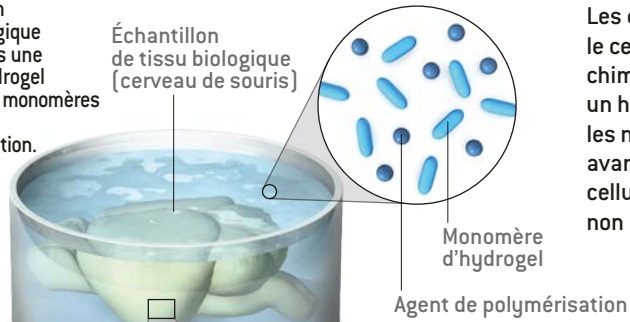


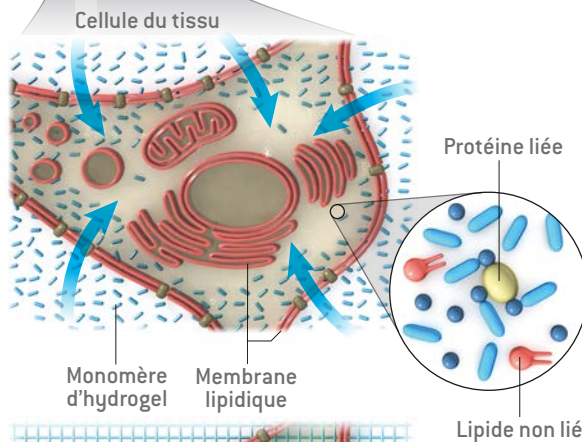
FABRIQUER UN HYDROGEL TISSULAIRE

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

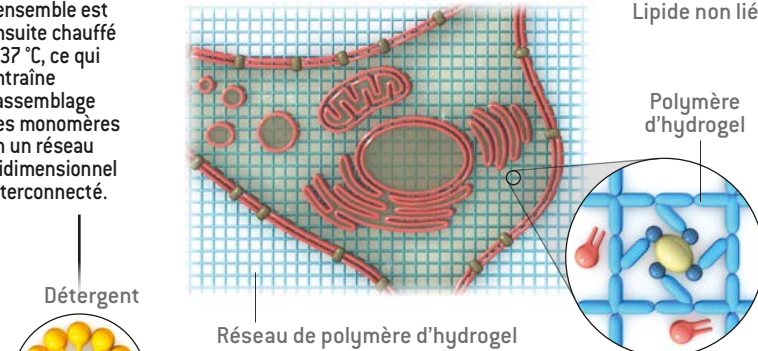


Les différentes pistes explorées pour rendre le cerveau transparent ont conduit à une méthode chimique de conception d'un nouveau matériau, un hybride hydrogel-tissu qui fixe à leur position les neurones et les molécules dans le cerveau entier avant l'élimination des lipides des membranes cellulaires.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

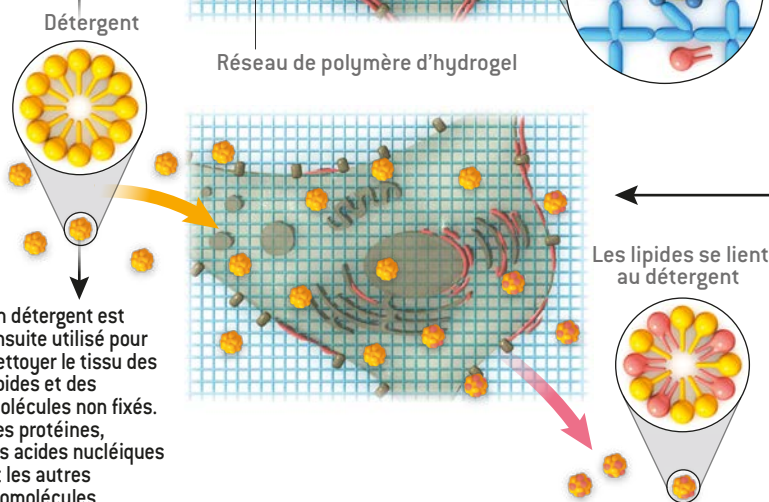
- 2 Les monomères et les agents de polymérisation pénètrent dans les cellules du tissu et se lient aux biomolécules comme les protéines ou les acides nucléiques, mais pas aux lipides qui diffusent la lumière.



- 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.

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



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

■ 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