

Imagerie moléculaire de la synapse

Daniel Choquet est Directeur de l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences de Bordeaux et membre de l'Académie des sciences française.

Les techniques d'imagerie par méthodes optiques, récemment définies par les laboratoires de recherche, apportent des progrès spectaculaires dans la connaissance de la nature moléculaire et du fonctionnement du cerveau. Elles permettent non seulement de visualiser le cerveau – et en particulier les synapses – à différentes échelles, de l'échelle moléculaire au cerveau entier, mais ouvrent la possibilité d'intervenir sur le cerveau et de contrôler son fonctionnement.

Parmi ces nouvelles techniques d'imagerie, des « **méthodes nanoscopiques** » ont permis de faire avancer de manière décisive la compréhension de la dynamique d'organisation des synapses, les composants de base du cerveau.

1 **Lumière sur l'organisation du cerveau**

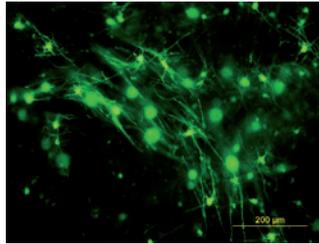
Les structures moléculaires des synapses ainsi que celles des récepteurs qu'elles contiennent sont aujourd'hui bien décrites. La question actuelle est de comprendre sur des neurones vivants quelle est la dynamique d'organisation des récepteurs qui conditionne de près le fonctionnement de l'organe.

La **Figure 1** représente des synapses (ou des parties de synapses), colorées en vert. Cette coloration a été provoquée par le marquage des neurones à la GFP (« *Green Fluorescent Protein* »), une protéine fluorescente qui a apporté le prix Nobel de Chimie 2008 à ses découvreurs Martin

Figure 1

Utilisation de la fluorescence verte introduite par la protéine fluorescente verte (GFP) pour visualiser la dynamique des synapses.

Source : CNRS Photothèque – Ghandour Said.



Chalfie, Osamu Shimomura et Roger Y. Tsien. Cette figure donne en statique une idée de la qualité de l'image rendue possible par la visualisation de ces protéines. En vidéo, les images de ces synapses donnent une vision frappante de leur mouvement *in vivo*.

Sur la **Figure 1**, on note aussi de nombreuses petites particules. On peut aussi obtenir une image vidéo du mouvement de ces particules, qui ne sont autres

que les récepteurs moléculaires présents dans les synapses. La technique à l'œuvre est celle de « l'imagerie de molécule individuelle ». Cette technique, qui permet d'obtenir une image en « super résolution » apportant une véritable révolution à l'imagerie, a connu un développement extraordinaire, en particulier par ses applications au cerveau, et vient d'être couronnée de nouveau par un prix Nobel de Chimie en 2014. Elle permet de visualiser le mouvement de molécules uniques, comme illustré ici sur un neurone vivant par la dynamique d'organisation des récepteurs de neurotransmetteurs (voir aussi les **Chapitres de J.-P. Changeux et J. Bockaert** dans l'ouvrage *Chimie et cerveau*, EDP Sciences, 2015).

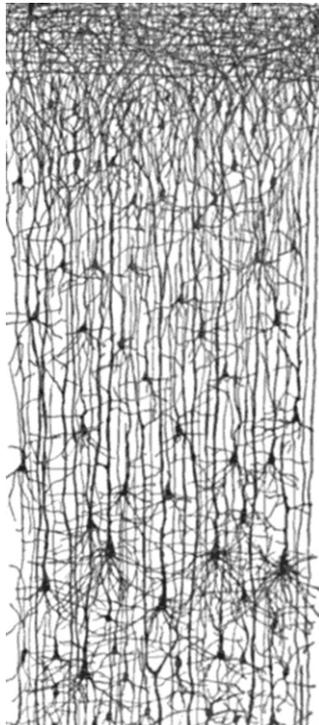
La **Figure 2** est un modèle présenté en 1899 par Ramón y Cajal, un précurseur qui a avancé la proposition fondamentale selon laquelle le système nerveux, donc le cerveau, est composé de cellules dissociées, les neurones, et reliées entre elles par les synapses.

Plus de cent ans après cette proposition, on parvient, grâce aux technologies optiques, à visualiser ces neurones sur des cellules vivantes et à en étudier l'organisation.

Figure 2

Connexion des neurones.
Le cerveau contient des centaines de milliards de neurones, et chaque neurone est connecté à environ mille autres neurones. Il y a donc environ cent mille milliards (10^{14}) de connexions (synapses) dans le cerveau.

Source : dessin de Ramón y Cajal, 1899.



2 Visualiser des neurones vivants !

La protéine fluorescente GFP, extraite de la méduse (**Figure 3A**), a été découverte au début des années 1960 par O. Shimomura, développée et exploitée par M. Chalfie, puis plus récemment par R.Y. Tsien. Elle permet de marquer des neurones par génie génétique

et même de marquer des individus entiers, comme on peut observer des souris vertes sur la **Figure 3B** : les souris vertes de la chanson sont devenues réalité ! On peut, par des techniques semblables, faire aussi des souris d'autres couleurs, des bleues, des vertes, des rouges, puisque la GFP peut être travaillée de différentes façons (**Figure 3C**). On peut de même fabriquer des protéines analogues de la GFP, qui sont photoactives et dont on peut moduler l'activité par la lu-

mière. Cela permettra dans le futur une voie de recherche importante pour non seulement regarder le fonctionnement du système nerveux mais aussi pour intervenir sur lui par des techniques optiques.

Appliquées à un système nerveux entier, ces protéines fluorescentes de différentes couleurs permettent d'obtenir un marquage très complet des différents types de neurones dans le cerveau (**Figure 4**). Elles ont permis, par exemple, de développer un marquage

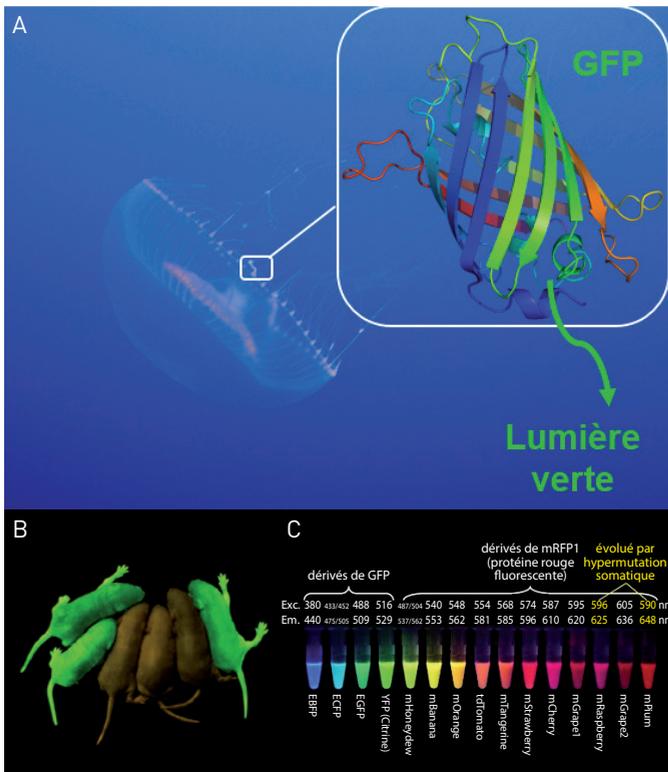


Figure 3

Marquage fluorescent à la GFP.

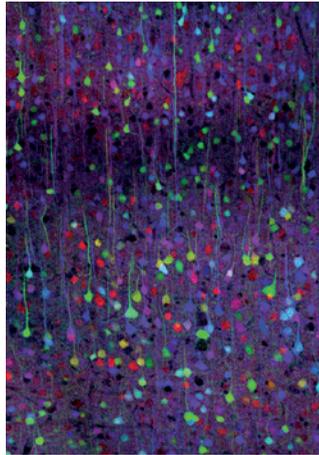
A) GFP, la protéine fluorescence verte de la méduse *Aequorea victoria* ; B) des souris vertes : de la chanson à la réalité ! ; C) modulation de la couleur des GFP.

Source : méduse : Wikipédia, licence CC-BY-SA-3.0, Mnolf ; protéine GFP : Licence CC-BY-SA, Richard Wheeler.

Figure 4

Le « Rainbow mouse » : des protéines fluorescentes de toutes les couleurs pour voir le cerveau « arc-en-ciel »...

Source : Livet J. et coll. (2007). *Nature*, **450** : 56-62.



de tout le lignage cellulaire¹ et d'accéder en détail au processus de développement du système nerveux (Figure 5). Tout cela fait appel à des techniques d'optique, car qui dit protéines fluorescentes dit observation par méthodes optiques.

1. Lignage cellulaire : évolution de cellules souches jusqu'à un état différencié.

Figure 5

Les neurones selon différentes souches.

Source : Cai D. et coll. (2013). *Nature Methods*, **10** : 540-547.

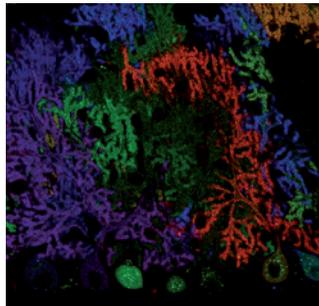
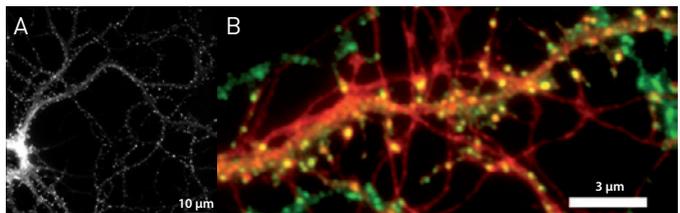


Figure 6

Imagerie par marquage. A) Neurone marqué par une protéine GFP ; B) synapse en microscopie optique.

Source : Daniel Choquet, CNRS-Université de Bordeaux.



L'imagerie par techniques optiques présente un avantage considérable sur d'autres techniques comme la microscopie électronique : celui de pouvoir s'appliquer à des cellules vivantes, des neurones par exemple ou même sur des organismes vivants. Cependant, elles ont tout de même des limitations, en particulier du fait que les synapses sont de très faibles dimensions, intrinsèquement peu adaptées à l'optique.

3 Les limites de la microscopie optique

La Figure 6A montre un neurone marqué par une protéine GFP. Des dizaines de milliers de synapses sont représentées (ce sont les petits points) ; les dimensions sont très petites, de l'ordre du milliardième de mètre, soit dix à vingt fois plus petit qu'un cheveu.

Lorsqu'on marque les différentes composantes avec différentes protéines fluorescentes pour regarder, d'une part, les récepteurs, d'autre part, les vésicules de neurotransmetteurs par une imagerie classique de microscopie optique (Figure 6B), on n'obtient pas de bons résultats du fait de la petitesse des dimensions (insuffisance de la résolution).

Sur la **Figure 6B**, on voit des éléments pré-synaptiques en vert, des éléments post-synaptiques² en rouge, mais on voit aussi que chacune de ces synapses est en fait jaune (ce qui correspond ici à du rouge et du vert superposés). Les techniques classiques de

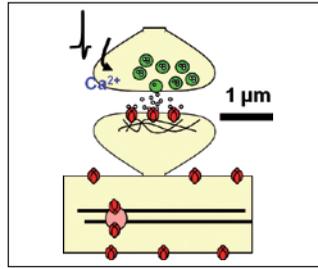


Figure 7

Schéma de fonctionnement d'une synapse (en jaune) :

les neurotransmetteurs, messagers chimiques pour la communication interneurones, sont stockés dans des vésicules (en vert) qui fusionnent avec la membrane pré-synaptique et diffusent vers l'espace post-synaptique, où elles vont se fixer sur des récepteurs situés sur les membranes des cellules (en rouge). Des récepteurs sont également présents dans des vésicules intracellulaires (rouge) et sont transportées sur le cytosquelette (lignes noires).

2. La synapse est l'aire de jonction par laquelle le message chimique passe d'un neurone à l'autre. Les molécules de neurotransmetteurs, constitutives de ces messages, présentes en amont de la synapse, sont dites pré-synaptiques. En aval de la synapse, ces éléments sont dits post-synaptiques (voir la **Figure 7**).

microscopie optique ne permettent pas de réellement distinguer ces deux éléments du fait de leur limitation intrinsèque, qui est la limite de diffraction (**Encart : « La limite de diffraction »**).

LA LIMITE DE DIFFRACTION

L'observation est la suivante (Ernst Abbe, 1873) : si on a un point source individuel (tel qu'une molécule fluorescente par exemple) qui fait quelques nanomètres de diamètre et que l'on regarde dans un microscope, ce que l'on voit ce n'est pas ce point source.

On voit une tache (tache de diffraction) dont la dimension est environ la moitié de la longueur d'onde de la lumière à laquelle on regarde. Avec une lumière visible, qui a une longueur d'onde de l'ordre de 500 nanomètres, on a une tache de diffraction de l'ordre de 250 nanomètres de diamètre.

Cette loi de la diffraction fait que l'on ne peut pas différencier deux objets qui sont séparés de moins que la moitié de la longueur d'onde de la lumière. Deux points sources (deux molécules par exemple) distants de moins de 250 nanomètres ne peuvent pas être distingués l'un de l'autre en lumière visible (**Figure 8**).

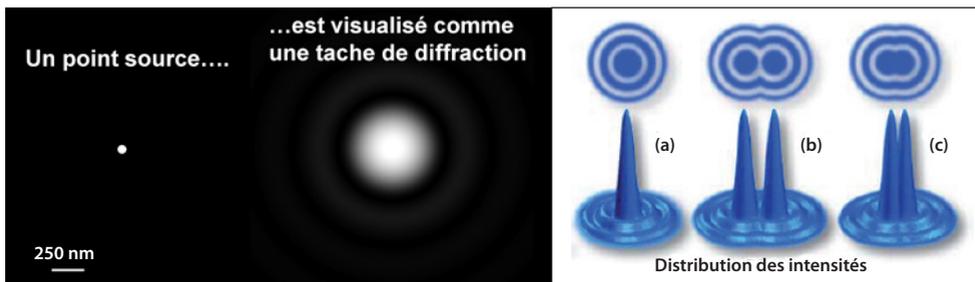


Figure 8

La limite de diffraction.

Schématisation : a) un objet est visualisé comme une tache de diffraction ; b) distance minimum entre deux objets pour qu'il soit possible de les distinguer par imagerie ; c) distance inférieure à la distance limite : il est impossible de distinguer les deux objets.

La loi de la diffraction posée par Ernst Abbe (**Figure 9**) en 1873 dit que la diffraction limite le pouvoir de résolution des instruments optiques. En pratique cette limite est de l'ordre de 200 nanomètres, soit 0,2 micron. Cette dimension est de l'ordre de grandeur de la taille des synapses.

Pendant plus d'un siècle, on a pensé que cette limite de diffraction était une barrière physique indépassable qui empêcherait à tout jamais d'utiliser des techniques optiques pour voir plus petit que cette limite de diffraction.

Les méthodes de super haute résolution ont cependant vu le jour, comme il est expliqué dans ce chapitre, pour le plus grand progrès des études du cerveau.



Figure 9

Le physicien allemand Ernst Abbe propose en 1873 la loi de limite de diffraction (à droite : monument en l'honneur d'Ernst Abbe (Iéna, Allemagne)).

Des nouvelles technologies, à super résolution, ont été développées pour contourner cette limitation, afin de pouvoir différencier ces différents objets et visualiser le niveau du récepteur individuel ou de la vésicule individuelle, et étudier les propriétés d'organisation de ces neurones.

La **Figure 10A** représente les récepteurs et les vésicules de neurotransmetteurs dans la synapse dont la dimension est de l'ordre du micron. On peut avoir une image très précise de l'organisation de ces synapses en utilisant les techniques de microscopie électronique (**Figure 10B**), qui donnent une résolution de l'ordre du nanomètre, donc moléculaire. Mais ces techniques ne peuvent être utili-

sées que sur des tissus fixés, des tissus morts. Les études de biologie veulent avoir accès à la dynamique de ce qui se passe sur une cellule vivante et ont donc besoin d'autres techniques : c'est là l'objectif du développement des techniques optiques.

Celles-ci sont limitées par la diffraction (**Figure 10C**) ; si l'on marque chacun des récepteurs avec une protéine fluorescente, chaque protéine donne naissance à une tache de diffraction, et le résultat du cliché sera un « gros flou » (**Figure 10D**) au lieu d'une belle image bien résolue (voir **Encart : « La limite de diffraction »**). Les nouvelles méthodologies doivent donc être mobilisées pour chercher à transgresser la limite de diffraction.

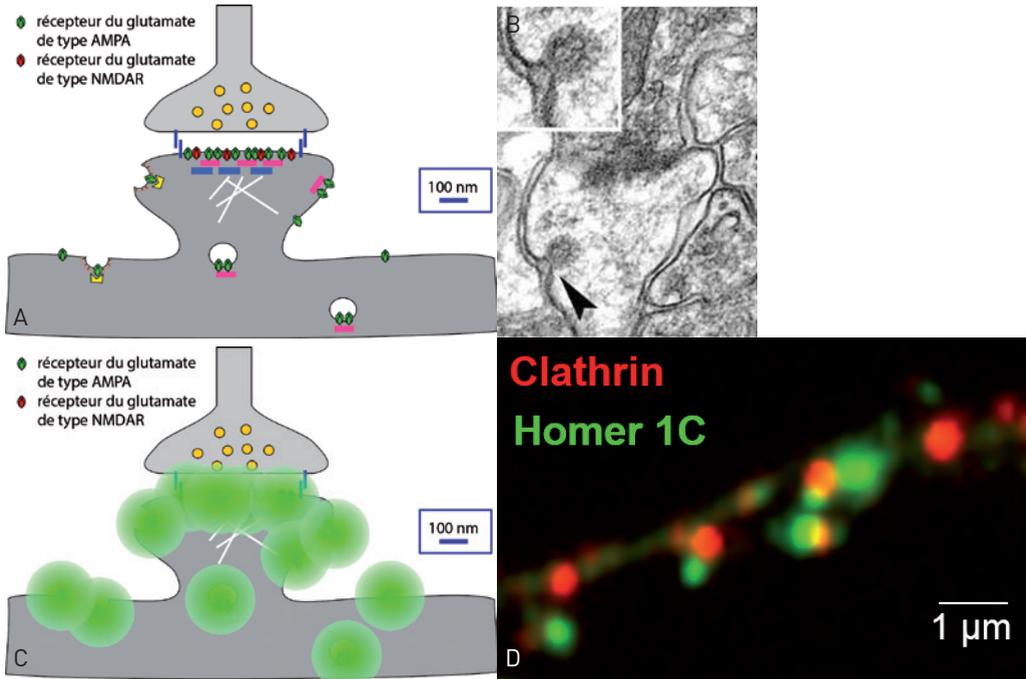


Figure 10

Imagerie d'une synapse par microscopie électronique. A) Schéma d'une synapse en fonctionnement ; B) image de la synapse en microscopie électronique (Raszcz et coll., 2004) ; C) limite de diffraction sous microscope optique ; D) tache de diffraction des protéines fluorescentes en microscopie optique.

Sources : Petrin E.M. et coll. (2009). *Neuron.*, **63** : 92.

4 Le développement de nouvelles techniques

Il existe tout un ensemble de techniques susceptibles de dépasser la limite de diffraction, et donc d'augmenter la résolution. Une première technique consiste à diminuer la tache de fluorescence : la microscopie STED³. Nous présentons plutôt ici les tech-

3. STED (« *stimulated-emission-depletion* », ou déplétion par émission stimulée) : technique de microscopie de fluorescence à balayage dont l'illumination est mise en forme de manière à dépasser la limite de diffraction.

niques qui permettent de localiser les molécules uniques et indiquons comment elles permettent de dépasser la limite de diffraction.

Ces développements (prix Nobel de Chimie 2014, **Figure 11**) ont impliqué William E. Moerner, qui a été l'un des tout premiers chercheurs à visualiser une molécule individuelle par imagerie. Plus récemment, Stefan W. Hell et Eric Betzig ont développé ces méthodes de nanoscopie. S.W. Hell a postulé dès 1994 la capacité de diminuer la tache de fluorescence, avec la technique du STED, puis

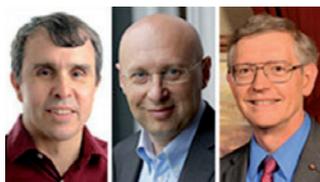


Figure 11

Eric Betzig, Stefan W. Hell et William E. Moerner,
prix Nobel de Chimie 2014 pour le développement de la microscopie à fluorescence à très haute résolution.

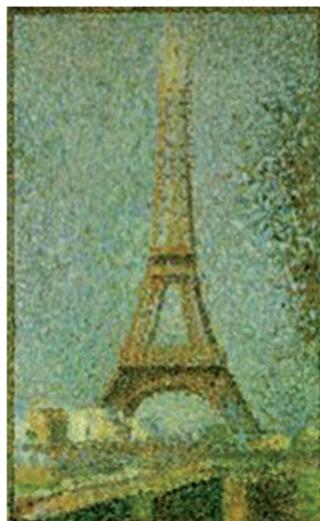


Figure 12

Un exemple de pointillisme :
La tour Eiffel de Georges Seurat (1889).

Eric Betzig a développé les techniques d'imagerie super résolution par localisation de molécules individuelles.

La technique de localisation de molécules individuelles s'apparente au pointillisme bien connu en peinture et que l'on reconnaît sur le tableau de Seurat par exemple (Figure 12), où, en faisant une myriade de petites taches, on est capable de reconstituer une image d'ensemble avec une bonne résolution. Dans les techniques de molécules individuelles – c'est la base même de leur principe –, on localise chaque molécule individuellement puis on reconstitue l'image d'ensemble.

Plus précisément, on peut expliquer le principe de la technique du pointillisme de la façon suivante. Quand un objet individuel émet une tache de fluorescence limitée par la diffraction, on sait calculer sa forme, sa taille et tous ses paramètres géométriques à partir de la tache de fluorescence. On sait donc localiser son centre avec une très bonne précision, pratiquement à la précision du nanomètre. La technique de super résolution basée sur la détection de molécules individuelles utilise cette capacité. Si un objet est composé d'un grand nombre de molécules, on localise chacune d'entre elles jusqu'à reconstituer l'ensemble. On peut de cette façon augmenter de presque deux ordres de grandeur (un facteur cent) la résolution effective de l'image (Figure 13A à F).

En pratique, on peut photoactiver petit à petit l'ensemble

des molécules individuelles pour reconstituer l'objet (Figure 13G) avec une précision quasiment moléculaire. À partir de l'objet flou de départ, on peut maintenant constituer des images bien résolues quasiment à vitesse vidéo en temps réel.

La Figure 14 montre de nouveau un cliché des synapses comportant deux éléments, d'une part des récepteurs, d'autre part des protéines d'échafaudage. Avec les techniques classiques limitées par la diffraction d'imagerie, le cliché est flou ; la protéine d'échafaudage marquée en rouge et le récepteur marqué en vert semblent superposés puisque la couleur dominante est le jaune dans toutes ces synapses.

En appliquant la technique de super résolution (Figure 15) (dite STORM), on observe que les protéines rouges et les protéines vertes ne sont pas aux mêmes endroits ; on a plutôt des protéines vertes autour des rouges. Ces clichés renseignent donc sur l'organisation moléculaire des récepteurs et des protéines d'échafaudage dans les synapses. On peut de surcroît assez facilement obtenir des images en trois dimensions et reconstruire l'organisation tridimensionnelle de ces récepteurs et de ces protéines d'échafaudage dans la synapse.

On réalise que la puissance de techniques optiques permet d'avoir accès à l'organisation dynamique des constituants moléculaires de la synapse. On peut par exemple, sur un neurone vivant, marquer une

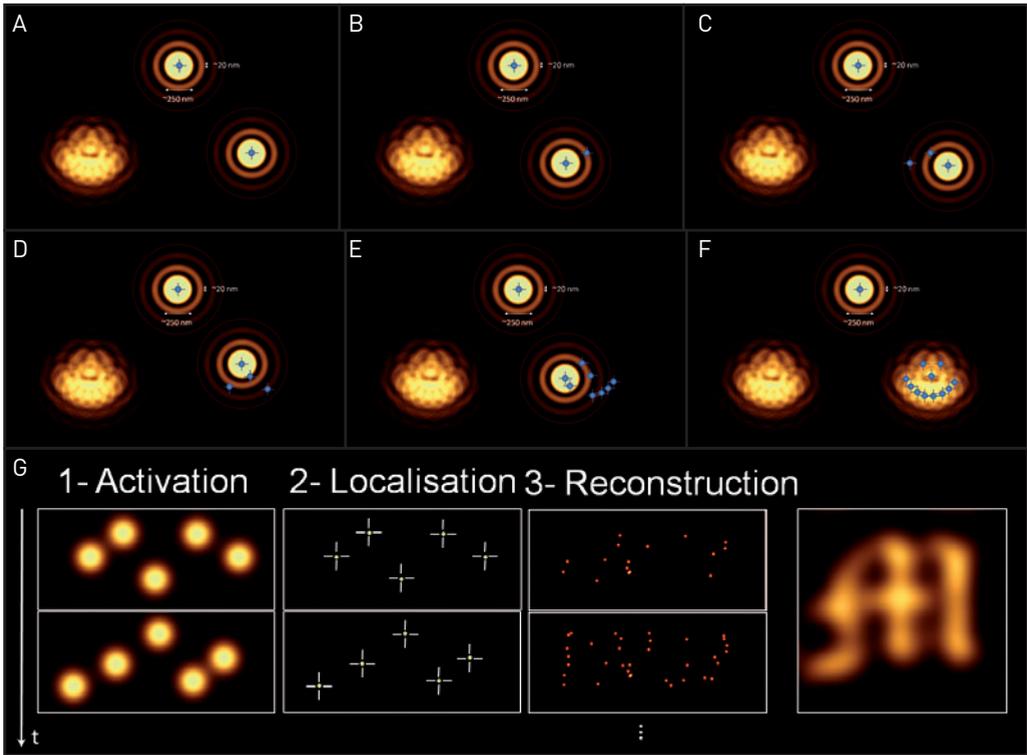


Figure 13

Augmentation de la résolution par la technique du pointillisme. Les étapes de la microscopie super résolution. Les molécules individuelles produisent des taches de diffraction dont le centre peut être localisé avec grande précision, permettant de reconstruire une image avec une résolution dépassant la limite de diffraction.

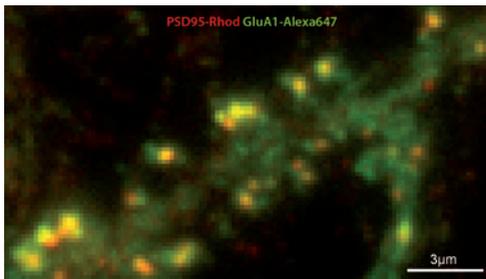


Figure 14

Synapse vue en microscopie optique classique.

Source : Nair D., Hossy E., Petersen J.D., Constals A., Giannone G., Choquet D., Sibarita J.-B. (2013). *The Journal of Neuroscience*, **33(32)** : 13204-13224.

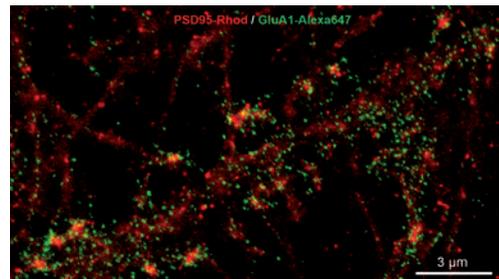


Figure 15

Organisation moléculaire des synapses, observées par super résolution : les points en rouge sont des protéines d'échafaudage et les points en vert sont des récepteurs.

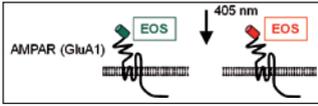


Figure 16

Activation des protéines activables (EOS). Les protéines EOS sont initialement fluorescentes en vert. Après illumination en ultra-violet, elles se photoconvertissent en rouge.

dendrite et les synapses attachées. Cela se fait par une fusion génétique d'un variant de la GFP. Il s'agit d'une protéine photoactivable, l'EOS (Figure 16), dont on peut changer la couleur en l'illuminant avec une lumière ultra-violette.

On peut alors enregistrer sur un neurone vivant non seu-

lement la localisation mais aussi le déplacement de ces récepteurs, et obtenir une cartographie de l'organisation dynamique des molécules (Figure 17). Cela permet d'obtenir tout un ensemble de caractérisations quantitatives sur les propriétés de diffusion et de mouvement des molécules, un succès dont on n'aurait osé rêver il y a seulement quelques années.

Les techniques de fusion génétique nécessaires à la coloration des molécules sont des opérations complexes susceptibles d'induire des artefacts comme une modification du récepteur endogène⁴. Pour marquer des récepteurs sans les modifier, on peut – entre autres techniques – utiliser la technique dite PAINT (« Point Accumulation In Nano Tomography »). Elle permet de marquer des récepteurs endogènes à l'aide d'anticorps qui reconnaissent les domaines extracellulaires des récepteurs (Figure 18). Des sondes et des biosenseurs⁵ spécifiques marquent ensuite directement ces anticorps avec différents fluorophores⁶. À partir de ces approches, on peut localiser des molécules individuelles sur des récepteurs endogènes et obtenir, à nouveau, ces cartes à la fois de localisation et de dynamique d'organisation des récepteurs (Figure 19).

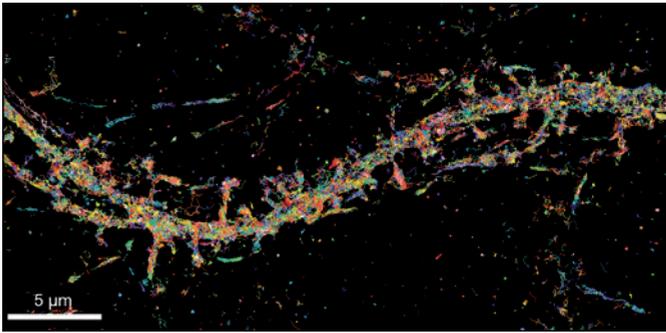


Figure 17

Cartographie de la synapse par utilisation des EOS.

Source : Daniel Choquet et Jean-Baptiste Sibarita, CNRS-Université de Bordeaux.

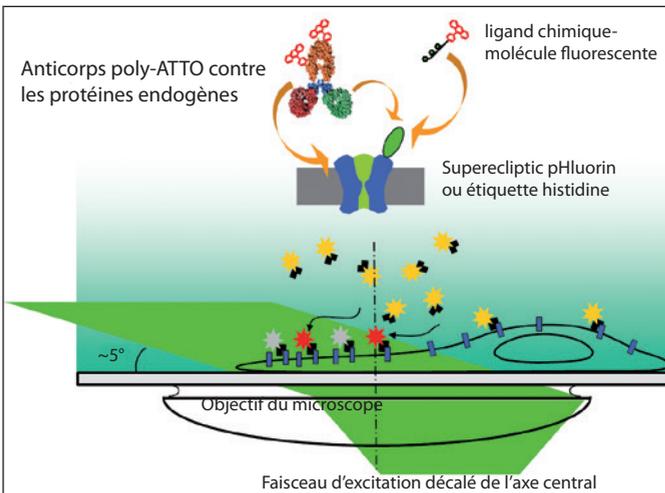


Figure 18

Schématisation de la méthode PAINT.

4. Endogène : élément qui a été élaboré dans l'organisme.

5. Biosenseur : récepteur d'origine biologique en contact avec un dispositif électronique.

6. Fluorophore : substance chimique capable d'émettre de la lumière fluorescente après excitation.

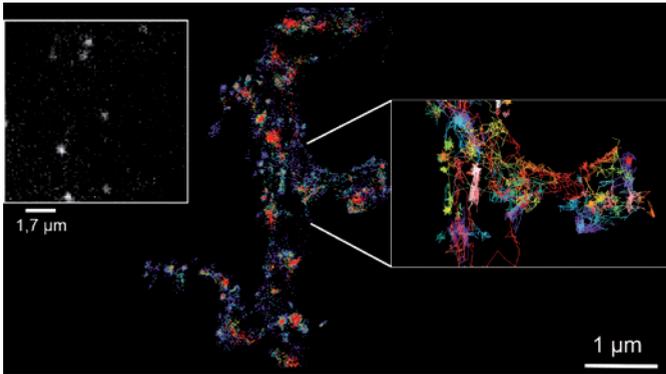


Figure 19

Illustration de la méthode PAINT : localisation de récepteurs et de dynamique d'organisation des récepteurs.

Source : Nair D., Hossy E., Petersen J.D., Constals A., Giannone D., Choquet D., Sibarita J.-B. (2013). *The Journal of Neuroscience*, **33**(32) : 13204-13224.

Vers le contrôle tout optique du cerveau ?

Après ce bref résumé de l'état de l'art sur les technologies d'imagerie optique, peut-on estimer leurs perspectives ?

Elles se trouvent principalement dans leur application à la compréhension de la plasticité synaptique à court et à long terme (**Figure 20**, et voir aussi les **Chapitres de J.-P. Changeux et J. Bockaert** dans *Chimie et cerveau*, EDP Sciences). En particulier, elles permettent de tester l'effet des différents agents pharmacologiques sur le système synaptique. Qu'il s'agisse du cannabis, de l'héroïne, de la cocaïne, ou d'autres molécules moins agressives (voir le **Chapitre de B. Kieffer** dans *Chimie et cerveau*), on observe qu'elles agissent principalement en modifiant les phénomènes de dynamique moléculaire. Accéder à ceux-ci grâce aux techniques optiques décrites dans ce chapitre ouvrira la voie vers de grands progrès dans la compréhension de leurs interactions avec le cerveau.

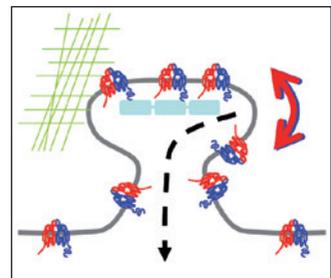


Figure 20

Schématisme de la plasticité synaptique. Les synapses ne se contentent pas de transmettre les informations d'un neurone à un autre, par le biais de signaux électriques. Elles peuvent également moduler, réguler ces signaux. C'est ce que l'on appelle la plasticité synaptique, qui permet notamment l'apprentissage.



Figure 21

L'avenir : vers le contrôle tout optique du cerveau ?

Un autre champ d'application des techniques optiques au cerveau est celui des manipulations optiques par lequel on cherche à intervenir sur le fonctionnement des récepteurs et donc du fonctionnement du système synaptique. Nous développons par exemple, avec des groupes de chimistes, des molécules photoactivables qui peuvent prendre place dans les assemblages moléculaires chargés des interactions entre récepteurs et protéines d'échafaudage. Ces molécules, en fonction de l'excitation optique, agiront différemment sur la dynamique des récepteurs ; les effets sur le fonctionnement du cerveau pourront être contrôlés par la lumière (longueurs d'ondes et intensités). Ces travaux utilisent en interactions fortes l'imagerie, la physiologie et la chimie pour le développement de nouvelles molécules photoactivables.

Et le grand avenir ? Ne serait-ce pas le contrôle tout optique du cerveau rendu possible par les techniques d'optogénétique qui permettent d'ores et déjà un certain contrôle de l'activité du cerveau par la lumière (**Figure 21**) ?