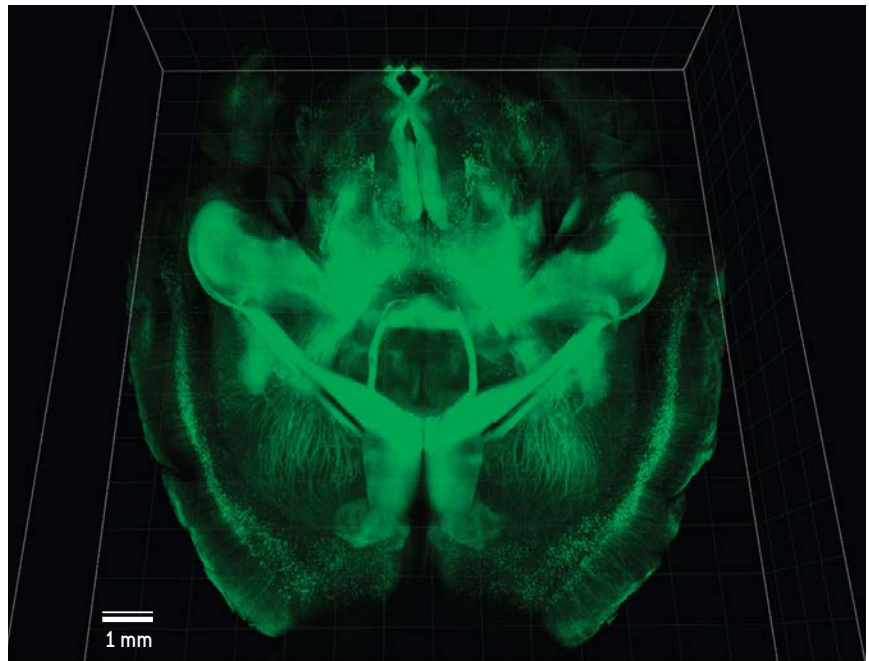


En 2009, je me suis attaqué au problème. Mon objectif était de mettre au point une technique qui rendrait transparent un cerveau mammifère mature tout en permettant un marquage détaillé de diverses molécules. À l'époque, des centaines de laboratoires avaient commencé à utiliser une technique que mes 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.

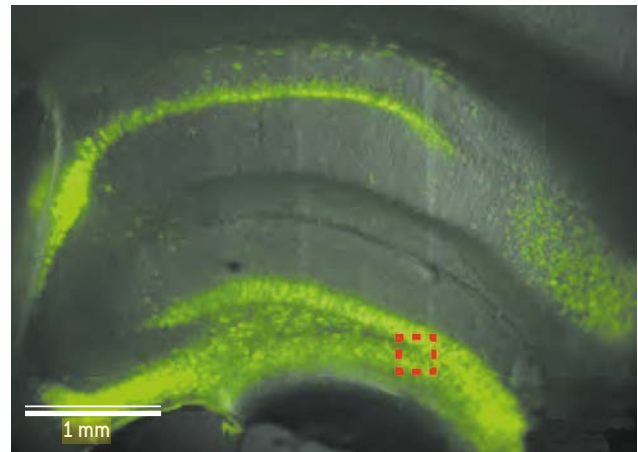
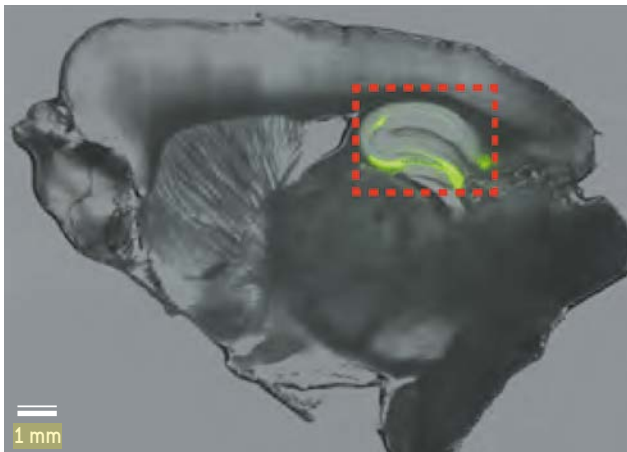
L'idée d'utiliser un gel était en fait déjà en germe quinze ans plus tôt. Au milieu des années 1990, j'avais voulu construire en laboratoire, à partir de cellules individuelles, des circuits imitant ceux du cerveau. Une piste consistait à semer des cellules souches neuronales sur des échafaudages de 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.

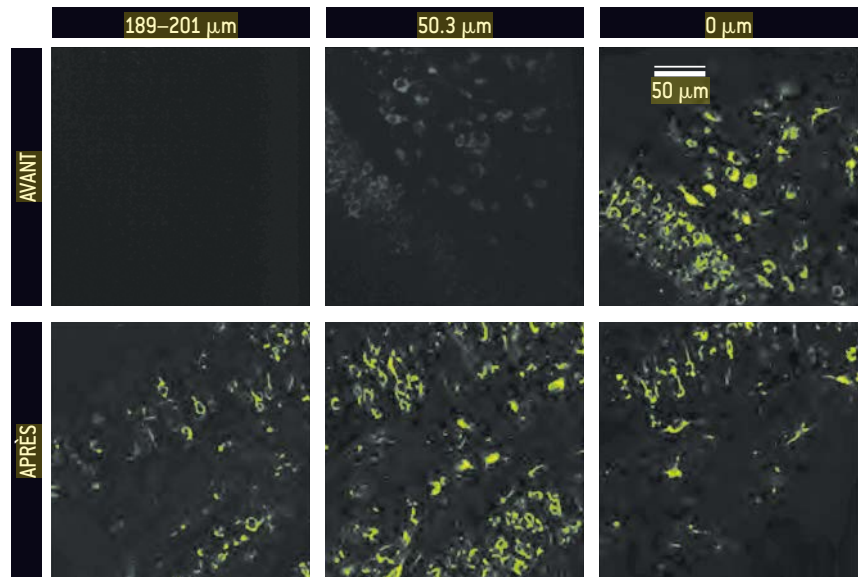
Mais l'échafaudage mental était en place, et l'idée a pris racine. Et grâce à l'investissement de plusieurs collègues talentueux, elle est devenue une stratégie exploitable pour construire un cerveau transparent.

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 Dossieroth 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 !