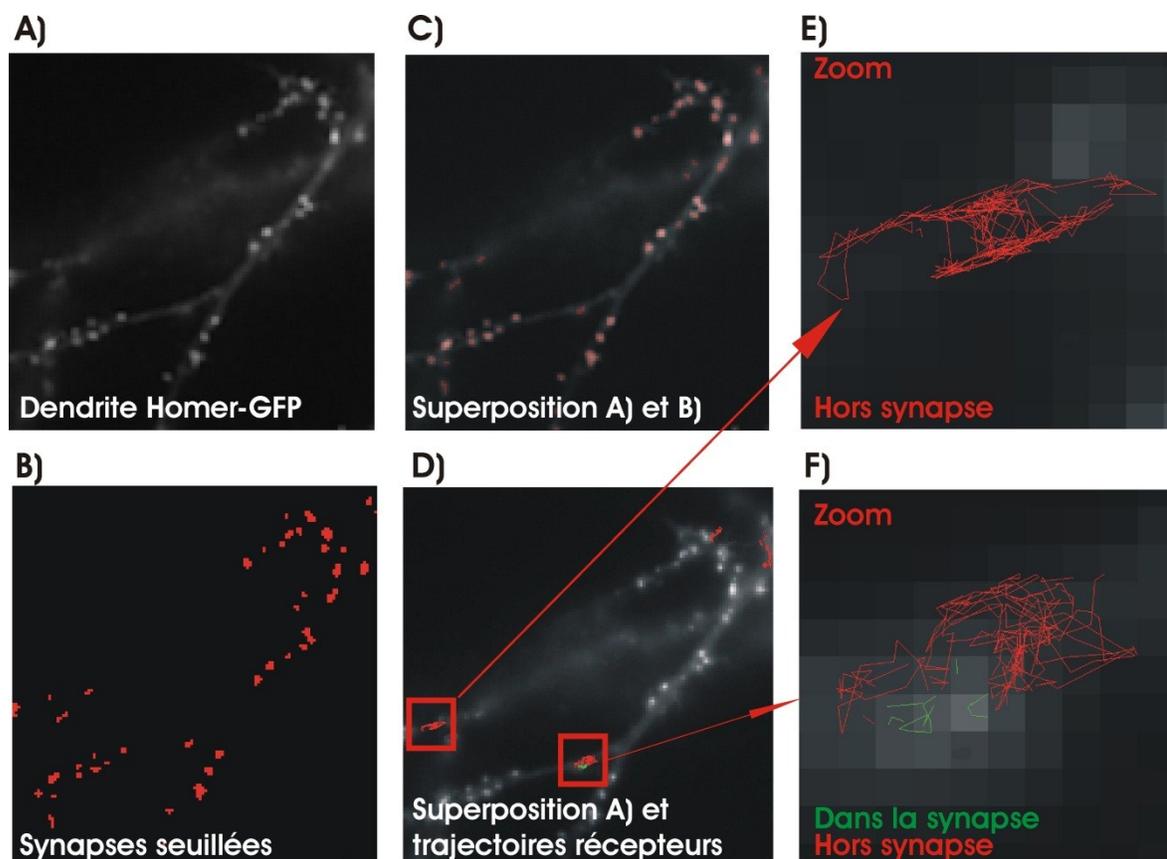


Figure 11 : Seuillage des synapses et superposition des trajectoires reconstituées

A) Signal de fluorescence de Homer-GFP. On remarque un contraste entre les synapses, plus fluorescentes, et le reste de la dendrite. **B)** Résultat du seuillage des synapses. **C)** Superposition entre le seuillage des synapses et l'image de Homer-GFP original. **D)** Superposition des trajectoires, avec l'image de Homer-GFP. **E)** Exemple de trajectoire extra-synaptique. **F)** Exemple de trajectoire synaptique.

2.2 Analyse des résultats

2.2.1 Quantification du coefficient de diffusion et de la résidence synaptique

L'objectif de l'expérience est de comparer, selon les conditions, si les récepteurs sont plus ou moins ralentis dans les synapses, si leur comportement reste constant dans le reste de la membrane et si, en moyenne, la pénétration synaptique et la proportion du temps passé dans les synapses varient. Pour ce faire, nous quantifions, en premier lieu, le coefficient de diffusion de chaque récepteur. En ce qui concerne les récepteurs synaptiques, nous déterminons, pour chaque récepteur, le rapport entre le temps passé à l'intérieur et le temps passé à l'extérieur de la synapse ainsi que la ou les périodes de résidence synaptique.

Le coefficient de diffusion est issu du calcul de déplacement carré moyen (MSD). Cette fonction est construite point par point, en déterminant, pour un intervalle de temps donné, la moyenne des carrés des distances séparant les positions séparées par cet intervalle [45,46,47]. La formule (1) décrit ce calcul pour des particules diffusant sur une surface à deux dimensions:

$$(1) MSD(n\tau) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} [(x((i+n)\tau) - x(i\tau))^2 + (y((i+n)\tau) - y(i\tau))^2]$$

Où : T= temps d'acquisition

N= nombre total d'images

Quand une particule diffuse librement en suivant une motion brownienne, la fonction $MSD(nT)$ est linéaire. Cependant, lorsque ce mouvement est confiné ou dirigé, la fonction s'apparente à un logarithme ou à une exponentielle respectivement. Dans les trois cas, les premiers points de la fonction sont assez linéaires, et c'est la pente de ce régime linéaire qui est proportionnelle au coefficient de diffusion [48]:

$$(2) m = 4D$$

Où : m = pente de $MSD(nT)$

D = coefficient de diffusion [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]

Il est assez courant d'observer des récepteurs diffuser rapidement et sur une longue période, avant d'être ralenti dans la synapse. Puisque le coefficient de diffusion D , issu de la pente du MSD, est lié à la mobilité moyenne du récepteur, considérer cette trajectoire comme strictement synaptique peut induire une erreur sur sa mobilité près des synapses. Nous avons donc décidé de segmenter ce genre de trajectoire en deux pour isoler la partie extra-synaptique et synaptique. Pour que les dynamiques des récepteurs diffusants dans les synapses tiennent compte des mouvements dans le voisinage de ces dernières, nous dilatons, dans toutes les directions, la synapse de deux pixels, et ce sont les positions à l'intérieur de cette région dilatée qui sont considérées comme appartenant à la trajectoire synaptique (figure 12).

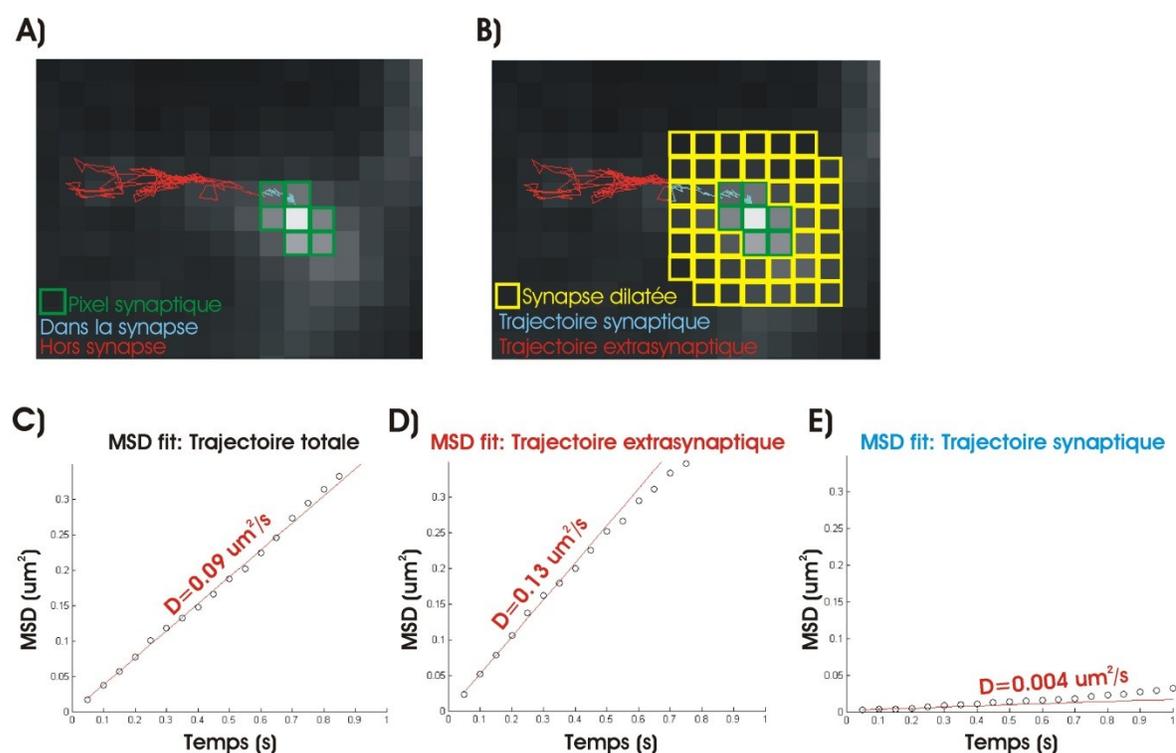
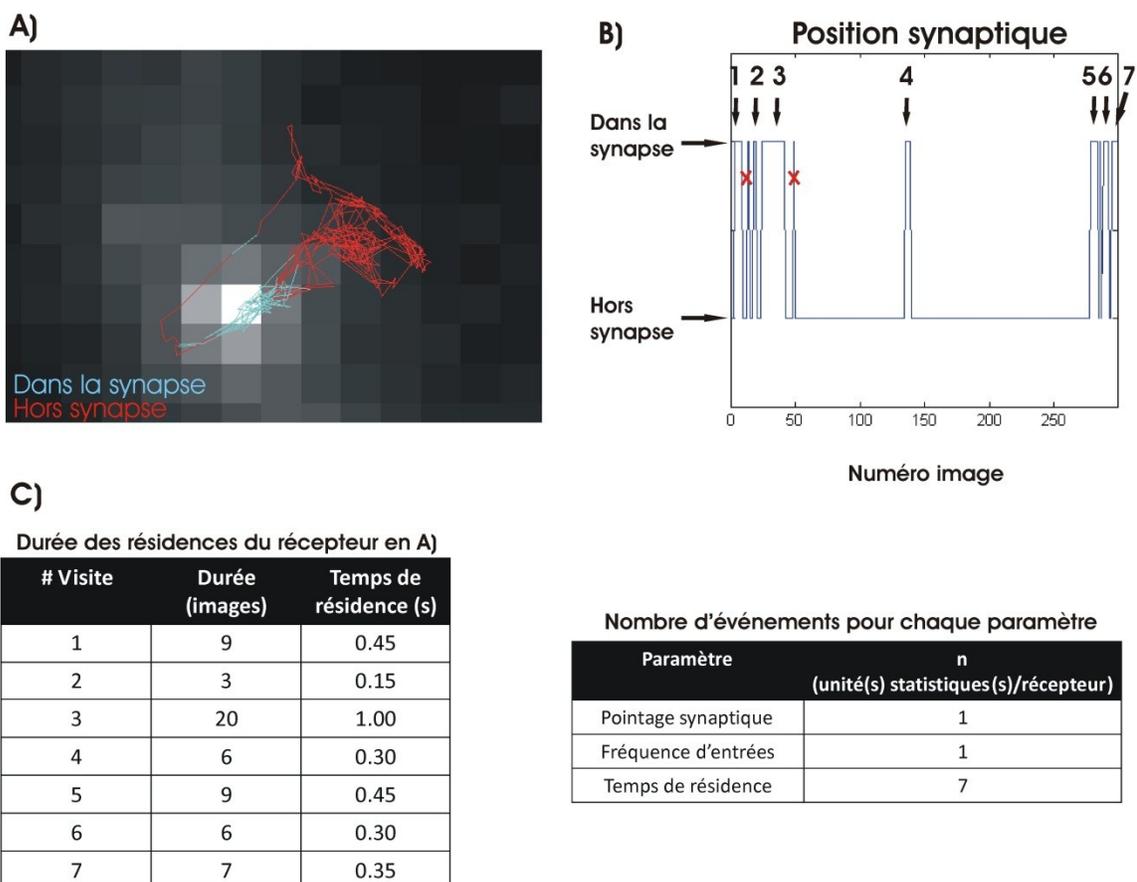


Figure 12 : Dilatation des synapses et fractionnement de la trajectoire

A) Superposition entre la synapse et une trajectoire synaptique. **B)** Dilatation de la synapse de 2 pixels et fractionnement de la trajectoire en une trajectoire synaptique et une trajectoire extra-synaptique à partir de la frontière de cette synapse dilatée. **C)** Le coefficient de diffusion (qui est proportionnel à la pente du *MSD fit*) de la trajectoire entière fait référence à un récepteur synaptique rapide. **D)** Loin de la synapse, le récepteur diffuse rapidement (coefficient de diffusion du même ordre de grandeur qu'en C)). **E)** Ce récepteur est ralenti énormément lors de son arrivée dans la synapse (coefficient de diffusion 20 fois moins élevé qu'en C)).

Les coefficients de diffusion de récepteurs diffusants à la membrane sont très variables et couvrent plusieurs ordres de grandeur (typiquement de $0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ à $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Nous nous attarderons donc à porter un regard sur les distributions de ces coefficients dans leur ensemble pour comparer si les distributions associées à deux conditions sont statistiquement distinctes.

Outre les dynamiques, il est possible de mettre l'accent sur les localisations des récepteurs. Un premier paramètre, le *pointage synaptique*, est obtenu en divisant, pour chaque récepteur ayant visité la synapse, le nombre d'images où il s'est retrouvé dans une synapse par le nombre total d'images associées à sa trajectoire. Pour décortiquer plus en profondeur ce pointage, nous avons décidé de regarder les statistiques associées aux temps de visite de chaque pénétration synaptique, ainsi que les fréquences de ces pénétrations (récepteur par récepteur, en pénétrations/s). La figure 13 présente le cas d'un récepteur ayant visité une synapse à plusieurs reprises ainsi qu'une représentation détaillée des paramètres de pénétration synaptique qui lui sont associés.



$$pointage_synaptique = \frac{nombre_images_dans_synapse}{nombre_images_total} = \frac{9+3+20+6+9+6+7}{300} = \frac{60}{300} = 20\%$$

$$fréquence_d'entrées = \frac{nombre_visites_synaptiques}{temps_acquisition_récepteur} = \frac{7visites}{300images \cdot 50ms/image} = 0.47visites/s$$

Figure 13 : Paramètres de pénétration synaptique

A) Superposition d'un récepteur synaptique avec la synapse qu'il a visité à plusieurs reprises durant le temps d'acquisition. **B)** Position, synaptique ou extra-synaptique, du récepteur durant l'échantillonnage de ses positions. Les croix rouges réfèrent à des passages synaptiques de 2 images ou moins, qui sont éliminés. Les flèches identifient les 7 passages qui sont considérés. **C)** Tableaux et formules qui exposent la quantification du pointage synaptique, de la fréquence d'entrée et des temps de résidence pour cet exemple.

2.2.2 Comparaison de l'utilisation de QDs-SAV vs QDs-AB en condition contrôlée

L'objet de cette section est de comparer l'utilisation de QDs-SAV, qui sont légèrement plus compacts et multivalents, à l'utilisation de QDs-AB monovalents pour le suivi des dynamiques de récepteurs synaptiques. Pour ce faire, nous avons étudié le simple effet du temps (0-5-10-15 minutes après le marquage) sur la diffusion des récepteurs marqués en fonction du type de marquage.

Lorsque l'on porte un œil sur les pointages synaptiques, on remarque que les récepteurs marqués avec des QDs-SAV passent en moyenne plus de temps à la synapse que ceux marqués avec des QDs-AB (figure 14 A et B). De plus, le pointage synaptique des mêmes récepteurs QDs-SAV augmente avec le temps. Pour les récepteurs QDs-AB, on observe le contraire, à savoir une subtile diminution du pointage synaptique entre le premier film et les films subséquents. Fait intéressant, au temps zéro, les pointages synaptiques des QDs-SAV et QDs-AB sont statistiquement comparables, alors qu'ils sont différents après 5, 10 et 15 minutes (figure 14 C et D, figures pour $t=0$ et 5 minutes seulement). Cette différence de pointages synaptiques après un certain temps est plus liée aux changements des pointages synaptiques des QDs-SAV (médiane qui passe de 40% à 55%) qu'à ceux des QDs-AB (médianes comparables).

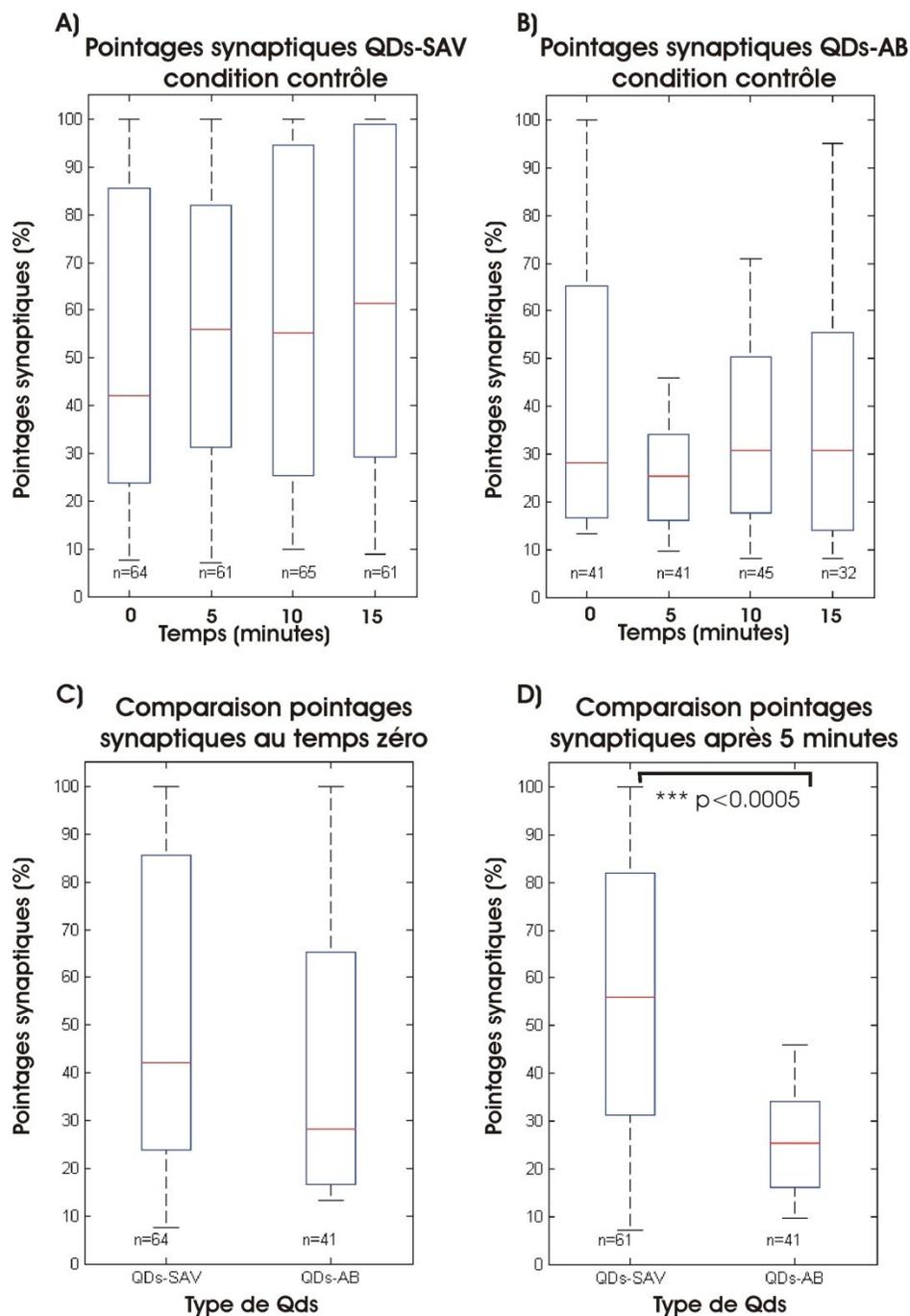


Figure 14: Pointages synaptiques des récepteurs en fonction du type de marquage

Diagrammes à barres des pointages synaptiques (n=nombre de récepteurs). Un récepteur doit avoir passé un minimum de 20 images dans une synapse (total d'images sur toute la trajectoire) pour être considéré. Les extrémités de la boîte bleue représentent le premier et le troisième quartile, alors que la ligne rouge représente la médiane. **A)** Récepteurs marqués avec les QDs-SAV (N=5 neurones). Nous remarquons une augmentation soutenue de la médiane. **B)** Récepteurs marqués avec les QDs-AB (N=6 neurones). Nous observons principalement une diminution du troisième quartile. **C)** Au temps zéro, les distributions des pointages synaptiques entre les deux types de marquage sont comparables (test statistique Kolmogorov-Smirnov). **D)** Après 5 minutes, ces distributions sont distinctes.

Toujours en condition contrôle, nous nous attendions à observer une certaine constance des dynamiques des récepteurs synaptiques et extra-synaptiques dans le temps. C'est le cas des récepteurs étiquetés avec des QDs-AB (figure 15 A et B). Pour les récepteurs marqués avec des QDs-SAV, les diagrammes à barre des coefficients de diffusion synaptiques et extra-synaptiques montrent un affaïssement progressif du premier quartile et de la médiane de ces coefficients dans le temps (figure 15 C et D).

Ce comportement n'a jamais été répertorié dans la littérature pour une expérience contrôle, et il est d'autant plus surprenant pour les récepteurs extra-synaptiques. Pour les récepteurs à la synapse, on peut toujours argumenter que l'immobilisation progressive des récepteurs donne lieu à une augmentation, dans le temps, de la proportion de récepteurs avec de faibles coefficients de diffusion. Cependant, pour des récepteurs libres de diffuser à l'extérieur des synapses, là où les sites d'interactions sont quasi inexistant, nous nous attendions à observer des distributions semblables pour les différentes séquences d'acquisitions, comme c'est le cas pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB (figure 15 B).

Le fait que les récepteurs puissent se comporter à la membrane comme des particules diffusantes libres ou des particules liées laisse présager l'existence de deux types de populations : des récepteurs mobiles et des récepteurs immobiles. On peut en effet observer ces deux populations à travers un histogramme des coefficients de diffusion. Les classes de cet histogramme doivent être exprimées en logarithme des coefficients, et ce afin de comparer les différents ordres de grandeur impliqués. À la figure 16, nous présentons les histogrammes des trajectoires synaptiques des récepteurs étiquetés avec les QDs-SAV. Pour $t=15$ minutes, là où la proportion de récepteurs immobiles est la plus grande, la distinction entre les deux types de population est très claire. On remarque deux distributions de coefficients centrées sur différentes classes, distributions que nous avons séparées par la ligne de démarcation rouge associée à $D=0.0075 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

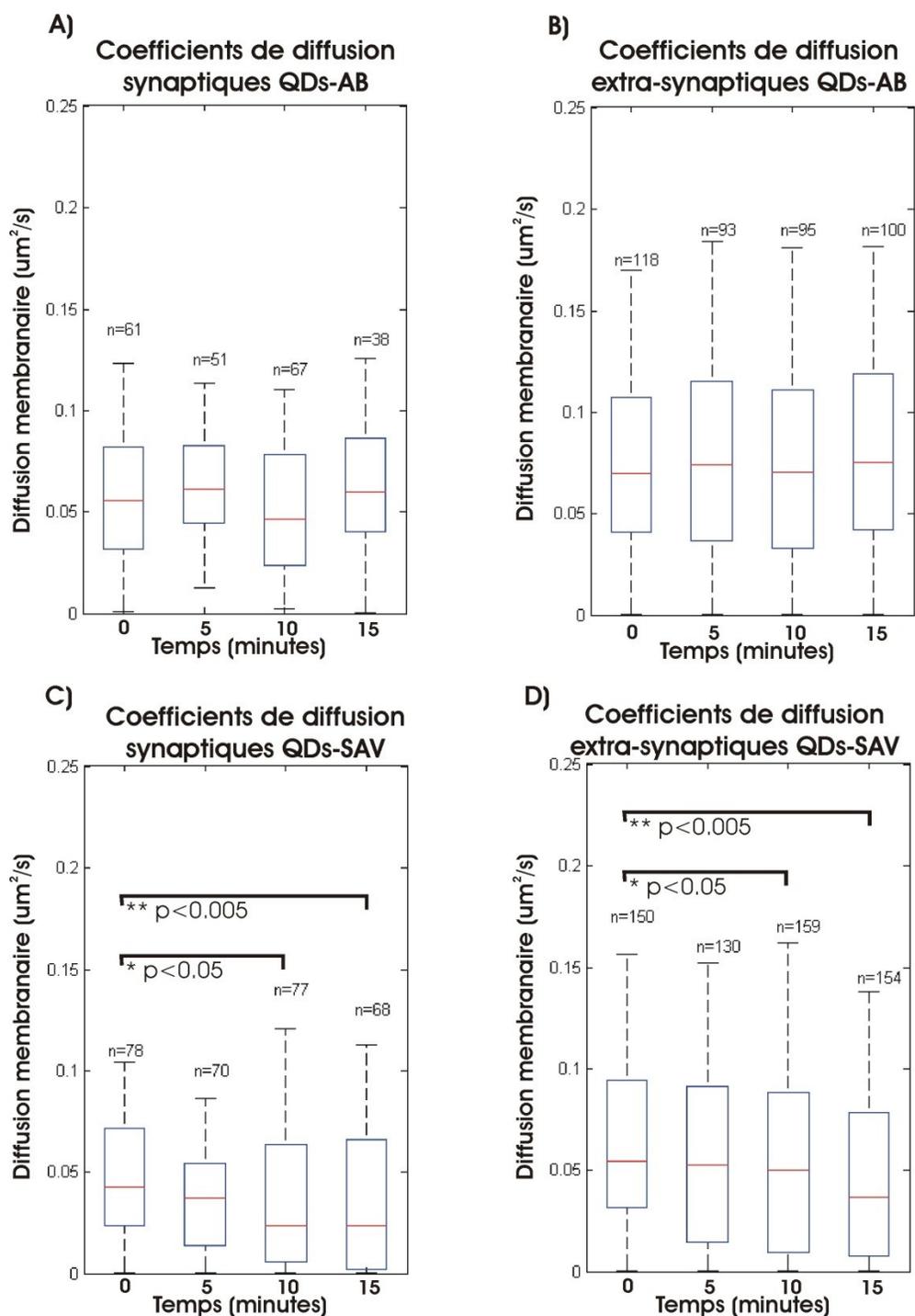


Figure 15: Coefficients de diffusion des récepteurs en fonction du type de marquage

Diagrammes à barre des coefficients de diffusion (n =nombre trajectoires, tests statistiques Kolmogorov-Smirnov) **A)** Pour les trajectoires extra-synaptiques de récepteurs étiquetés avec des QDs-AB, les différentes distributions sont comparables ($N=6$ neurones). **B)** Idem pour les coefficients de diffusion synaptiques. **C)** Le premier quartile et la médiane des coefficients de diffusion synaptiques des récepteurs QDs-SAV s'affaissent dans les 10 premières minutes ($N=5$ neurones). **D)** Les coefficients de diffusion extra-synaptiques des QDs-SAV chutent progressivement vers des valeurs plus basses.

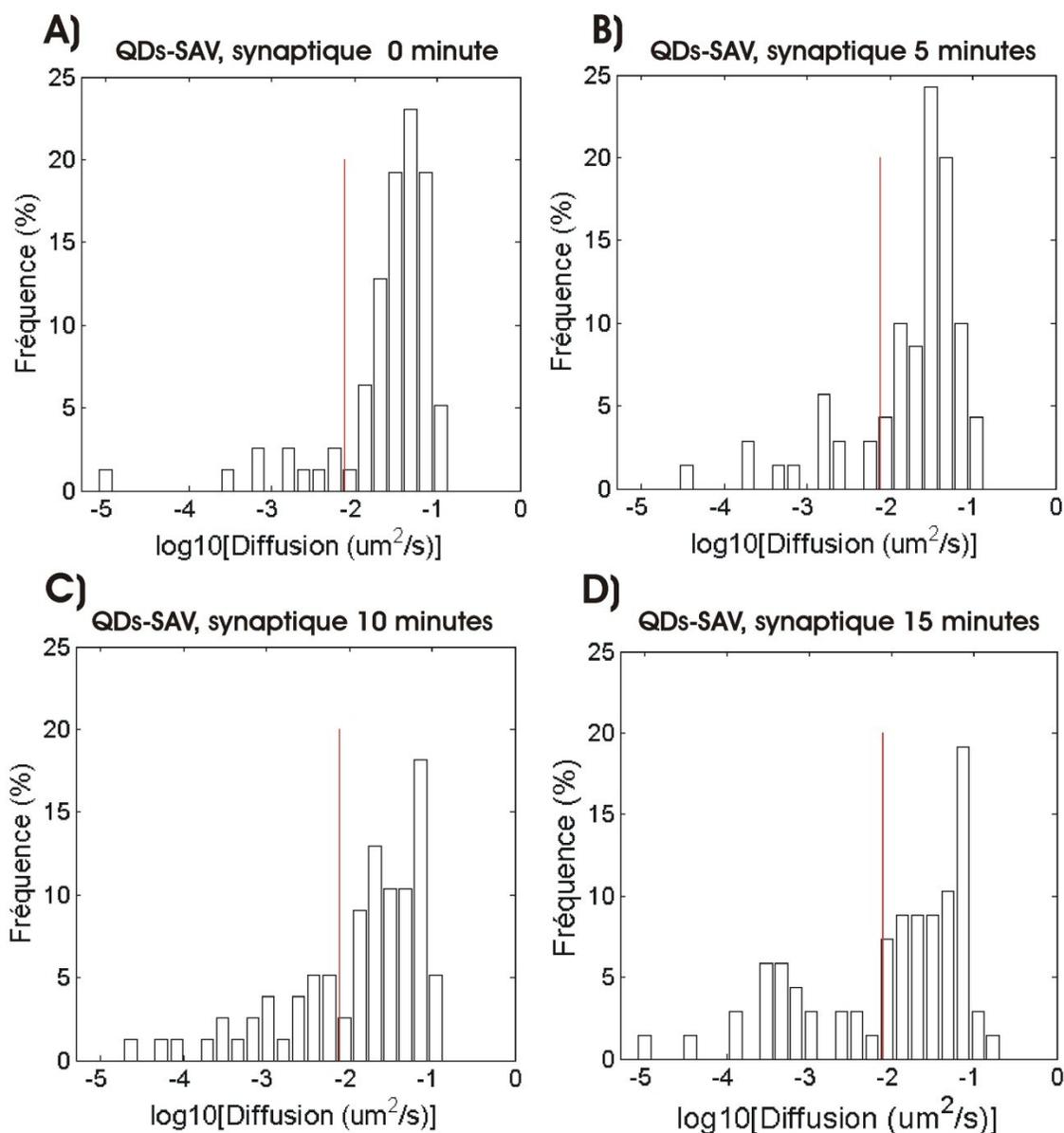


Figure 16: Histogrammes des coefficients de diffusion synaptiques des récepteurs QDs-SAV

Distributions de la figure 15C. La ligne rouge marque le seuil entre les récepteurs mobiles et les récepteurs immobiles. **A)** Au temps zéro, la plupart des récepteurs sont mobiles. **B)** À 5 minutes, la population mobile reste importante, mais on voit émerger de plus en plus de récepteurs immobiles. **C) et D)** La population immobile continue de gagner en importance.

Cette bi-population a aussi été observée dans le passé, avec un seuil semblable [2]. Nous avons donc choisi cette valeur seuil de $0.0075 \mu\text{m}^2/\text{s}$ pour diviser les échantillons de récepteurs en une fraction mobile et une fraction immobile. Pour chaque neurone, la fraction immobile a été compilée, et la figure 17 présente l'évolution de cette fraction

immobile dans le temps pour les 2 types de marquages et les 2 catégories de trajectoires (synaptiques et extra-synaptiques).

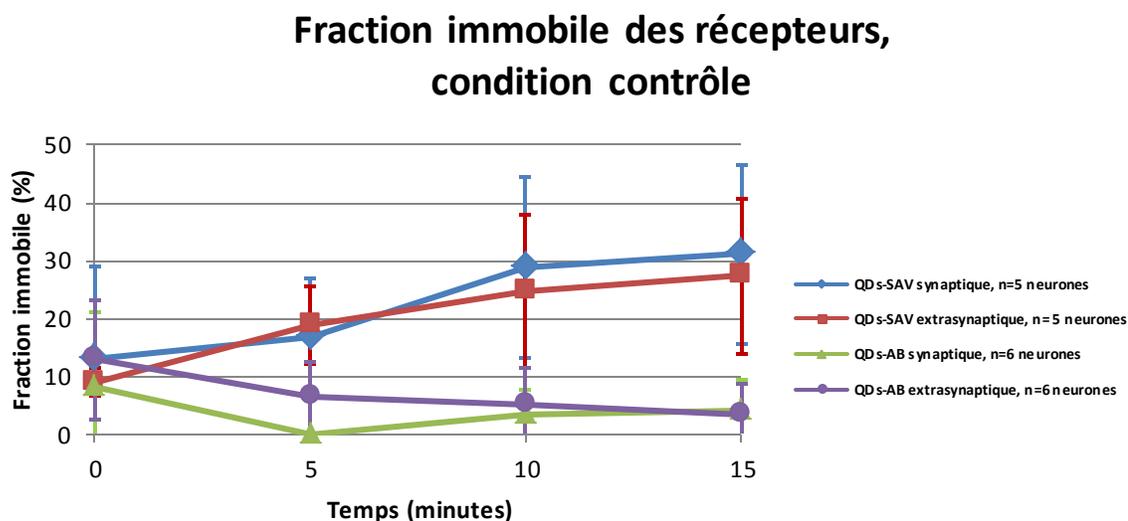


Figure 17 : Évolution dans le temps de la fraction de récepteurs immobilisée

Fraction immobile (moyenne \pm écart type) des différentes classes de récepteurs dans le temps. On observe une immobilisation progressive des deux types de trajectoires de récepteurs marqués avec des QDs-SAV, alors que ce n'est pas le cas pour les QDs-AB. Ces derniers montrent une tendance légèrement à la baisse.

Si nous résumons les résultats présentés aux figures 14-15 et 17, nous remarquons premièrement que les récepteurs marqués avec les QDs-SAV qui atteignent la synapse y passent une plus grande proportion du temps d'échantillonnage comparativement aux récepteurs QDs-AB. Quoique subtile au temps zéro, cette différence devient beaucoup plus importante aux autres temps d'acquisition, dû principalement à l'augmentation du pointage synaptique des récepteurs QDs-SAV. Cela s'apparente à la comparaison des fractions de récepteurs immobiles. Entre les deux types de marquage, ces fractions immobiles se distancient l'une de l'autre au fur et à mesure que l'expérience avance, ce qui est surtout provoqué par une forte augmentation des fractions immobiles des récepteurs QDs-SAV. Au niveau des distributions de coefficients de diffusion, ils sont stables tout au long de l'expérience pour les QDs-AB, alors qu'ils s'affaissent progressivement vers des valeurs plus basses pour les QDs-SAV.

Réunis, ces résultats suggèrent qu'une plus grande proportion de récepteurs marqués avec des QDs-SAV sont immobilisés à la synapse à mesure que le temps avance, ce qui a pour

effet d'augmenter le pointage synaptique. On ne remarque pas cet effet avec les QDs-AB. Une interprétation possible de ce résultat est l'hypothèse selon laquelle les QDs-SAV sont plus compacts, ce qui leur permet de pénétrer plus facilement et plus profondément à la synapse, et ainsi d'augmenter leur probabilité d'être immobilisés. Puisque la surface extra-synaptique est beaucoup plus grande que la surface synaptique, nous marquons initialement une grande majorité de récepteurs à l'extérieur des synapses. Ainsi, au temps zéro, peu de récepteurs sont immobilisés à la synapse, et au fur et à mesure que l'expérience avance, une proportion plus importante des récepteurs s'immobilisent. De son côté, la taille des QDs-AB serait un handicap pour atteindre aisément ces sites d'immobilisation prolongée.

Il y a cependant 2 éléments non négligeables qui remettent en question cette interprétation. Premièrement, le fait que les récepteurs diffusant à l'extérieur des synapses subissent une immobilisation progressive suggère l'existence d'un mécanisme d'immobilisation qui n'est pas strictement synaptique. De plus, en tenant pour acquis que, entre les deux types de marquage, un seul permet aux récepteurs marqués de s'accumuler progressivement aux synapses, on devrait remarquer, seulement dans ce cas, une augmentation du rapport de trajectoires synaptiques par rapport au nombre de trajectoires totales, puisqu'en moyenne les récepteurs mobiles conservent la même probabilité d'explorer une synapse, alors que ceux immobilisés y restent. Le tableau 1 présente le pourcentage de récepteurs synaptiques par rapport au nombre total de récepteurs pour toutes les conditions expérimentales, et nous ne remarquons pas une telle tendance. Qui plus est, pour les deux types de marquage, cette proportion est comparable.

Il appert que, malgré le fait qu'une plus grande proportion de récepteurs QDs-SAV soit stabilisée à la synapse à travers le temps, le même phénomène se produit à l'extérieur des synapses, de telle sorte que ces récepteurs stabilisés au niveau extra-synaptique ne sont plus disponibles pour pénétrer à nouveau les synapses.

Tableau 1: Pourcentage de récepteurs synaptiques* par rapport au nombre de récepteurs total

		Temps [minutes]											
		0			5			10			15		
		n_{syn}	n_{ex}	$\frac{n_{syn}}{n_{tot}}$	n_{syn}	n_{ex}	$\frac{n_{syn}}{n_{tot}}$	n_{syn}	n_{ex}	$\frac{n_{syn}}{n_{tot}}$	n_{syn}	n_{ex}	$\frac{n_{syn}}{n_{tot}}$
Marquage	QDs-SAV	64	122	34 %	61	107	36%	65	137	31%	61	131	32%
	QDs-AB	41	77	35 %	41	60	40%	45	65	41%	32	78	29%

*n est le nombre de récepteurs. Nous avons considéré les récepteurs ayant visité les synapses durant 20 images et plus (mêmes n que pour les pointages synaptiques). À ne pas confondre avec les nombres de trajectoires pour les distributions des coefficients de diffusion, où un même récepteur peut engendrer 2 trajectoires (synaptique et extra-synaptique).

Il est fort probable que la multivalence des QDs-SAV soit en partie responsable de cette immobilisation synaptique et extra-synaptique. Rappelons que, par rapport aux QDs-AB, qui sont en majorité équipés d'un seul anticorps primaire, les QDs-SAV sont enrobés de plusieurs SAV, qui ont chacune plusieurs sites d'adhésion à la biotine, et dont l'affinité de liaison est de beaucoup supérieure à celle d'un anticorps pour son antigène. Le fait de lier le même QD à plusieurs récepteurs occasionnerait donc une immobilisation du QD, puisque ces récepteurs, en étant liés les uns aux autres à travers le QD, formeraient une structure n'ayant pas la liberté de diffuser à la membrane. Au fur et à mesure de l'expérience, la probabilité de lier de nouvelles cibles augmente, ce qui peut expliquer l'apparition progressive de QDs immobilisés dus à des liaisons multiples.

Une autre hypothèse, expliquant l'immobilisation progressive des récepteurs extra-synaptiques, est celle du piégeage des récepteurs dans les zones d'endocytose [18]. On peut imaginer que les récepteurs QDs-SAV restent coincés dans de telles zones, alors que les

récepteurs QDs-AB n'y ont pas accès. Cependant, les zones d'endocytose ne sont pas des zones restreintes comme la fente synaptique, donc on pourrait difficilement prétendre que la légère différence de taille entre les deux types de QDs explique l'immobilisation préférentielle des QDs-SAV dans ces zones. Nous pouvons aussi considérer que le QD attaché au récepteur empêche l'endocytose et occasionne une immobilisation soutenue du récepteur dans cette zone d'endocytose en attente. Le fait que l'affinité de liaison du QD-AB pour le récepteur est plus faible pourrait expliquer que le lien se brise lors de l'endocytose (on arrête ainsi de répertorier un récepteur extra-synaptique immobile), alors que le QD-SAV reste lié et freine le processus. Cependant, on ne remarque pas de diminution marquée du nombre de récepteurs total dans la condition QDs-AB (118-101-110-110 récepteurs, voir tableau 1). Une alternative qui ne mène pas à la perte de récepteurs marqués est de considérer qu'un type de complexe sonde-récepteur peut être internalisé alors que l'autre ne le peut pas. Lorsqu'il est internalisé, le récepteur endocytosé se retrouve dans une vésicule membranaire qui peut être transportée dans la cellule. Cela signifierait que dans un cas, ce complexe pourrait subir un transport actif à l'intérieur de la cellule, c'est-à-dire qu'il est transporté par des moteurs moléculaires marchant sur le cytosquelette, au lieu de rester immobilisé à la membrane. Ce transport actif conférerait des dynamiques rapides aux récepteurs QDs-AB internalisés, alors que pour les récepteurs QDs-SAV, on continuerait de répertorier des récepteurs immobiles. Nous n'avons cependant pas remarqué un nombre significatif de cas de transport actif, ces événements étant très rares.

2.2.3 Effet de l'application d'un protocole de stimulation neuronale sur les dynamiques des récepteurs

Nous avons réalisé la même expérience en changeant les solutions d'imagerie pour induire une augmentation de l'activité neuronale dans nos cultures. Après l'acquisition d'un premier film, qui sert de référence à la mobilité des récepteurs avant la stimulation, nous avons appliqué un bain stimulant (solution 0 Mg, glycine 200 μ M) durant 5 minutes. La glycine contenue dans la solution saline active les récepteurs NMDA, alors que l'absence de magnésium (le magnésium bloque les récepteurs) se traduit par une diminution de l'inhibition de l'activité des récepteurs [16]. Ont suivi, respectivement, un film après les 5

minutes de stimulation et 2 films distancés de 5 et 10 minutes post-stimulation (durant ces 10 minutes de «lavage», la solution d'imagerie utilisée est la solution normale) pour vérifier si les changements du comportement des récepteurs se maintiennent dans le temps.

À priori, nous nous attendions à observer une immobilisation des récepteurs à la synapse suivant la stimulation, alors qu'au niveau extra-synaptique, les dynamiques devraient être comparables [16]. En tenant pour acquis qu'un piégeage accru des récepteurs engendre en moyenne des temps de résidence synaptique plus longs, une augmentation des pointages synaptiques était aussi à prévoir. C'est ce que nous avons observé avec le marquage utilisant des QDs-AB, alors que ce n'est pas le cas en condition contrôle (figure 18 C et D). Cependant, cette augmentation des pointages synaptiques n'est liée qu'aux récepteurs ayant passé le plus de temps à la synapse, puisque les médianes sont comparables. Pour les QDs-SAV, nous avons observé une augmentation des pointages synaptiques sans l'application de bain stimulant. Il est important de souligner que le simple effet du temps sur les dynamiques de ces récepteurs marqués rend difficile l'interprétation d'expériences où l'on compare les dynamiques avant/après un protocole chimique. Pour cette raison, nous ne présentons que l'analyse de l'effet de l'application d'un protocole de stimulation pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB.

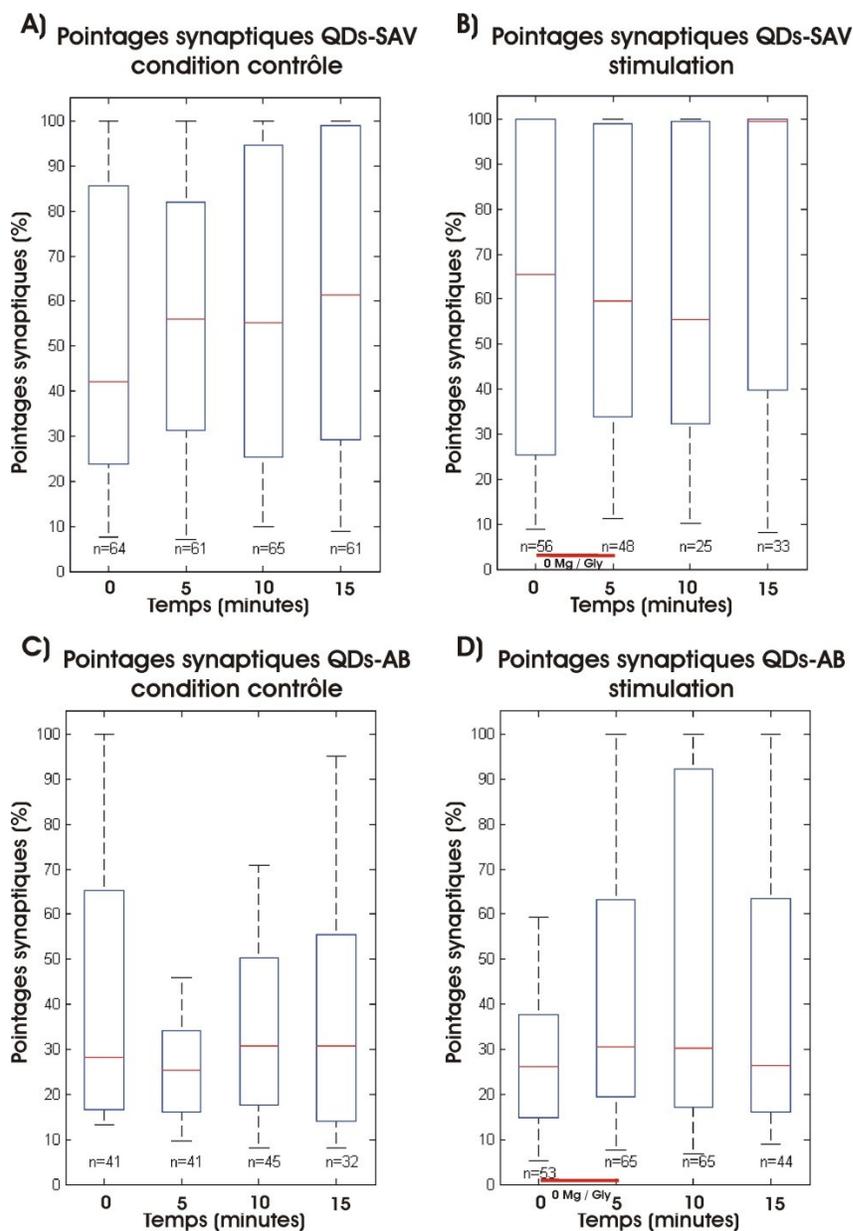


Figure 18: Effet du protocole de stimulation neuronale sur les pointages synaptiques

Diagrammes à barres des pointages synaptiques (n=nombre de récepteurs). Le trait rouge 0 Mg/Gly fait référence à l'intervalle de temps de perfusion avec la solution de stimulation. **A) B)** Pour les récepteurs QDs-SAV (N=5 neurones pour les 2 conditions), ces pointages sont très élevés. Remarquez, au temps = 15 minutes à la figure B, que la moitié des récepteurs sont immobilisés à la synapse (médiane près de 100 %), ce qui est étrange par rapport à l'évolution de ces pointages aux temps précédents. **C) D)** L'application d'un bain stimulant occasionne une augmentation des meilleurs pointages synaptiques pour les récepteurs étiquetés avec des QDs-AB (N=6 neurones pour les 2 conditions), alors qu'en contrôle, on ne note pas cette tendance. Ces pointages sont maximaux 5 minutes après l'arrêt de la perfusion avec la solution de stimulation au profit d'un lavage utilisant la solution saline régulière. Il faut noter que l'activité neuronale de la culture devrait rester anormalement élevée durant les premières minutes du lavage, puisque les concentrations de glycine et de magnésium reviennent lentement à la normale, ce qui est dû au faible débit de perfusion.

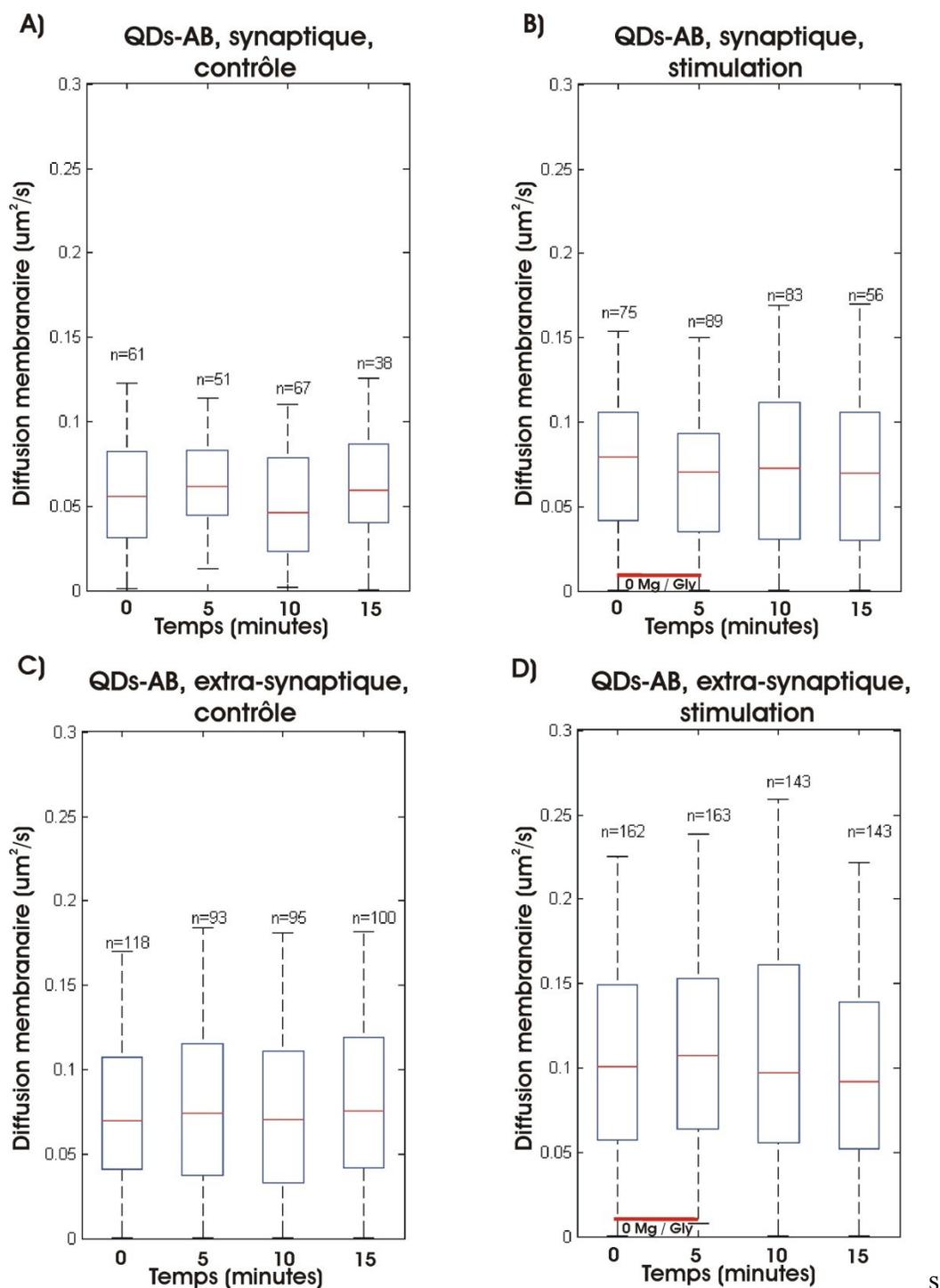


Figure 19 : Effet du protocole de stimulation sur les coefficients de diffusion des récepteurs marqués avec des QDs-AB

Diagrammes à barre des distributions des coefficients de diffusion synaptiques et extra-synaptiques pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB. (n=nombre de trajectoires) **A)B)** Pour les trajectoires synaptiques, le premier quartile et la médiane s'affaissent subtilement et de manière soutenue suivant la stimulation. **C)D)** Les distributions associées aux trajectoires extra-synaptiques sont stables pour les deux conditions.

À la figure 19, nous observons que les coefficients de diffusion des récepteurs QDs-AB extra-synaptiques avant/après stimulation sont stables tout au long de l'expérience, ce qui est en accord avec la littérature [16]. En comparaison, les coefficients de diffusion semblent diminuer pour les trajectoires synaptiques, diminution qui ne permet malheureusement pas de différencier ces échantillons d'un point de vue statistique. La figure 20 compare l'évolution de la fraction immobile des récepteurs à la synapse pour les QDs-AB en condition contrôle et sous stimulation. On remarque que la moyenne de cette fraction immobile n'augmente pas immédiatement après l'application de la solution 0Mg Glycine, mais subit une augmentation de 150 % dans les 10 minutes suivant la stimulation. Pour ces deux temps, l'immobilisation des récepteurs peut expliquer l'augmentation des pointages synaptiques. Cependant, directement après la stimulation, l'augmentation du rapport de temps passé à la synapse n'est pas corrélée au piégeage prolongé des récepteurs.

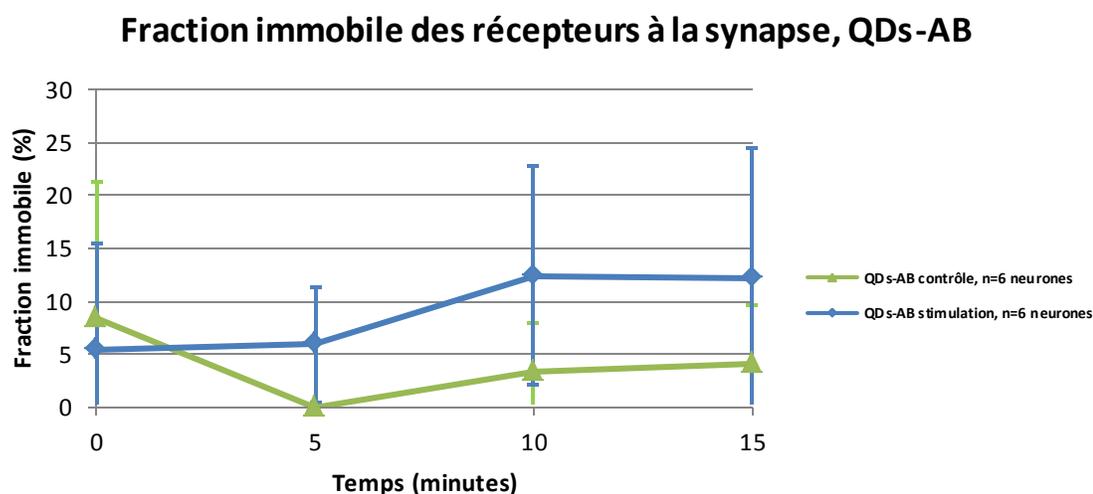


Figure 20 : Effet du protocole de stimulation sur la fraction immobile synaptique des récepteurs-QDs-AB

Progression de la fraction immobile (moyenne \pm écart type, fraction immobile compilée neurone par neurone) des récepteurs à la synapse avec et sans l'application d'un bain stimulant. Une perfusion avec la solution de stimulation (0 Mg/Gly 200 μ M) a été appliquée du temps zéro à $t=5$ minutes. Nous notons un effet d'augmentation de la fraction immobile après 10 minutes.

Pour comprendre le comportement des récepteurs qui a occasionné de plus grandes proportions de temps passé à la synapse suivant la stimulation, nous avons décidé de décortiquer plus en détail les passages synaptiques et de porter un regard sur les temps et les fréquences d'entrées à la synapse.

Le temps d'échantillonnage est un facteur important à considérer pour s'assurer de la pertinence de tels paramètres. Nous avons réuni toutes les fréquences d'entrées de l'expérience en condition contrôle et remarqué que la moyenne était de 0.47 entrée/s, avec une déviation standard de 0.23 entrée/s. Cela correspond, en référence à notre fréquence d'échantillonnage (20 images/s), à une distribution majoritairement comprise entre 1 entrée/ 20 images et 1 entrée/ 80 images. Suivant le critère de Nyquist-Shannon, nous avons donc décidé de ne considérer que les trajectoires de plus de 160 images, et ce pour minimiser l'effet de l'échantillonnage sur les résultats. En ce qui concerne les temps de résidence, 87.5 % de ces derniers ont duré moins de 1.35 s (27 images), et puisque le nombre d'images minimum pour retenir une trajectoire n'a jamais été inférieur à 70 images, nous n'avons donc pas imposé de restriction pour la compilation de ce paramètre.

La figure 21 présente, sous forme de diagramme à barres, les temps de résidence synaptique des récepteurs QDs-AB. Ces distributions montrent que la majorité des temps de résidence sont très courts pour toutes les conditions, avec un premier quartile entre 0.2 s et 0.25 s pour un minimum imposé de 0.15 s (3 images, seuil minimum pour considérer un passage synaptique), et des médianes situées entre 0.3 s et 0.4 s. Cela n'est pas surprenant, puisque la majorité des récepteurs ayant visités la synapse sont des récepteurs mobiles (fraction mobile moyenne minimale de 85 %, figure 20) avec des coefficients de diffusion assez élevés (figure 19). Afin de distinguer les différences au niveau des passages synaptiques plus soutenus, nous avons donc analysé les distributions des temps de passages de 1 s ou plus.

Le numero 1 mondial du memoires

www.rapport-gratuit.com

clubmemoire@gmail.com



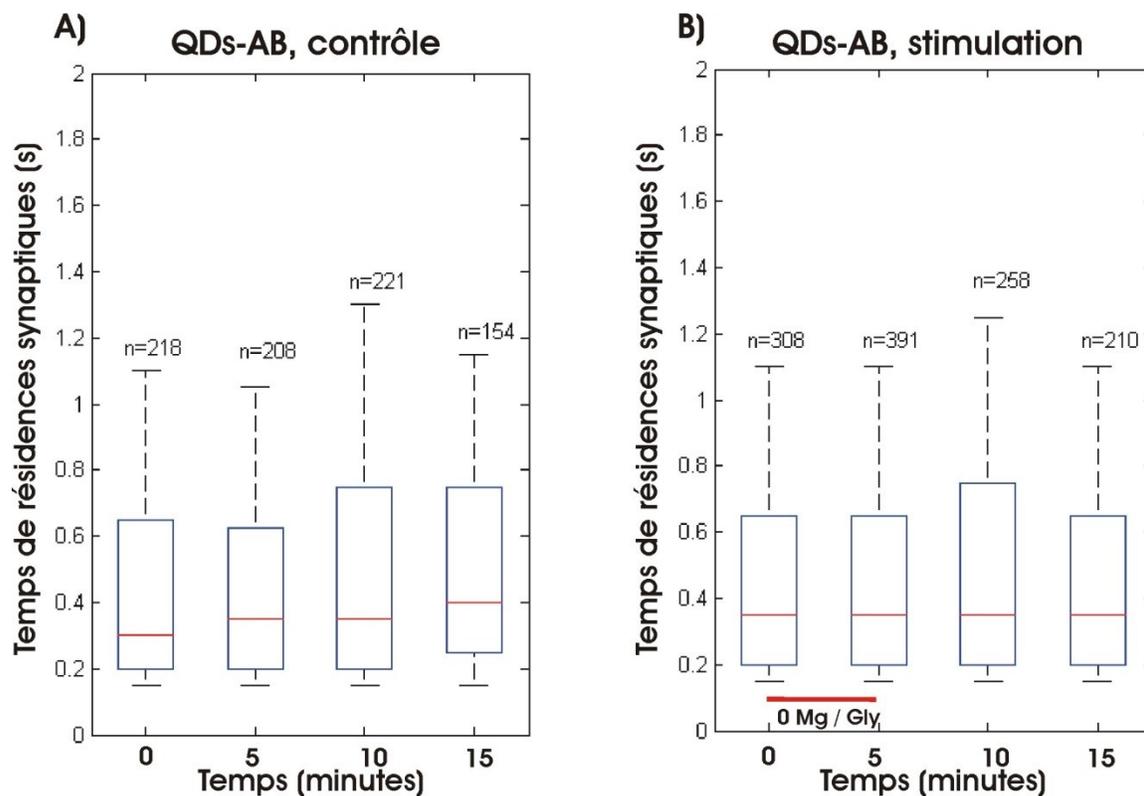


Figure 21: Temps de résidences synaptiques pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB

Temps de résidences synaptiques pour les récepteurs QDs-AB, avec et sans l'application d'un protocole de stimulation chimique (n=nombre de temps de résidences, N= 6 neurones pour les deux conditions). On ne distingue pas de différences dans ces distributions, et par rapport au temps minimal de 0.15 s pour considérer un événement, les temps de résidences sont très courts (premier et troisième quartiles entre 0.2 s et 0.7 s).

À la figure 22, nous présentons, côte à côte, les pointages synaptiques, les distributions des fréquences d'entrées des récepteurs ainsi que ces temps de passages pour l'expérience contrôle (A B et C) et pour l'application du protocole de stimulation (D E et F).

Nous remarquons premièrement, lors de l'application du bain stimulant, que la fréquence des visites synaptiques augmente tout de suite après cette application, avant de diminuer à nouveau. Il semblerait que la stimulation engendre l'apparition de passages synaptiques plus prolongés, surtout après 5 minutes de lavage (t=10 minutes), tout comme une augmentation de la proportion de séjours synaptiques de plus d'une seconde (figure 22 F). Le système de perfusion a un débit très faible, et ainsi, lors des premières minutes du lavage, la concentration de glycine reste très élevée et la concentration de magnésium très faible, de telles sortes que la solution continue d'induire une haute activité neuronale. Il

n'est donc pas surprenant de remarquer un effet maximum de l'apparition des longs temps de résidence à $t=10$ minutes. En condition contrôle, ces durées et ces proportions de longs séjours synaptiques restent comparables lors du lavage, et nous notons même une diminution marquée à $t=5$ minutes, ce qui pourrait expliquer le bas pointage synaptique pour ce temps à la figure 22 A.

Pour $t=5$ minutes, avec stimulation, l'augmentation du pointage synaptique semble être le fruit de récepteurs ayant un taux de visites synaptiques plus élevé combiné à une légère hausse des longs temps de résidences. Pour les acquisitions subséquentes, seule l'augmentation marquée de la proportion et de la durée de ces longs séjours synaptiques est corrélée à la progression des pointages synaptiques.

À la lumière de ces résultats, on peut soutenir l'hypothèse que l'activité accrue des neurones donne lieu à une réponse cellulaire qui favorise les récepteurs mobiles à diffuser à plusieurs reprises dans les synapses et à y rester un peu plus de temps. Nous pourrions imaginer, par exemple, la formation de barrières stables formées de protéines membranaires stabilisées, qui confinaient les récepteurs près des synapses. Cela pourrait expliquer pourquoi nous avons observé une augmentation des pointages synaptiques tout juste après la stimulation, alors que la fraction immobile des récepteurs est restée stable.

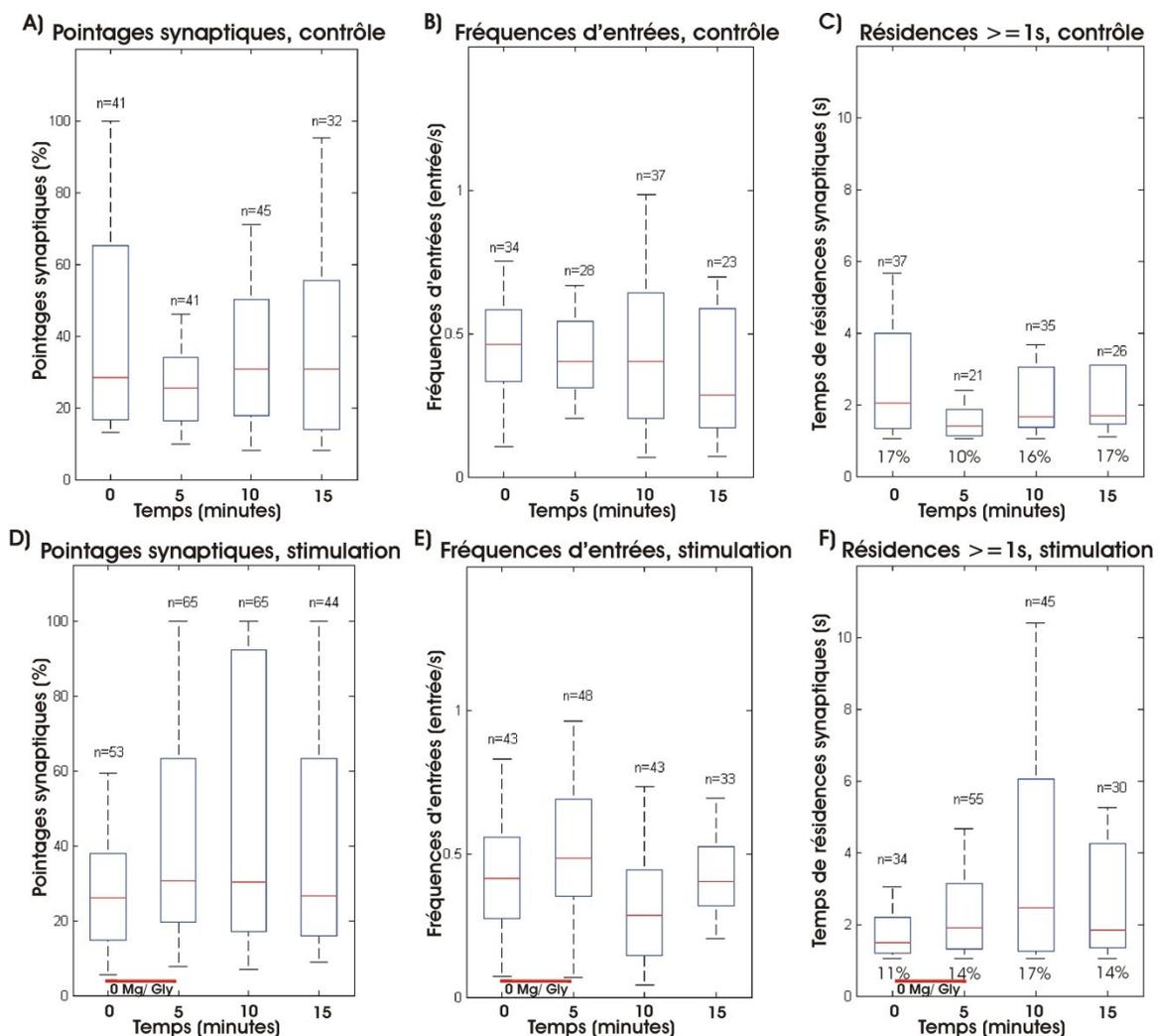


Figure 22 : Comparaison des paramètres de pénétration synaptique pour les récepteurs marqués avec des QDs-AB

Comparaison des pointages synaptiques (n=nombre de récepteurs), des fréquences d'entrées (n=nombre de récepteurs imagés durant plus de 160 images) et des temps de résidences (n=nombre de résidences de plus d'une seconde, les pourcentages au bas des colonnes réfèrent aux proportions de longs séjours par rapport aux nombres totaux de séjours présentés à la figure 21) avec et sans l'application de solution 0 Mg/Glycine 200 μ M. **A)B)C)** En condition contrôle, les fréquences d'entrées médianes baissent avec le temps, et les distributions de pointages synaptiques sont corrélées avec celles des longs temps de résidence. **D)E)F)** Avec stimulation, on note l'apparition marquée de longs passages synaptiques à t=10 minutes, et une augmentation des fréquences d'entrée tout juste après les 5 minutes de perfusion avec la solution 0 Mg/Gly.

Pour les deux dernières séquences d'acquisition, nous avons remarqué l'apparition d'une plus grande proportion de récepteurs immobiles, ce qui s'est traduit par l'apparition de temps de résidences synaptiques plus élevés. Cependant, nous nous attendions à observer une immobilisation marquée des récepteurs à la synapse, qui se serait reflétée par une différence notable des distributions des coefficients de diffusion synaptiques, et qui aurait été observée directement après la stimulation. Il est important de rappeler que l'augmentation des pointages synaptiques n'est pertinente que pour les deux derniers quartiles, et que l'augmentation des séjours synaptiques n'est visible qu'en comparant une minorité de longs séjours. Nous devons donc avouer que les effets induits par la stimulation sont trop limités pour conclure à un lien solide entre application d'un bain stimulant, potentialisation des synapses et changements des types de diffusion des récepteurs à la synapse.

Plusieurs pistes nous viennent à l'esprit pour expliquer l'absence de modifications marquées des dynamiques des récepteurs à la synapse. Premièrement, l'accès limité à la synapse des récepteurs marqués avec des QDs-AB est potentiellement responsable du manque d'immobilisations synaptiques.

Un autre facteur est la variabilité biologique, qui fait en sorte que tous les neurones d'une culture, et surtout d'une culture à l'autre, n'ont pas les mêmes propriétés, d'où l'importance de comparer entre eux les mêmes récepteurs sur les mêmes neurones. Nous en avons un exemple clair à la figure 19, où les neurones dans l'expérience contrôle ont en moyenne des récepteurs moins mobiles que les neurones associés à la condition de stimulation. Il est donc probable que, contrairement aux cultures étudiées par le passé avec des QDs-AB [16], nos cultures répondaient peu au protocole de stimulation chimique. Il est aussi possible que les synapses des cultures que nous avons étudiées étaient en moyenne plus étroites, et que la taille des QDs ait été plus critique par rapport aux expériences rapportées dans la littérature.

Une autre possibilité que nous envisageons est liée à la surexpression de la sous-unité exogène GluR2. Le récepteur AMPA est normalement composé de deux sous-unités,

GluR1 et GluR2. Dans le récepteur normalement constitué, c'est la sous-unité GluR1 qui présente la boucle intracellulaire qui interagit avec les protéines hameçons de la PSD. L'assemblage du récepteur peut se faire à partir d'un seul type de sous-unité, mais cela est assez rare à l'état endogène. Cependant, le transfert de gènes des récepteurs exogènes peut créer un problème de surexpression. Cette surexpression occasionne un débalancement du rapport normal entre la production de GluR1 et GluR2, ce qui peut se traduire par la production d'une grande proportion de récepteurs composés uniquement de sous-unités GluR2. Ne présentant pas les séquences d'acides aminés requises pour être stabilisés à la synapse, ces récepteurs ne pourraient pas y être piégés. Il est aussi possible que la modification génétique du GluR2-HA mène à des anomalies pour les récepteurs présentant l'étiquette, même si ces derniers comprennent des sous-unités GluR-1. Finalement, il ne faut pas oublier que la surexpression du récepteur et de la protéine Homer-GFP peut modifier l'équilibre de la cellule et altérer son fonctionnement normal, l'empêchant ainsi de répondre adéquatement à la stimulation.

2.3 Discussion sur le suivi de récepteurs synaptiques

2.3.1 Comparaison QDs-SAV et QDs-AB

Nous aimerions premièrement discuter de l'impact qu'a le choix de la stratégie de marquage sur les dynamiques des récepteurs. En comparant l'utilisation de QDs-SAV à celle de QDs-AB pour le marquage des récepteurs, nous avons remarqué des différences importantes entre les dynamiques des récepteurs marqués. Contrairement à ce qui a été publié dans le passé [16], le simple effet du temps après le marquage a engendré une immobilisation progressive des récepteurs à la synapse ainsi que sur le reste de la membrane pour les récepteurs liés aux QDs-SAV. Pour les récepteurs liés aux QDs-AB, les dynamiques sont restées comparables pour les 4 temps d'acquisition (15 minutes entre le premier et le dernier film). Il est important de souligner que l'utilisation d'un micro-injecteur pour marquer localement le neurone d'intérêt nous a permis de contrôler adéquatement le temps zéro. Avec la méthode d'incubation globale, le long temps d'incubation et la recherche post-marquage d'un neurone d'intérêt auraient introduit une

grande variabilité entre le moment du marquage des récepteurs et le moment du premier film.

En condition contrôle, nous avons observé en moyenne des neurones avec des synapses à l'équilibre dynamique pour lesquelles les populations de récepteurs étaient relativement constantes. Si le marquage initial n'est pas représentatif de la population dans son ensemble, alors il se pourrait que des changements dans les distributions des dynamiques surviennent entre les premiers films, sans nécessairement qu'il y ait de changements au niveau de l'équilibre dynamique des synapses. Par exemple, il est possible qu'au temps zéro, il y ait une proportion anormalement élevée de récepteurs extra-synaptiques dans notre échantillon. Après un certain temps, l'échantillon de récepteurs marqués deviendrait plus représentatif de la population totale à l'équilibre dynamique. Cette hypothèse pourrait expliquer l'émergence d'une plus grande proportion de récepteurs immobilisés à la synapse après le temps zéro, mais cela n'explique pas pourquoi nous avons observé le phénomène pour un seul type de sonde.

Nous pouvons cependant poser l'hypothèse que les QDs-SAV sont plus compacts que les QDs-AB, et que leur plus petite taille permet aux récepteurs marqués d'accéder à des sites d'immobilisation prolongée dans la synapse, ce qui n'est pas le cas des récepteurs-QDs-AB. Pour soutenir cette hypothèse, nous devons donc considérer que certains récepteurs marqués initialement à l'extérieur des synapses les pénètrent et y sont immobilisés sur de très longues périodes, périodes de l'ordre de grandeur des 15 minutes pour lesquelles nous avons noté une progression de la fraction immobile. Cela requiert l'existence d'une proportion non négligeable de récepteurs immobilisés sur de telles périodes. L'explication est la suivante : si la moyenne des longs temps de résidence propre à l'équilibre dynamique est beaucoup plus grande que l'intervalle de temps entre plusieurs acquisitions successives, alors il serait possible de voir l'émergence graduelle de cette population piégée. Cependant, si les longs temps de résidence sont par exemple de l'ordre de la minute, alors sur une attente de 5 minutes, il devrait avoir beaucoup de cycles d'échanges entre les compartiments cellulaires qui donneraient lieu, en moyenne, à des distributions de dynamiques de récepteurs comparables pour deux acquisitions successives.

En résumé, l'hypothèse selon laquelle la taille inférieure des QDs-SAV est responsable de l'immobilisation progressive des récepteurs échantillonnés s'appuie sur l'existence d'une proportion importante de récepteurs immobilisés sur de très longues périodes. Cependant, la différence du diamètre des QDs d'environ 10 nm (voir Annexe 4, *zeta-sizer*) n'explique pas pourquoi les récepteurs marqués avec les QDs-SAV sont aussi immobilisés de manière graduelle à l'extérieur de la synapse. Cette différence de diamètre semble permettre une meilleure accessibilité synaptique pour les récepteurs marqués avec les QDs-SAV, car les pointages synaptiques sont plus élevés, pour ce type de sonde, à tous les temps d'acquisition.

Pour expliquer l'immobilisation progressive des récepteurs à l'intérieur et à l'extérieur des synapses, l'hypothèse des liaisons multiples dues à la multivalence des QDs-SAV est aussi à considérer. Celle-ci est en accord avec le fait que les récepteurs se soient immobilisés partout sur le neurone. De plus, la différence de valence entre les deux types de sonde est claire, les QDs-SAV ayant beaucoup plus de sites d'ancrages avec de meilleures affinités que les QDs-AB. Il serait d'ailleurs intéressant de refaire ces expériences en préincubant les QDs-SAV avec de la biotine, pour que cette dernière occupe une portion des sites d'ancrages des QDs-SAV. Nous pourrions ainsi vérifier si cette étape occasionne une diminution de l'apparition progressive de la fraction immobile synaptique et extra-synaptique.

Il reste cependant un facteur d'incertitude pour comparer les deux sondes, puisque les cibles à l'étude étaient le fruit de l'expression de constructions génétiques distinctes. Pour les deux conditions, il peut donc exister des différences non négligeables dans le niveau d'expression de la cible, et aussi dans le comportement individuel des cibles, différences qui peuvent influencer les dynamiques des récepteurs. On peut imaginer, par exemple, une membrane trop riche en récepteurs dans un cas, alors que dans l'autre le rapport entre le nombre de protéines et les lipides est plus près du niveau endogène. Il est aussi possible qu'un récepteur avec un type d'étiquette soit la plupart du temps composé strictement de sous-unité GluR2, alors qu'avec l'autre étiquette, la composition du récepteur est plus près de la normale. Puisque c'est la sous-unité GluR1 qui est équipée des boucles intracellulaires qui interagissent avec les échafaudages stabilisateurs, le fait de manquer de sous-unité

GluR1 dans la composition des récepteurs pourrait avoir une grande influence sur l'immobilisation des récepteurs liés aux QDs.

Pour se libérer de la variabilité biologique liée à l'expression des plasmides, une alternative serait de travailler à l'élaboration d'un plasmide codant une sous-unité équipée des deux étiquettes à la fois. Cela permettrait premièrement d'éliminer l'incertitude liée au comportement individuel du récepteur exogène. Pour minimiser l'effet de l'expression variable des plasmides dans différents neurones, il serait possible de pratiquer les expériences sur les mêmes neurones, en utilisant deux couleurs d'émission distinctes pour les différentes sondes. Puisque le spectre d'émission des QDs est très étroit, ils sont le type de sonde idéal pour ce genre d'expérience multicolore, et nous pouvons aisément isoler les signaux en variant les filtres d'émission. De plus, les QDs-SAV et QDs-AB commerciaux sont aussi disponibles avec une longueur d'onde d'émission pic à 705 nm.

2.3.2 Effet de la stimulation neuronale sur les dynamiques des récepteurs

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux modifications des dynamiques des récepteurs suivant l'application d'un protocole de stimulation neuronale chimique. Puisqu'en condition contrôle, l'effet temporel influençait le comportement des récepteurs QDs-SAV, nous avons mis l'accent sur l'analyse des coefficients de diffusion et des statistiques de pénétration synaptique pour les QDs-AB.

Les coefficients de diffusion des récepteurs à la synapse n'ont pas changé de manière marquée, mais nous avons remarqué une légère diminution soutenue du premier quartile et de la médiane suivant la stimulation, alors que pour les trajectoires extra-synaptiques il n'y avait pas cette tendance. Néanmoins, pour les récepteurs passant le plus de temps à la synapse, les distributions des pointages synaptiques étaient en hausse suivant le bain de solution 0 Mg / Glycine 200 μ M, tandis que, sans l'application de la solution de stimulation, aucune hausse n'a été observée. C'est après les 5 premières minutes de lavage que nous avons observé les plus hauts pointages synaptiques, qui se sont reflétées par l'apparition de séjours synaptiques prolongés.

La faible proportion de ces longs séjours et le fait que, pour les quatre temps d'acquisition, la plupart des trajectoires synaptiques étaient toujours issues de récepteurs diffusant rapidement, laisse présager que les récepteurs avaient de la difficulté à s'y immobiliser. En comparaison, rappelons que le groupe de Choquet a évalué la fraction immobile des récepteurs endogènes à la synapse en condition basale aux alentours de 50 %, en utilisant, comme traceurs, tant des anticorps couplés à des fluorophores organiques (courtes trajectoires) [49] que des QDs [50]. Il serait donc intéressant de répéter notre expérience en insérant, par le biais du génie génétique, les étiquettes sur une sous-unité GluR-1, puisque c'est cette dernière qui a les boucles intracellulaires qui interagissent avec les échafaudages stabilisateurs. Nous aurions ainsi la certitude que les récepteurs exogènes ont tout ce qu'il faut pour être piégés à la synapse.

Nous devons spécifier que le temps d'échantillonnage de 15 s (300 images à 50 ms/image) était court pour évaluer correctement les fréquences d'entrées. Ce temps d'échantillonnage représente aussi la limite supérieure des longs temps d'immobilisation recensés, et il a une influence sur les pointages synaptiques. Pour ces derniers, plus le temps d'acquisition est court, plus les distributions sont poussées vers des pointages élevés. On explique cela par le fait que ce ne sont que les récepteurs ayant visité les synapses pour un minimum de 20 images qui sont considérés, qu'ils passent en moyenne plus de temps à l'extérieur de la synapse qu'à l'intérieur, et que le nombre d'images total d'une trajectoire représente le dénominateur de ce pointage.

Idéalement, il faudrait échantillonner les récepteurs sur de plus longues périodes, ce qui est possible grâce à la grande photostabilité des QDs. Cependant, il y a un coût associé aux longs temps d'échantillonnage, car la longueur d'onde d'excitation des QDs photoblanchie le marqueur synaptique Homer-GFP. C'est d'ailleurs cette particularité qui m'a incité à réaliser des films de 15 s, car pour les 2 derniers films, le contraste de la fluorescence de Homer-GFP du neurone transfecté avec l'autofluorescence des neurones avoisinants était souvent près de la limite acceptable. Il y a aussi un autre inconvénient lié aux longs temps d'acquisition : la phototoxicité. Nous excitons les QDs avec de la lumière bleu-UV, et, au niveau de l'imagerie de neurones vivants, cette lumière peut être toxique si les dépôts d'énergie sont trop importants.

2.3.3 Combiner des méthodes hyper-résolutives pour les trajectoires des récepteurs et la localisation des synapses

Il reste un enjeu de taille à discuter, qui est lié à la grande importance du statut intérieur/extérieur synapse que l'on accorde à chaque positionnement de récepteur. Le fait est que nous utilisons une technique hyper-résolutive pour le positionnement des récepteurs, alors que l'image des synapses issue de la fluorescence de Homer-GFP est soumise à la limite de la diffraction de la lumière.

Ainsi, la faiblesse majeure de notre analyse réside dans ce que nous considérons comme une synapse, puisque la surface de cette structure (diamètre moyen aux alentours de 500 nm) est de l'ordre de grandeur de la limite de diffraction pour de la lumière verte (environ 250 nm). De plus, le seuillage n'est jamais parfait pour toutes les synapses, il dépend de l'expérimentateur lors de l'ajustement des paramètres de détections, et la taille de l'unité minimale d'espace synaptique est le pixel, associé à une surface de 254 nm x 254 nm sur l'échantillon. Finalement, une grande proportion des détections synaptiques se fait à la périphérie de ce que nous considérons comme les synapses, là où l'incertitude sur le statut structurel de l'espace visité est la plus grande. Nous avons besoin d'une identification plus précise des synapses, pour s'assurer que les QDs pénètrent réellement dans la fente synaptique et pour mieux comparer l'accessibilité des différentes sondes.

Le prochain défi à relever est donc de jumeler la reconstitution hyper-résolutive des trajectoires de récepteurs uniques à l'imagerie hyper-résolutive des synapses. Il existe deux types de microscopie pour atteindre cet objectif. On peut par exemple utiliser la microscopie balayée pour induire l'émission, point par point, de surfaces d'échantillon plus petites que la limite de la résolution de la lumière. Cela est possible grâce à l'utilisation de faisceaux excitateurs spéciaux, comme dans le cas de la *Stimulated Emission Depletion microscopy* (STED). Cette technique nécessite cependant l'utilisation de faisceaux lasers très puissants et d'un montage complexe où l'alignement des composantes optiques est critique. Ce n'est donc pas l'option idéale pour jumeler l'imagerie des synapses au suivi de molécules uniques sur des neurones vivants.

L'autre alternative consiste à utiliser la microscopie à champs large et à faire allumer les sources de fluorescence une par une, ce qui permet une précision de pointage de quelques dizaines de nanomètres à partir du lissage gaussien subséquent sur chacune des PSF uniques. Il faut premièrement avoir des sources de fluorescences photo-activables, qui ont été développées ces dernières années pour l'imagerie hyper-résolutive de fluorophores synthétiques (STORM) et l'imagerie hyper-résolutive de fluorophores génétiquement encodés (PALM). La plateforme pour effectuer de telles expériences est la même que celle que nous utilisons déjà pour le suivi des récepteurs (microscope à épi-fluorescence équipé d'une caméra ultra-sensible), à la différence près qu'il faille insérer des lasers excitateurs adéquats. Ces derniers ne nécessitent cependant pas d'alignement compliqué.

Nous avons déjà développé, au laboratoire, la fusion entre la protéine Homer et la protéine fluorescente mEos, qui passe d'une émission verte à une émission orange suivant l'activation de la protéine à 405 nm. Il serait donc intéressant d'utiliser cette construction génétique, au lieu du Homer-GFP conventionnel, et d'effectuer l'imagerie des synapses dans le canal orange par l'accumulation des positions hyper-résolues des Homer-mEos activées. L'imagerie dynamique hyper-résolue d'épines sur des neurones vivants a déjà été effectuée en utilisant ce type de fusion fluorescente, avec une fenêtre temporelle idéale de 50 s pour l'accumulation des positions [51]. Il serait donc possible de prendre une image de synapses durant les 30 secondes précédant la réalisation du film des dynamiques de récepteurs et les 30 secondes suivant ce film, et de combiner ces deux distributions de points pour former l'image des synapses associée à ce film. Puisque Homer s'accumule à la synapse, nous nous attendons à avoir un saut abrupt de la concentration de points aux synapses par rapport à la concentration sur le reste du neurone. À l'opposé, l'imagerie de milliers de Homer-GFP confondus donne lieu à des gradients d'intensités plus lisses et ne permet pas de dresser les frontières de la synapse à l'intérieur même des pixels.

Chapitre 3: Biofonctionnalisation de points quantiques

Un objectif important du projet est de tester de nouvelles approches de fonctionnalisation de points quantiques dans le but de marquer des neurones. Pour fonctionnaliser des sondes plus compactes, nous avons testé différentes stratégies d'enrobage de QDs à partir de monocouches de molécules hydrophiles. Il est donc ici question de techniques de biofonctionnalisation de QDs qui sont hydrophobes après leur synthèse. Nous présenterons premièrement trois techniques d'échange de ligands, utilisant respectivement de l'acide dihydrolipoïque (DHHLA), du PEG-DHHLA et de courts peptides de 20 acides aminés, et qui permettent de disperser les QDs en milieu aqueux. Ensuite, nous détaillerons 2 types de conjugaison pour attacher des streptavidines à la surface de ces QDs hydrophiles. De plus, nous aborderons la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose, qui permet de valider la qualité de l'échantillon après l'échange de ligands, et de résoudre les populations de QDs selon le nombre de protéines attachées. Finalement, nous présenterons les marquages résultant de l'incubation de petits QDs fonctionnalisés (diamètre hydrodynamique entre 10 nm et 20 nm) sur des échantillons de cellules.

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Échanges de ligands

ÉCHANGE AVEC LE DHHLA

L'utilisation du DHHLA est une solution simple et économique pour solubiliser les QDs. De tous les ligands que nous avons utilisés, le DHHLA est la molécule la plus courte. Le ligand a été préparé à partir d'acide lipoïque (Sigma, cat no T5625). La réduction du pont disulfure en thiols (figure 23), pour transformer l'acide lipoïque en acide dihydrolipoïque, s'est faite suivant des procédures standards [39].

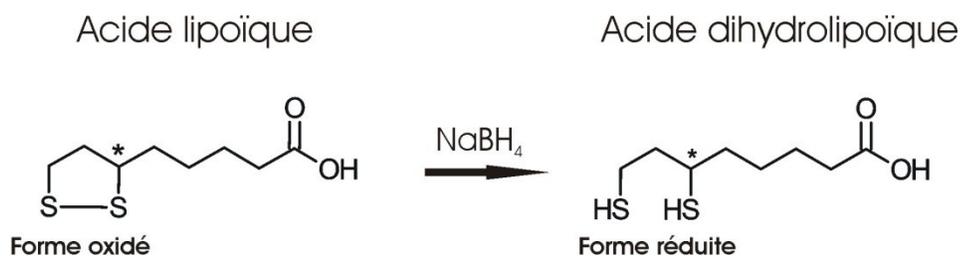


Figure 23: Réduction de l'acide lipoïque en acide dihydrolipoïque

L'échange de ligands s'est fait sur des QDs à coquilles multiples (CdSe/CdS/Cd_{0,5}Zn_{0,5}S/ZnS). Ces QDs ont l'avantage de n'avoir que de faibles contraintes, car le paramètre de maille du CdS est très près de celui du CdSe, et un bon confinement optique, car la bande interdite du ZnS a une énergie supérieure à celle du CdS.

PURIFICATION DES QDs

Les QDs sont conservés dans l'hexane avec un excès de ligands de synthèse. Il est important, avant l'échange de ligands, de purifier les QDs de cet excès de ligands de synthèse. Pour ce faire, nous procédons à un minimum de trois cycles de purification. Dans un tube conique de 1.5 mL, nous avons mélangé 100 µL de QDs entre 60 nM et 70 nM à 1 mL d'isopropanol. Après une centrifugation de 5 minutes à 15 000 tours/minute, nous avons éliminé le surnageant. Nous avons ensuite dilué le dépôt solide de QDs dans le volume initial d'hexane, et avons répété ces étapes deux autres fois.

ÉCHANGE DE LIGANDS

Nous avons par la suite mélangé les 100 µL de QDs purifiés en suspension dans l'hexane à 300 µL de DHLA, et nous avons fait chauffer le mélange 24 h à 60 °C. Les ligands sont labiles, et c'est le grand excès de DHLA par rapport aux ligands de synthèse qui permet l'échange. Il faut faire attention de ne pas sceller le contenant du mélange, pour laisser s'échapper l'hexane et éviter ainsi une montée de pression dans le contenant.

EXTRACTION DES QDs HYDROPHILES

Après l'échange de ligands, nous avons dilué le mélange dans 1 mL de diméthylformamide (DMF). Nous avons ensuite ajouté environ 30 mg de potassium-tert-butoxide, et nous avons mélangé jusqu'à ce que la poudre soit totalement dissoute. Nous avons fait précipiter les QDs en centrifugeant le mélange 3 minutes à 5000 révolutions par minute (RPM), et nous avons éliminé le surnageant. Nous avons ensuite dilué les QDs dans 300 μ L d'eau très basique (mélange avec du potassium-tert-butoxide jusqu'à pH 13). Finalement, nous avons procédé à un échange de tampons, en utilisant du tampon borate à 20 mM comme nouveau tampon. Pour ce faire, nous avons utilisé un filtre à centrifugation vivaspin 500 avec une membrane à coupure moléculaire de 10 KDa (GE Healthcare, cat no 28-9322-25), et nous avons rincé l'échantillon 3 fois avec le nouveau tampon en centrifugeant 10 minutes à 15 000 RPM. Nous avons récupéré les QDs et les avons dilués dans 300 μ L de tampon borate à 20 mM.

ÉCHANGE AVEC LE PEG-DHLA

Le principal inconvénient lié à l'utilisation de QDs-DHLA pour marquer des cellules est le grand nombre de liaisons non spécifiques qu'ils forment sur le tissu biologique. De plus, leur solubilité dépend principalement du groupement carboxylé, ce qui peut occasionner des problèmes d'agrégation en milieu acide. L'insertion de polyéthylènes glycols (PEGs) dans le ligand permet de diminuer les interactions non spécifiques de la sonde avec le tissu biologique, et d'avoir une polarité moins dépendante du groupement carboxylé.

PRÉPARATION DU LIGAND

Il est maintenant possible de se procurer commercialement des ligands PEG-acide lipoïque (Quanta biodesign) avec différents nombres d'éthylènes glycols dans la chaîne. Au moment où nous avons réalisé les échanges de ligands, ces produits n'étaient malheureusement pas disponibles, donc nous avons dû préparer le PEG-DHLA à partir d'acide lipoïque et de amino-PEG₄-t-butyle-ester (Quanta biodesign, cat no 10221). En annexe, nous présentons en détail le protocole de cette préparation. Celle-ci se fait en trois étapes : (a) la conjugaison entre les 2 molécules en utilisant de l'EDC comme réactif, (b) la déprotection du t-butyle-

ester pour libérer le carboxyle et (c) la réduction du pont disulfure pour former deux thiols (figure 24). L'étape de réduction du pont disulfure est nécessaire pour préparer le PEG-DHLA à partir du PEG-acide lipoïque qui est maintenant disponible commercialement. Il est important de conserver le PEG-DHLA sous vide ou sous azote pour éviter la formation de ponts disulfures par oxydation.

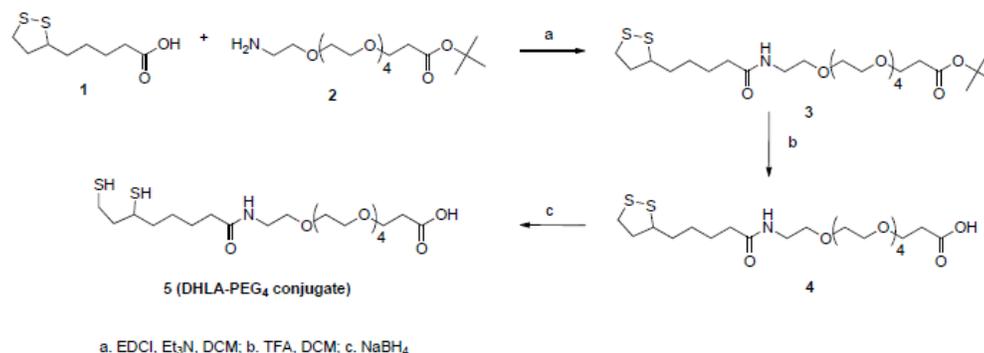


Figure 24 : Préparation du PEG-DHLA avec l'acide lipoïque et l'amino-PEG₄-t-butyle ester

En suivant les flèches : **a)** Conjugaison entre les 2 molécules en utilisant de l'EDC comme réactif. **b)** Déprotection du t-butyle ester pour libérer le carboxyle. **c)** Réduction du pont disulfure.

ÉCHANGE DE LIGANDS

Pour la préparation de QDs PEG-DHLA, nous avons utilisé des QDs cœur-coquille, avec une structure cristalline CdSe/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/ZnS. L'échange de ligands a été inspiré de procédures rapportées dans la littérature [6]. Nous avons pris soin de peser un tube conique de 1.5 mL, avant de le remplir avec 300 µL de QDs. Après trois purifications, en utilisant de l'isopropanol, nous avons éliminé le surnageant, pesé le tube avec le dépôt solide et évalué la masse de QDs à environ 5 mg. Les détails de la purification des QDs de leur excès de ligands de synthèse sont présentés dans les méthodes associées à l'échange de ligands avec du DHLA.

Nous avons ensuite dilué ces QDs dans 30 µL d'hexane, pour facilement les transférer dans un ballon contenant 30 µL de PEG-DHLA. Ensuite, le ballon a été rempli d'azote, recouvert d'un septum et inséré sur un support en mouvement rotatif dans un bain chauffant à 60 °C pendant 3 h. Durant le premier essai, le septum a été éjecté. Pour éviter ce

problème, lié à une montée de pression à l'intérieur du ballon, nous avons installé une petite sortie de gaz en insérant une aiguille à seringue dans le septum.

EXTRACTION DES QDs HYDROPHILES

Après l'échange, nous avons dilué le produit dans 200 μL d'éthanol, en prenant soin de bien rincer la paroi du ballon, pour ensuite transférer le mélange dans un tube de 1.5 mL. Le produit étant très précieux, nous avons rincé le ballon une deuxième fois avec 100 μL d'éthanol et ajouté ce mélange dans le tube. Nous avons successivement ajouté 50 μL de chloroforme et 500 μL d'hexane, en brassant le produit entre chaque ajout. Une centrifugation à 5000 RPM pendant 5 minutes a mené à la sédimentation des QDs hydrophiles. Après élimination du surnageant, nous avons dilué les QDs PEG-DHLA dans 300 μL de PBS dont le $\text{pH} = 7.4$.

PURIFICATION DES QDs HYDROPHILES

La purification du produit récupéré après l'extraction s'est faite en 2 étapes. Nous avons effectué une chromatographie dans une colonne de 5mL composée d'un gel sephadex G-25 (GE Healthcare, cat no 17-0853-01). Ensuite, le produit a été filtré par centrifugation à l'aide de 3 rinçages dans un filtre vivaspin 500 à coupure moléculaire de 10kDa.

Pour la chromatographie, il est important de rincer la colonne 3 fois avec du PBS $\text{pH} 7.4$ avant de l'utiliser. Après cette étape, nous avons déposé les QDs sur le dessus de la colonne et nous les avons laissé pénétrer dans le gel. Ensuite, nous avons rempli l'espace au-dessus du gel avec du PBS, ce qui a pour effet de faire couler la phase liquide à travers la colonne. Étant équipé d'une lampe UV, nous avons surveillé le passage du produit fluorescent à travers la colonne. Nous n'avons pas récupéré la première goutte fluorescente qui est sortie, car cette dernière peut contenir de grosses particules indésirables. Nous n'avons recueilli que les 10 gouttes suivantes, même si la solution qui continuait de sortir était fluorescente. Les QDs ont ensuite été déposés dans un filtre vivaspin 500. Nous avons centrifugé 5 minutes à 5000 RPM. Après avoir répété cette étape 2 fois, nous avons conservé la solution de QDs concentrée ayant un volume d'environ 10 μL à 20 μL .

ÉCHANGE AVEC LES PEPTIDES

Les peptides composés de 20 acides aminés utilisés pour la solubilisation des QDs sont des molécules plus grosses que les 2 types de ligands précédemment décrits. En effectuant des mesures en microscopie électronique, le groupe du Dr Maxime Dahan a évalué l'épaisseur de cet enrobage aux alentours de 2 nm, ce qui contribue à une augmentation du diamètre des QDs d'environ 4 nm [5]. Les ligands de synthèse et les petits ligands hydrophiles, qui sont composés de quelques dizaines d'atomes, peuvent difficilement former une couche de molécules de moins d'un nanomètre d'épaisseur. Ainsi, bien que les peptides soient légèrement plus gros, on peut considérer qu'ils appartiennent quand même à la catégorie des plus petits enrobages pour solubiliser les QDs.

Deux avantages des peptides sont qu'ils sont disponibles commercialement et peuvent être utilisés tels quels. Pour le type d'application recherché, nous pouvons choisir la séquence d'acides aminés et faire l'achat de cette séquence d'intérêt. Dans le cas présent, le choix des peptides et le protocole d'échange de ligands ont été développés par le Dr Fabien Pinaud, de l'École Normale Supérieure, à Paris. Une description sommaire de l'échange de ligand est présentée par Dahan *et al.* [5]. Pour plus de détails, nous présentons une description étape par étape de ce protocole en annexe.

Nous avons testé cet échange de ligand sur 2 échantillons de QDs CdSe/ZnS commerciaux (Evident tech.) dont le pic d'émission est respectivement de 605 nm et de 655 nm, et en suspension colloïdale dans le toluène. Les ligands de synthèse sur ces QDs sont composés en partie de TOPO et d'autres molécules pour lesquelles Evident tech. ne fournit pas d'information. Nous avons aussi testé ces échanges de ligands sur différents QDs synthétisés au laboratoire du Dr Claudine Allen. Ces QDs sont enrobés d'acide oléique et d'oleylamine, et ils sont en suspension dans l'hexane. Les QDs utilisés sont des cœur-coquille de CdSe/ZnS, CdSe/Cd_{0,5}Zn_{0,5}S et CdSe/CdS. Nous avons aussi fait l'échange de ligands sur deux types de QDs avec plusieurs coquilles de matériaux différents : CdSe/CdS/Cd_{0,5}Zn_{0,5}S/ZnS et CdSe/Cd_{0,5}Zn_{0,5}S/ZnS.

3.1.2 Conjugaison de la streptavidine (SAV)

Nous avons utilisé deux types de conjugaison pour lier de manière covalente de la SAV avec des QDs. Dans ces deux schémas de liaison, c'est l'amine primaire de la SAV qui est visée.

Pour les QDs DHLA et PEG-DHLA, nous avons utilisé du 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) pour former un lien amide entre la SAV et le carboxyle à l'extrémité de ces ligands. L'utilisation d'EDC engendre la formation de sous-produits indésirables, et la cinétique de réaction avec ce réactif est très rapide. Pour améliorer le rendement de la réaction, et ainsi diminuer la quantité de réactif utilisée, il est possible de stabiliser la réaction en utilisant du sulfo-N-hydroxysulfo-succinimide (sulfo-NHS) de concert avec l'EDC [43].

Une autre alternative, pour lier la SAV à partir d'une de ses amines primaires, est d'utiliser une molécule intermédiaire dont l'une des extrémités est un NHS-ester. Le Succinimidyl 4-(N-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), qui est une molécule avec un groupement NHS-ester réactif aux amines et un groupement maléimide réactif aux thiols, permet de coupler la SAV aux QDs-peptides qui présentent des thiols libres à leur surface.

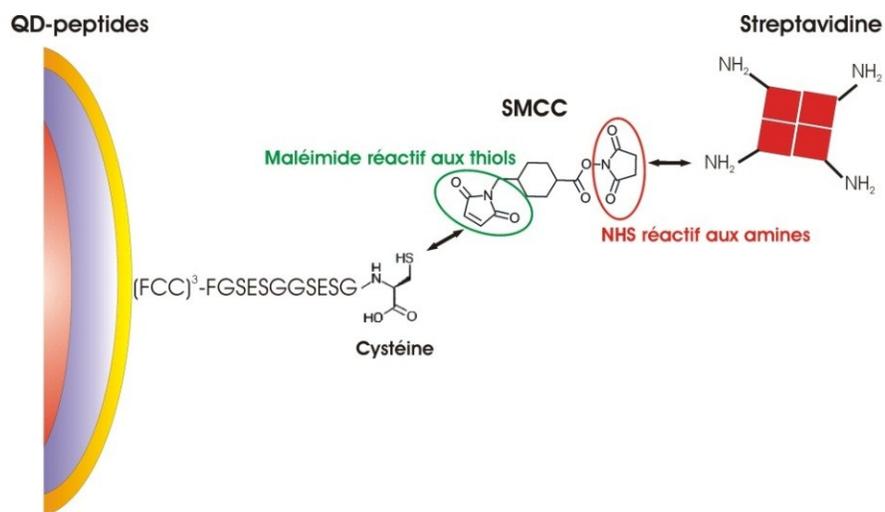


Figure 25: Utilisation du SMCC pour lier la streptavidine aux QDs-peptides

Conjugaison de la SAV sur les QDs-peptides en utilisant le SMCC. Le NHS du SMCC se lie de manière covalente à l'une des amines primaires de la SAV, alors que le maléimide du SMCC se lie de manière covalente avec et le thiol présent sur les cystéines des peptides. Figure inspirée de [5].

CONJUGAISON DE LA SAV AVEC LES QDs-DHLA :

RÉACTION

Pour cette conjugaison, nous avons utilisé de l'EDC (Sigma Aldrich, cat no 03449) comme réactif. Nous nous sommes procurés de la SAV lyophilisée (Sigma-Aldrich, cat no 85878), que nous avons aliquotée à 2 mg/mL (36 μ M) avec de l'eau distillée. Pour la préparation de 3 échantillons avec des ratios de SAV variables, nous avons dilué 60 μ L de QDs-DHLA (concentration approximative de 30 μ M) dans 1 mL de tampon borate 10 mM à pH 7.4. Nous avons par la suite mélangé 10 μ L d'eau distillé dans un aliquote de 10 μ L de SAV pour avoir une concentration de protéines à 1 mg/mL (18 μ M).

Nous avons filtré les QDs dans un filtre seringue à membrane PES avec des pores de 0.2 μ m et nous avons divisé le volume également dans 3 tubes coniques (environ 320 μ L par tube étant donnée la perte dans le filtre seringue). Nous avons ajouté 1, 2 et 5 μ L de SAV 1 mg/mL dans les différents tubes, et nous avons mélangé les solutions sur le vortex. Entre-temps, nous avons préparé 1 mL d'EDC à 10 mg/mL dans de l'eau distillée (il est préférable de garder l'EDC en poudre au congélateur et de préparer la solution juste avant la conjugaison). Pour chaque solution, nous avons ajouté doucement 5 μ L d'EDC à 10 mg/mL alors que le tube était sous agitation, et nous avons laissé les solutions réagir à température pièce pendant deux heures. Nous avons répété ces étapes en utilisant la même quantité de QDs avec, 2 μ L, 5 μ L et 10 μ L de SAV et 10 μ L d'EDC.

PURIFICATION DES QDS

Après la réaction, nous avons filtré les échantillons dans un filtre seringue à membrane de PES avec des pores de 0.2 μ m (cette étape permet d'éliminer les gros agrégats). Nous avons déposé la solution filtrée dans un filtre vivaspin 500 à coupure moléculaire de 100 kDa, et nous avons centrifugé 10 minutes à 7000 RPM. Nous avons ensuite rempli le filtre avec du tampon borate 20 mM à pH 8.3, avant d'effectuer une autre centrifugation à 7000 RPM (répéter cette étape 2 fois). Pour les trois premiers échantillons, nous avons ajouté 40 μ L de tampon borate 20 mM à pH 8.3 aux 10 μ L de QDs concentrés dans le vivaspin, et nous avons directement transféré les échantillons pour les conserver. Pour les 3 derniers

échantillons, nous les avons dilués dans 500 μL de tampon borate et les avons filtrés dans un filtre seringue avant de les récupérer.

CONJUGAISON DE LA SAV AVEC LES QDs-PEG-DHLA :

Pour les échantillons de QDs PEG-DHLA, nous avons simplement mélangé les QDs à différents ratios de SAV et d'EDC, avant de vérifier le résultat de la conjugaison par électrophorèse sur gel d'agarose. Nous avons donc mélangé 1 μL de QDs PEG-DHLA dans du PBS à différents volumes de SAV diluée dans du tampon Hepes (20 mM Hepes, 50 mM de NaCl) à une concentration de 1 mg/mL. Le volume total a été ajusté à 11 μL avec la balance de tampon Hepes. Nous avons calmement ajouté 1 μL d'EDC à 2 mM ou 40 mM alors que l'échantillon était sous agitation. Nous avons laissé réagir durant 1 h à température pièce.

CONJUGAISON DE LA SAV AVEC LES QDs-PEPTIDES :

Une description détaillée de ce protocole est présentée en annexe. Le SMCC est composé d'un maléimide qui se lie aux thiols des QDs-peptides et d'un NHS-ester qui se lie aux amines de la SAV. Pour attacher un NHS-ester aux amines d'une protéine, il faut faire attention aux produits de conservation des protéines ainsi qu'aux tampons de réaction. Pour la conservation, certains échantillons de protéines contiennent de la gélatine ou du sérum, qui sont riches en amines. Lors de la réaction, ces amines peuvent compétitionner avec les amines appartenant aux protéines à coupler. De même, certains tampons, comme le tris-acétate, contiennent des amines qui auront le même effet de compétition.

Alors que le groupement NHS-ester est très réactif en milieu aqueux, le maléimide qui se lie aux thiols est stable sur de longues périodes (de 1 à 2 jours à 4 °C). On utilise donc le SMCC en activant premièrement les protéines présentant les amines. Dans cette réaction, certains NHS-esters perdent leur réactivité avant de se lier aux amines, alors que les maléimides restent fonctionnels. Il peut donc être favorable de purger les protéines activées du surplus de SMCC non lié pour éviter une compétition lors de la conjugaison des protéines avec les QDs entourés de peptides.

Nous avons donc premièrement activé les protéines en les mélangeant à un équivalent de 4 molécules de SMCC par protéine, et nous avons laissé réagir à température pièce pendant 45 minutes. Pendant ce temps, nous avons préparé environ 100 μL de QDs-peptides en leur ajoutant 0.5 μL de TCEP à 5 μM pour réduire les cystines. Nous avons déposé les QDs dans un filtre vivaspin à 10 kDa, rempli le filtre avec de l'eau distillée et centrifugé à 1200 g pendant 12 minutes. Nous avons répété cette étape 2 fois, pour débarrasser l'échantillon de l'excès de peptides non lié (ces peptides passent au travers de la membrane du filtre vivaspin). Nous avons ensuite mélangé 1 μL de QD à différents volumes de SAV activée purgée ou non de l'excès de SMCC, et nous avons laissé réagir à température pièce pendant un minimum de 45 minutes.

3.1.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

La migration de QDs sur gel d'agarose, appliquée aux QDs enrobés de peptides, a été optimisée par le Dr Samuel Clark, au laboratoire du Dr Maxime Dahan (École Normale Supérieure, Paris). Nous avons appliqué cette technique sur les QDs-peptides ainsi que sur les QDs-PEG-DHLA.

Pour ce projet, l'électrophorèse sur gel d'agarose a rempli trois fonctions. Nous l'avons premièrement utilisé comme outil de vérification, pour s'assurer que l'échange de ligands avec les peptides avait bien fonctionné. Lorsque l'enrobage de peptides est approximativement uniforme pour tous les QDs, et que cette population est monodisperse, alors les QDs migrent également dans le gel lorsque l'on applique un courant, ce qui signifie que la bande de nanoparticules qui ont migré a gardé sa forme initiale. Il arrive cependant que l'échange de ligands ne soit pas parfait, et que cette condition ne soit pas respectée.

Deuxièmement, nous avons utilisé l'électrophorèse pour contrôler la conjugaison entre les QDs et la SAV. Avec l'électrophorèse, les différentes vitesses de migrations associées aux QDs de différentes tailles engendrent l'apparition de bandes pour les nanocristaux conjugués à 0, 1 ou plusieurs protéines. En comparant l'intensité des bandes pour un ratio de SAV donné, nous avons une idée de la proportion de QDs liés à 1 SAV ou à plusieurs SAV. Ainsi, pour avoir un contrôle sur la valence des nanoparticules conjuguées avec la

SAV, il est pratique d'avoir un outil de vérification qui permette de vérifier empiriquement le ratio idéal pour la réaction.

Finalement, la migration sur gel d'agarose permet de purifier l'échantillon en éliminant les nanocristaux qui ne lient pas de SAV, ou trop de SAV. Ainsi, après avoir sélectionné le ratio idéal entre les QDs et la SAV pour la conjugaison, il est possible de faire une conjugaison à plus grande échelle et de faire migrer les nanocristaux conjugués pour isoler et sélectionner la bande qui nous intéresse.

Pour la migration, nous avons utilisé un gel d'agarose (Invitrogen, cat no 15510-027) entre 0.6 % et 1 % (1 % équivaut à 1 g d'agarose/100 mL de tampon), préparé dans du tampon Tris-Acetate EDTA à 0.25x (Sigma, cat no T9650, stock à 10x). Les détails pour la préparation du gel sont présentés en annexe (annexe 3.1 B). Lors de la migration, le gel baigne dans le même tampon qui a été utilisé pour sa préparation.

En ce qui concerne le dépôt des échantillons dans les puits, nous avons mélangé 5 μ L de tampon à gel avec chaque échantillon juste avant le dépôt. De plus, pour que les échantillons remplissent le fond du puits, nous les avons mélangés à 0.5 μ L ou 1 μ L de glycérol à 50 %. Normalement, il ne faut pas dépasser un volume total de 20 μ L pour les échantillons (pour des puits de 5 mm de longueur et 1.5 mm de largeur), car cela peut occasionner un débordement du puits (il y a alors des QDs qui peuvent diffuser dans la fine couche de tampon qui recouvre le gel). Typiquement, nous avons fait migrer les QDs de 20 à 30 minutes dans la direction de l'électrode positive, avec un courant de 35 mA.

Pour récupérer les QDs, nous avons coupé la ou les bandes d'intérêt, nous avons haché finement la bande à l'aide d'une lame à rasoir et avons déposé le gel haché dans un filtre à centrifugation nanosep 2 μ m (Pall Corporation, cat no ODM02C33). Nous avons récupéré les QDs en centrifugeant à 5000 g pendant 5 minutes. Les QDs récupérés sont en suspension dans le tampon à gel, alors que l'agarose ne passe pas au travers du filtre.

3.1.4 Marquage des cellules avec les QDs

Pour le marquage des cellules, nous avons utilisé 2 techniques: (1) l'incubation globale et (2) l'incubation locale à l'aide d'un micro-injecteur relié à une micropipette. Ces techniques sont présentées plus en détail à la section 2.1.2 (Marquage des récepteurs avec des QDs fonctionnalisés). Pour les tests de spécificité impliquant les QDs PEG-DHLA et les QDs-peptides, nous avons utilisé l'incubation locale en préparant un stock avec de la caséine 1x (concentration finale) comme agent bloquant. Puisqu'il est possible d'avoir une idée en direct de la quantité de fluorescence sortant de la micropipette (nuage de QDs diffusant, exemple figure 8), nous avons pu confirmer que la quantité de QDs sortant de la micropipette était comparable à ce qui avait été observé lors de l'incubation locale avec des QDs commerciaux. Les cellules ont été transfectées pour exprimer la mauvaise cible (protocole pour le marquage avec des QDs-AB-anti-HA), ou pour exprimer des récepteurs biotinylés, selon les procédures décrites à la section 2.1.1.

Durant mon séjour à Paris, nous avons reçu un échantillon de QDs fonctionnalisés au laboratoire du Dr Mounji Bawendi, du MIT. Ces QDs, fonctionnalisés avec un enrobage de polymères [52] sur lequel est greffée de la SAV, ont un diamètre hydrodynamique entre 15 nm et 20 nm. Nous avons fait le test de spécificité en incubant les cellules pendant 3 minutes avec des QDs à 40 nM dans la solution d'imagerie (avec caséine 1x), et en procédant à 4 rinçages. Ces marquages ont été effectués sur des échantillons avec une proportion de cellules transfectées présentant des protéines membranaires fusionnées à de la biotine, alors que les cellules non transfectées ne présentaient pas de cibles biotinylées. Deux types de cellules ont été testés, soient des cellules Hela ainsi que des neurones.

3.2 Analyse des résultats

3.2.1 Biofonctionnalisation de QDs DHLA et PEG-DHLA

Ces deux protocoles ont mené à des QDs bien dispersés en milieu aqueux. Il faut cependant conserver les échantillons à 4 °C à une concentration de l'ordre du μM pour éviter que les QDs ne précipitent.

Pour vérifier l'efficacité de la conjugaison de la SAV sur les QDs-DHLA, nous avons effectué des tests en incubant les différents échantillons avec des microbilles enrobées de biotine. Malheureusement, l'expérience contrôle avec des QDs-DHLA sans SAV a démontré que ces QDs collaient sur les microbilles, ce qui nous a empêché d'utiliser ce test comme diagnostique. Nous avons aussi tenté de valider la conjugaison des QDs-PEG-DHLA avec la SAV en faisant migrer les échantillons, par électrophorèse, dans un gel d'agarose. Le résultat de cette expérience est présenté à la figure 27.

Lorsque nous avons fait les tests sur cellules, les QDs-DHLA-SAV adhéraient un peu partout (cellules Hek et neurones), et nous avons même observé plusieurs agrégats de multiples QDs. Nous avons aussi remarqué des problèmes de spécificité pour les QDs-PEG-DHLA (tests sur neurones seulement).

Par rapport aux QDs-DHLA, l'ajout de PEG a amélioré la qualité de l'échantillon pour les QDs-PEG-DHLA. Nous avons observé moins d'agrégats après le marquage sur cellules. De plus, l'arrosage de QDs-PEG-DHLA avec la micropipette donnait lieu à un nuage de QDs qui diffusaient normalement dans la solution d'imagerie. Pour les QDs-DHLA, lorsque nous avons appliqué une pression pour faire sortir les QDs de la micropipette, il y a eu éjection d'agrégats et de particules qui, au lieu de diffuser dans la solution, semblaient conserver leur vitesse et leur direction initiales (trajectoires balistiques), et qui ont adhéré directement sur les cellules.

Le tableau 2 présente les différents ratios de produits et réactifs utilisés pour la conjugaison de la SAV sur les QDs-DHLA. Alors que les échantillons 1-2 et 3 ont été concentrés avant d'être dilués dans un volume final de 50 μ L de tampon, les échantillons 4-5-6 ont été dilués dans un total de 500 μ L de tampon après leur concentration. À la figure 26, je présente une photo de ces 6 échantillons après 2 ans d'entreposage à 4 °C. Nous remarquons que les échantillons 1-2-3 sont toujours bien dispersés dans le tampon, alors que les échantillons 4-5-6 se sont agrégés dans le fond du tube conique.

Tableau 2: Tableau des réactifs pour la conjugaison de la streptavidine avec les QDs-DHLA

# Échantillon	Volume QDs (30 μ M)	Volume SAV (1mg/mL) (18 μ M)	Volume EDC (10mg/mL) (66 mM)
	[μ L]	[μ L]	[μ L]
1	20	1	5
2	20	2	5
3	20	5	5
4	20	2	10
5	20	5	10
6	20	10	10

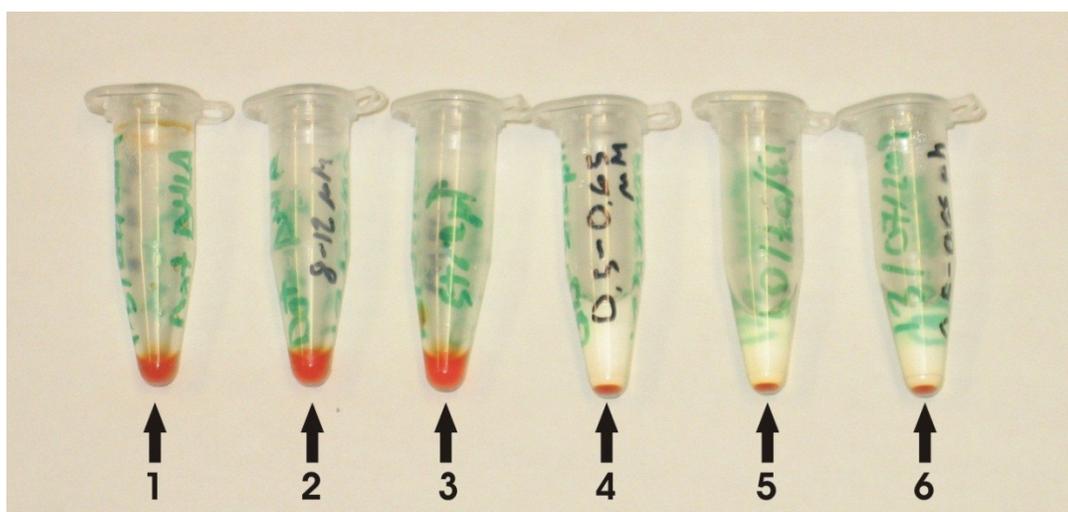


Figure 26: Agrégation d'échantillons de QDs-DHLA conjugués à la streptavidine

Échantillons de QDS-DHLA-SAV conservés pendant deux ans à 4°C. Les quantités de réactifs utilisées pour chaque échantillon sont présentées au tableau 2. **1, 2 et 3** : Lorsque la concentration des QDs est suffisamment élevée, ces derniers conservent bien leur couche de ligands de surface et restent en suspension colloïdale en milieu aqueux. **4, 5 et 6** : en diluant dans un volume de tampon 10 fois plus élevé (les quantités nettes de QDs sont aussi inférieures, car il y a eu plus de pertes durant les purifications), les échantillons précipitent, ce qui peut être dû par la perte progressive des ligands dans le tampon.

Nous pouvons expliquer cela par le fait qu'une partie des ligands échangent constamment entre la surface des QDs et le tampon. Lorsqu'il y a trop de tampon par rapport aux QDs dans l'échantillon, le DHLA décroche plus vite de la surface des QDs qu'il ne s'y raccroche, ce qui mène à une perte de ligands à la surface des QDs. Je suggèrerais donc de conserver les QDs en suspension dans un milieu aqueux à une concentration minimale de 1 μM .

Lors de la conjugaison des QDs avec la SAV en utilisant de l'EDC, nous avons noté quelques anomalies. Premièrement, pour les QDs-DHLA, le passage de la solution dans le filtre seringue après la conjugaison était pénible et requérait l'application d'une forte pression sur la seringue. Cela était encore plus vrai pour les échantillons où la quantité d'EDC utilisée était plus importante. De plus, pour les échantillons associés à l'utilisation des plus grandes quantités de SAV et d'EDC (échantillons 5-6), nous n'avons pas été capable de concentrer la solution au minimum du volume de concentration (10-20 μl) du filtre vivaspin, et beaucoup de QDs collaient à la membrane du filtre.

Le fait que l'on retrouve quatre amines primaires et quatre carboxyles terminaux sur chaque SAV fait en sorte que cette protéine a 8 sites pour former un lien amide avec un QD ou une autre SAV. Ainsi, il est fort probable que le mélange instantané de l'EDC avec les QDs et la SAV mène à la formation de gros complexes de QDs liés les uns aux autres par des ponts formés de SAV.

Les résultats associés à la conjugaison des QDs-PEG-DHLA avec la SAV en utilisant de l'EDC vont dans le même sens. Lorsque nous avons voulu faire migrer les QDs dans le gel d'agarose, les QDs-PEG-DHLA non conjugués pénétraient le gel, alors qu'une minorité des QDs conjugués le pénétrait (figure 27). Étant donné que les plus petites particules migrent plus facilement dans le gel que les plus grosses, il est fort probable que ce soit la formation d'agrégats de QDs, lors de la conjugaison, qui explique ce résultat. Il est aussi possible que la réaction avec l'EDC ait endommagé l'enrobage des QDs, et que la diminution de la charge négative des QDs due à la perte de PEG-DHLA se soit traduite par des problèmes de migration des QDs. Le tableau 3 présente les quantités de réactifs utilisées pour la préparation des échantillons.

Tableau 3: Tableau des réactifs pour la conjugaison de la streptavidine avec les QDs PEG-DHLA

# Échantillon	Volume QDs	Volume SAV (1mg/mL) (18 μ M)	Volume et concentration d'EDC
	[μ L]	[μ L]	-
A	1	-	-
B	1	2.5	1 μ L à 2 mM
C	1	5.0	1 μ L à 2 mM
D	1	10	1 μ L à 40 mM
E	1	2.5	1 μ L à 40 mM
F	1	5.0	1 μ L à 40 mM
G	1	10	1 μ L à 40mM

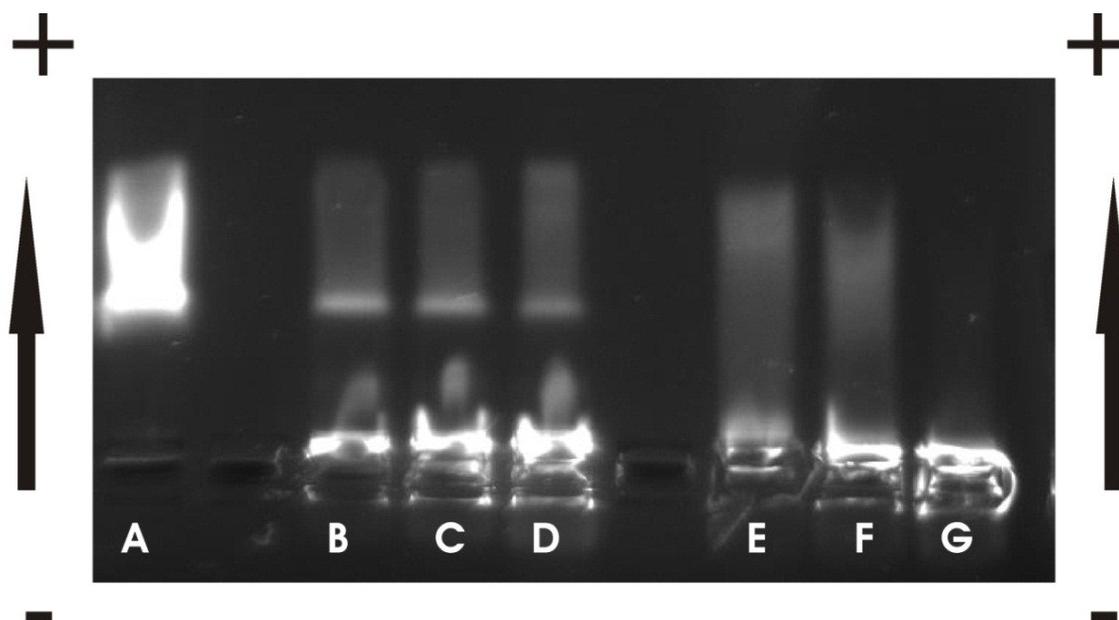


Figure 27: Migration des QDs PEG-DHLA conjugués à la SAV en utilisant de l'EDC

Les lettres des colonnes de migration réfèrent au tableau 3, où les quantités de réactifs utilisées pour chaque échantillon sont présentées. L'échantillon A est un contrôle, où les QDs n'ont pas été couplés à la SAV. Alors que pour cet échantillon, tous les QDs pénètrent le gel sans problème, la majorité des QDs des échantillons ayant subi la conjugaison restent piégés dans les premiers millimètres du gel.

3.2.2 Biofonctionnalisation de QDs avec des peptides

Pour cette technique, nous avons eu l'avantage d'appliquer des protocoles qui avaient déjà été optimisés au laboratoire du Dr Maxime Dahan. Les QDs fonctionnalisés selon cette méthode ont été utilisés pour marquer de manière spécifique des cellules de type Hela [5]. Sur neurones, nous avons malheureusement obtenu des marquages caractérisés par de nombreuses liaisons non spécifiques.

Nous avons premièrement effectué la conjugaison de la SAV sur des QDs cœur-coquille de CdSe/ZnS commerciaux avec des longueurs d'onde d'émission de 595 nm et 655 nm. Pour les plus petit QDs (émission à 595 nm), l'électrophorèse a permis d'isoler les populations de QDs liées à 0, 1, 2 et plus de 2 SAV (formation de 4 bandes). Pour les plus gros QDs, il était possible d'isoler les populations de 0, 1 et plus de 1 SAV (formation de 3 bandes).

Nous avons aussi testé l'échange de ligands et la conjugaison avec la SAV sur des QDs synthétisés au laboratoire du Dr Claudine Allen. Tous les échantillons étaient bien dispersés en milieu aqueux après l'échange de ligands. Cependant, la migration sur gel d'agarose a montré que cette technique ne permettrait pas de résoudre les populations de QDs liés à différents nombres de protéines pour tous les échantillons, certains échantillons enrobés étant moins monodisperses que d'autres (figure 29).

Puisque l'ajout de protéines occasionne une augmentation de la taille des QDs, les populations avec des nombres croissants de protéines interagissent de plus en plus avec l'agarose lors de leur migration dans le gel, ce qui les ralentie davantage. Ainsi, après une certaine distance de migration, ces différentes populations se distancient les unes des autres. Pour une population initiale de QDs uniforme avant la conjugaison, les différentes vitesses de migration des QDs conjugués à différents nombres de protéines occasionnent l'apparition de bandes.

À la figure 28, nous présentons un gel où l'on remarque la présence de bandes associées à différents nombres de SAV conjugués par QD. Pour les deux types de QDs que nous avons fait migrer (émission à 655 nm et à 595 nm), un contrôle a été effectué sans ajouter de SAV

(bandes de gauche 0x). Les QDs qui ont été déposés dans ces puits contrôles ont migré uniformément, de telle sorte que ces bandes sont restées étroites. Pour les QDs qui ont été incubés 1 h avec la SAV activée, nous remarquons l'apparition de nouvelles bandes. En multipliant la quantité de SAV d'un facteur 5 (comparaison bandes 1x aux bandes 5x), nous observons une perte de fluorescence des bandes du haut au profit des bandes du bas. Cela signifie qu'une plus grande proportion de QDs est couplée à plusieurs protéines. La disparition de la bande du haut, à l'encadré 5x des QDs émettant à 655 nm, montre que pour ce ratio de conjugaison, presque tous les QDs sont conjugués à 1 protéine ou plus.

Lorsque nous comparons les espacements entre les bandes des QDs émettant à 595 nm avec ceux des QDs émettant à 655 nm, nous remarquons une différence. Les bandes des QDs émettant à 595 nm sont plus espacées les unes des autres. Nous pouvons expliquer cela par le fait que le changement relatif de taille des QDs, lorsqu'une protéine s'y greffe, est plus important pour les petits QDs, que pour les gros QDs. Dans le même ordre d'idées, la différence de taille entre un QD seul et un QD conjugué à 1 protéine est plus importante que cette différence entre un QD conjugué à 1 protéine et un QD conjugué à 2 protéines. Ainsi, pour tous les QDs, nous remarquons un rapprochement des bandes au fur et à mesure que le nombre de protéines conjuguées augmente. À partir de 2 protéines conjuguées, les bandes se confondent pour les QDs avec un pic d'émission à 655 nm. Pour les plus petits QDs, il est encore possible de distinguer la quatrième bande (3 protéines ou plus) de la troisième bande, mais la distinction n'est pas aussi nette que pour les 2 premières bandes.

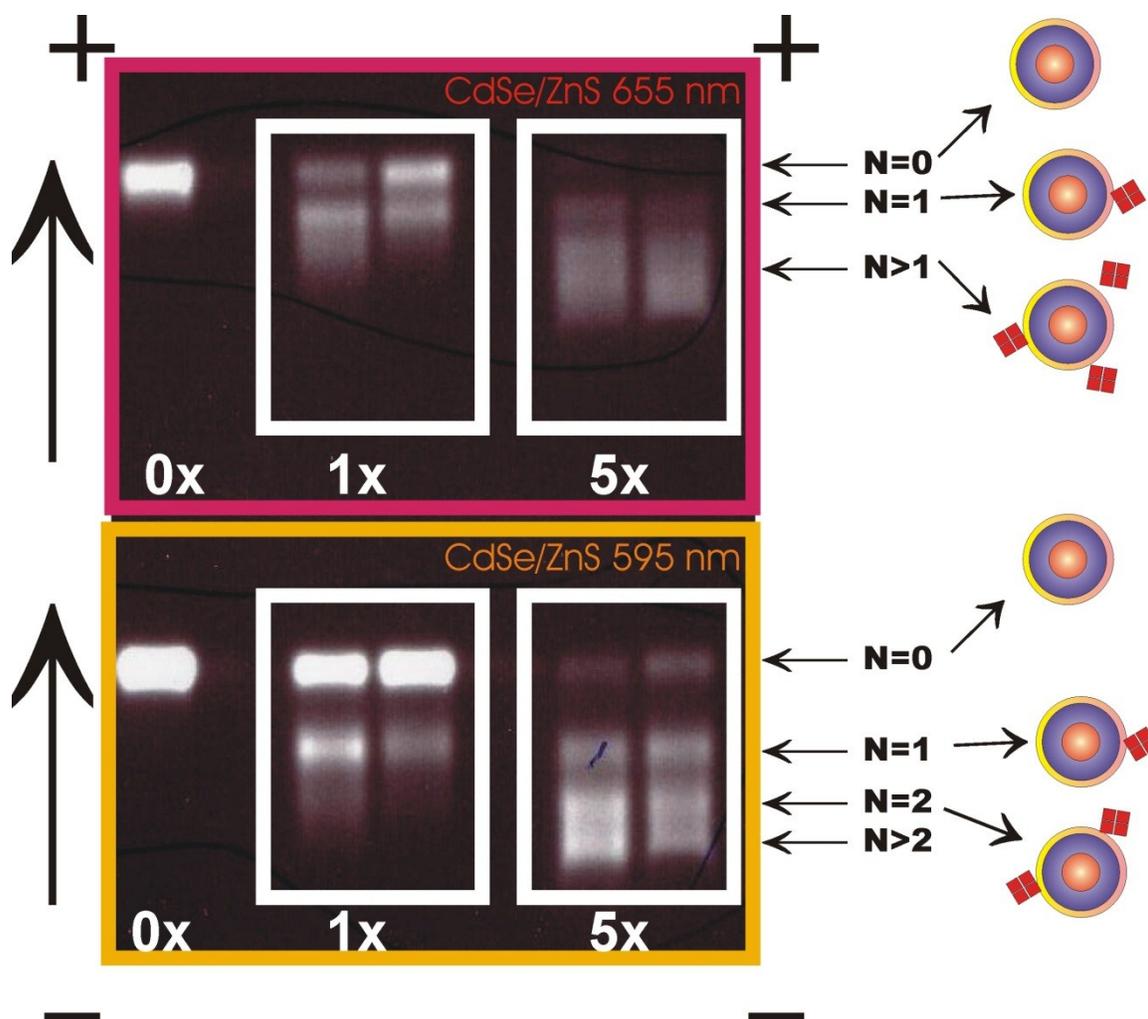


Figure 28 : Gel pour isoler les QDs selon le nombre de protéines attaché

Migration de QDs-peptides couplés à la SAV sur gel d'agarose 0.8 % (25 minutes à 160 V, courant de 35 mA, les flèches représentent la direction de la migration). Les colonnes à gauche complètement (0x) sont les contrôles de QDs non couplés. Pour chaque colonne de migration, la quantité de QDs-peptides est constante, contrairement à la quantité de SAV (0x, 1x et 5x). Les colonnes voisines d'un même encadré blanc réfèrent à l'utilisation d'une SAV activée non filtrée (colonne de gauche) et d'une SAV activée que l'on a purgée de l'excès de SMCC non lié (colonne de droite). La SAV non filtrée est la plus réactive.

Pour chaque ratio SAV/QDs (à l'intérieur d'un encadré blanc), nous avons comparé l'utilisation de 2 types de SAV activée. La bande de gauche, dans les encadrés blancs, est liée à l'utilisation de la SAV activée qui n'a pas été purifiée de l'excès de SMCC non lié. Pour la bande de droite, nous avons purifié l'échantillon de SAV de cet excès, en utilisant un filtre à centrifugation vivaspin 500 avec une coupure moléculaire de 10 kDa. Dans les colonnes de gauche des encadrés blancs, nous remarquons une plus grande proportion de la

fluorescence dans les bandes associées aux plus grands nombres de protéines conjuguées. Il apparaît donc que, pour cette application, la conjugaison est plus efficace si nous ne purifions pas la SAV. Il est important de souligner que, pour comparer l'efficacité des conjugaisons à partir de l'intensité de fluorescence des bandes, il faut utiliser la même quantité de QDs dans chaque puits.

Lors de la conjugaison, puisque le nombre total de thiols, sur la population de QDs, dépasse de beaucoup le nombre total de maléimides, cela peut expliquer pourquoi le SMCC non lié n'affecte pas le rendement de la conjugaison. En purifiant la SAV à partir de 2 centrifugations dans un filtre vivaspin, pour se débarrasser du SMCC non lié, nous avons peut-être perdu une partie de la SAV (une fraction des protéines peut adhérer à la membrane du filtre, et le volume de SAV, après purification, a été ajusté à son niveau initial). Il est aussi possible que les centrifugations engendrent la perte de réactivité d'une partie des maléimides sur les SMCC liés à la SAV, ou encore qu'ils provoquent le bris de liens entre la SAV et le SMCC. Cela expliquerait pourquoi la conjugaison avec la SAV purifiée a un rendement inférieur à la conjugaison avec la SAV non purifiée.

Les échanges de ligands avec peptides, sur différents types de QDs synthétisés à l'Université Laval, nous ont permis de valider que le protocole était fonctionnel pour des QDs enrobés d'acide oléique et d'oleylamine comme ligands de synthèse. De plus, cela nous a permis de comparer, entre les différents types de coquilles, le rendement quantique des QDs après l'échange de ligands. Nous avons aussi fait migrer les différents échantillons hydrophiles sur un gel d'agarose afin de déterminer s'il serait possible de contrôler empiriquement la conjugaison des QDs avec la SAV.

Au tableau 4, nous présentons les caractéristiques des différents échantillons testés. La lettre pour chaque échantillon réfère à la colonne de migration de cet échantillon à la figure 29.

Tableau 4 : Description des différents échantillons de QDs cœur-coquille enrobés de peptides

Échantillon	Composition	Pic d'émission [nm]	Rendement quantique* [%]
-	-	-	± déviation standard
A	CdSe/ZnS (evident tech.)	595	-
B	CdSe/ZnS	567	12±2
C	CdSe/Cd _{0.5} Zn _{0.5} S	613	43±6
D	CdSe/CdS	629	17±2
E	CdSe/CdS/ Cd _{0.5} Zn _{0.5} S/ZnS	607	30±3
F	CdSe/ Cd _{0.5} Zn _{0.5} S/ZnS	657	38±5

* Les calculs de rendement quantique ont été effectués en comparant le spectre d'émission (fluorespectromètre NanoDrop 3300, Thermo Scientific) et l'absorbance (spectrophotomètre NanoDrop 2000, Thermo Scientific) à 470 nm des QDs au spectre d'émission et à l'absorbance à 470 nm de la rhodamine, en considérant un rendement quantique de 95 % pour la rhodamine. Trois spectres d'émission par espèce de QD et deux spectres d'émission pour la rhodamine ont été mesurés (6 calculs de rendement quantique, moyenne ± déviation standard).

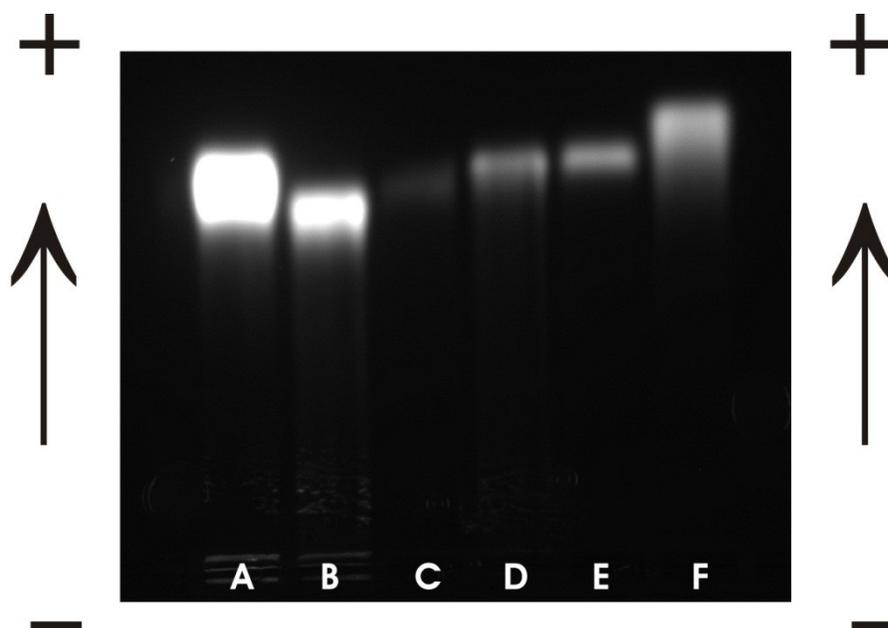


Figure 29 : Migration sur gel des différents échantillons de QDs enrobés de peptides.

Le tableau 4 présente la composition des échantillons ainsi que certaines de leurs propriétés optiques. Les échantillons C, D et E sont ceux qui ont le mieux migré.

En comparant les rendements quantiques au tableau 4, il apparaît que les échantillons avec les meilleurs rendements quantiques après l'échange de ligands sont ceux avec une première coquille composée de $\text{Cd}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{S}$. Pour les QDs CdSe/ZnS et CdSe/CdS , les rendements quantiques sont nettement inférieurs. Dans le cas des nanocristaux de CdSe/CdS , la croissance de coquilles supplémentaires avec des largeurs de bandes interdites supérieures à celle du CdS donne lieu à un meilleur rendement quantique (30 % pour les QDs $\text{CdSe/CdS/Cd}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{S/ZnS}$ contre 17 % pour les QDs CdSe/CdS).

Il est possible que la coquille de ZnS introduise trop de contraintes, donc plusieurs défauts de surface. Dans le cas de la coquille de CdS , cette dernière a une largeur de bande interdite trop près de celle du cœur de CdSe , ce qui empêche de bien confiner les porteurs de charge à l'intérieur du cœur. Ces deux caractéristiques associées au choix de la coquille peuvent avoir l'effet d'augmenter la perte de fluorescence des QDs due au piégeage des porteurs de charge dans les pièges de surface. L'utilisation d'une coquille de $\text{Cd}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{S}$ apparaît donc comme un excellent compromis entre contraintes et confinement optique pour optimiser le rendement quantique des nanocristaux après l'échange de ligands.

Le gel à la figure 29 montre que la plupart des échantillons ont bien migré. Cependant, les échantillons A (QDs CdSe/ZnS commerciaux) et F se sont trop élargis lors de la migration, ce qui peut être causé par une passivation inégale des QDs d'un même échantillon avec les peptides. Les QDs hydrophobes utilisés pour la préparation de l'échantillon A avaient déjà fait l'objet d'un échange de ligands où l'échantillon enrobé de peptides ne subissait pas un tel élargissement lors de la migration. Mon collègue, le Dr Samuel Clark, nous avait averti que l'échange de ligands ne fonctionnait pas toujours parfaitement, d'où l'importance de vérifier le comportement de l'échantillon soumis à l'électrophorèse avant de procéder aux étapes ultérieures de conjugaison avec des protéines hameçons.

Pour expliquer cette variabilité, il se peut que, parfois, l'étape de détachement des ligands de synthèse, en chauffant les QDs dans la pyridine (voir annexe 3.1 A), ne soit pas suffisamment avancée lorsque l'on ajoute les peptides. Ainsi, au moment de passiver la surface des QDs, certains QDs offriraient plus de sites d'adhésion que d'autres, ce qui mènerait à une distribution de QDs avec un enrobage variable. La dilution des peptides

dans le DMSO est plus difficile pour certains peptides, et il faut être prudent pour ne pas qu'une mauvaise dilution des peptides mène à un mauvais ratio entre les différents peptides, ou tout simplement à un manque dans la quantité totale de peptides disponibles pour passiver la surface des QDs. Finalement, la qualité de l'échantillon de QDs est un facteur important pour que l'échange de ligand fonctionne bien. Par exemple, pour un échantillon de QDs avec beaucoup de défauts de surface, ou un échantillon qui aurait mal vieilli, il se peut que l'enrobage de peptides ne soit pas optimal.

L'échantillon E ($\text{CdSe/CdS/Cd}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{S/ZnS}$) est celui qui s'est le moins élargi lors de la migration. Nous avons donc décidé de conjuguer cet échantillon à différents ratio de SAV, pour ensuite faire migrer les solutions conjuguées dans un gel d'agarose. Ce gel est présenté à la figure 30. L'ajout de multiples coquilles a pour effet d'augmenter la taille des QDs. Nous remarquons d'ailleurs que pour ces plus gros QDs, l'ajout de protéines a un impact moindre sur la vitesse de migration. Ainsi, pour l'échantillon E (pic d'émission à 607 nm), nous pouvons tout au plus distinguer les QDs conjugués à aucune protéine des QDs conjugués à plusieurs protéines (apparition de deux bandes). Si nous comparons ce gel au gel de la figure 27, nous remarquons que pour les QDs CdSe/ZnS avec un pic d'émission à 595 nm, il était possible de distinguer 4 populations de QDs avec différents nombres de protéines conjuguées (0, 1, 2 et plus de 2 protéines).

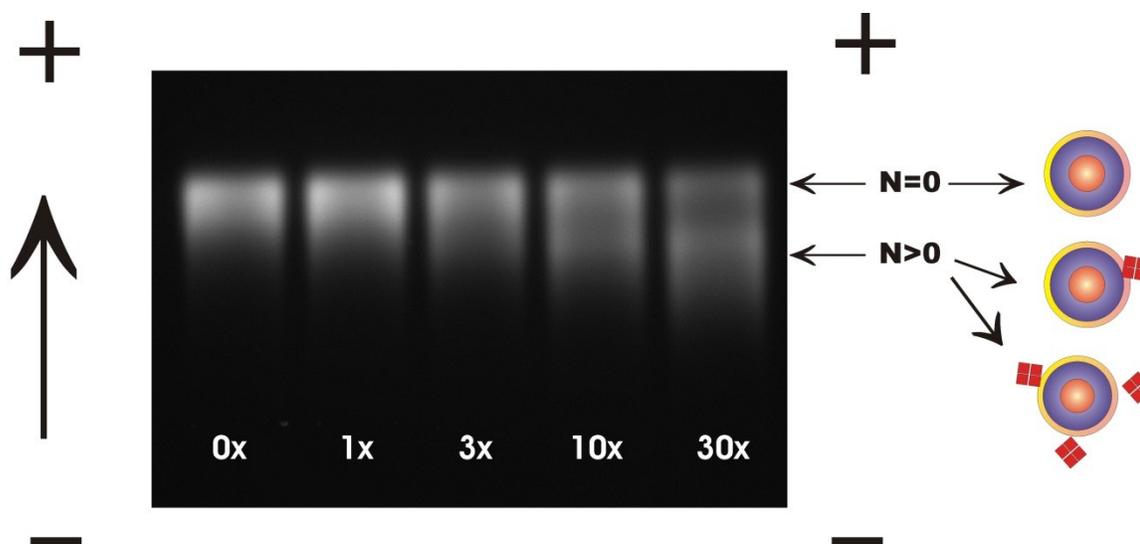


Figure 30: Gel de QDs CdSe/CdS/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/ZnS couplés à la streptavidine

Migration sur gel (160 V pendant 25 minutes, courant de 35 mA) de l'échantillon de QDs-peptides CdSe/CdS/Cd_{0.5}Zn_{0.5}S/ZnS conjugué à différents ratio de SAV (1x, 3x, 10x, 30x). Ces QDs cœur-coquilles-multiple sont plus gros que les QDs cœur-coquilles, donc nous ne pouvons distinguer que deux populations de QDs après la migration : les QDs non couplés, qui migrent à la même distance que la bande contrôle (0x), et les QDs couplés à une ou plusieurs streptavidines.

3.3.3 Marquage d'échantillons biologiques

Dans cette section, nous présentons différents marquages contrôles sur des neurones avec les sondes enrobées de PEG-DHLA et de peptides. Les QDs PEG-DHLA dépourvus de protéines hameçons ont été incubés sur des neurones transfectés pour exprimer des récepteurs biotinylés. Nous avons réalisé ce test pour s'assurer que ces QDs solubles en milieu aqueux, mais non fonctionnalisés, ne se liaient pas à des cibles quelconques sur le tissu biologique. Pour les QDs-peptides, nous présentons un exemple où des QDs-peptides conjugués à la SAV ont été incubés sur des neurones ne présentant pas de cibles biotinylées. Malheureusement, dans les deux cas, de nombreux QDs se sont liés à la membrane des neurones de manière non spécifique.

De plus, des marquages sur des cellules Hela ainsi que sur des neurones avec des petits QDs (entre 15 nm et 20 nm de diamètre hydrodynamiques) enrobés de polymères [52] et couplés à de la SAV sont présentés. Ces expériences ont été effectuées sur des cultures avec une proportion de cellules transfectées présentant des cibles biotinylées, alors que les

cellules non transfectées n'ont pas de cibles biotynilées à la membrane. Alors que le marquage était spécifique sur les cellules HeLa, il était non spécifique sur les neurones.

Pour l'expérience contrôle avec les QDs-PEG-DHLA, nous avons utilisé les QDs-PEG-DHLA récupérés après l'échange de ligands. Pour effectuer un contrôle sur la spécificité des QDs, l'idéal est de se rapprocher le plus près possible des conditions expérimentales associées à l'expérience régulière. Nous avons donc décidé d'effectuer le contrôle sur des cellules transfectées suivant le protocole utilisé pour le marquage de récepteurs synaptiques avec des QDs-SAV commerciaux (section 2.1.1 : Transfert de gènes sur modèle de neurones en culture). Les QDs n'étant pas conjugués à de la SAV, nous nous attendions à remarquer très peu de QDs liés à la membrane des neurones.

À la figure 31, nous présentons les images (1) de la culture de neurones en lumière transmise, (2) d'un neurone fluorescent Homer-GFP ainsi que (3) du marquage non spécifique des neurones avec des QDs-PEG-DHLA (pic d'émission à 620 nm). Alors que les QDs n'auraient pas dû se lier aux cellules, nous remarquons, dans tout le champ de vue, énormément de QDs qui ont adhéré à la membrane des neurones. Nous avons réalisé la même expérience sur une autre lamelle avec des QDs-SAV commerciaux, pour s'assurer d'avoir un contrôle positif. Avec ces QDs, nous avons obtenu un marquage comparable au marquage spécifique présenté à la section 2.1.2 (figure 9).

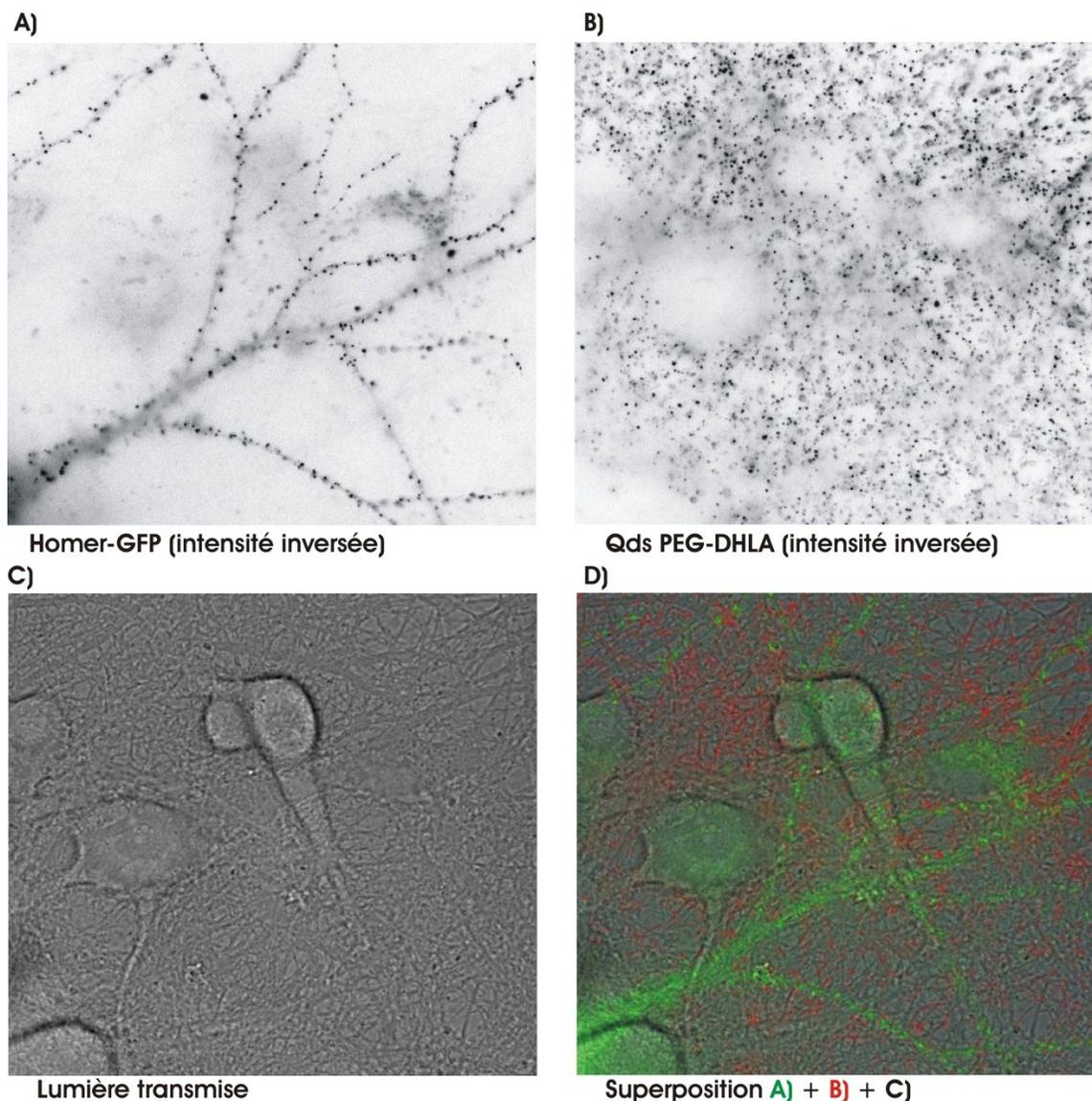


Figure 31 : Liaisons non spécifiques des QDs PEG-DHLA sur les neurones en culture

Expérience contrôle pour évaluer le niveau d'interactions non spécifiques des QDs-PEG-DHLA sur des neurones transfectés Homer-GFP + BiRA + GluR2-BAP (expression de récepteurs biotinylés à la membrane des neurones transfectés) **A)** Signal Homer-GFP d'un neurone transfecté : le neurone est en santé, il n'y a pas d'anomalies au niveau des dendrites et des synapses. Le signal de Homer-GFP est comparable à celui des expériences effectuées avec des QDs-SAV commerciaux, pour lesquelles les QDs liaient de manière spécifique les cibles biotinylées (figure 2). **B)** Signal non spécifique de QDs-PEG-DHLA avec un pic d'émission à 620 nm. Les QDs n'auraient pas dû se lier sur les neurones (transfectés ou non), puisque ces QDs n'ont pas été conjugué à de la SAV. **C)** Champ de vue en lumière transmise. La culture est dense et en santé. **D)** Superposition de A (vert), B (rouge) et C.

Face à ce résultat, nous nous sommes questionnés à savoir si le groupement carboxylé, à l'extrémité des PEG-DHLA, n'était pas responsable des liaisons non spécifiques. Puisque ce groupement est chargé, il est possible que des liens électrostatiques se forment entre les QDs et la membrane. Nous avons donc collaboré avec le groupe de Dr Éric Marsault, à l'Université de Sherbrooke, pour tester l'utilisation d'un ligand presque identique au PEG-DHLA, mais où le carboxyle est remplacé par un groupement méthyle, qui n'est pas chargé. L'échange de ligands a été effectué en suivant les mêmes procédures que pour le PEG-DHLA, et nous n'avons remarqué aucune anomalie au niveau des purifications et de la solubilité de l'échantillon hydrophile. Malheureusement, l'expérience contrôle, en utilisant ces QDs, a mené à un marquage comparable à celui de la figure 31.

Pour les QDs-peptides, nous présentons un autre exemple de contrôle. Dans cette expérience contrôle, nous avons cherché à évaluer si les sondes fonctionnalisés avec de la SAV forment des liens non spécifiques sur des cultures de neurones ayant subi une transfection, mais qui n'expriment pas la bonne cible. Ainsi, pour cette expérience contrôle, nous avons testé des QDs-peptides avec de la SAV sur des neurones ne présentant pas de cibles biotynilées.

Nous avons donc effectué une incubation locale des QDs sur des cellules transfectées avec le marqueur synaptique Homer-GFP et la sous-unité GluR2 (composant le récepteur AMPA) fusionnée à l'étiquette HA. La même journée, un marquage, avec des QDs commerciaux enrobés d'anticorps anti-HA, a été effectué sur une autre lamelle du même type, et la spécificité du signal avec ces QDs commerciaux a confirmé qu'il n'y avait pas de problèmes associés aux cultures elles-mêmes. Alors que les QDs-peptides-SAV n'auraient pas dû se lier aux neurones, nous remarquons le contraire, ce qui indique que les QDs-peptides-SAV s'attachent à des cibles non spécifiques sur l'échantillon (figure 32).

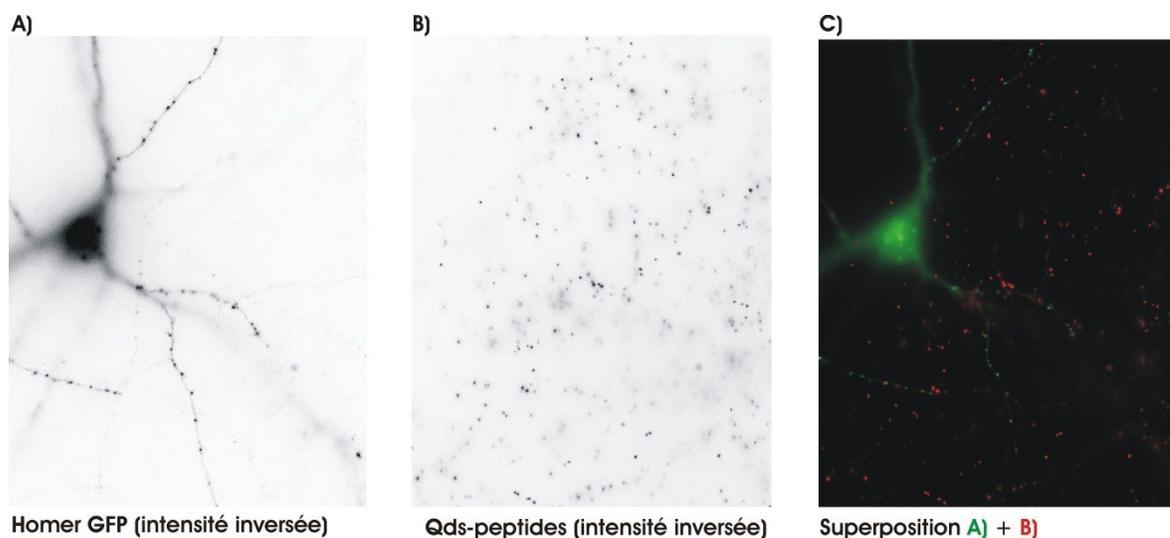


Figure 32: Liaisons non spécifiques des QDs-peptides sur les neurones en culture

Marquage de QDs-peptides-SAV sur une culture de neurones transfectée Homer-GFP + GluR2-HA. **A)** Signal Homer-GFP. Ce neurone transfecté n'a pas de cibles pour les QDs-peptides-SAV, mais l'utilisation de QDs-anti-HA commerciaux permet de marquer spécifiquement ce type de neurone (expérience en parallèle non présentée) **B)** Les QDs se sont liés à différentes cellules, dont la cellule transfectée. Ce sont toutes des liaisons non spécifiques **C)** Superposition de A et B.

Dans la littérature, des marquages spécifiques sur d'autres cellules que des neurones, en utilisant des QDs-PEG-DHLA [6] ainsi que des QDs-peptides [5], ont été présentés. Nous n'avons pas tenté de répéter ces expériences. Cependant, nous avons eu l'opportunité de tester un autre type d'échantillon de QDs fonctionnalisés avec de la SAV [52], et de taille inférieure (entre 15 et 20 nm) aux QDs commerciaux. En utilisant la transfection de plasmides codant (1) des protéines membranaires fusionnées au *biotin acceptor peptide* (BAP), (2) de la *biotine ligase*, et (3) un marqueur fluorescent, nous avons pu effectuer des tests de spécificité sur des échantillons où les cellules fluorescentes ont des protéines biotynilées à la membrane, ce qui n'est pas le cas des cellules non transfectées. Pour les cellules HeLa, nous n'avons pas eu à utiliser un troisième plasmide pour l'expression d'une protéine fluorescente, puisque la protéine-BAP transfectée est déjà fusionnée à un marqueur fluorescent (CFP).

Ces marquages sont présentés aux figures 33 et 34. Alors que sur les cellules HeLa, nous remarquons que les QDs se sont liés uniquement à la membrane des cellules transfectées,

pour les neurones, les QDs se sont liés sans distinction sur le neurone transfecté et sur les neurones non transfectés.

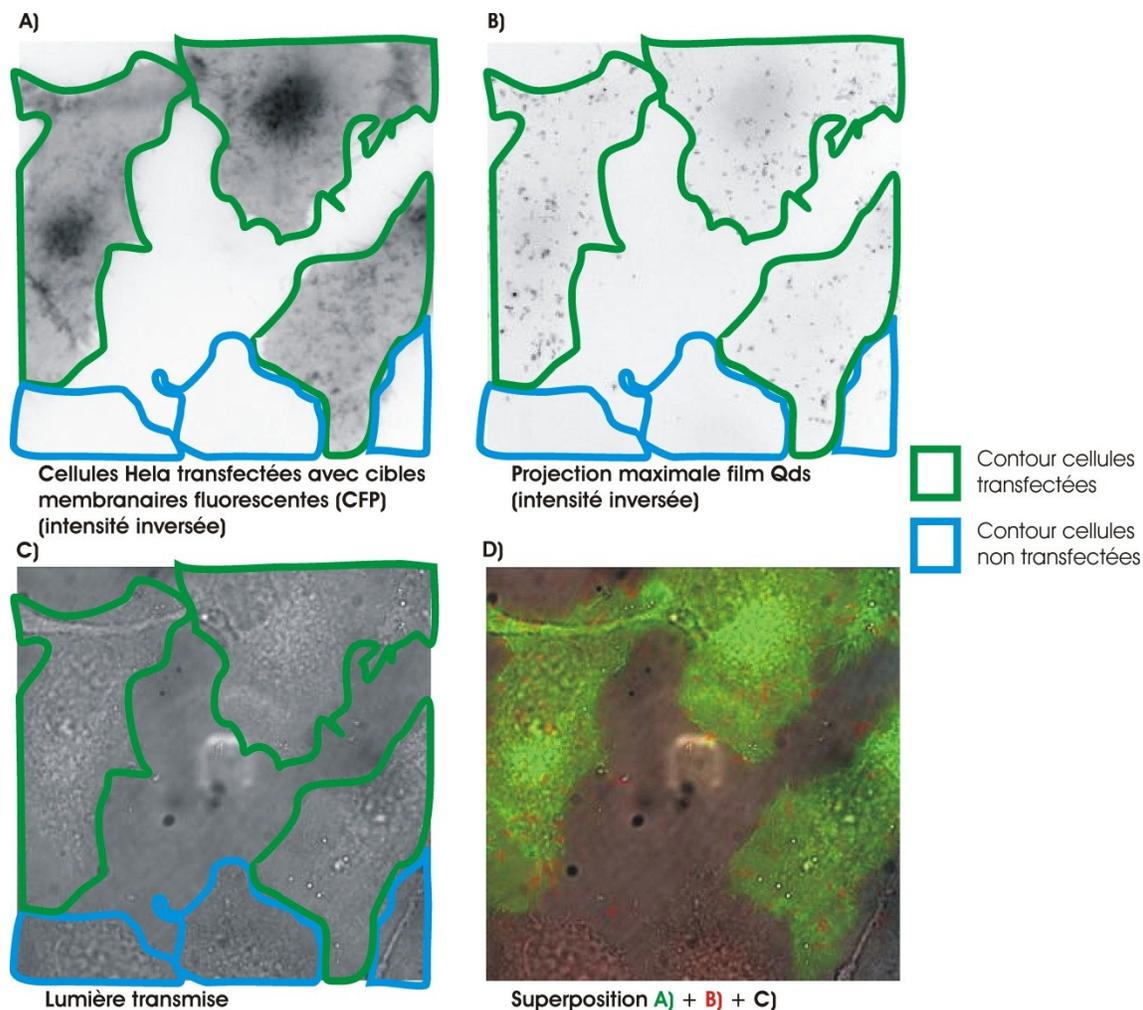


Figure 33 : Marquage spécifique de récepteurs sur cellules HeLa avec des QDs-polymères

Marquages avec des QDs enrobés d'une fine couche de polymère [52] et couplés à la SAV sur des cellules HeLa transfectées avec le récepteur au PDGF fusionné BAP-CFP (rPDGF-BAP-CFP) et la ligase BiRA. **A)** Les cellules transfectées expriment la cible fluorescente biotinyllée. **B)** La majorité des QDs s'est liée aux cellules transfectées. Il n'y a presque pas d'interactions non spécifiques. **C)** En lumière transmise, nous remarquons, dans le même champ de vue, la présence de 6 cellules. En comparant cette image avec A, nous observons que 3 cellules sont transfectées (cellules entourées en vert), et 3 cellules n'expriment pas les protéines exogènes (cellules entourées en bleu). **D)** Superposition de A) B) et C).

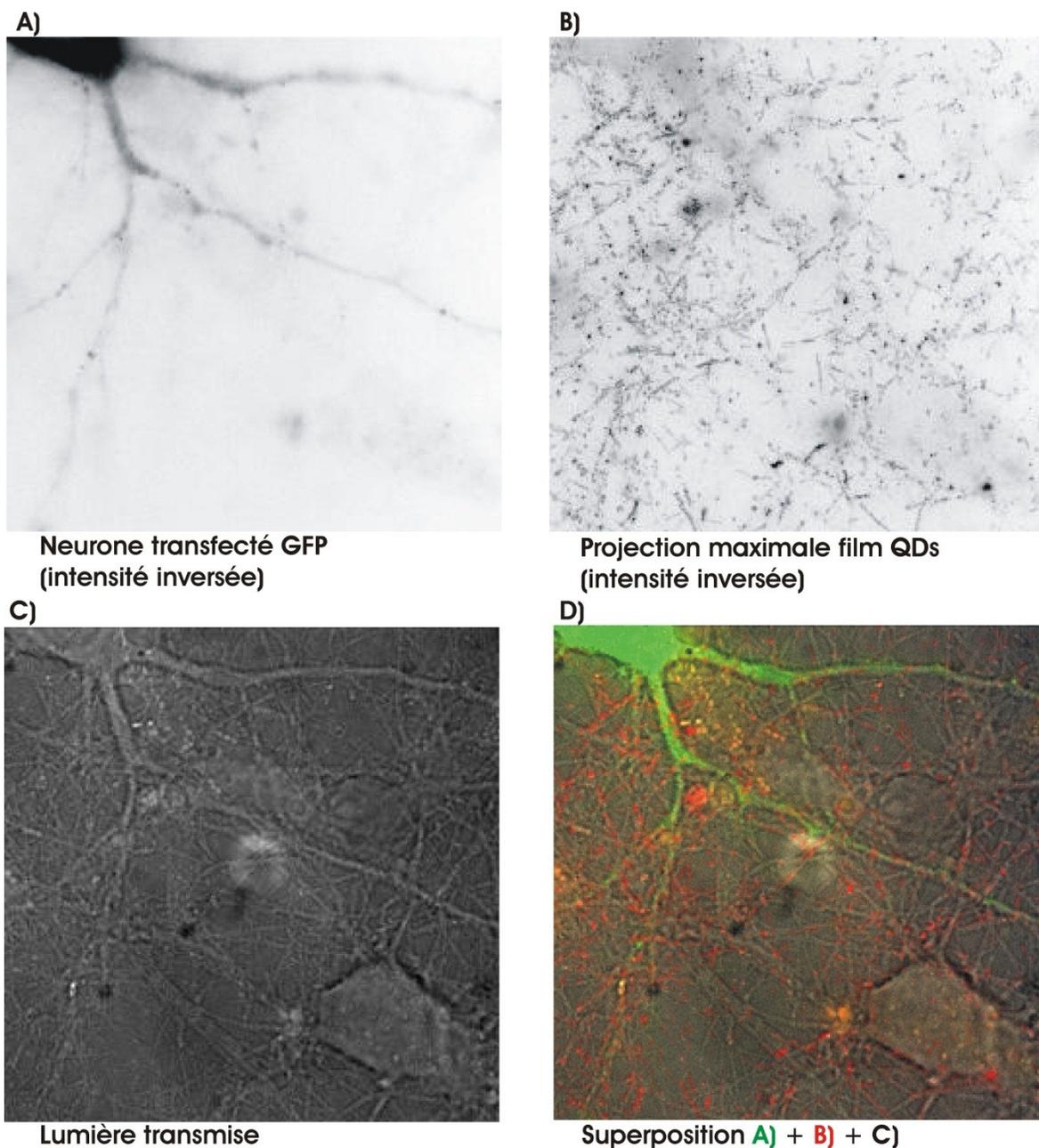


Figure 34: Liaisons non spécifiques des QDs-polymères sur les neurones en culture

Marquages avec des QDs enrobés d'une fine couche de polymère [52] et couplés à la SAV sur des échantillons de neurones transfectés pour exprimer des cibles biotinylées. **A)** Marqueur fluorescent GFP pour l'identification des neurones transfectés. **B)** Projection maximale du film de QDs. Les QDs sont attachés à la membrane de plusieurs neurones dans tout le champ de vue. S'ils étaient spécifiques aux cibles biotinylées, ils auraient dû se lier seulement sur le neurone transfecté. **C)** Image en lumière transmise. Nous remarquons la présence de plusieurs neurones dans le champ de vue. **D)** Superposition A, B et C.

3.3 Discussion sur la biofonctionnalisation de QDs

3.3.1 Problème de spécificité des petites sondes fonctionnalisées pour marquer des neurones

Jusqu'à ce jour, plusieurs protocoles ont été établis pour solubiliser des QDs, avec un enrobage hydrophile de l'ordre de grandeur du nanomètre d'épaisseur. Il a aussi été possible de greffer des protéines hameçons sur ces enrobages, et de lier de manière spécifique ces QDs aux cibles visées sur certains types de cellules. Cependant, lorsque nous avons voulu utiliser ces QDs pour marquer des protéines à la membrane de neurones, nous avons remarqué qu'ils se liaient un peu partout sur les échantillons, qu'il y ait les protéines visées ou non.

Ce problème de spécificité des QDs enrobés d'une relativement mince couche de molécules hydrophiles, et qui est spécialement problématique pour le marquage de neurones, doit absolument être résolu. Dans un contexte d'étude du comportement de molécules uniques, la spécificité de la sonde est d'une importance capitale. En comparaison, lors du marquage de milliers de cibles, nous nous retrouvons souvent avec un faible fond de fluorescence issu de liaisons non spécifiques, mais la grande quantité de cibles marquée fait en sorte que le signal d'intérêt se distingue du signal de fond. Nous tirons ainsi profit du fait qu'en saturant l'échantillon de sondes, il y a une accumulation beaucoup plus marquée de sondes liées là où il y a les cibles d'intérêt, ce qui nous permet d'extraire de l'information pertinente. En régime de molécules uniques, le marquage ne se fait pas en condition de saturation. De plus, chaque cible marquée fait partie d'un échantillon qui doit être représentatif de l'ensemble des comportements individuels d'une population. La présence d'intrus dans cet échantillon peut donc rapidement mener à des erreurs d'interprétation.

Nous avons quelques pistes à notre disposition pour expliquer ce qui peut mener aux problèmes de spécificité des QDs sur neurones. Le fait que la membrane de ce type de cellule, par rapport à celle d'un autre type de cellule, forme plus de liaisons non spécifiques avec les QDs fonctionnalisés, est un élément important à considérer. Cela démontre que la

composition en lipides et protéines de la membrane cellulaire a une grande influence sur la formation de liaisons non spécifiques.

En ce qui concerne la nature de l'enrobage hydrophile, plusieurs exemples dans la littérature montrent à quel point le choix de l'enrobage est important. Par exemple, l'ajout de PEG fait baisser le nombre d'interactions non spécifiques, qu'ils soient insérés dans le ligand hydrophile ou greffés sur les QDs enrobés. En comparant avec le DHLA, l'utilisation de PEG-DHLA fait toute la différence lorsque l'on évalue le niveau d'interactions non spécifiques des QDs sur les cellules HeLa [6]. De plus, l'ajout de PEG sur des QDs enrobés avec des polymères amphiphiles de poly(acide acrylique) fait baisser le nombre d'interactions non spécifiques entre les QDs et les cellules [53]. Cette baisse est plus significative lorsque le ratio entre le nombre de PEG et les QDs est plus grand (comparaison entre 100, 500 et 2000 amino-PEG par QDs), et lorsque la chaîne de PEG est plus longue. Il semble donc que l'ajout d'une quantité plus importante de PEGs à la surface des QDs mène à une meilleure protection des QDs contre les interactions non-spécifiques, et que l'utilisation de PEGs plus longs ait le même effet de protection.

Si je compare tous les QDs qui avaient des problèmes de spécificité sur les neurones, je remarque que plusieurs types d'enrobage étaient représentés (peptides, polymères, PEG-DHLA), et que le point commun de tous ces enrobages est leur faible épaisseur. À l'opposé, ce qui distingue les QDs commerciaux de ces QDs, c'est d'avoir un enrobage épais. Bien sûr, pour chaque échantillon, différentes raisons peuvent être responsables de la formation de liaisons non spécifiques sur les neurones. Par exemple, la charge négative des peptides et du groupement carboxylé du DHLA et du PEG-DHLA peut provoquer des interactions avec des espèces chargées positivement sur l'échantillon biologique. Cependant, nous avons réalisé des contrôles avec des QDs enrobés de dithiols-PEG-méthyle, qui est un ligand non chargé, et ces QDs se sont aussi liés de manière non spécifique sur les neurones.

Il est donc fort probable que, pour les petits enrobages, la surface cristalline des QDs n'est pas totalement protégée de l'environnement cellulaire, et que des imperfections dans la couche de molécules hydrophiles mènent à des interactions entre les matériaux semi-

conducteurs et les cellules. Par exemple, des ions Zn^{2+} d'une coquille de QDs CdSe/ZnS mal passivée pourraient se lier à des protéines contenant des séries d'histidines. L'utilisation d'un enrobage plus épais permettrait donc de mieux enrober la surface des QDs, et d'éviter ce type de liaison.

Cela ne signifie pas nécessairement que l'épaisseur de l'enrobage est un mal nécessaire. Nous devons cependant garder à l'esprit que, pour une mince monocouche de ligands de surface, les défauts et irrégularités de l'enrobage auront un impact direct sur l'exposition des matériaux semi-conducteurs des QDs à l'environnement extérieur. De plus, la stabilité des ligands, à la surface des QDs, est déterminante pour assurer le maintien d'un enrobage efficace, surtout lorsque ce dernier est formé d'une monocouche de molécules.

Il semblerait qu'une stratégie très prometteuse permette de biofonctionnaliser des QDs de moins de 15 nm de diamètre, qui ne forment presque pas de liaisons non spécifiques sur les neurones. Le laboratoire du Dr David Fernig, de l'Université de Liverpool, a effectué, sur des QDs de CdSe/ZnS, un échange de ligands qui a été développé pour l'utilisation en biologie de nanoparticules métalliques [54]. Ces ligands ont pour extrémité un thiol, séparé d'un domaine hydrophile composé d'une chaîne de PEG₄ par un domaine hydrophobe composé d'une chaîne de 11 CH₂. Nos collaborateurs ont mesuré, pour ces QDs, un diamètre hydrodynamique d'environ 7 nm après l'échange de ligands. Pour cet échange, ils ont combiné, dans un ratio 10 pour 1, le ligand non chargé avec une variante où un carboxyle a été ajouté à l'extrémité du ligand (figure 35). Ainsi, ces QDs hydrophiles ont un enrobage approximativement neutre où quelques groupes fonctionnels sont disponibles pour conjuguer un hameçon.

Nous avons eu, tout récemment, l'opportunité de marquer spécifiquement des neurones, exprimant des récepteurs biotynilés à la membrane, avec ces petits QDs enrobés de SAV (conjugaison en utilisant l'EDC). Bien que les résultats restent pour l'instant préliminaires, nous avons effectué des marquages spécifiques sur des neurones avec ces QDs dilués pendant une semaine à 5 nM avec de la caséine 1x. Cela prouve que l'échantillon est extrêmement stable, même à faible concentration.

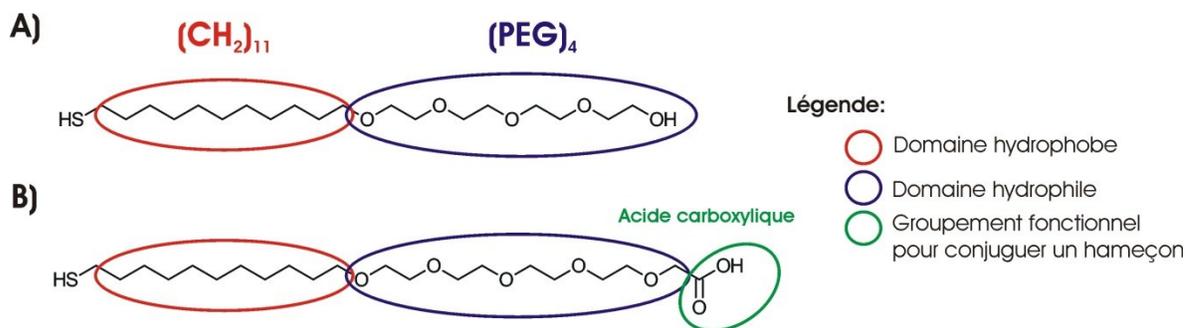


Figure 35 : Ligands amphiphiles composés d'un thiol, d'un alcane de 11 carbones et d'un PEG₄

A) Molécule dépourvue de groupement fonctionnel **B)** Molécule avec un acide carboxylique sur lequel on peut greffer de la streptavidine (SAV). Pour l'échange de ligands les ligands A et B ont été balancés dans un rapport 10:1 (A:B).

Lors de la solubilisation des QDs, les ligands de synthèses sont remplacés par les nouveaux ligands, qui se lient par liens de coordination à la surface des QDs avec leur thiol. Si nous comparons cet échange de ligands à d'autres stratégies d'enrobage amphiphile, où la nouvelle couche de ligand s'ajoute sur les ligands de synthèse et s'oriente selon la compatibilité des polarités, il se pourrait que le fait d'adhérer directement à la structure cristalline des QDs par un lien de coordination permette aux ligands d'être mieux stabilisés à la surface des QDs.

De plus, lorsque les QDs sont totalement enrobés, les interactions réversibles entre les monothiols et les ions positifs de la coquille semi-conductrice ne mènent pas à la perte des ligands, puisque la nature amphiphile de l'enrobage maintient les molécules près du QD. Le DHLA et le PEG-DHLA sont des molécules qui ont elles aussi un petit domaine hydrophobe, composé de 4 CH₂, qui permet aux molécules, en orientant leur domaine hydrophile vers l'environnement aqueux, de s'auto-assembler correctement autour des QDs lors de l'échange de ligands. Il semblerait donc qu'en allongeant ce domaine hydrophobe, on puisse améliorer l'efficacité et la stabilité de l'assemblage, à un tel point que l'utilisation d'un dithiol au profit d'un monothiol n'est pas nécessaire pour maintenir un enrobage stable autour des QDs. De plus, par rapport aux dithiols, ou aux multiples thiols liés parallèlement par des liens peptidiques, il est à prévoir que les liaisons de monothiols engendrent moins d'encombrements stériques pour passer tous les sites d'interactions disponibles à la surface des QDs.

3.3.2 Retour sur les techniques de biofonctionnalisation abordées

Par rapport au DHLA, l'utilisation de PEG-DHLA, pour enrober les QDs, est certainement une stratégie avantageuse. Plusieurs références, dans la littérature, montrent que l'ajout de PEG à la surface des QDs protège en partie ces derniers des liaisons non spécifiques sur les échantillons biologiques [6,53]. Nous avons malheureusement observé des problèmes d'interactions non spécifiques sur les neurones avec les QDs enrobés de PEG-DHLA. La charge négative et la réactivité du groupement carboxylé, ainsi que la présence de trous dans l'enrobage, sont toutes des raisons qui pourraient expliquer l'apparition de ces interactions non spécifiques.

Puisque les PEG sont hydrophiles, il est possible de conjuguer de l'acide lipéique avec des PEG, et de ne pas dépendre d'une terminaison carboxylée pour la solubilité des QDs enrobés avec ces molécules. Pour l'échange de ligands, il est donc possible d'utiliser un mélange de PEG-DHLA avec des variantes non chargées. Cela permet la formation d'enrobages avec une minorité de molécules munies de groupements réactifs, ce qui pourrait limiter les interactions non spécifiques. Bien que je n'aie pas testé ce type de mélange, ils représentent une alternative très intéressante à explorer lors de travaux futurs.

Il est possible que l'encombrement stérique des différents dithiols, lors de la passivation de la surface des QDs, fasse en sorte que certains PEG-DHLA ne peuvent lier leurs 2 thiols à la fois, ce qui mènerait à des problèmes de stabilité d'une partie des ligands sur les QDs. Il serait donc possible de modifier la molécule, en allongeant l'alcane représentant son domaine hydrophobe, pour que tous les ligands, qu'ils aient accès à deux ions²⁺ ou non à la surface des QDs, y soient mieux stabilisés. Il serait d'ailleurs intéressant de comparer ce type de ligand à son équivalent présenté à la section 3.3.1, où un monothiol remplace le dithiols.

En ce qui concerne l'échange de ligands avec les peptides, nous avons aussi remarqué la formation de nombreux liens non spécifiques entre les QDs-peptides et les neurones. Tout comme le DHLA et le PEG-DHLA, la charge négative des peptides, la présence de nombreux groupes réactifs (dans ce cas, les thiols) et la passivation incomplète de la surface des QDs sont toutes des raisons qui peuvent expliquer la formation de liaisons

indésirables sur les échantillons de neurones. Les nombreux thiols du domaine d'adhésion des peptides (même domaine d'adhésion pour les trois types de peptides) ne sont sûrement pas tous liés à la surface des QDs. Ainsi, même si nous voulons baisser la proportion de peptides avec un groupement réactif (ceux qui ont une cystéine ou une lysine comme dernier acide aminé) au profit de PEG-peptides dans le mélange, nous ne diminuerons qu'en partie la présence de groupements réactifs sur l'enrobage.

Pour certaines applications, le fait que les QDs soient chargés est profitable. C'est le cas de l'électrophorèse sur gel d'agarose, où la charge des QDs leur permet de migrer dans le gel lors de l'application d'un champ électrique. Il serait donc important d'évaluer si les interactions électrostatiques entre les QDs chargés et la membrane des neurones sont réellement responsables d'une partie des liaisons non spécifiques que nous avons observées.

À mon avis, le plus grand inconvénient, pour l'échange de ligand avec peptides, est la passivation incomplète de la surface des QDs. Les peptides sont de grosses molécules, pour lesquelles les multiples sites d'adhésion aux QDs (thiols sur les cystéines (C) de la série FCCFCCFCC) sont relativement séparés les uns des autres. Il est donc difficile de prétendre que ces molécules s'agencent parfaitement les unes à côté des autres pour passiver toute la surface des QDs. Il semblerait que des alternatives, utilisant un mélange entre des molécules amphiphiles avec PEG (thiol-alcane-PEG, figure 35) et des peptides avec une seule cystéine, permettent d'enrober des QDs hydrophiles avec un enrobage très stable [54].

L'utilisation de peptides sera sûrement une stratégie incontournable pour réduire encore plus la taille des QDs. Le prochain défi sera de trouver des hameçons spécifiques plus petits que les protéines complètes, et nous connaissons déjà des séquences de quelques acides aminés susceptibles de jouer ce rôle. Par exemple, pour le marquage de récepteurs synaptiques, certaines toxines sont des candidats potentiels, puisqu'elles sont présentes dans la nature pour bloquer les récepteurs en s'y liant. Le fait qu'un peptide «hameçon» soit directement greffé à la surface des QDs durant l'échange de ligands peut mener à la

formation de sondes fonctionnalisées plus compactes que celles où l'hameçon est greffé par-dessus l'enrobage.

Nous avons pu comparer 2 types de conjugaison pour attacher de la SAV sur des QDs, une conjugaison utilisant l'EDC comme réactif, et l'autre utilisant le SMCC. La chimie avec le SMCC est plus facile à contrôler. De plus, cette réaction ne mène pas à la formation d'agrégats de QDs, et aucun sous-produit de réaction ne sont produits. Pour conjuguer les QDs à la SAV, une toute petite quantité de SMCC est requise (seulement 4 molécules par protéine), et la présence de SMCC non lié à la SAV n'affecte pas le rendement de la conjugaison.

À l'opposé, l'utilisation d'EDC semble affecter une grande proportion des QDs lorsque l'on cherche à coupler les QDs-PEG-DHLA à de la SAV. La rapide cinétique de réaction de l'EDC est aussi problématique, et il est possible qu'une mauvaise injection de la molécule dans le mélange fasse en sorte que la réaction soit très inégale pour les différents QDs de l'échantillon.

Il ne faut pas pour autant éviter absolument l'utilisation d'EDC. Rappelons que l'utilisation de ce réactif est largement répandue pour la conjugaison de protéines. Par exemple, cette chimie de réaction a été utilisée avec succès pour conjuguer des QDs avec des groupements carboxylés ou des groupements amines et de la SAV [6]. Cependant, il semblerait que la réaction puisse être violente, et qu'il soit important d'effectuer des étapes de purification judicieuses après ce type de conjugaison, pour se débarrasser de sous-produit et d'agrégats issus de la réaction.

Conclusion

Un objectif important du projet était de valider l'utilisation de différents types de QDs pour marquer des récepteurs synaptiques sur des neurones en culture. Nous avons pu tester de nouvelles constructions génétiques pour exprimer des récepteurs qui exposent une étiquette biotine au milieu extracellulaire, et marquer spécifiquement ces récepteurs avec des QDs enrobés de streptavidine (SAV). Pour les essais avec les QDs-SAV fonctionnalisés à partir d'une monocouche de ligands de surface (PEG-DHLA et peptides), les marquages sur neurones étaient caractérisés par une majorité d'adhésions non spécifiques. À la lumière de récents tests que nous avons réalisés avec un échantillon du laboratoire du Dr David Ferning, il semblerait que l'utilisation d'un ligand amphiphile composé d'un alcane, de PEG et d'un monothiol permette de fonctionnaliser des QDs très compacts, qui occasionnent beaucoup moins de liaisons non spécifiques sur des neurones en culture.

L'autre objectif majeur était de comparer les dynamiques de récepteurs marqués avec des sondes de différentes tailles et d'évaluer s'il y avait des différences au niveau de l'accessibilité synaptique. Les QDs commerciaux enrobés de SAV sont relativement plus compacts (23 nm contre 35 nm) que les QDs commerciaux avec un échafaudage anticorps primaire-anticorps secondaire, et la comparaison des trajectoires de récepteurs marqués avec ces deux types de sonde a montré qu'en moyenne, on retrouve plus souvent les récepteurs marqués avec des QDs-SAV à la synapse. Ce résultat suggère que les QDs plus compacts ont un meilleur accès à la synapse. En parallèle, l'application d'un protocole de stimulation chimique n'a pas induit une immobilisation synaptique et une augmentation claire de la proportion de temps passé à la synapse pour les récepteurs-QDs-AB. Un mauvais accès synaptique peut être en partie responsable de cette observation.

De plus, le fait que les récepteurs marqués avec des QDs-SAV passent encore plus de temps à la synapse 5 minutes après le marquage, alors que ce n'est pas le cas des QDs-AB, est un autre indicatif qui suggère un meilleur accès synaptique pour les QDs-SAV. Il est fort à parier que le marquage rapide utilisant un nuage concentré de QDs diffusant à proximité du neurone visé se fasse principalement sur des récepteurs extra-synaptiques. (les

synapses étant moins accessibles). Par la suite, certains de ces récepteurs marqués auraient accès aux synapses, par diffusion latérale.

Il faut cependant user de prudence avec ces résultats, puisque les QDs-SAV sont fortement multivalents, et que le fait de lier plusieurs récepteurs à la fois pourrait être responsable du ralentissement des récepteurs observé pour les trajectoires synaptiques et extra-synaptiques. Au niveau synaptique, ce ralentissement pourrait être responsable de l'augmentation de la proportion de temps passé à la synapse pour ces récepteurs.

Nous pensons que toutes ces observations viennent justifier l'intérêt de fonctionnaliser des QDs plus petits tout en contrôlant le nombre de protéines attachées aux QDs (pour éviter aux sondes de lier plus d'un récepteur à la fois). Bien que les sondes d'un peu plus de 22 nm de diamètre jouissent d'un meilleur accès à la fente synaptique en comparaison aux sondes de plus de 35 nm, elles restent surement en partie encombrantes pour les récepteurs marqués.

Avec les techniques de biofonctionnalisation de QDs en utilisant une monocouche de ligands de surface, nous pouvons espérer utiliser des QDs d'environ 10 nm de diamètre pour marquer des récepteurs synaptiques. Cependant, le fait d'utiliser une monocouche de molécules relativement courtes augmente le risque d'interactions entre les surfaces non passivées du nanocristal et le tissu biologique, ce qu'il faut éviter pour maximiser la spécificité de la sonde. Il faut donc s'assurer que le ligand choisi ne provoque pas d'encombrements stériques susceptibles de laisser des trous lors de la passivation de la surface.

De toutes les molécules que nous avons testées, les peptides, avec leur longue série de 6 cystéines qui interagissent à la surface des nanocristaux, sont surement les molécules qui provoquent le plus d'encombrements stériques à la surface des QDs. Sur cette base, les molécules avec un dithiol, comme le PEG-DHLA, devraient mener à une meilleure passivation. Cependant, pour les deux types de QDs, nous avons observé des problèmes d'adhésions non spécifiques sur les échantillons de neurones. Malgré tout, pour ces deux stratégies, le choix des PEG comme domaine hydrophile du ligand (50 % des peptides utilisés lors de l'échange de ligands se terminent avec un PEG₆), est un choix judicieux.

Pour une monocouche de molécules, la stabilité du ligand est critique. Par rapport à certaines molécules avec des monothiols, les ligands avec des dithiols ont normalement une meilleure stabilité [6]. Il est cependant possible d'augmenter la stabilité des ligands avec monothiols en utilisant un ligand plus amphiphile. Au niveau de l'équilibre entre les domaines hydrophile et hydrophobe, il semblerait que le rapport d'un alcane de 11 carbones avec un PEG₄ permettent de bien contenir le monothiol près de la surface du QD lorsqu'il expérimente des liaisons transitoires sur les ions²⁺.

Par rapport au dithiol, le monothiol devrait être moins affecté par l'encombrement stérique lors de la passivation de la surface des QDs. Cependant, pour comparer les ligands sur de mêmes bases, il faudrait tester l'utilisation d'un dithiol avec le même domaine amphiphile. Quel qu'il en soit, pour les travaux futurs, l'utilisation de ce type de molécule amphiphile est à prioriser.

En ce qui concerne l'extrémité libre du ligand, il peut être avantageux de combiner 2 espèces de ligands avec différentes terminaisons. Cela permet d'obtenir un enrobage constitué d'une minorité de terminaisons réactives pour la conjugaison d'un hameçon et d'une majorité de terminaisons passives pour éviter les interactions non spécifiques. Pour les QDs prometteurs enrobés de thiol-alcane-PEG du laboratoire du Dr David Ferning, le fait d'avoir un enrobage composé à 90 % de ligands non chargés (alors qu'un carboxyle suit le PEG sur 10 % des ligands) est un obstacle à l'utilisation de l'électrophorèse pour isoler les QDs selon le nombre de protéines attachées. Pour des QDs qui sont couplés à de la SAV, une alternative, pour tenter d'isoler les QDs avec une seule SAV attachée sans passer par l'électrophorèse, est d'utiliser la chromatographie par affinité avec la biotine.

L'avantage des QDs par rapport aux autres fluorophores utilisés en biologie est leur grande photostabilité. Pour toute expérience où il est requis de suivre sur de longues périodes des cibles biologiques uniques, les QDs représentent un outil particulièrement intéressant. Il serait d'ailleurs très pratique de développer des QDs qui pourraient être utilisés tout à la fois comme traceurs et comme senseurs de l'environnement immédiat des cibles marquées. Pour l'étude du recyclage des récepteurs synaptiques à la membrane de neurones et des mécanismes qui lient diffusion membranaire, endocytose, exocytose et plasticité

synaptique, le développement de QDs sensibles au pH permettrait notamment de suivre des protéines sur de très longues périodes et de distinguer les protéines marquées qui sont toujours à la membrane de celles qui ont été endocytosées dans des vésicules à l'intérieur de la cellule.

Bibliographie

- [1] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller. *Diffusion Dynamics of Glycine Receptors revealed by Single Quantum Dot Tracking*, *Sciences*, 302, 442-445 (2003)
- [2] L. Groc, M. Heine, L. Cognet, K. Brickley, FA Stephenson, B. Lounis, D. Choquet. *Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors*, *Nature Neuroscience*, 7, 695-696 (2004)
- [3] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell. *Principles of neural science* (4me édition), McGraw-Hill, New York, (2000)
- [4] M. Howarth, W. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, A. Y. Ting. *Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells*, *Nature Methods*, 5, 397-399 (2008)
- [5] S. Clarke, F. Pinaud, O. Beutel, C. You, J. Piehler, M. Dahan. *Covalent Monofunctionalization of Peptide-Coated Quantum Dots for Single-Molecule Assays*, *NanoLetters*, 10, 2147-2154 (2010)
- [6] W. Liu, M. Howarth, A. B. Greytak, Y. Zheng, D. G. Nocera, A. Y. Ting, M. G. Bawendi. *Compact Biocompatible Quantum Dots Functionalized for Cellular Imaging*, *J Am Chem Soc.*, 130, 1274-1284 (2008)
- [7] D. Choquet, A. Triller, *The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane*, *Nature Reviews*, 4, 251-265 (2003)
- [8] A. Peters, S. L. Palay, H. de F. Webster, *The fine Structure of the Nervous System*, Saunders, Philadelphie, (1976)
- [9] A. Triller, D. Choquet, *New concepts in Synaptic Biology Derived from Single-Molecule Imaging*, *Neuron*, 59, 359-374 (2008)
- [10] M.-V. Ehrensperger, C. Hanus, C. Vannier, A. Triller, M. Dahan. *Multiple Association States between Glycine Receptors and Gephyrin Identified by SPT analysis*, *Biophysical Journal*, 92, 3706-3718 (2007)
- [11] C. Bats, L. Groc, D. Choquet. *The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking*, *Neuron*, 53, 719-734 (2007)

- [12] M. C. Ashby, S. A. De La Rue, G. S. Ralph, J. Uney, G. L. Collingridge, J. M. Henley. *Removal of AMPA receptors (AMPA_Rs) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPA_Rs*, *The Journal of Neuroscience*, 24, 5172-5176 (2004)
- [13] G. A. Youdowski, M. A. Puthenveedu, D. Leonoukadis, S. Panicker, K. S. Thorn, E. C. Beattie, M. von Zastrow. *Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors*, *The Journal of Neuroscience*, 27, 11112-11121 (2007)
- [14] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb. *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*, *Biophysical Journal*, 16, 1055-1069 (1976)
- [15] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W. W. Webb. *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one and two-photon excitation*, *Biophysical Journal*, 77, 2251-2265 (1999)
- [16] P. Opazo, S. Labrecque, C. M. Tigaret, A. Frouin, P. W. Wiseman, P. De Koninck, D. Choquet. *CaMKII Triggers the diffusional trapping of surface AMPA_Rs through phosphorylation of Stargazin*, *Neuron*, 67, 239-252 (2010)
- [17] H. Bannai, S. Lévi, C. Schweizer, T. Inoue, T. Launey, V. Racine, J. B. Sibarita, K. Mikoshiba, A. Triller. *Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABA_AR diffusion dynamics*, *Neuron*, 62, 670-682 (2009)
- [18] E. M. Petrini, J. Lu, L. Cognet, B. Lounis, M. D. Ehlers, D. Choquet. *Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation*, *Neuron*, 63, 92-105 (2010)
- [19] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequora*, *Journal of Cellular Physiology*, 59, 223-239 (1962)
- [20] G. Miesenböck, D. A. De Angelis, J. E. Rothman. *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins*, *Nature*, 394, 192-195 (1998)
- [21] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, *A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells*, *Science*, 297, 1873-1877 (2002)
- [22] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess. *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*, *Science*, 313, 1642-1645 (2006)

- [23] A. J. Borgdorff, D. Choquet. *Regulation of AMPA receptor lateral movements*, Nature, 417, 649-653 (2002)
- [24] C. Tardin, L. Cognet, C. Bats, B. Lounis, D. Choquet. *Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses*, EMBO Journal, 22, 4656-4665 (2003)
- [25] L. Chalet, F. J. Wolf. *The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 106, 1-5 (1964).
- [26] B. A. Tannous, J. Grimm, K. F. Perry, J. W. Chen, R. Weissleder, X. O. Breakefield. *Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging*, Nature Methods, 3, 391-396 (2006)
- [27] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos. *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*, Science, 281, 2013-2016 (1998)
- [28] A. P. Alivisatos. *Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots*, Science, 271, 933-937 (1996)
- [29] P. Reiss, M. Protière, L. Li. *Core/Shell semiconductor nanocrystal*, small, 5, 154-158 (2009)
- [30] M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest. *Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals*, J. Phys. Chem., 100, 468-471 (1996)
- [31] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann. *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*, Nature Methods, 5, 763-775 (2009)
- [32] S. Doose, J. M. Tsay, F. Pinaud, S. Weiss. *Comparison of photophysical and colloidal properties of biocompatible semiconductor nanocrystals using fluorescence correlation spectroscopy*, Anal. Chem., 77, 2235-2242 (2005)
- [33] X. Michalet et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*, Science, 307, 538-544 (2005)
- [34] X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. Chung, S. Nie. *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*, Nature biotechnology, 22, 969-976 (2004)
- [35] F. Osaki, T. Kanamori, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama. *A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region*, J. Am. Chem. Soc, 126, 6520-6521 (2004)

- [36] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber. *In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles*, Science, 298, 1759-1762 (2002)
- [37] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos. *Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots*, J. Phys. Chem. B, 105, 8861-8871 (2001)
- [38] F. Pinaud, S. Clarke, A. Sittner, M. Dahan. *Probing cellular events, one quantum dot at a time*, Nature Methods, 7, 275-285 (2010)
- [39] A. R. Clapp, E. R. Goldman, H. Mattoussi. *Capping of CdSe-ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins*, Nature Protocols, 1, 1258-1266 (2006)
- [40] F. Pinaud, D. King, H. P. Moore, S. Weiss. *Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides*, J. Am. Chem. Soc., 126, 6115-6123 (2004)
- [41] J. B. Delehanty, I. L. Medintz, T. Pons, F. M. Brunel, P. E. Dawson, H. Mattoussi. *Self-assembled quantum dot-peptide bioconjugates for selective intracellular delivery*, Bioconjugate Chem., 17, 920-927 (2006)
- [42] E. L. Bentzen, I. D. Tomlinson, J. Mason, P. Gresch, M. R. Warnement, D. Wright, E. Sanders-Bush, R. Blakely, S. J. Rosenthal. *Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays*, Bioconjugate Chem., 16, 1488-1494 (2005)
- [43] Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Elsevier, San Diego, 173-175 (1996)
- [44] A. Hudmon, E. Lebel, H. Roy, A. Sik, H. Schulman, M. N. Waxham, P. De Koninck. *A mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinase II clustering image at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association*, J. Neurosci., 25, 6971-6983 (2005)
- [45] D. J. Gross, W. W. Webb, *Cell surface clustering and mobility of the liganded LDL receptor measured by digital video fluorescence microscopy*, Spectroscopic Membrane Probes II, CRC Press, Boca Raton, 19-45 (1988)
- [46] G. M. Lee, A. Ishihara, K. A. Jacobson. *Direct observation of Brownian motion of lipids in a membrane*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6274-6278 (1991)
- [47] H. Qian, M. P. Sheetz, E. L. Elson. *Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems*, Biophys. J., 60, 910-921 (1991)

- [48] A. Kusumi, Y. Sako, M. Yamamoto. *Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells*, Biophys. J., 65, 2021-2040 (1993)
- [49] C. Tardin, L. Cognet, C. Bats, B. Lounis, D. Choquet. *Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses*, The EMBO Journal, 22, 4656-4665 (2003)
- [50] C. Bats, L. Groc, D. Choquet. *The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking*, Neuron, 53, 719-734 (2007)
- [51] I. Izeddin, C. G. Specht, M. Lelek, X. Darzacq, A. Triller, C. Zimmer, M. Dahan. *Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe*, PLOS one, 6 (2011)
- [52] W. Liu et al, *Compact biocompatible quantum dots via RAFT-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligands*, J. Am. Chem. Soc., 132, 472-483 (2010)
- [53] E. L. Bentzen, I. D. Tomlinson, J. Mason, P. Gresch, M. R. Warnement, D. Wright, E. Sanders-Bush, R. Blakely, S. J. Rosenthal. *Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assay*, Bioconjugate Chem., 16, 1488-1494 (2005)
- [54] L. Duchesne, D. Gentili, M. Comes-Franchini, D. G. Fernig. *Robust ligand shells for biological applications of gold nanoparticles*, Langmuir, 24, 13572-13580 (2008)

ANNEXES

ANNEXE 1: Algorithmes pour la détection des QDs et des synapses

Puisque la détection automatisée d'objets brillants est assez fréquente en photonique, nous avons décidé d'ajouter des explications sur les algorithmes de détection des QDs et des synapses.

Pour la détection d'objet, nous fonctionnons en deux étapes. Premièrement, nous sélectionnons les pixels (à l'aide d'un seuillage) qui sont associés aux objets recherchés (ce sont les codes de ces seuillages qui sont présentés). Ensuite, nous profitons du fait que Matlab offre plusieurs outils d'analyse d'objets. Avec la fonction *BWlabel*, nous réunissons les pixels positifs voisins en objets, avant de sélectionner les objets d'intérêt à partir de paramètres tels l'excentricité, le nombre de pixels minimal et le nombre de pixels maximal (ces fonctions sont des outils fournis avec le logiciel Matlab).

Annexe 1.1 : Corrélation d'un filtre gaussien pour la détection des QDs

Le seuillage à partir de la corrélation d'un filtre d'une allure prédéterminée est une option efficace si l'on cherche à identifier, dans une image, des objets qui ont des dimensions égales et des profils d'intensité comparables. C'est le cas des PSF de différents QDs qui ont la même longueur d'onde d'émission.

Puisque cette PSF a une allure gaussienne, alors l'utilisation d'un filtre d'allure gaussienne est appropriée. Dans notre cas, nous imposons une translation négative au filtre, de telle sorte que la périphérie est négative et le centre est positif. Ainsi, pour les pixels des objets

ayant la même allure que le filtre (objets avec une intensité supérieure au centre et inférieure en périphérie selon un profil gaussien), le résultat de la corrélation est positif. Pour les autres pixels, le résultat est négatif.

```

%L'algorithme va chercher dans l'interface utilisateur les valeurs des
paramètres du filtre gaussien

%fl est le premier degré de liberté et correspond à l'écart type de la
%gaussienne

    fl = (get(slidef1,'Value'));

    set( fh, 'String',fl);

%D1 est le deuxième degré de liberté et correspond à la translation
%négative de la gaussienne

    D1 = (get(slideD1,'Value'));

    set( Dh, 'String',D1);

%expression de la matrice selon les paramètres choisis : matrice 7x7 avec
% un écart type fl pour laquelle nous imposons une translation négative
%d'amplitude D1

    moule_Gauss1= fspecial('gaussian',7,fl)-D1*ones(7);

%corrélation image avec la matrice_filtre (puisque le filtre est
%symétrique, la convolution est l'équivalent d'une corrélation)

    I_corr_Gauss1=conv2(I2,moule_Gauss1,'same');

%on «binarise» le résultat en sélectionnant les pixels pour lesquelles la
%corrélation a donné un résultat positif

    If1=I_corr_Gauss1>0;

```

Annexe 1.2 : Application d'un seuil adaptatif pour localiser les synapses

Sur une image, en microscopie par fluorescence, d'un neurone avec une population de protéines fluorescentes qui s'accumulent aux synapses, les synapses sont caractérisées par une intensité supérieure à celle de leur entourage. Cependant, la concentration de protéines fluorescentes n'est pas la même dans toutes les synapses (donc la valeur pic de l'intensité des synapses n'est pas la même), et les dimensions des synapses sont variables. Il arrive même qu'aux régions éloignées du corps cellulaire, l'intensité des synapses soit inférieure à l'intensité d'une dendrite qui est prêt du corps cellulaire. Pour toutes ces raisons, la détection des synapses doit se faire avec un seuillage qui tient compte du voisinage de la synapse.

Le point de départ du seuillage adaptatif, c'est que nous calculons, pour tous les pixels, les moyennes régionales des intensités. Ensuite, nous appliquons la soustraction de ces intensités moyennes sur les intensités réelles. L'effet de cette soustraction est de faire ressortir les éléments de contrastes locaux, au détriment des valeurs d'intensité absolue (valeurs positives sur les maximums locaux et négatives pour les minimums locaux). Bien sûr, le choix des dimensions de la région sur laquelle effectuer la moyenne régionale est critique. Puisque les synapses, sur notre montage, font en moyenne 3pixels x 3pixels, une région de 7x7 à 12x12 pixels est appropriée. On effectue ensuite le seuillage sur cette nouvelle matrice, en sélectionnant les pixels dont la valeur est supérieure à un nombre d'écart types (que l'utilisateur sélectionne) au-dessus de la moyenne de la matrice.

```
%L'algorithme va chercher dans l'interface utilisateur les valeurs des
paramètres du seuillage adaptatif

%W est le premier degré de liberté, il donne la dimension de la région où
%effectuer une moyenne régionale

W = round(get(slideW, 'Value'));

set( Wh, 'String',W)
```

```
%kSD est le deuxième degré de liberté, il représente le contrôle du
%seuillage

kSD = (get(slidekSD, 'Value'));

set( kSDh, 'String', kSD)

% on prépare une matrice pour faire une moyenne régionale à
partir d'une convolution

Local_ROI = ones(W,W)/(W^2);

Local_Average = conv2(I2, Local_ROI, 'same');

% On soustrait la moyenne régionale à la valeur des pixels

I_Offset = I2 - Local_Average;

% On détermine la moyenne de cette nouvelle matrice

I_mean = mean2(I_Offset);

% On détermine l'écart type de cette nouvelle matrice

I_SD = std2(I_Offset);

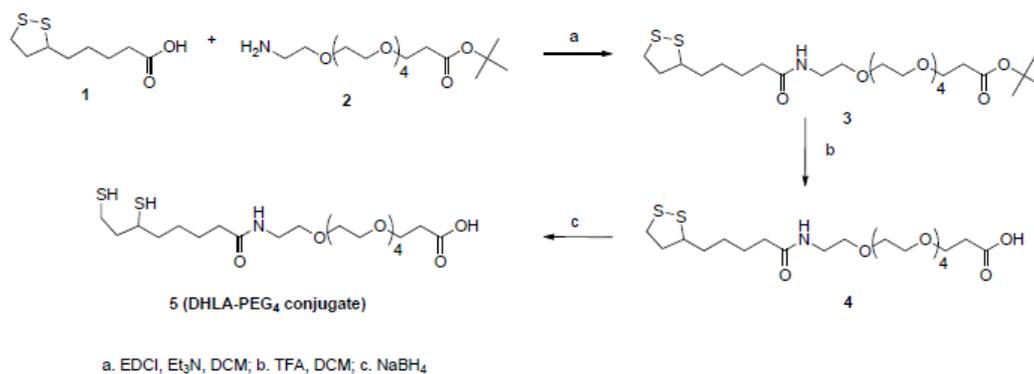
%on «binarise» le résultat du seuillage pour les valeurs de la nouvelle
matrices supérieurs à un nombre d'écart types (kSD*I_SD) au-dessus de la
moyenne

It = I_Offset > I_mean+kSD*I_SD;
```

ANNEXE 2: préparation du PEG-DHLA à partir d'acide lipoïque et de amino-PEG₄-t-butyle-ester

Note : les étapes, détails techniques et quantités réfèrent à la manipulation réalisée du 29 au 31 mars 2010 au laboratoire de M. Éric Marsault, Université de Sherbrooke.

Schémas des réactions:



A : Conjugaison du amino PEG t-butyle ester avec l'acide lipoïque

Tableau des quantités de produits utilisés

	Poids moléculaire [g/mol]	Nbr de moles [mmoles]	Quantité -
Acide lipoïque	206,3	0,78	161 mg
amino PEG t-butyle ester	321,4	0,78	250 mg
Et3N*	101,2	0,936	126,3ul
DCM	-	-	5 ml
EDC	191,7	0,936	179 mg

*L'Et3N a une densité de 0,75 g/ml

Procédure expérimentale :

Conjugaison

1. On dépose 250 mg de amino PEG t-butyle ester dans un ballon (on vise le double du volume de réactifs pour le ballon). Ce produit étant très précieux, il vaut mieux procéder par pesée inverse en utilisant une pipette pasteur. On rince la pipette (l'intérieur et le bout) avec le solvant (DCM) pour récupérer le plus de produit possible.
2. On ajoute l'acide lipoïque.
3. On ajoute l'EDC.
*note : on peut se satisfaire d'une précision à la pesée de ± 3 mg, la réaction n'étant pas trop capricieuse en terme de stœchiométrie.
4. On ajoute le Et3N.
5. On met un agitateur magnétique dans le ballon et on brasse à vitesse moyenne pour au moins 4 heures. On ferme le ballon avec un septum.

Vérification de la réaction: chromatographie sur couche mince (CCM)

On utilise une plaquette de verre recouverte de silice (Silicycle, cat no :TLG-R10011B-323) pour faire migrer, par élution, les différents composés du produit final à différentes positions sur la plaquette.

1. On prépare un mélange de 9 ml d'acétate d'éthyle et de 1 ml méthanol que l'on dépose dans le fond d'un bocal cylindrique bouchonné de diamètre de 5 cm environ. Ce mélange constitue notre éluant (le choix des quantités et du diamètre du bocal doit faire en sorte que l'éluant ne dépasse pas la ligne de dépôt de notre plaquette). On insère un papier filtre sur le côté du bocal pour saturer l'atmosphère du contenant.
2. On prépare la plaquette (environ 2 cm de largeur et 6 cm de hauteur). Au bas de cette dernière, on écrit au crayon de plomb les différents composants qui seront déposés (nous pouvons en déposer jusqu'à 4 par plaquette), et on inscrit un petit point environ 5 mm en haut du nom du produit (ce point correspond au «spot» de dépôt du produit).
3. On dépose les produits sur les «spots» (respectivement l'acide lipoïque, le amino PEG, le brut réactionnel, et un spot réunissant ces 3 produits), en utilisant une pipette pasteur étirée dans laquelle on fait monter une petite quantité de produit par capillarité (on trempe le plus vite possible la pipette dans le composé que l'on veut déposer et la quantité ainsi recueillie est suffisante). En déposant la pipette sur la silice, cette dernière agit en buvard (faire attention pour que les spots soient bien différenciés afin d'éviter les fuites dans les lignes de migration voisines).
4. On dépose la plaquette, «spot» vers le bas, dans le bocal, et on ferme le bocal. On laisse éluer jusqu'à ce que l'éluant arrive à 5 mm du haut de la plaquette
5. On amène à la lampe U.V. et on trace au crayon de plomb les spots ayant migré que l'on voit. On trempe la plaquette dans le CMA (d'un seul trait, éviter les vas et viens pour imbiber la plaquette, car ainsi on disperse nos spots...) et on cuit au pistolet chauffant pour la révélation des «spots». On reproduit l'allure de la plaquette dans notre cahier de laboratoire et on s'assure qu'il est impossible de discerner les spots des réactifs initiaux dans la ligne du composé final.

Lavage

Avec cette étape, on cherche à solubiliser dans l'eau les réactifs indésirables, alors que notre produit reste soluble dans le DCM. On utilise donc du NH_4Cl pour protoner toutes les bases et du NaHCO_3 pour déprotoner l'acide lipoïque.

1. On dilue le produit dans 20 ml de DCM.
2. On verse le contenu du ballon dans une ampoule à décantation. On rince par la suite le ballon avec du DCM (attention à la barre magnétique lorsque l'on verse dans l'ampoule).
3. On ajoute du NH_4Cl sursaturé (environ 20 ml, mais cela n'a pas besoin d'être très précis).
ATTENTION : ne jamais brasser les solutions sursaturées...
4. On prend 2 erlenmeyers pour séparer les phases DCM et H_2O (le DCM étant plus dense que l'eau, cette phase est celle du dessous).
5. On remet la phase DCM dans l'ampoule et on reprend le lavage NH_4Cl
6. On refait un 3^{me} lavage NH_4Cl
7. On procède par la suite à 3 lavages au NaHCO_3 sursaturé.
8. On fait un dernier lavage à la saumure saturée.
9. On ajoute à la phase DCM un bon gros quart de spatule de sulfate de Mg anhydre, et ce afin de bien déshydrater notre phase DCM.
10. On filtre avec un fritté « coarse » (avec une pompe à eau) au-dessus d'un ballon de 50 mL (la solution devrait être limpide).
11. On installe le ballon dans un rotavap à 30 °C-35 °C pour évaporer le DCM. Le produit final devrait ressembler à une huile jaunâtre. NB : ne pas oublier de tarer le ballon.
12. On met un septum sur notre ballon, en attendant de procéder à la purification.

Purification

On procède à une chromatographie sur colonne de gel de silice (compagnie : Silicycle, produit : SiliaFlash, cat no : R12030B), en utilisant un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol comme phase mobile.

1. On pèse le produit : 400 mg de brut.
2. On préparera la colonne avec 30 fois le poids de l'échantillon en silice. Pour les 400 mg, on utilise donc une colonne de 0,5 m de hauteur et de 2,5 cm de diamètre dans laquelle la silice occupe 20 cm de hauteur environ.
3. Avant d'insérer la silice, on s'assure qu'il y a un filtre à l'embouchure de sortie de la colonne. Si ce n'est pas le cas, on insère un petit bout de coton. On s'installe sous la hotte et on met environ 0,5 cm de sable dans le fond de la colonne.
4. Après avoir préalablement mouillé la silice avec de l'acétate d'éthyle pure, on l'insère dans la colonne, bien calmement pour éviter de déplacer le sable.
5. Avec un système de pression (ne pas dépasser 10psi), on fait couler de l'acétate d'éthyle à travers le gel pour compacter la silice. Il faut bien faire attention, lors de cette étape, d'ajouter du solvant lorsque celui-ci arrive au niveau de la silice (ne jamais laisser sécher la silice). Lorsque la colonne est suffisamment compacte, on laisse couler le solvant jusqu'au niveau de la silice (on devrait seulement voir la silice mouillée, et non une interface entre la silice mouillée et une quantité de solvant limpide).

6. On dissout notre produit à purifier dans l'acétate d'éthyle. On dépose le produit dissous dans la colonne à l'aide d'une pipette en faisant couler par les rebords de la colonne (il faut éviter les gouttes qui tombent directement sur la silice). On cherche toujours à minimiser la taille du dépôt : plus le dépôt est petit, meilleure sera la séparation des constituants.
7. On met ensuite de la pression pour faire couler le dépôt jusque dans la silice.
8. On rince la colonne avec l'acétate d'éthyle (on veut récupérer le plus de produit possible), et on fait couler le solvant jusqu'à l'extrémité de la silice.
9. On ajoute doucement 4 mm de sable sur le dessus de la colonne.
10. On prépare notre phase mobile : 99 % d'acétate d'éthyle et 1 % de méthanol. On remplit la colonne (avec précaution pour ne pas déplacer le sable) avec la phase mobile.
11. On laisse couler l'éluant en remplissant les petits contenants de manière ordonnée, en assignant à chaque contenant le numéro associé à l'ordre de remplissage. (notre produit étant jaunâtre, il peut être pratique de suivre sa progression dans la colonne pour avoir une petite idée du moment auquel il sort...).
12. On regarde les échantillons à partir de chromatographies sur couche mince, en préparant des plaquettes dont les spots sont issus de contenants distancés de quelques incréments (exemple : contenants 3-6-9-12 pour la première plaquette). Le produit étant très dilué, on peut préparer un «spot» à partir de plusieurs contacts entre la pipette et la plaquette, en laissant sécher le produit entre les contacts.
13. Si, après 1 remplissage et élution de la colonne, le produit n'est pas encore sorti (ou pas sorti complètement), on passe à 2 % de méthanol pour la phase mobile. Si après ce nouveau remplissage et une nouvelle élution, notre produit n'est pas sorti complètement, on remplit maintenant à 5 % de méthanol.
14. Lorsque l'on a repéré un premier contenant avec notre produit, on balaie, par incréments de 2 contenants, le voisinage de ce contenant positif (dans notre cas on a repéré le produit au contenant 54, donc on fait une première CCM sur les contenants 50-52-54-56). Attention : si la CCM révèle d'autres produits que celui qui nous intéresse, alors il faut rejeter le contenant, car cela indique que le produit d'intérêt n'est pas isolé des contaminants.
15. On procède ainsi pour déterminer la borne inférieure et supérieure des contenants où l'on retrouve strictement le produit d'intérêt, en faisant les dernières CCM à partir de spots incrémentés de 1 contenant (pour déterminer précisément le contenant où l'on ne retrouve plus de produits).
16. On concentre le produit à partir d'une succession d'évaporation du solvant au rotavap (30°C-35°C, vitesse de rotation moyenne, ballon de 100 ml, NE PAS OUBLIER DE PESER LE BALLON AVANT LA CONCENTRATION), en faisant bien attention de ne pas dépasser la moitié du volume du ballon en produit à concentrer à chaque étape de rotavap. Il est important de rincer nos contenants à l'acétate d'éthyle et de verser ce rinçage dans notre ballon pour récupérer le maximum de produit.

17. Lorsque cette étape est terminée, on pèse le ballon avec le produit. Nous en avons 241 ± 2 mg, ce qui, à raison d'un poids moléculaire de produit de 477.7 g/Mol, donne une quantité de 0.5 mMol (en comparant aux 0.78 mMol de produit initial, cela donne un rendement $\approx 65\%$).
18. Selon la quantité de produit recueillie, il peut être pratique de faire un transfert de ballon dans un ballon plus petit (ce qui nécessite un bon rinçage à l'acétate d'éthyle ainsi qu'une nouvelle évaporation du solvant au rotavap), dans notre cas on a transféré le produit dans un ballon de 25 ml.
19. On met notre ballon sous vide en attendant l'étape de déprotection du T-Butyle ester.

RMN

On s'assure que le produit recueilli correspond bien aux attentes à partir d'une RMN. On prépare l'échantillon en prélevant une infime quantité de produit (1mg suffit) que l'on disperse dans du CDCl_3 .

B : Déprotection du t-butyle ester

Tableau des quantités de produits utilisés

	Poids moléculaire [g/mol]	Nbr de moles [mmoles]	Quantité -
Produit no 3 (voir schémas des réactions)	477,7	0,5	240 mg
DCM	-	-	5 ml
TFA	-	-	5 ml

Procédure expérimentale :

Réaction

1. On tire notre ballon du vide.
2. On ajoute à notre ballon 5 ml de DCM.
3. On ajoute à notre ballon 5 ml de TFA (ATTENTION, LE TFA EST EXCESSIVEMENT CORROSIF).
4. On ajoute un agitateur magnétique et on brasse à température ambiante pendant 1 hr.

Vérification : CCM

1. Encore une fois, l'éluant est composé d'un mélange de 9ml d'acétate d'éthyle avec 1 ml de méthanol.
2. On dépose 3 spots sur la plaquette : le produit initial, le nouveau produit et le co-spot.
3. On procède à l'élution, et après révélation au CMA, on s'assure de ne pas retrouver de produit initial dans la ligne du nouveau produit.

Concentration

1. On retire le barreau magnétique du ballon.
2. On évapore le solvant au rotavap (30°C-35°C).
3. On insère du DCM en brassant bien le ballon.
4. On évapore le solvant au rotavap (30°C-35°C).
5. On reprend une deuxième fois les étapes 3 et 4.
6. On pèse le produit final (375 mg) et on met le ballon sous vide en attendant l'étape C.

C : Réduction

Tableau des quantités de produits utilisés

	Poids moléculaire [g/mol]	Nbr de moles [mmoles]	Quantité [mg]
Produit no 3 (voir schémas des réactions)	477,7	0,5	240
Bicarbonate de sodium	84	2,5	210
Borohydrure de sodium	38	3	114

Procédure expérimentale

Réaction

1. On ajoute 10 ml d'eau distillée dans le ballon, ainsi qu'un agitateur magnétique.
2. On pèse 240 mg de Bicarbonate de sodium (pour avoir l'équivalent d'une solution de 10ml de bicarbonate à 0.25 M), que l'on mélange tranquillement au contenu du ballon (attention, ça fait des bulles, commencer le brassage très calmement).
3. On pèse 114 mg de borohydrure de sodium, que l'on mélange tranquillement au contenu du ballon.
4. On couvre le ballon avec un septum que l'on perce avec une aiguille, et on brasse à température pièce pendant 1 heure.

Vérification : CCM

1. On utilise le même éluant que lors des dernières CCM.
2. Après révélation au CMA, le «spot» initial ne devrait pas avoir bougé, car après l'étape de réduction, le produit est tellement polaire qu'il ne doit pas être entraîné par l'éluant.

Extraction

Cette étape est semblable à l'étape «A :Lavage». On utilise une ampoule à décanter (60 ml dans notre cas, peut aussi être 30 ml), à l'intérieur de laquelle on isole notre produit d'intérêt des composés indésirables par séparation de phase. Il faut toujours laisser respirer l'ampoule lors de la décantation.

1. On met la solution dans l'ampoule (on rince bien notre ballon à l'eau distillé pour récupérer le maximum de produit). On ajoute par la suite à peu près 20 ml d'éther et on brasse bien notre ampoule en prenant soin de «dégâser» l'ampoule entre chaque «shake».
2. On récupère la phase aqueuse (celle du dessous, l'éther étant moins dense que l'eau) dans un erlenmeyer et la phase organique dans un autre erlenmeyer. Pour l'instant, la phase d'intérêt est la phase aqueuse.
3. On procède ainsi à un deuxième lavage à l'éther (on remet notre phase aqueuse dans l'ampoule et on ajoute de l'éther «neuf» du bidon).
4. On acidifie doucement notre solution à PH 2 en utilisant du HCL à 1 M (la précision d'un papier PH est suffisante pour ajuster le PH). Cette étape a pour but de reprotoner les carboxyles, et le produit d'intérêt, beaucoup moins polaire, se dirigera maintenant dans la phase organique.

5. On met la solution acide dans l'ampoule à décanter et on rince bien notre contenant à l'eau et par la suite au chloroforme (20-30 ml). La phase organique (chloroforme) est maintenant plus lourde.
6. On récupère notre phase organique dans un nouvel erlenmeyer, et on récupère aussi notre phase aqueuse. ATTENTION : l'efficacité de récupération de produit associé à cette étape de 70 %, il reste donc environ 30 % de produit dans la phase aqueuse.
7. On verse à nouveau notre phase aqueuse dans l'ampoule, et on rince l'erlenmeyer à l'eau distillée et au chloroforme. On brasse bien l'ampoule en dégasant, et on récupère nos deux phases. Il reste maintenant environ 9 % de produit dans la phase aqueuse.
8. On peut reprendre cette étape une 3^{me} fois, ainsi nous ne perdrons que 2.7 % de produit.
9. On verse notre phase organique dans l'ampoule et on rince bien le contenant au chloroforme. On ajoute ensuite du NaCl saturé. On brasse bien et on récupère la phase organique. On rince l'ampoule à décanter au chloroforme.
10. On ajoute une bonne cuillerée de Mg anhydre dans notre phase organique, on brasse bien, et on passe ensuite la solution dans un filtre fritter. On rince bien l'erlenmeyer au chloroforme, ainsi que le filtre fritter. On récupère la solution dans un ballon de 25 ml.
11. On évapore l'excès de chloroforme au rotavap et on prélève une toute petite quantité du produit pour procéder à la RMN. On met le ballon sous azote, et après avoir attendu pour s'assurer que l'atmosphère à l'intérieur du ballon est bien inerte, on recouvre le ballon avec un septum et on entoure le joint de paraffine.

ANNEXE 3 : Biofonctionnalisation de QDs-peptides enrobés de streptavidine (SAV)

Annexe 3.1 Échanges de ligands pour enrober les QDs de peptides

Note : les étapes, détails techniques et quantités réfèrent à la manipulation réalisée le 9 avril 2010 au laboratoire de M. Maxime Dahan, École Normale Supérieure, Paris.

A : Échange de ligands

Tableau des quantités de produits utilisés

	Concentration/Poids moléculaire	Nbr de moles	Quantité
	-	[nmoles]	-
Dots CdSe/ZnS 625nm	100 [μM]	2	20 ul
Peptide 1 (PEG)*	1795 [g/molle]	928	1,666 mg
Peptide 2 (K)**	2188 [g/molle]	761	1,666mg
Peptide 3 (C)***	2205 [g/molle]	378	0,833mg

*(FCC)³F-PEG₆

***(FCC)³FGSESGGSESGC

****(FCC)³FGSESGGSESGK

On préparera 3 échantillons de 20 μ l de dots, c'est ainsi plus facile de peser les peptides (par rapport au tableau, la procédure qui suit représente une recette triple).

1. On sort les QDs (CdSe/ZnS) du réfrigérateur et on leur laisse 5 minutes pour prendre la température pièce.
2. On mesure 3x20 μ l de QDs à 100 μ M que l'on dépose dans des petits pots en verre. On place les pots ouverts sur une plaque chauffante à 150 °C pour faire évaporer tout le solvant.
3. Lorsque les QDs sont bien secs, on ajoute 450 μ l de pyridine par pot. La pyridine fait décoller les ligands de surface hydrophobe. On ferme les pots et on les laisse sur la plaque chauffante, en prenant soin de brasser légèrement les pots aux 2 minutes pour s'assurer de disperser le plus de QDs possible (on veut récupérer le maximum de produit).
4. Pendant ce temps, on pèse un total d'environ 12 mg de peptides (toujours viser 4 mg de peptides par échantillon de 20 μ l QDs 100 μ M), donc 5 mg de PEG-peptide, 5 mg de K-peptide et 2.5 mg de C-peptide (en vérité, ça fait 12.5 mg de produit, de toute façon c'est assez difficile de peser au dixième de mg les quantités voulues...).
5. On dilue chaque échantillon de peptides avec 50 μ l de DMSO dans un tube conique. La dilution n'est pas instantanée, on doit donc patienter quelques minutes, en agitant très calmement à quelques reprises pour aider le processus.
6. Lorsque les peptides sont bien dilués, on mélange les trois tubes ensemble.
7. On divise ensuite les peptides dans trois nouveaux tubes de volumes égaux (50 μ l de peptide dans chaque tube).
8. On ajoute les 450 μ l de QDs dans un tube de peptides, et on mélange le tout calmement (10 «up and down»).
9. *****CETTE ÉTAPE EST SUBTILE, DANGEREUSE ET DOIT SE FAIRE TRÈS TRÈS RAPIDEMENT:** On pipette 12 μ L de tetramethylammoniumhydroxyde 25 % en solution dans le méthanol. On prend bien soin de sécher le contour de la pipette avec un papier absorbant. On injecte ce produit rapidement dans le milieu de notre échantillon de QDs-peptides, on ferme le tube conique et on agite assez ardemment avec le bras. Si tout se passe comme prévu, la solution devrait prendre une teinte ombragée.
10. On centrifuge à peu près 20 s dans la microcentrifugeuse. On fait couler le surnageant sous la hotte chimique, et on essuie délicatement le petit reste de liquide sur le dépôt de QDs avec un papier absorbant, en prenant soin de ne pas toucher aux QDs.
11. On ajoute 120 μ l de DMSO à notre échantillon. La dispersion n'étant pas instantanée, on patiente un peu en agitant calmement à petits intervalles pour aider le processus.
12. Pendant ce temps, on peut tout de suite commencer à rincer les colonnes «Sephadex G25» de 5 ml (GE healthcare, p.# 17-0853-02) avec de l'eau distillée. Avant le filtrage de notre échantillon, 3 rinçages sont requis (attention pour ne pas laisser sécher la colonne).
13. Lorsque l'échantillon est bien dilué dans le DMSO, on le centrifuge 1 minute à vitesse élevée pour précipiter les agrégats et autres résidus indésirables.

14. On pipette ensuite l'échantillon pour le déposer tranquillement sur le haut de notre colonne (après le dernier rinçage, on attend que la colonne ait arrêté de couler, et ensuite on dépose l'échantillon). On attend que l'échantillon ait pénétré la colonne (cette dernière s'est remise à couler après le dépôt de l'échantillon, et elle s'arrêtera lorsque l'échantillon aura pénétré complètement). On remplit ensuite la colonne d'eau DD, en y allant doucement (l'idéal est de faire couler l'eau sur le rebord de la colonne). On s'équipe ensuite d'une lampe UV et de lunette protectrice pour suivre l'évolution de l'échantillon dans la colonne. On prépare un tube conique de 1.5 mL, et lorsque les QDs commencent à sortir, on recueille la deuxième goutte (la première goutte peut avoir de gros agrégats, car les plus grosses particules sortent en premier de la colonne) et les 10 gouttes suivantes (après quoi, même s'il reste un tout petit peu de fluorescence, on est mieux d'arrêter la cueillette, les peptides libres pouvant être mêlé à notre produit).

B : Préparation du gel d'agarose 0,8 %

On prépare un gel d'agarose (10 cm par 7 cm) qui nous permettra de confirmer, en faisant migrer les QDs par application d'un champ électrique, que l'échantillon de QDs dispersés dans l'eau est suffisamment monodisperse pour procéder aux étapes subséquentes de la fonctionnalisation.

On prépare le tampon à gel en incorporant 50 ml de T-A-EDTA (Tris Acetate EDTA buffer 10X, Sigma, T9650) dans un contenant de 2 litres que l'on remplit subséquemment d'eau distillée (stock final à 0.25x).

1. On pèse 0,4 g d'agarose en poudre (agarose electrophoresis grade, Invitrogen, 15510-027). On mélange cette agarose à 50 ml de T-A-EDTA 0.25x. On met la solution au micro-ondes pendant 1 minute en surveillant bien le bocal pour ne pas que le liquide déborde. On récupère le bocal lorsque la solution est à ébullition et on brasse bien pour que la solution soit très claire. Parfois, il faut un peu plus de temps pour dissoudre l'agarose, donc on peut être appelé à remettre l'agarose au micro-ondes pendant 2-10 secondes pour que la solution bouille à nouveau. On attend par la suite 5-10 minutes jusqu'à ce que la solution soit parfaitement claire (on ne doit pas voir de petits «filaments de réfraction» dus à un indice de réfraction variable dans la solution) avant de déposer la solution dans nos plaques.
2. On prépare la plaque de gel en insérant le support transparent dans le fond du bac. On coule 50 ml de solution d'agarose dans le support. On insère ensuite les dents (séries de 8 ou 12 dents) pour que les bouts des dents ne touchent pas au fond du support, et pour que les fentes soient totalement submergées dans la solution d'agarose. On utilise une dent mince (environ 1.5 mm) pour avoir de fines bandes de nanoparticules lorsqu'elles

sont insérées dans le puits. On peut placer deux séries de dents par plaques, ce qui nous permet d'avoir deux groupes de couloirs de migrations par plaque.

3. On attend une trentaine de minutes pour que le gel prenne sa forme solide.
4. Il vaut mieux ne pas laisser le gel sécher trop longtemps, donc lorsque le gel est formé, on enlève les «dents» et on submerge le gel dans le tampon (T-A-EDTA 0.25x). Le tampon doit recouvrir tout le gel, en formant une couche mince sur le dessus de ce dernier.

C : Vérification de la qualité des échantillons

1. Lorsque le gel est prêt, on prépare les échantillons. Puisque nous n'aurons aucune difficulté à mesurer la fluorescence de nos échantillons (ces derniers sont bien concentrés et très fluorescents), nous mélangeons 1 μl d'un échantillon à 8 μl de tampon à gel et on ajoute 1 μl de glycérol (glycérol 50% dans l'eau). Nous préparons les mélanges tout juste avant de les déposer dans les puits.
2. On pipette les échantillons en les mélangeant bien (il est important que le glycérol se mélange bien pour que tout l'échantillon «coule» dans le puits), et on les dépose dans les puits. On branche ensuite les électrodes sur notre plaque, l'électrode positive étant du côté où on compte faire migrer les échantillons. On ajuste la tension à 180 V pour 20 minutes, et on vérifie après le départ qu'il y a bel et bien un courant aux alentours de 35 mA qui traverse le gel.
3. Après 20 minutes, on récupère le gel et on le photographie. Si l'échange de ligands s'est bien déroulé, il ne devrait avoir qu'une seule bande très brillante, relativement mince et bien distancée du point de départ.

Annexe 3.2 Conjugaison de la streptavidine

Note : les étapes, détails techniques et quantités réfèrent à la manipulation réalisée le 23 avril 2010 au laboratoire de M. Maxime Dahan, École Normale Supérieure, Paris.

A : Activation de la streptavidine (SAV)

	Concentration/Poids moléculaire	Nbr de moles [nmoles]	Quantité
	-		-
Streptavidine	36 μ M (2mg/ml)	1.8	50 μ l
SMCC dans le DMSO	5 mM	8	1.6 μ l

1. On sort les aliquotes de SAV et de SMCC du congélateur et on attend 15 minutes pour qu'ils dégèlent.
2. On ajoute 50 μ l de Hepes buffer 20 mM (NaCl 100 mM, pH 7.4) pour avoir une concentration finale de NaCl de 50 mM et une concentration finale de SAV de 18 μ M.
3. On ajoute 1.6 μ l de SMCC, pour avoir une concentration finale de SMCC de 80 μ M, et on brasse rapidement
4. On attend 45 minutes.

B : Purification des échantillons de QDs

1. On remplit un filtre vivaspin 10 kDA avec 100 μ l de QDs-peptides que l'on veut conjuguer (cet échantillon a été filtré sommairement à l'aide d'une colonne «sephadex», mais il reste encore du DMSO et un peu de peptides non liés après les étapes décrites à l'annexe 3.1 A). Si l'échantillon ne remplit pas le filtre, on le remplit avec de l'eau distillée. On ajoute 0.5 μ l de TCEP (5 μ M) pour réduire les cystines. On ajoute 0.5 μ l de NaOH 8 M afin d'augmenter le pH de la solution (cela facilite le filtrage et empêche les particules de coller à la membrane du vivaspin). On brasse bien et on centrifuge calmement à 1200 g pendant 12 minutes.

2. On vide le vivaspin du contenu qui a passé la membrane, on le remplit d'eau distillée, on brasse bien et on centrifuge à 1200 g pendant 12 minutes (refaire cette étape 3 fois).

C : Conjugaison

1. Puisqu'il est assez difficile de suivre l'évolution de la concentration de notre échantillon de nanoparticules, on procède empiriquement en préparant 5 mélanges «nanoparticules(μ L):streptavidine 18 μ M (μ L)»: «1:0 , 1:1 , 1:3 , 1:5 , 1:10». Cette conjugaison constitue un test, donc on essaie d'utiliser le moins possible de nanoparticules, d'où l'intérêt de ne conjuguer qu'un seul microlitre.
2. On s'assure que la concentration de nanoparticules soit la même dans tous les mélanges en ajoutant aux mélanges les moins volumineux la différence de tampon (Hepes 20mM 50 mM NaCl pH 7.4). Dans le présent exemple, nous avons donc 5 mélanges composés d'un total de 11 μ L de solution.
3. Nous laissons au moins 45minutes pour la réaction.
4. On profite de ce temps de réaction pour préparer un gel d'agarose 0,8%
5. Lorsque nos mélanges ont suffisamment réagi, on ajoute 5 μ L de gel Buffer (cela aide à la migration) et 1 μ L de glycérol 50 % à chacun de nos mélanges. On brasse bien et on insère dans les puits du gel.
6. On fait migrer en positionnant l'électrode positive dans le sens de la migration et on ajuste la tension à 180 V pour 25 minutes, en s'assurant que le courant au travers de la plaque est approximativement de 35 mA.
7. On prend une photographie du gel. La colonne associée aux QDs n'ayant pas été couplés à la SAV devrait révéler une seule bande, la plus distancée du point de départ (les plus petits QDs migrent plus vite). Progressivement, pour des quantités croissantes de SAV, on devrait voir la formation d'une deuxième et d'une troisième bande de plus en plus intenses, qui correspondent aux QDs conjugués à 1 seule SAV et à de multiples SAV respectivement.
8. Selon le gel et notre application, on choisit le ratio de couplage qui nous intéresse (on peut être intéressé à maximiser le couplage de QDs-1_SAV et on s'intéressera donc au ratio donnant une bande centrale très brillante, mais on peut aussi chercher à maximiser le couplage de QDs-plusieurs_SAV, donc s'intéresser au ratio donnant une bande finale très brillante).
9. On refait un couplage à grande échelle avec le ratio optimal (les QDs sont déjà purifiés et la SAV est déjà activée, il suffit donc de mélanger avec le bon ratio). S'il reste de la SAV activée, on peut la conserver quelques jours à 4 °C, car elle reste active sur cette période.

10. On prépare un nouveau gel d'agarose 80 %, en prenant soin de sélectionner une profondeur de puits étroite. On fait migrer à 180 V pendant 15 minutes environ (on diminue le temps de migration, car on cherche ici à former les bandes en minimisant l'élargissement de ces dernières, puisque l'on veut minimiser la quantité de tampon à gel qui sera mélangé aux QDs lors de la purification des bandes d'intérêt).
11. On prend une photo de notre gel et on coupe la (ou les) bande(s) d'intérêt, en prenant soin d'éliminer de notre bande les parties où la concentration de QDs est faible. On hache ensuite finement le gel recueilli, et on le dépose dans un filtre nanosep 0.2 μm (Sigma-Aldrich). On centrifuge à 5000 g pendant 5 minutes et on récupère l'échantillon dans le bas du filtre (le tampon et les QDs ont passé alors que l'agarose a été piégée).

ANNEXE 4 : Mesures au Zeta-sizer de diamètres hydrodynamiques de QDs commerciaux

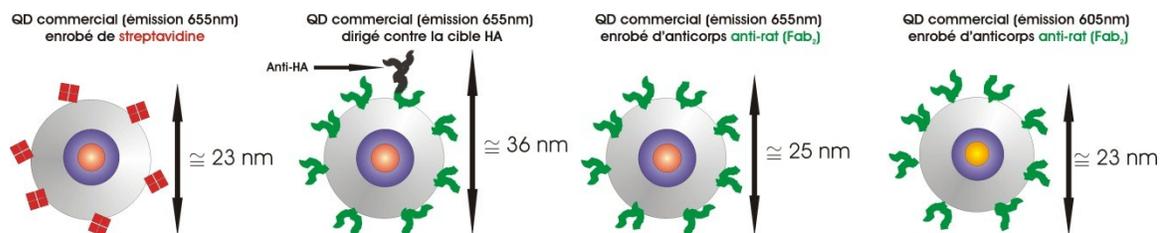
Pour des QDs enrobés de molécules organiques et conjugués à des protéines, il est difficile d'utiliser la microscopie électronique pour déterminer le diamètre de la particule, car le contraste obtenu est celui des matériaux semi-conducteurs. Une technique répandue, pour évaluer le diamètre de nanoparticules composées d'atomes légers, est de dériver leur diamètre hydrodynamique à partir de la mesure des fluctuations de lumière diffuse par un échantillon de ces nanoparticules diluées dans un solvant. Pour effectuer ces mesures, nous pouvons utiliser un «Zeta-sizer». Cet appareil prend les mesures, et le logiciel qui lui est associé fait les calculs et affiche le diamètre hydrodynamique des échantillons.

Nous avons utilisé l'appareil *Zeta Sizer Nano-ZS* de Malvern instruments, équipé d'un laser rouge, pour mesurer le rayon hydrodynamique de différents échantillons de QDs commerciaux. Ces échantillons sont des QDs enrobés de SAV (1 échantillon, émission à 655 nm), des QDs enrobés de fragment Fab d'anticorps anti-RAT (2 échantillons, émission à 655 nm et 605nm), et des QDs enrobés de fragment Fab d'anticorps anti-RAT sur lesquelles se sont ajoutés des anticorps de rat anti-HA (1 échantillon, émission à 655nm), dans un rapport stoechiométrique approximatif d'un anticorps anti-HA par QD. Tous les échantillons étaient dilués à 10nM dans le PBS.

Nous avons effectué la mesure à 25 °C, en mode «*back-scattering*». Nous avons entré un indice de réfraction de 1.33 pour le dispersant, et un indice de réfraction de 3 pour les particules (option CdSe dans le menu du logiciel). Nous sommes allés chercher les valeurs pics des rayons hydrodynamiques à partir de l'affichage des rayons hydrodynamiques en volume. Voici les résultats de ces mesures (moyenne±écart type, de 3 à 6 mesures par échantillon) :

Diamètres hydrodynamiques de QDs commerciaux

QDs-SAV 655nm	QDs-anti-HA 655nm	QDs-anti-rat 655nm	QDs-anti-rat 605nm
$D_h = 23 \pm 2$ nm	$D_h = 36 \pm 3$ nm	25 ± 4 nm	23 ± 4 nm



Le numero 1 mondial du memoires



www.rapport-gratuit.com

clubmemoire@gmail.com