

# L'IMAGERIE OPTIQUE DE NANOPARTICULES LUMINESCENTES : DE LA DÉTECTION DE BIOMOLÉCULES AU DIAGNOSTIC *IN VITRO*

Fanny MOUSSEAU\*, Chao YU, Antigoni ALEXANDROU, Cédric BOUZIGUES

Laboratoire d'Optique et Biosciences, École Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, INSERM, CNRS, 91128 Palaiseau, France

\* fanny.mousseau@polytechnique.edu



Pour détecter des biomolécules et pathogènes (protéines, virus, bactéries, ...) avec des sensibilités satisfaisantes, il est actuellement nécessaire d'utiliser des appareils de laboratoires coûteux. En combinant les remarquables propriétés optiques des ions lanthanides à un lecteur simple couplé à un smartphone, nous démontrons comment développer un système de détection portable, rapide et ultrasensible.

© École polytechnique - J.Barande

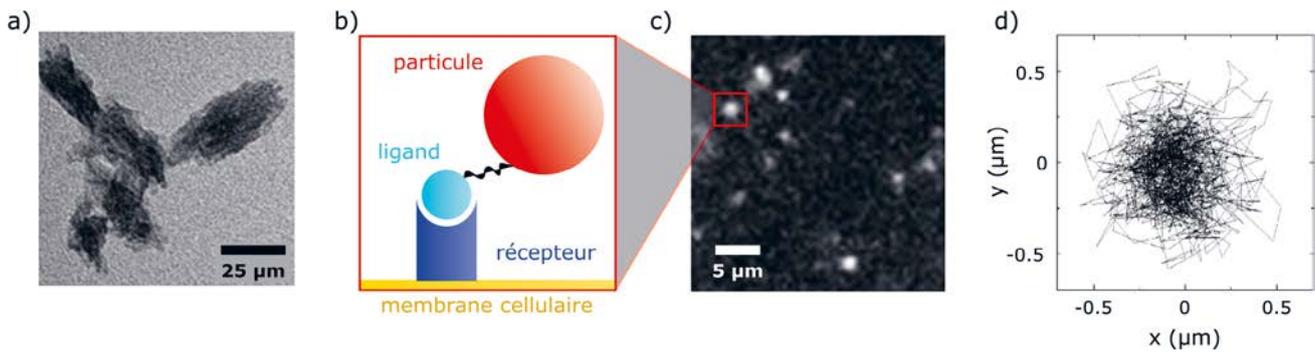
<https://doi.org/10.1051/photon/202110630>

Article publié en accès libre sous les conditions définies par la licence Creative Commons Attribution License CC-BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), qui autorise sans restrictions l'utilisation, la diffusion, et la reproduction sur quelque support que ce soit, sous réserve de citation correcte de la publication originale.

La détection sensible de biomolécules est essentielle dans de nombreux domaines fondamentaux ou applicatifs comme la biologie cellulaire ou la bio-médecine, notamment pour le diagnostic et l'identification de biomarqueurs ou pathogènes. Les avancées en termes de performance sont cependant souvent restreintes par les propriétés optiques des

sondes existantes. De plus, les résolutions spatiales et temporelles, qui sont des aspects primordiaux de la détection de biomolécules dans le vivant (cellule, organe ou petit animal) sont généralement restreintes. Ces limitations ont motivé le développement de nouvelles sondes et techniques d'imagerie optique dans l'espoir de contribuer à l'élaboration de technologies de détection plus puissantes. La synthèse et l'imagerie

de nanoparticules dopées aux ions lanthanides luminescents est une approche prometteuse dans ce domaine et a donc constitué un pan actif de recherche ces dix dernières années [1]. Pourquoi ces nanoparticules permettent-elles d'accéder par imagerie à de nouvelles informations en biologie fondamentale ? Comment en tirer parti pour développer de nouvelles technologies de diagnostic ?



### LES NANOPARTICULES DOPÉES AUX IONS LANTHANIDES

De nombreuses applications biologiques et biomédicales font appel à des marqueurs luminescents mais leur usage est souvent limité par leur photoblanchiment, un phénomène photophysique causant une perte de fluorescence irréversible suite à l'excitation. À l'inverse, certains ions lanthanides (Ln), comme l'ion europium  $\text{Eu}^{3+}$ , ont des propriétés optiques remarquables : ils sont photostables, possèdent des bandes d'absorption et d'émission fines, présentent un grand décalage de Stokes et des états excités à temps de vie long ( $> 100 \mu\text{s}$ ). Pour tirer avantage de la luminescence de ces ions, ils sont généralement chélatés par des molécules organiques et/ou incorporés dans des nanoparticules, ce qui limite leur désexcitation par voie non radiative [1].

### Figure 1.

a) Image de microscopie électronique des nanoparticules  $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ . b) Représentation schématique de la construction permettant le marquage *in situ* de récepteurs membranaires par les nanoparticules. c) Image en microscopie à épifluorescence de nanoparticules à la surface de cellules vivantes (lignée MDCK, excitation à  $0.1 \text{ kw}/\text{cm}^2$  par une diode laser à 466 nm (Modulight)). d) Trajectoire d'un récepteur unique (toxine  $\alpha$ , température :  $37^\circ\text{C}$ , temps d'exposition : 50 ms).

Les chélatés ne contenant par définition qu'un ion émetteur, ils ont été incorporés dans des nanoparticules, donnant alors naissance à des objets possédant de nombreux ions luminescents. Cependant, un plus grand nombre d'ions émetteurs par unité de volume est accessible dans le cas où des ions lanthanides non

chélatés sont utilisés en tant que dopants, c'est à dire en remplacement d'une partie des ions de la matrice hôte, comme dans le cas de  $\text{YVO}_4:\text{Ln}$  et plus particulièrement de  $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ . De plus, la matrice de vanadate d'yttrium présente d'autres avantages comme permettre l'émission des ions europium (617 nm) soit par excitation directe à 466 nm de l'ion  $\text{Eu}^{3+}$ , soit par excitation de la matrice à 280 nm suivie d'un transfert d'énergie vers l'ion émetteur.

### DE L'IMAGERIE DE MOLÉCULES UNIQUES...

Pour imager des biomolécules, des nanoparticules de 30 nm de diamètre contenant une dizaine de milliers d'ions luminescents ont été synthétisées (Fig. 1a), fonctionnalisées puis couplées à la molécule d'intérêt en collaboration avec l'équipe de ●●●

## SPECTROGON

State of the art products

### Filtres Interférentiels

- De 200 à 15000 nm
- Passe-bande
  - Passe-haut
  - Passe-bas
  - Large bande
  - Densité neutre
  - Disponible en stock



### Réseaux Holographiques

- De 150 à 2000 nm
- Compression d'impulsion
  - Télécom
  - Accordabilité spectrale
  - Monochromateurs
  - Spectroscopie
  - Disponible en stock



UK (parle français): sales.uk@spectrogon.com • Tel +44 1592770000  
 Sweden (headquarters): sales.se@spectrogon.com • Tel +46 86382800  
 US: sales.us@spectrogon.com • Tel +1 9733311191

[www.spectrogon.com](http://www.spectrogon.com)

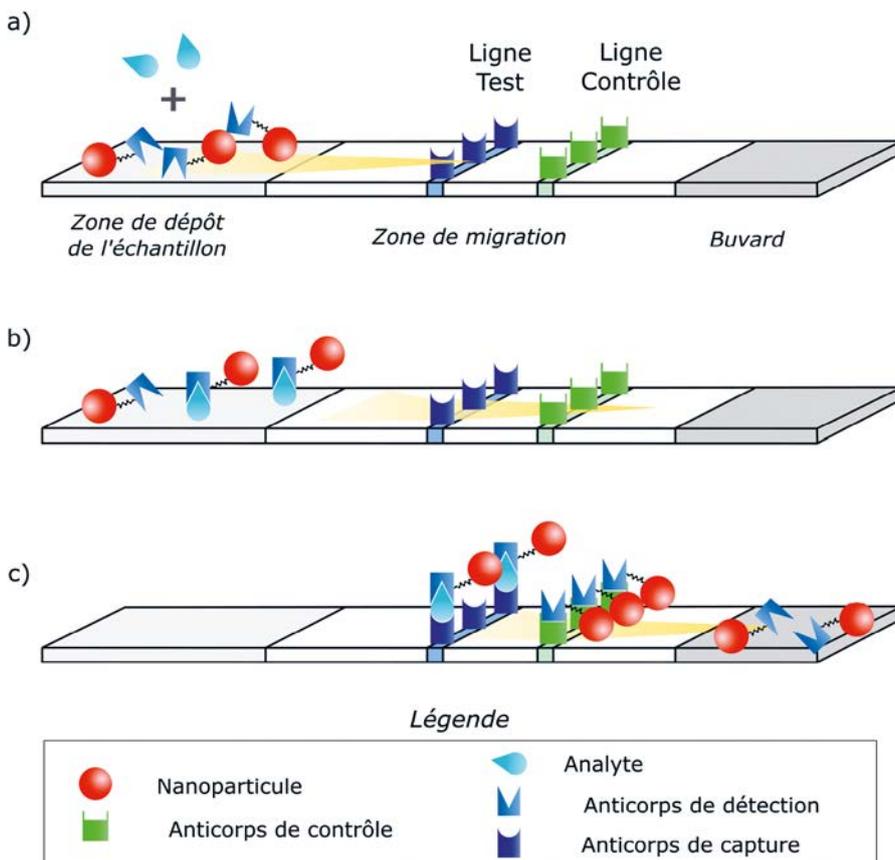
Thierry Gacoïn au Laboratoire PMC (Ecole Polytechnique, CNRS). Cette construction permet de détecter une particule individuelle *via* un microscope à épifluorescence conventionnel, le nombre de photons disponibles dépendant uniquement de l'illumination supportable par l'échantillon. Ainsi, de nombreuses applications comme la quantification d'espèces réactives de l'oxygène au sein d'une cellule vivante, l'imagerie multimodale chez la souris ou le suivi de récepteurs membranaires individuels ont vu le jour [2,3,4].

L'organisation en nanodomains des molécules présentes à la membrane extérieure des cellules est essentielle dans le contrôle des processus de signalisation cellulaire et sa compréhension est donc un sujet majeur en biologie. Nous avons marqué les ligands spécifiques des récepteurs membranaires d'intérêt par des nanoparticules YVO<sub>4</sub>:Eu (Fig. 1b) à fort taux de dopage en europium (>20 %). Afin de les détecter, nous avons opté pour l'excitation directe des ions europium par une diode laser à 466 nm

La détection à la sensibilité « ultime », c'est-à-dire celle de la molécule individuelle, est ainsi réalisable par un dispositif optique « simple ».

### Figure 2.

Principe d'un test à flux latéral. a) Une bandelette de nitrocellulose, comportant une ligne « Test » et une ligne « Contrôle » est plongée dans l'échantillon. b) Si l'analyte d'intérêt (dans notre cas une protéine) est présent, il interagit pendant la migration avec les anticorps de détection marqués par une sonde (souvent une nanoparticule) et préalablement déposés sur la bandelette. c) Les complexes obtenus migrent le long de la cellulose et interagissent avec les anticorps de capture qui constituent la ligne « Test », la rendant ainsi visible. L'échantillon et les particules s'écoulent à travers la ligne « Contrôle » constituée d'un anticorps de contrôle qui reconnaît spécifiquement celui de détection greffé aux nanoparticules. Dans un format conçu pour détecter un seul analyte, un échantillon positif est indiqué par l'apparition de deux lignes (« Test » et « Contrôle ») tandis qu'une seule ligne (« Contrôle ») est observée pour un échantillon négatif.



plutôt qu'une excitation de la matrice dans l'UV dans le but d'éviter le photo-dommage des cellules (Fig. 1c). Ce dispositif a rendu possible leur suivi spatial avec une précision de l'ordre de 10 à 30 nm à une résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de millisecondes, ainsi que la reconstruction de trajectoires haute résolution (Fig. 1d). L'absence de clignotement de ces nanoparticules a permis l'acquisition de trajectoires longues et ininterrompues et l'inférence du paysage énergétique dans lequel se déplace le récepteur [4]. La détection à la sensibilité « ultime », c'est-à-dire celle de la molécule individuelle, est ainsi réalisable par un dispositif optique « simple ». Elle est néanmoins limitée à un usage en laboratoire. Est-il envisageable d'adapter cette technologie – au prix éventuel d'une perte relative de sensibilité – dans des formats compatibles avec le diagnostic *in vitro* sur le terrain ou au chevet d'un patient ?

### ... AU DIAGNOSTIC *IN VITRO*

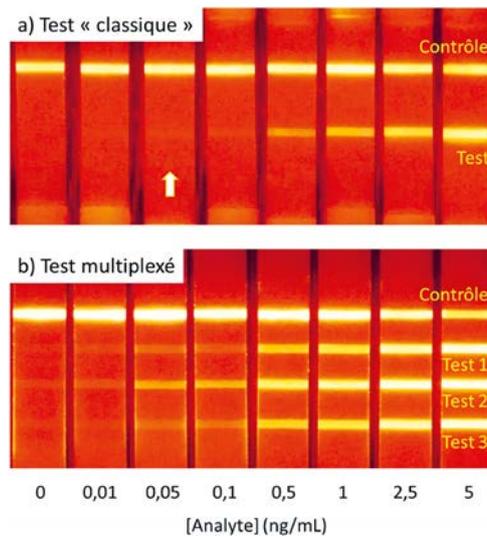
La détection simple, rapide, portable et spécifique de biomolécules (protéines, acides nucléiques, ...), potentiellement dans des milieux complexes (sang, eaux usées, matrices alimentaires, ...) présente un intérêt croissant dans de nombreux domaines comme le diagnostic médical « au chevet du patient », l'industrie agro-alimentaire, la police scientifique, le dépistage de drogues et la surveillance de l'environnement. Les tests à flux latéral (ou LFA pour « Lateral Flow Assay ») sont un outil central dans ce contexte puisque qu'ils répondent à la majorité des critères recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour de

telles analyses [5]. Ils permettent entre autres l'obtention de résultats rapides (< 30 min) avec une mise en œuvre élémentaire – c'est-à-dire réalisable par un non-spécialiste – mais présentent une sensibilité limitée en comparaison à d'autres techniques de laboratoire (PCR, ELISA, ...).

Le principe du LFA est résumé en figure 2. On peut citer comme exemple d'utilisation grand public les tests de grossesse vendus en pharmacie et, plus récemment, les tests antigéniques pour la détection de la COVID-19.

Les nanoparticules d'or sont les sondes les plus utilisées en LFA, notamment dans les tests commerciaux, car elles présentent entre autres l'avantage d'une lecture du résultat à l'œil nu et par un opérateur sans formation particulière. Ces tests sont cependant peu sensibles et leur analyse est subjective. Afin de surmonter ces limitations, nous développons des tests utilisant comme sonde des nanoparticules YVO<sub>4</sub>:Eu. Contrairement aux applications d'imagerie cellulaire, il n'est pas envisageable d'exciter directement l'ion europium à 466 nm puisque cela nécessiterait l'emploi d'un laser de puissance moyenne (> 100 W/cm<sup>2</sup>), difficilement intégrable dans un système portable destiné à un patient ou un praticien sur le terrain, éventuellement dans des régions à faibles ressources logistiques et/ou financières.

La luminescence de l'europium peut cependant être obtenue par excitation de la matrice qui l'entoure. Les nanoparticules YVO<sub>4</sub>:Eu présentent en effet une intense bande d'absorption dans l'UV (280 nm) due aux ions vanadates, qui peut être utilisée sans risque en l'absence de cellules vivantes. Par transfert de l'excitation depuis la matrice cristalline, les ions europium luminescent comme après excitation directe. La forte absorption de la matrice permet une illumination à faible puissance (~ 10 mW) et intensité (~ 1 mW/cm<sup>2</sup>) par des LED UV-C, ce qui rend possible l'utilisation d'un lecteur portable fonctionnant sur batterie (cf. image TOC).



**Figure 3.**

Tests LFA « classiques » (a) permettant de détecter une entérotoxine (ici SEH) ou multiplexés (b) pour détecter simultanément 3 entérotoxines différentes (SEG, SEH et SEI).

L'acquisition et le traitement d'image se font *via* un smartphone (couplé au lecteur) et une application embarquée [6]. L'analyse quantitative des images des tests réalisés avec les nanoparticules YVO<sub>4</sub>:Eu (Fig. 3a) démontre un gain de plus d'un ordre de grandeur par rapport à l'analyse subjective des bandelettes de référence à base de nanoparticules d'or. La start-up LumediX, spin-off du laboratoire, s'emploie donc à industrialiser la technologie développée.

Notre approche peut facilement être étendue aux paradigmes de détection plus complexes avec plusieurs cibles :

par un multiplexage spatial, 3 analytes différents sont détectés simultanément, et ce, sans perte de sensibilité (Fig. 3b). Ce type de mesure sur site de différentes substances à partir d'un seul échantillon peut être crucial pour établir un diagnostic médical précis ou un profilage environnemental à l'aide d'un seul geste. À l'avenir, la détection de biomarqueurs en milieux complexes diffusants ou auto-fluorescents pourra être réalisée *via* l'implémentation d'une mesure résolue en temps de la luminescence des particules dans le but de disposer de tests sensibles dans des matrices pertinentes (sang, eaux sales, ...).

## CONCLUSION

L'utilisation de nanoparticules luminescentes YVO<sub>4</sub>:Eu excitables dans l'UV permet la détection rapide de protéines présentes en faible concentration, sans formation particulière de l'opérateur et sans matériel coûteux ni infrastructure spécifique, grâce à leurs propriétés optiques remarquables. Le transfert de ces objets en dehors du laboratoire est ainsi réalisable, et mène à la conception d'un outil puissant, qui ouvre la voie à de nombreuses applications, notamment dans le diagnostic médical. Cette technologie pourrait ainsi rendre possible la détection ultrasensible et rapide de pathogènes, de virus et de biomarqueurs et ce, au chevet du patient, dès l'intervention des premiers secours en cas d'urgence, ou en routine dans des régions ou pays émergents ou sinistrés. ●

## RÉFÉRENCES

- [1] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou., *ACS Nano* **5**, 8488 (2011)
- [2] M. Abdesselem *et al.*, *Nanoscale* **2**, 656 (2017)
- [3] M. Abdesselem *et al.*, *ACS Nano* **8**, 11126 (2014)
- [4] S. Türkcan *et al.*, *Biophys. J.* **102**, 2299 (2012)
- [5] C. S. Kosack *et al.*, *Bulletin of the World Health Organization* **95**, 639 (2017)
- [6] P. Preira *et al.*, *Test à diffusion capillaire mettant en œuvre des nanoparticules inorganiques photoluminescentes*, FR 18/56651 18/07/2018 ; WO2020016308A1