



HAL
open science

Nano-imagerie corrélative de fluorescence X synchrotron et de super résolution des métaux et des protéines dans les synapses de neurones d'hippocampe

Florelle Domart

► **To cite this version:**

Florelle Domart. Nano-imagerie corrélative de fluorescence X synchrotron et de super résolution des métaux et des protéines dans les synapses de neurones d'hippocampe. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0185 . tel-02363022

HAL Id: tel-02363022

<https://theses.hal.science/tel-02363022v1>

Submitted on 14 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Par Florelle DOMART

**Nano-imagerie corrélative de fluorescence X synchrotron
et de super résolution des métaux et des protéines dans
les synapses de neurones d'hippocampe**

Sous la direction de : Dr. Richard ORTEGA
(co-directeur : Dr. Daniel CHOQUET)

Soutenue le 15 octobre 2019

Membres du jury :

M. KUHN, Alexander	Professeur, ENSCPB, Bordeaux	Président
Mme. CARRIERE, Marie	Chercheuse CEA, HDR, Grenoble	Rapporteuse
M. BUISSON, Alain	Professeur, Université de Grenoble Alpes	Rapporteur
Mme. ISAURE, Marie Pierre	Maître de Conférences, HDR, IPREM Pau	Examinatrice
M. THOUMINE, Olivier	DR CNRS, IINS, Bordeaux	Examinateur
M. ORTEGA, Richard	DR CNRS, CENBG, Bordeaux-Gradignan	Directeur de thèse
M. CHOQUET, Daniel	DR CNRS, IINS, Bordeaux	Co-directeur de thèse
M. CLOETENS, Peter	Chercheur ESRF, Grenoble	Invité

Remerciements

En premier lieu je remercie le Dr. Marie Carriere et le Pr. Alain Buisson pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de lire et évaluer mon manuscrit de thèse. Je remercie les autres membres du jury, le Dr Marie Pierre Isaure, le Dr Olivier Thoumine et le Pr. Alexander Kuhn pour avoir accepté de participer au jury de thèse.

Merci à mes deux directeurs de thèse, le Dr. Richard Ortega et le Dr. Daniel Choquet. Merci de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce projet. Merci pour votre patience. Merci pour vos encouragements tout au long de ses trois années qui m'ont donné l'occasion d'apprendre beaucoup de choses sur des domaines aussi variées que les neurosciences, la microscopie synchrotron et photonique et l'imagerie chimique. Cela a été un immense plaisir pour moi.

Merci au Dr. Asuncion Carmona et au Dr. Stéphane Roudeau. Merci pour toute votre aide, vos conseils, vos encouragements.

Merci aussi au Dr. Christelle Breillat et au Dr. Monica Fernandez Monreal pour tous vos conseils pour la culture des neurones, l'électroporation et les cryofixations. Un grand merci aussi à l'ensemble du personnel des laboratoires CENBG et IINS.

Un grand merci au Dr. Peter Cloetens pour les manip' synchrotron sur ID16A. Merci pour tout le temps que vous avez consacré à ce projet jusqu'à heure tardive. Merci encore pour le temps *in house* pendant lequel nous avons fait les plus belles acquisitions d'images.

Merci à Emeline Verdier pour toutes les cultures de neurones. Combien de membranes de Si₃N₄ ont été coatées,ensemencées avec grand calme pour toi, avec grosses grimaces pour moi ? On doit être qualifiées pour n'importe quel jeu d'adresse maintenant !

Merci aux thesards et post-doctorants de l'IINS de l'équipe de Daniel Choquet. Merci à Léa Claverie et à Magalie Martineau. Merci à Caroline Bonnet, Diogo Neto, Valéria Pecoraro et Charlotte Rimbault, May Bakr du premier bureau! Chez vous, on se croyait un peu au jardin Botanique !

Merci à mes fantastiques voisins de bureau : Amine Mehidi, Jose Filipe Nunes Vicente, Maureen Cercy, Ani Augustine Jose mais aussi à Konstantina Liouta et Matthieu Lagardère. Merci pour tous les moments... comment dirais-je ?... drôles, insolites, improbables... Merci aussi à Silvia Sposini et Valéria Pecoraro pour nos discussions franco-italiennes. Grazie molto ! Je suis presque parée pour faire des group meeting en italien maintenant.

Un grand merci aussi particulièrement aux thésards et Post-doctorants du CENBG : Francesco Porcaro, Ana Isabel Henriques, José Hénarès ainsi qu'Esther et votre petite Muriel, Ricardo Pérez Sanchez, Eva Torfeh et Pilar Puyuelo-Valdes. Merci aussi à Juan Estefan et Hervé Palis doctorants de l'école doctorale des sciences chimiques. Merci à vous tous, à tous les moments qu'on a passés ensemble au labo et en dehors du labo, à Bordeaux et en dehors de Bordeaux, à notre belle amitié !

Je voudrais remercier spécialement May Bakr et Francesco Porcaro. May, un grand Shokran, pour ta bonne humeur, toujours. Bonne humeur qui remonta le moral ce jour où, un neurone, unique rescapé, s'était accroché à ma membrane de Si_3N_4 comme à une bouée de secours. Merci a toi Francesco, in italiano. Non ho le parole per dire quanto mi hai aiutato ogni giorno di mia tesi. Lo sai, sono di coccio.

Enfin un immense merci à ma famille. Merci à mes sœurs Emeline et Madeline. Merci Emeline, parce que tes sourires malgré tout m'ont toujours encouragé à continuer, et continueront à m'encourager. Merci à ma mère, parce que tu m'as toujours écouté, conseillé et encouragé.

Sommaire

Abréviations	8
Index des figures et des tableaux	12
Introduction	16
Chapitre 1 : Etat de l'art	20
1-1 Structure des neurones d'hippocampe	22
1-1-1 Le cytosquelette.....	22
1-1-1-1 Les filaments d'actine	22
1-1-1-2 Les microtubules.....	24
1-1-1-3 Les neurofilaments	26
1-1-2 Les synapses	27
1-1-2-1 Les synapses électriques.....	28
1-1-2-2 Les synapses chimiques	28
1-1-3 Les épines dendritiques	30
1-1-3-1 Morphologie des épines dendritiques.....	30
1-1-3-2 La machinerie dendritique.....	31
1-1-3-3 Développement des épines dendritiques : la spinogénèse	32
1-1-3-4 Perturbation des épines dendritiques et neuropathologies	34
1-2 Plasticité synaptique	34
1-2-1 Les récepteurs au glutamate.....	35
1-2-1-1 Les récepteurs métabotropiques	35
1-2-1-2 Les récepteurs ionotropiques.....	35
1-2-2 La plasticité synaptique à long terme	38
1-2-2-1 La potentialisation à long terme (PLT).....	38
1-2-2-2 La dépression à long terme (DLT)	39
1-2-3 Rôle du cytosquelette dans la plasticité synaptique.....	41
1-2-3-1 Remodelage du réseau d'actine lors de la transmission synaptique	41
1-2-3-2 Microtubules et plasticité morphologique	43
1-3 Métaux et neurones	44
1-3-1 Le zinc.....	45
1-3-1-1 Homéostasie du zinc dans les neurones.....	46
1-3-1-1-1 Les protéines de transport du zinc	46
1-3-1-1-2 Les métallothionéines.....	47
1-3-1-2 Rôle du zinc dans les neurones.....	47

1-3-1-2-1 Neuromodulation de NMDAR et AMPAR	48
1-3-1-2-2 Zinc et cytosquelette	48
1-3-1-3 Dyshoméostasie du zinc dans les neuropathologies	51
1-3-1-3-1 Maladies neurodégénératives	51
1-3-1-3-2 Troubles du neuro-développement.....	53
1-3-2 Le cuivre	54
1-3-2-1 Régulation de l'homéostasie du cuivre dans les neurones	54
1-3-2-1-1 Les protéines de transport du cuivre.....	54
1-3-2-1-2 Les protéines chaperones.....	55
1-3-2-2 Rôle du cuivre dans les neurones	55
1-3-2-2-1 Neuromodulation de NMDAR et AMPAR	55
1-3-2-2-2 Cuivre et cytosquelette	55
1-3-2-3 Dyshoméostasie du cuivre dans les neuropathologies	56
1-3-2-3-1 Maladies neurodégénératives	56
1-3-2-3-2 Troubles du neuro-développement.....	57
1-3-3 Autres éléments chimiques	57
1-3-3-1 Le fer	57
1-3-3-2 Le manganèse	58
1-3-3-3 Le sélénium.....	59
Chapitre 2 : Imagerie super résolution des protéines et nano-chimie des métaux.....	60
2-1 La microscopie photonique	62
2-1-1 La microscopie confocale.....	63
2-1-2 Présentation des microscopies de super résolution.....	65
2-1-3 Microscopie de déplétion par émission stimulée (STED)	67
2-1-4 Trajet optique d'un microscope STED.....	68
2-2 La microscopie synchrotron	70
2-2-1 Principe du rayonnement synchrotron	70
2-2-2 Focalisation du rayonnement synchrotron.....	72
2-2-3 Méthodes d'imagerie chimique.....	74
2-2-3-1 La nano-imagerie par spectrométrie de fluorescence-X synchrotron	74
2-2-3-2 La nano-imagerie par contraste de phase.....	76
2-2-4 Description des lignes utilisées	76
2-2-4-1 ID16A (ESRF)	76
2-2-4-2 Nanoscopium (SOLEIL).....	77

2-2-4-3 HERMES (SOLEIL)	78
2-2-4-4 I08 (DIAMOND)	81
Chapitre 3 : Développement de la méthode d'imagerie corrélative	82
3-1 Culture de neurones primaires d'hippocampe de rat	84
3-2 Support de culture	85
3-2-1 Les lamelles de verre	85
3-2-1-1 Propriétés physiques	85
3-2-1-2 Composition chimique	86
3-2-2 Les lamelles de quartz et de silice ESCO Optics	88
3-2-2-1 Propriétés physiques	88
3-2-2-2 Composition chimique	88
3-2-2-3 Imagerie SXRF de cellules cultivées sur lamelles de quartz	89
3-2-3 Les membranes de Si ₃ N ₄	90
3-2-3-1 Propriétés physiques	91
3-2-3-2 Microscopie STED sur membrane de Si ₃ N ₄	91
3-3 Solution de rinçage des éléments extracellulaires	94
3-4 Etat physique des échantillons : la fixation	96
3-4-1 Fixation chimique	97
3-4-2 La cryofixation et la lyophilisation (<i>freeze-drying</i>)	98
3-4-3 Comparaison fixation chimique et cryofixation par analyse PIXE	98
3-4-4 Imagerie photonique sur échantillons lyophilisés	100
3-5 Marquage fluorescent d'autres protéines	103
3-6 Repérage des cellules pour l'imagerie corrélative	105
3-7 Validation de la préservation structurale des neurones après lyophilisation	107
3-7-1 Microscopie STXM sur la ligne HERMES (SOLEIL)	107
3-7-2 Microscopie STXM et SXRF sur la ligne I08 (DIAMOND)	109
3-8 Imagerie SXRF des cellules sur Nanoscopium	111
3-9 Imagerie corrélative super résolutive STED et nano-SXRF sur échantillons lyophilisés	113
3-10 Imagerie nano-SXRF sur échantillons congelés hydratés	115
3-11 Conclusion sur le développement de la méthode	118
Chapitre 4 : Résultats biologiques	120
4-1 Caractérisation chimique des milieux de culture	122
4-2 Effet de la supplémentation et de la chélation du zinc et du cuivre sur le cytosquelette neuronal	123

4-2-1 Cytotoxicité du zinc	124
4-2-2 Effet du TPEM sur le cytosquelette neuronal	126
4-3 Imagerie corrélative microscopie super résolutive et imagerie nano-SXRF du zinc, du cuivre et des protéines du cytosquelette neuronal	128
4-3-1 Distributions des éléments chimiques dans les dendrites et les épines dendritiques des neurones primaires d'hippocampe de rat.....	128
4-3-2 Imagerie corrélative : co-localisation du zinc et de la tubuline	132
4-3-3 Le zinc présente une distribution différente de celle de l'actine	134
4-3-4 Le cuivre est présent sous forme très localisée dans les épines dendritiques	135
Chapitre 5 : Discussion et conclusion	136
5-1 Discussion et perspectives sur le développement de la méthode	138
5-2 Discussion et perspectives sur les résultats biologiques	142
5-3 Conclusion générale	145
Références	146

Abréviations

ABP: Protéine de liaison à l'actine (*actin binding protein*)

ADP: adénosine diphosphate

AIFIRA: Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine

AMPA: acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate

AMPAR: récepteur à AMPA

AP1S1: *Adaptor Related Protein Complex 1 Subunit Sigma 1*

AP5: acide aminophosphonoaléique

APP: *Amyloid- β Precursor Protein*

Atox1 : *Antioxidant 1 Copper chaperone*

ATP: adénosine triphosphate

BSA: Albumine de serum bovin (*Bovin Serum Albumin*)

BM : aimants de courbure (*Bending Magnets*)

CaMKII: Protéine kinase calmoduline dépendante

Ccs1: *Copper chaperone for superoxide dismutase 1*

CENBG: Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan

CKAMP: *Cystine-knot AMPA receptor-modulating protein*

CLEM: *Correlative Light and Electronic Microscopy*

CNIH: *Cornichon homolog*

Cox17: *Cytochrome C Oxidase Chaperone*

CREB: *C-AMP Response Element-binding protein*

Ctr1: *Copper transporter 1*

DCM: Monochromateur à doubles cristaux (*Double-crystal fixed-exit monochromator*)

DIV: Jour *in vitro* (*Day In Vitro*)

DLT: Dépression à long terme

DMT1 : *Divalent Metal Transporter 1*

EB3: *End Binding protein 3*

EBS: *Extremely Brilliant Source*

EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique

EGTA: acide ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacétique

ESRF: Synchrotron européen (*European Synchrotron Radiation Facility*)

FMRP: *Fragile x Mental Retardation Protein*

GABA: acide γ -aminobutyrique

GDP: guanosine diphosphate

GFAP: protéine acide fibrillaire gliale (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GFP: Protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*)

GSG1L: *Germ cell specific gene 1-like*

GTP: guanosine triphosphate

HBSS: *Hank Balanced Salt Solution*

HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HERMES: *High Efficiency and Resolution beamline dedicated to X-ray Microscopy and Electron Spectrometry*

HU: Onduleur hélicoïdal (*Helical Undulator*)

I1: Inhibiteur de PP1

ID : Élément d'insertion (*Insertion Device*)

ID16A: Insertion Device 16 A

IINS: Institut Interdisciplinaire de Neurosciences

IMAC: chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KB: Kirkpatrick-Baez. Miroirs de focalisation des rayons X

LBD: domaine de liaison au ligand (*Ligand-binding domain*)

LOD: Limite de détection (*Limit Of Detection*)

MAP: *Microtubule Associated Protein*

Mdm2: *Murine double minute2*

MEDNIK: *Mental retardation, Enteropathy, Deafness, peripheral Neuropathy, Ichthyosis, Keratoderma*

MEM: *Minimum Essential Media*

MES: acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique

MT: MétalloThionéine

NA: ouverture numérique (*Numerical Aperture*)

NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique

NMDAR: récepteur à NMDA

NTD: Domaine N-terminal extracellulaire (*N-terminal domain*)

PS: Pénicilline/Streptomycine

PALM: Microscopie par localisation photo-activée (*Photo-Activated Localization Microscopy*)

PBS: Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*)

PDZ: *Post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), and *Zonula occludens-1 protein* (zo-1)

PIXE: *Particule Induced X-ray Emission*

PFA: Paraformaldéhyde

PGM: Monochromateur à réseau plan (*Plane Gating Monochromator*)

PKA / PKC: Protéine Kinase A / Protéine Kinase

PLT: Potentialisation à long terme

PP1: Protéine phosphatase

PP2B: Protéine phosphatase calmoduline dépendante

PPSE: Potentiel post-synaptique excitateur

PPSI: Potentiel post-synaptique inhibiteur

PSD: Densité post-synaptique (*Post-Synaptic Density*)

RCPG: Récepteur transmembranaire couplé à une protéine G

RhoGTPases: *Ras homolog family of Guanosine Triphosphate hydrolases*

ROS: espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)

SA: appareil de l'épine (spine apparatus)

SAXS: diffusion des rayons-X aux petits angles (*Small Angle X-ray Scattering*)

SER: réticulum endoplasmique lisse (*Smooth Endoplasmic Reticulum*)

SHANK3: *SH3 and multiple ANKyrin repeat domains 3*

SLC30A : protéine de transport du zinc (*Solute-Link Carrier 30 A*). Voir aussi ZnT

SLC39A : protéine de transport du zinc (*Solute-Link Carrier 39 A*). Voir aussi ZIP

SOD2 : Superoxyde dismutase 2

STED : Microscopie de déplétion par émission stimulée (*STimulated Emission Depletion*)

STORM : Microscopie de reconstruction optique stochastique (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*)

STXM : Microscopie de rayonnement X en transmission par balayage (*Scanning Transmission X-ray Microscopy*)

SXRF : Spectrométrie de fluorescence X (*Synchrotron X-Ray Fluorescence*)

TARP: *Transmembrane AMPAR regulator protein*

TIRF : Microscopie de fluorescence par réflexion interne (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*)

TMD: Domaine transmembranaire (*TransMembranaire Domain*)

TPEN: N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine

TPPP: *Tubulin Polymerization Promoting Protein*

VGLUT: Vésicule de transport du glutamate (*Vesicular Glutamate Transporter*)

VLS-VGD : *Variable Line Spacing- Variable Groove Depth*

XPEEM: spectrométrie d'émission des photoélectrons (*X-ray PhotoEmitted Electron Microscopy*)

ZIP : transporteur du zinc (*Zinc Irt-like Protein*). Voir aussi SLC39A

ZnT : transporteur du zinc (*Zn Transporter*). Voir aussi SLC30A

Index des figures et des tableaux

Figure 1 : Dessin de Santiago Ramón y Cajal	19
Figure 2 : Structure de l'actine-G et de l'actine-F	24
Figure 3 : Structure des microtubules polymères de tubuline	26
Figure 4 : Filaments intermédiaires	27
Figure 5 : Synapse chimique	29
Figure 6 : Morphologie des épines dendritiques	30
Figure 7 : Organisation des épines dendritiques	32
Figure 8 : Les trois modèles de spinogénèse	33
Figure 9 : Structure d'un récepteur ionotropique au glutamate de type AMPAR	36
Figure 10 : Structure des récepteurs NMDAR et kaïnate	37
Figure 11 : Réseau d'actine et sa régulation	43
Figure 12 : Coupe sagittale d'un cerveau de rat révélant la distribution du zinc dans les régions du cerveau par méthode de coloration histochimique Timm-Danscher	46
Figure 13 : Site de fixation potentiel du zinc sur la tubuline indentifié par Löwe <i>et al.</i>	49
Figure 14 : Simulation numérique mettant en évidence les sites putatifs de fixation du zinc sur la tubuline	50
Figure 15 : Hypothèse de Craddock et al. Selon laquelle la séquestration du zinc par l'amyloïde- β serait responsable de la perturbation du cytosquelette neuronale chez les patients souffrant d'Alzheimer	53
Figure 16 : Simulation d'une synapse excitatrice avec ses vésicules synaptiques dans la pré-synapse et qui serait imagée à différentes résolutions spatiales	63
Figure 17 : Principe de la fluorescence	64
Figure 18 : Principe des microscopies super résolutive PALM et STORM	66
Figure 19 : Microscopie super résolutive PALM d'épines dendritiques de neurone primaire d'hippocampe de rat exprimant ABP-tdEosFP (marquage actine)	67
Figure 20 : Principe de la microscopie STED	68
Figure 21 : Schéma du trajet optique du microscope STED	69
Figure 22 : Schéma montrant les principales structures d'une installation de production de rayonnement synchrotron	71
Figure 23 : Schéma de deux miroirs Kirkpatrick-Baez	73
Figure 24 : Lentille de Fresnel vue par microscopie électronique.....	73
Figure 25 : Principe de spectrométrie de fluorescence-X.....	74
Figure 26 : Spectre somme montrant la composition en éléments chimiques d'une cellule cancéreuse (lignée IGROV1)	75
Figure 27 : Schéma de la ligne ID16A	77

Figure 28 : Trajet optique de la ligne Nanoscopium.....	78
Figure 29 : Trajet optique de la ligne HERMES	80
Figure 30 : Flux calculé pour l'onduleur HU64 et l'onduleur HU42	80
Figure 31 : Trajet optique de la ligne I08 du synchrotron Diamond	81
Figure 32 : Chambre d'observation de type 'Ludin'	86
Figure 33 : Spectre PIXE d'une lamelle de verre	87
Figure 34 : Spectre PIXE montrant la composition des lamelles de quartz (ESCO, R512000, A1-Fused Quartz) et des lamelles de silice (ESCO, R412000, S1-UV)	89
Figure 35 : Image SXRF de cellules HeLa	90
Figure 36 : Support de Si ₃ N ₄ et microscopie STED	92
Figure 37 : Dendrites de neurones primaires de rat marquées avec le fluorophore SiR-tubulin et observées en microscopie STED.....	93
Figure 38 : Microscopie confocale et microscopie STED	93
Figure 39 : Comparaison des spectres PIXE des éléments chimiques obtenus pour des neurones primaires d'hippocampe de rat après fixation chimique en PFA 2% dans du milieu BrainPhys	99
Figure 40 : Fluorophores basés sur la 'silicone rhodamine' SiR	100
Figure 41 : Fluorophores SiR-tubulin et SiR-actin.....	101
Figure 42 : Comparaison de l'effet des méthodes de fixation sur la qualité des observations en microscopie photonique.....	102
Figure 43 : Neurone primaire d'hippocampe de rat exprimant la protéine de synthèse Xph20 dirigée contre la PSD95 et marqué avec la SiR-actin	104
Figure 44 : Repérage sur la membrane de Si ₃ N ₄	105
Figure 45 : Corrélations de l'imagerie STED sur cellules vivantes et de la microscopie STXM après cryofixation et lyophilisation	108
Figure 46 : Corrélations de l'imagerie STED de l'actine sur cellules vivantes et de la microscopie STXM après cryofixation et lyophilisation.	109
Figure 47 : Astrocyte marqué avec le fluorophore SiR-tubulin.....	110
Figure 48 : Dendrite de neurone primaire d'hippocampe de rat imagée par microscopie STED et spectrométrie nano-SXRF.....	111
Figure 49 : Imagerie corrélative confocale et SXRF	112
Figure 50 : Neurone primaire d'hippocampe de rat analysé par spectrométrie nano-SXRF et microscopie photonique STED avec une résolution de 40 nm.....	114
Figure 51 : Transfert des échantillons congelés hydratés sur la ligne ID16A	117
Figure 52 : Combinaison entre microscopie photonique STED sur neurones vivants et spectrométrie cryo-nano-SXRF après cryofixation	118

Figure 53 : Expression de l'actine-F et de la β-tubuline dans des neurones d'hippocampe de rat après exposition 24h dans un milieu supplémenté en zinc (10 μM)	123
Figure 54 : Pourcentages de viabilité des neurones après traitement avec 0 μM, 1 μM, 5 μM ou 10 μM de TPEN	125
Figure 55 : Quantification de fluorescence de l'actine-F et de la β-tubuline dans des neurones primaires d'hippocampe de rat à DIV15 après traitement avec 5 μM de TPEN.....	127
Figure 56 : Neurone primaire d'hippocampe de rat analysé par spectrométrie nano-SXRF et microscopie photonique STED avec une résolution de 40 nm.....	129
Figure 57 : Distributions des éléments P, S et Zn dans des épines dendritiques	130
Figure 58 : Image corrélative dans des dendrites et des épines de neurone primaire d'hippocampe de rat.....	130
Figure 59 : Image corrélative dans des épines dendritiques de neurone primaire d'hippocampe de rat.....	131
Figure 60 : Image corrélative microscopie STED et spectrométrie nano-SXRF de dendrites de neurones primaires d'hippocampe de rat	133
Figure 61 : Corrélatrice entre la microscopie STED, la spectrométrie nano-SXRF et le contraste de phase.....	134
Figure 62 : Corrélatrice entre la microscopie STED, la spectrométrie nano-SXRF.....	135
Tableau 1 : Concentration de cinq éléments chimiques essentiels pour le système nerveux central en fonction de la région cérébrale	45
Tableau 2 : Mesure de l'osmolarité des solutions de rinçage des éléments extracellulaires.....	95
Tableau 3 : Limites de détection (LOD) obtenues avec la spectrométrie nano-SXRF	115
Tableau4 : Concentrations des éléments chimiques Zn, Fe et Cu dans les milieux de culture Neurobasal et BrainPhys	122
Tableau 5 : Concentrations des éléments chimiques Zn, Fe et Cu dans le milieu de culture Neurobasal BrainPhys après supplémentation avec 10 μM de $ZnCl_2$.....	124

Introduction

Depuis la découverte de la cellule par Robert Hooke en 1665 au moyen d'un microscope optique rudimentaire, les méthodes de microscopie n'ont cessé de s'améliorer, en quête de meilleures résolutions dans le but de comprendre le fonctionnement des organismes au cœur de l'infiniment petit. En 1873 le médecin italien Camillo Golgi développe une méthode de marquage basée sur l'imprégnation des tissus nerveux avec du nitrate d'argent permettant de mettre en évidence les structures nerveuses. Cette méthode, appelée alors « réaction noire » est connue aujourd'hui sous le nom de coloration de Golgi (Kang, 2017). Quelques années plus tard, en 1888, le neuroscientifique Santiago Ramon y Cajal utilise cette réaction pour marquer les systèmes nerveux et remarque alors des protrusions à la surface des cellules de Purkinje qu'il nomme « épines » du fait de leur curieuse ressemblance avec des épines de rose (Fig. 1). Ces épines sont également observées par Golgi mais celui-ci considère alors qu'il s'agit d'artefacts liés au marquage. A cette époque, Golgi suggère également que la connexion entre axone et dendrites se présente sous forme d'anastosomes donnant naissance à la Théorie Réticulaire. Cependant, Cajal ne retrouve pas ces anastosomes et conclut que les systèmes nerveux sont composés de cellules indépendantes (Yuste, 2015). Le terme « neurone » pour qualifier ces cellules sera attribué par Wilhem Weldeyer en 1891 (Bock, 2013). La doctrine du Neurone est née. En dépit de leur conclusion opposée, en 1906, Cajal et Golgi recevront tous les deux le prix Nobel de Physiologie et Médecine. Par leurs travaux, ces pionniers de la neuroscience ont permis beaucoup des avancées dans ce domaine qui ont eu lieu durant le siècle passé.

Grâce à la coloration de Golgi, toujours utilisée de nos jours, la totalité du neurone peut être marquée apportant ainsi de précieuses informations quant à leur morphologie et leur organisation au sein d'un tissu ou du cerveau. Cependant, comprendre le fonctionnement d'un neurone à l'échelle sub-cellulaire a nécessité de développer des outils de marquage permettant de cibler des protéines d'intérêt. Une stratégie a été d'utiliser les propriétés physico-chimiques des fluorophores, des molécules qui émettent de la lumière lorsqu'elles sont excitées à une certaine longueur d'onde. Lorsqu'ils sont couplés à un ligand d'une protéine cible ou bien à la protéine cible elle-même, ces fluorophores permettent de mettre en évidence spécifiquement la localisation de cette protéine.

A la même période que Cajal et Golgi, le chimiste français Gabriel Bertrand met en évidence l'importance de certains métaux comme le zinc et le manganèse pour les organismes ainsi que leur rôle essentiel dans le fonctionnement de certaines enzymes. Il développe alors les premières méthodes d'analyse des éléments traces qu'il définit alors sous le terme « oligo-éléments » (Courrier, 1964). Aujourd'hui nous savons que les métaux sont essentiels pour le bon fonctionnement neuronal, cependant leur rôle et leur distribution sont encore mal connus. Si les techniques d'imagerie des neurones et d'imagerie chimique ont beaucoup évolué, l'étude du rôle des métaux dans les neurones demeure un véritable challenge. Leur faible concentration nécessite une très haute sensibilité de la technique analytique. Bien que des bio senseurs se liant aux métaux aient été développés (Chang, 2004 ; Jung, 2016) ils ne se lient qu'à la fraction libre des métaux, et présentent une différence d'affinité selon l'état redox ainsi qu'une affinité non nulle pour d'autres métaux limitant ainsi grandement leur sensibilité.

L'imagerie de fluorescence X, basée sur l'irradiation de l'échantillon par un faisceau de rayons-X, permet d'identifier, quantifier et imager les éléments traces dans des échantillons biologiques à très haute sensibilité mais aussi très haute résolution spatiale sans nécessité de marquage (Ortega, 2009). Ainsi, une résolution spatiale record de 13 nm a été obtenue sur la ligne ID16A de l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) à Grenoble (Da Silva, 2017). Combinée à la microscopie de rayonnement-X en transmission par balayage ou bien l'imagerie de contraste de phase, elle donne accès à l'information chimique de l'échantillon ainsi qu'à sa structure. Cependant, en dépit de sa résolution nanométrique et de sa très haute sensibilité, cette technique ne permet pas de comprendre à quels organites ou protéines ces éléments chimiques sont associés.

Le couplage de l'imagerie nano-SXRF à la microscopie à épifluorescence ou à la microscopie confocale de marqueurs fluorescents a été développé il y a quelques années et permet d'associer la distribution de ces métaux à des protéines d'intérêt ou des organites cellulaires (Roudeau, 2014 ; Grubman, 2014 ; Bourassa, 2014). Cependant la différence de résolution spatiale, de l'ordre du micron en épifluorescence, 200 nm en microscopie confocale, et de l'ordre de 20 nm en fluorescence X, ne permet pas de corréliser ces informations à l'échelle protéique. Or, ces dernières années ont vu le développement de nouvelles techniques d'imagerie photonique super résolutive atteignant des résolutions

spatiales inférieure à 40 nm. La microscopie photonique super-résolutive permet ainsi de visualiser la distribution de protéines cibles à très haute résolution spatiale.

Ainsi, l'objectif de ce travail a été de proposer une méthode innovante combinant à la fois l'imagerie photonique super-résolutive par émission stimulée (STED) des protéines et l'imagerie nano-SXRF des métaux dans des neurones primaires d'hippocampe de rat afin d'étudier le rôle de ces métaux dans les fonctions neuronales.

Dans le premier chapitre nous nous intéresserons à une des caractéristiques propres aux neurones : la transmission de signaux électriques. Cette transmission a lieu au niveau des synapses, le lieu de connexion entre deux neurones formé principalement par des épines dendritiques. Nous verrons comment la formation de ces synapses est un processus dynamique dépendant de l'activité neuronale et définissant la plasticité synaptique. Nous verrons ensuite comment cette plasticité se décompose en deux parties : une plasticité fonctionnelle mettant en jeu différents canaux-ioniques tels que les récepteurs ionotropiques au glutamate AMPARs et NMDARs, et une plasticité structurale définie par la dynamique du cytosquelette neuronal principalement par le réseau d'actine dans les épines dendritiques et par les microtubules le long des dendrites. La troisième partie de ce chapitre portera sur la modulation de cette plasticité par des éléments chimiques tels que le zinc et le cuivre régulant d'une part les récepteurs AMPAR et NMDAR et d'autre part le cytosquelette neuronal. Nous verrons enfin comment la dyshoméostasie de ces éléments est associée à des neuropathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les syndromes de Wilson et de Menkes ou encore le syndrome de Phelan McDermid.

Dans le chapitre 2 nous nous intéresserons aux méthodes d'imagerie super résolutive des protéines et des éléments chimiques existantes puis nous verrons dans le chapitre suivant comment combiner la microscopie super résolutive STED des protéines et l'imagerie nano-SXRF des métaux. Nous verrons ensuite les étapes de validation de cette méthode qui ont été effectuées en utilisant les lignes synchrotron Hermes (SOLEIL, Paris), I08 (Diamond, Oxford) et Nanoscopium (SOLEIL, Paris) avant d'utiliser celle-ci en super résolution sur la ligne ID16A (ESRF, Grenoble). Nous verrons alors comment cette méthode appliquée à des neurones primaires d'hippocampe de rat, nous permet d'imager dans une même dendrite, une même synapse, à la fois la distribution de protéines cibles et celle des éléments chimiques à haute résolution spatiale (40 nm) et très haute sensibilité (<130 atomes de zinc). Nous avons alors

utilisé celle-ci afin d'étudier l'implication des métaux zinc et cuivre d'une part au niveau du cytosquelette neuronal et d'autre part dans la plasticité synaptique ce qui nous a permis de mettre en lumière la co-localisation du zinc et de la tubuline le long des dendrites. Enfin nous discuterons des limitations et perspectives pour l'imagerie corrélative STED et nano-SXRF ainsi que des résultats biologiques que nous avons obtenus.

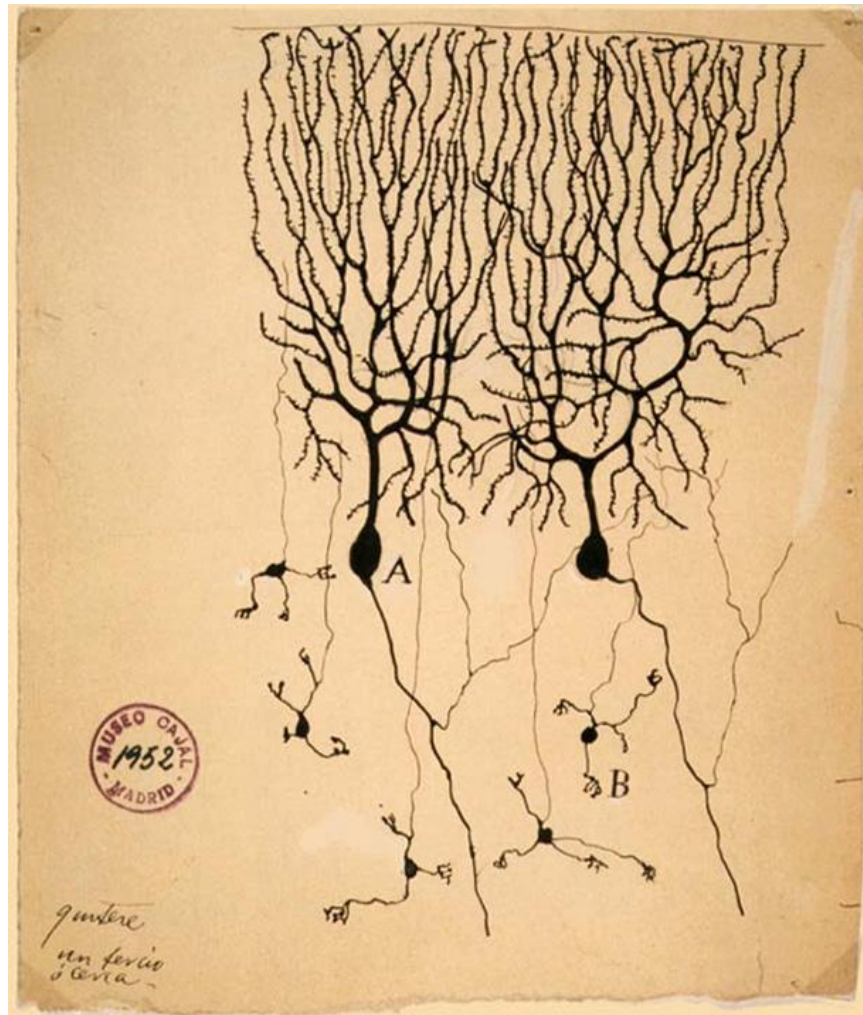


Figure 1 : Dessin de Santiago Ramón y Cajal (1899), conservé à l'Institut Santiago Ramón y Cajal, Madrid, Espagne et montrant des neurones présentant des dendrites avec de petites protrusions semblables à des épines de roses. Santiago Ramón y Cajal / Public Domain.

Chapitre 1

Etat de l'art

1-1 Structure des neurones d'hippocampe

A la fin du 19^{ème} siècle, Les travaux de Santiago Ramon y Cajal, utilisant la méthode de coloration de Golgi, ont permis de mettre en évidence que les systèmes nerveux étaient majoritairement composés de deux grands types cellulaires : les cellules gliales et les neurones. Les cellules gliales, ou cellules de la névroglie, sont jusqu'à trois fois plus abondantes que les neurones. Elles assurent le soutien et se distinguent en trois classes : les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann. Les neurones ont la particularité d'être spécialisés dans la communication cellulaire et la transmission de signaux électriques. Cette caractéristique est notamment rendue possible grâce à leurs ramifications étendues appelés dendrites comportant les épines dendritiques ainsi qu'à la dynamique de leur cytosquelette. On estime que le cerveau humain contient 100 milliards de neurones.

Dans cette étude nous nous focaliserons sur les neurones de l'hippocampe, une structure de l'encéphale impliquée dans les processus de mémorisation et atteinte dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Une des caractéristiques propres aux neurones est la transmission de signaux électriques. Cette transmission a lieu au niveau des synapses, lieu de connexion entre les neurones. Les synapses se forment au niveau des épines dendritiques, dans le cas des synapses excitatrices ou bien des dendrites, dans le cas des synapses inhibitrices. La formation de ces synapses implique la dynamique du cytosquelette neuronal.

1-1-1 Le cytosquelette

Véritable ossature, le cytosquelette va venir rigidifier les cellules tout en intervenant dans différentes autres fonctions cellulaires comme la mobilité, le transport et les phénomènes d'endocytose et d'exocytose. Il comprend trois grands éléments, les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

1-1-1-1 Les filaments d'actine

Un filament d'actine connu également sous le nom de microfilament ou encore actine-F, correspond à une double-hélice de 8 nm de diamètre formée par la polymérisation de monomère d'actine globulaire (actine-G). Chaque filament comprend 13 monomères par 6 tours d'hélice correspondant à une longueur de 36 nm et où chacun des monomères interagit avec les autres en présentant tous la même orientation (Fig. 2c) (Holmes, 1990). L'actine-G

est une des protéines les plus abondantes dans les cellules. Chez l'homme on distingue six isoformes d'actine codées par six gènes et répertoriées en trois familles ayant des structures primaires très similaires mais des fonctions bien distinctes (Perrin, 2010). L'actine α est présente dans les cellules osseuses, cardiaques et les muscles lisses, l'actine β dans les muscles lisses et les cellules non-musculaires et l'actine γ dans les cellules non-musculaires. Les neurones expriment majoritairement l'actine β et l'actine γ . Chaque monomère d'actine peut être schématisé comme un parallélépipède rectangle de 42 KDa mesurant 55 Å x 55 Å x 33 Å. Il présente deux lobes, un large et un plus petit, divisés en quatre sous domaines I, II, III et IV (Fig. 2a). Le domaine I comprend les extrémités N-terminal et C-terminal. Au centre des deux lobes se trouve le site de liaison spécifique aux nucléotides adénosine diphosphate (ADP) et adénosine triphosphate (ATP) ainsi que celui du Mg^{2+} (Fig. 2b) (Bremer, 1992).

Les filaments d'actine sont des structures très dynamiques et polarisées et vont pouvoir se polymériser et dépolymériser. Cette polymérisation se fera préférentiellement du côté de l'extrémité positive dite aussi extrémité barbue. Elle sera plus rapide du côté positif et plus lente du côté négatif, encore appelée extrémité pointue. Chaque monomère d'actine-G complexe un ion Mg^{2+} et une molécule d'ADP ou ATP. L'actine-ATP ayant une meilleure capacité à polymériser. *In vitro*, la polymérisation comporte trois étapes : la nucléation où deux ou trois monomères d'actine vont s'assembler pour former un nucléus, l'élongation puis enfin, un état stable où la vitesse de polymérisation sera alors égale à la vitesse de dépolymérisation (Lodish, 2003).

In vivo, cette polymérisation est régulée par une famille de protéines, les protéines ABP, de l'anglais 'Actin Binding Protein' qui favorisent soit la polymérisation, soit la dépolymérisation de l'actine (Penzes, 2012). Les épines dendritiques sont des protrusions particulièrement riches en actine. Parmi ces protéines ABP, le complexe Arp2/3 localisé dans des régions spécifiques de l'épine (Rácz, 2008 ; Chazeau, 2014), va intervenir dans le processus de ramification des filaments d'actine et dans la formation des épines dendritiques (Wegner, 2008). Les filaments d'actine sont très dynamiques et jouent un rôle essentiel dans la formation et la morphologie des épines dendritiques ainsi qu'au niveau des fonctions synaptiques. Star et al ont montré que dans des neurones hippocampiques de rat matures, 85% de l'actine était dynamique et présentait un *turnover* de 40 secondes (Star, 2002). Les protéines ABP vont permettre la réorganisation du réseau d'actine et donc la modulation de

l'activité synaptique. La profiline favorise ainsi la polymérisation en catalysant le changement ADP en ATP de l'actine-G. *A contrario* la cofiline, localisée dans la densité post-synaptique, favorisera la dépolymérisation en séquestrant l'actine-G ou encore en se fixant sur les filaments d'actine, modifiant leur structure (Lin, 2009). Au niveau de l'axone et des dendrites on trouve également des structures d'actine périodique composées de filaments d'actine courts et stables et interagissant avec l' α/β -spectrine (Konietzny, 2017). Ces structures stables joueraient un rôle notamment dans le maintien des microtubules (Qu, 2017).

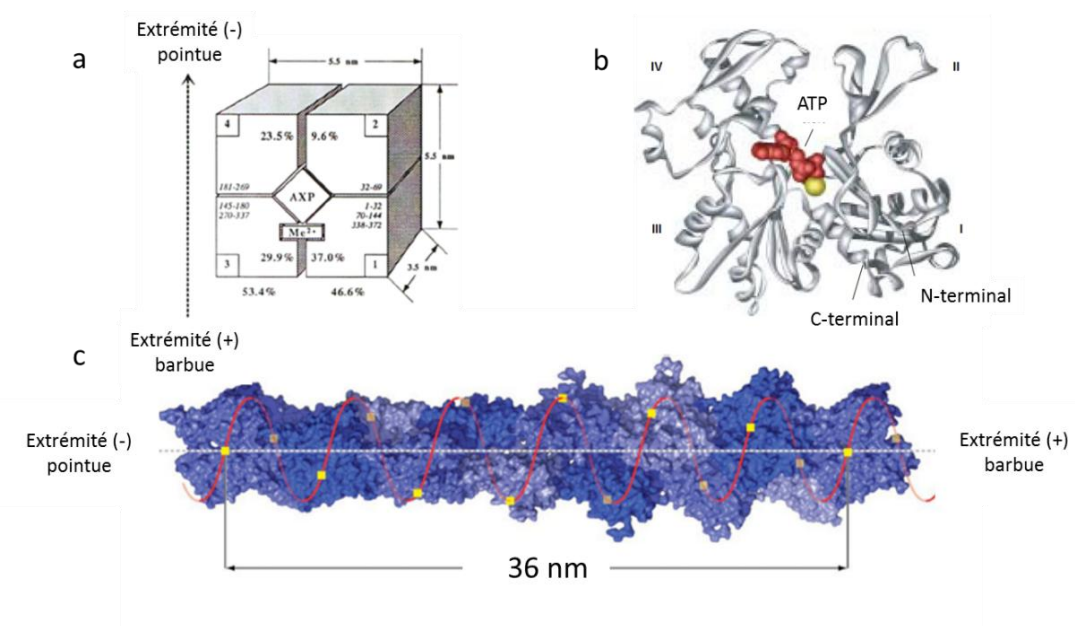


Figure 2: Structure de l'actine-G et de l'actine-F. a) Structure schématisée de l'actine-G comme un parallélépipède rectangle présentant quatre domaines I, II, III et IV et au centre le site de liaison aux nucléotides ATP ou ADP. D'après Bremer, 1992. b) Modèle d'un monomère d'actine β . Adapté de Lodish, 2003. c) Structure en hélice d'actine-F avec 13 monomères par 6 tours d'hélice ou par 36 nm de filament. D'après Dominguez et Holmes, 2011.

1-1-1-2 Les microtubules

Comme les filaments d'actine, les microtubules interviennent dans l'armature du neurone mais ils jouent également un rôle crucial dans la transmission du signal électrique le long de l'axone et des dendrites. Ces microtubules sont des polymères de tubuline, une protéine globulaire et hétérodimérique comprenant une sous-unité α et une sous-unité β , deux polypeptides de 55 KDa. Tout comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures cylindriques polarisées. Lors de la polymérisation, les dimères s'orientent sous-

unité α vers l'extrémité (-) et sous-unité β vers l'extrémité (+) pour former un protofilament. Un microtubule est formé par l'assemblage de 13 protofilaments, sous-unités α contre sous-unités α et sous-unités β contre sous-unités β (Fig. 3). Il présente une structure tubulaire de 24 nm de diamètre (Pampaloni, 2008).

Chaque dimère de tubuline a deux sites de liaison au guanosine triphosphate (GTP). Un site sur la sous-unité β dit site échangeable, et un site sur la sous-unité α non échangeable. Le GTP lié au site échangeable peut être hydrolysé après ou pendant la polymérisation. L'extrémité (+) du microtubule présente une coiffe où les GTP ne sont pas hydrolysés. Cette coiffe assure une stabilité au microtubule et la perte de celle-ci provoque la dépolymérisation du microtubule (Hyman, 1992).

Plusieurs protéines vont être associées aux microtubules. Elles sont rangées dans une famille appelée MAP de l'anglais '*Microtubule-Associated-Protein*'. On distingue principalement MAP1A, MAP1B, MAP2A, MAP2B, MAP2C, Tau, big tau et MAP4. Certaines auront une distribution ubiquitaire comme MAP 4. D'autres comme MAP2A et MAP2B ont une localisation majoritairement dendritique tandis que Tau se retrouve principalement au niveau de l'axone (Hirokawa, 1994).

Les microtubules jouent un rôle très important dans le transport intracellulaire le long de l'axone et des dendrites. Dans l'axone ils présentent une seule orientation, extrémité (-) côté soma et extrémité (+) côté terminal de l'axone. Dans les dendrites les microtubules adoptent les deux orientations. Associées aux microtubules, des protéines vont assurer le transport. Ainsi les kinésines vont assurer le transport des molécules vers la terminaison de l'axone, transport dit antérograde. Les dynéines vont intervenir dans le transport vers le soma, transport rétrograde.

Outre leur rôle dans le transport, les microtubules ont d'autres fonctions. Ils participent au développement du système nerveux, dans les processus de neurogenèse, de migration neuronale et de différenciation (Breuss, 2017).

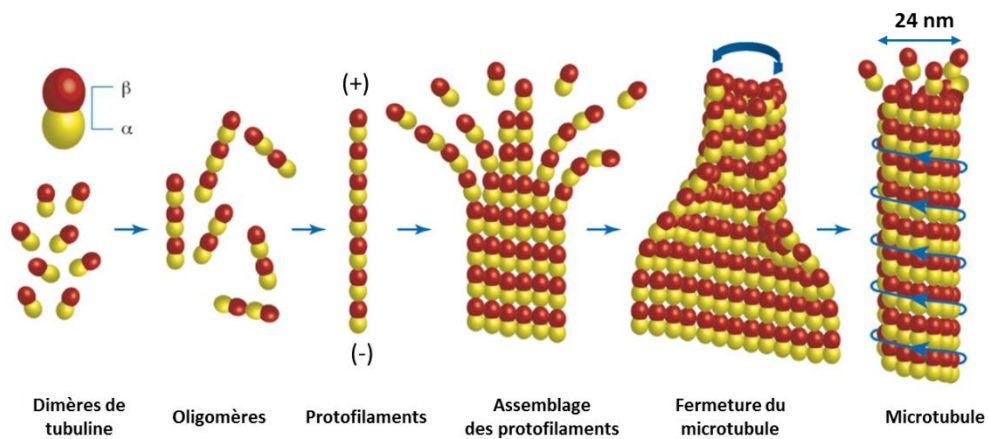


Figure 3: Structure des microtubules polymères de tubuline. Les dimères de tubulines présentent une sous-unité α et une sous-unité β . Les sous-unités s'assemblent sous-unité β côté de l'extrémité (+) pour former un protofilament. 13 protofilaments interagissent ensemble et se ferment pour former un microtubule. Adapté de Pampaloni, 2008.

1-1-1-3 Les neurofilaments

La troisième classe de composants du cytosquelette regroupe les filaments intermédiaires qui portent le nom de neurofilaments dans les neurones. Ces fibres tiennent leur nom du fait que leur diamètre (11 nm) est compris entre celui des filaments d'actine (6 nm) et celui des microtubules (24 nm). Contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules, ils ne lient pas de nucléotides et ne sont pas polarisés. Ce sont des hétéropolymères constitués de différents types de protéines à hélice α classées en 6 catégories, type I (kératines acides), type II (kératines basiques), type III (vimentine, desmine, périphérine et protéine acide fibrillaire gliale (GFAP)), type IV (NF-L, NF-M et NF-H), type V (lamines nucléaires) et type VI (nestine). La composition des filaments intermédiaires diffèrera selon le type cellulaire. Ainsi, dans les neurones, les neurofilaments sont essentiellement constitués de cinq types de protéines fibrillaires NF-L, NF-M et NF-H (NF correspondant à neurofilament et L, M et H respectivement, light, middle et high, faisant référence à leur poids moléculaire), internexine- α et périphérine. La vimentine et la nestine sont présentes dans les neurones non matures puis au cours du développement sont progressivement remplacées par les protéines de types IV (Yuan A. 2017). Les filaments intermédiaires ont une fonction principalement structurale. Dans les neurones, ils déterminent le diamètre de l'axone. Contrairement aux microtubules qui interviennent dans l'élongation de l'axone, les

neurofilaments permettent la croissance radiale de l'axone. La formation des filaments intermédiaires présents dans le cytoplasme se déroule en trois phases. Tout d'abord, la formation de tétramères qui s'assemblent par association latérale, puis de manière longitudinale. Le filament intermédiaire est ensuite compacté et atteint alors son diamètre final de 11 nm (Fig. 4).

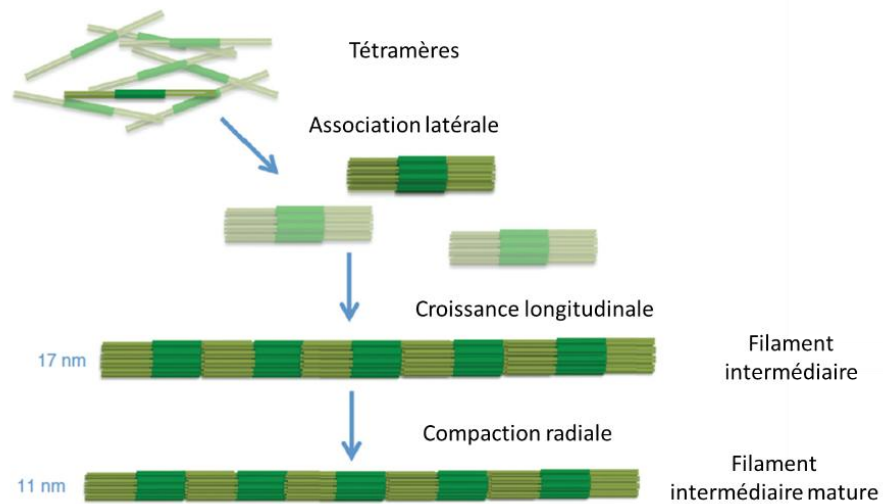


Figure 4: Filaments intermédiaires. Schéma de l'assemblage des filaments intermédiaires en trois phases : phase 1, association latérale des tétramères, phase 2, association longitudinale et formation d'un filament intermédiaire, phase 3, compaction de ce filament. Adapté d'après Herrmann, 2016.

1-1-2 Les synapses

Le terme synapse a été employé pour la première fois par Sherrington en 1897 et désigne la connexion entre une cellule nerveuse, au niveau d'une épine dendritique, avec une autre cellule. La synapse comprend deux parties, la pré-synapse qui transmet l'influx nerveux ou encore potentiel d'action et la post-synapse qui reçoit l'influx nerveux. On distingue deux grands types de synapses selon leur mécanisme de transmission. Les synapses électriques qui laissent passer le courant de façon passive entre la pré-synapse et la post-synapse, et les synapses chimiques qui mettent en jeu des facteurs chimiques appelés neurotransmetteurs sécrétés par la pré-synapse et qui vont venir activer des récepteurs membranaires de la post-synapse conduisant à la production d'un courant secondaire appelé potentiel post-synaptique.

1-1-2-1 Les synapses électriques

Dans les synapses électriques, les membranes de la pré-synapse et de la post-synapse sont reliées par des jonctions communicantes qui forment des canaux ioniques transmettant l'influx nerveux. Ces canaux ont été observés pour la première fois en 1963 par Robertson en microscopie électronique dans des synapses de poisson rouge (Robertson, 1963). Cependant leur véritable fonction de jonctions communicantes n'a été mise en évidence que quelques années plus tard, en 1967 par Revel et Karnovsky (Revel, 1967). Ces jonctions appelées également jonctions gap sont constituées de six sous-unités appelées connexons constituées eux-mêmes de protéines membranaires appelées connexines. En plus du système nerveux central, elles sont présentes dans d'autres organes comme le cœur, le foie, ou les muscles lisses où elles assurent plusieurs fonctions telles que le maintien de l'homéostasie, du pH, et la communication entre cellules. Les neurones ne sont capables de former des jonctions communicantes uniquement qu'avec des neurones (Rash, 2001). Les canaux de la pré-synapse et de la post-synapse sont reliés et forment des pores qui permettent de créer une continuité et laisser passer les ions par diffusion passive. Cette transmission du signal est très rapide et peut être bidirectionnelle. La largeur des pores permet de laisser diffuser les ions mais également des molécules plus grandes comme l'ATP. Du fait de la présence de ces jonctions communicantes l'espace entre la pré-synapse et la post-synapse est très réduit et compris entre 2 et 4 nm. Cependant bien que présentes dans tout le système nerveux les synapses électriques restent minoritaires comparées aux synapses chimiques.

1-1-2-2 Les synapses chimiques

En 1914 Dale démontra que la transmission ne se faisait pas toujours par diffusion passive mais pouvait nécessiter l'action de facteurs chimiques (Fishman, 1972). Ces synapses dénommées synapses chimiques sont en fait majoritaires (Fig. 8). On distingue des synapses excitatrices, formées par la connexion entre des épines dendritiques et les synapses inhibitrices qui se forment sur la dendrite. Contrairement aux synapses électriques, la fente synaptique est large, mesurant entre 10 et 40 nm. La terminaison pré-synaptique comprend les vésicules synaptiques, lieu de stockage des neurotransmetteurs. La dépolarisation de la terminaison pré-synaptique engendrée par un potentiel d'action permet l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. L'entrée de calcium dans la pré-synapse provoque alors la fusion de la membrane des vésicules synaptiques avec la membrane de la pré-synapse

et permet la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique qui se lient alors aux récepteurs membranaires de la post-synapse. La liaison aux récepteurs membranaires active ou inhibe ces récepteurs en provoquant l'ouverture ou la fermeture des canaux. Dans une synapse excitatrice l'ouverture des canaux conduit au passage des ions Na^+ , K^+ et parfois Ca^{2+} entre le milieu extracellulaire et intracellulaire de la post-synapse aboutissant à la formation d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). A l'inverse dans une synapse inhibitrice, l'ouverture des canaux conduit à l'entrée d'ions négatifs Cl^- et à la formation d'un potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI). Les neurotransmetteurs dans la fente synaptique sont ensuite soit dégradés par des enzymes soit capturés par les cellules gliales ou bien recyclés au niveau présynaptique.

Ils existent plusieurs types de neurotransmetteurs. Certains, comme par exemple le glutamate ou l'acétylcholine, ont la propriété d'être excitateur. Ils favorisent le transfert du signal électrique en activant les récepteurs membranaires. D'autres neurotransmetteurs comme l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ou la glycine sont inhibiteurs et bloquent donc le passage de l'influx nerveux.

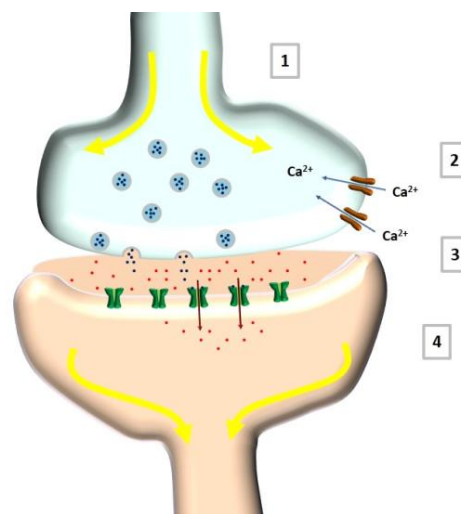


Figure 5: Synapse chimique. Synapse chimique : 1) Potentiel d'action dans la terminaison synaptique. 2) Dépolarisation de la membrane, ouverture des canaux calciques et entrée de calcium dans la pré-synapse. 3) Fusion des membranes des vésicules synaptiques et libération de neurotransmetteurs (points bleus) dans la fente synaptique. 4) Activation (ou inhibition) des récepteurs membranaires, entrée d'ions (points rouges) dans la post-synapse et formation d'un potentiel post-synaptique excitateur (ou inhibiteur).

1-1-3 Les épines dendritiques

1-1-3-1 Morphologie des épines dendritiques

Les synapses excitatrices sont formées par la connexion entre deux épines dendritiques, petites protubérances de la membrane plasmique de la dendrite observées par Cajal en 1888. Elles sont présentes dans plusieurs populations de neurones du cerveau et ont été le mieux caractérisées dans les neurones de l'hippocampe, du néocortex ainsi que du cervelet avec les cellules de Purkinje. Elles se composent d'une extrémité globuleuse, la tête, au niveau de laquelle se forme la connexion synaptique. Celle-ci est reliée à la dendrite par un rétrécissement, le cou. Chaque tête ne peut être impliquée que dans une seule connexion synaptique à la fois (Harris, 1988). Les épines dendritiques mesurent entre $0,2 \mu\text{m}$ et $2 \mu\text{m}$ de long et ont un volume compris entre $0,01 \mu\text{m}^3$ et $1 \mu\text{m}^3$. Elles présentent une grande hétérogénéité quant à leurs formes que l'on range habituellement en quatre catégories (Fig. 5). Les épines dites fines '*thin*' ont un long cou et un diamètre de tête étroit. Les épines trapues '*stubby*' sont courtes et larges et ne présentent pas de rétrécissement au niveau du cou. Les épines en champignon '*mushroom*' présentent une tête large de diamètre supérieur à $0,6 \mu\text{m}$ et un rétrécissement au niveau du cou. Enfin, les épines branchées '*branched*' présentent plusieurs têtes (Sorra, 2000). On distingue enfin des protrusions très fines et longues sans extrémité globulaire présentes le long des dendrites des neurones en développement. Celle-ci correspondent à des épines immatures appelées filopodes.

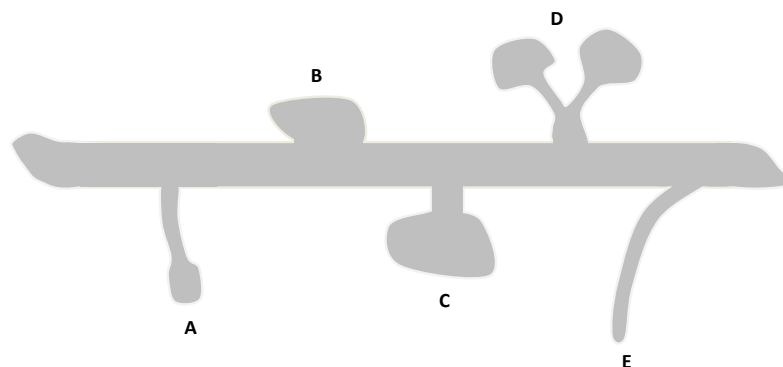


Figure 6: Morphologie des épines dendritiques. A) épine fine '*thin*'. B) épine trapue '*stubby*'. C) épine présentant un cou et une tête large en champignon '*mushroom*'. D) épine à plusieurs têtes dite branchée '*branched*'. E) épine immature ou filopode.

1-1-3-2 La machinerie dendritique

Les épines dendritiques assurent la transmission du signal nerveux d'un neurone à un autre en étant acteur de la plupart des synapses excitatrices mais aussi de quelques synapses inhibitrices. Cette transmission est rendue possible grâce à l'implication de plusieurs organites spécifiques de l'épine (Fig. 6). On distingue ainsi l'appareil de l'épine, la densité post-synaptique, le spinule, des vésicules synaptiques. L'appareil de l'épine (SA '*spine apparatus*') est une prolongation du réticulum endoplasmique lisse (SER '*smooth endoplasmic reticulum*') qui provient de la dendrite et qui s'étend parfois dans le cou de l'épine dendritique. Le SA est présent plus fréquemment dans les épines larges et en champignon que dans les épines fines. La formation de cet organite est régulée par une protéine ABP, la synaptopodine. Il a été montré que les souris déficientes en synaptopodine ne présentaient pas de SA dans leur épines dendritiques (Deller, 2003). Le SA jouerait un rôle dans la régulation du calcium (Fifková, 1983). Des vésicules présentes à l'extrémité de l'appareil de l'épine nous permettent de suggérer son implication dans la croissance de l'épine et dans le trafic de certaines protéines comme les récepteurs au glutamate AMPAR (du nom de leur activateur l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate ou AMPA) et NMDAR (du nom de leur activateur l'acide N-méthyl-D-aspartique ou NMDA).

Les synapses sont caractérisées par la présence d'une densité post-synaptique (PSD) située dans la tête de l'épine dendritique et juste en dessous de la zone de contact avec la terminaison pré-synaptique. Cette zone est appelée densité post-synaptique (PSD, '*post synaptic density*') car elle apparaît sous la forme d'une région dense aux électrons en microscopie électronique. La PSD est un réseau de protéines comprenant des canaux ioniques, des récepteurs membranaires, des protéines d'échafaudage et des protéines de signalisation. Ces protéines gardent pour certaines une connexion avec les filaments d'actine, principal composant du cytosquelette présent dans l'épine, et sont liées entre elles par des domaines d'interaction spécifiques comme le domaine PDZ (pour '*Post synaptic density protein 95 (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (zo-1)*'). La densité post-synaptique s'étend généralement sur un diamètre de quelques centaines de nanomètres. Elle peut être continue ou perforée et de taille variable mais proportionnelle au volume de la tête de l'épine (Harris, 1989). Les analyses protéomiques de la PSD ont permis de mettre en évidence la présence de plus d'une centaine de protéines parmi lesquelles des

protéines membranaires, les récepteurs au glutamate NMDAR et AMPAR (Carlin, 1980). Des polyribosomes sont aussi présents à la base de nombreuses épines dendritiques. Or les polyribosomes sont impliqués dans la synthèse protéique ce qui suggère la synthèse locale de protéines jouant un rôle dans la spécialisation synaptique de l'épine (Steward, 1982). Un autre organe souvent retrouvé dans les épines dendritiques et dont l'existence et la fonction ont été davantage controversées est le spinule. Il s'agit d'une excroissance de la membrane post-synaptique dans la pré-synapse mesurant moins de 100 nm de large et 1 μ m de long. Cet organe est plus fréquemment rencontré dans les synapses larges et très actives. Le spinule peut perforer ou segmenter la PSD. Enfin les vésicules synaptiques sont des organites sphériques renfermant les neurotransmetteurs comme le glutamate et d'autres éléments comme le zinc qui, lors d'un stimulus, pourront être libérés par exocytose.

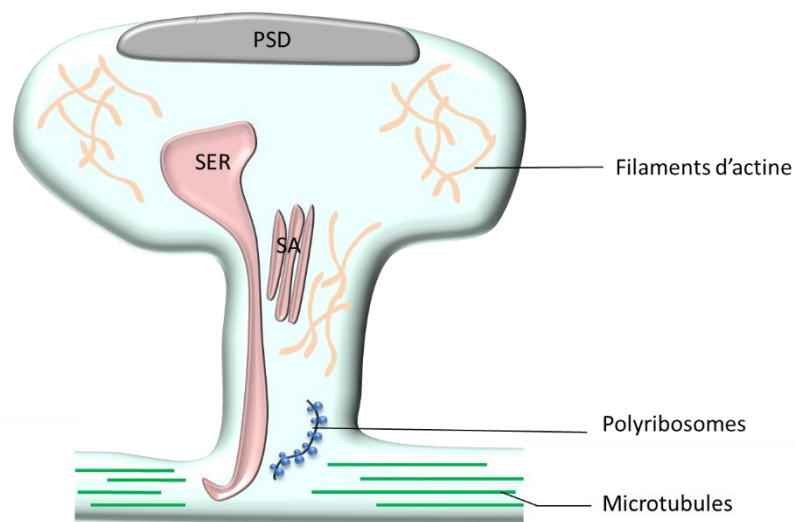


Figure 7: Organisation d'une épine dendritique. Schéma mettant en évidence les différents organites d'une épine dendritique. PSD : densité post-synaptique ; SER : réticulum endoplasmique lisse ; SA : appareil de l'épine.

1-1-3-3 Développement des épines dendritiques : la spinogénèse

Même si la structure d'une épine paraît relativement simple, la régulation de sa morphologie et de sa physiologie est complexe. Les épines se développent selon un processus appelé spinogénèse. Différentes hypothèses ont été émises quant à la naissance des épines et regroupées en trois grands modèles (Fig. 7). Le premier modèle proposé par Miller et Peters, se base sur l'observation que la majorité des synapses se forment sur le tronc

dendritique et suggère qu'un filopode de l'axone vient trouver une région appropriée sur le tronc dendritique pour former une synapse et ensuite une épine (Fig. 7a) (Miller, 1981). Cependant plus le nombre de synapses augmente plus le nombre de filopodes sur la dendrite diminue ce qui suggère que les filopodes dendritiques et non plus axonaux sont les précurseurs des épines dendritiques. Ziv et Smith proposèrent un deuxième modèle de spinogénèse où le filopode entre en contact avec l'axone pour former une synapse et évoluer ensuite en épine dendritique (Fig. 7b) (Ziv, 1996). Dans ces deux premiers modèles, la formation de l'épine est rendue possible par le contact synaptique. Cependant des études montrent que les neurones de Purkinje sont également capables de former des épines indépendamment de la terminaison pré-synaptique, en faveur d'un troisième modèle de spinogénèse (Fig. 7c) (Sotelo, 1990).

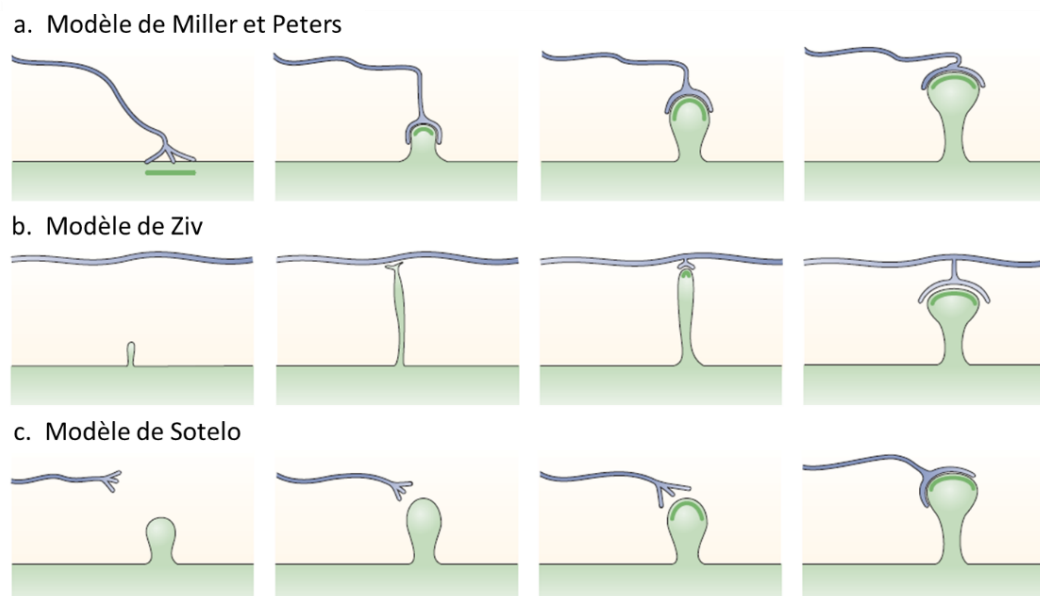


Figure 8: Les trois modèles de spinogénèse proposés par : a) Miller et Peters. L'épine se forme suite à l'interaction d'un filopode de l'axone avec la dendrite. b) Ziv. Un filopode de la dendrite vient interagir avec l'axone. c) Sotelo. Formation des épines indépendamment de la terminaison pré-synaptique. D'après Yuste, 2004.

Plusieurs facteurs vont favoriser ou empêcher la spinogénèse. L'actine, comme nous l'avons vu précédemment, joue un rôle essentiel dans la spinogénèse en contrôlant la morphologie et la motilité de l'épine (Zito, 2004). Le calcium ainsi que les protéines ABP peuvent affecter l'organisation du cytosquelette et donc la spinogénèse et nous verrons notamment, dans le chapitre 1.2.3, comment ce cytosquelette des épines va être régulé lors de la transmission synaptique.

1-1-3-4 Perturbations des épines dendritiques et neuropathologies

Si à la fin de XIX^{ème} siècle la présence d'épines sur les dendrites était controversée aujourd'hui nous savons qu'elles sont le siège de la transmission synaptique excitatrice et que des perturbations de leur taille, de leur forme ou encore de leur nombre sont associées à des dysfonctionnements neurologiques. Un lien entre altérations morphologiques des épines et retard mental a été démontré dès le début des années 70 par Huttenlocher et Purpura (Huttenlocher, 1970 ; Purpura, 1974). Dans le syndrome de l'X fragile, pathologie associée à un retard mental la plus fréquente après la trisomie 21 et due à la mutation du gène codant pour FMRP (*fragile x mental retardation protein*), le nombre d'épines est très supérieur à la normal et beaucoup d'entre elles sont immatures ce qui suggère une perturbation dans les mécanismes de maturation et d'élimination des épines (Irwin, 2000). Cette augmentation du nombre d'épines a été retrouvée plus tard comme étant présente de manière plus générale dans l'autisme avec plusieurs protéines synaptiques impliquées comme SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) ou ACTN4 (*α-actinin-4*) (Penzes, 2011 ; Lima Caldeira, 2019). *A contrario* dans le syndrome de Rett et dans la trisomie 21 on retrouve une réduction du nombre d'épines ainsi qu'une altération de leur morphologie (Torres, 2018 ; Xu, 2014). La schizophrénie est également associée à une réduction du nombre d'épines accompagnée d'une perturbation de leur morphologie. Une perturbation du ratio actine-F/G et de l'expression de certaines protéines ABP comme le complexe Arp2/3 a été observée dans le cerveau de patients schizophrènes. Ceci suggère que l'altération du cytosquelette au niveau synaptique contribuerait à la perte d'épines dendritiques dans le cas de la schizophrénie (Lima Caldeira, 2019). Une baisse du nombre d'épines dendritiques est observée principalement dans l'hippocampe et le cortex des patients atteints d'Alzheimer (Penzes, 2011). Ces études soulignent donc l'importance de ces protrusions dendritiques pour le fonctionnement du système nerveux central.

1-2 Plasticité synaptique

Les épines dendritiques forment des connexions entre les neurones et permettent la transmission du signal nerveux. Cette connectivité entre neurones est dynamique et change en permanence en fonction de l'activité neuronale. Ces changements sont une caractéristique

essentielle et propre aux neurones : la plasticité synaptique. Celle-ci fait intervenir des mécanismes survenant dans un laps de temps de quelques millisecondes à des années.

1-2-1 Les récepteurs au glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant du système nerveux et un activateur de deux classes de récepteurs. Les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Le glutamate fait partie des acides aminés non essentiels et il ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Il est donc synthétisé localement et majoritairement à partir de glutamine libéré par les cellules gliales (Hamberger, 1979) et stocké dans des vésicules synaptiques par des transporteurs VGLUT '*Vesicular GLUTamate Transporter*'.

1-2-1-1 Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques font partie de la famille des Récepteurs transmembranaires Couplés à une Protéine G (RCPG) et vont donc induire la formation de phosphatidylinositol (Sladeczek, 1985). Ils ne répondent qu'à des libérations de glutamate prolongées. Comme tous les RCPGs ils sont formés par une seule protéine comportant sept domaines transmembranaires. Le glutamate se lie sur la partie N-terminal de la protéine tandis que la partie C-terminal interagit avec la protéine G. On distingue huit récepteurs nommés de mGluR1 à mGluR8.

1-2-1-2 Les récepteurs ionotropiques

Ces récepteurs, présents dans la synapse excitatrice, sont des canaux ioniques tétramériques et perméable aux cations K^+ et Na^+ et dans certains cas Ca^{2+} . Leur activation permet la transmission rapide du signal nerveux. On distingue trois grandes classes de récepteurs ionotropiques en fonction de leur agoniste : les récepteurs à l'AMPA (AMPARs), les récepteurs au NMDA (NMDARs) et les récepteurs au kaïnate.

Les AMPARs sont des hétérotétramères ou homotétramères formés par l'assemblage de deux dimères composées de sous-unités nommées de GluA1 à GluA4 très conservées (Wisden, 1993 ; Hollmann, 1994). Chaque sous-unité comprend un domaine N-terminal extracellulaire (NTD, '*N-Terminal Domain*'), un domaine de liaison au ligand (LBD '*Ligand Binding-Domain*') et un domaine transmembranaire (TMD, '*TransMembrane Domain*') constitué de quatre hélices M1-M4 et formant le canal ionique. Les quatre NTD s'assemblent

en deux dimères (Fig. 9). La liaison du glutamate à la sous-unité LBD provoque un mouvement des hélices du TMD et l'ouverture du canal.

Les AMPARs sont associés à des protéines avec lesquelles ils forment des complexes macromoléculaires. Ces protéines auxiliaires affectent le trafic, l'expression des récepteurs à la synapse et leurs fonctions (Greger, 2017). Celles-ci comprennent les protéines de la famille TARP (*Transmembrane AMPAR Regulator Protein*), classées en deux types en fonction de leur séquence en acides aminés et leurs fonctions, les TARPs de type 1 (γ -2 encore appelée stargazine, γ -3, γ -4 et γ -8) et les TARPs de type 2 (γ -5 et γ -7) (Jackson, 2011), les protéines cornichons CNIHs (*Cornichon Homologs*) (Schwenk, 2009), les protéines de la famille CKAMP (*Cystine-knot AMPA receptor-modulating proteins*) CKAMP39/Shisa8, CKAMP44/Shisa9 et CKAMP59/shisa7 (Engelhardt, 2019) et enfin la protéine GSG1L (*Germ cell Specific gene 1-like protein*) (Gu, 2016).

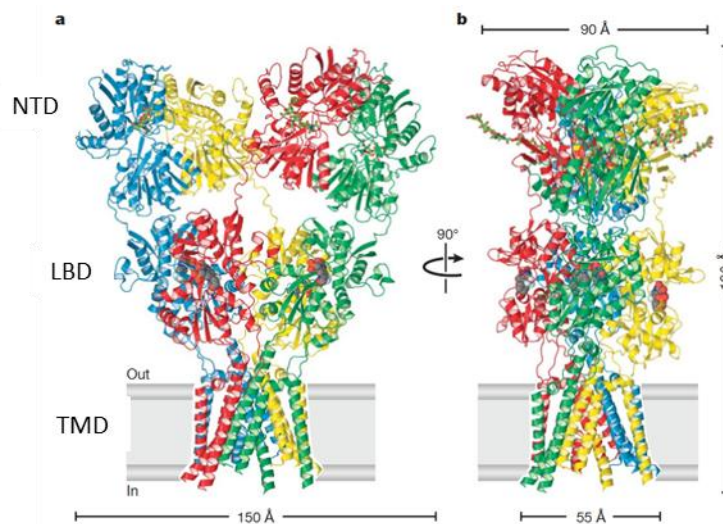


Figure 9 : Structure d'un récepteur ionotropique au glutamate de type AMPAR. a) vue côté large montrant les domaines TMD, LBD et NTD. b) vue étroite. TMD : domaine transmembranaire, LBD : domaine de liaison au ligand et NTD : domaine N-terminal. Adapté de Sobolevsky, 2009.

Les différentes combinaisons de tétramères confèrent aux AMPARs des cinétiques et des propriétés différentes. Certains récepteurs peuvent laisser passer le Ca^{2+} notamment en absence de sous-unités GluA2 très imperméables au Ca^{2+} . Ces sous-unités s'expriment différemment selon la maturité du neurone. Ainsi au début du développement, dans les neurones immatures on retrouve les sous-unités GluA4 et GluA2 tandis que dans les neurones

matures les formes GluA1/GluA2 et GluA2/GluA3 sont majoritaires. On retrouve aussi un faible pourcentage de récepteurs AMPARs homotétramériques constitués seulement de sous-unités GluA1. Les récepteurs AMPA sont très largement exprimés dans les synapses excitatrices glutamatergiques. Une synapse de type *'mushroom'* (tête large et cou étroit) peut ainsi présenter plus de 140 AMPARs et il y a une étroite corrélation entre le nombre de récepteurs et le volume de la tête de l'épine (Matsuzaki, 2001). Ces récepteurs peuvent être stabilisés en nanodomains dans la PSD par la protéine PSD-95 (Nair, 2013).

Les NMDARs ont une structure tétramérique proche des AMPARs (Fig. 10a). Ils comprennent sept types de sous-unités classées en trois groupes de GluN1 à GluN3. Les sous-unités GluN2 lient le glutamate tandis que GluN1 et GluN3 lient le co-agoniste glycine ou bien la D-sérine. Les NMDARs comprennent souvent deux sous-unités GluN2 et deux sous-unités GluN1 et dans certains cas GluN3 vient remplacer une des sous-unités GluN2. En plus de permettre les échanges des ions Na^+ et K^+ , ils favorisent l'entrée des ions Ca^{2+} donc les PPSE induits par l'activation des NMDARs accompagnés d'une augmentation de la concentration post-synaptique de calcium. Celui-ci va pouvoir jouer le rôle de second messager et activer des voies de signalisation. Lors de l'hyperpolarisation de la membrane les NMDARs sont bloqués par des ions Mg^{2+} . Ces ions sont repoussés lorsque la membrane est dépolarisée. Nous verrons dans les paragraphes suivants (1.2.2.1 et 1.2.2.2) comment ces récepteurs jouent un rôle crucial dans deux mécanismes de plasticité synaptique, la potentialisation à long terme et la dépression à long terme.

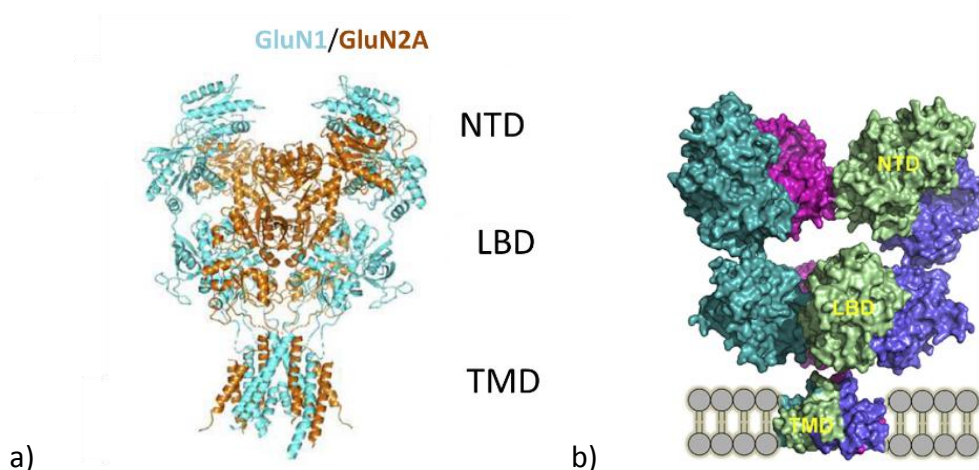


Figure 10 : Structure des récepteurs NMDAR et kaïnate. a) de type NMDAR, présentant une sous-unité GluN1 et une sous-unité GluN2A. Adapté de Zhang, 2018. b) de type kaïnate, d'après Møllerud, 2017. NTD : domaine N-terminal, LBD : domaine de liaison au ligand, TMD : domaine transmembranaire.

Les récepteurs kainates présentent également cette structure tétramérique et les domaines TMD, LBD et NTD (Fig. 10b). On les retrouve dans la pré-synapse où ils modulent le relargage du glutamate dans la fente synaptique, et dans la post-synapse où ils vont induire rapidement un courant post-synaptique mais qui va décroître plus lentement que ceux engendrés par les AMPARs.

1-2-2 La plasticité synaptique à long terme

La plasticité synaptique est un mécanisme essentiel dans les processus de mémorisation et d'apprentissage. La plasticité synaptique à long terme comprend deux grands processus, la potentialisation à long terme et la dépression à long terme. Les récepteurs ionotropiques au glutamate NMDARs et AMPARs vont jouer un rôle essentiel dans cette plasticité.

1-2-2-1 La potentialisation à long terme (PLT)

La potentialisation à long terme (PLT) a été observée pour la première fois en 1966 par le physiologiste norvégien Terje Lomo alors qu'il était étudiant dans le laboratoire de Per Andersen de l'université d'Oslo. Il collabora avec Timothy Bliss et ensemble ils publièrent leurs travaux sur la potentialisation en 1973. Ils montrèrent dans des hippocampes de lapins anesthésiés que suite à quelques secondes d'une unique stimulation à haute fréquence électrique une augmentation de la transmission synaptique était observable encore plusieurs jours voire plusieurs semaines après le stimulus (Bliss, 1973). Ces travaux ont donc permis de montrer qu'il existait un mécanisme qui suite à certains stimuli permettait de renforcer durablement la transmission synaptique. Ce mécanisme fut nommé potentialisation à long terme. En accord avec la loi de Hebb qui postule que le renforcement d'une synapse ne peut survenir que lorsque les activités pré- et post-synaptiques coïncident (Hebb, 1949), la PLT a lieu quand la pré-synapse est active et qu'il y a une forte dépolarisation de la membrane de la post-synapse.

La PLT se déroule en deux phases : une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce qui dure entre une et trois heures est induite généralement par un seul stimulus à haute fréquence (100 Hz) et comprend la phosphorylation de protéines synaptiques. La phase tardive est souvent considérée comme induite par la répétition de stimuli à haute fréquence pendant plusieurs minutes et nécessitant la synthèse de nouvelles protéines.

Lors de la phase précoce de la PLT, la liaison du glutamate aux AMPARs provoque l'ouverture des canaux ioniques. L'entrée des ions Na^+ et la sortie des ions K^+ induisent la dépolarisation de la membrane de la post-synapse. Cette forte dépolarisation de la membrane provoque la libération des ions Mg^{2+} qui bloquent les NMDARs. Les NMDARs peuvent alors être activés par le glutamate ce qui conduit à une entrée de Ca^{2+} dans la post-synapse. La liaison du Ca^{2+} à la calmoduline induit l'activation de plusieurs protéines par la calmoduline comme la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase calmoduline dépendante (CaMKII). Richard Morris et son équipe ont montré que l'application d'un antagoniste aux NMDARs, l'acide aminophosphonoaléique (AP5), par transfusion intraventriculaire dans l'hippocampe d'un rat, empêchait la formation de la PLT et conduisait à des difficultés de l'apprentissage spatial. Ils ont ainsi démontré l'importance des récepteurs de type NMDARs dans la PLT (Morris, 1986). A la même époque Karl Peter Giese montra que l'induction d'une mutation de la calmoduline bloquant l'auto-phosphorylation de la thréonine 286 chez des souris provoque une déficience de PLT et des problèmes de l'apprentissage spatial (Giese, 1998).

Comme l'a montré Terje Lomo, la PLT est un processus de renforcement de la transmission synaptique et elle nécessite donc des mécanismes d'amplification du signal et le recrutement des récepteurs AMPARs à la surface de la post-synapse. Ce trafic des AMPARs se fait par exocytose et quel que soit la combinaison des sous-unités des récepteurs (Granger, 2013). La CaMKII activée va pouvoir à son tour phosphoryler les AMPARs (Barria, 1997) sur la serine 831 de la sous-unité GluR1 (Mammen, 1997). Elle phosphoryle également la terminaison C-terminal du domaine PDZ de la stargazine ce qui favorise sa liaison à la PSD-95 et ensuite la stabilisation des AMPARs en nanodomains (Opazo, 2010).

1-2-2-2 La dépression à long terme (DLT)

Par la suite d'autres formes de plasticité synaptiques ont été découvertes et qui, à l'inverse, pouvaient diminuer à long terme la transmission synaptique. Ainsi, alors qu'une stimulation à haute fréquence induit une PLT, l'application de stimuli à plus basse fréquence (1-3 Hz) pendant une durée de 10 à 15 minutes dans les neurones du CA1 de l'hippocampe résulte en une dépression de la transmission synaptique à long terme (DLT) (Stanton, 1989 ; Dudek, 1992). La DLT suit également la loi de Hebb avec la synchronisation de la pré-synapse et de la post-synapse cependant contrairement à la PLT celle-ci est induite par

l'hyperpolarisation de la membrane de la post-synapse. Patrick Stanton et son équipe observèrent que l'application d'AP5 à 10 μM empêchait l'induction de la PLT mais pas de la DLT et émirent donc l'hypothèse que l'activation des NMDARs n'était pas nécessaire à la DLT (Stanton, 1989). Cependant d'autres études montrèrent que l'application de cet antagoniste à des concentrations plus élevées (25 μM et 200 μM) bloquait également la formation de la DLT (Dudek, 1992 ; Mulkey, 1992). Rosel M Mulkey et son équipe traitèrent des neurones du CA1 avec le chélateur intracellulaire du Ca^{2+} , l'acide aminopolycarboxylique (ou BAPTA). Celui-ci empêchait l'induction de DLT. A contrario l'induction d'une stimulation à basse fréquence après traitement à la nifépidine, un inhibiteur des canaux-calciques dépendants du voltage de type L, provoque l'induction de la DLT. Donc le blocage de l'entrée du calcium au niveau des canaux-calciques à la membrane de la post-synapse n'empêche pas l'induction de la DLT (Mulkey, 1992). Ces résultats sont en faveur de l'idée que la DLT est induite par une entrée lente et faible de Ca^{2+} médiée par les récepteurs NMDARs.

Dans le cas de la PLT l'entrée de Ca^{2+} mène à l'activation de protéines kinases. Si la DLT correspond au mécanisme inverse on peut alors envisager que l'entrée de Ca^{2+} conduira dans ce cas en l'activation de phosphatases. C'est ce que Lisman et son équipe énoncèrent dans un modèle théorique proposant qu'une entrée massive de Ca^{2+} conduirait en l'activation de la kinase CaMKII tandis qu'une entrée plus modérée permettrait l'activation de la protéine phosphatase calmoduline-dépendante ou PP2B (Lisman, 1989). Une fois activée la PP2B va pouvoir déphosphoryler la phosphoprotéine inhibiteur I1, un inhibiteur de la protéine phosphatase 1 (PP1). La déphosphorylation de cet inhibiteur permet alors l'augmentation de l'activité de PP1 (Lisman, 1989). Cependant si la PLT et la DLT semblent être des mécanismes totalement inversés ils présentent des différences au niveau des sites de phosphorylation/déphosphorylation des AMPARs. Ainsi si la PLT conduit à la phosphorylation des AMPARs sur la Ser 831, lors de la DLT c'est la Ser 845 qui sera déphosphorylée (Lee, 2000). PP2B se lie également à la PSD-95 et déclenche alors la perte de PSD-95 et par conséquent d'AMPARs à la synapse.

La différence de concentration de Ca^{2+} est donc primordiale pour l'induction soit de la PLT soit de la DLT. Cependant comment les voies de signalisation peuvent-elles être influencées par la concentration de Ca^{2+} ? Nous pouvons souligner la différence d'affinité pour le Ca^{2+} de PP2B et CaMKII. Le Ca^{2+} présente en effet une affinité plus importante pour PP2B

que pour CaMKII avec une constante de dissociation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{PP2B}$ de l'ordre de 28 pM (Quintana, 2005) contre 75 nM pour le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}$ (Tzortzopoulos, 2004). De plus une haute concentration en Ca^{2+} favorise la phosphorylation de l'inhibiteur I1 par PKA et donc l'inhibition de l'activité de PP1.

1-2-3 Rôle du cytosquelette dans la plasticité synaptique

1-2-3-1 Remodelage du réseau d'actine lors de la transmission synaptique

Les mécanismes que nous venons d'aborder précédemment, potentialisation et dépression synaptique, correspondent à un processus crucial de la plasticité synaptique : la plasticité fonctionnelle. Cependant celle-ci implique également une plasticité dite morphologique c'est-à-dire l'intervention de changements structuraux comprenant l'expression des protéines modulant le volume et la taille des synapses. Nous avons vu précédemment que le cytosquelette jouait un rôle important dans cette morphologie avec comme composant principal, les filaments d'actine. Dans les neurones les filaments d'actine se présentent sous différents types de conformations : des patches d'actine de quelques microns constitués d'actine branchée qui serviraient de point de départ de croissance des filopodes, des fibres d'actine longitudinales présentes dans les dendrites, et des structures périodiques en anneaux présentes dans l'axone, les dendrites et le cou des épines dendritiques (Fig. 11a,b) (Frost, 2010 ; Konietzny, 2017). Ces réseaux d'actine sont modulés directement par les protéines ABP.

En appliquant des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (latrunculine B) ou des stabilisateurs de l'actine-F comme la phalloïdine avant l'induction de la LTP, Kim et son équipe observèrent une diminution de la transmission synaptique spécifique des AMPARs suggérant ainsi un rôle essentiel de l'actine-F dans la transmission synaptique médiée par les AMPARs (Kim, 1999). Or la PLT implique le recrutement de récepteurs AMPARs à la PSD en nanodomains et cet ajout de récepteurs nécessite davantage d'espace pour la PSD et donc d'augmenter le volume de la tête de l'épine. Cette augmentation a lieu presque simultanément avec l'induction de la PLT et nécessite pour cela un remodelage du réseau d'actine. Ce remodelage comprend trois phases, tout d'abord la réorganisation du réseau puis la stabilisation morphologique et enfin le recrutement des protéines d'échafaudages telles que la PSD-95 pour la stabilisation des récepteurs glutamatergiques. L'activation de la CaMKII et des RhoGTPases est un processus crucial pour cette réorganisation. La CaMKII inactive se

lie aux filaments d'actine et stabilise et inhibe la polymérisation de l'actine en empêchant la liaison des protéines ABP (Okamoto, 2007 ; Hoffman, 2013). L'autophosphorylation de la CaMKII lors de la PLT induit la dissociation du complexe CaMKII/F-actin (Kim K, 2015). Des coupures sont alors effectuées au niveau des filaments d'actine par l'intermédiaire de plusieurs protéines dont la cofiline (Bosch, 2014). En parallèle, la polymérisation de l'actine conduit à une augmentation de filaments d'actine courts et une expansion du volume de la tête. Dans la seconde phase, le volume de la tête décroît mais reste supérieur à celui avant l'induction de la PLT. La CaMKII se lie à nouveau aux filaments d'actine et la vitesse de dépolymérisation devient alors égale à la vitesse de polymérisation (Okamoto, 2004) et les protéines de ramification consolident le nouveau réseau d'actine. Enfin, les protéines d'échafaudages rejoignent la PSD pour stabiliser les récepteurs glutamatergiques. En outre, l'activation de la CaMKII permet l'activation des RhoGTPases (pour '*Ras homolog family of guanosine triphosphate hydrolases*') telles que RhoA, Rac1 et Cdc42 qui diffusent alors le long des dendrites et des épines dendritiques voisines (Fig. 11c) (Konietzny, 2017). Ces protéines hydrolysent le GTP en GDP et sont des régulateurs de l'assemblage et de l'organisation du réseau d'actine. Dans le cas contraire, lors de la dépression synaptique il y a déplétion du nombre de récepteurs à la post-synapse accompagnée d'une diminution du volume de la tête de l'épine. Comme lors de la LTP, l'entrée de Ca^{2+} mène à la coupure du réseau d'actine et à une diminution du volume de l'épine. Plusieurs protéines ABP vont pouvoir contrôler la morphologie des épines en régulant le réseau d'actine. Le complexe WAVE localisé dans la PSD est un complexe formé de 5 sous-unités (WAVE, Abi, Nap, Brick et Sra). Il active le complexe Arp2/3 et régule le réseau branché d'actine (Chazeau, 2014). La localisation de la protéine ABP cortactine est régulée par l'activation des récepteurs NMDA donc cette protéine peut être également considérée comme un régulateur de la morphologie des épines dépendante de l'activité neuronale (Sala, 2014).

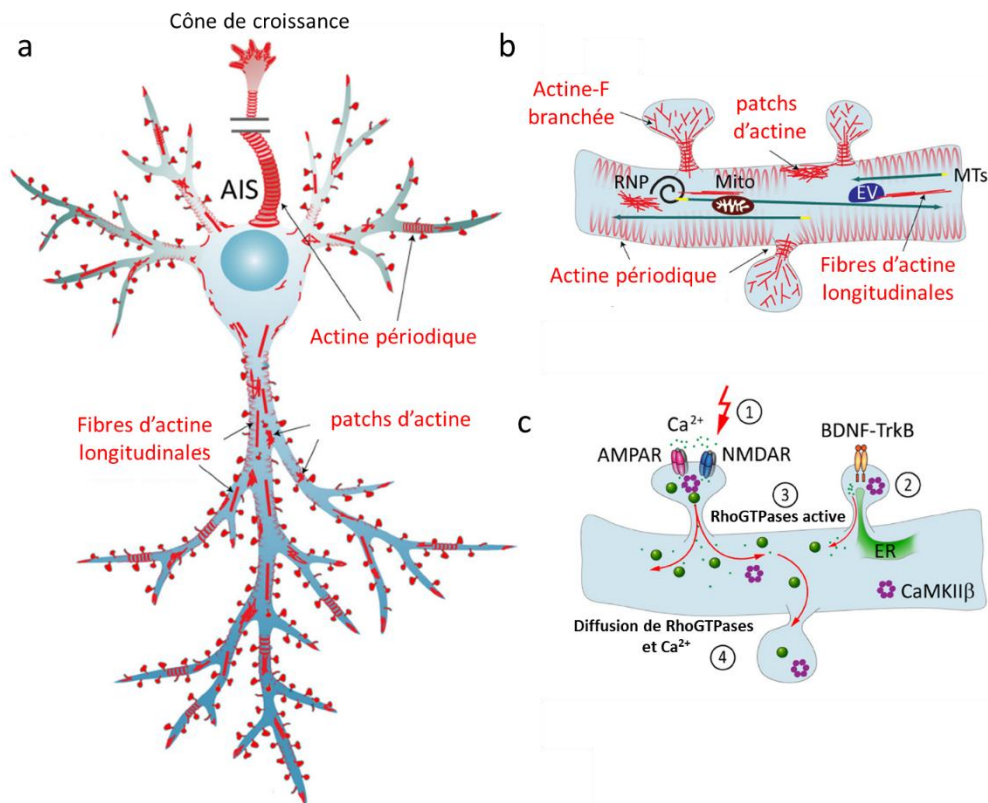


Figure 11 : Réseau d'actine et sa régulation. a) vue d'ensemble des différentes conformations d'actine dans un neurone pyramidal : actine périodique, patches d'actine et fibres d'actine longitudinales. b) structures d'actine dans des épines dendritiques. c) facteurs influençant la dynamique du réseau d'actine. AIS : segment initial de l'axone, EV : vésicules d'endocytoses, Mito : mitochondrie, RNP : ribonucléoprotéine, MTs : microtubules, ER : réticulum endoplasmique. D'après Konietzny, 2017.

1-2-3-2 Microtubules et plasticité morphologique

Un autre composant du cytosquelette impliqué dans cette plasticité morphologique sont les microtubules. En dépit du fait que les microtubules soient un composant du cytosquelette essentiellement présent dans les dendrites et l'axone, plusieurs études ont montré qu'ils pénètrent parfois jusqu'à l'intérieur de l'épine. Cette présence de microtubules dans la synapse n'est pas systématique et est corrélée avec une fréquence d'influx de Ca^{2+} importante et également avec un réseau d'actine-F développé (Merriam, 2013). Lukas C. Kapitein et son équipe ont montré que l'activation des récepteurs glutamatergiques entraîne la suppression de la dynamique des microtubules dans les dendrites de même que l'inhibition de cette entrée de microtubule à l'intérieur de l'épine et conduit à la diminution du volume de l'épine (Kapitein, 2011). Cette activation s'accompagne de la translocation de la protéine EB3 'End Binding protein 3', protéine coiffe associée au microtubule sur l'extrémité (+)

(Jaworski, 2009). Cette protéine joue le rôle d'anti-catastrophe en empêchant la dépolymérisation du microtubule (Komarova, 2009). Dans des neurones en culture, la délétion de la protéine EB3 induit la perte d'épines dendritiques cependant celle-ci est recouverte par traitement à la jasplakinolide, un activateur de la polymérisation de l'actine, suggérant donc qu'EB3 régule la taille des épines par altération de la dynamique du réseau d'actine. EB3 influencerait la morphologie des épines en contrôlant le réseau d'actine via les protéines p140Cap et cortactine (Jaworski, 2009 ; Pchitskaya, 2018). La débrine est autre protéine ABP permettant l'interaction des microtubules avec les filaments d'actine via sa liaison à EB3. Une surexpression de débrine induit l'augmentation de la présence de microtubule dans les épines dendritiques alors que sa délétion provoque au contraire, une diminution de l'invasion des microtubules dans les épines (Gordon-Weeks, 2014 ; Sala, 2014). La protéine MAP1B '*Microtubule-associated protein 1 B*' est une protéine qui à l'état phosphorylé s'associe aux microtubules en favorisant l'assemblage des microtubules. Or celle-ci est phosphorylée par la kinase caseine II qui est activée lors de l'induction de la PLT. Mark Zervas et son équipe ont montré qu'il y avait une réduction de la transmission chez des souris déficientes en MAP1B ce qui suggère que la phosphorylation de MAP1B suite à l'induction de la PLT serait une étape nécessaire pour le remodelage du cytosquelette (Zervas, 2005). Les souris déficientes en MAP1B présentent une diminution du nombre d'épines dendritiques matures et une augmentation du nombre de filopodes. En outre, celles-ci s'accompagnent d'une diminution de l'activité de la protéine Rac1, une augmentation de la RhoGTPases RhoA et une diminution de la phosphorylation de la cofiline ce qui suggère que MAP1B est impliquée également dans le remodelage du réseau d'actine (Sala, 2014).

1-3 Métaux et neurones

De la structure neuronale, de la structure des épines dépend la transmission synaptique. Cependant d'autres facteurs vont pouvoir la moduler. Des éléments chimiques essentiels participent à de nombreuses fonctions cellulaires. Parmi eux, on distingue principalement les métaux avec le fer, le zinc, le cuivre et en plus faibles concentrations le manganèse ainsi qu'un élément de la classe des non métaux, le sélénium (Davies, 2013) (Tableau 1).

Brain region	n	Metal ion levels ($\mu\text{g g}^{-1}$ wet tissue weight)				
		Copper	Iron	Zinc	Manganese	Selenium
Visual cortex	10	4.14 \pm 0.34	51.61 \pm 3.19	11.01 \pm 0.88	0.15 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03
Anterior cingulate cortex	10	4.04 \pm 0.27	42.51 \pm 2.61	11.24 \pm 0.67	0.09 \pm 0.04	0.09 \pm 0.03
Body of caudate	10	5.09 \pm 0.70	108.01 \pm 20.60*	12.44 \pm 0.94	0.31 \pm 0.06*	0.07 \pm 0.03
Putamen	10	4.47 \pm 0.47	78.15 \pm 16.85	11.26 \pm 0.50	0.22 \pm 0.05	0.12 \pm 0.05
Substantia nigra	5	11.40 \pm 2.50*	131.97 \pm 15.57*	16.81 \pm 3.56*	0.20 \pm 0.05	0.07 \pm 0.04
Cerebellum	9	4.85 \pm 0.57	33.23 \pm 3.71	11.84 \pm 0.58	0.19 \pm 0.05	0.18 \pm 0.05

Values are mean \pm SEM. Brain regions where metal levels were significantly greater than other regions are marked with an asterisk. Levels of copper in the substantia nigra were greater than that in all other brain regions ($p < 0.001$). Iron levels were higher in the substantia nigra and body of caudate compared with the visual cortex ($p=0.006$, $p=0.029$), anterior cingulate cortex ($p=0.001$, $p=0.006$), and cerebellum ($p < 0.001$, $p=0.002$), respectively. Levels of zinc in the substantia nigra were greater than that in the putamen ($p=0.04$), visual cortex ($p=0.026$), and anterior cingulate cortex ($p=0.038$). Levels of manganese in the body of caudate were greater than that in the anterior cingulate cortex ($p=0.028$).

Tableau 1: Concentration de cinq éléments chimiques essentiels pour le système nerveux central, en fonction de la région cérébrale. D'après Davies, 2013.

1-3-1 Le zinc

Le zinc est l'élément trace métallique le plus abondant dans l'organisme après le fer et il est indispensable au bon fonctionnement de centaines de protéines. Il est présent dans différentes régions du cerveau, principalement dans l'hippocampe et l'amygdale (Fig. 12) (Frederickson, 2000) et contribue à la structure ainsi qu'au bon fonctionnement cérébral. Il se trouve en grande partie complexé avec des protéines. Seul environ 10% est à l'état « labile », c'est-à-dire plus facilement échangeable et donc plus mobile (Takeda, 2001). Ce pool de zinc labile est aussi appelé zinc chélatable, en référence aux senseurs moléculaires à base de chélateurs du zinc qui permettent d'étudier cette fraction labile du zinc (Sanford, 2019). Dans certains neurones glutamatergiques appelés gluzinergiques, ce zinc chélatable se retrouve très concentré au niveau pré-synaptique stocké dans des vésicules synaptiques. Lors d'une stimulation celui-ci est alors relargué en même temps que les neurotransmetteurs et peut alors moduler la transmission synaptique en se liant aux récepteurs de la membrane post-synaptique (Peters, 1987).

Un excès de zinc, tout comme un déficit, peuvent avoir des conséquences dramatiques sur le fonctionnement neuronal. Très vite nous nous retrouvons donc confrontés à un problème. En effet, d'une part la transmission s'accompagne d'un relargage rapide de zinc dans la fente synaptique et d'autre part la cellule doit maintenir l'homéostasie du zinc. Dans ce chapitre nous verrons comment cette homéostasie est régulée avant de nous intéresser au rôle du zinc à la fois dans la plasticité synaptique et dans la structure du neurone. Enfin nous aborderons le lien entre dyshoméostasie du zinc et certaines neuropathologies.

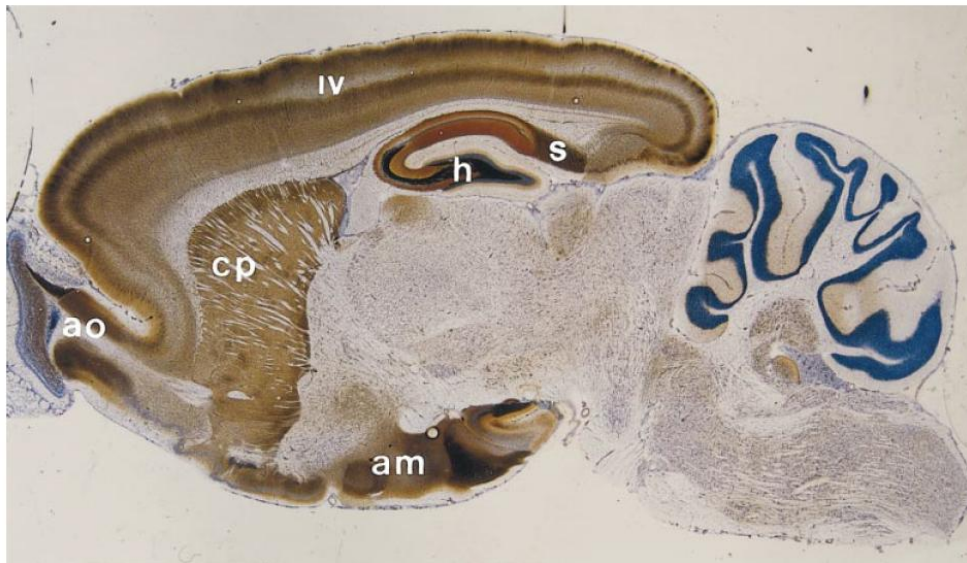


Figure 12 : Coupe sagittale d'un cerveau de rat révélant la distribution du zinc dans les régions du cerveau par méthode de coloration histochemique Timm-Danscher. Les zones noires correspondent aux zones riches en zinc. Avec s : subiculum ; h : hippocampe; ao: bulbe olfactif, am : amygdale et cp : putamen caudal. D'après Frederickson, 2000.

1-3-1-1 Homéostasie du zinc dans les neurones

1-3-1-1-1 Les protéines de transport du zinc

Le transport transmembranaire du zinc est effectué par deux classes de protéines. Les transporteurs de type ZIP '*Zinc Irt-like Protein*' connus également sous le nom de SLC39A '*Solute-Link Carrier 39 A*' et les transporteurs de type ZnT '*Zn Transporter*' ou SLC30A '*Solute-Link Carrier 30 A*'. Les transporteurs ZIP sont chargés des flux de zinc de l'espace extracellulaire ou des organites vers le cytosol. Les transporteurs ZnT permettent les flux en sens inverse et donc de maintenir une faible concentration cytosolique de zinc. Chez l'homme on distingue 9 protéines ZnT et 14 ZIP (Bum-Ho, 2018). Plusieurs ZnT sont exprimés dans le cerveau dont notamment ZnT1 et ZnT3. Le transporteur ZnT1 est localisé au niveau de la membrane cellulaire. Il limiterait la concentration en zinc en permettant son efflux conférant ainsi une résistance contre la toxicité induite par un excès de zinc (Palmiter, 1995). Une autre hypothèse quant à son mécanisme d'action serait qu'il inhiberait indirectement l'influx du zinc via l'inhibition des canaux-calciques de type L qui peuvent aussi transporter le zinc (Ohana, 2006). ZnT1 est exprimé dans différentes régions du cerveau et notamment dans le cortex et le cervelet (Sekler, 2002). Dans le CA1 de l'hippocampe il est exprimé dans le soma et dans les dendrites des neurones pyramidaux. Il se trouve aussi enrichi dans les épines et Sindreu et son équipe ont montré qu'il était colocalisé avec la PSD (Sindreu, 2014). Un autre transporteur de type ZnT important au niveau neuronal, le transporteur ZnT3 (ou SLC30A3) va permettre le

stockage du zinc par les vésicules synaptiques (Palmiter, 1996). Nous le verrons plus expressément dans la partie traitant du stockage du zinc (cf. 1.3.1.1.2).

Si ZnT1 permet de lutter contre les excès de zinc cytosolique, le transporteur ZIP12 (ou SLC39A12) permet au contraire de faire entrer le zinc dans la cellule. Il a été montré chez des souris *knockdown* pour ZIP12 une réduction de l'activation de la protéine CREB '*cAMP response element-binding*'. Cette protéine est essentielle à la croissance des neurites, à la différenciation neuronale et est impliquée dans les mécanismes moléculaires de la PLT. De plus ces souris présentent une diminution de la polymérisation de la tubuline démontrant un lien entre le transport du zinc médié par ZIP12 et la polymérisation de la tubuline et donc un rôle important de ce transporteur dans le neurodéveloppement (Chowanadisai, 2013).

1-3-1-1-2 Les métallothionéines

En plus des transporteurs du zinc ZnTs et ZIPs d'autres protéines appelées métallothionéines (MTs) vont permettre le stockage du zinc en séquestrant celui-ci. Ces petites protéines de 60 à 68 acides aminés comprennent 20 cystéines. Elles complexent en moyenne 7 atomes de zinc via la liaison à leurs cystéines (Kägi, 1988). Ces complexes MT-Zn sont sensibles aux changements physiologiques comme les changements de pH. Il existe plusieurs isoformes de MTs exprimées différemment selon le type cellulaire. Dans le cerveau, on retrouve essentiellement trois isoformes, MT-1, MT-2 et MT-3. MT-1 et MT-2 étant exprimées par les cellules gliales tandis que MT3 est exprimée par les neurones. L'expression de MT-3 est particulièrement élevée dans les neurones gluzinergiques riches en vésicules synaptiques stockant le zinc ce qui suggère que cette protéine participe à la neuromodulation médiée par le zinc (Masters, 1994). MT3 pourrait avoir un rôle similaire à celui des protéines chaperones, facilitant l'accumulation du zinc dans les vésicules en apportant le zinc vers la membrane des vésicules synaptiques où il sera alors internalisé via les transporteurs ZnT3.

1-3-1-2 Rôle du zinc dans les neurones

Le zinc stocké dans les vésicules pré-synaptiques est libéré dans la fente synaptique en même temps que le glutamate. De plus, la protéine de transport ZnT1 est fortement exprimée au niveau de la PSD dans l'espace post-synaptique. Ces observations supposent donc un rôle du zinc dans la modulation de la plasticité synaptique fonctionnelle. Dans le prochain paragraphe nous verrons comment le zinc est un acteur de la plasticité synaptique en

contrôlant l'activité des récepteurs des neurones glutamatergiques NMDARs et AMPARs. Or nous avons vu que le zinc chélatable représentait seulement 10% du pool total de zinc. 90% du zinc est complexé de manière stable aux molécules biologiques, principalement aux protéines. Nous verrons par la suite comment ce pool de zinc pourrait intervenir dans la régulation du cytosquelette neuronale.

1-3-1-2-1 Neuromodulation de NMDAR et AMPAR

Lors de la libération synaptique de zinc, la concentration en zinc dans la fente synaptique passe de quelques nanomolaires à plus d'une centaine de micromolaires. Kalappa et son équipe observèrent que ce zinc libéré dans la fente synaptique induisait une inhibition de la transmission médiée par les AMPARs (Kalappa, 2015). Une concentration nanomolaire de zinc appliquée à des synapses formées entre neurones des collatéraux de Schaffer et du CA1 suffirait également à inhiber les récepteurs NMDARs via la sous-unité GluN2A (Vergnano, 2014). Cette inhibition se ferait de manière allostérique, le NTD de la sous-unité GluN2A comprenant un site de fixation spécifique du zinc. Ces résultats confirment ceux de Chen qui observa une inhibition par le zinc différente selon la composition des récepteurs NMDARs (Chen, 1997). Cependant dans une étude récente, Sullivan et son équipe montrèrent que l'application d'une concentration micromolaire de zinc au niveau des synapses formées entre neurones des collatéraux de Schaffer et du CA1 de l'hippocampe conduisait à une augmentation de l'induction de la PLT via l'activation des récepteurs NMDARs comprenant la sous-unité GluN2B (Sullivan, 2018). Kun Tian et son équipe observèrent que le zinc induisait une augmentation de l'expression de cette sous-unité ainsi qu'une diminution de l'expression de GluR2 des récepteurs AMPARs, résultats concordant avec les conclusions de Sullivan et de Kalappa (Tian, 2017).

1-3-1-2-2 Zinc et cytosquelette

Les mécanismes impliquant le zinc dans la régulation du cytosquelette neuronal ne sont pas encore bien connus et les conclusions actuelles reposent essentiellement sur des observations biochimiques anciennes. De premières études biochimiques, notamment avec les travaux de Gaskin, montrèrent que, *in vitro*, le zinc induisait l'assemblage des dimères de tubuline en différentes structures en fonction de la présence ou l'absence des protéines MAPs et de GTP. Ces travaux suggérèrent alors que le zinc se liait soit directement sur la tubuline ou

sur les protéines MAPs soit qu'il formait un complexe avec le GTP (Gaskin, 1977). Quelques années plus tard, Eagle réfuta l'hypothèse d'un complexe zinc-GTP en montrant que le zinc pouvait se lier directement sur la tubuline et que celle-ci comprenait plus de 60 sites de fixation potentiels pour le zinc. Cependant la liaison d'un seul atome de zinc par dimère suffirait pour favoriser l'interaction des protofilaments (Eagle, 1983). Toutefois si le zinc stimule la polymérisation de la tubuline *in vitro* celle-ci reste possible en absence de zinc (Hesketh, 1983).

Dans leur modèle de dimère $\alpha\beta$ tubuline obtenu par cristallographie au rayons-X avec une résolution de 3.5 Å, Löwe et son équipe identifièrent un site putatif de fixation du zinc au niveau de l'interaction latérale de deux sous-unités α faisant intervenir 4 résidus d'acide aminés histidine et glutamate (Fig. 13) (Löwe, 2001). Craddock et son équipe déterminèrent par modélisation moléculaire les sites de fixation théorique du zinc sur la tubuline et trouvèrent, tout comme les prédictions de Eagle, 64 sites de fixation potentiels pour le zinc parmi lesquels deux des résidus identifiés par Löwe (Fig. 14). Ils identifièrent 6 principaux sites pour le zinc dont le site de liaison à la colchicine, un des résidus identifiés par Löwe, et le site d'échange GTP/GDP. Le zinc jouerait alors le rôle de stabilisateur des microtubules en renforçant les interactions électrostatiques entre protofilaments. Un excès de zinc serait responsable de la formation d'interactions aberrantes (Craddock, 2012).

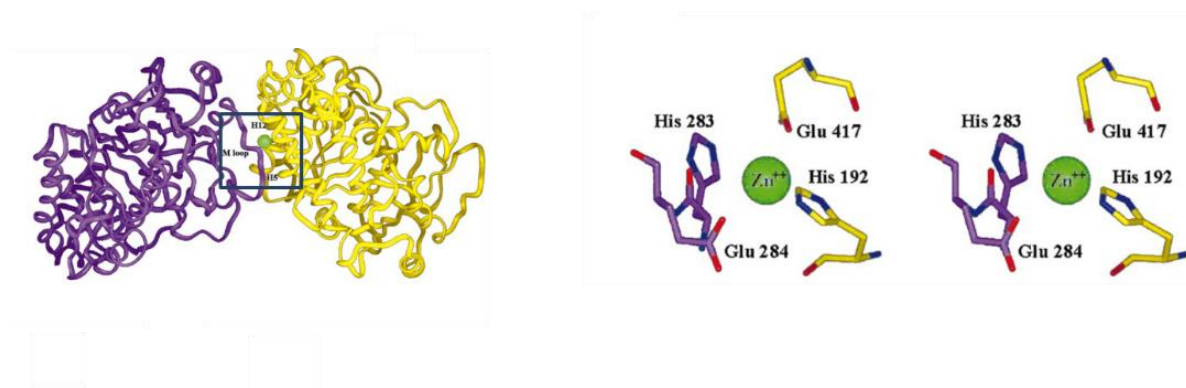


Figure 13 : Site de fixation potentiel du zinc sur la tubuline identifié par Löwe *et al.* Ce site putatif du zinc sur la tubuline se trouve au niveau de l'interaction latérale de deux sous-unités α entre la boucle M de la première sous-unité α et les domaines H5 et H12 de la deuxième sous-unité α et fait intervenir une histidine et un acide glutamique de chacune des sous-unités. D'après le modèle de Löwe, 2001

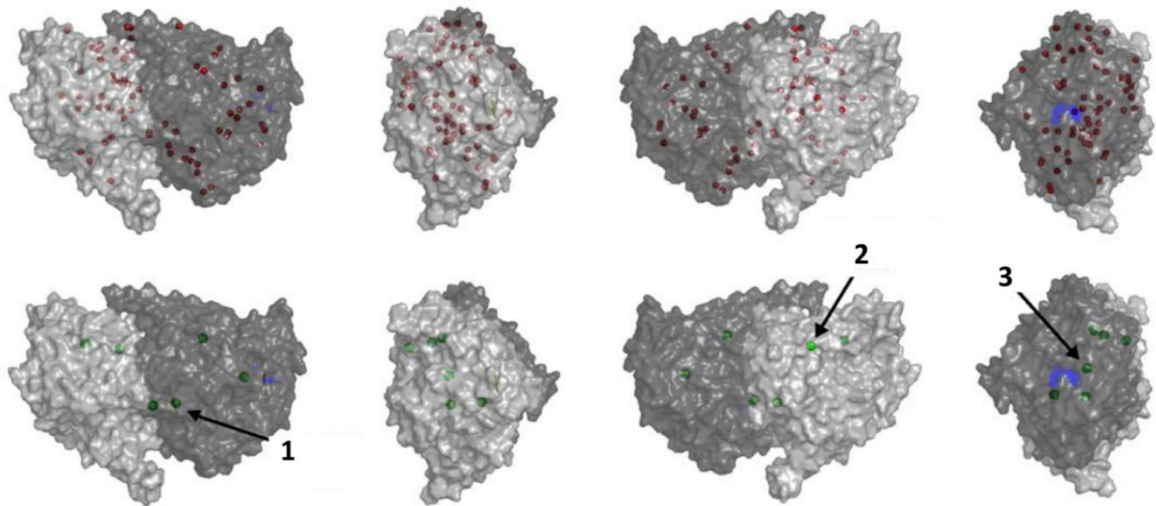


Figure 14 : Simulation numérique mettant en évidence les sites putatifs de fixation du zinc sur la tubuline avec en gris clair la tubuline α et gris foncé la tubuline β . En rouge, les 64 sites prédits et en vert les 6 sites principaux sélectionnés parmi lesquels 1) le site de liaison à la colchicine, 2) le site putatif impliqué dans l'interaction protofilament-protofilament et 3) le site de liaison GTP/GDP (en bleu). D'après Craddock, 2012.

Si ces études sont en faveur d'une interaction directe du zinc sur la tubuline d'autres études ont montré que le zinc pouvait se lier à des protéines ABPs comme la protéine TPPP/p25 '*tubulin polymerization promoting protein*'. Cette protéine, exprimée majoritairement dans les oligodendrocytes, favorise la polymérisation de la tubuline en hydrolysant le GTP. La liaison du zinc sur cette protéine pourrait induire des changements structurels de TPPP/P25 et affecter la polymérisation de la tubuline (Zotter, 2011). Une autre étude montre que le zinc induit une augmentation de l'expression de TPPP/p25 et de la liaison de celle-ci sur la tubuline ce qui suggère que le changement de conformation de TPPP/p25 induit par le zinc est un mécanisme permettant la régulation de l'expression de cette protéine (Lehotsky, 2015).

D'autres études montrent un rôle important du zinc sur le cytosquelette et le développement neuronal. Ainsi une déficience en transporteur ZIP12 est corrélée avec une perturbation de la polymérisation de la tubuline et conduit à une augmentation du risque de mauvaise fermeture du tube neural pendant le développement embryonnaire (Chowanadisai, 2013). Dans une étude sur l'apparition de troubles cognitifs liés aux traitements par chimiothérapie, Lee et son équipe ont montré que des souris traitées au paclitaxel, un agent

stabilisateur des microtubules, présentaient une diminution de l'expression du transporteur ZnT3 et des vésicules synaptiques contenant du zinc (Lee, 2017).

Toutes ces études impliquent le zinc comme régulateur des microtubules, cependant la dyshoméostasie du zinc pourrait également perturber les filaments d'actine. Dans le paragraphe 1.3.1.1.2 nous avons vu que la métallothionéine MT-3 était un des principaux régulateurs de l'homéostasie du zinc dans le cerveau. Or il a été montré que cette protéine se liait aux filaments d'actine et une diminution de son expression dans les astrocytes est associée à une perturbation de la polymérisation de l'actine (Lee, 2011).

1-3-1-3 Dyshoméostasie du zinc dans les neuropathologies

1-3-1-3-1 Maladies neurodégénératives

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative s'accompagnant d'un déficit cognitif progressif et d'une perte de la mémoire. Il s'agit de la forme la plus connue de démence. Elle se caractérise par la formation extracellulaire de plaques amyloïdes composées essentiellement de peptides amyloïde- β obtenu par clivage de la protéine APP '*Amyloid- β precursor protein*' par la γ -secrétase. L'analyse de ces plaques amyloïdes formées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par spectrométrie synchrotron de fluorescence-X montre des concentrations très élevées en zinc et en cuivre ce qui suggère un rôle potentiel du zinc et du cuivre dans le développement de cette pathologie (Miller, 2006). Des traitements à base de chélateurs du zinc et du cuivre tel que le clioquinol ont été envisagés. Chez des modèles murins, ceux-ci conduisent à une diminution des plaques amyloïdes (Adlard, 2008). Cependant les résultats des essais cliniques effectués à ce jour avec le clioquinol ne sont pas probants.

De nombreuses études se sont penchées sur le rôle de ces métaux dans la formation des plaques amyloïdes. Les astrocytes jouent un rôle important dans l'endocytose et la dégradation de l'amyloïde- β extracellulaire. Or l'endocytose est un processus cellulaire qui requiert l'intervention du réseau d'actine. Une diminution importante de l'expression du régulateur de l'homéostasie du zinc MT-3 est retrouvée dans le cerveau des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. Lee et son équipe ont observé une diminution de cette endocytose en absence de MT-3 supposant ainsi une diminution de l'endocytose de l'amyloïde- β médiée par MT-3 et donc son accumulation au niveau extracellulaire (Lee, 2015). Plusieurs études

tendent à montrer que le zinc agit comme un protecteur contre la formation des plaques amyloïdes. Le zinc peut se lier directement sur la protéine APP empêchant ainsi son clivage par la γ -secrétase (Gerber, 2017).

Le zinc se lie directement à l'amyloïde- β et cette séquestration du zinc est accompagnée d'une diminution de l'expression de la protéine Shank3 à la PSD. Ces effets sur Shank3 sont compensés par une supplémentation en zinc (Grabrucker, 2011).

Cependant la maladie d'Alzheimer s'accompagne également d'une perturbation du cytosquelette neuronal avec une diminution de l'expression et de la longueur des microtubules (Matsuyama, 1989 ; Cash, 2003). Craddock et son équipe proposèrent comme modèle que, le zinc serait important pour la polymérisation et la stabilité des microtubules (Fig. 15A) et qu'une fois séquestré par l'amyloïde- β il ne serait plus disponible pour la tubuline induisant donc une perturbation de la structure des microtubules (Fig. 15B) (Craddock, 2012).

La maladie d'Alzheimer se caractérise également par l'agrégation de protéines Tau hyperphosphorylées sous forme d'enchevêtrements neurofibrillaires. La protéine Tau appartient à la famille des protéines MAPs. Elle est exprimée par les neurones et interagit avec les microtubules favorisant ainsi leur stabilité. Li et son équipe ont montré par des études *in vitro* que le zinc se liait à la région R3 de la protéine Tau et favoriserait l'agrégation de cette dernière (Li, 2019). Or parmi les sites de fixation potentiels du zinc sur la tubuline tels qu'identifiés par Craddock et son équipe, un des sites de liaison est localisé au niveau du site de fixation de la protéine Tau ce qui suggère que le zinc pourrait stabiliser la liaison de Tau sur les microtubules (Craddock, 2012).

L'ensemble de ces études montrent combien l'origine et la conséquence de la dyshoméostasie du zinc dans la maladie d'Alzheimer sont mal connues. Nous savons aujourd'hui que les plaques amyloïdes accumulent du zinc cependant les patients atteints d'Alzheimer souffrent-ils d'un excès local de zinc, au niveau des plaques amyloïdes ou bien d'une déficience en zinc, plus générale au niveau du cytosquelette neuronal, induite par cette accumulation locale ?

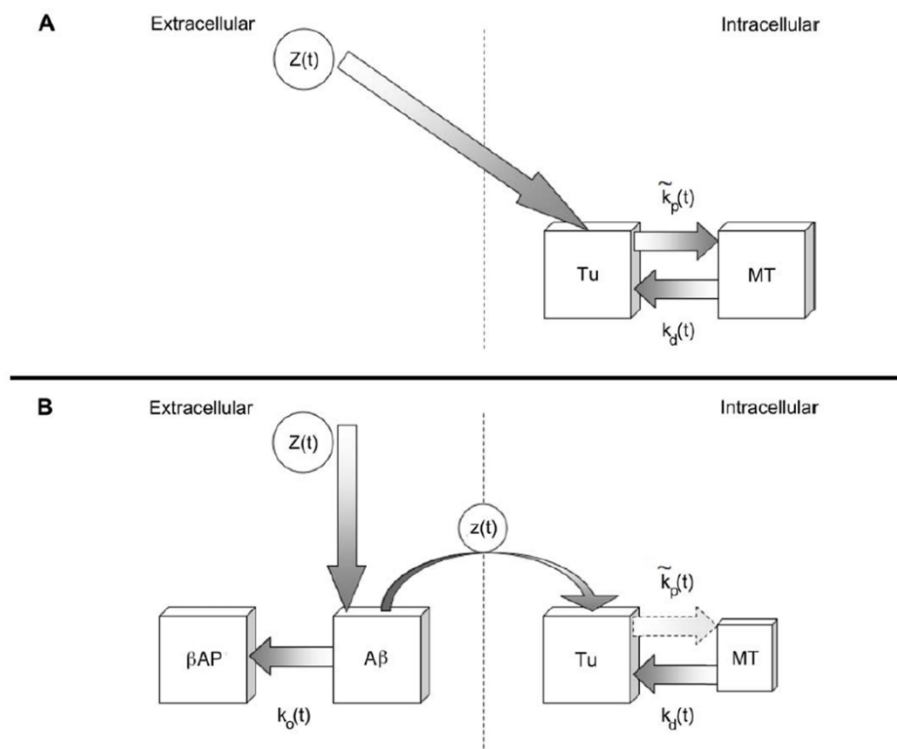


Figure 15 : Hypothèse de Craddock *et al.* selon laquelle la séquestration du zinc par l'amyloïde-β serait responsable de la perturbation du cytosquelette neuronale chez les patients souffrant d'Alzheimer. A) Le zinc favorise la polymérisation de la tubuline en microtubules. B) Le zinc séquestré par l'amyloïde-β n'est plus disponible pour la polymérisation de la tubuline. Tu : Tubuline, MT : Microtubule, Aβ : Amyloïde-β, βAP : plaque amyloïde, \tilde{k}_p : taux de polymérisation de la tubuline, k_d : taux de dépolymérisation, k_o : taux de d'oligomérisation de l'amyloïde-β. D'après Craddock, 2012.

1-3-1-3-2 Troubles du neuro-développement

Comme vu précédemment, Shank3 est une protéine d'échafaudage de la PSD impliquée dans le développement synaptique. La mutation ou la délétion de cette protéine est associée à des troubles du spectre autistique et autres problèmes neurologiques regroupés sous le terme de « shankopathies ». Parmi les « shankopathies » les plus fréquentes on distingue le syndrome de Phelan Mc Dermid (OMIM 606232), un syndrome de microdélétion chromosomique emportant la région 22q13.3 comprenant le gène codant pour Shank3. Cette protéine comprend un site de liaison du zinc sur son domaine SAM (Sala, 2015). Tao-Cheng et son équipe ont montré que la supplémentation en zinc de neurones conduisait en l'augmentation de l'expression de Shank3 à la PSD. La stabilisation de cette protéine à la PSD nécessite son interaction avec le zinc (Tao-Cheng, 2016).

D'autres pathologies peuvent être dues à un déficit en zinc survenant au cours du développement embryonnaire. Un défaut de zinc peut conduire à la mauvaise fermeture du tube neural à l'origine de plusieurs pathologies selon la région touchée comme le spina bifida et l'encéphalocèle. Il a ainsi été montré qu'une carence en zinc perturbe l'interaction entre la protéine p53 régulant l'apoptose et l'E3 ubiquitine ligase Mdm2 (*Murine double minute2*). Cette ubiquitine dépendante au zinc régule négativement p53. La diminution de l'ubiquitylation de p53 conduit à la stabilisation de p53 et par conséquent à une augmentation excessive de l'apoptose lors de la fermeture du tube neural (Li, 2018).

1-3-2 Le cuivre

Le cuivre est un autre métal essentiel pour diverses fonctions cellulaires telles que la respiration, la défense contre les radicaux libres ou la synthèse de neurotransmetteurs. Contrairement au zinc qui n'est présent que sous un seul état redox, Zn(II), on retrouve le cuivre dans les tissus biologiques sous deux états d'oxydation, Cu(I) et Cu(II). La concentration en cuivre dans le cerveau, moins élevée que celle du zinc est à peu près homogène dans toutes les régions du cerveau et comprise entre 4 et 5 µg de cuivre par g de de tissu (Tableau 1) (Davies, 2013). Tout comme le zinc, le cuivre est libéré dans la fente synaptique où il peut alors moduler la transcription. Plusieurs protéines permettent de réguler les concentrations intracellulaires en cuivre.

1-3-2-1 Régulation de l'homéostasie du cuivre dans les neurones

1-3-2-1-1 Les protéines de transport du cuivre

Comme pour le zinc, l'homéostasie du cuivre est finement régulée par des protéines de transport. On distingue le transporteur Ctr1 '*copper transporter 1*' et les deux ATPases transporteuses de Cu²⁺ ATP7A et ATP7B (Davies, 2013). Ces transporteurs du cuivre sont exprimés dans toutes les régions du cerveau. Ctr1 est une protéine transmembranaire qui s'assemble en homotrimères pour former un pore permettant l'influx de cuivre vers le milieu intracellulaire (Nose, 2006). *A contrario* ATP7A et ATP7B utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le cuivre du cytosol vers le milieu extracellulaire et ainsi réduire la concentration intracellulaire et permettre de maintenir l'homéostasie du cuivre. Ces ATPases jouent également un rôle dans la biosynthèse en fournissant du cuivre dans la voie de

sécrétion où il est alors incorporé dans les enzymes à cuivre telles que la dopamine- β -hydrolase ou la ferroxidase (Lutsenko, 2007).

1-3-2-1-2 Les protéines chaperones

Les protéines chaperones, Atox1 '*Antioxidant 1 Copper chaperone*', Cox17 '*Cytochrome C Oxidase Chaperone*' et Ccs1 '*Copper Chaperone for Superoxide Dismutase 1*' permettent de réguler et de conduire le cuivre vers ses sites de fixation dans la cellule. Le cuivre absorbé par les cellules via le transporteur Ctr1 est ainsi distribué à la superoxyde dismutase 1 (SOD1) dans le cytosol via la protéine chaperonne Ccs1, à la cytochrome c oxydase mitochondriale via Cox17 et à la lysyl oxydase dans l'appareil de Golgi par Atox1 (Lutsenko, 2007).

1-3-2-2 Rôle du cuivre dans les neurones

1-3-2-2-1 Neuromodulation de NMDAR et AMPAR

Plusieurs études ont montré que des traitements de cuivre sur des coupes d'hippocampe de rat modulaient la PLT en diminuant la neurotransmission (Goldschmith, 2005 ; Gaier, 2013). Peters et son équipe montrèrent cependant que 10 μ M de cuivre appliqués à des neurones hippocampiques cultivés pendant 3h provoquait une augmentation de la transmission médiée par les AMPARs ce qui suggère donc un effet biphasique du cuivre sur la neurotransmission. Cette augmentation de la transmission s'accompagne de la formation de larges nanodomains de récepteurs AMPARs à la surface de la membrane de la post-synapse. En outre, l'intervention de protéines d'ancrage telle que la PSD-95 est nécessaires pour la formation de ces nanodomains et l'étude de la PSD-95 montre que celle-ci est plus exprimée dans les neurones traités avec le cuivre (Peters, 2011).

1-3-2-2-2 Cuivre et cytosquelette

Comme le zinc, le cuivre pourrait avoir un rôle de régulateur du cytosquelette. En 1972, des études biochimiques montrèrent que l'actine-G et l'actine-F pouvaient lier le cuivre avec une grande affinité et une stœchiométrie de 1 : 1. Le traitement de l'actine avec du N-éthyl-maléimide, un alcène réagissant avec les groupes thiols (-SH), abolit la liaison du cuivre sur l'actine suggérant donc l'intervention d'au moins un groupement -SH d'une des 5 cystéines de l'actine et préférentiellement la cystéine-373 présente au niveau du C-terminal. (Lehrer, 1972). La carboxypeptidase A est une hydrolase enlevant les acides aminés un à un à partir du

résidu présentant le groupement carboxyle libre c'est à dire l'extrémité C-terminal de la protéine ou du peptide. Le traitement de l'actine par la carboxypeptidase A conduit à l'hydrolyse de la phénylalanine-374 ce qui abolit la liaison du cuivre sur l'actine démontrant donc l'implication du C-terminal et de la cystéine-373 dans la fixation du cuivre (Drabikowski, 1977). Outre ces études biochimiques réalisées sur des protéines purifiées, l'interaction du cuivre avec les protéines du cytosquelette est suggérée par des analyses métallogénomiques plus récentes. Ainsi, la séparation des protéines affines au cuivre par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) à partir d'une lignée cellulaire d'hépatome humain a permis d'identifier les tubuline- α et β , l'actine- γ et la cofiline comme des protéines qui pourraient fixer le cuivre dans les cellules (She, 2003 ; Smith, 2004).

1-3-2-3 Dyshoméostasie du cuivre dans les neuropathologies

1-3-2-3-1 Maladies neurodégénératives

Une mutation d'une des deux ATPases transporteuses de Cu^{2+} ATP7A ou ATP7B perturbe l'homéostasie du cuivre et est associée à d'importants troubles neurologiques, respectivement syndrome de Menkes (Kaler, 2014) et syndrome de Wilson (Kaščáková, 2016). Le syndrome de Wilson (OMIM 277900), décrit pour la première fois par Kinneer Wilson en 1912 comme une dégénérescence lenticulaire associée à une cirrhose du foie et survenant au cours de l'enfance (Wilson, 1912) se traduit par une accumulation de cuivre dans le foie et le cerveau causée par l'inefficacité du transporteur ATP7B.

Le syndrome de Menkes (OMIM 309400), du nom du pédiatre John H. Menkes qui l'a décrit en 1962, est due à la mutation du gène codant pour l'ATP7A et fait partie des maladies génétiques liées à l'X. Comme le syndrome de Wilson elle se traduit par une dégénérescence neurologique survenant dès les premiers mois de la vie. Dans ce syndrome, on retrouve une déficience de l'expression de la dopamine-beta-hydroxylase, une enzyme à cuivre qui catalyse l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline, deux neurotransmetteurs de type catécholamine. Le ratio de concentration de ces deux catécholamines est utilisé comme marqueur pour le diagnostic précoce de cette pathologie (Kaler, 2013).

En plus des syndromes de Wilson et de Menkes touchant directement l'expression de transporteur de Cu^{2+} , une dyshoméostasie de cuivre est retrouvée dans plusieurs maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Parkinson. Les plaques amyloïdes formées chez des

patients souffrant d'Alzheimer présentent une accumulation à la fois de zinc et de cuivre (Miller, 2006). Néanmoins on observe un déficit en cuivre dans les régions cérébrales cibles de la neurodégénérescence comme la substance noire pour la maladie de Parkinson (Davies, 2014) ou l'hippocampe pour la maladie d'Alzheimer (Xu, 2017). Dans la maladie d'Alzheimer ce déficit s'étend de manière générale à toutes les régions du cerveau (Xu, 2017).

1-3-2-3-2 Troubles du neuro-développement

L'érythrokratodermie variable de type 3 (OMIM 609313) encore appelée syndrome MEDNIK, acronyme anglais pour retard mental, entéropathie, surdité, neuropathie ichtyose et kéraatodermie est une maladie génétique rare causée par une mutation récessive touchant le gène codant pour AP1S1 (*Adaptor Related Protein Complex 1 Subunit Sigma 1*), sous-unité $\sigma 1$ du complexe adaptateur de clathrine AP1. Il s'agit d'une maladie du métabolisme du cuivre qui d'un point de vue clinique partage des points communs à la fois avec le syndrome de Menkes et celui de Wilson. Il a été mis en évidence que $\sigma 1$ était impliquée dans la régulation du trafic clathrine-dépendant du transporteur ATP7A (Martinelli, 2013).

1-3-3 Autres éléments chimiques

Mis à part le zinc et le cuivre, d'autres éléments chimiques participent aux fonctions cellulaires. Le fer est le métal le plus abondant dans le cerveau. Présents à de faibles concentrations, le manganèse, et le sélénium sont des éléments qui sont essentiels au fonctionnement du système nerveux central (Tableau 1; Davies, 2013).

1-3-3-1 Le fer

On retrouve le fer dans les tissus biologiques sous deux états d'oxydations, le Fe(II) et le Fe(III) ce qui en fait un des cofacteurs enzymatiques le plus commun compte tenu de sa capacité à capter ou à donner un électron. Le fer est transporté dans le sang par la transferrine. Le transfert du fer vers le cerveau se fait par l'intermédiaire de récepteurs à la transferrine présents au niveau des cellules endothéliales du cerveau qui vont lier le fer transporté par la transferrine avant d'être endocytosés. L'entrée du fer dans les neurones est médiée par le transporteur DMT1 '*Divalent Metal Transporter 1*'. Des études suggèrent que le fer joue un rôle dans la plasticité synaptique en générant des espèces réactives de l'oxygène ROS '*Reactive Oxygen Species*' qui vont induire des modifications redox des canaux calciques

à ryanodine conduisant à la phosphorylation de la protéine ERK1/2 et de la protéine CREB, facteur de transcription impliqué dans la régulation de la PLT (Muñoz, 2011 ; Muñoz, 2012). La maladie de Parkinson est une synucléinopathie associée à une concentration élevée de fer dans la substance noire. Cependant les raisons de cette accumulation ne sont pas encore bien établies. Ortega R. et son équipe ont montré que l'exposition de cellules dopaminergiques à un excès de fer conduisait à la sur-expression de l' α -synucléine (Ortega, 2016). Par ailleurs, une dyshomeostasie du fer est retrouvée dans la maladie d'Alzheimer et il a été montré que l'exposition de neurones primaires de souris à un excès de fer conduisait à des perturbations dans le métabolisme de la protéine APP ainsi qu'à une augmentation de la production de peptides amyloïde- β . Ces perturbations sont inhibées par le traitement à la dizolcipine (MK-801), un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDARs, ce qui suggère un rôle des récepteurs NMDARs dans le métabolisme du fer (Becerril-Ortega, 2014). L'analyse des plaques amyloïdes par imagerie de fluorescence X révèle en outre la présence de fer sous forme d'agrégats dans les plaques amyloïdes provenant de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Everett, 2018).

1-3-3-2 Le manganèse

Le manganèse est présent en faible concentration dans les cellules et est essentiel à plusieurs fonctions cellulaires notamment en tant que cofacteur d'enzymes comme par exemple la superoxyde dismutase 2 (SOD2) mitochondriale. Comme les autres métaux, cet élément essentiel devient toxique à haute concentration. Son homéostasie est régulée par différentes protéines de transport, notamment via les transporteurs DMT1, SLC30A10 et ZIP14. Le transporteur SLC30A10 permet l'efflux du manganèse et ainsi de lutter contre des excès toxiques de manganèse. Dans certains syndromes parkinsoniens de type familiaux une mutation du gène codant pour ce transporteur est retrouvée. Tuschl et son équipe rapportèrent également le cas d'enfants présentant des symptômes similaires au syndrome de Wilson mais dus à une accumulation de manganèse. Ces enfants étaient tous porteurs d'une mutation du gène codant pour le transporteur ZnT-10 (ou SLC30A10) (Tuschl, 2008, Tuschl, 2012). Récemment il a été mis en évidence qu'une mutation du gène codant pour ce transporteur était responsable de l'accumulation de manganèse dans l'appareil de Golgi (Carmona, 2019).

1-3-3-3 Le sélénium

Mis en évidence pour la première fois en 1941 par M.J. Horn et D.B. Jones comme composant d'un acide aminé (Horn, 1941) identifié plus tard sous le nom de sélénocystéine, le sélénium est un composant essentiel de plusieurs sélénoprotéines dont la glutathion peroxydase enzyme permettant de lutter contre les radicaux libres (Rotruck, 1973). Dans la majorité des cas, on retrouve la sélénocystéine au niveau du site catalytique de ces enzymes. Parmi les sélénoprotéines, la sélénoprotéine P (ou encore Sepp1) est une protéine riche en sélénocystéines (10 résidus) qui va permettre le transport du sélénium du foie vers les autres organes et tissus dont le cerveau. (Pillai, 2014). Avec des concentrations du même ordre de grandeur que le manganèse, le sélénium est présent dans toutes les régions du cerveau (tableau 1 ; Davies, 2013) et intervient dans plusieurs fonctions physiologiques. Un déficit en sélénium est associé à des troubles neurologiques principalement causées par des défauts dans la régulation du stress oxydant (Zhang, 2012). Sur des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat, des faibles concentrations de sélénium induiraient une augmentation de la densité synaptique (Hagmeyer, 2015). Plusieurs études se sont penchées sur le rôle potentiel du sélénium dans la neurotransmission via différents mécanismes tels que la régulation de l'homéostasie du calcium, la phosphorylation de protéines, l'interaction à des canaux ioniques (Solovyev, 2015), cependant ce rôle reste aujourd'hui encore mal compris.

Chapitre 2

Imagerie super résolution des protéines et nano-chimique des métaux

2-1 La microscopie photonique

Comme toutes les ondes électromagnétiques, lorsque la lumière rencontre un objet, celle-ci a la propriété de diffracter. Cette diffraction induit une limitation dans la résolution du microscope, c'est-à-dire dans la plus petite distance séparant deux points pouvant être indépendamment distingués. Cette limite de résolution a été démontrée par le physicien Ernst Abbe en 1873 comme étant en première approximation le résultat de l'équation

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin(\alpha)} \quad (1)$$

où d correspond à la plus petite distance pouvant être résolue, λ la longueur d'onde d'émission de la lumière et α la moitié de l'angle d'ouverture de l'objectif du microscope. Cette équation fut complétée quelques années plus tard par Hermann Von Helmholtz, celui-ci démontrant que cette résolution dépendait également de l'indice de réfraction utilisé. Ernst Abbe avait en effet réalisé ces expérimentations dans l'air avec un indice de réfraction égale à 1. On note donc la résolution comme

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha)} \quad (2)$$

avec n = indice de réfraction et où $n \cdot \sin(\alpha)$ correspond à l'ouverture numérique NA '*Numerical Aperture*' du microscope.

Ainsi pour un microscope à fluorescence « classique », qui utilise le spectre de la lumière visible, nous obtenons une résolution spatiale généralement comprise entre 200 et 400 nm. Or si nous prenons l'exemple d'une épine dendritique, celle-ci mesure en moyenne 1 μm (Fig. 16). Une résolution de 200 à 400 nm ne permet donc pas de les étudier à l'échelle des compartiments sub-synaptiques précédemment décrits (voir chapitre 1.1).

Près d'un siècle et demi après les travaux des physiciens Abbe et Helmholtz, Eric Betzig, Stefan W. Hell et William E. Moerner reçurent le prix Nobel de chimie en 2014 pour avoir développé des techniques de microscopie dites super-résolutives basées sur l'imagerie de molécules fluorescentes et permettant d'atteindre des résolutions nanométriques, bien inférieures à la limite physique de résolution imposée par la diffraction de la lumière. Ces microscopies de fluorescence super-résolues ont permis de nombreuses avancées pour l'imagerie cellulaire en particulier l'imagerie des cellules neuronales comme l'illustre la figure

16. Les microscopies de fluorescence super-résolutives seront présentées dans les sections suivantes, mais nous reviendrons sur le principe de la microscopie confocale, technique de référence en biologie cellulaire, elle aussi basée sur l'utilisation de molécules fluorescentes.

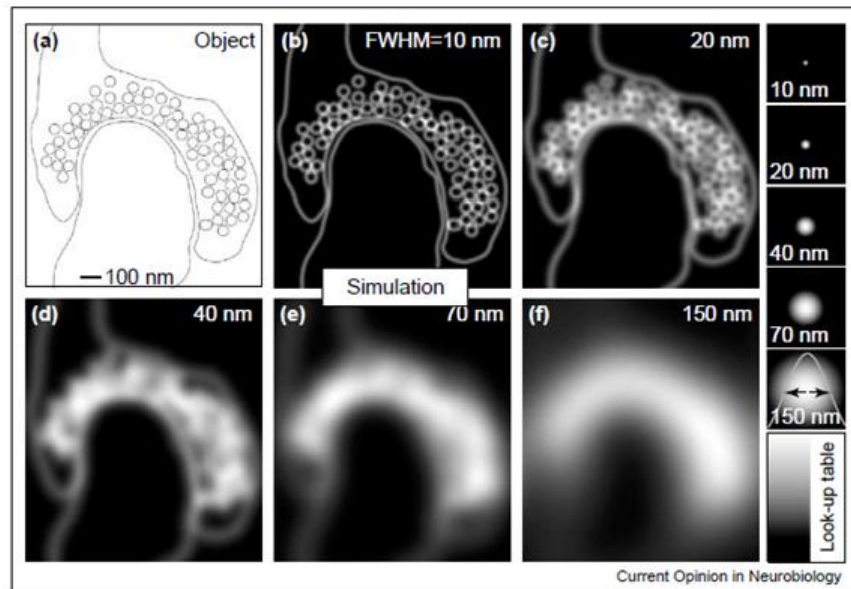


Figure 16 : Simulation d'une synapse excitatrice avec ses vésicules synaptiques dans la pré-synapse et qui serait imagée à différentes résolutions spatiales montrant que nous ne pouvons distinguer séparément les vésicules synaptiques qu'au-dessous d'une résolution de 40 nm. D'après Hell, 2004.

2-1-1 La microscopie confocale

La microscopie confocale nécessite la fluorescence des objets d'intérêts. Les organites ou protéines devront donc au préalable être marqués de manière spécifique avec des fluorophores. Un fluorophore est une molécule qui excitée à une certaine longueur d'onde va pouvoir émettre de la lumière à une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde d'excitation. Le principe de fluorescence peut être résumé sous la forme d'un diagramme de Jablonski, où S_0 et S_1 correspondent respectivement à l'état fondamental et l'état excité, après absorption d'un photon. La relaxation vibrationnelle correspond à une dissipation d'énergie de la molécule vers les molécules voisines et s'accompagne donc d'une perte d'énergie (Fig. 17a). Le décalage entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission, connu sous le nom de déplacement de Stokes confère au fluorophore ses propriétés (Fig. 17b).

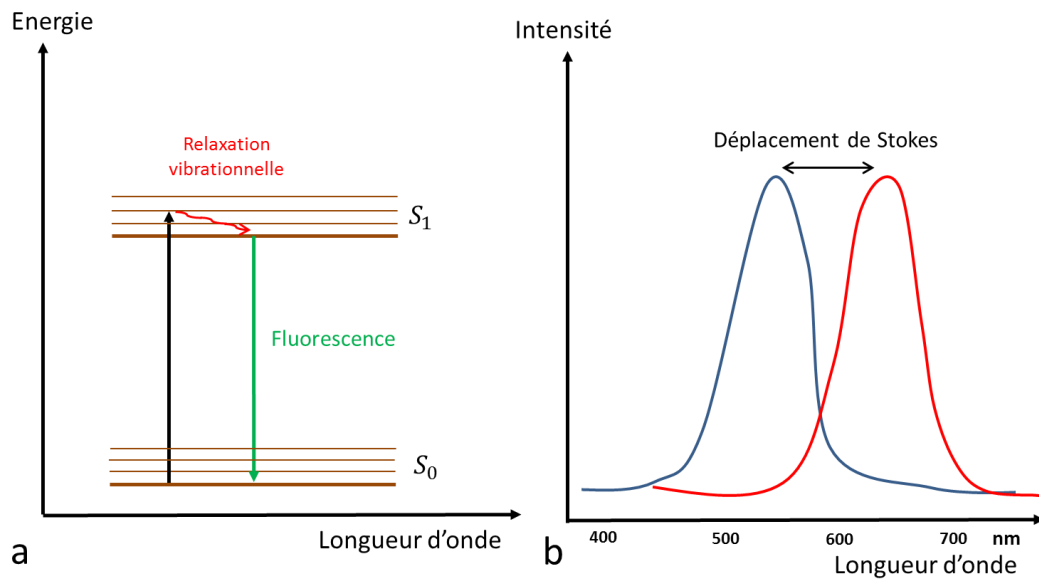


Figure 17: Principe de la fluorescence. a) Diagramme de Jablonski montrant les changements d'état énergétique du fluorophore après avoir été excité par un photon. Le fluorophore est initialement dans son état fondamental S_0 . Après avoir absorbé un photon il se retrouve à l'état S_1 plus haut en énergie. Une partie de cette énergie est dissipée et correspond à la relaxation vibrationnelle puis le fluorophore retourne à son état fondamental en émettant de la fluorescence. b) Déplacement de Stokes. En bleu, le spectre d'excitation du fluorophore et en rouge le spectre d'émission. Le décalage entre les deux spectres correspond au déplacement de Stokes.

Le microscope confocal a été inventé par Marvin Minsky et breveté en 1957 (Minsky, 1957). Ce microscope permet d'améliorer les résolutions latérales et axiales et donc les analyses tridimensionnelles des objets biologiques. Il se caractérise par l'utilisation d'une source brillante, de type laser.

Le principe du microscope confocal est basé sur une illumination focalisée et l'utilisation d'un diaphragme très fermé appelé *pinhole* disposé entre la lentille et le détecteur. Ainsi, la lumière située en dehors du plan focal n'atteint pas le détecteur. Cette focalisation est rendue possible par l'utilisation d'un faisceau laser. Le laser et le *pinhole* sont des éléments statiques cependant le point où ils vont être focalisés est déplacé sur l'échantillon par balayage pixel par pixel en utilisant des miroirs oscillants (Sanderson, 2014). L'image obtenue est alors plus nette et correspond à une seule section de l'échantillon. La fermeture du *pinhole* est ajustable ce qui permet de faire varier l'épaisseur de l'échantillon analysée ainsi que la

résolution. Plus il sera fermé plus l'image obtenue sera nette. La résolution latérale se retrouve alors légèrement améliorée par rapport à la distance donnée par la loi d'Abbe en

$$d = \frac{0,4.\lambda}{n.\sin(\alpha)} \quad (3)$$

Cependant la microscopie confocale reste toujours confrontée au problème posé par la diffraction de la lumière.

2-1-2 Présentation des microscopies de super résolution

La stratégie développée par Eric Betzig et William E. Moerner pour pallier au problème de diffraction de la lumière est d'utiliser les propriétés des fluorophores en les excitants tour à tour afin de pouvoir distinguer des molécules uniques et de remplacer le critère de séparation de deux points par un critère de localisation de source unique. Deux techniques se basent sur cette stratégie, la microscopie par localisation photo-activée ou PALM '*Photo Activated Localization Microscopy*' et la microscopie de reconstruction optique stochastique ou STORM '*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*' offrant une résolution spatiale latérale de l'ordre de 25 nm à 65 nm (Fig. 19) (Izeddin, 2011). Les fluorophores utilisés pour les microscopies PALM et STORM possèdent un état non fluorescent et un état fluorescent, ils sont photo-activables (PALM) ou ont la capacité de clignoter (STORM). Le PALM se base sur la combinaison de deux lasers, un laser UV et un laser de lecture. Le laser UV active les fluorophores de manière stochastique. En choisissant une faible puissance UV, seule une petite fraction des molécules est activée, permettant d'isoler des molécules individuelles. Le laser de lecture permet ensuite de visualiser les fluorophores qui ont été activés. En STORM, les fluorophores sont poussés dans un état noir par illumination intense, ils reviennent ensuite stochastiquement vers un état fluorescent en clignotant, ce qui permet d'isoler des molécules individuelles. Les centroïdes de chacune des molécules fluorescentes sont alors calculés et considérés comme un pixel de l'image finale super-résolue. Le processus est répété des milliers de fois et l'image est reconstruite par addition des centroïdes (Fig. 18) (Betzig, 2006).

Il existe des différences entre les techniques PALM et STORM notamment quant à la préparation des échantillons et le type de fluorophore utilisé. La microscopie STORM utilise des fluorophores organiques de type cyanine tandis que la microscopie PALM utilise des protéines fluorescentes variantes de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) (MacDonald, 2015). Dans le cas du STORM les protéines d'intérêts sont marquées par immunomarquage avec des

anticorps et doit se faire en absence d'oxygène pour éviter le photoblanchiment des fluorophores. Cette technique nécessite donc la fixation chimique des échantillons. Dans le cas du PALM, les cellules sont transfectées de manière à exprimer le gène codant pour la protéine d'intérêt (ou une protéine ligand) liée à la protéine fluorescente. La microscopie PALM présente donc l'avantage d'être compatible avec l'imagerie sur cellules vivantes.

Une autre stratégie en microscopie de super résolution consiste à diminuer directement la taille du point focal de fluorescence. C'est le principe utilisé dans la microscopie de déplétion par émission stimulée ou STED '*STimulated Emission Depletion microscopy*', développée par Stefan W Hell. En plus du laser d'excitation celle-ci met en jeu un laser de déplétion en forme de tore qui va dépléter la fluorescence périphérique du point focal pour ne garder que la fluorescence de cœur. Nous aborderons plus en détail cette technique dans le paragraphe suivant.

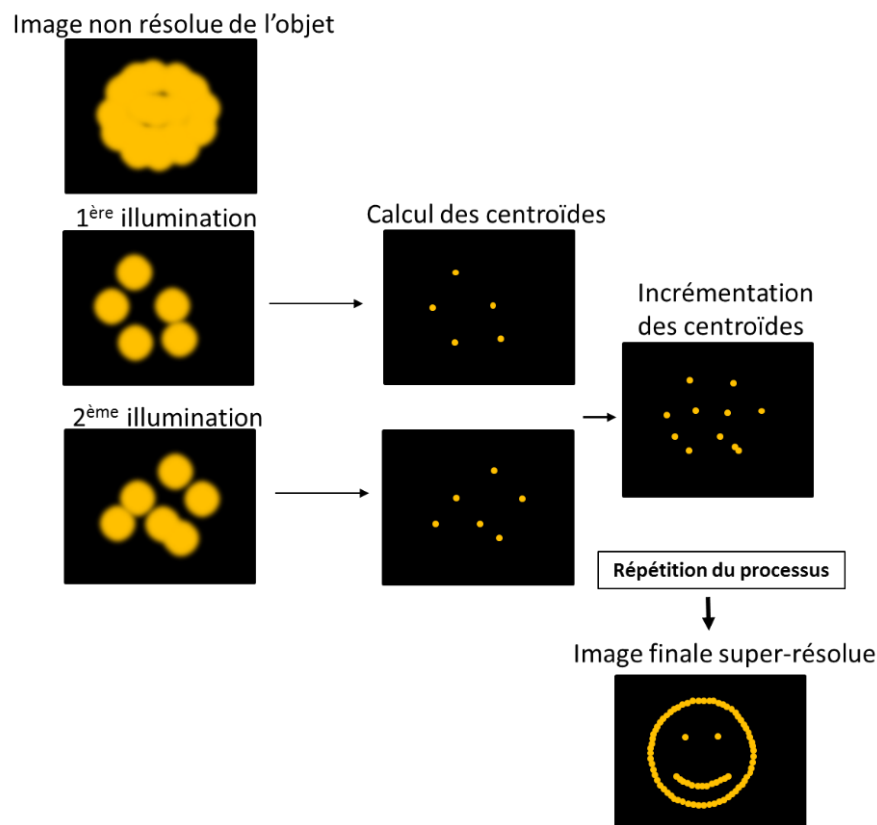


Figure 18 : Principe des microscopies super résolutive PALM et STORM. L'application d'un flash UV court permet de faire passer un petit nombre de fluorophores à l'état fluorescent et de visualiser des molécules uniques. Les centroïdes des points de fluorescence sont calculés et le processus est répété de très nombreuses fois jusqu'à l'obtention d'une image super-résolue.

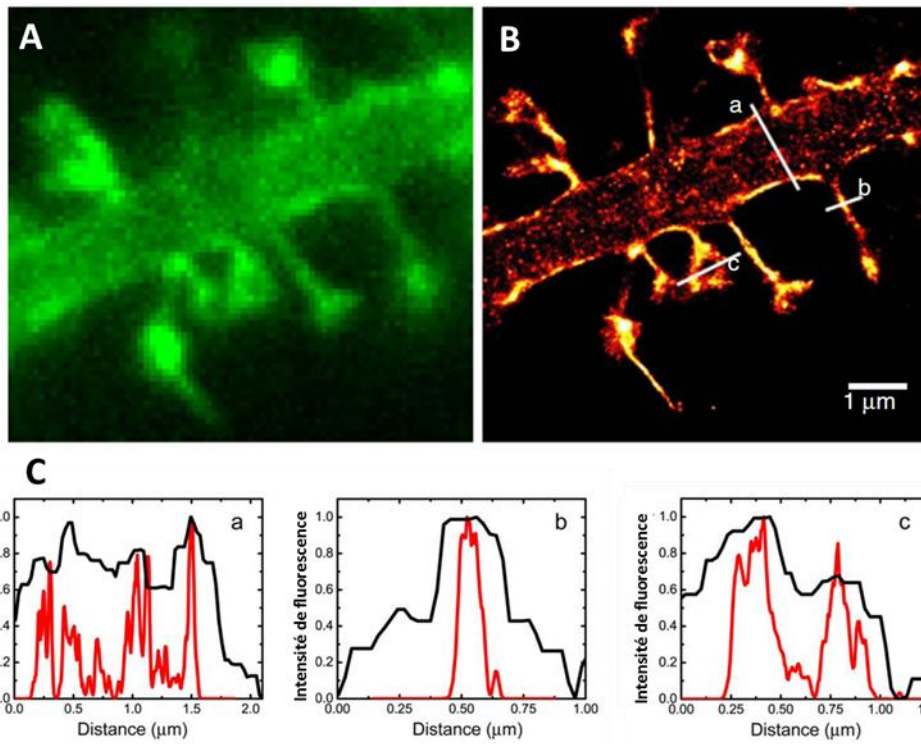


Figure 19 : Microscopie super résolutive PALM d'épines dendritiques de neurone primaire d'hippocampe de rat exprimant ABP-tdEosFP (marquage actine). A) microscopie de fluorescence conventionnelle. B) Même région imagée en super résolution PALM. C) Profils (a) dendrite, b) cou de l'épine et c) tête de l'épine, montrant les résolutions obtenues en microscopie conventionnelle (noire) et microscopie super résolutive PALM (rouge). D'après Izeddin, 2011.

2-1-3 Microscopie de déplétion par émission stimulée (STED)

La microscopie STED permet d'obtenir une résolution latérale de l'ordre de 30 à 80 nm en se basant sur le principe de l'émission stimulée. L'émission stimulée est un principe de physique atomique décrit par Albert Einstein selon lequel un atome excité interagissant avec un photon incident peut revenir à un état énergétique inférieure en émettant un photon présentant la même phase et la même direction que le photon incident. Ainsi, lorsqu'un fluorophore est excité par un laser, l'application d'une seconde illumination avec une énergie différente de celle du laser d'excitation provoque le retour du fluorophore à son état fondamental et l'émission d'un photon ayant les mêmes propriétés que le photon provenant de cette deuxième excitation. L'émission de fluorescence n'est donc plus spontanée et isotropique mais stimulée et directionnelle, ce qui permet de ne pas l'enregistrer dans la technique d'épifluorescence. Pour cela les fluorophores sont tout d'abord excités avec un laser d'excitation conventionnel puis reçoivent, pendant qu'ils sont excités, une deuxième

illumination provenant d'un second laser appelé laser STED ou laser de déplétion qui a une forme de tore. Il n'y aura pas d'émission de la fluorescence isotropique autour du point d'excitation et la tâche de diffraction devient alors plus petite ce qui permet d'augmenter considérablement la résolution (Fig. 20) (Hell, 1994 ; Nägerl, 2008 ; Tam, 2015).

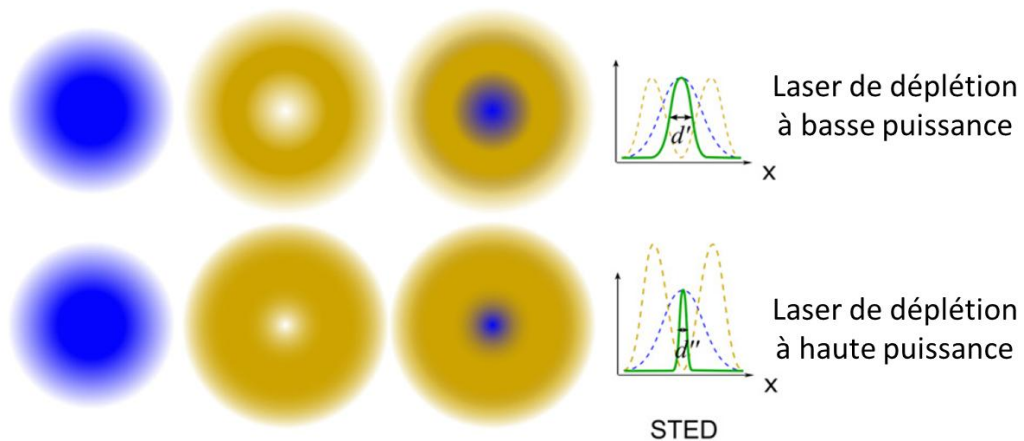


Figure 20: Principe de la microscopie STED. Images des points d'excitation (bleu) et de déplétion (jaune) ainsi que la superposition des deux montrant l'annulation de la fluorescence périphérique pour ne garder que la fluorescence au centre de l'excitation. En haut, lorsque la puissance du laser de déplétion est basse et en bas lorsque la puissance est élevée. A droite, représentation des courbes d'intensité associées. Adapté de Tam, 2015.

La relation donnée par la loi d'Abbe $d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha)}$ se trouve alors modifiée en

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha) \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}} \quad (5)$$

Elle tient en compte l'indice de saturation I_{sat} propre à chaque fluorophore et l'intensité maximale I du laser STED. Ainsi plus le rapport $\frac{I}{I_{sat}}$ est grand, meilleure est la résolution.

2-1-4 Trajet optique d'un microscope STED

Afin de décrire le trajet optique d'un microscope STED nous prendrons pour exemple le microscope STED Leica DMI6000 TCS SP8 X sur lequel nous avons travaillé. Le microscope

comprend plusieurs sources de lumière pour l'excitation et la déplétion. Il comprend un laser diode (405 nm), un laser supercontinuum (470 nm à 670 nm) et trois lasers STED (592 nm, 660 nm et 775 nm). Le faisceau d'excitation est identique à celui d'un microscope confocal classique. La forme caractéristique en tore du spot de déplétion est obtenue en utilisant une lame de phase $\frac{1}{2}$ onde. Le faisceau provenant du laser d'excitation et le laser STED sont focalisés sur l'objet au moyen de lentilles pour respectivement l'excitation et l'émission stimulée. L'utilisation de miroirs dichroïques permet de réfléchir la lumière vers l'échantillon en laissant passer une partie des longueurs d'onde (Fig. 21) (Sanderson, 2014). Ils contribuent ainsi à limiter le bruit de fond. L'objectif, à immersion dans le glycérol, est constitué de lentilles convergentes permettant la focalisation de la lumière en un point focal sur l'échantillon. Le signal provenant de l'échantillon est détecté par un détecteur hybride ou un photomultiplicateur. L'image est obtenue par balayage des faisceaux sur l'objet. L'objet est placé sur un plateau motorisé permettant les déplacements en X, Y et Z. Un plateau galvanométrique est utilisé pour les acquisitions rapides et précises en Z.

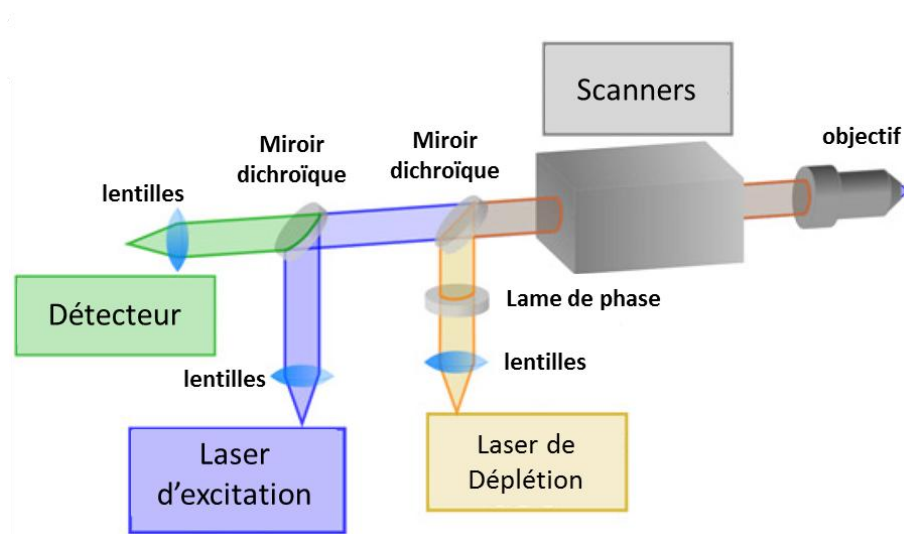


Figure 21 : Schéma du trajet optique du microscope STED. Une lame de phase est utilisée pour obtenir la forme de tore du spot de déplétion. Les faisceaux d'excitation et de déplétion sont focalisés sur l'échantillon au moyen de lentilles et de miroirs dichroïques. L'échantillon est scanné pixel par pixel. D'après Tam, 2015.

2-2 Microscopie synchrotron

2-2-1 Principe du rayonnement synchrotron

D'après les équations du physicien Maxwell, lorsqu'une particule chargée est soumise à une accélération elle émet un rayonnement électromagnétique. Ainsi le rayonnement synchrotron provient de la lumière émise dans des accélérateurs circulaires (anneaux de stockage) par des particules chargées, telles que des électrons ou des positons, et accélérées à une vitesse proche de celle de la lumière. Ce rayonnement a la propriété d'être extrêmement intense. Le rayonnement synchrotron est émis sur une large gamme de longueurs d'ondes, des rayons X à l'infrarouge. Plusieurs installations de rayonnement synchrotron ont été construites à travers le monde parmi lesquelles l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble) et SOLEIL, en France, ou DIAMOND en Angleterre, pour ne citer que les installations sur lesquelles nous avons travaillé. Chacune présente des caractéristiques quelque peu différentes en termes de gamme d'énergie ou de brillance. Nous prendrons pour exemple l'ESRF afin d'illustrer le principe de production et les caractéristiques du rayonnement synchrotron (Fig. 22).

Pour le synchrotron européen ESRF, la brillance atteint 10^{21} photons/[s.mm².mrad².0,1%bande passante] et sera multipliée d'un facteur 100 avec l'installation d'une nouvelle source prévue pour 2020. Les électrons sont émis par un canon à électrons puis accélérés dans un accélérateur linéaire (linac) par des champs électriques jusqu'à atteindre une énergie de 200 MeV. Ils sont ensuite envoyés dans un « booster » où ils vont gagner de l'énergie à chaque tour. Lorsqu'ils atteignent une énergie de 6 GeV ils sont injectés dans l'anneau de stockage. Dans cet anneau (844 m de circonférence pour le synchrotron ESRF), les électrons circulent sous un vide de 10^{-9} mbar et à une vitesse proche de celle de la lumière et quasi constante grâce à des cavités accélératrices radiofréquences qui réinjectent périodiquement de l'énergie aux électrons. Les électrons peuvent être injectés vers l'anneau de stockage selon plusieurs modes de remplissage. En mode multi-paquets uniforme, les électrons sont répartis tout au long de l'anneau en 992 paquets ce qui permet de fournir aux lignes de faisceau un flux maximal et un courant de 200 mA pendant environ 60h. Des champs magnétiques, produits par les éléments de courbures (BM, *bending magnets*) dévient les électrons qui perdent alors leur énergie sous forme de rayonnement

synchrotron et prennent une direction tangentielle à celle des électrons. Les éléments d'insertion (ID, *insertion device*) permettent d'obtenir des faisceaux beaucoup plus intenses que ceux produits par les aimants de courbures. Ils sont constitués de petits aimants polarisés alternés forçant les électrons à suivre une trajectoire oscillante mais globalement rectiligne. On distingue deux catégories d'éléments d'insertion, les wigglers et les onduleurs. Les wigglers fournissent un spectre d'énergie continu dans une gamme d'énergie choisie tandis que les onduleurs permettent d'obtenir une source de très grande intensité sur une énergie donnée et ajustable.

Le synchrotron ESRF comprend 43 lignes de lumière pour des applications dans les domaines de la physique, de la chimie, des matériaux, des sciences de la vie, ou pour la recherche biomédicale. Nous avons utilisé la ligne ID16A '*Insertion Device 16 A*' pour la nano-imagerie de fluorescence-X et de contraste de phase à très haute résolution.

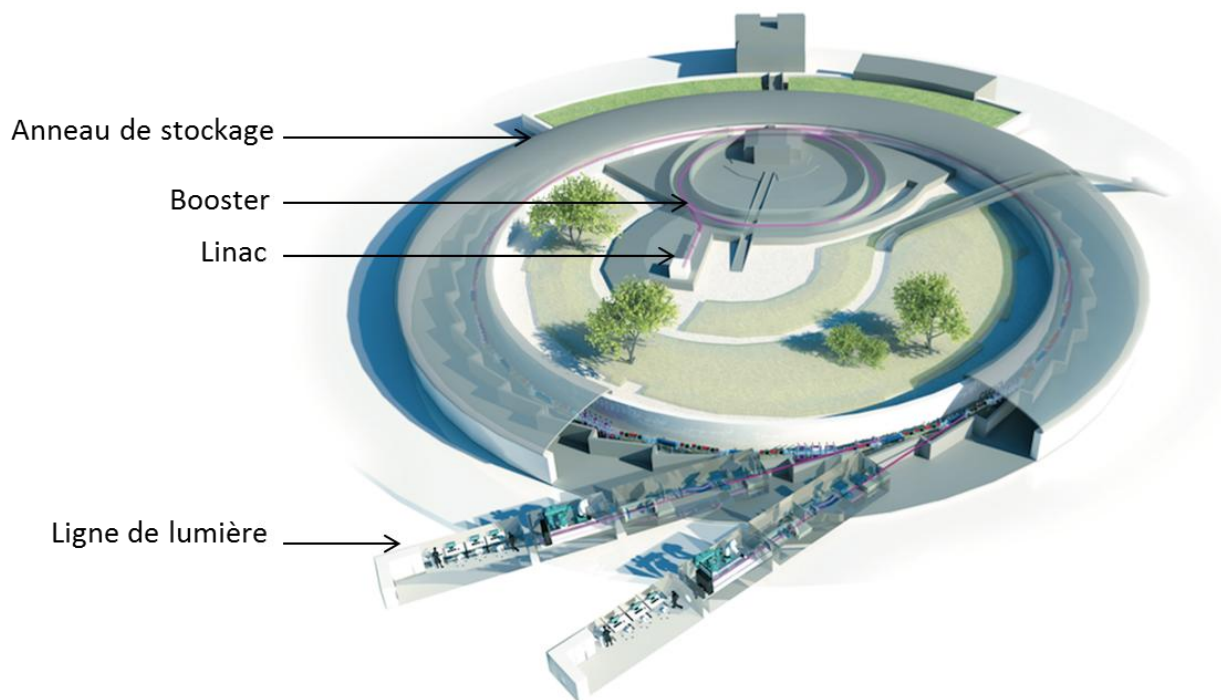


Figure 22: Schéma montrant les principales structures d'une installation de production de rayonnement synchrotron. Les électrons sont produits au niveau du linac puis accélérés jusqu'à 200 MeV, injectés dans le booster où ils atteignent une énergie de 6 GeV puis introduits dans l'anneau de stockage. Ils sont déviés par des aimants de courbures (BM, *bending magnet*) ou des éléments d'insertion (ID, *insertion device*) et produisent alors le rayonnement synchrotron dirigé vers les lignes de lumière. <https://www.esrf.eu/>

Chaque ligne de faisceau est spécialisée dans quelques techniques précises ou bien dans un domaine de recherche. Disposée de façon tangentielle à l'anneau de stockage, elle comprend trois cabines, une cabine optique, une cabine expérimentale et une cabine de contrôle. La cabine optique contient les éléments optiques tels que les monochromateurs et les miroirs qui servent à sélectionner la taille et l'énergie du rayonnement. Cette cabine est située contre l'anneau de stockage.

La source est polychromatique et appelée faisceau blanc. Ce faisceau blanc est rendu monochromatique au moyen d'un monochromateur. Le monochromateur sélectionne la longueur d'onde nécessaire pour l'expérience par réflexion de Bragg sur un monocristal. L'utilisation de deux cristaux permet d'obtenir un faisceau monochromatique parallèle au faisceau incident. Selon la nature du monocristal la transmission et la résolution en énergie varient. On distingue notamment les monochromateurs à silicium Si(111) ou à germanium Ge(220) où $\Delta E/E \sim 10^{-4}$. Le premier cristal est refroidi à l'azote liquide.

La cabine expérimentale comprend le dispositif de montage de l'échantillon, l'échantillon, les éléments de focalisation ainsi que les différents détecteurs. Enfin la cabine de contrôle permet de piloter les analyses. Les cabines optique et expérimentale sont verrouillées avant que les obturateurs ne laissent le faisceau pénétrer dans les cabines. La cabine de contrôle reste alors la seule accessible.

2-2-2 Focalisation du rayonnement synchrotron

Les miroirs Kirkpatrick-Baez (Kirkpatrick, 1948) permettent d'orienter et de nanofocaliser le faisceau par réflexion (Fig. 23) (Snigirev, 2008 ; Da Silva, 2017). Ces systèmes optiques se composent de deux miroirs présentant chacun une forme elliptique. Leur forme permet d'éviter les aberrations sphériques, c'est-à-dire le fait que tous les rayons ne convergent pas au même point, phénomène que l'on retrouve habituellement avec les autres miroirs incurvés. Un système de pliage mécanique développé à l'ESRF permet au miroir d'obtenir leur courbure optimale pour l'expérience. Afin d'augmenter la réflectivité ces miroirs peuvent être multicouches. Les miroirs Kirkpatrick-Baez sont formés de couches consécutives de deux matériaux présentant des index de réfraction différents. L'index de réfraction varie alors périodiquement avec la profondeur.

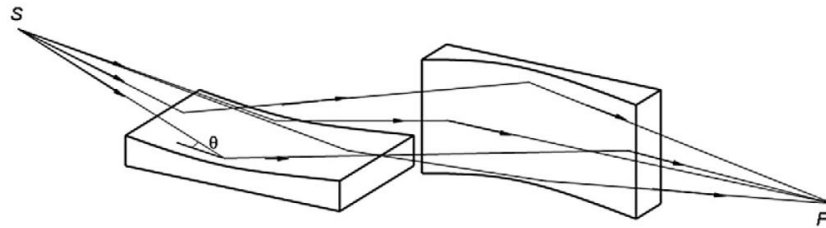


Figure 23 : Schéma de deux miroirs Kirkpatrick-Baez avec S, la source, θ l'angle d'incidence des miroirs et F le focus. D'après Snigirev, 2008.

Les lentilles de Fresnel permettent également d'orienter et de focaliser le faisceau incident en un point focal avec une très bonne résolution mais cette fois-ci par diffraction du faisceau. Elles sont cependant plus efficaces pour une utilisation dans la gamme d'énergie des rayons-X mous (100 eV à 10 keV). Ces lentilles consistent en une série d'anneaux concentriques de longueur de rayons décroissante et alternant anneaux opaques et anneaux transparents (Fig. 24) (Snigirev, 2008 ; Pépin, 2000). La lumière est arrêtée par les anneaux opaques et diffracte des anneaux transparents. Les interférences constructives se retrouvent modifiées après avoir traversé la lentille.

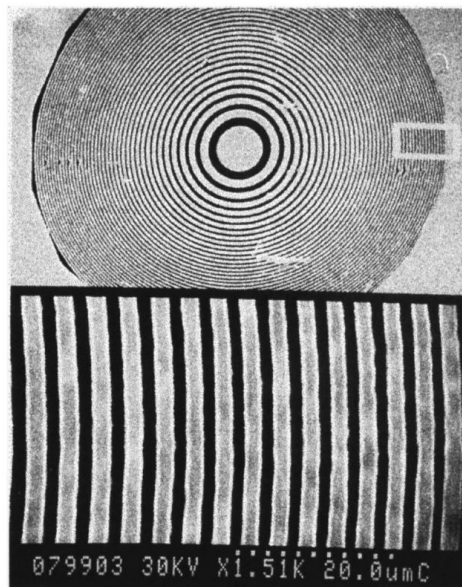


Figure 24 : Lentille de Fresnel vue par microscopie électronique. Cette lentille est constituée d'anneaux concentriques opaques et transparents. Le plus grand rayon de cette lentille mesure 25 μm et le rayon du plus petit anneau 0,25 μm . D'après Pépin, 2000.

2-2-3 Méthodes d'imagerie chimique

2-2-3-1 La nano-imagerie par spectrométrie de fluorescence-X synchrotron

La spectrométrie de fluorescence-X synchrotron (SXRF, 'Synchrotron X-Ray Fluorescence') est une technique permettant d'analyser la composition chimique élémentaire d'un échantillon de manière quantitative. Cette technique s'appuie sur le principe de fluorescence X suivant : lorsqu'un photon rentre en collision avec un électron d'une des couches électroniques d'un atome, si cet électron présente une énergie de liaison inférieure à l'énergie du photon incident alors celui-ci est éjecté et la lacune électronique induite est comblée par un électron venant d'une des couches électroniques supérieures. Cette transition électronique libère l'énergie correspondant à la différence d'énergie des niveaux impliqués, il y a alors émission d'un rayonnement X secondaire, dit de fluorescence X. L'énergie de rayonnement de fluorescence est caractéristique de l'élément chimique émetteur (Fig. 25a). La transition électronique de la couche électronique L vers la couche K est appelée K_{α} , la transition de la couche M vers la couche K, K_{β} , de la couche M vers la couche L, L_{α} , et ainsi de suite (Fig. 25b). L'analyse XRF peut être réalisée avec différentes sources de rayonnement X. Dans le cas d'utilisation d'une source synchrotron, l'analyse SXRF bénéficie de la grande brillance de la source et permet l'analyse d'éléments en faible concentration dans l'échantillon.

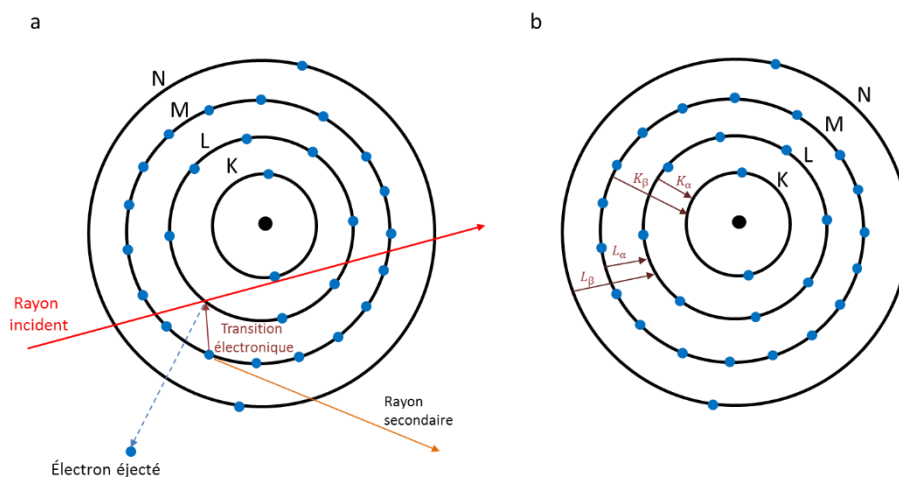


Figure 25 : Principe de spectrométrie de fluorescence-X. a) Lorsqu'un rayon X incident rencontre un électron d'une couche électronique d'un atome, celui-ci est éjecté et il y a transition électronique et émission d'un rayonnement X secondaire. b) Schéma montrant les différentes transitions électroniques selon la couche électronique. La transition de la couche L vers K donne lieu à l'émission de rayonnement X secondaire appelé K_{α} , de la couche M vers K, K_{β} , de la couche M vers L, L_{α} et ainsi de suite.

Cette technique repose sur l'utilisation d'une source monochromatique afin de faciliter l'interprétation des spectres en particulier pour la quantification des teneurs en éléments chimiques. Lorsqu'elle est mise en œuvre avec un faisceau focalisé et avec un système de déplacement de l'échantillon, la méthode SXRF permet l'imagerie de la distribution des éléments chimiques.

Des détecteurs placés selon une géométrie de rétrodiffusion permettent de recueillir la fluorescence X émise par l'échantillon. L'échantillon est scanné pixel par pixel. Pour chaque pixel, un spectre des énergies de fluorescence X est obtenu correspondant à l'ensemble des éléments chimiques détectables de l'échantillon dont les énergies d'émission sont inférieures à l'énergie du faisceau incident (Fig. 26). Les cartographies des distributions de chaque élément sont ensuite reconstituées par analyse de ces spectres. La quantification des éléments chimiques est effectuée en utilisant un échantillon de référence standard multiélément analysé dans les mêmes conditions que les échantillons.

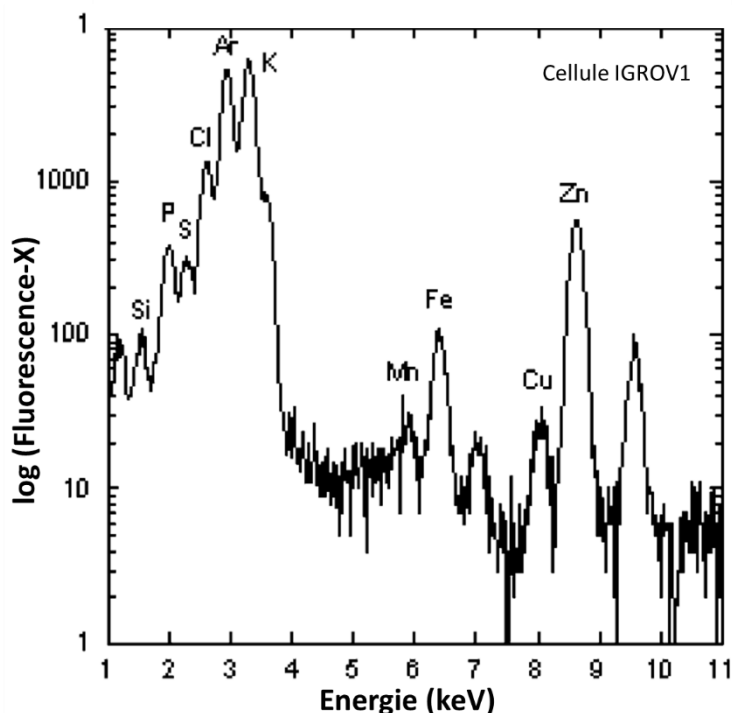


Figure 26 : Spectre somme montrant la composition en éléments chimiques d'une cellule cancéreuse (lignée IGROV1) et obtenue par spectrométrie de fluorescence-X sur la ligne ID22 à l'ESRF. D'après Ortega, 2004.

2-2-3-2 La nano-imagerie par contraste de phase

Les rayons-X qui traversent de la matière peuvent être déviés par l'objet et par conséquent cela se traduit par une modification de leur phase. Ces déphasages peuvent être calculés afin de déterminer la structure d'objets qui sont 'transparents' tels que les échantillons biologiques (Zernike, 1942). La diffraction provoquée par l'objet sur les ondes est donnée par l'équation

$$\varphi(x) = -\frac{2\pi}{\lambda} \int \delta(x, y, z) dz \quad (6)$$

où z correspond à l'axe de propagation de l'onde et δ à la différence d'indice de réfraction de l'objet par rapport à l'air ($1-n$). L'imagerie de contraste de phase cherche donc à recalculer cette fonction qui présente le décalage de phase provoqué par l'objet et permet donc de caractériser précisément la structure de cet objet. Pour ce projet nous avons utilisé le contraste de phase en complément de la spectrométrie SXRF sur la ligne ID16A, ce qui nous a permis de cartographier à la fois la distribution des éléments chimiques dans les neurones mais également d'obtenir des informations sur la structure de notre échantillon avec la même résolution (Kosior, 2012).

2-2-4 Description des lignes synchrotron utilisées

2-2-4-1 ID16A (ESRF)

La ligne ID16A du synchrotron ESRF mesure 185 m de long et permet de travailler dans la gamme des rayons-X durs (>10 keV) (Fig. 27). Elle utilise deux onduleurs, un onduleur ayant une période de 18,3 mm et fournissant une source de 17 keV et un onduleur ayant une période de 22,4 mm et fournissant une source de 33,6 keV. Le monochromateur est un monochromateur à multicouches à miroir sphérique ayant un angle d'incidence de 8 mrad et qui focalise le faisceau horizontalement vers la source secondaire. Cette ligne comprend deux paires de miroirs de focalisation Kirkpatrick-Baez à couches multiples (ou miroirs KB), une pour chacune des énergies, 17 keV et 33,6 keV. Elle permet de travailler à de très haute résolution spatiale avec une taille de faisceau pouvant descendre jusqu'à 13 nm (Da Silva, 2017). La taille du faisceau est déterminée dans les dimensions verticale et horizontale par méthode de « *knife-edge* ». Cette méthode consiste à balayer avec le faisceau un objet de lithographie pointu et enregistrer la fluorescence X émise pour déterminer la largeur du faisceau dans chacune des directions verticale et horizontale (Da Silva, 2017). ID16A présente un flux

supérieur à 10^{12} photon/s à $\Delta E/E \sim 1\%$ ce qui lui confère une très haute sensibilité. Elle est dotée de deux détecteurs à dispersion d'énergie disposés de part et d'autre de l'échantillon ce qui rend possible la détection de très faibles concentrations d'éléments, comme nous le verrons dans le chapitre 'résultats'. Elle présente également un microscope optique à longue distance de travail permettant de placer l'échantillon dans le plan focal. Récemment dotée d'un système cryostat cette ligne de lumière permet l'analyse d'échantillons à température ambiante ou bien refroidis à la température de l'azote liquide. Elle permet d'étudier la composition chimique et la morphologie de l'échantillon au moyen de plusieurs types d'analyse comme la spectrométrie de fluorescence-X et l'imagerie de contraste de phase. Ces analyses peuvent être réalisées en 2D ou en 3D (tomographie).

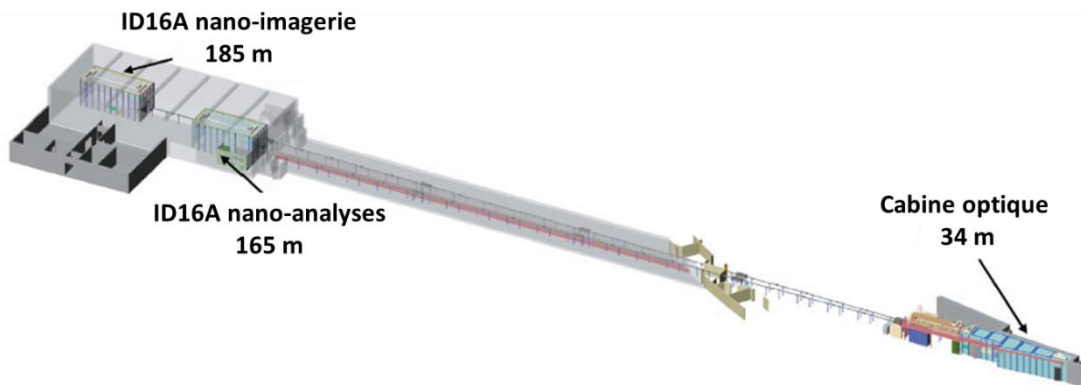


Figure 27 : Schéma de la ligne ID16A montrant les dispositions des différentes cabines optique, expérimentale et de contrôle ainsi que leur distance de l'anneau de stockage. <https://www.esrf.eu/>

2-2-4-2 Nanoscopium (SOLEIL)

Le synchrotron SOLEIL est un synchrotron français situé à Saint-Aubin près de Paris et comprenant 29 lignes de lumières dont la ligne Nanoscopium (Fig. 28). Cette ligne de lumière mesure 155 m de long et permet de travailler dans la gamme des rayons-X durs (Somogyi, 2015). La source est produite par un onduleur U18 cryogénisé couvrant une gamme d'énergie de 5 à 20 keV et ayant une période de 18 mm et un nombre de périodes de 107. La source traverse ensuite un diaphragme mobile de 800 μm de diamètre qui permet de supprimer les parties les plus divergentes du faisceau (les très basses énergies). Les miroirs M1 et M2 présentant un angle d'incidence de 5 mrad ($0,29^\circ$) permettent respectivement la

défocalisation verticale et horizontale du faisceau et la réduction de la puissance du faisceau. Le monochromateur est cryogénisé de type Si(111) à doubles cristaux DCM (*Double-crystal fixed-exit monochromator*) permettant d'obtenir un faisceau monochromatique parallèle au faisceau incident. La source secondaire, située à 81,6 m de l'onduleur assure la stabilité du faisceau et se présente sous la forme d'un collimateur ou d'un ensemble de fentes dont l'ouverture est ajustable dans les deux dimensions. Le faisceau est ensuite focalisé dans la cabine expérimentale. La ligne Nanoscopium comprend deux cabines expérimentales EH1 et EH2 pour la nanosonde comportant les détecteurs de fluorescence X et de faisceau transmis où le faisceau est focalisé au moyen d'une lentille de Fresnel et de miroirs KB.

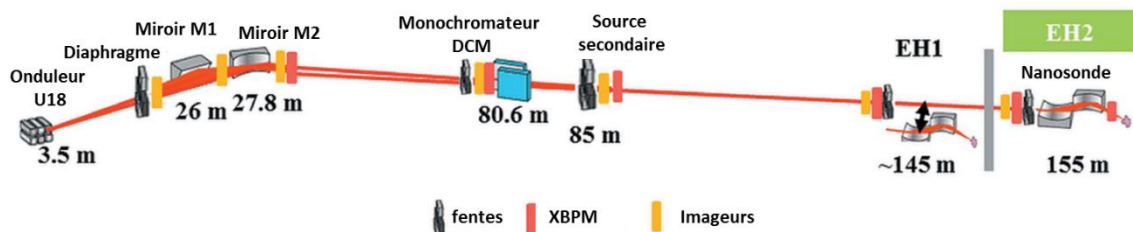


Figure 28 : Trajet optique de la ligne Nanoscopium. La source est produite au niveau de l'onduleur U18 puis traverse un diaphragme de 800 μm . Le faisceau est ensuite défocalisé au moyen des miroirs M1 et M2. Le monochromateur à double cristaux permet alors d'obtenir une source monochromatique qui est focalisée dans la cabine expérimentale au moyen de la lentille de Fresnel et des miroirs KB sur l'échantillon. La ligne comprend deux cabines expérimentales EH1 et EH2. D'après Somogyi, 2015.

2-2-4-3 HERMES (SOLEIL)

La ligne HERMES '*High Efficiency and Resolution beamline dedicated to X-ray Microscopy and Electron Spectrometry*' est une ligne de faisceau du synchrotron SOLEIL (Fig. 29) permettant de travailler dans la gamme des X-mous ($< 2,5 \text{ keV}$). Elle combine spectromicroscopie d'émission des photoélectrons XPEEM, '*X-ray PhotoEmitted Electron Microscopy*' avec un flux sur échantillon de 5.10^{12} ph/s et microscopie de rayonnement-X en transmission par balayage (STXM) '*Scanning Transmission X-ray Microscopy*' avec un flux sur échantillon de 1.10^{11} ph/s (Belkhou, 2015). Elle dispose de deux onduleurs hélicoïdaux de type APPLE-II couvrant une gamme d'énergie comprise entre 70 eV et 2,5 keV : l'onduleur HU64 '*Helical Undulator*' pour les basses énergies comprises entre 70 eV et 600 eV et l'onduleur HU42 pour les énergies plus hautes (0.5-2,5 keV) (Fig. 30). Elle permet donc de travailler aux

seuils d'énergies K des éléments légers (C, N, O ainsi que S et P) et L des éléments tels que Zn et Cu. Le premier élément optique comprend trois miroirs qui s'associent par deux en mode chicane. Un miroir plan M1A et deux miroirs en forme de tore M1B et M1C. M1B associé à M1A est optimisé pour les énergies inférieures à 800 eV. Avec un angle d'incidence élevé ($2,5^\circ$) ces miroirs permettent d'améliorer la pureté du spectre en rejetant une partie de la contamination induite par la seconde harmonique. M1C associé à M1A avec un angle d'incidence de $1,2^\circ$ est optimisé pour les énergies hautes, supérieures à 800 eV. Elle permet d'atteindre des résolutions spatiales inférieures à 20 nm. Le monochromateur est à réseau plan PGM '*Plane grating monochromator*'. Il comprend deux types de réseaux : un réseau multicouches pour les hautes énergies et un réseau de type VLS-VGD '*Variable line Spacing et Variable Groove Depth*' pour les basses énergies optimisant le rejet des harmoniques supérieures. Les miroirs M4 et M5 permettent ensuite de défléchir le faisceau vers les deux types de techniques XPEEM et STXM. Pour la spectromicroscopie XPEEM le faisceau est focalisé au moyen de miroir Kirkpatrick-Baez. Pour la microscopie STXM le système contient une lentille de Fresnel (ou zone-plate). Nous avons utilisé la ligne HERMES pour la microscopie STXM. Cette microscopie détecte les rayons X qui ont été absorbés par l'échantillon et permet d'analyser la morphologie de l'échantillon avec un détecteur de type photomultiplicateur placé à l'arrière de l'échantillon. Le faisceau est focalisé à l'aide de lentilles de Fresnel (zone-plate). Comme pour les autres lignes de microscopie par rayonnement synchrotron, l'échantillon est déplacé devant le faisceau fixe.

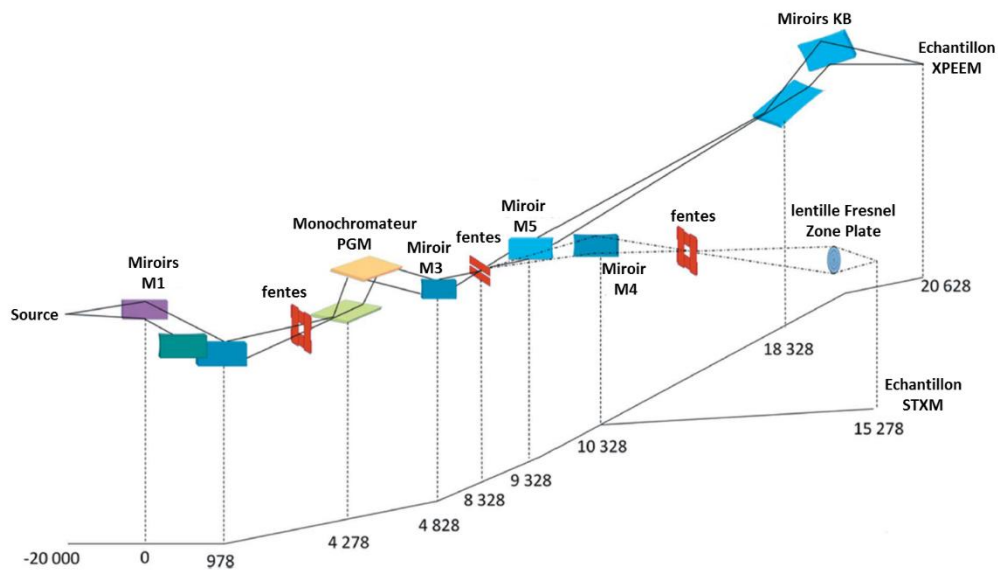


Figure 29 : Trajet optique de la ligne HERMES depuis la source avec les onduleurs HU64 pour les basses énergies et HU42 pour les hautes énergies, les trois miroirs M1 (M1A, M1B et M1C), le monochromateur PGM, les miroirs M4 et M5 permettant de défléchir le faisceau respectivement vers le microscope XPEEM et le microscope STXM, les miroirs KB et la lentille Fresnel. D'après Belkhou, 2015.

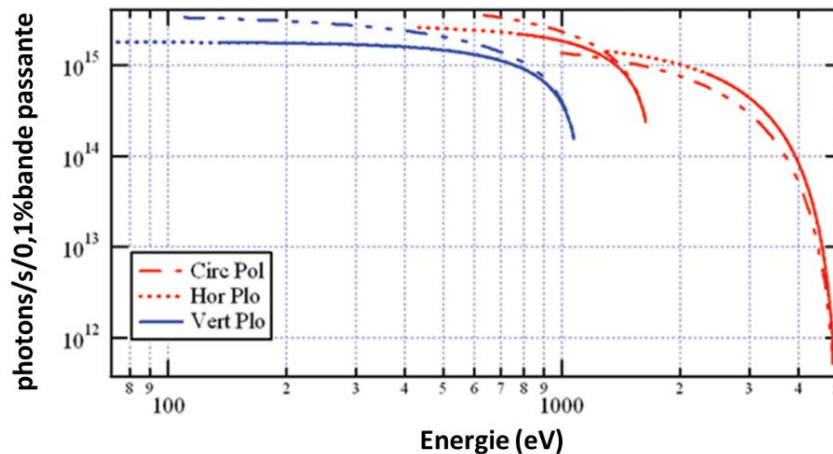


Figure 30 : Flux calculé pour l'onduleur HU64 (bleu) et l'onduleur HU42 (rouge) en fonction de l'énergie et de la polarisation du faisceau. La courbe en pointillé correspond à la lumière polarisée circulaire, la courbe en points correspond à la lumière polarisée horizontalement et la courbe pleine à la lumière polarisée verticalement. L'onduleur HU64 couvre une gamme d'énergie de 70 eV à 600 eV et l'onduleur HU42 une énergie de 500 eV à 2,5 keV. <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/lignes-de-lumiere/hermes>

2-2-4-4 I08 (DIAMOND)

I08 est ligne de lumière du synchrotron DIAMOND situé près d'Oxford au Royaume-Uni (Fig. 31). Cette ligne, ouverte en 2017, permet de travailler dans la gamme des X-mous à des énergies comprises entre 250 eV à 4,2 keV et des résolutions spatiales inférieures à 30 nm. Elle permet de travailler en contraste de phase, fluorescence X, absorption. Les rayons-X sont générés par un onduleur de 4,5 m de long de type APPLE-II, HU53. Cet onduleur fournit des rayons-X polarisés horizontalement et verticalement dans la gamme d'énergie de 250 eV à 4,2 keV ainsi que des rayons-X polarisés circulaire de 250 eV à 1,2 keV. Le premier élément d'optique consiste en une ouverture de 1 mm² et définissant le faisceau. Celui-ci est ensuite focalisé verticalement par un premier miroir M1 ayant un angle d'incidence de 0,7° et présentant un revêtement en Au et Ni. Ce miroir sert de filtre passe-bande des basses fréquences et élimine le rayonnement parasite et indésirable. Le monochromateur est un monochromateur à réseau plan (PGM). Les miroirs cylindriques (M3/M5) et elliptiques (M4/M6) permettent respectivement la focalisation verticale et horizontale du faisceau. Cette ligne est équipée d'un cryostat ce qui permet également d'analyser les échantillons congelés hydratés.

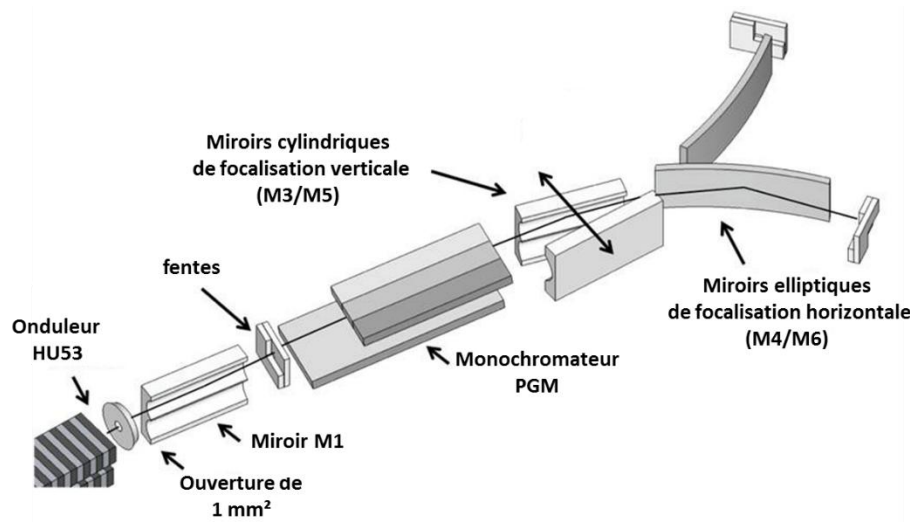


Figure 31 : Trajet optique de la ligne I08 du synchrotron Diamond. Les rayons X sont produits au niveau de l'onduleur HU53. Le faisceau est défini par une ouverture de 1 mm² puis focalisé verticalement à l'aide d'un premier miroir M1. La source est rendue monochromatique à l'aide d'un monochromateur plan (PGM). Les miroirs M3/M5 et M4/M6 permettent respectivement la focalisation verticale et horizontale du faisceau. <https://www.diamond.ac.uk/Instruments/Imaging-and-Microscopy/I08/Optical-Layout.html>

Chapitre 3

Développement de la méthode d'imagerie corrélative

3-1 Culture de neurones primaires d'hippocampe de rat

Avant de nous attarder sur les différentes parties du protocole de cette méthode nous détaillerons la culture classique des neurones primaires d'hippocampe de rat sur lamelle de verre. Ces cultures se basent sur le protocole développé par Kaech et Banker (Kaech, 2006). Les neurones sont cultivés sur des lamelles de verre déposées dans des boîtes de Pétri présentant une couche de cellules gliales (astrocytes) nécessaire à leur développement et leur survie. Ces cellules gliales sontensemencées 15 jours avant les neurones. Les astrocytes et les neurones sont préparés selon le même protocole. Les hippocampes d'embryons de rat (Sprague-Dawley) au stade E18, c'est-à-dire à 18 jours après fécondation, sont disséqués dans du milieu HBSS '*Hank Balanced Salt Solution*' en présence des antibiotiques pénicilline et streptomycine (PS) et de tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique). Ils sont ensuite dissociés 15 min à 37°C dans une solution de Trypsine-EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) à 0,05% /PS/HEPES. Au terme de cette dissociation les deux populations de cellules, neurones et cellules gliales, sont conservées.

Pour la culture des astrocytes, les cellules sontensemencées selon une densité comprise entre 20 000 et 40 000 cellules par boîte de Pétri de 60 mm de diamètre préalablement recouverte avec 0,1 mg.ml⁻¹ de poly-lysine solubilisée dans 0,1 M de tampon borate à pH 8,5. Elles sont ensuite cultivées pendant 15 jours dans du milieu MEM '*Minimum Essential Media*' supplémenté avec 10% de sérum de cheval, milieu propice à la division des cellules gliales.

Pour les neurones, les cellules issues de cette même dissociation sontensemencées à une densité comprise entre 38 000 et 75 000 cellules par lamelles de verre de 18 mm de diamètre. Ces lamelles sont recouvertes avec 1 mg.ml⁻¹ de poly-lysine et présentent des points de paraffines sur une de leur face afin d'établir un espace entre la couche d'astrocytes et les neurones. Les cellules sontensemencées sur le côté de la lamelle présentant la paraffine puis retournées 2h après dans les boîtes de Pétri contenant des astrocytes de 15 jours dont le milieu MEM avec 10% de sérum de cheval a été au préalable changé par du milieu Neurobasal complété avec du milieu SM1 (Stemcell) et de la L-alanyl-L-glutamine à 200 mM dans 0,85% de NaCl (GlutaMAX™ 100X, ThermoFisher). La face de la lamelle comprenant les neurones se retrouve alors contre la couche de cellules gliales. Les neurones et astrocytes sont ensuite maintenus dans une atmosphère à 36,7°C et 5% CO₂ jusqu'au jour d'observation.

Au 4^{ème} jour *in vitro* ou DIV4 'Day In Vitro' les cultures sont traitées avec de la cytosine arabinoside à 2 μM . Cet analogue de la pyrimidine freine la prolifération des cellules gliales en bloquant la réplication de l'ADN et permet ainsi de sélectionner la population de neurones. A partir de DIV6, le milieu de culture est remplacé par du milieu BrainPhys progressivement afin d'éviter un choc osmotique. La moitié du milieu neurobasal est remplacée par un volume égal de BrainPhys tous les trois jours. A DIV15 le réseau dendritique et les épines du neurone sont bien développés et les neurones sont utilisés pour observations.

3-2 Support de culture

Combiner la microscopie photonique super-résolutive avec la spectrométrie nano-SXRF demande en premier lieu d'utiliser un support qui soit à la fois compatible avec la culture de neurones primaires, les observations en microscopie photonique super-résolutive et les analyses des éléments chimiques par nano-SXRF. Cela signifie donc que le support doit être à la fois biocompatible et accordable avec le protocole de culture. Le support doit être exempt de toutes traces d'éléments chimiques présents dans les cellules tels que phosphore, soufre, potassium, zinc, cuivre et fer. Enfin, le support doit présenter des propriétés optiques compatibles avec la microscopie photonique super-résolutive et avoir de faibles propriétés de diffusion sous le faisceau de rayons-X.

3-2-1 Les lamelles de verre

Les neurones primaires d'hippocampe de rat sont couramment cultivés sur des lamelles de verre adaptées à la microscopie photonique super-résolutive (VWR, Marienfeld). Dans cette partie, nous allons nous attarder sur les propriétés physiques et chimiques de ces supports en verre.

3-2-1-1 Propriétés physiques

Le verre est transparent ce qui en fait un matériau d'excellence pour les lamelles de microscopie photonique. De plus le verre est compatible avec la culture cellulaire. Cependant le verre a un indice de réfraction $n = 1,52$ supérieur à celui de l'air ($n = 1$). Or selon la loi de Snell-Descartes lorsqu'un faisceau lumineux traverse des milieux dont les indices de réfractations sont différents celui-ci est réfracté. Chaque objectif du microscope est défini par

son ouverture numérique c'est-à-dire sa capacité à capter les rayons lumineux. Plus l'ouverture numérique est grande plus la résolution est importante. La microscopie super-résolutive est réalisée avec des objectifs à immersion (93X ou 100X). L'ajout d'huile ($n=1,49$) ou de glycérol ($n=1,47$) entre les objectifs à immersion et la lamelle permet alors de garder un indice de réfraction quasi constant entre les deux milieux et donc de limiter le phénomène de réfraction tout en augmentant le pouvoir résolutif de l'objectif.

Les lamelles de verre utilisées pour les cultures sont des lamelles circulaires ayant une épaisseur de 170 μm . Pour la microscopie photonique super-résolutive sur cellules vivantes, les lamelles de 12 mm ou 18 mm de diamètre sont montées dans une chambre de type 'Ludin' dans laquelle du milieu d'observation Tyrode à 37°C peut être ajouté afin de maintenir les cellules en vie pendant les observations (Fig. 32).

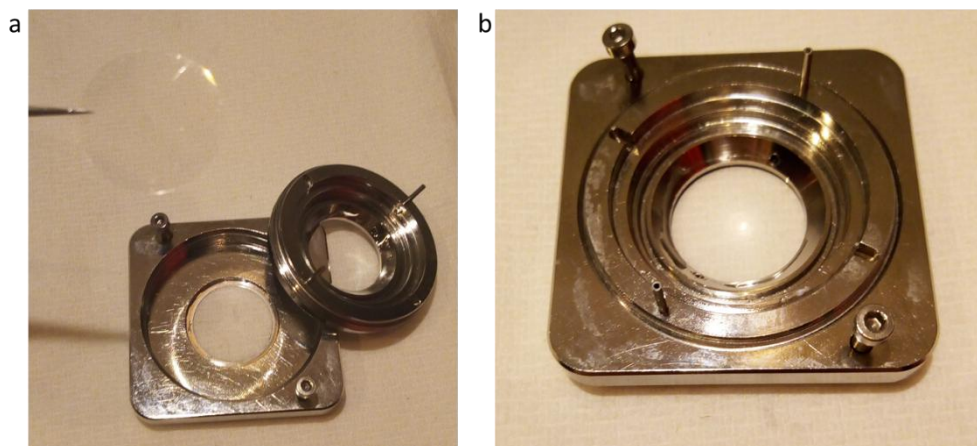


Figure 32: Chambre d'observation de type 'Ludin'. a) Montage de la lamelle dans la chambre Ludin. b) Chambre Ludin montée. Le milieu d'observation à 37°C est ajouté dans la chambre d'observation afin de maintenir les cellules en vie.

3-2-1-2 Composition chimique

Le verre est un matériau riche en oxydes métalliques. La composition chimique exacte des lamelles de verre (VWR, Marienfeld) utilisées pour la microscopie super résolution a été déterminée par analyses PIXE '*Particule Induced X-ray Emission*' sur la microsonde de l'accélérateur de la plateforme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) du CENBG (Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan). Un faisceau de protons est accéléré jusqu'à obtenir une énergie cinétique de 3 MeV. L'interaction avec un atome de l'échantillon induit alors l'ionisation des couches électroniques internes (K,

L ou M), un réarrangement électronique et l'émission d'un rayonnement-X qui va pouvoir être détecté par les détecteurs de type Si(Li) (Carmona, 2008 ; Perrin, 2015). Les spectres obtenus par analyse PIXE expriment le nombre d'évènements obtenus en fonction de l'énergie des rayons X émis, exprimée en keV. Chaque pic correspond à une transition électronique et donc à la signature propre d'un élément chimique.

Les spectres obtenus suite à l'analyse des lamelles de verre indiquent la présence de nombreux éléments, en concentrations très élevées, et dont certains sont attendus dans la composition des cellules (Cl, K, Ca, Fe, Zn) (Fig. 33). Ceci rend donc impossible l'utilisation de ce type de support en verre pour l'étude des métaux et notamment celle du zinc en spectrométrie SXRF.

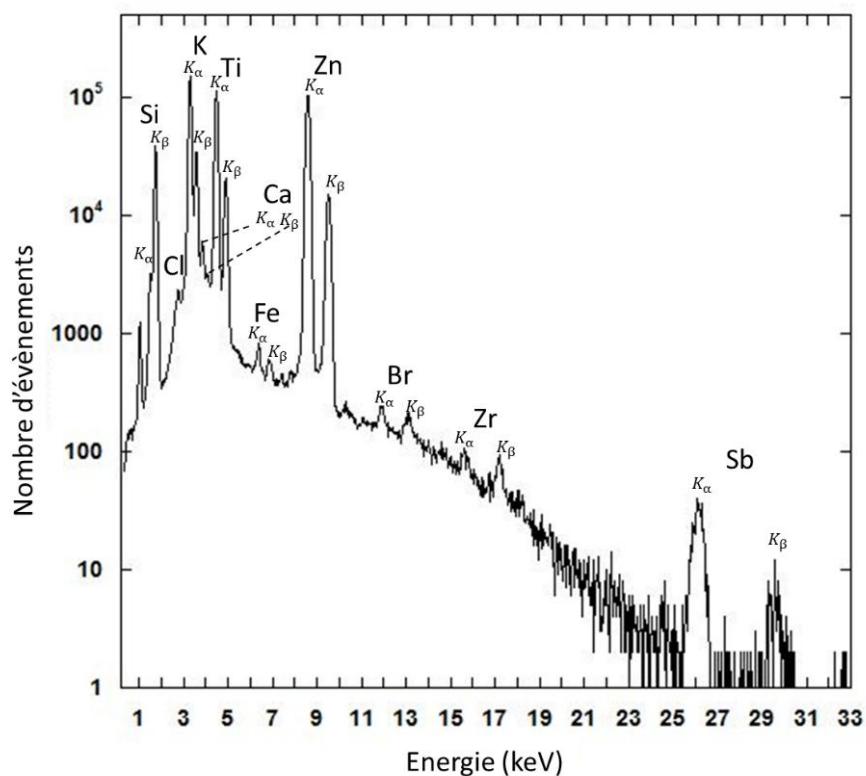


Figure 33 : Spectre PIXE d'une lamelle de verre montrant la présence de nombreux éléments chimiques (K, Ti, Fe, Zn, Br, Sb,...). La présence de ces éléments ne permet pas l'utilisation de ce type de support en verre pour la spectrométrie SXRF.

3-2-2 Les lamelles de quartz et de silice ESCO Optics

Un autre type de support doit être utilisé afin de combiner la microscopie photonique super-résolutive et la spectrométrie SXRF. Nous nous sommes tournés vers des lamelles de très haute pureté chimique conçues par la société ESCO Optics.

3-2-2-1 Propriétés physiques

Deux sortes de lamelles provenant du fournisseur ESCO Optics ont été étudiées: les lamelles S1-UV (R412000) que nous appellerons par la suite lamelles de silice et les lamelles A1-Fused Quartz (R512000) que nous nommerons lamelles de quartz. Ces lamelles présentent chacune une épaisseur de 160 μm et un indice de réfraction n de 1,45. Elles présentent donc des propriétés optiques proches des lamelles de verre classiques. En utilisant la lignée cellulaire HeLa nous avons tout d'abord vérifié qu'elles étaient bien compatibles avec la culture cellulaire. Comme les lamelles de verre, ces lamelles de 12 mm de diamètre peuvent être montées dans une chambre 'Ludin' standard ce qui facilite leur utilisation pour la microscopie sur cellules vivantes.

3-2-2-2 Composition chimique

En suivant la même méthodologie que pour les lamelles de verre, nous avons vérifié que ces lamelles ne contenaient aucune contamination en éléments métalliques (Fig. 34). Sur les spectres de ces lamelles obtenus par analyse PIXE, nous retrouvons uniquement le pic correspondant au silicium. Aucun pic n'est observé pour le potassium, le zinc ou autres éléments métalliques comme dans le cas des lamelles de verre. Ceci confirme donc que ces lamelles ne présentent aucune contribution de métaux.

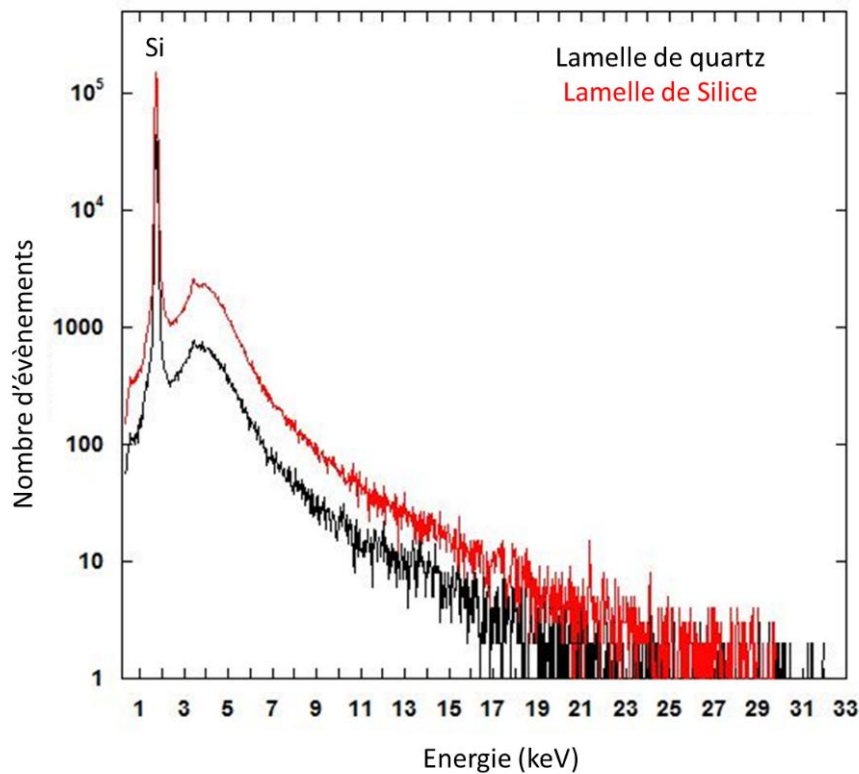


Figure 34 : Spectre PIXE montrant la composition des lamelles de quartz (en noir) (ESCO, R512000, A1-Fused Quartz) et des lamelles de silice (en rouge) (ESCO, R412000, S1-UV). Le pic observable correspond à l'élément chimique silicium. Aucune contribution de métaux n'est présente dans ces lamelles.

3-2-2-3 Imagerie SXRF de cellules cultivées sur lamelles de quartz

Afin de vérifier la compatibilité des lamelles de quartz et de silice avec des analyses SXRF nous avons cultivées des cellules HeLa sur ces lamelles. Le milieu cellulaire a ensuite été rincé et les échantillons cryofixés et lyophilisés en conditions douces. Nous expliquerons plus en détails les étapes de préparation de l'échantillon dans le chapitre 3-4. Avant la spectrométrie SXRF les traces de glycérol laissées par l'objectif à immersion sur le revers de la lamelle sont parfaitement enlevées à l'aide de méthanol en faisant attention à ne pas altérer l'échantillon.

Nous avons analysé les échantillons par spectrométrie SXRF sur la microsonde de la ligne P06 du synchrotron DESY (Hambourg). Les analyses ont été réalisées avec une énergie de 12 keV et une taille de faisceau de 831 nm x 738 nm ainsi qu'une taille de pixel de 500 nm. La figure 35 montre les cartographies des éléments chimiques K, P, S et Zn obtenues pour une cellule HeLa cultivée sur une lamelle de quartz (Fig. 35a). Des cellules HeLa cultivées sur

support de polycarbonate, support adapté à la spectrométrie SXRF (Perrin, 2015), ont été analysées dans les mêmes conditions que les échantillons sur lamelle de quartz. Nous avons comparé le signal obtenu pour les deux types de support.

Lorsque les cellules sont cultivées sur les lamelles de quartz, le signal obtenu est très faible. La comparaison du signal obtenu sur lamelle de quartz et lorsque les cellules sont cultivées sur un support adapté pour la spectrométrie SXRF démontre combien celui-ci est beaucoup plus faible et non optimal sur lamelle de quartz (Fig. 35). Cette perte de signal s'explique par le fait que le support en quartz présente une épaisseur de 160 μm responsable d'une diffusion importante du faisceau de rayons X. Cette diffusion du rayonnement entraîne une forte augmentation du bruit de fond dans les spectres de fluorescence X, dégradant notablement le rapport signal sur bruit. Il est donc nécessaire d'avoir un support qui ne présente à la fois aucune contribution en métaux et ayant une épaisseur beaucoup plus fine.

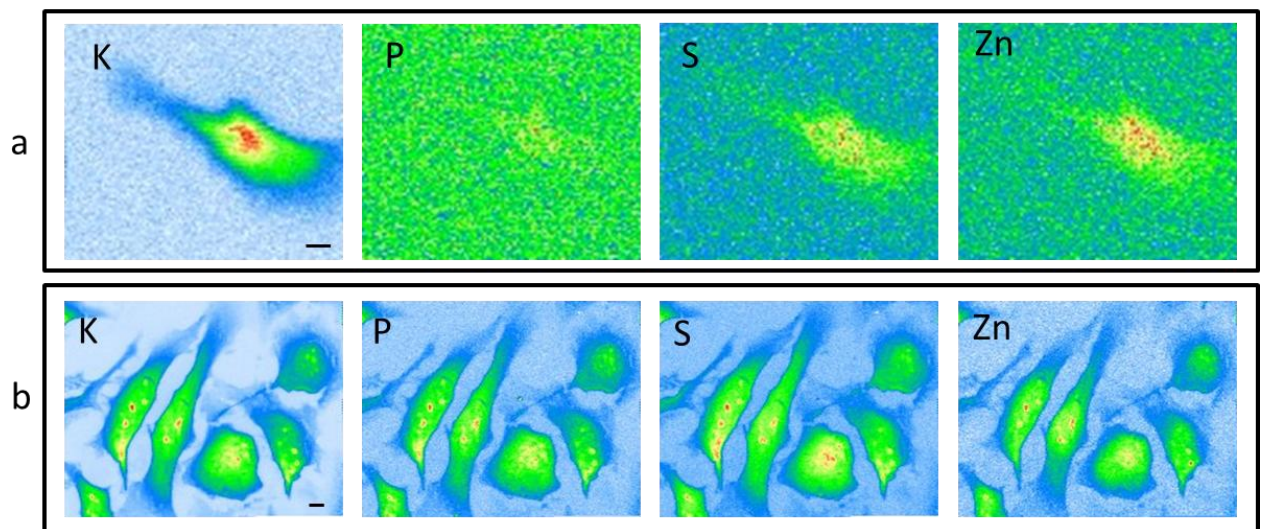


Figure 35 : Images SXRF de cellules HeLa. a) distributions du potassium (K), du phosphore (P), du soufre (S) et du zinc (Zn) d'une cellule HeLa cultivée sur lamelle de quartz. b) images SXRF obtenues pour les mêmes éléments chimiques dans le cas de cellules HeLa cultivées cette fois sur un support de polycarbonate adapté pour l'imagerie SXRF. On note le mauvais rapport signal/bruit obtenu dans la figure a) dû à la diffusion du faisceau. Echelle = 5 μm .

3-2-3 Les membranes de Si_3N_4

Dans un premier temps nous avons testé si les supports utilisés en microscopie photonique super-résolutive pouvaient s'adapter aux analyses SXRF. Les lamelles de verre ont

été éliminées du fait de leur haute concentration en éléments métalliques. Malgré leur pureté chimique, les lamelles de quartz et de silice ESCO Optics ne sont pas non plus adaptées pour la spectrométrie SXRF car elles induisent une trop forte diffusion du faisceau et un rapport signal sur bruit élevé. Une autre stratégie était donc de contrôler si les supports habituellement utilisés pour la spectrométrie SXRF pouvaient être utilisés en microscopie photonique super-résolutive. Deux types de supports sont utilisés classiquement pour la spectrométrie SXRF : des films fins de polymères (ex : polycarbonate 2 μm) et des membranes de Si_3N_4 fines de l'ordre de 100 nm à 500 nm (Perrin, 2015). L'inconvénient des films de polycarbonate est qu'ils ne sont pas adaptés à toutes les lignes d'imagerie synchrotron et notamment à la ligne ID16A du synchrotron ESRF qui requiert des supports parfaitement plans pour pouvoir déplacer l'échantillon tout en restant sur le plan focal lors des analyses. Les films polymères tels que le polycarbonate de 2 μm d'épaisseur sont beaucoup moins rigides que les membranes de Si_3N_4 . L'utilisation des membranes de Si_3N_4 est adaptée à toutes les lignes de microscopie synchrotron et procure une plus large gamme d'application possible pour l'imagerie corrélative.

3-2-3-1 Propriétés physiques

Les supports de nitrure de silicium Si_3N_4 que nous avons utilisés proviennent de la société Silson basée au Royaume-Uni. Ce sont des supports adaptés pour la microscopie électronique à transmission et aux applications en rayons X comme les techniques d'imagerie synchrotron. Plusieurs configurations de supports existent. Dans notre cas, ils se composent d'un cadre de silicium carré de 5 mm de côté et 200 μm d'épaisseur, au centre duquel se trouve la membrane de Si_3N_4 , également carrée mesurant 1,5 mm de côté et présentant une épaisseur très fine. Pour la culture de neurones primaires d'hippocampe de rat nous avons utilisé des membranes de 200 nm ou 500 nm d'épaisseur (Fig. 36a). A notre demande auprès de la compagnie Silson une petite membrane carrée (de 100 μm de côté) est usinée près d'un des quatre coins de la membrane centrale afin de faciliter l'orientation du support et permettre l'imagerie corrélative comme nous le verrons par la suite.

3-2-3-2 Microscopie STED sur membrane de Si_3N_4

Les membranes de Si_3N_4 ont été testées en microscopie STED (Leica DMI6000 TCS SP8 X). L'huile ne pouvant pas être déposée directement sur la membrane compte tenu de la taille et de la fragilité de celle-ci, les supports de Si_3N_4 sont montés dans une chambre 'Ludin' sur

une lamelle de verre (Fig. 36b et c). La face présentant les cellules est disposée contre la lamelle de verre. La membrane est ainsi retournée contre la lamelle en verre en présence de milieu d'observation Tyrode et en évitant la formation de bulles d'air. La figure 26 c) montre le montage du support sur le microscope STED.

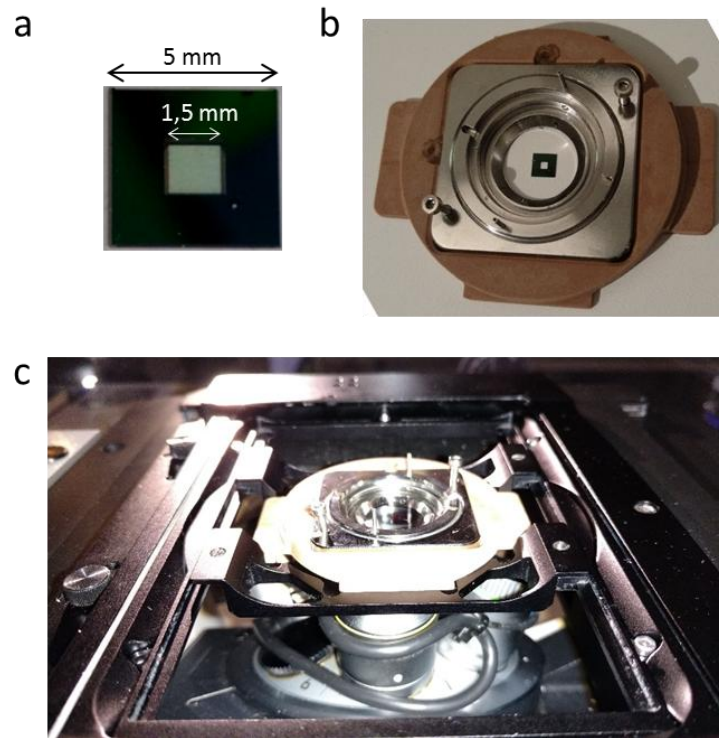


Figure 36 : Support de Si_3N_4 et microscopie STED. a) Support de Si_3N_4 de 5 mm par 5 mm avec une membrane de 1,5 mm par 1,5 mm. b) Support monté dans la chambre d'observation 'Ludin' pour l'imagerie sur cellules vivantes. c) Montage sur le microscope STED

Les membranes de Si_3N_4 sont des supports déjà utilisés pour les cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat analysées en spectrométrie SXRF (Colvin, 2016 ; Perrin, 2017). Nous avons cultivé les neurones sur couche d'astrocytes en se basant sur le protocole de culture de Kaech et Banker (Kaech, 2006). Comme les lamelles de verre, les supports de Si_3N_4 sont traités avec de la poly-lysine à 1 mg.ml^{-1} 24 h avant la dissection des neurones et gardés à 37°C en présence de milieu Neurobasal. Après la dissociation des neurones, le milieu contenant les supports est délicatement aspiré de manière à ne laisser qu'une fine pellicule de milieu sur la surface de la membrane. 500 000 neurones sont re-suspendus dans un volume final de $240 \mu\text{L}$ de milieu Neurobasal etensemencés en goutte à goutte de $20 \mu\text{L}$ pour une densité finale de 80 000 neurones par support. Les neurones sont incubés 2h à 37°C puis les

supports sont placés sur la couche d'astrocytes face plane comprenant les neurones vers le haut.

L'exemple ci-dessous compare des images STED obtenues pour des dendrites de neurones cultivés sur une lamelle de verre (Fig. 37a) et marqués par le fluorophore SiR-tubulin dont nous parlerons davantage dans la partie 3.4.1.1.2 et des dendrites de neurones cultivés sur membrane de Si_3N_4 marqués également avec la SiR-tubulin (Fig. 37b).

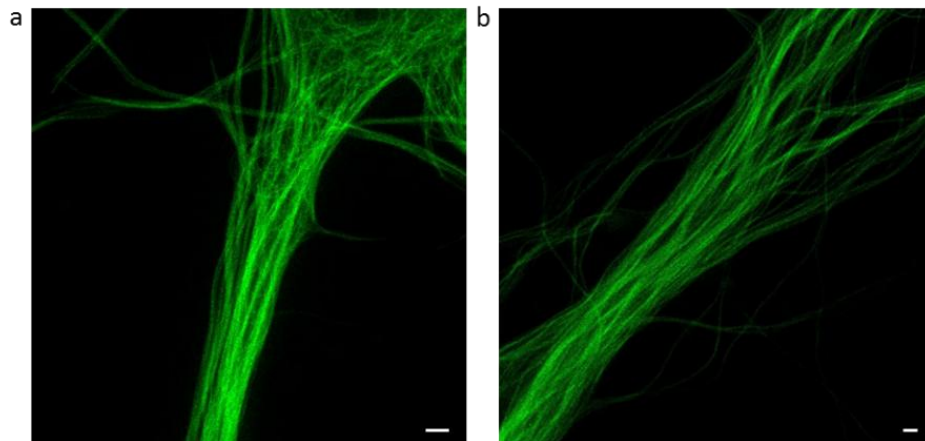


Figure 37 : Dendrites de neurones primaires de rat marquées avec le fluorophore SiR-tubulin et observées en microscopie STED. a) Neurone cultivé sur lamelle de verre. b) Neurone sur membrane de Si_3N_4 . Echelle = 1 μm

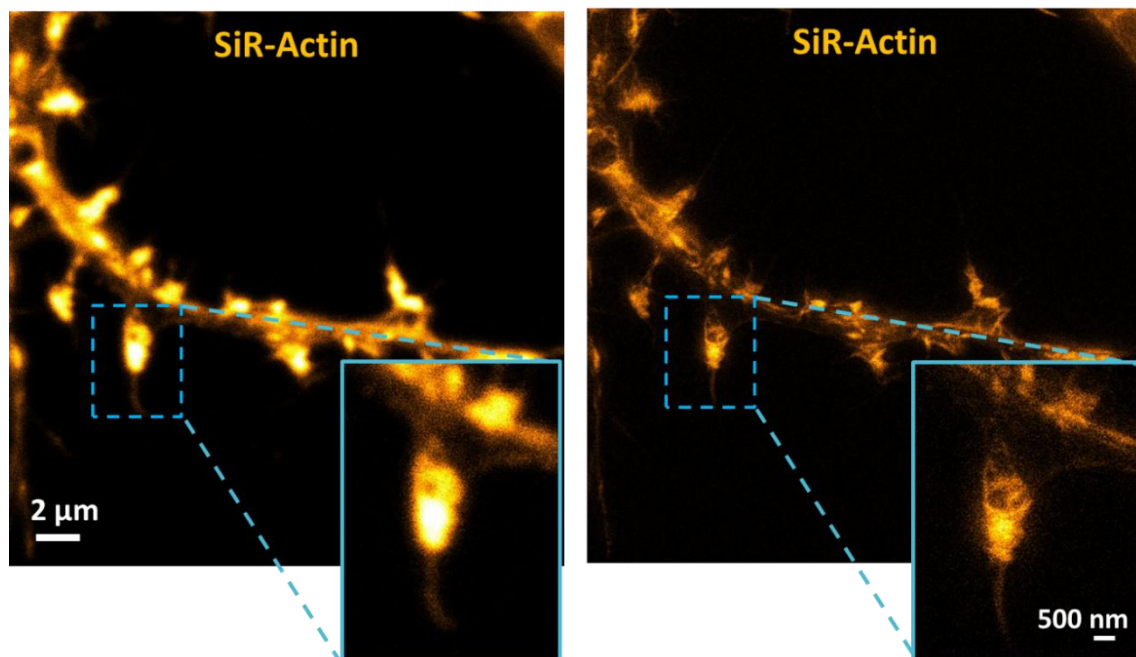


Figure 38 : Microscopie confocale (à gauche) et microscopie STED (à droite) montrant une dendrite de neurone primaire d'hippocampe de rat cultivé sur membrane de Si_3N_4 et marqué avec le fluorophore SiR-actin.

La figure 38 montre l'effet STED obtenu pour une dendrite d'hippocampe primaire de rat cultivé sur membrane de Si₃N₄ et marqué avec le fluorophore SiR-actin.

Avec un rapport $\frac{I}{I_{sat}}$ de 46, une ouverture numérique NA de 1,3 et une longueur d'onde d'émission $\lambda = 674$ nm pour le fluorophore SiR-actin, la résolution spatiale maximale obtenue dans ces conditions est égale à $d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha) \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}} = 38$ nm.

Ces images démontrent que ce support adapté pour la spectrométrie SXRF peut être utilisé pour la microscopie photonique STED. Sur les différents supports analysés c'est celui qui présente donc les meilleurs résultats, les meilleurs compromis, pour une combinaison des techniques d'imagerie nano-SXRF et STED. Ce support a donc été sélectionné pour la suite du développement de la méthode.

3-3 Solution de rinçage des éléments extracellulaires

Lorsque la microscopie photonique STED est réalisée sur des cellules vivantes, elle nécessite l'utilisation d'un milieu d'observation adapté à la microscopie photonique donc sans protéines, ni rouge phénol, indicateur de pH couramment utilisé dans les milieux de culture. Ce milieu doit être isotonique et permettre le maintien des neurones en vie en leur apportant les éléments nécessaires à leur survie. Le milieu d'observation que nous avons utilisé est un milieu Tyrode composé de 135 mM de chlorure de sodium (NaCl), 5 mM de chlorure de potassium (KCl), 1,8 mM de chlorure de calcium (CaCl₂), 0,4 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 1 mM de glucose et 1 mM d'HEPES dilués dans de l'eau purifié de type MilliQ. Le pH est ajusté à 7,4 et l'osmolarité à celle du milieu de culture BrainPhys (310 mOsm). La solution est filtrée à l'aide d'un filtre Stericup® Millipore présentant une taille de pore de 0,22 µm puis équilibrée dans une atmosphère à 36,7°C et 5% CO₂ 4h avant utilisation sur les neurones.

Le milieu Tyrode est donc un milieu très riche en éléments chimiques et ceux-ci sont susceptibles d'être détectés en spectrométrie SXRF et de camoufler le signal provenant des cellules. Les sels en forte concentration dans le milieu extracellulaire sont à la fois une source de contamination possible en métaux traces, de plus, ils provoquent une très forte émission de fluorescence X pour les éléments Na, Cl, K, Ca qui sature le signal détecté versus celui des éléments traces cellulaires. Il est donc crucial d'éliminer ces éléments extracellulaires. Avant la cryofixation, les échantillons sont donc rincés dans une solution permettant d'éliminer ces

éléments chimiques présents dans le milieu d'observation. Ceci est obtenu au moyen d'un tampon formé de sels organiques dont le numéro atomique est < 11 (Na) car ces éléments légers ne sont pas détectés en spectrométrie SXRF. Même si le rinçage est effectué sur un temps court avant la cryofixation (de l'ordre de 10 secondes), la solution de rinçage doit préserver la viabilité et la morphologie cellulaire en évitant un choc osmotique, tout particulièrement dans le cas des neurones primaires d'hippocampe dont la morphologie varie rapidement, surtout en milieu hypotonique (Aitken, 1998).

En étudiant la littérature nous pouvons constater que différentes solutions sont utilisées pour le rinçage des cellules avant cryofixation et analyse SXRF : solution d'acétate d'ammonium à osmolarité égale au milieu de culture et pH 7,4 (Dučić, 2013 ; Perrin, 2015), solution de Tris Glucose 261 mM pH 7,4 (Matsuyama, 2010), PBS '*Phosphate Buffered Saline*' (Perrin, 2015) ou encore de l'eau stérile (Dučić, 2015).

Afin de sélectionner la meilleure solution de rinçage les osmolarités de chacune de ces solutions ont été mesurées à l'aide d'un osmomètre à tension de vapeur VAPRO®. Les valeurs sont répertoriées dans le tableau 2 ci-dessous et comparées à l'osmolarité du milieu de culture BrainPhys.

Solution	Osmolarité (mosmol/kg)
Milieu BrainPhys	310
Acétate d'ammonium 185 mM	310
Tris Glucose 261 mM	417
PBS	268
Eau stérile	83

Tableau 2: Mesure de l'osmolarité des solutions de rinçage des éléments extracellulaires utilisées avant la cryofixation de l'échantillon décrites dans la littérature.

La solution Tris Glucose 261 mM présente une osmolarité trop élevée par rapport au milieu de culture BrainPhys des neurones. Même si en principe l'osmolarité de la solution pourrait être ajustée par dilution, ce milieu induit la formation de filaments de glucose sur le

support au moment de la cryofixation. Après le *freeze-drying* les cellules apparaissent mal préservées signe d'une mauvaise lyophilisation. L'eau distillée et le PBS sont des milieux hypotoniques par rapport au milieu BrainPhys. Ils peuvent provoquer des modifications morphologiques, voire la mort cellulaire dans le cas de l'eau, par choc osmotique. L'acétate d'ammonium de formule $C_2H_7NO_2$ est un sel azoté comprenant uniquement les éléments légers C, H, N et O. Ces éléments légers ne perturbent pas les analyses nano-SXRF car seuls les éléments de $Z > 11$ sont détectés. La solution est préparée dans de l'eau ultra pure Optima™ (Fisher), le pH est ajusté à 7,4 par ajout de NaOH et l'osmolarité à 310 mOsm, égale à celle du milieu BrainPhys, puis la solution est stérilisée par filtration et équilibrée à 36,7°C avant utilisation. Cette solution préserve le mieux la morphologie cellulaire et la viabilité en respectant l'osmolarité du milieu de culture et du milieu d'observation. Elle s'avère être la meilleure option comme solution de rinçage des éléments extracellulaires avant la cryofixation.

3-4 Etat physique des échantillons : la fixation

L'imagerie par spectrométrie SXRF ne peut être réalisée sur cellules vivantes en raison des dommages dus à l'irradiation intense sous faisceaux X très focalisés, particulièrement en raison de la radiolyse de l'eau. Les analyses sont nécessairement conduites sur des échantillons déshydratés ou sur des échantillons hydratés maintenus à très basse température. Dans le premier cas les échantillons peuvent être déshydratés soit par fixation chimique et rinçage par des solvants volatils, soit par cryofixation suivie d'une lyophilisation à basse température et sous vide (*freeze-drying*). Dans le cas des échantillons congelés hydratés, la cryofixation est requise mais n'est pas suivie d'une lyophilisation. La microscopie photonique est réalisée sur des échantillons vivants ou bien fixés chimiquement. Pour corrélérer les images obtenues par deux techniques d'imagerie différentes il est nécessaire d'analyser les échantillons dans un état physique compatible à la fois en microscopie photonique de super résolution et en imagerie nano-SXRF.

Plusieurs combinaisons restent alors envisageables :

- Fixation chimiques des échantillons et observation en microscopie photonique et nano-SXRF. Cela signifie alors de vérifier si la fixation chimique est compatible avec l'imagerie des métaux par spectrométrie-SXRF.

- Echantillon fixés par cryofixation et observation en cryo-microscopie photonique et cryo-nano-SXRF. Analyse possible en cryo-nano-SXRF sur les lignes de microscopie synchrotron équipées d'un porte échantillon cryogénique mais pas en cryo-microscopie de super résolution car il n'existe pas encore de microscope de super résolution fonctionnant en mode cryogénique. Cette option n'a donc pas été testée.
- Echantillons cryofixés puis lyophilisés par *freeze-drying* et observation en cryo-microscopie photonique et cryo-nano-SXRF. Il faudra vérifier si la microscopie photonique super-résolutive peut s'effectuer sur des échantillons lyophilisés.
- Microscopie photonique super-résolutive sur cellules vivantes puis imagerie SXRF sur échantillons cryofixés et lyophilisés. Ceci implique de contrôler que la lyophilisation n'empêche pas la corrélation des deux images à haute résolution.
- Microscopie photonique super-résolutive sur cellules vivantes puis cryofixation et analyse cryo-nano-SXRF. Implique que l'imagerie SXRF puisse être réalisée en conditions cryogéniques tout en retrouvant les régions d'intérêt préalablement observées sur cellule vivantes.

Dans cette section nous évaluerons chaque stratégie et déterminerons celle qui est la plus intéressante pour combiner spectrométrie nano-SXRF et microscopie photonique super-résolutive.

Nous avons étudié les deux modes de fixation : la fixation chimique au paraformaldéhyde et la cryofixation. Avant de contrôler leur validité dans chacune des techniques d'imagerie nous regarderons plus en détail leur principe.

3-4-1 Fixation chimique

La fixation chimique consiste à figer la structure des échantillons de façon à rendre insolubles les composants cellulaires tout en préservant leur localisation spatiale en formant des liaisons covalentes entre les protéines. Elle s'effectue couramment au moyen de composants aldéhydes, classiquement le paraformaldéhyde (PFA) et le glutaraldéhyde. La fonction aldéhyde ($-CH_2O$) réagit essentiellement avec les groupements amines ($-NH_2$) des liaisons N-terminal des protéines et de la chaîne latérale de la lysine pour former des ponts méthylènes entre protéines voisines (Kiernan, 2000). Pour cela, l'échantillon est incubé 10 à

15 min à température ambiante dans du tampon phosphate salin PBS (contenant 4% de paraformaldéhyde (EMS, Electron Microscopy Sciences). L'échantillon est ensuite rincé trois fois dans une solution de PBS puis incubé 10 min dans une solution de NH_4Cl à 50 mM puis dans 0,1% NaBH_4 ou 0,1% de glycine afin de bloquer les fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi et susceptibles de fluorescer au moment de la microscopie photonique.

3-4-2 La cryofixation et la lyophilisation (*freeze-drying*)

La cryofixation est une méthode de congélation rapide des échantillons. Les échantillons sont d'abord rincés, dans notre cas avec de l'acétate d'ammonium à pH 7,4 présentant la même osmolarité que le milieu de culture BrainPhys (310 mOsm). Cette étape permet d'éliminer les éléments chimiques extracellulaires présents dans les milieux de culture (BrainPhys) et d'observation (tyrode) sans créer de choc osmotique. A l'issue de cette étape, les traces d'acétate d'ammonium présents dans le puits et le cadre du support sont délicatement absorbés avec du papier absorbant (whatman®) puis les échantillons sont plongés rapidement dans du 2-méthylbutane (Sigma) refroidit à -165°C dans de l'azote liquide et maintenu dans le fluide cryogénique pendant 30 secondes. Afin d'éliminer les traces du 2-méthylbutane, le puits et le cadre du support sont à nouveau épongés avec du papier filtre (whatman®) refroidit au préalable à la même température que l'échantillon. Les échantillons peuvent alors être stockés dans des vapeurs d'azote liquide avant d'être analysés sous forme congelée hydratée lorsqu'un porte-échantillon cryogénique est installé sur le microscope SXRF ou bien lyophilisée par *freeze-drying* si les analyses sont menées à température ambiante.

Le *freeze-drying* consiste en la déshydratation sous vide et à très basse température. Les échantillons sont donc lyophilisés en conditions douces par sublimation de la glace en vapeur d'eau pour minimiser les effets de la déshydratation sur la structure cellulaire (Carmona, 2008). Les échantillons sont déshydratés (lyophilisateur CHRIST Alpha 1-4) pendant deux jours à -80°C et sous vide (0,040 mbar). La température et la pression sont ensuite progressivement remontées jusqu'à température ambiante et pression atmosphérique. Les échantillons sont conservés à température ambiante en présence de dessicant jusqu'au jour d'observation.

3-4-3 Comparaison fixation chimique et cryofixation par analyse PIXE

De nombreuses études ont montré que la fixation des cellules au moyen d'aldéhydes cause des modifications de la distribution des éléments chimiques cellulaires (Chwiej, 2005,

Hackett, 2011 ; Roudeau, 2014). Nous avons donc cultivé des neurones primaires d'hippocampe de rat sur des membranes de Si_3N_4 puis nous les avons cryofixés et lyophilisés par *freeze-drying* ou alors nous les avons fixés chimiquement en suivant un protocole de fixation plus doux que la fixation classique (PFA 2% dans du milieu de culture au lieu de PFA 4% dans du tampon PBS comme habituellement utilisé). Les éléments chimiques ont ensuite été analysés par la méthode PIXE au CENBG. La comparaison des spectres obtenus après cryofixation et *freeze-drying* ou après fixation chimique montre que la fixation chimique induit des changements dans la concentration des éléments notamment du potassium, du phosphore et du chlore (Fig. 39). La perte d'éléments chimiques, notamment des ions les plus mobiles dans la cellule, s'explique par la perméabilisation des membranes provoquée par la fixation avec les aldéhydes suivie du rinçage (Hackett, 2011 ; Roudeau, 2014). Ceci démontre donc que ce type de fixation, même en conditions douces (PFA 2%), n'est pas un protocole optimal pour l'étude des éléments chimiques dans les neurones. La cryofixation préserve mieux les pools intracellulaires des éléments chimiques.

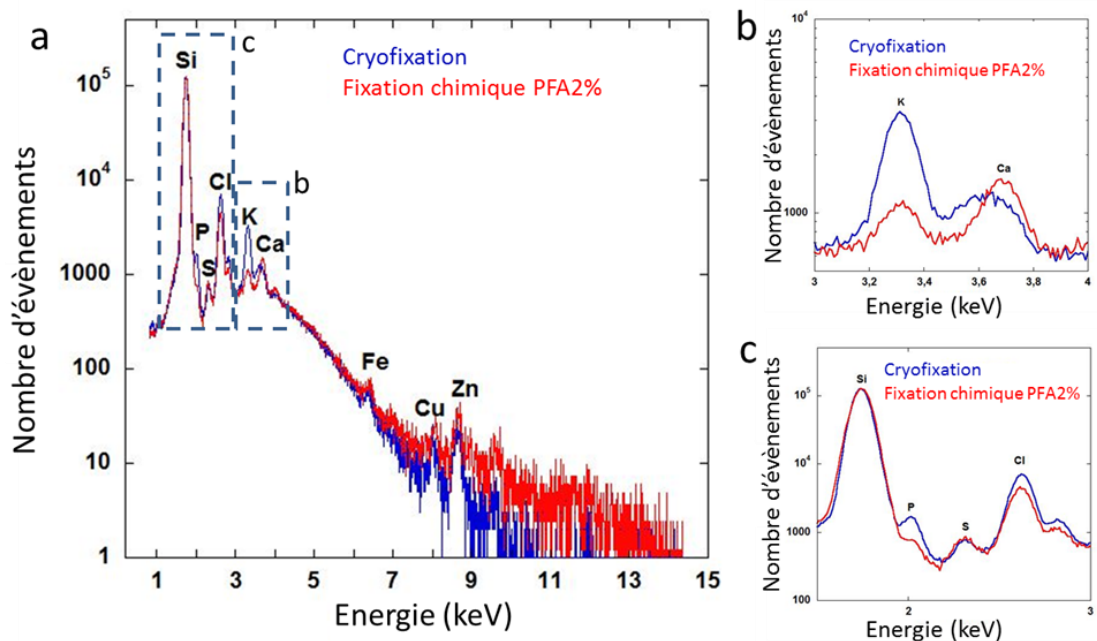


Figure 39 : a) Comparaison des spectres PIXE des éléments chimiques obtenus pour des neurones primaires d'hippocampe de rat après fixation chimique en PFA 2% dans du milieu BrainPhys (en rouge) ou après cryofixation et *freeze-drying* (en bleu). La fixation chimique induit une perte drastique des éléments K, P et Cl comme illustré en b) et c). La cryofixation préserve mieux les pools cellulaires des éléments chimiques.

3-4-4 Imagerie photonique sur échantillons lyophilisés

Nous avons tout d'abord cherché à vérifier si la microscopie photonique super résolutive était réalisable sur des échantillons lyophilisés. Cela nécessite l'utilisation d'un fluorophore suffisamment stable gardant ses propriétés de fluorescence même après avoir été lyophilisé.

Nous nous sommes tournés vers des fluorophores basés sur la '*silicone rhodamine*' (SiR) très stables et développés pour la microscopie STED : la SiR650 (communément appelée SiR) et la SiR700 (Fig. 40a et b) (Lukinavičius, 2014 ; Lukinavičius, 2016) (Spirochrome). Ces fluorophores très brillants et très résistants au photoblanchiment fluorescent dans le rouge lointain avec, pour la SiR650, un pic d'excitation à 652 nm et un pic d'émission à 674 nm et pour la SiR700, un pic d'excitation à 682 nm et un pic d'émission à 716 nm (Fig. 40c). En outre ces fluorophores sont compatibles avec la microscopie sur cellules vivantes. La membrane plasmique étant perméable à ce type de fluorophore leur utilisation ne nécessite pas d'électroporer ou de transfecter les cellules. Les cellules peuvent donc être marquées juste avant d'être cryofixées et l'expression de la protéine ciblée reste endogène.

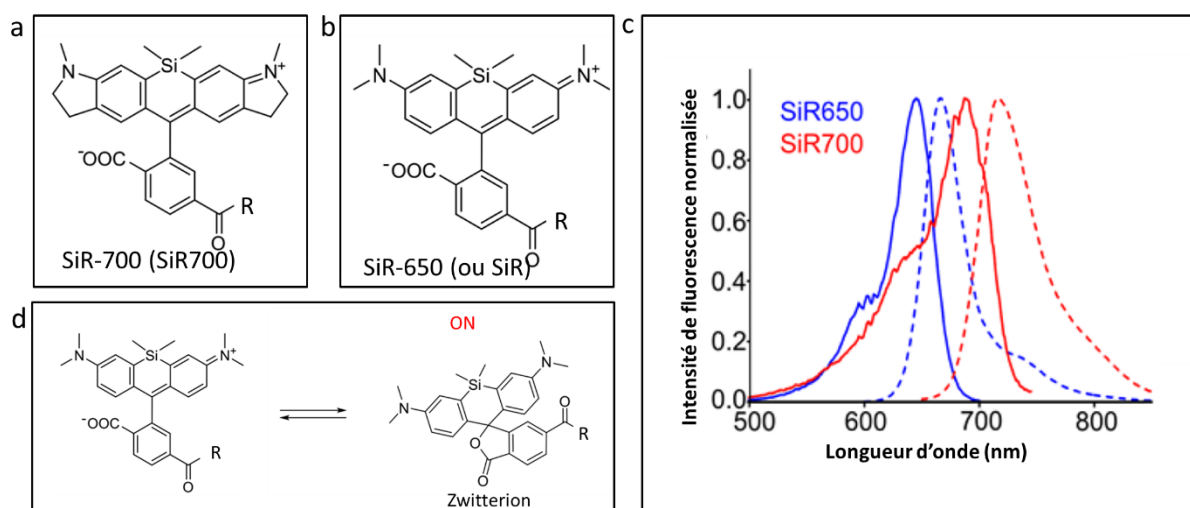


Figure 40 : Fluorophores basés sur la '*silicone rhodamine*' SiR. a) Molécule de SiR700. b) Molécule de SiR650 communément appelée SiR. c) spectre d'excitation (courbes pleines) et d'émission (courbes pointillées) de fluorescence des fluorophores SiR650 (bleu) et SiR700 (rouge). d) Equilibre entre la forme non-fluorescente et la forme fluorescente (zwitterion). R désigne le ligand associé spécifique de la protéine cible. Adapté de Lukinavičius, 2016.

Ces fluorophores possèdent la caractéristique d'être en équilibre entre une forme non-fluorescente (OFF) et une forme fluorescente de type zwitterion (ON). L'interaction du fluorophore avec une protéine polaire déplace l'équilibre vers la forme zwitterion fluorescente (Fig. 40d).

L'objectif de la méthode étant d'étudier les interactions métaux-protéines du cytosquelette, nous avons utilisé la SiR-tubulin (Fig. 41a), fluorophore couplé au docetaxel et se liant donc spécifiquement aux microtubules tout en les stabilisant, et la SiR-actin (Fig. 41b), couplé à la jasplakinolide qui se lie et stabilise les filaments d'actine.

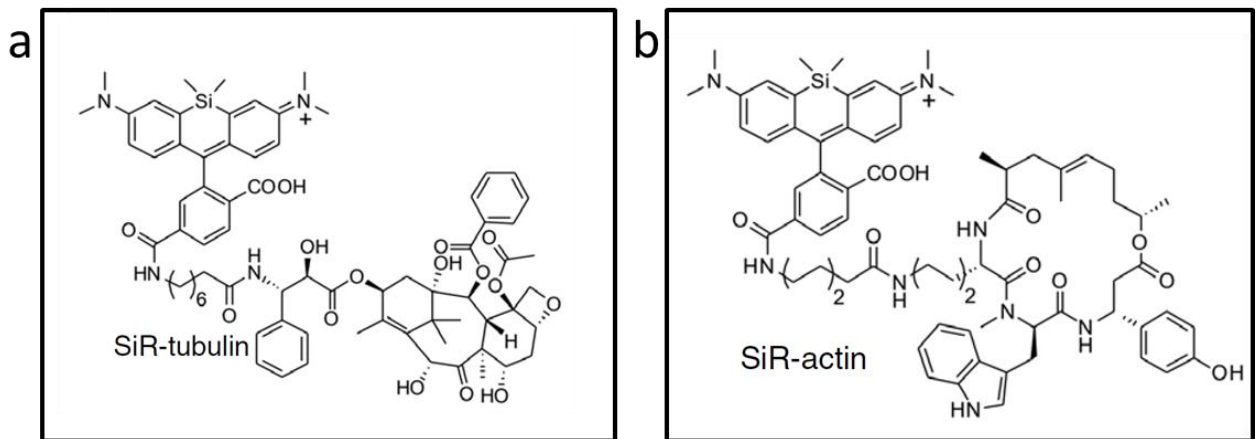


Figure 41: Fluorophores SiR-tubulin et SiR-actin. a) La SiR-tubulin correspond au fluorophore SiR650 couplé au docetaxel. b) Dans le cas de la SiR-actin, le fluorophore SiR650 est couplé à la jasplakinolide. Adapté de Lukinavičius, 2014.

Par soucis de commodité, nous avons réalisé ce test sur la lignée cellulaire HeLa, car la culture des neurones d'hippocampe nécessite pratiquement un mois de préparation au total. Les cellules HeLa ont été cultivées sur lamelles de verre afin de réaliser les observations dans les conditions optimales pour la microscopie photonique. Les cellules ont été marquées 1h30 avec 1 μ M de fluorophore SiR-actin, cryofixées, puis lyophilisées. Les images ont été obtenues en utilisant un objectif 100 X à immersion dans l'huile (NA : 1,4), le laser de déplétion 775 nm et en réglant la fenêtre d'excitation de 658 nm à 711 nm (laser supercontinuum). Les échantillons ont été scannés de manière unidirectionnelle et avec une vitesse de scan de 400 Hz. La figure 42 compare le résultat obtenu entre une cellule lyophilisée (Fig. 42a) et une

cellule fixée chimiquement (Fig. 42b) observées en microscopie confocale et en microscopie STED.

La lyophilisation induit une perte importante de fluorescence du fluorophore et donc une perte importante de signal. Il est nécessaire de baisser le laser de déplétion STED 775 nm à la puissance de 15% et la puissance du laser d'excitation à 10% alors que pour la cellule fixée chimiquement ceux-ci étaient appliqués avec une puissance respectivement de 70% et 15%. Cela a donc une répercussion dramatique sur la résolution de l'image en STED. La courbe noire (Fig. 42a) montre le profil d'un filament (trait jaune) en microscopie confocale et la courbe rouge le profil obtenu en STED. Pour la cellule lyophilisée, une amélioration de la résolution d'un facteur 1,5 est notée en STED (largeur à mi-hauteur du pic étant 1,5 fois plus petite pour la courbe rouge). Cependant lorsque nous sommes dans des conditions de fixation chimique nous améliorons la résolution d'un facteur 8,5 comparé à la microscopie confocale. Ainsi le profil pour la fibre mesurée en microscopie confocale est de 300 nm contre 36 nm en STED (Fig. 42b).

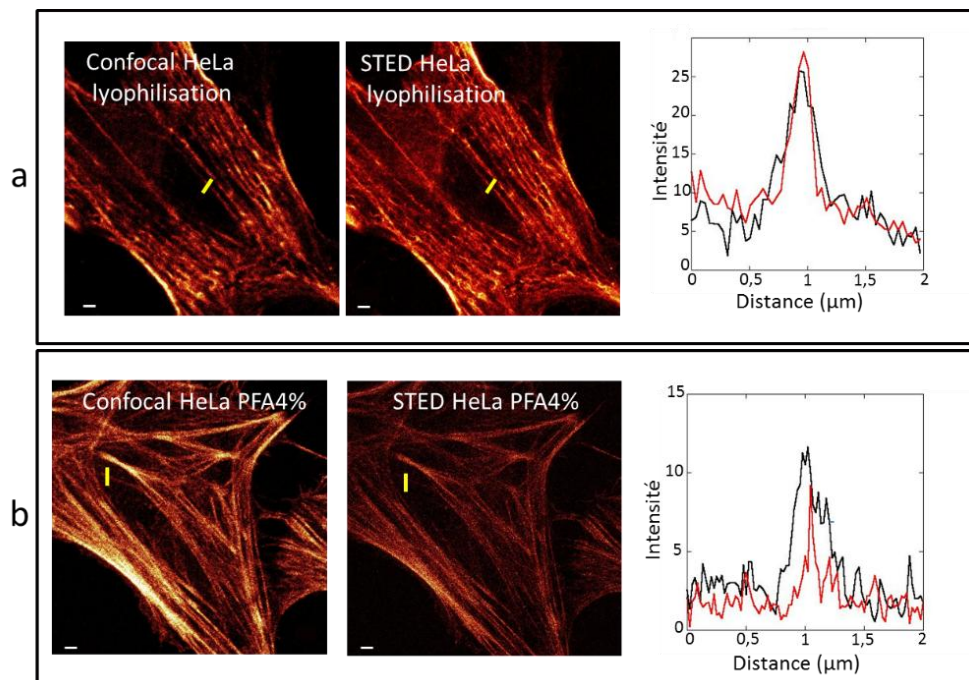


Figure 42 : Comparaison de l'effet des méthodes de fixation sur la qualité des observations en microscopie photonique. Les cellules HeLa ont été marquées avec le fluorophore SiR-actin. Exemples d'images de microscopie confocale, microscopie STED et superposition de l'intensité du signal de fluorescence le long de profils (barres jaunes) en microscopie confocale (spectre noir) et en STED (spectre rouge) pour a) une cellule HeLa cryofixée et lyophilisée et b) une cellule HeLa fixée chimiquement avec 4% de PFA. Dans le cas de la fixation chimique, la puissance du laser de déplétion est fixée à 70%, alors que pour les échantillons lyophilisés cette puissance doit être abaissée à 15%

entraînant une forte dégradation de l'effet STED comme illustré par la perte de résolution spatiale. Barre d'échelle = 2 μm .

Donc réaliser la microscopie STED sur des cellules lyophilisées reste possible cependant on perd beaucoup quant à la résolution finale et le gain comparé à la microscopie confocale est très faible. Bien que la résolution du microscope confocal soit légèrement améliorée on ne peut plus parler à proprement dit de microscopie super résolutive.

Nous avons ensuite réalisé la même expérience mais cette fois sur des cellules HeLa cultivées sur membrane de Si_3N_4 puis cryofixées et lyophilisées. Comme nous l'avons vu dans la partie décrivant le choix du support de culture, le montage sur le microscope STED change lorsque l'on utilise les membranes de Si_3N_4 et non plus les lamelles de microscopie (Fig. 36). La membrane de Si_3N_4 est posée sur une lamelle de verre, cellules face sur la lamelle. Au niveau du trajet optique on passe donc par différents indices de réfractions : la goutte d'huile avec $n = 1,49$, le verre avec $n = 1,5$, l'air avec $n = 1$ et enfin la membrane de Si_3N_4 avec $n = 2$. Dans ces conditions, la perte de signal est beaucoup plus importante et il n'est alors plus possible de réaliser l'imagerie STED. Par conséquent nous observerons les cellules en microscopie STED avant l'étape de cryofixation, sur cellules vivantes.

3-5 Marquage fluorescent d'autres protéines

L'utilisation des fluorophores de type SiR reste limitée à certaines protéines pour lesquelles les fluorophores sont commercialisés, comme le marquage des protéines du cytosquelette tubuline et actine. Nous avons cherché à montrer qu'il était possible d'utiliser d'autres types de fluorophores afin de marquer d'autres protéines cibles par introduction d'un plasmide dans les neurones. Pour cela nous avons choisi de marquer la protéine de la densité post-synaptique PSD95. Cette manipulation peut être réalisée soit par électroporation, soit par transfection. Les supports de culture de type Si_3N_4 étant très petits et le nombre de neurones pouvant être cultivés dessus étant faibles, nous avons opté pour l'électroporation des neurones (pouvant aller jusqu'à 70% des cellules exprimant le vecteur), plus efficace que la transfection (de l'ordre de 30% d'efficacité). En effet, compte tenu de la taille de la membrane, il est important que la majorité des neurones expriment le vecteur fluorescent, d'où le choix de l'électroporation. Pour cela nous avons utilisé l'électroporateur 4D-Nucleofector™. Après dissection de l'hippocampe et dissociation des neurones, 500 000

neurones sont centrifugés 5 min à 900 g puis le surnageant est aspiré délicatement. Le culot est re-suspendu dans 100 μ L de solution d'électroporation (Lonza-P3). 4 μ g d'ADN sont ensuite incorporés avec les cellules dans une cuve d'électroporation en veillant à ne pas former de bulles. Les cellules sont ensuite électroporées en sélectionnant le type cellulaire et l'efficacité souhaitée (dans notre cas 'Haute viabilité'). Les neurones sont récupérés à l'aide d'une pipette pasteur fine et dilués dans 140 μ L de milieu de culture neurobasal. Le milieu de culture présent sur les membranes est aspiré jusqu'à l'obtention d'une fine pellicule. Les neurones sont enfin déposés en deux gouttes de 20 μ L sur chacune des membranes de Si₃N₄ pour une densité de 80 000 neurones par membrane. La plaque contenant les membranes est laissée 5 min à température ambiante afin de laisser les neurones se déposer sur la membrane sans provoquer de flux. Les neurones sont ensuite incubés 2h à 36,7°C avant d'être déposés sur les couches d'astrocyte.

Afin de marquer la PSD95 sans surexprimer la protéine nous avons utilisé un plasmide exprimant le *monobody* Xph20 dirigé contre la PSD95, fusionné à la GFP et développée par Matthieu Sainlos et Charlotte Rimbault dans l'équipe de Daniel Choquet à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS). Cette protéine de synthèse est construite à partir du 10^{ème} domaine de type III de la fibronectine humaine et obtenue par Phage display réalisée contre les deux domaines PDZ de la PSD95. Xph20 se lie spécifiquement au premier domaine PDZ de la PSD95 (Rimbault, 2019).

A DIV21, les neurones ont été marqués avec la SiR-actin. La PSD95 et l'actine ont été imagées par microscopie STED. La figure 43 montre les distributions de la PSD95 et de l'actine dans une dendrite de neurone primaire d'hippocampe de rat.

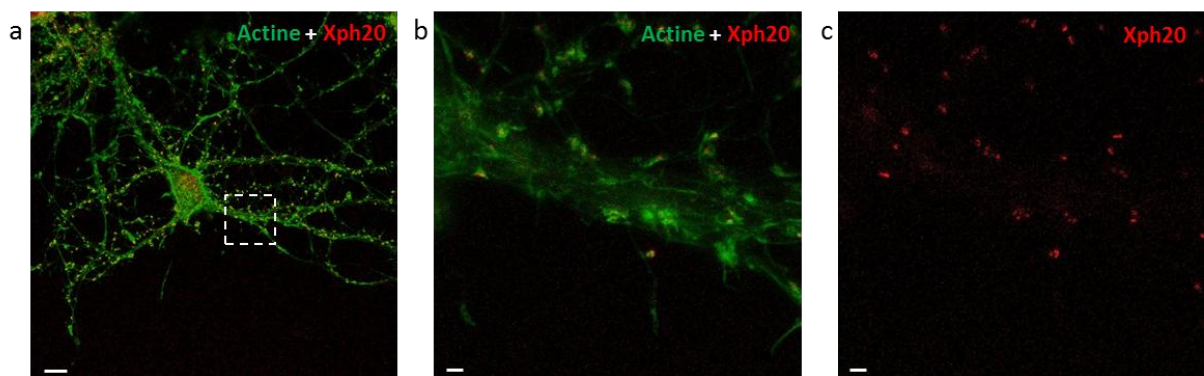


Figure 43 : Neurone primaire d'hippocampe de rat exprimant la protéine de synthèse Xph20 dirigée contre la PSD95 et marqué avec la SiR-actin. a) Image confocale de Xph20 (rouge) et de l'actine (vert). b) Image STED de la protéine Xph20 dirigée contre la PSD95 (rouge) et de l'actine (vert) de la région

encadrée en blanc sur l'image a). c) Image STED de Xph20 (rouge) de la même région qu'en b). Barre d'échelle : 1 μm excepté a) échelle = 10 μm .

3-6 Repérage des cellules pour l'imagerie corrélative

Un autre point crucial pour la combinaison de deux techniques d'imagerie et de savoir corréler les images obtenues. L'objectif de la méthode est en effet de pouvoir visualiser dans une même dendrite ou une même épine dendritique à la fois la distribution des éléments chimiques et celle de protéines cibles. Ceci demande donc de pouvoir retrouver exactement la même zone analysée au microscope STED sur la ligne de faisceau nano-SXRF. Or une épine dendritique mesurant en moyenne 1 μm de long et un neurone en possédant en moyenne 10.000 il est crucial d'avoir un système de repérage ayant une précision nanométrique. Pour cela nous nous sommes basés sur un système de repérage géométrique à trois points.

Lors de la fabrication des supports de Si_3N_4 nous avons la possibilité de faire ajouter un repère se présentant sous la forme d'une membrane plus petite présente dans un des coins du support. Ce repère nous permet d'orienter les membranes et de définir les coordonnées de points bien identifiés. Les coordonnées du coin de la membrane proche du repère définissent le point A de notre système de coordonnées. La membrane étant carrée nous pouvons facilement définir à partir du point A, les points B et C correspondant aux coins suivants rencontrés dans le sens des aiguilles d'une montre qui définissent un repère orthonormé de centre A (Fig. 44).

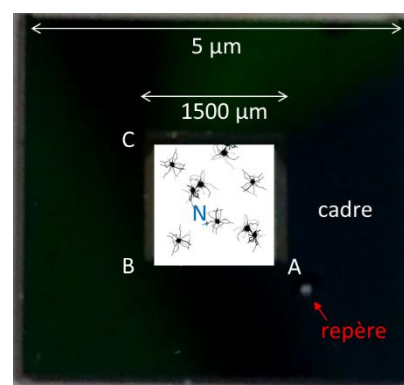


Figure 44 : Repérage sur la membrane de Si_3N_4 . Un repère est usiné près d'un des coins de la membrane et sert de référence. Les coins A, B et C sont trois points appartenant au repère orthonormé de centre A. La région N correspond à une zone d'un neurone analysée en STED et dont les positions sont recalculées sur le microscope synchrotron à partir du repère orthonormé.

Les positions de chaque point d'intérêt (A, B, et C) sont enregistrées sur le microscope STED. Si nous prenons N, une région d'un neurone analysée en microscopie STED, nous pouvons calculer les distances NA, NB et NC correspondant respectivement aux distances entre N et les trois coins A, B et C et correspondant aux rayons des trois cercles de centre A, B et C et passant par N. Ces distances demeurent donc égales quelque que soit l'instrument utilisé par la suite et sont données par l'équation :

$$NR = \sqrt{(x - x_R)^2 + (y - y_R)^2} \quad (7)$$

Où R correspond à un des points de repère A, B ou C, $(x_R; y_R)$ les coordonnées de ce point, et $(x; y)$ les coordonnées du neurone N, toutes enregistrés sur le microscope STED. Le point N correspond alors au point appartenant aux deux droites d'intersection des cercles A et B et des cercles A et C qui ont pour équations respectivement :

$$y = -\frac{(x_A - x_B)}{(y_A - y_B)}x + \frac{NB^2 - NA^2 + y_A^2 - y_B^2 + x_A^2 - x_B^2}{2(y_A - y_B)} \quad (8)$$

Et

$$y = -\frac{(x_A - x_C)}{(y_A - y_C)}x + \frac{NC^2 - NA^2 + y_A^2 - y_C^2 + x_A^2 - x_C^2}{2(y_A - y_C)} \quad (9)$$

Déterminer la coordonnée x de cette région N revient alors à déterminer le résultat de l'équation pour laquelle (8) = (9)

On a ainsi :

$$x = \frac{\left(\frac{NB^2 - NA^2 + y_A^2 - y_B^2 + x_A^2 - x_B^2}{2(y_A - y_B)}\right) - \left(\frac{NC^2 - NA^2 + y_A^2 - y_C^2 + x_A^2 - x_C^2}{2(y_A - y_C)}\right)}{-\left(\frac{x_A - x_C}{y_A - y_C} - \frac{x_A - x_B}{y_A - y_B}\right)} \quad (10)$$

Les nouvelles coordonnées des repères A, B et C (x'_R, y'_R) sont enregistrées sur le microscope synchrotron ce qui permet alors de recalculer les coordonnées (x', y') de N telles que :

$$x' = \frac{\left(\frac{NB^2 - NA^2 + y_A'^2 - y_B'^2 + x_A'^2 - x_B'^2}{2(y_A' - y_B')}\right) - \left(\frac{NC^2 - NA^2 + y_A'^2 - y_C'^2 + x_A'^2 - x_C'^2}{2(y_A' - y_C')}\right)}{-\left(\frac{x'_A - x'_C}{y'_A - y'_C} - \frac{x'_A - x'_B}{y'_A - y'_B}\right)} \quad (11)$$

3-7 Validation de la préservation structurale des neurones après lyophilisation

3-7-1 Microscopie STXM sur la ligne HERMES (SOLEIL)

Comme nous l'avons vu au chapitre 3-4-4, la stratégie retenue est l'imagerie des cellules vivantes en microscopie super-résolutive puis la cryofixation et la lyophilisation avant l'analyse par imagerie nano-SXRF. L'un des inconvénients majeurs du *freeze-drying* et l'éventuelle déformation des structures cellulaires notamment à l'échelle nanométrique qui nous intéresse. Nous avons contrôlé qu'après la cryofixation et la lyophilisation la corrélation des deux images à l'échelle nanométrique était toujours réalisable.

Nous avons donc imagé des neurones vivants cultivés sur membrane de Si_3N_4 en microscopie STED marqués avec les fluorophores SiR-tubulin et SiR700-actin puis nous avons cryofixé et lyophilisé les échantillons. Nous avons ensuite analysé les mêmes dendrites des mêmes neurones en utilisant la microscopie STXM sur la ligne HERMES du synchrotron SOLEIL avec une résolution spatiale de 25 nm. La figure 45 montre une dendrite de neurone primaire d'hippocampe marquée avec les fluorophores SiR-tubulin et SiR700-actin et observée avec les deux modes d'imageries, STED sur cellules vivantes, et STXM après cryofixation et lyophilisation. Les images a) et d) montrent respectivement le marquage de la tubuline obtenu en microscopie STED et la densité de matière obtenue par STXM tandis que l'image e) correspond à la superposition de ces deux images. La figure b) est une image obtenue par microscopie confocale donc moins résolue que le STED mais mettant en évidence les épines dendritiques par double marquage tubuline (rouge) et actine en (vert). Enfin des zooms focalisés sur les épines dendritiques sont visualisés en c) et f).

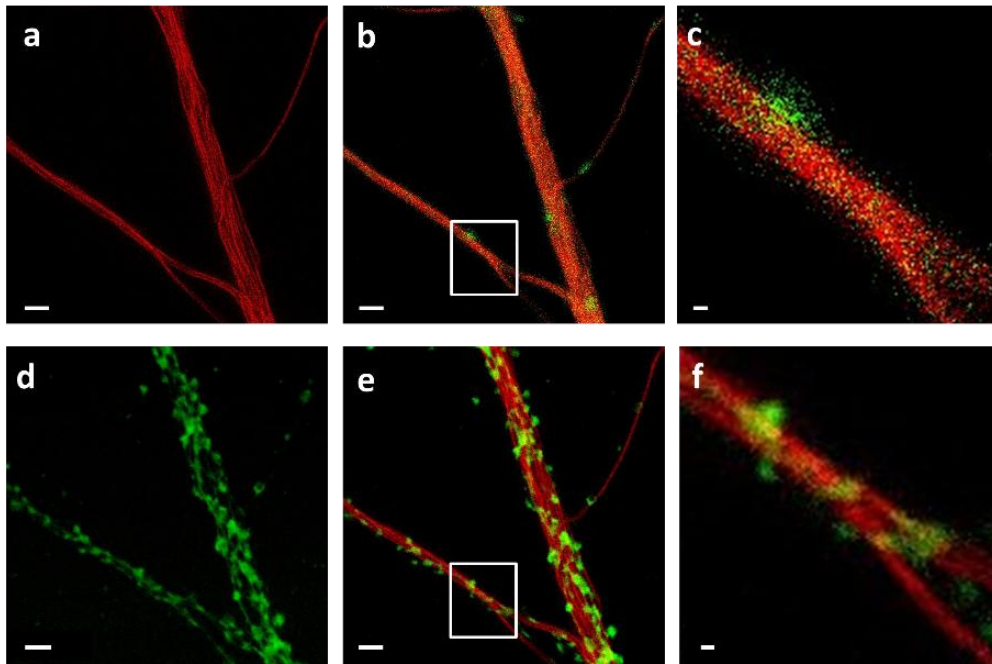


Figure 45: Corrélation de l'imagerie STED de la tubuline sur cellules vivantes et de la microscopie STXM après cryofixation et lyophilisation. a) Image STED de la tubuline d'une dendrite de neurone vivant d'hippocampe de rat après marquage SiR-tubulin. b) image confocale de la même dendrite montrant en rouge la tubuline et en vert l'actine (marquage SiR700-actin). c) zoom sur la région encadrée de l'image b) montrant en vert une épine riche en actine sur la dendrite riche en tubuline (en rouge). d) Image STXM de la même dendrite obtenue avec une résolution spatiale de 25 nm après cryofixation et lyophilisation. e) superposition des images STED et STXM montrant l'excellente préservation des structures cellulaires après lyophilisation. f) zoom de la région encadrée dans l'image e) montrant la présence d'épines dendritiques sur la dendrite révélée par STXM. L'une de ces épines est corrélée avec la fluorescence d'actine visible en c). Echelles = 2 μ m sauf pour les images c et f, échelles = 250 nm.

Nous pouvons noter la bonne corrélation obtenue entre les deux types d'imageries avec la structure des neurites même les plus fins qui reste bien conservée (Fig. 45 et 46). L'imagerie STXM offre la possibilité de visualiser la morphologie cellulaire sans marquage. Par cette méthode l'ensemble des structures et des épines est révélée sur une projection 2D. La microscopie STED *a contrario* cible spécifiquement une protéine par marquage. Cependant le marquage n'est pas efficace à 100% et l'image correspond à un seul point focal. Ainsi certaines épines peuvent ne pas être visibles. Comme dans le principe d'une radiographie, dans le cas de la microscopie STXM c'est l'intégralité de la matière qui est visualisée.

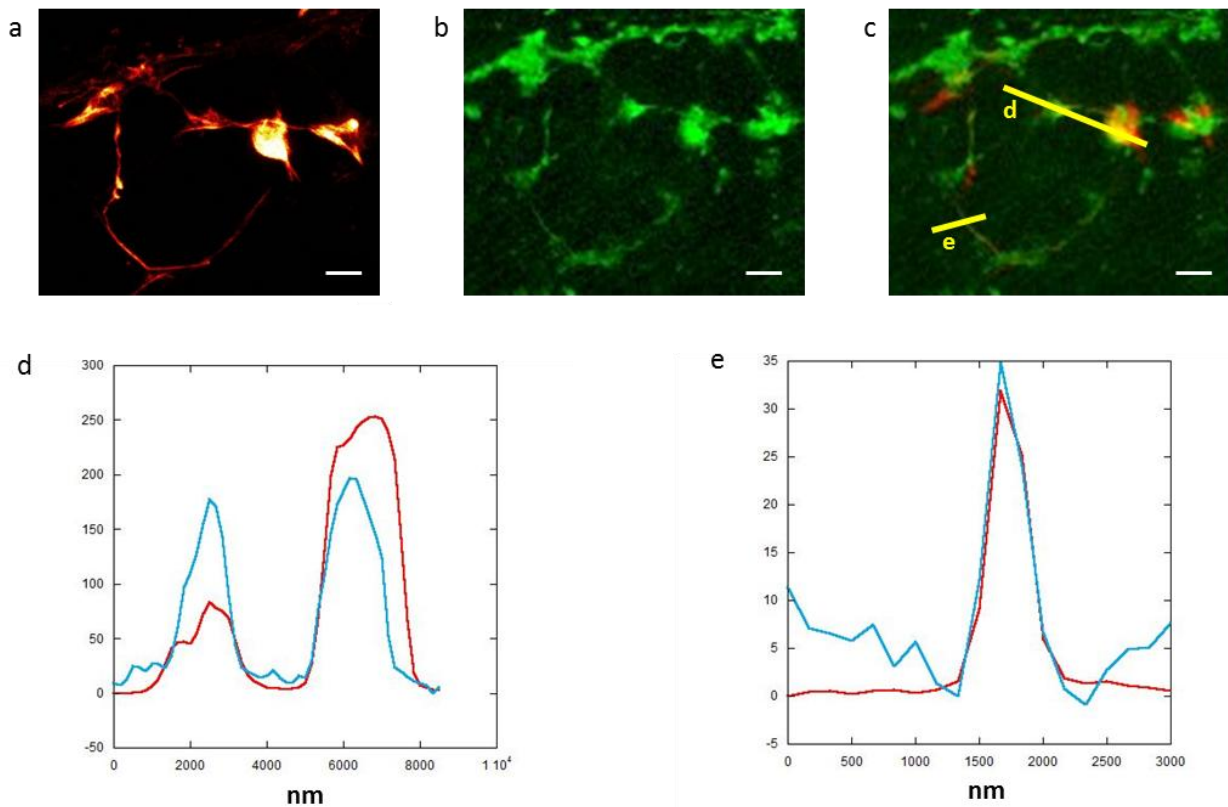


Figure 46: Corrélation de l'imagerie STED de l'actine sur cellules vivantes et de la microscopie STXM après cryofixation et lyophilisation. a) Image STED de l'actine d'épines dendritiques de neurone vivant d'hippocampe de rat après marquage SiR-actin. b) Image STXM de la même région. c) corrélation entre l'image STED et l'image STXM. d) profil correspondant à la section d tracée sur l'image c. e) profil correspondant à la section e tracée sur l'image c. Echelles = 2 μ m.

3-7-2 Microscopie STXM et SXRF sur la ligne I08 (DIAMOND)

Nous avons également eu l'opportunité de valider le protocole de préparation sur la ligne I08 du synchrotron Diamond (Oxford) en combinant microscopie STXM à 30 nm de résolution et imagerie SXRF avec une résolution de 200 nm. Pour cette expérience nous avons imagé à la fois des neurones primaires d'hippocampe de rat et des cellules gliales et différents marquages (actine, tubuline et PSD95). Dans la figure 47 nous pouvons voir un astrocyte observé vivant par microscopie confocale (Fig. 47a) puis cryofixé et lyophilisé avant d'être analysé par microscopie STXM (Fig. 47b). La morphologie cellulaire initiale de la cellule vivante est bien conservée après les étapes de cryofixation et lyophilisation.

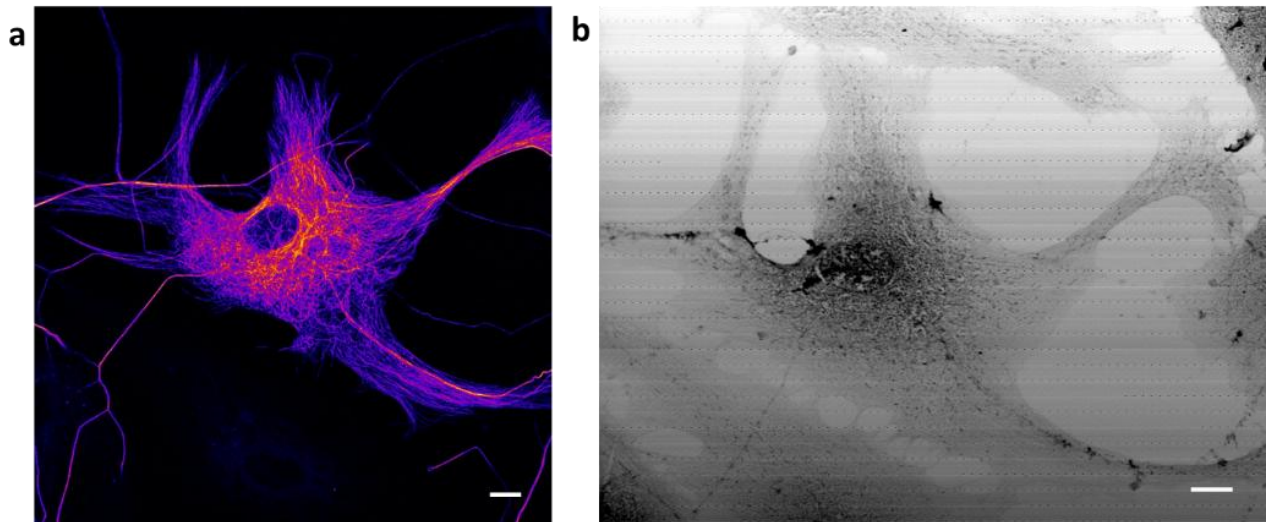


Figure 47: Astrocyte marqué avec le fluorophore SiR-tubulin. a) image confocale de la SiR-tubulin. b) ultrastructure de l'échantillon après cryofixation et lyophilisation obtenue par microscopie STXM sur la ligne I08 du synchrotron Diamond avec une taille de pixel de 100 nm (b). Echelle 10 µm.

Cette ligne de microscopie synchrotron permet de travailler à des énergies comprises entre 250 eV et 4,4 keV et offre également la possibilité de réaliser l'imagerie SXRF des éléments légers tels que le P et le S (Fig. 48). Elle atteint donc aussi les énergies d'excitation des raies de transitions L des métaux tels que Mn, Fe, Cu, Zn. Néanmoins, la probabilité d'obtenir ce type de transition demeure beaucoup plus faible que les transitions des raies K, la sensibilité est donc amoindrie et n'est pas suffisamment importante pour l'imagerie chimique de ces métaux dans des échantillons biologiques.

Afin toujours de valider la méthode d'imagerie corrélative, nous avons imagé les distributions du P et du S dans différents types d'échantillons : des neurones marqués avec la SiR-actin (Fig. 48 d-f), la SiR-tubulin ou encore des neurones exprimant le *monobody* Xph20 contre la PSD95 (Fig. 48 a-c). Ces images sont les premiers exemples d'imagerie corrélative de microscopie de super résolution (STED) et d'imagerie des éléments chimiques (nano-SXRF). Elles confirment la faisabilité de cette approche.

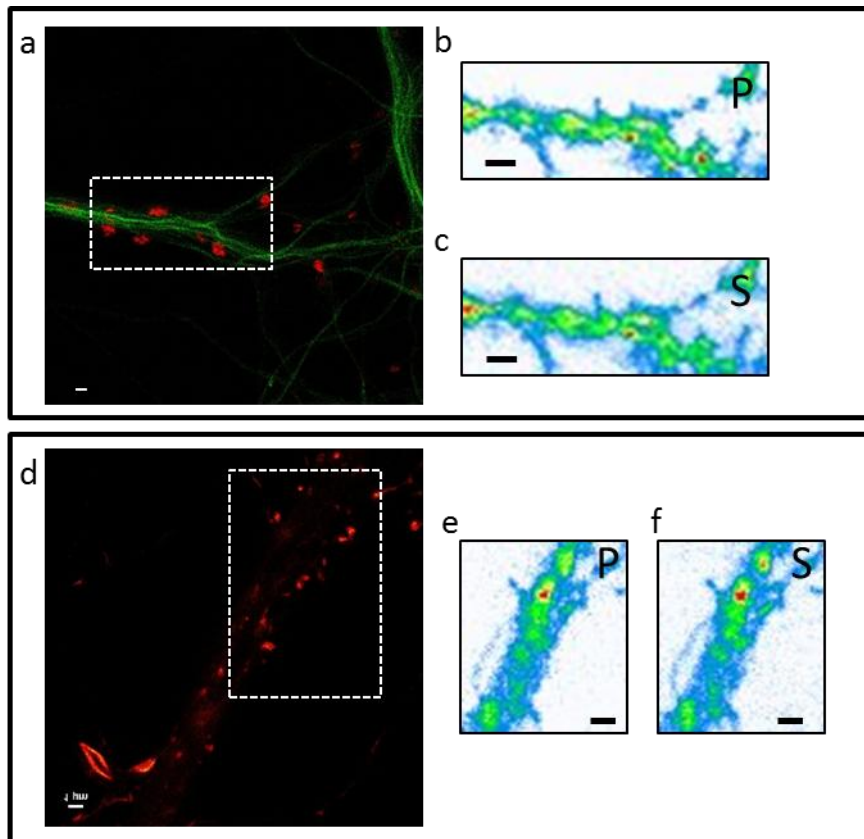


Figure 48: Dendrites de neurone primaire d'hippocampe de rat imagées par microscopie STED et spectrométrie nano-SXRF. a) Dendrite imagée en microscopie STED exprimant le monobody Xph20 contre la PSD95 (rouge) et marqué avec la SiR-tubulin (vert). b) Cartographie du phosphore dans la région encadrée en a). c) Cartographie du soufre dans la même région que b). d) Dendrite d'un neurone marqué avec la SiR-actin imagé en STED. e) Cartographie du phosphore dans la région encadrée en d). f) Cartographie du soufre dans la même région que e). Les images des éléments chimiques ont été obtenues sur la ligne I08 du synchrotron Diamond avec une résolution de 200 nm. Echelle = 1 μ m.

3-8 Imagerie SXRF des cellules sur Nanoscopium

Avant de combiner la spectrométrie nano-SXRF et le STED à très haute résolution nous avons eu la possibilité de valider la méthode corrélative développée en utilisant la ligne Nanoscopium au synchrotron SOLEIL sur des neurones primaires d'hippocampe de rat. Les neurones ont été marqués à DIV15 avec le fluorophore SiR-tubulin et imagés vivants en microscopie confocale puis cryofixés et lyophilisés. La spectrométrie SXRF a été réalisée à une énergie de 12 keV avec un flux de photon de 10^{10} ph/s permettant l'imagerie des métaux. Les images ont été acquises avec une taille de pixel de 300 nm et un temps d'intégration de 300 ms par point. La figure ci-dessous montre les distributions de plusieurs éléments chimiques (K, P, S, Fe et Zn) obtenues par spectrométrie SXRF ainsi que la tubuline imagée en microscopie confocale (Fig. 49).

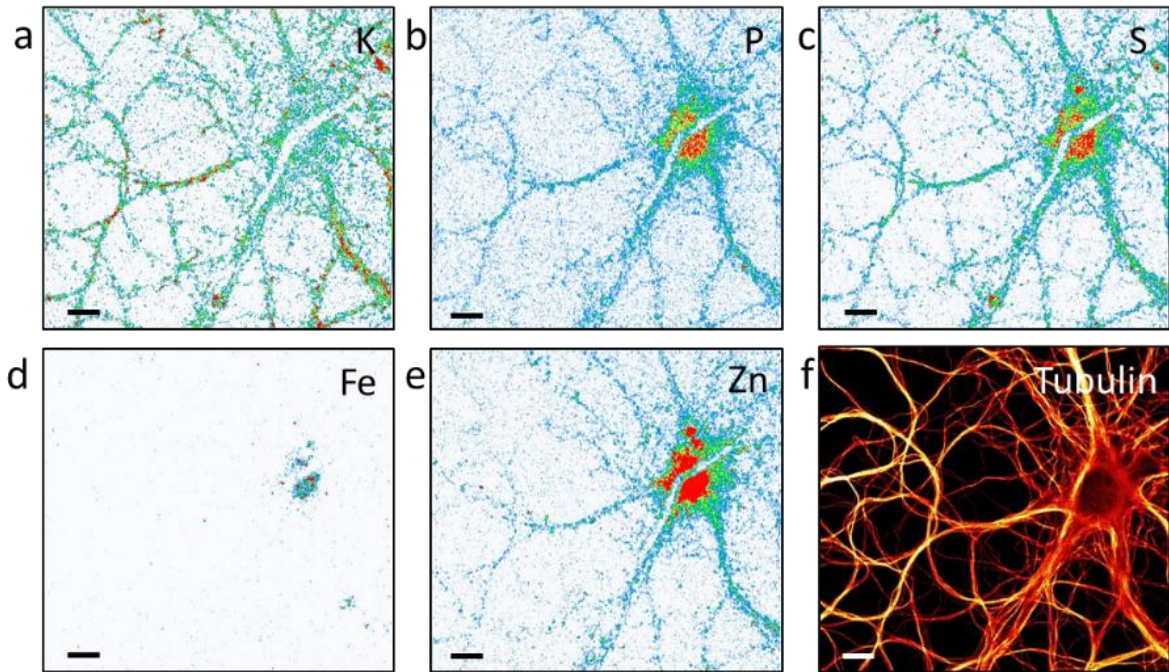


Figure 49 : Imagerie corrélative confocale et SXRF montrant les distributions des éléments chimiques d'un neurone primaire d'hippocampe de rat. a-e) cartographies des éléments chimiques K, P, S, Fe et Zn obtenues avec une taille de pixel de 300 nm sur la ligne Nanoscopium du synchrotron SOLEIL après cryofixation et lyophilisation des échantillons. f) Image confocale du même neurone vivant avant cryofixation marqué avec la SiR-tubulin. Echelle d'intensité croissante du bleu vers le rouge. Barre d'échelle : 10 μ m.

Les cartographies du P, du S et du Zn (Fig. 49, b, c, e) révèlent le noyau cellulaire (rouge) particulièrement riche en zinc. Les épines dendritiques sont également bien visibles sur les cartographies de ces éléments (P, S, Zn). Alors que le P, le S et le Zn semblent présents dans chaque compartiment cellulaire, le Fe est localisé principalement dans le corps cellulaire du neurone. Il est présent également en forme de points très localisés à plusieurs endroits dans les dendrites. Ces images sont les premières à valider entièrement la méthode d'imagerie corrélative entre l'imagerie SXRF et microscopie confocale sur des neurones primaires d'hippocampe de rat bien qu'elles aient été obtenues à relativement basse résolution (300 nm). Cependant, bien que cette méthode soit validée, une cassure est visible au niveau du corps cellulaire du neurone montrant que la préservation de l'échantillon lors de la lyophilisation reste délicate.

3-9 Imagerie corrélative super résolutive STED et nano-SXRF sur échantillons lyophilisés

Après validation du protocole nous avons appliqué la méthode en utilisant la ligne ID16A du synchrotron ESRF qui offre une résolution spatiale comparable à celle obtenue en STED. Pour cela les neurones ont été cultivés sur membrane de Si₃N₄ dans du milieu BrainPhys. A DIV21 les épines dendritiques des neurones matures sont alors bien développées et les neurones ont été marqués pendant 1h30 avec 1 μM de SiR-tubulin.

Les positions des cellules ont été retrouvées en utilisant le système de repérage géométrique à trois repères. Les analyses ont été effectuées avec un faisceau de 17 keV et un flux de photon de 3.7 10¹¹ ph/s. Les échantillons ont été analysés avec une taille de pixel de 40 nm par 40 nm et un temps d'intégration de 100 ms. Les échantillons ont été imagés par spectrométrie nano-SXRF et par contraste de phase. L'analyse quantitative des données a été réalisée à partir du logiciel PyMCA (Solé, 2007).

La figure 50 montre les résultats obtenus pour un échantillon lyophilisé. La figure 50a) correspond à une vue globale de la tubuline du neurone marqué SiR-tubulin et imagé en microscopie confocale. Les figures 50b) et 50c) correspondent à un zoom obtenu de la région entourée dans l'image 50a) respectivement en microscopie confocale et en super résolution STED. Les cartographies des éléments P, S et Zn sont répertoriées en d), e) et f).

Nous avons ensuite déterminé les limites de détection (LOD, '*limit of detection*') obtenues avec la spectrométrie nano-SXRF (Tableau 3). Selon la nomenclature de l'IUPAC '*International Union of Pure and Applied Chemistry*' la limite de détection pour une méthode de chimie analytique correspond à trois fois l'écart-type ajouté à la moyenne du bruit de fond

$$LOD = m_{bi} + k \cdot \sigma_{bi} \quad (12)$$

avec m_{bi} , la moyenne obtenue sur les mesures des blancs, k , le facteur numérique choisi en fonction du niveau de confiance souhaité ($k = 3$ pour la LOD) et σ_{bi} , la déviation standard sur les mesures de blancs (IUPAC, 1997).

Pour calculer les limites de détection obtenues avec la spectrométrie nano-SXRF dans les conditions d'analyse que nous avons utilisées (taille de faisceau, énergie, flux, échantillon)

nous avons calculés la moyenne et l'écart-type sur 12 mesures de bruit de fond. Ces valeurs exprimées en $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ peuvent être ramenées à un nombre d'atomes détectés par pixel sachant que chaque pixel mesure 40 nm de côté et en tenant compte de la masse atomique de chaque élément chimique. La LOD atteint 130 atomes de Zn par pixel de 40 nm (Tableau 3).

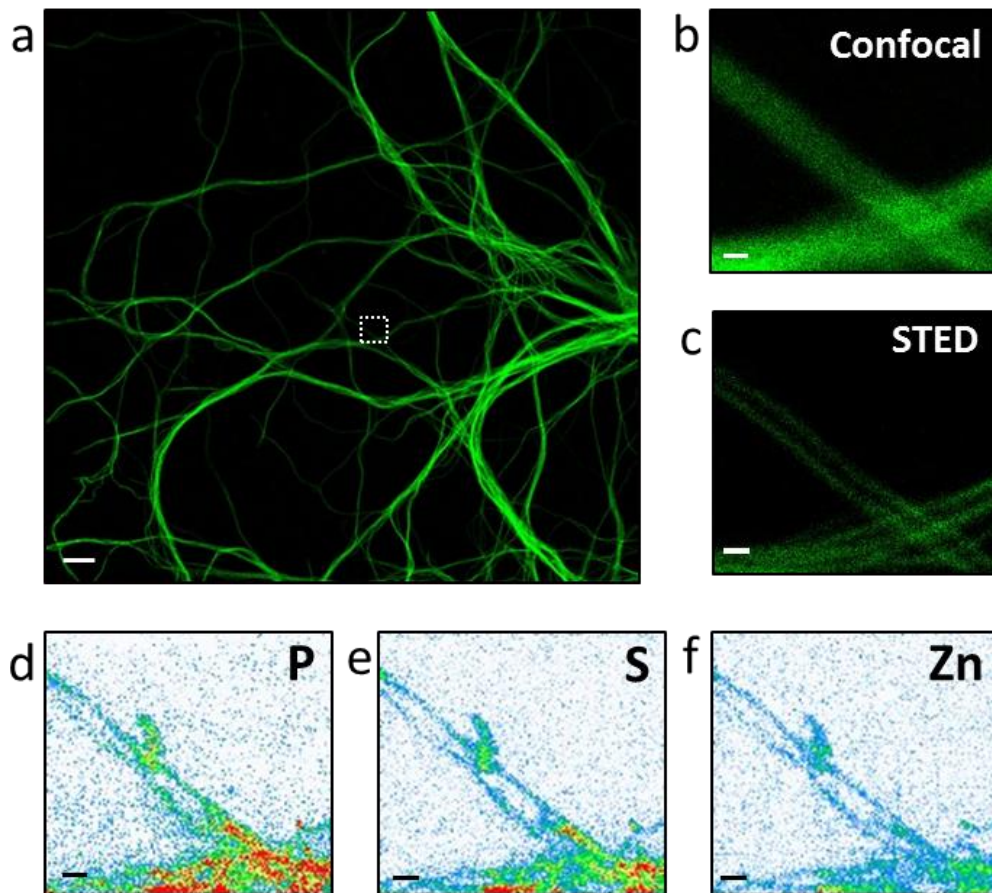


Figure 50: Neurone primaire d'hippocampe de rat analysé par spectrométrie nano-SXRF et microscopie photonique STED avec une résolution de 40 nm. a) Neurone primaire marqué SiR-tubulin et imagé en microscopie confocale, b) Zoom sur la région encadrée dans l'image a) en microscopie confocale, c) même zoom mais imagé en super résolution STED. Les images d-f montrent les distributions des éléments P, S et Zn dans la même région, obtenues avec une résolution de 40 nm par nano-SXRF.

	Phosphore	Soufre	Potassium	Zinc
LOD	0,331 ng.mm ²	0,095 ng.mm ²	0,080 ng.mm ²	0,007 ng.mm ²
LOD par pixel 40 nm x 40 nm	8,2 10 ⁻¹⁹ g (16000 atomes)	2,2 10 ⁻¹⁹ g (4200 atomes)	2,4 10 ⁻¹⁹ g (3800 atomes)	1,4 10 ⁻²⁰ g (130 atomes)

Tableau 3 : Limites de détection (LOD) obtenues avec la spectrométrie nano-SXRF pour les éléments P, S, K et Zn et en accord avec les recommandations de l'IUPAC '*International Union of Pure and Applied Chemistry*'. Ces limites ont été calculées en prenant en compte 12 mesures de bruit de fond.

Par ailleurs, sur la ligne I08 de Diamond nous avons imagé à basse résolution (200 nm) les distributions du P et S dans des neurones exprimant le *monobody* Xph20 ciblant la PSD95 et donc marquant spécifiquement la densité post-synaptique des synapses. Nous avons montré ainsi qu'il était possible d'utiliser d'autres types de marquage que les fluorophores SiR pour la corrélative STED et SXRF. Cependant, en analysant ce type d'échantillon sur la ligne ID16A nous avons constaté la présence de contamination en calcium ne rendant pas possible la réalisation d'analyses fines sur ces échantillons. Ces contaminations pourraient être dues à la solution d'électroporation utilisée.

Cette stratégie d'imagerie corrélative, basée sur l'observation STED de neurones vivants puis l'imagerie nano-SXRF après cryofixation et lyophilisation, est donc validée en super-résolution. Cependant, comme nous l'avons développé en début de chapitre, pour une meilleure corrélation des résultats obtenus par la combinaison de deux techniques d'imageries et une meilleure compréhension de l'information biologique il s'avère essentiel de travailler au plus près possible de l'état du vivant. Dans la méthode que nous venons de développer la microscopie photonique super-résolutive s'effectue sur des cellules vivantes. Cependant la spectrométrie nano-SXRF est réalisée sur des cellules lyophilisées donc non hydratées. Nous avons donc par la suite appliqué la méthode sur des échantillons cryofixés maintenus congelés hydratés.

3-10 Imagerie nano-SXRF sur échantillons congelés hydratés

Bien que l'état cryofixé hydraté reste théoriquement l'état le plus proche du vivant cette préparation nécessite plusieurs étapes cruciales afin de garantir la meilleure

préservation possible de l'échantillon. Dans un premier temps, le milieu de rinçage doit être soigneusement éliminé avant la cryofixation de l'échantillon au risque de voir se former une couche de glace importante à l'arrière et sur l'échantillon rendant alors difficile le repérage des cellules avec le microscope à transmission de la ligne et diminuant fortement le signal. Néanmoins une très fine couche de glace doit être présente sur l'échantillon afin d'éviter la lyophilisation de celui-ci sous vide dans la chambre d'analyse. Un juste milieu doit donc être obtenu. Ensuite, toute trace de fluide cryogénique doit être éliminée, avec du papier absorbant refroidit dans l'azote liquide, ce qui n'est pas aisé dans le cas du 2-méthylbutane (isopentane). Les échantillons conservés dans des vapeurs d'azote sont montés dans la chambre d'analyse sous vide par transfert dans de l'azote liquide en utilisant le système de cryo-transfert Leica EM VCT500 présent sur la ligne ID16A (Fig. 51). L'échantillon doit être constamment immergé dans l'azote liquide au risque de voir se former là aussi une couche de glace. Le cryotube contenant l'échantillon doit donc être ouvert dans l'azote liquide. Le remplissage dans la cuve de transfert avec l'azote liquide est automatisé de manière à empêcher la contamination des échantillons. Avant le transfert sur la ligne tout le matériel est refroidit à la température de l'azote liquide.

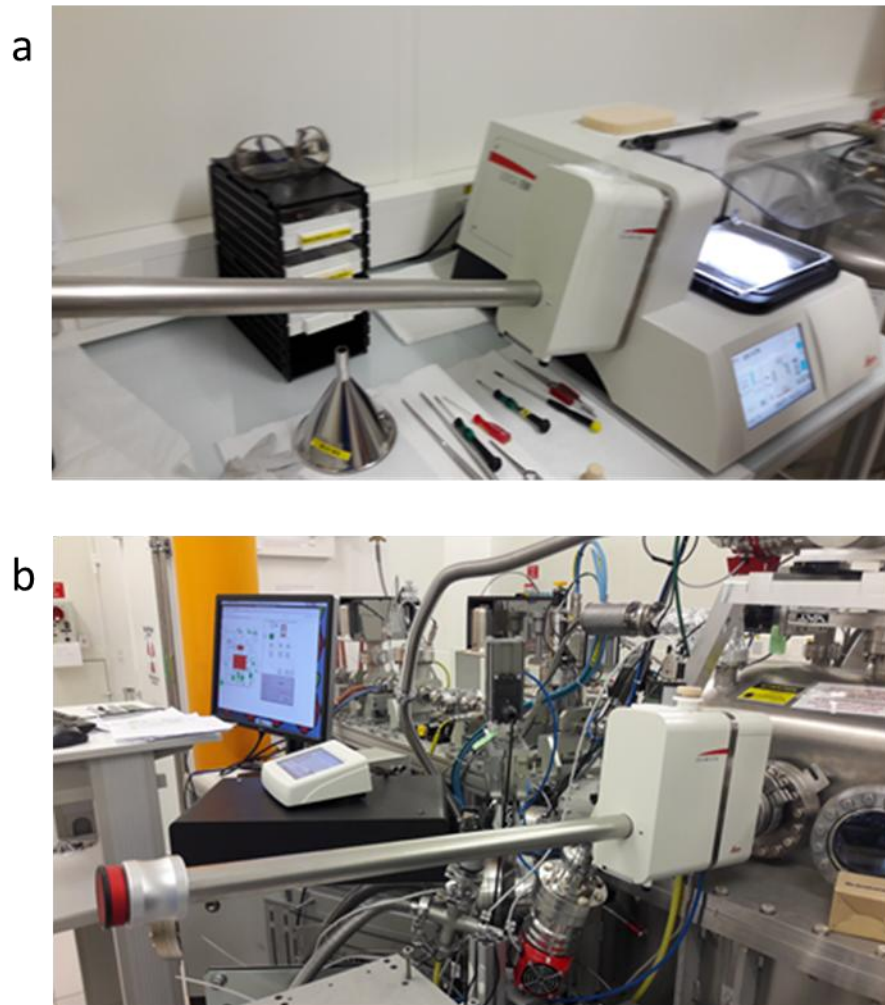


Figure 51 : Transfert des échantillons congelés hydratés sur la ligne ID16A. a) les échantillons sont transférés dans l'azote liquide à l'aide du système de cryo-transfert Leica EM VCT500. b) Transfert de l'échantillon sur la ligne.

La figure 52 montre une dendrite de neurone imagée en microscopie confocale et STED puis analysée par spectrométrie cryo-nano-SXRF après avoir été cryofixée. Nous pouvons noter la présence d'un bruit de fond plus important que dans le cas des cellules analysées à l'état lyophilisé et due à la présence de glace sur l'échantillon. L'épaisseur de glace présente sur l'échantillon a été déterminée à $33,2 \mu\text{m}$ en moyenne avec un minimum de $15,6 \mu\text{m}$ et un maximum de $42,6 \mu\text{m}$. Nous pouvons remarquer également que la préservation de l'échantillon n'est pas optimale et il est difficile de corrélérer ces images avec les images obtenues sur cellules vivantes. De plus la cartographie du Zn montre une distribution anormale de celui-ci avec en rouge une structure non retrouvée sur les cartographies des autres éléments et correspondant très probablement à une contamination.

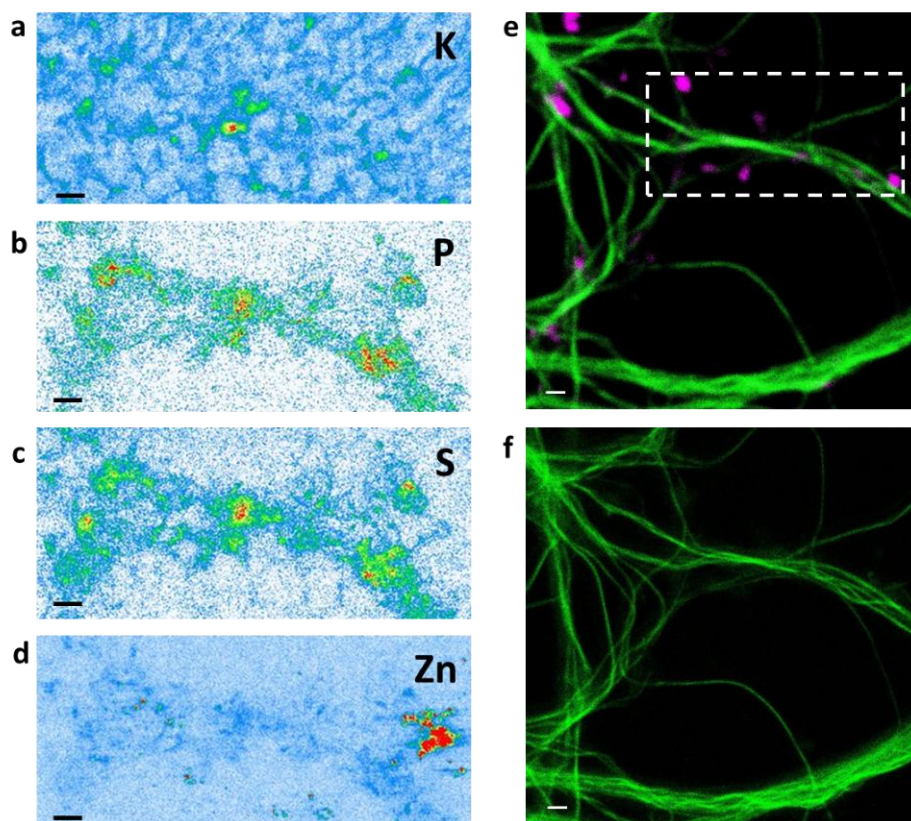


Figure 52: Combinaison entre microscopie photonique STED sur neurones vivants et spectrométrie cryo-nano-SXRF après cryofixation. Les images a-d montrent les distributions des éléments K, P, S et Zn dans une dendrite de neurone. e) microscopie confocale comprenant la région analysée par spectrométrie cryo-nano-SXRF (cadre en pointillé). f) même région imagée en microscopie STED. Echelle : 1 μm .

Travailler sur échantillons cryofixés demande encore du développement cependant les travaux de Carmona *et al*, sur le rôle du manganèse dans un syndrome parkinsonien montrant la distribution du manganèse dans des lignées cellulaires analysées par spectrométrie nano-SXRF à l'état congelé hydraté (Carmona, 2019) soulignent combien le développement de la corrélatrice microscopie super résolutive et spectrométrie nano-SXRF sur échantillons cryofixés hydratés est important.

3-11 Conclusion sur le développement de la méthode

Après le choix du support de culture, le point le plus crucial pour combiner la microscopie super résolutive STED et l'imagerie nano-SXRF est la préparation de l'échantillon. Nous avons testé plusieurs stratégies : imagerie sur cellules fixées chimiquement, sur cellules vivantes en

STED puis lyophilisées ou encore analysées à l'état congelé et hydraté en imagerie nano-SRXF. En utilisant la microscopie STXM et l'imagerie SXRF nous avons montré qu'il était possible de corréler des images obtenues en microscopie super résolutive de cellules vivantes avec l'imagerie nano-synchrotron des échantillons cryofixés puis lyophilisés. Cependant cette préservation n'est pas toujours optimale et des déformations morphologiques fines peuvent survenir, toutes les analyses ne sont pas exploitables. Afin de nous affranchir de la lyophilisation nous avons choisi d'étudier une autre stratégie : l'imagerie STED sur cellules vivantes suivie de l'imagerie nano-SRXF sur échantillons congelés hydratés. Cependant, la manipulation de ce type d'échantillon s'avère beaucoup plus délicate et nécessite encore du développement que nous n'avons pas eu le temps de réaliser au cours de cette thèse. Nous avons donc opté pour l'imagerie STED sur cellules vivantes suivie de l'imagerie nano-SRXF des cellules cryofixées puis lyophilisées. En suivant cette stratégie, nous avons combiné la microscopie super résolutive STED et l'imagerie nano-SRXF avec une résolution de 40 nm et une très haute sensibilité (< 130 atomes de zinc par pixel). Dans le chapitre 5 'résultats biologiques' nous aborderons comment nous avons utilisé cette méthode pour étudier la distribution des métaux dans les structures neuronales, en particulier les dendrites et épines dendritiques marquées avec les fluorophores SiR-actin ou SiR-tubulin.

Chapitre 4

Résultats biologiques

4-1 Caractérisation chimique des milieux de culture

Etudier le rôle des métaux dans les neurones nécessite au préalable de bien définir les notions de groupes contrôles et de groupes traités. En effet, les neurones primaires d'hippocampe de rat sont cultivés dans du milieu Neurobasal puis ce milieu est progressivement remplacé par du milieu BrainPhys démontré comme étant un milieu plus favorable à l'activité neuronale (Bardy, 2015). Comme nous le verrons, pour étudier le rôle des éléments métalliques sur les protéines du cytosquelette neuronal nous pouvons imager la distribution des éléments chimiques dans des cellules dites contrôles et corrélérer cette distribution avec celle des protéines du cytosquelette. Nous pouvons aussi étudier l'effet d'une surexposition ou du déficit d'un élément sur l'expression des protéines du cytosquelette, en supplémentant le milieu avec cet élément ou bien en utilisant un chélateur. Il nous faut toutefois déjà bien identifier les concentrations de ces éléments qui sont utilisées classiquement en culture neuronale dans les milieux Neurobasal et BrainPhys. En effet, les milieux de cultures sont riches en protéines et en sels et contiennent ces éléments chimiques essentiels. Les concentrations des milieux Neurobasal et BrainPhys ont été déterminées par analyse de faisceau d'ions PIXE sur la plateforme AIFIRA du CENBG. Pour chaque échantillon de milieu à analyser, un standard d'yttrium a été ajouté afin de servir de contrôle interne permettant de normaliser les résultats obtenus par rapport à la concentration connue d'yttrium (112,5 μM). Trois dépôts successifs de 1 μL de milieu ont été déposés en goutte sur des membranes de polycarbonate et analysés en PIXE. Les concentrations déterminées sont répertoriées dans le tableau 4 ci-dessous.

Milieu de culture	Zn (μM)	Fe (μM)	Cu (μM)
Neurobasal	2,5 \pm 0,2	6,0 \pm 4,2	4,2 \pm 0,8
BrainPhys	1,4 \pm 0,04	1,4 \pm 0,4	1,8 \pm 0,4

Tableau 4 : Concentrations des éléments chimiques Zn, Fe et Cu dans les milieux de culture Neurobasal et BrainPhys déterminées par analyse PIXE (moyenne \pm écart type pour n = 3).

Ces résultats sont cohérents avec des analyses des éléments traces qui avaient été effectuées sur d'autres milieux de culture comme le DMEM (Cu : 1,3 μM ; Zn : 1,7 μM) ou RPMI (Cu : 7,9 μM ; Zn : 2,6 μM) (Glassman, 1980).

4-2 Effet de la supplémentation et de la chélation du zinc et du cuivre sur le cytosquelette neuronal

Dans l'étude de Perrin *et al.* sur le rôle du zinc dans la stabilité du cytosquelette (Perrin, 2017), des neurones primaires d'hippocampes de rat traités à DIV15 avec 10 μM de ZnCl_2 pendant 24h présentaient une augmentation de l'expression de la β -tubuline et de l'actine-F mesurée par quantification d'immunofluorescence (Fig. 53).

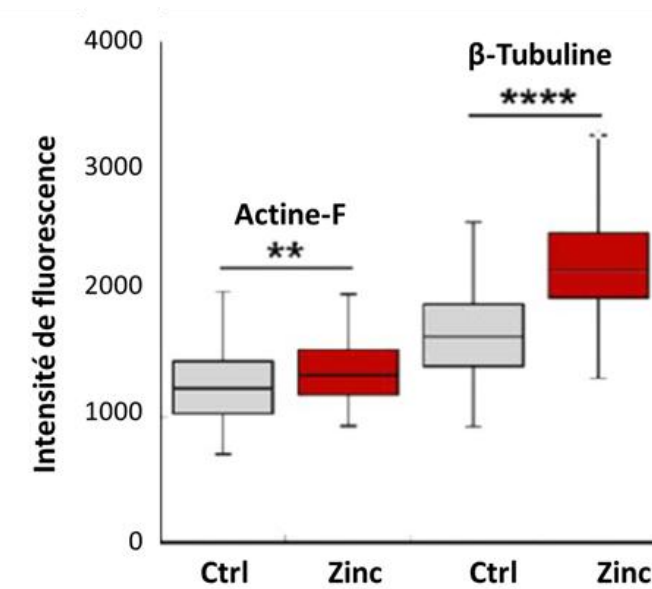


Figure 53 : Expression de l'actine-F et de la β -tubuline dans des neurones d'hippocampe de rat après exposition 24h dans un milieu supplémenté en zinc (10 μM). ** $p < 0,01$ et **** $p < 0,001$, test de Mann-Whitney. Avec $n = 84$ pour le groupe contrôle et 82 pour le groupe traité au zinc. D'après Perrin, 2017.

Les concentrations des éléments chimiques Zn, Fe et Cu ont été déterminées comme dans le paragraphe 4-1, par analyse PIXE (Tableau 5). Les résultats d'immunomarquage de la tubuline et de l'actine (Fig. 53) et de quantification des milieux (Tableaux 4 et 5) montrent que probablement les milieux de culture Neurobasal et BrainPhys ne contiennent pas assez de zinc ce qui limite la différenciation des neurones.

Milieu de culture supplémenté en zinc	Zn (μM)	Fe (μM)	Cu (μM)
Brain Phys + 10 μM ZnCl_2	10,83 \pm 2,95	1,23 \pm 0,58	2,20 \pm 0,75

Tableau 5 : Concentrations des éléments chimiques Zn, Fe et Cu dans le milieu de culture BrainPhys après supplémentation avec 10 μM de ZnCl_2 et déterminées par analyse PIXE (moyenne \pm écart type pour n = 3).

Afin de confirmer le rôle du zinc dans la stabilité du cytosquelette nous avons exposé des neurones primaires d'hippocampe de rat à DIV15 à un milieu déplété en zinc en utilisant un chélateur du zinc, le N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine (TPEN). Le TPEN est un chélateur ayant une structure proche de celle de l'EDTA mais qui est caractérisé par sa haute affinité pour le zinc avec une constante d'association de 10^{16}M^{-1} (Arslan, 1985). Ce chélateur perméable à la membrane va pouvoir venir chélater le zinc intracellulaire.

4-2-1 Cytotoxicité du zinc

Plusieurs études ont montré que la chélation du zinc par le TPEN était responsable de l'induction de l'apoptose par les cellules (Pang, 2013 ; Kim HL, 2015). Etudier l'effet de la chélation du TPEN sur le cytosquelette nous demande donc de nous assurer qu'il n'y ait pas de biais dans les changements d'expression de la tubuline et de l'actine provoqués par l'apoptose. Nous avons pour cela évalué la viabilité des neurones primaires d'hippocampe de rat après traitement par des concentrations croissantes de TPEN en utilisant le kit ReadyProbe® (ThermoFisher). Ce test se base sur un marquage deux couleurs des cellules: une sonde NucBlue® Live DAPI (bleu) se liant à tous les noyaux des cellules et une sonde NucGreen® Dead (vert) se liant uniquement aux noyaux des cellules mortes.

Les neurones primaires d'hippocampe de rat ont été cultivés sur des lamelles de verre dans du milieu BrainPhys. A DIV15 les neurones ont été traités avec 0 μM , 1 μM , 5 μM ou 10 μM de TPEN. Le TPEN est soluble dans l'éthanol. Afin de pouvoir utiliser ce chélateur en solution aqueuse dans le milieu de culture, une solution mère à 20 mM a été préparée au préalable dans de l'éthanol ultra pure. Cette solution a ensuite été diluée dans du milieu BrainPhys jusqu'aux concentrations souhaitées. Le volume d'éthanol ajouté par ml de milieu

BrainPhys était donc compris entre 0,05 μL pour le groupe traité avec 1 μM de TPEN, et 0,5 μL pour le groupe traité avec 10 μM de TPEN. Pour éviter un biais dans la viabilité dû à la présence d'éthanol, le groupe contrôle a été traité avec 0,5 μL d'éthanol par ml de milieu.

Après 24 h d'incubation à 36,7°C et 5% CO_2 avec le TPEN, les sondes NucBlue® et le NucGreen® ont été ajoutées pendant 15 min dans le milieu de culture. Les neurones ont ensuite été fixés dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 15 min et à température ambiante. Après fixation les échantillons ont été rincés dans du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) afin de bloquer la fluorescence des fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi.

Le graphe ci-dessous (Fig. 54) montre le pourcentage de viabilité des neurones en fonction de la concentration de TPEN utilisée. Les neurones du groupe 'Contrôle' présentent 76% de viabilité. Il faut noter que la mortalité dans le groupe contrôle ne peut être attribuée uniquement à l'éthanol car les neurones primaires en culture sont fragiles et présentent toujours des cellules mortes. Cette viabilité décroît en fonction de la concentration de TPEN jusqu'à 51% dans le groupe traité avec 10 μM de TPEN.

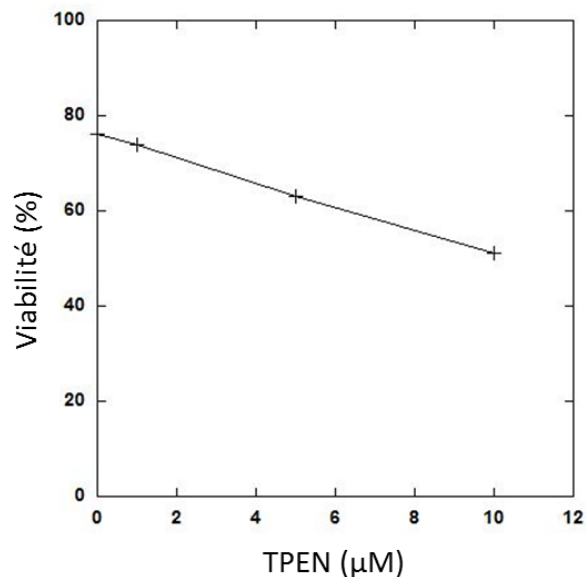


Figure 54 : Pourcentages de viabilité des neurones après traitement avec 0 μM , 1 μM , 5 μM ou 10 μM de TPEN pendant 24 h et mesurés à partir du test ReadyProbe® (ThermoFisher). La viabilité diminue en fonction de la concentration de TPEN ajoutée.

4-2-2 Effet du TPEN sur le cytosquelette neuronal

Nous avons utilisé la concentration 5 μM de TPEN pour voir l'impact causé par la chélation du zinc sur le cytosquelette neuronal. Cette concentration a été choisie comme un compromis entre une concentration de TPEN qui ne soit pas trop faible afin de provoquer un effet, et pas trop toxique puisque la viabilité est de 63 % à comparer à 76% dans le groupe contrôle (Fig. 54). Pour cela des neurones primaires d'hippocampe de rat ont été cultivés sur des lamelles de verre dans du milieu BrainPhys. A DIV15 les neurones ont été traités pendant 24h selon trois groupes différents : un groupe contrôle, un groupe traité avec 5 μM de TPEN et un groupe traité avec 5 μM de TPEN et supplémenté avec 10 μM de zinc. Après 24 h de traitement l'expression de la β -tubuline et l'actine-F ont été quantifiées après immunomarquage.

Nous avons préparé une solution '*cytoskeleton buffer*' pour permettre la meilleure préservation possible du cytosquelette lors de la fixation chimique. Cette solution comprend 150 mM de NaCl, 5 mM de glucose, 5 mM d'EGTA (acide éthylène glycol-bis (β -aminoéthyl éther)-*N,N,N',N'*-tétraacétique), 5 mM de MgCl_2 et 10 mM de tampon MES (acide 2-(*N*-morpholino)éthanosulfonique). Le pH est ajusté à 6.2. La solution de fixation est préparée par dilution du PFA à 4%, du glutaraldéhyde à 0,25% et de Triton X 100 à 0,1% dans la solution '*cytoskeleton buffer*'. Les neurones ont été fixés pendant 20 min à température ambiante dans la solution de fixation puis traités 5 min dans 0,1% de tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) pour éteindre la fluorescence des fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi. Les neurones ont à nouveau été traités dans du Triton X 100 à 0,2% dans du PBS avant d'être incubés 45 min dans de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 2% dans du PBS afin d'éviter les interactions non spécifiques.

L'anticorps primaire contre la β -tubuline M_{SiG1} anti β -tubulin (T4026 ; Sigma) dilué à 1 :3000 dans de la BSA à 2% dans du PBS a été alors ajouté sur les neurones et ceux-ci ont été incubés pendant 45 min à température ambiante. Les neurones ont été ensuite rincés dans la solution de BSA 2% avant d'être incubés 30 min à température ambiante et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire Gt anti M_{SiG1} CF568 (BTM20248, Ozyme) dilué à 1 :500 et la Phalloïdine Alexa 647 (A22287, Thermo Fischer) diluée à 1 :40 (0,165 μM), marqueur spécifique de l'actine-F. Les neurones ont été rincés dans du PBS puis fixés à nouveau dans du

PFA 2% afin de stabiliser l'anticorps secondaire et la phalloïdine Alexa 647. Ils ont ensuite été incubés dans du NH_4Cl à 50 mM pendant 10 min. Les plots de paraffine permettant les cultures en Banker ont été retirés puis les échantillons ont été montés entre lame et lamelle dans du milieu de montage Prolong Gold Antifade Mountant afin d'éviter le photoblanchiment des fluorophores au moment de l'imagerie.

Après immunomarquage les niveaux d'expression de la β -tubuline et de l'actine-F ont été mesurés par quantification de fluorescence après observation par microscopie à épifluorescence Leica DM 5000 en utilisant les filtres TRITC pour le fluorophore CF568 et CY5 pour l'alexa 647.

Les résultats de la figure 55 correspondent à la somme de trois expérimentations réalisées sur trois dissections distinctes avec pour chacune deux échantillons par groupe avec un nombre d'effectif n final pour chacun des groupes de l'ordre de 240 neurones. Les résultats ont été normalisés par rapport au groupe contrôle.

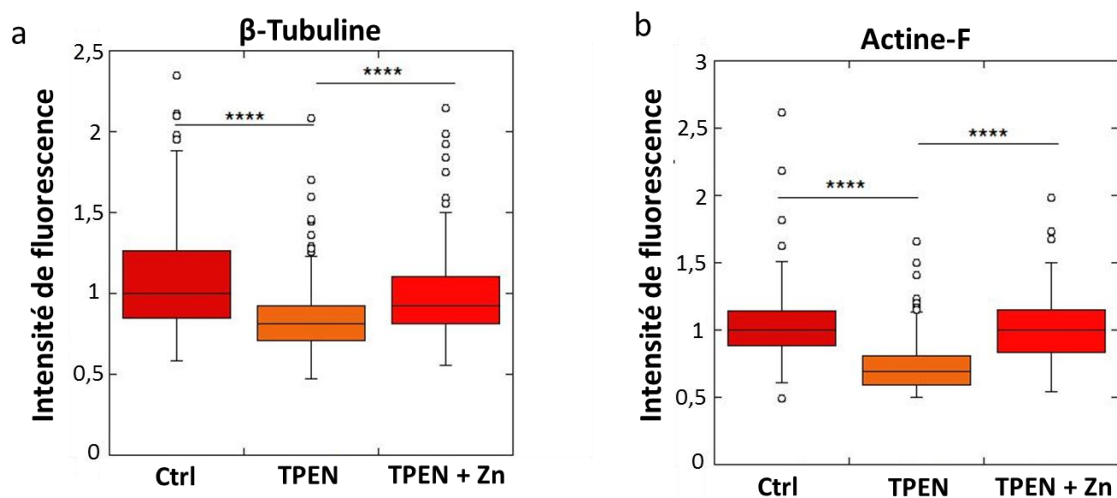


Figure 55 : Quantification de fluorescence de l'actine-F et de la β -tubuline dans des neurones primaires d'hippocampe de rat à DIV15 après traitement avec 5 μM de TPEN supplémenté ou non par 10 μM de zinc. ** p-value < 0,0001. Test statistique d'ANOVA. Les analyses ont été réalisées sur n \approx 240 neurones par microscopie à épifluorescence quantitative. Les intensités de fluorescence ont été normalisées par rapport à la moyenne du groupe contrôle.**

Les neurones traités avec le chélateur du zinc présentent une diminution de l'intensité de fluorescence de la β -tubuline ce qui démontre une perturbation dans la stabilité des

microtubules. Lorsque les neurones sont traités avec le chélateur mais supplémentés en zinc, le zinc ajouté stoppe l'effet du TPEN et on retrouve un niveau d'expression similaire à celui du contrôle. Ces résultats sont similaires lorsque nous nous intéressons cette fois à l'actine-F. Le TPEN induit une diminution de l'expression de l'actine-F qui est inversée par la supplémentation en zinc. Ces résultats confirment donc les observations faites lors de la supplémentation en zinc du milieu de culture (Perrin, 2017) et tendent donc à démontrer l'importance du zinc pour la stabilité du cytosquelette neuronale.

4-3 Imagerie corrélative par microscopie super résolutive et imagerie nano-SXRF du zinc, du cuivre et des protéines du cytosquelette neuronal

Les résultats d'immunomarquage de l'actine-F et de la β -tubuline après chélation ou supplémentation en zinc montrent que celui-ci joue un rôle dans la stabilité du cytosquelette neuronale. Plusieurs études biochimiques ont montré que le zinc favorisait la polymérisation de la tubuline et suggérèrent une interaction possible du zinc sur la tubuline (Gaskin, 1977 ; Eagle, 1983 ; Hesketh, 1983). L'obtention de modèle cristallographique de la tubuline a permis de mettre en évidence des sites de fixation potentiel du zinc sur la tubuline (Löwe, 2001 ; Craddock, 2012). Cependant la liaison du zinc sur la tubuline n'a jamais été mise en évidence dans des cellules en culture. Or si le zinc régule le cytosquelette par liaison directe sur la tubuline il doit se retrouver par conséquent étroitement co-localisé avec la tubuline. En utilisant l'approche corrélative entre microscopie super résolutive STED et l'imagerie nano-SXRF nous avons étudié les distributions des éléments chimiques P, S, Zn, Cu et Fe ainsi que les distributions de l'actine-F et de la tubuline.

4-3-1 Distributions des éléments chimiques dans les dendrites et les épines dendritiques des neurones primaires d'hippocampe de rat

Les neurones primaires d'hippocampe de rat ont été marqués avec la SiR-tubulin et la SiR700-actin et imagés en STED avec une résolution de 40 nm puis les distributions des éléments chimiques ont été déterminées par imagerie nano-SXRF sur la ligne ID16A du

synchrotron ESRF avec une résolution identique. Les analyses nano-SXRF ont été réalisées avec une taille de faisceau de 30 nm, une taille de pixel de 40 nm x 40 nm et une énergie de 17 keV.

La figure 56 montre les distributions des éléments chimiques P, S, et Zn dans des épines dendritiques. Les épines dendritiques, riches en actine-F, sont mises en évidence par le marquage SiR700-actin par microscopie confocale. Le zinc est présent dans les épines dendritiques mais également le long des dendrites (Fig. 56). Comme le montre les calculs des coefficients de corrélation de Pearson, les distributions du Zn et du S sont corrélées ce qui laisse suggérer l'implication de protéines à résidus de cystéines ou de méthionines dans l'interaction du zinc (Fig. 57, 58).

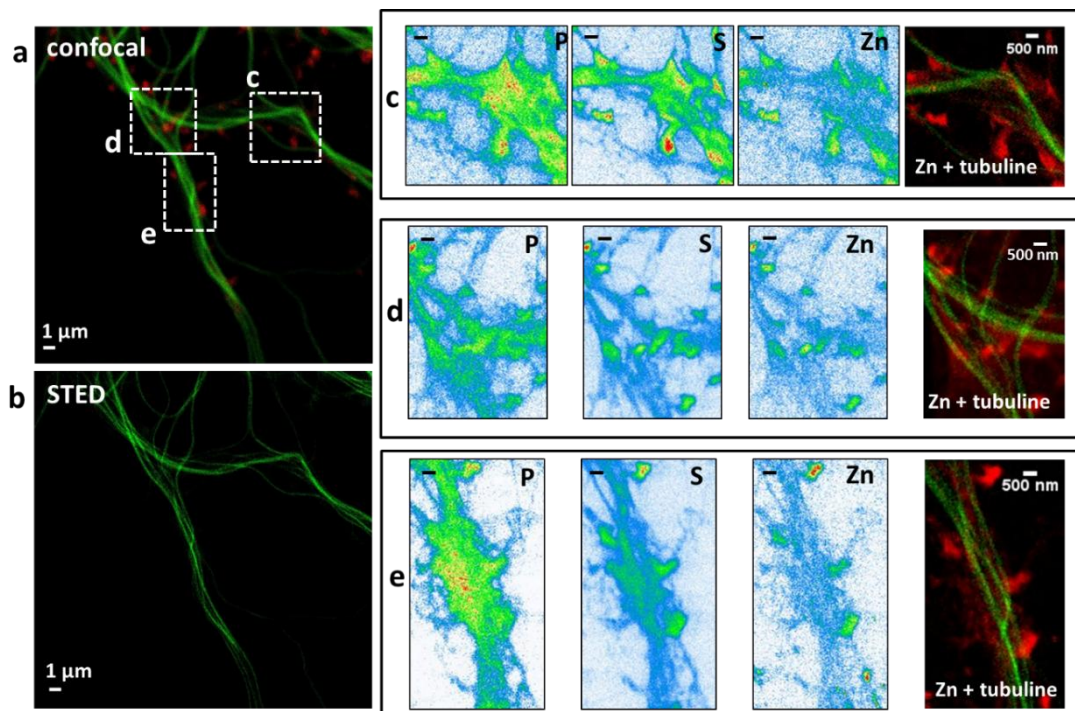


Figure 56 : Neurone primaire d'hippocampe de rat analysé par spectrométrie nano-SXRF et microscopie photonique STED avec une résolution de 40 nm. a) Neurone primaire marqué SiR-tubulin et SiR700-actin imagé en microscopie confocale, b) Image STED de la tubuline c)-e) distribution des éléments chimiques P, S et Zn et imagerie corrélative du Zn et de la tubuline dans les régions c, d et e encadrées en a). Barres d'échelle = 500 nm (excepté a et b, barres d'échelle = 1 μm).

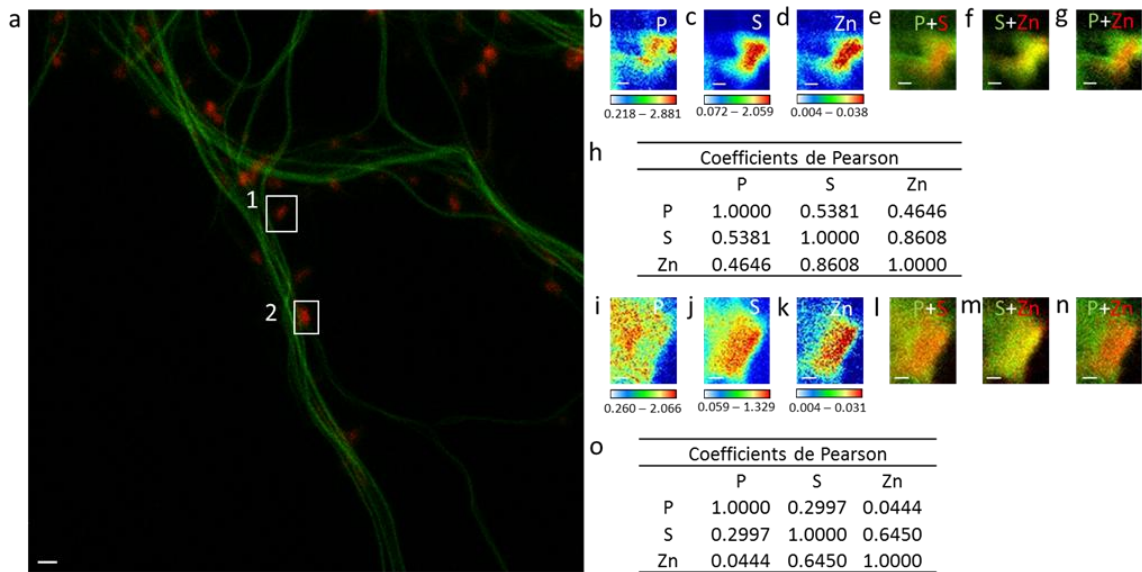


Figure 57 : Distributions des éléments P, S, et Zn dans des épines dendritiques. a) Image STED de la SiR-tubuline superposée à l'image confocale de la SiR700-actin (rouge). b-d) Distributions des éléments P, S et Zn dans l'épine 1 encadrée en a). e-g) Superposition des distributions P et S, S et Zn et P et Zn. h) Tableau des coefficients de corrélation de Pearson des éléments P, S et Zn dans l'épine 1. i-k) Distributions des 3 éléments P, S et Zn dans l'épine 2 encadrée sur la figure a). l-n) Superposition des éléments P et S, S et Zn et P et Zn dans l'épine 2. o) Tableau des coefficients de corrélation de Pearson des éléments P, S et Zn présents dans l'épine 2. Barres d'échelle = 200 nm (excepté a, barre d'échelle = 1 μ m). Echelles de couleur : valeurs min-max exprimées en $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$.

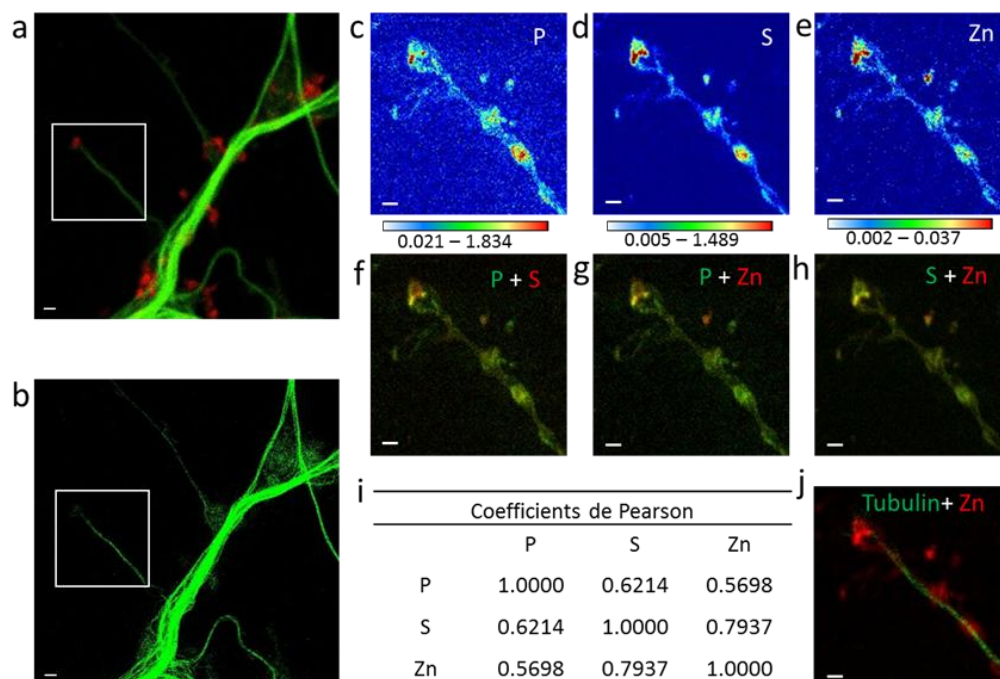


Figure 58 : Imagerie corrélative dans des dendrites et épines de neurone primaire d'hippocampe de rat. a) Image confocale de la SiR700-actin (rouge) et de la SiR-tubulin (vert) d'une dendrite et épines. b) image STED de la SiR-tubulin dans la même région. c-e) Distributions des éléments chimiques P, S et Zn. f-h) Superposition des distributions P et S, P et Zn et S et Zn. i) Tableau des coefficients de corrélation de Pearson des éléments P, S et Zn. j) Superposition des distributions Tubulin et Zn.

Zn dans la même région par nano-SXRF. f) Superposition des distributions du P et S. g) Superposition des distributions des éléments P et Zn. h) Superposition des distributions du S et Zn. i) Coefficients de Pearson pour les éléments P, S et Zn. j) Superposition de la distribution de la tubuline (vert) et du zinc (rouge). Barres d'échelle = 500 nm, excepté pour a) et b) 1 μm . Echelles de couleurs : valeurs min-max exprimées en $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$.

Un autre point intéressant est la distribution du fer dans les épines dendritiques. Dans le chapitre 3-8 nous avons vu que la distribution du fer dans les neurones n'était pas homogène mais présente essentiellement dans le corps cellulaire et présente sous forme d'îlots dans les dendrites. L'imagerie nano-SXRF du fer dans les épines dendritiques a permis de mettre en évidence que le fer était présent sous forme d'inclusions pouvant correspondre à la ferritine mitochondriale, protéine de stockage du fer présente dans les mitochondries (Guan, 2017) (Fig. 59). Il serait intéressant par la suite de corrélérer la distribution du fer avec un marquage de type mitotracker et ferritine.

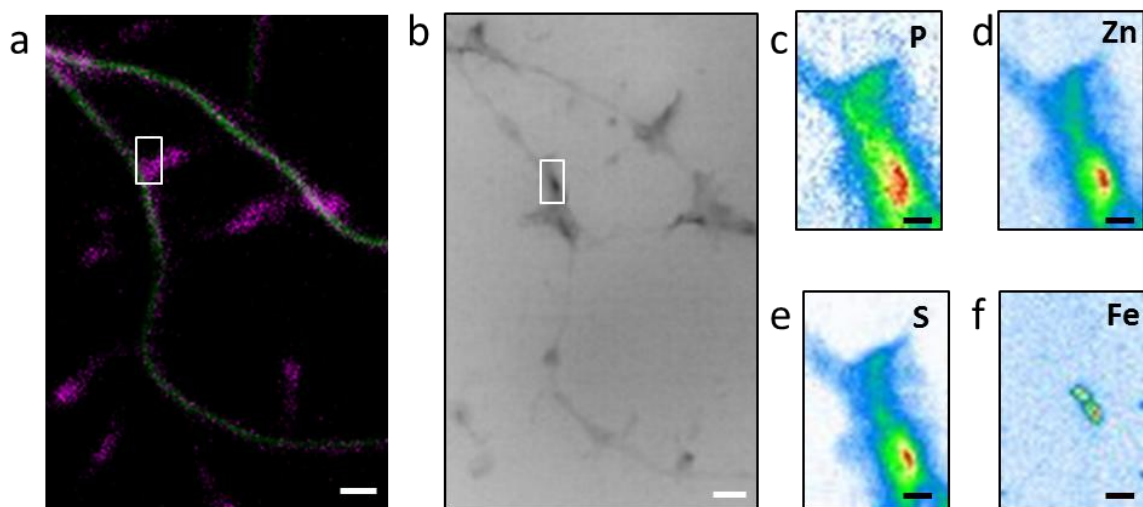


Figure 59 : Image corrélative dans des épines dendritiques de neurone primaire d'hippocampe de rat. a) image STED de la SiR-tubulin et confocale de la SiR700-actin mettant en évidence les épines dendritiques riches en actine (vert). b) image synchrotron de contraste de phase obtenue sur la même région après cryofixation et lyophilisation des échantillons. c-f) distributions des éléments chimiques P, S, Zn et Fe dans l'épine dendritique encadrée en blanc en a) et b). Echelle : 1 μm , sauf c-f) échelle = 200 nm.

4-3-2 Imagerie corrélative : co-localisation du zinc et de la tubuline

Des neurones primaires d'hippocampe de rat cultivés sur membranes de Si_3N_4 ont été marqués à DIV15 avec le fluorophore SiR-tubulin. La figure 60 met en évidence le réseau de microtubules (Fig. 60 a-c et g-h) et la distribution des éléments chimiques S et Zn (Fig. 60 d-e et Fig. 60 i-j) dans les mêmes dendrites. Nous obtenons systématiquement une excellente superposition des distributions du zinc et des microtubules.

Un profil correspondant à la section indiquée par la flèche sur la figure 60e) montre la corrélation des distributions du zinc et des microtubules imagés en STED (Fig. 60 f) et confirme la nécessité de combiner l'imagerie nano-SXRF avec une technique de microscopie photonique à résolution similaire. Comme nous pouvons le voir dans la figure 60b) la microscopie confocale ne permet pas de dissocier les deux filaments visibles sur la figure 60c) et n'est donc pas suffisante pour comprendre la distribution des éléments chimiques obtenue par spectrométrie nano-SXRF (Fig. 60 d et e).

Les cartographies des éléments chimiques obtenues par nano-SRXF sont calibrées en $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$. Nous avons quantifié le nombre d'atomes de soufre, de zinc et de phosphore par pixel de 40 nm x 40 nm en moyennant sur 21 régions d'intérêt (Tableau 5).

Chaque dimère de tubuline contient 49 atomes de S apportés par les acides aminés méthionines et cystéines. Nous obtenons un ratio S/Zn de 44 ± 11 qui comparé au nombre d'atomes de S par dimère de tubuline α/β correspondrait donc à une stœchiométrie de 0,9 atome de zinc par dimère de tubuline. En outre ces résultats sont en accord avec les résultats de Hesketh qui trouvait un ratio de $0,86 \pm 0,18$ atomes de zinc par dimère de tubuline lors d'une étude *in vitro* (Hesketh, 1983). Dans cette étude, la liaison du zinc sur la tubuline avait été déterminée selon la méthode de Scatchard (Scatchard, 1949) sur une préparation de microtubules issus de cerveau de cochon obtenus par cycles de polymérisation-dépolymérisation *in vitro*. La méthode de Scatchard consiste à estimer le nombre de sites occupés par un ligand sur une protéine en déterminant les rapports entre les concentrations en ligands libres et ligands fixés. Pour cela, les microtubules ont été traités avec des concentrations croissantes en $^{65}\text{ZnCl}_2$ puis passés sur une colonne d'échange d'ions (colonne DEAE-Sephadex). Les concentrations en zinc lié et fixé ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (Hesketh, 1983).

S	P	K	Zn	S/Zn
Atomes/pixel	Atomes/pixel	Atomes/pixel	Atomes/pixel	
6400 ± 2100	19000 ± 5200	4100 ± 2000	150 ± 20	43 ± 10

Tableau 5 : Analyse quantitative des éléments chimiques de microtubules. Nombre d'atomes de S, P, K et Zn calculés par pixel de 40 nm x 40 nm.

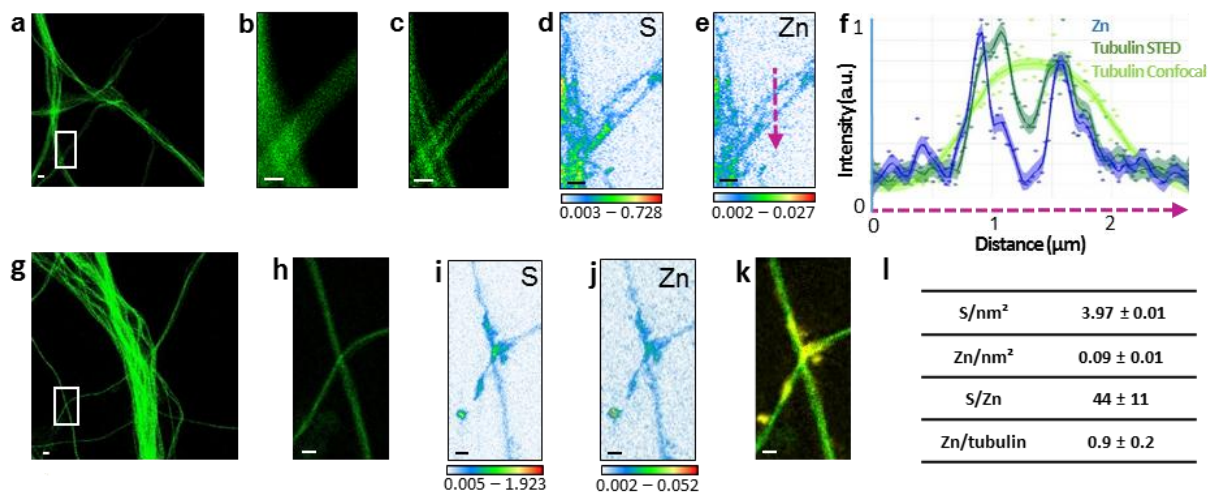


Figure 60 : Imagerie corrélative microscopie STED et spectrométrie nano-SXRF de dendrites de neurones primaires d'hippocampe de rat. a) Dendrites de neurone primaire d'hippocampe de rat marqués avec la SiR-tubulin et imagés en microscopie STED. b) et c) correspondent respectivement aux images confocale et STED obtenues après zoom de la région encadrée en blanc dans la figure a). d) et e) Cartes de éléments S et Zn obtenues dans la même région que b) et c). f) profil du zinc (bleu) de la tubulin en STED (vert foncé) et en confocale (vert clair) de la région notée par la flèche en e). g) Dendrites marquées SiR-tubulin et imagées en STED. h) image STED de la région encadrée en blanc en g). i) et j) cartes montrant la distribution respectivement du S et du Zn dans la région de la figure h). k) superposition de la distribution du Zn et de la tubuline. l) analyses quantitatives du nombre d'atomes pour les éléments S et Zn. Moyenne calculée sur 21 régions d'intérêt. Echelle : 500 nm, excepté figures a) et g) 1 µm. Echelle de couleur : valeurs min et max exprimées en ng.mm⁻².

Les résultats obtenus par analyses immunoquantitatives démontraient l'importance du zinc dans la stabilité du cytosquelette neuronale sans pour autant expliquer à quel niveau celui-ci agissait. La combinaison entre la microscopie super résolutive STED et la spectrométrie nano-SXRF nous a permis de mettre en évidence que le zinc suivait la même distribution que les microtubules selon une stœchiométrie de 1 :1 suggérant un rôle direct du zinc sur la tubuline en accord avec le modèle de Löwe et les travaux de Eagle, Hesketh et Craddock (Eagle, 1983 ; Hesketh, 1983 ; Craddock, 2012).

4-3-3 Le zinc présente une distribution différente de celle de l'actine

L'actine des neurones primaires d'hippocampe de rat a été marquée à l'aide du fluorophore SiR-actin. Les neurones ont été imagés en microscopie confocale (Fig. 61a) et microscopie STED (Fig. 61b et c) avant d'être analysés par imagerie synchrotron à la fois de contraste de phase (Fig. 61d et e) et par spectrométrie nano-SXRF (Fig. 61f-i). Nous avons montré par analyses immunoquantitatives que lorsque le zinc était chélaté nous observions une diminution de l'expression de l'actine-F. Or, contrairement aux microtubules, nous ne trouvons qu'une co-localisation partielle du zinc avec les structures riches en actine (Fig. 61j) suggérant donc que le zinc n'est pas impliqué dans la stabilisation des filaments d'actine de manière directe comme dans le cas des microtubules. Par contre, dans les épines dendritiques, le zinc est fortement corrélé avec la densité de matière comme le montre les images de contraste de phase. Ce résultat suggère que le zinc pourrait être localisé dans la PSD ce qui serait en accord avec les résultats montrant l'expression de ZnT1 dans la PSD (Sindreu, 2014).

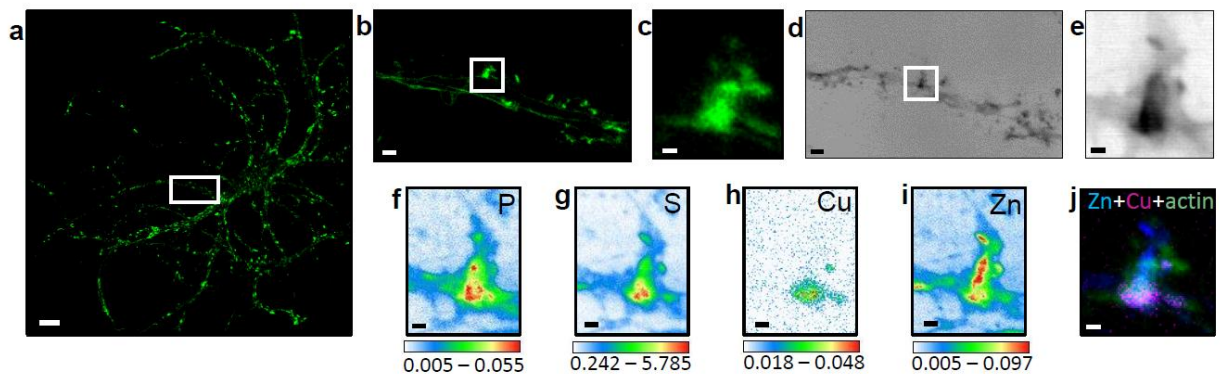


Figure 61 : Corrélation entre la microscopie STED, la spectrométrie nano-SXRF et le contraste de phase. a) Vue large d'un neurone primaire d'hippocampe de rat marqué SiR-actin et imagé par microscopie confocale. b) Zoom sur la région encadrée en blanc sur la figure a) et imagée en STED. c) Image STED de l'épine dendritique encadrée en blanc sur la figure b). d) Image de contraste de phase de la même région que l'image b). e) Contraste de phase de l'épine imagée en c). f-i) Cartes des éléments chimiques, P, S, Cu et Zn obtenues dans la même épine. j) superposition des cartes des éléments Zn (bleu), Cu (rouge) et de l'actine (vert). Echelle : 200 nm. Excepté figure a) 10 µm, figures b) et d) 1 µm. Echelle de couleur : valeurs min et max données en $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$.

4-3-4 Le cuivre est présent sous forme très localisée dans les épines dendritiques

Le cuivre est plus difficilement détecté car en plus faible concentration que le zinc dans les neurones. Le cuivre est présent uniquement à l'intérieur des épines dendritiques riches en actine-F, sous forme très localisée (Fig. 61), sa distribution n'est pas corrélée avec celle de la tubuline. Nous observons une répartition distincte du zinc et du cuivre à l'échelle de l'épine dendritique (Fig. 61h-j, Fig.62), ce qui est en accord avec les résultats de l'étude de Perrin *et al* (Perrin, 2017). Même si le cuivre est concentré dans les régions les plus riches en actine-F des épines dendritiques, sa distribution n'est que partiellement localisée avec celle de l'actine-F. Le cuivre pourrait peut-être servir de co-facteur aux protéines de remodelage de l'actine comme par exemple la cofiline comme suggéré par des études de métallobotéomique (She, 2003 ; Smith, 2004).

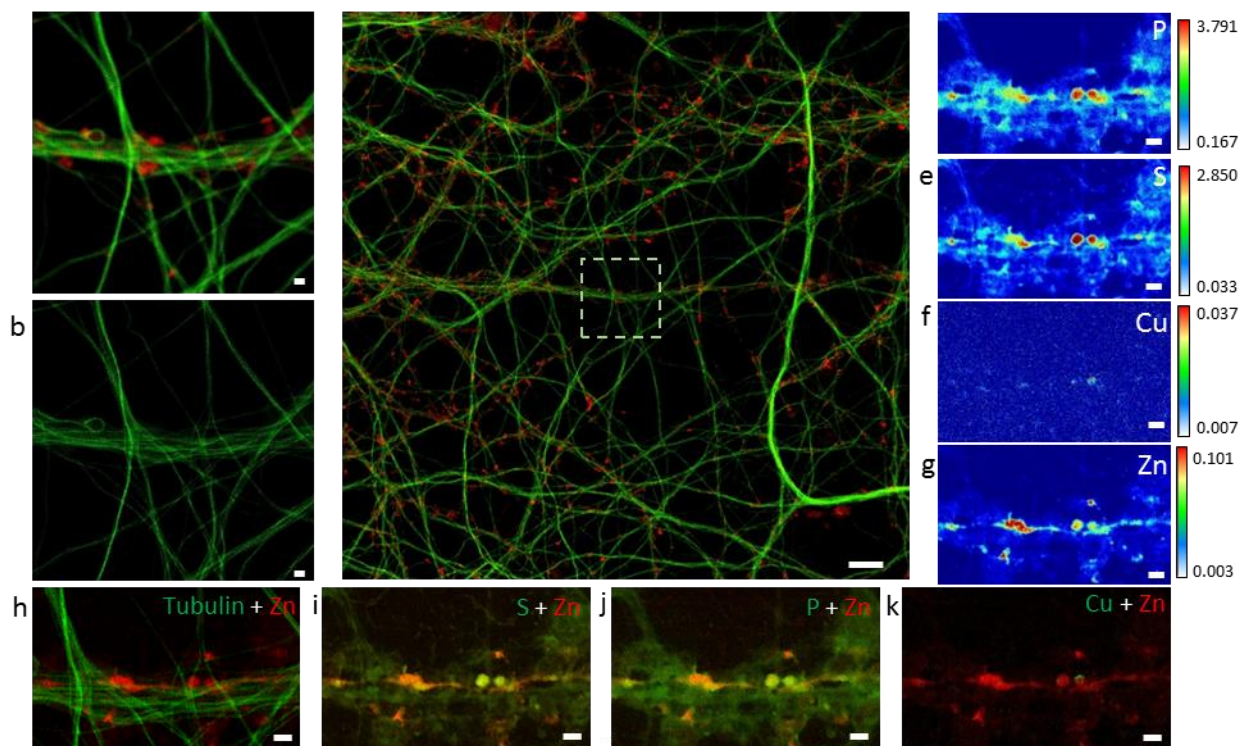


Figure 62 : Corrélation entre la microscopie STED et la spectrométrie nano-SXRF. a) Image confocale de la SiR-tubuline (vert) et de la SiR-actine (rouge) dans des dendrites de neurone primaire d'hippocampe de rat. b) Image STED de la SiR-tubuline dans la même région que a). c) Vue confocale large incluant la région montrée en a) et b) avec la SiR-tubuline (vert) et la SiR-actine (rouge). d-g) Image nano-SXRF des éléments chimiques P, S, Cu et Zn dans la même région que a) et b). h) Superposition des distributions de la tubuline (vert) et du Zn (rouge). i) Superposition des distributions du S (vert) et du Zn (rouge). j) Superposition des distributions du P (vert) et du Zn (rouge). k) Superposition des distributions du Cu (vert) et du Zn (rouge). Echelles = 1 μm , excepté pour c) 10 μm . Echelles de couleurs : valeurs min-max exprimées $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$.

Chapitre 5

Discussion et conclusion

5-1 Discussion et perspectives sur le développement de la méthode

Certains métaux comme le fer, le cuivre, ou le zinc sont essentiels au fonctionnement neuronal (Davies, 2013). Cependant, comprendre leur rôle précis dans les fonctions neuronales reste difficile en raison de leur présence en faible concentration ce qui nécessite des développements méthodologiques. Les progrès récents avec le développement de la microscopie photonique super-résolutive (Hell, 1994) et des techniques de nano-imagerie par rayonnement synchrotron (Da Silva, 2017) nous ont ouvert les portes vers le monde observé à l'échelle du nanomètre. Une des manières couramment utilisée pour montrer la co-localisation de deux protéines à l'échelle sub-cellulaire est de marquer ces protéines au moyen de fluorophores et d'analyser leur distribution par microscopie photonique super-résolutive. De même étudier la co-localisation de deux éléments chimiques comme le zinc et le soufre est réalisable en imagerie chimique par spectrométrie nano-SXRF en comparant les cartes de distribution de chacun de ces éléments. Cependant, étudier la co-localisation d'un élément chimique comme le zinc et d'une protéine demeure plus compliqué. Plusieurs familles de biosenseurs des métaux ont été développées afin d'imager les éléments chimiques par microscopie photonique. Par exemple, les fluorophores zinpyr et zinspy pour la détection du zinc (Nolan, 2009). Toutefois, ces biosenseurs permettent de détecter seulement la fraction labile des métaux. Ils sont également limités en termes de sensibilité car, en dépit de leur plus faible affinité, ils sont capables de lier d'autres ions divalents et ne sont pas utilisables en microscopie photonique super résolutive. La spectrométrie nano-SXRF est une méthode d'analyse chimique sans marquage qui se base sur les énergies d'émission de rayonnement X caractéristiques pour chaque élément chimique. Elle offre donc une très haute sensibilité et permet d'obtenir pour une analyse et une cellule donnée les cartographies de divers éléments chimiques avec une très haute précision et résolution.

La combinaison de la spectrométrie nano-SXRF avec la microscopie à épifluorescence ou confocale permet d'associer la distribution des éléments chimiques avec des protéines ou des organites (Roudeau, 2014 ; Grubman, 2014 ; Bourassa, 2014) mais cette approche reste limitée par la résolution de la microscopie à épifluorescence, de l'ordre du micron, ou à celle de la microscopie confocale ne dépassant pas les 180 nm. Ces dernières années ont vu le développement d'approches corrélatives avec la combinaison notamment de la microscopie photonique super résolutive avec la microscopie électronique. Cette microscopie corrélative

permet d'obtenir la localisation de protéines cibles corrélée avec l'ultrastructure de la cellule en super résolution (Watanabe, 2011). Récemment une approche a permis de combiner pour la première fois la microscopie photonique super résolutive STED avec des analyses synchrotron de diffusion des rayons-X aux petits angles SAXS '*Small Angle X-ray Scattering*' (Bernhardt, 2018). Cette technique permet d'étudier les caractéristiques structurales de l'objet mais n'a toutefois pas accès à l'information chimique de l'échantillon. Dans cette approche, les cellules sont cultivées sur lamelles de verre or nous avons montré que ce type de support est riche en métaux, notamment en zinc, et ne peut donc pas être utilisé pour l'imagerie des éléments chimiques présent dans la cellule. Comme mode de fixation, les auteurs ont utilisé la fixation chimique avec du paraformaldéhyde. Or l'analyse PIXE de neurones fixés par fixation chimique montre que cette fixation génère la perte d'une partie des éléments chimiques de l'échantillon et n'est donc pas un mode de fixation optimal pour l'imagerie SXRF. La cryofixation est la meilleure stratégie de fixation pour ce type d'analyse. L'approche décrite pour la corrélation STED et SAXS n'est donc pas applicable pour la spectrométrie nano-SXRF et l'étude des métaux dans des échantillons biologiques. En outre, dans la méthode proposée par Bernhardt, les analyses synchrotron ont été réalisées avec une taille de faisceau de 300 nm et une taille de pixel de 1 μm donc la résolution obtenue ne dépassait pas les 1 μm . La méthode que nous avons développée ici combine la spectrométrie nano-SXRF avec la microscopie photonique STED et permet d'imager à la fois la distribution des éléments chimiques et des protéines cibles dans des neurones primaires d'hippocampe de rat à haute résolution (40 nm) et sensibilité (<130 atomes de zinc par pixel de 40 nm de côté).

Nous avons développé cette méthode en marquant principalement les protéines du cytosquelette actine et tubuline avec des fluorophores basés sur la silicone rhodamine. Ces fluorophores, développés ces dernières années, ont la propriété d'être de petite taille, brillants, photo-stables, d'émettre dans le rouge lointain et enfin d'être compatibles avec l'imagerie sur cellules vivantes ce qui fait d'eux des fluorophores d'excellence pour l'imagerie super-résolutive STED. Actuellement la société Spirochrome propose plusieurs fluorophores de type silicone rhodamine pour le marquage de l'actine et de la tubuline mais également du lysosome, de l'ADN et enfin un fluorophore se liant de manière spécifique à la protéine de fusion SNAP-tag[®] permettant, après transfection des cellules, de marquer toute protéine

d'intérêt fusionnée à SNAP-tag®. Cependant, l'inconvénient des systèmes SNAP-tag® est que l'expression de la protéine cible n'est plus endogène. Nous avons donc également montré qu'il était possible de d'utiliser d'autres méthodes de marquage en électroporant des neurones primaires d'hippocampe de rat avec un plasmide exprimant le *monobody* Xph20, protéine de synthèse se liant spécifiquement à la PSD95, couplé à la GFP. Dans ce cas, l'expression de la protéine reste endogène. Cependant nous n'avons pu analyser les échantillons électroporés en super résolution sur la ligne ID16A car nous avons constaté la présence de contamination en calcium sur les échantillons. Ces contaminations pourraient provenir de la solution d'électroporation. Il faudrait identifier clairement d'où elles proviennent.

Il existe encore des limitations quant à la méthode développée pour combiner la microscopie super résolutive STED et l'imagerie nano-SXRF et il s'avère nécessaire d'améliorer cette méthode pour une meilleure corrélation possible. Une des principales limitations est la préparation des échantillons. L'imagerie photonique est réalisée sur cellules vivantes puis les échantillons sont cryofixés avant d'être lyophilisés par *freeze-drying* afin d'être analysés par spectrométrie nano-SXRF sous vide à température ambiante. L'étape de cryofixation est cruciale, les échantillons doivent être vitrifiés sans qu'il y ait formation de cristaux de glace. Lors de la sublimation ces cristaux peuvent léser les cellules et conduire à la déformation de régions analysées en microscopie STED.

Pour une corrélation plus précise des analyses STED et nano-SXRF il serait préférable d'observer les échantillons sous un état le plus proche de l'état physiologique et le plus similaire possible dans les deux techniques. C'est pourquoi une des stratégies, que nous avons commencé à développer dans ce travail, est d'imager des neurones vivants en microscopie photonique puis d'analyser par spectrométrie nano-SXRF les neurones dans l'état cryofixé, c'est-à-dire congelé hydraté. Cependant avant les analyses par spectrométrie nano-SXRF sur la ligne ID16A nous avons été confrontés à des problèmes de contamination sur les échantillons. De plus, la présence de glace sur l'échantillon provoque l'absorption des rayons-X et peut être le signe soit de traces d'ammonium d'acétate, soit d'isopentane sur la membrane ou dans le puit qui solidifie à une température en dessous de -160°C. Il est donc nécessaire de contrôler plus finement l'absorption de l'acétate d'ammonium et de l'isopentane par le papier filtre (whatman®) avant de monter les échantillons sur la ligne de faisceau. En plus d'être responsables de la formation de glace, des traces d'isopentane

peuvent provoquer des contaminations de l'échantillon. Un des moyens pour pallier à ces problèmes est de cryofixer les échantillons dans de l'éthane en utilisant un système de cryofixation automatique comme le système Leica EM GP™, un système dans lequel l'échantillon est maintenu dans une chambre à température et humidité contrôlées. Les étapes d'absorption puis de transfert sont contrôlées ce qui permet d'éviter la formation de glace sur l'échantillon.

Le laps de temps de 30 min entre acquisitions en microscopie STED et la cryofixation de l'échantillon peut être suffisant pour qu'il y ait des changements structuraux au niveau des dendrites et synapses et dans le cas du cytosquelette ceci est d'autant plus valable pour les neurones en début de développement. Les fluorophores SiR-tubulin et SiR-actin sont basés sur des stabilisateurs du cytosquelette, respectivement le docetaxol et jasplakinolide. Ces fluorophores ont l'avantage de permettre l'imagerie sur cellules vivantes tout en freinant la dynamique du cytosquelette. Cependant ceci n'est pas applicable à toutes les protéines. Afin de s'affranchir de ce délai entre les acquisitions en STED et la fixation la meilleure stratégie serait de pouvoir imager les échantillons congelés hydratés à la fois en microscopie photonique et nano-SXRF après cryofixation. Ces dernières années le développement de l'imagerie corrélative cryo-CLEM '*Correlative Light and Electronic Microscopy*' entre la microscopie photonique et la microscopie électronique sur échantillon congelé hydraté a permis la réalisation de la microscopie photonique sur des échantillons congelés cependant la résolution reste limitée du fait de manque de développement d'objectifs à cryo-immersion pour la super résolution. Certains fluorophores photoactivables comme la mGFP sont cependant compatibles avec la cryofixation rendant possible l'imagerie de molécules uniques sur des échantillons vitrifiés permettant d'améliorer la résolution (Kaufmann, 2014).

Un autre point à soulever c'est le fait que la microscopie corrélative ici est réalisée sur des analyses bidimensionnelles. En effet les analyses obtenues par spectrométrie nano-SXRF correspondent à une projection bidimensionnelle de l'objet bien que l'imagerie STED puisse être réalisée sur plusieurs plans. Ainsi deux objets peuvent apparaître co-localisés sur une projection bidimensionnelle mais ne pas l'être car localisés sur deux plans z différents. L'acquisition 3D est possible en imagerie nano-SXRF cependant le temps d'acquisition se retrouve grandement multiplié. Même si je n'ai pas pu aborder ce type d'analyses corrélatives tri-dimensionnelles lors de mes travaux de thèse, cette approche présente de nombreux

avantages en termes de corrélation à l'échelle nanométrique et son développement devrait être promu dans le futur.

Un autre point limite est l'imagerie du cuivre. Celle-ci est actuellement possible uniquement sur la ligne ID16A du synchrotron ESRF grâce notamment à la présence de deux détecteurs de fluorescence-X mais le signal reste proche de la limite de détection. Il est vraisemblable que le cuivre n'ait été détecté dans les épines dendritiques que dans les régions de plus forte accumulation locale. Le projet de nouvelle source (EBS, '*Extremely Brilliant Source*') de l'ESRF devrait permettre d'obtenir à compter de 2020 des faisceaux encore plus brillants sur l'ensemble des lignes de lumière, et, très probablement permettre d'abaisser encore la limite de détection sur la ligne ID16A.

5-2 Discussion et perspectives sur les résultats biologiques

Ce développement méthodologique nous a permis d'étudier une hypothèse établie depuis de nombreuses années quant à la liaison possible du zinc sur la tubuline mais qui n'avait jamais pu être confirmée sur des cellules vivantes. Plusieurs études biochimiques montrèrent que le zinc favorisait la polymérisation de la tubuline (Gaskin, 1977 ; Eagle, 1983 ; Hesketh, 1983). Eagle montra que cette polymérisation favorisée par le zinc ne nécessitait pas l'intervention de protéines et suggérant alors une interaction directe du zinc sur la tubuline (Eagle, 1983). La résolution de la structure de la tubuline par cristallographie et la modélisation moléculaire ont permis de mettre en évidence six sites de liaison principaux du zinc sur la tubuline suggérant que le zinc stabiliserait les microtubules en renforçant les interactions électrostatiques entre les protofilaments (Löwe, 2001 ; Craddock, 2012). Par étude d'immunomarquage nous avons montré qu'un déficit en zinc, provoqué par le TPEN un chélateur intracellulaire du zinc par, s'accompagnait de la perturbation des microtubules et de l'actine-F. Ces résultats démontrent l'importance du zinc dans la différenciation du cytosquelette neuronale et confirment les observations de Perrin *et al.* montrant une augmentation de l'expression de l'actine-F et de la β -tubuline dans des neurones traités avec du zinc (Perrin, 2017). Cependant, ces expériences d'immuno-quantification ne permettent pas de montrer si le zinc agit de manière directe sur les microtubules et l'actine-F ou bien par régulation d'autres voies de signalisation impactant sur le cytosquelette. La corrélation des

cartographies du zinc obtenue par spectrométrie nano-SXRF avec la distribution de la tubuline imagée en STED a montré que le zinc, en plus d'être présent dans la tête des épines, était présent tout au long des dendrites en suivant la même distribution que les microtubules. La spectrométrie nano-SXRF est une méthode qualitative mais également quantitative et nous permet de quantifier le nombre d'atomes de chaque espèce chimique dans une région donnée. **Nous avons pu déterminer un ratio zinc/soufre de 43 ± 10 dans les régions corrélées à la tubuline. En nous basant sur le nombre d'atomes de soufre connu de 49 par dimère de tubuline, cela suggère que la co-localisation du zinc avec les microtubules s'effectuerait avec une stœchiométrie de $0,9 \pm 0,2$ atome de zinc par dimère de tubuline ce qui confirme les résultats de Hesketh montrant, par la méthode de Scatchard sur des préparations de microtubules de cerveau de cochon, que le zinc se lie sur les microtubules avec un ratio de $0,86 \pm 0,18$ atomes de zinc par dimère de tubuline.** Toutefois cette co-localisation n'est pas retrouvée pour l'actine et le zinc indiquant donc une régulation indirecte de l'actine-F par le zinc. En outre, les microtubules sont impliqués dans la régulation des épines dendritiques via le remodelage de l'actine. Des études montrent que la perte de certaines protéines de liaison aux microtubules telles que EB3 et MAP1B provoque une diminution du nombre d'épines dendritiques ce qui suggèrent que ces protéines sont impliquées dans la régulation du réseau d'actine (Jaworski, 2009 ; Sala, 2014). Ceci suggère que l'altération des microtubules se répercute sur les épines dendritiques entraînant une diminution de leur taille via la diminution du réseau d'actine.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer deux grandes stratégies s'opposent aujourd'hui suite à l'observation d'une accumulation de métaux dans les plaques amyloïdes: chélater le zinc afin de réduire la taille des plaques amyloïdes ou alors supplémenter en zinc car celui-ci ne serait plus disponible pour les neurones ce qui conduit progressivement à leur dégénération. Certains essais cliniques ont été réalisés pour la maladie d'Alzheimer utilisant des chélateurs du zinc tels que le clioquinol. Cependant bien qu'il ait été montré que la chélation du zinc conduisait à la diminution du nombre et de la taille des plaques amyloïdes (Adlard, 2008) ces essais cliniques ont malheureusement été voués à l'échec car ne freine pas le déclin cognitif provoqué par la maladie d'Alzheimer chez les patients. D'après l'hypothèse de Craddock le principal agent responsable de la dyshoméostasie du zinc serait l'amyloïde- β . Il séquestrerait le zinc extracellulaire qui ne serait alors plus disponible pour la cellule et notamment pour la

polymérisation de la tubuline en microtubule (Craddock, 2012 ; Perrin, 2017). Or la mise en évidence de la colocalisation du zinc et de la tubuline conforte cette hypothèse.

Nous avons également vu que le cuivre et le zinc présentait des distributions séparées au niveau des épines dendritiques avec une localisation préférentielle du cuivre dans le cou des épines. Or si le cuivre module aussi la transmission synaptique son rôle est beaucoup moins connu et ces résultats montrent combien il serait intéressant d'étudier plus spécifiquement son rôle au niveau synaptique. Certaines études suggèrent une liaison spécifique du cuivre sur l'actine (Lehrer, 1972 ; She, 2003). Les cartographies du cuivre dans les neurones montrent que celui-ci est localisé dans le cou des épines, région particulièrement riche en actine (Perrin, 2017). La corrélation avec les images d'actine montre que seules certaines régions riches en actine dans l'épine sont corrélées avec le cuivre. Une des manières de confirmer la colocalisation du cuivre et de l'actine serait de combiner le STED et la spectrométrie nano-SXRF sur des neurones à différents stades de croissance et de vérifier si la colocalisation du cuivre et de l'actine est retrouvée dans les cônes de croissance et dans l'axone.

Enfin, nous avons montré que le zinc et la tubuline étaient localisés ce qui confirme l'hypothèse que le zinc est essentiel à la stabilité du cytosquelette. L'objectif maintenant est de répondre à la question d'une séquestration du zinc par l'amyloïde- β en trois points. Premièrement en traitant des neurones primaires d'hippocampe avec de l'amyloïde- β en présence ou non d'une supplémentation en zinc et en quantifier l'expression de l'actine-F et des microtubules par immunofluorescence. Ceci nous permettrait alors de voir si le zinc empêche la perturbation du cytosquelette induite par l'amyloïde- β . Les pools intracellulaires de zinc pourront être déterminés par analyse PIXE afin de voir si l'amyloïde- β provoque une diminution de la concentration intracellulaire en zinc. Enfin la combinaison de la spectrométrie nano-SXRF et STED nous permettra de déterminer si le ratio S/Zn ainsi que la stœchiométrie d'atomes de zinc par dimère de tubuline sont modifiés par le traitement à amyloïde- β et si donc cette chélation de zinc le rend moins disponible pour le cytosquelette.

5-3 Conclusion générale

Dans ces travaux de thèse, nous avons combiné la microscopie photonique super-résolutive STED avec l'imagerie nano-SXRF à haute résolution spatiale (40 nm) et sensibilité (<130 atomes de zinc détectable). Nous avons ainsi pu mettre en évidence la distribution des éléments chimiques S, P, Zn, Cu et Fe dans des dendrites et épines dendritiques de neurones primaires d'hippocampe de rat. Nous avons montré que le zinc et les microtubules étaient colocalisés. En outre, par des méthodes d'immunomarquage nous avons montré que la chélation du zinc dans des neurones primaires d'hippocampe de rat induisait une diminution à la fois du réseau d'actine et des microtubules. Ces résultats suggèrent un rôle important du zinc sur le cytosquelette neuronal. Ces résultats donnent lieu à de nombreuses questions sur l'impact du zinc aussi bien dans le fonctionnement neuronal que dans la division cellulaire ou dans la migration.

Bien que cette méthode d'imagerie corrélative nécessite encore un grand nombre d'amélioration, elle ouvre aujourd'hui la voie à un large panel d'investigations possibles en vue de comprendre les causes et conséquences des dyshoméostasies des éléments chimiques observées dans de nombreuses neuropathologies ainsi qu'à l'espoir de pouvoir trouver de nouvelles cibles potentielles en vue de développer de nouveaux traitements pour ces pathologies. Parmi les nombreuses questions que nous nous posons celle du rôle du zinc et du cuivre dans le fonctionnement neuronal est une question importante du fait que la dyshoméostasie de ces éléments est retrouvée dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique ce qui en fait un point commun très caractéristique entre ces pathologies neurodégénératives pourtant différentes.

Références

Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, Gautier E, Robb E, Cortes M, Volitakis I, Liu X, Smith JP, Perez K, Laughton K, Li QX, Charman SA, Nicolazzo JA, Wilkins S, Deleva K, Lynch T, Kok G, Ritchie CW, Tanzi RE, Cappai R, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI. Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial A β . *Neuron*. 2008 Jul 10; 59(1):43-55.

Aitken PG, Borgdorff AJ, Jutta AJ, Kiehart DP, Somjen GG, Wadman WJ. Volume changes induced by osmotic stress in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch*. 1998 Nov; 436(6):991-8.

Arslan P, Di Virgilio F, Beltrame M, Tsien RY, Pozzan T. Cytosolic Ca $^{2+}$ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca $^{2+}$. *J Biol Chem*. 1985 Mar 10; 260(5):2719-27.

Bardy C, van den Hurk M, Eames T, Marchand C, Hernandez RV, Kellogg M, Gorris M, Galet B, Palomares V, Brown J, Bang AG, Mertens J, Böhnke L, Boyer L, Simon S, Gage FH. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 19; 112(20):E2725-34.

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*. 1997 Jun 27; 276(5321):2042-5.

Becerril-Ortega J, Bordji K, Fréret T, Rush T, Buisson A. Iron overload accelerates neuronal amyloid- β production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Oct;35(10):2288-301.

Belkhou R, Stanescu S, Swaraj S, Besson A, Ledoux M, Hajlaoui M, Dalle D. HERMES: a soft X-ray beamline dedicated to X-ray microscopy. *J Synchrotron Radiat*. 2015 Jul; 22(4):968-79.

Bernhardt M, Nicolas JD, Osterhoff M, Mittelstädt H, Reuss M, Harke B, Wittmeier A, Sprung M, Köster S, Salditt T. Correlative microscopy approach for biology using X-ray holography, X-ray scanning diffraction and STED microscopy. *Nat Commun*. 2018 Sep 7; 9(1):3641.

Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*. 2006 Sep 15; 313(5793):1642-5.

Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973 Jul; 232(2): 331–356.

Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. 2014 Apr 16; 82(2):444-59.

Bock O. Cajal, Golgi, Nansen, Schäfer and the Neuron Doctrine. *Endeavour*. 2013 Dec; 37(4):228-34.

Bourassa MW, Brown HH, Borchelt DR, Vogt S, Miller LM. Metal-deficient aggregates and diminished copper found in cells expressing SOD1 mutations that cause ALS. *Front Aging Neurosci*. 2014 Jun 16; 6:110.

Brandt R, Bakota L. Microtubule dynamics and the neurodegenerative triad of Alzheimer's disease: The hidden connection. *J Neurochem*. 2017 Nov; 143(4):409-417.

Bremer A, Aebi U. The structure of the F-actin filament and the actin molecule. *Current Opinion in Cell Biology*. 1992 Feb; 4(1):20-26.

Breuss MW, Leca I, Gstrein T, Hansen AH, Keays DA. Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Mol Cell Neurosci*. 2017 Oct; 84:58-67.

Bum-Ho Bin, Juyeon Seo, Sung Tae Kim. Function, Structure, and Transport Aspects of ZIP and ZnT Zinc Transporters in Immune Cells. *J Immunol Res*. 2018; 2018: 9365747.

Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol*. 1980 Sept; 86(3):831-45.

Carmona A, Devès G, Ortega R. Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Mar; 390(6):1585-94.

Carmona A, Zogzas CE, Roudeau S, Porcaro F, Garrevoet J, Spiers KM, Salomé M, Cloetens P, Mukhopadhyay S, Ortega R. SLC30A10 Mutation Involved in Parkinsonism Results in Manganese Accumulation within Nanovesicles of the Golgi Apparatus. *ACS Chem Neurosci*. 2019 Jan 16; 10(1):599-609.

Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol*. 2003 May; 162(5):1623-7.

Chang CJ, Nolan EM, Jaworski J, Burdette SC, Sheng M, Lippard SJ. Bright Fluorescent Chemosensor Platforms for Imaging Endogenous Pools of Neuronal Zinc. *Chem. Biol*. 11, 203–210 (2004).

Chazeau A, Mehidi A, Nair D, Gautier JJ, Leduc C, Chamma I, Kage F, Kechkar A, Thoumine O, Rottner K, Choquet D, Gautreau A, Sibarita JB, Giannone G. Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J*. 2014 Dec 1; 33(23):2745-64.

Chen N, Moshaver A, Raymond LA. Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol*. 1997 Jun; 51(6):1015-23.

Chowanadisai W, Graham DM, Keen CL, Rucker RB, Messerli MA. A zinc transporter gene required for development of the nervous system. *Commun Integr Biol*. 2013 Nov 1; 6(6):e26207.

Chwiej J, Szczerbowska-Boruchowska M, Lankosz M, Wojcik S, Falkenberg G, Stegowski Z, Setkowicz Z. Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy. *Spectrochim. Acta, Part B*. 2005; 60, 1531–1537.

Colvin RA, Jin Q, Lai B, and Kiedrowski L. Visualizing Metal Content and Intracellular Distribution in Primary Hippocampal Neurons with Synchrotron X-Ray Fluorescence. *PLoS One*. 2016 Jul 19;11(7):e0159582.

Courrier R. Notice sur la vie et les travaux de Gabriel Bertrand membre de la section de chimie. Lecture faite en la séance annuelle des prix du 14 décembre 1964.

Craddock TJ, Tuszynski JA, Chopra D, Casey N, Goldstein LE, Hameroff SR, Tanzi RE. The zinc dyshomeostasis hypothesis of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33552.

Da Silva JC, Pacureanu A, Yang Y., Bohic S., Morawe C., Barrett R., Cloetens P. Efficient concentration of high-energy x-rays for diffraction-limited imaging resolution. *Optica*. 2017; 4: 492-495.

Davies KM, Hare DJ, Cottam V, Chen N, Hilgers L, Halliday G, Mercer JF, Double KL. Localization of copper and copper transporters in the human brain. *Metallomics*. 2013 Jan; 5(1):43-51.

Davies KM, Bohic S, Carmona A, Ortega R, Cottam V, Hare DJ, Finberg JP, Reyes S, Halliday GM, Mercer JF, Double KL. Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Apr; 35(4):858-66.

Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003 Sep 2; 100(18):10494-9.

Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys*. 2011; 40:169-86.

Drabikowski W, Lehrer S, Nagy B, Gergely J. Loss of Cu²⁺-binding to actin upon removal of the C-terminal phenylalanine by carboxypeptidase A. *Arch Biochem Biophys*. 1977 May; 181(1):359-61.

Dučić T, Barski E, Salome M, Koch JC, Bähr M, Lingor P. X-ray fluorescence analysis of iron and manganese distribution in primary dopaminergic neurons. *J Neurochem*. 2013 Jan; 124(2):250-61.

Dučić T, Carboni E, Lai B, Chen S, Michalke B, Lázaro DF, Outeiro TF, Bähr M, Barski E, Lingor P. Alpha-Synuclein Regulates Neuronal Levels of Manganese and Calcium. *ACS Chem Neurosci*. 2015 Oct 21; 6(10):1769-79.

Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 May 15; 89(10):4363-7.

Eagle GR, Zombola RR, Himes RH. Tubulin-zinc interactions: binding and polymerization studies. *Biochemistry*. 1983 Jan 4; 22(1):221-8.

Engelhardt J. AMPA Receptor Auxiliary Proteins of the CKAMP Family. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 22; 20(6). pii: E1460.

Everett J, Collingwood JF, Tjendana-Tjhin V, Brooks J, Lermyte F, Plascencia-Villa G, Hands-Portman I, Dobson J, Perry G, Telling ND. Nanoscale synchrotron X-ray speciation of iron and calcium compounds in amyloid plaque cores from Alzheimer's disease subjects. *Nanoscale*. 2018 Jul 5; 10(25):11782-11796.

Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* 2000 May; 130(5S Suppl):1471S-83S.

Frost NA, Shroff H, Kong H, Betzig E, Blanpied TA. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron.* 2010 Jul 15;67(1):86-99.

Fifková E, Markham JA, Delay RJ. Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res.* 1983 Apr 25;266(1):163-8.

Fishman MC. Sir Henry Hallett Dale and acetylcholine story. *Yale J Biol Med.* 1972 Apr; 45(2): 104-18.

Gaier ED, Eipper BA, Mains RE. Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects. *J Neurosci Res.* 2013 Jan; 91(1):2-19.

Gaskin F, Kress Y. Zinc ion-induced assembly of tubulin. *J Biol Chem.* 1977 Oct 10; 252(19):6918-24.

Gerber H, Wu F, Dimitrov M, Garcia Osuna GM, Fraering PC. Zinc and Copper Differentially Modulate Amyloid Precursor Protein Processing by γ -Secretase and Amyloid- β Peptide Production. *J Biol Chem.* 2017 Mar 3; 292(9):3751-3767.

Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science.* 1998 Feb 6; 279(5352):870-3.

Glassman AB, Ryzewski RS, Bennett CE. Trace metal levels in commercially prepared tissue culture media. *Tissue Cell.* 1980; 12(4):613-7.

Goldschmith A, Infante C, Leiva J, Motles E, Palestini M. Interference of chronically ingested copper in long-term potentiation (LTP) of rat hippocampus. *Brain Res.* 2005 Sep 21; 1056(2):176-82.

Gordon-Weeks PR, Fournier AE. Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. *J Neurochem.* 2014 Apr; 129(2):206-12.

Grabrucker AM, Schmeisser MJ, Udvardi PT, Arons M, Schoen M, Woodling NS, Andreasson KI, Hof PR, Buxbaum JD, Garner CC, Boeckers TM. Amyloid beta protein-induced zinc sequestration leads to synaptic loss via dysregulation of the ProSAP2/Shank3 scaffold. *Mol Neurodegener.* 2011 Sep 22; 6:65.

Granger AJ, Shi Y, Lu W, Cerpas M, Nicoll RA. LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature.* 2013 Jan 24; 493(7433):495-500.

Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron.* 2017 May 17;94(4):713-730.

Grubman A, James SA, James J, Duncan C, Volitakis I, Hickey JL, Crouch PJ, Donnelly PS, Kanninen KM, Liddell JR, Cotman SL, de Jonge, White AR. X-ray fluorescence imaging reveals subcellular biometal disturbances in a childhood neurodegenerative disorder. *Chem Sci.* 2014 Jun; 5(6):2503-2516.

Gu X, Mao X, Lussier MP, Hutchison MA, Zhou L, Hamra FK, Roche KW, Lu W. GSG1L suppresses AMPA receptor-mediated synaptic transmission and uniquely modulates AMPA receptor kinetics in hippocampal neurons. *Nat Commun.* 2016 Mar 2;7:10873.

Guan H, Yang H, Yang M, Yanagisawa D, Bellier JP, Mori M, Takahata S, Nonaka T, Zhao S, Tooyama I. Mitochondrial ferritin protects SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative stress and modulates α -synuclein expression. *Exp Neurol.* 2017 May; 291:51-61.

Hackett MJ, McQuillan JA, El-Assaad F, Aitken JB, Levina A, Cohen DD, Siegele R, Carter EA, Grau GE, Hunt NH, Lay PA. Chemical alterations to murine brain tissue induced by formalin fixation: implications for biospectroscopic imaging and mapping studies of disease pathogenesis. *Analyst.* 2011 Jul 21; 136(14):2941-52.

Hagmeyer S, Mangus K, Boeckers TM, Grabrucker AM. Effects of trace metal profiles characteristic for autism on synapses in cultured neurons. *Neural Plast.* 2015; 2015:985083.

Hamberger A, Chiang GH, Sandoval E, Cotman CW. Glutamate as a CNS transmitter. II. Regulation of synthesis in the releasable pool. *Brain Res.* 1979 Jun 8; 168(3):531-41.

Harris KM, Stevens JK. Dendritic Spines of Rat Cerebellar Purkinje Cells: Serial Electron Microscopy with Reference to Their Biophysical Characteristics. *The Journal of Neuroscience.* 1988 Dec; 8(12):4455-4469.

Harris KM, Stevens JK. Dendritic Spines of CA1 Pyramidal Cells in the Rat Hippocampus: Serial Electron Microscopy with Reference to Their Biophysical Characteristics. *J Neurosci.* 1989 Aug; 9(8):2982-97.
Hebb DO. *The Organization of Behavior a Neuropsychological Theory.* 1949. New York JOHN WHAT & SONS. INC. London.

Hell SW, Dyba M, Jakobs S. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Curr Opin Neurobiol.* 2004 Oct; 14(5):599-609.

Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* 1994 Jun 1; 19(11):780-2.

Herrmann H, Aebi U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Nov 1; 8(11) pii: a018242.

Hesketh JE. Zinc binding to tubulin. *Int J Biochem.* 1983; 15(5):743-6.

Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1994 Feb; 6(1):74-81.

Hoffman L, Farley MM, Waxham MN. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II isoforms differentially impact the dynamics and structure of the actin cytoskeleton. *Biochemistry.* 2013 Feb 19; 52(7):1198-207.

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994; 17:31-108.

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature*. 1990 Sep 6; 347(6288):44-9.

Horn MJ, Jones DB. Isolation from *Astragalus Pectinatus* of a crystalline amino acid complex containing selenium and sulfur. *Journal of Biological Chemistry*. 1941; 139(2):649-660.

Huttenlocher PR. Dendritic development and mental defect. *Neurology*. 1970 Apr; 20(4):381.

Hyman AA, Salser S, Drechsel DN, Unwin N, Mitchison TJ. Role of GTP Hydrolysis in Microtubule Dynamics: Information from a Slowly Hydrolyzable Analogue, GMPCPP. *Molecular Biology of the Cell*. 1992. Oct; 3:1155-1167.

Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex*. 2000 Oct; 10(10):1038-44.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught, A.D. and Wilkinson, A. (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997).

Izeddin I, Specht CG, Lelek M, Darzacq X, Triller A, Zimmer C, Dahan M. Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS One*. 2011 Jan 17; 6(1):e15611.

Jackson AC, Nicoll RA. The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron*. 2011 Apr 28;70(2):178-99.

Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron*. 2009 Jan 15; 61(1):85-100.

Jung KH, Oh ET, Park HJ, Lee KH. Development of new peptide-based receptor of fluorescent probe with femtomolar affinity for Cu⁺ and detection of Cu⁺ in Golgi apparatus. *Biosens Bioelectron*. 2016 Nov 15; 85:437-444.

Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 2006; 1(5):2406-15.

Kiernan J.A., Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*. 2000. 00-1 pp. 8-12.

Kägi JH, Schäffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*. 1988 Nov 15; 27(23):8509-15.

Kalappa BI, Anderson CT, Goldberg JM, Lippard SJ, Tzounopoulos T. AMPA receptor inhibition by synaptically released zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 22; 112(51):15749-54.

Kaler SG. Neurodevelopment and brain growth in classic Menkes disease is influenced by age and symptomatology at initiation of copper treatment. *J Trace Elem Med Biol*. 2014 Oct; 28(4):427-30.

Kaler SG, Holmes CS. Catecholamine metabolites affected by the copper-dependent enzyme dopamine-beta-hydroxylase provide sensitive biomarkers for early diagnosis of menkes disease and viral-mediated ATP7A gene therapy. *Adv Pharmacol.* 2013; 68:223-33.

Kang HW, Kim HK, Moon BH, Lee SJ, Lee SJ, Rhyu IJ. Comprehensive Review of Golgi Staining Methods for Nervous Tissue. *Applied Microscopy.* 2017. June; 47(2):63-69.

Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, van der Zwan WA, Wulf PS, Keijzer N, Demmers J, Jaworski J, Akhmanova A, Hoogenraad CC. NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *J Neurosci.* 2011 Jun 1; 31(22):8194-209.

Kaščáková S, Kewish CM, Rouzière S, Schmitt F, Sobesky R, Poupon J, Sandt C, Francou B, Somogyi A, Samuel D, Jacquemin E, Dubart-Kupperschmitt A, Nguyen TH, Bazin D, Duclos-Vallée JC, Guettier C12, Le Naour F. Rapid and reliable diagnosis of Wilson disease using X-ray fluorescence. *J Pathol Clin Res.* 2016 Jun 6; 2(3):175-86.

Kaufmann R, Schellenberger P, Seiradake E, Dobbie IM, Jones EY, Davis I, Hagen C, Grünwald K. Super-resolution microscopy using standard fluorescent proteins in intact cells under cryo-conditions. *Nano Lett.* 2014 Jul 9; 14(7):4171-5.

Kim CH, Lisman JE. A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J Neurosci.* 1999 Jun 1; 19(11):4314-24.

Kim HL, Ra H, Kim KR, Lee JM, Im H, Kim YH. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 contributes to TPEN-induced neuronal apoptosis. *Mol Cells.* 2015 Apr; 38(4):312-317.

Kim K, Lakhanpal G, Lu HE, Khan M, Suzuki A, Hayashi MK, Narayanan R, Luyben TT, Matsuda T, Nagai T, Blanpied TA, Hayashi Y, Okamoto K. A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron.* 2015 Aug 19; 87(4):813-26.

Kirkpatrick P, Baez AV. Formation of optical images by X-rays. *J Opt Soc Am.* 1948 Sep; 38(9):766-74.

Konietzny A, Bär J, Mikhaylova M. Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Front Cell Neurosci.* 2017 May 18; 11:147.

Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Gouveia SM, Munteanu EL, Schober JM, Honnappa S, Buey RM, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol.* 2009 Mar 9; 184(5):691-706.

Kosior E, Bohic S, Suhonen H, Ortega R, Devès G, Carmona A, Marchi F, Guillet JF, Cloetens P. Combined use of hard X-ray phase contrast imaging and X-ray fluorescence microscopy for sub-cellular metal quantification. *J Struct Biol.* 2012 Feb; 177(2):239-47.

Lee BE, Choi BY, Hong DK, Kim JH, Lee SH, Kho AR, Kim H, Choi HC, Suh SW. The cancer chemotherapeutic agent paclitaxel (Taxol) reduces hippocampal neurogenesis via down-regulation of vesicular zinc. *Sci Rep.* 2017 Sep 15; 7(1):11667.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*. 2000 Jun 22; 405(6789):955-9.

Lee SJ, Cho KS, Kim HN, Kim HJ, Koh JY. Role of zinc metallothionein-3 (ZnMt3) in epidermal growth factor (EGF)-induced c-Abl protein activation and actin polymerization in cultured astrocytes. *J Biol Chem*. 2011 Nov 25; 286(47):40847-56.

Lee SJ, Seo BR, Koh JY. Metallothionein-3 modulates the amyloid β endocytosis of astrocytes through its effects on actin polymerization. *Mol Brain*. 2015 Dec 4; 8(1):84.

Lehotzky A, Oláh J, Szunyogh S, Szabó A, Berki T, Ovádi J. Zinc-induced structural changes of the disordered tppp/p25 inhibits its degradation by the proteasome. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jan; 1852(1):83-91.

Lehrer SS, Nagy B, Gergely J. The binding of Cu^{2+} to actin without loss of polymerizability: the involvement of the rapidly reacting -SH group. *Arch Biochem Biophys*. 1972 May; 150(1):164-74.

Li H, Zhang J, Niswander L. Zinc deficiency causes neural tube defects through attenuation of p53 ubiquitylation. *Development*. 2018 Dec 13;145(24). pii: dev169797.

Li X, Du X, Ni J. Zn^{2+} Aggravates Tau Aggregation and Neurotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 23; 20(3).

Lima Caldeira G, Peça J, Carvalho AL. New insights on synaptic dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 2019 Aug; 57:62-70.

Lin WH, Webb DJ. Actin and Actin-Binding Proteins: Masters of Dendritic Spine Formation, Morphology, and Function. *Open Neurosci J*. 2009 Jan 1; 3:54-66.

Lisman J. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Dec; 86(23):9574-8.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. Fifth edition. 2003.

Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol*. 2001 Nov 9; 313(5):1045-57.

Lukinavičius G, Reymond L, D'Este E, Masharina A, Göttfert F, Ta H, Güther A, Fournier M, Rizzo S, Waldmann H, Blaukopf C, Sommer C, Gerlich DW, Arndt HD, Hell SW, Johnsson K. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods*. 2014 Jul; 11(7):731-3.

Lukinavičius G, Reymond L, Umezawa K, Sallin O, D'Este E, Göttfert F, Ta H, Hell SW, Urano Y, Johnsson K. Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging in Living Cells. *J Am Chem Soc*. 2016 Aug 3; 138(30):9365-8.

Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev*. 2007 Jul; 87(3):1011-46.

MacDonald L, Baldini, Storrie B. Does Super Resolution Fluorescence Microscopy Obsolete Previous Microscopic Approaches to Protein Co-localization? *Methods Mol Biol.* 2015; 1270: 255–275.

Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Haganir RL. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19; 272(51):32528-33.

Martinelli D, Travaglini L, Drouin CA, Ceballos-Picot I, Rizza T, Bertini E, Carrozzo R, Petrini S, de Lonlay P, El Hachem M, Hubert L, Montpetit A, Torre G, Dionisi-Vici C. MEDNIK syndrome: a novel defect of copper metabolism treatable by zinc acetate therapy. *Brain.* 2013 Mar; 136(Pt 3):872-81.

Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci.* 1994 Oct; 14(10):5844-57.

Matsuyama S, Shimura M, Fujii M, Maeshima K, Yumoto H, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Nishino Y, Tamasaku K, Ishizaka Y, Ishikawa T, Yamauchi K. Elemental mapping of frozen-hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy. *X-Ray Spectrom.* 2010; 39, 260–266.

Matsuyama SS, Jarvik LF. Hypothesis: microtubules, a key to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct; 86(20):8152-6.

Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci.* 2001 Nov; 4(11):1086-92.

Merriam EB, Millette M, Lumbard DC, Saengsawang W, Fothergill T, Hu X, Ferhat L, Dent EW. Synaptic regulation of microtubule dynamics in dendritic spines by calcium, F-actin, and drebrin. *J Neurosci.* 2013 Oct 16; 33(42):16471-82.

Miller M, Peters A. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *J Comp Neurol.* 1981 Dec 20; 203(4):555-73.

Miller LM, Wang Q, Telivala TP, Smith RJ, Lanzirotti A, Miklossy J. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J Struct Biol.* 2006 Jul; 155(1):30-7.

Minsky M. 1957. Microscopy Apparatus. U.S. Patent 3013467.

Møllerud S, Frydenvang K, Pickering DS, Kastrup JS. Lessons from crystal structures of kainate receptors. *Neuropharmacology.* 2017 Jan; 112(Pt A):16-28.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 1986 Feb 27-Mar 5; 319(6056):774-6.

Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron.* 1992 Nov; 9(5):967-75.

Muñoz P, Humeres A, Elgueta C, Kirkwood A, Hidalgo C, Núñez MT. Iron mediates N-methyl-D-aspartate receptor-dependent stimulation of calcium-induced pathways and hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15; 286(15):13382-92.

Muñoz P. Iron-mediated redox modulation in neural plasticity. *Commun Integr Biol*. 2012 Mar 1; 5(2):166-8.

Nair D, Hosy E, Petersen JD, Constals A, Giannone G, Choquet D, Sibarita JB. Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J Neurosci*. 2013 Aug 7; 33(32):13204-24.

Nägerl UV, Willig KI, Hein B, Hell SW, Bonhoeffer T. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 2; 105(48):18982-7.

Nolan EM, Lippard SJ. Small-molecule fluorescent sensors for investigating zinc metalloneurochemistry. *Acc Chem Res*. 2009 Jan 20; 42(1):193-203.

Nose Y, Rees EM, Thiele DJ. Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem Sci*. 2006 Nov; 31(11):604-7.

Ohana E, Sekler I, Kaisman T, Kahn N, Cove J, Silverman WF, Amsterdam A, Hershfinkel M. Silencing of ZnT-1 expression enhances heavy metal influx and toxicity. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Sep; 84(9):753-63.

Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci*. 2004 Oct; 7(10):1104-12.

Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10; 104(15):6418-23.

Opazo P, Labrecque S, Tigaret CM, Frouin A, Wiseman PW, De Koninck P, Choquet D. CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*. 2010 Jul 29; 67(2):239-52.

Ortega R, Bohic S, Tucoulou R, Somogyi A, Devès G. Microchemical element imaging of yeast and human cells using synchrotron X-ray microprobe with Kirkpatrick-Baez optics. *Anal Chem*. 2004 Jan 15; 76(2):309-14.

Ortega R, Devès G, Carmona A. Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J R Soc Interface*. 2009 Oct 6; 6 Suppl 5:S649-58.

Ortega R, Carmona A, Roudeau S, Perrin L, Dučić T, Carboni E, Bohic S, Cloetens P, Lingor P. α -Synuclein Over-Expression Induces Increased Iron Accumulation and Redistribution in Iron-Exposed Neurons. *Mol Neurobiol*. 2016 Apr; 53(3):1925-1934.

Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 1995 Feb 15; 14(4):639-49.

Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10; 93(25):14934-9.

Pampaloni F, Florin EL. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* 2008 Jun; 26(6):302-10.

Pang W, Leng X, Lu H, Yang H, Song N, Tan L, Jiang Y, Guo C. Depletion of intracellular zinc induces apoptosis of cultured hippocampal neurons through suppression of ERK signaling pathway and activation of caspase-3. *Neurosci Lett.* 2013 Sep 27; 552:140-5.

Pchitskaya EI, Zhemkov VA, Bezprozvanny IB. Dynamic Microtubules in Alzheimer's Disease: Association with Dendritic Spine Pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2018 Sep; 83(9):1068-1074.

Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 2011 Mar; 14(3):285-93.

Penzes P, Rafalovich I. Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 970:81-95.

Pépin A, Decanini D, Chen Y. Zone-plate-array lithography using synchrotron radiation. *J. Vac. Sci. Technol.* 2000; B 18(6): 2981-2985

Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010 Oct; 67(10):630-4.

Perrin L, Carmona A, Roudeau S, Ortega, R. Evaluation of sample preparation methods for single cell quantitative elemental imaging using proton or synchrotron radiation focused beams. *J. Anal. At. Spectrom.* 2015 Oct; 30, 2525-2532.

Perrin L, Roudeau S, Carmona A, Domart F, Petersen JD, Bohic S, Yang Y, Cloetens P, Ortega R. Zinc and Copper Effects on Stability of Tubulin and Actin Networks in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *ACS Chem Neurosci.* 2017 Jul 19; 8(7):1490-1499.

Peters C, Muñoz B, Sepúlveda FJ, Urrutia J, Quiroz M, Luza S, De Ferrari GV, Aguayo LG, Opazo C. Biphasic effects of copper on neurotransmission in rat hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2011 Oct; 119(1):78-88.

Peters S, Koh J, Choi DW. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science.* 1987 May 1; 236(4801):589-93.

Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life.* 2014 Apr;66(4):229-39.

Purpura DP. Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science.* 1974 Dec 20; 186(4169):1126-8.

Qu Y, Hahn I, Webb SE, Pearce SP, Prokop A. Periodic actin structures in neuronal axons are required to maintain microtubules. *Mol Biol Cell*. 2017 Jan 15;28(2):296-308.

Quintana AR, Wang D, Forbes JE, Waxham MN. Kinetics of calmodulin binding to calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Aug 26; 334(2):674-80.

Rácz B, Weinberg RJ, Organization of the Arp2/3 Complex in Hippocampal Spines. *J Neurosci*. 2008 May; 28(22): 5654–5659.

Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci*. 2001 Mar 15; 21(6):1983-2000.

Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol*. 1967 Jun; 33(3):C7-C12.

Rimbault C, Maruthi K, Breillat C, Genuer C, Crespillo S, Puente-Muñoz V, Chamma I, Gauthereau I, Antoine S, Thibaut C, Tai FWJ, Dartigues B, Grillo-Bosch D, Claverol S, Poujol C, Choquet D, Mackereth CD, Sainlos M. Engineering selective competitors for the discrimination of highly conserved protein-protein interaction modules. *Nat Commun*. 2019 Oct 4;10(1):4521.

Robertson JD. The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauther cell synapses in goldfish brains. *J Cell Biol*. 1963 Oct; 19:201-21.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973 Feb 9; 179(4073):588-90.

Roudeau S, Carmona A, Perrin L, Ortega R. Correlative organelle fluorescence microscopy and synchrotron X-ray chemical element imaging in single cells. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Nov; 406(27):6979-91.

Sala C, Segal M. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*. 2014 Jan; 94(1):141-88.

Sala C, Vicidomini C, Bigi I, Mossa A, Verpelli C. Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders. *J Neurochem*. 2015 Dec; 135(5):849-58.

Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014 Oct 1; 2014(10):pdb.top071795.

Sanford L, Carpenter MC, Palmer AE. Intracellular Zn²⁺ transients modulate global gene expression in dissociated rat hippocampal neurons. *Sci Rep*. 2019 Jun 28; 9(1):9411.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Molecular Interaction*. 1949 May; 51(4):660-672

Schroer CG, Boye P, Feldkamp JM, Patommel J, Samberg D, Schropp A, Schwab A, Stephan S, Falkenberg G, Wellenreuther G, Reimers N. Hard X-ray nanoprobe at beamline P06 at PETRAIII. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 2010 May; 616(2-3):93–97

Schwenk J, Harmel N, Zolles G, Bildl W, Kulik A, Heimrich B, Chisaka O, Jonas P, Schulte U, Fakler B, Klöcker N. Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science*. 2009 Mar 6;323(5919):1313-9.

Sekler I, Moran A, Hershinkel M, Dori A, Margulis A, Birenzweig N, Nitzan Y, Silverman WF. Distribution of the zinc transporter ZnT-1 in comparison with chelatable zinc in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2002 Jun 3; 447(3):201-9.

Sindreu C, Bayés Á, Altafaj X, Pérez-Clausell J. Zinc transporter-1 concentrates at the postsynaptic density of hippocampal synapses. *Mol Brain*. 2014 Mar 7; 7:16.

She YM, Narindrasorasak S, Yang S, Spitale N, Roberts EA, Sarkar B. Identification of metal-binding proteins in human hepatoma lines by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Dec; 2(12):1306-18.

Sladeczek F, Pin JP, Récasens M, Bockaert J, Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*. 1985 Oct 24-30; 317(6039):717-9.

Smith SD, She YM, Roberts EA, Sarkar B. Using immobilized metal affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify hepatocellular proteins with copper-binding ability. *J Proteome Res*. 2004 Jul-Aug; 3(4):834-40.

Snigirev A, Snigireva I. High energy X-ray micro-optics. *C. R. Physique* 9 (2008) 507–516.

Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*. 2009 Dec 10; 462(7274):745-56.

Solé VA, Papillon E, Cotte M, Walter P, Susini J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochim. Acta Part B* 62, 63–68.

Solovyev ND. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *J Inorg Biochem*. 2015 Dec; 153:1-12.

Somogyi A, Medjoubi K, Baranton G, Le Roux V, Ribbens M, Polack F, Philippot P, Samama JP. Optical design and multi-length-scale scanning spectro-microscopy possibilities at the Nanoscopium beamline of Synchrotron Soleil. *J Synchrotron Radiat*. 2015 Jul; 22(4):1118-29.

Sorra KE, Harris KM. Overview on the Structure, Composition, Function, Development, and Plasticity of Hippocampal Dendritic Spines. *Hippocampus*. 2000; 10(5):501-11.

Sotelo C. Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol*. 1990 Oct; 153:225-49.

Stanton PK, Sejnowski TJ. Associative long-term depression in the hippocampus induced by hebbian covariance. *Nature*. 1989 May 18; 339(6221):215-8.

Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature neuroscience*. 2002 Mar; 5(3):239-46.

Steward O, Levy WB. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*. 1982 Mar; 2(3):284-91.

Sullivan JA, Zhang XL, Sullivan AP, Vose LR, Moghadam AA, Fried VA, Stanton PK. Zinc enhances hippocampal long-term potentiation at CA1 synapses through NR2B containing NMDA receptors. *PLoS One*. 2018 Nov 28; 13(11):e0205907.

Takeda A. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals*. 2001 Sep-Dec; 14(3-4):343-51.

Tam J, Merino D. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods. *J Neurochem*. 2015 Nov; 135(4):643-58.

Tao-Cheng JH, Toy D, Winters CA, Reese TS, Dosemeci A. Zinc Stabilizes Shank3 at the Postsynaptic Density of Hippocampal Synapses. *PLoS One*. 2016 May 4; 11(5):e0153979.

Tian K, He CC, Xu HN, Wang YX, Wang HG, An D, Heng B, Pang W, Jiang YG, Liu YQ. Zn²⁺ reduction induces neuronal death with changes in voltage-gated potassium and sodium channel currents. *J Trace Elem Med Biol*. 2017 May; 41:66-74.

Torres MD, Garcia O, Tang C, Busciglio J. Dendritic spine pathology and thrombospondin-1 deficits in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2018 Jan; 114:10-14.

Tuschl K, Mills PB, Parsons H, Malone M, Fowler D, Bitner-Glindzicz M, Clayton PT. Hepatic cirrhosis, dystonia, polycythaemia and hypermanganesaemia--a new metabolic disorder. *J Inherit Metab Dis*. 2008 Apr; 31(2):151-63.

Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM Jr, Gulab S, Ibrahim S, Singhi P, Aulakh R, Ribeiro RT, Barsottini OG, Zaki MS, Del Rosario ML, Dyack S, Price V, Rideout A, Gordon K, Wevers RA, Chong WK, Mills PB. Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet*. 2012 Mar 9; 90(3):457-66.

Tzortzopoulos A, Török K. Mechanism of the T286A-mutant alphaCaMKII interactions with Ca²⁺/calmodulin and ATP. *Biochemistry*. 2004 Jun 1; 43(21):6404-14.

Vergnano AM, Rebola N, Savtchenko LP, Pinheiro PS, Casado M, Kieffer BL, Rusakov DA, Mülle C, Paoletti P. Zinc dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron*. 2014 Jun 4; 82(5):1101-14.

Villers A, Godaux E, Ris L. Long-lasting LTP requires neither repeated trains for its induction nor protein synthesis for its development. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40823.

Watanabe S, Punge A, Hollopeter G, Willig KI, Hobson RJ, Davis MW, Hell SW, Jorgensen EM. Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat Methods*. 2011; 8: 80-84.

Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*. 2008 Jun; 283(23):15912-20.

- Wisden W, Seeburg PH. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Jun; 3(3):291-8.
- Wilson SA, Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain.* 1912 March; 34 (4):295–507
- Xu J, Church SJ, Patassini S, Begley P, Waldvogel HJ, Curtis MA, Faull RLM, Unwin RD, Cooper GJS. Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia. *Metallomics.* 2017 Aug 16; 9(8):1106-1119.
- Xu X, Miller EC, Pozzo-Miller L. Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome. *Front Neuroanat.* 2014 Sep 10; 8:97.
- Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Apr 3; 9(4) pii: a018309.
- Yuste R, Bonhoeffer T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jan; 5(1):24-34.
- Yuste R. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Frontiers in Neuroanatomy.* 2015 Apr 21; 9:18
- Zernike F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica.* 1942 Jul; 9(7):686-98.
- Zervas M, Opitz T, Edelmann W, Wainer B, Kucherlapati R, Stanton PK. Impaired hippocampal long-term potentiation in microtubule-associated protein 1B-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2005 Oct 1; 82(1):83-92.
- Zhang JB, Chang S, Xu P, Miao M, Wu H, Zhang Y, Zhang T, Wang H, Zhang J, Xie C, Song N, Luo C, Zhang X, Zhu S. Structural Basis of the Proton Sensitivity of Human GluN1-GluN2A NMDA Receptors. *Cell Rep.* 2018 Dec 26; 25(13):3582-3590.e4.
- Zhang ZW, Wang QH, Zhang JL, Li S, Wang XL, Xu SW. Effects of oxidative stress on immunosuppression induced by selenium deficiency in chickens. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Dec; 149(3):352-61.
- Zito K, Knott G, Shepherd GM, Shenolikar S, Svoboda K. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron.* 2004 Oct 14; 44(2):321-34.
- Ziv NE, Smith SJ. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron.* 1996 Jul; 17(1):91-102.
- Zotter Á, Oláh J, Hlavanda E, Bodor A, Perczel A, Szigeti K, Fidy J, Ovádi J. Zn²⁺-induced rearrangement of the disordered TPPP/p25 affects its microtubule assembly and GTPase activity. *Biochemistry.* 2011 Nov 8; 50(44):9568-78.

Nano-imagerie corrélative de fluorescence X synchrotron et de super résolution des métaux et des protéines dans les synapses de neurones d'hippocampe

Résumé : Les éléments chimiques métalliques tels que Fe, Cu ou Zn sont présents en quantité infime dans le cerveau. Le rôle de ces métaux traces dans les fonctions neuronales, telles que la transmission synaptique et les processus de mémorisation, reste encore largement à élucider. En outre, une dyshoméostasie des métaux est retrouvée dans de nombreuses neuropathologies, telles que maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou sclérose latérale amyotrophique. Les mécanismes d'interaction des métaux traces au niveau neuronal sont difficiles à décrire faute de méthodes analytiques possédant une résolution et une sensibilité adaptées pour en déterminer la distribution à l'échelle synaptique. La spectrométrie de fluorescence-X synchrotron (SXRF) est une méthode d'analyse chimique multi-élémentaire permettant de décrire la distribution quantitative de ces éléments à l'échelle subcellulaire avec une résolution nanométrique (40 nm avec la ligne ID16A du synchrotron ESRF) et une très haute sensibilité. Afin d'interpréter avec précision les résultats d'imagerie chimique, nous avons développé un protocole pour corréliser l'imagerie nano-SXRF avec la microscopie super résolutive de déplétion par émission stimulée (STED) permettant ainsi la corrélation des distributions des métaux avec celle de protéines cibles en super résolution. Nous avons marqué les microtubules et l'actine-F de neurones primaires d'hippocampe de rat puis imagé le cytosquelette par microscopie STED avant de déterminer par spectrométrie SXRF les distributions des éléments P, S, Fe, Cu et Zn. Nous avons ainsi mis en évidence la colocalisation du Zn et des microtubules au niveau dendritique ainsi qu'une localisation du Cu essentiellement dans le cou des épines dendritiques riches en F-actine, et une distribution du Fe sous forme de points très localisés dans les dendrites. Ces résultats ont révélé le rôle essentiel du Zn dans l'architecture du cytosquelette des neurones d'hippocampe et la méthode d'imagerie corrélative développée ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude des dyshoméostasies des métaux dans les maladies neurodégénératives.

Mots clés : chimie analytique, neurobiologie, métaux traces, synchrotron, synapse, microscopie corrélative

Synchrotron X-ray fluorescence and super resolution correlative nanoimaging of metals and proteins in synapses of hippocampal neurons

Abstract: Metallic chemical elements such as Fe, Cu or Zn are present in minute quantities in the brain. The role of these trace metals in neuronal functions such as synaptic transmission and memory processes remains largely unclear. Moreover, metal dyshomeostasis is found in many neuropathologies, such as Alzheimer's disease, Parkinson's or amyotrophic lateral sclerosis. The interaction mechanisms of trace metals at the neuronal level are difficult to describe because of the lack of analytical methods with appropriate resolution and sensitivity to determine metal distribution at the synaptic level. Synchrotron X-ray fluorescence spectrometry (SXRF) is a multielemental chemical analysis method for describing the quantitative distribution of these elements at the sub-cellular scale with a nanometric resolution (40 nm at ESRF beamline ID16A) and a very high sensitivity. In order to accurately interpret chemical imaging results, we have developed a protocol to correlate nano-SXRF imaging with stimulated emission depletion super resolution microscopy (STED), allowing the correlation of metal distribution and that of target proteins in super resolution. We labeled microtubules and F-actin of primary rat hippocampal neurons and imaged the cytoskeleton by STED microscopy before determining the distributions of P, S, Fe, Cu and Zn by SXRF spectrometry. We evidenced the colocalization of Zn and microtubules at the dendritic level and a localization of Cu mainly in the neck of dendritic spines rich in F-actin, and a distribution of Fe in the form of very localized points in the dendrites. These results highlight the crucial role of Zn in cytoskeleton architecture of hippocampal neurons and the developed correlative imaging method opens new perspectives for the study of metal dyshomeostasis in neurodegenerative diseases.

Keywords : analytical chemistry, neurobiology, trace metals, synchrotron, synapse, correlative microscopy

CNRS UMR 5797 – Centre d'études nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG) Université Bordeaux
19, rue du Solarium, 33170 Gradignan

CNRS UMR 5297 – Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS) Université Bordeaux
146, rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux Cedex