



Développement d'une méthode de mesure et d'analyse du transport intraneuronal dans le cerveau de larve de poissons-zèbre par suivi de nanocristaux non-linéaires en microscopie de second-harmonique : application à l'étude d'anomalies de transport chez des poissons portant une mutation retrouvée dans des neuropathies humaines.

Fériel Terras

► **To cite this version:**

Fériel Terras. Développement d'une méthode de mesure et d'analyse du transport intraneuronal dans le cerveau de larve de poissons-zèbre par suivi de nanocristaux non-linéaires en microscopie de second-harmonique : application à l'étude d'anomalies de transport chez des poissons portant une mutation retrouvée dans des neuropathies humaines.. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASP050 . tel-03331646

HAL Id: tel-03331646

<https://theses.hal.science/tel-03331646>

Submitted on 2 Sep 2021

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.

Développement d'une méthode de mesure et
d'analyse du transport intraneuronal dans le
cerveau de larve de poisson zèbre par suivi de
nanocristaux non-linéaires en microscopie de
second-harmonique : application à l'étude
d'anomalies de transport chez des poissons
portant une mutation retrouvée dans des
neuropathies humaines

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 572, Ondes et Matières (EDOM)

Spécialité de doctorat : Optique et Photonique

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CentraleSupélec, CNRS,
LuMIn, 91190, Gif-sur-Yvette, France.
Réfèrent : ENS Paris-Saclay

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 13 Octobre 2020, par

Fériel TERRAS

Composition du jury :

Rachel Méallet-Renault Professeure à l'Université Paris-Saclay, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, Orsay	Présidente du Jury
Lydia Danglot Chargée de recherche INSERM, Institut de Psychiatrie et Neu- rosciences de Paris, Paris	Rapporteuse
Cédric Bouzigues Maître de conférences à l'École Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biosciences, Palaiseau	Rapporteur
Claire Wyart Directrice de recherche INSERM, Institut du Cerveau, Paris	Examinatrice
François Treussart Professeur à l'ENS Paris-Saclay, Laboratoire Lumière, Matière et Interfaces, Gif-sur-Yvette	Directeur
François Marquier Professeur à l'ENS Paris-Saclay, Laboratoire Lumière, Matière et Interfaces, Gif-sur-Yvette	Co-encadrant
Christelle Langevin Chargée de recherche INRAE, IERP, Jouy-en-Josas	Invitée

Table des matières

Introduction	6
1 Le transport intraneuronal : un paramètre fonctionnel pour l'étude des maladies neurologiques	11
1.1 Quelques fonctions essentielles propres aux neurones	12
1.2 Le transport intraneuronal normal et pathologique	15
1.2.1 Les acteurs du transport intraneuronal	15
1.2.2 Anomalies du transport intraneuronal et facteurs de risques gé- nétiques de maladies neurologiques	22
1.2.2.1 Anomalies du transport intraneuronal dans les patho- logies neurologiques	22
1.3 État de l'art des méthodes de mesure du transport intraneuronal	26
1.3.1 Suivi de moteurs moléculaires individuels à l'intérieur de cellules	29
1.3.2 Mesure du transport intraneuronal par suivi de vésicules ou d'or- ganites cellulaires <i>in vivo</i>	30
1.4 Bilan	34
2 Utilisation de nano-traceurs optiquement actifs pour mesurer le trans- port intraneuronal	39
2.1 Introduction	40
2.2 Comparaison des nano-traceurs optiquement actifs utilisés pour la me- sure de phénomènes dynamiques	41
2.2.1 Introduction	41
2.2.2 Différents nano-traceurs inorganiques	43
2.2.2.1 Quantum dots (QDs)	43
2.2.2.2 Nano-diamants fluorescents (FNDs)	46
2.2.2.3 Nano-bâtonnets d'or (AuNRs)	49
2.2.3 Nano-cristaux à réponse optique non linéaire : des nano-traceurs IR alternatifs	52
2.2.3.1 Génération d'un signal de seconde harmonique (SHG) et principe de la microscopie biphotonique	52
2.2.3.2 Etude de phénomènes biologiques dynamiques par suivi du signal SHG de nanocristaux	58
2.3 Suivi de nanoparticules à réponse optique non linéaire, après leur inter- nalisation dans des neurones en culture	60

2.3.1	Test de différents nano-cristaux à réponse optique non linéaire : KTiOPO ₄ , BaTiO ₃ et SiC.	60
2.3.1.1	Synthèse des nanocristaux	60
2.3.1.2	Internalisation de nano-KTP et premières observations dans des cultures primaires de neurones	64
2.3.1.3	Comparaison des transports intraneuronaux de nano- KTP et de FND	69
2.3.2	Choix du nano-traceur SHG le plus adapté : comparaison des propriétés physico-chimiques et optiques.	69
2.4	Conclusion	77
3	Méthode de reconstitution et d'analyse de trajectoires de nanoparti- cules uniques	81
3.1	Introduction	82
3.2	Détection des émetteurs et extraction de trajectoires brutes	84
3.2.1	Méthodes usuelles de suivi d'émetteurs uniques	84
3.2.1.1	Algorithmes de détection et localisation des nanoparti- cules dans chaque image	85
3.2.1.2	Algorithmes de reconstruction de trajectoires	90
3.2.2	Précision de localisation : limite théorique et mesure	92
3.2.2.1	Définitions	93
3.2.2.2	Incertitudes de localisation des nanodiamants fluores- cents (FNDs) suivis par vidéomicroscopie pseudo-TIRF (incidence rasante)	97
3.2.2.3	Incertitudes de localisation des nano-KTP dans la larve de poisson zèbre	99
3.2.3	Détection des nanoparticules dans les scans et extraction de tra- jectoires à l'aide du module Python Trackpy	106
3.2.3.1	Détection des spots	107
3.2.3.2	Reconstruction des trajectoires	108
3.3	Traitement et tri des trajectoires	111
3.3.1	Filtrage spatial des coordonnées des trajectoires	112
3.3.2	Tri des trajectoires : critère de seuillage du déplacement quadra- tique moyen	117
3.4	Segmentation d'une trajectoire et extraction des paramètres de transport	121
3.4.1	Méthodes usuelles de segmentation de phénomènes biologiques dynamiques	121
3.4.1.1	L'outil <i>mean-square displacement</i>	122
3.4.1.2	Le kymographe	123
3.4.1.3	Le modèle de Markov caché (<i>Hidden Markov Model</i> (HMM))	123
3.4.2	Méthode de segmentation automatique mise en place et extrac- tion des paramètres de transport	126
3.5	Bilan	129

4	Imagerie <i>in vivo</i> du transport intraneuronal dans la larve de poisson-zèbre	131
4.1	Introduction	132
4.2	Suivi <i>in vivo</i> de nanocristaux non linéaires dans le cerveau de la larve de poisson-zèbre	135
4.2.1	Premiers essais de mesures de transport intraneuronal dans le cerveau de la souris	135
4.2.2	Conception des expériences dans la larve de poisson-zèbre	137
4.2.2.1	Intérêt de la larve de poisson-zèbre pour des études neurobiologiques	137
4.2.2.2	Choix de la région cérébrale du Zf étudiée	138
4.2.3	Mesure du transport axonal dans le toit optique de la larve de poisson-zèbre	146
4.2.3.1	Protocole d'internalisation des nanoparticules de KTP dans le cerveau des larves de Zf	146
4.2.3.2	Imagerie dynamique SHG du transport axonal dans les larves de Zf	147
4.2.4	Analyse des données de transport axonal dans Zf	149
4.3	Détection et quantification d'altérations du transport axonal dans la larve de Zf	152
4.3.1	Mesures du transport axonal après déstabilisation du cytosquelette par traitement pharmacologique	152
4.3.1.1	Impact du nocodazole sur le transport axonal	152
4.3.1.2	Résultats des mesures de transport axonal dans des larves Zf après ajout de nocodazole	154
4.3.2	Mesure du transport axonal dans les larves Zf transgéniques <i>kif5aa</i> ^{-/-}	156
4.3.2.1	Description de la larve mutante <i>kif5aa</i> ^{-/-}	156
4.3.2.2	Résultats des mesures de transport axonal dans des larves Zf <i>kif5aa</i>	161
4.3.3	Étude du transport axonal dans les larves Zf transgéniques <i>dync1h1</i> ^{mw20}	169
4.3.3.1	Description du mutants Zf <i>dync1h1</i> ^{mw20}	169
4.3.3.2	Résultats des mesures de transport axonal dans des larves Zf mutantes <i>dync1h1</i> ^{mw20}	171
4.4	Conclusion	173
	Conclusion et perspectives	175
	A Notion de “facteur de risque génétique” des maladies neurologiques	181
	B Notations simplifiées des coefficients de Kleinman	183
	C Protocole : Culture primaire de neurones corticaux	185
	D Protocole : Internalisation des nanoparticules dans des neurones corticaux issus de cultures primaires	187

E	Comparaison de la fluorescence deux photons des nanodiamants (FNDs) et du signal SHG des nano-KTP	189
F	Puissance $P_{2\omega}(\theta)$ du rayonnement SHG collectée par l'objectif de microscope	191
G	Comparaison du signal SHG de différents nanocristaux à réponse optique non linéaire : les SiC, les BTO et les KTP	195
H	Protocole : Injection des nano-KTP dans la larve de Zf <i>in vivo</i>	197
I	Protocole de marquage des axones et des corps cellulaires du toit optique par anticorps contre la tubuline acétylée et DAPI respectivement	199
J	Génotypage de l'allèle mutant <i>kifaa</i>	201
K	Génotypage de l'allèle mutant <i>dync1h1^{mw20}</i>	203

Introduction

Le transport actif de cargos tels que des organelles et des complexes protéiques à l'intérieur des cellules est un processus moléculaire essentiel de l'homéostasie cellulaire. Ce transport joue un rôle encore plus important dans les neurones dont les neurites (axone et dendrites) forment des prolongements connectant des régions du cerveau pouvant être très distantes. Ainsi, le transport antérograde (du corps cellulaire vers la périphérie) permet d'apporter sur de longues distances, avec une grande spécificité et précision, les lipides et les protéines essentiels au maintien des fonctions neuronales telles que l'activité synaptique et mitochondriale, tandis que le transport rétrograde (de la périphérie vers le soma) assure à la fois l'apport en facteurs trophiques et permet également l'élimination d'agrégats protéiques de conformations pathologiques (Millecamps and Julien, 2013). De plus en plus d'études consolident le rôle clé joué par le transport moléculaire dans le maintien et le fonctionnement normal des synapses (Guedes-Dias and Holzbaur, 2019), même si les acteurs moléculaires connectant les deux processus restent encore pour la plupart inconnus.

De nombreuses études ont établi qu'au cours de certaines pathologies chroniques progressives cérébrales, des anomalies du transport axonal pouvaient être soit indirectement observées (accumulation de cargos) (Stokin et al., 2005) soit directement mises en évidence (Haziza et al., 2017). Ces pathologies qui touchent le système nerveux central et/ou périphérique, incluent la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer pour lesquelles il n'existe actuellement aucun traitement curatif, en dépit d'une recherche effrénée. Ces maladies incurables et invalidantes se caractérisent par la dégénérescence progressive et la mort des neurones. Les dysfonctionnements induits sont extrêmement

variés. La maladie d'Alzheimer par exemple, qui représente aujourd'hui la principale cause de démence et de dépendance chez les personnes âgées dans les pays développés, se traduit par un déclin progressif des facultés cognitives (mémoire, langage...) tandis que la maladie de Parkinson ou la Sclérose Latérale Amyotrophique touchent surtout les fonctions motrices.

Sachant que des anomalies du transport intra neuronal peuvent représenter un facteur aggravant de la pathologie ou bien être la conséquence de mutations retrouvées chez les patients sur des interacteurs du transport (Goldstein, 2012; Millecamps and Julien, 2013), je me suis intéressé pendant ma thèse à la mesure précise de ce transport, plus précisément celui de compartiment endosomaux, en condition normale et pathologique. J'ai perfectionné et étendu une méthode de mesure de transport intra neuronal qui avait été préalablement développée dans l'équipe (Haziza et al., 2017), et je l'ai adaptée pour permettre des mesures *in vivo* et en profondeur dans le tissu. Cette technique s'appuie sur (i) l'internalisation spontanée de nano traceurs par endocytose, et (ii) le suivi du signal optique de ce traceur qui décrit le transport du compartiment endocytaire qui le contient. Pour ce faire, j'ai utilisé des nanocristaux à réponse optique non-linéaire excités en microscopie rapide à deux photons à une longueur d'onde de 1040 nm peu absorbée par les tissus. J'ai adressé la question du transport intraneuronal dans la larve de poisson-zèbre (zebrafish, Zf). En guise de modèle pathologiques, j'ai mesuré l'impact sur ce transport d'une diminution de la concentration de certains moteurs moléculaires dont les gènes ont été trouvés mutés dans plusieurs neuropathies humaines (Millecamps and Julien, 2013).

Dans le chapitre 1, nous présenterons le contexte autour duquel s'articulent les travaux présentés dans ce manuscrit. Après avoir décrit les principaux acteurs intervenant dans le transport intraneuronal et plus particulièrement les moteurs moléculaires et le cytosquelette, nous discuterons plus en détails des modifications de transports associées à plusieurs maladies neurologiques et de leur lien avec des mutations concernant des gènes des molécules du transport. Les outils et méthodes permettant la mesure et

la quantification précise des paramètres du transport intraneuronal *in vivo* dans des modèles animaux ont émergé ces dix dernières années mais ils présentent encore des limitations, notamment en terme de cadence d’acquisition. La deuxième section de ce chapitre présente un bref état de l’art des méthodes permettant d’observer *in vivo* le transport intraneuronal.

Le transport, dont la dynamique est pilotée à l’échelle biomoléculaire, ne peut être observé qu’à l’aide de traceurs lumineux nanométriques suivies à l’aide de techniques avancées de microscopie. **Le chapitre 2** sera consacré spécifiquement à la présentation de divers traceurs utilisés pour mesurer et quantifier des phénomènes dynamiques à l’échelle subcellulaire. Nous verrons notamment que parmi les sondes les plus connues, telles que les nanocristaux semiconducteurs (*quantum dots*, QDots), les nanodiamants fluorescents ou encore les nano-bâtonnets d’or, les nanocristaux à réponse optique non-linéaire capables d’émettre un signal de seconde harmonique (SHG) sont très prometteurs dans le cadre de l’imagerie dans des échantillons *in vivo* épais (quelques centaines de micromètres). Nous décrirons ainsi la manière dont nous pouvons tirer avantage des propriétés optiques de certains de ces nanocristaux afin de suivre par microscopie bi-photonique leur dynamique après leur internalisation dans des neurones en culture. Les propriétés optiques de trois nanomarqueurs SHG différents seront exposées plus en détails.

Le chapitre 3 est dédié à l’extraction des trajectoires à partir des données brutes de la mesure (vidéos) puis à la description des outils d’analyse mis en place pour quantifier des paramètres du transport intraneuronal. Nous présenterons à cette occasion notre nouvelle méthode numérique de détection et reconstruction de trajectoires, ainsi que notre méthode heuristique de segmentation de trajectoires en phases de mouvement et d’arrêt et nous la comparerons brièvement aux autres méthodes communément utilisées.

Dans le chapitre 4 nous présenterons les résultats de l'application au cerveau de larve de poisson-zèbre de cette nouvelle méthode de suivi utilisant la microscopie à deux photons et une approche améliorée d'extraction des paramètres du transport intraneuronal. Nous commencerons par discuter des avantages du modèle de la larve de poisson-zèbre pour la mesure des caractéristiques du transport intraneuronal. Nous verrons ensuite comment nous avons adapté les outils de mesure et d'analyses mis au point au cours de ma thèse afin de mesurer le transport dans les axones de neurones du toit optique de la larve de Zf. Nous présenterons ensuite les modifications de transports induites par différentes perturbations. Nous étudierons dans un premier temps l'impact d'une déstabilisation du cytosquelette par traitement pharmacologique sur le transport. Dans un second temps, nous nous intéresserons à l'étude du transport intraneuronal dans un mutant correspondant à la perte de fonction de la chaîne lourde Kif5aa d'une kinésine responsable du mouvement antérograde (du corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone), ainsi qu'à un deuxième mutant ayant une mutation non-sens sur le gène codant pour la chaîne lourde de la dynéine, responsable du mouvement rétrograde (de l'extrémité de l'axone vers le soma). Enfin nous conclurons sur les perspectives d'application à la détection d'anomalies de transports dans des mutants pouvant servir de modèles de tauopathies humaines. Cette étude se rapproche ainsi plus des applications aux criblages, *in vivo*, d'anomalies fonctionnelles associées à des mutations.

Chapitre 1

Le transport intraneuronal : un paramètre fonctionnel pour l'étude des maladies neurologiques

Sommaire

1.1	Quelques fonctions essentielles propres aux neurones . . .	12
1.2	Le transport intraneuronal normal et pathologique	15
1.2.1	Les acteurs du transport intraneuronal	15
1.2.2	Anomalies du transport intraneuronal et facteurs de risques génétiques de maladies neurologiques	22
1.3	État de l'art des méthodes de mesure du transport intra- neuronal	26
1.3.1	Suivi de moteurs moléculaires individuels à l'intérieur de cellules	29
1.3.2	Mesure du transport intraneuronal par suivi de vésicules ou d'organites cellulaires <i>in vivo</i>	30
1.4	Bilan	34

1.1 Quelques fonctions essentielles propres aux neurones

Communication interneuronale. Le système nerveux est constitué d'une part du système nerveux central, c'est-à-dire le cerveau et la moelle épinière et d'autre part du système périphérique, correspondant aux multiples prolongements nerveux dirigés vers l'ensemble des organes. Le système périphérique perçoit des stimulations qu'il transforme en signaux électriques, appelés potentiels d'action, ensuite envoyés vers le système nerveux central et en particulier vers le centre de traitement principal : le cerveau. Chez l'humain, ce dernier est composé d'environ 100 milliards de neurones et d'autant de cellules gliales essentielles au fonctionnement des neurones. Les neurones ont la particularité d'être polarisés : ils possèdent de longues arborescences comprenant un axone et de multiples dendrites émergeant du corps cellulaire et établissant des contacts avec d'autres neurones par le biais des **synapses**. Ces dernières ont la spécificité de pouvoir transmettre un signal électrique, le potentiel d'action, d'un neurone à l'autre par l'intermédiaire de neurotransmetteurs libérés par la région présynaptique très dynamique (Südhof, 2012). La complexité des circuits neuronaux réside entre autres dans le fait qu'un unique neurone humain peut établir jusqu'à 100 000 connexions, au travers d'autant de synapses.

Les analyses génomiques ou pangénomiques à grande échelle sur des cohortes de patients, couplées aux constructions d'animaux transgéniques, ont permis de mettre en évidence l'implication forte des molécules essentielles aux fonctions synaptiques dans divers **troubles neurologiques** (Penzes et al., 2011). Ainsi des mutations de gènes codant pour des molécules synaptiques ont été liées de manière causale à des maladies neuropsychiatriques apparaissant précocement, tels les troubles du spectre autistique (Zoghbi and Bear, 2012). Dans le cas de la schizophrénie, des anomalies des épines dendritiques (compartiments post-synaptiques) ont été directement observées (Glausier and Lewis, 2013). Enfin, de nouvelles approches des maladies neurodégénératives

sont en train d'émerger, dans lesquelles, en plus des facteurs de risques génétiques reconnus qui expliquent directement l'accumulation d'agrégats protéiques toxiques (TAU et β -amyloïde dans le cas de la maladie d'Alzheimer, ou α -synucléine pour la maladie de Parkinson), d'autres facteurs qui leur sont liés pourraient nuire au fonctionnement synaptique : c'est le cas de protéines impliquées dans la formation et la maintenance de points focaux d'adhésion et dans le remodelage des filaments d'actine (Dourlen et al., 2019) qui jouent un rôle dans la plasticité synaptique (remodelage morphologique et moléculaire des épines dendritiques).

Pour étudier et quantifier l'activité synaptique et celle des circuits neuronaux, **l'électrophysiology** est une méthode communément utilisée. Différentes techniques permettent, à l'aide d'électrodes, d'enregistrer l'activité de neurones isolés ou bien l'activité synchrone d'une population de neurones. David HUBEL et Torsten WIESEL, récompensés par le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1981, sont les pionniers d'une technique permettant de détecter l'activité électrique générée par un groupe de neurones en disposant une électrode à l'extérieur de la cellule et dont la pointe est proche du réseau neuronal ciblé. D'autres méthodes permettent de mesurer les courants électriques transmembranaires à l'intérieur d'une unique cellule. L'une d'entre elles consiste à utiliser une électrode en verre de très fin diamètre, nommée électrode *sharp*, qui traverse la membrane cellulaire afin d'effectuer la mesure du potentiel transmembranaire. La technique de *patch-clamp*, développée par Erwin NEHER et Bert SAKMANN dont les travaux ont été récompensés par le prix Nobel en 1991 (Neher and Sakmann, 1976), permet également de mesurer les courants électriques transmembranaires. Cette méthode consiste à mettre en continuité électrique une micro-pipette en verre remplie d'une solution ionique de composition définie avec la membrane d'une cellule vivante isolée. Une limitation importante de l'ensemble de ces techniques d'électrophysiologie est le fait qu'elles soient réduites à l'étude de l'activité neuronale d'un petit groupe de cellules seulement. Afin de pallier ce problème, des sondes fluorescentes ont été mises au point qui sont sensibles à la différence de potentiel transmembranaire. Il s'agit soit

de colorants (Ferezou et al., 2006) soit **d’indicateurs protéiques fluorescents encodés génétiquement** (Knopfel and Song, 2019). De plus, l’activité électrique peut être approchée via le suivi de la concentration en calcium à l’aide de senseurs calciques encodés génétiquement, encore plus brillants que les senseurs de potentiel (Lin and Schnitzer, 2016).

Outre l’électrophysiologie, au cours des 20 dernières années, de nouvelles **techniques de microscopie optique à super-résolution** ont été développées et ont permis d’améliorer nos connaissances de la fonction synaptique. La revue de (Hosy et al., 2014) souligne comment ces nouvelles techniques d’imagerie aident à déchiffrer l’organisation des protéines post-synaptiques, offrant une nouvelle vision du mécanisme de transmission synaptique. Parmi elles, la microscopie STED (*Stimulated Emission Depletion*), la microscopie à illumination structurée SIM ou encore les techniques de localisation de molécules uniques, telles que PALM (*Photo-Activated Localization Microscopy*) et STORM (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*) ont par exemple permis d’étudier la nano-organisation des récepteurs AMPA¹ et des protéines d’échafaudage post-synaptiques² En particulier, l’étude des régions post-synaptiques à une résolution spatiale allant de 10 à 100 nm a permis de mettre en évidence que les récepteurs AMPA sont organisés en groupes appelés “nanodomaines” ; chaque synapse présentait entre 0 et 4 nanodomaines (Nair et al., 2013). Par ailleurs, il a aussi été montré que ces derniers sont reliés à des protéines de la densité post-synaptique³ (PSD) (MacGillavry et al., 2013). (Frost et al., 2010) ont utilisé la technique sptPALM (*single particle tracking Photo-Activated Localization Microscopy*) reposant sur la localisation et le suivi d’une molécule fluorescente photo-activée de manière aléatoire afin de mesurer le mouvement des molécules d’actine individuelles dans les épines dendri-

1. Les récepteurs AMPA sont des récepteurs membranaires activés par le glutamate. Ils sont notamment responsables de la transmission synaptique rapide.

2. Les protéines d’échafaudage sont des protéines qui participent à la transduction de signaux entre cellules en régulant l’activation des cascades moléculaires impliquées dans la transmission du signal.

3. La densité post-synaptique est une zone dense en protéines attachée à la membrane postsynaptique.

tiques de cellules vivantes. Au sein des épines dendritiques, l'actine joue en effet un rôle important en régulant la transmission synaptique ; elle permettrait notamment l'ancrage de divers récepteurs à la densité post-synaptique.

Le transport intraneuronal. L'activité synaptique n'est pas la seule fonction biologique qui est altérée dans les maladies neurologiques. De nombreuses études ont révélé dans certaines maladies des **anomalies du transport** de divers cargos (organites, granules d'ARN...) qui est assuré par des moteurs moléculaires le long des cytosquelettes de microtubule et d'actine structurant les branches neuronales (Hirokawa et al., 2010). Il a été montré en particulier que le transport axonal était dégradé à un stade précoce de la maladie d'Alzheimer, amenant à l'accumulation d'organites (Stokin et al., 2005), ainsi que dans des maladies neurodégénératives des motoneurones (Chevalier-Larsen and Holzbaaur, 2006). Les causes moléculaires de ces défauts et les effets qu'ils entraînent sont intimement liés (Goldstein, 2012).

Dans ce chapitre nous discuterons plus en détail du lien qui existe entre les maladies neurologiques et le transport intraneuronal, et qui fournissent des pistes d'intérêt pour élucider les voies de signalisation inconnues. Après avoir décrit les divers acteurs intervenant dans le transport intraneuronal, nous nous intéressons en particulier à l'**impact de facteurs de risques génétiques associés à des maladies neurologiques sur ce transport** (section 1.2). Dans un second temps, nous présenterons un état de l'art des principales **méthodes permettant la mesure du transport intraneuronal** (section 1.3).

1.2 Le transport intraneuronal normal et pathologique

1.2.1 Les acteurs du transport intraneuronal

Les moteurs moléculaires sont des macromolécules capables de convertir l'énergie chimique (provenant principalement de l'ATP) en force mécanique. Ils jouent un rôle

fondamental dans la fonction et la survie des neurones en transportant, le long du cytosquelette, différents types de vésicules membranaires et de complexes protéiques tels que les vésicules synaptiques, les récepteurs des neurotransmetteurs et des facteurs neurotrophiques, les ARN messagers, les organites, ou encore les endosomes. Ces derniers sont des structures sphériques créées par invagination de la membrane plasmique au moment de l'internalisation de molécules ou nanostructures extracellulaires ; leur rôle est ensuite de véhiculer leur contenu vers la région subcellulaire la plus pertinente. Le devenir de ces vésicules est alors variable : elles peuvent être recyclées et repartir à la membrane plasmique, être dégradées, ou encore être redirigées vers d'autres compartiments cellulaires pour agir à des endroits spécifiques du neurone, tels qu'un compartiment synaptique. Ces multiples cargos sont alors transportés à l'intérieur de l'axone et dans les dendrites (Hirokawa et al., 2010).

Trois familles de moteurs moléculaires ont été identifiées comme responsables de ce transport : **les kinésines, les dynéines et les myosines** (Hirokawa et al., 2010). Dans l'axone et dans les dendrites, le cytosquelette est composé en majorité de microtubules (MTs) alignés selon la direction des branches et de neurofilaments (NFs) (Figure 1.1). Les kinésines et les dynéines étant spécifiques des microtubules, elles sont les principaux moteurs à l'intérieur des branches du neurone. En revanche, dans les régions synaptiques telles que les terminaisons pré-synaptiques et les épines dendritiques post-synaptiques, les filaments d'actine forment la principale architecture du cytosquelette. Ici, ce sont les myosines qui gouvernent le transport.

Les moteurs de la famille des **kinésines**, nommés KIFs, comprennent de nombreuses sous-catégories de protéines qui sont apparues au cours de l'évolution des espèces (Vale, 2003) et qui dépendent principalement de leur structure et notamment de la position du domaine moteur au sein de la molécule (Hirokawa et al., 2010). Chez les mammifères tels que l'homme et la souris, il existe 45 gènes *KIF* codant pour différents types de kinésines, différenciés en 14 classes (Lawrence et al., 2004). Les multiples kinésines contribuent alors au transport antérograde de diverses vésicules et organites

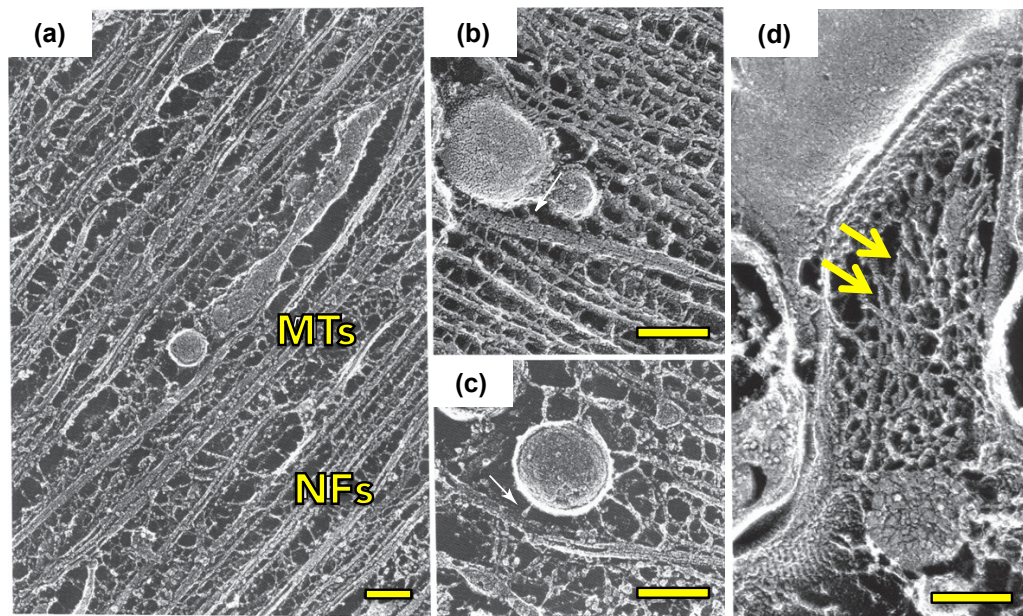


FIGURE 1.1 – Le cytosquelette neuronal révélé par une technique de microscopie nommée *Quick-freeze deep-etch electron microscopy*⁴(QFDE). (a) Vue à faible grossissement de faisceaux de microtubules (MTs) et de neurofilaments (NFs) alignés à l'intérieur d'un neurite. (b) et (c) Zoom sur des vésicules se déplaçant le long des MTs. On constate que la structure du cytosquelette se déforme légèrement pour permettre la circulation des divers organites. (d) Structure du cytosquelette à l'intérieur d'une épine postsynaptique. Le réseau de filaments d'actine est indiqué par les flèches jaunes. Barres d'échelle : 100 nm. Adaptée de (Hirokawa et al., 2010)

du neurone. (Brown et al., 2005) montrent par exemple que la kinésine 2 (KIF3A) est impliquée dans le mouvement des endosomes tardifs et des lysosomes, mais d'autres membres de la famille des kinésines peuvent également intervenir.

Les **dynéines** comprennent deux grands groupes, les dynéines cytoplasmiques et les dynéines axonémales. Ces dernières n'interviennent pas dans le transport actif de vésicules ; elles sont responsables des mouvements des cils et des flagelles de la cellule. En revanche, la dynéine cytoplasmique est utilisée pour le transport intraneuronal ; c'est cette catégorie qui nous intéresse particulièrement. Elle est constituée d'un imposant complexe protéique contenant de multiples sous-unités polypeptidiques : deux chaînes lourdes (≈ 520 kDa), deux chaînes intermédiaires (≈ 74 kDa), quatre chaînes légères intermédiaires ($\approx 33-59$ kDa) et plusieurs chaînes légères ($\approx 10-14$ kDa) (Pfister et al., 2006). En outre, la dynéine cytoplasmique est associée à un autre complexe protéique

appelé dynactine ayant pour rôle essentiel de réguler l'activité de la dynéine ainsi que sa capacité de liaison avec les différents cargos (Schroer, 2004). Par rapport à la diversité des protéines de la famille des kinésines, les dynéines cytoplasmiques ne comptent que deux sous-catégories : les dynéines constituées de la chaîne lourde 1 nommées DYNC1H1 et celles associées à la chaîne lourde 2, DYNC2H1 (Pfister et al., 2006). La figure 1.2 illustre la structure de trois kinésines de types différents (KIF5, KIF1A et KIF3) ainsi que du complexe dynéine/dynactine.

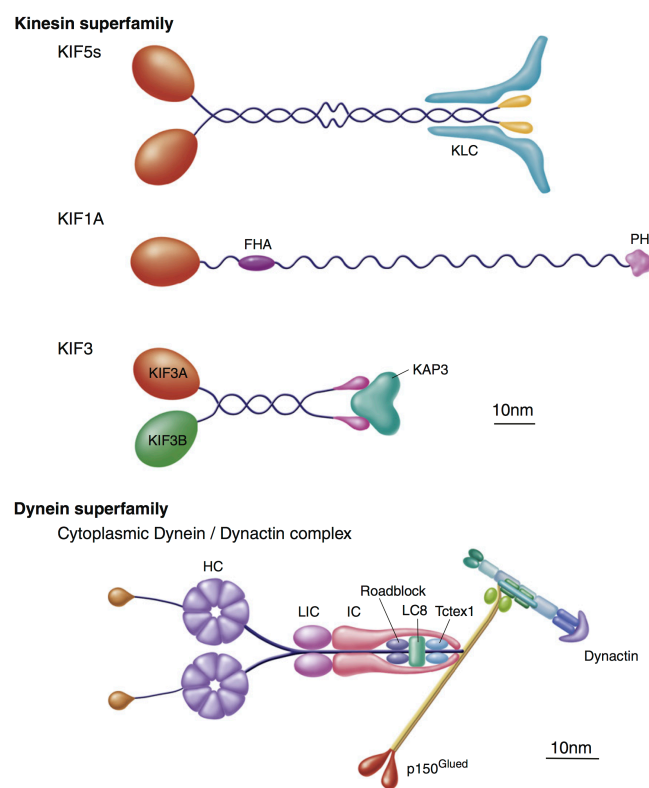


FIGURE 1.2 – Structures de différents moteurs moléculaires se mouvant sur les microtubules. En haut : protéines de la famille des kinésines. La kinésine 1 est un dimère composé de deux KIF5 et de deux chaînes légères (*Kinesin light chain*, KLC). KIF1A est un monomère. KIF3A, KIF3B et KAP3 forment un tétramère. En bas : dynéine cytoplasmique. Les dynéines cytoplasmiques sont constituées de chaînes lourdes (HC), de chaînes intermédiaires légères (LIC), de chaînes intermédiaires (IC) et de chaînes légères (LC8). Pour transporter des cargos le long des microtubules, la dynéine cytoplasmique se lie au complexe de dynactine. Adaptée de (Hirokawa et al., 2010).

Dans les prolongements du neurone, le transport se fait de manière bidirectionnelle, du corps cellulaire vers la périphérie (transport **antérograde**) et de la périphérie vers

le corps cellulaire (transport **rétrograde**). Ces directions dépendent de la polarité des MTs. Ces derniers sont formés de dimères de tubulines constitués chacun de deux sous-unités, la tubuline α et la tubuline β , liées par des liaisons non covalentes. Les MTs sont des polymères extrêmement dynamiques dont les deux extrémités peuvent se polymériser et se dépolymériser en permanence. Dans les axones, les MTs sont uniformément polarisés : l'extrémité à croissance rapide, dite extrémité “+” pointe vers la périphérie tandis que l'extrémité de dépolymérisation rapide, dite extrémité “-” pointe vers le corps cellulaire. Les kinésines se dirigeant exclusivement vers le côté “+” des MTs, elles sont donc responsables des mouvements antérogrades à l'intérieur de l'axone. À l'inverse, les dynéines se déplacent vers le côté “-” et sont à l'origine du transport axonal rétrograde (Figure 1.3). Dans les dendrites, l'organisation est bien plus complexe car les MTs ont une polarité mixte (Baas et al., 1988). Associer le sens du mouvement à un moteur spécifique n'est donc pas possible sans connaissance précise de la polarité du MT observé.

La régulation et la stabilisation du réseau de MTs dans les neurites permettent de maintenir la polarité du cytosquelette, ce qui est essentiel au bon fonctionnement neuronal. Ces fonctions sont entre autres assurées par les **protéines associées aux microtubules** (*microtubule-associated proteins*, **MAPs**) qui sont une famille diversifiée de protéines, souvent phosphorylables, qui parsèment les MTs et régulent leur polymérisation en favorisant leur stabilisation ou leur déstabilisation. Parmi elles, on peut par exemple citer la **protéine TAU** qui est une MAP présente en grande quantité dans les neurones et dont la fonction dépend de son état de phosphorylation (Johnson and Stoothoff, 2004).

Nous verrons dans la section suivante que TAU (notée aussi MAPT) a un rôle extrêmement important dans la cellule car une légère perturbation de son état chimique ou de sa concentration peut engendrer des dysfonctionnements associés à des maladies

4. La microscopie *Quick-freeze deep-etch* est une technique, initialement développée par Hans Moor (Moor et al., 1961) et perfectionnée par John Heuser (Heuser and Salpeter, 1979), qui permet l'imagerie de tissus extrêmement bien préservés à une haute résolution de l'ordre de 2 nm.

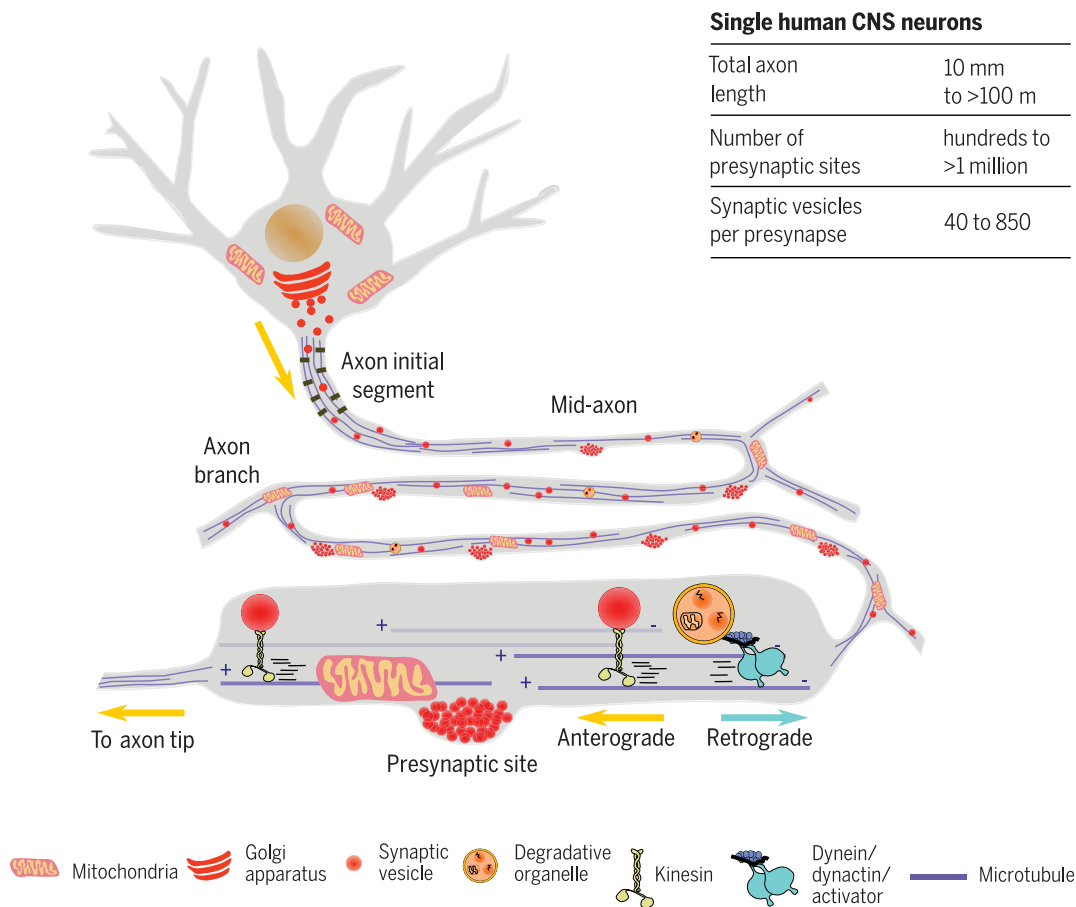


FIGURE 1.3 – Organisation du transport axonal. Zoom sur une partie de l'axone où l'on constate que les microtubules ont une polarité uniforme avec leur extrémité "+" orientée vers la région distale. Deux kinésines transportant leur vésicule dans le sens antérograde sont représentées. Le complexe dynéine/dynactine transportant un organelle est également schématisé. Figure extraite de (Guedes-Dias and Holzbaur, 2019).

neurodégénératives (Noble et al., 2013). Par ailleurs, dans son état natif TAU modifie le transport en empêchant l'accrochage des moteurs aux microtubules, tandis qu'une fois phosphorylé par des kinases, TAU se détache des MT facilitant la progression des moteurs (figure 1.4).

L'observation du transport intraneuronal montre que les déplacements de tous les organites sont ponctués de **changements de direction**, d'arrêts et de redémarrages multiples et fréquents. La littérature s'accorde sur le fait qu'il existe plusieurs mécanismes de régulation du transport bidirectionnel faisant intervenir les moteurs kinésines et dynéines dans différents états (actif/inactif; attaché/détaché des MT). En effet,

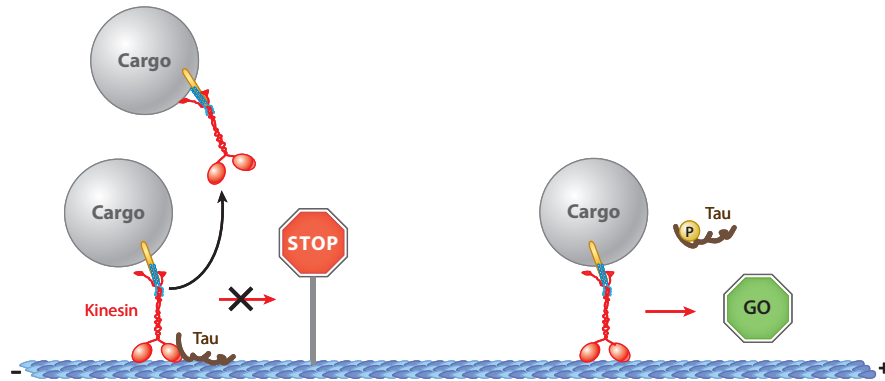


FIGURE 1.4 – Interaction entre la protéine TAU et les moteurs kinésines. La présence de TAU non phosphorylée sur le MT inhibe le transport de la kinésine. En revanche, la phosphorylation de TAU engendre la libération du MT et facilite le déplacement de la kinésine. Adaptée de (Encalada and Goldstein, 2014).

toutes les expériences montrent que la suppression ou l’inhibition d’une seule famille de moteurs affectent les déplacements dans les deux directions, soulignant un fort degré d’interdépendance (Hancock, 2014), sur lequel nous reviendrons dans le chapitre 4. La figure 1.5 représente trois scénarios possibles (Encalada and Goldstein, 2014) :

- **le modèle de coordination des moteurs** qui suppose que la kinésine et la dynéine sont attachées simultanément au même cargo et que la direction du déplacement est déterminée par des régulateurs qui activent un groupe de moteurs du même type (dynéine ou kinésine) et désactivent les autres (figure 1.5(a)).
- **le modèle de “tir à la corde”** (ou “*tug-of-war*” en anglais) correspondant à la situation où des moteurs dynéines et kinésines sont actifs simultanément et tirent le cargo dans des sens opposés (Soppina et al., 2009)(figure 1.5(b)).
- **le modèle d’association/dissociation des moteurs** correspondant la situation où un unique type de moteur est attaché à la vésicule et détermine alors le sens du transport (figure 1.5(c)).

Dans cette section nous venons de décrire très brièvement les différents acteurs intervenant dans le transport intraneuronal. Nous allons maintenant présenter des situations pathologiques dans lesquelles ce transport est dérégulé, puis évoquer, dans des cas simples, des mécanismes moléculaires sous-jacents probables, suggérés par les fac-

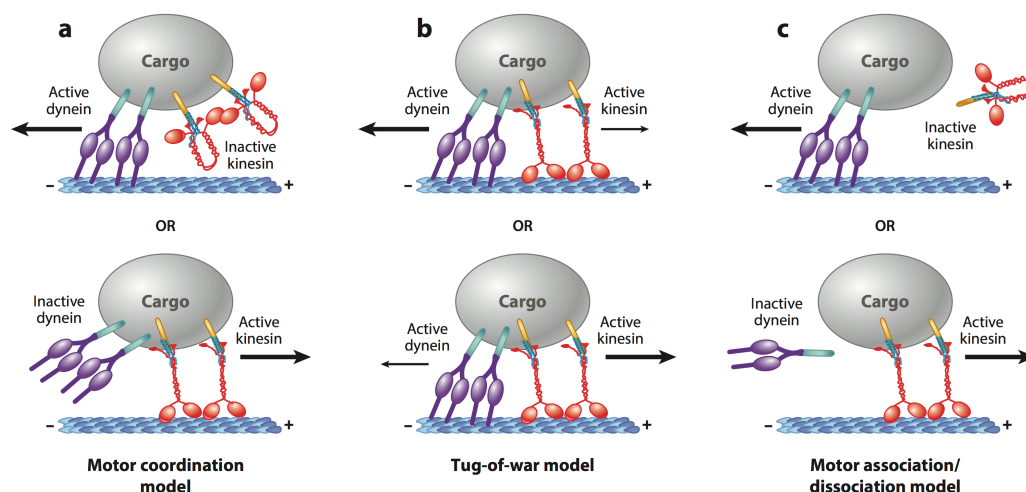


FIGURE 1.5 – Trois mécanismes possibles de régulation du transport bidirectionnel. (a) Coordination : les kinésines et dynéines sont liées à la même vésicule mais seul un type est actif. (b) Modèle de “tir à la corde” montrant la liaison et l’engagement simultanés de moteurs kinésines et dynéines tirant le cargo dans des directions opposées. L’équipe de moteurs générant des forces plus élevées impose la direction du mouvement. (c) Modèle d’association/dissociation : un seul type de moteur est lié à la vésicule. Dans les panneaux (a) et (c) la kinésine inactive est dessinée dans une conformation hypothétique pliée. Adaptée de (Encalada and Goldstein, 2014).

teurs de risques trouvés chez les patients par analyse génomique. Ainsi, nous poserons les bases d’une démarche de diagnostique, dans laquelle la mesure du transport intraneuronal pourrait servir à cribler, dans des modèles, l’impact fonctionnel des facteurs de risques génétiques détectés chez l’homme.

1.2.2 Anomalies du transport intraneuronal et facteurs de risques génétiques de maladies neurologiques

1.2.2.1 Anomalies du transport intraneuronal dans les pathologies neurologiques

De nombreux travaux de recherche ont montré que le transport intraneuronal et les axones étaient altérés dans plusieurs pathologies neurologiques dont de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d’Alzheimer (MA), la maladie de Huntington (MH), la maladie de Parkinson (MP) et la sclérose latérale amyotrophique

(SLA) (Millecamps and Julien, 2013). En particulier, des gonflements au niveau des axones engendrés par l'accumulation d'organites indiquent des défauts du transport dans la MA (Stokin et al., 2005). Ces observations suggèrent que l'altération du transport axonal contribue à l'initiation ou à la progression de ces maladies mais de nombreuses questions demeurent quant aux mécanismes mis en jeu (Goldstein, 2012).

Une façon d'aborder cette question est de considérer le transport intraneuronal comme interdépendant des autres mécanismes moléculaires essentiels à l'homéostasie neuronale. Il est alors intéressant de chercher des pistes moléculaires dans des analyses génomiques à grande échelle chez les patients. De nombreuses mutations ou **facteurs de risques** (voir Annexe 1 page 181 pour l'explication de ce concept) sont associées aux troubles neurologiques cités plus haut et sont régulièrement complétées par de nouvelles découvertes (Jansen et al., 2019). Ces mutations peuvent affecter différents acteurs du transport tels que les moteurs moléculaires, les MAPs, les composants du cytosquelette, ou encore des protéines adaptatrices qui attachent les cargos aux moteurs moléculaires (Millecamps and Julien, 2013). La figure 1.6 en liste certaines de manière non exhaustive. Dans la très grande majorité des cas, aucune d'entre elles ne peut seule reproduire le tableau pathologique complet de la maladie.

- **Altérations des moteurs moléculaires**

Les analyses génomiques chez les patients, principalement atteints de maladies des motoneurones, ont fait ressortir de nombreuses mutations en lien avec les moteurs moléculaires. Ainsi, des mutations faux sens du gène *SPG10* codant pour le moteur kinésine 1 KIF5A ont été détectées dans la paraplégie spastique héréditaire (Reid et al., 2002). Des patients atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 présentent des mutations de perte de fonction dans le domaine moteur de la kinésine KIF1B (Zhao et al., 2001) ou dans le gène *DYNC1H1* qui code pour la dynéine cytoplasmique (Weedon et al., 2011). De plus, une mutation de la dynactine a été identifiée dans une famille où les membres présentaient une dégénérescence et une paralysie des motoneurones (Puls et al., 2003). Par

ailleurs, des niveaux réduits de sous-unités de protéines motrices (*kinesin light chain-1* et *-2*, et *dynein intermediate chain*) ont été observés par western blot dans le cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Morel et al., 2012), ce qui suggère que le fonctionnement anormal des moteurs contribue probablement à la pathologie. Afin de mieux comprendre le lien entre la présence de ces mutations et les symptômes, certaines ont été introduites dans des **modèles animaux**.

Ainsi, dans la drosophile (où l'ingénierie génétique est très bien maîtrisée) il a été montré que des mutations introduites pour affecter les chaînes légères et lourdes de la kinésine (Hurd and Saxton, 1996), la chaîne lourde de la dynéine, ou encore la dynactine, entraînent une paralysie motrice qui peut être expliquée au niveau moléculaire par une accumulation des organites consécutive à l'arrêt du fonctionnement des moteurs. De plus l'interdépendance entre moteurs antérograde et rétrograde a également été établie : une mutation sur un type de moteur affecte le transport du moteur de sens opposé (Martin et al., 1999). Chez la souris, l'introduction de mutations de *Dync1h1* codant pour la chaîne lourde de la dynéine engendre une dégénérescence progressive des motoneurones et l'accumulation de corps de Lewy. De même, des souris transgéniques portant une mutation de perte de fonction de l'isoforme β de Kif1b présentent une faiblesse musculaire progressive telle qu'observée dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (Zhao et al., 2001). Ainsi, les troubles associés à ces mutations récapitulent bien les principales caractéristiques de pathologies humaines des motoneurones (Hafezparast, 2003).

- **Altérations des protéines associées aux microtubules**

Les mutations de protéines non motrices telles que les MAPs sont également impliquées dans la neurodégénérescence. C'est par exemple le cas de la protéine TAU plus abondante dans sa forme hyper-phosphorylée dans de nombreuses maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer ainsi que dans d'autres

troubles tels que les démences fronto-temporales (Iqbal et al., 2015). L’hyperphosphorylation favorise l’agrégation de TAU en fibrilles dont la grande concentration est un indicateur caractéristique de ces pathologies, également appelées “tauopathies” (Goedert, 2018).

- **Altérations d’autres protéines impliquées dans le transport (adaptateurs, protéines de liaison...)**

Des mutations des gènes codant pour des protéines de liaison associées à la kinésine et à la dynéine ont également été découvertes dans certaines pathologies neurodéveloppementales.

Ainsi des mutations du gène *KIAA1279* codant pour une protéine se liant à KIF1 ont été retrouvées chez des malades atteints du syndrome de Goldberg-Shprintzen (Dafsari et al., 2015), un trouble neurologique caractérisé par de nombreuses anomalies dont une craniosynostose (anomalie des soudures crâniennes) et un retard mental. De même des mutations créant l’happloinsuffisance de *LIS1* codant pour une protéine qui se lie à la dynéine ont été identifiées dans des lissencéphalies (anomalies de la structuration cérébrale, le cortex présentant notamment un aspect lisse). En reproduisant l’happloinsuffisance dans des souris il a été possible d’étudier son impact sur le transport axonal qui s’est révélé très affecté (Hines et al., 2018). On peut également citer des mutations du gène *DCTN1* codant pour la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine (Figure 1.2) qui sont présentes chez des malades du syndrome de Perry (une forme agressive de la maladie de Parkinson) et de neuronopathies motrices héréditaires distales (Farrer et al., 2009). La reproduction de ces mutations en culture a permis de montrer qu’elles affectent l’initiation du transport rétrograde (Moughamian and Holzbaur, 2012). Par ailleurs, des mutations engendrant une surexpression du gène *MARK1* codant pour une kinase des MAP ont été retrouvés chez des patients atteints de troubles du spectre autistique (Maussion and Carayol, 2008). Dans culture de neurones de souris transgéniques reproduisant cette sur-expression,

Simon Haziza a montré dans sa thèse qui a précédé la mienne que la longueur entre deux pauses consécutives étaient accrue, ce qui est en accord avec une diminution des obstacles MAP sur les microtubules, en raison de l'augmentation de phosphorylation (Haziza et al., 2017).

Il existe donc une multitude de mutations affectant les différents acteurs du transport intraneuronal et associées très clairement à des maladies neurologiques. Cependant, on ne sait toujours pas pourquoi les mutations de gènes nécessaires au transport axonal entraînent une si grande variété de maladies, affectant des stades de développement très différents. Par exemple, les mutations au sein du gène *DYNC1H1* codant pour la chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique peuvent induire soit une déficience intellectuelle, soit une faiblesse des membres supérieurs, ou bien les deux (King, 2011). Améliorer nos connaissances sur le rôle des différents acteurs du transport dans le fonctionnement cellulaire globale ainsi que dans le développement est donc crucial si l'on souhaite comprendre davantage les conséquences des mutations dans les mécanismes du transport axonal.

Dans le cadre des travaux que nous avons réalisés, nous nous sommes principalement intéressés aux **mutations affectant les moteurs moléculaires** et aux conséquences directes sur le transport axonal mesuré *in vivo* dans le **cerveau de la larve de zebrafish** (voir chapitre 4).

1.3 État de l'art des méthodes de mesure du transport intraneuronal

Dans la section précédente nous avons montré que de nombreuses molécules du transport intraneuronal étaient impliquées dans des maladies neurologiques. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans ces situations pathologiques, il est nécessaire de développer des outils permettant la mesure précise de ce transport. Dans cette partie, nous présentons un état de l'art des principales mé-

thodes utilisées afin de quantifier les mouvements actifs dirigés des vésicules à l'intérieur de la cellule.

Au cours des dernières décennies, les systèmes biologiques dans lesquels le transport intracellulaire a été mesuré ont été de plus en plus complexes. Les premières études visant à élucider les mécanismes moléculaires du transport se sont intéressées à la dynamique des moteurs moléculaires. Le premier défi fut alors de réussir à détecter un objet de taille nanométrique en mouvement. En 1983, M. SHEETS et J. SPUDICH proposent d'attacher au moteur une bille microscopique de taille allant de 100 nm à 1 μm (Spudich et al., 1985). Suffisamment grande pour être vue au microscope optique par diffusion de la lumière incidente, la bille indique, à chaque instant, la position du moteur. Cette idée simple a révolutionné notre connaissance des moteurs moléculaires et a permis d'observer leur déplacement et de mesurer des paramètres caractéristiques tels que la vitesse, la distance entre deux pauses ou encore la durée de ces pauses. Par la suite, cette nouvelle approche expérimentale a été couplée à de puissants outils de micromanipulation et de mesure de forces à l'échelle du piconewton tels que les pinces optiques. Cette méthode repose sur le fait qu'un faisceau laser très focalisé a la capacité de piéger des microbilles diélectriques au niveau de son foyer par la force électromagnétique s'exerçant sur le dipôle induit dans la bille. Ainsi, en 1990, S. BLOCK piège pour la première fois une bille attachée à un moteur (Block et al., 1990). Comme le montre la figure 1.7, cette méthode a par exemple permis de mettre en évidence le fait que le moteur myosine se déplace par pas de 72 nm sur les filaments du cytosquelette d'actine.

Ces premiers travaux ont été réalisés sur des systèmes minimaux, reconstitués *in vitro*. L'enjeu suivant a été d'étendre tout d'abord ces études de mesure du transport dans des cellules en culture. Pour cela, diverses stratégies ont été développées. En effet, **le moteur moléculaire** (l'acteur principal, à l'origine du déplacement) peut être directement suivi grâce au couplage à un nanocristal fluorescent (Courty et al., 2006; Nelson et al., 2009), ou via l'expression d'une protéine fluorescente associée (Cai et al.,

2007), ou bien de manière indirecte **en suivant le cargo** transporté par les moteurs. Dans ce cas deux stratégies de marquage ont été utilisées. Dans la première les cargos sont rendus fluorescents à l'aide d'un colorant qui n'est présent que dans la population d'intérêt (c'est le cas par exemple du lysotracker[®] qui marque spécifiquement les lysosomes en raison de leur acidité) ou par une construction génétique qui associe une protéine fluorescente à une protéine du cargo, comme dans le cas des mitochondries, ou des péroxisomes. Dans la deuxième stratégie des nanoparticules optiquement actives (fluorescentes ou à réponse non linéaire) sont internalisées dans les compartiments que l'on souhaite suivre tels que les endosomes. C'est l'approche que nous suivons. Dans la première stratégie, les avancés en génie génétique en sont au stade de l'*in vivo* (Misgeld et al., 2007; Mandal et al., 2018) comme nous allons le développer plus loin, tandis que dans la deuxième, ce type d'étude a été initié par S. CHU et B. CUI à l'Université de Stanford en 2007 à l'aide QDots, dans des cultures de neurone orientées en circuit microfluidique (Cui et al., 2007) mais n'a encore jamais été étendu à l'*in vivo*, ce qui est l'un des objectifs de cette thèse.

Les fluorophores et protéines fluorescentes ont l'avantage d'être assez facilement manipulables ; néanmoins le phénomène de photoblanchiment est limitant car il impose une excitation à faible puissance engendrant alors des cadences d'acquisition relativement faibles. De plus les protéines fluorescentes requièrent une surexpression qui peut fausser le phénomène étudié. À l'inverse, la manipulation de nanoparticules peut être plus complexe car de nombreuses contraintes de taille, de chimie de surface ou encore de toxicité doivent être prises en compte. En revanche, ces marqueurs sont souvent choisis pour leur grande efficacité quantique ou bien pour les nanocristaux non-linéaires pour la possibilité d'ajuster l'intensité du signal sans jamais saturer et d'accéder ainsi à des résolutions temporelles et spatiales supérieures.

1.3.1 Suivi de moteurs moléculaires individuels à l'intérieur de cellules

Le suivi de molécules individuelles à l'intérieur de cellules intactes est techniquement difficile notamment en raison de l'autofluorescence relativement importante et de la nécessité d'introduire des traceurs à l'intérieur des cellules. Il a en effet fallu identifier des traceurs non toxiques et suffisamment petits pour ne pas perturber le système étudié. Par ailleurs, comme nous le verrons dans le chapitre 3, pour enregistrer le signal optique puis mesurer les positions d'un émetteur avec une bonne précision de localisation, il est essentiel que ce signal soit suffisamment stable, intense et détecté efficacement. Les techniques mises en œuvre relèvent de la microscopie d'émetteurs uniques, qui s'appuie sur un éclairage par onde évanescente en réflexion totale interne, grâce à l'utilisation d'un objectif de microscope de grande ouverture numérique, et sur l'utilisation d'un capteur CCD matriciel à gain de multiplication d'électrons (EMCCD) très sensible. Ces techniques permettent de réaliser une vidéomicroscopie à une cadence de plusieurs dizaines de champs par seconde avec une résolution spatiale d'une dizaine de nanomètres. Enfin, le traceur doit pouvoir être introduit dans le cytoplasme sans compromettre la survie de la cellule.

À titre d'exemple citons (Courty et al., 2006) qui sont les premiers à avoir réussi à réaliser une telle expérience en introduisant des kinésines purifiées de drosophiles couplées à des nanocristaux semiconducteurs (*quantum dots*, QDs) dans des cellules de lignée cancéreuse (HeLa), par le biais d'un choc osmotique. Ils ont pu ensuite enregistrer les mouvements de moteurs kinésines individuels en suivant le signal des QDs. Sur la figure 1.8 on peut voir différents types de déplacements dont des trajectoires droites, qui indiquent que la kinésine exogène a pu se lier aux microtubules et se déplacer de façon dirigée comme les kinésines endogènes.

Il est important de noter que ce type d'expériences ne peut pas être facilement généralisé, notamment aux neurones, pour deux raisons. La première est que les neurones

ne supportent pas les chocs osmotiques aussi bien que les lignées de cellules, si bien que la voie d'internalisation utilisée ici ne fonctionnera pas. La deuxième est que la purification du moteur puis sa complexation avec un nanotraceur sans compromettre ses fonctions motrices peut s'avérer très délicate. Ces complexités expérimentales sont à l'origine de l'émergence d'autres approches de mesure du transport reposant sur le suivi du cargo et non du moteur.

1.3.2 Mesure du transport intraneuronal par suivi de vésicules ou d'organites cellulaires *in vivo*

Dans cette section, nous nous sommes limités aux études appliquées à la mesure du **transport intraneuronal**. Par ailleurs, nous nous concentrons exclusivement sur des travaux effectués dans le cerveau d'**organismes *in vivo***. Dans le chapitre 2, nous discuterons plus en détails du défi que représente l'imagerie du transport en profondeur dans des tissus neuronaux dont la structure est bien plus complexe que celle de neurones en culture. En particulier, nous verrons que l'imagerie en champ large n'est plus adaptée et qu'il est recommandé d'utiliser des systèmes faisant intervenir un sectionnement optique nécessaire à l'obtention d'images ayant un rapport signal sur bruit élevé, ce dernier élément étant critique dans le suivi d'émetteur unique. La microscopie confocale à balayage ou bien la microscopie par excitation à deux photons sont les méthodes typiquement utilisées dans ces situations. Néanmoins, elles nécessitent de balayer le faisceau excitateur, ce qui diminue la cadence d'acquisition.

Comme nous le verrons dans le chapitre 4, le poisson-zèbre (ou *zebrafish*, **Zf** en anglais) constitue un très bon système pour identifier et caractériser les mécanismes qui régulent le transport axonal *in vivo* en particulier celui des mitochondries en situation normale et dans des modèles de pathologies. Différents protocoles ont été mis au point pour cibler par ingénierie génétique l'étude du transport dans une population

de neurones, jusqu'à présent uniquement les neurones sensori-moteurs (Paquet et al., 2014; Drerup and Nechiporuk, 2016; Mandal et al., 2018), et limité à un plan. Ce type d'approche a permis de montrer dans des neurones sensitifs de la peau de la larve de Zf que la motilité des mitochondries n'est pas un paramètre suffisant pour quantifier la dégénérescence axonale (O'Donnell et al., 2013). Dans toutes ces expériences, des champs d'une taille d'environ $100\ \mu\text{m}$ sont imagés par microscopie confocale à une cadence d'acquisition de 1 à 5 images par seconde, trop lente pour détecter de courtes pauses dans les déplacements. Nous pourrions imaginer compenser cette perte de cadence par une augmentation de la puissance optique excitatrice mais cette alternative fait intervenir une autre limitation : le photoblanchiment de la fluorescence des protéines fluorescentes marquant les mitochondries. Ainsi, un compromis est à trouver entre l'optimisation de la cadence et l'obtention d'un rapport signal sur bruit suffisant.

Très récemment, (Wehnekamp et al., 2019) ont développé une nouvelle stratégie pour augmenter très significativement cette cadence, jusqu'à 100 ms entre deux points de mesure, en suivant le déplacement tridimensionnel de mitochondries individuelles dans les axones de neurones sensoriels de Rohon-Beard, dont les prolongements se font dans la queue de larves de Zf (Wehnekamp et al., 2019). Cette prouesse technologique a été réalisée en implémentant le suivi orbital⁵. Leur approche diffère des études précédentes par le fait qu'une seule mitochondrie est suivie à la fois, ce qui permet la cadence d'acquisition élevée (jusqu'à 100 Hz). Cette dernière a permis aux auteurs de décomposer les phases de mouvement en une phase rapide et une phase lente, d'une façon un peu artificielle, mais d'intérêt tout de même. Cependant, la méthode présente deux limitations : son faible débit (une trajectoire à la fois) et le fait de n'avoir adressé que des neurones superficiels et donc facilement accessibles dans la larve. Il reste donc pertinent de proposer une technologie permettant un suivi à une plus grande profondeur. La figure 1.9 illustre la zone du Zf imagée ainsi que le résultat d'une reconstruction de

5. Il s'agit de localiser l'émetteur par rapport au spot d'excitation qui est balayé rapidement selon une trajectoire circulaire à l'aide de scanners galvanométriques résonants.

trajectoire typique. Notez que les trajectoires observées ne comportent qu’une seule direction de déplacement et ne mélangent jamais des phases de mouvements rétrogrades et antérogrades. Nos observations dans les axones de neurones du cerveau de larves de Zf (chapitre 4) sont très différentes.

Le modèle Zf n’est pas le plus pertinent pour l’étude de maladies complexes telles que les troubles neuropsychiatriques, pour lesquels la souris est plus adaptée comme nous l’avons montré à travers quelques exemples cités dans la section ???. Dans ces exemples, les anomalies de transport sont la plupart du temps mises en évidence de façon indirecte par l’observation des conséquences qu’elles entraînent (accumulation d’organites, gonflement axonal...). Il existe peu d’études rapportant des mesures directes de transport intraneuronal dans des neurones de souris *in vivo* qui portent pratiquement toutes sur des motoneurones. Les travaux pionniers de (Misgeld et al., 2007) ont observé des modifications du transport de mitochondries dans des axones de motoneurones de nerfs explantés (encore reliés à la circulation sanguine) après qu’ils aient été sectionnés. Cette technologie a ensuite permis à T. MISGELD et ses collaborateurs de révéler des anomalies de transport axonal (de mitochondries et de péroxisomes couplés à une protéine fluorescente) dans les fibres de la moelle épinière d’un modèle l’encéphalomyélite auto-immune provoquée (pour mimer des symptômes de la sclérose en plaque) (Sorbara et al., 2014), par une mesure directe *in vivo*. Cette approche a été également utilisée par l’équipe de G. SCHIAVO dans des souris transgéniques exprimant le mutant SOD1^{G93A} de la superoxyde dismutase 1, retrouvé dans la sclérose amyotrophique latérale. Cette équipe a découvert que le transport axonal était défaillant avant l’apparition des troubles moteurs (Bilsland et al., 2010), montrant l’intérêt d’une telle mesure. La même équipe a aussi utilisé le même diagnostic pour identifier des composés thérapeutiques susceptibles de corriger les symptômes (Gibbs et al., 2018).

À notre connaissance une seule étude du **transport intraneuronal dans le cortex** d’une souris vivante a été rapportée très récemment (Knabbe et al., 2018), au moment même où nous réalisons des essais malheureusement infructueux s’appuyant

sur la même préparation de l'animal (implant d'une fenêtre optique chronique), en collaboration avec Brice BATHELLIER (cf. section 4.1). À la différence de notre stratégie qui consiste à injecter des nanoparticules optiquement actives en comptant sur leur internalisation spontanée, les auteurs ont fait exprimer une protéine fluorescente marquant les vésicules à centre dense (*dense core vesicles*, DCVs) dans les neurones du thalamus d'une souris (qui projettent dans le cortex). Le cerveau de souris étant optiquement très opaque, les techniques de microscopie non linéaire deviennent alors nécessaires pour effectuer une imagerie en profondeur. Des trajectoires de DCVs dans les axones thalamo-corticaux de souris anesthésiées ou vigiles ont ainsi été enregistrées par microscopie deux-photons, mais à une cadence de seulement 1 image par seconde (Figure 1.10) là où notre méthode décrite par la suite permet d'atteindre une cadence de 30 champs carrés de côté $100\ \mu\text{m}$ par seconde.

Les quelques études de mesures de transport intraneuronale dans des organismes présentées ci-dessus mettent en évidence les immenses progrès qui ont été réalisés ces dernières années jusqu'à l'utilisation de cette approche pour réaliser le criblage de principes actifs *in vivo*. En revanche, il est important de noter que **la détection d'anomalies subtiles du transport telles que notre équipe l'a réalisée en culture (Haziza et al., 2017) nécessite une cadence d'acquisition plus élevée** que celles utilisées dans la grande majorité des études citées qui font un compromis entre la spécificité du marquage fluorescent, le rapport signal sur bruit de l'émetteur (directement lié à la précision de localisation) et la résolution temporelle. Ce dernier paramètre est très souvent celui qui est sacrifié, notamment à cause du phénomène de photoblanchiment des fluorophores utilisés, à l'exception d'une seule étude dans laquelle les mitochondries sont suivies individuellement (Wehnekamp et al., 2019).

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont consisté à développer une méthode de mesure du transport intraneuronale dans le cerveau de la larve de Zf grâce au suivi du signal de génération de seconde harmonique de nanocristaux à réponse optique

non linéaire, par microscopie deux-photons. Comme nous le verrons dans le chapitre 2, l'utilisation de ces traceurs a le grand avantage de ne pas être sensible au photoblanchiment. Ainsi, l'unique élément limitant la puissance d'excitation utilisée est la tolérance de la larve à l'irradiation lumineuse à une longueur d'onde (1040 nm) où l'absorption des tissus est faible, et non la saturation de la fluorescence des particules. Cela nous a permis de repousser les limites de résolution temporelle et d'acquérir des données de transport axonal à une cadence de 20 images (taille $\approx 80 \mu\text{m}$) par seconde.

1.4 Bilan

Dans ce chapitre, nous avons commencé par décrire brièvement les principaux acteurs intervenant dans le transport intraneuronal dont les moteurs moléculaires, le cytosquelette et les protéines qui lui sont associées. Un transport fonctionnel est essentiel à l'homéostasie neuronale. Nous avons d'abord décrit plusieurs études montrant que la perturbation d'un acteur moléculaire de ce transport reproduisait dans des modèles animaux des troubles neurologiques, principalement neuromoteurs. Cette première partie a mis en évidence l'intérêt qu'il y a à développer des outils permettant la mesure directe et la quantification précise de ce transport *in vivo*. Dans la deuxième section, nous avons alors présenté l'état de l'art des mesures de ce transport *in vivo*, où les principaux modèles utilisés sont la larve de Zf et la souris. Une seule étude a mesuré le transport dans des neurones du cerveau (région d'intérêt pour les troubles neuropsychiatriques et neurodégénératifs), mais à une cadence très faible en raison de l'utilisation de protéines fluorescentes excitées à une faible puissance laser pour éviter leur photoblanchiment trop rapide. Dans le chapitre 4, nous verrons comment nous avons tiré avantage de nanoparticules non linéaires émettant un fort signal de seconde harmonique afin de mesurer le transport axonal dans des neurones du toit optique de la larve de Zf à une cadence élevée de 20 images par seconde.

Mutated gene in patients	Common protein name	Affected axonal transport-related process	Refs
Alzheimer's disease and other dementias			
APP	Amyloid precursor protein	Unknown effect but shown to undergo axonal transport	46
		Retrograde transport of NGF	41
PSEN1	Presenilin 1	Microtubule stabilization through GSK3 β activation	60
		Cargo binding to motor proteins	42
MAPT	Microtubule-associated protein tau	Microtubule stabilization	60,61
		Motor protein binding to microtubules	54
		Cargo binding to motor proteins	57
Parkinson's disease and Perry syndrome			
SNCA	α -synuclein	Unknown effect but shown to undergo axonal transport	158
PARK2	E3 ubiquitin-protein ligase parkin	Mitochondrial function	159
PINK1	Serine/threonine-protein kinase	Mitochondrial function	159
PARK7	Protein DJ-1	Mitochondrial function	159
DCTN1	Dynactin subunit 1	Dynein complex function	162
Huntington's disease			
HTT	Huntingtin	Microtubule acetylation	78
		Cargo binding to motor proteins	70,71
		Kinesin binding to microtubules	81
		Retrograde transport of BDNF (trophic support)	74
Upper motor neuron diseases*			
NIPA1 (SPG6)	Non-imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome region protein 1	Endosomal trafficking	87
KIF5A (SPG10)	Kinesin heavy chain isoform 5A	Kinesin function and anterograde transport	98
Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathy*			
NEFL (CMT2E)	Neurofilament light chain	Neurofilament transport	110,111
HSBP1 (CMT2F)	Heat shock factor protein β 1	Neurofilament transport	112,113
		Microtubule acetylation	114
DYNC1H1 (CMT2O)	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Proper dynein complex function	115
Lower motor neuron diseases			
DCTN1	Dynactin subunit 1	Proper dynein complex function	148
AR	Androgen receptor	Kinesin binding to microtubules	83
ALS*			
SOD1 (ALS1)	Superoxide dismutase 1	Neurofilament phosphorylation and binding to motor proteins	65,140
		Mitochondria binding to kinesin	141
ALS2	Alsin	Endosomal trafficking	153
VAPB (ALS8)	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	Endoplasmic reticulum to Golgi transfer	156,157

FIGURE 1.6 – Tableau non exhaustif de mutations trouvées chez des patients atteints de divers troubles neurologiques et affectant des protéines impliquées dans le transport axonal. Dans le cadre de nos travaux (présentés dans le chapitre 4), nous nous sommes intéressés aux conséquences sur le transport axonal d'une mutation au niveau du gène KIF5A (encadré en rouge). SLA : sclérose latérale amyotrophique ; BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; CMT2, maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 ; GSK3 β , glycogène synthase kinase 3 β ; NGF : facteur de croissance des nerfs ; PARK : protéine de la maladie de Parkinson ; PINK1 : kinase 1 putative induite par le gène PTEN ; SPG : paraplégie spastique ; TBC1D15 : membre 15 de la famille du domaine protéique TBC1 ; ZFYVE : domaine protéique FYVE du doigt de zinc. *Le sous-type de la maladie est précisé entre parenthèses après le nom du gène. Adaptée de (Millecamps and Julien, 2013).

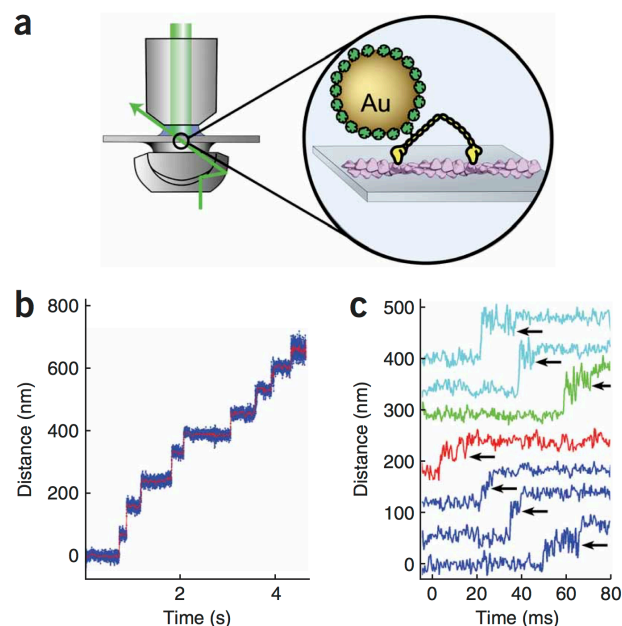


FIGURE 1.7 – Mouvement d’une bille d’or attachée à la tête d’une myosine. (a) Schéma de l’échantillon étudié : une myosine à laquelle est attachée une bille d’or. (b) Évolution de la position de la bille en fonction du temps. On constate que la myosine se déplace par pas de 72 nm. (c) Agrandissements de la courbe (b), qui mettent en évidence le détail des pas et montrent qu’ils s’effectuent en deux temps. Adaptée de (Dunn and Spudich, 2007).

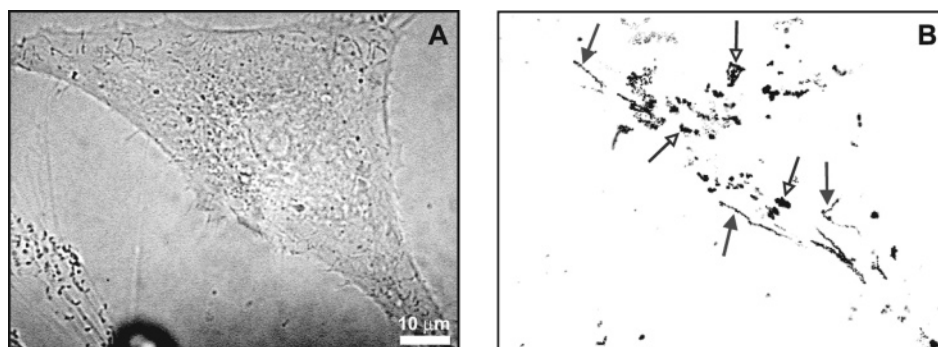


FIGURE 1.8 – Suivi de moteurs kinésines individuels fonctionnalisés avec des QDots introduits par pinocytose dans une cellule HeLa. (A) Image en champ clair d’une cellule HeLa cultivée sur une lamelle de verre. (B) Image de fluorescence obtenue par superposition des 600 images consécutives de la séquence dynamique acquise (résolution temporelle : 230 ms). Les trajectoires linéaires (indiquées par des flèches pleines) représentent des mouvements dirigés de moteurs individuels. Les trajectoires des QDots indiquées par des pointes de flèches vides correspondent à des mouvements de diffusion aléatoire. Adaptée de (Courty et al., 2006).

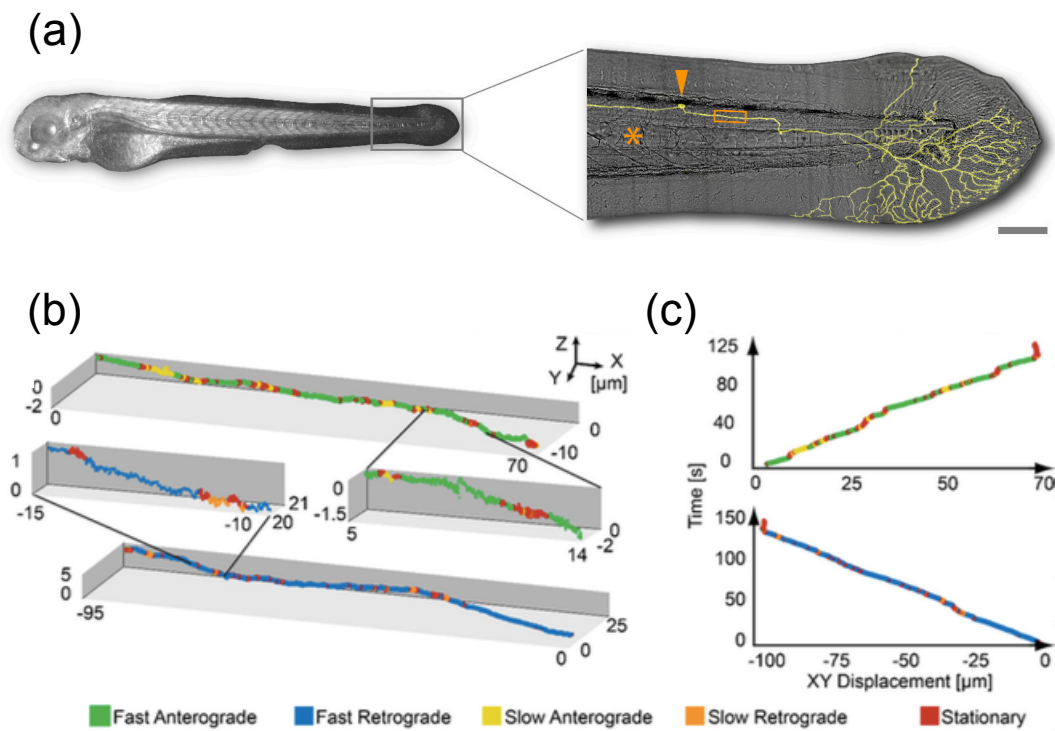


FIGURE 1.9 – Suivi du transport *in vivo* de mitochondries individuelles dans la larve de Zf. (a) Image du Zf obtenue par microscopie optique en transmission et zoom sur la queue avec un neurone sensoriel de Rohon-Beard typiquement marqué par une protéine fluorescente ciblant la membrane (en jaune). Barre d'échelle : 200 μm . (b) Représentation d'une trajectoire antérograde (en haut) et rétrograde (en bas). Le codage couleur indique les phases de mouvement rapide (vert - antérograde; bleu - rétrograde), de mouvement lent (jaune - antérograde; orange - rétrograde) et les phases stationnaires (rouge). (c) Kymographes des trajectoires présentées dans le panneau (b). Adaptée de (Wehnekamp et al., 2019).

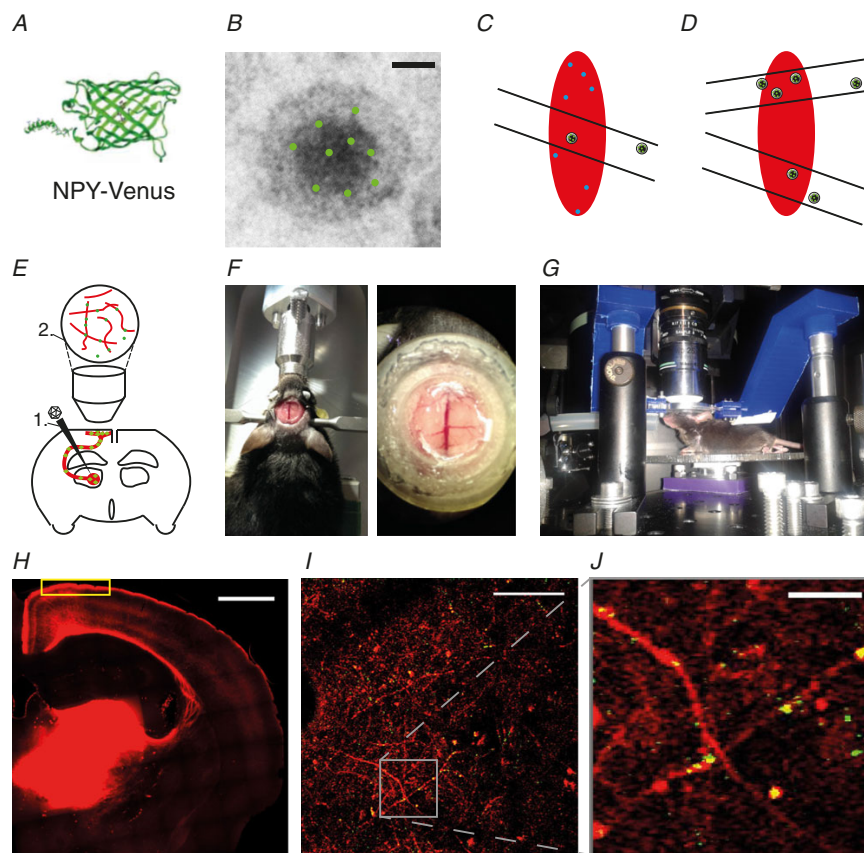


FIGURE 1.10 – Expérience de mesure du transport axonal dans le cerveau d’une souris, par microscopie à balayage deux-photons. (A) Schéma du fluorophore NPY-Venus utilisé pour marquer les vésicules à centre dense (DCVs). (B) Image TEM d’une DCV avec un nombre arbitraire de molécules NPY-Venus (en vert) schématisées à l’intérieur afin d’illustrer la stratégie de marquage. Barre d’échelle : 20 nm. (C) La forme ovale rouge représente le volume d’excitation deux-photons. Les lignes illustrent un axone positionné dans le volume focal. Les petits points bleus indiquent la fluorescence du fond. (D) Situation illustrant la présence de deux axones et de plusieurs DCVs dans un seul volume focal. (E) Injection du vecteur viral permettant l’expression des colorants NPY-Venus (vert) et de mCherry (rouge) dans la zone du thalamus médiodorsal droit. (F) Fenêtre chronique. (G) Préparation pour l’imagerie en éveil. La souris est fixée par la couronne, mais peut se déplacer sur un disque tournant librement. (H) Balayage en mosaïque du site d’injection thalamique et du signal émanant des projections axonales de la zone. Barre d’échelle : 1 mm. Le rectangle jaune représente la région d’intérêt imagée dans le cortex moteur primaire, 30-80 μm sous la surface de la fenêtre optique. (I) Exemple d’image *in vivo* obtenue par microscopie deux-photons, à 40 μm sous la fenêtre. Les axones sont marqués par l’expression de mCherry (rouge) et les DCVs par NPY-Venus (vert). Les DCVs présents dans les axones marqués apparaissent en jaune. Barre d’échelle : 5 μm . (J) Vue agrandie de la région encadrée dans (I). Barre d’échelle : 10 μm . Adaptée de (Knabbe et al., 2018).

Chapitre 2

Utilisation de nano-traceurs optiquement actifs pour mesurer le transport intraneuronal

Sommaire

2.1	Introduction	40
2.2	Comparaison des nano-traceurs optiquement actifs utilisés pour la mesure de phénomènes dynamiques	41
2.2.1	Introduction	41
2.2.2	Différents nano-traceurs inorganiques	43
2.2.3	Nano-cristaux à réponse optique non linéaire : des nano-traceurs IR alternatifs	52
2.3	Suivi de nanoparticules à réponse optique non linéaire, après leur internalisation dans des neurones en culture . .	60
2.3.1	Test de différents nano-cristaux à réponse optique non linéaire : KTiOPO_4 , BaTiO_3 et SiC	60
2.3.2	Choix du nano-traceur SHG le plus adapté : comparaison des propriétés physico-chimiques et optiques.	69
2.4	Conclusion	77

2.1 Introduction

La microscopie de fluorescence appliquée à la biologie nécessite des traceurs fluorescents capables de localiser et suivre des biomolécules dans un environnement cellulaire. Les traceurs organiques de synthèse (fluorophore) ou les protéines fluorescentes encodées génétiquement sont utilisés de manière courante depuis plusieurs dizaines d'années. C'est le cas par exemple de la GFP (*Green Fluorescent Protein*), découverte en 1962 (Shimomura et al., 1962) qui peut être directement exprimée par l'organisme étudié, après l'introduction (ou "transfection") de la séquence d'ADN encodant la GFP (Chalfie et al., 1994). Ces traceurs ont cependant l'inconvénient de se dégrader au bout de quelques minutes d'illumination typiquement : c'est le phénomène de photo-blanchiment. Ce dernier est un facteur très limitant pour l'imagerie de phénomènes dynamiques se produisant sur des durées plus longues, tels que le transport intracellulaire. Pour lever cette limitation, de nombreux traceurs inorganiques ont été développés durant les 20 dernières années, qui ont permis d'améliorer les techniques d'imagerie biologique. Les plus connus sont les boîtes quantiques, ou *quantum dots* (*QDs*), qui sont des nanocristaux semiconducteurs possédant une très bonne efficacité quantique et une section efficace d'absorption d'un à deux ordres de grandeur supérieure à celle des meilleures fluorophores. De plus les QDs présentent peu de photo-blanchiment. En revanche, ils ont l'inconvénient d'avoir une émission intermittente (clignotement) (Nirmal et al., 1996; Pinaud et al., 2010) et d'être pour la plupart constitués d'éléments toxiques (notamment le cadmium (Gomes et al., 2011)) ce qui n'est pas propice à des études sur le long terme dans des cellules et organismes vivants (Hoshino et al., 2011), même si cette toxicité peut être limitée grâce à une fonctionnalisation adéquate (Oh et al., 2016). Dans ce chapitre nous présenterons dans un premier temps différents traceurs pouvant être utilisés pour l'étude de phénomènes biologiques dynamiques. Parmi tous les nano-traceurs usuellement utilisés, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la place des cristaux à réponse optique non linéaire (cf section 2.2).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'objectif de nos travaux de recherche est de développer une approche permettant d'explorer le transport intraneuronal dans des tissus épais, dans un environnement *in vivo* représentant mieux la complexité de l'organisation cellulaire dans le cerveau. Pour cela nous utilisons la microscopie d'excitation à deux photons, qui reste actuellement l'une des techniques les plus adaptées à l'étude de tissus épais. Nous décrirons dans la deuxième partie de ce chapitre comment nous avons tiré avantage de l'utilisation de nanocristaux très efficaces dans l'émission de seconde harmonique (*Second Harmonic Generation*, SHG) afin de mesurer les paramètres de transport des vésicules présentes dans des circuits neuronaux épais et intacts. Trois matériaux non-linéaires ont été étudiés au cours de cette thèse, dont nous comparerons et évaluerons les propriétés optiques : le titanyl phosphate de potassium KTiOPO_4 (KTP), le titanate de baryum BaTiO_3 (BTO) et le carbure de silicium (SiC) (cf section 2.3).

2.2 Comparaison des nano-traceurs optiquement actifs utilisés pour la mesure de phénomènes dynamiques

2.2.1 Introduction

L'étude de phénomènes biologiques dynamiques tels que le transport intraneuronal nécessite l'utilisation de traceurs réunissant un certain nombre de propriétés :

- **Un signal optique intense et stable** : le rapport signal sur bruit doit être suffisamment élevé afin d'obtenir une bonne précision de localisation de l'émetteur et donc une méthode de suivi sensible et précise (voir section 3.2.2 du chapitre 3). Par ailleurs, le suivi de phénomènes "longs", d'une durée d'au moins quelques minutes, nécessite des nano-traceurs optiquement stables, c'est-à-dire ne se dégradant pas pendant l'expérience. A l'inverse des fluorophores orga-

niques, les nanoparticules inorganiques ont l'avantage de ne pas photo-blanchir et sont donc appropriées à ce type d'application.

- **La biocompatibilité** : l'utilisation du nano-traceur ne doit bien sûr pas perturber l'échantillon biologique étudié.
- **Une petite taille et une chimie de surface bien définie** : plusieurs études se sont intéressées à l'influence du diamètre des nanoparticules sur l'efficacité d'internalisation. L'efficacité d'internalisation diminue au fur et à mesure que la taille des particules augmente. Des modèles mécaniques indiquent que la taille optimale pour l'internalisation rapide par endocytose est de 30 nm (Zhang et al., 2015), mais l'endocytose reste cependant possible, mais lente, jusqu'à de "grandes" tailles (diamètre maximal ≈ 500 nm pour tous les mécanismes d'endocytose, et 200 nm seulement pour celui médié par la clathrine) (Rejman et al., 2004). Tout comme le choix de la taille de la nanoparticule, la chimie de surface influence l'efficacité d'internalisation (Akinc and Battaglia, 2013) ainsi que l'induction de toxicité (Oh et al., 2016). Il est important de noter que trouver les paramètres de forme, de taille et de chimie de surface optimaux de la nanoparticule n'est pas un problème simple. Cela est en particulier dû au fait qu'ils dépendent énormément de l'application visée. Ainsi, en fonction du type cellulaire étudié (neurones ou autres types de cellules), de l'environnement biologique (étude *in vitro* ou *in vivo*) ainsi que du matériau constituant le nanocrystal, les paramètres "optimaux" de la nanoparticule sont susceptibles de ne pas être les mêmes.

Dans cette section 2.2, nous discutons des propriétés physico-chimiques de quelques nano-traceurs communément utilisés, ainsi que quelques unes de leurs applications biomédicales.

2.2.2 Différents nano-traceurs inorganiques

2.2.2.1 Quantum dots (QDs)

Les *quantum dots* sont des nanocristaux semi-conducteurs luminescents dont les propriétés optiques dépendent de la taille. Comme le montre en effet la figure 2.1, la couleur de leur émission est intimement liée à leur dimension : plus leur taille augmente, plus la longueur d'onde d'émission se décale vers le rouge. A partir de 1993, le contrôle de la taille des QDs a permis la production d'émetteurs fluorescents à des longueurs d'onde maîtrisées et ajustables suivant les paramètres de fabrication. Par ailleurs, les QDs sont plus robustes chimiquement que les molécules organiques, rendant leur photo-blanchiment plus difficile notamment grâce une structure cœur-coquille incluant une couche de passivation (Talapin et al., 2004). Du point de vue de l'émission de lumière, le facteur le plus limitant de ces fluorophores est leur clignotement. De manière aléatoire, le nombre de photons émis par unité de temps peut chuter brutalement, puis revenir à son niveau initial (Nirmal et al., 1996). Cela est lié à la recombinaison Auger des excitons (états excités du QD) qui conduit à porter un électron dans un état de plus haute énergie où il reste piégé longtemps avant de revenir dans l'état fondamental (Efros and Rosen, 1997). Cet effet peut être réduit en augmentant l'épaisseur de la coquille dans une structure QD cœur-coquille (Mahler et al., 2008). Les QDs sont maintenant utilisés largement dans plusieurs domaines tels que la science des matériaux, le photovoltaïque ou encore la nano-médecine. En particulier, leur capacité de résistance au photo-blanchiment en fait des sondes fluorescentes très intéressantes pour certaines applications biologiques.

Pour ces dernières, de nombreuses équipes ont travaillé à la fonctionnalisation de ces émetteurs. Différentes biomolécules ont ainsi été greffées de façon covalente à la surface des QDs selon la question posée. On trouve plusieurs exemples en neurosciences. Ainsi, pour mesurer le transport des protéines NGF (*nerve growth factor*) qui sont impliquées dans la croissance, la prolifération et la survie des neurones, Cui *et al.* ont fonctionnalisé

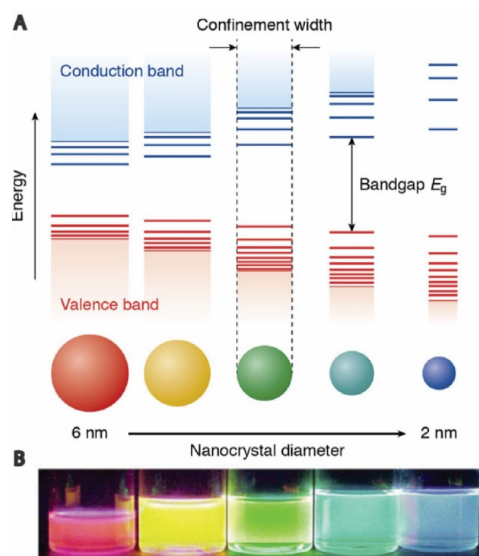


FIGURE 2.1 – Evolution de la longueur d’onde d’émission de boîtes quantiques en fonction de leur taille. Adaptée de (Berends and De Mello Donega, 2017).

des QDs avec le NGF (Cui et al., 2007). Ils ont ensuite tiré profit de la fluorescence des QDs pour suivre la propagation du signal des NGF du cône de croissance axonal jusqu’au corps cellulaire, dans des cultures compartimentalisées de neurones de rats (Figure 2.2).

On peut également citer l’exemple des célèbres travaux de Dahan *et al.*, qui ont utilisé des QDs d’une taille d’environ 10 nm sur lesquels un fragment d’anticorps spécifique d’une sous-unité du récepteur GlyR au neuromodulateur glycine a été greffé. Le complexe reconnaît alors les GlyR dont les mouvements peuvent ainsi être suivis à l’échelle individuelle, même dans les fentes synaptiques, grâce à leur taille plus petite que la dimension de cette fente (≈ 20 nm). Les déplacements latéraux des GlyR peuvent être enregistrés pendant des durées allant jusqu’à quelques minutes et mettent en évidence des comportements dynamiques différents des GlyR en fonction de leur localisation synaptique (Figure 2.3) (Dahan et al., 2003).

Ainsi, par leur petite dimension et leur forte brillance, les QDs offrent de nombreux avantages par rapport aux fluorophores organiques classiques. Néanmoins, comme nous l’avons souligné précédemment, une des limitations importantes de ces nano-traceurs provient du clignotement intrinsèque de leur fluorescence. En effet, comme le montre

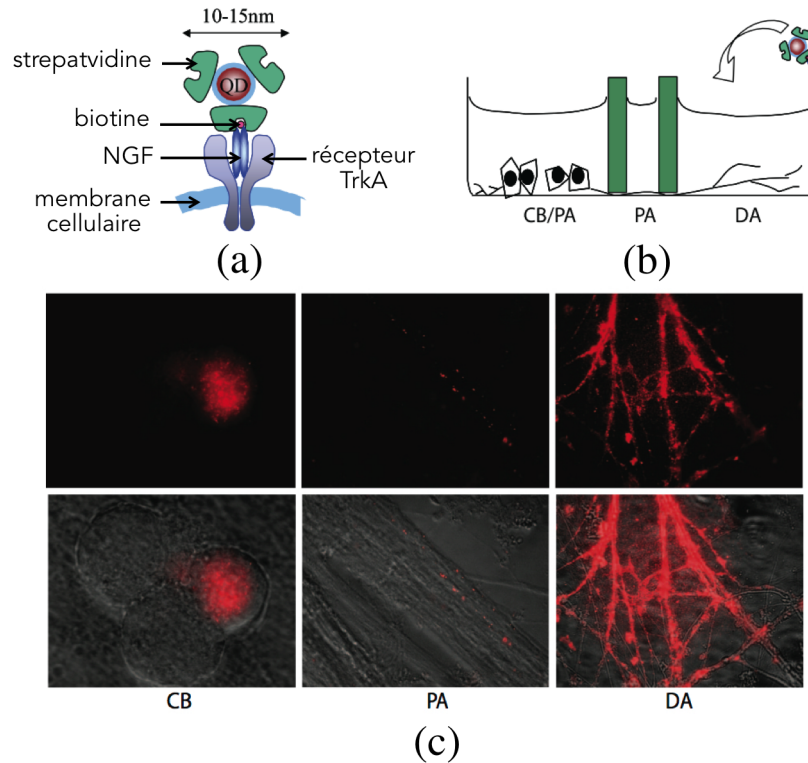


FIGURE 2.2 – Utilisation de QDs fonctionnalisés avec le facteur de croissance nerveuse NGF pour mesurer le transport axonal de ce facteur dans des neurones en culture primaire. (a) Schéma d'un QD-NGF lié à un récepteur TrkA. (b) Schéma de la chambre de culture compartimentalisée en trois zones : DA, *distal axon* ; PA, *proximal axon* ; CB, *cell body*. Pour étudier la propagation du signal NGF, l'ajout de QD-NGF se fait dans le compartiment DA. (c) Ligne du haut, images représentatives de la fluorescence rouge des QD-NGF observée dans chaque compartiment 2 h après l'ajout de 4 nM de QD-NGF dans le compartiment DA. En bas, les images de fluorescence sont superposées avec les images champs clairs correspondantes. Adaptée de (Cui et al., 2007).

la figure 2.4, le signal d'un QD peut s'interrompre pendant des durées de près d'une seconde, ce qui rend le suivi du phénomène biologique étudié plus compliqué. Les nanodiamants fluorescents, que nous abordons dans la partie suivante, ne présentent pas cet inconvénient.

Les QDs sont usuellement utilisés en microscopie de fluorescence en excitation à un photon, comme le montrent les exemples des figures 2.2 et 2.3 . Il est intéressant de noter qu'on trouve également parmi eux certains QDs dont la structure non-centrosymétrique leur permet de générer un signal optique non linéaire de seconde harmonique (voir section 2.2.3.1). On peut par exemple citer dans cette catégorie les

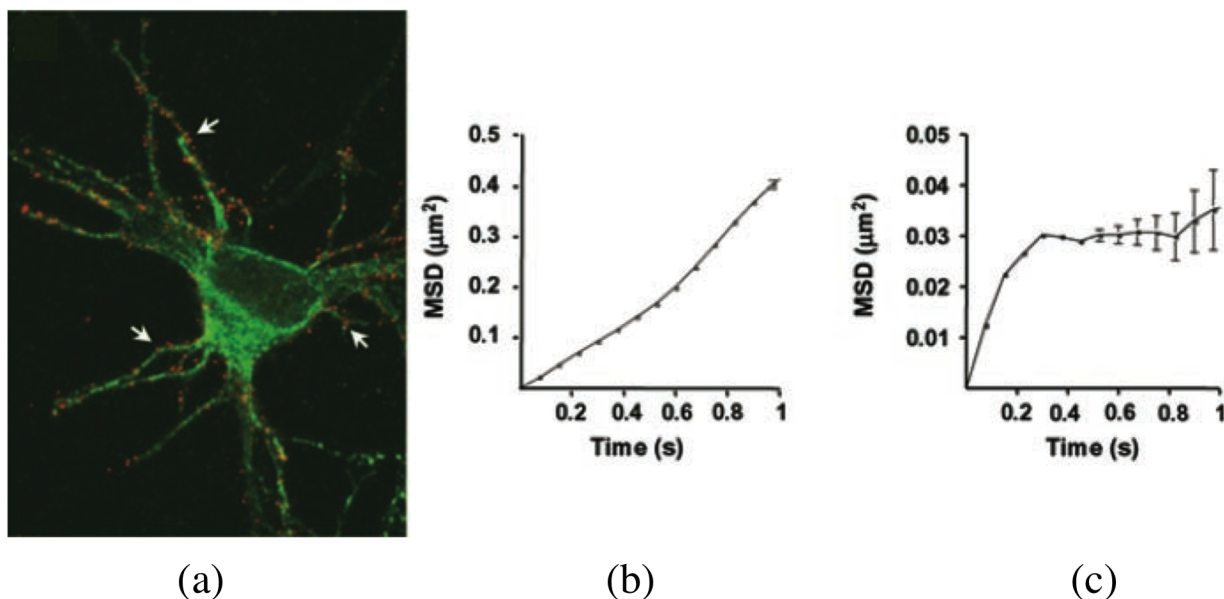


FIGURE 2.3 – Utilisation de QDs comme traceurs des déplacements des récepteurs de glycine GlyR dans des neurones en culture. (a) Complexes QD-GlyR (en rouge) détectés principalement sur les dendrites identifiées grâce à un marquage des protéines associées aux microtubules MAP2 (en vert). (b) Evolution du déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps, calculé à partir d’une séquence d’images décrivant les déplacements d’un QD situé dans une partie extrasynaptique car l’allure du MSD indique une diffusion brownienne dirigée (cf section 3.3.2), en accord avec un déplacement latéral non contraint. (c) Évolution du MSD en fonction du temps montrant un plateau associé à un confinement sans doute révélateur du fait que le complexe QD-GlyR est situé à proximité d’un bouton synaptique. Adaptée de (Dahan et al., 2003).

nanocristaux de CdSe (Jacobsohn and Banin, 2000), de CdZnS (Petrov et al., 2002) ou encore de CdTe (Winter et al., 2011). Cependant, différentes études ont prouvé que la présence de cadmium pouvait engendrer une toxicité (Gomes et al., 2011). Même si cette dernière peut être atténuée par une fonctionnalisation appropriée (Oh et al., 2016), elle représente un inconvénient majeur pour des applications biologiques telles que la mesure du transport intraneuronal *in vivo*. Par ailleurs, les risques pour l’environnement et le recyclage sont également à considérer en cas de production industrielle.

2.2.2.2 Nano-diamants fluorescents (FNDs)

Les nanoparticules de diamant fluorescents constituent une alternative bien adaptée à l’étude de phénomènes biologiques de “longues” durées tels que le transport intra-

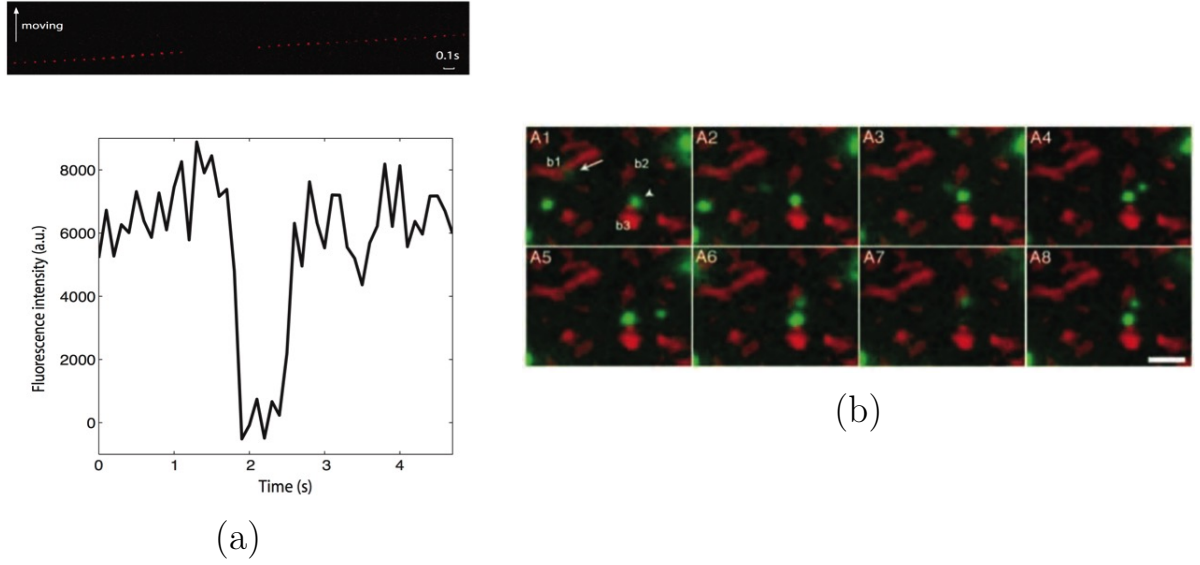


FIGURE 2.4 – Mise en évidence du phénomène de clignotement de l’émission d’un QD unique utilisé pour le suivi de biomolécules. (a) En haut, visualisation des positions d’un QD-NGF individuel (contenu dans un endosome en mouvement) toutes les 100 ms lors de son déplacement pendant environ 4.5 s. En bas, trace de l’intensité de fluorescence en fonction du temps de ce QD pendant la même période, montrant la perte du signal pendant 0.7 s due au scintillement. Adaptée de (Cui et al., 2007) (b) Suivi d’un QD-GlyR individuel (en vert) au voisinage de boutons synaptiques marqués en rouge. Images (A1)-(A8) extraites d’une séquence acquise à la cadence de 13 images par seconde. On constate une interruption du signal du QD sur l’image (A7). Barre d’échelle : 2 μm . Adaptée de (Dahan et al., 2003).

neuronal (Haziza et al., 2017). En effet, ces particules de taille ≈ 35 nm sont capables d’émettre une fluorescence parfaitement stable et intense autour de 700 nm (émission située dans la première fenêtre de transparence des tissus biologiques, figure 2.5b) et ne sont pas toxiques pour les cellules et organismes où elles ont été utilisées jusqu’à présent (Chen and Zhang, 2017). Leur efficacité quantique peut être élevée, proche de l’unité, mais elle varie aussi beaucoup d’une particule à l’autre, pouvant descendre jusqu’à 25% (Frimmer et al., 2013). L’émission de lumière provient de centres colorés azote-lacune (NV). L’azote est naturellement présent dans la maille cristalline comme impureté substitutionnelle dans le diamant. Les lacunes sont créées par irradiation avec un faisceau de particules accélérées (*e.g.* protons d’énergie ≈ 3 MeV) suivie d’un recuit à haute température (800 °C, 2h). Les particules déplacent les atomes de carbone, laissant des lacunes derrière eux. Le recuit restructure la maille cristalline, conduisant

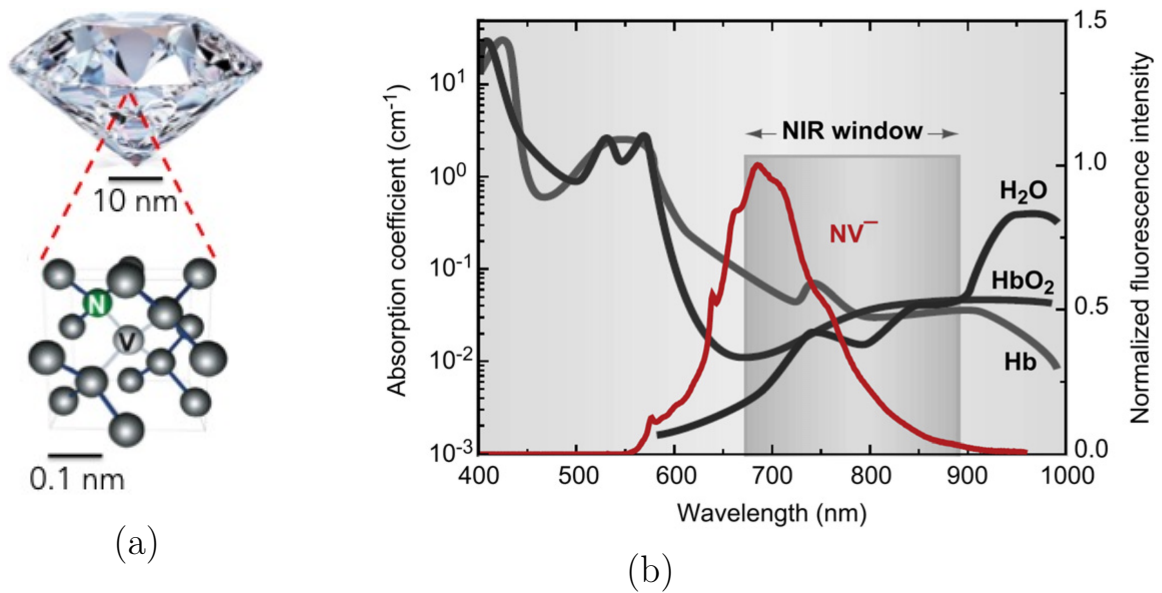


FIGURE 2.5 – Fluorescence du diamant dans le rouge lointain. (a) Centre coloré NV du diamant. Adaptée de (Neumann et al., 2009). (b) Comparaison du spectre de fluorescence des centres NV du diamant avec la fenêtre de transparence des tissus biologiques. Adaptée de (Vaijayanthimala et al., 2012).

à la stabilisation des lacunes sur un site adjacent des atomes d’azote, position thermodynamiquement stable (Figure 2.5a). On obtient alors des particules ayant un spectre d’émission centré autour de 700 nm lorsqu’elles sont excitées à 561 nm (courbe rouge, figure 2.5b). Le centre NV unique dans un nanodiamant est utilisé comme source de photons uniques à la demande ou, lorsque ses propriétés de spin détectables optiquement sont mises à profit, pour mesurer des champs magnétiques à l’échelle nanométrique (Rondin et al., 2014; Casola et al., 2018).

Comme nous l’avons vu dans le chapitre 1, le transport moléculaire dans les branches neuronales est l’une des fonctions essentielles à l’homéostasie des neurones. Notre équipe (“Biophotonique et Physiopathologie des synapses”, laboratoire LuMIn) a développé une méthode sensible de mesure du transport intraneuronal avec laquelle elle a mis en évidence des anomalies de transport endosomal dans les branches de neurones hippocampaux de lignées de souris transgéniques portant un facteur de risque génétique de maladies (Haziza et al., 2017). Pour ce faire elle s’est appuyée sur un mécanisme naturel qui est l’internalisation spontanée, par endocytose, des FNDs. Le

paramètre important est la brillance de ces émetteurs : les nanoparticules utilisées, de taille ≈ 30 nm, sont synthétisées par l'équipe de notre collaborateur Huan-Cheng CHANG (Academia Sinica, Taiwan (Fu et al., 2007)) et contiennent une quinzaine de centres NV. Comme nous l'avons déjà souligné, la stabilité de l'intensité émise par ces émetteurs nous permet d'enregistrer des trajectoire sans limitation de durée, puis d'analyser les paramètres du transport intraneuronal. La durée d'une expérience n'est jamais limitée par l'éventuelle extinction d'un émetteur, mais par la durée que l'on choisit pour un film, qui est de deux minutes.

La figure 2.6 illustre l'utilisation des FNDs pour sonder le transport intraneuronal dans des cultures de neurones *in vitro*. En revanche, si l'on veut étudier des échantillons biologiques *in vivo* plus complexes et plus épais, il est plus adapté d'utiliser la microscopie à deux photons. Malheureusement, la section efficace d'absorption à deux photons des centres NV du diamant est de l'ordre de 0.45 GM (Goeppert-Mayer, 10^{-50} cm⁴.s/ph), bien plus faible en comparaison de celle de fluorophores conventionnels ($\approx 40 - 100$ GM), et donc inadaptée à une détection à la cadence vidéo (Ji et al., 2018). D'autres nanostructures disposant d'une forte réponse à deux photons ont ainsi été proposées pour le suivi du transport intraneuronal, telles que les nano-bâtonnets d'or.

2.2.2.3 Nano-bâtonnets d'or (AuNRs)

Les nano-bâtonnets d'or (AuNRs) peuvent présenter un phénomène de diffusion résonante de la lumière. Cette résonance est liée à une oscillation collective des électrons libres de la bande de conduction. Le couplage de cette oscillation collective avec une onde électromagnétique est un plasmon, localisé dans la nanoparticule. On parle ainsi de résonance plasmonique. La résonance plasmonique confère à ces nanoparticules des propriétés optiques uniques très intéressantes dans le cadre d'applications biologiques. En particulier, comme le montre la figure 2.7, il est possible d'ajuster la position spectrale et l'intensité de cette résonance en modifiant la taille et la forme des

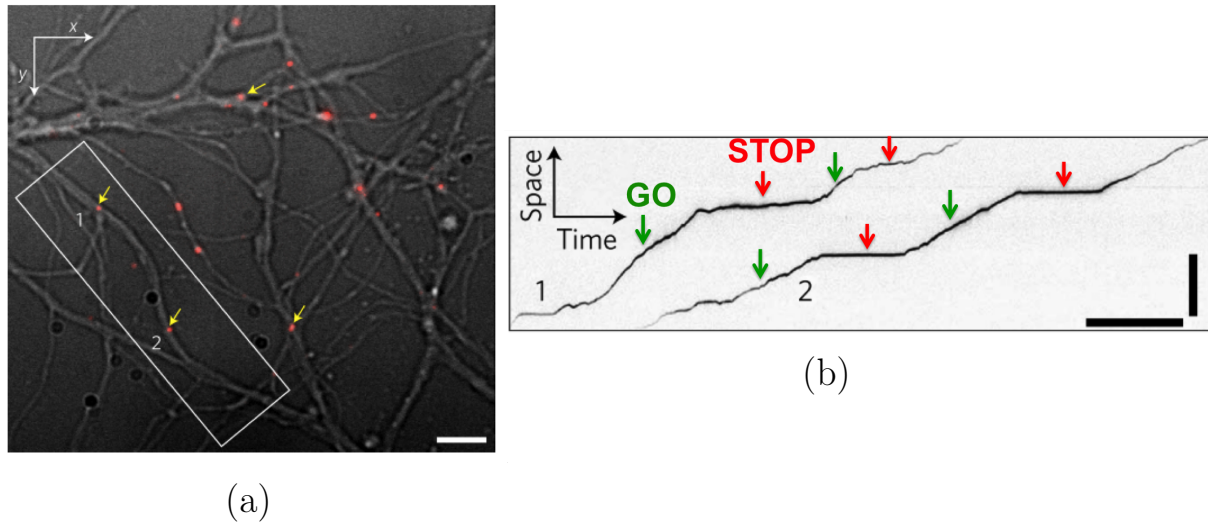


FIGURE 2.6 – Mesure du transport intraneuronal dans des cultures de neurones hippocampaux par suivi de nanodiamants fluorescents. (a) Superposition du signal des FNDs (en rouge) se trouvant dans les branches de neurones avec une image en contraste interférentiel de la zone étudiée. Les flèches jaunes pointent les FNDs en mouvement dans les dendrites de neurones. Barre d'échelle : $5\ \mu\text{m}$ (b) Évolution de la position curviligne en fonction du temps pour les particules 1 et 2 pointées dans l'image de gauche. Les flèches vertes indiquent les phases de mouvement et les flèches rouges, les phases d'arrêt. Barres d'échelles : $15\ \mu\text{m}$ et 10 s. Adaptée de (Haziza et al., 2017).

nanoparticules.

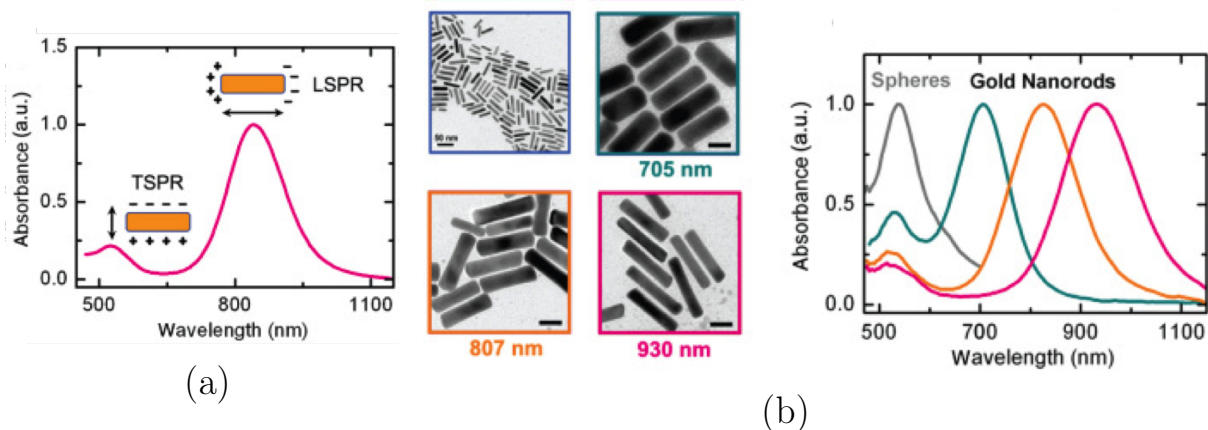


FIGURE 2.7 – Influence du rapport d'aspect de nanobatonnets d'or sur leur spectre d'absorption. (a) Spectre d'absorption de AuNRs en solution aqueuse. En particulier, on observe deux fréquences de résonance caractéristiques associées à des oscillations de charges se produisant selon les axes transverse et longitudinal du bâtonnet, comme le montrent les schémas insérés. (b) A gauche, image TEM de AuNRs de rapports d'aspect différents. A droite, spectres d'absorption des AuNRs correspondant aux images TEM. Adaptée de (Li et al., 2013).

Nous avons vu précédemment qu’il était possible d’utiliser les nanocristaux semi-conducteurs (section 2.2.2.1) ou encore les nanodiamants fluorescents (section 2.2.2.2) afin de suivre les déplacements de différents types d’entités biologiques, et plus particulièrement dans le cadre de notre problématique de recherche, de mesurer le transport intraneuronal. Les AuNRs peuvent être utilisés de la même manière comme nano-traceurs. Ils ont en outre l’avantage de pouvoir rendre compte de l’orientation de l’objet suivi. En effet, la lumière diffusée par le couplage de la résonance plasmonique au rayonnement est polarisée dans la direction associée à la résonance excitée, c’est à dire selon un des axes géométriques du nano-bâtonnet, encodant ainsi l’orientation du bâtonnet (Sönnichsen and Alivisatos, 2005). Il est donc possible de suivre également l’orientation du compartiment marqué par un AuNR, en même temps que sa position.

Kaplan *et al* (Kaplan et al., 2018) se sont ainsi intéressés en 2018 à la corrélation qui pouvait exister entre le transport axonal d’endosomes et leur dynamique de rotation dans des neurones en culture. Ils ont utilisé des AuNRs et un système optique capable d’analyser la polarisation de la lumière diffusée afin d’enregistrer des centaines de trajectoires de vésicules. Cela leur a permis notamment de montrer que lors des changements de sens de déplacement des endosomes d’antérograde $\rightarrow$ rétrograde, il y avait une augmentation transitoire de l’amplitude des déplacements angulaires (“labilité”). Avec les éléments dont ils disposaient, les auteurs n’ont pas pu proposer d’explications, mais ils ont cependant montré que l’augmentation de la labilité n’est pas liée à l’endosome (*i.e.* les endosomes changeant souvent de direction pourraient être plus labiles que les autres) mais au changement de direction (Kaplan et al., 2018).

Notons qu’en tirant profit de la résonance de spin détectable optiquement des centres NV dans un nanodiamant, il est possible de déterminer l’orientation d’un nanodiamant par rapport à la direction d’un champ magnétique (McGuinness et al., 2011). Très récemment, cette approche a été perfectionnée par Igarashi *et al.* (Igarashi et al., 2020) qui ont implémenté dans un microscope en épifluorescence trois électroaimants à proximité de l’échantillon permettant d’appliquer successivement des directions dif-

férentes de champ magnétique et ainsi de remonter à des angles d'Euler caractérisant complètement l'orientation d'un nanodiamant dans l'espace. Les auteurs ont utilisé ce dispositif sophistiqué pour suivre le fonctionnement du moteur moléculaire rotatif F1-ATPase à l'échelle de la molécule individuelle, mais aussi pour suivre les changements d'orientation d'un nanodiamant au fur et à mesure qu'il progresse dans le lumen de l'intestin d'un ver *Caenorhabditis elegans*. Dans ce dernier cas, ils ont découvert que le mouvement était le mieux décrit par une rotation autour d'un seul axe pas forcément aligné avec la direction de l'intestin. Il s'agit de la première mesure d'orientation tridimensionnelle d'une nanoparticule *in vivo*. Cette approche est élégante et puissante, mais complexe à mettre en œuvre.

2.2.3 Nano-cristaux à réponse optique non linéaire : des nano-traceurs IR alternatifs

2.2.3.1 Génération d'un signal de seconde harmonique (SHG) et principe de la microscopie biphotonique

Nous avons vu dans la partie précédente (cf section 2.2.2) des exemples de nanoparticules utilisées comme nano-traceurs et permettant de suivre la dynamique de phénomènes biologiques divers. La fluorescence est l'une des propriétés optiques les plus exploitées (quantum dots, nanodiamants fluorescents, ...), ainsi que le signal de diffusion (e.g. diffusion résonnante de nanoparticules d'or). Dans une moindre mesure, et en lien avec la diffusion et le développement de systèmes optiques multiphotoniques, les chercheurs se sont intéressés aux nanoparticules à réponse optique non linéaire. En particulier, le recours plus fréquent à l'imagerie *in vivo* de tissus épais a mis en évidence le besoin de disposer de traceurs optiquement stables et possédant une forte section efficace d'absorption à deux photons dans la bande spectrale du proche infrarouge (plage de longueurs d'onde : 1000-1350 nm, qualifiée de “seconde fenêtre de transparence” ou “fenêtre thérapeutique” des tissus biologiques (Smith et al., 2009)).

Certains nanocristaux à réponse optique non linéaire ont la capacité intrinsèque de générer un signal de seconde harmonique (*Second Harmonic Generation*, SHG) ; on les nommera “traceurs à réponse SHG” dans la suite. Comme le montre la figure 2.8, cette émission non linéaire correspond à la conversion d’une source laser intense (un laser impulsif est le plus adapté) de fréquence ω en son harmonique double à 2ω . Cette interaction impliquant trois photons est décrite par un tenseur de susceptibilité non linéaire d’ordre deux $\chi^{(2)}$ qui est relié aux coefficients non-linéaires d_{ijk} par la relation :

$$d_{ijk} = \frac{1}{2}\chi_{ijk}^{(2)}, \quad (2.1)$$

où les indices ijk correspondent aux composantes (x, y, z) d’un repère cartésien dans lequel sont définis les champs.

Dans le cas particulier de la génération de seconde harmonique dans des matériaux nanométriques où l’accord de phase est nécessairement respecté, la composante de la polarisation non linéaire selon l’axe i peut être écrite :

$$P_i(2\omega) = 2\epsilon_o \sum_{jk} d_{ijk}(2\omega; \omega; \omega) E_j(\omega) E_k(\omega), \quad (2.2)$$

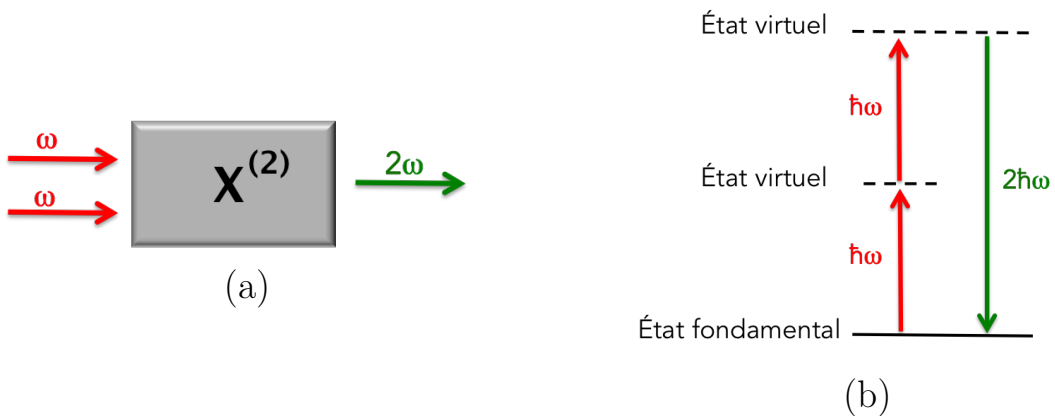


FIGURE 2.8 – Représentation de la génération de seconde harmonique (SHG). (a) Cristal caractérisé par son tenseur de susceptibilité $\chi^{(2)}$, excité par une onde à la pulsation ω et générant une onde à la pulsation 2ω . (b) Schéma de transition énergétique de la SHG.

Dans les condition de Kleinman¹, il est usuel de simplifier ces notations. Le tenseur de susceptibilité non linéaire est de plus lié à la symétrie de la structure cristalline du matériau. Dans le cas particulier d'une structure cristalline non centrosymétrique, les règles de symétrie s'appliquent et sont à l'origine d'une forme de tenseur particulière dont certains coefficients sont égaux entre eux et d'autres s'annulent. Les tenseurs des trois matériaux étudiés ensuite sont indiqués dans la figure 2.9. Les notations simplifiées utilisées sont détaillées dans l'annexe B.

<u>Matériaux</u>	<u>Tenseur sous sa forme matricielle</u>
BTO	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$
KTP	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{24} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$
3C-SiC	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & d_{14} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & d_{14} \end{pmatrix}$

FIGURE 2.9 – Forme des tenseurs de susceptibilité non linéaire des matériaux utilisés durant cette thèse. Extraits de (Rogov et al., 2016) pour le SiC et (Shea, 2004) pour le BTO et le KTP.

En fonction de la polarisation du champ exciteur, le signal de SHG est donc sensible à une combinaison des coefficients d_{il} . Dans le cadre de nos expériences, nous utilisons une excitation par une onde polarisée circulairement dans le plan de l'échantillon (x, y) afin de nous affranchir de la réponse en polarisation à l'excitation (le cristal non linéaire étant excité par un champ électrique de même amplitude selon les axes (Ox) et (Oy)).

Nous verrons dans la section 2.3.2 que cette configuration nous permet dans certains cas de relier l'intensité du rayonnement SHG collecté à l'angle polaire du cristal non

1. L'hypothèse de Kleinman correspond au cas où les fréquences optiques sont très inférieures aux fréquences de résonance du matériau.

linéaire, c'est-à-dire l'angle défini par l'axe cristallographique et l'axe de propagation (Oz) de la lumière, identique à celui de l'objectif de microscope (cf Figure 2.20).

Contrairement à la fluorescence, la SHG n'implique pas d'absorption lumineuse par le matériau : l'onde à la pulsation 2ω est issue de la diffusion de deux photons à la pulsation ω . De même que pour la diffusion linéaire, le phénomène est cohérent et instantané, et la largeur spectrale du signal à la pulsation 2ω est identique à celle du laser d'excitation. D'un point de vue quantique, ce processus fait intervenir des niveaux d'énergie dits virtuels, ce qui implique un phénomène d'émission non-résonant. En d'autres termes, la SHG ne dépend pas de bandes d'énergie particulières du matériau : elle est donc effective quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. Toutefois, l'agencement des atomes dans le matériau considéré joue un rôle important dans la capacité de la particule à générer le signal de seconde harmonique. Les traceurs SHG représentent ainsi une classe de nano-traceurs alternatifs possédant de nombreux avantages tels que :

- l'absence de photo-blanchiment
- une émission possédant une fine largeur spectrale
- la possibilité d'être excité à n'importe quelle longueur d'onde
- un signal optique pouvant permettre, pour certains matériaux (*i.e.* en fonction de leur tenseur $\chi^{(2)}$), de remonter à l'orientation du cristal .

Les traceurs à réponse SHG ont spécifiquement été conçus pour des applications utilisant des techniques de microscopie biphotonique permettant de contourner de nombreux inconvénients de la microscopie classique. Développée à l'origine dans les années 90 (Denk et al., 1990) sur la base de signaux de fluorescence excités à deux photons (*Two-Photon Excitation Fluorescence*, 2PEF), la microscopie multiphotonique s'est peu à peu imposée comme une méthode incontournable d'imagerie de tissus intacts à l'échelle subcellulaire.

Un premier avantage de cette méthode réside dans sa capacité à imager des tissus

biologiques à des profondeurs inaccessibles à la microscopie confocale (Shotton, 1989). En effet, sous excitation laser à des longueurs d'onde dans le visible, les tissus épais génèrent beaucoup d'autofluorescence qui constitue un fond de niveau trop élevé pour permettre l'imagerie de structure en profondeur, le rapport signal/fond étant alors très faible. Pour imager optiquement des tissus en profondeur la microscopie multiphotonique tire profit de leur transparence dans le proche infrarouge, comme déjà indiquée, et utilise différents processus optiques tels que la fluorescence à deux photons (*Two-Photon Fluorescence*, 2PF) ou à trois photons (3PF) ou encore d'autres phénomènes optiques non linéaires comme la SHG que nous venons de discuter (si le tissu est composé de structures organisées périodiquement, comme le collagène, les microtubules...) ou bien la génération de troisième harmonique (THG) notamment aux interfaces eau-lipide et eau-protéines (Figure 2.10). Plusieurs articles comme par exemple celui de Ouzounov *et al* (Ouzounov et al., 2017) montrent que **la microscopie de fluorescence à deux photons permet l'imagerie de tissus à des profondeurs allant jusqu'à environ 780 micromètres** en maintenant un rapport signal sur fond supérieur à l'unité, mais qu'au delà de cette valeur il convient d'utiliser la microscopie de fluorescence à trois photons, qui tire profit de la troisième fenêtre de transparence optique des tissus (1600-1870 nm) pour laquelle la diffusion Rayleigh est plus faible que dans la 2^{ème} fenêtre (1100-1350 nm). Dans le cadre de notre thématique de recherche centrée autour de la mesure du transport intraneuronal, nous nous limitons à la microscopie à deux-photons car nos échantillons ne nécessitent pas l'étude à des profondeurs supérieures à 500 μm .

Un deuxième avantage majeur de la microscopie multiphotonique réside dans sa capacité à **restreindre la photo-dégradation des échantillons**. Cela est lié d'une part à l'utilisation d'une gamme de longueurs d'onde d'excitation où les tissus absorbent très peu (Figure 2.5b), et d'autre part, comme le montre la figure 2.10(b), au fait que le volume de la zone excitée est restreint au point de focalisation, ce qui est responsable d'une absence de dommages optiques en dehors du point focal. Cela s'ex-

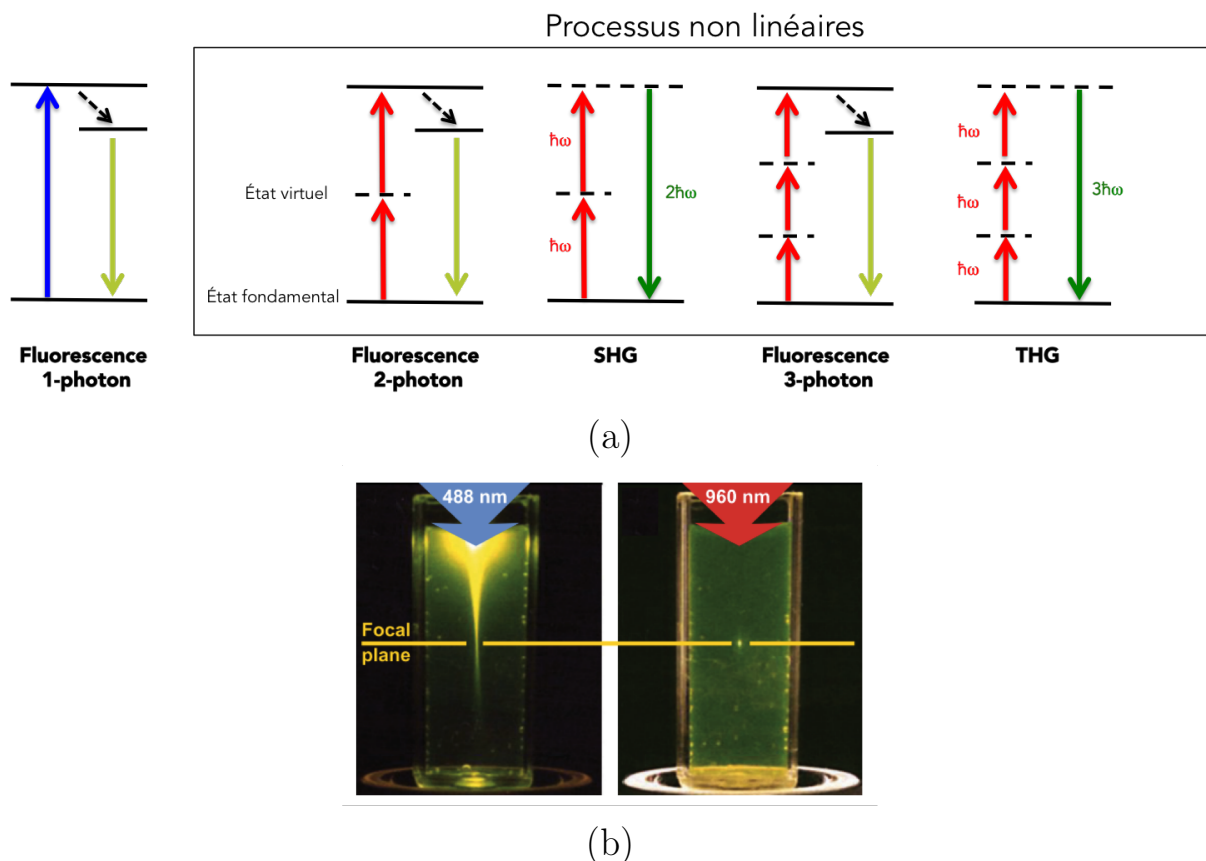


FIGURE 2.10 – Comparaison des processus optiques utilisés en microscopie à un photon et multiphotonique. (a) Schéma des transitions énergétiques de chaque processus. (b) Mise en évidence du sectionnement optique intrinsèque de la microscopie à deux photons, adaptée de (Zipfel et al., 2003). Localisation du faisceau excitateur pour une excitation continue à un photon à la longueur d’onde de 488 nm (à gauche) et pour une excitation impulsionnelle à deux photons de longueur d’onde 960 nm (à droite).

plique par le fait que les processus optiques non linéaires mis en jeu (Figure 2.10(a)) ont une probabilité d’occurrence beaucoup plus faible que celle de la fluorescence à un photon, d’où la nécessité d’une excitation laser impulsionnelle (durées d’impulsions ≈ 140 fs). Le laser doit être focalisé sur l’échantillon pour atteindre le régime de non-linéarité nécessaire et ce n’est qu’à ce point de focalisation que la probabilité d’absorber plusieurs photons simultanément devient non négligeable. Finalement, l’image est obtenue en balayant point à point le spot d’excitation. Cette nécessité de scanner l’image a néanmoins l’inconvénient de fortement ralentir la cadence d’acquisition.

Par ailleurs, **l’amélioration de la résolution spatiale** par rapport à la microscopie

pie confocale (Shotton, 1989) est un troisième avantage des techniques de microscopie multiphotonique. En effet, le processus optique d'émission non linéaire est limité spatialement par l'intensité d'excitation. Comme nous l'avons vu précédemment, le signal dépend quadratiquement de l'intensité d'excitation (équation 2.2) dont l'extension est plus petite que la limite de diffraction (voir figure 3.1) : la résolution spatiale ainsi obtenue est donc meilleure que celle obtenue en microscopie confocale.

Ainsi, cette technique permet de surmonter les difficultés habituellement rencontrées en microscopie optique classique pour imager en profondeur, telles que l'endommagement des échantillons par photo-dégradation ou encore la diminution de résolution spatiale. Ces éléments font de la microscopie multiphotonique une technique très utile dans le domaine des applications biomédicales.

Pour notre application, nous cherchons à détecter et suivre le signal SHG provenant d'un nanocristal internalisé dans une vésicule de neurone. Les nombreuses propriétés optiques intrinsèques de ces nanocristaux en font des traceurs biologiques très intéressants dans le cadre d'applications de suivi de phénomènes biologiques dynamiques par microscopie biphotonique. Nous allons discuter dans la section suivante de certains travaux utilisant ce type de nano-traceurs SHG.

2.2.3.2 Etude de phénomènes biologiques dynamiques par suivi du signal SHG de nanocristaux

Plusieurs articles récents se sont intéressés de près à ce type de traceurs et à leurs applications en imagerie biologique (Staedler et al., 2012; Bonacina, 2013). On peut par exemple citer les travaux de Grange *et al* (Grange et al., 2011) qui démontrent qu'il est possible de détecter la SHG de nanocristaux de titanate de baryum (BaTiO_3) à une profondeur de $120\ \mu\text{m}$ pour une longueur d'onde d'excitation de $812\ \text{nm}$ (Figure 2.11). Outre la démonstration d'une détection à une profondeur difficilement accessible à la microscopie confocale, cet article met en évidence le fait que la faible absorption optique des tissus biologiques à la longueur d'onde d'excitation entraîne une accumulation

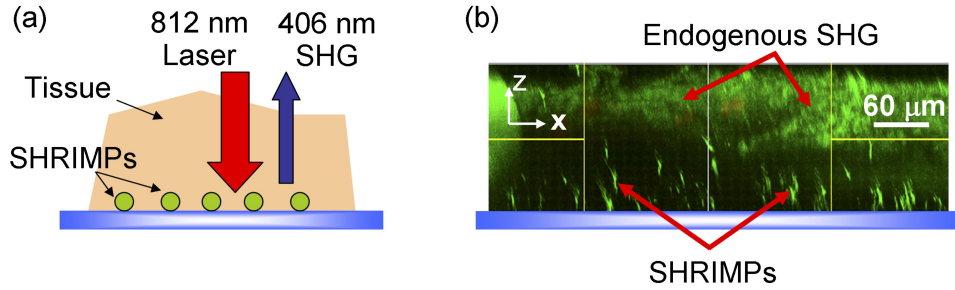


FIGURE 2.11 – Détection en profondeur de nanocristaux donnant une réponse SHG. À gauche, schéma de l'échantillon imagé. À droite, détection des nano-traceurs (appelés génériquement SHRIMPS, acronyme anglais pour *Second Harmonic Radiation Imaging ProbeS*), ici constitués de nanocristaux de BaTiO_3 de taille ≈ 300 nm, sous une épaisseur de $120 \mu\text{m}$ d'un tissu de queue de souris. Extrait de (Grange et al., 2011).

d'énergie moindre et diminue donc l'endommagement de ces tissus.

Hsieh *et al* (Hsieh et al., 2009) montrent en 2009 que des nanoparticules de BaTiO_3 peuvent être internalisées dans des cellules HeLa en culture, grâce au processus spontané d'endocytose. Sur la figure 2.12, on observe en vert le signal de plusieurs émetteurs BaTiO_3 et en rouge la fluorescence excitée à deux photons des cellules marquées avec la calcéïne. Dans cet article (Hsieh et al., 2009), les auteurs utilisent le caractère cohérent du signal SHG afin de réaliser une imagerie holographique en trois dimensions. Cette technique originale a été appliquée avec succès à des nanoparticules de BaTiO_3 internalisées dans des cellules. En revanche, elle ne permet pas d'imager en profondeur car elle est utilisable uniquement dans le cas de milieux turbides relativement minces où le bruit de *speckle* reste faible, engendrant alors des hologrammes correctement résolus.

Pantazis *et al* (Pantazis et al., 2010) ont également comparé l'intensité du signal SHG issu d'une particule de BaTiO_3 à la fluorescence excitée à deux photons d'un QD : contrairement au QD qui clignote, le signal de SHG est parfaitement stable. La photostabilité de ces traceurs offre ainsi la possibilité d'effectuer des études à long terme ou encore en dynamique (Figure 2.13).

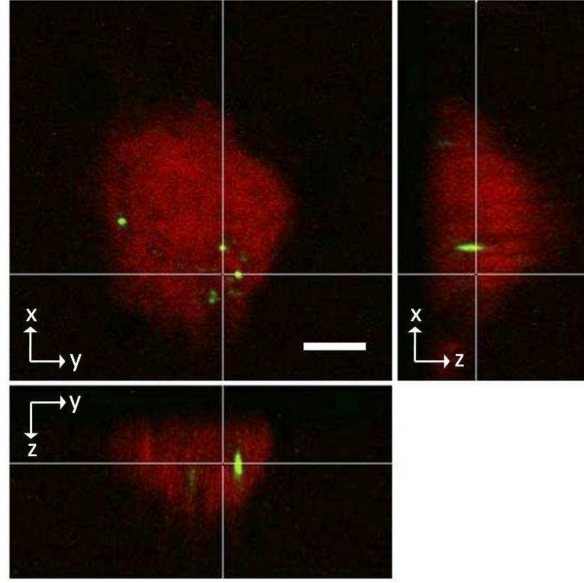


FIGURE 2.12 – Différentes sections d'un balayage 3D (laser impulsionnel à la longueur d'onde de 800 nm) d'une cellule HeLa (en rouge, marquage calcéine) ayant internalisé plusieurs nanocristaux de BaTiO_3 émettant un signal SHG (en vert). Extrait de (Hsieh et al., 2009).

2.3 Suivi de nanoparticules à réponse optique non linéaire, après leur internalisation dans des neurones en culture

2.3.1 Test de différents nano-cristaux à réponse optique non linéaire : KTiOPO_4 , BaTiO_3 et SiC .

2.3.1.1 Synthèse des nanocristaux

Plusieurs matériaux présentent la structure non centrosymétrique nécessaire à la génération efficace de seconde harmonique, et peuvent alors être utilisés comme traceurs SHG. Il s'agit de matériaux inorganiques, principalement des oxydes. Pour notre application de mesure du transport intraneuronal, nous avons étudié trois types de nanocristaux différents : le titanyl phosphate de potassium KTiOPO_4 (KTP), le titanate de baryum BaTiO_3 (BTO) et le carbure de silicium (SiC). Différentes techniques de

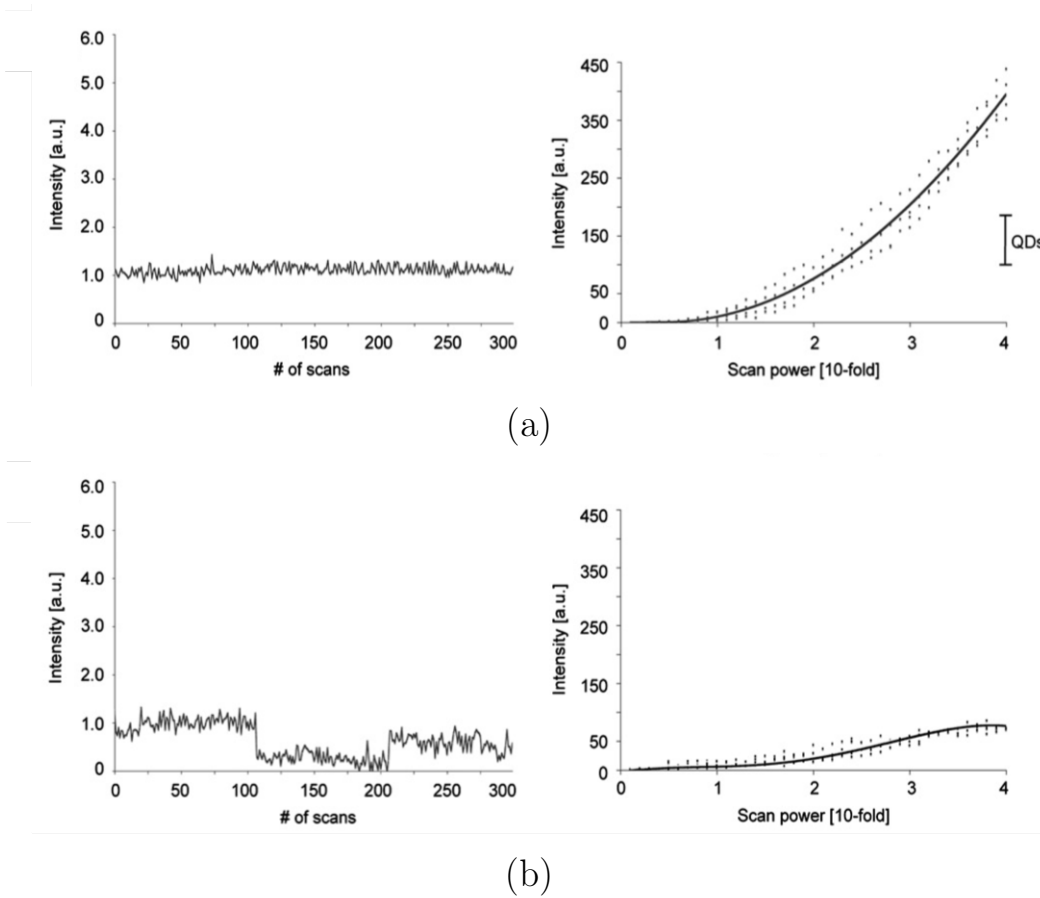


FIGURE 2.13 – Comparaison des signaux de SHG et de fluorescence à deux photons sous une excitation laser à 820 nm pour deux types de nanoparticules. (a) À gauche, intensité du signal SHG d’une nanoparticule de BaTiO_3 en fonction du temps (intervalle de temps entre 2 scans : 50 ms) ; à droite, évolution de l’intensité en fonction de la puissance d’excitation. (b) À gauche, signal de fluorescence de QDs de CdSe/ZnS en fonction du temps ; à droite, mise en évidence de la saturation de fluorescence des QDs. Adaptée de (Pantazis et al., 2010)

synthèse sont utilisées actuellement pour obtenir des cristaux de taille nanométrique. Les nanoparticules de KTP (Biswas et al., 2007) et de BTO (Bogicevic et al., 2015) sont synthétisées chimiquement tandis que celles de SiC sont issues d’autres types de synthèse telles que la pyrolyse laser.

- **Les nanoparticules de KTP (nano-KTP)**

Avec l’aide de Thierry GACOIN, chercheur au laboratoire de Physique de la Matière Condensée de l’Ecole Polytechnique, Gaëlle ALLARD, ingénieure chimiste dans notre laboratoire, a synthétisé des nano-KTP d’environ 100 nm de diamètre

selon le protocole de synthèse publié par Biswas *et al* (Biswas et al., 2007). À l’issue de cette synthèse, les particules de KTP ont tendance à s’agréger. Grâce à l’application d’ultrasons de “forte” puissance avec une sonde de type *cup horn* (ref : 4608, *Qsonica*, CT, USA), et en raison de la présence de charges surfaciques (potentiel zéta ≈ -40 mV, mesure de mobilité électrophorétique réalisée par vélocimétrie Doppler laser, appareil Wallis, Cordouan Technologies, France) nous avons été capables de désagréger ces agrégats de nano-KTP et d’obtenir une solution finale comportant une population majoritaire de nanoparticules de taille ≈ 100 nm, adaptée à l’internalisation par endocytose et à la mesure du transport intraneuronal. Ces nanoKTP ont été utilisés dans les expériences de mesure du transport dans des cultures primaires de neurones (expériences présentées dans la section suivante 2.3.1.2). Le résultat de la mesure de taille réalisée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*) est représenté dans la figure 2.14.

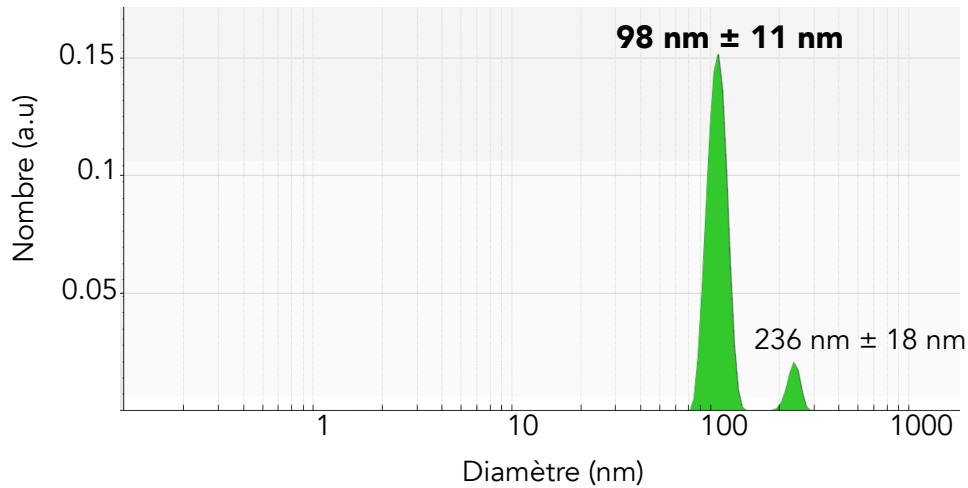


FIGURE 2.14 – Mesure de la taille des nanoKTP synthétisés par Gaëlle ALLARD et utilisés dans les expériences de mesure de transport dans des cultures primaires de neurones (2.3.1.2). La mesure a été réalisée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) avec l’appareil VASCO FlexTM Analyzer et le logiciel d’analyse NanoQ (v2.6.2.0). On représente ici la distribution de taille en nombre de particules (après correction de la diffusion de Rayleigh et Mie) extrapolée de la fonction d’autocorrélation en intensité avec l’algorithme SBL (*Sparse Bayesian Learning*) implémenté dans le logiciel.

- Les nanoparticules de BTO (nano-BTO)

Les expériences préliminaires de mesure du transport intraneuronal utilisant des nano-BTO ont été effectuées avec des particules d'environ 80 nm qui nous avaient été fournies par l'équipe de Periklis PANTAZIS de l'Imperial College (Londres, Angleterre). Cette équipe avait déjà utilisé des nano-BTO dans le cadre de leur propre projet de recherche pour des applications d'imagerie *in vivo* (Pantazis et al., 2010). Ces nanocristaux ont la particularité d'avoir été recouverts de chaînes de poly-éthylène glycol (PEG) à leur surface, qui ont pour effet de limiter leurs interactions non-spécifiques et leur agrégation mutuelle.

Par la suite, nous avons pris contact avec Christine BOGICEVIC, ingénieure chimiste au laboratoire SPMS de CentraleSupélec (Gif-sur-Yvette), afin d'obtenir des nano-BTO à façon. Elle a développé une stratégie de synthèse de nanoparticules de BTO reposant sur l'utilisation d'un précurseur de titanate sous la forme de nano-bâtonnets ou bien de nano-tubes. En fonction du choix du précurseur et d'autres paramètres (température, proportions de baryum et de titanate utilisées...), elle peut former des nano-BTO de formes et de tailles très diverses (Bogicevic et al., 2015). Ainsi, travailler en collaboration avec cette équipe nous permet d'utiliser, dans le cadre de nos expériences de mesure de transport intraneuronal, des nanoparticules de BTO dont les caractéristiques sont extrêmement bien contrôlées.

- **Les nanoparticules de SiC (nano-SiC)**

Les nano-SiC que nous avons utilisés ont été obtenus auprès de deux entreprises qui les fabriquent en grande quantité : *PlasmaChem* (basée en Allemagne) et *Nanomakers* (entreprise locale basée à Rambouillet). La production issue de *Nanomakers* repose sur la pyrolyse laser. La chambre de pyrolyse laser constitue le réacteur dans lequel les réactifs sont injectés sous la forme d'aérosols et croisent un faisceau laser infrarouge (laser à CO₂). Le transfert d'énergie provoque la décomposition des réactifs sous forme de radicaux atomiques qui se recombinent immédiatement pour former des particules dont la croissance est

bloquée par un effet de trempe contrôlé.

Que ce soit chez *Nanomakers* ou chez *PlasmaChem*, il est possible d'acheter des nanoparticules de SiC sous forme de poudre dont la taille des cristaux et la pureté est très bien contrôlée. Seule la structure cristalline cubique (polytype 3C-SiC) est produite par ce type de synthèse. Les expériences de mesure du transport intraneuronal ont été réalisées avec des nano-SiC de diamètre primaire d'environ 30 nm, en poudre sèche. Cependant, malgré nos tentatives de sonication ultrason à haute intensité, nous ne sommes pas parvenus à disperser ces particules à leur taille primaire dans l'eau, ce qui représente un handicap important pour la mise en place de notre méthode de mesure du transport.

2.3.1.2 Internalisation de nano-KTP et premières observations dans des cultures primaires de neurones

Nous avons effectué des expériences préliminaires utilisant un microscope à deux photons ayant pour but de (i) vérifier que les neurones corticaux de souris cultivés sur lamelle de microscope (que l'équipe utilise couramment; protocole détaillé dans l'annexe C) sont capables d'internaliser des nano-KTP et (ii) que leur signal SHG permet de suivre le déplacement des endosomes les contenant à la même cadence qu'en microscopie de fluorescence plein champ (suivi des FND) (Haziza et al., 2017).

Nous avons utilisé le même **protocole d'internalisation** que pour les FNDs et la mise en contact pendant quelques minutes des particules avec les neurones conduit bien à leur internalisation spontanée par endocytose (protocole détaillé dans l'annexe D). Nous verrons dans la section 2.3.2 que cette stratégie d'internalisation par endocytose non spécifique dépend de facteurs tels que la taille, la forme et l'état de surface. Par ailleurs, la concentration et le temps d'incubation des neurones avec les particules sont aussi des éléments importants. Dans notre cas, nous déposons la lamelle contenant les neurones sur une goutte de solution de nanoparticules diluée dans du milieu de culture nouveau, à une concentration de 0.05 mg/mL. Après 10 minutes d'incubation (37°C en

atmosphère humide et 5% de CO_2), le surplus de solution est absorbé en utilisant une lingette absorbante (Kimtech, Kimberly-Clark, USA) puis la lamelle est délicatement remise dans son milieu de culture originel et incubée durant 20 min.

Le microscope utilisé est celui de la Plateforme PIMPA à Orsay (SP8 multiphotons, Leica, Allemagne), très bien adapté au suivi dynamique que nous souhaitons réaliser. En effet, le spot d'excitation laser est balayé dans le plan de l'échantillon avec des miroirs installés sur scanner galvanométrique fonctionnant à sa fréquence de résonance (8 kHz), ce qui permet d'atteindre de grandes cadences d'acquisition. Le faisceau d'excitation est polarisé circulairement grâce à une lame déphasante quart d'onde ($\lambda/4$) que nous positionnons dans le chemin optique du laser (axes neutres de la lame $\lambda/4$ orientés à 45° de la polarisation rectiligne initiale du laser). La longueur d'onde est fixée à $\lambda = 896$ nm en raison du fait que le filtre passe-bande de détection placé devant le détecteur est centré sur 448 nm et qu'il nous est demandé par les responsables de la plateforme de ne pas le changer. Le signal de SHG à cette longueur d'onde est collecté par le même objectif de microscope que celui servant à focaliser le laser sur l'échantillon (détection en rétrodiffusion) par un photodétecteur hybride GaAsP ayant une efficacité quantique de 40% à 448 nm. L'ensemble du montage est piloté par une interface électronique et par le logiciel LAS X propriétaire du microscope (Leica).

La plateforme PIMPA ne disposant pas encore à l'époque d'enceinte thermostatée à 37°C et d'arrivée de CO_2 , nous avons dû adapter une ancienne chambre d'incubation destinée à un microscope inversé, alors que le microscope PIMPA est droit. Cette chambre ne nous a pas permis d'atteindre une température supérieure à 32°C dans le milieu de culture au-dessus de la lamelle. Nous avons observé qu'à cette température les endosomes ont une activité très fortement ralentie. Pour résoudre ce problème, nous avons acquis un élément chauffant l'objectif de microscope immergé dans le milieu (H401-T-CONTROLLER, Okolab, Italie). La température du milieu a alors pu être amenée à 37°C et les mouvements dirigés des nanocristaux sont alors apparus avec une densité par champ d'observation similaire à celle des expériences en fluorescence

utilisant les nanodiamants. La figure 2.15 illustre le montage expérimental utilisé.

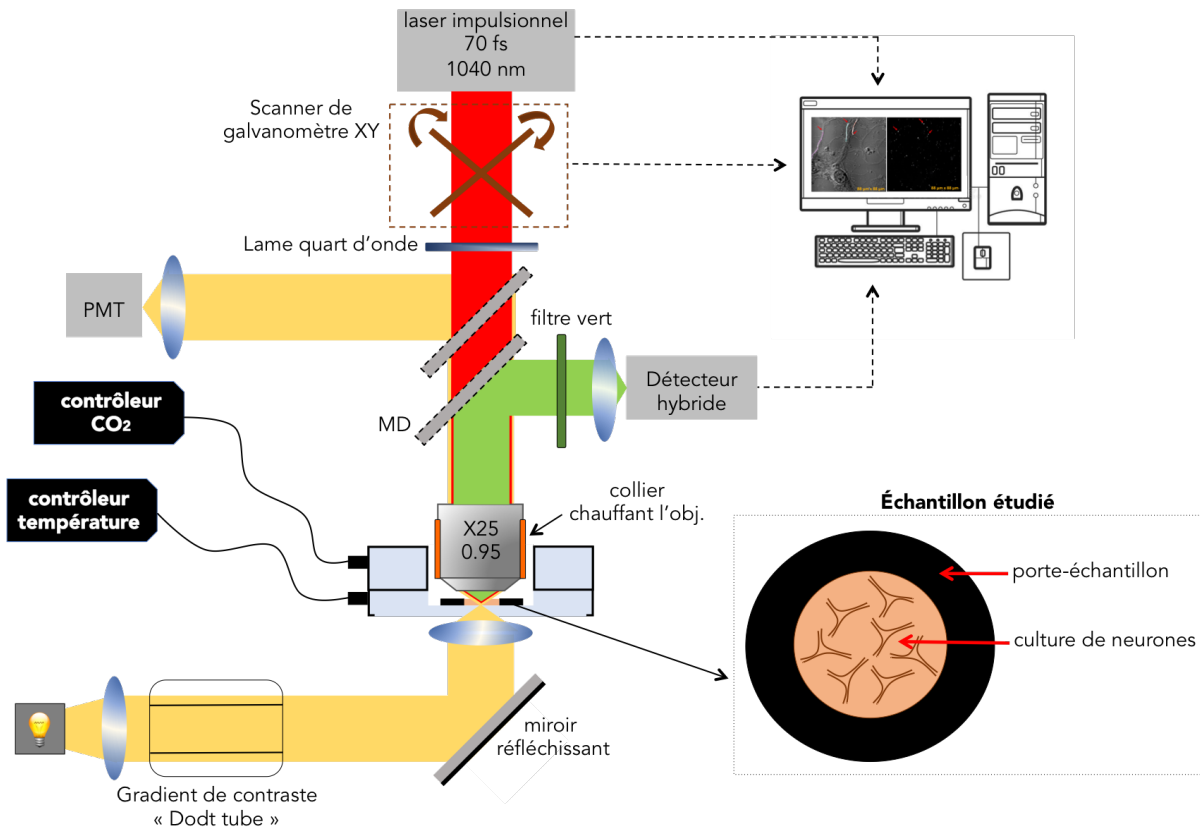


FIGURE 2.15 – Schéma optique du microscope à deux-photons (plateforme PIMPA, Orsay + éléments d’adaptation spécifiques à nos expériences) que nous avons utilisé pour la mesure du transport intraneuronale. En bas à droite, un zoom sur l’échantillon contenu dans la chambre thermostatée est représenté. MD : miroir dichroïque.

En parallèle de l’image du signal SHG, nous enregistrons une image en champ clair (illumination à gradient de contraste Dodt (Dodt et al., 1999) en transmission, détection par un photomultiplicateur conventionnel) des cellules de manière à pouvoir situer les particules dans l’environnement cellulaire (Figure 2.16).

La forte intensité d’émission SHG des nano-KTP associée à la grande susceptibilité non linéaire d’ordre 2 de ce matériau, alliée à la grande sensibilité du détecteur hybride à la longueur d’onde de détection permet d’utiliser le laser d’excitation à une puissance moyenne suffisamment faible (environ 10 mW en sortie de l’objectif) pour ne pas dégrader les cellules tout en continuant à détecter les particules avec un très bon rapport signal sur fond (voir l’annexe E. Nous sommes ainsi parvenus à enre-

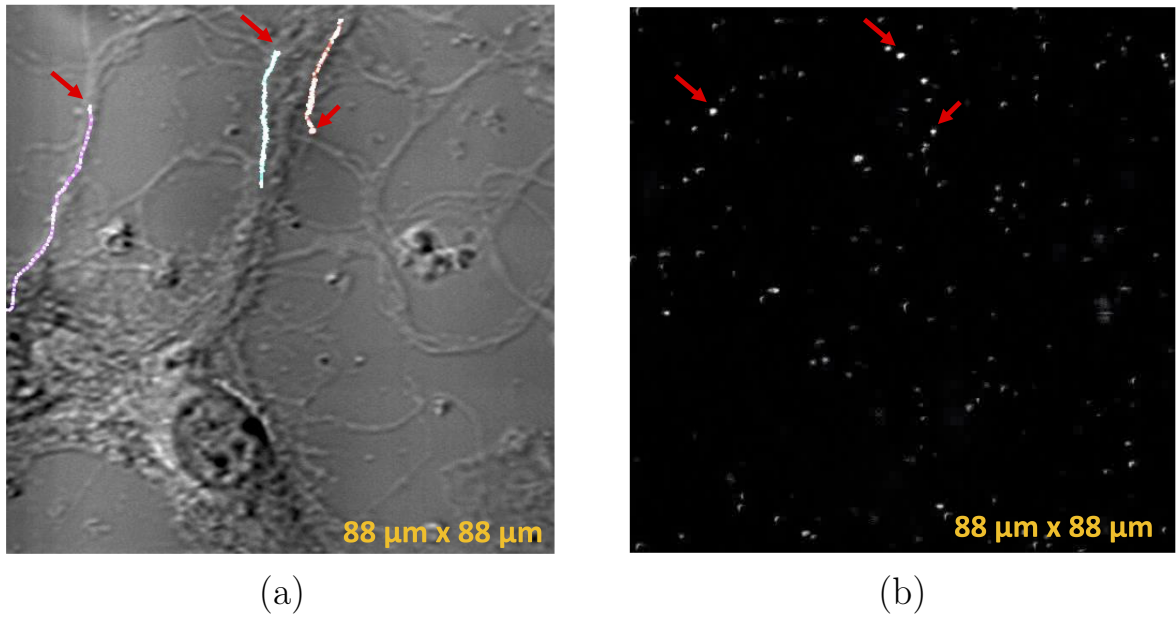


FIGURE 2.16 – Suivi du signal SHG de nanocristaux de KTP (taille ≈ 100 nm) internalisés dans des neurones corticaux de souris en culture. L'étude est réalisée au quatorzième jour de développement des cultures (DIV 14). (a) Un neurone (observé en transmission), sur lequel 3 trajectoires représentatives de nano-KTP ont été superposées. (b) Première image SHG de la séquence enregistrée. Acquisitions sur le microscope biphoton de la plateforme France Life Imaging PIMPA (Orsay), $\lambda_{\text{exc}} = 896$ nm, puissance ≈ 10 mW, filtre passe-bande de détection de la SHG : 448/20 nm. Taille d'un pixel de l'image : 252 nm. Cadence d'acquisition : 2.3 images/s, qui a pu être augmentée par la suite à 20 images/s avec d'autres nanocristaux (*cf* Fig.2.17).

gistrer des déplacements d'endosomes détectés via le signal SHG d'un nano-KTP à une cadence de 20 images par seconde identique à celle utilisée en microscopie champ large de suivi des nanodiamants fluorescents. Néanmoins, pour atteindre cette cadence malgré le système de balayage du spot d'excitation, nous avons dû en contrepartie diminuer la taille du champ étudié et augmenter celle du pixel tout en continuant de respecter le critère d'échantillonnage de Shannon pour ne pas perdre d'information (*cf* section 3.2.1). Comme le montre la figure 2.17, nous avons détecté des déplacements dirigés de particules sur des distances de plusieurs dizaines de micromètres, ce qui sous-entend l'implication de moteurs moléculaires dans la génération de ces mouvements et donc l'internalisation du nano-KTP dans un compartiment endosomal. En effet, si une particule n'a pas été internalisée, elle se retrouve alors à flotter dans le milieu de culture ou bien est accrochée au substrat recouvrant la lamelle de verre ou

sur la membrane plasmique d'un neurone, à l'extérieur. Dans ces cas-là, le déplacement de la particule est caractérisé par un mouvement brownien ou "pendulaire" (dans le cas où elle adhère à la membrane) et est donc bien reconnaissable. De plus, les trajectoires représentées sur la figures 2.17 ont également été découpées en deux phases de mouvement : les phases de mouvements dirigés nommées "GO" (en bleu) et les phases d'arrêt de la vésicule, nommées "STOP" (en rouge). Nous verrons dans le chapitre 3 que cette étape du traitement des données est cruciale car elle permet de définir les paramètres de transport finaux tels que la fréquence des STOP (nombre de STOP par minute), la vitesse curviligne (moyenne des vitesses curvilignes des phases de GO), le temps de pause ou encore la durée des phases de GO.

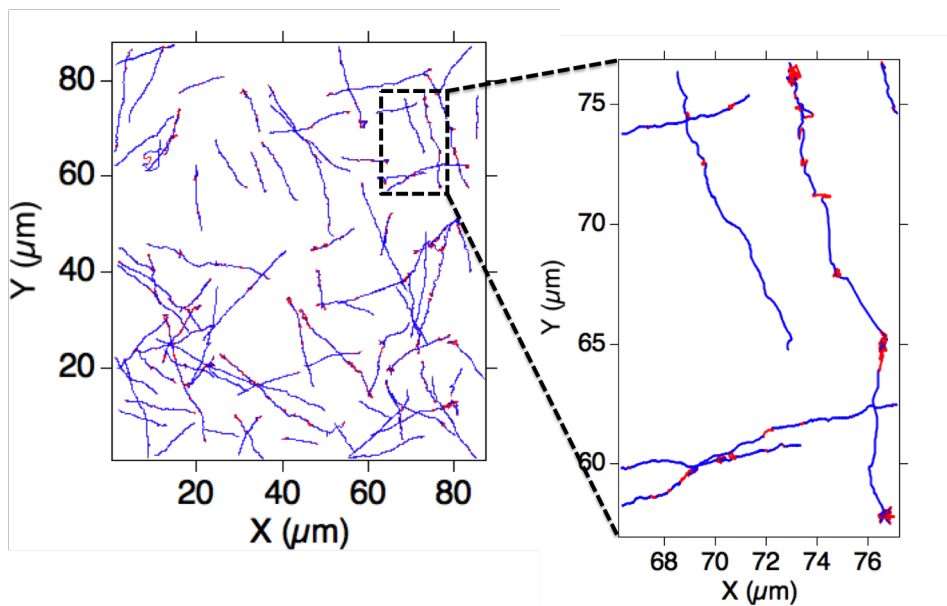


FIGURE 2.17 – Trajectoires typiques de nano-KTP internalisés dans des neurones corticaux de souris en culture (DIV14) enregistrées sur la Plateforme PIMPA, à la cadence de 20 images/seconde. À gauche, 90 trajectoires ont été regroupées artificiellement dans un seul champ ; c'est en réalité l'accumulation d'une dizaine de champs d'observation différents. À droite, on observe un zoom sur quelques trajectoires reconstruites par l'algorithme développé dans notre équipe puis segmentées en phases de mouvement ou de pause : en bleu, les phases de "GO", et en rouge, les phases de "STOP" (voir chapitre 3).

2.3.1.3 Comparaison des transports intraneuronaux de nano-KTP et de FND

Afin de valider notre nouvelle approche de mesure du transport intraneuronal, nous avons comparé les paramètres de transport d'endosomes dans des neurones corticaux de souris en culture obtenus par suivi du signal SHG de nano-KTP (imagerie par balayage du faisceau d'excitation à deux-photons) et par suivi de FNDs (imagerie de fluorescence plein champ pseudo-TIRF) au même stade de développement. La figure 2.18 illustre les résultats obtenus pour deux paramètres majeurs du transport endosomal : la vitesse curviligne et la fréquence des pauses. On constate qu'aucune différence significative n'est observée entre les mesures effectuées avec les FNDs et celles faites avec les nano-KTP. Ces résultats tendent à indiquer que les nano-KTP et les FND sont localisés dans les mêmes compartiments endosomaux et que le changement de méthode d'imagerie ne biaise pas la mesure des paramètres de transport. Ces expériences en culture ont ainsi permis de valider l'extension de notre méthode de mesure du transport intraneuronal à l'utilisation de la microscopie non-linéaire.

2.3.2 Choix du nano-traceur SHG le plus adapté : comparaison des propriétés physico-chimiques et optiques.

Nous avons réalisé des expériences sur des cultures de neurones corticaux avec les trois nanocristaux non linéaires présentés dans la section précédente. Afin de choisir le nano-traceur le mieux adapté à la mesure du transport intraneuronal, nous les avons comparés sur trois propriétés essentielles :

- 1. Les nanoparticules doivent être correctement internalisées dans les neurones.** Une fois intégrées dans les compartiments endosomaux, celles-ci doivent être prises en charge par des moteurs moléculaires et se déplacer de manière dirigée, ce qui caractérise le transport intraneuronal actif que nous souhaitons mesurer et quantifier. Beaucoup de paramètres influencent l'efficacité

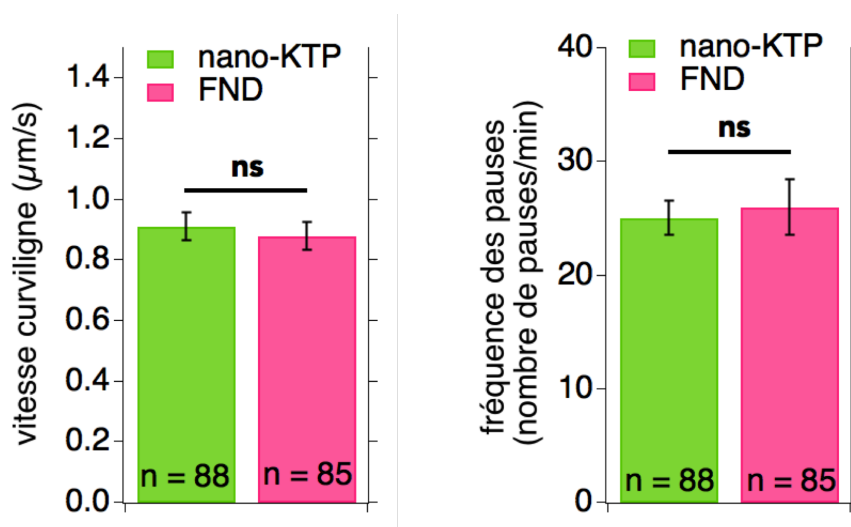


FIGURE 2.18 – Comparaison des paramètres de transport intraneuronal *in vitro* obtenus avec les nanoparticules de KTP (nano-KTP, en vert) et avec les nanodiamants fluorescents (FND, en rose) mesurés au même stade de développement DIV14. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney est effectué en prenant en compte les paramètres de 88 trajectoires de KTP issues de 4 lamelles de culture différentes et 85 trajectoires de FND issues d’une lamelle de culture représentative des paramètres habituellement mesurés. À gauche, on constate que la vitesse curviligne mesurée est la même pour les deux nano-traceurs ($p = 0,38$). À droite, on observe la même chose pour le paramètre de fréquence des pauses ($p = 0,53$) ; ns : non significatif.

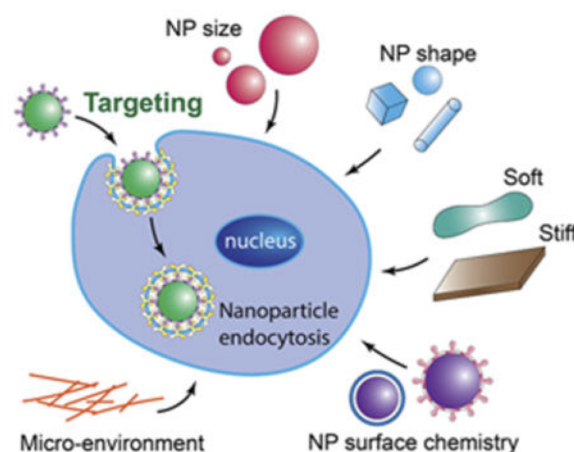


FIGURE 2.19 – Internalisation de nanoparticules dans des cellules : schéma récapitulant les différents paramètres qui influencent l’efficacité d’internalisation. Extrait de (Zhang et al., 2015).

d’endocytose des nanoparticules dans les neurones (Figure 2.19) :

- **La taille** : il est indispensable que la particule ne soit pas trop grosse. Les expériences que nous avons réalisées nous permettent d’estimer une borne

supérieure du diamètre des nanoparticules de l'ordre de 200 nm (Rejman et al., 2004), qui est une dimension typique au-delà de laquelle on peut considérer que le mécanisme d'endocytose n'est plus efficace.

- **La forme** : certaines études montrent que l'internalisation est plus efficace avec des particules sphériques (Zhao and Stenzel, 2018). Les particules que nous utilisons n'ont pas toujours une forme parfaitement définie mais elles sont toujours, en moyenne, comparables à une sphère.
- **L'état de surface** : la rugosité, la rigidité et le potentiel de surface sont des éléments qui peuvent aussi influencer l'internalisation. Les cristaux de KTP et de SiC que nous avons utilisés n'ont pas été fonctionnalisés. Les nano-SiC ont cependant été nettoyés avec des acides forts favorisant la formation de groupements carboxyles en surface, qui, à pH neutre, confèrent une charge négative aux nanoparticules (potentiel zéta ≈ -40 mV). En revanche, les essais d'étude de transport faits avec les nano-BTO ont été réalisés avec les particules de l'équipe de Periklis Pantazis (Pantazis et al., 2010). Ces nano-BTO sont recouverts de poly-éthylène glycol greffé de façon covalente à leur surface (nano-BTO-PEG). Malgré le fait que le PEG réduise les interactions non spécifiques de la particule avec les biomolécules environnantes (Zhao and Stenzel, 2018), ce traitement de surface n'a pas empêché l'internalisation des nano-BTO-PEG dans les neurones en culture. Cela résulte sans doute du fait que ce traitement les maintient bien séparées les unes des autres et permet aussi une "circulation" plus longue avant la rencontre d'un site d'interaction avec les neurones.

2. **Les nanoparticules ne doivent pas engendrer de toxicité.** Au cours de chacune de nos expériences, nous n'avons pas constaté de toxicité liée à la présence de nanoparticules, que ce soient les cristaux de BTO, KTP ou SiC. En effet, le transport intraneuronal est un indicateur permettant de vérifier que les cellules sont toujours vivantes. Chaque lamelle de culture de neurones est étudiée

pendant une à deux heures sous microscope et aucune modification du transport n'est détectée entre le début et la fin de l'expérience. À l'inverse, il nous est arrivé de travailler avec des solutions de nanoparticules très agrégées formant des amas de l'ordre de quelques micromètres et engendrant alors un arrêt brutal du transport lié à la présence de ces corps étrangers trop encombrants.

3. Les nanoparticules doivent avoir une intensité d'émission SHG élevée.

Ceci est garanti par des coefficients non-linéaires d_{il} où $(i, l) = (1, \dots, 6)$ suffisamment grands (cf section 2.2.3.1). Cela est un élément essentiel pour obtenir une cadence d'acquisition élevée permettant de détecter des pauses courtes. Par ailleurs, certains cristaux ont un diagramme de rayonnement du signal SHG anisotrope, en raison notamment de la prédominance d'un coefficient d_{il} sur les autres. On observe dans ce cas le scintillement du signal SHG collecté par l'objectif de microscope lors de la rotation du nanocristal et de son axe cristallographique.

Il est alors possible de relier la puissance du rayonnement SHG collecté par l'objectif $P_{2\omega}(\theta)$ à l'angle polaire θ du cristal (Figure 2.20). Dans le cas général, le raisonnement permettant d'obtenir cette relation est décrit très précisément dans la référence (Lethiec et al., 2014). Dans notre cas particulier du rayonnement SHG d'un dipôle excité par un champ polarisé circulairement, les calculs (détaillés dans l'annexe F) sont simplifiés et la relation obtenue est :

$$P_{2\omega}(\theta) = |\vec{p}_3|^2 \times \pi \cos(\alpha_{\max}) \sin^2(\alpha_{\max}) \sin^2(\theta) + 2\pi \left(\frac{2}{3} + \frac{\cos^2(\alpha_{\max}) - 3 \cos(\alpha_{\max})}{3} \right), \quad (2.3)$$

où $\vec{p}_3$ est le diôle considéré et $\alpha_{\max}$ l'angle maximal de collection du signal par l'objectif.

Par ailleurs, la résolution temporelle est un élément crucial car elle influence grandement la précision avec laquelle nous quantifions les paramètres de trans-

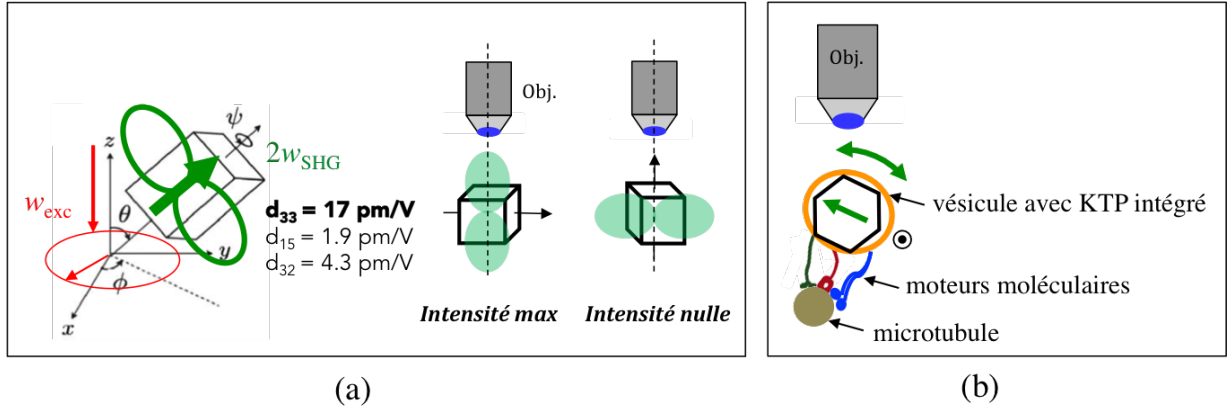


FIGURE 2.20 – Dépendance du signal SHG d’un nano-KTP en fonction de son orientation par rapport à l’objectif de microscope. (a) Schéma représentant qualitativement le rayonnement SHG du nano-KTP, montrant son anisotropie : chaque nanocristal peut être considéré en première approximation comme un dipôle du point de vue de sa réponse optique non-linéaire. On représente également en rouge le faisceau d’excitation polarisé circulairement. À droite, les configurations “extrêmes” sont représentées : celle où le dipôle est orienté perpendiculairement à l’axe de l’objectif de microscope (intensité max) et celle où le dipôle est parallèle à ce même axe (intensité nulle). (b) Schéma d’un nano-KTP internalisé dans une vésicule (orange) ayant un mouvement de rotation autour du microtubule : les fluctuations d’intensité permettent de remonter à l’angle polaire θ entre le nanocristal et l’axe de collection du signal.

port. Nous avons décidé d’obtenir au moins une cadence de 20 images par seconde qui correspond à la résolution temporelle que nous utilisons avec les FNDs en microscopie de fluorescence en champ large qui s’était avérée suffisante pour mettre en évidence des anomalies subtiles du transport (Haziza et al., 2017).

Le tableau donné en figure 2.21 résume quelques **propriétés de réponses non-linéaires** et de **caractéristiques physico-chimiques** des trois nanoparticules étudiées. On constate que les nano-KTP et les nano-BTO sont très bien internalisés dans les neurones. En revanche, les nano-SiC ne sont pas internalisés de manière très efficace. Nous pensons que cela est dû à leur état d’agrégation. En effet, malgré nos essais de désagrégation par sonication ultrason à haute intensité, les particules restent agglomérées les unes aux autres. On retrouve ici le fait que la taille des particules influence grandement l’intégration des nano-traceurs dans les vésicules. On peut aussi noter que malgré leur fonctionnalisation par PEG, les nano-BTO-PEG sont correctement inter-

Nanoparticule	SiC	BTO	KTP
Toxicité	aucune	aucune	aucune
Internalisation	Difficile	OK	OK
Diamètre	75 nm	80 nm	100 nm
État de surface	couche de SiO ₂	traitement PEG	aucun traitement
Forme	plutôt sphérique	plutôt sphérique	plutôt sphérique
Stabilité colloïdale	mauvaise : <i>particules très agrégées</i>	bonne : <i>solution bien dispersée</i>	assez bonne : <i>solution bien dispersée mais agrégation possible dans le temps</i>
Intensité du signal	faible	faible	élevée (x10)
Dépendance en polarisation du rayonnement SHG	Isotrope <d> = 29 pm/V	Anisotrope d ₃₁ = 14.4 pm/V d ₁₅ = 13.7 pm/V d ₃₃ = 5.5 pm/V	Anisotrope d ₃₃ = 17 pm/V d ₃₂ = 1.9 pm/V d ₃₁ = 4.3 pm/V
Fluctuation du signal	non	oui	oui

FIGURE 2.21 – Tableau récapitulatif des propriétés physico-chimiques et optiques non-linéaires des trois nanocristaux utilisés. Coefficients non linéaires extraits de (Rogov et al., 2016) pour les SiC et (Shea, 2004) pour les BTO et KTP.

nalisés.

Concernant le signal SHG, parmi les trois traceurs, les nano-KTP sont ceux qui donnent un signal d'un ordre de grandeur supérieur aux autres (voir l'annexe G). Cela est lié à deux paramètres importants : les propriétés intrinsèques du cristal d'une part (la valeur des coefficients non linéaires caractérisant un cristal définit l'intensité du rayonnement SHG dans les trois directions de l'espace), et le volume de la particule d'autre part, dont dépend fortement l'intensité émise. L'intensité du signal de SHG est effectivement proportionnelle au carré du volume de la particule : une légère diminution du diamètre de l'émetteur a de grandes conséquences sur l'intensité d'émission. Ainsi, même si le coefficient non linéaire du SiC est un facteur 2 plus grand (Rogov et al., 2016) que celui du KTP, il s'avère qu'expérimentalement, le signal SHG des nano-SiC est plus faible que celui des nano-KTP, à cause peut-être de la différence de qualité cristallographique des particules ou du fait qu'il s'agisse d'agrégats de monocristaux d'axes cristallographiques non confondus.

En raison de différences de leur symétrie cristalline, les trois types de nanocris-

taux ont une **réponse en polarisation** et des **diagrammes de rayonnement** très différents. Pour s’affranchir de la réponse en polarisation à l’excitation, nous avons systématiquement utilisé un faisceau d’excitation polarisé circulairement. Compte tenu de la symétrie cubique du polytype 3C utilisé, les nano-SiC ont la particularité d’avoir un rayonnement SHG isotrope. À l’inverse, les BTO et KTP ont des coefficients non-linéaires différents selon les directions de l’espace avec un coefficient dominant, conduisant à une direction privilégiée d’émission. Cette anisotropie est responsable d’un clignotement de la particule pendant son mouvement qui indique que la vésicule qui la contient tourne relativement à la direction de collection du signal². Ce clignotement est un désavantage pour le suivi précis de la particule dans son déplacement puisqu’il conduit à perdre le signal comme c’est le cas avec les QDs. Néanmoins, il permet d’obtenir une information supplémentaire sur le mouvement de rotation de la vésicule. La figure 2.20 illustre le lien existant entre les fluctuations du signal SHG collecté et l’orientation du nanocristal de KTP par rapport à l’axe optique de collection. Le fait de pouvoir associer les mouvements de rotation du cristal au mouvement de la vésicule présuppose qu’elle ne contienne qu’un **seul nanocristal** et que ce dernier soit **immobile** par rapport à elle.

Pour les nano-KTP, nos observations d’un clignotement on-off durant le déplacement dirigé de toutes les vésicules observées, est une preuve indirecte du fait qu’elles ne contiennent qu’un seul nanocristal. En effet, si les nano-KTP étaient plusieurs à l’intérieur d’une même vésicule, nous n’observerions pas de clignotement aussi contrasté car les axes cristallographiques des différents cristaux n’ont pas de raison d’être alignés si bien que le diagramme d’émission tendrait vers celui d’un émetteur isotrope.

Nous pouvons par ailleurs proposer des arguments simples en faveur d’une **particule immobile** par rapport à l’endosome qui la contient. En effet, si l’on revient sur le processus d’internalisation des nanoparticules par endocytose, il s’effectue en plusieurs

2. On fait ici l’hypothèse, discutée plus loin, que la taille de la vésicule est ajustée à celle de la particule et que cette dernière ne bouge pas relativement à la vésicule.

étapes que nous présentons sommairement d'un point de vue mécanique, sans prendre en compte les spécificités des différentes voies. Dans un premier temps, la particule se pose sur la membrane du neurone et y adhère sans doute par interaction électrostatique dans notre cas. Dans un deuxième temps, l'énergie d'adhésion est transformée en énergie de courbure et d'allongement de la membrane pour qu'elle englobe la particule, comme le montre la figure 2.22.



FIGURE 2.22 – Schéma des étapes d'internalisation par endocytose d'une nanoparticule en contact avec la membrane plasmique d'une cellule. Le coefficient η nommé "wrapping" correspond au degré d'"enrobage" de la particule par la membrane. Extrait de la référence (Zhao and Stenzel, 2018).

Il existe un optimum de taille pour obtenir une endocytose efficace. Une particule trop "petite" nécessite une énergie de courbure supérieure à celle d'interaction (faible en raison de la petite surface de contact), tandis que pour une "grosse" particule la déformation est très lente. Il a été montré que la taille conduisant à l'internalisation la plus rapide était dans la gamme 20-30 nm en fonction du type d'interaction particule-membrane (force de van der Waals, force électrostatique, interaction récepteurs-ligands...) (Zhao and Stenzel, 2018). Les nanocristaux non-linéaires que nous utilisons ont une taille supérieure à cette valeur optimale : leur internalisation n'est donc pas la plus efficace, et nécessite de laisser du temps à la membrane pour se déformer et créer de nouvelles zones d'interactions surfaciques qui fournissent à leur tour l'énergie nécessaire pour qu'elle poursuive sa déformation, jusqu'à englober totalement la particule ($\eta = 1$ sur la figure 2.22). Enfin, l'invagination produite se referme et se détache de la membrane vers l'intérieur de la cellule, créant alors une vésicule contenant la nanoparticule. Bien que nous ne l'ayons pas rigoureusement démontré, le

processus d’internalisation aboutit à ce que la membrane enrobe la nanoparticule au plus près d’elle, ne lui laissant alors pas de degré de liberté pour bouger à l’intérieur. La particule est donc très certainement immobile par rapport à la vésicule.

Nos observations expérimentales sont en accord avec cette situation. En effet, nous nous avons comparé l’amplitude des fluctuations d’intensité SHG (reliées aux fluctuations d’angle polaire) le long d’une trajectoire d’endosome pendant les phases de mouvement à celle pendant les pauses. Si le nano-KTP était libre de tout mouvement à l’intérieur de son endosome, les fluctuations angulaires ne devraient pas différer entre les deux phases. La figure 2.23 montre que les fluctuations du signal SHG sont significativement plus importantes pendant les phases de mouvement de la vésicule que pendant les phases de STOP. Ce résultat est issu des 88 trajectoires de nano-KTP enregistrées sur la plateforme PIMPA (Figure 2.17). Cette observation est en accord avec le fait que les nano-KTP sont bien liés fermement aux vésicules qui les transportent. De plus, la variance des fluctuations d’intensité étant plus faible pendant les phases de STOP que pendant les phases de GO il semblerait que les vésicules soient davantage contraintes pendant les STOP, que durant les GO, où la vésicule aurait un mouvement de rotation plus libre.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons tout d’abord présenté quelques traceurs biologiques inorganiques usuellement utilisés pour mesurer et quantifier des phénomènes dynamiques à l’échelle subcellulaire. Nous avons vu que parmi les sondes les plus connues telles que les *quantum dots*, les nanodiamants fluorescents ou encore les nano-bâtonnets d’or, les nanocristaux à réponse optique non linéaire capables d’émettre un signal SHG sont très prometteurs dans le cadre de l’imagerie de phénomènes dynamiques dans des échantillons *in vivo* épais (quelques centaines de micromètres). Après avoir brièvement exposé quelques exemples d’utilisation de ces traceurs SHG que l’on trouve dans la lit-

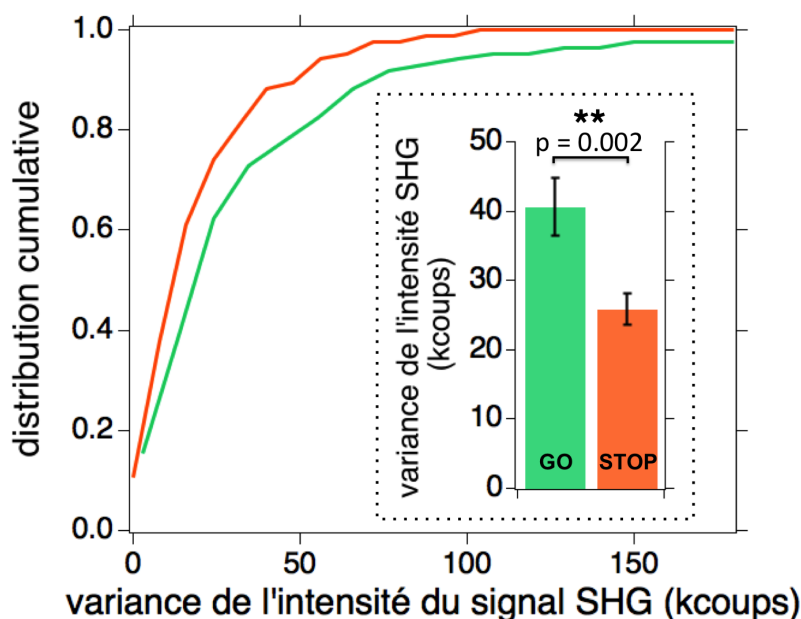


FIGURE 2.23 – Fluctuations d'intensité du signal SHG d'un nanocristal, pendant les deux phases du déplacement de la vésicule qui le contient. Chaque trajectoire est découpée en phases de mouvement : les GO (en vert) et les STOP (en rouge). La moyenne de la variance de l'intensité de toutes les phases de GO est calculée; de même pour les phases de STOP. On constate sur le graphique encadré que la variance de l'intensité des phases de STOP est significativement inférieure à celle des phases de GO. On représente aussi les distributions cumulatives qui montrent de la même manière un décalage de la distribution vers les faibles valeurs de variance pour les phases de STOP. Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney est effectué.

térature, nous avons décrit la manière dont nous pouvons tirer avantage des propriétés optiques de certains de ces nanocristaux afin de suivre par microscopie biphotonique leur dynamique après leur internalisation dans des neurones en culture. Les expériences préliminaires dans des neurones corticaux de souris en culture que nous avons décrites ont permis de vérifier des éléments essentiels nécessaires à l'extension de cette méthode à l'étude des circuits neuronaux plus complexes et plus épais que nous avons ensuite menée (transport dans le cerveau de larves de poisson zèbre, chapitre 4). Nous avons ainsi testé trois nano-traceurs SHG différents (KTP, BTO et le carbure de silicium) en terme d'internalisation dans les neurones en culture. Les nano-KTP et nano-BTO sont les deux qui sont internalisés le plus facilement. Par ailleurs, la comparaison des propriétés optiques de ces trois traceurs a montré que le nano-KTP était le traceur à

réponse SHG le plus adapté dans le cadre de notre application. De plus, le KTP ayant une émission SHG très directionnelle, le nano-KTP peut permettre de sonder l'orientation de la vésicule pendant son déplacement. Pour cette raison, nous avons décidé de poursuivre nos travaux en utilisant uniquement des nanocristaux de KTP afin de mesurer le transport intraneuronal *in vivo* dans le cerveau de larves de *zebrafish*.

Chapitre 3

Méthode de reconstitution et d'analyse de trajectoires de nanoparticules uniques

Sommaire

3.1	Introduction	82
3.2	Détection des émetteurs et extraction de trajectoires brutes	84
3.2.1	Méthodes usuelles de suivi d'émetteurs uniques	84
3.2.2	Précision de localisation : limite théorique et mesure	92
3.2.3	Détection des nanoparticules dans les scans et extraction de trajectoires à l'aide du module Python <code>Trackpy</code>	106
3.3	Traitement et tri des trajectoires	111
3.3.1	Filtrage spatial des coordonnées des trajectoires	112
3.3.2	Tri des trajectoires : critère de seuillage du déplacement quadratique moyen	117
3.4	Segmentation d'une trajectoire et extraction des paramètres de transport	121
3.4.1	Méthodes usuelles de segmentation de phénomènes biologiques dynamiques	121
3.4.2	Méthode de segmentation automatique mise en place et extraction des paramètres de transport	126
3.5	Bilan	129

3.1 Introduction

La méthode de suivi d'émetteurs uniques (nommée “*Single-particle tracking*” (SPT) en anglais) est une technique de microscopie utilisée depuis plus de 25 ans permettant d'étudier le comportement dynamique dans le temps et l'espace de divers systèmes biologiques (Manzo and Garcia-Parajo, 2015; Shen et al., 2017; Hou et al., 2019; Yu et al., 2019). Elle a notamment permis de mieux comprendre l'organisation et la mobilité des différentes entités constituant la membrane plasmique (Jacobson et al., 2019; Kusumi et al., 2010), d'observer la dynamique de molécules et protéines dans des cellules vivantes (Kusumi et al., 2014) ou encore d'apporter des éclairages sur les mécanismes de déplacements des moteurs moléculaires et des vésicules qu'ils transportent (Yildiz, 2003; Kaplan et al., 2018). Dans le travail présenté ici, nous avons développé nos propres méthodes SPT pour mesurer le déplacement de vésicules dans des branches de neurones en culture afin de quantifier le plus précisément possible les paramètres du transport intraneuronal (Haziza et al., 2017).

Malgré les grandes avancées qu'a permis le développement de la SPT, extraire des informations précises et avec le moins d'artefacts possible des données recueillies expérimentalement reste un défi du fait de nombreuses sources d'incertitudes. Ces dernières proviennent tout d'abord de l'expérience elle-même : photo-blanchiment, auto-fluorescence cellulaire, images bruitées, vibrations mécaniques de l'instrument, émetteurs sortant du plan d'imagerie, ... Par ailleurs, le traitement numérique des données expérimentales, consistant à repérer et superlocaliser les particules, puis à reconstruire des trajectoires à partir des points obtenus est une autre source d'imprécision. En effet, nous verrons plus loin que les algorithmes mis en jeu dans ces étapes de traitement ne sont pas parfaits et peuvent introduire des erreurs de détection et de reconstruction de trajectoire. Enfin, l'analyse elle-même peut introduire des biais : par exemple, comment distinguer une trajectoire d'intérêt, c'est-à-dire celle d'une particule portée au sein d'une vésicule par des moteurs moléculaires, d'une trajectoire de particule flottant

dans le milieu de culture. Les techniques de SPT peuvent ainsi mener à des résultats trompeurs si certaines précautions ne sont pas prises. Il est essentiel de développer des solutions permettant de rendre l'utilisation de cette méthode la plus rigoureuse possible.

Ce chapitre traite des méthodes d'analyses que nous avons mises au point pour étudier le transport intraneuronal afin de limiter ces sources d'incertitudes et d'optimiser la sensibilité de notre mesure. L'enjeu est d'être capable de détecter les plus petites variations possibles des paramètres de transport dans des neurones issus de modèles pathologiques (cf section 4.3). Nous souhaitons aussi pouvoir traiter rapidement un grand nombre de données. À l'issue d'une seule expérience, une centaine de films qui doivent être analysés est en effet enregistrée ; il s'agit alors d'extraire efficacement toutes les trajectoires de vésicules présentes dans chacun des films ainsi que les paramètres quantitatifs associés à leur déplacement.

Nous nous intéressons exclusivement dans ce chapitre au traitement et à l'analyse des données expérimentales :

- **Détection des émetteurs et extraction de trajectoires brutes** (cf section 3.2). Ces premières étapes nous amènent à définir une précision de localisation qui est une quantité importante pour la suite.
- **Lissage et tri des trajectoires** (cf section 3.3).
- **Segmentation de la trajectoire en phases de mouvements et extraction de paramètres de transport** (cf section 3.4).

3.2 Détection des émetteurs et extraction de trajectoires brutes

3.2.1 Méthodes usuelles de suivi d'émetteurs uniques

Durant une expérience de mesure de transport intraneuronal, nous enregistrons une centaine de films d'une durée totale de 2 min à une cadence de 20 images par seconde. Les vidéos acquises sont une série d'images contenant chacune les réponses optiques individuelles de chaque émetteur à un instant donné. En visionnant les vidéos en mode accéléré, un observateur constate que chaque film contient typiquement, dans nos conditions expérimentales, une dizaine de trajectoires dirigées de vésicules neuronales pour un champ de vue de l'ordre de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Une fois ces données brutes acquises, la première étape du processus d'analyse automatique consiste à repérer le plus précisément possible les nanoparticules optiquement actives. Il s'agit de localiser les centroïdes des spots correspondant aux nanoparticule dans chaque image de la vidéo. La seconde étape du traitement consiste à reconstruire des trajectoires à partir des positions des centroïdes sur chaque image. Il est intéressant de noter que les principes de détection et de localisation en imagerie SPT sont similaires à ceux des méthodes de super-résolution reposant sur la détection de molécules uniques telles que la microscopie PALM (*Photo-Active Localization Microscopy*) ou encore la technique STORM (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*). Ainsi les méthodes d'analyse développées pour ces techniques peuvent servir à l'analyse d'images SPT.

Il existe différentes stratégies de suivi comportant chacune leurs avantages et inconvénients en fonction de leur algorithme de détection d'une part et de celui de reconstruction de trajectoires d'autre part. Le choix de la stratégie de suivi dépendra de la nature des données traitées (films plus ou moins bruités, densité des émetteurs au sein d'une image, phénomène biologique dynamique lent ou rapide, ...).

3.2.1.1 Algorithmes de détection et localisation des nanoparticules dans chaque image

L’une des propriétés remarquables des techniques récentes de microscopie de fluorescence (au sens large), et donc des méthodes SPT, est la possibilité de localiser la position des émetteurs avec une précision bien plus grande que la limite de diffraction du microscope : on appelle cela la “superlocalisation”.

A la fin du 19^{ème} siècle, Ernst Abbe démontre que la résolution d’un microscope est fondamentalement limitée par la diffraction à travers les optiques du système d’imagerie. Ainsi, la lumière émise par une source ponctuelle (une molécule de colorant unique par exemple) dans le plan objet n’induit pas un unique point dans le plan image mais une distribution d’intensité appelée réponse impulsionnelle (PSF pour *Point Spread Function*). Dans le cas d’un système optique à ouverture circulaire, cette PSF prend la forme d’une “tache d’Airy” dont le rayon ρ_A dépend de l’ouverture numérique (ON) du système et de la longueur d’onde d’excitation λ (dans le cas d’un système d’imagerie à balayage) selon la formule :

$$\rho_A = \frac{1.22\lambda}{2ON} \quad (3.1)$$

La forme de cette PSF est modifiée pour les méthodes d’imagerie non linéaires¹ telle que la microscopie à excitation à deux photons. Par exemple, en microscopie deux photons, le profil de la réponse optique de l’objet est proportionnelle au carré du profil d’intensité du faisceau d’excitation (Figure 3.1). Le rayon de la PSF est donc diminué d’un facteur $\sqrt{2}$. Néanmoins, on peut noter qu’il n’y a pas de gain en résolution pour cette technique qui nécessite d’utiliser une longueur d’onde d’excitation deux fois plus grande que la microscopie de fluorescence conventionnelle à un photon.

À la limite de diffraction et dans les conditions usuelles d’imagerie, la PSF s’étale sur plusieurs pixels du capteur matriciel. Il est alors possible d’utiliser cette PSF pour

1. Le terme de “non-linéarités” désigne une relation non linéaire entre l’éclairement de l’objet et sa réponse optique.

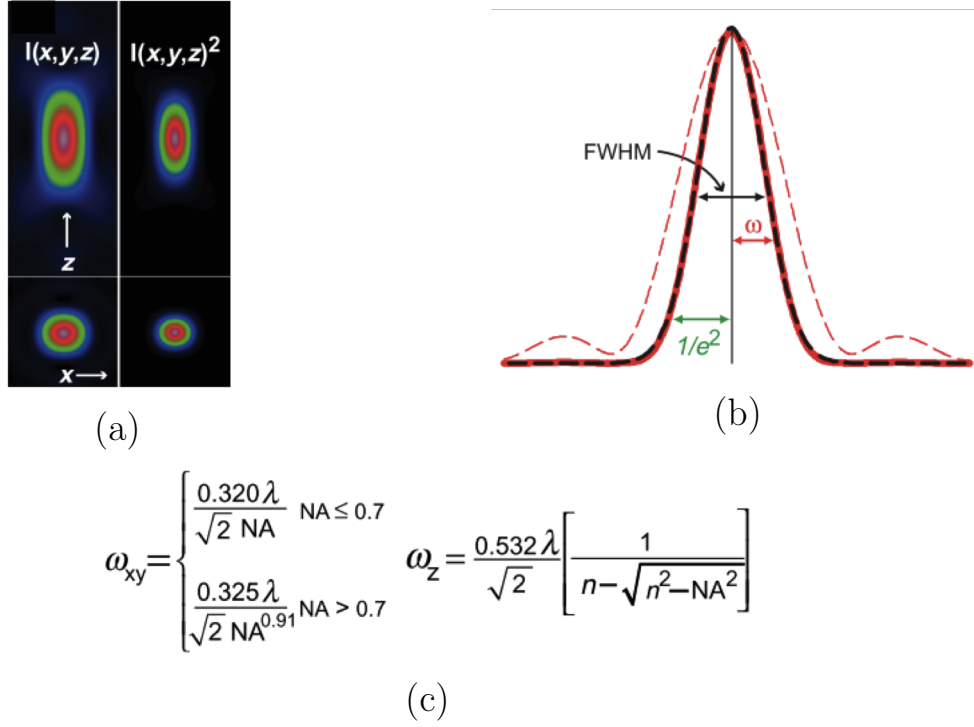


FIGURE 3.1 – Réponse optique obtenue pour une excitation à deux photons. (a) Profil axial et latéral du faisceau d’excitation $I(x, y, z)$ et de son carré $I^2(x, y, z)$, dont la réponse à deux photons est proportionnelle. (b) Profil axial du faisceau d’excitation $I(0, 0, z)$ (en pointillés rouges) et du profil non linéaire induit $I^2(0, 0, z)$ (en ligne continue rouge) avec sa courbe d’ajustement gaussien (pointillés noirs). (c) Equation permettant de calculer la demi-largeur à $1/e$ du profil axial (ω_z) et latéral (ω_{xy}) de la PSF en microscopie à deux photons, où n est l’indice de réfraction du milieu (ici proche de celui de l’eau) et NA, l’ouverture numérique. Adaptée de la référence (Zipfel et al., 2003)

déconvoluer l’image obtenue et déterminer avec une grande précision, bien meilleure que la longueur d’onde, la position de la particule. En pratique, nous n’effectuons pas de déconvolution informatique des images mais une simple recherche de barycentre (Jia et al., 2010), ce qui permet aussi d’atteindre des précisions de localisation de l’ordre de la dizaine à quelques dizaines de nanomètres. On parle alors de super-localisation. Par ailleurs, il faut bien sûr faire attention à ne pas être limité par l’échantillonnage, et il est essentiel de respecter le critère de Shannon, c’est-à-dire que la taille du pixel numérique dans le plan d’imagerie doit être inférieure à $\frac{\rho_A}{2}$. Dans le cas de nos études de transport intraneuronal dans les larves de poissons zèbre, l’objectif a une ouverture numérique ON=0.95, si bien qu’à la longueur d’onde d’excitation de 1040 nm, la réponse optique

à une excitation deux photons a un rayon d’Airy $\rho_A = \frac{1.22 \times 1040}{2 \times 0.95 \times \sqrt{2}} = 472 \text{ nm}$, et il faut alors choisir une taille de pixel inférieure à $\frac{\rho_A}{2} = 236 \text{ nm}$. Lorsque cette condition est réalisée, on peut décrire la précision de localisation à l’aide d’une expression analytique (cf section 3.2.2). Il est important de noter que la localisation des nanoparticules s’effectue en deux temps : d’abord le repérage des spots puis la détermination de la position précise de l’émetteur.

La méthode la plus communément utilisée pour **repérer les particules** consiste à détecter les maximums locaux d’intensité présents dans l’image et séparés d’une certaine distance définie par l’expérimentateur. Ces pixels sont alors identifiés comme des “candidats” possibles d’émetteurs uniques. À la suite de ce repérage, il est usuel d’effectuer un ajustement de la figure d’émission de la particule par une fonction gaussienne qui s’avère être une très bonne approximation de la PSF du système optique. Cette approche a l’avantage d’amener à une très bonne précision de localisation (MK Cheezum and Guilford, 2001; Abraham et al., 2009) ; en revanche, elle nécessite l’utilisation de processus itératifs d’optimisation coûteux en temps tels que la méthode de l’estimation du maximum de vraisemblance ou bien la méthode des moindres carrés non linéaire. C’est entre autre pour pallier cette limitation qu’une approche alternative de repérage d’émetteurs uniques a été développée. Celle-ci repose sur une **méthode de segmentation “par ondelettes”** et permet de gagner un facteur 20 sur le temps de calcul (Izeddin et al., 2012). Cet algorithme de filtrage permet d’isoler des structures de dimension donnée. Il permet alors une reconstruction de l’image initiale avec uniquement les détails pertinents. Dans le cadre de la détection d’émetteurs uniques, l’algorithme le plus approprié est appelé “à trou” (Holschneider et al., 1989). Il permet un repérage rapide et précis des spots. L’image de départ est décomposée en plusieurs images qui montrent chacune des détails d’échelles de tailles croissantes. La première composante issue de cette décomposition en ondelettes contient ainsi les hautes fréquences spatiales, c’est à dire principalement le bruit de l’image de départ, tandis que la deuxième composante contient les structures ayant une taille proche de celle de la limite de dif-

fraction et est donc bien adaptée à la détection des émetteurs uniques. C'est sur cette deuxième composante que le repérage des spots est effectué grâce à l'application d'un seuil en intensité qui permet d'isoler des groupes de pixels qui forment les différents spots présents dans l'image (Izeddin et al., 2012). L'utilisation de la décomposition en ondelettes pour un premier repérage des émetteurs a l'avantage d'être rapide et parfaitement adaptée à l'analyse d'images très bruitées, comme le montre la figure 3.2. Il est intéressant de noter que dans le cadre de la détection par microscopie deux photons du signal de génération de seconde harmonique par des nanocristaux à réponse optique non linéaire, l'utilisation du traitement par ondelettes perd en intérêt car les images d'origine ont déjà un très bon rapport signal sur fond grâce à un fond d'intensité quasi nulle.

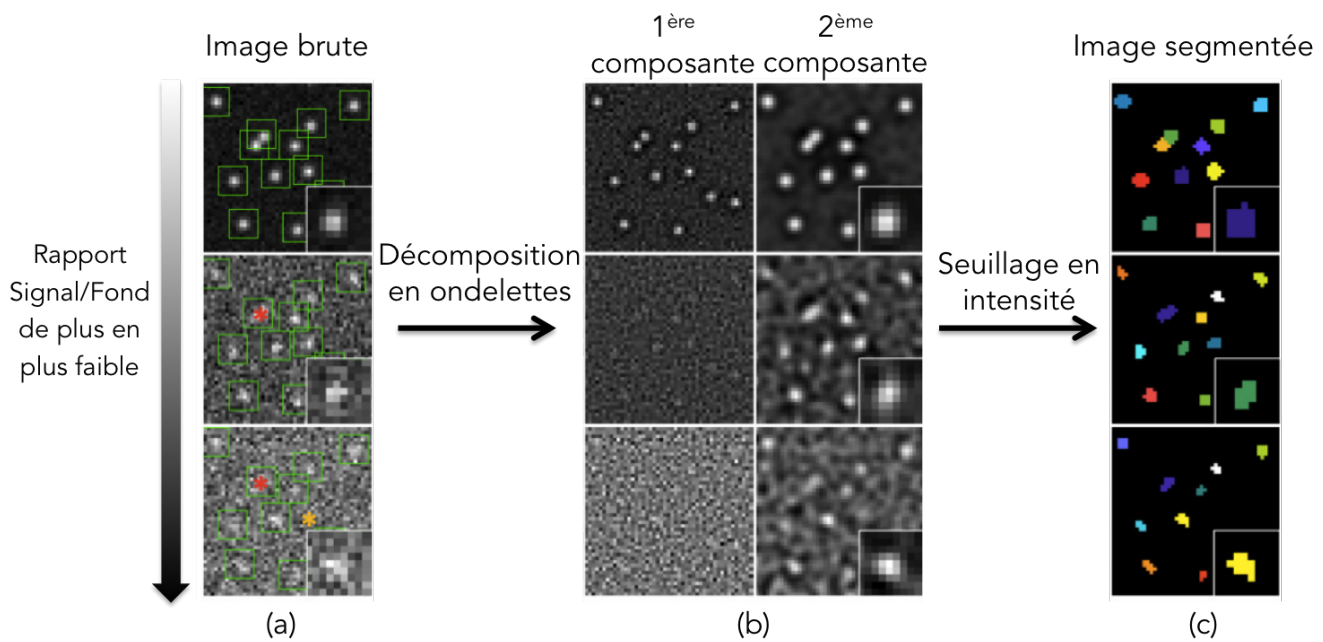
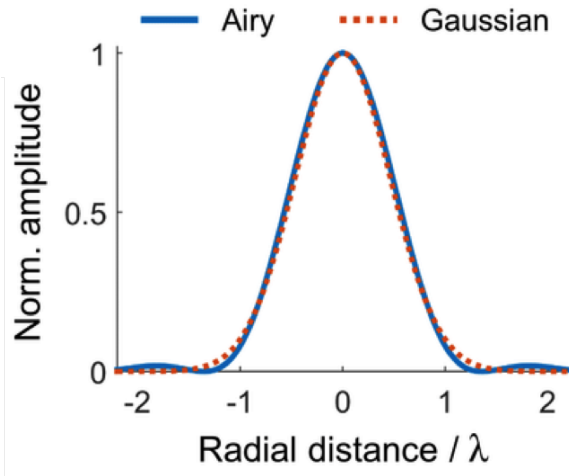


FIGURE 3.2 – Traitement par ondelettes d'une image comportant des spots associés à la fluorescence d'émetteurs individuels, dans des situations où l'image de départ est de plus en plus bruitée (de haut en bas). (a) Image brute à analyser ; les émetteurs que l'on souhaite repérer sont encadrés en vert. (b) Première et deuxième composantes de la décomposition en ondelettes. (c) Application d'un seuil d'intensité sur la deuxième composante de la décomposition en ondelettes afin d'isoler les spots d'intérêts. Adapté de (Izeddin et al., 2012).

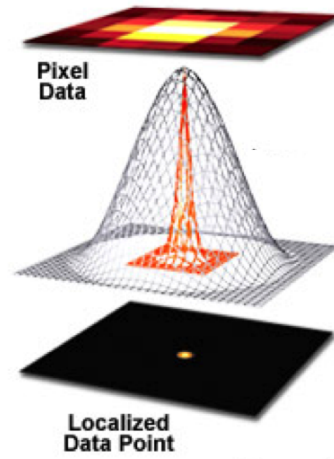
Qu'on choisisse d'utiliser la segmentation par ondelettes ou bien la détection des

maximums locaux suivie d'un ajustement gaussien, à l'issue de cette étape de repérage des spots, ces derniers sont décrits par un groupe de pixels bien définis : les pixels présents sous la gaussienne d'ajustement dans un cas et les pixels isolés par la segmentation en ondelettes (Figure 3.2) dans l'autre cas. L'étape suivante consiste alors à localiser précisément les nanoparticules. Dans le cas de l'ajustement gaussien, la position du maximum de la gaussienne donne directement la position la plus probable de l'émetteur avec une précision de localisation théorique de l'ordre du nanomètre (Izeddin et al., 2012) (Figure 3.3). Une seconde possibilité consiste à localiser chaque spot par le barycentre des intensités des pixels qui le composent (Deschout et al., 2014). Le choix entre ces deux approches doit se faire en fonction du phénomène biologique observé afin de localiser les émetteurs avec une précision maximisée. En effet, il a été montré que la méthode très répandue d'ajustement gaussien n'est pas optimale dans le cadre de la détection de particules en mouvement car le déplacement des émetteurs durant l'acquisition de chaque image du film peut altérer la forme du spot qu'ils produisent sur le capteur. Dans les faits, si on compare la forme d'un spot produit par un émetteur fixe à celle produite par ce même émetteur en mouvement, on constate une déformation du spot qui nuit à la précision de l'ajustement gaussien. Il est plus adapté dans ce cas d'utiliser la méthode de localisation du centre de masse afin d'obtenir une précision de localisation optimale (Deschout et al., 2012, 2014).

Ces différentes méthodes de détection permettent toutes d'obtenir une **précision de localisation** théorique de quelques nanomètres. Néanmoins, expérimentalement d'autres facteurs interviennent et dégradent cette valeur optimale de l'incertitude de localisation. Dans notre cas, les nanoparticules sont localisées avec une précision qui va typiquement de 30 nm à 150 nm. Cette plage de résolution dépend en particulier du type de nanoémetteur et du système de détection utilisés qui vont influencer le rapport signal sur bruit des images recueillies, principalement via le nombre de photons collectés dépendant du processus optique d'émission et du temps d'intégration, et donc la précision de localisation avec laquelle les vésicules sont détectées (cf section 3.2.2).



(a)



(b)

FIGURE 3.3 – Localisation du maximum de la PSF par ajustement gaussien. (a) Ajustement gaussien (pointillés rouges) de la PSF (ligne continue bleue). On constate qu’une gaussienne $\exp(-r^2/(2s^2))$ de déviation standard s est une très bonne approximation de la PSF avec pour règle pratique de correspondance $s \approx \rho_A/3$. (b) Superlocalisation de la PSF grâce à la détection du maximum de l’ajustement gaussien, figure adaptée du site internet PALM Zeiss.

La nature de l’échantillon biologique étudié influence également cette incertitude de localisation. En effet, à l’inverse des échantillons *in vitro* tels que des cultures primaires de neurones (cf section 2.3), l’imagerie *in vivo* du transport (cf section 4.2.3) dans des organismes anesthésiés ou vigiles est plus susceptible de faire intervenir des vibrations parasites (battements cardiaques, circulation sanguine, tremblements de l’animal, ...) et donc d’augmenter l’incertitude de localisation. Nous discuterons plus précisément dans la partie suivante de la manière dont on peut définir théoriquement et expérimentalement cette précision de localisation (cf section 3.2.2).

3.2.1.2 Algorithmes de reconstruction de trajectoires

Une fois que les émetteurs de toutes les images du film ont été repérés et localisés précisément, l’étape suivante consiste à trouver le lien d’une image à l’autre entre les spots correspondant à un même émetteur en mouvement durant la séquence d’images. Encore une fois, différents algorithmes ont été présentés dans la littérature en fonction

de l'objet suivi et de sa dynamique. Chacun d'eux utilise l'accumulation d'informations spatio-temporelles sur les spots détectés afin de les apparier avec les autres et de reconstruire les trajectoires complètes de tous les émetteurs en mouvement dans le champ d'imagerie.

Cette reconstruction de trajectoire n'est pas un problème simple. Parmi les complexités pouvant être rencontrées on trouve :

- La présence d'une forte densité d'émetteurs dans le champ d'observation.
- Des disparitions et réapparitions des objets suivis pendant le film. Ce problème peut être dû à un scintillement des émetteurs ou encore à leur sortie du plan de mise au point.
- Des trajectoires ambiguës en raison du fait que les émetteurs associés se superposent ou se croisent.

En outre, des erreurs de mesure durant la phase de détection peuvent ajouter une complexité de suivi :

- Détection d'objets ne correspondant pas à ceux que l'on souhaite suivre. Cette confusion peut par exemple être liée à la détection d'autres éléments parasites de l'image émettant un signal de forme et d'intensité similaires à celui des émetteurs recherchés.

Les divers algorithmes de suivi qui ont été développés tentent alors de surmonter ces problèmes. On peut distinguer deux grandes méthodologies de suivi d'objets uniques :

- **L'approche déterministe** (NN, *Nearest Neighbor algorithm*) de J. CROCKER et D. GRIER (Crocker and Grier, 1996), programmé initialement en IDL, effectue la détection des spots ainsi que leur appariement simultanément grâce à un algorithme reposant sur la méthode des plus proches voisins qui consiste à relier les positions des spots suffisamment proches dans le temps et l'espace. Cette méthode s'accompagne souvent d'une technique nommée *gating* qui élimine préalablement les spots trop éloignés de la position prédite de l'objet suivi. La position finalement choisie à un instant t donné est alors utilisée pour mettre

à jour l’algorithme et déterminer la position suivante. La méthode du plus proche voisin a été la première à être développée du fait de sa simplicité et sa facilité à être implémentée. Néanmoins, elle présente des inconvénients dans le cadre du suivi d’objets présents dans un environnement où la densité d’émetteurs est trop grande, engendrant alors un risque de fausses associations très élevé (Bar-Shalom and Li, 1996).

- **L’approche probabiliste** (*Probability Data Association algorithm*) est une méthode alternative qui prend en considération toutes les détections de spots de toutes les images puis utilise ensuite une méthode reposant sur l’inférence bayésienne afin de relier les spots entre eux et reconstruire les trajectoires. Cette stratégie de suivi permet d’exploiter efficacement l’information spatio-temporelle contenue dans les vidéos. En particulier, il a été montré qu’elle était plus apte à surmonter les difficultés de suivi qu’engendrent le croisement ou la superposition d’objet (Godinez et al., 2009). Néanmoins, cet algorithme est beaucoup plus complexe à exécuter que celui de la méthode NN et requiert donc plus de ressources de calcul.

Ainsi, il faut adapter le choix de l’algorithme aux conditions expérimentales d’acquisition des données brutes ainsi qu’au phénomène dynamique étudié. Néanmoins, dans le cadre de la détection d’émetteurs ayant un très bon rapport signal sur bruit, les deux types de méthodes s’avèrent aussi efficaces l’une que l’autre (Chenouard et al., 2014).

3.2.2 Précision de localisation : limite théorique et mesure

Nous avons pu voir précédemment que les méthodes de localisation des émetteurs individuels, que ce soit par ajustement du spot à l’aide d’une fonction gaussienne ou par détection du barycentre d’intensité, sont capables de déterminer la position de l’émetteur avec une précision de localisation bien inférieure à la taille typique de la PSF. Nous allons ici discuter de la manière dont cette précision est définie et mesurée.

3.2.2.1 Définitions

Un émetteur individuel se trouvant à la position (x_p, y_p) peut être imagé à travers un microscope et localisé avec une incertitude comprenant deux contributions différentes : la **justesse de localisation** (*accuracy* en anglais) et la **précision de localisation** (*precision*). Si la position de l'émetteur est mesurée n fois, la précision de localisation correspondra à la déviation standard de ces n mesures $x_{p,i}$ autour de la valeur moyenne estimée (l'espérance) $\bar{x}_p : \sigma_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{p,i} - \bar{x}_p)^2}$; tandis que la justesse de localisation correspond à l'écart entre la valeur réelle x_p et la valeur moyenne estimée $\bar{x}_p : \Delta x = \bar{x}_p - x_p$. De manière générale il n'est pas possible de mesurer la valeur de cet écart de justesse. En revanche, si l'algorithme de localisation estimant la position x_p n'est pas biaisé, alors on peut considérer que pour un grand nombre de mesures, $\bar{x}_p = x_p$.

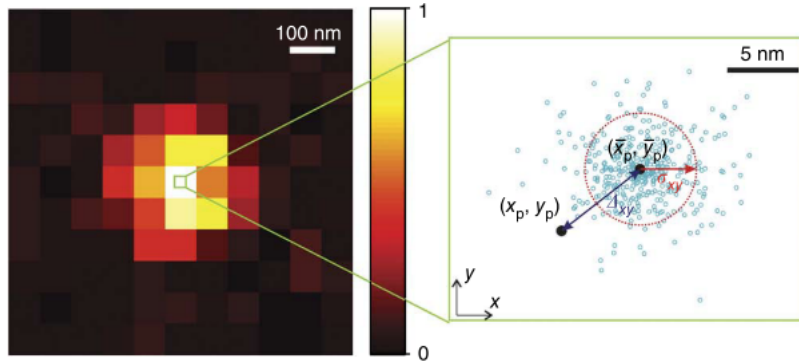


FIGURE 3.4 – Définition de la **précision de localisation** expérimentale et de la **justesse de localisation**. Le cercle en pointillés rouges met en évidence la précision de localisation $\sigma_{xy} = \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}$. L'écart Δ_{xy} correspond à la justesse de localisation. Adapté de (Deschout et al., 2014)

Cette précision de localisation a un impact direct sur l'analyse de trajectoires de nanoparticules uniques. En effet, comme le montre la figure 3.5 plus l'incertitude est grande, moins nous serons en mesure de reconstruire de manière fidèle la trajectoire.

En théorie, la précision de localisation d'un émetteur est essentiellement régie par le nombre de photons détectés qui forment le spot associé sur le détecteur matriciel. Si on se place dans le cas le plus simple où seul le bruit de photon limite la précision

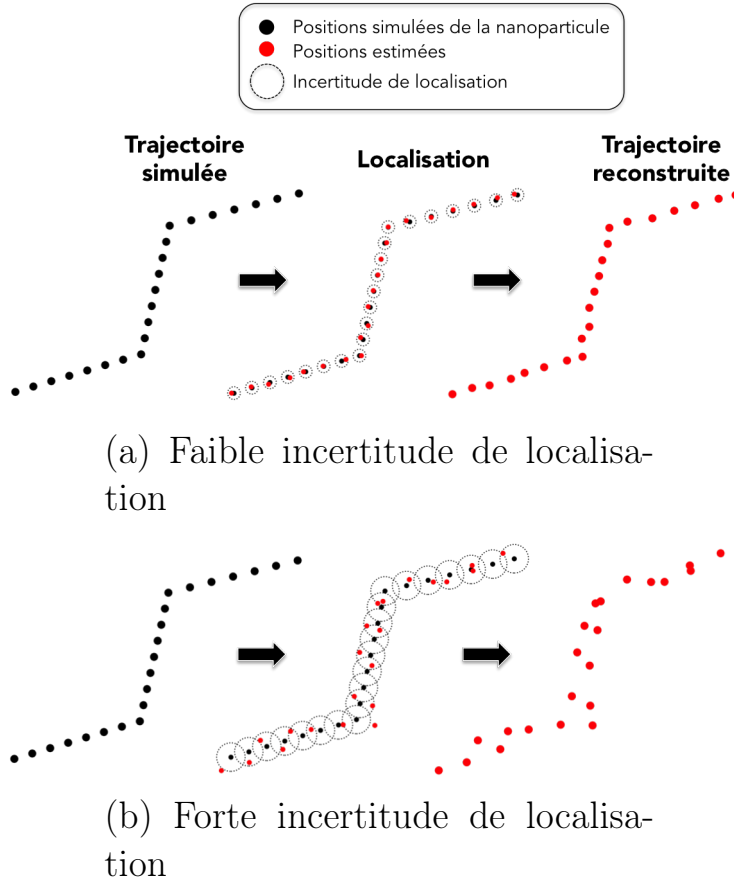


FIGURE 3.5 – Influence de la précision de localisation sur la reconstruction d’une trajectoire simulée. (a) Faible incertitude de localisation menant à une bonne reconstruction de la trajectoire. (b) Même trajectoire reconstruite en considérant une plus grande incertitude de localisation.

alors on peut considérer que le nombre de photons arrivant dans un intervalle de temps donné est décrit par une distribution de Poisson dont la déviation standard correspond au bruit de photon (*shot noise* en anglais). Par ailleurs, dans la plupart des cas, on peut considérer que la distribution spatiale sur le capteur bidimensionnel de la réponse optique de l’émetteur est assimilable à une gaussienne. On peut alors définir théoriquement la limite inférieure de la précision de localisation par la borne de Cramér-Rao (Deschout et al., 2014; Thompson et al., 2002). En statistique, la borne de Cramér-Rao définit la plus petite variance possible d’un estimateur sans biais en se basant sur la théorie de l’information de Fisher (Winick, 1986; Ober et al., 2004). On a alors :

$$\langle \sigma_x^2 \rangle \geq \frac{s^2}{N} \quad (3.2)$$

où N correspond au nombre total de photons détectés et s à la déviation standard, c'est-à-dire la largeur typique de la gaussienne représentant la PSF du système. L'ordre de grandeur de cette largeur est typiquement d'une longueur d'onde. On constate ainsi que la détection de 10^4 photons permet une précision de $\frac{s}{100}$, de l'ordre de quelques nanomètres. Cette variance est, comme nous l'avons souligné, une limite inférieure de la précision de localisation.

On peut compléter cette estimation en prenant aussi en compte la pixellisation du détecteur. Cela revient à introduire une erreur sur la position d'arrivée exacte de chaque photon à l'échelle d'un pixel. Cette erreur, qui est indépendante du bruit de photon, contribue à l'incertitude de localisation et peut donc être ajoutée quadratiquement à la limite précédemment définie :

$$\langle \sigma_x^2 \rangle \geq \frac{s^2}{N} + \frac{a^2}{12N} \quad (3.3)$$

où a est la taille du pixel ramenée au plan de l'échantillon (tenant compte du grossissement du microscope).

On peut en général considérer être limité par le bruit de photon si les fluctuations du nombre de coups de conversion analogique numérique au niveau de chaque pixel ne sont dues qu'aux photons provenant de l'émetteur. Malheureusement, la réalité est plus complexe et il est fréquent que l'on soit limité par d'autres phénomènes, c'est-à-dire que les fluctuations du signal sur chaque pixel proviennent d'autres sources de bruit. Les origines de ce bruit sont typiquement liés au bruit de lecture (conversion du nombre de photons en tension électrique), au bruit de quantifications (conversion analogique numérique), au bruit de courant d'obscurité (dans le cas d'intégration "longues"), ou encore à la présence d'éléments fluorescents parasites (impuretés, autofluorescence de l'échantillon, ...). De nombreux groupes de recherche ont travaillé sur le développement

d'une expression analytique complexe de cette précision de localisation. Thompson *et al.*, prend en compte notamment la contribution du bruit de fond sur l'image et exprime cette erreur de localisation par la formule suivante (Thompson et al., 2002) :

$$\sigma \approx \sqrt{\frac{s^2}{N} + \frac{a^2}{12N} + \frac{8\pi s^4 \sigma_b^2}{a^2 N^2}} \quad (3.4)$$

où s est la déviation standard de la PSF, N le nombre de photons collectés, a la taille du pixel et σ_b la déviation standard du bruit de fond.

Cette approche mathématique permet de modéliser certains facteurs, principalement liés au système de détection, qui altèrent la précision de localisation, mais elle ne prend pas en compte des erreurs liées à d'autres aspects expérimentaux tels que les vibrations mécaniques du système d'imagerie ou encore les dérives de l'échantillon. En ce qui concerne nos mesures, que ce soit dans le cadre du suivi de FNDs par microscopie plein champ Pseudo-TIRF (méthode reposant sur une excitation en incidence rasante ; TIRF signifie *Total Internal Reflexion Fluorescence* en anglais) (Haziza et al., 2017) ou de nanocristaux à réponse non linéaire par microscopie à balayage en excitation à deux photons, nous sommes dans les deux cas limités par ces facteurs environnementaux. Il est donc important de bien distinguer la précision de localisation théorique de quelques nanomètres que nous pourrions avoir en considérant la formule de Thompson *et al* (équation 3.4) et la précision expérimentale réelle.

La **mesure de la précision de localisation expérimentale**, s'effectue grâce à un échantillon de référence où les émetteurs sont dispersés sur une lamelle de verre avec une distance minimale entre émetteurs de l'ordre du micromètre. On enregistre dans les mêmes conditions expérimentales (régulation de la température et du CO₂, cadence d'imagerie et puissance laser) des films de 2 min qui seront ensuite analysés de la même manière que les données biologiques normalement acquises. La précision de localisation est alors définie par la déviation standard de la position des particules fixes extraite dans chaque image dans les directions x et y du plan, sur une fenêtre de

N images : $\sigma_{xy} = \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}$. La durée typique d'une longue pause sur la trajectoire d'une vésicule le long d'une branche neuronale est de l'ordre de quelques secondes. Les dérives de l'appareil sont plus lentes et négligeables par rapport à la dynamique rapide du transport intraneuronal. On se limite donc pour le calcul de la précision σ_{xy} à une fenêtre temporelle choisie arbitrairement à 5 secondes, soit pour une cadence typique de 20 images/s, 100 images. L'incertitude de localisation mesurée correspondra donc à une borne supérieure de la déviation standard à laquelle la particule est réellement soumise durant son mouvement (figure 3.4).

L'incertitude de localisation étant spécifique de la particule suivie (nombre de photons détectés N) et du système optique (taille de la PSF, taille de pixel et bruit de fond), il est nécessaire de déterminer sa valeur expérimentale pour tout nouveau dispositif optique et nanocristal utilisé.

3.2.2.2 Incertitudes de localisation des nanodiamants fluorescents (FNDs) suivis par vidéomicroscopie pseudo-TIRF (incidence rasante)

À titre d'exemple pour une configuration d'imagerie en champ large, nous avons étudié l'évolution de l'incertitude de localisation expérimentale σ_{xy} en fonction du signal des FNDs. L'intensité des FNDs mesurée en unité *Analog-to-Digital* (N_{ADU}) est convertie en nombre de photons par la relation suivante :

$$N_{\text{photon}} = \frac{(N_{\text{ADU}} - N_{\text{BL}}) \times \eta_{\text{EMCCD}}}{EM_{\text{gain}} \times QE} \quad (3.5)$$

D'après les caractéristiques de la camera utilisée (Andor iXon DU-885K), la valeur de N_{BL} ("*Base Level*") est égale à 419 ADU, la sensibilité du détecteur η_{EMCCD} vaut 1.5 electrons/ADU, le gain choisi EM_{gain} est de 30 et l'efficacité quantique QE vaut 0.65 à la longueur d'onde du maximum d'émission des FNDs, 700 nm.

La figure 3.6 représente l'incertitude de localisation expérimentale en fonction du nombre de photons détectés N_{photon} . Elle a été obtenue selon le protocole décrit dans

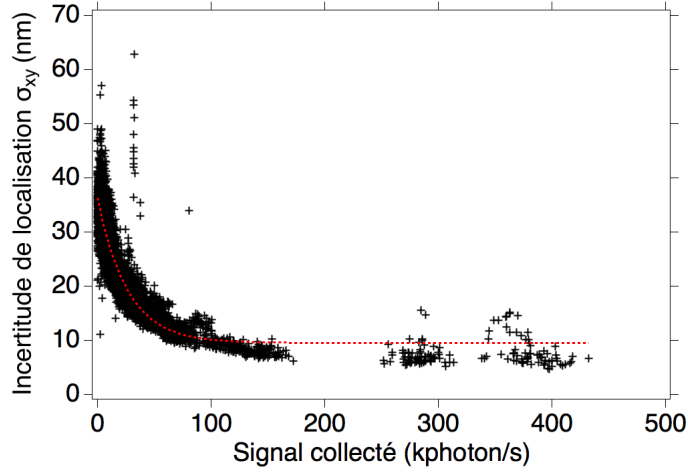


FIGURE 3.6 – Evolution de l’incertitude de localisation σ_{xy} expérimentale (en nm) pour des FNDs déposés sur une lamelle de microscope en fonction du signal détecté (en kphotons/s, pour une excitation à un photon à la longueur d’onde de 561 nm). Courbe guide en pointillés rouges.

le paragraphe précédent. Quatre films de 2 min comportant une trentaine de FNDs ont été utilisés. On constate que la courbe est constituée d’un grand nombre de points qui couvrent une gamme de signal importante. Cela s’explique d’une part par le fait que tous les FNDs n’ont pas exactement la même efficacité d’émission (ce qui est directement lié au nombre de défauts fluorescents que contient le nanocristal) et d’autre part au fait que le profil d’illumination est gaussien ; ainsi, les particules au centre du champ de vision sont excitées avec une puissance supérieure à celles se trouvant en bord de champ.

L’allure de la figure 3.6 est cohérente avec la théorie car elle montre que l’incertitude de localisation varie de manière inversement proportionnelle avec N_{photon} : les particules les plus brillantes sont en effet les mieux localisées. Il est alors possible de fixer un seuil sur l’intensité des émetteurs afin de garantir une borne supérieure de l’incertitude de localisation. Par exemple, si on conserve uniquement les trajectoires de vésicules ayant un signal supérieur à 10 kphotons/s on peut affirmer que les particules sont localisées avec une précision meilleure que 30 nm.

3.2.2.3 Incertitudes de localisation des nano-KTP dans la larve de poisson zèbre

Incertitude de localisation théorique. On s'intéresse ici à l'incertitude de localisation associée aux mesures du transport axonal dans le cerveau de larves de Zf. La mesure se fait alors par suivi de nanocristaux à réponse optique non linéaire par **microscopie à balayage en excitation bi-photonique**. Par rapport au suivi de FNDs en microscopie plein champ, beaucoup de paramètres sont modifiés et vont malheureusement avoir tendance à dégrader la précision de localisation pour certains d'entre eux. Certains facteurs sont liés au système optique et au mode d'acquisition :

- La **longueur d'onde d'excitation** (1040 nm), l'ouverture numérique ($ON = 0.95$) et le processus d'imagerie non linéaire engendrent une PSF de rayon différent : $\rho_{\text{Airy}}^{\text{2 ph}} = \frac{1.22\lambda}{2\sqrt{2}ON} = 473 \text{ nm}$ au lieu de 290 nm dans le cas des FNDs (excitation à un photon, $\lambda_{\text{ém}} \approx 700 \text{ nm}$ et $ON = 1.49$).
- La **taille du pixel** passe de 80 nm à 173 nm, mais le critère échantillonnage de Shannon est toujours respecté (taille de pixel $< \rho_{\text{Airy}}^{\text{2 ph}}/2 \approx 236 \text{ nm}$).
- L'image est maintenant issue d'un **scan du champ d'observation par le faisceau laser focalisé**. Ainsi, le temps de pause par pixel n'est que de 72 ns. Cela diffère grandement du mode d'acquisition champ large où l'exposition de l'image entière dure 50 ms avant de passer à l'exposition suivante "immédiatement" après. Cette différence du mode d'acquisition a de lourdes conséquences sur la précision de localisation des particules. En effet, plus le temps de pause est court, plus **le signal détecté est susceptible d'être faible**, détériorant alors la précision de localisation.

Afin de collecter un maximum de photons et de limiter les conséquences du court temps d'exposition, le signal SHG des nanoparticules est collecté par un **détecteur hybride très sensible** (HyD NDD, Leica). Ces détecteurs ont l'avantage de combiner les caractéristiques des photomultiplicateurs avec celles des photodiodes à avalanche ce qui permet d'obtenir une grande sensibilité et une large plage dynamique, associées à

une détection rapide et un bruit d'image faible. A l'issue de l'acquisition d'un film, nous obtenons une serie d'images encodées sur 8 bits. Chaque pixel est alors associé à un niveau de gris compris entre 0 et 255. Il est possible de déterminer approximativement le facteur de conversion entre le nombre de photons collectés et les niveaux de gris associés. La figure 3.7 illustre le raisonnement appliqué en s'appuyant sur une image typique du signal SHG de nano-KTP internalisés dans le cerveau d'une larve de poisson zèbre.

Considérons un spot associé à l'émission d'une nanoparticule et une région d'intérêt (ROI) l'englobant juste. La figure 3.7b représente l'histogramme de l'intensité dans cette ROI qui est constitué 21 barres individuelles. En faisant l'hypothèse qu'entre chaque niveau de gris différent il y a un incrément d'au moins un photon, alors on peut supposer que le pixel d'intensité maximale de la zone d'intérêt correspond au minimum au nombre de pics discrets observés dans l'histogramme, soit 21 photons. Le système de détection a alors compté entre 0 photon (les pixels du fond) et 21 photons (le pixel le plus intense) dans cette ROI. On constate que les 21 photons du pixel d'intensité maximum ont été convertis par le gain du détecteur un niveau de gris de 240 dans l'image. En faisant l'hypothèse que la valeur du niveau de gris est proportionnelle au nombre de photon détecté on peut calculer approximativement le facteur de conversion K_{photons} :

$$K_{\text{niv. gris-photons}} = \frac{n_{\text{niv. gris}}}{n_{\text{photons}}} = \frac{240}{21} \approx 11.4 \quad (3.6)$$

Ainsi, pour la particule considérée dans la figure 3.7a, l'intégrale sur la ROI donne 3513, soit $\frac{3513}{11.4} \approx 308$ **photons détectés**. En considérant le temps d'exposition par pixel de 72 ns et les 44 pixels décrivant le spot de la figure 3.7a, on estime alors un signal de $\frac{308}{44 \times 72 \text{ ns}} \approx 100$ Mcoups/s. Il est important de noter que cela n'est qu'une estimation ; d'autre facteurs de correction auquel nous n'avons pas accès peuvent intervenir et altérer l'histogramme et donc la valeur de $K_{\text{niv. gris-photons}}$. Néanmoins, on

peut comparer l'ordre de grandeur du signal SHG de nano-KTP obtenu à celui des QDs dont la durée de vie radiative typique est de l'ordre de 10 ns. En admettant une efficacité globale collection-détection de 10% de la fluorescence du QD, à saturation, on obtiendrait au mieux 10 Mcoups/s, soit dix fois moins de photons qu'avec les nano-KTP.

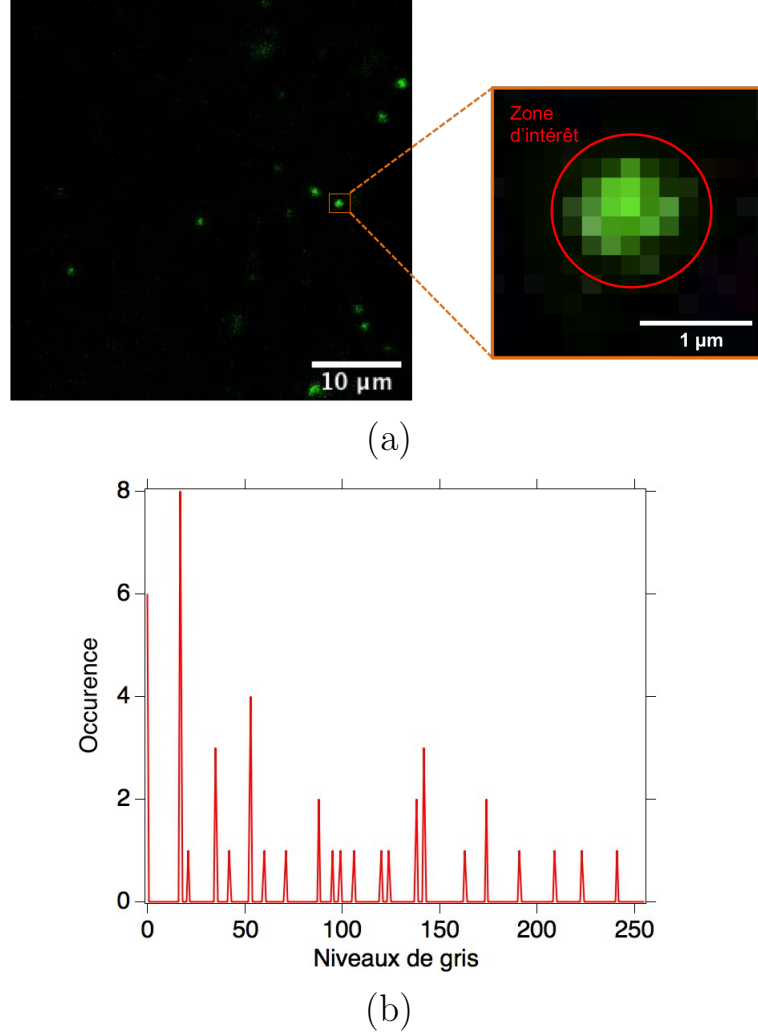


FIGURE 3.7 – Estimation du facteur de conversion $K_{\text{niv. gris-photons}}$ entre les niveaux de gris et le nombre de photons d'une image acquise par le détecteur hybride (HyD NDD, Leica) en mode "Standard". (a) Image du signal SHG de nano-KTP collecté par le détecteur et zoom sur une nanoparticule. (b) Histogramme de la ROI encadrée sur le zoom. Nous remercions Clément LAIGLE, ingénieur de la société Leica qui nous a aidé à convertir le signal des détecteurs en termes de nombre de photons.

Il est possible d'avoir une valeur précise du nombre de photons collectés si l'on utilise le détecteur dans son mode de fonctionnement "Comptage de photons" qui permet

d'accéder directement à un nombre de photons, et non dans le mode "Standard" comme nous l'avons fait. Néanmoins, la configuration "Comptage de photons" a l'inconvénient de saturer à 60 Mcoups/s par pixel. Ce taux de comptage est largement plus élevé que celui des photomultiplicateurs conventionnels usuels mais est plus faible que celui du nombre de coups que nous obtenons avec un nanoKTP. Notons que le nombre de coups maximal que nous pouvons détecter dans le mode "Standard" est par extrapolation de nos mesures $\frac{255}{K_{\text{niv. gris-photons}} \times 72 \text{ ns}} \approx 310 \text{ Mcoups/s}$, valeur en très bon accord avec celle de 300 Mcoups/s fournie par Leica pour ce mode².

Revenons sur le nombre $N \approx 300$ de photons comptés pour la nanoparticule de la figure 3.7. La **valeur théorique de la précision de localisation** peut être estimée à l'aide d'un ajustement gaussien de la PSF (figure 3.3) qui n'est pas limitée par diffraction (instrument mal réglé sans doute) et donne une déviation standard $s \approx 320 \text{ nm}$ (pour $\lambda_{\text{exc}}=1040 \text{ nm}$, et $ON = 0.95$), et donc une borne supérieure de la précision de localisation théorique associée au bruit de photon de $s/\sqrt{300} \approx 18 \text{ nm}$. Cette valeur s'avère très inférieure à la précision expérimentale que nous allons discuter à présent.

Incertitude de localisation expérimentale. Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, d'autres facteurs liés à la nature de l'échantillon biologique étudié peuvent impacter la précision, en particulier les mouvements involontaires de la larve (battements cardiaques, tremblements), des dérives liées à des changements de température. . .

Ces modifications expérimentales dégradent la précision mais sont un mal incontournable si l'on veut passer la barrière de l'imagerie *in vivo*. Comme nous l'avons vu dans la section 3.2.1, il est cependant essentiel de respecter le critère de Shannon afin de ne pas être limité par l'échantillonnage. Nous avons réalisé une première expérience sur le microscope deux photons de la plateforme PIMPA (Orsay) permettant de **quantifier l'impact du choix d'une taille de pixel sur la précision de localisation**.

2. Pour étendre la limite de comptage de 60 à 300 Mcoups/s, une fonction non-linéaire calibrée est appliquée au signal issu du détecteur hybride.

Ainsi, nous avons mesuré l'incertitude de localisation de nanoparticules de KTP fixes dispersées sur une lamelle de verre dans les mêmes conditions d'imagerie mais avec deux tailles de pixel différentes : 80 nm et 252 nm. Le critère de Shannon imposant une taille de pixel $< \rho_{\text{Airy}}^2 / 2 = 407/2 \approx 203$ nm (ici $\lambda_{\text{exc}} = 896$ nm), le deuxième cas ne respecte pas cette condition. La conséquence de cela est illustrée par la figure 3.8 : un choix de pixel de 80 nm plutôt que de 252 nm permet d'améliorer l'incertitude de localisation. En particulier, pour un signal typique de 100 Mcoups/s, on trouve une différence de l'ordre de 30 %. Par ailleurs, si l'on souhaite conserver une cadence d'acquisition de 20 images par seconde et utiliser un pixel de 80 nm, cela nous contraint sur les dimensions du champ de vue étudié. Pour la suite des expériences, nous décidons d'effectuer un compromis entre la **taille du pixel (choisie à 173 nm)** et la cadence que l'on conserve à 20 images par seconde.

La taille du pixel étant maintenant choisie, la **mesure expérimentale de la précision de localisation** a été réalisée de manière à être le plus représentatif des conditions réelles d'expérience. Nous avons donc procédé à l'injection de nano-KTP dans le cerveau de larves de Zf (cf section 4.2.3) et l'étude de la précision a été faite en considérant les nano-KTP qui apparaissaient immobiles pendant toute la durée du film (2 min). Ces particules sont soit collées sur la membrane des cellules soit internalisées mais bloquées à l'intérieur des neurones. La figure 3.9 montre que l'on obtient une **précision de localisation dans le cerveau de larves de Zf variant de 300 nm à 90 nm** en fonction du signal issu d'un nano-KTP.

Il est important de noter que le diagramme de rayonnement SHG des KTP est très anisotrope car un coefficient domine dans le tenseur de susceptibilité non linéaire, induisant une réponse quasi-dipolaire. Ainsi, en condition d'expérience de mesure dynamique du transport, on observe de fortes variations d'intensité de la particule pendant son mouvement ce qui traduit un changement d'orientation du cristal relatif à la direction de collection du signal. Cela a deux conséquences principales :

- Certaines particules sont susceptibles des **saturer le détecteur** lorsqu'elles

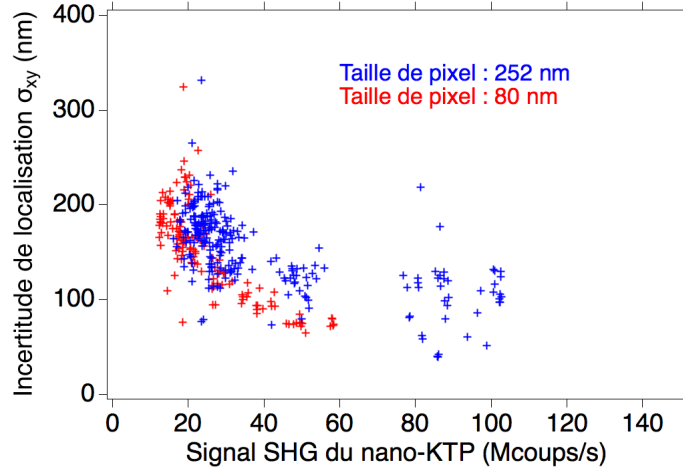


FIGURE 3.8 – Evolution de l’incertitude de localisation expérimentale (en nm) de nano-KTP déposés sur une lamelle de microscope, en fonction du signal SHG (en Mcoups/s, à la longueur d’onde d’excitation de 896 nm et à la puissance de 10 mW en sortie du laser d’excitation) pour deux tailles de pixel : 252 nm en bleu et 80 nm en rouge.

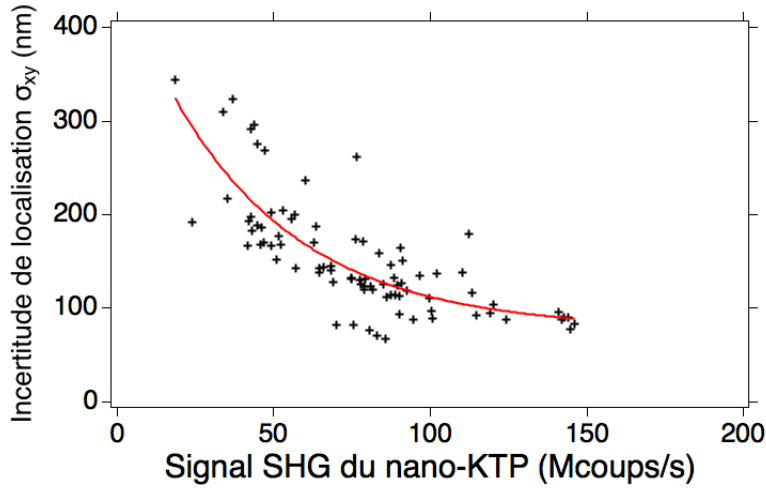


FIGURE 3.9 – Evolution de l’incertitude de localisation des nano-KTP (en nm) dans le Zf en fonction du signal de la particule (en Mcoups/s). Excitation laser à la longueur d’onde de 1040 nm et à la puissance d’environ 10 mW en sortie du laser impulsif.

se retrouvent dans une orientation qui maximise la collection de photons. En effet, malgré le fait que nous fassions en sorte de régler la puissance du laser de manière à éviter le phénomène de saturation, si l’on veut suivre la particule dans la majorité de ses orientations nous ne pouvons pas nous permettre d’utiliser une puissance trop faible. Un compromis doit alors être trouvé : une puissance assez forte permettant d’exciter correctement l’émetteur et une puissance assez faible

limitant la saturation. Cette saturation pourrait être problématique car elle engendre une augmentation de l'incertitude de localisation. On peut la modéliser en première approximation en remplaçant l'échelle de pixellisation a par $p.a$ (p étant le nombre de pixels saturés) dans l'équation 3.4 ; cela revient en fait à agrandir la taille du pixel. La formule de Thompson devient alors :

$$\sigma \approx \sqrt{\frac{s^2}{N} + \frac{(p.a)^2}{12N} + \frac{8\pi s^4 \sigma_b^2}{(p.a)^2 N^2}} \quad (3.7)$$

Estimons la dégradation de la précision de localisation engendrée par la saturation de $p = 4$ pixels. Considérons par exemple une nanoparticule dont le spot induit sur le détecteur a une déviation standard $s \approx 320$ nm et un signal typique de 100 Mcoups/s, soit $N \approx 300$ photons en tenant compte du fait que le faisceau d'excitation passe 72 ns par pixel et que le spot s'étale sur une quarantaine de pixels. En négligeant le bruit de fond et en considérant un pixel de $a = 173$ nm, la précision de localisation théorique passe de 18 nm à **environ 21 nm avec saturation**³, mais elle reste de toute façon très inférieure à la meilleure précision mesurée.

- Une deuxième conséquence de la directionnalité de l'émission SHG des KTP est que **l'incertitude de localisation d'un émetteur donné varie au cours de sa trajectoire**. Nos analyses ne prennent pas encore cette variation en compte ; en effet, nous évaluons l'incertitude de localisation sur la base d'un signal moyen pour chaque particule.

En conclusion, la précision de localisation réelle est donc limitée à une valeur médiane de l'ordre de 150 nm par des facteurs indépendants du bruit de photons que nous n'avons pas précisément identifiés.

3. la saturation des nano-KTP engendre une dégradation typique de l'ordre de 17%.

3.2.3 Détection des nanoparticules dans les scans et extraction de trajectoires à l'aide du module Python Trackpy

Dans cette partie, nous discuterons de la manière dont nous utilisons le module **Trackpy** de Python reposant sur l'algorithme de Crocker-Grier (Crocker and Grier, 1996) et permettant d'implémenter la méthode de localisation du centre de masse des spots (méthode de choix dans le cadre de la détection d'émetteurs en mouvement) ainsi qu'un algorithme de reconstruction de type déterministe (NN). Cette méthode de suivi permet alors de mesurer les déplacements des vésicules avec une précision de localisation médiane valant de 30 nm à 150 nm en fonction de l'expérience réalisée (*in vitro* ou *in vivo*), de la méthode d'imagerie et des nanoparticules utilisées (cf section 3.2.2).

Dans le cadre de nos études, nous sommes amenés à analyser des données issues du suivi de FND par microscopie plein champ TIRF ou de nano-cristaux à réponse optique non linéaire par microscopie à balayage en excitation à deux photons. La différence majeure de traitement engendrée par ces deux méthodes d'imagerie concerne le bruit de fond que contiennent les films enregistrés. Là où la microscopie champ large engendre des images relativement bruitées du fait de la présence d'autofluorescence, la microscopie biphotonique, grâce à son sectionnement optique intrinsèque, a l'avantage de produire des images dépourvues de fond. Ainsi, dans le premier cas, la détection des spots est-elle précédée par un filtrage par ondelettes (Figure 3.2) afin d'améliorer le rapport signal sur fond des nanoparticules. Dans un premier temps, la détection des émetteurs est effectuée par le biais d'une fonction Python nommée **batch** appartenant au module **Trackpy**. Dans un deuxième temps, les spots détectés sont reliés d'une image à l'autre par la fonction **link** afin de reconstruire les trajectoires du film.

3.2.3.1 Détection des spots

La première étape consiste à **repérer les maximums locaux d'intensité** présents dans l'image puis de les identifier comme des candidats possibles de particules. Un pixel est adopté comme candidat si aucun autre pixel plus proche de lui d'une certaine distance n'est plus intense. Cette distance qui caractérise le voisinage du pixel est un paramètre nommé **separation**. Usuellement, on prend comme valeur celle du diamètre attendu de la PSF à laquelle on ajoute un pixel. Une deuxième étape consiste en un **filtrage** qui a pour but d'éliminer certains candidats qui correspondraient à de fausses détections liées à la présence de bruit par exemple. Pour effectuer ce tri on doit définir deux autres arguments essentiels de la fonction **batch** : **les paramètres diameter et minmass**. Le **diameter** correspond à la taille attendue du spot recherché (en pixel). En fonction du système optique et de la taille du pixel, ce paramètre doit être adapté. Le tri repose alors sur le fait que les pixels donnant l'image d'une unique particule ont une répartition d'intensité proche d'une gaussienne, correspondant à une forme typique de PSF. Il faut également que le signal intégré autour du pixel candidat (sur un diamètre correspondant au paramètre **diameter**) soit supérieur à un seuil d'intensité indiqué par le paramètre **minmass** choisi par l'expérimentateur.

Dans le cas de la détection des FNDs, le signal recherché étant très stable optiquement, le seuil se trouve facilement et permet de détecter exclusivement les émetteurs. En revanche, dans le cadre de la détection d'émetteurs à réponse optique directionnelle, tels que les KTP, il est parfois plus compliqué de trouver la valeur optimale du seuil. En effet, pour certaines orientations du cristal par rapport à l'axe optique de collection, le nombre de photons collectés peut être très faible ; il en résulte des trajectoires décrites par des émetteurs dont le signal oscille entre de fortes et faibles valeurs. Ainsi, il faut choisir une **minmass** assez faible pour détecter les émetteurs indépendamment de leur orientation et assez forte pour minimiser la détection de faux positifs correspondant à des pixels isolés liés à la présence du bruit électronique. Un compromis doit alors être fait.

Une fois le repérage des spots effectué, la troisième étape concerne le **raffinement de l'estimation de la position** de chaque émetteur. La position du pixel d'intensité maximale à l'origine détecté est remplacée par la position du **barycentre des intensités de l'ensemble des pixels décrivant le spot**, restreints par le diamètre de la PSF.

Finalement, la fonction `batch` fournit en sortie un fichier contenant les coordonnées (x, y) du barycentre de chaque émetteur, l'intensité intégrée sur la totalité du spot (paramètre nommé `mass`), le rayon du profil gaussien associé à chaque émetteur (paramètre `size`), l'excentricité du spot (`ecc`) ainsi que la valeur du pixel associé au centre de masse (`signal`).

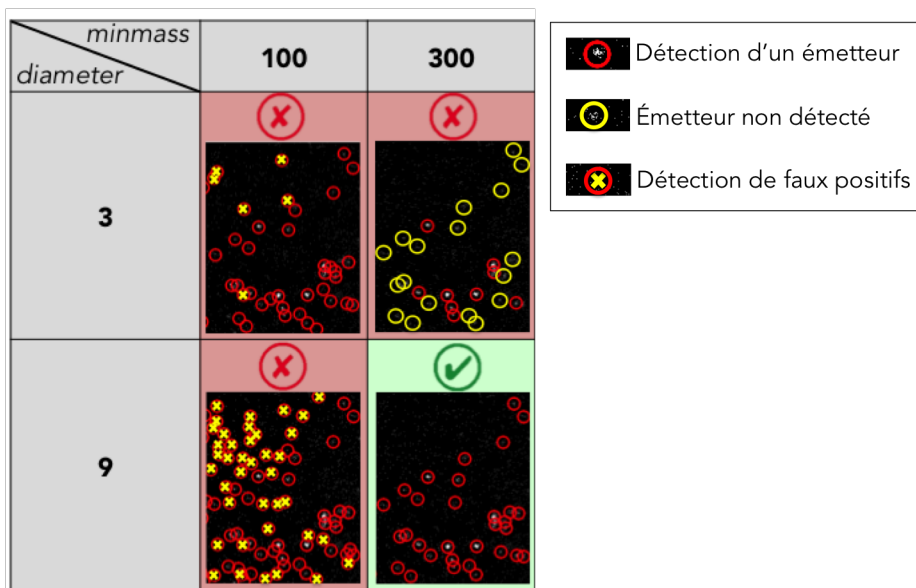


FIGURE 3.10 – Influence des arguments `diameter` et `minmass` de la fonction `batch` dans la détection des nano-KTP au sein des séquences d'images.

3.2.3.2 Reconstruction des trajectoires

Une fois que toutes les particules de toutes les images de la séquence sont localisées, il reste à **relier les spots entre eux** afin de reconstruire les trajectoires. Pour cela, un numéro d'identification est attribué à chaque particule de la première image ; la fonction `link` permet d'identifier image par image les spots correspondant à la même

particule. Pour que les associations soient faites correctement, cette fonction nécessite de renseigner certains paramètres :

- Le **searchrange** correspond au déplacement maximum autorisé entre deux images consécutives. Cette valeur dépend bien sûr du phénomène biologique suivi mais il est important de noter qu'une grande valeur augmentera considérablement les temps de calculs. En revanche, un **searchrange** trop petit aura le désavantage d'exclure certains spots du champ des possibles de l'algorithme.
- L'**adaptive-stop** et l'**adaptive-step** sont deux paramètres permettant d'éviter de devoir choisir une unique valeur du **searchrange** pour toutes les particules de toute l'image. En effet, il est possible de définir une borne maximale pour le paramètre **searchrange** puis de laisser la fonction réduire le champ des possibles si nécessaire. Ainsi **link** ajuste ces zones de recherche de particules en multipliant le **searchrange** par l'**adaptive-step** jusqu'à la borne minimale définie par l'**adaptive-stop**. Dans notre cas précis de suivi de vésicules neuronales à l'aide de nano-KTP, nous avons choisi de tirer avantage de cette fonctionnalité en choisissant volontairement une grande valeur du **searchrange** (10 pixels, soit $1\ \mu\text{m}$ en considérant un pixel de 100 nm), puis de réduire le rayon de recherche en appliquant un coefficient de 0.9 (**adaptive-step**) jusqu'à une borne minimale de 5 pixels, soit 500 nm (**adaptive-stop**). De cette manière on s'accorde la possibilité de suivre des vésicules ayant des vitesses très différentes les unes des autres ou encore très différentes au sein d'une même trajectoire.
- Le **paramètre memory** correspond au nombre d'images pendant lesquelles la particule peut disparaître. Par défaut cette valeur est fixée à zéro. Dans notre cas, il est essentiel de libérer cette contrainte afin de prendre en compte les phénomènes tels que le clignotement apparent de la particule (dans le cas des KTP par exemple) ou encore les possibles défocalisations des émetteurs par rapport au plan d'imagerie. Il est en effet fréquent de voir disparaître puis réapparaître l'émetteur suivi. Nous avons ainsi choisi d'accepter de perdre la particule pen-

dant 5 images maximum, soit pendant une durée de 250 ms.

À ce stade du traitement, chaque émetteur du film qui a été associé à une trajectoire possède son numéro d'identification et la fonction `link` fournit en sortie un tableau contenant toutes les informations spatio-temporelles de toutes les trajectoires reconstruites.

L'utilisation de ces deux fonctions `batch` (pour la détection) et `link` (pour la reconstruction de trajectoires) permettent ainsi d'implémenter assez simplement un algorithme de suivi complet. Néanmoins, comme nous avons pu le voir dans cette partie, de nombreux paramètres doivent être ajustés en fonction de l'expérience menée afin d'optimiser la précision de localisation d'une part (cf section 3.2.2) puis la reconstruction des trajectoires d'autre part. Étant donné que les choix des paramètres sont souvent des compromis, il est difficile d'optimiser ensemble tous les aspects du suivi. Par exemple, si l'on optimise les paramètres afin de minimiser les fausses associations et donc l'obtention de mauvaises trajectoires, en contrepartie, nous allons favoriser la segmentation des trajectoires. En effet, la grande majorité des trajectoires reconstruites seront correctes mais beaucoup d'entre elles seront découpées en plusieurs petites trajectoires considérées comme indépendantes.

Pour améliorer ce dernier point, nous avons créé une **fonction qui permet de rabouter les trajectoires** qui ont une forte probabilité de correspondre à la même particule suivie. Encore une fois, cette fonction est basée sur la connaissance complète des informations spatio-temporelle des trajectoires connues. Si deux trajectoires sont proches dans le temps et l'espace, c'est à dire que l'une se termine au moment où l'autre commence, alors on peut les relier. Pour relier les deux extrémités nous faisons alors une interpolation linéaire. Pour implémenter cela, il a à nouveau fallu définir une fenêtre temporelle maximum autorisée (fixée à 10 images, soit 500 ms) et une fenêtre spatiale maximale (fixée à 60 pixels).

L'utilisation du module Python **Trackpy** nous a donc permis de tirer avantage de l'efficacité de l'algorithme de reconstruction de Crocker-Grier (Crocker and Grier, 1996)

que nous avons adapté et optimisé pour notre application précise de suivi de nanoparticules ayant un signal d'intensité et de forme très variables. Par ailleurs, nous avons vu qu'il était nécessaire d'ajouter une fonction permettant de rabouter les trajectoires pour améliorer la reconstruction de la dynamique des vésicules.

3.3 Traitement et tri des trajectoires

Les trajectoires reconstruites par l'algorithme Python décrit précédemment vont maintenant permettre d'extraire un certain nombre de paramètres utilisés pour caractériser quantitativement le transport des vésicules dans les neurones. Leur déplacement est constitué d'une succession de deux phases : les **phases dirigées** où la vésicule est transportée activement (phases de "GO") et les **phases d'arrêt** (phases de "STOP"). Nous cherchons alors à segmenter les trajectoires en phases de GO et STOP de manière à pouvoir extraire des paramètres de transport tels que la vitesse moyenne de la vésicule pendant les phases de mouvement, la fréquence des pauses, la durée moyenne des pauses... (cf section 3.4). L'objectif final est de comparer des paramètres de transport issus d'échantillons biologiques "sains" (condition dite *wild type* (WT)) à ceux de situations pathologiques (induites par exemple par l'introduction d'un transgène, ou liées à l'exposition à une drogue perturbatrice). Il est critique, si l'on veut pouvoir détecter des altérations subtiles de ce transport, que l'extraction des paramètres finaux soit la plus juste possible. Par exemple, si la trajectoire est mal segmentée (phases de "GO" et de "STOP" mal reconnues), alors les paramètres extraits (vitesse, fréquence des pauses, ...) perdent leur sens et peuvent mener à de fausses conclusions (cf section 3.4). Une cause de mauvaise segmentation est par exemple le cas où la trajectoire reconstruite par l'algorithme est trop bruitée à cause d'une mauvaise précision de localisation. C'est sur ce dernier point que l'on va se concentrer dans cette section. Nous verrons dans un premier temps qu'il est nécessaire (surtout dans le cadre du suivi de nano-KTP) de filtrer les coordonnées des points formant les trajectoires afin d'assurer un découpage

efficace de celles-ci et donc une extraction précise des paramètres (cf section 3.3.1). Par ailleurs, nous discuterons des raisons pour lesquelles nous effectuons ensuite un tri de trajectoire reposant sur l’allure du déplacement quadratique moyen à l’issue duquel certaines trajectoires seulement sont retenues pour mesurer les paramètres de transport (cf section 3.3.2).

3.3.1 Filtrage spatial des coordonnées des trajectoires

Nous avons vu précédemment que la mesure du transport de vésicules neuronales dans le cerveau de larves de Zf s’effectue avec une précision de localisation allant de 90 nm à 300 nm (Figure 3.9). Cette incertitude de localisation est nettement plus grande que celle obtenue dans le cadre du suivi de FNDs dans des cultures primaires (cf section 3.6). À l’issue du processus d’extraction des trajectoires, les **données sont particulièrement bruitées** (Figure 3.5) ce qui engendre alors de nombreuses erreurs dans l’étape suivante de segmentation de la trajectoire en phases de mouvement. Nous abordons dans cette partie la stratégie de filtrage que nous avons choisie pour diminuer au mieux le bruit et retrouver en conséquence une information la plus fiable possible sur la trajectoire.

De nombreuses techniques de filtrage ont été développées afin d’atténuer le bruit tout en préservant le maximum d’informations. Afin de ne conserver que l’information utile, certains filtres agissent sélectivement sur certaines fréquences dans le but de les amplifier ou de les réduire. On distingue principalement deux grandes catégories de filtrage : les filtres linéaires de convolution (filtre moyen, filtre gaussien...) et les filtres non linéaires qui ne sont pas définis par un masque de convolution.

Dans notre cas, une grande incertitude de localisation engendre un bruit de haute fréquence spatiale responsable de la présence d’une gigue tout le long de la trajectoire comme le montre la figure (3.11(a)). Ce bruit “spatial” sur les coordonnées de la particule peut se voir comme la conséquence d’un bruit à haute fréquence temporelle sur chaque coordonnée $x(t)$ et $y(t)$ (3.11(b)). Nous avons choisi d’utiliser un filtrage

temporel linéaire gaussien sur chaque élément de coordonnée afin d'atténuer les hautes fréquences de la trajectoire. Cette approche lisse donc la trajectoire en moyennant localement les coordonnées $(x(t), y(t))$.

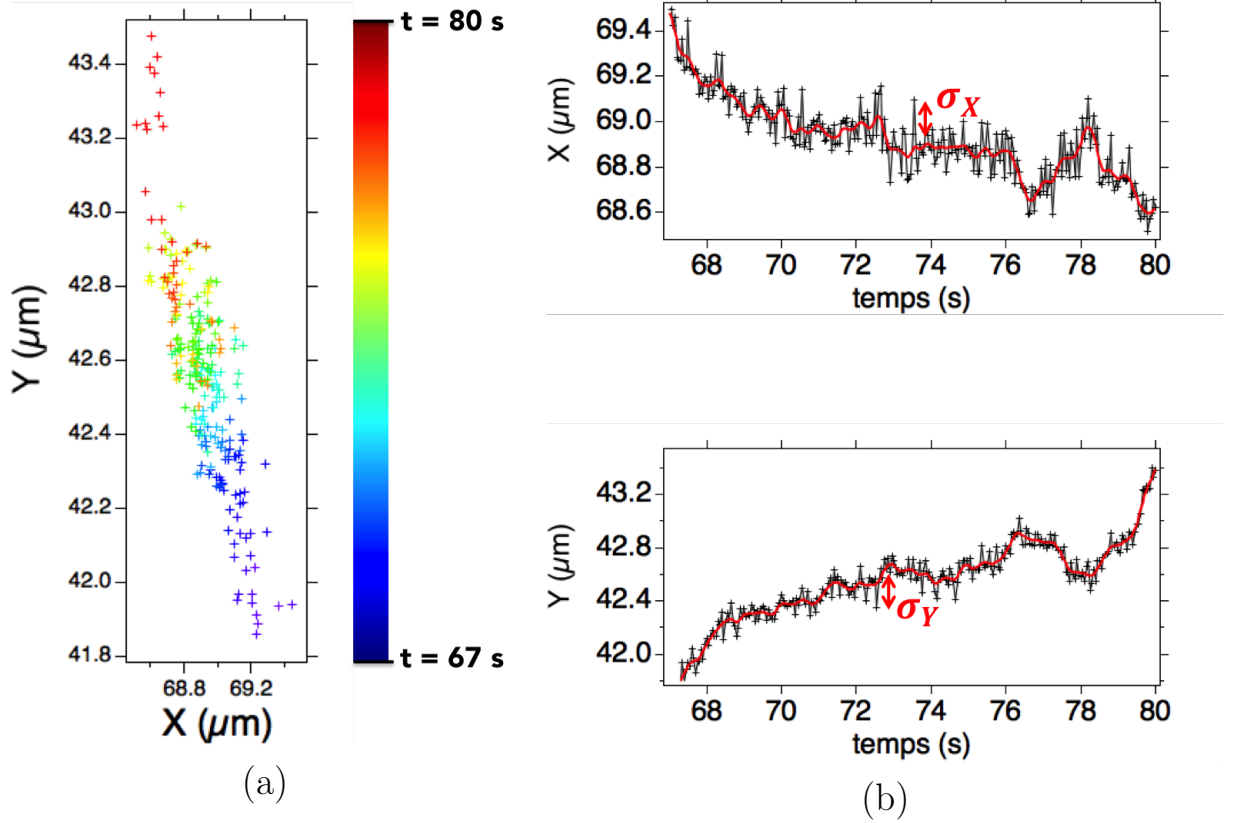


FIGURE 3.11 – Mise en évidence d'une gigue le long d'une trajectoire typique de nano-KTP. a) Trajectoire brute reconstruite. b) Evolution des coordonnées x et y en fonction du temps t . La courbe rouge est le résultat du filtrage linéaire gaussien appliqué.

Nous allons illustrer cette opération de filtrage sur l'évolution de l'abscisse $x(t)$. Considérons G la fonction gaussienne de la variable t , de déviation standard s , de norme unité, de dimension une fréquence, donnée par la formule suivante :

$$G(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}s} \exp\left(-\frac{t^2}{2s^2}\right) \quad (3.8)$$

Le filtrage gaussien des coordonnées $x(t)$ résulte alors de la convolution de cette fonction avec $G(t)$ à chaque instant t , soit en chaque point de la trajectoire. On obtient alors la fonction filtrée $x_{\text{filt}}(t)$:

$$x_{\text{filt}}(t) = (G * x)(t) = \int_{\mathbb{R}} G(t - u)x(u) \, du \quad (3.9)$$

Cette convolution permet de régulariser la fonction d'origine $x(t)$. Le choix du paramètre de lissage s est crucial si l'on veut s'affranchir uniquement du bruit et ne pas perdre de l'information utile contenue dans les données de départ.

Dans notre situation, nous allons établir empiriquement un lien entre s , qui est en unité de temps, et l'incertitude de localisation σ_x , en unité de longueur. Pour cela, exprimons tout d'abord l'effet de la convolution appliquée dans l'espace de Fourier ; on obtient :

$$\tilde{x}_{\text{filt}}(\nu) = TF[(G * x)](\nu) = \tilde{G}(\nu)\tilde{x}(\nu), \quad (3.10)$$

où $\tilde{x}(\nu)$ représente le spectre des fréquences spatiales présentes dans la trajectoire $x(t)$ dont la dimension est homogène au produit d'une longueur par un temps ($\tilde{x}(\nu) = \int_{\mathbb{R}} x(t)e^{-i2\pi\nu t} \, dt$), et $\tilde{G}(\nu)$ est la transformée de Fourier de G , qui n'a pas de dimension.

Tout signal, spatial ou temporel, est limité en fréquence à cause de l'échantillonnage. Dans notre cas, la trajectoire est échantillonnée temporellement avec un pas dt ce qui détermine la fréquence d'échantillonnage $1/dt$. Le critère de Shannon indique alors que le signal ne peut pas contenir de fréquences supérieures à la moitié de la fréquence d'échantillonnage. Cette fréquence maximale $1/2dt$ au-delà de laquelle l'information n'est plus valide est appelée **fréquence de Nyquist**. L'amplitude maximale du déplacement $x(t)$ associée à la fréquence de Nyquist est de l'ordre de notre incertitude de localisation expérimentale σ_x . Dans le domaine de Fourier cela se traduit donc par la relation :

$$\tilde{x}\left(\frac{1}{2dt}\right) \simeq \sigma_x dt. \quad (3.11)$$

On souhaite diminuer cette amplitude. Pour choisir le facteur d'atténuation, nous avons considéré une précision de localisation idéale σ_{ref} (inférieure à la précision réelle σ_x), qui correspondrait à la précision attendue pour les limitations fondamentales (équation 3.4). On souhaite alors, à l'issue du filtrage, diminuer l'amplitude associée à

la fréquence de coupure jusqu'à la valeur σ_{ref} . À nouveau, on peut traduire cela par la relation :

$$\tilde{x}_{\text{filt}} \left(\frac{1}{2dt} \right) = \tilde{G} \left(\frac{1}{2dt} \right) \tilde{x} \left(\frac{1}{2dt} \right) = \sigma_{\text{ref}} dt, \quad (3.12)$$

avec :

$$\tilde{G} \left(\frac{1}{2dt} \right) = \exp \left(-\frac{s^2}{8dt^2} \right). \quad (3.13)$$

On arrive finalement, en combinant les équations 3.11 à 3.13 à l'expression reliant la déviation standard de la gaussienne filtrante s à la précision de localisation expérimentale σ_x :

$$s = 2dt \sqrt{2 \ln \left(\frac{\sigma_x}{\sigma_{\text{ref}}} \right)}. \quad (3.14)$$

Comme nous l'avons déjà évoqué, théoriquement, σ_{ref} correspond à la précision attendue pour les limitations fondamentales (équation 3.4), à savoir environ 18 nm d'après la section 3.2.2.3. Nous **avons finalement choisi de prendre** $\sigma_{\text{ref}} = 20 \text{ nm}$.

La figure 3.12 illustre l'importance du traitement par filtrage gaussien dans **l'étape de segmentation** de la trajectoire en phases de mouvement que nous allons détailler. On constate que les estimations brutes des positions de la nanoparticule suivie (croix noires sur la figure 3.12a) sont très bruitées. La trajectoire reconstruite après filtrage gaussien (en bleu cyan) permet de supprimer la gigue de la trajectoire brute tout en conservant l'information utile. En effet, on constate sur la figure 3.12b que la segmentation en phases de mouvements de la trajectoire reconstruite filtrée est bien réalisée : en rouge on observe les phases de STOP et en bleu les phases de GO. Comme le montre la figure 3.13, sans cette étape de lissage gaussien, la segmentation en phases de mouvement n'est pas possible : le bruit présent dans les coordonnées (x, y) est trop important et mène à la détection d'une unique phase de STOP.

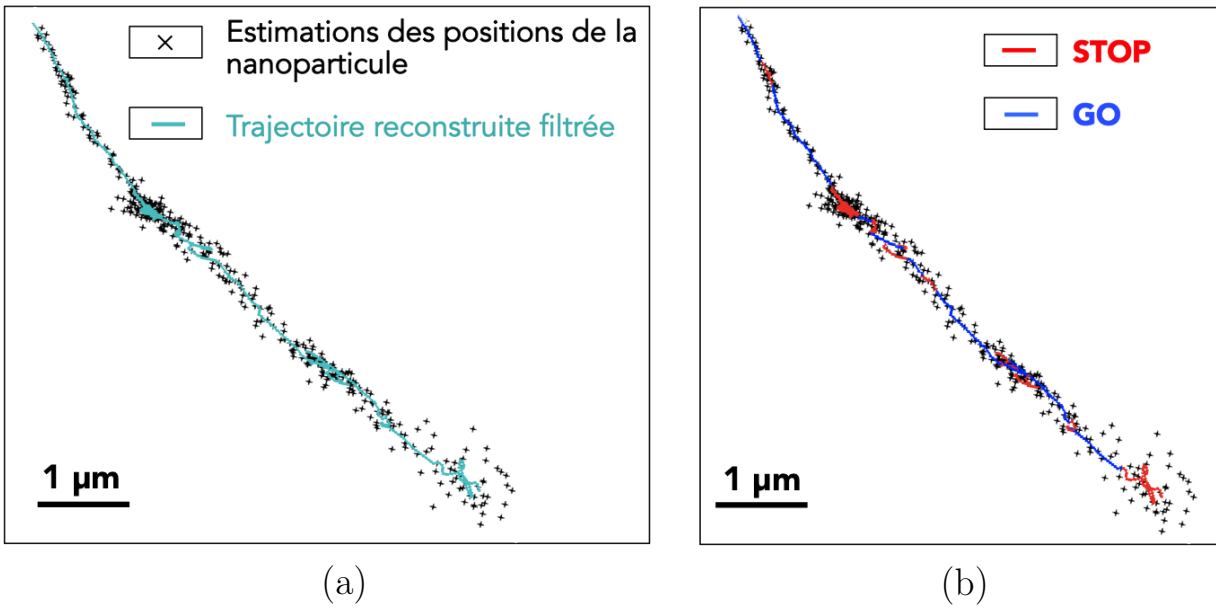


FIGURE 3.12 – Impact du lissage gaussien sur la segmentation d’une trajectoire de nano-KTP. (a) Exemple de trajectoire de nano-KTP reconstruite avec et sans filtrage gaussien. Les croix noires correspondent à la trajectoire brute reconstruite par l’algorithme Python et la courbe bleue est la trajectoire obtenue après filtrage gaussien des coordonnées (x, y) (b) Segmentation de la trajectoire lissée en phases de GO (en bleu) et STOP (en rouge) de la même trajectoire.

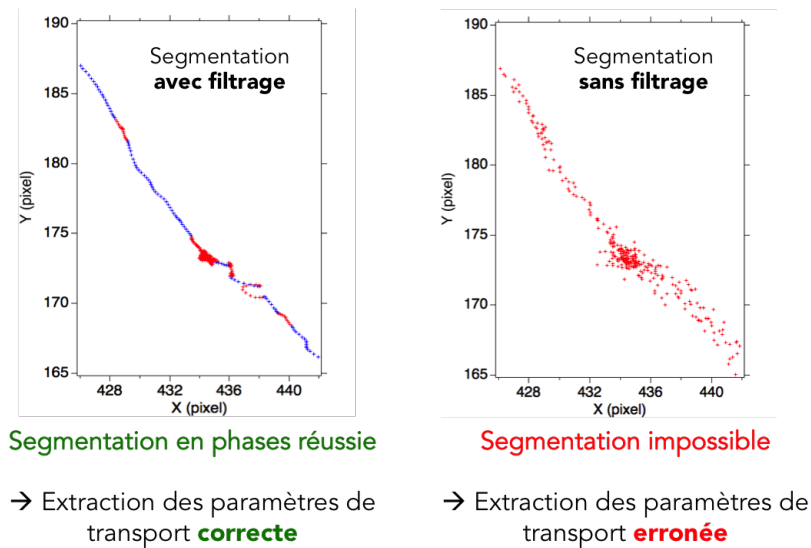


FIGURE 3.13 – Comparaison du résultat de la segmentation d’une trajectoire de nano-KTP en phases de GO (en bleu) et STOP (en rouge) avec utilisation de l’outil de lissage gaussien à gauche et sans ce filtrage à droite.

3.3.2 Tri des trajectoires : critère de seuillage du déplacement quadratique moyen

L’internalisation de nanoparticules dans les neurones se fait de manière spontanée par endocytose lorsque les nanoparticules sont en contact avec la membrane plasmique des branches neuronales. La stratégie qui permet de rendre possible ce contact est différente en fonction des échantillons. Dans le cas des cultures primaires de neurones, une mise en contact directe de la lamelle avec une goutte de la solution rend possible l’internalisation. En revanche, dans un environnement *in vivo* plus complexe, tel que la larve de Zf, une injection de la solution de nanoparticules dans le cerveau est nécessaire. Dans les deux cas, l’efficacité d’internalisation n’est pas de 100%. On constate dans le cas des cultures que certains émetteurs sont immobiles (collés sur la membrane des cellules ou sur la lamelle de verre), d’autres peuvent flotter dans le milieu (mouvement brownien bien distinct avec de nombreuses disparitions et réapparitions de la particule), ou encore certaines nanoparticules semblent accrochées à la membrane à l’extérieur de la cellule et ont alors un mouvement pendulaire rapide. *In vivo*, dans le cerveau de la larve Zf, on peut parfois être témoin du mouvement de macrophages qui ont phagocyté une ou plusieurs nanoparticules ; dans ce cas, le déplacement est moins dirigé et plus erratique que celui d’une vésicule en mouvement à l’intérieur d’une branche neuronale. Par ailleurs, on peut également enregistrer des mouvements de nanoparticules piégées dans le ventricule de la larve ; dans ce cas, les déplacements sont désorganisés et souvent très rapides.

Dans tous les cas, en culture comme *in vivo*, il faut pouvoir **discerner les trajectoires dirigées** correspondant à des émetteurs ayant été internalisés dans les vésicules et se déplaçant à l’intérieur des neurones, de toutes les autres trajectoires “parasites”. Un outil usuellement utilisé pour discriminer les différents types de dynamique que peut avoir un objet en mouvement est le **déplacement quadratique moyen** (*mean square displacement*, MSD). Ce paramètre mesure la déviation de la position d’une

particule dans le temps, par rapport à une position référence et permet de remonter à des paramètres caractéristiques du mouvement : coefficient de diffusion dans le cas du mouvement brownien ou vitesse de déplacement dans le cas d'un mouvement dirigé (Qian et al., 1991; Kusumi et al., 1993). On le définit mathématiquement de la manière suivante :

$$\text{MSD}(n\Delta t) = \frac{1}{N-1-n} \sum_{i=1}^{N-1-n} ((x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2) \quad (3.15)$$

avec N , le nombre total d'images de la séquence vidéo, ou définissant la trajectoire, Δt , l'intervalle de temps entre deux images consécutives et (x_i, y_i) , la position de l'objet suivi sur la $i^{\text{ième}}$ image.

L'allure du MSD en fonction de la taille de la fenêtre temporelle de calcul $n\Delta t$ permet de distinguer trois types de dynamiques :

- Les déplacements associés à une **diffusion simple** : c'est le mode qu'aurait une particule soumise à un mouvement strictement brownien. Dans ce cas, le MSD varie linéairement avec le temps selon l'équation $\text{MSD}(t) = 4Dt$ en deux dimensions et $\text{MSD}(t) = 6Dt$ en trois dimensions ; avec D , le coefficient de diffusion de la particule dans le milieu.
- Les **mouvements dirigés** (associés au transport intraneuronal) : la particule se déplace dans une direction donnée à vitesse constante v et est également soumise à une diffusion aléatoire liée au coefficient de diffusion D de la particule dans le milieu. Le MSD varie alors paraboliquement en fonction du temps : $\text{MSD}(t) = 4Dt + v^2t^2$.
- Les mouvements associés à une **diffusion contrainte** : la particule est soumise à un mouvement Brownien dans une zone confinée de taille caractéristique L . Cette fois-ci, on peut approximer l'évolution du MSD à des temps long par une asymptote horizontale d'équation $\text{MSD} = \frac{L^2}{3}$ (Kusumi et al., 1993).

Ces trois régimes de déplacement correspondent à des lois de puissance et sont

facilement classés en exprimant le logarithme du MSD : $\log(\text{MSD}(\Delta t)) = \alpha \log(\Delta t) + \text{constante}$. Ainsi, la valeur du coefficient α renseigne sur le mode de la dynamique : $\alpha < 1$ correspond à de la diffusion contrainte, $\alpha = 1$ à un mouvement purement diffusif (Brownien) et $\alpha > 1$ (superdiffusif) à un déplacement dirigé (Figure 3.14)

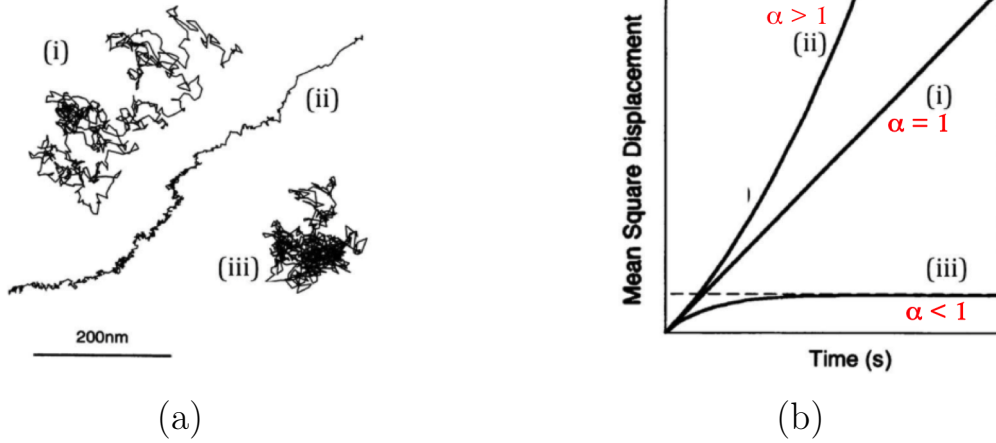


FIGURE 3.14 – Calcul de MSD dans le cadre de l’étude de dynamique de molécules. (a) Différents types de trajectoires de nanoparticule d’or attachées à la protéine membranaire E-cadherin. (b) Allure du MSD en fonction du temps pour les trois trajectoires caractérisées par les dynamiques (i) de diffusion Brownienne pure, (ii) de diffusion dirigée, (iii) de diffusion contrainte. Adapté de (Kusumi et al., 1993).

Le MSD peut ainsi être utilisé pour caractériser la dynamique de divers phénomènes biologiques tels que la diffusion de récepteurs membranaires de la synapse marqués par des nanocristaux semiconducteurs (Triller and Choquet, 2008). Certaines équipes l’ont également utilisé afin d’étudier la dynamique de moteurs moléculaires appartenant à la famille des kinésines 1 dans des lignées cellulaires de type fibroblaste grâce au suivi de nanotubes de carbone fluorescents (Fakhri et al., 2014) ou de QDots (Courty et al., 2006).

Nous avons donc décidé de tirer avantage de cet outil et de l’utiliser afin de différencier les trajectoires d’intérêt correspondant à des vésicules en mouvement dans les neurones (composées au moins d’une phase de mouvement dirigé) des trajectoires “parasites” (associées principalement à des mouvements de type brownien). Ainsi, en appliquant un seuil que doit dépasser le maximum de la courbe du MSD, on arrive

à éliminer les trajectoires indésirables et à ne conserver que les trajectoires d'intérêt décrivant réellement le transport intraneuronale.

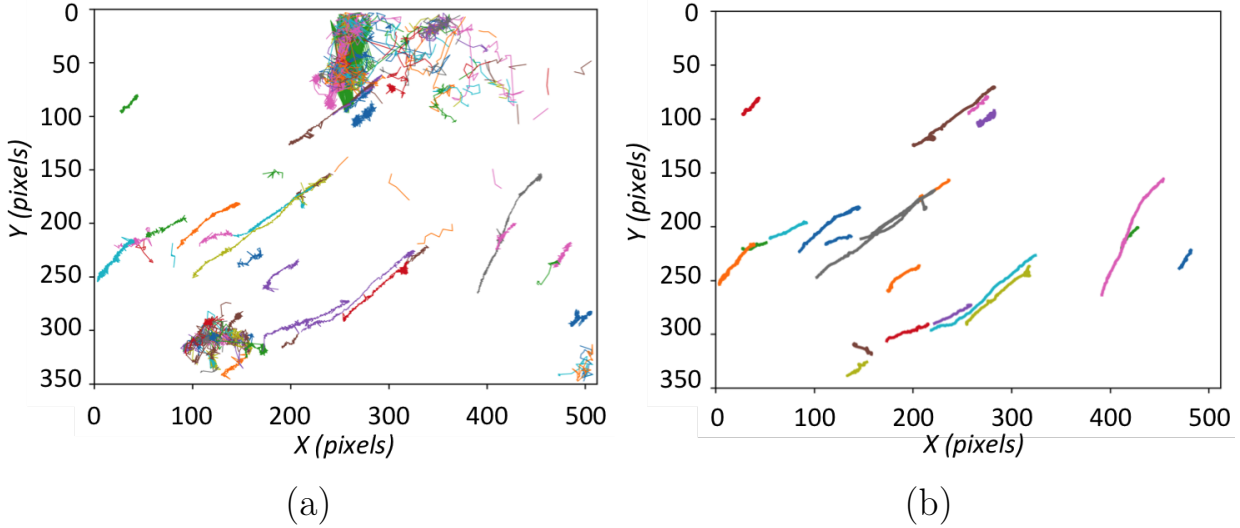


FIGURE 3.15 – Application d'un critère de seuillage du MSD calculé à partir de trajectoires de nano-KTP suivis dans le cerveau de larve de Zf. (a) Intégralité des trajectoires reconstruites par l'algorithme Python. (b) Trajectoires sélectionnées par le tri du critère MSD. Seules les trajectoires dont le maximum du MSD est supérieur à 250 sont conservées. La valeur du seuil est choisie expérimentalement de manière à supprimer les trajectoires non dirigées.

Il est important de noter que l'analyse des mouvements par MSD a des limites. En effet, l'outil MSD n'est pas assez robuste dans le cadre de l'analyse fine de phénomènes dynamiques complexes contenant des phases de diffusion pure et des phases de mouvements dirigés (Meijering et al., 2012). Le MSD est présenté ici comme un critère de tri global des trajectoires. Il permet de sélectionner les trajectoires intéressantes qui vont elles mêmes avoir des paramètres que l'on doit qualifier autrement car on ne peut utiliser le MSD pour discriminer les phases de GO et de STOP. Cela nécessiterait que la trajectoire étudiée soit définie, ainsi que chacune des phases qui la composent, par un très grand nombre de points ; en effet, plus la trajectoire est courte, plus l'imprécision sur la mesure du coefficient de diffusion et /ou du coefficient α sera grande (Weimann et al., 2013).

3.4 Segmentation d’une trajectoire et extraction des paramètres de transport

A ce stade de l’analyse, toutes les trajectoires des vésicules ont été extraites grâce à l’algorithme de détection et de reconstruction des trajectoires programmé en Python (cf section 3.2). Dans le cadre du suivi de nano-KTP, nous avons pu constater que les trajectoires étaient particulièrement bruitées à cause d’une incertitude de localisation trop élevée (Figure 3.9). Un traitement par lissage gaussien a été mis en place pour pallier ce problème (cf section 3.3). A l’issue de ce filtrage, les trajectoires sont suffisamment filtrées et peuvent donc être soumises à la dernière étape du traitement : la **segmentation en phases de mouvement**. Dans cette partie nous discuterons dans un premier temps des méthodes de segmentation usuellement utilisées pour analyser des phénomènes biologiques. Nous justifierons ensuite la stratégie que nous avons choisie d’adopter pour découper les trajectoires de vésicules en phases de mouvement dirigé (dites phases de “GO”) et en phases d’arrêt (“STOP”). Enfin, nous terminerons par décrire la manière dont sont calculés les paramètres de transport.

3.4.1 Méthodes usuelles de segmentation de phénomènes biologiques dynamiques

Le transport intraneuronale est un phénomène biologique dynamique complexe et encore mal connu. Un cargo peut avoir plusieurs moteurs moléculaires associés dont le type (moteur antérograde ou rétrograde) peut être différent. L’activité de tous ces moteurs permet le transport de la vésicule (Hendricks et al., 2010). Par ailleurs, pendant son mouvement, certains moteurs peuvent se détacher et d’autres s’attacher, engendrant alors des changements de vitesse, des phases d’arrêt ou encore des changements de direction. Plusieurs interprétations sont possibles pour une même phase. Par exemple les phases de pause peuvent être interprétées par un décrochage de la vésicule avec

ses moteurs, par la rencontre d'un obstacle ou encore par une situation où le cargo est simultanément tiré dans deux directions opposées créant alors un conflit et donc une interruption dans le mouvement (situation de compétition de moteurs rappelant le jeu de tir à la corde, ou *tug of war*) (Soppina et al., 2009; Müller et al., 2008). Appréhender les multiples mécanismes moléculaires à l'origine de ces changements de phase est un réel défi et représente actuellement un enjeu majeur dans le cadre de la compréhension de certaines maladies neurodégénératives dont il a été montré que le transport intraneuronal était impacté (Bálint et al., 2013).

La segmentation des trajectoires a pour but de repérer ces changements de dynamique et de découper la trajectoire en différentes phases. A nouveau, cela n'est pas un problème simple et beaucoup d'approches différentes ont été développées. Dans ce paragraphe, nous allons brièvement présenter les méthodes les plus couramment utilisées avant de discuter plus en détails de la stratégie que nous avons choisie dans notre cas.

3.4.1.1 L'outil *mean-square displacement*

Comme nous l'avons vu dans la section 3.3.2, une méthode usuellement utilisée consiste à calculer le MSD afin de déterminer si le mouvement est lié à un phénomène de diffusion brownienne pure, de diffusion contrainte ou de déplacement dirigé. (Qian et al., 1991; Kusumi et al., 1993) . En particulier, cette approche est souvent utilisée pour trouver la valeur du coefficient de diffusion de l'émetteur dans le milieu. Il a été montré que cette estimation était robuste dans le cas de la diffusion brownienne pure ; à l'inverse, le résultat peut être biaisé si le mouvement de la particule est plus complexe, notamment dans le cas de la diffusion contrainte (Masson et al., 2009; Voisinne et al., 2010). Par ailleurs, l'échantillonnage de la trajectoire impacte beaucoup les résultats obtenus par l'approche MSD. La trajectoire étudiée doit contenir au moins 10 points afin que son MSD en fonction du temps soit bien défini. Cela est essentiel si l'on veut détecter un changement de courbure du MSD et donc être capable de différencier des mouvements de diffusion simple de mouvements de diffusion complexe (dirigée

ou contrainte) (Huet et al., 2006; Weimann et al., 2013). Dans le cadre particulier de l'étude du transport intraneuronal, cette approche ne convient pas car elle a le gros inconvénient de considérer que toute la trajectoire est caractérisée par un unique régime. Il est donc évident que l'information contenue dans une trajectoire de vésicule de neurone (constituée de plusieurs phases de mouvement) ne sera pas efficacement exploitée si l'on utilise l'approche MSD.

3.4.1.2 Le kymographe

Le kymographe est un autre outil très couramment utilisé qui permet de représenter en une image la dynamique d'un phénomène à l'origine issu de l'enregistrement d'un film. Cette méthode repose sur la représentation judicieuse de l'information spatio-temporelle de la séquence : l'abscisse curviligne de l'objet suivi est calculée et tracée en fonction du temps. Cela permet d'obtenir une représentation graphique de la trajectoire où chaque phase du mouvement uniforme est caractérisée par un segment de pente constante (égale à la vitesse curviligne) ; les ruptures de pente matérialisent alors les changements de phases (Chenouard et al., 2010) (Zhang et al., 2011). Une fois le kymographe reconstruit, l'étape cruciale est donc de repérer précisément ces ruptures de pente. Plusieurs algorithmes ont été développés afin d'automatiser cette partie ; néanmoins, il est fréquent qu'il y ait des erreurs de découpages (Zala et al., 2013). Ainsi, en pratique, cette étape est souvent faite manuellement ce qui a l'inconvénient, en plus du biais introduit par l'expérimentateur, de rendre le processus d'analyse long et fastidieux.

3.4.1.3 Le modèle de Markov caché (*Hidden Markov Model* (HMM))

C'est un modèle mathématique statistique dérivé des chaînes de Markov reposant sur une approche bayésienne. Le principe général est d'étudier une séquence d'observations que l'on sait liées à une séquence d'états cachés qui n'est pas directement observable. Ainsi, dans notre cas, chaque point de la trajectoire correspond à une "ob-

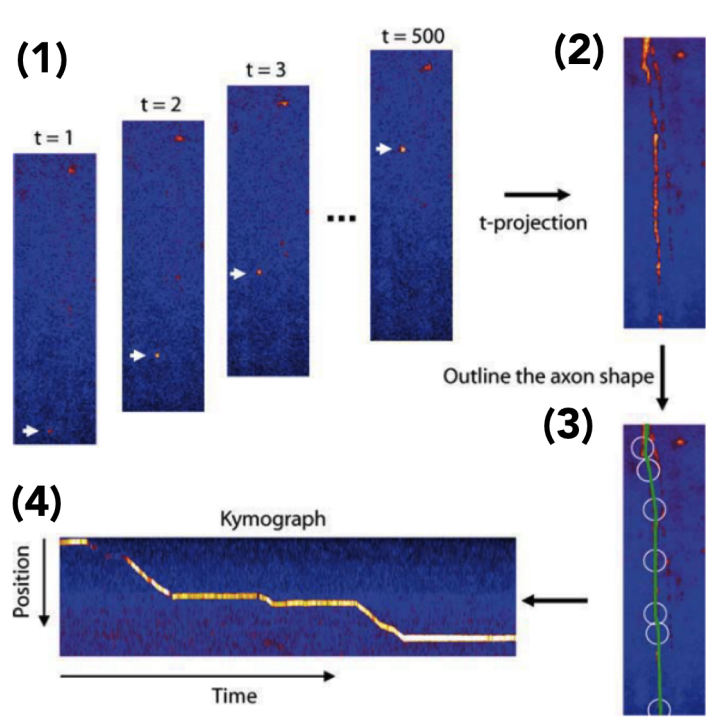


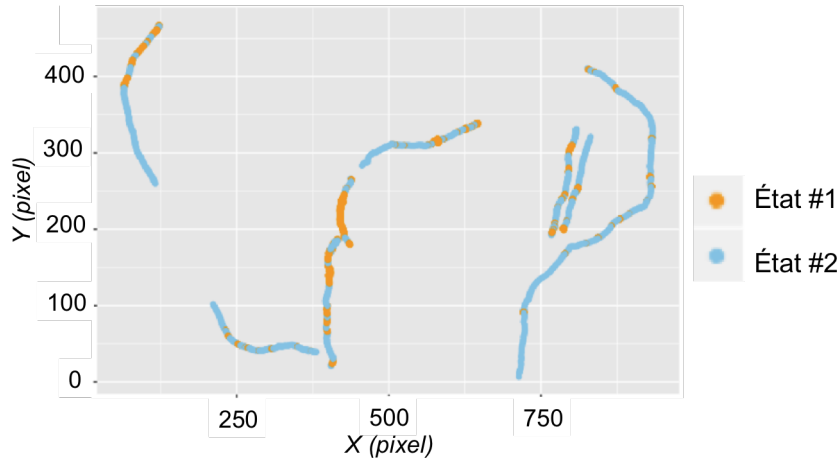
FIGURE 3.16 – Construction d’un kymographe à partir du film d’un émetteur fluorescent en mouvement dans l’axone d’un neurone. (1) Image de l’émetteur fluorescent suivi (pointé par une flèche blanche) à différents instants t . (2) Projection d’intensité maximale selon l’axe temporel. (3) Reconstitution de l’axone du neurone dans lequel la mesure du déplacement de l’émetteur est effectuée. (4) Construction du kymographe : évolution de la position curviligne de l’émetteur en fonction du temps. Adapté de (Zhang et al., 2011).

servation” et les “états cachés” sont les différents types de mouvement (dont le nombre de possibilités est fixé par l’utilisateur). L’algorithme estime la probabilité de passer d’un état à l’autre point par point et segmente ainsi la trajectoire en différentes classes de mouvement (Das et al., 2009; Persson et al., 2013; Monnier et al., 2015).

Ces dernières années, différents algorithmes reposant également sur l’inférence bayésienne ont été développés et ont permis dans certaines applications d’améliorer la qualité de segmentation de trajectoires (Yoon et al., 2008). Contrairement au kymographe, ces approches alternatives ont l’avantage d’être automatiques et dépourvues de biais liés à l’utilisateur. Néanmoins, les temps de calculs sont conséquents et le processus d’analyse nécessite un grand nombre de données afin d’obtenir des modèles de segmentation optimaux (Yu, 2016).

Analyse comparative de quelques méthodes de segmentation. Dans le cadre de l’analyse de nos trajectoires de vésicules neuronales, nous nous sommes penchés sur différentes approches. Nous avons notamment essayé d’utiliser des algorithmes de segmentation déjà développés et disponibles gratuitement en ligne, tel que l’algorithme Matlab u-track, développé par Jaqaman *et al* (Jaqaman et al., 2008; Vega et al., 2018) ou encore celui de Petrov *et al* (Petrov et al., 2007; Chowdary et al., 2015). En outre, nous avons travaillé avec Adeline SAMSON, professeure à l’Université Grenoble Alpes, et Sophie DONNET, chargée de recherche à l’INRAE afin d’étudier les résultats d’une segmentation de nos trajectoires par la méthode HMM. Sous leur direction, Ignacio MADRID, dans le cadre de son projet de Master 2 (“Mathématiques pour les Sciences du vivant”), a mis en place cet algorithme HMM et l’a appliqué à nos données. Un des éléments intéressants qui est ressorti de ces travaux est le fait que la méthode HMM, si nous n’imposons pas un nombre d’états prédéfini, permet la détection de phases intermédiaires telles que des “pseudo-STOP” correspondant à une diffusion contrainte, et qui pourraient être associées à un détachement partiel ou total de la vésicule du microtubule sur lequel elle se déplaçait, tout en restant dans son voisinage. En revanche, si l’on impose à l’algorithme HMM de ne détecter que deux états, alors la segmentation mène à des résultats très proches d’une méthode heuristique que nous avons mis en place dans l’équipe et qui permet de définir des phases de GO et de STOP dans une trajectoire. En effet, la figure 3.17, réalisée par Ignacio MADRID, illustre le résultat de la segmentation par la méthode HMM d’un ensemble de trajectoires issues de nos données. On constate que l’algorithme HMM découpe les trajectoires en morceaux et identifie chaque morceau comme appartenant à l’état 1 ou à l’état 2. Le tableau de contingence (cf figure 3.17b) a pour but de comparer le résultat HMM à celui de notre méthode heuristique. On établit alors que l’état 1 comprend 88 % des phases de STOP définies par notre méthode et que l’état 2 correspond en majorité nos phases de GO.

Ainsi, nous avons finalement décidé d’utiliser la **méthode heuristique** reposant sur un critère local d’évaluation du **rapport de confinement** (défini ci-après) afin de



(a)

	HMM état #1	HMM état #2
Méthode heuristique : phase de STOP	88.44 %	11.56 %
Méthode heuristique : phase de GO	11.28 %	88.72 %

(b)

FIGURE 3.17 – Comparaison du découpage de trajectoires obtenu par une méthode de type HMM et par notre méthode heuristique. (a) Ensemble de trajectoires segmentées par HMM. (b) Tableau de contingence des deux méthodes. Figures adaptées des travaux de Ignacio MADRID.

déterminer les différentes transitions de dynamiques. Cette technique “maison” donne des résultats très proches de ceux obtenus par les méthodes de type HMM et s’est avérée bien plus efficace en terme de temps de calculs.

3.4.2 Méthode de segmentation automatique mise en place et extraction des paramètres de transport

En utilisant une fenêtre glissante de taille fixée N (en nombre d’images), il est possible de définir une valeur du **rapport de confinement** en chaque point de la trajectoire. Cette grandeur correspond au ratio entre la distance effective nette parcourue (distance entre le point d’arrivée et le point de départ) et la distance totale parcourue sur N points (somme des longueurs des $(N - 1)$ segments) :

$$R_{\text{conf}}(i) = \frac{d_{\text{nette}}}{\left(\sum_{j=i-N/2}^{i+N/2} d_j\right)} \quad (3.16)$$

La fenêtre glissante que nous utilisons a une taille fixée à 11 points ; ce choix a été fait de manière empirique. En effet, en fonction du phénomène biologique suivi et des phases que l'utilisateur veut détecter, le choix de la taille de cette fenêtre est important. Une valeur trop grande ne permettra pas de détecter les transitions de mouvement rapides (par exemple, les phases de STOP très courtes) ; à l'inverse, si la fenêtre est trop petite, le risque est de favoriser la détection de faux positifs.

Le rapport de confinement donne finalement une idée du caractère dirigé de la trajectoire : s'il tend vers 1, la trajectoire a une allure rectiligne et sans changement abrupt de direction ; si au contraire le rapport tend vers zéro, le mouvement est plus confiné (Figure 3.18). Ainsi, en appliquant un seuil sur le rapport de confinement, il est possible de différencier deux types de mouvements caractérisant le transport intraneuronal : les pauses des vésicules (phases de STOP) et les portions où la vésicule avance dans une direction donnée (phases de GO) (Figure 3.18). À nouveau, ce seuil est défini par l'utilisateur ; un moyen efficace de trouver sa valeur optimale est de tracer l'histogramme du rapport de confinement d'une trajectoire typique. On constate sur la figure 3.18 que cet histogramme permet de mettre en évidence deux populations bien distinctes : les points de la trajectoire ayant un rapport de confinement très haut (supérieure à 0.8) et les autres points dont le rapport est proche de zéro ; autrement dit, les GO et les STOP.

Ainsi, le rapport de confinement permet de repérer de manière efficace la majorité des transitions de phase. En revanche, il peut y avoir au cours d'une trajectoire un fort ralentissement de la vésicule sans pour autant qu'il y ait de changement de direction. Dans ce cas, la valeur de r_{conf} restera proche de 1 car la trajectoire conserve son caractère rectiligne. Cela est un problème car biologiquement un tel ralentissement peut être dû à la rencontre d'un obstacle ou à des décrochages de moteurs. Dans

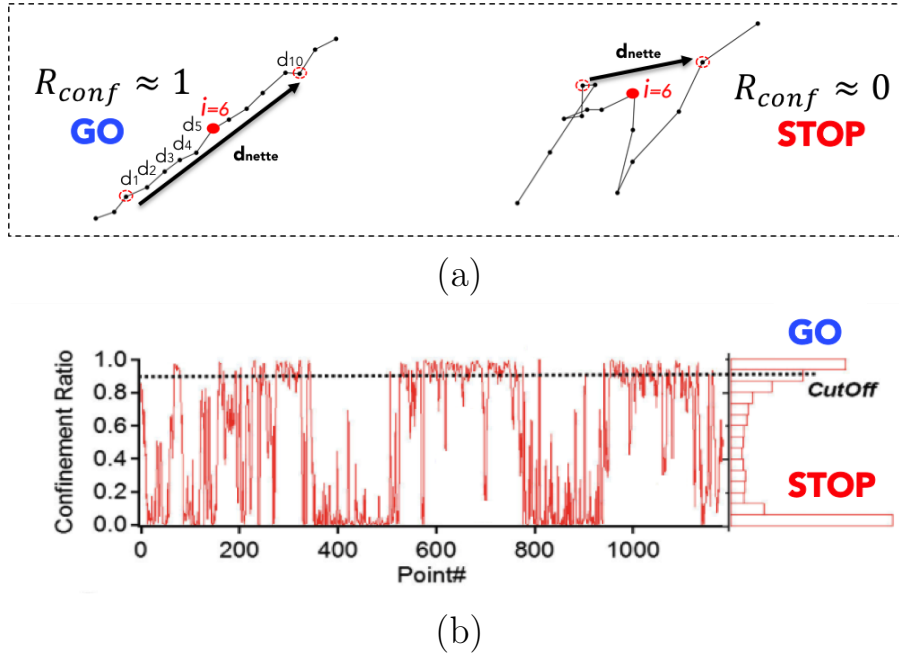


FIGURE 3.18 – Méthode heuristique de segmentation et classification des phases de mouvement dans une trajectoire. (a) Rapport de confinement dans le cas d’une phase de GO et d’une phase de STOP. (b) Rapport de confinement en chaque point d’une trajectoire et segmentation engendrée par la mise en place d’un seuil, figure tirée de (Haziza et al., 2017).

tous les cas, il est important que l’algorithme mis en place détecte cet évènement et classe les points de ralentissement dans les catégories des STOP. Afin de définir rigoureusement la notion de “fort ralentissement” nous avons décidé d’utiliser la valeur de la précision de localisation des trajectoires analysées. Ainsi, si la vésicule se déplace entre deux images d’une distance inférieure à la précision de localisation, alors nous considérons que son mouvement est “fortement” ralenti. En considérant une précision de localisation idéale σ_{ref} de 20 nm (correspondant à la précision obtenue après filtrage spatial des coordonnées $(x(t), y(t))$ de la trajectoire; voir section 3.3.1), la vitesse minimale détectable associée est de 400 nm par seconde (en considérant un intervalle de temps de 50 ms entre chaque image). On peut aussi comprendre cela par le fait que si la vésicule est détectée dans un rayon inférieur à la précision de localisation alors nous ne pouvons pas être certains qu’elle se soit déplacée : la vésicule est alors considérée en phase de STOP.

Une fois la trajectoire découpée en phases, nous pouvons extraire des paramètres de transport caractéristiques du mouvement. Ces derniers sont :

- la vitesse moyenne de toutes les phases de GO de la trajectoire (en $\mu m/s$)
- la durée moyenne des phases de GO (en s)
- la distance parcourue pendant les phases de GO (en μm)
- la durée des phases de STOP (en s)
- la fréquence des pauses (en $events/s$)

3.5 Bilan

Dans ce chapitre nous avons montré qu’il faut adapter les outils d’analyse des données brutes d’imagerie de nanotraceurs en mouvement, à la dynamique du phénomène biologique étudié. En particulier, dans le cadre de l’étude du transport intraneuronal *in vivo*, nous avons justifié l’utilisation d’un algorithme Python “maison” de détection et reconstruction de trajectoires. Par ailleurs, pour segmenter les trajectoires en phases de mouvements dirigés et pauses, nous avons établi que notre méthode heuristique était robuste car elle menait à des résultats très proches des autres méthodes communément utilisées, mais plus gourmandes en moyens de calcul.

Chapitre 4

Imagerie *in vivo* du transport intraneuronal dans la larve de poisson-zèbre

Sommaire

4.1	Introduction	132
4.2	Suivi <i>in vivo</i> de nanocristaux non linéaires dans le cerveau de la larve de poisson-zèbre	135
4.2.1	Premiers essais de mesures de transport intraneuronal dans le cerveau de la souris	135
4.2.2	Conception des expériences dans la larve de poisson-zèbre	137
4.2.3	Mesure du transport axonal dans le toit optique de la larve de poisson-zèbre	146
4.2.4	Analyse des données de transport axonal dans Zf	149
4.3	Détection et quantification d'altérations du transport axonal dans la larve de Zf	152
4.3.1	Mesures du transport axonal après déstabilisation du cytosquelette par traitement pharmacologique	152
4.3.2	Mesure du transport axonal dans les larves Zf transgéniques <i>kif5aa</i> ^{-/-}	156
4.3.3	Étude du transport axonal dans les larves Zf transgéniques <i>dync1h1</i> ^{mw20}	169
4.4	Conclusion	173

4.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 des études pangénomiques à grande échelle ont révélé qu'un grand nombre de facteurs de risques génétiques sont associés aux maladies neurodégénératives mais l'impact fonctionnel de ces facteurs n'est pas connu.

De plus, dans plusieurs de ces pathologies les axones présentent des anomalies morphologiques, en lien avec des anomalies de transport intracellulaire. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces anomalies et leur lien avec les facteurs de risques des pathologies, divers modèles expérimentaux *in vitro* et *ex vivo* ont été élaborés tels que : des lignées cellulaires, des cultures primaires de neurones, des coupes organotypiques ou plus récemment des organoïdes. Dans le cas des cultures *in vitro* (Vossel et al., 2015; Chowdary et al., 2015), le réseau est désorganisé et ne comprend pas de région spécialisées comme dans le cerveau. Ce système rend impossible la reconstitution d'une architecture semblable à celles que l'on trouve dans un environnement *in vivo*.

Plusieurs équipes cherchent maintenant à étendre leurs études à des circuits neuro-naux *in vivo* intègres. Nous avons discuté dans le chapitre 2 des nombreuses difficultés techniques associées à l'imagerie *in vivo*, notamment à cause de l'épaisseur des tissus (au minimum, quelques centaines de micromètres) qui complique l'acquisition des données dynamiques de bonne résolutions spatiale et temporelle. Les **expériences *in vivo*** décrites dans la littérature concernent majoritairement des **neurones du système nerveux périphérique** accessibles par chirurgie. Misgeld *et al* ont ainsi mesuré le transport des mitochondries dans le nerf sciatique d'une souris transgénique ayant une enzyme de la membrane mitochondriale fusionnée avec une protéine fluorescente (Misgeld et al., 2007). Pour cette expérience une incision a dû être faite pour extraire le nerf, sans le couper, et le placer sous l'objectif de microscope. L'équipe de Giampietro Schiavo utilise également cette méthode d'imagerie *in vivo* dont elle a détaillé le pro-

toque expérimental dans (Gibbs et al., 2016). Cette équipe a très récemment appliqué cette méthode à la mesure du transport d'endosomes (marqués avec un fluorophore greffé à la toxine tétanique) dans des souris transgéniques portant une mutation présente dans la sclérose amyotrophique latérale (ALS). Elle a démontré que l'anomalie de transport endosomal ne survenait qu'à l'âge d'un mois et demi (Sleigh et al., 2020). Elle s'est aussi servie de cette approche pour identifier une molécule capable de corriger l'anomalie de transport axonal dans des souris transgéniques portant une autre mutation associée à l'ALS (Gibbs et al., 2018), démontrant ainsi la puissance de cette méthode. Cependant, cette méthode d'imagerie de nerfs isolés chirurgicalement sur des souris vivantes est très invasive, et n'a pour l'instant été appliquée qu'au nerf sciatique et aux axones de neurones du ganglion spinal (Sorbara et al., 2014). De plus les cadences d'acquisition d'une image toutes les 2 à 3 secondes, utilisées dans ces expériences, sont trop lentes pour détecter des défauts "fins" tels que des pauses courtes dans le déplacement des organites.

À notre connaissance, il n'y a qu'une étude (publiée en 2018) faisant état de la mesure du transport de vésicules endosomales dans le cerveau de souris vivantes (Knabbe et al., 2018). L'accessibilité au cerveau est plus difficile car elle nécessite d'abord de traverser le crâne puis de pénétrer à des profondeurs qui peuvent atteindre plusieurs millimètres pour certaines structures cérébrales d'intérêt. Ainsi, Knabbe *et al* ont monté une fenêtre optique chronique sur le crâne d'une souris, pour suivre par microscopie le déplacement de vésicules à cœur dense marquées par une protéine fluorescente. Cette approche permet d'accéder au transport dans les dendrites et axones de neurones des couches supérieures du cortex (en surface du cerveau donc), qui sont organisés parallèlement à la surface du cerveau (Knabbe et al., 2018). Dans cette étude, Knabbe *et al* ont utilisé un microscope à deux photons, et la cadence d'acquisition était d'un champ carré de taille $200\ \mu\text{m}$ (taille d'un pixel : 192 nm) par seconde. Cette cadence est probablement limitée par le photoblanchiment trop rapide qui résulterait d'une augmentation de la puissance d'excitation. Là encore, tout comme pour les expériences faites sur les

nerfs périphériques (Misgeld et al., 2007; Gibbs et al., 2016), cette faible cadence risque d'empêcher la détection d'anomalies de déplacement des moteurs de courtes durées, telles que celles dues à la présence de molécule associées aux microtubules, pouvant réduire très transitoirement la vitesse de déplacement.

Dans le chapitre 2 nous avons montré que pour maintenir la cadence d'acquisition de 20 images/s, nous pouvions utiliser un nanotraceur à réponse optique non-linéaire, qui ne blanchit pas. Cependant, alors qu'il est aisé de l'internaliser dans des cultures (par endocytose spontanée), il est plus difficile de le faire *in vivo*. Au début de ce chapitre nous présenterons les premiers essais que nous avons réalisés au début de ma thèse dans le but de mesurer le transport intraneuronale dans le cerveau de la souris. Nous verrons que l'étape d'internalisation des particules s'est avérée limitante, ce qui nous a conduit à nous tourner vers la larve de poisson-zèbre, dont les tissus encore en développement, et la plus faible densité cellulaire, rendent l'internalisation de nanoparticules plus faciles.

Au cours des dernières décennies, le poisson-zèbre (ou *zebrafish*, **Zf** en anglais) s'est imposé comme un puissant modèle vertébré largement utilisé en biologie du développement notamment pour l'étude du système nerveux *in vivo* (Bercier et al., 2019). Les avantages du Zf sont en effet nombreux. Il se reproduit rapidement et en grand nombre. Du fait de sa petite taille, son élevage prend peu de place. Les larves se développent hors de la femelle et sont transparentes, ce qui permet d'imager en profondeur. Par ailleurs, les récents progrès en matière de manipulations génétiques ont fait de ce modèle une excellente option pour mieux comprendre le développement du système nerveux (Schmidt et al., 2013) et pour tester l'effet de composés moléculaires. En outre, le poisson zèbre est récemment apparu comme un outil prometteur pour étudier, à l'échelle cellulaire, l'infectiologie et les virus responsables de maladies humaines telles que l'herpès, la grippe ou l'hépatite et plus spécifiquement leurs mécanismes de propagation ainsi que leur persistance (Langevin and Boudinot, 2016).

Au cours de ce chapitre, nous discuterons dans un premier temps plus en détails de l'intérêt d'utiliser la larve de Zf (section 4.2.2), puis nous verrons comment nous avons

adapté nos outils d'imagerie et d'analyse (décrits dans le chapitre 2 et 3 respectivement) à la mesure du transport intraneuronal dans les axones de neurones du toit optique de la larve de Zf (section 4.2.3 et 4.2.4). Dans un second temps, nous nous intéresserons à la détection de modifications subtiles du transport dans des poissons portant une mutation sur l'un des moteurs moléculaires. Nous présenterons ainsi les résultats de mesures de transport obtenus pour deux études différentes que nous avons menées :

- L'étude de l'**impact d'une déstabilisation du cytosquelette par traitement pharmacologique** sur le transport (section 4.3.1).
- L'étude de l'**impact d'un changement de concentration des moteurs kinésine I assurant le mouvement antérograde, par l'utilisation d'une lignée transgénique *kif5aa*^{*162} de poisson-zèbre** (mutant invalidé pour l'expression de la sous-unité Kif5aa). Des mutations sur le gène humain *KIF5A* ont été retrouvées dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (section 4.3.2).
- L'étude d'une perturbation de la dynéine assurant le mouvement rétrograde, de la périphérie vers le corps cellulaire. Un modèle de poisson-zèbre transgénique possédant une **mutation de la chaîne lourde 1 de la dynéine cytoplasmique 1** est étudié.

4.2 Suivi *in vivo* de nanocristaux non linéaires dans le cerveau de la larve de poisson-zèbre

4.2.1 Premiers essais de mesures de transport intraneuronal dans le cerveau de la souris

Dans le cadre d'un projet conjoint avec Brice BATHELLIER (à l'époque à NeuroPSI, Gif-sur-Yvette ; projet Défis Imag'In MITI CNRS 2017-2019) nous avons tenté de faire internaliser des nano-KTP et nano-BTO-PEG par des neurones du cortex de souris. Pour cela nous avons appliqué une procédure identique à celle de (Knabbe

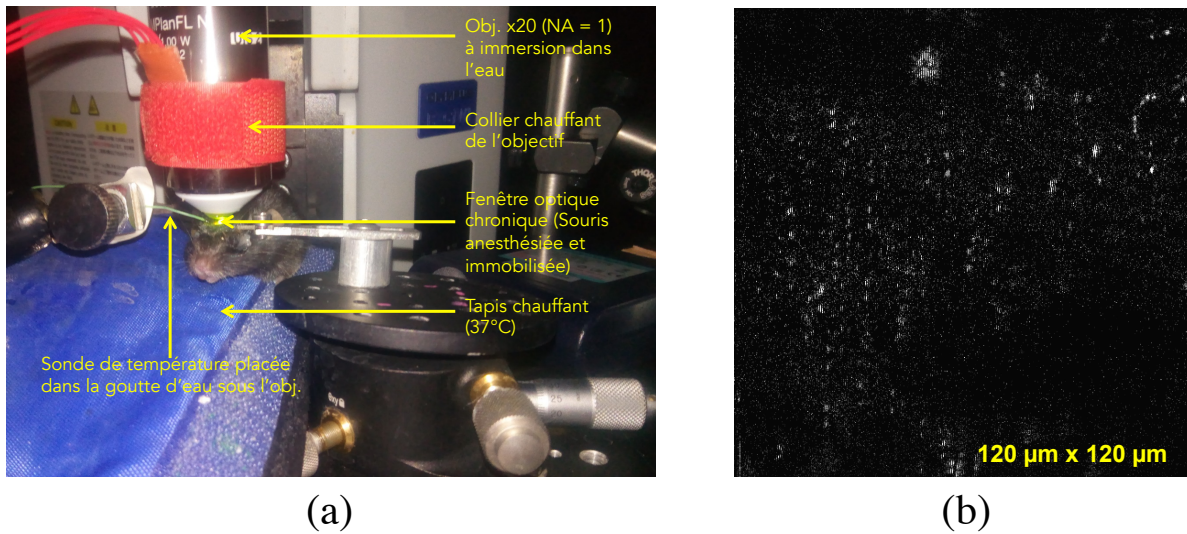


FIGURE 4.1 – Enregistrement par microscopie deux-photons du signal SHG de nano-KTP injectés dans le cerveau de la souris à une profondeur d'environ $100\ \mu\text{m}$ sous la surface ; expériences réalisées en collaboration avec Brice BATHELLIER dans le laboratoire NeuroPSI à Gif-sur-Yvette. (a) Photo de la souris anesthésiée et positionnée sous le microscope deux-photons (b) Signal SHG de nanoKTP détectés à une profondeur de $85\ \mu\text{m}$ sous la dure-mère, à la cadence de 30 images/s. Filtre de détection : $515/25\ \text{nm}$.

et al., 2018), à savoir la réalisation d'une craniotomie et la pose d'une fenêtre optique chronique, après injection stéréotaxique des nanocristaux à une profondeur d'environ $100\ \mu\text{m}$. Nous avons pu détecter, avec le microscope 2-photons d'imagerie du petit animal de B. BATHELLIER (FemtoSmart résonnant scanners, Femtonics, Hongrie) le signal SHG de nano-KTP à une cadence aussi élevée que 30 images/s avec un rapport signal/fond élevé de l'ordre de 10, mais n'avons pas observé le moindre mouvements. Les nanoparticules sont bien dispersées au delà du point d'injection, mais elles ne semblent pas être internalisées par les neurones. Une des deux souris a survécu à la chirurgie et a été réexaminée 10 jours après l'injection : les nanoparticules étaient toujours présentes. Nous pensons qu'une solution pourrait être d'associer les particules à un agent de transfection pour permettre leur internalisation neuronale, dans un environnement aussi dense que le cortex. Ce point est discuté dans les perspectives.

Ces premiers résultats nous ont conduits à l'étude d'un modèle *in vivo* alternatif et nous avons ainsi transposé notre stratégie à la larve de poisson-zèbre.

4.2.2 Conception des expériences dans la larve de poisson-zèbre

4.2.2.1 Intérêt de la larve de poisson-zèbre pour des études neurobiologiques

Le Zf est un petit poisson de 2 à 4 cm dans sa forme adulte. Sa petite taille et sa rapidité de reproduction (chaque femelle peut pondre de 100 à 200 œufs par semaine) rendent son élevage facile et peu couteux. Le développement des embryons s'effectue de plus hors de la femelle et très rapidement ; la plupart des organes sont mis en place au cours des 24 premières heures du développement. Comme nous l'avons déjà évoqué, **la transparence des embryons est un grand avantage pour l'imagerie du système *in vivo*.**

Un autre atout essentiel de ce modèle est le fait que **70 % des gènes humains aient au moins un orthologue chez le Zf** (Howe et al., 2013). En particulier, les structures des moteurs moléculaires appartenant à la famille des kinésines, dynéines et myosines impliquées dans le transport intraneuronal sont extrêmement bien conservés chez les vertébrés (Kim and Endow, 2000; Sittaramane and Chandrasekhar, 2008). Par exemple, la chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique 1 (Dync1h) présentent 91 % de similitudes avec la protéine humaine. Ce degré élevé de ressemblance permet d'utiliser le Zf comme système modèle pour étudier les fonctions de ces moteurs moléculaires dans un contexte d'intérêt ultérieur pour l'homme. Il permet ainsi d'étudier des phénomènes biologiques complexes à l'interface entre les modèles cellulaires et les modèles mammifères.

Le poisson zèbre possède un large éventail de possibilités en termes de manipulation génétique. En effet, la transgénèse est efficacement et régulièrement utilisée chez le Zf afin de synthétiser des lignées transgéniques exprimant des protéines rapportrices sous promoteur d'intérêt et fusionnées à des protéines cibles. Par ailleurs, avec le développement d'outils génétiques puissants tel que le système CRISPR/Cas9, les manipulations sur le Zf sont devenues encore plus performantes. CRISPR/Cas9 est

en effet une technique permettant de cibler spécifiquement une zone de l'ADN et de le découper à un endroit précis. Ensuite, il est possible d'insérer une séquence dans ce gène par recombinaison homologue (Doudna and Charpentier, 2014). Cette approche permet d'éditer rapidement et facilement le génome des cellules. Il est par exemple possible d'induire chez le Zf des mutations spécifiques à certains tissus et de modifier leur phénotype (Di Donato et al., 2016). L'ensemble de ces technologies permet aussi de cibler des domaines protéiques particuliers afin d'interférer avec les interactions protéine-protéine et ouvre ainsi la possibilité de reproduire chez le Zf des mutations associées aux maladies humaines. **La larve de Zf est ainsi largement utilisée pour modéliser les mécanismes moléculaires impliqués dans certaines maladies neurodégénératives (*e.g.* maladie de Parkinson, amyotrophie spinale...)** (Bandmann and Burton, 2010; Babin et al., 2014; Fontana et al., 2018). En particulier, certains moteurs moléculaires ont été associés à des troubles neuropsychiatriques (Chen and Sheng, 2013) et de nombreuses études ont révélé la présence d'anomalies du transport axonal dans le contexte de maladies neurodégénératives (Encalada and Goldstein, 2014; Millecamps and Julien, 2013; Guedes-Dias and Holzbaur, 2019).

4.2.2.2 Choix de la région cérébrale du Zf étudiée

Le **toit optique** (TO) est un centre de traitement des informations somatosensorielles, principalement visuelles, qui permet d'engendrer des réponses comportementales adaptées. Chez le Zf, il est nécessaire pour une vision de haute acuité (Gahtan, 2005), et est également à l'origine de la régulation des fonctions motrices de prise de proie et de comportement d'évitement (Del Bene et al., 2010) ou encore, de la coordination des saccades oculaires (Roeser and Baier, 2003). Chez les vertébrés, le TO est une structure très stratifiée située dans le mésencéphale¹ (Krauzlis et al., 2013). Chez les mammifères, le TO, également appelé colliculus supérieur, reçoit des entrées afférentes de plusieurs régions sensorielles du cerveau, et possède une topographie complexe (Chabot et al.,

1. Le mésencéphale, également appelé cerveau moyen, est une région du tronc cérébral reliée au cerveau.

2013). À l'inverse des mammifères, les poissons n'ont pas de cortex visuel (Striedter and Northcutt, 1989) ; ce manque est alors compensé par un TO proportionnellement plus grand qui permettrait de remplacer les fonctions réalisées par le cortex visuel présent chez les mammifères (Orger, 2016). Comme le montre la figure 4.2, le TO du Zf est une structure dorsale formée de deux lobes symétriques de chaque côté du cerveau.

Le TO est subdivisé en deux zones principales : la zone périventriculaire grise (PVL, *periventricular layer*) et le **neuropile** (NP). La zone PVL contient les corps cellulaires de la majorité des neurones tectaux nommés **neurones périventriculaires** (PVNs, *periventricular neurons*) (Corbo et al., 2012). Ces neurones tectaux projettent leur axone vers le neuropile qui contient également les axones et dendrites des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC, *Retinal ganglion cells*) dont le corps cellulaire est localisé dans l'oeil opposé. La majorité des informations reçues par le TO est fournie par les projections axonales des RGC (Cerveny et al., 2012). Chez le poisson-zèbre, la structure du toit optique se forme au début du développement. Trois jours après la fécondation, le neuropile ainsi que la zone périventriculaire sont formés et les axones des RGC commencent à arriver dans le neuropile.

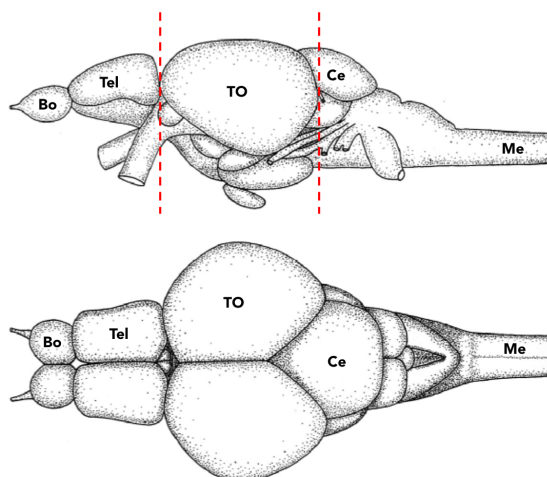


FIGURE 4.2 – Vue latérale et dorsale du cerveau d'un poisson-zèbre adulte. Les traits pointillés délimitent de gauche à droite le télencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Bo : Bulbe olfactif ; Tel : Télencéphale ; TO : Toit optique ; Ce : Cervelet ; Me : Moelle épinière. Adaptée de l'atlas de neurotomie de (Wullimann et al., 1996).

Afin de mesurer le **transport intraneuronal dans le toit optique** de la larve de Zf, nous avons décidé d'utiliser les nanoparticules de KTP que nous avons préalablement validées *in vitro*. Comme nous l'avons déjà expliqué dans le chapitre 2, ce nanotraceur à réponse non linéaire SHG a été choisi car il émet un signal de forte intensité qui nous permet de suivre ses déplacements à une cadence élevée tout en conservant une précision de localisation satisfaisante.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'injecter les nanoparticules de KTP dans l'œil du poisson où se trouvent les RGCs. Nous espérions alors que les nano-KTP puissent diffuser vers ces cellules, y être internalisées et ainsi être transportées à l'intérieur des axones. Néanmoins, cela n'a pas été observé : il semblerait que les KTP restent bloqués au niveau de l'œil. Après plusieurs tentatives, nous avons finalement décidé d'effectuer une injection directement dans le toit optique (protocole détaillé dans l'annexe H). Une partie des nano-KTP injectés se retrouve alors dans le ventricule cérébral², comme l'indique le fait que leur mouvement est brownien dans le liquide céphalo-rachidien du ventricule, tandis qu'il est dirigé lorsque les nano-KTP sont internalisés dans les neurones. Par ailleurs, il a également fallu optimiser la durée entre l'injection des marqueurs et l'observation du transport. Nos essais ont montré qu'un délai de 24 h convenait bien pour observer des déplacements de vésicules dirigés. Ainsi, à 4 dpf³, nous pouvons effectuer l'imagerie dynamique en microscopie à deux photons pour extraire des mesures du transport.

Dans le cadre de nos expériences de mesure du transport, nous pensons observer les déplacements d'endosomes à l'intérieur des branches neuronales des PVNs. En effet, l'organisation particulière des PVNs qui projettent leur axones parallèlement les uns aux autres donne un **critère de sélection des trajectoires** par leur caractère rectiligne et leur orientation dirigée vers l'oeil. La figure 4.3 illustre la zone du TO que l'on étudie à l'aide d'un schéma et d'une image de fluorescence que nous avons réalisée

2. Cavité située dans l'encéphale et contenant du liquide céphalo-rachidien

3. **dpf** signifie *days post fertilization*, c'est à dire jours après fécondation.

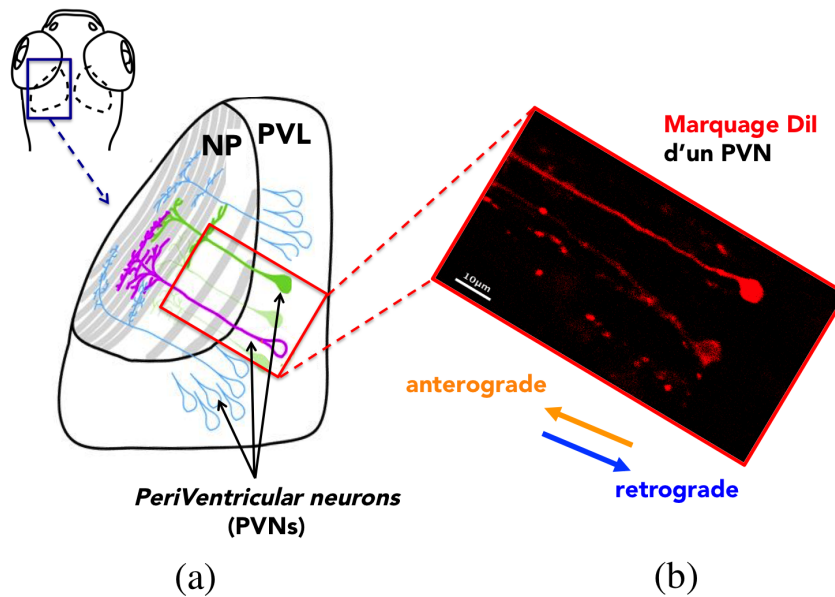


FIGURE 4.3 – Organisation des neurones périventriculaires (PVNs) dans le toit optique (TO). Les corps cellulaires des PVNs sont dans la zone périventriculaire grise (PLV) et les axones sont projetés dans le neuropile. (a) Schéma du TO adapté de (Förster et al., 2017). (b) Image d'un PVN marqué par un colorant acquise par nos soins sur la plateforme IERP -EMERG'IN de l'INRAE (Jouy-en-Josas). Une solution aqueuse d'un colorant carbocyanine lipophile (DiI) ciblant la membrane des cellules neuronales a été injectée directement dans le toit optique au troisième jour du développement de la larve. Le colorant diffuse dans l'organisme pendant 24h et l'imagerie est effectuée au quatrième jour de développement. On observe très distinctement un neurone du PVL dont l'axone se projette vers le neuropile.

(par marquage membranaire) où l'on observe des corps cellulaires très probablement de PVN ainsi que les projections de leur axone vers le neuropile. **Néanmoins, cela reste une hypothèse car pour s'en assurer il faudrait utiliser une construction permettant de marquer spécifiquement les PVN.** Malheureusement, à notre connaissance il n'existe pas de lignées marquant spécifiquement les PVNs. En effet, malgré le fait que le modèle de Zf soit grandement utilisé pour étudier le fonctionnement de circuits neuronaux du cerveau, il existe peu d'informations concernant les types cellulaires spécifiques dans la principale région cérébrale du poisson qu'est le toit optique.

(Robles et al., 2011) ont réussi à identifier trois types de cellules tectales spécifiquement marquées grâce à une construction génétique contenant le promoteur *distal-less*

six (*dlx6*) 5' et un fragment de la région intergénique situé entre *dlx5* et *dlx6* : les inter-neurones périventriculaires bistratifiés (*Bistratified periventricular interneurons*, bsPVIN), les inter-neurones périventriculaires non stratifiés (*Non-stratified periventricular interneurons*, nsPVIN) et les neurones de projection périventriculaires (*Periventricular projection neurons*, PVPN). Ces trois types de neurones projettent leur axone dans le neuropile du toit optique et cet article apporte d'importantes précisions concernant leur arborisation et plus précisément sur la position de leur projection axonale et connexions synaptiques dans les différentes couches du neuropile. La figure 4.4 illustre par exemple le marquage d'un bsPVIN dans le toit optique d'une larve de poisson-zèbre à 4 dpf.

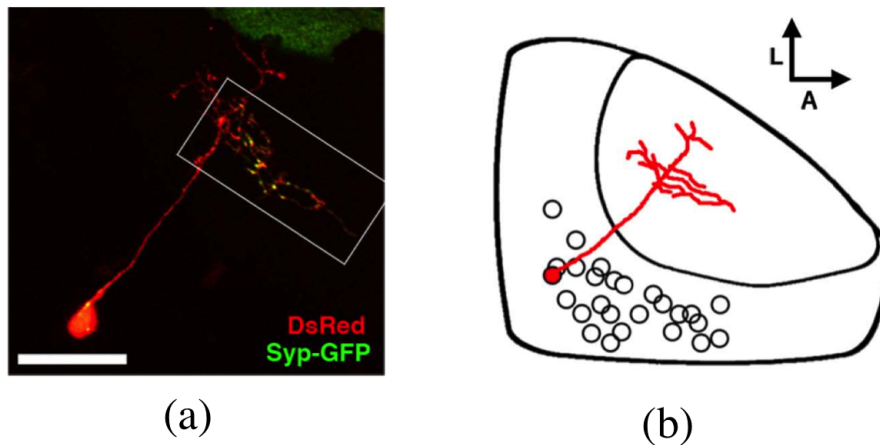


FIGURE 4.4 – Les inter-neurones périventriculaires bistratifiés (bsPVIN). (a) Image d'un bsPVIN à 4 dpf exprimant à la fois DsRed (rouge) et Syp-GFP (vert); projection maximale dans la direction z d'une séquence d'images acquises par microscopie confocale. Barre d'échelle : $20\ \mu\text{m}$ (b) Représentation schématique de la répartition des corps cellulaires bsPVIN dans la couche PVL (*periventricular layer*). La cellule tracée en rouge indique l'emplacement relatif et l'échelle du neurone représenté en (a). Adaptée de (Robles et al., 2011).

Plus récemment, (Förster et al., 2017) ont introduit une boîte à outils d'optogénétiques polyvalente, appelée "Optobow", permettant de regrouper les découvertes associées aux connexions neuronales excitatrices *in vivo*. En combinant le système Gal4-UAS avec la recombinaison Cre/lox⁴, ils arrivent à cibler et à marquer stochas-

4. La recombinaison Cre-Lox est une technologie de recombinaison spécifique à un site, utilisée pour

tiquement des sous-ensembles de neurones dans le but d'étudier leurs interconnexions.

(Orger, 2016) a également apporté des éléments concernant l'identification des types cellulaires. Des neurones individuels ont été identifiés et caractérisés en fonction de leur morphologie et de l'organisation de leurs projections. La figure 4.5 illustre à nouveau l'organisation du toit optique grâce à une image représentant l'activité spontanée du cerveau par expression de la sonde calcique GCaMP3. La Fig. 4.5B a été enregistrée par (Romano et al., 2015) dont les travaux ont notamment permis d'identifier la présence de groupes de neurones ayant une activité spontanée similaire.

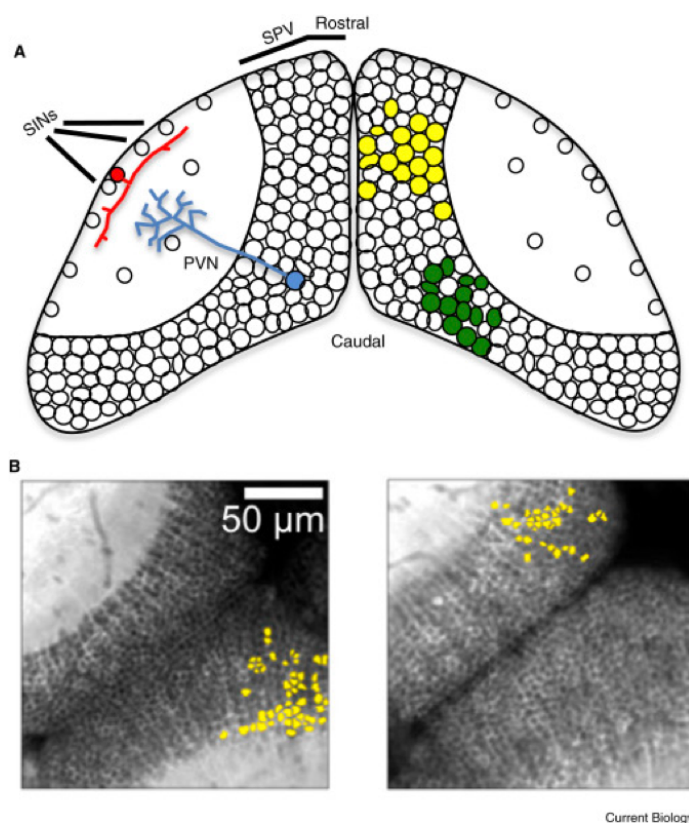


FIGURE 4.5 – Activité électrique spontanée des PVN. (A) schéma du toit optique illustrant la forte densité des corps cellulaires des PVN dans la couche périventriculaire (SPV, également nommée PVL), et la distribution plus dispersée et moins dense des autres types de cellules, y compris les inter-neurones superficiels (SIN) dans le neuropile. Les exemples de morphologies des PVN et des SIN sont indiqués en bleu et en rouge. En jaune et vert, ensembles de neurones ayant une activité électrique spontanée simultanée, telle qu'observée par (Romano et al., 2015) dans (B), grâce au marqueur GCaMP3, et indiqué en jaune. Figure extraite de (Orger, 2016)

effectuer des suppressions, insertions, translocations et inversions à des sites spécifiques de l'ADN.

Dans le cadre de nos expériences de mesures de transport, nous avons voulu observer simultanément la dynamique des nanoKTP et les axones des PVN, neurones que nous pensons cibler. Faute d’avoir pu identifier des lignées transgéniques exprimant un rapporteur fluorescent dans ces axones, nous avons dû procéder par injection de colorants lipophiles s’intercalant dans les membranes cellulaires (dont une carbocyanine 7 à longue chaîne aliphatique C₁₈, DiIC₁₈, notée DiI). Plusieurs stratégies ont été entreprises : l’injection simultanée des KTP et du colorant, ou bien la mise en place de deux injections successives. Dans tous les cas, il semblerait que la présence du DiI altère la distribution des nanoparticules dans les axones probablement en bloquant leur endocytose. Nous aurions pourtant espéré qu’injecter en premier lieu les particules et dans un deuxième temps le colorant empêcherait la perturbation de l’endocytose. Malheureusement, cela n’a pas fonctionné non plus et nous avons alors décidé d’effectuer les expériences de mesure de transport sans DiI. D’autres essais ont été conduits par observation de lignées *huc:mcherry* ou par injection de la toxine cholérique β conjuguée au fluorophore Alexa594 qui se sont avérés inefficaces pour marquer les axones.

Finalement, faute de pouvoir effectuer un marquage des neurones sur les larves vivantes pendant l’expérience de mesure de transport, nous avons, après avoir injecté les nanoparticules de KTP dans le toit optique, réalisé un immunomarquage des axones sur les larves fixées en utilisant un anticorps contre la tubuline acétylée (marquage spécifique des axones, protocole détaillé dans l’annexe I). Le résultat est représenté sur la figure 4.6. On constate que l’organisation des branches neuronales est semblable à celle de la figure 4.5. Par ailleurs, les nano-KTP (en vert) sont pour certains alignés dans les axones marqués (en rouge), ce qui est compatible avec leur internalisation par ces branches.

Malgré l’impossibilité que nous avons rencontrée de disposer d’un marquage axonal dans le rouge durant l’expérience de mesure de transport, nous verrons plus loin qu’une fraction importante des nanotraceurs à réponse SHG que nous utilisons pour mesurer le transport (voir section 4.2.3) se retrouve alignée (figure 4.9), indiquant ainsi la direction

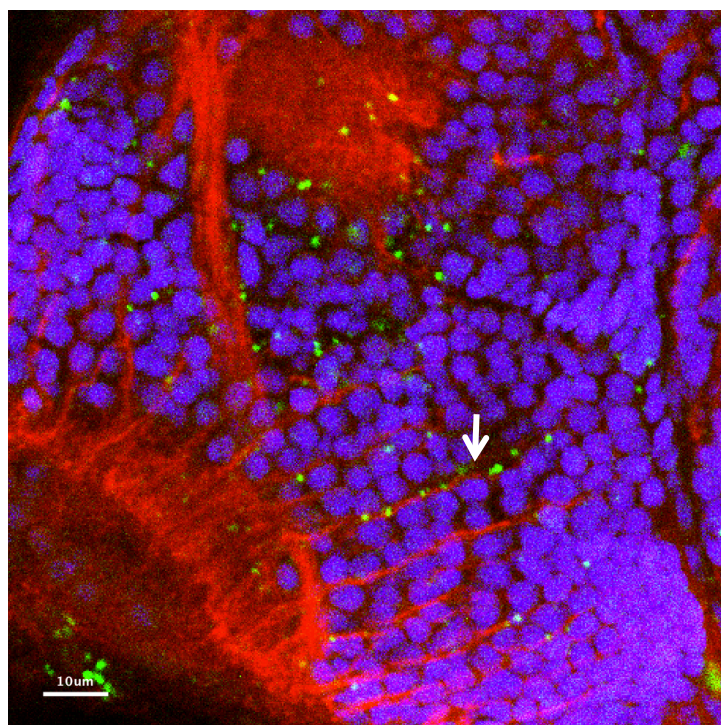


FIGURE 4.6 – Image d’immunofluorescence du toit optique d’une larve à 4 dpf. En rouge, marquage des axones par un anticorps dirigé contre la tubuline acétylée. En bleu, marquage des corps cellulaires (par DAPI). En vert, signal SHG des nano-KTP ayant été injectés dans le toit optique. La flèche blanche indique un axone le long duquel on retrouve des nano-KTP alignés probablement à l’intérieur de celui-ci. Barre d’échelle : 10 μm . Marquages et acquisitions réalisés par Maxence FRETAUD.

d’un ou plusieurs axones sans que le marquage fluorescent des cellules ne soit finalement nécessaire. **Dans la suite de ces travaux, nous faisons donc l’hypothèse que les nanoKTP mobiles sont majoritairement situés dans des neurones PVN.**

L’organisation particulière du toit optique et plus spécifiquement le fait de connaître la position des corps cellulaires des PVNs par rapport aux déplacements des endosomes enregistrés, permet de **distinguer les mouvements antérogrades correspondant aux déplacements allant du corps cellulaire vers l’extrémité axonale, des déplacements rétrogrades qui ont un sens inverse.** Nous verrons plus loin dans ce chapitre (section 4.3) que cela est important lorsque l’on étudie des dysfonctionnements de moteurs moléculaires spécifiques du transport antérograde ou rétrograde.

Un autre avantage des études menées dans cette région est le fait que **les axones sont principalement organisés dans des plans en deux dimensions.** Le suivi

des nanotraceurs peut alors se faire plus facilement à haute cadence puisqu'il n'est pas nécessaire de réaliser une pile d'images⁵. C'est ainsi que nous avons pu conserver la cadence de balayage de 20 images par seconde, qui correspond à la cadence utilisée dans l'étude du transport dans les cultures de neurones *in vitro*, que ce soit en imagerie de fluorescence avec les nano-diamants fluorescents ou les expériences en microscopie à deux-photons sur cultures de neurones.

4.2.3 Mesure du transport axonal dans le toit optique de la larve de poisson-zèbre

Ces expériences ont toutes été réalisées par Maxence FRÉTAUD, ingénieur de la plateforme IERP-EMERG'IN de l'INRAE de Jouy-en-Josas, et nous-mêmes en accompagnement, et en collaboration étroite avec Christelle LANGEVIN, chercheuse à l'unité d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons (IERP) de l'INRAE.

4.2.3.1 Protocole d'internalisation des nanoparticules de KTP dans le cerveau des larves de Zf

Les larves provenant des laboratoires de nos collaborateurs sont incubées dans du phénylthiourée (PTU) qui permet d'inhiber le développement de pigments cellulaires pouvant masquer les zones du cerveau que nous souhaitons imager et absorbant suffisamment le faisceau d'excitation, même dans l'infrarouge, ce qui entraîne un échauffement local délétère. Le PTU est ajouté au milieu à la fin du premier jour de développement des larves après leur (1 dpf) ; l'ajouter plus tôt peut provoquer des malformations.

Trois jours après la fécondation (3 dpf), une solution de nano-KTP de taille ≈ 100 nm (cf figure 4.7) est injectée dans le lobe gauche du toit optique de la larve. Pour chaque larve, un volume de 3 nL de solution de concentration 0.1 mg/mL est

5. Le changement de plan de mise au point est réalisé par le biais d'un transducteur piézoélectrique dont le temps de réponse est de l'ordre de la milliseconde, là où le balayage par scanners galvanométriques résonnants permet d'atteindre un intervalle de temps entre pixels de seulement 72 ns. Aussi, l'imagerie volumétrique sur le microscope multiphotons SP8 Leica peut conduire à perdre au moins un ordre de grandeur sur la cadence d'acquisition.

injecté à l'aide de microcapillaires en verre avec filament (réf. GC100F-15, Phymep) et d'un microinjecteur électronique (FemtoJet, Eppendorf). Cette étape est effectuée par Maxence FRÉTAUD qui, pour une seule expérience d'imagerie du transport, effectue l'injection dans environ 100 larves.

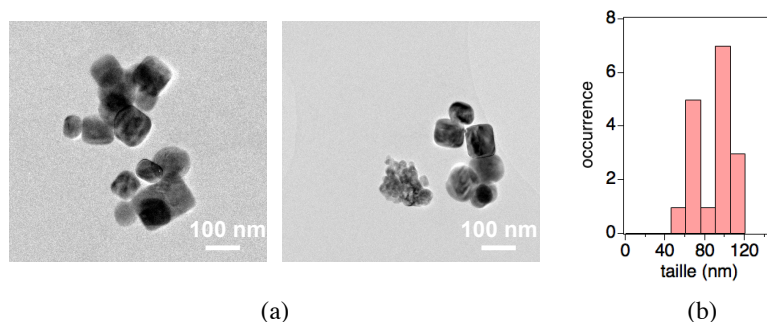


FIGURE 4.7 – Nanoparticules de KTP utilisées pour les expériences de mesure de transport dans le cerveau de la larve de Zf. Cristaux synthétisés par l'équipe de Thierry GACOIN, chercheur au laboratoire de Physique de la Matière Condensée de l'École Polytechnique. (a) Image TEM (CentraleSupélec, Gif-sur-Yvette). (b) Distribution des tailles des nanoparticules mesurées à partir des images TEM du panneau (a).

4.2.3.2 Imagerie dynamique SHG du transport axonal dans les larves de Zf

La plateforme IERP EMERG'IN est équipée du même système d'imagerie (SP8 multiphoton, Leica) que celui de la plateforme PIMPA (Orsay) décrit dans la section 2.3.1.2 du chapitre 2 et dont les éléments sont schématisés dans la figure 2.15.

Afin d'optimiser les conditions d'observation sur plusieurs animaux, les larves anesthésiées sont placées dans des puits résultant d'empreintes faites dans une couche d'agar et elle sont maintenues immobiles par un coussin d'agarose mou à 0.5 % (*Low Melting agarose*). Avant la gélification de l'agarose, les poissons sont placés **en vue dorsale** afin de pouvoir imager la zone ciblée du toit optique, comme indiqué sur la figure 4.8.

Nous accordons la longueur d'onde du laser impulsionnel d'excitation (140 fs de durée d'impulsion) à la valeur de 1040 nm. La puissance en sortie de l'objectif de microscope ($\times 25$, ouverture numérique 0.95, immersion dans l'eau, traitement VIS-IR,

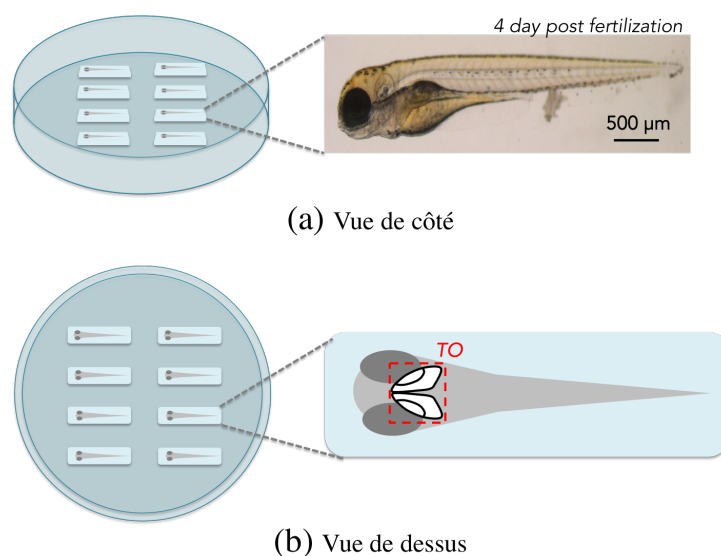


FIGURE 4.8 – Porte échantillon utilisé pour l’imagerie du transport intraneuronale dans des larves de Zf. Huit puits moulés dans de l’agarose permettent d’immobiliser les larves. (a) Vue de côté avec un zoom sur une photo de larve prise à 4 dpf. (b) Vue de dessus avec un zoom sur le schéma d’une larve placée en vue dorsale, avec le toit optique (TO) accessible.

25×/0.95 W VisIR, Leica) de l’ordre de 10 mW. La transparence de la larve à une excitation infrarouge ainsi que son anesthésie et son immobilisation dans un gel d’agarose nous permet de mesurer des déplacements d’endosomes à une cadence⁶ de **20 images/s** avec une taille de champ d’imagerie de 512×352 pixels, chaque pixel ayant une taille équivalente dans le plan de l’échantillon de 173 nm, ce qui fait une taille de champ de $88 \times 61 \mu\text{m}$, comparable à celle des expériences plein champ avec les nanodiamants fluorescents (Haziza et al., 2017). La puissance laser utilisée semble par ailleurs bien tolérée puisque les observations n’entraînent pas de lésions visibles des tissus et les animaux observés peuvent être réveillés en fin d’acquisition. La figure 4.9 illustre le signal SHG typique de nano-KTP internalisés dans des vésicules et se déplaçant probablement le long des axones des PVNs.

6. Le terme “d’image” est utilisé par extension pour ce qui est en réalité le balayage d’un champ et la construction d’une image point par point.

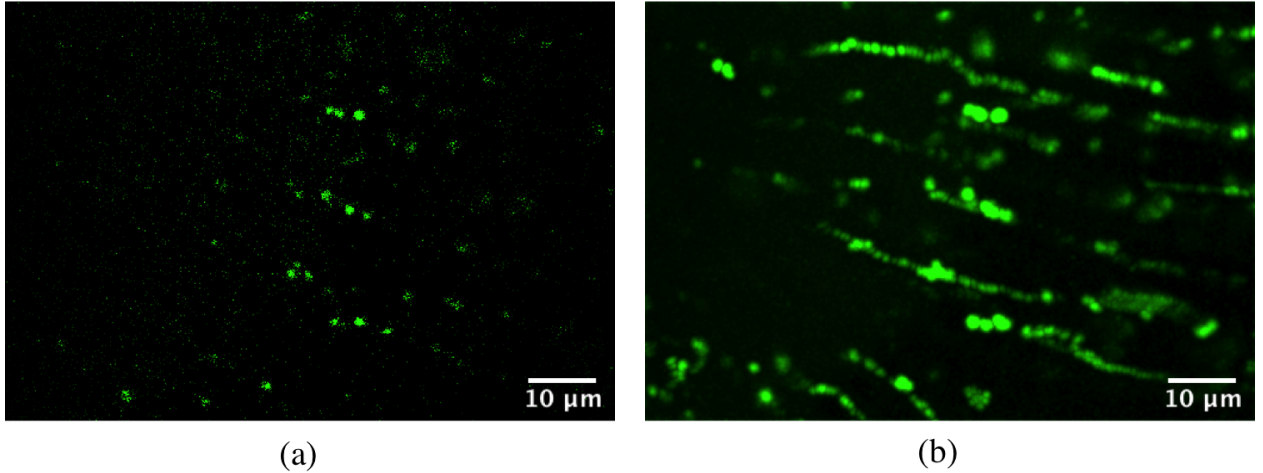


FIGURE 4.9 – Suivi du signal SHG de nanocristaux de KTP (taille ≈ 100 nm) dans le toit optique d’une larve de poisson-zèbre dont l’œil est situé à gauche de l’image (œil droit de l’animal). Acquisition sur le microscope biphoton de la plateforme EMERG’IN (INRAE, Jouy). Longueur d’onde d’excitation : 1040 nm ; puissance laser ≈ 10 mW. Cadence d’acquisition : 20 images/s. (a) Image extraite d’un film. (b) Projection d’intensité maximale effectuée sur toute la séquence du film d’une durée de 2 min. La direction des axones des PVNs est alors bien discernable.

4.2.4 Analyse des données de transport axonal dans Zf

Un fois les données expérimentales acquises, nous avons utilisé les méthodes d’analyse décrites dans le chapitre 3 afin de reconstruire les trajectoires de nano-KTP et d’extraire les paramètres de transport. **Néanmoins, une étape de traitement supplémentaire a dû être ajoutée dans le but de ne sélectionner que les trajectoires d’intérêt correspondant aux déplacements d’endosomes à l’intérieur des axones des PVNs.** En effet, connaissant l’organisation du réseau neuronal ciblé (Figure 4.3), nous avons exclu toute trajectoire ne suivant pas la direction des axones attendue afin de restreindre au mieux l’analyse à celle du transport à l’intérieur des PVN.

Après avoir lissé par un filtre gaussien les coordonnées (x, y) des trajectoires (voir section 3.3.1) et effectué un premier tri reposant sur une valeur minimale du déplacement carré moyen (*mean square displacement*, MSD) (section 3.3.2), nous avons mis en place un deuxième tri reposant sur deux grandeurs :

- Le coefficient de corrélation linéaire, également appelé coefficient de

Bravais-Pearson, des coordonnées (x, y) des points de la trajectoire. Cette grandeur permet de détecter la présence ou l'absence d'une relation linéaire entre deux variables (Figure 4.10) et est défini par la relation :

$$R \equiv \frac{\text{Cov}(x, y)}{\sigma_x \sigma_y} \quad (4.1)$$

où $\text{Cov}(x, y)$ désigne la covariance des variables x et y et σ_x, σ_y , leurs écarts-types.

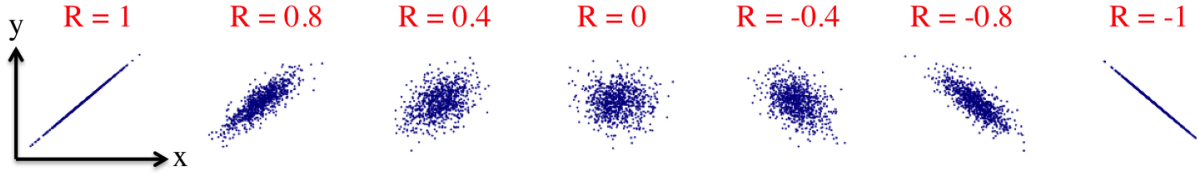


FIGURE 4.10 – Exemple de distribution de points (x, y) et valeurs des coefficients de Bravais-Pearson associés. Adaptée de Wikipedia : *Correlation and dependence*.

- **la moyenne de la valeur absolue des distances des positions détectées (x, y) à la droite de régression linéaire associée à la trajectoire.** En considérant une trajectoire de N points dont la régression linéaire correspond à une droite d'équation $y = mx + p$, cet écart est défini par la formule :

$$E \equiv \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|y_i - (mx_i + p)|}{\sqrt{1 + m^2}} \quad (4.2)$$

Nous avons ainsi utilisé ces deux grandeurs afin de ne sélectionner que les trajectoires linéaires orientées selon les axones des PVNs comme indiqué dans la figure 4.11. Des seuils établis de manière expérimentale ont été fixés de manière à ce que les trajectoires conservées respectent au moins l'un des deux critères suivants :

- **$R > 0.9$ et $E < 2$ pixels** (soit $2 \times 173 = 346$ nm). Cela correspond aux trajectoires ayant une allure très linéaire mais une dispersion autour de la régression linéaire relativement importante.
- **R non contraint et $E < 0.5$ pixels (87 nm).** Cela correspond à des trajec-

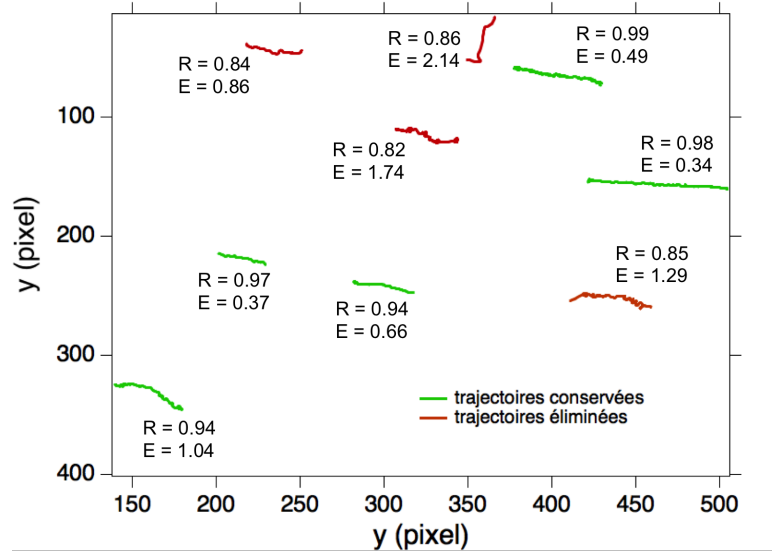


FIGURE 4.11 – Reconstruction de trajectoires de nano-KTP internalisés dans le toit optique d’une larve de Zf. Ces trajectoires sont issues de la séquence d’images illustrée sur la figure 4.9. Les valeurs de R et E sont indiquées à côté des trajectoires. En rouge, ce sont les trajectoires éliminées par les critères associés à la linéarité des trajectoires. En vert, ce sont celles sélectionnées et permettant d’extraire les paramètres du transport axonal dans les PVNs.

toires qui peuvent être légèrement courbes (et donc ne pas avoir un coefficient de corrélation proche 1) mais dont les points ne s’éloignent que très peu de la droite d’ajustement, de sorte que l’on peut les considérer comme valides.

Les premières expériences réalisées sur des larves de poisson-zèbre de type sauvage ont permis de mettre en place chaque étape du protocole : l’internalisation des nano-KTP, l’imagerie du transport à une cadence de 20 images/seconde et l’optimisation des outils d’analyse permettant de reconstruire et de sélectionner spécifiquement les trajectoires axonales des PVNs.

L’objectif suivant a été de confronter la méthode de mesure en perturbant pharmacologiquement le transport intraneuronale et en mesurant les conséquence sur les paramètres de transport. Il s’agissait de se préparer à utiliser notre méthodologie pour détecter des anomalies de ce transport axonal dans des larves transgéniques comportant des mutations sur les gènes codant pour des moteurs moléculaires.

4.3 Détection et quantification d'altérations du transport axonal dans la larve de Zf

Dans cette section, nous présentons les résultats de mesure du transport axonal obtenus dans des larves de Zf étudiées dans trois contextes pathologiques différents associés à :

- une destabilisation du cytosquelette
- une défaillance du moteur Kinésine I, responsable du transport antérograde
- une défaillance du moteur Dynéine, responsable du transport rétrograde

4.3.1 Mesures du transport axonal après destabilisation du cytosquelette par traitement pharmacologique

4.3.1.1 Impact du nocodazole sur le transport axonal

Les microtubules (MTs), fibres constitutives du cytosquelette, sont formés de dimères de tubulines constitués chacun de deux sous-unités, la tubuline α et la tubuline β , liées par des liaisons non covalentes. Les microtubules sont des polymères extrêmement dynamiques dont les deux extrémités se polymérisent et dépolymérisent en permanence. Il existe plusieurs substances chimiques capables d'inhiber la polymérisation et donc perturber l'équilibre et la stabilité des MTs. L'une des plus connues est le **nocodazole** qui, en se fixant sur la tubuline β , peut engendrer la dépolymérisation des MTs.

On trouve dans la littérature de nombreux articles dans lesquels l'impact du nocodazole sur le transport intraneuronal est étudié. Il a été montré dans des cultures cellulaires *in vitro*, qu'à forte dose ($\approx 10 \mu\text{M}$), le nocodazole inhibe le transport (Courty et al., 2006), ce qui semble cohérent avec son action de dépolymérisation des MTs. En revanche, à plus faible dose, l'effet du nocodazole est plus subtil car il ne cause pas de dépolymérisation totale du réseau de MTs mais engendre des modifications post-

traductionnelles au niveau des dimères de tubulines (Tas et al., 2017; Ayloo et al., 2017). Dans ces conditions, l'impact sur le transport est plus complexe et la littérature se contredit parfois.

En culture de neurones d'hippocampe d'embryons de souris *in vitro*, notre équipe avait démontré que le transport endosomal de neurones hippocampaux d'embryons de souris est très ralenti en cas d'exposition à une faible concentration de nocodazole (≈ 5 nM) (Haziza et al., 2017). Par ailleurs, la même année, Ayloo *et al* montrent dans des cultures de neurones hippocampaux de rat, que la dérégulation du transport causée par la présence de nocodazole (concentration de 300 nM) dépend du cargo transporté et du type de moteur moléculaire impliqué (Ayloo et al., 2017).

Les conséquences du nocodazole sur le transport *in vivo* dans le poisson-zèbre ont également été étudiées. La plupart des publications s'intéressent aux mouvements des mitochondries à l'intérieur des neurones, et tous les travaux semblent s'accorder sur le fait que la fraction de mitochondries en mouvement chute en présence de nocodazole (Plucinska et al., 2012; Bergamin et al., 2016; Xu et al., 2017). En revanche, concernant les autres paramètres du transport, il n'y a pas de consensus entre les équipes : Xu *et al* constatent une diminution significative de la vitesse des mitochondries en mouvement tandis que Plucinska *et al* n'observent aucune différence.

Nous avons ainsi souhaité étudier l'impact du nocodazole sur le transport axonal dans les axones des PVN de larves de Zf. Il est important de noter que notre étude diffère des travaux présentés brièvement dans cette section car nous ne suivons pas les mitochondries mais des compartiments endosomaux. Par ailleurs, la population de neurones ciblés n'est pas la même que celles des publications citées. Malgré cela, les mécanismes mis en jeu étant les mêmes, la comparaison est tout de même intéressante.

4.3.1.2 Résultats des mesures de transport axonal dans des larves Zf après ajout de nocodazole

Nous avons effectué trois séries d'expériences à trois doses de nocodazole différentes : 1 μ M, 500 nM et 200 nM. Le traitement est réalisé en baignant les larves dans la solution de nocodazole pendant 30 min avant de les positionner dans les empreintes d'agar et d'imager le transport axonal.

Avec une concentration de 1 μ M le transport est complètement arrêté : aucun déplacement dirigé n'a pu être observé. On en déduit donc que cette concentration correspond à un régime de forte dose et engendre très probablement la dépolymérisation totale des microtubules, d'où l'absence de mouvements.

En revanche, **à plus faible concentration (500 nM et 200 nM), nous avons été capables d'enregistrer des déplacements d'endosomes** et d'extraire plusieurs trajectoires. Les résultats sont représentés sur la figure 4.12. La **longueur d'une trajectoire** est celle de la diagonale du rectangle dans lequel elle est incluse. Plusieurs éléments ressortent de ces expériences :

- On observe une **diminution significative de la fraction de particules mobiles** pour les deux concentrations de nocodazole utilisées par rapport au cas contrôle sans nocodazole. Comme nous l'avons évoqué plus haut, cela est en parfait accord avec la littérature actuelle. Par ailleurs, on mesure une **diminution de la moyenne des longueurs des trajectoires dans le cas où la concentration est la plus élevée (500 nM)**. Cette anomalie du transport n'est pas visible à 200 nM ce qui suggère que les effets observés dépendent de manière cohérente de la dose de nocodazole utilisée.
- On mesure une **augmentation de la vitesse curviligne des phases de mouvement dans le cas d'un traitement à 500 nM**. Cette observation va à l'encontre de la publication de (Xu et al., 2017) qui observaient à l'inverse une diminution de la vitesse des mitochondries. Il est cependant important de noter que la vitesse mesurée dans l'article de (Xu et al., 2017) (appelée *speed*) prend

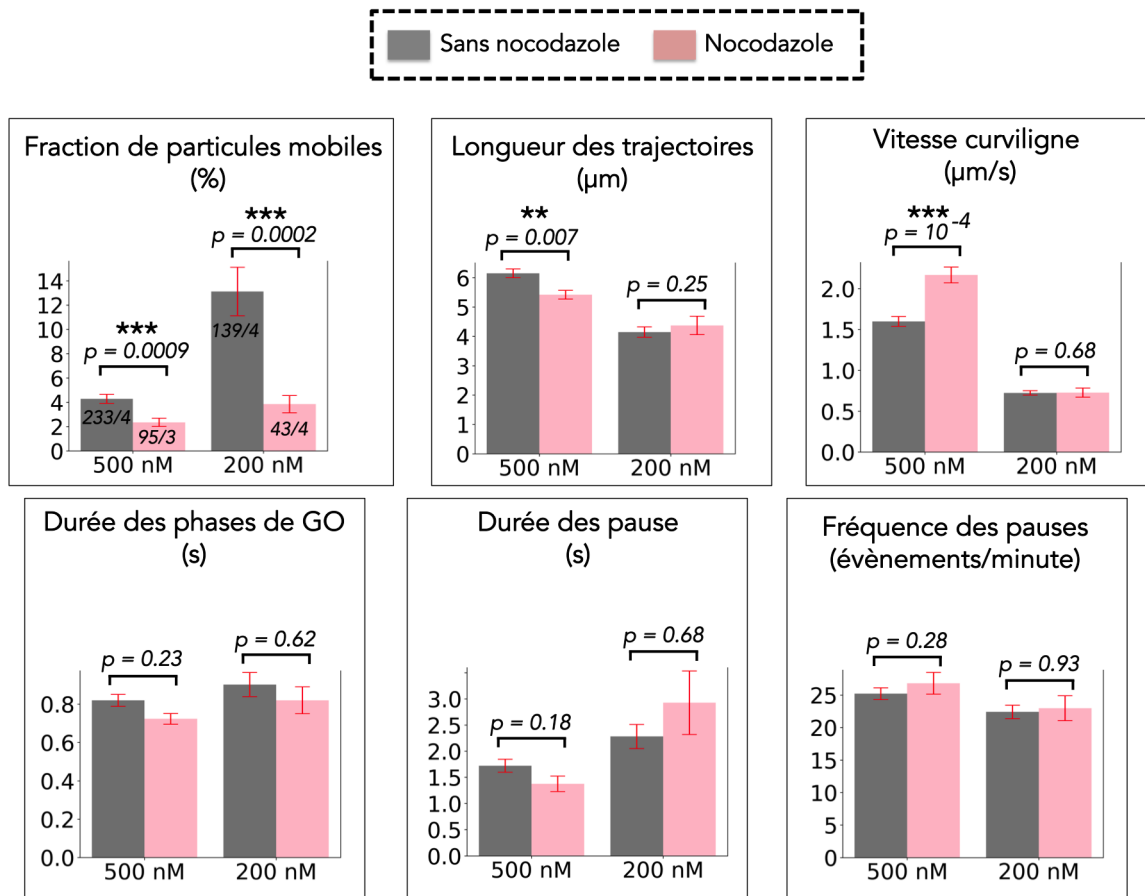


FIGURE 4.12 – Effet du nocodazole sur le transport axonal *in vivo* dans les axones des neurones périventriculaires du toit optique de larves de Zf. Le nocodazole est ajouté dans le bain, avant imagerie (30 min d'exposition). L'expérience réalisée à la concentration de 200 nM comprend 233 trajectoires contrôles (sans nocodazole) issues de 4 larves et 95 trajectoires en présence de nocodazole issues de 3 larves. L'expérience réalisée à 500 nM comprend 139 trajectoires contrôles issues de 4 larves et 43 trajectoires en présence de nocodazole issues de 4 larves. Les comparaisons statistiques sont effectuées avec le test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

en compte les phases d'arrêt contenues dans les trajectoires ce qui ne correspond pas à notre paramètre "vitesse curviligne" qui est défini en ne tenant compte que des phases de GO uniquement (les STOP sont exclus). Afin d'effectuer une comparaison légitime avec cet article nous avons pris soin de recalculer une vitesse globale incluant les phases de STOP. Malgré cette correction, le résultat que nous obtenons est semblable à celui représenté sur la figure 4.12, c'est-à-dire que l'augmentation de la vitesse curviligne est toujours présente. Il est difficile avec ces seules expériences de trouver une interprétation à notre observation.

Nous n'avons malheureusement pas eu le temps dans le cadre de ma thèse de reproduire cette étude à 500 nM afin de confirmer l'effet observé.

Néanmoins, comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, à faible dose, nous savons grâce à plusieurs études de la littérature que le nocodazole peut engendrer des modifications post-traductionnelle au niveau des dimères de tubulines (Tas et al., 2017; Ayloo et al., 2017). On pourrait supposer que ces perturbations du cytosquelette aient pour conséquence de libérer des obstacles et de faciliter ainsi l'interaction moteurs-microtubules, engendrant alors une augmentation de la vitesse de déplacement. Cela n'est bien sûr qu'une hypothèse et nos résultats ne nous permettent pas de conclure de manière précise quant aux mécanismes mis en jeu.

- **Les autres paramètres de transport, la fréquence des pauses, la durée moyenne des pauses et la durée des phases de mouvement, ne sont pas significativement modifiés** par le traitement pharmacologique appliqué. Cela est donc plutôt en accord avec les observations de (Plucinska et al., 2012).

4.3.2 Mesure du transport axonal dans les larves Zf transgéniques *kif5aa*^{-/-}

4.3.2.1 Description de la larve mutante *kif5aa*^{-/-}

Comme nous l'avons déjà évoqué, le transport intraneuronal fait intervenir les moteurs moléculaires de plusieurs familles : les **kinésines** et les **dynéines**, principaux moteurs régissant le transport le long des microtubules et responsables des déplacements antérogrades et rétrogrades respectivement (Hirokawa, 1998; Vale, 2003), et les **myosines** associées au transport le long des filaments d'actine. Bien qu'il soit bien établi que les moteurs moléculaires antérogrades sont essentiels à la génération et au fonctionnement des synapses (Okada et al., 1995), leurs contributions spécifiques restent mal connues.

Dans la famille des kinésines, qui comprend 45 membres chez les mammifères (Miki et al., 2001) et bien plus chez les poissons-zèbres, la sous-classe **kinésine I** a un rôle essentiel dans les neurones. Comme le montre la figure 4.13, la kinésine I est un complexe formé de deux chaînes lourdes identiques (KIF5s) et de deux chaînes légères (KLCs, *Kinesin Light Chains*) (Hirokawa et al., 2010). Dans le génome des mammifères, les gènes *KIF5A*, *KIF5B* et *KIF5C* codent pour les chaînes lourdes de la kinésine I. Contrairement à la protéine KIF5C qui est présente dans toutes les cellules, les moteurs KIF5A et KIF5B sont spécifiques aux neurones (Xia et al., 1998) et permettent de transporter divers cargos, y compris des organites, des protéines et des ARN (Hirokawa et al., 2009).

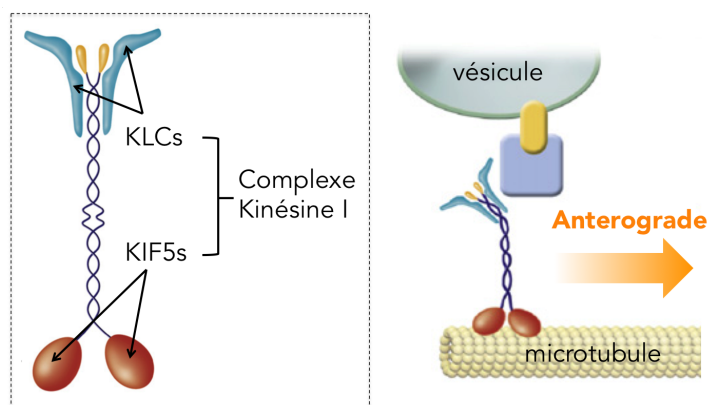


FIGURE 4.13 – Structure de la kinésine I. Les deux chaînes lourdes KIF5s forment un complexe avec les deux chaînes légères KLCs. À droite : schéma représentant le déplacement antérograde d'une vésicule transportée le long d'un microtubule par une kinésine I. Adaptée de (Hirokawa et al., 2010).

Il a été montré que les souris dont le gène *Kif5c* (Kanai et al., 2000) a été invalidé (dites *knock-out*, KO) présentent un dysfonctionnement neuronal caractérisé par une perte des motoneurones, tandis que les souris *Kif5a* (Xia et al., 2003) ou *Kif5b* (Tanaka et al., 1998) KO meurent rapidement après la naissance ou pendant le développement embryonnaire, respectivement. En outre, chez l'humain, il a été établi que des mutations du gène *KIF5A* étaient impliquées dans plusieurs troubles neurologiques tels que la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2, une neuropathie génétique héréditaire atteignant les nerfs périphériques (Crimella et al., 2012) et provoquant souvent une

amyotrophie de certains membres tels que les mollets, les avant-bras et les mains.

Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes intéressés à la mesure du transport axonal d'endosomes *in vivo* dans un modèle transgénique de Zf pour lequel le gène codant pour les chaînes lourdes kif5a de la kinesine I a été muté (Auer et al., 2015). Le mutant *kif5aa*^{-/-} a été développée par l'équipe de Filippo DEL BENE, chercheur INSERM, à l'époque à l'Institut Curie et maintenant installé à l'Institut de la Vision (Paris).

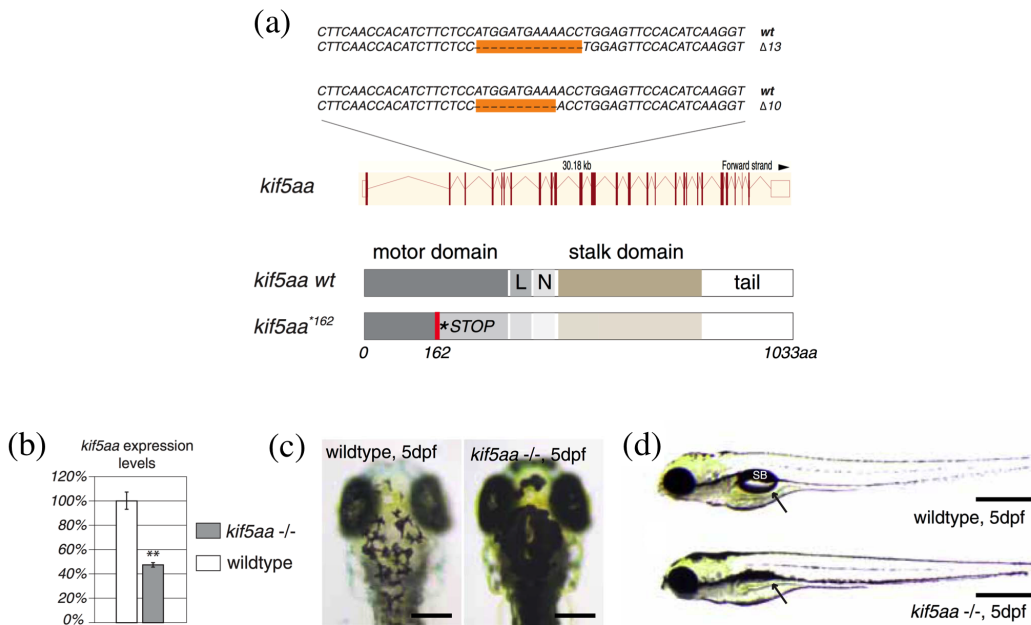


FIGURE 4.14 – Génération et étude de la larve de Zf transgénique *kif5aa*. (a) Schéma représentant la mutation appliquée au gène *kif5aa* codant pour la chaîne lourde de la kinesine I. Un codon-stop est créé au niveau du nucléotide 162. (b) Résultat de la RT-PCR quantitative montrant une diminution de 47 % de l'expression de l'ARN messenger *kif5a* chez les larves mutantes homozygotes *kif5aa*^{-/-} à 4 dpf ($p < 0,01$). (c) Les embryons mutants *kif5aa*^{-/-} présentent des mélanosomes très larges apparaissant sombres sur leur tête par rapport aux embryons de type sauvage. Barres d'échelle = 200 μ m. (d) Les embryons mutants *kif5aa*^{-/-} ne parviennent pas à gonfler leur vessie natatoire. Barres d'échelle = 400 μ m. Flèche pointant la vessie natatoire (swim bladder [SB] en anglais). Adaptée de (Auer et al., 2015).

La mutation ponctuelle⁷ introduite, dite “décalante” (ou *frame-shift*) est caractérisée par une suppression de plusieurs nucléotides. Ces délétions sont à l'origine de l'ap-

7. Une mutation est dite “ponctuelle” dès lors qu'elle touche un ou plusieurs nucléotides d'un même gène.

parition d'un codon-stop prématuré dans la séquence du gène ciblé. Ainsi, au moment de la traduction, la protéine n'est pas formée dans sa totalité. Dans le cas du mutant *kif5aa*^{-/-} (où les deux allèles portent la mutation, ce qu'indique "-/-"), le codon-stop apparaît au niveau de la base 162 du gène, ce qui correspond à la zone de la séquence codant pour le domaine moteur de la protéine kif5a (Figure 4.14a). (Auer et al., 2015) exposent certaines caractéristiques phénotypiques de cette mutation dans la larve de Zf :

- On observe une **diminution de 47 % de l'expression de l'ARN messager *kif5a*** chez les larves mutantes homozygotes *kif5aa*^{-/-} (Figure 4.14b).
- À partir de 5 dpf on constate la **présence de grands mélanosomes sur la tête des larves mutantes** (Figure 4.14c).
- On constate également un **problème de développement de la vessie natale** chez les mutants (Figure 4.14d).
- Les larves transgéniques **meurent 10 jours après la fécondation**.
- Des expériences d'imagerie calcique ciblant les neurones RGCs et les PVNs ont révélé chez les mutants une **perturbation de l'activité pré-synaptique des RGCs**.
- Études du transport intraneuronal : L'activité synaptique dans les RGCs étant défaillante. Ainsi (Auer et al., 2015) se sont naturellement intéressés à la distribution et au transport des **vésicules synaptiques**, mais aussi des mitochondries dans les axones des RGCs. Les enregistrements ont été réalisés par microscopie confocale, avec une acquisition très lente d'une image toutes les 5 secondes.

Transport des vésicules synaptiques : Pour ces expériences, l'expression d'une protéine de fusion fluorescente *Synaptophysine-GFP* a été utilisée. La synaptophysine étant une protéine membranaire spécifique des vésicules synaptiques, elle permet de suivre le transport de ces dernières mais on la retrouve également de manière immobile au niveau des sites pré-synaptiques. **Aucune**

différence de distribution des sites pré-synaptiques n'a été observée à 5 et 7 dpf (Figure 4.15(a)), indiquant que leur formation n'est pas affectée par la perte de la sous-unité kif5aa. **Aucune différence dans les paramètres de transport antérograde ou rétrograde (vitesse, direction,...) n'a été observée chez le mutant (Figure 4.15(b)).** Cela est cohérent avec le fait que les vésicules contenant de la synaptophysine ne sont pas transportées par la kinésine I (Karle et al., 2012)).

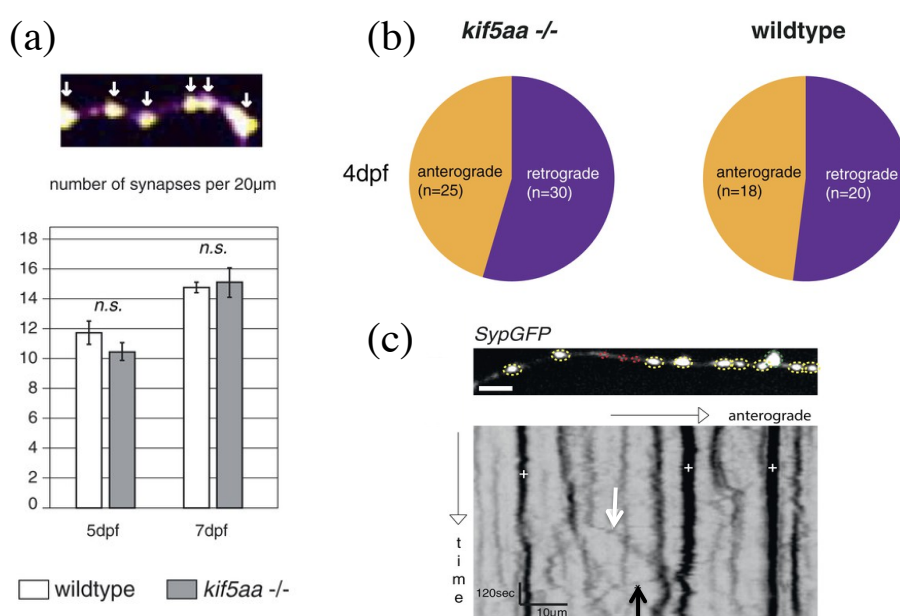


FIGURE 4.15 – Étude de la distribution et de la dynamique de vésicules synaptiques dans les RGCs de larves mutantes *kif5aa*^{-/-} et sauvages (WT). (a) Quantification du nombre de sites pré-synaptiques (marqués par la Synaptophysine-GFP) à 5 et 7 dpf. Aucune différence de distribution n'est observée entre les modèles mutant et sauvage. (b) Quantification du taux de transport antérograde et rétrograde à 4 dpf. Aucune différence n'est détectée. (c) En haut, images de la fluorescence de la Synaptophysine-GFP marquant des vésicules synaptiques de tailles différentes (en pointillés rouges, des petites ($< 0.4 \mu\text{m}$) et en jaune des grandes ($> 0.4 \mu\text{m}$)). En bas, kymographes représentant la dynamique de transport de ces vésicules. Flèche blanche : vésicule transportée dans le sens antérograde. Flèche noire : vésicule transportée dans le sens rétrograde. Barre d'échelle = $3 \mu\text{m}$. Adaptée de (Auer et al., 2015).

Transport des mitochondries : De la même manière, la GFP a été fusionnée à une protéine des mitochondries pour mesurer leur transport dans les axones des RGCs par suivi du signal de fluorescence. **Aucune différence n'a été**

détectée dans la quantité globale de mitochondries mobiles et statiques entre les larves sauvages et les mutantes (Figure 4.16(a)). En revanche, chez les mutantes, les mitochondries sont transportées plus souvent dans la direction rétrograde que dans l'antérograde (Figure 4.16(b)). Ce biais explique l'observation d'un appauvrissement des mitochondries dans les extrémités des RGCs des larves mutantes *kif5aa*^{-/-} (Figure 4.16(c)). Ces observations sont cohérentes avec de précédents travaux montrant que les mitochondries sont transportées par kif5a (Karle et al., 2012; Chen and Sheng, 2013).

Dans l'ensemble, ces études de transport montrent que dans les RGCs des larves mutantes *kif5aa*^{-/-}, il se forme autant de sites pré-synaptiques que dans les cellules des larves de type sauvage; de plus les vésicules contenant de la synaptophysine sont transportées à la même vitesse et dans les mêmes directions. En revanche, une réduction significative du transport antérograde des mitochondries entraîne très probablement un appauvrissement de ces organites au niveau des extrémités des axones des RGCs.

4.3.2.2 Résultats des mesures de transport axonal dans des larves Zf *kif5aa*

L'objectif de notre étude est de déterminer si notre méthode de mesure permet de révéler des défauts de transport plus fins dans les larves mutantes *kif5aa*^{-/-} que ceux mesurés sur les vésicules contenant la synaptophysine et sur les mitochondries, toutes deux mesurées par suivi du signal de GFP fusionnées avec ces entités. Il est important de noter qu'au moment de la fécondation, les chances d'obtenir des larves homozygotes et sauvages (WT) sont plus faibles (25% de chance) par rapport aux hétérozygotes (50%). Nous utiliserons les larves WT de la même ponte comme référence, afin de disposer d'un même fonds génétique.

L'étape d'imagerie du transport est faite "à l'aveugle" : nous n'avons pas connaissance du génotype des larves qui est déterminé *a posteriori*. Afin d'obtenir suffisamment de données sur les larves homozygotes et WT, il est ainsi nécessaire d'étudier le plus

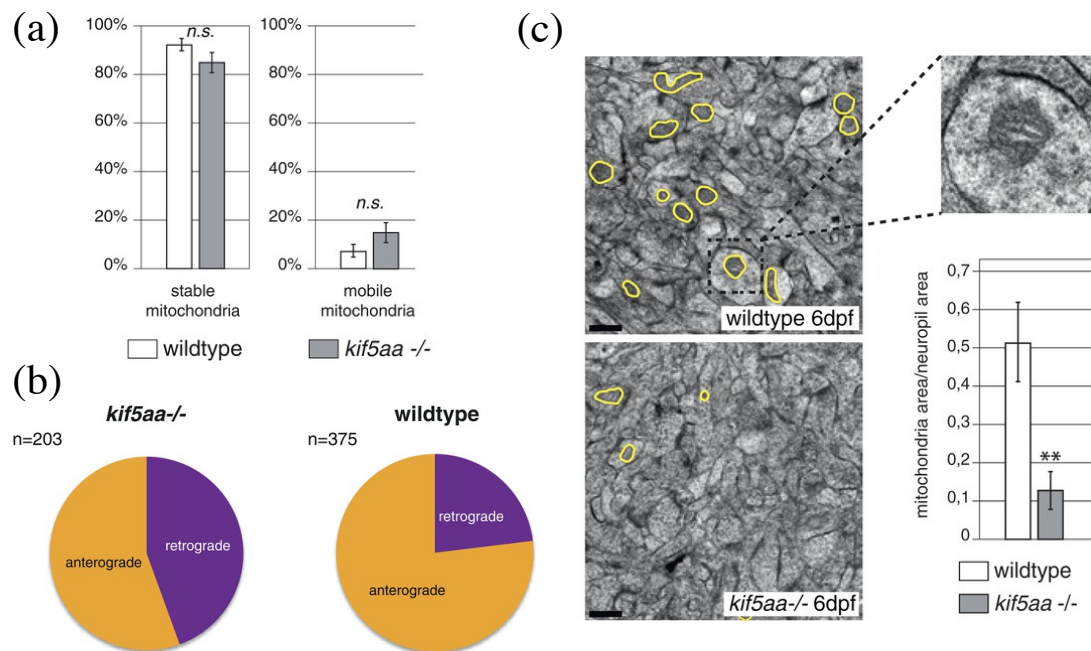


FIGURE 4.16 – Étude de la distribution et de la dynamique des mitochondries dans les RGCs de larves mutantes *kif5aa*^{-/-} et sauvages (WT). (a) Les distribution des mitochondries mobiles et statiques sont les mêmes chez les larves mutantes et sauvages. On remarque aussi que dans les deux cas, la majorité des mitochondries sont statiques alors que seulement 15% environ sont mobiles. (b) Parmi celles-ci, dans la larve mutante, les mitochondries se déplacent beaucoup plus souvent dans le sens rétrograde ($p < 0,05$). Les cellules de type sauvage présentent une proportion plus élevée de transport antérograde. (c) Microscopie électronique en transmission d’une section transversale du neuropile contenant les axones des RGCs. Panneau supérieur : neuropile de type sauvage, panneau inférieur : neuropile mutant. Les mitochondries sont dans les cercles jaunes. Panneau gauche : Zoom sur un seul segment axonal contenant une mitochondrie. Le neuropile des mutants contient moins de mitochondries. Barre d’échelle = 500 nm. Le graphique associé représente la quantification de la surface occupée par les mitochondries par rapport à la surface du neuropile. A 6 dpf, les axones des RGCs des larves mutantes contiennent significativement moins de mitochondries que les cellules de type sauvage ($p < 0,01$). Adaptée de (Auer et al., 2015).

efficacement possible un grand nombre de Zf. Dans cette optique, nous avons choisi de nous limiter à l’enregistrement de 8 films par larve, pris dans des champs différents du toit optique, 4 du côté de l’oeil gauche (où l’injection est faite) et 4 de l’autre côté. Ces 8 films correspondent à une durée d’environ à 20 minutes d’imagerie pour chaque larve. Dans ces conditions, en une journée d’expérience nous arrivons à observer une dizaine de larves.

Trois séries d'expériences ont été réalisées. Malheureusement, lors de la dernière, le génotypage a révélé que toutes les larves étaient hétérozygotes. Ces données n'ont donc pas pu être exploitées. La figure 4.17 représente, à gauche, les résultats des paramètres de transport extraits de la première expérience ("exp1") où 11 larves ont été étudiées : 6 hétérozygotes, 3 homozygotes et 2 WT, et de la deuxième expérience où 11 larves ont été observées : 7 hétérozygotes, 2 homozygotes et 2 WT. La reproduction et les croisements des Zf ont été effectués par Karine DUROURE, technicienne dans l'équipe de Filippo DEL BENE. Par ailleurs, les génotypages de la première série ont été réalisés par Christelle LANGEVIN (IERP/INRAE Jouy), tandis que ceux de la série 2 ont été faits par C. LANGEVIN et Valérie BERCIER chercheuse post-doctorante au *VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research* (Louvain, Belgique), anciennement doctorante dans l'équipe de Filippo DEL BENE qui a participé aux études sur les mutants *kif5aa*. Les gels ayant permis de déterminer les génotypes sont fournis en annexe J.

L'observation a eu lieu à 4 dpf et le protocole d'imagerie est le même que celui décrit dans la section 4.2.3. Plusieurs éléments ont été observés :

- **Aucune différence significative n'est observée pour les paramètres de durée et longueur moyenne des phases de mouvement antérograde et rétrograde. Il en est de même pour les paramètres de durée des pauses et de fréquence des pauses.** De la même manière, pour chaque paramètre, les tests de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon-Mann-Whitney ont été réalisés ; les valeurs p de ce dernier sont indiquées sur les graphes de la figure 4.17. En observant ces graphiques on constate que les modifications des valeurs moyennes sont soit très faibles soit relativement importantes mais accompagnées d'un grand écart-type ce qui explique que les tests statistiques effectués ne détectent pas de réelles différences.
- **Aucune modification de la fraction de vésicules mobiles ayant internalisé un nanoKTP n'a été détectée entre les différents génotypes (Figure 4.18(a)).** Ce paramètre est calculé en considérant le rapport entre le

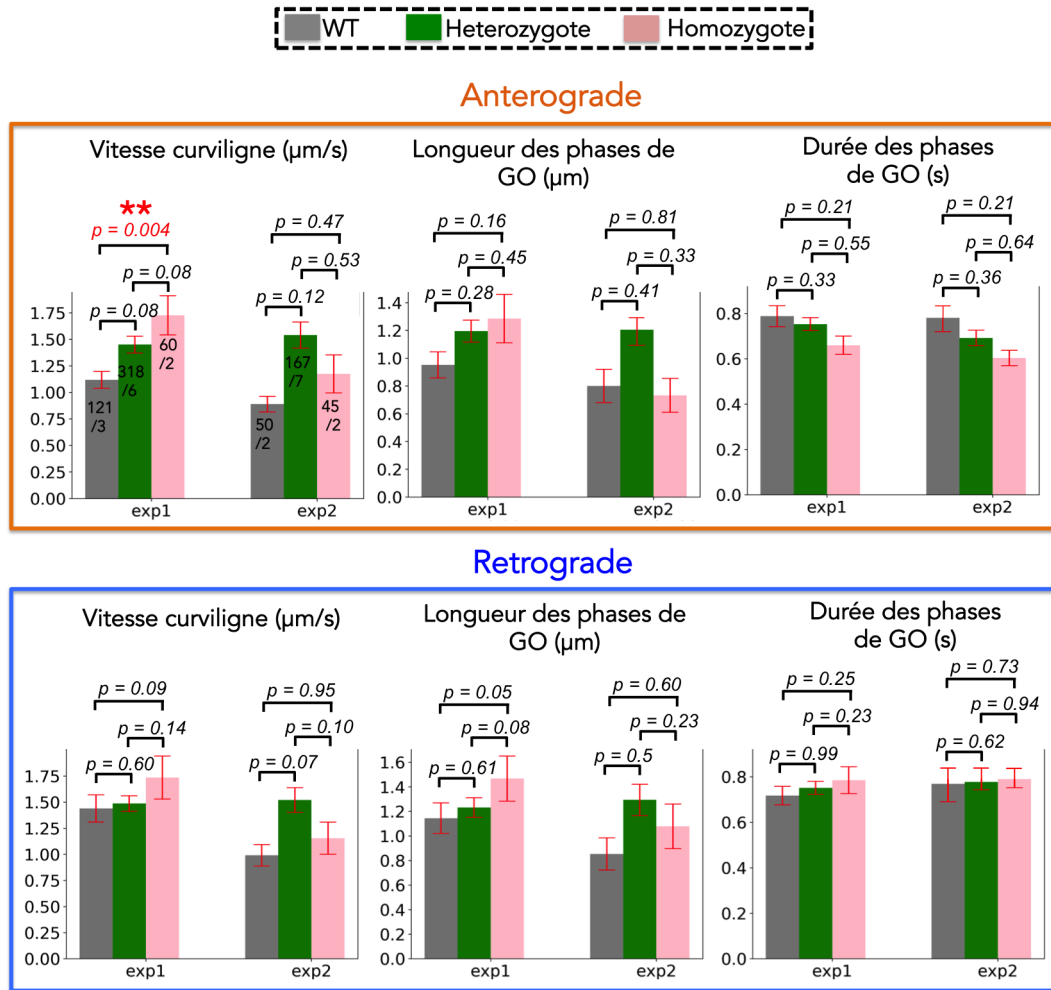


FIGURE 4.17 – Paramètres du transport intraneuronale mesuré dans les larves mutantes *kif5aa*^{-/-}. Une comparaison statistique des distributions des paramètres de transport est effectuée entre les larves WT, hétérozygotes et homozygotes. Le nombre de trajectoires n_t et de larves n_l est donné dans les barres du graphe de vitesse curviligne, sous la forme n_t/n_l). Pour chaque paramètre, les valeurs présentées correspondent à une moyenne sur l'ensemble des trajectoires de la catégorie considérée. Encadré en orange, ce sont les paramètres associés aux trajectoires antérogrades de vésicules. Encadré en bleu, ce sont les trajectoires rétrogrades. * * $p < 0.01$.

nombre de trajectoires reconstruites dans un film donné et le nombre total de nanoKTP (immobiles et en mouvement) détectés dans le champ. Ce résultat confirme les observations faites par (Auer et al., 2015) concernant la fraction mobile des vésicules synaptiques et des mitochondries.

- Chez les larves sauvage et mutante, les vésicules suivies se déplacent autant dans les deux sens, antérograde et rétrograde (Figure 4.18(b)).

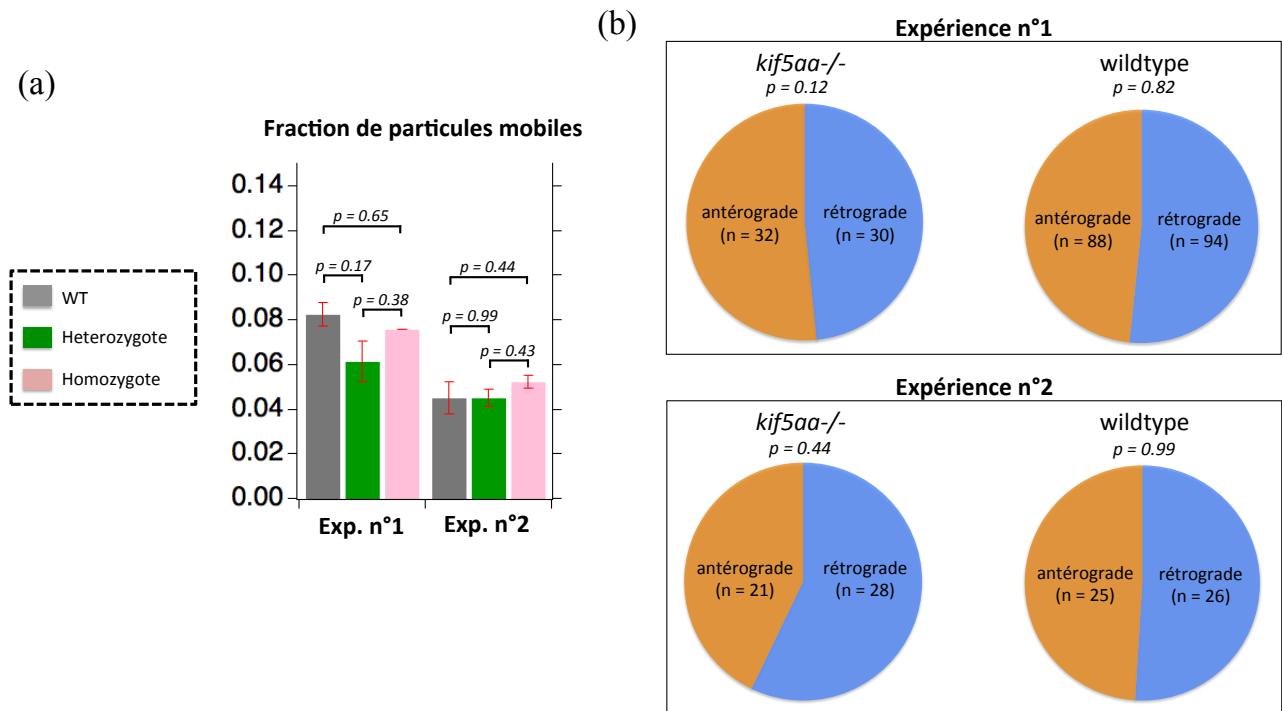


FIGURE 4.18 – Paramètres du transport axonal mesuré dans les larves mutantes *kif5aa*^{-/-}. (a) Quantification de la fraction de vésicules mobiles contenant un nanoKTP dans les axones des PVNs. Les p-valeurs sont toutes supérieures à 0.05 indiquant l’absence de modifications de ce paramètre en fonction du génotype. (b) Quantification pour les deux séries d’expériences du taux de transport antérograde et rétrograde chez les larves sauvage (wildtype) et mutante *kif5aa*. Aucune différence n’est détectée.

D’après les résultats de (Auer et al., 2015), ce comportement est identique à celui des vésicules synaptiques présentes dans les axones des RGCs (Figure 4.15(b)). En revanche, il est différent de celui des mitochondries dont le mouvement antérograde est diminué de manière significative chez la larve mutante (Figure 4.16(b)).

- On observe cependant une **augmentation graduelle de la vitesse curviligne des trajectoires antérogades** entre les larves sauvage, hétérozygote et homozygote. Le test de Kruskal-Wallis appliqué aux trois distributions donne $p = 0.018$ caractérisant la présence d’une différence significative. Par ailleurs le test de Wilcoxon-Mann-Whitney appliqué entre les données des larves homozygotes et WT donne $p = 0.004$ confirmant alors la différence observée.

Un point intéressant est que **cette augmentation n'est pas observée aussi nettement dans les trajectoires rétrogrades**. Cette dissymétrie n'est pas étonnante car la mutation étudiée cible un moteur spécifique du mouvement antérograde.

Discussion : L'absence de modification des paramètres de transport (exceptée la vitesse curviligne) chez la larve mutante *kif5aa*^{-/-} peut s'expliquer par le fait qu'il existe plusieurs familles de kinésines pouvant potentiellement mettre en place des mécanismes de compensation en cas de perte de certains moteurs. En particulier, le transport des endosomes tardifs et des lysosomes est majoritairement effectué par la famille des kinésines II (Hendricks et al., 2010), ce qui pourrait expliquer que nous n'observons pas de différences importantes. En effet, l'injection des nanoparticules de KTP se faisant 24 h avant l'imagerie, il est très probable que le transport que l'on sonde soit celui des lysosomes et des endosomes tardifs.

Concernant l'augmentation de la vitesse curviligne, une hypothèse qui pourrait expliquer cette observation serait que chez le mutant *kif5aa*^{-/-}, la perte de la sous-unité kif5a de la kinésine I pourrait favoriser une meilleure coordination de l'ensemble des moteurs responsables du transport antérograde. En effet, il est très probable que plusieurs moteurs soient accrochés à chaque vésicule pouvant plus ou moins bien coordonner leur dynamique (Hendricks et al., 2010; Chowdary et al., 2015) et donc transporter la vésicule plus ou moins rapidement. Bien évidemment, cette hypothèse nécessiterait d'être testée afin d'être validée. On pourrait par exemple imaginer perturber une autre famille de kinésines ou bien invalider plusieurs gènes de kinésine I afin de vérifier que les effets sont similaires. Par ailleurs, on constate sur la figure 4.17 que cette augmentation de la vitesse antérograde n'est hélas pas observée dans la deuxième expérience que nous avons réalisée. Ainsi, la première étape serait avant tout de s'assurer que cet effet est bien réel et ne résulte pas de la variabilité expérimentale en reproduisant une quatrième fois l'expérience de mesure du transport.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes également intéressés au **paramètre de fluctuation d'intensité SHG** qui, comme le montre la figure 2.20 du chapitre 2 reflète les mouvements de rotation des vésicules pendant leurs déplacements. Sur la figure 4.19, nous avons comparé les fluctuations d'intensité SHG entre les trois génotypes, pendant les phases de mouvement et pendant les phases d'arrêt. Durant les phases de GO, on constate une légère augmentation graduelle de ces fluctuations entre les larves WT, hétérozygotes et homozygotes. Cette augmentation est, selon les tests statistiques, significative entre les larves WT et hétérozygotes ($p = 0.04$) mais n'est pas considérée rigoureusement significative entre les conditions WT et homozygotes ($p = 0.07$). Concernant les phases de STOP, aucune modification n'est observée (les valeurs de p sont toutes supérieures à 0.3). **Il semblerait donc qu'en l'absence des sous-unités kif5a, les vésicules aient des mouvements de rotation plus importants lorsqu'elles se déplacent le long des microtubules.** Cela semble assez cohérent avec le fait qu'une diminution du nombre de moteurs augmente les degrés de liberté de mouvement des vésicules transportées.

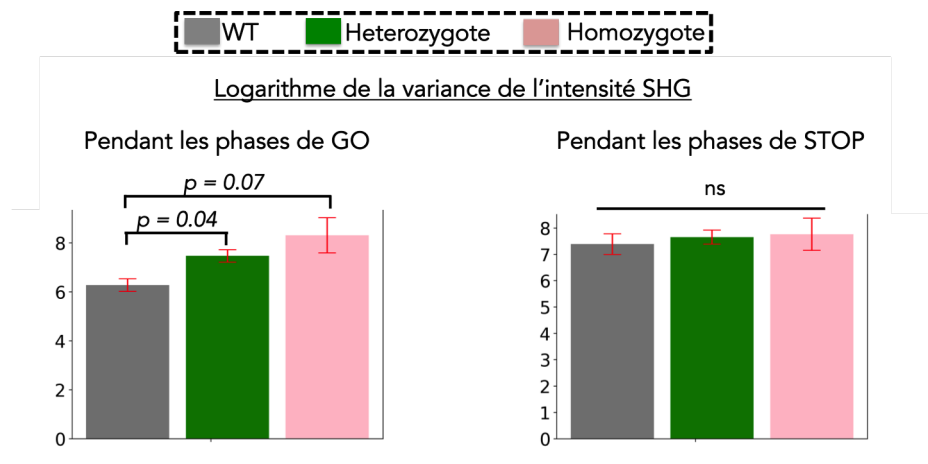


FIGURE 4.19 – Estimation de la mobilité rotationnelle des vésicules contenant les nanoKTP. Évolution du logarithme de la variance de l'intensité du rayonnement SHG pendant les phases de mouvement (à gauche) et les phases d'arrêt des vésicules (à droite). La comparaison est effectuée entre les trois génotypes : WT, hétérozygote et homozygote. Les données présentées ici sont issues de la première expérience réalisée sur les larves mutantes.

Bilan : Ces expériences ont permis d’apporter de nouveaux éléments concernant le transport d’organites dans les neurones du cerveau de mutants *kif5aa*^{-/-}. Comme indiqué en introduction de cette section, (Auer et al., 2015) qui ont développé ce mutant, ont également étudié par la méthode plus conventionnelle des kymographes le transport d’organites dans les axones de cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs). Ces mesures ont été réalisées par microscopie confocale à une cadence très lente de 0.2 image par seconde. Ils montrent alors que le transport de l’ensemble des vésicules synaptiques (toutes tailles comprises) n’est pas perturbé : ces dernières se déplacent en effet à la même vitesse et dans les mêmes directions dans les larves sauvages et mutantes. En revanche, ils constatent une réduction significative du transport antérograde des mitochondries chez la larve mutante.

Il est important de noter que dans nos expériences nous ne ciblons pas les mêmes neurones. Nos données sont donc complémentaires de celles de (Auer et al., 2015). Nos mesures du transport endosomal dans les axones des PVNs ont tendance à confirmer le fait que cette larve mutante *kif5aa*^{-/-} ne possède pas un transport intraneuronal particulièrement perturbé dans la mesure où la grande majorité des paramètres mesurés ne sont pas modifiés de manière significative. Concernant la fraction de transport antérograde et rétrograde, les endosomes que l’on suit semblent se comporter de la même manière que les vésicules synaptiques des axones des RGCs et différemment des mitochondries pour lesquelles un biais a été constaté.

En revanche, la précision de la méthode que nous avons mise en place durant ma thèse, notamment liée à une cadence d’acquisition élevée de 20 images par seconde, a permis de rechercher de potentielles modifications plus subtiles du transport axonal dans le toit optique du Zf. Grâce à ces observations, de nouvelles hypothèses sur les mécanismes mis en jeu ont émergé, notamment concernant l’éventualité d’une compensation par un autre moteur moléculaire de la même famille, en cas de déficit de l’un d’eux.

4.3.3 Étude du transport axonal dans les larves Zf transgéniques *dync1h1^{mw20}*

Les expériences réalisées sur le modèle transgénique *kif5aa*^{-/-}, ont mis en évidence la possibilité que les nombreuses familles de kinésines puissent mettre en place des mécanismes de compensation à l'origine des très faibles modifications du transport que nous avons détectées. Ainsi, nous avons décidé de nous intéresser à un autre modèle mutant ayant cette fois-ci **une défaillance du moteur dynéine** : le mutant *dync1h1^{mw20}*. À l'inverse des kinésines, les dynéines ne comprennent que deux grands groupes dont l'un correspond aux dynéines axonémales qui n'interviennent pas dans le transport actif de vésicules que l'on cherche à mesurer. Les dynéines cytoplasmiques sont donc les seules à assurer le transport actif rétrograde axonal. En guise de contrôle, nous voulons alors vérifier qu'en perturbant génétiquement ce moteur indispensable, nous arrivons à observer des modifications plus brutales du transport.

4.3.3.1 Description du mutants Zf *dync1h1^{mw20}*

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, un certain nombre de mutations affectant les moteurs moléculaires ont été associées à des troubles neuroaux. Par exemple, chez la souris, différentes mutations du gène *dync1h1* codant pour la chaîne lourde 1 de la dynéine cytoplasmique 1 engendrent une dégénérescence progressive des motoneurones (Hafezparast, 2003). Le Zf transgénique étudié ici possède également une mutation du gène *dync1h1* mais celle-ci n'est pas impliquée dans une pathologie neurologique humaine. En revanche, cette mutation (Figure 4.20) affecte grandement le développement des neurones photorécepteurs (Insinna et al., 2010). Ces derniers peuvent convertir par un processus photo-chimique l'énergie lumineuse en un signal neurochimique. Ils fonctionnent alors comme des neurones sensoriels capables de recevoir et d'initier la transmission d'informations visuelles. Une morphogenèse correcte de ces neurones est essentielle pour assurer leur bon fonctionnement et leur survie.

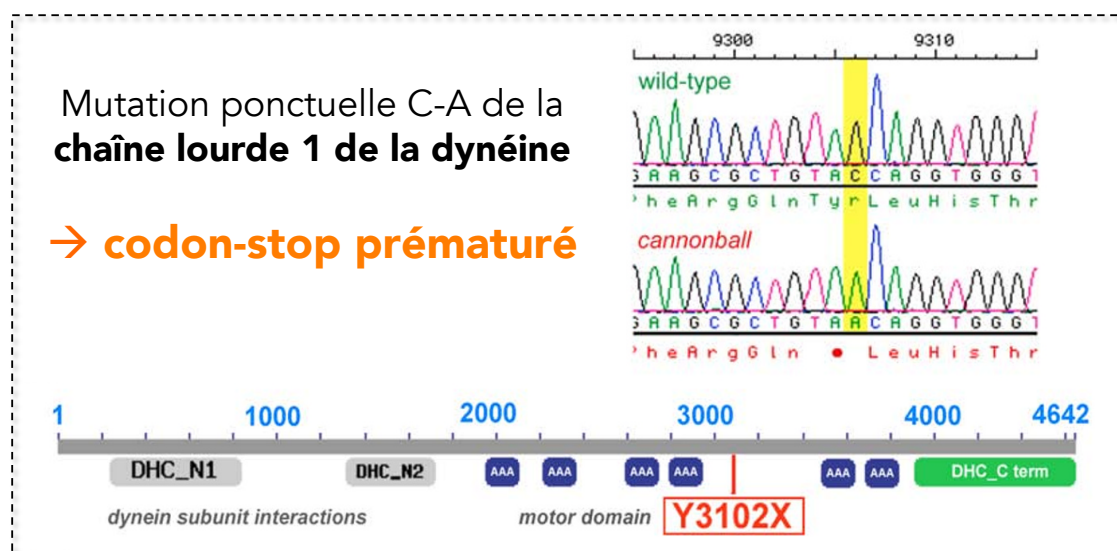


FIGURE 4.20 – Mutation étudiée du gène *dync1h1* codant pour la chaîne lourde 1 de la dynéine. En haut à gauche, illustration de la mutation ponctuelle : la séquence nucléotidique est modifiée (substitution de C par A à la position 9306). En bas, schéma de la protéine *dync1h1* et localisation du codon-stop prématuré. Adapté de (Insinna et al., 2010).

Le poisson-zèbre transgénique *dync1h1^{mw20}* que nous étudions ici a été développé par l'équipe de Brian LINK, professeur au département *Cell Biology, Neurobiology and Anatomy* du *Medical College of Wisconsin* (USA). Comme l'illustre la figure 4.20, ce mutant présente une mutation ponctuelle dans laquelle un nucléotide de la séquence du gène *dync1h1* a été changé (la nucléobase cytosine C est substituée par l'adénine A), induisant le remplacement du codon initial par un codon-stop à la position 3102 de l'acide aminé correspondant (Y3102X). Le processus de traduction se termine alors prématurément, engendrant une protéine résultante *dync1h1* tronquée. Cette dernière ne contient ni la queue de la protéine, essentielle à la liaison aux microtubules, ni certains domaines associés à l'activité ATPase⁸ et essentiels pour l'activité motrice et la structure globale de la protéine (Vallee and Höök, 2006). La protéine mutante formée n'est alors probablement pas fonctionnelle. (Insinna et al., 2010) exposent certaines caractéristiques phénotypiques de cette mutation dans la larve de Zf :

- À partir du 5^{ème} jour, les yeux de la larve mutante deviennent nettement plus

8. Les ATPases sont une classe d'enzymes liées au métabolisme énergétique.

petits.

- Les embryons mutants meurent entre le 6 et le 8 dpf, à la suite d'une dégénérescence des tissus cellulaires rapides.
- Des analyses d'images de microscopie électronique en transmission ont mis en évidence de graves défauts dans l'organisation des organites des photorécepteurs (accumulations de vésicules golgiennes et de mitochondries).
- Les segments externes⁹ ne se forment pas correctement.

(Insinna et al., 2010) mettent ainsi en évidence le rôle de la dynéine cytoplasmique dans le développement des neurones photorécepteurs.

4.3.3.2 Résultats des mesures de transport axonal dans des larves Zf mutantes *dync1h1^{mw20}*

Les expériences de mesure du transport axonal que nous avons réalisées sur ce mutant *dync1h1^{mw20}* ont eu pour but de vérifier que notre méthode détecte correctement l'impact de cette mutation sur le transport. Comme nous l'avons évoqué plus haut, la dynéine étant l'unique moteur responsable du transport rétrograde, nous nous attendions à une forte diminution de la fraction du mouvement dans cette direction. En réalité, la figure 4.21 montre que tous les mouvements, rétrogrades mais également antérogrades, sont inhibés. En effet, sur six larves mutantes, seulement deux trajectoires dirigées ont été observées. Par ailleurs, aucune différence de transport n'a été mesurée chez les larves hétérozygotes par rapport aux larves sauvages (les résultats et le protocole du génotypage sont disponibles dans l'annexe K)

Discussion : Malgré le fait que le complexe dynéine/dynactine soit spécifique du mouvement rétrograde, nos données indiquent que la dynéine joue un rôle important dans le transport antérograde axonal dans le toit optique de la larve de Zf. Plusieurs équipes se sont intéressées au rôle de la dynéine et du complexe dynactine sur le trans-

9. Zone du photorécepteur où se trouvent les pigments sensibles à la lumière

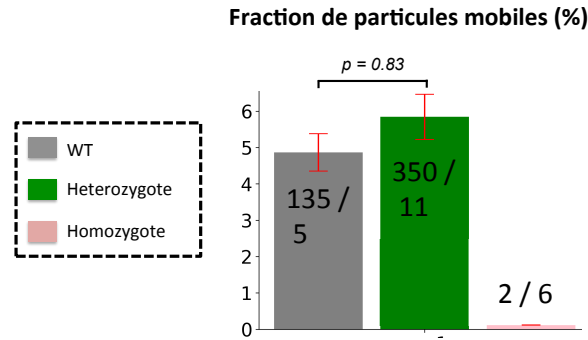


FIGURE 4.21 – Quantification de la fraction de vésicules mobiles contenant un nanoKTP dans les axones des PVNs. Comparaison effectuée dans les larves sauvages (WT), hétérozygotes et mutantes homozygotes. Le nombre de trajectoires n_t et de larves n_l est donné dans les barres du graphe, sous la forme n_t/n_l .

port antérograde. (Martin et al., 1999) mettent en évidence et s'interrogent sur le fait que des perturbations spécifiques de moteurs moléculaires unidirectionnels peuvent provoquer des défauts bidirectionnels du transport. Pour cela, ils ont étudié l'impact de mutations sur la chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique (cDhc64C) et sur la sous-unité p150^{Glued} du complexe dynactine en utilisant des techniques génétiques chez des larves de drosophile. Ils constatent alors que ces deux mutations perturbent chacune le transport axonal des organites dans les deux sens. (Deacon et al., 2003) démontrent par ailleurs que la dynactine est nécessaire pour le transport bidirectionnel d'organelles. Dans le cadre de leurs travaux, ils ont utilisé la larve de Xénope lisse comme système modèle. En analysant le déplacement des mélanosomes par la kinésine II, ils ont déterminé que le complexe dynactine, connu à l'origine pour son rôle d'activateur de la dynéine cytoplasmique, relie également la kinésine II aux organelles. Plus récemment, (Herbert et al., 2017) mettent en évidence le fait que le complexe dynéine/dynactine est nécessaire au transport antérograde de l'ARNm de protéine de myéline basique¹⁰ (Mbp) dans les oligodendrocytes¹¹ du poisson-zèbre. Ils constatent en effet, qu'une mutation du gène *actr10*, qui code pour la sous-unité arp11 de la dynactine se traduit par

10. La protéine basique de la myéline est une protéine considérée comme importante dans le processus de myélinisation des nerfs du système nerveux.

11. Un oligodendrocyte est une cellule de la névroglie interstitielle. Sa principale fonction est la formation de la gaine de myéline entourant les axones du système nerveux central.

une mauvaise distribution de l'ARNm Mbp dans les oligodendrocytes, ce qui indique un rôle paradoxal du complexe dynéine/dynactine spécifique du transport rétrograde mais également acteur dans la dynamique antérograde de l'ARNm mbp.

L'absence de transport antérograde que nous avons observée chez le mutant *dync1h1* s'accorde donc avec plusieurs études de la littérature. Actuellement, nous effectuons des expériences de mesure du transport dans la continuité de ces travaux : nous souhaitons comprendre davantage les mécanismes mis en jeu à l'issue de la perte du moteur dynéine. Pour cela, nous utilisons un traitement pharmacologique (le dynapyrazole) permettant d'inhiber la dynéine (Steinman et al., 2017). Le but est d'étudier le processus de dérégulation du transport bidirectionnel de manière progressive grâce l'utilisation de doses d'inhibiteur différentes.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu discuter des nombreux avantages du modèle poisson-zèbre et plus spécifiquement de la larve de poisson-zèbre pour mesurer les caractéristiques du transport intraneuronal. Après avoir brièvement décrit le travail de plusieurs équipes s'intéressant à cette problématique, nous avons expliqué comment nous avons adapté les outils de mesure et d'analyse mis au point au cours de ma thèse afin de mesurer le transport axonal dans le toit optique de la larve de Zf. Enfin, les premiers résultats de détection d'anomalies du transport dans des cas pathologiques ont été présentés. Ainsi, l'effet du nocodazole sur ce transport a été discuté et a permis de retrouver et compléter certains résultats de la littérature. Dans un second temps, nous avons commencé à étudier le transport intraneuronal dans le cerveau de mutants conçus pour mimer les anomalies de la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Cette deuxième étude nécessite d'être complétée par des expériences supplémentaires afin de confirmer les premières observations et tester nos interprétations. Pour finir, nous avons présenté nos derniers travaux concernant l'étude d'un deuxième mutant ayant une défaillance

du moteur dynéine. Ces derniers résultats ont permis de confirmer des études de la littérature concernant le rôle du moteur dynéine dans le transport antérograde.

Conclusion et perspectives

Ce mémoire a présenté le développement d'une méthode de mesure et d'analyse du transport intraneuronal dans des neurones du toit optique de la larve de poisson-zèbre par suivi de nanocristaux non-linéaires en microscopie de seconde harmonique. Nous avons mis au point un protocole complet et original de mesure depuis l'injection des nanocristaux jusqu'à l'extraction des paramètres de transport à partir des données vidéos.

Les quelques études de mesures de transport intraneuronal dans des organismes *in vivo* présentées dans le chapitre 1 mettent en évidence les progrès importants qui ont été réalisés ces dernières années dans ce domaine jusqu'à l'utilisation de cette approche pour réaliser le criblage de principes actifs *in vivo*. L'utilisation de nanocristaux à réponse optique non-linéaire, insensibles au photoblanchiment, nous a permis de repousser les limites de résolution temporelle des autres méthodes afin d'acquérir des données de transport axonal à une cadence de 20 images par seconde.

Dans le cadre du développement de cette méthode, nous avons dû mettre au point un processus d'analyse qui gère l'excès de bruit observé dans la localisation des nanocristaux non-linéaires afin d'empêcher des artefacts de segmentation. En outre, afin de pouvoir traiter efficacement le grand nombre de données acquises au cours d'une expérience (une centaine de films) nous avons uniformisé et automatisé tout le flux d'analyse précédemment réalisé avec des logiciels différents, en un seul et même programme, qui comprend un module de détection des émetteurs et de reconstruction des trajectoires, un module de segmentation en phases de mouvement et de pause, et finalement un module d'extraction des paramètres de transport.

Nous avons ensuite confronté notre technique de mesure à la détection d'altérations du transport dans différentes situations où nous induisons une perturbation, soit avec un composé chimique (pour déstabiliser le cytosquelette), soit en utilisant des larves mutantes ayant une perte de fonction du gène *Kif5aa* (gène retrouvé muté dans la maladie de Charcot-Marie Tooth de type 2) ou ayant une mutation non sens sur le gène de la chaîne lourde de la dynéine. Enfin nous avons proposé des pistes d'interprétation des résultats obtenus, qui requièrent des expériences complémentaires pour être consolidées. La méthodologie que nous avons mise en place pourrait permettre de cribler l'impact fonctionnel (sur le transport intraneuronal) de facteurs de risques génétiques de maladies neurologiques, et plus particulièrement neurodégénératives.

La larve de Zf est un modèle animal bien adapté pour élucider les mécanismes moléculaires du fonctionnement normal et pathologique des circuits neuronaux et nous souhaitons donc continuer à utiliser ce système. Après nous être intéressés à l'effet d'une perturbation de la polymérisation des microtubules, puis des moteurs moléculaires, l'équipe va étudier l'impact d'une hyperphosphorylation de la protéine associée aux microtubules TAU/MAPT. Comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre 1, TAU est retrouvée hyperphosphorylée dans plusieurs maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou les démences fronto-temporales. À l'échelle moléculaire, l'hyperphosphorylation de TAU entraîne le décrochement de TAU des microtubules puis dans une deuxième étape, à un stade déjà bien avancé de la maladie, son accumulation intracellulaire sous forme d'enchevêtrements neuro-fibrillaires. La détection de différences de transport vésiculaire entre la situation contrôle sauvage et la situation d'hyperphosphorylation, permettrait d'identifier une phase présymptomatique précoce de la pathologie, qui pourrait aider à mieux comprendre la cascade moléculaire se terminant par la présence de fibres enchevêtrées. L'équipe s'apprête à mesurer le transport intraneuronal dans deux mutants surexprimant la forme humaine phosphorylée TAU^{P301L} dans des régions différentes du système nerveux : celui développé par Bettina

SCHMID (Paquet et al., 2009) qui a une faible expression cérébrale et celui de Caghan KIZIL où l’expression est cérébrale (Cosacak et al., 2017).

Concernant les perspectives à plus long terme, **nous voulons étendre la mesure du transport à des échantillons encore plus complexes et plus proches du modèle humain. L’objectif est donc de reprendre les expériences de mesure du transport dans le cerveau de la souris** que nous avons initiées avec Brice BATHÉLLIER dans le laboratoire NeuroPSI à Gif-sur-Yvette. Comme nous l’avons décrit au début du chapitre 4, nos premières tentatives ont mis en évidence la difficulté de faire internaliser les nanoparticules dans les neurones du cortex après micro-injection. **Nous pensons qu’une alternative serait d’associer ces nanoparticules à un agent de transfection pour permettre leur internalisation neuronale dans un environnement aussi dense que le cortex.** Pour cela, nous envisageons d’entourer les nanoparticules de virus adéno-associés (AAV). Ces structures sont reconnues comme les plus efficaces pour infecter les neurones. Elles devraient faciliter l’internalisation des nanoparticules. Nous ferons appel à des AAV chimiquement modifiés qui ont été développés par des équipes du laboratoire “Chimie et interdisciplinarité : synthèse, analyse et modélisation” (Université de Nantes/CNRS) et du laboratoire “Thérapie génique translationnelle des maladies génétiques” (Inserm). Cette technologie brevetée¹², baptisée ChemAAV (Mével et al., 2020), repose sur la création d’une liaison chimique covalente entre un ligand, une molécule capable de se lier spécifiquement à une cellule cible et la capsid¹³ de l’AAV (Figure 4.22). Dans notre cas nous souhaitons lier une biotine à l’AAV et une streptavidine au nanoKTP. En effet, les protéines homotétramères de streptadivine ont une affinité exceptionnellement haute pour la biotine ce qui permettrait d’utiliser la liaison streptadivine-biotine afin d’attacher par un lien fort le nano-KTP à l’AAV.

Une étape intermédiaire, avant l’étude du cerveau intact de souris *in vivo*, serait de

12. Brevet «rAAV with chemically modified capsid », en copropriété CNRS/Inserm/Université de Nantes/CHU de Nantes, déposé 09/06/2017.

13. Coque protéique qui entoure le matériel génétique d’un virus.

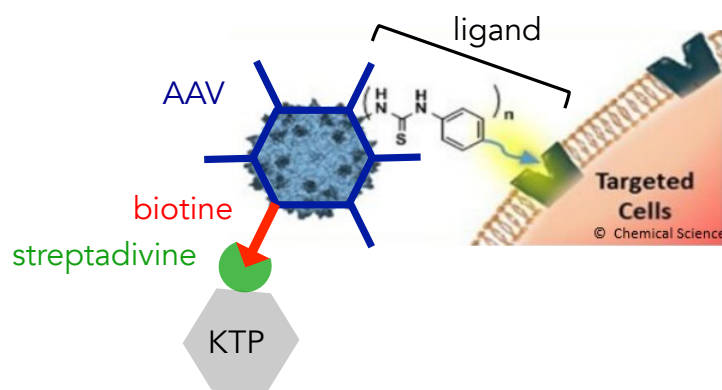


FIGURE 4.22 – Schéma du virus adéno-associé (AAV) relié à un KTP par une liaison streptavidine-biotine et sur lequel ont été greffés des ligands permettant de cibler spécifiquement une cellule. Extrait de (Mével et al., 2020).

tester l'efficacité de ces marqueurs optiquement actifs et fonctionnalisés sur des organoïdes cérébraux dérivés de cellules souches humaines. Dans cette optique, notre équipe participe à un projet financé par la Fondation pour la recherche Médicale (FRM) intitulé “Des mini-cerveaux Alzheimer humains pour élucider les mécanismes physiopathologiques précoces : vers l'identification de nouvelles voies de signalisation” coordonné par Frank YATES et Jean-Philippe DESLYS au service SEPIA/CEA Paris-Saclay de Fontenay-aux-Roses. L'un des principaux atouts de ces nouvelles structures 3D est le fait de pouvoir être dérivées de cellules humaines de patients atteints de la forme familiale ou sporadique de la maladie d'Alzheimer, offrant ainsi des possibilités uniques d'accéder, d'observer et de perturber les processus biologiques dans le cerveau humain sans les contraintes et les complications liées à l'étude de modèles animaux ou d'échantillons de cerveau humain. Il est ainsi prévu dans le cadre de ces travaux de réaliser des mesures du transport axonal (en forçant la croissance des branches dans le plan de l'interface air-liquide comme dans (Giandomenico et al., 2019)) dans le but de détecter des altérations de ce dernier et de les corrélérer à des anomalies de l'activité synaptique, mesurée par des techniques d'électrophysiologie (Figure 4.23).

En parallèle des études de mesure du transport réalisées par microscopie deux-photons, Florian SEMMER, en thèse dans l'équipe, encadré par François MARQUIER

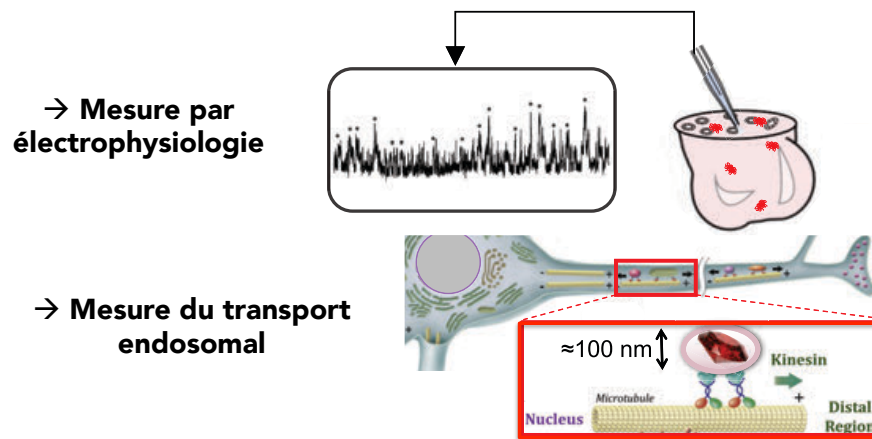


FIGURE 4.23 – Détections d’anomalies fonctionnelles dans des mini-cerveaux Alzheimer humains. Corrélation de l’activité synaptique avec le transport intraneuronal.

et Karen PERRONET développe un dispositif de balayage très rapide de faisceau en **3 dimensions**, en vue de son intégration dans un microscope pour le suivi individuel de nanoparticules. Ce dispositif de microscopie repose sur un suivi orbital de **particules individuelles une par une** similaire à celui développé par (Wehnekamp et al., 2019) mais utilisant une technologie de balayage radicalement différente. Il rendra possible la reconstruction 3D de trajectoires de nanoparticules internalisées dans des neurones de structures intactes complexes, avec des résolutions spatiale et temporelle actuellement inaccessibles dans de tels milieux (10 nm et 40 nm de précision de localisation latérale et axiale respectivement et moins de 1 ms de résolution temporelle).

Le balayage 3D est assuré par une méthode d’holographie numérique (Cheng et al., 2016) : les hologrammes imprimés sur un modulateur spatial de lumière (SLM) permettant de choisir la position du faisceau excitateur (Figure 4.24). Le suivi dynamique d’un émetteur est alors assuré par une rétroaction qui rafraîchit les hologrammes en fonction du déplacement de la particule suivie. Grâce à l’utilisation d’une matrice de micro-miroirs (DMD, *digital micromirror device*) comme dispositif SLM, cette opération peut être effectuée à une fréquence de 22 kHz. À l’inverse des techniques d’imagerie volumique usuellement utilisées, où le passage d’un plan imagé au suivant se fait par l’intermédiaire de cristaux piézo-électriques au déplacement relativement lent (plusieurs

millisecondes), ce microscope suit un unique émetteur à la fois, permettant d'atteindre de très hautes cadences.

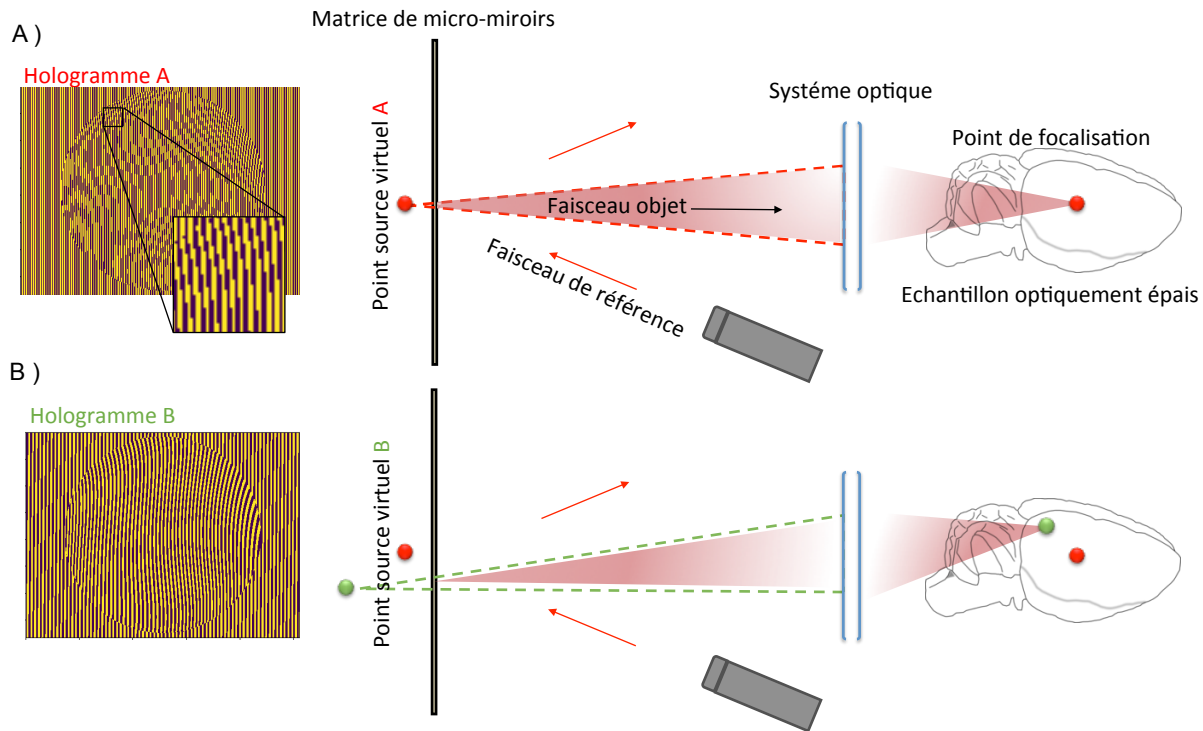


FIGURE 4.24 – Schéma de principe du microscope à balayage de faisceau par holographie en 3 dimensions. La matrice de miroirs (DMD) affiche les hologrammes. Ils sont représentés à gauche de la figure. L'hologramme est calculé pour modifier la lumière du faisceau de référence, en une lumière provenant d'un point source virtuel. Le choix de l'hologramme détermine ainsi la position du point source virtuel associé à la position de point de focalisation du faisceau excitateur. Entre la situation A et la situation B, la position du laser d'excitation a été modifiée.

Les diverses équipes s'intéressant à l'imagerie de systèmes complexes *in vivo* ne cessent de repousser les limites de résolution temporelle et spatiale. La profusion de techniques développées actuellement va très certainement permettre d'observer de mieux en mieux les processus dynamiques à l'échelle moléculaire ce qui permettra d'accroître notre compréhension des mécanismes intervenant dans les troubles neurologiques.

Annexe A

Notion de “facteur de risque génétique” des maladies neurologiques

Les maladies neurologiques sont des pathologies qui touchent le système nerveux central ou périphérique. Les affections sont diverses dans leurs symptômes et incluent les maladies neurodégénératives qui forment un groupe complexe de pathologies chroniques progressives. Certaines de ces maladies possèdent une forme très rare héréditaire, également appelée **forme familiale**. Purement génétique, elle se caractérise souvent par une apparition précoce des symptômes et par une transmission dite autosomique dominante, c’est à dire que le risque de transmission est de 50% à chaque conception. A l’inverse, **les formes sporadiques**, qui représentent la grande majorité des cas, sont des pathologies multifactorielles dont l’apparition provient de l’interaction entre un terrain génétique et des facteurs de risques reconnus (Bertram and Tanzi, 2005). Individuellement, ces facteurs augmentent statistiquement le risque de développer la maladie sans pour autant en être la cause. Par exemple, pour la forme non mendélienne de la maladie d’Alzheimer, l’âge est le principal facteur de risque avéré. D’autres ont été mis en évidence tels que l’hypertension artérielle non traitée, les accidents vasculaires cérébraux, le diabète, le surpoids, le sexe féminin ou encore des facteurs environnementaux (tabac, alcool, pollution, certains médicaments,...). Bien qu’il n’existe, dans ce cas, pas de processus purement héréditaire, ces formes semblent néanmoins comporter une prédisposition génétique : c’est ce que l’on nomme les **facteurs de risques génétiques**.

Grâce à des études génomiques large échelle, pour chaque maladie neurodégénérative, des gènes particuliers ont pu être identifiés comme facteurs de risque génétique. Un trouble neurologique peut parfois être associé à des mutations dans un unique gène ; c'est par exemple le cas de la maladie de Huntington. Le plus souvent néanmoins, plusieurs gènes sont identifiés : on parle alors de **maladies polygéniques**. Dans ce dernier cas, la contribution de chacun des gènes est très diverse et l'apparition de la pathologie nécessite probablement l'effet combiné de modifications des différents facteurs génétiques ainsi que des facteurs environnementaux indépendants, ce qui est à l'origine de la complexité de ces pathologies. La compréhension de la contribution génétique globale dans le processus pathologique de dégénérescence neuronale nécessite alors de séparer l'effet des gènes individuels liés à la maladie de l'effet général.

Annexe B

Notations simplifiées des coefficients de Kleinman

Les coefficients non linéaires d_{ijk} sont donnés dans le repère cartésien (x, y, z) dans lequel sont définis les champs. Les indices ijk du tenseur sont notés dans ce repère par $1 = x$, $2 = y$, $3 = z$. Par ailleurs, Il y a permutation sur les indices j et k . En effet, considérons un champ électrique d'excitation à la pulsation ω dont les composantes sont $(E_i(\omega), E_j(\omega), E_k(\omega))$. La polarisabilité non linéaire issue du produit $E_j(\omega)E_k(\omega)$ est équivalente à celle issue de $E_k(\omega)E_j(\omega)$, c'est-à-dire que $d_{ijk} = d_{ikj}$. De plus, dans le cas particulier de la génération de second harmonique, nous pouvons utiliser l'hypothèse de Kleinman qui s'applique lorsque les fréquences optiques sont très inférieures aux fréquences de résonance du matériau, impliquant alors une interaction lumière-matière sans perte et instantanée. Dans ces conditions, la permutation est possible sur tous les indices des coefficients. La notation est alors simplifiée grâce à la contraction $d_{ijk} = d_{il}$ avec les correspondances suivantes :

jk	11	22	33	23 = 32	31 = 13	12 = 21
l	1	2	3	4	5	6

Annexe C

Protocole : Culture primaire de neurones corticaux

Produits utilisés :

- Neurones corticaux de souris, 4×10^6 fioles de cellules congelées (*Viable cells/Vial*) : Thermo Fisher Cat.no. A15586.
- Poly-DL-ornithine hydrobromide (traitement des lamelles) : Sigma-Aldrich P0421.
- Milieu Neurobasal sans phenol red : Thermo Fisher Cat.no. 12348017.
- 200 mM GlutaMax™-1 Supplement : Thermo Fisher Cat.no.35050061.
- 50X B-27 Supplement : Thermo Fisher Cat.no. 17504044.
- Penicillin-streptomycin 5000 U/ml : Thermo Fisher Cat.no. 15070063.

Préparation du milieu de culture complet :

- Ajouter 200 mM de GlutaMax™-1 Supplement (Cat.no.35050061) pour une concentration finale de 0.5 mM et 50X B-27 Supplement (Cat.no.35050061) pour une concentration finale de 2 % (v/v). Ajouter 5000 U/ml de Penicillin-Streptomycin au milieu de Neurobasal (Cat.no. 12348017) pour une concentration finale de 50 U/ml.

Traitement des lamelles de microscope :

- Mettre des lamelles de 18 mm (1.5 mm d'épaisseur) dans un plat 6 puits de culture.
- Traiter les lamelles avec une solution de poly-DL-ornithine (Sigma-Aldrich P0421) à 0.03 mg/ml.
- Incuber les lamelles à 37°C pendant 2 h.
- Aspirer la solution de traitement et la remplacer par du milieu de culture.

Mise en culture des neurones corticaux :

- Rincer un tube de 50 ml avec du milieu de culture préchauffé à 37°C et laisser le tube dans l'incubateur.
- Décongeler rapidement (<2 min) la fiole de cellules congelées en la plaçant dans un bain d'eau à 37°C . Enlever la fiole du bain chauffant juste avant qu'elle ne soit totalement décongelée (1 min).
- Transférer la fiole dans l'incubateur.

- Rincer une micropipette P-1000 avec du milieu de culture préchauffé à $37^{\circ}C$ et, très doucement, transférer les cellules dans le tube de 50 mL pré-rincé avec du milieu de culture. Pour cela, ajouter 1 ml de milieu de culture dans la fiole et transférer les neurones dans le tube de 50 mL extrêmement doucement (une goutte par seconde). Mélanger soigneusement en faisant des “va-et-vient” avec la pipette.
- Ajouter très doucement 2 ml de milieu dans le tube de 50 mL (pour arriver à un volume total de 4 ml). Mélanger la suspension à l’aide de la pipette P-1000 en prenant soin de ne pas créer de bulles d’air.
- Dans chaque puits, verser 500 μ L de la solution contenant les neurones; cela correspond alors à une densité de 6×10^5 neurones par puits.
- Incuber les cellules à $37^{\circ}C$, 5 % CO_2 incubator.
- Après 8 h d’incubation, pour chaque puits, aspirer la moitié du milieu et le remplacer par du milieu neuf. Remettre le plat de cellule dans l’incubateur.
- Nourrir les cellules tous les trois jours en aspirant la moitié du milieu et en le remplaçant par du milieu neuf.

Annexe D

Protocole : Internalisation des nanoparticules dans des neurones corticaux issus de cultures primaires

Les expériences de mesure du transport en culture primaire ont été effectuées au DIV14 (*day in vitro*). Toutes les manipulations décrites ci-dessous doivent être effectuées sous hotte stérile.

Étape 1 : Dans une boîte de pétri non cytotoxiques, en PS vierge, de diamètre 55 mm (Sterilin), déposer un morceau carré de papier Parafilm.

Étape 2 : Préparer une solution de nanoparticules diluée dans du milieu de culture “neuf”, à une concentration de 0.05 mg/mL.

Étape 3 : Déposer une goutte de 200 μL de la solution de nanoparticules dans la boîte de pétri, sur le Parafilm.

Étape 4 : Sortir le plat de neurones de l’incubateur (DIV14), prendre délicatement (à l’aide d’une pince) une lamelle sur laquelle les neurones se sont développés et la retourner sur la goutte de solution de nanoparticule précédemment déposée dans la boîte de pétri.

Étape 5 : Placer la boîte de pétri (avec son couvercle) contenant la lamelle dans incubateur à 37°C en atmosphère humide et à 5% de CO₂ pendant 10 min. Ne pas oublier de replacer le plat de neurones à l’incubateur également.

Étape 6 : Sortir la boîte de pétri contenant la lamelle de l’incubateur. Prendre la lamelle avec une pince et absorber le surplus de solution en utilisant une lingette absorbante (Kimtech, Kimberly-Clark, USA) sur laquelle on vient déposer un rebord de la lamelle pendant un court instant. Remettre la lamelle dans son milieu de culture originel et incubée durant 20 min.

Annexe E

Comparaison de la fluorescence deux photons des nanodiamants (FNDs) et du signal SHG des nano-KTP

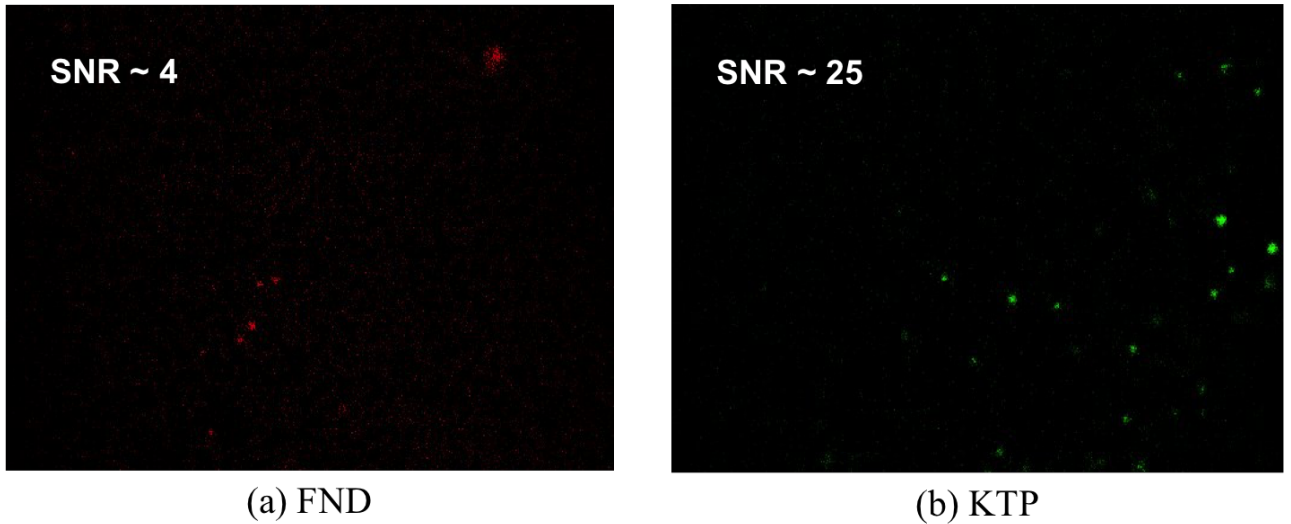


FIGURE E.1 – Estimation du rapport signal sur bruit de nanodiamants (FNDs) et de nano-KTP internalisés dans le cerveau d'un poisson zèbre juvénile de 21 jours (lignée NACRE (sans mélanocytes) ; injection des nanoparticules 24h avant l'imagerie). Longueur d'onde : 1040 nm. $P_{laser} = 77\%$. (a) Fluorescence deux photons des FNDs. L'image est enregistrée en surface du cerveau du poisson-zèbre (très peu de FNDs sont détectés en profondeur). On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 4. (b) Signal SHG des nano-KTP. L'image est enregistrée à une profondeur d'environ 100 μm . On estime un rapport signal sur bruit bien plus élevé que les FNDs, de l'ordre de 25.

Annexe F

Puissance $P_{2\omega}(\theta)$ du rayonnement SHG collectée par l'objectif de microscope

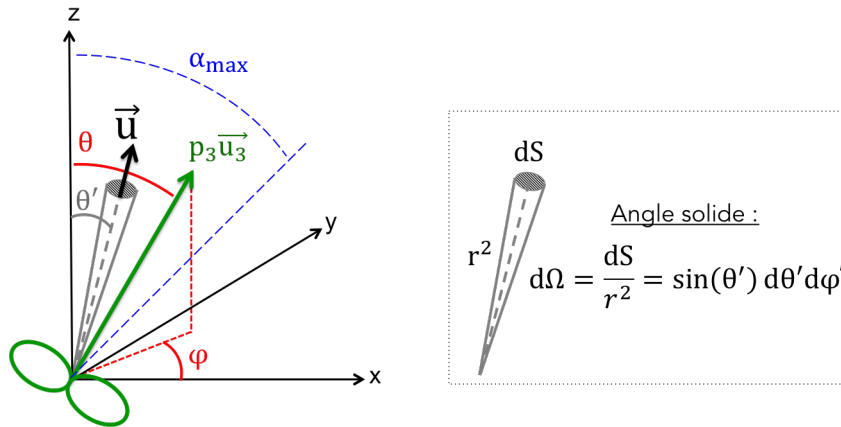


FIGURE F.1 – Schéma représentant le rayonnement SHG du nano-KTP dont l'axe cristallin est déterminé par l'angle polaire θ et l'azimut φ , repéré par rapport à l'axe (Oz) de l'objectif de microscope qui collecte l'émission. L'émission est assimilée à celle d'un dipôle unique aligné avec l'axe cristallographique (axe 3). $\alpha_{\max}$ correspond à l'angle maximal de collection du signal par l'objectif. Ce dernier est relié à l'ouverture numérique ON par la relation : $ON = n_{\text{eau}} \sin \alpha_{\max}$, où n_{eau} est l'indice de réfraction de l'eau car nous utilisons un objectif à immersion dans l'eau. le vecteur u défini par les angles θ' et φ' (non représenté pour alléger la figure) représentent la direction de collection du signal. À droite, l'angle solide élémentaire est représenté et son expression est explicitée.

On définit le vecteur $\vec{u}$ correspondant à la direction de collection du signal :

$$\vec{u} = \begin{pmatrix} \sin \theta' \cos \varphi' \\ \sin \theta' \sin \varphi' \\ \cos \theta' \end{pmatrix} \quad (\text{F.1})$$

Le dipôle est excité par une onde à la fréquence ω polarisée circulairement dans le plan (x, y) , dont les composantes du champ complexe peuvent être écrites :

$$\vec{E}_\omega^{\text{inc}} = \begin{pmatrix} E_\omega \\ iE_\omega \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{F.2})$$

Le coefficient non-linéaire d_{33} du tenseur de susceptibilité du KTP étant prédominant devant tous les autres (cf figure 2.21) on peut, en utilisant l'équation 2.2, faire l'approximation que la polarisation non-linéaire engendrée à la fréquence 2ω vaut :

$$p_3(\theta, \varphi) = 2\varepsilon_0 d_{33} |E_3(\theta, \varphi)|^2, \quad (\text{F.3})$$

où $E_3(\theta, \varphi)$ est la projection de $\vec{E}^{\text{inc}}$ sur le vecteur $\vec{u}_3$ donnant la direction du dipôle.

Par ailleurs, le système étudié est à symétrie de révolution autour de l'axe optique de l'objectif z . On peut donc raisonner et faire le calcul en considérant $\varphi = 0$. Cela revient à définir :

$$\vec{u}_3 = \begin{pmatrix} \sin \theta \\ 0 \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (\text{F.4})$$

De plus, la puissance rayonnée par le dipôle p_3 par unité d'angle solide vaut :

$$\frac{dP_{2\omega}}{d\Omega} = K |\vec{p}_{3\perp}(\theta)|^2, \quad (\text{F.5})$$

où K est une constante, θ l'angle polaire d'orientation du dipôle par rapport à l'axe de l'objectif de microscope et $\vec{p}_{3\perp}$ la projection de $\vec{p}_3$ dans le plan perpendiculaire au vecteur $\vec{u}$.

On peut exprimer $\vec{p}_{3\perp}$:

$$\vec{p}_{3\perp} = \vec{p}_3 - (\vec{p}_3 \cdot \vec{u}) \vec{u} \quad (\text{F.6})$$

Il est alors possible de calculer $|\vec{p}_{3\perp}|^2$ (calcul fastidieux non détaillé) :

$$|\vec{p}_{3\perp}|^2 = |\vec{p}_3|^2 \times M(\theta, \theta', \varphi'), \quad (\text{F.7})$$

où $M(\theta, \theta', \varphi')$ est un facteur multiplicatif dépendant de θ, θ' et φ' qui peut être calculé et explicité analytiquement (non détaillé). On trouve l'expression suivante :

$$M(\theta, \theta', \varphi') = 1 - (\sin^2 \theta \sin^2 \theta' \cos^2 \varphi' + \cos^2 \theta \cos^2 \theta' + 2 \cos \theta \sin \theta \cos \theta' \sin \theta' \cos \varphi') \quad (\text{F.8})$$

Finalement, l'expression intégrale de la puissance $P_{2\omega}(\theta)$ du rayonnement SHG collectée par l'objectif de microscope est obtenue en intégrant l'équation F.5 sur les angles solides (cf figure F.2) :

$$\begin{aligned} P_{2\omega}(\theta) &= |\vec{p}_3|^2 \times \int_0^{\alpha_{\max}} \int_0^{2\pi} M(\theta, \theta', \varphi') \sin \theta' d\theta' d\varphi' \\ &= |\vec{p}_3|^2 \times \pi \cos \alpha_{\max} \sin^2 \alpha_{\max} \sin^2 \theta + 2\pi \left(\frac{2}{3} + \frac{\cos^2 \alpha_{\max} - 3 \cos \alpha_{\max}}{3} \right) \\ &= |\vec{p}_3|^2 \times A(\theta, \alpha_{\max}), \end{aligned} \quad (\text{F.9})$$

où la notation $A(\theta, \alpha_{\max})$ est introduite pour alléger l'expression.

On peut noter que si on intégrait dans tout l'espace, on aurait $A_{\text{tot}} = \frac{8\pi}{3}$. On peut alors normaliser la puissance $P_{2\omega}(\theta)$ par cette valeur.

L'efficacité de collection du rayonnement SHG en fonction de θ défini par $\frac{P_{2\omega}(\theta)}{|\vec{p}_3|^2 \times A_{\text{tot}}}$

est représentée ci-dessous, en considérant une ouverture numérique de $ON = 0.95$:

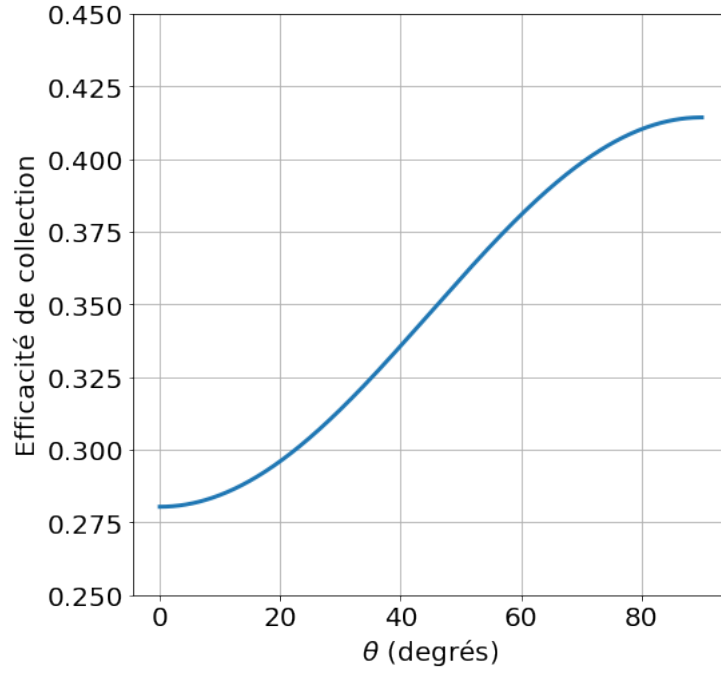


FIGURE F.2 – Efficacité de collection de la SHG d’une nanoparticule assimilé à un dipôle en fonction de son orientation polaire θ (par rapport à l’axe de l’objectif de microscope). Il s’agit essentiellement d’un $\sin^2 \theta$ dont le contraste de modulation dépend de l’angle de collection maximal.

Annexe G

Comparaison du signal SHG de différents nanocristaux à réponse optique non linéaire : les SiC, les BTO et les KTP

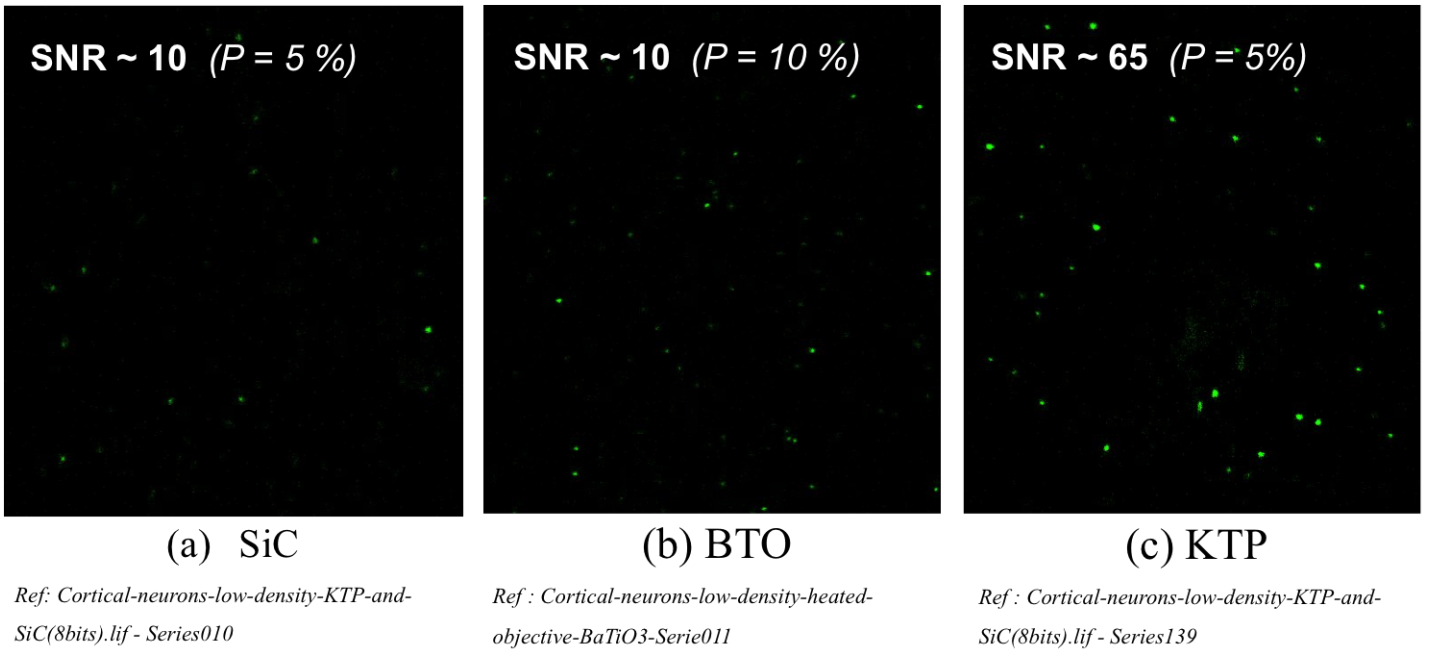


FIGURE G.1 – Estimation du rapport signal sur bruit de nano-SiC, nano-BTO et nano-KTP internalisés dans des cultures primaires de neurones corticaux. Longueur d'onde : 896 nm. (a) Signal SHG des nano-SiC. $P_{laser} = 5\%$. On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 10. (b) Signal SHG des nano-BTO. $P_{laser} = 10\%$. On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 10. (c) Signal SHG des nano-KTP. $P_{laser} = 5\%$. On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 65.

Annexe H

Protocole : Injection des nano-KTP dans la larve de *Zf in vivo*

Nanoparticules de KTP utilisées :

Synthèse chimique des nanoparticules :

Avec l'aide de Thierry GACOIN, chercheur au laboratoire de Physique de la Matière Condensée de l'Ecole Polytechnique, Gaëlle ALLARD, ingénieure chimiste dans notre laboratoire, a synthétisé des nano-KTP d'environ 100 nm de diamètre selon le protocole de synthèse publié par Biswas *et al* (Biswas et al., 2007).

Désagrégation des nanoparticules :

Grâce à l'application d'ultrasons de "forte" puissance avec une sonde de type *cup horn* (ref : 4608, *Qsonica*, CT, USA). La sonication est effectuée pendant **45 min** en utilisant un tube conique de 15 mL contenant environ **2 mL de la solution de nano-KTP de concentration d'environ 1 mg/mL**. Nous avons ainsi été capables de désagréger ces agrégats de nano-KTP et d'obtenir une solution finale comportant une population majoritaire de nanoparticules de taille ≈ 100 nm, adaptée à l'internalisation par endocytose et à la mesure du transport intraneuronal.

Croissance des larves :

Les larves provenant des laboratoires de nos collaborateurs sont incubées dans du phénylthiourée (PTU) qui permet d'inhiber le développement de pigments cellulaires. Le PTU est ajouté au milieu à la fin du premier jour de développement des larves (1 dpf). Les larves restent ensuite en milieu PTU tout le temps, même pendant l'observation.

Injection :

Trois jours après la fécondation (3 dpf), une solution de nano-KTP de taille ≈ 100 nm est injectée dans le lobe gauche du toit optique de la larve. Pour chaque larve, un volume de 3 nL de solution de concentration 0.1 mg/mL est injecté à l'aide de microcapillaires en verre avec filament (réf. GC100F-15, Phymep) et d'un microinjecteur électronique (FemtoJet, Eppendorf). Pendant cette manipulation les larves sont anesthésiées dans de l'Eugenol à 0,0075 %

Imagerie :

L'imagerie dynamique en microscopie à deux photons est effectuée 24h après l'injection : au 4 dpf. Les larves sont à nouveau anesthésiées dans de l'Eugenol à 0,0075 % et placées dans des puits résultant d'empreintes faites dans une couche d'agar. Elles sont alors maintenues immobiles par un coussin d'agarose mou à 0.5 % (*Low Melting agarose*). Avant la gélification de l'agarose, les poissons sont placés en vue dorsale afin de pouvoir imager la zone ciblée du toit optique.

Annexe I

Protocole de marquage des axones et des corps cellulaires du toit optique par anticorps contre la tubuline acétylée et DAPI respectivement

Étape 1 : Fixation

La larve est fixée dans du formaldéhyde 4 % puis laissée une nuit à 4 °C dans du PBS+Tween 0.1 %

Étape 2 : Perméabilisation

PBS + CaCl₂ 0.5 μ M + collagénase (sigma C9891) 1 mg/ml : 1 h à température ambiante (RT) PBS + Tween 0.1 % : 3 $\times$ 5 min à RT PBS + Triton 0.2 % : 1 h à RT

Étape 3 : “Blocking”

PBS + Triton 0.2 % + DMSO 10 % + Horse serum 10 % + sodium azide 0,01 % : 5h à 37 °C

Étape 4 : Marquage par l’anticorps primaire

Mouse anti-acetylated tubulin (sigma T7451) 1 :500 dilué dans du PBS + Triton 0.2 % + DMSO 10 % + Horse serum 10 % + sodium azide 0.01 % Temps de pause : une nuit à 37 °C

Étape 5 : Rinçage

PBS + Triton 0.2 % + DMSO 10 % : 6 fois à RT

Étape 6 : Marquage par l’anticorps secondaire

Alexa 546 anti-mouse (molecular probes A11005) 1 :1000 dilué dans du PBS + Triton 0.2 % + DMSO 10 % + Horse serum 10 % + sodium azide 0.01 % + DAPI 5 μ g/ml Temps de pause : une nuit à 37 °C

Étape 7 : Rinçages

PBS + Tween 0.1 %

Annexe J

Génotypage de l'allèle mutant *kifaa*

Protocole

Étape 1 : L'ADN génomique des larves est extrait par digestion en utilisant l'enzyme Proteinase K (on parle de "digestion Pk").

Étape 2 : Le génotypage utilise l'amorce gauche 5' (*forward*) GTTCACAGATTGT-GATGTCTGTG et l'amorce droite 3' (*reverse*) TGGAGGATGGAGAAATGATGACA. L'ADN est amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). On obtient alors dans le cas sauvage un amplicon de 400 paires de bases (pb).

Étape 3 : L'amplicon est digéré par l'enzyme NciI. L'allèle sauvage engendre deux fragments de 240 pb et 160 pb tandis que l'allèle mutant *kifaa* n'est pas digéré et engendre un fragment de 387 bp ou de 390 bp.

Résultats du génotypage

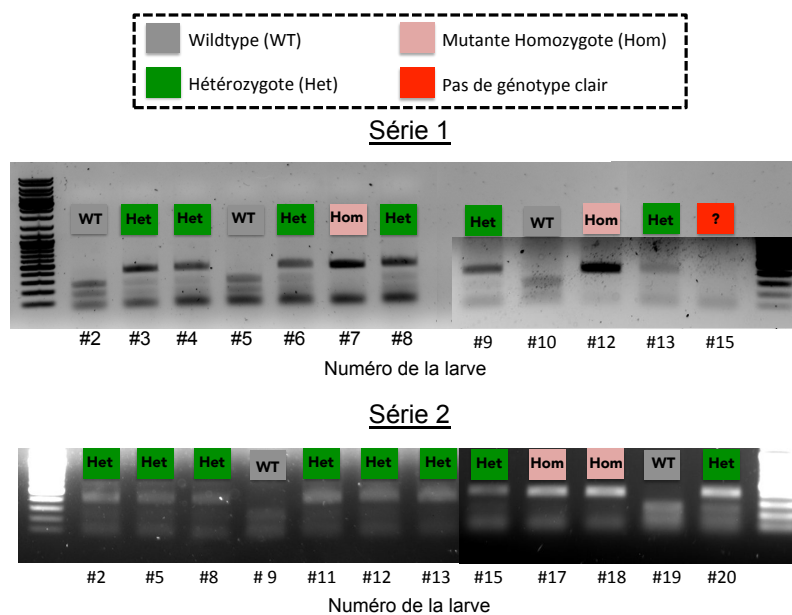


FIGURE J.1 – Génotypage de l’allèle mutant *kif5a* : résultats des gels. Génotypage de la série 1 réalisé par Christelle LANGEVIN (IERP/INRAE Jouy). Génotypage de la série 2 réalisé par C. LANGEVIN et Valérie BERCIER chercheuse post-doctorante au *VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research* (Louvain, Belgique), anciennement doctorante dans l’équipe de Filippo DEL BENE qui a participé aux études sur les mutants *kif5a*.

Annexe K

Génotypage de l'allèle mutant *dync1h1*^{mw20}

Protocole

(*cnb*)/*dync1h1* mutant identification *RasI* cut mut

Fish : mw20

name	seq
Primer(fwd): <i>cnb</i> snp F2 (TA160)	CACGAGGAGCTCTACAAGTGG
Primer(Rev): <i>cnb</i> snp R2 (TA161)	GAACAGGTTGGCGTAGTGGT

Fin clip and DNA prep:

1. Fin clip in 50µL of 100% methanol
2. Store at -20°C for 1hrs
3. Thaw the methanol and dry 10 min at 72°
4. Add 50µL of proteinase K (d=1/10 in TE buffer)
5. Incubate 55°C of 4hrs to o.n
6. Heat 95°C for 10min
7. Add 50µL of TE buffer
6. Store on ice or frozen.

PCR reaction:		
	1X (µl)	22 X <-change this number only
10x buffer	2	44
dNTP 10 mM each	0.4	9
primer 1 10µM	0.3	7
primer 2 10µM	0.3	7
Taq (GenScript)	0.1	2
H2O	15.9	350
diluted DNA	1	
Vt	20	

Aliquot 20ul mix into tube with 1ul of diluted DNA

PCR Profile: "geno mw20"		
Step	Temp	Time
1		94 1 min
2		94 25 sec
3		60 35 sec
4		72 45 sec
5	go step 2 35x	
6	4°C soak	
7	end	

RsaI digestion: @ 37°C		
	1X (μl)	22 X
ddH ₂ O	16.5	363
10X NEBuffer 1	3	66
RsaI	0.5	11
Vt=	20	

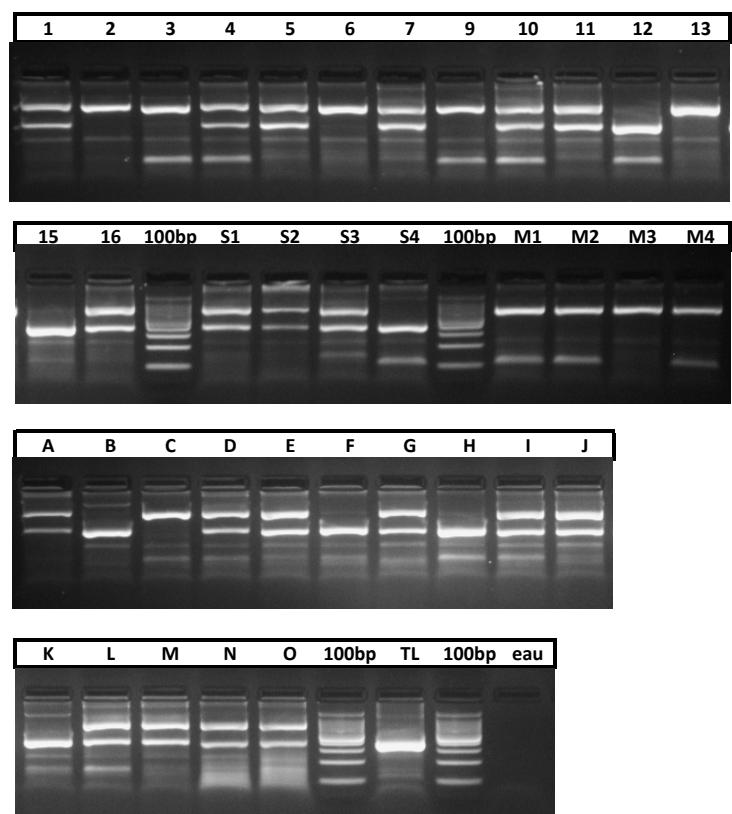
1. Add 20 μl of above mix into each well of PCR reaction.
2. Seal plate well and incubate 4hrs (min.) to O/N at 37°C

1. Run products out on 2% agarose TBE gel.

2. RsaI cuts the mutant band : if 350bp =>Wt and mutant if 750+350 bp

3. Not a great enzyme must digest overnight

FIGURE K.1 – Protocole de Karine DUROURE, équipe Filippo DEL BENE, Institut de la Vision, Paris



série 14.01	1	HET
	2	HM
	3	HM
	4	HET
	5	HET
	6	HM
	7	HET
	9	HM
	10	HET
	11	HET
	12	WT
	13	HM
	15	WT
	16	HET

série 28.01	A	HET
	B	WT
	C	HM
	D	HET
	E	HET
	F	WT
	G	HET
	H	WT
	I	HT
	J	HET
	K	WT
	L	HET
	M	HET
	N	HET
	O	HET

série 30.01	S1	HET
	S2	HET
	S3	HET
	S4	WT
	M1	HM
	M2	HM
	M3	HM
	M4	HM

HET	750+350 bp
WT	350 bp
HM	750 bp

TL WT contrôle OK
eau rien contrôle OK

FIGURE K.2 – Génotypage de l'allèle mutant *dync1h1^{mw20}* : résultats des gels. Génotypages réalisés par Karine DUROURE, technicienne dans l'équipe de Filippo DEL BENE.

Table des figures

1.1	Le cytosquelette neuronal révélé par une technique de microscopie nommée <i>Quick-freeze deep-etch electron microscopy</i> ¹ (QFDE). (a) Vue à faible grossissement de faisceaux de microtubules (MTs) et de neurofilaments (NFs) alignés à l'intérieur d'un neurite. (b) et (c) Zoom sur des vésicules se déplaçant le long des MTs. On constate que la structure du cytosquelette se déforme légèrement pour permettre la circulation des divers organites. (d) Structure du cytosquelette à l'intérieur d'une épine post-synaptique. Le réseau de filaments d'actine est indiqué par les flèches jaunes. Barres d'échelle : 100 nm. Adaptée de (Hirokawa et al., 2010) .	17
1.2	Structures de différents moteurs moléculaires se mouvant sur les microtubules. En haut : protéines de la famille des kinésines. La kinésine 1 est un dimère composé de deux KIF5 et de deux chaînes légères (<i>Kinesin light chain</i> , KLC). KIF1A est un monomère. KIF3A, KIF3B et KAP3 forment un tétramère. En bas : dynéine cytoplasmique. Les dynéines cytoplasmiques sont constituées de chaînes lourdes (HC), de chaînes intermédiaires légères (LIC), de chaînes intermédiaires (IC) et de chaînes légères (LC8). Pour transporter des cargos le long des microtubules, la dynéine cytoplasmique se lie au complexe de dynactine. Adaptée de (Hirokawa et al., 2010).	18
1.3	Organisation du transport axonal. Zoom sur une partie de l'axone où l'on constate que les microtubules ont une polarité uniforme avec leur extrémité "+" orientée vers la région distale. Deux kinésines transportant leur vésicule dans le sens antérograde sont représentées. Le complexe dynéine/dynactine transportant un organelle est également schématisé. Figure extraite de (Guedes-Dias and Holzbaur, 2019).	20
1.4	Interaction entre la protéine TAU et les moteurs kinésines. La présence de TAU non phosphorylée sur le MT inhibe le transport de la kinésine. En revanche, la phosphorylation de TAU engendre la libération du MT et facilite le déplacement de la kinésine. Adaptée de (Encalada and Goldstein, 2014).	21

1.5	Trois mécanismes possibles de régulation du transport bidirectionnel. (a) Coordination : les kinésines et dynéines sont liées à la même vésicule mais seul un type est actif. (b) Modèle de “tir à la corde” montrant la liaison et l’engagement simultanés de moteurs kinésines et dynéines tirant le cargo dans des directions opposées. L’équipe de moteurs générant des forces plus élevées impose la direction du mouvement. (c) Modèle d’association/dissociation : un seul type de moteur est lié à la vésicule. Dans les panneaux (a) et (c) la kinésine inactive est dessinée dans une conformation hypothétique pliée. Adaptée de (Encalada and Goldstein, 2014).	22
1.6	Tableau non exhaustif de mutations trouvées chez des patients atteints de divers troubles neurologiques et affectant des protéines impliquées dans le transport axonal. Dans le cadre de nos travaux (présentés dans le chapitre 4), nous nous sommes intéressés aux conséquences sur le transport axonal d’une mutation au niveau du gène KIF5A (encadré en rouge). SLA : sclérose latérale amyotrophique ; BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; CMT2, maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 ; GSK3 β , glycogène synthase kinase 3 β ; NGF : facteur de croissance des nerfs ; PARK : protéine de la maladie de Parkinson ; PINK1 : kinase 1 putative induite par le gène PTEN ; SPG : paraplégie spastique ; TBC1D15 : membre 15 de la famille du domaine protéique TBC1 ; ZFYVE : domaine protéique FYVE du doigt de zinc. *Le sous-type de la maladie est précisé entre parenthèses après le nom du gène. Adaptée de (Millecamps and Julien, 2013).	35
1.7	Mouvement d’une bille d’or attachée à la tête d’une myosine. (a) Schéma de l’échantillon étudié : une myosine à laquelle est attachée une bille d’or. (b) Évolution de la position de la bille en fonction du temps. On constate que la myosine se déplace par pas de 72 nm. (c) Agrandissements de la courbe (b), qui mettent en évidence le détail des pas et montrent qu’ils s’effectuent en deux temps. Adaptée de (Dunn and Spudich, 2007).	36
1.8	Suivi de moteurs kinésines individuels fonctionnalisés avec des QDots introduits par pinocytose dans une cellule HeLa. (A) Image en champ clair d’une cellule HeLa cultivée sur une lamelle de verre. (B) Image de fluorescence obtenue par superposition des 600 images consécutives de la séquence dynamique acquise (résolution temporelle : 230 ms). Les trajectoires linéaires (indiquées par des flèches pleines) représentent des mouvements dirigés de moteurs individuels. Les trajectoires des QDots indiquées par des pointes de flèches vides correspondent à des mouvements de diffusion aléatoire. Adaptée de (Courty et al., 2006).	36

- 1.9 Suivi du transport *in vivo* de mitochondries individuelles dans la larve de Zf. (a) Image du Zf obtenue par microscopie optique en transmission et zoom sur la queue avec un neurone sensoriel de Rohon-Beard typiquement marqué par une protéine fluorescente ciblant la membrane (en jaune). Barre d'échelle : 200 μm . (b) Représentation d'une trajectoire antérograde (en haut) et rétrograde (en bas). Le codage couleur indique les phases de mouvement rapide (vert - antérograde ; bleu - rétrograde), de mouvement lent (jaune - antérograde ; orange - rétrograde) et les phases stationnaires (rouge). (c) Kymographes des trajectoires présentées dans le panneau (b). Adaptée de (Wehnekamp et al., 2019). 37
- 1.10 Expérience de mesure du transport axonal dans le cerveau d'une souris, par microscopie à balayage deux-photons. (A) Schéma du fluorophore NPY-Venus utilisé pour marquer les vésicules à centre dense (DCVs). (B) Image TEM d'une DCV avec un nombre arbitraire de molécules NPY-Venus (en vert) schématisées à l'intérieur afin d'illustrer la stratégie de marquage. Barre d'échelle : 20 nm. (C) La forme ovale rouge représente le volume d'excitation deux-photons. Les lignes illustrent un axone positionné dans le volume focal. Les petits points bleus indiquent la fluorescence du fond. (D) Situation illustrant la présence de deux axones et de plusieurs DCVs dans un seul volume focal. (E) Injection du vecteur viral permettant l'expression des colorants NPY-Venus (vert) et de mCherry (rouge) dans la zone du thalamus médiodorsal droit. (F) Fenêtre chronique. (G) Préparation pour l'imagerie en éveil. La souris est fixée par la couronne, mais peut se déplacer sur un disque tournant librement. (H) Balayage en mosaïque du site d'injection thalamique et du signal émanant des projections axonales de la zone. Barre d'échelle : 1 mm. Le rectangle jaune représente la région d'intérêt imagée dans le cortex moteur primaire, 30-80 μm sous la surface de la fenêtre optique. (I) Exemple d'image *in vivo* obtenue par microscopie deux-photons, à 40 μm sous la fenêtre. Les axones sont marqués par l'expression de mCherry (rouge) et les DCVs par NPY-Venus (vert). Les DCVs présents dans les axones marqués apparaissent en jaune. Barre d'échelle : 5 μm . (J) Vue agrandie de la région encadrée dans (I). Barre d'échelle : 10 μm . Adaptée de (Knabbe et al., 2018). 38
- 2.1 Evolution de la longueur d'onde d'émission de boîtes quantiques en fonction de leur taille. Adaptée de (Berends and De Mello Donega, 2017). 44

2.2	Utilisation de QDs fonctionnalisés avec le facteur de croissance nerveuse NGF pour mesurer le transport axonal de ce facteur dans des neurones en culture primaire. (a) Schéma d'un QD-NGF lié à un récepteur TrkA. (b) Schéma de la chambre de culture compartimentalisée en trois zones : DA, <i>distal axon</i> ; PA, <i>proximal axon</i> ; CB, <i>cell body</i> . Pour étudier la propagation du signal NGF, l'ajout de QD-NGF se fait dans le compartiment DA. (c) Ligne du haut, images représentatives de la fluorescence rouge des QD-NGF observée dans chaque compartiment 2 h après l'ajout de 4 nM de QD-NGF dans le compartiment DA. En bas, les images de fluorescence sont superposées avec les images champs clairs correspondantes. Adaptée de (Cui et al., 2007).	45
2.3	Utilisation de QDs comme traceurs des déplacements des récepteurs de glycine GlyR dans des neurones en culture. (a) Complexes QD-GlyR (en rouge) détectés principalement sur les dendrites identifiées grâce à un marquage des protéines associées aux microtubules MAP2 (en vert). (b) Evolution du déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps, calculé à partir d'une séquence d'images décrivant les déplacements d'un QD situé dans une partie extrasynaptique car l'allure du MSD indique une diffusion brownienne dirigée (cf section 3.3.2), en accord avec un déplacement latéral non contraint. (c) Évolution du MSD en fonction du temps montrant un plateau associé à un confinement sans doute révélateur du fait que le complexe QD-GlyR est situé à proximité d'un bouton synaptique. Adaptée de (Dahan et al., 2003).	46
2.4	Mise en évidence du phénomène de clignotement de l'émission d'un QD unique utilisé pour le suivi de biomolécules. (a) En haut, visualisation des positions d'un QD-NGF individuel (contenu dans un endosome en mouvement) toutes les 100 ms lors de son déplacement pendant environ 4.5 s. En bas, trace de l'intensité de fluorescence en fonction du temps de ce QD pendant la même période, montrant la perte du signal pendant 0.7 s due au scintillement. Adaptée de (Cui et al., 2007) (b) Suivi d'un QD-GlyR individuel (en vert) au voisinage de boutons synaptiques marqués en rouge. Images (A1)-(A8) extraites d'une séquence acquise à la cadence de 13 images par seconde. On constate une interruption du signal du QD sur l'image (A7). Barre d'échelle : 2 μ m. Adaptée de (Dahan et al., 2003).	47
2.5	Fluorescence du diamant dans le rouge lointain. (a) Centre coloré NV du diamant. Adaptée de (Neumann et al., 2009). (b) Comparaison du spectre de fluorescence des centres NV du diamant avec la fenêtre de transparence des tissus biologiques. Adaptée de (Vaijayanthimala et al., 2012).	48

2.6	Mesure du transport intraneuronal dans des cultures de neurones hippocampaux par suivi de nanodiamants fluorescents. (a) Superposition du signal des FNDs (en rouge) se trouvant dans les branches de neurones avec une image en contraste interférentiel de la zone étudiée. Les flèches jaunes pointent les FNDs en mouvement dans les dendrites de neurones. Barre d'échelle : $5\ \mu\text{m}$ (b) Évolution de la position curviligne en fonction du temps pour les particules 1 et 2 pointées dans l'image de gauche. Les flèches vertes indiquent les phases de mouvement et les flèches rouges, les phases d'arrêt. Barres d'échelles : $15\ \mu\text{m}$ et $10\ \text{s}$. Adaptée de (Haziza et al., 2017).	50
2.7	Influence du rapport d'aspect de nanobatonnets d'or sur leur spectre d'absorption. (a) Spectre d'absorption de AuNRs en solution aqueuse. En particulier, on observe deux fréquences de résonance caractéristiques associées à des oscillations de charges se produisant selon les axes transverse et longitudinal du bâtonnet, comme le montrent les schémas insérés. (b) À gauche, image TEM de AuNRs de rapports d'aspect différents. À droite, spectres d'absorption des AuNRs correspondant aux images TEM. Adaptée de (Li et al., 2013).	50
2.8	Représentation de la génération de seconde harmonique (SHG). (a) Cristal caractérisé par son tenseur de susceptibilité $\chi^{(2)}$, excité par une onde à la pulsation ω et générant une onde à la pulsation 2ω . (b) Schéma de transition énergétique de la SHG.	53
2.9	Forme des tenseurs de susceptibilité non linéaire des matériaux utilisés durant cette thèse. Extraits de (Rogov et al., 2016) pour le SiC et (Shea, 2004) pour le BTO et le KTP.	54
2.10	Comparaison des processus optiques utilisés en microscopie à un photon et multiphotonique. (a) Schéma des transitions énergétiques de chaque processus. (b) Mise en évidence du sectionnement optique intrinsèque de la microscopie à deux photons, adaptée de (Zipfel et al., 2003). Localisation du faisceau excitateur pour une excitation continue à un photon à la longueur d'onde de $488\ \text{nm}$ (à gauche) et pour une excitation impulsionnelle à deux photons de longueur d'onde $960\ \text{nm}$ (à droite).	57
2.11	Détection en profondeur de nanocristaux donnant une réponse SHG. À gauche, schéma de l'échantillon imagé. À droite, détection des nanotraceurs (appelés génériquement SHRIMPS, acronyme anglais pour <i>Second Harmonic Radiation IMaging ProbeS</i>), ici constitués de nanocristaux de BaTiO_3 de taille $\approx 300\ \text{nm}$, sous une épaisseur de $120\ \mu\text{m}$ d'un tissu de queue de souris. Extrait de (Grange et al., 2011).	59
2.12	Différentes sections d'un balayage 3D (laser impulsionnel à la longueur d'onde de $800\ \text{nm}$) d'une cellule HeLa (en rouge, marquage calcéïne) ayant internalisé plusieurs nanocristaux de BaTiO_3 émettant un signal SHG (en vert). Extrait de (Hsieh et al., 2009).	60

2.13	Comparaison des signaux de SHG et de fluorescence à deux photons sous une excitation laser à 820 nm pour deux types de nanoparticules. (a) À gauche, intensité du signal SHG d'une nanoparticule de BaTiO ₃ en fonction du temps (intervalle de temps entre 2 scans : 50 ms) ; à droite, évolution de l'intensité en fonction de la puissance d'excitation. (b) À gauche, signal de fluorescence de QDs de CdSe/ZnS en fonction du temps ; à droite, mise en évidence de la saturation de fluorescence des QDs. Adaptée de (Pantazis et al., 2010)	61
2.14	Mesure de la taille des nanoKTP synthétisés par Gaëlle ALLARD et utilisés dans les expériences de mesure de transport dans des cultures primaires de neurones (2.3.1.2). La mesure a été réalisée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) avec l'appareil VASCO Flex TM Analyzer et le logiciel d'analyse NanoQ (v2.6.2.0). On représente ici la distribution de taille en nombre de particules (après correction de la diffusion de Rayleigh et Mie) extrapolée de la fonction d'autocorrélation en intensité avec l'algorithme SBL (<i>Sparse Bayesian Learning</i>) implémenté dans le logiciel.	62
2.15	Schéma optique du microscope à deux-photons (plateforme PIMPA, Orsay + éléments d'adaptation spécifiques à nos expériences) que nous avons utilisé pour la mesure du transport intraneuronal . En bas à droite, un zoom sur l'échantillon contenu dans la chambre thermostatée est représenté. MD : miroir dichroïque.	66
2.16	Suivi du signal SHG de nanocristaux de KTP (taille ≈ 100 nm) internalisés dans des neurones corticaux de souris en culture. L'étude est réalisée au quatorzième jour de développement des cultures (DIV 14). (a) Un neurone (observé en transmission), sur lequel 3 trajectoires représentatives de nano-KTP ont été superposées. (b) Première image SHG de la séquence enregistrée. Acquisitions sur le microscope biphoton de la plateforme France Life Imaging PIMPA (Orsay), $\lambda_{\text{exc}} = 896$ nm, puissance ≈ 10 mW, filtre passe-bande de détection de la SHG : 448/20 nm. Taille d'un pixel de l'image : 252 nm. Cadence d'acquisition : 2.3 images/s, qui a pu être augmentée par la suite à 20 images/s avec d'autres nanocristaux (<i>cf</i> Fig.2.17).	67
2.17	Trajectoires typiques de nano-KTP internalisés dans des neurones corticaux de souris en culture (DIV14) enregistrées sur la Plateforme PIMPA, à la cadence de 20 images/seconde. À gauche, 90 trajectoires ont été regroupées artificiellement dans un seul champ ; c'est en réalité l'accumulation d'une dizaine de champs d'observation différents. À droite, on observe un zoom sur quelques trajectoires reconstruites par l'algorithme développé dans notre équipe puis segmentées en phases de mouvement ou de pause : en bleu, les phases de "GO", et en rouge, les phases de "STOP" (voir chapitre 3).	68

2.18	Comparaison des paramètres de transport intraneuronal <i>in vitro</i> obtenus avec les nanoparticules de KTP (nano-KTP, en vert) et avec les nanodiamants fluorescents (FND, en rose) mesurés au même stade de développement DIV14. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney est effectué en prenant en compte les paramètres de 88 trajectoires de KTP issues de 4 lamelles de culture différentes et 85 trajectoires de FND issues d'une lamelle de culture représentative des paramètres habituellement mesurés. À gauche, on constate que la vitesse curviligne mesurée est la même pour les deux nano-traceurs ($p = 0,38$). À droite, on observe la même chose pour le paramètre de fréquence des pauses ($p = 0,53$); ns : non significatif.	70
2.19	Internalisation de nanoparticules dans des cellules : schéma récapitulant les différents paramètres qui influencent l'efficacité d'internalisation. Extrait de (Zhang et al., 2015).	70
2.20	Dépendance du signal SHG d'un nano-KTP en fonction de son orientation par rapport à l'objectif de microscope. (a) Schéma représentant qualitativement le rayonnement SHG du nano-KTP, montrant son anisotropie : chaque nanocristal peut être considéré en première approximation comme un dipôle du point de vue de sa réponse optique non-linéaire. On représente également en rouge le faisceau d'excitation polarisé circulairement. À droite, les configurations "extrêmes" sont représentées : celle où le dipôle est orienté perpendiculairement à l'axe de l'objectif de microscope (intensité max) et celle où le dipôle est parallèle à ce même axe (intensité nulle). (b) Schéma d'un nano-KTP internalisé dans une vésicule (orange) ayant un mouvement de rotation autour du microtubule : les fluctuations d'intensité permettent de remonter à l'angle polaire θ entre le nanocristal et l'axe de collection du signal.	73
2.21	Tableau récapitulatif des propriétés physico-chimiques et optiques non-linéaires des trois nanocristaux utilisés. Coefficients non linéaires extraits de (Rogov et al., 2016) pour les SiC et (Shea, 2004) pour les BTO et KTP.	74
2.22	Schéma des étapes d'internalisation par endocytose d'une nanoparticule en contact avec la membrane plasmique d'une cellule. Le coefficient η nommé "wrapping" correspond au degré d'"enrobage" de la particule par la membrane. Extrait de la référence (Zhao and Stenzel, 2018).	76
2.23	Fluctuations d'intensité du signal SHG d'un nanocristal, pendant les deux phases du déplacement de la vésicule qui le contient. Chaque trajectoire est découpée en phases de mouvement : les GO (en vert) et les STOP (en rouge). La moyenne de la variance de l'intensité de toutes les phases de GO est calculée; de même pour les phases de STOP. On constate sur le graphique encadré que la variance de l'intensité des phases de STOP est significativement inférieure à celle des phases de GO. On représente aussi les distributions cumulatives qui montrent de la même manière un décalage de la distribution vers les faibles valeurs de variance pour les phases de STOP. Le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney est effectué.	78

3.1	Réponse optique obtenue pour une excitation à deux photons. (a) Profil axial et latéral du faisceau d'excitation $I(x, y, z)$ et de son carré $I^2(x, y, z)$, dont la réponse à deux photons est proportionnelle. (b) Profil axial du faisceau d'excitation $I(0, 0, z)$ (en pointillés rouges) et du profil non linéaire induit $I^2(0, 0, z)$ (en ligne continue rouge) avec sa courbe d'ajustement gaussien (pointillés noirs). (c) Equation permettant de calculer la demi-largeur à $1/e$ du profil axial (ω_z) et latéral (ω_{xy}) de la PSF en microscopie à deux photons, où n est l'indice de réfraction du milieu (ici proche de celui de l'eau) et NA, l'ouverture numérique. Adaptée de la référence (Zipfel et al., 2003)	86
3.2	Traitement par ondelettes d'une image comportant des spots associés à la fluorescence d'émetteurs individuels, dans des situations où l'image de départ est de plus en plus bruitée (de haut en bas). (a) Image brute à analyser ; les émetteurs que l'on souhaite repérer sont encadrés en vert. (b) Première et deuxième composantes de la décomposition en ondelettes. (c) Application d'un seuil d'intensité sur la deuxième composante de la décomposition en ondelettes afin d'isoler les spots d'intérêts. Adapté de (Izeddin et al., 2012).	88
3.3	Localisation du maximum de la PSF par ajustement gaussien. (a) Ajustement gaussien (pointillés rouges) de la PSF (ligne continue bleue). On constate qu'une gaussienne $\exp(-r^2/(2s^2))$ de déviation standard s est une très bonne approximation de la PSF avec pour règle pratique de correspondance $s \approx \rho_A/3$. (b) Superlocalisation de la PSF grâce à la détection du maximum de l'ajustement gaussien, figure adaptée du site internet PALM Zeiss.	90
3.4	Définition de la précision de localisation expérimentale et de la justesse de localisation . Le cercle en pointillés rouges met en évidence la précision de localisation $\sigma_{xy} = \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}$. L'écart Δ_{xy} correspond à la justesse de localisation. Adapté de (Deschout et al., 2014)	93
3.5	Influence de la précision de localisation sur la reconstruction d'une trajectoire simulée. (a) Faible incertitude de localisation menant à une bonne reconstruction de la trajectoire. (b) Même trajectoire reconstruite en considérant une plus grande incertitude de localisation.	94
3.6	Evolution de l'incertitude de localisation σ_{xy} expérimentale (en nm) pour des FNDs déposés sur une lamelle de microscope en fonction du signal détecté (en kphotons/s, pour une excitation à un photon à la longueur d'onde de 561 nm). Courbe guide en pointillés rouges.	98
3.7	Estimation du facteur de conversion $K_{\text{niv. gris-photons}}$ entre les niveaux de gris et le nombre de photons d'une image acquise par le détecteur hybride (HyD NDD, Leica) en mode "Standard". (a) Image du signal SHG de nano-KTP collecté par le détecteur et zoom sur une nanoparticule. (b) Histogramme de la ROI encerclée sur le zoom. Nous remercions Clément LAIGLE, ingénieur de la société Leica qui nous a aidé à convertir le signal des détecteurs en termes de nombre de photons.	101

3.8	Evolution de l'incertitude de localisation expérimentale (en nm) de nano-KTP déposés sur une lamelle de microscope, en fonction du signal SHG (en Mcoups/s, à la longueur d'onde d'excitation de 896 nm et à la puissance de 10 mW en sortie du laser d'excitation) pour deux tailles de pixel : 252 nm en bleu et 80 nm en rouge.	104
3.9	Evolution de l'incertitude de localisation des nano-KTP (en nm) dans le Zf en fonction du signal de la particule (en Mcoups/s). Excitation laser à la longueur d'onde de 1040 nm et à la puissance d'environ 10 mW en sortie du laser impulsionnel.	104
3.10	Influence des arguments <code>diameter</code> et <code>minmass</code> de la fonction <code>batch</code> dans la détection des nano-KTP au sein des séquences d'images.	108
3.11	Mise en évidence d'une gigue le long d'une trajectoire typique de nano-KTP. a) Trajectoire brute reconstruite. b) Evolution des coordonnées x et y en fonction du temps t . La courbe rouge est le résultat du filtrage linéaire gaussien appliqué.	113
3.12	Impact du lissage gaussien sur la segmentation d'une trajectoire de nano-KTP. (a) Exemple de trajectoire de nano-KTP reconstruite avec et sans filtrage gaussien. Les croix noires correspondent à la trajectoire brute reconstruite par l'algorithme Python et la courbe bleue est la trajectoire obtenue après filtrage gaussien des coordonnées (x, y) (b) Segmentation de la trajectoire lissée en phases de GO (en bleu) et STOP (en rouge) de la même trajectoire.	116
3.13	Comparaison du résultat de la segmentation d'une trajectoire de nano-KTP en phases de GO (en bleue) et STOP (en rouge) avec utilisation de l'outil de lissage gaussien à gauche et sans ce filtrage à droite.	116
3.14	Calcul de MSD dans le cadre de l'étude de dynamique de molécules. (a) Différents types de trajectoires de nanoparticule d'or attachées à la protéine membranaire E-cadherin. (b) Allure du MSD en fonction du temps pour les trois trajectoires caractérisées par les dynamiques (i) de diffusion Brownienne pure, (ii) de diffusion dirigée, (iii) de diffusion contrainte. Adapté de (Kusumi et al., 1993).	119
3.15	Application d'un critère de seuillage du MSD calculé à partir de trajectoires de nano-KTP suivis dans le cerveau de larve de Zf. (a) Intégralité des trajectoires reconstruites par l'algorithme Python. (b) Trajectoires sélectionnées par le tri du critère MSD. Seules les trajectoires dont le maximum du MSD est supérieur à 250 sont conservées. La valeur du seuil est choisie expérimentalement de manière à supprimer les trajectoires non dirigées.	120
3.16	Construction d'un kymographe à partir du film d'un émetteur fluorescent en mouvement dans l'axone d'un neurone. (1) Image de l'émetteur fluorescent suivi (pointé par une flèche blanche) à différents instants t . (2) Projection d'intensité maximale selon l'axe temporel. (3) Reconstitution de l'axone du neurone dans lequel la mesure du déplacement de l'émetteur est effectuée. (4) Construction du kymographe : évolution de la position curviligne de l'émetteur en fonction du temps. Adapté de (Zhang et al., 2011).	124

3.17	Comparaison du découpage de trajectoires obtenu par une méthode de type HMM et par notre méthode heuristique. (a) Ensemble de trajectoires segmentées par HMM. (b) Tableau de contingence des deux méthodes. Figures adaptées des travaux de Ignacio MADRID.	126
3.18	Méthode heuristique de segmentation et classification des phases de mouvement dans une trajectoire. (a) Rapport de confinement dans le cas d'une phase de GO et d'une phase de STOP. (b) Rapport de confinement en chaque point d'une trajectoire et segmentation engendrée par la mise en place d'un seuil, figure tirée de (Haziza et al., 2017).	128
4.1	Enregistrement par microscopie deux-photons du signal SHG de nano-KTP injectés dans le cerveau de la souris à une profondeur d'environ 100 μm sous la surface ; expériences réalisées en collaboration avec Brice BATHELLIER dans le laboratoire NeuroPSI à Gif-sur-Yvette. (a) Photo de la souris anesthésiée et positionnée sous le microscope deux-photons (b) Signal SHG de nanoKTP détectés à une profondeur de 85 μm sous la dure-mère, à la cadence de 30 images/s. Filtre de détection : 515/25 nm.	136
4.2	Vue latérale et dorsale du cerveau d'un poisson-zèbre adulte. Les traits pointillés délimitent de gauche à droite le télencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Bo : Bulbe olfactif ; Tel : Télencéphale ; TO : Toit optique ; Ce : Cervelet ; Me : Moelle épinière. Adaptée de l'atlas de neurotomie de (Wullimann et al., 1996).	139
4.3	Organisation des neurones périventriculaires (PVNs) dans le toit optique (TO). Les corps cellulaires des PVNs sont dans la zone périventriculaire grise (PLV) et les axones sont projetés dans le neuropile. (a) Schéma du TO adapté de (Förster et al., 2017). (b) Image d'un PVN marqué par un colorant acquise par nos soins sur la plateforme IERP -EMERG'IN de l'INRAE (Jouy-en-Josas). Une solution aqueuse d'un colorant carbo-cyanine lipophile (DiI) ciblant la membrane des cellules neuronales a été injectée directement dans le toit optique au troisième jour du développement de la larve. Le colorant diffuse dans l'organisme pendant 24h et l'imagerie est effectuée au quatrième jour de développement. On observe très distinctement un neurone du PVL dont l'axone se projette vers le neuropile.	141
4.4	Les inter-neurones périventriculaires bistratifiés (bsPVIN). (a) Image d'un bsPVIN à 4 dpf exprimant à la fois DsRed (rouge) et Syp-GFP (vert) ; projection maximale dans la direction z d'une séquence d'images acquises par microscopie confocale. Barre d'échelle : 20 μm (b) Représentation schématique de la répartition des corps cellulaires bsPVIN dans la couche PVL (<i>periventricular layer</i>). La cellule tracée en rouge indique l'emplacement relatif et l'échelle du neurone représenté en (a). Adaptée de (Robles et al., 2011).	142

4.5	Activité électrique spontanée des PVN. (A) schéma du toit optique illustrant la forte densité des corps cellulaires des PVN dans la couche périventriculaire (SPV, également nommée PVL), et la distribution plus dispersée et moins dense des autres types de cellules, y compris les interneurons superficiels (SIN) dans le neuropile. Les exemples de morphologies des PVN et des SIN sont indiqués en bleu et en rouge. En jaune et vert, ensembles de neurones ayant une activité électrique spontanée simultanée, telle qu'observée par (Romano et al., 2015) dans (B), grâce au marqueur GCaMP3, et indiqué en jaune. Figure extraite de (Orger, 2016)	143
4.6	Image d'immunofluorescence du toit optique d'une larve à 4 dpf. En rouge, marquage des axones par un anticorps dirigé contre la tubuline acétylée. En bleu, marquage des corps cellulaires (par DAPI). En vert, signal SHG des nano-KTP ayant été injectés dans le toit optique. La flèche blanche indique un axone le long duquel on retrouve des nano-KTP alignés probablement à l'intérieur de celui-ci. Barre d'échelle : 10 μ m. Marquages et acquisitions réalisés par Maxence FRETAUD.	145
4.7	Nanoparticules de KTP utilisées pour les expériences de mesure de transport dans le cerveau de la larve de Zf. Cristaux synthétisés par l'équipe de Thierry GACOIN, chercheur au laboratoire de Physique de la Matière Condensée de l'École Polytechnique. (a) Image TEM (CentraleSupélec, Gif-sur-Yvette). (b) Distribution des tailles des nanoparticules mesurées à partir des images TEM du panneau (a).	147
4.8	Porte échantillon utilisé pour l'imagerie du transport intraneuronal dans des larves de Zf. Huit puits moulés dans de l'agarose permettent d'immobiliser les larves. (a) Vue de côté avec un zoom sur une photo de larve prise à 4 dpf. (b) Vue de dessus avec un zoom sur le schéma d'une larve placée en vue dorsale, avec le toit optique (TO) accessible.	148
4.9	Suivi du signal SHG de nanocristaux de KTP (taille ≈ 100 nm) dans le toit optique d'une larve de poisson-zèbre dont l'œil est situé à gauche de l'image (œil droit de l'animal). Acquisition sur le microscope biphoton de la plateforme EMERG'IN (INRAE, Jouy). Longueur d'onde d'excitation : 1040 nm ; puissance laser ≈ 10 mW. Cadence d'acquisition : 20 images/s. (a) Image extraite d'un film. (b) Projection d'intensité maximale effectuée sur toute la séquence du film d'une durée de 2 min. La direction des axones des PVNs est alors bien discernable.	149
4.10	Exemple de distribution de points (x, y) et valeurs des coefficients de Bravais-Pearson associés. Adaptée de Wikipedia : <i>Correlation and dependence</i>	150
4.11	Reconstruction de trajectoires de nano-KTP internalisés dans le toit optique d'une larve de Zf. Ces trajectoires sont issues de la séquence d'images illustrée sur la figure 4.9. Les valeurs de R et E sont indiquées à côté des trajectoires. En rouge, ce sont les trajectoires éliminées par les critères associés à la linéarité des trajectoires. En vert, ce sont celles sélectionnées et permettant d'extraire les paramètres du transport axonal dans les PVNs.	151

- 4.12 Effet du nocodazole sur le transport axonal *in vivo* dans les axones des neurones périventriculaires du toit optique de larves de Zf. Le nocodazole est ajouté dans le bain, avant imagerie (30 min d'exposition). L'expérience réalisée à la concentration de 200 nM comprend 233 trajectoires contrôles (sans nocodazole) issues de 4 larves et 95 trajectoires en présence de nocodazole issues de 3 larves. L'expérience réalisée à 500 nM comprend 139 trajectoires contrôles issues de 4 larves et 43 trajectoires en présence de nocodazole issues de 4 larves. Les comparaisons statistiques sont effectuées avec le test de Wilcoxon-Mann-Whitney. 155
- 4.13 Structure de la kinésine I. Les deux chaînes lourdes KIF5s forment un complexe avec les deux chaînes légères KLCs. À droite : schéma représentant le déplacement antérograde d'une vésicule transportée le long d'un microtubule par une kinésine I. Adaptée de (Hirokawa et al., 2010). 157
- 4.14 Génération et étude de la larve de Zf transgénique *kif5aa*. (a) Schéma représentant la mutation appliquée au gène *kif5aa* codant pour la chaîne lourde de la kinésine I. Un codon-stop est créé au niveau du nucléotide 162. (b) Résultat de la RT-PCR quantitative montrant une diminution de 47 % de l'expression de l'ARN messager *kif5a* chez les larves mutantes homozygotes *kif5aa*^{-/-} à 4 dpf ($p < 0,01$). (c) Les embryons mutants *kif5a*^{-/-} présentent des mélanosomes très larges apparaissant sombres sur leur tête par rapport aux embryons de type sauvage. Barres d'échelle = 200 μm . (d) Les embryons mutants *kif5aa*^{-/-} ne parviennent pas à gonfler leur vessie natatoire. Barres d'échelle = 400 μm . Flèche pointant la vessie natatoire (*swim bladder* [SB] en anglais). Adaptée de (Auer et al., 2015). 158
- 4.15 Étude de la distribution et de la dynamique de vésicules synaptiques dans les RGCs de larves mutantes *kif5aa*^{-/-} et sauvages (WT). (a) Quantification du nombre de sites pré-synaptiques (marqués par la Synaptophysine-GFP) à 5 et 7 dpf. Aucune différence de distribution n'est observée entre les modèles mutant et sauvage. (b) Quantification du taux de transport antérograde et rétrograde à 4 dpf. Aucune différence n'est détectée. (c) En haut, images de la fluorescence de la Synaptophysine-GFP marquant des vésicules synaptiques de tailles différentes (en pointillés rouges, des petites ($< 0.4 \mu\text{m}$) et en jaune des grandes ($> 0.4 \mu\text{m}$). En bas, kymographes représentant la dynamique de transport de ces vésicules. Flèche blanche : vésicule transportée dans le sens antérograde. Flèche noire : vésicule transportée dans le sens rétrograde. Barre d'échelle = 3 μm . Adaptée de (Auer et al., 2015). 160

- 4.16 Étude de la distribution et de la dynamique des mitochondries dans les RGCs de larves mutantes *kif5aa*^{-/-} et sauvages (WT). (a) Les distributions des mitochondries mobiles et statiques sont les mêmes chez les larves mutantes et sauvages. On remarque aussi que dans les deux cas, la majorité des mitochondries sont statiques alors que seulement 15% environ sont mobiles. (b) Parmi celles-ci, dans la larve mutante, les mitochondries se déplacent beaucoup plus souvent dans le sens rétrograde ($p < 0,05$). Les cellules de type sauvage présentent une proportion plus élevée de transport antérograde. (c) Microscopie électronique en transmission d'une section transversale du neuropile contenant les axones des RGCs. Panneau supérieur : neuropile de type sauvage, panneau inférieur : neuropile mutant. Les mitochondries sont dans les cercles jaunes. Panneau gauche : Zoom sur un seul segment axonal contenant une mitochondrie. Le neuropile des mutants contient moins de mitochondries. Barre d'échelle = 500 nm. Le graphique associé représente la quantification de la surface occupée par les mitochondries par rapport à la surface du neuropile. A 6 dpf, les axones des RGCs des larves mutantes contiennent significativement moins de mitochondries que les cellules de type sauvage ($p < 0,01$). Adaptée de (Auer et al., 2015). 162
- 4.17 Paramètres du transport intraneuronal mesuré dans les larves mutantes *kif5aa*^{-/-}. Une comparaison statistique des distributions des paramètres de transport est effectuée entre les larves WT, hétérozygotes et homozygotes. Le nombre de trajectoires n_t et de larves n_l est donné dans les barres du graphe de vitesse curviligne, sous la forme n_t/n_l . Pour chaque paramètre, les valeurs présentées correspondent à une moyenne sur l'ensemble des trajectoires de la catégorie considérée. Encadré en orange, ce sont les paramètres associés aux trajectoires antérogades de vésicules. Encadré en bleu, ce sont les trajectoires rétrogrades. * * $p < 0.01$ 164
- 4.18 Paramètres du transport axonal mesuré dans les larves mutantes *kif5aa*^{-/-}. (a) Quantification de la fraction de vésicules mobiles contenant un nanoKTP dans les axones des PVNs. Les p-valeurs sont toutes supérieures à 0.05 indiquant l'absence de modifications de ce paramètre en fonction du génotype. (b) Quantification pour les deux séries d'expériences du taux de transport antérograde et rétrograde chez les larves sauvage (wildtype) et mutante *kif5aa*. Aucune différence n'est détectée. 165
- 4.19 Estimation de la mobilité rotationnelle des vésicules contenant les nanoKTP. Évolution du logarithme de la variance de l'intensité du rayonnement SHG pendant les phases de mouvement (à gauche) et les phases d'arrêt des vésicules (à droite). La comparaison est effectuée entre les trois génotypes : WT, hétérozygote et homozygote. Les données présentées ici sont issues de la première expérience réalisée sur les larves mutantes. 167

4.20	Mutation étudiée du gène <i>dync1h1</i> codant pour la chaîne lourde 1 de la dynéine. En haut à gauche, illustration de la mutation ponctuelle : la séquence nucléotidique est modifiée (substitution de C par A à la position 9306). En bas, schéma de la protéine dync1h1 et localisation du codon-stop prématuré. Adapté de (Insinna et al., 2010).	170
4.21	Quantification de la fraction de vésicules mobiles contenant un nanoKTP dans les axones des PVNs. Comparaison effectuée dans les larves sauvages (WT), hétérozygotes et mutantes homozygotes. Le nombre de trajectoires n_t et de larves n_l est donné dans les barres du graphe, sous la forme n_t/n_l).	172
4.22	Schéma du virus adéno-associé (AAV) relié à un KTP par un liaison streptadivine-biotine et sur lequel ont été greffés des ligands permettant de cibler spécifiquement une cellule. Extrait de (Mével et al., 2020). . .	178
4.23	Détections d'anomalies fonctionnelles dans des mini-cerveaux Alzheimer humains. Corrélation de l'activité synaptique avec le transport intraneuronal.	179
4.24	Schéma de principe du microscope à balayage de faisceau par holographie en 3 dimensions. La matrice de miroirs (DMD) affiche les hologrammes. Ils sont représentés à gauche de la figure. L'hologramme est calculé pour modifier la lumière du faisceau de référence, en une lumière provenant d'un point source virtuel. Le choix de l'hologramme détermine ainsi la position du point source virtuel associé à la position de point de focalisation du faisceau excitateur. Entre la situation A et la situation B, la position du laser d'excitation a été modifiée.	180
E.1	Estimation du rapport signal sur bruit de nanodiamants (FNDs) et de nano-KTP internalisés dans le cerveau d'un poisson zèbre juvénile de 21 jours (lignée NACRE (sans mélanocytes) ; injection des nanoparticules 24h avant l'imagerie). Longueur d'onde : 1040 nm. $P_{laser} = 77\%$. (a) Fluorescence deux photons des FNDs. L'image est enregistrée en superficie du cerveau du poisson-zèbre (très peu de FNDs sont détectés en profondeur). On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 4. (b) Signal SHG des nano-KTP. L'image est enregistrée à une profondeur d'environ 100 μm . On estime un rapport signal sur bruit bien plus élevé que les FNDs, de l'ordre de 25.	189

F.1	Schéma représentant le rayonnement SHG du nano-KTP dont l'axe cristallin est déterminé par l'angle polaire θ et l'azimut φ , repéré par rapport à l'axe (Oz) de l'objectif de microscope qui collecte l'émission. L'émission est assimilée à celle d'un dipôle unique aligné avec l'axe cristallographique (axe 3). $\alpha_{\max}$ correspond à l'angle maximal de collection du signal par l'objectif. Ce dernier est relié à l'ouverture numérique ON par la relation : $ON = n_{\text{eau}} \sin \alpha_{\max}$, où n_{eau} est l'indice de réfraction de l'eau car nous utilisons un objectif à immersion dans l'eau. le vecteur u défini par les angles θ' et φ' (non représenté pour alléger la figure) représentent la direction de collection du signal. À droite, l'angle solide élémentaire est représenté et son expression est explicitée.	191
F.2	Efficacité de collection de la SHG d'une nanoparticule assimilé à un dipôle en fonction de son orientation polaire θ (par rapport à l'axe de l'objectif de microscope). Il s'agit essentiellement d'un $\sin^2 \theta$ dont le contraste de modulation dépend de l'angle de collection maximal. . . .	194
G.1	Estimation du rapport signal sur bruit de nano-SiC, nano-BTO et nano-KTP internalisés dans des cultures primaires de neurones corticaux. Longueur d'onde : 896 nm. (a) Signal SHG des nano-SiC. $P_{\text{laser}} = 5\%$. On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 10. (b) Signal SHG des nano-BTO. $P_{\text{laser}} = 10\%$. On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 10. (c) Signal SHG des nano-KTP. $P_{\text{laser}} = 5\%$. On estime un rapport signal sur bruit de l'ordre de 65.	195
J.1	Génotypage de l'allèle mutant <i>kifaa</i> : résultats des gels. Génotypage de la série 1 réalisé par Christelle LANGEVIN (IERP/INRAE Jouy). Génotypage de la série 2 réalisé par C. LANGEVIN et Valérie BERCIER chercheuse post-doctorante au <i>VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research</i> (Louvain, Belgique), anciennement doctorante dans l'équipe de Filippo DEL BENE qui a participé aux études sur les mutants <i>kif5aa</i>	202
K.1	Protocole de Karine DUROURE, équipe Filippo DEL BENE, Institut de la Vision, Paris	204
K.2	Génotypage de l'allèle mutant <i>dync1h1^{mw20}</i> : résultats des gels. Génotypes réalisés par Karine DUROURE, technicienne dans l'équipe de Filippo DEL BENE.	205

Bibliographie

- Abraham, A. V., S. Ram, J. Chao, E. S. Ward, and R. J. Ober
2009. Quantitative study of single molecule location estimation techniques. Optics Express, 17(26) :23352.
- Akinc, A. and G. Battaglia
2013. Exploiting endocytosis for nanomedicines. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5(11) :a016980.
- Auer, T. O., T. Xiao, V. Bercier, C. Gebhardt, K. Durore, J.-P. Concordet, C. Wyart, M. Suster, K. Kawakami, J. Wittbrodt, H. Baier, and F. Del Bene
2015. Deletion of a kinesin I motor unmasks a mechanism of homeostatic branching control by neurotrophin-3. eLife, 4(JUNE) :1–26.
- Ayloo, S., P. Guedes-Dias, A. E. Ghiretti, and E. L. F. Holzbaur
2017. Dynein efficiently navigates the dendritic cytoskeleton to drive the retrograde trafficking of BDNF/TrkB signaling endosomes. Molecular Biology of the Cell, 28(19) :2543–2554.
- Baas, P. W., J. S. Deitch, M. M. Black, and G. A. Banker
1988. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons : uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85(21) :8335–8339.
- Babin, P. J., C. Goizet, and D. Raldúa
2014. Zebrafish models of human motor neuron diseases : Advantages and limitations.
- Bálint, Š., I. V. Vilanova, Á. S. Álvarez, and M. Lakadamyali
2013. Correlative live-cell and superresolution microscopy reveals cargo transport dynamics at microtubule intersections. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(9) :3375–3380.
- Bandmann, O. and E. A. Burton
2010. Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Disease, 40(1) :58–65.
- Bar-Shalom, Y. and X. R. Li
1996. Multitarget-Multisensor Tracking : Principles and Techniques [BOOKSHELF]. IEEE Control Systems, 16(1) :93.

- Bercier, V., M. Rosello, F. D. Bene, and C. Revenu
2019. Zebrafish as a Model for the Study of Live in vivo Processive Transport in Neurons. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 7(February) :1–9.
- Berends, A. C. and C. De Mello Donega
2017. Ultrathin One- and Two-Dimensional Colloidal Semiconductor Nanocrystals : Pushing Quantum Confinement to the Limit. Journal of Physical Chemistry Letters, 8(17) :4077–4090.
- Bergamin, G., D. Cieri, G. Vazza, F. Argenton, and M. L. Mostacciolo
2016. Zebrafish Tg(hb9 :MTS-Kaede) : A new in vivo tool for studying the axonal movement of mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1860(6) :1247–1255.
- Bertram, L. and R. E. Tanzi
2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease.
- Bilsland, L. G., E. Sahai, G. Kelly, M. Golding, L. Greensmith, and G. Schiavo
2010. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(47) :20523–8.
- Biswas, S. K., A. Pathak, and P. Pramanik
2007. Synthesis of Nanocrystalline KTiOPO 4 Powder by Chemical Method. Journal of the American Ceramic Society, 90(4) :1071–1076.
- Block, S. M., L. S. B. Goldstein, and B. J. Schnapp
1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. Nature, 348(6299) :348–352.
- Bogicevic, C., G. Thorner, F. Karolak, P. Haghi-Ashtiani, and J. M. Kiat
2015. Morphogenesis mechanisms in the solvothermal synthesis of BaTiO₃ from titanate nanorods and nanotubes. Nanoscale, 7(8) :3594–3603.
- Bonacina, L.
2013. Nonlinear nanomedicine : Harmonic nanoparticles toward targeted diagnosis and therapy. Molecular Pharmaceutics, 10(3) :783–792.
- Brown, C. L., K. C. Maier, T. Stauber, L. M. Ginkel, L. Wordeman, I. Vernos, and T. A. Schroer
2005. Kinesin-2 is a Motor for Late Endosomes and Lysosomes : Kinesin-2 is a Late Endosome Motor. Traffic, 6(12) :1114–1124.
- Cai, D., K. J. Verhey, and E. Meyhöfer
2007. Tracking Single Kinesin Molecules in the Cytoplasm of Mammalian Cells. Biophysical Journal, 92(12) :4137–4144.
- Casola, F., T. v. d. Sar, and A. Yacoby
2018. Probing condensed matter physics with magnetometry based on nitrogen-vacancy centres in diamond. Nature Reviews Materials, 3(1) :17088.

- Cervený, K. L., M. Varga, and S. W. Wilson
2012. Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. Developmental Neurobiology, 72(3) :328–345.
- Chabot, N., J. G. Mellott, A. J. Hall, E. L. Tichenoff, and S. G. Lomber
2013. Cerebral origins of the auditory projection to the superior colliculus of the cat. Hearing Research, 300 :33–45.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher
1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263(5148) :802–805.
- Chen, X. and W. Zhang
2017. Diamond nanostructures for drug delivery, bioimaging, and biosensing. Chemical Society Reviews, 46(3) :734–760.
- Chen, Y. and Z.-H. Sheng
2013. Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. The Journal of Cell Biology, 202(2) :351–364.
- Cheng, J., C. Gu, D. Zhang, D. Wang, and S.-C. Chen
2016. Ultrafast axial scanning for two-photon microscopy via a digital micromirror device and binary holography. Optics Letters, 41(7) :1451.
- Chenouard, N., J. Buisson, I. Bloch, P. Bastin, and J.-C. Olivo-Marin
2010. Curvelet analysis of kymograph for tracking bi-directional particles in fluorescence microscopy images. In 2010 IEEE International Conference on Image Processing, Pp. 3657–3660. IEEE.
- Chenouard, N., I. Smal, F. De Chaumont, M. Maška, I. F. Sbalzarini, Y. Gong, J. Cardinale, C. Carthel, S. Coraluppi, and Winter
2014. Objective comparison of particle tracking methods. Nature Methods, 11(3) :281–289.
- Chevalier-Larsen, E. and E. L. Holzbaur
2006. Axonal transport and neurodegenerative disease.
- Chowdary, P. D., D. L. Che, K. Zhang, and B. Cui
2015. Retrograde NGF axonal transport - Motor coordination in the unidirectional motility regime. Biophysical Journal, 108(11) :2691–2703.
- Corbo, C. P., N. A. Othman, M. C. Gutkin, A. D. C. Alonso, and Z. L. Fulop
2012. Use of different morphological techniques to analyze the cellular composition of the adult zebrafish optic tectum. Microscopy Research and Technique, 75(3) :325–333.
- Cosacak, M. I., P. Bhattarai, L. Bocova, T. Dzewas, V. Mashkaryan, C. Papadimitriou, K. Brandt, H. Hollak, C. L. Antos, and C. Kizil
2017. Human TAUP301L overexpression results in TAU hyperphosphorylation without neurofibrillary tangles in adult zebrafish brain. Scientific Reports, 7(1) :12959.

- Courty, S., C. Luccardini, Y. Bellaiche, G. Cappelletto, and M. Dahan
2006. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. Nano Letters, 6(7) :1491–1495.
- Crimella, C., C. Baschiroto, A. Arnoldi, A. Tonelli, E. Tenderini, G. Airolidi, A. Martinuzzi, A. Trabacca, L. Losito, M. Scarlato, S. Benedetti, E. Scarpini, G. Spinicci, N. Bresolin, and M. Bassi
2012. Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in axonal Charcot-Marie-Tooth type 2. Clinical Genetics, 82(2) :157–164.
- Crocker, J. C. and D. G. Grier
1996. Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. Journal of Colloid and Interface Science, 179(1) :298–310.
- Cui, B., C. Wu, L. Chen, A. Ramirez, E. L. Bearer, W. P. Li, W. C. Mobley, and S. Chu
2007. One at a time, live tracking of NGF axonal transport using quantum dots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(34) :13666–13671.
- Dafsari, H. S., S. Byrne, J.-P. Lin, M. Pitt, J. D. Jongbloed, F. Flinter, and H. Jungbluth
2015. Goldberg-Shprintzen megacolon syndrome with associated sensory motor axonal neuropathy. American Journal of Medical Genetics Part A, 167(6) :1300–1304.
- Dahan, M., S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller
2003. Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. Science, 302(5644) :442–445.
- Das, R., C. W. Cairo, and D. Coombs
2009. A Hidden Markov Model for Single Particle Tracks Quantifies Dynamic Interactions between LFA-1 and the Actin Cytoskeleton. PLoS Computational Biology, 5(11) :e1000556.
- Deacon, S. W., A. S. Serpinskaya, P. S. Vaughan, M. L. Fanarraga, I. Vernos, K. T. Vaughan, and V. I. Gelfand
2003. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. Journal of Cell Biology, 160(3) :297–301.
- Del Bene, F., C. Wyart, E. Robles, A. Tran, L. Looger, E. K. Scott, E. Y. Isacoff, and H. Baier
2010. Filtering of Visual Information in the Tectum by an Identified Neural Circuit. Science, 330(6004) :669–673.
- Denk, W., J. Strickler, and W. Webb
1990. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. Science, 248(4951) :73.
- Deschout, H., K. Neyts, and K. Braeckmans
2012. The influence of movement on the localization precision of sub-resolution particles in fluorescence microscopy. Journal of Biophotonics, 5(1) :97–109.

- Deschout, H., F. C. Zancchi, M. Młodzianoski, A. Diaspro, J. Bewersdorf, S. T. Hess, and K. Braeckmans
2014. Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. Nature Methods, 11(3) :253–266.
- Di Donato, V., F. De Santis, T. O. Auer, N. Testa, H. Sánchez-Iranzo, N. Mercader, J.-P. Concordet, and F. Del Bene
2016. 2C-Cas9 : a versatile tool for clonal analysis of gene function. Genome Research, 26(5) :681–692.
- Dodt, H.-U., M. Eder, A. Frick, and W. Ziegler
1999. Precisely Localized LTD in the Neocortex Revealed by Infrared-Guided Laser Stimulation. Science, 286(5437) :110–113.
- Doudna, J. A. and E. Charpentier
2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346(6213) :1258096.
- Dourlen, P., D. Kilinc, N. Malmanche, J. Chapuis, and J.-C. Lambert
2019. The new genetic landscape of Alzheimer’s disease : from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? Acta neuropathologica, 138(2) :221–236.
- Drerup, C. M. and A. V. Nechiporuk
2016. In vivo analysis of axonal transport in zebrafish. Methods in Cell Biology, 131 :311–329.
- Dunn, A. R. and J. A. Spudich
2007. Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. Nature Structural and Molecular Biology, 14(3) :246–248.
- Efros, A. L. and M. Rosen
1997. Random telegraph signal in the photoluminescence intensity of a single quantum dot. Phys. Rev. Lett., 78 :1110–1113.
- Encalada, S. E. and L. S. Goldstein
2014. Biophysical Challenges to Axonal Transport : Motor-Cargo Deficiencies and Neurodegeneration. Annual Review of Biophysics, 43(1) :141–169.
- Fakhri, N., A. D. Wessel, C. Willms, M. Pasquali, D. R. Klopfenstein, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt
2014. High-resolution mapping of intracellular fluctuations using carbon nanotubes. Science, 344(6187) :1031–1035.
- Farrer, M. J., M. M. Hulihan, J. M. Kachergus, J. C. Dächsel, A. J. Stoessl, L. L. Grantier, S. Calne, D. B. Calne, and Lechevalier
2009. DCTN1 mutations in Perry syndrome. Nature Genetics, 41(2) :163–165.

- Ferezou, I., S. Bolea, and C. C. Petersen
2006. Visualizing the Cortical Representation of Whisker Touch : Voltage-Sensitive Dye Imaging in Freely Moving Mice. Neuron, 50(4) :617–629.
- Fontana, B. D., N. J. Mezzomo, A. V. Kalueff, and D. B. Rosenberg
2018. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders : A critical review.
- Förster, D., M. Dal Maschio, E. Laurell, and H. Baier
2017. An optogenetic toolbox for unbiased discovery of functionally connected cells in neural circuits. Nature Communications, 8(1) :116.
- Frimmer, M., A. Mohtashami, and A. F. Koenderink
2013. Nanomechanical method to gauge emission quantum yield applied to nitrogen-vacancy centers in nanodiamond. Applied Physics Letters, 102(12) :121105.
- Frost, N. A., H. Shroff, H. Kong, E. Betzig, and T. A. Blanpied
2010. Single-Molecule Discrimination of Discrete Perisynaptic and Distributed Sites of Actin Filament Assembly within Dendritic Spines. Neuron, 67(1) :86–99.
- Fu, C. C., H. Y. Lee, K. Chen, T. S. Lim, H. Y. Wu, P. K. Lin, P. K. Wei, P. H. Tsao, H. C. Chang, and W. Fann
2007. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(3) :727–732.
- Gahtan, E.
2005. Visual Prey Capture in Larval Zebrafish Is Controlled by Identified Reticulospinal Neurons Downstream of the Tectum. Journal of Neuroscience, 25(40) :9294–9303.
- Giandomenico, S. L., S. B. Mierau, G. M. Gibbons, L. M. D. Wenger, L. Masullo, T. Sit, M. Sutcliffe, J. Boulanger, M. Tripodi, E. Derivery, O. Paulsen, A. Lakatos, and M. A. Lancaster
2019. Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. Nature neuroscience, 22(4) :669–679.
- Gibbs, K. L., B. Kalmar, E. R. Rhymes, A. D. Fellows, M. Ahmed, P. Whiting, C. H. Davies, L. Greensmith, and G. Schiavo
2018. Inhibiting p38 MAPK alpha rescues axonal retrograde transport defects in a mouse model of ALS. Cell Death & Disease, 9(6) :596.
- Gibbs, K. L., B. Kalmar, J. N. Sleight, L. Greensmith, and G. Schiavo
2016. In vivo imaging of axonal transport in murine motor and sensory neurons. Journal of Neuroscience Methods, 257 :26–33.
- Glausier, J. R. and D. A. Lewis
2013. Dendritic spine pathology in schizophrenia.

- Godinez, W. J., M. Lampe, S. Wörz, B. Müller, R. Eils, and K. Rohr
2009. Deterministic and probabilistic approaches for tracking virus particles in time-lapse fluorescence microscopy image sequences. Medical Image Analysis, 13(2) :325–342.
- Goedert, M.
2018. Tau filaments in neurodegenerative diseases. FEBS Letters, 592(14) :2383–2391.
- Goldstein, L. S.
2012. Axonal transport and neurodegenerative disease : Can we see the elephant ?
- Gomes, S. A., C. S. Vieira, D. B. Almeida, J. R. Santos-Mallet, R. F. Menna-Barreto, C. L. Cesar, and D. Feder
2011. CdTe and CdSe quantum dots cytotoxicity : A comparative study on microorganisms. Sensors, 11(12) :11664–11678.
- Grange, R., T. Lanvin, C.-L. Hsieh, Y. Pu, and D. Psaltis
2011. Imaging with second-harmonic radiation probes in living tissue. Biomedical Optics Express, 2(9) :2532.
- Guedes-Dias, P. and E. L. F. Holzbaur
2019. Axonal transport : Driving synaptic function. Science, 366(6462) :eaaw9997.
- Hafezparast, M.
2003. Mutations in Dynein Link Motor Neuron Degeneration to Defects in Retrograde Transport. Science, 300(5620) :808–812.
- Hancock, W. O.
2014. Bidirectional cargo transport : moving beyond tug of war. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(9) :615–628.
- Haziza, S., N. Mohan, Y. Loe-Mie, A.-M. Lepagnol-Bestel, S. Massou, M.-P. Adam, X. L. Le, J. Viard, C. Plancon, R. Daudin, P. Koebel, E. Dorard, C. Rose, F.-J. Hsieh, C.-C. Wu, B. Potier, Y. Herault, C. Sala, A. Corvin, B. Allinquant, H.-C. Chang, F. Treussart, and M. Simonneau
2017. Fluorescent nanodiamond tracking reveals intraneuronal transport abnormalities induced by brain-disease-related genetic risk factors. Nature Nanotechnology, 12(4) :322–328.
- Hendricks, A. G., E. Perlson, J. L. Ross, H. W. Schroeder, M. Tokito, and E. L. Holzbaur
2010. Motor Coordination via a Tug-of-War Mechanism Drives Bidirectional Vesicle Transport. Current Biology, 20(8) :697–702.
- Herbert, A. L., M.-m. Fu, C. M. Drerup, R. S. Gray, B. L. Harty, S. D. Ackerman, T. O'Reilly-Pol, S. L. Johnson, A. V. Nechiporuk, B. A. Barres, and K. R. Monk
2017. Dynein/dynactin is necessary for anterograde transport of Mbp mRNA in oligodendrocytes and for myelination in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(43) :E9153–E9162.

- Heuser, J. E. and S. R. Salpeter
1979. Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen, deep-etched, and rotary-replicated Torpedo postsynaptic membrane. The Journal of Cell Biology, 82(1) :150–173.
- Hines, T. J., X. Gao, S. Sahu, M. M. Lange, J. R. Turner, J. L. Twiss, and D. S. Smith
2018. An Essential Postdevelopmental Role for Lis1 in Mice. eneuro, 5(1) :ENEURO.0350–17.2018.
- Hirokawa, N.
1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport.
- Hirokawa, N., S. Niwa, and Y. Tanaka
2010. Molecular motors in neurons : Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Neuron, 68(4) :610–638.
- Hirokawa, N., Y. Noda, Y. Tanaka, and S. Niwa
2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport.
- Holschneider, M., R. Kronland-Martinet, J. Morlet, and P. Tchamitchian
1989. A Real-Time Algorithm for Signal Analysis with the Help of the Wavelet Transform. Wavelets, Time-Frequency Methods and Phase Space, -1 :286–297.
- Hoshino, A., S. Hanada, and K. Yamamoto
2011. Toxicity of nanocrystal quantum dots : the relevance of surface modifications. Archives of Toxicology, 85(7) :707–720.
- Hosy, E., C. Butler, and J. B. Sibarita
2014. Organization and dynamics of AMPA receptors inside synapses-nano-organization of AMPA receptors and main synaptic scaffolding proteins revealed by super-resolution imaging.
- Hou, S., C. Johnson, and K. Welsher
2019. Real-Time 3D Single Particle Tracking : Towards Active Feedback Single Molecule Spectroscopy in Live Cells. Molecules, 24(15) :2826.
- Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, and Koch
2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, 496(7446) :498–503.
- Hsieh, C. L., R. Grange, Y. Pu, and D. Psaltis
2009. Harmonic holographic microscopy using nanoparticles as probes for three-dimensional cell imaging. Optics InfoBase Conference Papers, 17(4) :2880–2891.
- Huet, S., E. Karatekin, V. S. Tran, I. Fanget, S. Cribier, and J.-P. Henry
2006. Analysis of Transient Behavior in Complex Trajectories : Application to Secretory Vesicle Dynamics. Biophysical Journal, 91(9) :3542–3559.

- Hurd, D. D. and W. M. Saxton
1996. Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. Genetics, 144(3) :1075–85.
- Igarashi, R., T. Sugi, S. Sotoma, T. Genjo, Y. Kumiya, E. Walinda, H. Ueno, K. Ikeda, H. Sumiya, H. Tochio, Y. Yoshinari, Y. Harada, and M. Shirakawa
2020. Tracking the 3D Rotational Dynamics in Nanoscopic Biological Systems. Journal of the American Chemical Society, 142(16) :7542–7554.
- Insinna, C., L. M. Baye, A. Amsterdam, J. C. Besharse, and B. A. Link
2010. Analysis of a zebrafish *dync1h1* mutant reveals multiple functions for cytoplasmic dynein 1 during retinal photoreceptor development. Neural Development, 5(1) :19.
- Iqbal, K., F. Liu, and C.-X. Gong
2015. Tau and neurodegenerative disease : the story so far. Nature reviews. Neurology, 12(1) :15–27.
- Izeddin, I., J. Boulanger, V. Racine, C. Specht, A. Kechkar, D. Nair, A. Triller, D. Choquet, M. Dahan, and J. Sibarita
2012. Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. Optics Express, 20(3) :2081.
- Jacobsohn, M. and U. Banin
2000. Size dependence of second harmonic generation in CdSe nanocrystal quantum dots.(Letter to the Editor). Journal of Physical Chemistry B, 104(1) :1.
- Jacobson, K., P. Liu, and B. C. Lagerholm
2019. The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. Cell, 177(4) :806–819.
- Jansen, I. E., J. E. Savage, K. Watanabe, J. Bryois, D. M. Williams, S. Steinberg, J. Sealock, I. K. Karlsson, S. Hägg, L. Athanasiu, N. Voyle, P. Proitsi, A. Witoelar, S. Stringer, D. Aarsland, and Almdahl
2019. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer’s disease risk. Nature Genetics, 51(3) :404–413.
- Jaqaman, K., D. Loeke, M. Mettlen, H. Kuwata, S. Grinstein, S. L. Schmid, and G. Danuser
2008. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. Nature Methods, 5(8) :695–702.
- Ji, P., R. Balili, J. Beaumariage, S. Mukherjee, D. Snoke, and M. V. Dutt
2018. Multiple-photon excitation of nitrogen vacancy centers in diamond. Physical Review B, 97(13) :1–6.
- Jia, H., J. Yang, and X. Li
2010. Minimum variance unbiased subpixel centroid estimation of point image limited by photon shot noise. Journal of the Optical Society of America A, 27(9) :2038.

- Johnson, G. V. W. and W. H. Stoothoff
2004. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. Journal of Cell Science, 117(24) :5721–5729.
- Kanai, Y., Y. Okada, Y. Tanaka, A. Harada, S. Terada, and N. Hirokawa
2000. KIF5C, a Novel Neuronal Kinesin Enriched in Motor Neurons. The Journal of Neuroscience, 20(17) :6374–6384.
- Kaplan, L., A. Ierokomos, P. Chowdary, Z. Bryant, and B. Cui
2018. Rotation of endosomes demonstrates coordination of molecular motors during axonal transport. Science Advances, 4(3) :e1602170.
- Karle, K. N., D. Möckel, E. Reid, and L. Schöls
2012. Axonal transport deficit in a KIF5A mouse model. neurogenetics, 13(2) :169–179.
- Kim, A. J. and S. A. Endow
2000. A kinesin family tree. Journal of Cell Science, 113(21) :3681–3682.
- King, S. M.
2011. Dyneins : Structure, Biology and Disease. Elsevier Science.
- Knabbe, J., J. P. Nassal, M. Verhage, and T. Kuner
2018. Secretory vesicle trafficking in awake and anaesthetized mice : differential speeds in axons versus synapses. Journal of Physiology, 596(16) :3759–3773.
- Knopfel, T. and C. Song
2019. Optical voltage imaging in neurons : moving from technology development to practical tool. Nature reviews. Neuroscience, 20(12) :719–727.
- Krauzlis, R. J., L. P. Lovejoy, and A. Zénon
2013. Superior Colliculus and Visual Spatial Attention. Annual Review of Neuroscience, 36(1) :165–182.
- Kusumi, A., Y. Sako, and M. Yamamoto
1993. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. Biophysical Journal, 65(5) :2021–2040.
- Kusumi, A., Y. M. Shirai, I. Koyama-Honda, K. G. Suzuki, and T. K. Fujiwara
2010. Hierarchical organization of the plasma membrane : Investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy. FEBS Letters, 584(9) :1814–1823.
- Kusumi, A., T. A. Tsunoyama, K. M. Hirosawa, R. S. Kasai, and T. K. Fujiwara
2014. Tracking single molecules at work in living cells. Nature Chemical Biology, 10(7) :524–532.

- Langevin, C. and P. Boudinot
2016. Real time analysis of viral infection : contribution of the zebrafish model to visualization and characterization of host/pathogen interactions. Virologie (Montrouge, France), 20(6) :321–334.
- Lawrence, C. J., R. K. Dawe, K. R. Christie, D. W. Cleveland, S. C. Dawson, S. A. Endow, L. S. Goldstein, H. V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R. L. Malmberg, J. R. McIntosh, H. Miki, T. J. Mitchison, Y. Okada, A. S. Reddy, W. M. Saxton, M. Schliwa, J. M. Scholey, R. D. Vale, C. E. Walczak, and L. Wordeman
2004. A standardized kinesin nomenclature.
- Lethiec, C., J. Laverdant, H. Vallon, C. Javaux, B. Dubertret, J.-M. Frigerio, C. Schwob, L. Coolen, and A. Maître
2014. Measurement of Three-Dimensional Dipole Orientation of a Single Fluorescent Nanoemitter by Emission Polarization Analysis. Physical Review X, 4(2) :021037.
- Li, J., H. Guo, and Z.-Y. Li
2013. Microscopic and macroscopic manipulation of gold nanorod and its hybrid nanostructures [Invited]. Photonics Research, 1(1) :28.
- Lin, M. Z. and M. J. Schnitzer
2016. Genetically encoded indicators of neuronal activity.
- MacGillavry, H. D., Y. Song, S. Raghavachari, and T. A. Blanpied
2013. Nanoscale Scaffolding Domains within the Postsynaptic Density Concentrate Synaptic AMPA Receptors. Neuron, 78(4) :615–622.
- Mahler, B., P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J. P. Hermier, and B. Dubertret
2008. Towards non-blinking colloidal quantum dots. Nature Materials, 7(8) :659–664.
- Mandal, A., K. Pinter, and C. M. Drerup
2018. Analyzing Neuronal Mitochondria in vivo Using Fluorescent Reporters in Zebrafish. Frontiers in cell and developmental biology, 6 :144.
- Manzo, C. and M. F. Garcia-Parajo
2015. A review of progress in single particle tracking : from methods to biophysical insights. Reports on Progress in Physics, 78(12) :124601.
- Martin, M., S. J. Iyadurai, A. Gassman, J. G. Gindhart, T. S. Hays, and W. M. Saxton
1999. <Interdependance Dynein Dynactin Kinesin.Pdf>. Molecular biology of the cell, 10(November) :3717–3728.
- Masson, J.-B., D. Casanova, S. Türkcan, G. Voisinne, M. R. Popoff, M. Vergassola, and A. Alexandrou
2009. Inferring Maps of Forces inside Cell Membrane Microdomains. Physical Review Letters, 102(4) :048103.
- Maussion, G. and Carayol
2008. Convergent evidence identifying MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) as a susceptibility gene for autism. Human molecular genetics, 17(16) :2541–51.

- McGuinness, L. P., Y. Yan, A. Stacey, D. A. Simpson, L. T. Hall, D. Maclaurin, S. Praver, P. Mulvaney, J. Wrachtrup, F. Caruso, R. E. Scholten, and L. C. L. Hollenberg
2011. Quantum measurement and orientation tracking of fluorescent nanodiamonds inside living cells. Nature Nanotechnology, 6(6) :358–363.
- Meijering, E., O. Dzyubachyk, and I. Smal
2012. Methods for cell and particle tracking, volume 504, 1 edition. Elsevier Inc.
- Mével, M., M. Bouzelha, A. Leray, S. Pacouret, M. Guilbaud, M. Penaud-Budloo, D. Alvarez-Dorta, L. Dubreil, S. G. Gouin, J. P. Combal, M. Hommel, G. Gonzalez-Aseguinolaza, V. Blouin, P. Moullier, O. Adjali, D. Deniaud, and E. Ayuso
2020. Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery. Chemical Science, 11(4) :1122–1131.
- Miki, H., M. Setou, K. Kaneshiro, and N. Hirokawa
2001. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(13) :7004–7011.
- Millecamps, S. and J. P. Julien
2013. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. Nature Reviews Neuroscience, 14(3) :161–176.
- Misgeld, T., M. Kerschensteiner, F. M. Bareyre, R. W. Burgess, and J. W. Lichtman
2007. Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. Nature Methods, 4(7) :559–561.
- MK Cheezum, W. W. and W. Guilford
2001. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. Biophysical journal, 81(4) :2378–2388.
- Monnier, N., Z. Barry, H. Y. Park, K.-C. Su, Z. Katz, B. P. English, A. Dey, K. Pan, I. M. Cheeseman, R. H. Singer, and M. Bathe
2015. Inferring transient particle transport dynamics in live cells. Nature Methods, 12(9) :838–840.
- Moor, H., K. Muhlethaler, H. Waldner, and A. Frey-Wyssling
1961. A New Freezing-ultramicrotome. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 10(1) :1–13.
- Morel, M., C. Héraud, C. Nicaise, V. Suain, and J.-P. Brion
2012. Levels of kinesin light chain and dynein intermediate chain are reduced in the frontal cortex in Alzheimer’s disease : implications for axoplasmic transport. Acta Neuropathologica, 123(1) :71–84.
- Moughamian, A. J. and E. L. Holzbaur
2012. Dynactin Is Required for Transport Initiation from the Distal Axon. Neuron, 74(2) :331–343.

- Müller, M. J., S. Klumpp, and R. Lipowsky
2008. Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(12) :4609–4614.
- Nair, D., E. Hossy, J. D. Petersen, A. Constals, G. Giannone, D. Choquet, and J.-B. Sibarita
2013. Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. Journal of Neuroscience, 33(32) :13204–13224.
- Neher, E. and B. Sakmann
1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature, 260(5554) :799–802.
- Nelson, S. R., M. Y. Ali, K. M. Trybus, and D. M. Warshaw
2009. Random Walk of Processive, Quantum Dot-Labeled Myosin Va Molecules within the Actin Cortex of COS-7 Cells. Biophysical Journal, 97(2) :509–518.
- Neumann, P., R. Kolesov, V. Jacques, J. Beck, J. Tisler, A. Batalov, L. Rogers, N. B. Manson, G. Balasubramanian, F. Jelezko, and J. Wrachtrup
2009. Excited-state spectroscopy of single NV defects in diamond using optically detected magnetic resonance. New Journal of Physics, 11(1) :013017.
- Nirmal, M., B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, and L. E. Brus
1996. Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. Nature, 383(6603) :802–804.
- Noble, W., D. P. Hanger, C. C. Miller, and S. Lovestone
2013. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases.
- Ober, R. J., S. Ram, and E. S. Ward
2004. Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy. Biophysical Journal, 86(2) :1185–1200.
- O'Donnell, K. C., M. E. Vargas, and A. Sagasti
2013. WldS and PGC-1 Regulate Mitochondrial Transport and Oxidation State after Axonal Injury. Journal of Neuroscience, 33(37) :14778–14790.
- Oh, E., R. Liu, A. Nel, K. B. Gemill, M. Bilal, Y. Cohen, and I. L. Medintz
2016. Meta-analysis of cellular toxicity for cadmium-containing quantum dots. Nature Nanotechnology, 11(5) :479–486.
- Okada, Y., H. Yamazaki, Y. Sekine-Aizawa, and N. Hirokawa
1995. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. Cell, 81(5) :769–780.

- Orger, M. B.
2016. The Cellular Organization of Zebrafish Visuomotor Circuits. Current Biology, 26(9) :R377–R385.
- Ouzounov, D. G., T. Wang, M. Wang, D. D. Feng, N. G. Horton, J. C. Cruz-Hernández, Y. T. Cheng, J. Reimer, A. S. Tolia, N. Nishimura, and C. Xu
2017. In vivo three-photon imaging of activity of Gcamp6-labeled neurons deep in intact mouse brain. Nature Methods, 14(4) :388–390.
- Pantazis, P., J. Maloney, D. Wu, and S. E. Fraser
2010. Second harmonic generating (SHG) nanoprobe for in vivo imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(33) :14535–14540.
- Paquet, D., R. Bhat, A. Sydow, E.-M. Mandelkow, S. Berg, S. Hellberg, J. Flting, and Distel
2009. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. The Journal of clinical investigation, 119(5) :1382–95.
- Paquet, D., G. Plucinaska, and T. Misgeld
2014. In vivo imaging of mitochondria in intact zebrafish larvae. Methods in enzymology, 547 :151–64.
- Penzes, P., M. E. Cahill, K. A. Jones, J. E. Vanleeuwen, and K. M. Woolfrey
2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders.
- Persson, F., M. Lindén, C. Unoson, and J. Elf
2013. Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. Nature Methods, 10(3) :265–269.
- Petrov, D. V., B. S. Santos, G. A. L. Pereira, and C. d. M. Donega
2002. Size and band-gap dependences of the first hyperpolarizability of Cd_xZn_{1-x}S nanocrystals. Journal of Physical Chemistry B, 106(21) :5325.
- Petrov, D. Y., R. Mallik, G. T. Shubeita, M. Vershinin, S. P. Gross, and C. C. Yu
2007. Studying molecular motor-based cargo transport : What is real and what is noise ? Biophysical Journal, 92(8) :2953–2963.
- Pfister, K., P. R. Shah, H. Hummerich, A. Russ, J. Cotton, A. A. Annular, S. M. King, and E. M. Fisher
2006. Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families.
- Pinaud, F., S. Clarke, A. Sittner, and M. Dahan
2010. Probing cellular events, one quantum dot at a time. Nature Methods, 7(4) :275–285.
- Plucinska, G., D. Paquet, A. Hruscha, L. Godinho, C. Haass, B. Schmid, and T. Misgeld
2012. In Vivo Imaging of Disease-Related Mitochondrial Dynamics in a Vertebrate Model System. Journal of Neuroscience, 32(46) :16203–16212.

- Puls, I., C. Jonnakuty, B. H. LaMonte, E. L. Holzbaur, M. Tokito, E. Mann, M. K. Floeter, K. Bidus, D. Drayna, S. J. Oh, R. H. Brown, C. L. Ludlow, and K. H. Fischbeck
2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. Nature Genetics, 33(4) :455–456.
- Qian, H., M. P. Sheetz, and E. L. Elson
1991. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. Biophysical Journal, 60(4) :910–921.
- Reid, E., M. Kloos, A. Ashley-Koch, L. Hughes, S. Bevan, I. K. Svenson, F. L. Graham, P. C. Gaskell, A. Dearlove, M. A. Pericak-Vance, D. C. Rubinsztein, and D. A. Marchuk
2002. A Kinesin Heavy Chain (KIF5A) Mutation in Hereditary Spastic Paraplegia (SPG10). The American Journal of Human Genetics, 71(5) :1189–1194.
- Rejman, J., V. Oberle, I. S. Zuhorn, and D. Hoekstra
2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Biochemical Journal, 377(1) :159–169.
- Robles, E., S. J. Smith, and H. Baier
2011. Characterization of Genetically Targeted Neuron Types in the Zebrafish Optic Tectum. Frontiers in Neural Circuits, 5 :1.
- Roeser, T. and H. Baier
2003. Visuomotor Behaviors in Larval Zebrafish after GFP-Guided Laser Ablation of the Optic Tectum. The Journal of Neuroscience, 23(9) :3726–3734.
- Rogov, A., I. Tishchenko, C. Joulaud, A. Pastushenko, Y. Ryabchikov, A. Kyrychenko, D. Mishchuk, A. Kharin, V. Timoshenko, Y. Mugnier, R. Le Dantec, A. Geloën, J.-P. Wolf, V. Lysenko, and L. Bonacina
2016. Nonlinear optical properties of silicon carbide (SiC) nanoparticles by carbo-thermal reduction. In Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications XI, W. J. Parak, M. Osinski, and X.-J. Liang, eds., P. 972213.
- Romano, S. A., T. Pietri, V. Pérez-Schuster, A. Jouary, M. Haudrechy, and G. Sumbre
2015. Spontaneous Neuronal Network Dynamics Reveal Circuit’s Functional Adaptations for Behavior. Neuron, 85(5) :1070–1085.
- Rondin, L., J.-P. Tetienne, T. Hingant, J.-F. Roch, P. Maletinsky, and V. Jacques
2014. Magnetometry with nitrogen-vacancy defects in diamond. Rep. Prog. Phys., 77(5) :056503.
- Schmidt, R., U. Strähle, and S. Scholpp
2013. Neurogenesis in zebrafish a from embryo to adult. Neural Development, 8(1) :3.
- Schroer, T. A.
2004. DYNACTIN. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 20(1) :759–779.

- Shea, J.
2004. Handbook of optical materials [Book Review]. IEEE Electrical Insulation Magazine, 20(5) :46–46.
- Shen, H., L. J. Tauzin, R. Baiyasi, W. Wang, N. Moringo, B. Shuang, and C. F. Landes
2017. Single Particle Tracking : From Theory to Biophysical Applications. Chemical Reviews, 117(11) :7331–7376.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, and Y. Saiga
1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. Journal of cellular and comparative physiology, 59(165) :223–239.
- Shotton, D. M.
1989. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. Journal of Cell Science, 94(2) :175–206.
- Sittaramane, V. and A. Chandrasekhar
2008. Expression of unconventional myosin genes during neuronal development in zebrafish. Gene Expression Patterns, 8(3) :161–170.
- Sleigh, J. N., A. P. Tosolini, D. Gordon, A. Devoy, P. Fratta, E. M. Fisher, K. Talbot, and G. Schiavo
2020. Mice Carrying ALS Mutant TDP-43, but Not Mutant FUS, Display In Vivo Defects in Axonal Transport of Signaling Endosomes. Cell Reports, 30(11) :3655–3662.e2.
- Smith, A. M., M. C. Mancini, and S. Nie
2009. Second window for in vivo imaging. Nature Nanotechnology, 4(11) :710–711.
- Sönnichsen, C. and A. P. Alivisatos
2005. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. Nano Letters, 5(2) :301–304.
- Soppina, V., A. K. Rai, A. J. Ramaiya, P. Barak, and R. Mallik
2009. Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(46) :19381–19386.
- Sorbara, C. D., N. E. Wagner, A. Ladwig, I. , D. Merkler, T. Kleele, P. Marinkovi, R. Naumann, L. Godinho, F. M. Bareyre, D. Bishop, T. Misgeld, and M. Kerschensteiner
2014. Pervasive axonal transport deficits in multiple sclerosis models. Neuron, 84(6) :1183–90.
- Spudich, J. A., S. J. Kron, and M. P. Sheetz
1985. Movement of myosin-coated beads on oriented filaments reconstituted from purified actin. Nature, 315(6020) :584–586.

- Staedler, D., T. Magouroux, R. Hadji, C. Joulaud, J. Extermann, S. Schwung, S. Passemard, C. Kasparian, G. Clarke, M. Germann, R. L. Dantec, Y. Mugnier, D. Rytz, D. Ciepielewski, C. Galez, S. Gerber-Lemaire, L. Juillerat-Jeanneret, L. Bonacina, and J. P. Wolf
2012. Harmonic nanocrystals for biolabeling : A survey of optical properties and biocompatibility. ACS Nano, 6(3) :2542–2549.
- Steinman, J. B., C. C. Santarossa, R. M. Miller, L. S. Yu, A. S. Serpinskaya, H. Furukawa, S. Morimoto, Y. Tanaka, M. Nishitani, M. Asano, R. Zalyte, A. E. Ondrus, A. G. Johnson, F. Ye, M. V. Nachury, Y. Fukase, K. Aso, M. A. Foley, V. I. Gelfand, J. K. Chen, A. P. Carter, and T. M. Kapoor
2017. Chemical structure-guided design of dynapyrazoles, cell-permeable dynein inhibitors with a unique mode of action. eLife, 6 :e25174.
- Stokin, G. B., C. Lillo, T. L. Falzone, R. G. Brusch, E. Rockenstein, S. L. Mount, R. Raman, P. Davies, E. Masliah, D. S. Williams, and L. S. B. Goldstein
2005. Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. Science, 307(5713) :1282–1288.
- Striedter, G. F. and R. G. Northcutt
1989. Two distinct visual pathways through the superficial pretectum in a percomorph teleost. The Journal of Comparative Neurology, 283(3) :342–354.
- Südhof, T. C.
2012. The presynaptic active zone.
- Talapin, D. V., I. Mekis, S. Götzinger, A. Kornowski, O. Benson, and H. Weller
2004. CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals. Journal of Physical Chemistry B, 108(49) :18826–18831.
- Tanaka, Y., Y. Kanai, Y. Okada, S. Nonaka, S. Takeda, A. Harada, and N. Hirokawa
1998. Targeted Disruption of Mouse Conventional Kinesin Heavy Chain kif5B, Results in Abnormal Perinuclear Clustering of Mitochondria. Cell, 93(7) :1147–1158.
- Tas, R. P., A. Chazeau, B. M. Cloin, M. L. Lambers, C. C. Hoogenraad, and L. C. Kapitein
2017. Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport. Neuron, 96(6) :1264–1271.e5.
- Thompson, R. E., D. R. Larson, and W. W. Webb
2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. Biophysical Journal, 82(5) :2775–2783.
- Triller, A. and D. Choquet
2008. New Concepts in Synaptic Biology Derived from Single-Molecule Imaging. Neuron, 59(3) :359–374.

- Vaijayanthimala, V., P. Y. Cheng, S. H. Yeh, K. K. Liu, C. H. Hsiao, J. I. Chao, and H. C. Chang
2012. The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an in vivo contrast agent. Biomaterials, 33(31) :7794–7802.
- Vale, R. D.
2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport.
- Vallee, R. B. and P. Höök
2006. Autoinhibitory and other autoregulatory elements within the dynein motor domain.
- Vega, A. R., S. A. Freeman, S. Grinstein, and K. Jaqaman
2018. Multistep Track Segmentation and Motion Classification for Transient Mobility Analysis. Biophysical Journal, 114(5) :1018–1025.
- Voisinne, G., A. Alexandrou, and J.-B. Masson
2010. Quantifying Biomolecule Diffusivity Using an Optimal Bayesian Method. Biophysical Journal, 98(4) :596–605.
- Vossel, K. A., J. C. Xu, V. Fomenko, T. Miyamoto, E. Suberbielle, J. A. Knox, K. Ho, D. H. Kim, G. Q. Yu, and L. Mucke
2015. Tau reduction prevents A β -induced axonal transport deficits by blocking activation of GSK3 β . Journal of Cell Biology, 209(3) :419–433.
- Weedon, M. N., R. Hastings, R. Caswell, W. Xie, K. Paszkiewicz, T. Antoniadi, M. Williams, C. King, L. Greenhalgh, R. Newbury-Ecob, and S. Ellard
2011. Exome Sequencing Identifies a DYNC1H1 Mutation in a Large Pedigree with Dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. The American Journal of Human Genetics, 89(2) :308–312.
- Wehnekamp, F., G. Plucinaska, R. Thong, T. Misgeld, and D. C. Lamb
2019. Nanoresolution real-time 3D orbital tracking for studying mitochondrial trafficking in vertebrate axons in vivo. eLife, 8 :e46059.
- Weimann, L., K. A. Ganzinger, J. McColl, K. L. Irvine, S. J. Davis, N. J. Gay, C. E. Bryant, and D. Klenerman
2013. A Quantitative Comparison of Single-Dye Tracking Analysis Tools Using Monte Carlo Simulations. PLoS ONE, 8(5) :e64287.
- Winick, K. A.
1986. Cramer-Rao lower bounds on the performance of charge-coupled-device optical position estimators. Journal of the Optical Society of America A, 3 :1809–1815.
- Winter, S., M. Zielinski, D. Chauvat, J. Zyss, and D. Oron
2011. The Second Order Nonlinear Susceptibility of Quantum Confined Semiconductors: A Single Dot Study. The Journal of Physical Chemistry C, 115(11) :4558–4563.
- Wullimann, M. F., B. Rupp, and H. Reichert
1996. Neuroanatomy of the Zebrafish Brain. Basel : Birkhäuser Basel.

- Xia, C.-h., A. Rahman, Z. Yang, and L. S. Goldstein
1998. Chromosomal Localization Reveals Three Kinesin Heavy Chain Genes in Mouse. Genomics, 52(2) :209–213.
- Xia, C.-H., E. A. Roberts, L.-S. Her, X. Liu, D. S. Williams, D. W. Cleveland, and L. S. Goldstein
2003. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. Journal of Cell Biology, 161(1) :55–66.
- Xu, Y., M. Chen, B. Hu, R. Huang, and B. Hu
2017. In vivo imaging of mitochondrial transport in single-axon regeneration of zebrafish mauthner cells. Frontiers in Cellular Neuroscience, 11(January) :1–12.
- Yildiz, A.
2003. Myosin V Walks Hand-Over-Hand : Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. Science, 300(5628) :2061–2065.
- Yoon, J. W., A. Bruckbauer, W. J. Fitzgerald, and D. Klenerman
2008. Bayesian Inference for Improved Single Molecule Fluorescence Tracking. Biophysical Journal, 94(12) :4932–4947.
- Yu, J.
2016. Single-Molecule Studies in Live Cells. Annual Review of Physical Chemistry, 67(1) :565–585.
- Yu, Y., M. Li, and Y. Yu
2019. Tracking Single Molecules in Biomembranes : Is Seeing Always Believing? ACS Nano, 13(10) :10860–10868.
- Zala, D., M.-V. Hinckelmann, H. Yu, M. M. Lyra da Cunha, G. Liot, F. P. Cordelières, S. Marco, and F. Saudou
2013. Vesicular Glycolysis Provides On-Board Energy for Fast Axonal Transport. Cell, 152(3) :479–491.
- Zhang, K., Y. Osakada, W. Xie, and B. Cui
2011. Automated image analysis for tracking cargo transport in axons. Microscopy Research and Technique, 74(7) :605–613.
- Zhang, S., H. Gao, and G. Bao
2015. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. ACS Nano, 9(9) :8655–8671.
- Zhao, C., J. Takita, Y. Tanaka, M. Setou, T. Nakagawa, S. Takeda, H. W. Yang, S. Terada, T. Nakata, Y. Takei, M. Saito, S. Tsuji, Y. Hayashi, and N. Hirokawa
2001. Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A Caused by Mutation in a Microtubule Motor KIF1B β . Cell, 105(5) :587–597.
- Zhao, J. and M. H. Stenzel
2018. Entry of nanoparticles into cells : the importance of nanoparticle properties. Polymer Chemistry, 9(3) :259–272.

Zipfel, W. R., R. M. Williams, and W. W. Webb

2003. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. Nature Biotechnology, 21(11) :1369–1377.

Zoghbi, H. Y. and M. F. Bear

2012. Synaptic Dysfunction in Neurodevelopmental Disorders Associated with Autism and Intellectual Disabilities. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(3) :a009886–a009886.

Titre : Développement d'une méthode de mesure et d'analyse du transport intraneuronal dans le cerveau de larve de poissons zèbre par suivi de nanocristaux non-linéaires en microscopie de second-harmonique : application à l'étude d'anomalies de transport chez des poissons portant une mutation retrouvée dans des neuropathies humaines.

Mots clés : transport intraneuronal, poisson-zèbre, nanocristaux nonlinéaires, microscopie multiphotonique, algorithme de suivi

Résumé : Un grand nombre de maladies neurologiques et neurodégénératives partagent un point commun : le transport moléculaire intracellulaire indispensable au bon développement et la maintenance des fonctions du neurone est dérégulé. Peu d'outils permettent la mesure précise de ce transport en culture et encore moins in vivo. Durant ma thèse j'ai mis au point une méthode de mesure du transport intraneuronal dans des neurones du cerveau de larves de poisson zèbre vivantes. Cette méthode s'appuie sur

l'internalisation spontanée par les neurones de nanocristaux   réponse optique non linéaire et le suivi du transport des vésicules les contenant, par microscopie multiphotonique rapide à une longueur d'onde d'excitation proche infrarouge permettant des mesures à plus de 100 μm de profondeur dans le cerveau.   l'aide de cette technique j'ai détecté des modifications subtiles du transport dans des poissons transgéniques portant une mutation sur un gène impliqué dans des maladies neurologique humaines.

Title : Development of a method for measuring and analyzing intraneuronal transport in the brain of zebrafish larvae by tracking the second-order nonlinear response of nanocrystals by two-photon excitation microscopy : application to the study of transport abnormalities in transgenic zebrafish carrying a mutation found in human neuropathies.

Keywords : intraneuronal transport, zebrafish, nonlinear nanocrystals, mutliphoton microscopy, tracking algorithm

Abstract : A large number of neurological and neurodegenerative diseases share a common feature : the molecular transport essential for the proper development and maintenance of neuronal functions is deregulated. Few tools allow for the detailed study of this transport in culture and even less in vivo. During my thesis I developed a method to measure the intraneuronal transport in neurons of the brain of living zebrafish larvae. This method is ba-

sed on the spontaneous internalization by the neurons of nanocrystals with non-linear optical response and the tracking and motion analysis of the vesicles containing them, using a fast-multiphoton microscope at a near-infrared excitation wavelength allowing measurements at a depth of more than 100 μm in the brain. Using this technique I have detected subtle changes in vesicle transport in transgenic fishes with a mutation in a gene involved in human neurological diseases.