

L'imagerie tridimensionnelle, une observation « transparente » du système nerveux central

CHLOE CHAUMETON¹, JEREMIE TEILLON², DAVID GODEFROY³

1-Sorbonne Université, CNRS, Inserm, UAR 3631, IBPS, I2PS, Paris France

2-Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, BIC, US4, UAR 3420, Bordeaux, France

3-Univ Rouen Normandie, Inserm, Normandie Univ, NorDiC UMR 1239, Rouen, France

La transparisation ou comment s'affranchir de l'opacité du cerveau.

À la fin du 19^{ème} siècle, Werner Spalteholz, anatomiste allemand, souhaitait observer l'organisation des organes sans avoir à disséquer les spécimens étudiés. Afin de réaliser ces observations et créer des atlas anatomiques de différentes espèces, il mit au point un protocole à base de solvants organiques permettant de rendre transparent ses échantillons, cette approche scientifique marque le début de la transparisation.

Un siècle après cette découverte technique, des chercheurs se sont réintéressés à celle-ci pour « voir » à

travers les échantillons biologiques. Trois familles regroupent la majorité des protocoles de transparisation, avec pour chacune d'elle son protocole phare, iDISCO+ pour les méthodes hydrophobes utilisant les solvants organiques, CUBIC pour les méthodes hydrophiles à base de solutions aqueuses, ou encore CLARITY avec le maillage par hydrogel des échantillons (1). Toutes ces approches sont basées sur le même principe optique, l'homogénéisation de l'indice de réfraction de l'échantillon, homogénéisation permettant de réduire très fortement la dispersion de la lumière et rendant ainsi transparent l'organe observé (Figure 1).

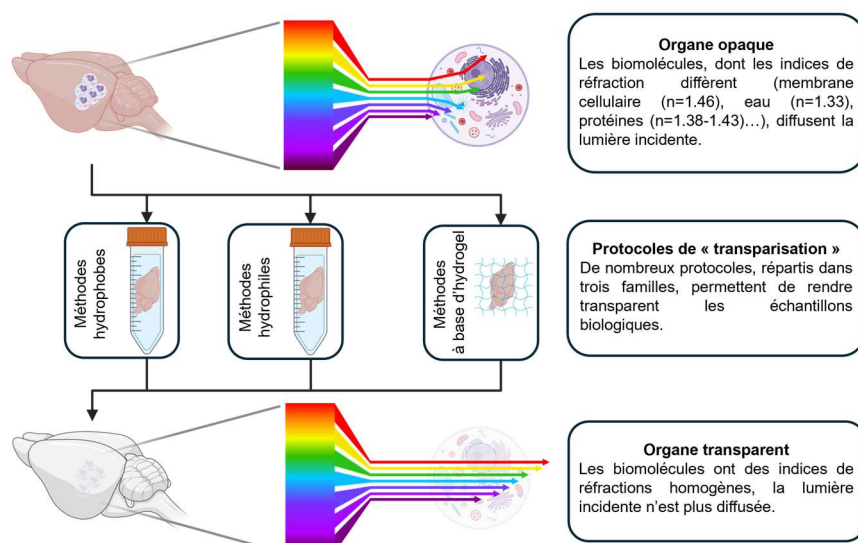


Figure 1 : Illustration du principe de la « transparisation » d'organe biologique. La lumière incidente traverse les échantillons biologiques sans être dispersée lorsque l'indice de réfraction de l'organe est homogénéisé. Créé avec Biorender.com

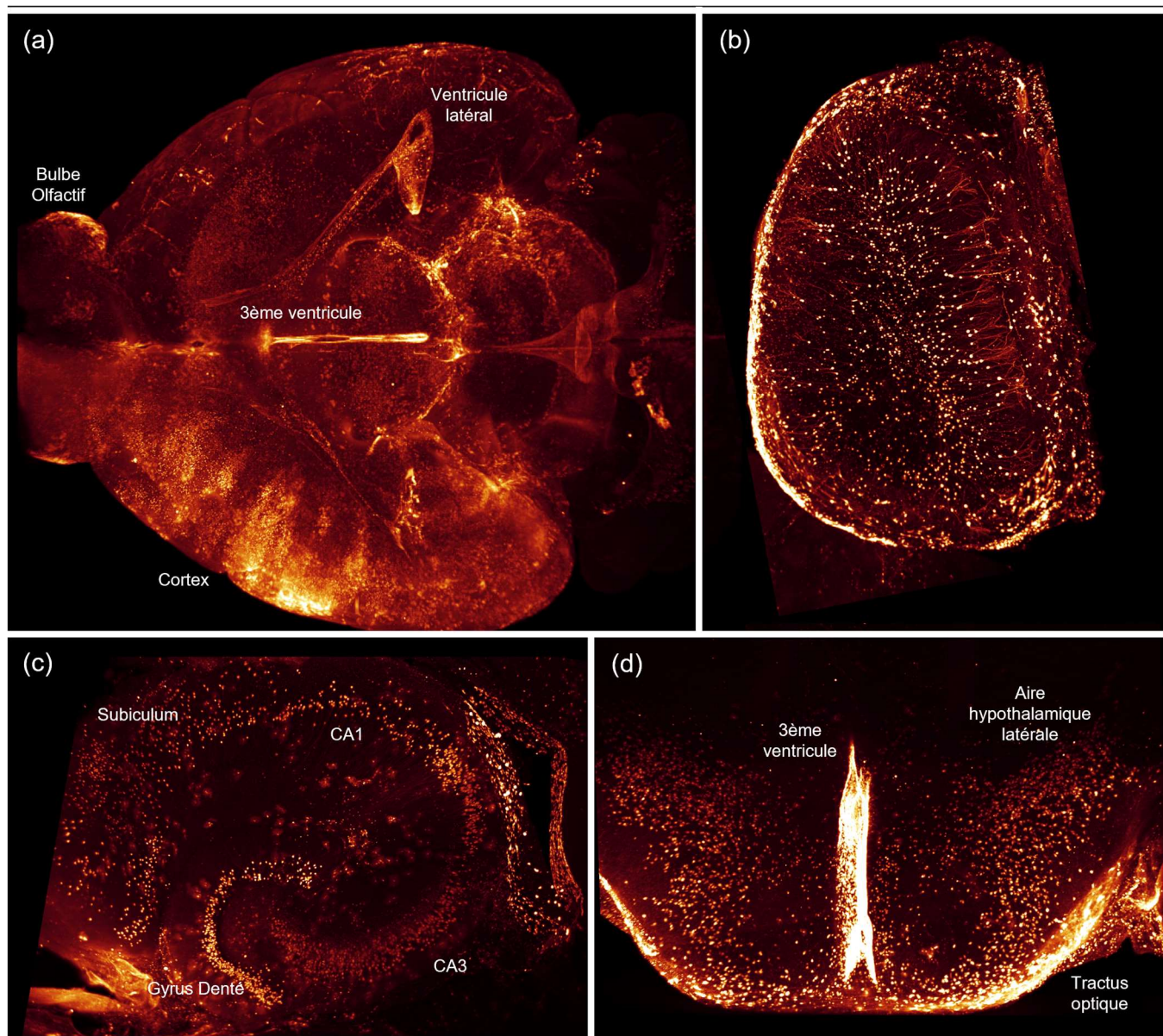


Figure 2 : Cartographie tridimensionnelle des cellules exprimant le peptide 26Rfa dans (a) le système nerveux central de souris, (b) le bulbe olfactif, (c) l'hippocampe, (d) l'hypothalamus. L'atlas de la distribution des cellules exprimant le peptide est réalisé avec la méthode iDISCO+ [Peptide] (Picot et al.) copyright (2025).

La transparisation est une étape indispensable à l'imagerie tridimensionnelle, les récentes innovations en microscopie, décrits ci-dessous, permettent une imagerie 3D de plus en plus performantes. Pour observer les différentes unités biologiques structurales, comme les cellules, les fibres nerveuses ou encore les vaisseaux sanguins, plusieurs stratégies de marquages sont possibles : utilisation de modèles génétiquement modifiés exprimant des protéines fluorescentes, injection de traceurs fluorescents, marquage de protéine cibles par immunomarquages *in toto* ou encore marquage d'ARN avec des sondes fluorescentes.

L'immunomarquage *in toto*, développé par Adrian Aitken en 1987, consiste à marquer un échantillon sans effectuer de coupe préalable. Cette approche a connu des évolutions majeures pour réaliser l'imagerie 3D. Le pré-

traitement des échantillons avec des étapes de déshydratation, délipidation et la modification des conditions classiques d'immunomarquage permettent une pénétration des anticorps dans les organes entiers dont le cerveau (Figure 2) (2). Les protocoles d'immunomarquage *in toto* utilisent classiquement une dispersion passive des anticorps, avec pour conséquence un traitement non homogène des épitopes ciblés dans le tissu. En effet, la perturbation spatiale de l'environnement chimique entourant les épitopes dû à divers facteurs comme la lenteur du transport et la rapidité des réactions chimiques, entraîne des gradients de marquage avec au centre de l'échantillon un marquage moins prononcé qu'aux pourtours. De récents travaux montrent une nouvelle approche visant à éliminer ces perturbations spatiales de l'environnement chimique entourant les cibles, CuRVE (Continuous Redisposition of Volumetric

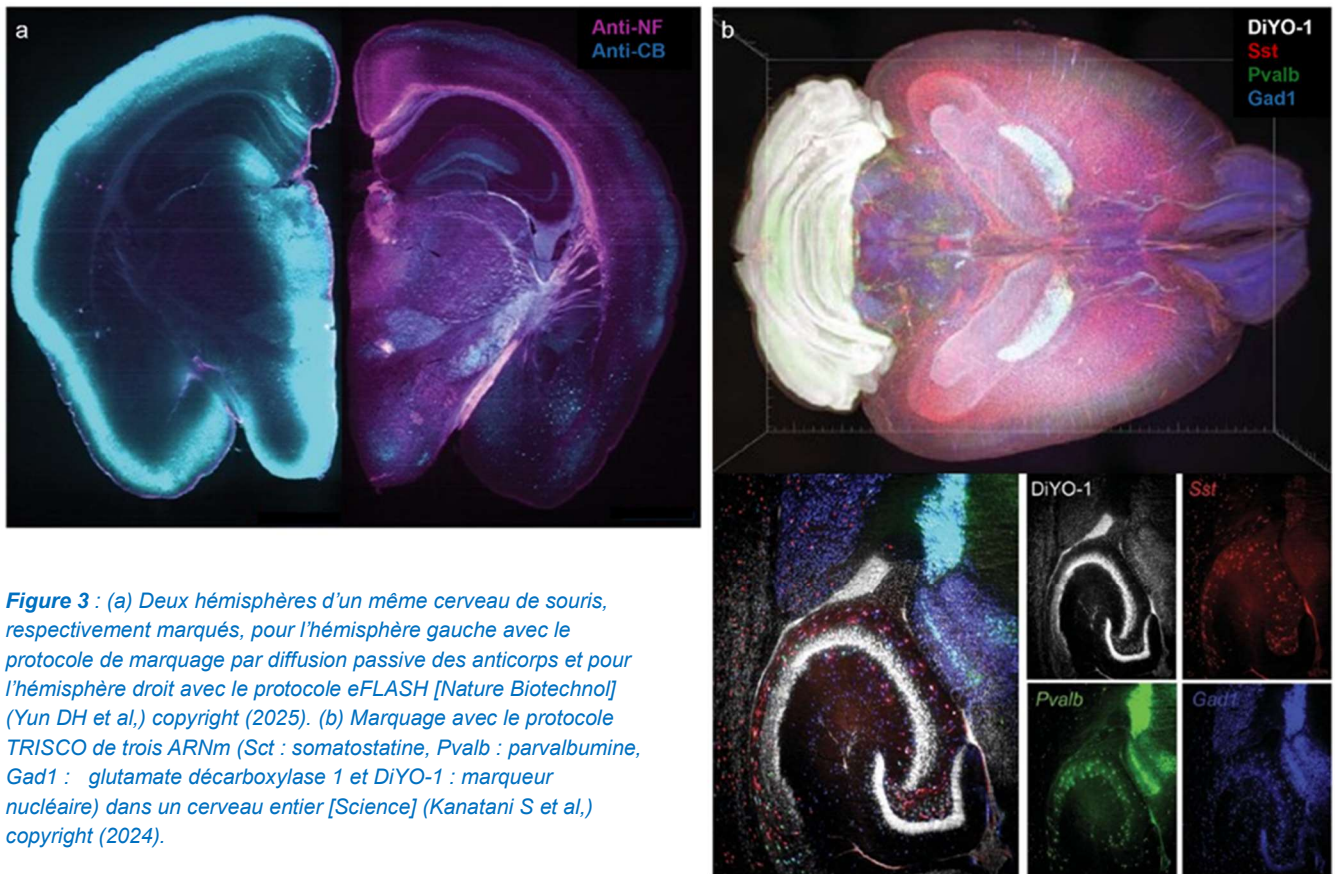


Figure 3 : (a) Deux hémisphères d'un même cerveau de souris, respectivement marqués, pour l'hémisphère gauche avec le protocole de marquage par diffusion passive des anticorps et pour l'hémisphère droit avec le protocole eFLASH [Nature Biotechnol] (Yun DH et al.) copyright (2025). (b) Marquage avec le protocole TRISCO de trois ARNm (Sct : somatostatine, Pvalb : parvalbumine, Gad1 : glutamate décarboxylase 1 et DiYO-1 : marqueur nucléaire) dans un cerveau entier [Science] (Kanatani S et al.) copyright (2024).

Equilibrium), associé à un immunomarquage électrophorétique rapide (eFLASH), le marquage de l'organe est uniforme, sans gradient (Figure 3, a). En opposition aux méthodes de marquage passives, cette méthode dite active est une amélioration majeure pour l'imagerie tridimensionnelle (3).

Pour avoir une compréhension approfondie de l'état cellulaire des tissus, de récents progrès dans la détection de l'ARN ont été développés avec une limite concernant les données spatiales, ceci à cause de la stabilité de cette molécule et son marquage difficile dans un organe entier. Une nouvelle méthode permet de s'affranchir de ces difficultés de marquage, le protocole TRISCO (Tris buffer-mediated retention of in situ hybridization chain reaction signal in cleared organs), contourne ces problèmes d'intégrité et de marquage uniforme de l'ARN et permet d'obtenir des marquages tridimensionnels d'ARN de cellules sur des organes entiers (Figure 3, b) (4), augmentant ainsi la pertinence des données biologiques.

La microscopie pour l'imagerie 3D, de multiples solutions existent.

Pour faire suite aux marquages et à la transparence des échantillons épais et opaques, plusieurs techniques de microscopie à fluorescence peuvent être utilisées pour l'imagerie tridimensionnelle, ceci grâce à des objectifs ayant de grandes distances de travail permettant de

collecter du signal fluorescent à des profondeurs de plusieurs centimètres.

La microscopie plein champ permet d'obtenir rapidement des images de l'échantillon. Cependant, cette technique présente un inconvénient majeur pour la 3D. Le signal fluorescent émis par le plan focal est capté, ainsi que celui provenant des différentes profondeurs de l'échantillon, ces signaux se superposent, entraînant un flou optique de l'image. Pour corriger cet effet, la microscopie confocale utilise un diaphragme, appelé *pinhole*, afin de rejeter la lumière issue des plans non focaux. On obtient ainsi une coupe optique. En déplaçant l'échantillon il devient possible de réaliser des acquisitions volumétriques. En revanche, cette méthode endommage rapidement la fluorescence de l'échantillon et nécessite des temps d'acquisition plus longs.

La microscopie multi-photonique, ou à excitation à deux photons, produit une qualité d'image avec un rapport signal/bruit meilleur que celle du confocal car le diaphragme n'est plus présent ce qui permet de collecter plus de photons. Elle utilise un rayonnement infrarouge moins diffus et plus absorbé par les tissus non transparents que ceux du domaine visible ou UV, ce qui permet une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus.

Enfin, la microscopie à feuillet de lumière (Light Sheet Fluorescence Microscopy, LSFM) ou SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy) permet d'imager des

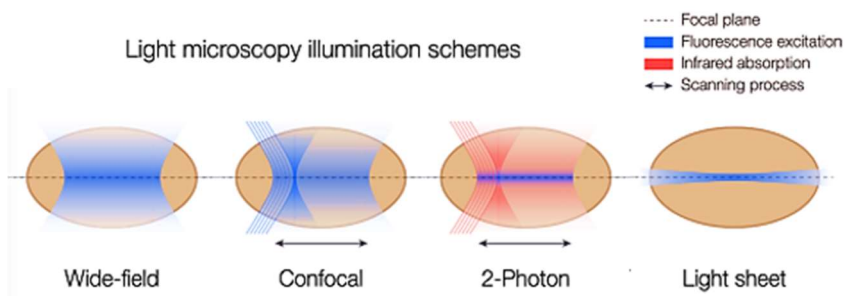


Figure 4 : Illustrations schématiques des techniques d'imagerie par fluorescence : - champ large (wide-field), tout le signal fluorescent de l'échantillon est collecté - microscopie confocale à balayage laser uniquement le signal fluorescent issu du plan focal est collecté - microscopie multi-photonique, le volume d'excitation est réduit - microscopie à feuille de lumière, le sectionnement optique a lieu pendant l'excitation et la lumière émise par l'ensemble du champ de vision est capturée avec une caméra. [BioEssays] (Icha et al.) copyright (2017).

échantillons volumineux comme des cerveaux, des embryons de souris, des poissons ou des organoïdes, de manière très rapide grâce à l'emploi d'une caméra à champ large capable de collecter efficacement le signal fluorescent (Figure 4). Cette technique de microscopie consiste à éclairer l'échantillon avec une nappe lumineuse perpendiculaire à l'axe de détection, limitant ainsi l'exposition à la lumière. Sa résolution spatiale varie de 500 nm à une dizaine de micromètres, selon l'épaisseur de la feuille et l'objectif de détection utilisée. Néanmoins, cette approche souffre d'une illumination asymétrique qui peut générer des ombres et une perte d'uniformité du signal dans la profondeur de l'échantillon. Pour pallier à cette limitation, la microscopie multivue (mSPIM) combine plusieurs faisceaux d'illumination et de détection disposés selon différents angles, permettant la fusion des images et la reconstitution d'un volume 3D isotrope, à résolution améliorée et sans zones d'ombre (5). Certaines entreprises comme Bruker, Miltenyi-Biotec, PhaseView ou Zeiss développent des microscopes à feuillet de lumière en intégrant différentes technologies permettant d'imager des échantillons de 500 µm à plusieurs centimètres. Une autre alternative, la microscopie DSLM (Digital Scanned Light Sheet Microscopy), génère le feuillet lumineux par le balayage rapide d'un faisceau gaussien dans le plan vertical à l'aide de miroirs galvanométriques, ce qui offre une illumination plus homogène et une réduction des ombres sur l'image. Il y a une dizaine d'années, cette technologie a été mise en place sur le projet du microscope à feuillet de lumière mesoSPIM (6), développé par des équipes de recherche suisse. Plus spécifique pour les échantillons de grande taille avec des feuillets lumineux plus épais, des optiques à grand champ et une réduction de la phototoxicité, le mesoSPIM offre une solution à grande échelle où la documentation matérielle et logicielle sont disponibles gratuitement pour la communauté scientifique (<https://github.com/mesoSPIM>).

Depuis la technique fondatrice SPIM (*Selective Plane Illumination Microscopy*), de nombreuses variantes ont été développées afin d'améliorer la résolution, la pénétration optique, la vitesse d'imagerie et la compatibilité avec différents types d'échantillons transparisés ou pas.

Des outils d'analyse pour une cartographie fonctionnelle 3D du cerveau entier.

La transparisation des tissus, combinée à la microscopie à feuille de lumière, a profondément transformé l'imagerie cérébrale en permettant d'observer un cerveau de souris entier.

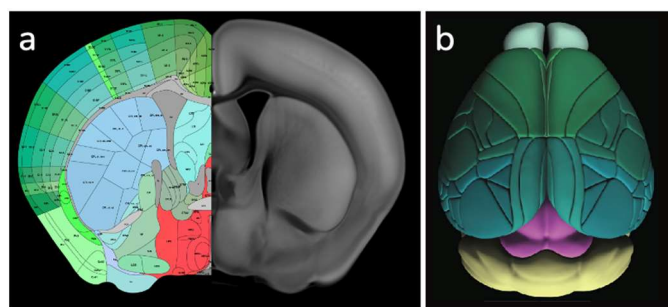
De plus, l'alignement des acquisitions sur un atlas de référence tel que l'Allen Brain Atlas (Figure 5 a–b–c–d), a véritablement transformé ces acquisitions en un outil d'analyse quantitative. Par cette standardisation, il est possible de comparer et quantifier les signaux dans l'ensemble des structures cérébrales (Figure 5 e). Aujourd'hui, différents logiciels répondent à ce besoin. Par exemple Brainreg permet un alignement sur des atlas de souris adulte ou en développement, mais également de travailler avec d'autres espèces (rat, poisson zèbre, etc...)

Ces avancées ont ouvert la voie à de nouvelles applications qui offrent une vision systémique du cerveau, unifiant activité, connectivité, vascularisation et pathologie dans une même approche anatomique et fonctionnelle.

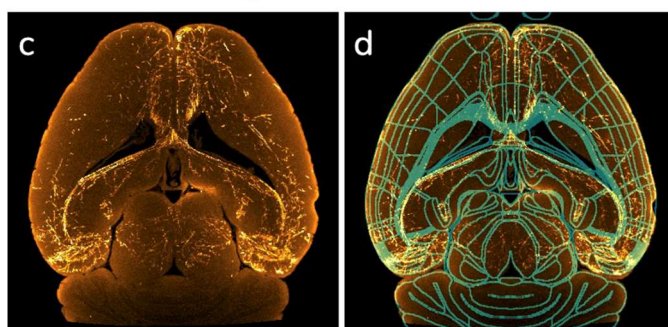
L'une des applications majeures concerne la cartographie de l'activité neuronale par visualisation de la protéine c-Fos, exprimée après activation des neurones (voir l'article de A Chancel et coll dans ce numéro). La transparisation associée à un immunomarquage c-Fos permet de visualiser et de quantifier l'ensemble des neurones activés dans un cerveau de souris entier (7). L'analyse automatisée et l'alignement sur un atlas offrent une représentation complète des réseaux fonctionnels impliqués dans des comportements spécifiques, tels que l'apprentissage, la réponse aux drogues, ou l'addiction. Les logiciels ClearMap (<https://github.com/ClearAnatomics/ClearMap>) ou DelivR (<https://discotechnologies.org/DELiVR/>) assurent l'ensemble de la procédure d'analyse.

Ces approches facilitent également l'étude de la connectivité anatomique cérébrale, grâce au suivi des projections axonales entre régions. On peut révéler la trajectoire continue des fibres et la topologie des circuits neuronaux, depuis leur origine jusqu'aux zones cibles. Alignées sur l'atlas de référence, ces cartes de

Atlas de cerveau de souris Allen CCFv3



Alignement sur atlas



Quantifications

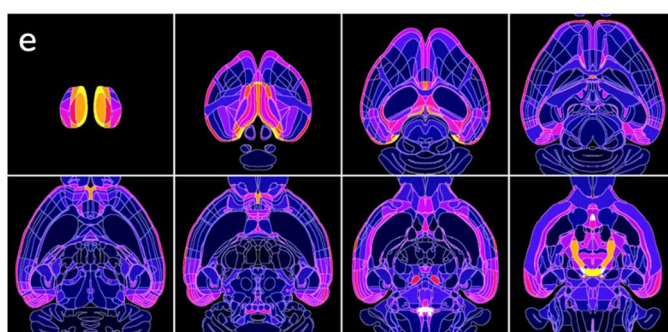


Figure 5 : atlas de cerveau et analyses quantitatives. (a) Exemple de régions du Allen brain atlas sur coupe 2D. (b) Représentation 3D de l'atlas. (c) Image d'un plan en microscopie à feuille de lumière (d) Alignement de l'image sur l'atlas. (e) Représentation des moyennes d'intensité par régions.

connectivité contribuent à la compréhension des réseaux et à la mise en relation de structure et fonction (8).

Le réseau vasculaire cérébral bénéficie aussi de ces avancées : il est possible de reconstruire le système capillaire et artériel dans son intégralité chez la souris. Ces cartes 3D facilitent l'étude du couplage neurovasculaire, des altérations ischémiques ou des remaniements liés au vieillissement et aux maladies neurodégénératives (9). Les solutions open source ClearMap ou Vessap (<https://www.discotechnologies.org/VesSAP/>) permettent ces analyses.

Enfin, la transparence s'impose dans l'exploration pathologique, pour la détection des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, la présence de la protéine Spike du SARS-CoV-2 ou de tumeurs cérébrales. Ces approches permettent une analyse spatiale précise des lésions à l'échelle du cerveau entier et leur corrélation avec les réseaux neuronaux et vasculaires environnants.

Conclusion

Les techniques d'analyse unicellulaire ont révolutionné la compréhension de l'hétérogénéité cellulaire et la diversité fonctionnelle des tissus. Ces techniques telle que la cytométrie, le séquençage d'ARN unicellulaire, l'électrophysiologie, permettent de comprendre des processus biologiques complexes, en intégrant des données quantitatives sur ces systèmes biologiques. Associées à l'imagerie 3D, toutes ces approches vont permettre de comprendre de plus en plus précisément le fonctionnement du système nerveux, ces pathologies, et ouvriront de nouvelles voies thérapeutiques.

Cet article est un résumé non exhaustif des méthodes existantes d'imagerie tridimensionnelle. Dans l'objectif d'aider la communauté scientifique voulant utiliser ces approches d'imagerie, un groupe d'expert du réseau d'imagerie du RTmfm du CNRS a mis à disposition plusieurs outils regroupés sur le site du RTmfm (<https://rtmfm.cnrs.fr/gt/gt-transparisation/>)

chloe.chaumeton@sorbonne-universite.fr

jeremie.teillon@u-bordeaux.fr

david.godefroy@univ-rouen.fr

Références

- (1) Ueda HR, et al. (2020) Nat Rev Neurosci, 61-79.
- (2) Picot M, et al. (2025) Peptides, 190 :171417.
- (3) Yun DH, et al. (2025) Nat Biotechnol, Online ahead of print.
- (4) Kanatani S, et al. (2024) Science : 386, 907-915.
- (5) Adams MW, et al. (2015) Curr Protoc Cytom. ;71:12.37.1-12.37.15.
- (6) Vladimirov N, et al. (2024) Nat Commun 15(1):2679.
- (7) Renier N, et al. (2016) Cell, 1789-1802.
- (8) Friedmann D, (2020) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 117 (20) 11068-11075.
- (9) Kirst C, (2020) Cell, 180: 780-795.