



Chapitre 6 – Au labo

L'expérience d'imagerie calcique que vous allez voir a pour but d'identifier l'**activité spontanée ou évoquée de centaines de neurones en même temps**. Comment fait-on ? Le principe général est le suivant : on fait entrer une **sonde fluorescente sensible aux ions calcium, ici le Fura2**, dans les neurones ; comme cette sonde **change de fluorescence en fonction des changements de concentration intracellulaire en ions calcium**, si on quantifie les changements de fluorescence dans chaque neurone du champ analysé, on quantifie l'activité de chaque neurone. En effet, les ions calcium entrent à travers les canaux calcium présents dans la membrane du corps cellulaire en réponse à l'émission de potentiels d'action sodiques. Ce type d'expérience permet de comprendre l'activité spontanée ou évoquée d'un réseau de neurones et de voir ses changements au cours notamment du développement ou de pathologies.

Pourquoi utiliser l'imagerie et non pas l'électrophysiologie pour ce type d'expérience ?

On utilise l'imagerie car on ne peut pas **enregistrer l'activité de centaines de neurones** à l'aide d'électrodes, il faudrait « patcher » des centaines de neurones et avoir des centaines d'amplis, etc. L'imagerie a toutefois des inconvénients par rapport à l'électrophysiologie notamment sa lenteur due au temps d'acquisition des images.

Pourquoi utiliser l'imagerie calcique et non pas l'imagerie sodique ou même l'imagerie des changements de potentiels à l'aide d'une sonde sensible au voltage ?

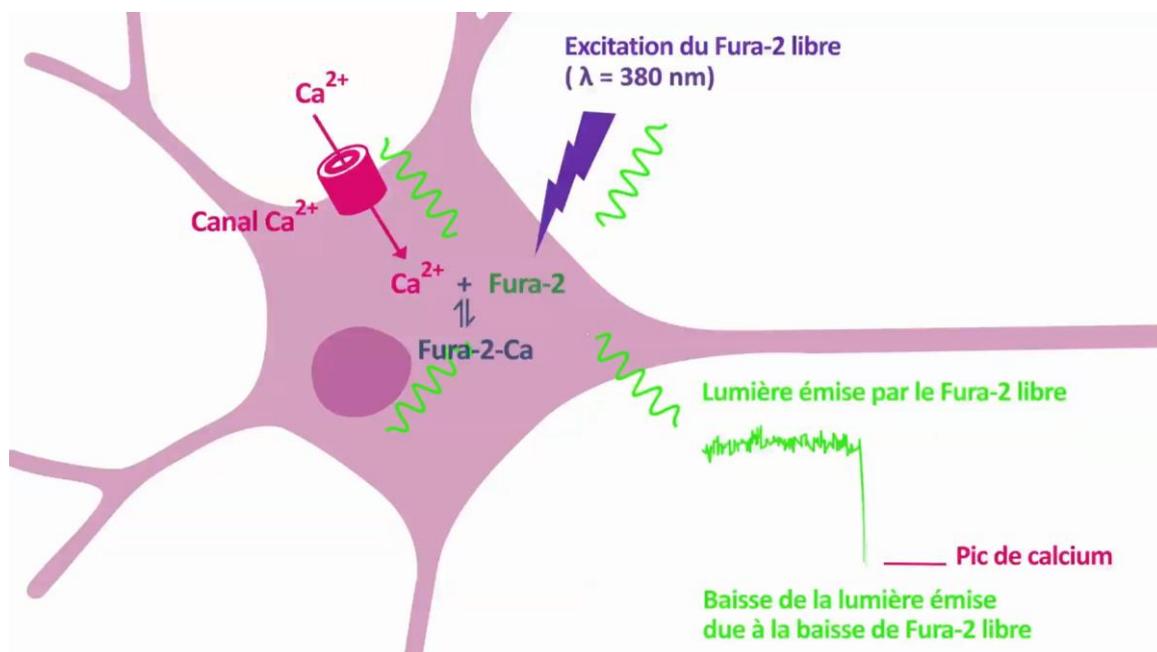
Il se trouve qu'à l'heure actuelle, les sondes sensibles aux ions calcium sont les **plus fiables**.

COMMENT ETUDIER LES VARIATIONS DE CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DES IONS CA²⁺ (5:40)

Le but de cette expérience est de faire entrer une sonde calcique fluorescente, le Fura2 AM à l'intérieur des neurones. Pour cela, on commence par allumer la plaque chauffante qui maintiendra les tranches de cerveau pendant l'incubation à une température de 30-32 degrés Celsius. On vient ensuite déposer 2,5 mL de solution de liquide extracellulaire artificiel oxygéné dans la petite chambre où va se passer l'incubation. Les tranches de cerveau maintenues en ce milieu artificiel ont été réalisées au préalable. On vient en sélectionner trois. Le choix des tranches se porte sur la présence de la zone du cerveau que l'on souhaite étudier et sur la qualité de celle-ci. Le Fura2 AM est la sonde fluorescente que nous utilisons pour suivre l'activité calcique des neurones. On vient déposer 25 microlitres de Fura2 AM sur les tranches de cerveau. Le Fura2 AM est une molécule liposoluble grâce au groupement AM, acétoxy-méthyl ester. Une fois dans le neurone, la molécule de Fura2 AM va perdre son groupement AM grâce aux estérases endogènes qui vont venir cliver la sonde calcique au niveau de ce groupement. Ensuite, le Fura2, seul, sans le groupement AM, ne peut plus sortir du neurone. Dans nos conditions expérimentales, les molécules de Fura2 qui ne sont pas fixées



à des ions calcium émettent de la fluorescence. L'incubation se fait dans le noir, car la fluorescence de la sonde peut s'atténuer ou s'éteindre totalement en présence de lumière. Après les vingt minutes d'incubation, nous faisons un rinçage de ces tranches de cerveau, c'est-à-dire que les tranches sont placées dans une solution de liquide extracellulaire artificiel oxygéné dans l'attente de leur utilisation. Dans cette pièce d'enregistrement, il y a un dispositif optique qui permet une acquisition rapide, c'est-à-dire une image toutes les 100 ms, de l'activité calcique des neurones grâce à un laser spécifique. Cet appareil est équipé d'un poste d'enregistrement électrophysiologique permettant de faire simultanément la technique de patch clamp. Cette chambre d'enregistrement est perfusée en continu avec une solution de liquide extracellulaire oxygéné. Le balayage de la tranche de cerveau par ce laser spécifique permet d'obtenir des films, qui sont en fait une succession de plusieurs milliers d'images. Un film correspond à l'activité calcique d'une centaine de neurones au cours du temps, présents dans un même champ d'acquisition. Mais que se passe-t-il dans chacun des neurones et comment fonctionne cette sonde calcique fluorescente, le Fura2? Lors d'une activité neuronale, il y a une production de potentiels d'action. Ces potentiels d'action provoquent une dépolarisation de la membrane du neurone qui va permettre l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'ouverture de ces canaux calciques permet donc au calcium extracellulaire de rentrer dans les neurones. Ces ions calcium intracellulaires viennent se fixer à la sonde calcique Fura2, et dans cette configuration-là, la molécule de Fura2 n'est plus fluorescente. Lorsqu'on excite la molécule de Fura2 avec le laser, on enregistre donc des variations de fluorescence émise par cette molécule, selon si elle est liée ou non au calcium.



L'enregistrement de ces variations de fluorescence, à la fois dans le temps et dans l'espace, chaque neurone présent dans le champ d'enregistrement, représente donc l'activité neuronale de manière indirecte. Nous allons voir maintenant comment on peut analyser ces films obtenus en imagerie calcique. L'analyse de ces données permet, par exemple, de mettre en évidence des activités neuronales synchrones. Nous utilisons un logiciel qui a été développé et mis au point dans le laboratoire. Pour faire une analyse automatique de nos



films d'imagerie calcique, nous rentrons dans le logiciel les paramètres d'acquisition de chacun de ces films, comme par exemple la résolution temporelle, c'est-à-dire la durée de chaque image du film. Ce logiciel nous permet de faire le contour de chacun des neurones. Les contours de neurones sont associés avec leur propre variation de fluorescence calcique au cours du temps. Ce même logiciel nous permet, en plus, d'analyser plus en détail chaque variation de fluorescence de chaque neurone au cours du temps. En effet, le logiciel marque de manière automatique le début, par des petits ronds, et la fin, par des petits carrés, de chacun des événements ou variation de fluorescence calcique. Le logiciel réalise ce marquage des événements calciques pour tous les neurones enregistrés, c'est-à-dire tous les neurones dont le contour a été marqué. Ce même logiciel nous dresse un graphique, que l'on appelle "Raster plot", de l'activité calcique des neurones enregistrés. L'axe des abscisses représente le temps, l'axe des ordonnées représente chaque neurone individuellement, et chaque point noir que l'on voit dans ce graphique correspond à un événement calcique pour un neurone donné à un temps donné. Les lignes verticales représentent des événements synchrones de plusieurs dizaines de neurones à un temps donné. On peut enregistrer l'activité électrique d'un neurone en même temps que son activité calcique. Lorsque le neurone émet un potentiel d'action, nous enregistrons une variation de la fluorescence. L'amplitude et la durée du signal calcique sont proportionnelles au nombre de potentiels d'action émis par le neurone enregistré. En conclusion, la technique d'imagerie calcique que je vous ai présentée permet d'enregistrer l'activité de centaines de neurones à la fois. Cette technique permet ainsi de comprendre l'activité de réseaux de neurones.