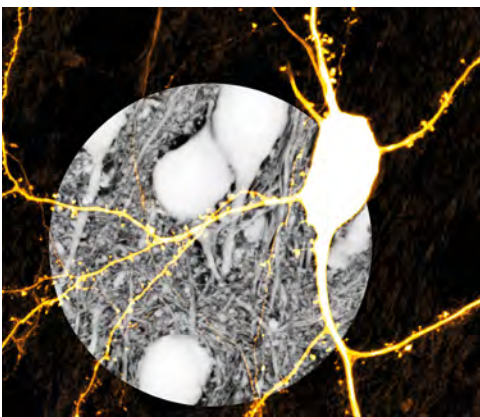


# PLUS VIVE, PLUS NETTE : LA MICROSCOPIE STED DU CERVEAU

Misa ARIZONO<sup>1</sup> and U. Valentin NÄGERL<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5297, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

\*valentin.nagerl@u-bordeaux.fr



La microscopie à super-résolution (SRM) désigne une nouvelle catégorie de techniques de microscopie optique qui permettent de surmonter la barrière de diffraction classique, barrière qui a rendu difficile l'observation des structures et des activités qui constituent la base de la vie cellulaire biologique. La microscopie STED, qui est l'une des techniques SRM, a attiré l'attention des neurobiologistes, car elle permet de révéler la nanostructure des cellules cérébrales non seulement dans une boîte de Pétri, mais aussi à l'intérieur du tissu cérébral réel, voire dans le cerveau intact in vivo.

<https://doi.org/10.1051/photon/202211436>

Article publié en accès libre sous les conditions définies par la licence Creative Commons Attribution License CC-BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), qui autorise sans restrictions l'utilisation, la diffusion, et la reproduction sur quelque support que ce soit, sous réserve de citation correcte de la publication originale.

La microscopie à fluorescence conventionnelle ne parvient jamais à produire des images nettes des caractéristiques morphologiques et moléculaires lorsque celles-ci sont inférieures à 250 nm, ce qui est le cas pour de nombreuses structures cellulaires clés. Ce problème est particulièrement contraignant dans le domaine des neurosciences, car la morphologie des cellules cérébrales telles que les neurones et les cellules gliales est extrêmement élaborée et miniaturisée de par sa conception. Cependant, la microscopie STED, qui est une technique récente d'imagerie de fluorescence à super-résolution, offre une résolution spatiale suffisante pour ces structures nanométriques. De plus, elle peut être réalisée sur des

cellules vivantes à l'intérieur de tissus cérébraux intacts ou d'organoïdes 3D, et être combinée à d'autres techniques de cellules vivantes, telles que l'imagerie du Ca<sup>2+</sup> et l'électrophysiologie, ce qui permet d'étudier les liens entre la nanostructure et la physiologie.

## LA LIMITE CLASSIQUE DE LA RÉOLUTION SPATIALE

Pour comprendre comment fonctionne la microscopie optique à super-résolution, il faut d'abord rappeler la notion fondamentale de résolution spatiale et pourquoi les scientifiques ont cru pendant si longtemps qu'elle était limitée. En raison de sa nature ondulatoire, la lumière ne peut être focalisée en un point arbitrairement petit, quelles que soient la collimation et la cohérence. L'image d'une seule protéine fluorescente, comme

la GFP (protéine fluorescente verte), sera toujours une tache floue plus de cent fois plus grande que la molécule elle-même. Ceci est dû au fait que les photons sont « diffractés » par l'optique d'un microscope, et la largeur de cette tache floue ( $\Delta r$ ) est appelée « limite de diffraction de la microscopie optique ». Cette limite de diffraction est bien approchée par l'équation simple :

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1)$$

également connue sous le nom de « formule d'Abbe », où  $\lambda$  désigne la longueur d'onde de la lumière et NA l'ouverture numérique, qui est définie comme  $nsina$  et désigne la capacité de l'objectif à capturer la lumière se déplaçant sur l'angle solide ( $\alpha$ ) depuis l'échantillon à travers un milieu d'immersion avec un indice de réfraction

de  $n$ . Pour imager par exemple un échantillon marqué GFP ( $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ ) avec un objectif à fort indice de réfraction ( $NA = 1,0$ ),  $\Delta r$  est d'environ 250 nm. Pour ces raisons, il était impossible, jusqu'à récemment, de résoudre des éléments plus petits que la moitié environ de la longueur d'onde des photons utilisés dans un microscope, ce qui représentait un obstacle insurmontable et une source de frustration permanente pour les biologistes cellulaires et les neuroscientifiques.

Heureusement, plusieurs concepts fructueux ont été développés - créant ainsi le domaine de la SRM (*Super-Resolution Microscopy*) - qui surmontent ce problème de longue date et permettent d'atteindre une résolution bien au-delà de la zone de diffraction. Au lieu d'essayer de pousser les paramètres  $NA$  ou  $\lambda$ , ils introduisent de nouveaux termes dans les formules de résolution qui s'échelonnent en fonction des intensités lumineuses impliquées dans la formation de l'image.

### LA MICROSCOPIE STED

Le premier principe viable pour dépasser la limite de diffraction a été la microscopie STED (*STimulated Emission Depletion*), qui repose sur la réduction du spot de fluorescence dans un microscope à balayage laser [1]. Cette réduction est obtenue par un second laser (le laser STED), qui peut désexciter, ou éteindre, les molécules par émission stimulée, bien connue de la physique des lasers. En façonnant le laser STED comme un doughnut, il peut supprimer la fluorescence sur le bord du point d'excitation, tout en la laissant intacte au milieu du doughnut, ce qui augmente efficacement la résolution spatiale du microscope (Fig. 1).

Bien que la technique de rétrécissement du spot tende à offrir une résolution spatiale moindre ( $\sim 50 \text{ nm}$ ) que d'autres techniques de SRM basées sur la localisation de molécules uniques (voir les autres articles de ce numéro), elle s'accompagne naturellement d'une section

optique supérieure (en raison de leur conception à balayage laser comme la microscopie confocale et la microscopie biphotonique) et d'une vitesse supérieure (quelques secondes ou moins suffisent pour une image super-résolue, selon le nombre de pixels). La microscopie STED est bien adaptée à l'imagerie volumétrique de fluorophores hautement concentrés et diffusibles, et a ouvert la voie à l'imagerie à l'échelle nanométrique dans des préparations épaisses de tissus cérébraux et même dans le cerveau intact *in vivo*. Dans le cas de la STED, la formule d'Abbe prend la forme modifiée :

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + \frac{I_{STED}}{I_{sat}}}} \quad (2)$$

où  $I_{STED}$  est l'intensité du laser STED et  $I_{sat}$  l'intensité à laquelle la moitié des molécules sont désexcitées.

### APPLICATIONS DE LA MICROSCOPIE STED EN NEUROSCIENCES

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons illustrer plusieurs exemples tirés de nos propres travaux où la microscopie STED a apporté une différence cruciale, en mettant au jour de nouvelles connaissances biologiques sur la structure et la fonction à l'échelle nanométrique des cellules du cerveau.

**Figure 1.** Principe de la microscopie STED. En plus d'un laser d'excitation, un microscope STED est équipé d'un laser STED qui peut désexciter les molécules. En façonnant ce laser comme un doughnut, il peut fortement supprimer la fluorescence sur le bord du spot d'excitation, augmentant ainsi la résolution spatiale.



### La plasticité du col de l'épine régule la compartimentation des synapses

Les épines dendritiques sont de minuscules protubérances de la membrane externe des neurones qui forment l'extrémité réceptrice (ou partie postsynaptique) des synapses. Les recherches intensives menées depuis plus d'un siècle, ces belles structures restent assez énigmatiques. De forme évidente, avec une tête proéminente et un cou allongé, les épines transforment les signaux synaptiques par une compartimentation chimique et électrique. Cependant, l'impact de la morphologie des épines sur la compartimentation des synapses reste difficile à évaluer, car les épines, en particulier leur cou, sont petites et difficiles à résoudre. Grâce à une combinaison de STED et de techniques électrophysiologiques, nous avons pu mettre en lumière la relation entre la structure à l'échelle nanométrique et la fonction des épines (Fig. 2a) [2].

Nous avons démontré que les cous des épines deviennent sensiblement plus larges et plus courts après l'induction de la plasticité synaptique. Ces changements pourraient refléter un mécanisme structurel permettant de renforcer les synapses, car tout changement réduisant la résistance électrique du col de l'épine conduit à diminuer l'amplitude des potentiels-synaptiques électriques dans la tête de l'épine.

Contre-intuitivement, cette réduction du signal électrique rendrait en fait la synapse plus forte, en empêchant le signal de saturer, ce qui maintiendrait la synapse dans une bonne gamme dynamique. Cet effet de désinhibition deviendra physiologiquement important, lorsque ●●●



le signal synaptique et la résistance du cou sont très élevés, ce qui est le cas pour les épines à tête large et à cou long ou fin [3].

### La plasticité des axones règle la vitesse de conduction des impulsions nerveuses

Les axones sont l'équivalent biologique des câbles électriques, conduisant les impulsions nerveuses, appelées potentiels d'action (AP), reliant différentes cellules et zones du cerveau entre elles et déterminant la « vitesse d'horloge » du traitement des informations par les circuits cérébraux. D'après la plupart des manuels, la conduction des AP se fait de manière tout ou rien et de manière très stéréotypée. Cependant, au cours des 20 dernières années, il a été démontré que les axones disposent d'une variété de moyens sophistiqués pour réguler la conduction AP et la transmission synaptique.

Grâce à l'imagerie STED time-lapse couplée à l'électrophysiologie dans des tranches de cerveau hippocampique, nous avons montré que les tirs de AP à haute fréquence induisaient un élargissement physique des axones (Fig. 2B), où les boutons axonaux (la partie présynaptique d'une synapse) présentaient une augmentation transitoire, suivie d'un élargissement durable des tiges axonales intermédiaires. Ces dynamiques

structurelles ont été reflétées par des changements bidirectionnels dans la vitesse de conduction du AP.

Ces résultats ont révélé un nouveau mécanisme de plasticité structurelle, qui règle le timing de la signalisation électrique rapide [4].

### Des nanostructures astrocytaires génèrent des signaux calciques au niveau des synapses « tripartites » entre la glie et les neurones

Les astrocytes, un type de cellules gliales du cerveau, ont une morphologie qui est encore plus élaborée et miniaturisée que celle des neurones. Leurs spécialisations morphologiques à l'échelle nanométrique s'enroulent autour des synapses, formant ce qu'on appelle des synapses tripartites, réglant la transmission et la plasticité des synapses, affectant la fonction des circuits et le comportement animal. Ces structures gliales sont responsables de l'absorption du glutamate dans la fente synaptique, de l'absorption d'ions « neurophysiologiques » comme le  $K^+$  et semblent libérer des substances neuroactives. Mais comme ils ont un aspect très flou sous un microscope normal, il a été difficile d'observer comment les astrocytes interagissent avec les synapses. Pour surmonter ce problème, nous nous sommes tournés encore vers la microscopie STED en 3D et l'avons

combinée avec l'imagerie du  $Ca^{2+}$  pour évaluer leur activité de signalisation.

Nous avons observé que ces structures astrocytaires forment un maillage réticulaire de noeuds et d'arbres qui étaient fréquemment disposés en anneaux. Les noeuds donnent lieu à des signaux  $Ca^{2+}$  spontanés, qui ont tendance à rester confinés, mais qui peuvent aussi se propager aux noeuds voisins *via* les arbres. La cartographie des signaux  $Ca^{2+}$  sur la morphologie résolue par STED a montré que l'activité  $Ca^{2+}$  astrocytaire était principalement associée à des synapses uniques (Fig. 2c) [5]. Dans l'ensemble, cette étude a pu démontrer l'organisation à l'échelle nanométrique des astrocytes dans les tissus cérébraux vivants, en identifiant les noeuds astrocytaires comme la structure anatomique insaisissable qui permet aux astrocytes de communiquer « en privé » avec mille de synapses différentes en parallèle.

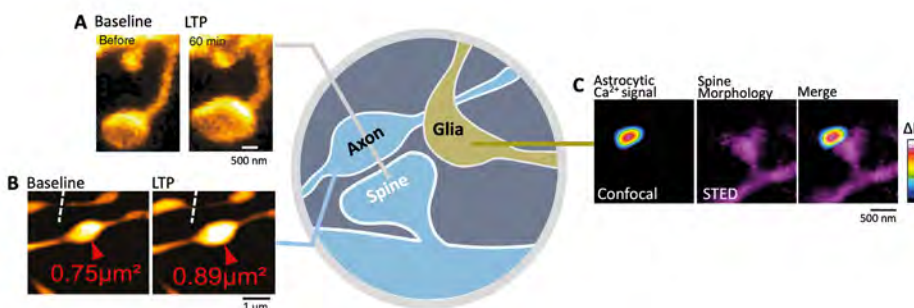
### Super-resolution shadow imaging de l'espace extracellulaire

Malgré tous ses points forts, la microscopie à fluorescence présente le net désavantage de ne voir que ce que l'on étiquette, ce qui laisse le reste dans l'ombre. Pour obtenir une vue d'ensemble, nous avons mis au point une stratégie « inversée », simple mais convaincante, pour marquer le tissu cérébral. Au lieu de marquer les cellules individuelles, nous marquons et visualisons les espaces entre les cellules, en utilisant un colorant fluorescent hautement diffusible mais imperméable aux membranes et un microscope STED en 3D. L'ensemble de ces espaces intermédiaires est appelé l'espace extracellulaire du cerveau (ECS), qui représente environ 20% du volume du cerveau et contient le liquide céphalorachidien et la matrice extracellulaire.

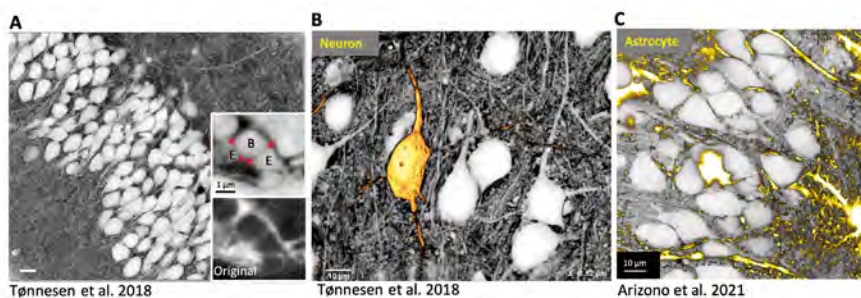
Nous avons baptisé cette technique « Super-Resolution Shadow Imaging » ou SUSHI [6], car toutes les cellules apparaissent comme des ombres sombres dans une mer lumineuse de fluorescence. SUSHI génère

**Figure 2.** Relier la nano-anatomie et la physiologie en utilisant la microscopie STED en direct.

(a) L'élargissement du col d'un épine dendritique accompagné de l'élargissement de la tête de l'épine a été détecté lors de la plasticité synaptique. (b) Un élargissement significatif des boutons axonaux lors de la plasticité synaptique a été observé, suivi d'un élargissement des tiges axonales. (c) La cartographie des signaux  $Ca^{2+}$  astrocytaires sur l'image STED des épines a révélé que ces signaux  $Ca^{2+}$  peuvent être spécifiques aux épines individuelles.



**Lasers**  
*pour usages*  
**industriel,**  
**scientifique,**  
**défense**  
**& médical**



**Figure 3.** (a) Une image SUSHI inversée montrant les empreintes négatives de toutes les cellules du cerveau dans le tissu. Ceci peut être combiné avec un marquage positif d'un type de cellule particulier tel que les neurones ( $E$  = épine dendritique ;  $B$  = bouton axonale, marqueurs en rouge = fente synaptique) (b) et les astrocytes (c). Modifié à partir de Arizono *et al.* 2021 Neuroforum.

une empreinte négative super-résolue de l'espace occupé par les structures cellulaires liées à la membrane (figure 3). Bien que le marquage soit par nature non spécifique, les différentes cellules et leurs structures subcellulaires peuvent être facilement distinguées en fonction de leur forme, y compris les fentes synaptiques (Fig. 3). Le marquage de l'ECS plutôt que des cellules individuelles présente plusieurs avantages pratiques. Il est facile à appliquer et beaucoup plus résistant au photoblanchiment et à la phototoxicité, car le colorant se trouve à l'extérieur des cellules. C'est un grand avantage de ne pas avoir à introduire un colorant dans les cellules, action qui peut être très invasive voire même impossible.

De plus, il y a un grand intérêt à étudier l'ECS en tant que tel, ce qui peut être fait en utilisant *SUSHI*. Entourant toutes les cellules, l'ECS est la station de transit obligatoire pour les molécules de signalisation extracellulaire et les substances thérapeutiques, influençant la communication neuronale et l'efficacité des traitements médicamenteux.

Physiologiquement régulé et très sensible aux stimulations expérimentales, l'ECS constitue une scène tridimensionnelle dynamique et influence sur le plan biophysique, où les neurones et les cellules gliales agissent de concert. En tant que technique polyvalente, *SUSHI* peut être facilement appliquée à d'autres tissus et organes, des tumeurs aux glandes salivaires [7]. ●

## RÉFÉRENCES

- [1] SW. Hell, *Science* **316**, 1153-8 (2007). doi: 10.1126/science.1137395
- [2] J. Tønnesen, G. Katona, B. Rózsa, U.V. Nägerl, *Nat; Neurosci.* **17**, 678-85 (2014) doi: 10.1038/nn.3682
- [3] J. Tønnesen, U.V. Nägerl, *Front Psychiatry.* **7**, 101 (2016) doi: 10.3389/fpsy.2016.00101
- [4] R. Chéreau, G.E. Saraceno, J. Angibaud, D. Cattaert, U.V. Nägerl, "Super-resolution imaging reveals activity-dependent plasticity of axon morphology linked to changes in action potential conduction velocity," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 1401-1406 (2017) doi: 10.1073/pnas.1607541114
- [5] M. Arizono, V.V.G.K. Inavalli, A. Panatier *et al.*, *Nat Commun.* **11**, 1906 (2020) doi: 10.1038/s41467-020-15648-4
- [6] J. Tønnesen, V.V.G.K. Inavalli, U.V. Nägerl, *Cell.* **172**, 1108-1121 (2018) doi: 10.1016/j.cell.2018.02.007
- [7] B. Stolp, F. Thelen, X. Ficht, L. M. Altenburger *et al.*, *Sci. Immunol.* **5**, eaaz4371 (2020) doi: 10.1126/sciimmunol.aaz4371

www.lumibird.com



LE SPÉCIALISTE  
 DES TECHNOLOGIES  
 LASER