



ces efforts et ces dépenses seront à l'esprit de l'ensemble des acteurs du projet lors de la phase cruciale qui ne durera pas plus de cinq petites secondes, lorsque OSIRIS-REx devra se poser pour redécoller aussitôt après avoir prélevé un échantillon à la surface de l'astéroïde.

Toute cette opération reposera sur l'instrument TAGSAM (*Touch-And-Go Sample Acquisition Mechanism* ou « mécanisme d'acquisition d'échantillon par posé-décollé »). Ce dernier est constitué de deux principaux éléments : une tête de prélèvement et un bras de positionnement articulé. La tête émettra un jet d'azote gazeux qui « fluidifiera » un fragment de sol et le propulsera dans une chambre de prélèvement. TAGSAM contient assez d'azote pour trois tentatives d'échantillonnage – trois, pas une de plus. Le bras articulé positionnera la tête pour le prélèvement, puis la ramènera pour une analyse visuelle et la placera dans une capsule pour le retour sur Terre.

Comme solution de secours, 24 pastilles de contact avec la surface sont réparties sous le socle de TAGSAM. Elles récolteront du matériau à grains fins au moment où elles toucheront la surface de l'astéroïde.

La préparation de cette manœuvre finale occupera la plus grande part des trois années de révolution de la sonde autour de Bennu. Avec ses caméras, ses lasers, ses antennes radio et ses spectromètres, OSIRIS-REx effectuera de multiples relevés à haute résolution de l'astéroïde dans son intégralité. À partir de ces données, les équipes terrestres reconstruiront une carte de Bennu et détermineront un site principal de prélèvement (et un autre de secours), en fonction de la sécurité, de la facilité d'extraction et de la valeur

OSIRIS-REx À L'APPROCHE DE BENNU.

Sur cette image de synthèse, la sonde semble bien petite à côté de l'astéroïde d'un demi-kilomètre d'envergure. Par sa taille, ce corps céleste serait dangereux si son orbite croisait la trajectoire de la Terre. Cependant, du fait de sa composition primitive, Bennu constitue une cible intéressante et accessible pour une mission d'extraction et retour d'un échantillon.

scientifique attendue du matériau présent. Les sites les plus intéressants sur le plan scientifique devraient contenir une variété de composés organiques, de minéraux riches en eau et d'autres matériaux susceptibles de nous aider à savoir si les astéroïdes ont contribué à l'origine de la vie sur Terre.

Dès que l'équipe d'OSIRIS-REx aura choisi le site de prélèvement et effectué toutes les répétitions générales de rigueur, la manœuvre finale sera lancée. Bennu sera alors probablement aux confins de son orbite par rapport à la Terre, à plus de 18 minutes-lumière. L'équipe du projet n'aura alors plus aucun moyen d'intervenir et devra attendre que le processus automatique se déroule.

En trois poussées réparties sur quelques heures, OSIRIS-REx quittera son orbite, s'alignera avec le site d'atterrissage et descendra lentement vers la surface de l'astéroïde. Il se posera à une vitesse relative de 10 centimètres par seconde au plus. TAGSAM disposera de 5 secondes pour recueillir ses échantillons avant que la sonde ne redécroche et s'élève à une altitude d'environ 10 kilomètres au-dessus de Bennu. Là, l'instrument fera une série de tests pour s'assurer du succès de l'échantillonnage.

La mission s'achèvera en 2023... si tout va bien

En 2021, la sonde allumera ses moteurs principaux pour rapporter son précieux échantillon sur Terre. Fin 2023, après avoir largué la capsule de retour d'échantillon dans l'atmosphère terrestre, OSIRIS-REx allumera une ultime fois ses moteurs et rejoindra définitivement une orbite autour du Soleil. La capsule de retour d'échantillon pénétrera le haut de l'atmosphère terrestre à une vitesse avoisinant 45 000 kilomètres par heure, sous la protection d'un bouclier thermique capable d'évacuer 99 % de son énergie de rentrée. À une altitude de 3 000 mètres, la capsule déploiera un parachute pour atterrir en douceur dans le désert de l'Utah, sept ans après le début de son voyage.

L'échantillon sera récupéré et transporté jusqu'au centre spatial Johnson de la Nasa où il sera stocké de façon optimale. Des morceaux en seront ensuite distribués auprès de la communauté scientifique pour étude, ce qui occupera des chercheurs pendant plusieurs décennies. ■

■ BIBLIOGRAPHIE

Météorites, astéroïdes, comètes, *Dossier Pour la Science*, n° 90, janvier-mars 2016.

D. S. Lauretta et al., *The OSIRIS-REx target asteroid (101955) Bennu*, *Meteoritics & Planetary Science*, vol. 50 (4), pp. 834-849, 2015.

A. Rubin, *Les secrets des météorites primitives*, *Pour la Science*, n° 425, mars 2013.

D. S. Lauretta et H. Y. McSween (Éds.), *Meteorites and the early Solar system II*, University of Arizona Press, 2006.

R. Schweickart et al., *Remorqueur d'astéroïdes*, *Pour la Science*, n° 319, mai 2004.

LA FIXATION POSTMORTEM D'UN CERVEAU
à l'aide d'un hydrogel permet d'observer chaque
neurone de la structure et ses connexions,
comme ici dans le cortex préfrontal d'une souris.



Gélifier le cerveau pour mieux l'explorer

Karl Deisseroth

Grâce à une nouvelle méthode à l'interface entre la chimie et la biologie, des neurobiologistes observent le million de milliards de connexions du cerveau, jusqu'aux plus profondément enfouies.

Notre système nerveux ressemble à une tapisserie tissée de fils interconnectés. Ces fils, les axones – de minces fibres que projettent les neurones –, transportent une information électrique d'un neurone à d'autres. Dans le cerveau, des axones à longue portée s'entrelacent avec des fibres plus courtes pour former un réseau qui transmet des signaux et traite l'information.

Pour comprendre les mécanismes internes du cerveau, les scientifiques doivent déchiffrer comment les éléments de cette tapisserie neuronale sont organisés. Mais comprendre le rôle d'un axone nécessite aussi une vision globale du cerveau qui n'occulte pas l'axone individuel et son contexte. Toutefois, il est impossible d'y parvenir avec les techniques classiques d'imagerie, car les molécules de graisse (les lipides) présentes partout dans le cerveau (en particulier dans les membranes des cellules) diffractent la lumière des appareils d'imagerie et empêchent de dépasser les couches cellulaires les plus superficielles pour atteindre les profondeurs du cerveau. Le cerveau n'étant ni transparent ni plat comme un tissu, il faut donc un outil spécial.

Aujourd'hui, une nouvelle technologie ouvre des perspectives passionnantes, apportant un moyen de voir l'intérieur du cerveau entier et de déterminer à la fois les trajectoires et les propriétés moléculaires de chaque fibre. Conçue dans notre laboratoire, cette méthode s'appuie sur la chimie des hydrogels, des polymères qui forment un réseau tridimensionnel de compartiments connectés capables de retenir l'eau sans se dissoudre.

L'idée est de créer un squelette tridimensionnel de polymère à l'intérieur du tissu biologique. On commence par imprégner d'un gel transparent le cerveau d'un animal de laboratoire ou d'un humain *postmortem*. Ce gel se lie aux molécules clés porteuses d'information, notamment les protéines et les acides nucléiques (l'ADN et l'ARN), et ce faisant les protège. L'étape suivante consiste à éliminer des tissus les composants sans intérêt ou qui diffusent la lumière, comme les lipides. Enfin, on introduit une multitude d'indicateurs fluorescents et autres marqueurs dans l'ensemble de la structure (en plus d'être transparent, le gel est conçu pour permettre l'infusion rapide de ces sondes), ce qui permet, en éclairant, de visualiser

directement diverses fibres et molécules d'intérêt à très haute résolution partout dans le cerveau.

Cette nouvelle technique ouvre de nombreuses perspectives. Des scientifiques utilisent cette approche pour relier la forme physique de voies neuronales impliquées dans l'action et la cognition à leur fonction comportementale, qu'il s'agisse d'un mouvement ou d'une mémorisation. La méthode a aussi aidé à élucider des processus impliqués dans la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, l'autisme, la toxicomanie et les troubles anxieux. Nous avons même aidé à monter une société visant à explorer les applications des tissus d'hydrogel dans le diagnostic du cancer. Car la méthode est maintenant appliquée à divers organes et tissus de l'organisme.

■ L'AUTEUR



Karl DEISSEROTH est professeur de bio-ingénierie et de psychiatrie à l'université Stanford.

L'ESSENTIEL

- On ne comprendra le fonctionnement du cerveau que lorsque l'on combinera son étude aux échelles cellulaire et globale.
- Toutefois, à cause des lipides qu'il contient, le cerveau est trop opaque pour que les techniques classiques d'imagerie optique en explorent plus de 50 micromètres d'épaisseur.
- De nouvelles techniques éliminent ces lipides et soutiennent le « squelette » restant.
- Ces méthodes permettent d'étudier le câblage de circuits neuronaux spécifiques contrôlant divers comportements.

Page précédente : avec l'aimable autorisation du Deisseroth Lab, université Stanford, et L'Yé

Vers la transparence

Rendre un cerveau transparent est si difficile que même l'évolution, en plusieurs centaines de millions d'années, n'y est pas parvenue chez les grands animaux. Pourtant, l'invisibilité apporterait des avantages considérables : certaines espèces de crevettes et de poissons ne présentent-elles pas un degré de transparence qui a certainement favorisé leur sélection au fil de l'évolution (par exemple en leurrant les prédateurs) ? Certains poissons sont ainsi dépourvus d'hémoglobine, la protéine qui colore le sang en rouge. Mais même chez ces animaux, le système nerveux central reste au moins partiellement opaque, malgré une intense pression de sélection. Rien ne laisse la lumière se propager sans encombre à travers un cerveau vivant.

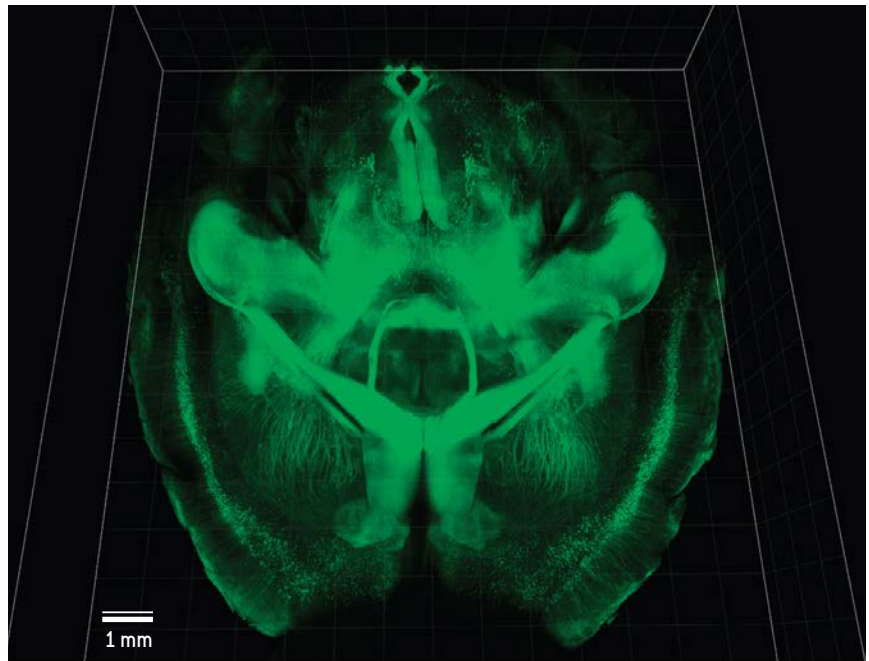
Cette opacité résulte de la diffusion de la lumière dans le tissu nerveux. Les photons rebondissent aux interfaces entre la graisse et l'eau (à cause des différences de vitesse de propagation de la lumière dans les deux substances) et dans des directions apparemment aléatoires (en raison de la complexité structurale des connexions neuronales). Un effet délicat à supprimer par l'ingénierie ou l'évolution, d'autant plus que dans le cerveau, les barrières lipidiques qui constituent les membranes des cellules jouent un rôle clé : elles servent de matériau isolant pour les ions qui orchestrent la circulation des impulsions électriques le long des axones. Peut-on contourner cette difficulté ?

En 2009, je me suis attaqué au problème. Mon objectif était de mettre au point une technique qui rendrait transparent un cerveau mammifère mature tout en permettant un marquage détaillé de diverses molécules. À l'époque, des centaines de laboratoires avaient commencé à utiliser une technique que mes collègues et moi-même avions développée entre 2005 et 2009 pour allumer et éteindre, avec de la lumière, différents composants spécifiques des circuits du cerveau. Associant des lasers, des fibres optiques et des gènes de protéines photoactivables nommées opsines microbiennes, issues d'algues et de bactéries, cette technique, appelée optogénétique, contrôle précisément l'activité dans des neurones spécifiques au sein de cerveaux vivants entiers, et ce alors même que les animaux courent, sautent, nagent, socialisent et se livrent à des comportements complexes.

À l'été 2009, cinq ans après sa première démonstration expérimentale, les principaux défis de l'optogénétique étaient en grande partie résolus et la technique en mesure d'être appliquée facilement et à large échelle. Grâce à cette méthode, les mécanismes neuronaux du comportement ont bénéficié de nombreux éclairages. Néanmoins, l'optogénétique seule ne peut fournir une autre information clé : une image de haute résolution du câblage des cellules contrôlées par la lumière à travers l'ensemble du cerveau.

Relier la représentation globale d'un système à ses composants est une des grandes aspirations de nombreux domaines scientifiques, même si cet objectif est souvent (et à raison) sacrifié. Séparer les composants d'un système complexe pour les étudier isolément a toujours joué un rôle essentiel en science, car sortir chaque composant de son contexte permet de déterminer quelles propriétés sont intrinsèques et ne dépendent pas des autres éléments. Mais dans le cas d'une structure étroitement interconnectée telle que celle du cerveau, démonter le système, comme séparer tous les fils d'une tapisserie, n'est pas toujours la meilleure stratégie pour comprendre la structure entière.

Depuis longtemps, pour marquer et étudier les cerveaux mammifères adultes malgré leur opacité, on les analyse *postmortem* en les « démontant » : on les découpe en tranches qui transforment le volume tridimensionnel de tissu cérébral en centaines



LE SYSTÈME NERVEUX D'UNE SOURIS transgénique de 4 mois exprimant une protéine fluorescente, observé à l'aide de la technique Clarity.

de milliers de couches quasi bidimensionnelles. Ce processus est coûteux en temps et en argent, en particulier quand il s'agit d'étudier de nombreux cerveaux pour produire des résultats statistiques significatifs. En 2009, j'ai donc commencé à rechercher un moyen d'améliorer l'étude tridimensionnelle du cerveau.

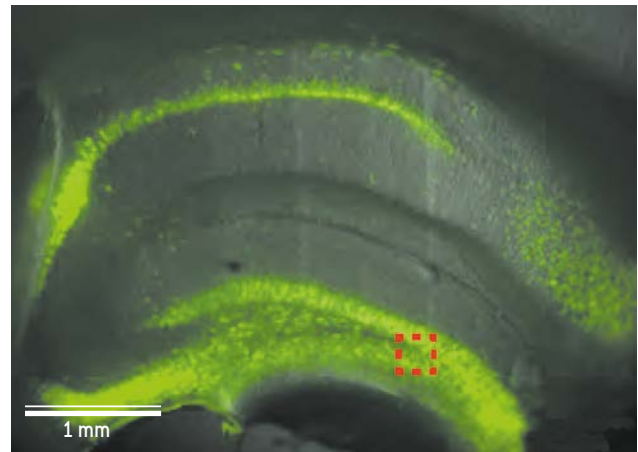
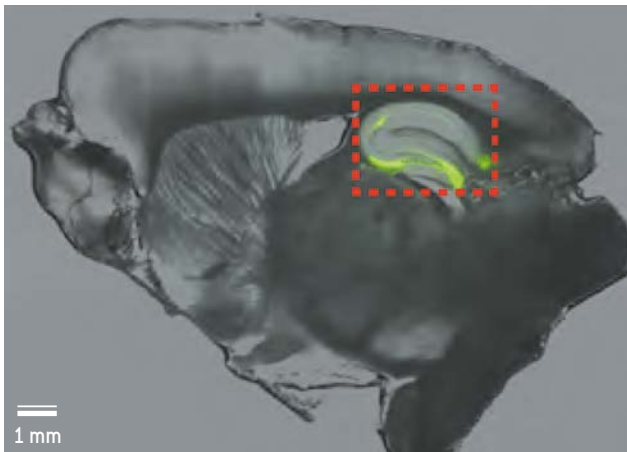
L'idée d'utiliser un gel était en fait déjà en germe quinze ans plus tôt. Au milieu des années 1990, j'avais voulu construire en laboratoire, à partir de cellules individuelles, des circuits imitant ceux du cerveau. Une piste consistait à semer des cellules souches neuronales sur des échafaudages de polymères et à les inciter alors, *via* une activation biologique adéquate, à se développer en neurones. Dans le cadre de ce projet, j'avais étudié la bibliographie scientifique et technique des hydrogels, qui semblaient particulièrement prometteurs pour servir d'échafaudages en vertu de leur biocompatibilité et de leur transparence.

Les années suivantes, je n'ai finalement réalisé que des expériences pilotes simples, semant des cellules souches sur des échafaudages de polymères et les transformant en neurones, et n'ai jamais atteint une structure de type cérébral. Et consciencieusement, j'ai trimballé de laboratoire en laboratoire un dossier « hydrogels » de plus en plus poussiéreux rassemblant les articles que j'avais amassés sur le sujet.

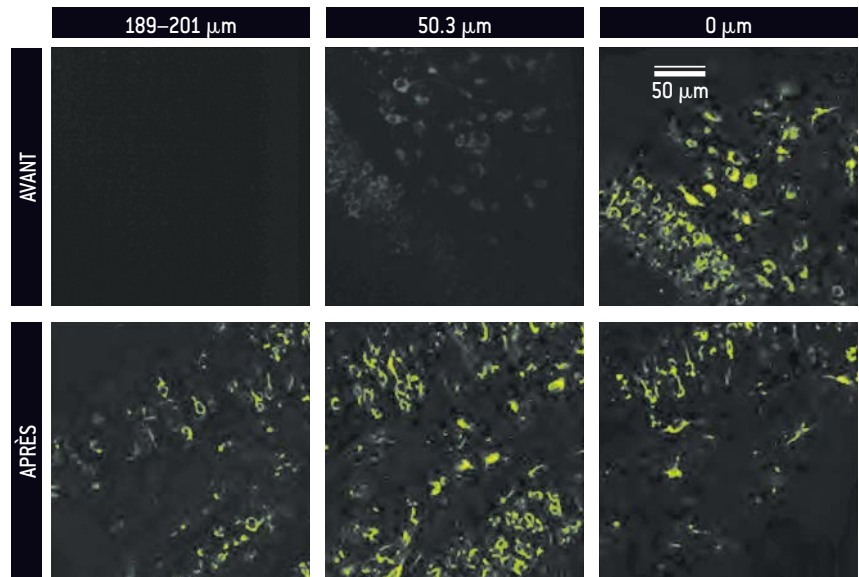
Mais l'échafaudage mental était en place, et l'idée a pris racine. Et grâce à l'investissement de plusieurs collègues talentueux, elle est devenue une stratégie exploitable pour construire un cerveau transparent.

Le déclic s'est produit en février 2010 : j'ai compris qu'il fallait utiliser le concept initial à l'envers. Au lieu de partir d'un hydrogel et d'y construire un cerveau, nous partirions d'un cerveau et y construirions un hydrogel. L'hydrogel servirait d'armature et préserverait la disposition des composants cérébraux importants pour nous, tels que les protéines et les acides nucléiques, mais permettrait l'élimination de tous les autres éléments qui bloquent la vision en profondeur. Il empêcherait le cerveau de s'effondrer en une soupe informe quand les composants structuraux moins intéressants seraient éliminés par dissolution ou digestion.

Les toutes premières expériences, qui ont joint la neurobiologie et la chimie des hydrogels et tenté de donner un début de forme à ce qui n'était qu'une simple possibilité, sont mieux appréciées à leur juste valeur avec le recul des années. Deux chercheuses créatives et audacieuses du laboratoire, Viviana Gradinaru et Charu Ramakrishnan, furent les premières à accepter de s'attaquer à ce projet colossal. Le risque d'échec était si élevé que j'avais décidé de ne pas impliquer tout le



UN CERVEAU DE SOURIS fixé à l'aide d'un hydrogel transparent – et dont on a éliminé les éléments qui diffusent la lumière – devient si transparent que l'on y détecte, même en profondeur, des cellules marquées à l'aide d'une protéine fluorescente (*ci-dessus*). Avant le traitement, les cellules situées à plus de 50 micromètres de profondeur étaient invisibles à cause de la diffusion lumineuse (*ci-contre, en haut*). Une fois la fixation effectuée, les cellules sont détectables à des profondeurs de 200 micromètres et au-delà (*ci-contre, en bas*).



Avec l'aimable autorisation du Derseroh Lab, université Stanford, et Viviana Gradinaru, Kwanghun Chung et Charu Ramakrishnan

laboratoire ; Viviana Gradinaru et Charu Ramakrishnan, qui avaient déjà connu de brillants succès avec d'autres projets, sauraient gérer le risque et la déception si le projet se révélait un échec.

Dès le début de l'année 2010, les deux biologistes ont cherché à rendre les neurones invulnérables aux dégâts que pourraient causer les agents utilisés pour détruire la structure tissulaire fine et les membranes cellulaires. En théorie, il suffisait de remplir les neurones avec un polymère durable adéquat et ils resteraient intacts si l'hydrogel les soutenait. Les chercheuses ont essayé diverses stratégies, dont l'introduction de gènes codant certaines enzymes qui rendent les neurones capables de fabriquer des polymères durables tels la chitine et la cellulose. La meilleure approche, une idée de Viviana Gradinaru, fut un processus permettant de fabriquer un autre biopolymère, la kératine, à l'intérieur des cellules.

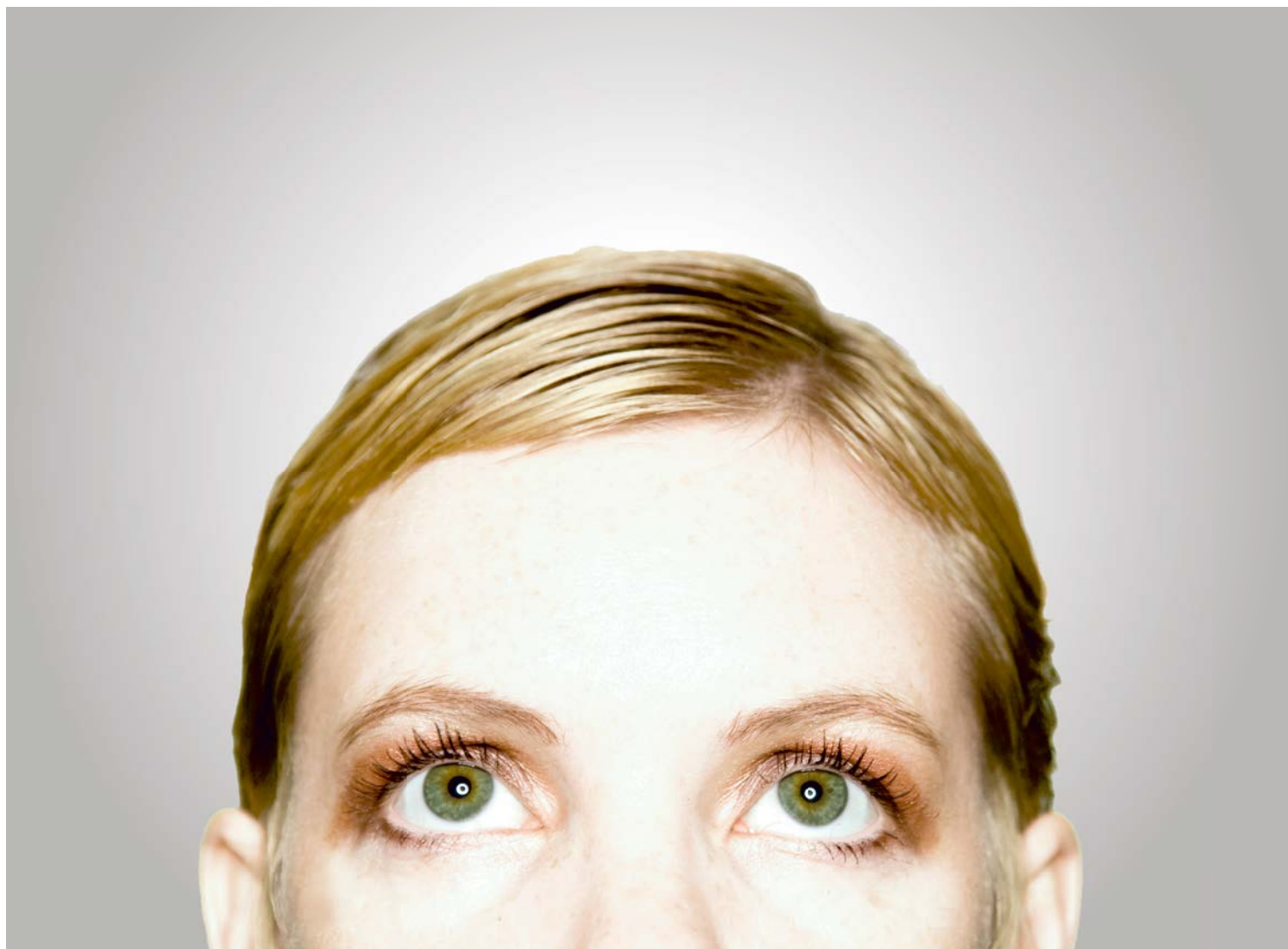
Viviana Gradinaru avait montré que dans les neurones en culture, la kératine produite protège la structure des cellules, et elle a supposé que dans un tissu cérébral gélifié (où l'on aurait stabilisé les neurones avec de la kératine, et où de l'hydrogel aurait été ajouté pour apporter un soutien supplémentaire), il serait possible d'éliminer les lipides avec du détergent afin de révéler les structures cérébrales cibles, suspendues dans l'hydrogel transparent.

Un chimiste à la rescousse

À ce stade, imprégner un cerveau entier d'hydrogel n'était qu'une idée. J'ai décidé d'accélérer le projet en cherchant à lui associer les compétences d'un ingénieur chimiste. Personne hors du laboratoire n'était au courant du projet. J'ai néanmoins fouillé dans mes courriels à la recherche de

messages de jeunes chercheurs prospectant pour des bourses postdoctorales et susceptibles d'avoir l'expérience requise sur les hydrogels. C'est ainsi que j'ai repéré le nom de Kwanghun Chung, un jeune et talentueux ingénieur chimiste alors à Georgia Tech, à Atlanta. Kwanghun Chung avait eu vent de nos travaux sur l'optogénétique et les cellules souches, et souhaitait intégrer notre laboratoire.

Début mars 2010, nous avons eu notre première (brève) conversation téléphonique alors que j'assistais à une conférence dans l'Utah. J'étais tellement sûr d'être sur la bonne voie que je l'ai invité à rejoindre notre équipe sur le champ, sans même une visite du laboratoire ou un entretien *de visu* – une chose que je n'avais jamais faite (et que je n'ai pas réitérée depuis). Un ingénieur chimiste a ainsi surgi de nulle part dans l'équipe. Drôle d'époque pour un laboratoire de neurosciences !



AcademiaNet offre un service unique aux instituts de recherche, aux journalistes et aux organisateurs de conférences qui recherchent des femmes d'exception dont l'expérience et les capacités de management complètent les compétences et la culture scientifique.

AcademiaNet, base de données regroupant toutes les femmes scientifiques d'exception, offre:

- :: Le profil des femmes scientifiques les plus qualifiées dans chaque discipline – et distinguées par des organisations de scientifiques ou des associations d'industriels renommées
- :: Des moteurs de recherche adaptés à des requêtes par discipline ou par domaine d'expertise
- :: Des reportages réguliers sur le thème »Women in Science«

Robert Bosch **Stiftung**

Spektrum
DER WISSENSCHAFT

nature

POUR LA
SCIENCE

Une initiative de la Fondation Robert Bosch en association avec
Spektrum der Wissenschaft et Nature Publishing Group

www.academia-net.org

Dès son arrivée, Kwanghun Chung s'est attelé au projet. Fin 2010, les trois membres de l'équipe avaient créé des blocs transparents de cerveau de souris dans lesquels on voyait clairement les cellules préservées, contenant de la kératine et ancrées dans de l'hydrogel, et ce à plusieurs centaines de microns à l'intérieur du tissu, une profondeur très supérieure à ce qui aurait été possible avec les autres méthodes existantes (voir la figure page 50). Le premier hydrogel entièrement fonctionnel que Kwanghun Chung a produit était à base d'acrylamide, une substance couramment utilisée en laboratoire pour séparer les acides nucléiques ou les protéines en fonction de leur taille. Les hybrides gel-tissu produits à partir de ces travaux ont été conçus de telle sorte que l'on puisse y introduire directement des marqueurs fluorescents et autres indicateurs, afin de visualiser les protéines et structures préservées, comme les axones, sur plusieurs marquages successifs, et nous nous sommes aperçus que la kératine n'était pas indispensable pour préserver les structures cellulaires : l'hydrogel seul suffisait.

Avec d'autres approches – les méthodes 3DISCO et Scale, respectivement –, des travaux pionniers de Hans-Ulrich Dodt, du Centre pour la recherche sur le cerveau à l'université médicale de Vienne, et d'Atsushi Miyawaki, de l'institut Riken de science du cerveau, à Saitama, au Japon, avaient déjà donné des résultats encourageants, mais personne n'avait encore jamais atteint une telle transparence ni une telle accessibilité dans un cerveau mammifère adulte.

Nous avons nommé Clarity (*Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel*) cette version d'hydrogel à base d'acrylamide. De nombreuses variantes de Clarity sont parues depuis. Après notre publication de la technique en 2013, rien que la première version de Clarity a été adoptée pour diverses applications de science fondamentale et a également été utilisée à l'échelle clinique (notamment pour observer des cerveaux *postmortem* d'individus atteints d'autisme ou de la maladie d'Alzheimer), ainsi que sur la moelle épinière et le cerveau de souris (par exemple dans la découverte de voies de contrôle jusque-là inconnues du

comportement anxieux). Plusieurs laboratoires dans le monde ont publié des articles où ils ont utilisé cette approche générale afin d'appréhender la structure du système nerveux, souvent en association avec l'optogénétique, et d'apporter des idées nouvelles pour comprendre les différences entre les câblages neuronaux fonctionnel et pathologique.

En quelques années, les techniques de fabrication des hydrogels tissulaires à l'intérieur de cerveaux ont fait de rapides progrès. Par exemple, dans la première version de la méthode, une étape consistait à imposer un champ électrique afin d'accélérer l'évacuation des particules de détergent électriquement chargées liées aux lipides. Il fallait un sérieux entraînement pour maîtriser cette étape, susceptible d'endommager les tissus si la tension appliquée était trop forte. Pour résoudre cette difficulté, nos collègues Raju Tomer, Brian Hsueh et Li Ye ont publié début 2014, avec l'aide de collaborateurs en Suède, une version simplifiée de cette étape, sans utilisation de champ électrique. La technique porte aujourd'hui le nom de Clarity passive. Ils ont aussi décrit une imagerie spécialisée pour hydrogel cérébral à l'aide d'une forme de microscopie rapide et de haute résolution dite à « feuillet de lumière ». Cette technique permet de scanner de gros volumes d'hydrogel (de deux à trois centimètres d'épaisseur) en les balayant à l'aide d'un plan lumineux (les feuillets de lumière) au lieu d'un point, comme en microscopie classique.

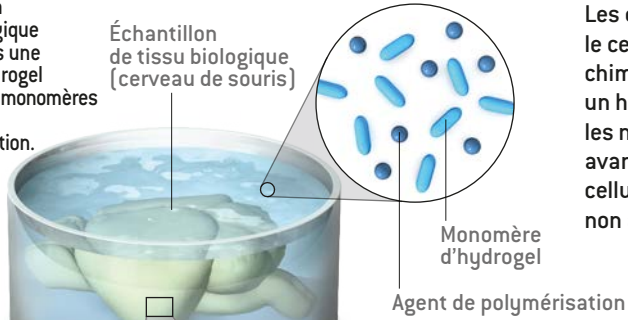
À cestade, Viviana Gradinaru et Kwanghun Chung dirigeaient tous deux leurs propres laboratoires florissants (à Caltech et au MIT, respectivement). Leurs équipes et d'autres ont rapidement proposé de nouveaux développements. Viviana Gradinaru a mis au point une stratégie de Clarity passive convenant à des organismes entiers comme des rongeurs, nommée PARS. Elle a aussi publié, comme Kwanghun Chung, de nouvelles recettes pour les hydrogels, dénommées PACT et SWITCH.

Aujourd'hui, il existe toute une variété d'hydrogels tissulaires, décrits par des laboratoires du monde entier. Leur exploration expérimentale n'en est en revanche qu'à ses débuts. Kwanghun Chung et moi-même avons divulgué en 2013 une longue liste

Personne
n'avait encore
jamais atteint **une**
telle transparence
dans un cerveau
mammifère
adulte

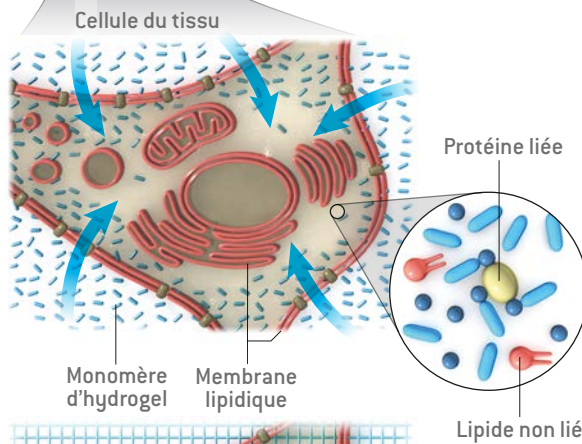
FABRIQUER UN HYDROGEL TISSULAIRE

- 1 Un échantillon de tissu biologique est placé dans une solution d'hydrogel contenant des monomères et des agents de polymérisation.



Les différentes pistes explorées pour rendre le cerveau transparent ont conduit à une méthode chimique de conception d'un nouveau matériau, un hybride hydrogel-tissu qui fixe à leur position les neurones et les molécules dans le cerveau entier avant l'élimination des lipides des membranes cellulaires. Les chercheurs ont ainsi une vision non altérée de la structure du cerveau.

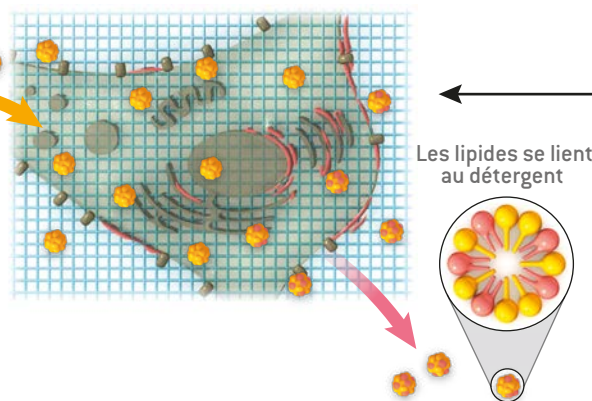
- 2 Les monomères et les agents de polymérisation pénètrent dans les cellules du tissu et se lient aux biomolécules comme les protéines ou les acides nucléiques, mais pas aux lipides qui diffusent la lumière.



- 3 L'ensemble est ensuite chauffé à 37 °C, ce qui entraîne l'assemblage des monomères en un réseau tridimensionnel interconnecté.



- 4 Un détergent est ensuite utilisé pour nettoyer le tissu des lipides et des molécules non fixés. Les protéines, les acides nucléiques et les autres biomolécules sont fixés au réseau d'hydrogel.



- 5 Si besoin, plusieurs marqueurs d'acides nucléiques à base d'anticorps peuvent être utilisés simultanément pour mettre en évidence diverses structures de l'échantillon.



- 6 Le tissu est ensuite observé avec un microscope confocal, un microscope à feuillet de lumière ou toute autre technique de visualisation en 3D.



- 7 Il est possible de réutiliser l'échantillon avec d'autres marqueurs en éliminant le marquage précédent de la même façon que les lipides.

L'ère de la « transparenisation »

Rendre le cerveau transparent pour observer les cellules qui le constituent n'est pas une idée récente : la première méthode fut mise au point par l'anatomiste allemand Werner Spalteholz en 1914.

Son procédé, toujours utilisé, consiste à déshydrater l'organe, puis à l'immerger dans un mélange d'alcool benzylique et d'ester, le salicylate de méthyle. L'indice de réfraction de cette solution est équivalent à celui des protéines du tissu, ce qui rend ce dernier transparent à la lumière. Cette méthode n'est efficace que pour des échantillons de petite taille, mais en 2012, elle a inspiré à Frank Bradke, alors à l'institut Max Planck, à Munich, et son équipe la technique 3DISCO, où l'indice de réfraction est cette fois modifié à l'aide d'un solvant organique, le tétrahydrofurane, et d'éther de benzyle.

Cette technique permet de rendre transparent – « transparer » – le cerveau d'une souris adulte en quelques heures. Un inconvénient est que la

déshydratation du tissu éteint la fluorescence de protéines telles que la protéine verte GFP, très utilisée pour visualiser des neurones et leurs projections dans le système nerveux d'animaux transgéniques. Par ailleurs, le volume de l'échantillon traité diminue de 30 à 40 %, ce qui pose un problème si l'on souhaite mesurer la taille réelle des axones. Cela a conduit d'autres équipes à développer des techniques alternatives, telle Clarity, qui préserve mieux la fluorescence et la taille de l'échantillon.

Depuis, au moins une douzaine de techniques de « transparenisation » ont vu le jour, reposant toutes sur le même principe : rendre le tissu transparent en l'imprégnant d'une solution de même indice de réfraction que ses protéines, souvent

après l'avoir débarrassé des lipides membranaires, principaux responsables de la diffraction de la lumière. La technique 3DISCO a été peu à peu améliorée (une variante récente, Ultimate DISCO, maintient la fluorescence) et est à ce jour la moins coûteuse et la plus facile à mettre en œuvre. Nous avons aussi montré qu'elle se combine efficacement avec l'immunocytochimie, une méthode qui permet de visualiser des protéines spécifiques (par exemple présentes dans des neurones particuliers) grâce à des anticorps couplés à des molécules fluorescentes.

Toutefois, l'application de ces techniques à la compréhension de l'organisation des connexions cérébrales humaines sera complexe, car les microscopes actuels les plus puissants ne permettent pas d'observer des échantillons d'une épaisseur supérieure à deux ou trois centimètres (au-delà, l'objectif touche l'échantillon). Néanmoins, ces techniques devraient rapidement améliorer le diagnostic des cancers en permettant un examen plus précis des biopsies sur un large volume et non plus sur quelques coupes microscopiques des tissus.

– Alain Chédotal
Institut de la vision, Paris

LES PROJECTIONS

visuelles dans le cerveau d'une souris, rendues transparentes à l'aide de la technique 3DISCO et observées au microscope à feuillet de lumière. Les axones provenant de l'œil gauche sont marqués en vert et ceux de l'œil droit en magenta.



Cliché d'Antoine Mialot et Alain Chédotal, Institut de la vision

de variantes d'hydrogel, des acrylates aux alginates et au-delà, et avec nos collaborateurs, nous explorons maintenant des pistes pour rendre ces polymères actifs, par exemple en les modifiant avec des éléments qui produiraient une conductivité électrique ou une réactivité chimique réglables, ce qui ouvrirait de nouvelles possibilités expérimentales.

Un autre défi concerne une propriété des hydrogels tissulaires : nous avons montré que leur fabrication entraîne un gonflement important des tissus cérébraux noyés. Cet effet n'est pas toujours un problème et reste compatible avec l'imagerie de haute résolution, qu'il concerne la technique Clarity originale ou d'autres développées plus récemment par d'autres groupes promouvant le gonflement (PACT/ePACT, ExM/proExM, MAP...). Mais comparer les cerveaux transparents à ceux des atlas universitaires exige une reconstitution précise et non perturbée du tissu d'origine. Nous avons donc développé une étape finale optionnelle qui ramène le tissu dilaté à sa taille initiale.

Au laboratoire, Li Ye et Will Allen ont également conçu un logiciel d'imagerie et d'analyse automatique à grande vitesse, téléchargeable et utilisable par tous. Le groupe de Marc Tessier-Lavigne, alors à l'université Rockefeller, s'en est ainsi servi pour sa nouvelle méthode, iDISCO, une version améliorée de 3DISCO. Mon groupe a aussi développé, dans un nouveau type d'hydrogel tissulaire, un marquage fluorescent de cerveaux entiers qui atteint en une fois de nombreux ARN. La capacité de marquer différents types de molécules, dont des acides nucléiques tels que l'ARN, se révèle un avantage particulier de l'approche par les hydrogels et ouvre des perspectives pour l'analyse de l'expression génique.

Combiner l'optogénétique et l'étude par hydrogel

Quand on compare l'esquisse du projet en 2010 et le résultat à peine six ans plus tard, le chemin parcouru est impressionnant. Un moteur clé de cette progression était de compléter l'optogénétique avec des informations structurales sur le cerveau entier. L'objectif est atteint et a fait l'objet de plusieurs publications, dont une en juin 2016. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur le cortex préfrontal

■ BIBLIOGRAPHIE

L. Ye *et al.*, Wiring and molecular features of prefrontal ensembles representing distinct experiences, *Cell*, vol. 165(7), pp. 1776-1788, 2016.

M. Belle *et al.*, A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system, *Cell Reports*, vol. 9, pp. 1191-1201, 2014.

K. Chung *et al.*, Structural and molecular interrogation of intact biological systems, *Nature*, vol. 497, pp. 332-337, 2013.

A. Ertürk *et al.*, Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO, *Nature Protocols*, vol. 7(11), pp. 1983-1995, 2012.

K. Deisseroth, Les neurones sous l'emprise de la lumière, *Pour la Science*, n° 401, mars 2011.

du cerveau, une région qui régule divers processus cognitifs complexes et les émotions. En effet, les scientifiques espèrent qu'en élucidant la façon dont cette structure contrôle des comportements aussi divers, on comprendra mieux certains troubles psychiatriques tels que l'autisme et la schizophrénie.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord utilisé l'optogénétique pour définir, au sein du cortex préfrontal de souris vivantes, une population de cellules actives pendant des expériences gratifiantes telles que la consommation de nourriture particulièrement savoureuse ou même de cocaïne (la population de cellules devait aussi contrôler des réponses comportementales appropriées à ces expériences). Nous avons ensuite procédé de même pour isoler une population de cellules réagissant à des expériences négatives (dissuasives). Enfin, à l'aide des derniers développements de Clarity, nous avons montré, sur les mêmes souris *postmortem*, que ces deux populations sont câblées différemment

au sein du cerveau : les cellules positives envoient des connexions préférentiellement vers une structure cérébrale profonde, le noyau accumbens (voir la figure pages 46 et 47), tandis que les cellules négatives sont davantage connectées à une autre structure profonde, l'habenula latérale. Ainsi, en conjuguant les deux approches – optogénétique et hydrogel tissulaire –, les nouvelles études des tissus biologiques entiers fournissent des données qui étaient inaccessibles jusqu'alors.

On ne comprend vraiment un système complexe que lorsque l'on est capable d'échanger de l'information entre les échelles locale et globale, qu'il s'agisse d'un cerveau entier ou d'une tapisserie finement ouvragée. En neuroscience, il est désormais possible de recueillir d'énormes quantités d'information détaillée sur la structure de l'organe entier, les composants moléculaires et l'activité des cellules. Peu à peu, une vision large et néanmoins nuancée de la fonction cérébrale se dessine. Et devrait se préciser encore ces prochaines années. ■

Toutes les archives



■ Pour la Science
■ Dossier
Pour la Science
depuis
1996

Disponibles sur www.pourlascience.fr*

*Numéros à lire en ligne ou à télécharger au format PDF

LE ROUGE est en Chine traditionnellement la couleur du mariage et du bonheur. Mais les félicités conjugales ne seront bientôt plus accessibles à de nombreux Chinois.