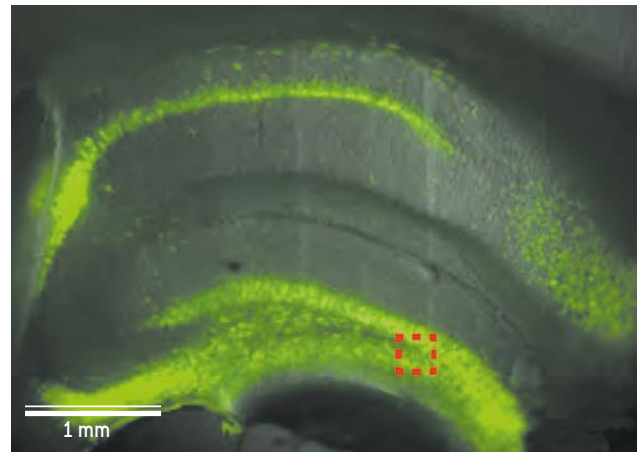
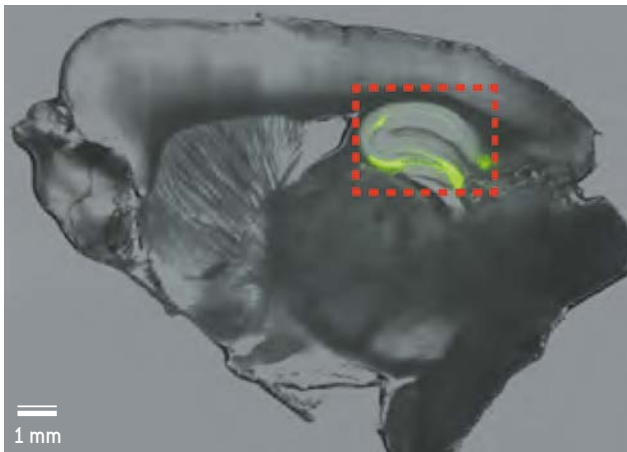
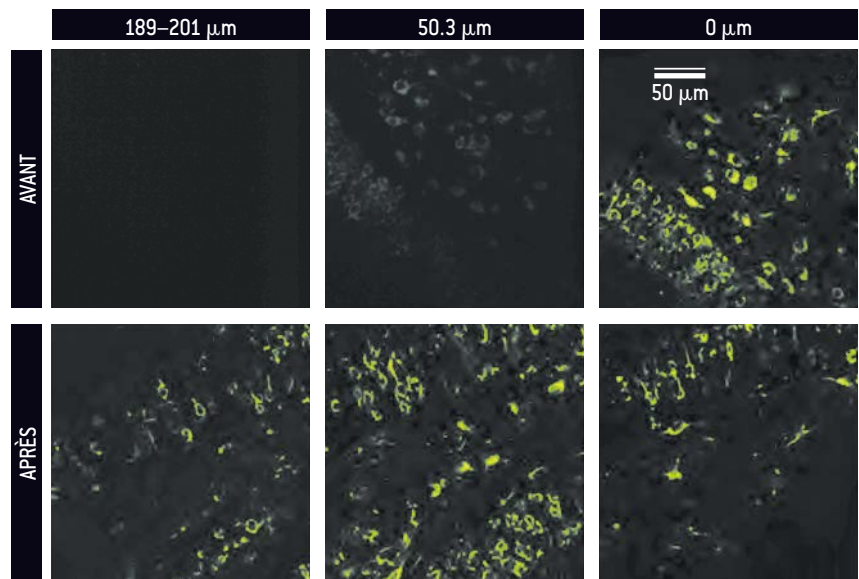




UN CERVEAU DE SOURIS fixé à l'aide d'un hydrogel transparent – et dont on a éliminé les éléments qui diffusent la lumière – devient si transparent que l'on y détecte, même en profondeur, des cellules marquées à l'aide d'une protéine fluorescente (*ci-dessus*). Avant le traitement, les cellules situées 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.

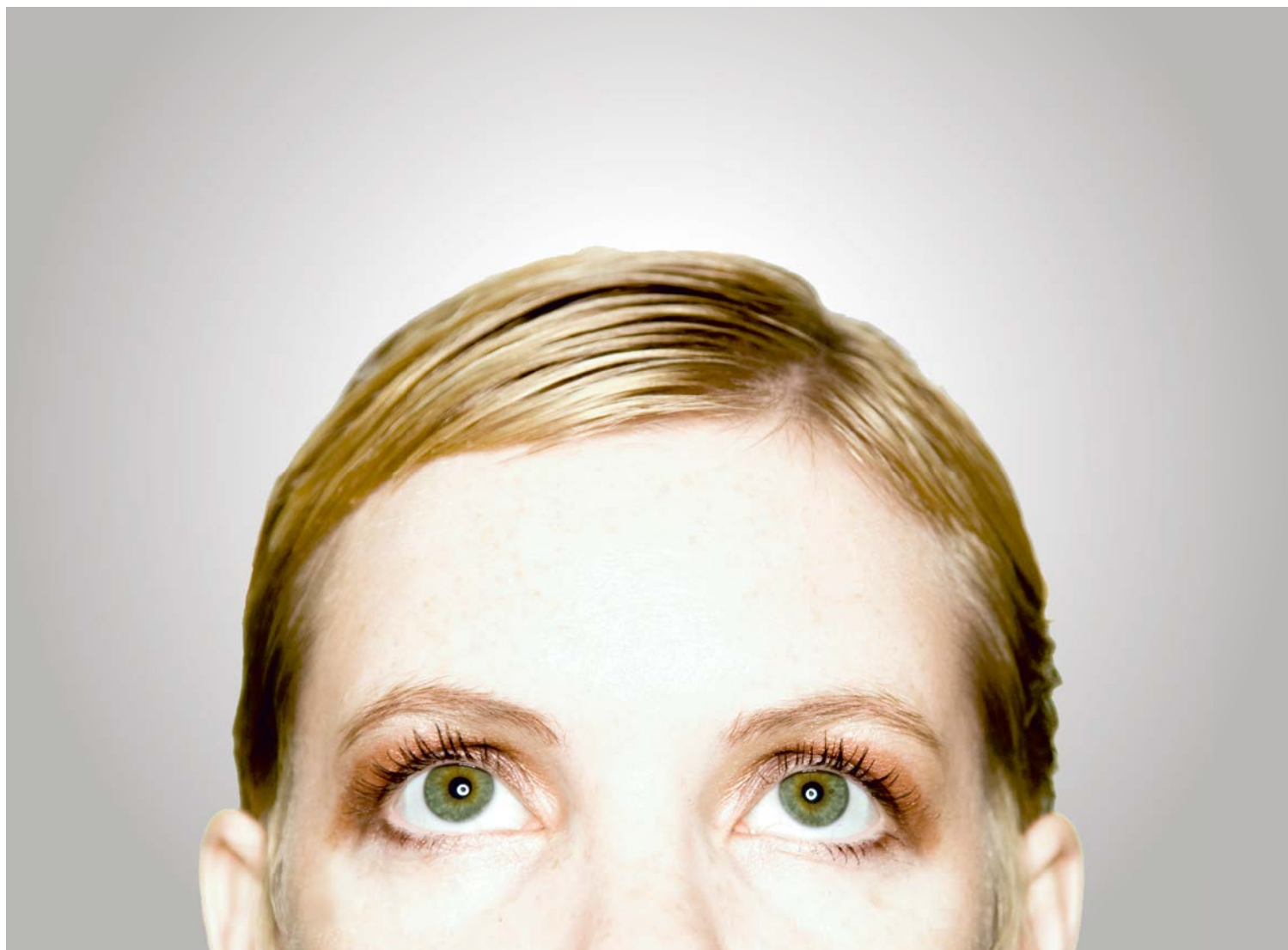
Viviana Gradinaru avait montré que dans les neurones en culture, la kératine produite protège la structure des cellules, et elle a supposé que dans un tissu cérébral gélifié (où l'on aurait stabilisé les neurones avec de la kératine, et où de l'hydrogel aurait été ajouté pour apporter un soutien supplémentaire), 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 ce stade, 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.

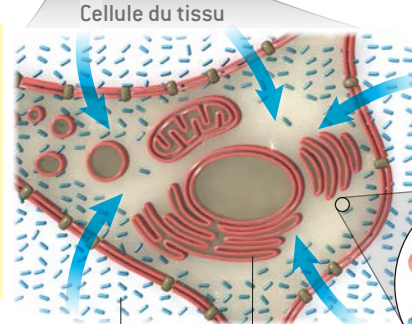
Échantillon de tissu biologique (cerveau de souris)

Monomère d'hydrogel

Agent 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.



Cellule du tissu

Protéine liée

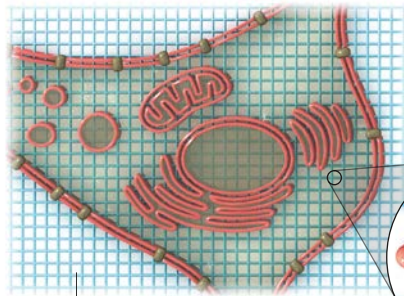
Monomère d'hydrogel

Membrane lipidique

Lipide non lié

Polymère d'hydrogel

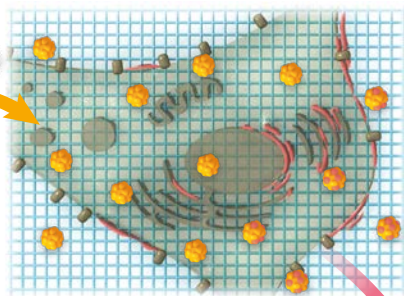
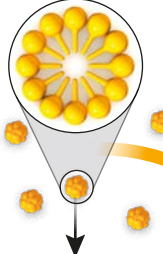
- 3 L'ensemble est ensuite chauffé à 37 °C, ce qui entraîne l'assemblage des monomères en un réseau tridimensionnel interconnecté.



Réseau de polymère d'hydrogel

Détergent

- 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.



Les lipides se lient au détergent

- 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.