

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.

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 ?

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.

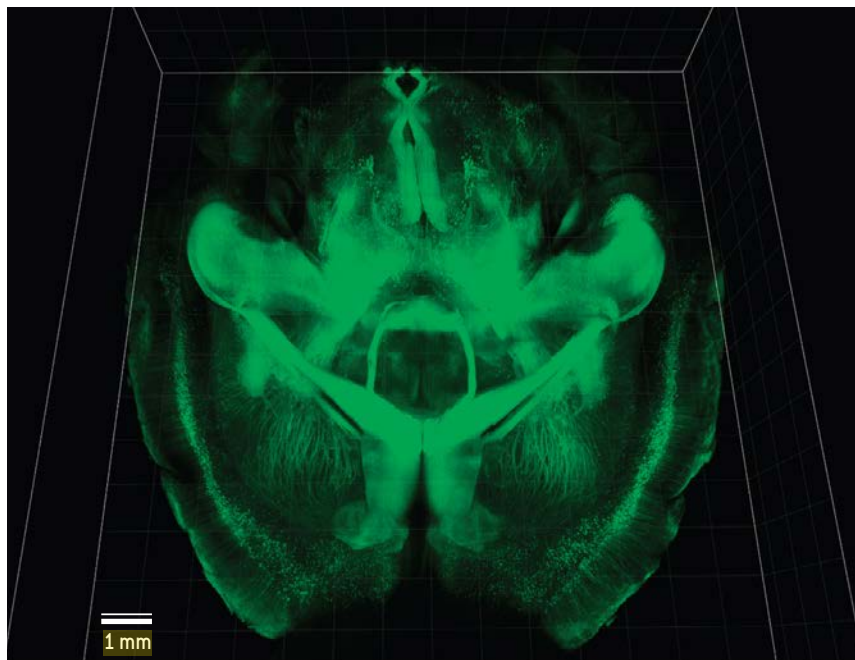
Page précédente : avec l'aimable autorisation du Deisseroth Lab, université Stanford, et L'Yé

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