

Microscopie à haute résolution temporelle et spatiale pour l'étude de la dynamique multi-échelle de neurones sains et Huntington

Contexte scientifique

Les cellules vivantes peuvent être considérées comme de la matière active, où les phénomènes de transport sont à la fois amplifiés par l'énergie produite par la cellule elle-même et restreints par d'importantes limitations de diffusion. Elles présentent une importante activité hors équilibre, principalement due aux forces générées par le *cytosquelette* et les moteurs moléculaires. L'activité de ces protéines contribue à la violation du théorème de fluctuation-dissipation dans les systèmes vivants et définit les propriétés rhéologiques des cellules [1, 2]. L'énergie nécessaire est produite en oxydant le carbone : dans les organismes aérobies, une étape majeure de cette oxydation est réalisée par la chaîne respiratoire dans les *mitochondries*. Cette production d'énergie implique donc l'oxydation et le vieillissement des matériaux cellulaires. Le contrôle de cette activité oxydative permet aux cellules de rester suffisamment loin de l'équilibre thermodynamique et l'équilibre entre respiration et vieillissement est ainsi un paramètre de régulation majeur du devenir des cellules.

Le milieu cellulaire est très structuré dans l'espace à tous les niveaux : depuis les petits assemblages moléculaires aux compartiments subcellulaires nano- et micrométriques, jusqu'aux échelles micrométriques (niveau classique de description des cellules). Cette approche a conduit, ces dernières années, à un profond renouvellement de notre vision du comportement cellulaire, en particulier grâce aux preuves que l'architecture et la forme des membranes modulent le réseau de régulation et les fonctions cellulaires [3,4]. La *biologie systémique des membranes cellulaires* converge donc avec la biophysique, et l'organisation spatio-temporelle multi-échelle des cellules apparaît maintenant comme organisant et coordonnant les réseaux de signalisation et le comportement des cellules.

Une telle approche implique l'intégration de divers outils théoriques et expérimentaux. En outre, un défi majeur consiste à relier le niveau moléculaire à l'échelle nanométrique et la description classique des cellules à l'échelle micronique, en termes de dynamique, de mécanismes et de remodelage [5]. Dans ce contexte, nous avons développé – sur lignées cellulaires – une méthode efficace. Nous l'étendons maintenant à des systèmes plus réalistes, sur des cellules primaires (neurones corticaux, obtenus à partir de modèles de souris saines ou modèles de la *maladie de Huntington*, MH).

Objectifs scientifiques

La question centrale de notre projet est celle de savoir *comment que la topologie particulière d'une membrane cellulaire peut moduler ses fonctions biologiques*. Le terme topologie est utilisé ici pour prendre en considération la configuration, la dynamique et la modulation de la forme de la membrane. Nous nous concentrerons sur deux membranes clés des cellules, dont l'état et les activités sont liés à des points clés de l'état physiologique et thermodynamique de la cellule :

- La *membrane plasmique*, qui est directement couplée à l'activité du cytosquelette, et qui contrôle les échanges cellulaires, y compris par endo- et exocytose,
- Les *membranes mitochondriales* dont l'organisation spatiale et temporelle est liée à la production d'énergie cellulaire.

Dans notre modèles pathologique (MH), ces deux membranes sont affectées : la membrane plasmique, où les modulations à l'échelle méso sont liées à un patern plan (1D), constitués d'éléments appelés radeaux lipidiques [6], et la membrane interne mitochondriale, où l'organisation à l'échelle nanométrique présente des invaginations membranaires en 3D appelées cristae [7]. Ces arrangements membranaires impliquent des caractéristiques physiques et chimiques (comme respectivement l'enrichissement en cholestérol ou en cardiopline). Ceci induit des architectures spécifiques de la surface membranaire, provoquant ainsi des modulations particulières des processus de diffusion des molécules et des complexes protéiques (effets de confinement dans le plan et en 3D), capables de moduler leurs interactions et leur activité biologique. Notre approche est basée sur la combinaison de l'étude de la diversité et de la fonction des composants membranaires avec celle des aspects topologiques et mécaniques de la membrane. Ces études sont rendues possibles d'un point de vue dynamique par les dernières avancées en microscopie d'imagerie par fluorescence.

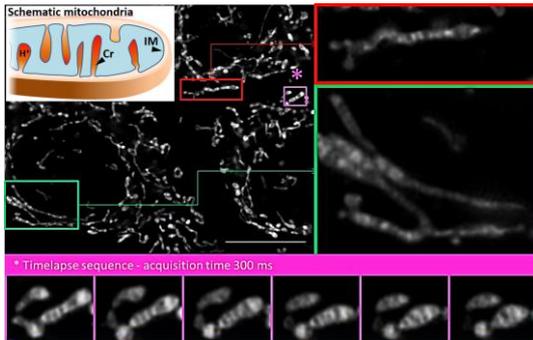


Fig. 1: Schéma des mitochondries et image Fast-SIM dans des cellules vivantes. Barre 10 μm

La microscopie haute résolution est très utile pour appréhender à la fois la structure et la fonction des structures de la cellule. D'une part, les domaines lipidiques sont accessibles aux techniques de super-résolution [8], tout comme les protéines associées [9-11]. Par exemple, la microscopie à illumination structurée (SIM) a permis de visualiser la réorganisation de la membrane lors de l'activation des cellules immunitaires [12]. D'autre part, en raison de leur petite taille, les organites intracellulaires sont des cibles parfaites pour l'imagerie à super-résolution. Jusqu'à récemment, la microscopie optique ne permettait pas d'étudier les structures des mitochondries (1 μm), des lysosomes (500 nm), des endosomes (100 nm) ou des vésicules synaptiques (50 nm).

Aujourd'hui, les techniques de microscopie à super-résolution donnent accès à l'organisation des membranes mitochondriales à l'intérieur des cellules [13,14]. Néanmoins, outre cette *hétérogénéité spatiale*, les membranes cellulaires présentent une *hétérogénéité temporelle*. Pour les études de la dynamique des cellules vivantes, cependant, les techniques de super-résolution présentent certaines limites, notamment en raison du temps d'acquisition (généralement des dizaines de secondes à la minute) [15]. Enfin, une limitation spécifique pour le suivi de la dynamique membranaire est le répertoire limité de sondes.

Pour dépasser ces limites et réaliser des études sur cellules vivantes, nous avons monté un set-up SIM maison, dont l'approche innovante améliore le taux d'acquisition [16]. Les expériences sur les cellules HeLa vivantes ont donné des résultats prometteurs (Fig. 1) : nous avons fait la démonstration d'une méthode, appelée Fast-SIM, offrant une résolution latérale de ~ 100 nm à un taux d'acquisition de données brutes de 15 images par seconde pour une image à grand champ de $85\mu\text{m} \times 85\mu\text{m}$ ([17] et article soumis).

Approches et déroulement du projet

Mathématiques appliquées et optique pour la microscopie de pointe sur les cellules vivantes. En microscopie SIM, les caractéristiques de haute fréquence sont codées dans l'image à grand champ. Plusieurs images du même échantillon sont acquises et combinées numériquement pour reconstruire une image super-résolue de l'objet. Cette méthode présente un intérêt particulier pour les études biologiques en raison de sa rapidité, de sa flexibilité et du faible niveau d'irradiation nécessaire. De plus, les images sont obtenues avec les sondes fluorescentes classiques qui offrent un large éventail d'applications. La résolution spatiale est améliorée d'un facteur deux. Alors que sept images soient généralement nécessaires, notre méthode de reconstruction est basée sur seulement quatre images, améliorant ainsi la vitesse d'acquisition [16].

Modèles de cellules. Les expériences sont menées sur deux modèles de cellules. La *lignée cellulaire HEK* est un modèle labile et sera utilisée pour les expériences préliminaires, le développement et la mise au point expérimentale. Le niveau de stress cellulaire sera contrôlé en utilisant une molécule photoactivable [2,17]. Les *cultures de cellules primaires de neurones corticaux* constituent un modèle plus réaliste et bien adapté à notre problématique. En effet, nous avons accès à des modèles de la maladie de MH, une maladie neurodégénérative. La membrane plasmique des neurones atteints de cette maladie présente une augmentation du taux de cholestérol, des radeaux lipidiques modifiés [18] et un dérèglement des récepteurs ionotropes au glutamate NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (GluN2B). Les propriétés et la fonction des mitochondries sont également fortement altérées [19]. Nous avons développé des outils biochimiques permettant un contrôle fin de ces compositions membranaires (méthyl- β -cyclodextrine, un chélateur de cholestérol, l'enzyme CYP46A1, qui dégrade le cholestérol en 24S-OH cholestérol [20]). Notre stratégie est de suivre, dans des conditions contrôlées :

- (1) les radeaux de lipides riches en cholestérol (Cholera-toxine B Alexa-488) et la sous-unité GluN2B-Cherry, ainsi que le cytosquelette,
- (2) la dynamique mitochondriale interne (MitoTracker Green) et l'activité (JC-1) et

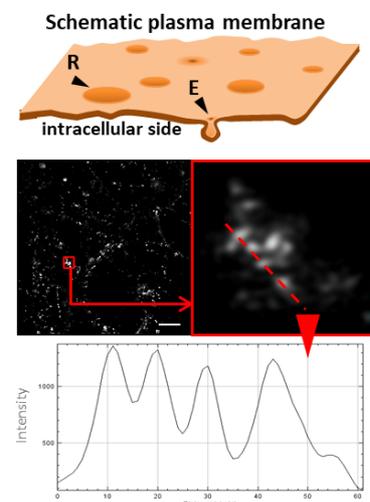


Fig. 2 Schéma des radeaux lipidiques et image Fast-SIM dans les neurones primaires MH. Barre 10 μm .

(3) la viscosité dynamique locale des compartiments des cellules pour obtenir une cartographie à l'échelle nanométrique des propriétés viscoélastiques (des sondes fluorescentes à base de rotor seront obtenues auprès de M. Kuimova, Imperial College, Londres) [21].

Nous avons obtenu des premières images super-résolues des radeaux lipidiques et des mitochondries dans les neurones primaires grâce au dispositif Fast-SIM en cours de développement au LJP (Fig. 2).

Analyse statistique et corrélations. Les cellules seront caractérisées par des approches biochimiques classiques (lipidomique, Western Blot, etc.) ainsi que par imagerie (à la fois fonctionnelle et Fast-SIM). Des données quantitatives seront dérivées de l'analyse des images (nombre de radeaux et distribution de taille, nombre et aspect-ratio des mitochondries, ainsi que déplacement quadratique moyen et événements de fission/fusion) pour analyser la topologie et la dynamique. Ces données sont caractéristiques de l'état hors équilibre de la cellule. Elles seront corrélées avec les données obtenues par l'analyse biochimique et l'imagerie fonctionnelle, qui donnent accès à l'état physiopathologique. Pour interpréter ces corrélations, des modèles théoriques aideront à comprendre comment la composition de la membrane contrôle sa structuration à l'échelle nanométrique, et comment une topologie spécifique influe sur les interactions des complexes protéiques et la fonction biologique. Nous développons des modèles à la fois du couplage forme-fonction et des aspects dynamiques des structures observées en intégrant les effets de couplage dépendant de phénomènes physiques à plus petite échelle tels que la diffusion des espèces ioniques, la mécanique membranaire et les effets électrostatiques.

Programme :

	Year 0 - preliminary				Year 1				Year 2				Year 3			
	-12	-9	-6	-3	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
[1]a																
[1]b																
[1]c																
[2]a																
[2]b																
[3]a																
[3]b																
[4]																
[5]																

WORKPACKAGES	[1] High resolution imaging	b. Calibrate the speed acquisition
	a. Improvement of the acquisition speed	[3] Data acquisition
	b. Calibration of the illumination of the sample	a. Tracking experiments (Dynamics of the cells membranes)
	c. Cell line (HeLa, HEK) cells experiments	b. Functional imaging (JC-1, Calcein-Co2+ experiments)
	[2] Primary neuron imaging	[4] Data analysis and identification of correlations
a. Find of setup use condition that preserve cells from stress	[5] Model computing and correlations analysis	

Conclusions

Le fort couplage des réactions biochimiques avec la coordination spatiale fait que la signalisation biologique est soumise à une pléthore de contraintes physiques. Dans une approche systémique, nos efforts pour comprendre leur dynamique méso-échelle et ses conséquences interroge la relation multi-échelle entre structures et fonctions. Par ailleurs, le vieillissement et les maladies neurodégénératives sont de véritables problèmes de santé publique. Le développement de modèles, de connaissances et d'approches peut ouvrir vers de nouvelles techniques de diagnostic et, de façon plus ambitieuse et à plus long terme, constituer une première étape dans la proposition de dispositifs bioinspirés tels des mitochondries biomimétiques afin équilibrer la dérégulation énergétique.

Bibliographie

[1] F. Galet, *Soft Matter* 5 (2009), [2]* [K. Aubertin, PLoS ONE 8 \(2013\)](#), [3] M. Chabanon, *Wiley Interdisciplinary Reviews* 9 (2017), [4] R. Nussinov, *Phys Biol* 10 (2013), [5] M. Ashrafuzzaman, *Nanoscale Biophysics of the Cell*, 2018, [6] E. Sezgin, *Nat Rev Mol Cell Biol* 18 (2017), [7] C.A. Mannella, *BBA - Molecular Cell Research* 1763 (2006), [8] D.M. Owen, *Nat Commun* 3 (2012), [9] P. Sengupta, *Nat. Methods* 8 (2011), [10] M.B. Stone, *ELife* 6 (2017), [11] J. Gao, *Nanoscale* 7 (2015), [12] A.C.N. Brown, *PLOS Biology* 9, [13] R. Salvador-Gallego, *EMBO J.* 35 (2016), [14] L. Große, *EMBO J.* 35 (2016), [15] A.G. Godin, *Biophys J* 107 (2014), [16]* [F. Orieux, Inverse Problems 33 \(2017\)](#), [17]* [Z. Nadova, Biophys. J. 110 \(2016\)](#), [18]* [L. Boussicault, Biochimie 153 \(2018\)](#), [19] C. Carmo, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1049 (2018), [20]* [L. Boussicault, Brain 139 \(2016\)](#), [21] J.E. Chambers, et al., *ACS Nano* 12 (2018).