

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Spécialité : Neurosciences

Présentée par Fabien NADRIGNY

Pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

IDENTIFICATION ET EXOCYTOSE D'ORGANELLES DANS LES ASTROCYTES EN CULTURE : COUPLAGE DE LA MICROSCOPIE À ONDE ÉVANESCENTE ET DE LA DÉCOMPOSITION SPECTRALE

Soutenue le 26 septembre 2006 devant le jury composé de :

Pr. Régis LAMBERT	:	Président
Pr. Gérard DREYFUS	:	Rapporteur
Pr. Maïte COPPEY-MOISAN	:	Rapporteur
Pr. Serge CHARPAK	:	Directeur de thèse
Dr. Martin OHEIM	:	Co-directeur de thèse

À Marie-Clothilde, *sorori, sponsae meae*

S'il fallait donner une comparaison qui exprimât mon sentiment sur les sciences de la vie, je dirais que c'est un salon superbe tout resplendissant de lumière, dans lequel on ne peut parvenir qu'en passant par une longue et affreuse cuisine.

Claude BERNARD

Table des matières

Remerciements	13
Résumé	17
I Introduction générale	19
1 Contexte	21
1.1 Interaction neurone-astrocyte	21
1.1.1 Les astrocytes dans le système nerveux central	21
1.1.2 Les astrocytes sont <i>activables</i>	23
1.1.3 Interaction bi-directionnelle entre les astrocytes et les neurones	25
1.1.4 L'hypothèse de la synapse tri-partite	27
1.2 L'exocytose du glutamate dans les astrocytes	29
1.2.1 Différentes voies possibles de sécrétion	29
1.2.2 Rappel sur l'exocytose régulée	32
1.2.3 Évidences en faveur de l'exocytose régulée	34
2 Méthodes	43
2.1 Introduction	43
2.2 La réflexion totale interne	44
2.2.1 La loi de Snell-Descartes	45
2.2.2 Considérations énergétiques	46
2.2.3 L'onde évanescente	47
2.2.4 Application	48

2.3	Marquage des organelles	49
2.3.1	Colorants chimiques	49
2.3.2	Protéines fluorescentes	50
2.4	Décomposition spectrale (<i>Unmixing</i>)	53
2.4.1	Principe	53
2.4.2	Cas particulier du <i>unmixing</i> uni-vésiculaire	56
2.5	Conclusion	57
 II Résultats		59
 1 Mise au point de la méthode : décomposition linéaire spectrale uni-vésiculaire		61
1.1	Introduction	61
1.1.1	Applications du <i>unmixing</i>	61
1.1.2	Principe du <i>unmixing</i>	62
1.1.3	Cas particulier du <i>unmixing</i> uni-vésiculaire	63
1.2	Résultats	64
1.2.1	Observation des organelles - figure 1	64
1.2.2	<i>Unmixing</i> des pixels - figure 2	65
1.2.3	Spectres de référence et pH - figure 3	67
1.2.4	Validité des spectres de référence - figure 4	67
1.2.5	Détection de l'expression et de la colocalisation des protéines - figure 5	67
1.2.6	Intervalle de confiance et SBR - figure 6	69
1.3	Conclusion	69
1.4	Article	73
 2 Application de la méthode : colocalisation entre l'acridine orange et la EGFP		75
2.1	Introduction	75
2.2	Résultats	76

2.2.1	Métachromasie de l'AO dans les organelles - figure 1	76
2.2.2	Obtention des spectres de référence de m.AO et d.AO - figures supplémentaires 1 et 2	76
2.2.3	<i>Unmixing</i> de l'AO - tableau 1 et figure supplé- mentaire 3	77
2.2.4	<i>Unmixing</i> de l'AO en présence d'organelles EGFP - tableau 2 et figure 2	78
2.3	Conclusion	78
2.4	Article (soumis)	79
3	Autofluorescence	81
3.1	Introduction	81
3.2	Identité des organelles AF	82
3.2.1	Intensité	82
3.2.2	Répartition dans la cellule et mouvement	84
3.2.3	Spectres	86
3.2.4	Taille	88
3.2.5	Caractérisation moléculaire	90
3.3	Exocytose des organelles AF	97
3.3.1	Introduction	97
3.3.2	Vagues calciques	97
3.3.3	Exocytose	102
3.3.4	Conclusion	110
3.4	Discussion	111
3.4.1	Identification	111
3.4.2	Exocytose	114
III	Conclusion générale	119
1	Rappel des résultats	121
1.1	<i>Unmixing</i> uni-vésiculaire	121

1.2	EGFP et Acridine orange	123
1.3	Identification et exocytose des organelles autofluorescents	125
2	Perspectives	127
2.1	<i>Unmixing</i> en champ évanescent	127
2.2	Identité des organelles de sécrétion dans les astrocytes en culture	129
2.3	Conclusion	131
IV	Annexes	133
A	Microscopie à onde évanescente	135
A.1	Description du montage	135
A.1.1	Source de lumière	135
A.1.2	Dispositif pour le champ évanescent	136
A.1.3	Formation de l'image	137
A.2	Réglage	138
A.2.1	Laser	138
A.2.2	Polariseurs	139
A.2.3	Modulateur acousto-optique	139
A.2.4	Entrée dans le microscope	140
A.2.5	Champ évanescent	140
B	Normalisation et dénormalisation des spectres	143
B.1	Normalisation	143
B.2	Dénormalisation	145
C	Test vectoriel des valeurs aberrantes	147
C.1	Introduction	147
C.2	Notations	148
C.3	Écart entre le pixel i et ses voisins	148
C.4	Variabilité des pixels autres que i	149
C.5	Synthèse	151

D	Justification du <i>unmixing</i> de l'organelle (et pas seulement du voxel)	153
D.1	Principe	153
D.2	Exemple	155
E	Intervalle de confiance	157
E.1	Définition de la région de confiance	157
E.2	Extraction d'un intervalle de confiance	158
E.3	Calcul de l'intervalle de confiance	159

Remerciements

C'est à Marie-Clothilde que s'adresse en premier ma reconnaissance, pour sa confiance et sa patience au long de ces années de vache maigre et de travail intense. Comme le fait remarquer Chesterton, le mariage sert à régler des problèmes qui n'existeraient pas sans lui. Aussi n'aurais-je jamais pu m'amuser avec le champ évanescent et le *unmixing* si elle ne s'était pas occupée si bien de nos enfants ! Mais les temps ont changé depuis l'époque du créateur de *Father Brown* et il semble qu'en général, il ne reste du mariage que les problèmes ! J'espère être capable du bienheureux anti-conformisme de Marie-Clothilde pour lui rendre au centuple son abnégation.

Nombreuses sont les autres personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail. Après Dieu, source de tout bien, je dois d'abord remercier mes grands-parents pour l'éducation qu'ils m'ont donnée par leur exemple lorsqu'ils m'ont gardé. Le "Quoi que vous fassiez, ..." de Raymond sera toujours comme une étoile pour guider ma route laborieuse. Pauvre Staline qui a dû s'inventer un Stakanov, c'est dans une famille parisienne qu'il fallait le chercher. Le dernier bolchevique m'a transmis définitivement cette morale effrayante selon laquelle il n'est de bonheur qu'en travaillant, et en travaillant bien ! Morale chez lui heureusement humanisée par l'aiguillon de la recherche de la vérité et l'admiration de la seule œuvre vraiment gratuite : la Création.

La motivation nécessaire à la recherche se trouve chez certains dans la curiosité. L'envie d'être utile et le goût de contempler la nature sont mes carottes à moi. Je crois que je dois la seconde en partie à Oscar.

Sans remonter aux heures passées à me nourrir et me changer, je tiens

bien sûr à remercier aussi mes parents pour la part essentielle de mon éducation. Au delà des mots — mais pas sans — ils m'ont donné un bel exemple de conscience professionnelle et d'amour de leur métier. Je veux croire également qu'ils ne sont pas pour rien dans mon attrait pour les sciences de la vie.

Je n'oublie pas mes amis de — presque — toujours mais qui, heureusement pour eux, ont peu à voir avec mes études.

Enfin, je remercie l'ensemble du laboratoire de Neurophysiologie et nouvelles microscopies qui m'a accueilli depuis mes débuts dans la recherche. En particulier Martin Oheim, mon directeur de DEA et de thèse. Je crois que son encadrement scientifique a été excellent et je le remercie pour sa disponibilité et la confiance sans bornes qu'il m'a témoignée, même lorsque je lui cassais tout son matériel. Je lui suis aussi reconnaissant de s'être parfois chargé de besognes techniques que ni lui ni moi n'aurions dû avoir à faire dans le meilleur des mondes. Nos relations ont eu des hauts et des bas, des chauds et des froids... Au final, je suis satisfait d'avoir pu travailler avec un chercheur alliant compétence, motivation et intelligence, ce qui est plutôt rare.

Merci aussi à Françoise qui m'a souvent donné de son temps pour m'expliquer le fonctionnement d'appareils mystérieux et à Annette pour ses belles préparations, ses explications toujours intéressantes et la patience dont elle a fait preuve face à mes étourderies perpétuelles...

Parmi les biologistes qui ont eu la patience de m'apprendre les rudiments de leur savoir-faire, je n'oublie pas non plus nos confrères allemands Petra, Christian, Johannes et Frank qui m'ont si bien accueilli que je vais faire mon post-doc chez eux!

Merci enfin aux directeurs d'équipe et à Mohammed, Carcajou, Aren, Andreï, Karim, Yann, Gaëlle — je lui dois toujours une bière — Thomas, Mace, Mateo, Matthieu, Jérôme, Jean-François, France, Béatrice, Pascale et Helena. Leurs conseils et leurs coups de main par ci par là, mais surtout leur amitié m'ont soutenu au long de la thèse qui — comme chacun sait —

comporte de rares îlots de jubilation environnés d'une mer de galère !

Je garde un très bon souvenir de mes passages à l'équipe de statistique appliquée de l'ESPCI. Au milieu de ce couloir sombre et désolé, le bureau accueillant et lumineux d'Isabelle Rivals et de Léon Personnaz m'a toujours ouvert ses portes pour entendre mes questions et y répondre avec rigueur, pédagogie et humour.

Enfin, de façon plus académique mais tout aussi sincère, je remercie les professeurs Maïte Coppey et Gérard Dreyfus d'avoir accepté d'être rapporteurs dans des conditions un peu précipitées. Merci à Serge Charpak d'avoir bien voulu tenir le rôle officiel de directeur à la place de Martin Oheim et au Professeur Régis Lambert d'avoir été assez aimable pour accepter le rôle de Président du jury une semaine avant la soutenance...

Résumé

Les astrocytes sont capables de sécréter des gliotransmetteurs en réponse à une stimulation qui engendre l'augmentation de la concentration calcique intra-cellulaire. Différents mécanismes de sécrétion ont été proposés, parmi lesquels l'exocytose régulée. Mais les expériences menées dans le but d'observer la fusion d'organelles individuels dans des astrocytes en culture ont conduit à des résultats contradictoires, notamment en terme d'identité des vésicules libérables. Nos expériences préliminaires nous ont convaincus que les conflits sur l'identité des organelles libérables sont dus à de fausses co-localisations à cause du recouvrement spectral des marqueurs fluorescents utilisés et de la présence d'autofluorescence dans les astrocytes en culture.

Nous avons donc adapté la décomposition spectrale à l'identification rigoureuse d'organelles individuels et au suivi de leur exocytose. La décomposition spectrale permet la séparation de sources de fluorescence mal séparées et ainsi l'étude de l'expression et de la colocalisation de protéines fluorescentes, même en présence d'autofluorescence. Nous avons à cette occasion introduit un intervalle de confiance du résultat de l'estimation des quantités de colorants. Appliquée au marquage des organelles astrocytaires avec la EGFP et l'acridine orange, cette méthode a montré que l'apparente colocalisation entre ces marqueurs reflète en fait la présence d'acridine orange plus intense que la EGFP et co-existant dans les mêmes organelles sous deux formes verte et rouge. À l'aide de la décomposition spectrale et de la microscopie à onde évanescente, nous avons ensuite montré que les organelles autofluorescents dans les astrocytes sont en majorité des lysosomes capables de fusionner lors d'une stimulation qui engendre l'augmentation

du calcium intra-cellulaire. Ces lysosomes sont peut-être les organelles majoritairement responsables de l'exocytose dans les astrocytes en culture.

Première partie

Introduction générale

Chapitre 1

Contexte

1.1 Interaction neurone-astrocyte

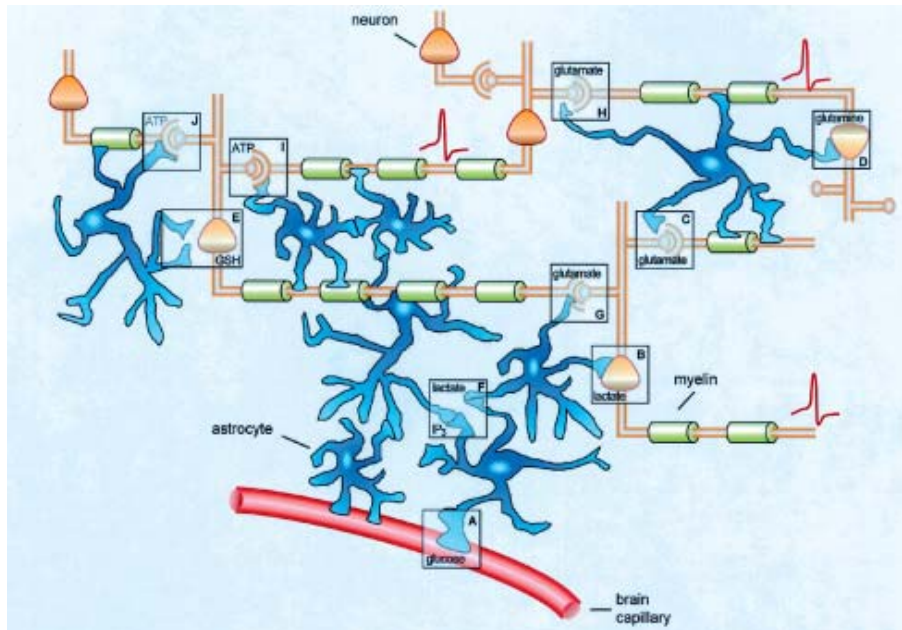
1.1.1 Les astrocytes dans le système nerveux central

Les astrocytes sont des cellules gliales du système nerveux central. Découvertes il y a un peu plus d'un siècle par Golgi, ils diffèrent des neurones par trois caractéristiques essentielles illustrées sur le schéma 1.1.

Premièrement, les astrocytes (représentés en bleu sur le schéma) ne sont pas des cellules excitables électriquement à la différence des neurones (représentés en orange) qui génèrent des signaux électriques se propageant sous forme de potentiels d'action (schématisés en rouge). Cette absence d'excitabilité électrique commune à l'ensemble des cellules gliales explique pourquoi les astrocytes ont d'abord été considérés notamment par Rudolph Virchow à la fin du XIX^esiècle comme des cellules secondaires du système nerveux central, assurant une fonction de ciment-colle entre les neurones, d'où le nom de glie ($\gamma\lambda\omicron\iota\varsigma$ en grec).

Deuxièmement, les neurones sont majoritairement connectés par des synapses chimiques (encadrés C, G et H) qui assurent le transfert de l'information sans continuité physique entre les cellules. Au contraire, les astrocytes sont le plus souvent directement couplés par des complexes de protéines connexines qui forment des jonctions lacunaires (ou communicantes)

FIG. 1.1 – Situation des astrocytes dans le système nerveux central



Ce schéma situe les astrocytes (en bleu) en lien avec les réseaux de neurones (en orange) et les capillaires sanguins (en rouge). Contrairement aux neurones, cellules excitables qui génèrent des potentiels d'action (traces rouges), les astrocytes ne présentent pas d'excitabilité électrique. Ils ne sont pas couplés par des synapses chimiques mais par des jonctions lacunaires qui assurent la continuité physique entre deux cellules adjacentes. Les boîtes attirent l'attention sur les sites d'interaction possible entre les astrocytes et les neurones, les astrocytes et les capillaires et les astrocytes entre eux. Extrait de [1].

assurant la continuité entre deux cellules adjacentes (encadré F).

La troisième différence est moins générale mais concerne directement le rôle des astrocytes dans le système nerveux central. Le nom d'*astrocyte*, qui signifie cellule étoilée, a été donné à ces cellules à cause de leurs très nombreux prolongements qui leur permettent de contacter d'un côté les capillaires sanguins (en rouge sur le schéma, encadré A) et de l'autre les réseaux de neurones au niveau des axones, des corps cellulaires (encadrés

B et D) ou des synapses. Cette association morphologique correspond à une association fonctionnelle. En effet, les astrocytes participent au couplage neuro-vasculaire, notamment en régulant le flux sanguin comme l'a confirmé récemment *in vivo* l'étude de Takano et al. [2]. Par ailleurs, les astrocytes permettent le maintien de l'homéostasie du milieu extra-cellulaire en particulier en transportant des ions et des neurotransmetteurs en excès à l'intérieur de leur cytoplasme [3, 4].

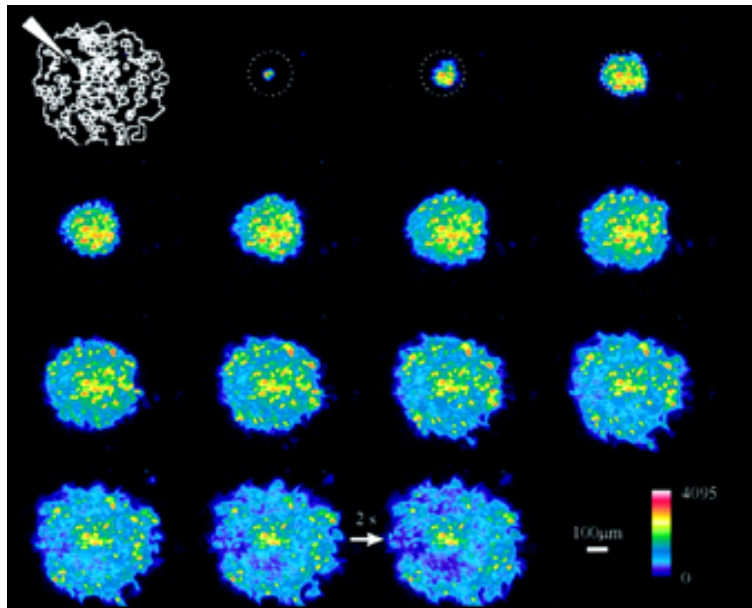
Les astrocytes interviennent aussi dans d'autres processus comme le développement ou la neuro-inflammation mais on a longtemps considéré qu'ils ne participaient pas directement au traitement de l'information réservé aux seuls neurones [5, 6].

1.1.2 Les astrocytes sont *activables*

S'ils ne génèrent pas de potentiels d'action, les astrocytes répondent en revanche à de nombreux stimuli par une activation visible sous la forme de l'augmentation de la concentration calcique intra-cellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). Cette propriété a été découverte en 1990 en appliquant du glutamate sur des astrocytes en culture [7]. La réponse calcique se manifeste dans ces conditions par une augmentation locale de $[Ca^{2+}]_i$ qui se propage aux cellules voisines puis revient au point d'initiation sous la forme de vagues oscillantes.

En fait, les astrocytes possèdent en culture et *in situ* de nombreux récepteurs membranaires couplés à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ [8]. Ainsi l'application en culture de sérotonine (5HT) ou de dopamine déclenche-t-elle la naissance de vagues calciques [9, 10]. Il est également possible de les déclencher par une stimulation mécanique car les astrocytes expriment du moins en culture des récepteurs mécano-sensibles couplés à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ [11]. La figure 1.2 montre la propagation d'une telle vague dans des astrocytes en culture à partir d'une cellule stimulée mécaniquement. Dans cette expérience, les astrocytes sont confluent mais il a été montré que les vagues peuvent aussi se propager entre des cellules non adjacentes [12].

FIG. 1.2 – *Propagation d'une vague calcique en réponse à une stimulation mécanique*



La stimulation mécanique d'un seul astrocyte induit la propagation d'une vague calcique dans une culture d'astrocytes confluents. Le dessin dans le coin supérieur gauche montre la position de la pipette par rapport à l'astrocyte stimulé et au champ de vue. La séquence des images fluorescentes, espacées de 2 secondes, comme l'indique la flèche, va de gauche à droite et de haut en bas. La première montre l'élévation de $[Ca^{2+}]_i$ dans l'astrocyte stimulé. Le cercle en traits pointillés délimite une aire de $200 \mu m$ de diamètre. L'échelle de couleur indique la représentation linéaire en pseudo-couleurs de l'intensité de fluorescence allant de 0 à 4095 cts. Extrait de [13].

Comme dans de nombreux autres types cellulaires [14], l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans le cytoplasme provient de l'ouverture des stocks calciques intra-cellulaires (entre autres le reticulum endoplasmique) déclenchée par la production d' IP_3 mais aussi de canaux membranaires perméables au calcium [15, 16]. Ensuite, la propagation inter-cellulaire, la génération des oscillations et le retour à l'équilibre font intervenir de nombreux facteurs couplés entre eux comme des organelles intra-cellulaires (mitochondries), les

jonctions lacunaires et des molécules (ATP, phosphatases) qui régulent la concentration d'IP₃ et de $[Ca^{2+}]_i$ [17, 18, 19].

Cette activité astrocytaire a été observée sous la forme de signaux calciques spontanés *in vivo* [20] et en réponse à une stimulation sensorielle [21]. Si le rôle physiologique de ces oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ n'est pas encore déterminé, leur existence est donc établie [22].

1.1.3 Interaction bi-directionnelle entre les astrocytes et les neurones

Les expériences de Parpura et al. de 1994 montrent que les astrocytes en culture libèrent du glutamate en réponse à des stimuli induisant l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ [23]. De fait, cette étude montre que dans des co-cultures astrocytes-neurones, ces stimuli spécifiques des astrocytes induisent aussi une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones voisins qui est inhibée par l'application d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques. Ces expériences ont apporté les premières évidences en faveur d'une action possible de l'activation des astrocytes sur les neurones.

Les enregistrements électriques des neurones ont confirmé cette interaction en mettant en lumière la modification de la transmission synaptique par l'activation des astrocytes. Ainsi Araque et al. en 1998 ont-ils montré dans des co-cultures astrocytes-neurones de l'hippocampe que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans les astrocytes est nécessaire et suffisante pour provoquer l'augmentation de la fréquence des courants synaptiques miniatures excitateurs et inhibiteurs [9]. Par ailleurs, ce phénomène, inhibé par l'antagoniste des récepteurs glutamatergiques AP5, n'est pas supprimé par des antagonistes glutamatergiques synaptiques. Ces données montrent donc qu'en culture du moins, les astrocytes peuvent agir sur la synapse via des récepteurs NMDA extra-synaptiques.

Un autre phénomène neuronal dépendant de l'activation des astrocytes en culture a été mis en évidence par la suite : les SIC (*Slow Inward Current*, courants lents entrants) [24]. L'observation de $[Ca^{2+}]_i$ dans les astrocytes

en même temps que l'enregistrement du courant dans les neurones voisins a en effet montré la corrélation entre l'activation calcique des astrocytes par photolibération de calcium et l'occurrence d'un courant neuronal entrant avec une constante de temps d'inactivation très grande (de l'ordre de la seconde). Comme les phénomènes précédents, la génération des SIC est dépendante des récepteurs glutamatergiques. Par ailleurs, cette étude a vérifié de façon intéressante que les concentrations calciques dans les astrocytes nécessaires pour induire les SIC étaient facilement atteintes lors d'activations plus physiologiques, en appliquant par exemple des catécholamines.

La validation de l'hypothèse d'un rôle possible des astrocytes dans la modulation de la synapse ne nécessitait plus que la mise en évidence des SIC *in situ*, ce qui fut réalisé en 2001 par l'étude de Parri et al. où l'on peut voir dans des tranches de thalamus de rat nouveau-né la corrélation entre la propagation des vagues calciques astrocytaires et la génération des SIC dépendant des récepteurs glutamatergiques NMDA [25]. Par ailleurs, l'action des astrocytes sur les neurones n'est pas restreinte à l'hippocampe ni réalisée uniquement via la sécrétion de glutamate, comme l'ont montré Kozlov et al. dans le bulbe olfactif de rat où le GABA libéré par les astrocytes engendre des SOC synchronisés (*Slow Outward Current*) dans des neurones distants [26]. Néanmoins, ces expériences ont révélé l'extrême rareté de l'occurrence des courants neuronaux induits par les astrocytes *in situ* (de l'ordre de 0,005 Hz dans [25]).

Auparavant, une étude avait montré que les astrocytes ne sont pas seulement capables d'induire des courants dans les neurones *in situ* mais qu'ils participent à une communication bi-directionnelle astrocyte-neurone en jouant un rôle d'intermédiaire au sein du réseau neuronal. Kang et al. ont en effet montré dans des tranches d'hippocampe de rat que la potentiation de synapses inhibitrices déclenchée par l'excitation d'interneurones passe par l'activation des astrocytes [27].

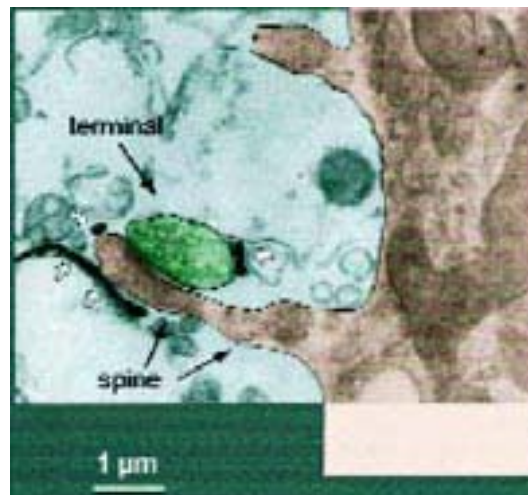
Les neurones et les astrocytes peuvent donc interagir *in vitro* et *in situ*.

1.1.4 L'hypothèse de la synapse tri-partite

L'ensemble des expériences précédentes et d'autres encore, par exemple celles décrivant dans le système nerveux périphérique le rôle d'autres cellules gliales dans la modulation synaptique [28], ont conforté l'idée que les cellules gliales participent au traitement de l'information en interagissant avec les neurones. Les données anatomiques confirment cette hypothèse en révélant l'étroite association fréquente de prolongements gliaux avec les synapses ¹.

La figure 1.3 en montre un exemple dans le cervelet. Une terminaison synaptique fait face à une épine dendritique de cellule de Purkinje qui est contactée par un prolongement d'une cellule de Bergman (marquée en noir par photoconversion) qui est l'analogue des astrocytes dans le cervelet.

FIG. 1.3 – Association entre une synapse et une cellule de Bergman



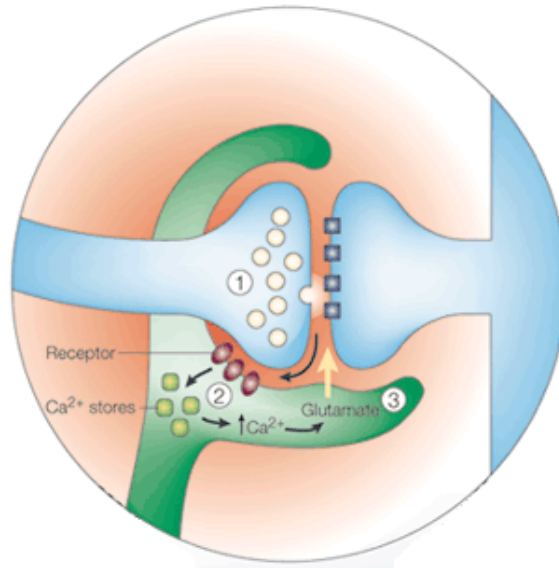
Cette image colorisée de cliché de microscopie électronique montre une synapse dans le cervelet avec l'élément pré-synaptique (en vert) et l'élément post-synaptique (en brun) à l'extrémité d'une épine dendritique d'une cellule de Purkinje. Une cellule de Bergman voisine a été injectée par un colorant dont la photoconversion produit une coloration noire : ce procédé permet de révéler un prolongement glial accolé à la synapse. Extrait de [29].

¹Un astrocyte peut contacter 140 000 synapses [22].

Les données fonctionnelles et anatomiques ont permis de préciser la théorie de la *synapse tri-partite* qui guidait l'ensemble de ces travaux. La figure 1.4 en montre le principe. Une synapse ne serait pas constituée seulement d'éléments pré et post-synaptiques neuronaux mais aussi des prolongements de cellules gliales (astrocyte dans les hémisphères cérébraux, cellule de Bergman dans le cervelet, cellule de Schwann à la jonction neuromusculaire,...). La proximité entre la synapse et les prolongements gliaux permettrait aux molécules de neurotransmetteurs sécrétés dans ou à l'extérieur de la fente synaptique par le neurone pré-synaptique de diffuser jusqu'à ces prolongements pour se lier aux récepteurs gliaux. L'activation de la cellule gliale qui en résulte déclencherait alors une cascade de réactions dont la libération de calcium hors des stocks calciques intra-cellulaires qui est capable d'engendrer la libération de *gliotransmetteurs* par exemple le glutamate. Finalement, ces molécules de gliotransmetteurs pourraient à leur tour diffuser vers la synapse et agir sur elle.

L'hypothèse de la synapse tri-partite permet d'expliquer les résultats de la modulation de l'activité synaptique et de la génération des SIC. Mais si son existence semble reposer sur des données solides, l'importance de son rôle dans le fonctionnement de la synapse reste très discutée, en particulier à cause de l'extrême rareté des SIC ou des SOC [25, 26].

Quoi qu'il en soit, il est démontré que les astrocytes — du moins en culture — libèrent du glutamate en réponse à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Mais différents modes de sécrétion semblent possibles. En dehors de l'implication de ce phénomène dans l'éventuelle synapse tri-partite, nous nous sommes focalisé sur une voie possible de libération : l'exocytose régulée par le calcium.

FIG. 1.4 – *Principe de la synapse tri-partite*

Une synapse (en bleu) est enveloppée par un prolongement astrocytaire (en vert). Le neurotransmetteur sécrété par le neurone pré-synaptique (1) se lie aux récepteurs d'une épine dendritique du neurone post-synaptique. Mais des molécules de neurotransmetteur diffusent en dehors de la fente synaptique (nuage rouge) pour se lier aux récepteurs astrocytaires. Leur activation provoque l'augmentation de la concentration calcique cytosolique (2) qui induit la sécrétion de glutamate par l'astrocyte (3). Extrait de [30].

1.2 L'exocytose du glutamate dans les astrocytes

1.2.1 Différentes voies possibles de sécrétion

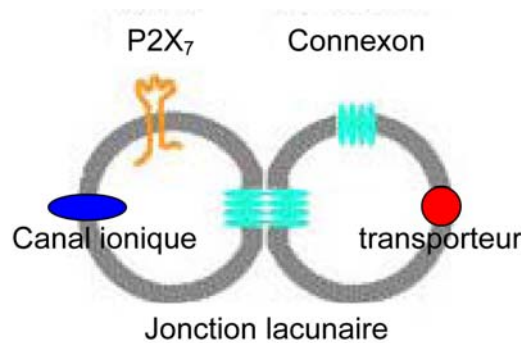
Au moins cinq voies de sécrétion du glutamate ont été mises en évidence dans les astrocytes en culture (voir [31, 32] pour des revues détaillées) :

- l'exocytose régulée par le calcium [33, 34, 35, 13, 36, 37, 38]
- le passage par les hémicanaux de connexines [39]
- l'inversion du transporteur membranaire du glutamate [40, 41]

- le passage par des canaux ioniques activés par la déformation de la membrane (*swelling*) [42]
- le passage par les récepteurs-canaux P2X₇ [43]

Le premier nécessite des vésicules chargées en glutamate tandis que les suivants utilisent le gradient de la concentration de glutamate entre le cytoplasme et le milieu extra-cellulaire. Le schéma de la figure 1.5 montre ces voies *cytoplasmiques*.

FIG. 1.5 – Mécanismes de la libération cytoplasmique de glutamate par les astrocytes



Cette figure représente les principales voies de libération du glutamate directement à partir du cytoplasme. Les deux cercles gris représentent deux astrocytes accolés par une jonction lacunaire constituée de deux connexons (en bleu clair). La présence d'un connexon sur une face non adjacente à un autre astrocyte constitue une porte vers le milieu extra-cellulaire à travers laquelle le glutamate cytoplasmique peut diffuser. Les astrocytes peuvent transporter le glutamate extra-cellulaire vers leur cytoplasme à l'aide de transporteurs membranaires (en rouge). Leur fonctionnement en sens inverse provoque la fuite du glutamate en dehors des astrocytes. En bleu est représenté un canal ionique perméable au glutamate activé lors de l'application d'une solution extra-cellulaire hypotonique (*swelling*). Le glutamate cytoplasmique peut aussi diffuser à travers les récepteurs-canaux P2X₇. Extrait de [32].

Aucune de ces voies — vésiculaire ou cytoplasmique — n'a été mise en évidence *in situ*. Cependant, toutes sont envisageables. Par exemple, les transporteurs membranaires du glutamate fonctionnent en sens inverse du gradient de glutamate grâce au co-transport de Na^+ et de K^+ . Aussi a-t-il été démontré que les neurones avaient très peu de chance d'utiliser ce mode de sécrétion en dehors de cas pathologiques d'inversion des concentrations de ces ions, par exemple en cas d'ischémie [40]. Mais vue la très faible épaisseur des prolongements astrocytaires, les calculs sur les neurones ne peuvent plus s'appliquer et une telle inversion n'est pas improbable dans le cas des astrocytes en conditions physiologiques. Pour la même raison, l'ouverture des canaux ioniques induite par le gonflement de la membrane (*swelling*) n'est pas impossible *in situ* d'autant plus que des données montrent que d'autres facteurs peuvent s'ajouter au *swelling* et potentielier la sécrétion d'aspartate par exemple [44].

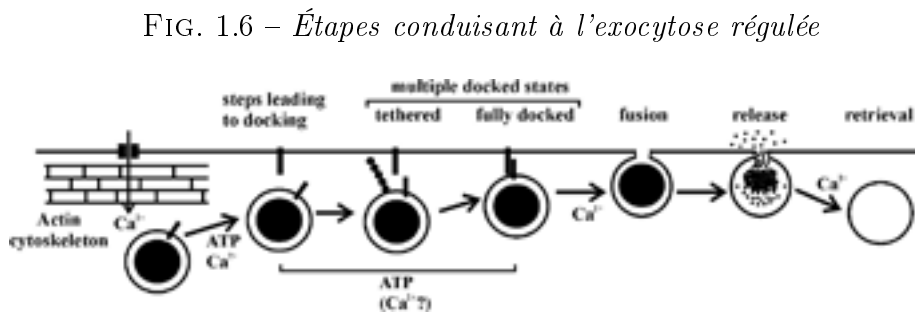
Les résultats des études mettant chacune en évidence un mode prépondérant de libération du glutamate semblent contradictoires. En fait, il est aujourd'hui difficile de savoir quel mécanisme est majoritaire et même s'il en est un. Ces voies ainsi que leurs antagonistes sont en effet souvent couplés, rendant souvent difficile l'isolation d'une seule parmi les autres [31]. Par exemple, les antagonistes des canaux Cl^- qui inhibent les canaux ioniques activés par *swelling* interfèrent avec l'exocytose dans la mesure où ce processus nécessite le fonctionnement de canaux Cl^- vésiculaires [45]. Autre exemple, l'ouverture des connexons (ou hémicanaux) est sensible à la concentration calcique extra-cellulaire, comme celle des récepteurs-canaux P2X_7 [39, 43]. Au contraire, certaines études montrent l'inexistence de voies qu'ils inhibent en fait. Ainsi du travail de Duan et al. sur les récepteurs-canaux P2X_7 : pour détecter la sécrétion de glutamate, les auteurs chargent les astrocytes avec des neurotransmetteurs radiomarqués, soit du glutamate soit du D-aspartate. Or, le D-aspartate n'est pas chargé dans les organelles de sécrétion, aussi n'est-il pas étonnant que sa sécrétion soit indépendante des facteurs indispensables à l'exocytose comme $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [43].

Dans notre étude, nous n'avons ainsi pas cherché à savoir si un mécanisme est prépondérant mais plutôt à mieux comprendre l'un d'eux. Pour des raisons tenant aux techniques à notre disposition mais aussi parce que cette voie est la plus facile à observer sélectivement, nous avons choisi d'étudier l'exocytose régulée par le calcium. Elle offre en outre l'avantage d'être bien décrite dans d'autres types cellulaires comme les neurones ou les cellules neuro-endocrines et bénéficie des outils de biologie moléculaire mis au point pour l'étude des bases protéiques de l'exocytose dans ces cellules.

1.2.2 Rappel sur l'exocytose régulée

Étapes de l'exocytose régulée

La sécrétion régulée de molécules par l'intermédiaire d'organelles intracellulaires passe par des étapes qui sont à peu près communes à toutes les cellules sécrétrices. La figure 1.6 schématise ce processus dans le cas de l'exocytose de granules à cœur dense de cellules neuro-endocrines.



L'exocytose d'un granule à cœur dense est ici schématisée. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ conduit au désassemblage du cytosquelette formé par le réseau d'actine, permettant le recrutement des granules à la membrane plasmique. L'amarrage et la préparation des granules peut s'ensuivre avant la fusion et la sécrétion du contenu des granules qui dépendent directement de $[Ca^{2+}]_i$. Extrait de [46].

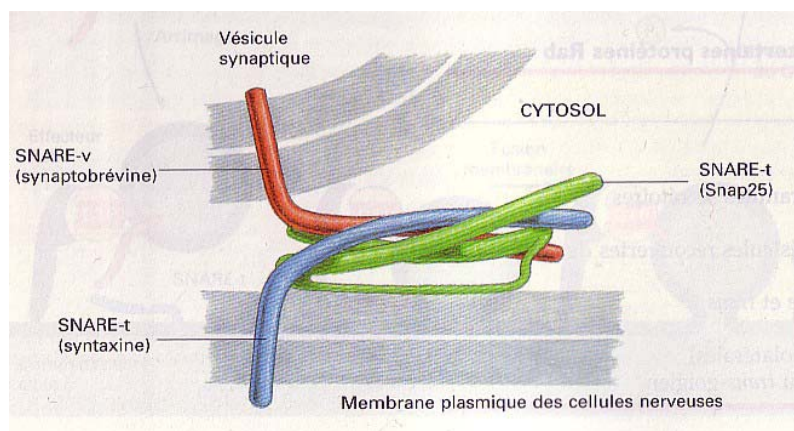
Les granules sont mobilisés en réponse à une stimulation qui engendre l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ puis dirigés vers la membrane plasmique. Leur

amarrage suit, puis leur fusion qui permet la sécrétion du contenu vésiculaire dans l'espace extra-cellulaire. Enfin, l'organelle est éventuellement récupéré par endocytose. La plupart de ces étapes sont généralement dépendantes de $[Ca^{2+}]_i$ en particulier la fusion.

Le complexe *trans-SNARE*

Dans le cas des vésicules synaptiques ou des granules à cœur dense mais aussi d'autres organelles capables d'exocytose régulée comme les lysosomes [47], la fusion est en effet déclenchée par le changement de conformation d'un complexe protéique, qui permet aussi leur amarrage à la membrane plasmique, en réponse à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. La figure 1.7 est un schéma simplifié de la structure cristalline d'un tel complexe formé de protéines issues de terminaisons synaptiques.

FIG. 1.7 – Structure du complexe *trans-SNARE*



Le complexe trans-SNARE responsable de l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique des terminaisons nerveuses sont composées de trois protéines. La SNARE-v synaptobrévine et la SNARE-t syntaxine sont des protéines trans-membranaires qui apportent chacune une hélice α dans le complexe. La SNARE-t Snap25 est une protéine membranaire qui apporte deux hélices α . Au final, un faisceau de quatre hélices α entrelacées lie ensemble les SNARE et par elles la vésicule avec la membrane plasmique. Extrait de [48, 49].

Ce complexe est appelé *trans-SNARE* parce qu'il est constitué de protéines SNARE (*Soluble NSF-attachment proteins receptors*) imbriquées l'une dans l'autre. Deux sont des protéines trans-membranaires, l'une vésiculaire (ici, en rouge, la synaptobrevine), l'autre étant présente dans la membrane plasmique (ici, en bleu, la syntaxine) tandis qu'une troisième est une protéine membranaire (ici, en vert, SNAP25). Comme nous le verrons par la suite, les SNARE vésiculaires sont très utiles d'un point de vue pratique car elles dépendent du type d'organelles. Ainsi est-il possible de reconnaître ces derniers en détectant quelles SNARE ils expriment.

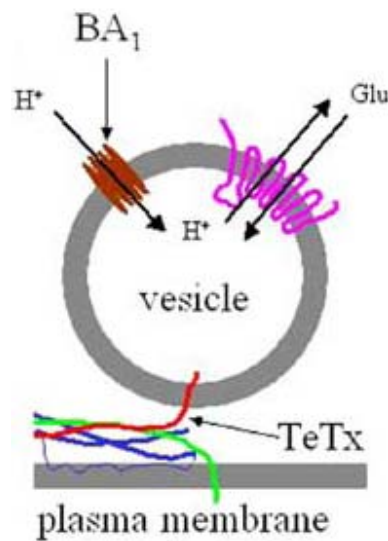
Par ailleurs, certains organismes expriment des protéases capables de cliver spécifiquement certaines SNARE. Ces toxines ont été isolées et permettent d'inhiber l'exocytose régulée [50]. Ce mécanisme est illustré dans la figure 1.8 qui schématise une vésicule glutamatergique. La tetanus toxine (TeTx) clive la synaptobrevine du complexe *trans-SNARE*. On peut voir sur le même schéma deux autres protéines qui sont des transporteurs vésiculaires indispensables à l'exocytose glutamatergique.

Transporteurs vésiculaires

Pour que du glutamate soit libéré lors de la fusion, il faut en effet que la vésicule de sécrétion en contienne. Or, son chargement intra-vésiculaire est réalisé par un transporteur membranaire VGlut (en violet sur la figure 1.8) qui utilise le gradient de la concentration de protons entre la lumière de la vésicule (acide) et le cytoplasme (neutre). Ce gradient est généré par un transporteur de protons qui fonctionne grâce à l'hydrolyse de l'ATP (H^+ -ATPase de type vésiculaire). Il peut être inhibé par la bafylomycine A_1 (BA_1 sur la figure 1.8) qui empêche ainsi indirectement la sécrétion.

1.2.3 Évidences en faveur de l'exocytose régulée

D'un point de vue subjectif, l'hypothèse de la participation directe des astrocytes au traitement de l'information serait renforcée s'il était montré que la libération de *gliotransmetteurs* se fait par exocytose régulée. En

FIG. 1.8 – *Protéines vésiculaires de l'exocytose du glutamate*

Une vésicule glutamatergique contient en plus de la protéine *SNARE* vésiculaire — ici la synaptobrévine, en rouge, qui peut être clivée sélectivement par la toxine tétanique (*TeTx*) — deux transporteurs qui permettent le chargement du glutamate dans la vésicule. L'un est un transporteur glutamatergique antiport, *VGlut*, qui utilise le gradient de la concentration de protons entre la lumière de la vésicule et le cytoplasme (deux flèches en sens inverse à travers la protéine en violet). L'autre est un transporteur uniport et charge des protons à l'intérieur de la vésicule pour générer le gradient protonique indispensable au fonctionnement des *VGlut* (flèche unique à travers la protéine en brun). Il utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (*H⁺-ATPase*). Extrait de [32].

ressortirait en effet l'idée que les astrocytes ne peuvent pas être de moindre importance que les neurones puisqu'ils seraient capables des mêmes mécanismes extrêmement sophistiqués. C'est probablement pourquoi les premiers partisans de la synapse tri-partite défendent en général la thèse de l'exocytose dans les astrocytes et ont multiplié les expériences pour la confirmer.

SNARE

Parpura et al. ont ainsi montré d'abord la présence de protéines SNARE dans des astrocytes en culture [33]. Compte tenu d'une part de la variation de l'expression des protéines vésiculaires avec la durée de culture [51] et d'autre part de la différence entre les phénotypes d'astrocytes fraîchement isolés et en culture [52], la mise en évidence de leur présence *in situ* était indispensable et il fallut attendre 2004 pour qu'elle soit réalisé par Wilhelm et al [34].

Les SNARE exprimées par les astrocytes jouent un rôle essentiel dans la sécrétion de glutamate en culture. En effet, Araque et al. ont montré que la stimulation mécanique d'un astrocyte préalablement chargé par la toxine botulique — qui clive la synaptobrevine comme la tetanus toxine dans la figure 1.8 — induit des SIC neuronaux réduits en amplitude de 90 % par rapport au contrôle [35].

Calcium intra-cellulaire $[Ca^{2+}]_i$

Autre évidence en faveur de l'exocytose régulée, la sécrétion de glutamate dépend de $[Ca^{2+}]_i$. Une méthode de mesure enzymatique en fluorescence a en effet permis à Innocenti et al. de voir en fluorescence la propagation de vagues de glutamate libéré par des astrocytes en culture stimulés mécaniquement [13]. Or, l'application de drogues qui empêchent l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, soit des inhibiteurs du remplissage des stocks calciques intra-cellulaires, soit un chélateur de Ca^{2+} , réduisent de 70 % environ la quantité de glutamate sécrété. Par ailleurs, malgré l'impossibilité technique dans cette étude de mesurer en même temps $[Ca^{2+}]_i$ et le glutamate, la similitude entre la vitesse de propagation des vagues glutamatergiques ($\sim 25 \mu\text{m.s}^{-1}$) et celle des vagues calciques ($\sim 20 \mu\text{m.s}^{-1}$ [7]) confirme le lien entre la sécrétion de glutamate et $[Ca^{2+}]_i$.

Transporteurs vésiculaires

Nous avons vu en 1.2.2 que le chargement de glutamate dans les vésicules de sécrétion requiert la présence et le fonctionnement de deux transporteurs : VGlut pour le glutamate et une H^+ -ATPase pour les protons. Dans la même étude que celle réalisée pour montrer la nécessité des SNARE, Araque et al. ont montré que l'inhibition des H^+ -ATPase par la bafylomycine A_1 fait chuter l'amplitude des SIC neuronaux induits par la stimulation des astrocytes de 60 % [35]. Par ailleurs, deux fois moins d'astrocytes ont été capables d'engendrer ce phénomène. Au contraire, l'article de Kozlov et al. publié en 2006 montre l'existence de SIC et de SOC (*Slow Inward Current* GABA-ergiques) neuronaux dans des tranches de bulbe olfactif de rat induits par la stimulation des astrocytes mais qui sont résistants à la bafylomycine A_1 [26]. C'est à notre connaissance la seule donnée expérimentale *in situ* qui s'oppose à l'hypothèse de l'exocytose régulée de gliotransmetteurs, mais il s'agit il est vrai d'une mesure indirecte via l'activité neuronale.

D'autre part, Montana et al. ont mis en évidence en 2004 la présence de transporteurs VGlut (1, 2 et 3) sur des astrocytes en culture et fraîchement isolés à partir du cortex visuel de rats [36]. Du moins en culture, leur marquage en immunofluorescence révèle une structure punctiforme. L'inhibition en culture de ces transporteurs par le rose bengale fait diminuer la libération de glutamate (mesurée par la méthode enzymatique) d'environ 50 %. Cet article présente aussi des images de colocalisation entre la synaptobrevine et les trois VGlut mais qui ne sont absolument pas convaincantes à cause de la distribution homogène des marqueurs.

En revanche, Bezzi et al. ont présenté la même année des images en microscopie électronique d'astrocytes de l'hippocampe où le marquage avec des anticorps spécifiques de VGlut1 et 2 révèle une localisation punctiforme et la colocalisation avec la cellubrevine, protéine SNARE des vésicules synaptiques [37].

Exocytose d'organelles individuels

Les astrocytes en culture possèdent donc et utilisent la machinerie nécessaire à l'exocytose régulée du glutamate. Clairement, l'analyse des études qui ont permis de le démontrer met en relief l'existence d'autres mécanismes de sécrétion déjà mentionnés car la libération de glutamate n'est jamais totalement supprimée par l'application des antagonistes de cette machinerie. Ces expériences souffrent en fait d'un manque de sélectivité intrinsèque parce que le glutamate globalement libéré est mesuré et que leur résolution temporelle et spatiale est trop faible pour voir des organelles individuels (20 μm et 0,5 s dans [13]). C'est pourquoi une technique permettant de n'observer que ce mécanisme à l'échelle uni-vésiculaire était indispensable pour étudier précisément cette voie de sécrétion. La microscopie à onde évanescente (TIRFM en anglais, voir 2.1) est cet outil et son application à l'observation de l'exocytose d'organelles individuels dans les astrocytes en culture a été réalisée en 2004 par Bezzi et al. [37].

Comme les expériences présentées dans cet article ressemblent aux nôtres, nous renvoyons le détail des protocoles au chapitre 2 consacré aux méthodes. Brièvement, les auteurs ont utilisé un colorant *sélectif* (la protéine de fusion EGFP-VGlut) et un colorant *fonctionnel* (l'acridine orange) pour mettre en évidence l'exocytose d'organelles soi-disant identifiés comme glutamatergiques². L'application, en culture d'astrocytes seuls, d'un agoniste des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (100 μM DHPG) provoque dans ces expériences la disparition rapide (moins d'une seconde) d'environ un tiers des vésicules *glutamatergiques* visibles en TIRFM. Ces fusions sont totalement supprimées par l'application de chélateurs de $[Ca^{2+}]_i$ ou de la toxine tetanique qui clive la synaptobrevine (voir 1.2.2). Ce résultat tranche avec les diminutions partielles observées dans les expériences présentées ci-dessus et confirme qu'elles étaient dues à la prise en compte de tous les mécanismes de libération du glutamate plutôt qu'à un défaut des antag-

²Nous verrons dans le chapitre 2 de la partie consacrée à nos résultats ce qu'il faut penser de la sélectivité de ces marquages.

onistes de l'exocytose. Pour confirmer le lien entre l'exocytose de ces organelles et la sécrétion du glutamate, Bezzi et al. ont utilisé de co-cultures astrocytes-insulinomes. Ces derniers répondent en effet au glutamate par l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Or, les auteurs ont observé la concomitance — ce qui ne signifie pas corrélation car d'autres organelles non fluorescents pouvaient être responsables de la sécrétion du glutamate³ — entre la disparition des organelles *glutamatergiques* et la réponse calcique des insulinomes.

Les résultats de cet article n'ont pu être reproduits par aucune équipe dans le monde, dont la nôtre, vraisemblablement à cause de problèmes de marquage par EGFP-VGlut que nous détaillerons au chapitre 2 de la deuxième partie. Par exemple, Crippa et al. trouvent une colocalisation très différente entre l'acridine orange et les vésicules synaptiques (40 % contre 75 %) marquées par la synaptobrevine [38]. Cependant, le travail de Bezzi et al. montre sans ambiguïté que les astrocytes en culture possèdent des organelles — glutamatergiques ou non — qui peuvent être libérés de manière régulée.

Différentes populations d'organelles de sécrétion

Une dernière condition nécessaire à l'exocytose du glutamate dans les astrocytes est bien sûr la présence d'organelles de sécrétion. Nous l'avons déjà implicitement évoquée en citant les résultats qui montrent le marquage punctiforme de protéines vésiculaires [51, 34] mais les images de microscopie électronique permettent d'aller plus loin en montrant la structure de ces organelles dans les astrocytes.

Ainsi les anticorps contre VGlut dans l'article de Bezzi et al. précédemment cité sont-ils détectés au voisinage d'organelles de 50 nm de diamètre environ [37]. Dans la même étude, on peut voir des organelles de la même taille après la transfection par la cellubrevine fusionnée à la EGFP et l'application d'anticorps contre la EGFP.

De même, Chen et al. dans un article publié l'année suivante, présentent

³voir le chapitre 3 de la deuxième partie

des images d'organelles en microscopie électronique après marquage par un colorant FM (entrée dans les organelles après endocytose) et photoconversion [53]. L'identité de ces organelles serait partiellement glutamatergique puisque leur colocalisation avec le glutamate marqué par un anticorps est de l'ordre de 65 %. Or, le diamètre de ces organelles est d'environ 300 nm.

La présence d'organelles de tailles très différentes correspond en fait à l'observation faite par Coco et al. l'année avant la parution de l'article de Bezzi et al. [54]. Les auteurs proposent l'existence de deux voies d'exocytose dans les astrocytes qui rendraient compte d'une part des différentes sensibilités de la libération d'ATP et de glutamate notamment à l'application d'agonistes des récepteurs glutamatergiques et d'autre part de la mise en évidence de deux types d'organelles dans un gradient de sucrose après fractionation sub-cellulaire [54]. Ces mesures montrent en particulier qu'un type d'organelles contient la synaptobrevine tandis que l'autre contient la secréto granine — marqueur des granules à cœur dense — et de l'ATP. En outre, les images de microscopie électronique présentées dans cet article montrent clairement la co-existence dans les mêmes cellules d'organelles de 150 nm et de 50 nm. Ces expériences ont été réalisées sur des cultures cellulaires d'hippocampe de rat. En outre, l'existence de vésicules synaptiques (*i. e.*, ici, de petite taille) capables de charger le glutamate a été montrée par la même équipe sur des vésicules isolées après marquage contre la synaptobrevine [38].

La question de la taille des organelles n'est pas anodine car elle est liée à leur identité⁴. L'exocytose du glutamate par les astrocytes serait ainsi due à des vésicules synaptiques [54, 37, 38] ou à des granules à cœur dense [53]. Outre les différences de préparation, les expériences qui ont conduit à ces résultats diffèrent par les modes de marquage des organelles (VGlut, synaptobrevine, colorant FM), aussi n'est-il pas étonnant qu'elles parviennent à des tailles différentes puisqu'elles marquent probablement différents types d'organelles.

⁴cf. page 88

Conclusion

L'analyse des articles des dernières années consacrés à la libération des gliotransmetteurs a montré que l'hypothèse de l'exocytose régulée dans les astrocytes en culture repose sur des données solides. Cependant, elles ont été obtenues par des expériences qui ne permettaient pas d'étudier sélectivement l'exocytose parmi les autres voies de sécrétion. Il a ainsi fallu attendre l'application de la TIRFM pour ébaucher une caractérisation de l'exocytose régulée dans les astrocytes en culture. Or, les résultats obtenus n'ont pu être reproduits par aucune autre équipe, notamment en ce qui concerne l'identification des organelles libérables. Nous avons donc cherché à savoir si cette expérience était reproductible et pourquoi elle pose des difficultés. Par ailleurs, pour tenter de résoudre les conflits issus des données anatomiques, nous avons tâché de répondre à la question de l'identité des organelles libérables dans les astrocytes en culture. Ces deux questions nécessitaient l'utilisation de méthodes que nous allons maintenant présenter.

Chapitre 2

Méthodes

2.1 Introduction

La réponse aux deux questions soulevées à la fin du chapitre précédent pourrait être obtenue par *l'observation* en temps réel de *l'exocytose* d'organelles *identifiés* dans des astrocytes. C'est pourquoi plusieurs équipes dans le monde ont tenté une telle expérience [37, 53, 38]. Elle nécessite d'une part une technique d'imagerie capable de suivre la dynamique de vésicules individuelles dans des cellules vivantes et d'autre part un moyen de marquer les organelles afin de pouvoir les identifier. La première méthode est par excellence la microscopie à onde évanescente (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*, TIRFM) qui permet de voir des organelles individuels au voisinage de la membrane plasmique [55, 56] avec un très bon contraste. Pour marquer sélectivement les organelles en fonction de leur identité, la solution la plus sûre actuellement est l'utilisation de sondes fluorescentes couplées à des protéines spécifiques des organelles.

La combinaison de la TIRFM et de ces marquages permet de suivre en temps réel le comportement d'organelles spécifiques avant, pendant et après leur exocytose. Cependant, le contrôle de la spécificité de leur marquage passe par le co-marquage avec une autre sonde dont on est sûr de la spécificité. Ou bien la sonde fluorescente permet d'identifier sans ambiguïté les organelles mais pas de voir leur exocytose (voir le chapitre 2 de

la deuxième partie) : il faut alors également ajouter un marqueur dit *fonctionnel* pour détecter la fusion des organelles. Dans les deux cas, on est donc amené à étudier la colocalisation entre deux marqueurs fluorescents. Or cette simple mesure peut être faussée par deux sources d'erreur : le recouvrement spectral des marqueurs et la présence d'autofluorescence. Un marqueur de spectre large peut en effet être visible dans le canal spectral de l'autre colorant tandis que des molécules endogènes fluorescentes peuvent faire faussement croire au marquage d'organelles. Si la première cause d'erreur peut souvent être contournée, la seconde est parfois inévitable et revient au même que la première si le spectre de l'autofluorescence est suffisamment large pour recouvrir une partie des spectres des deux marqueurs exogènes. Une troisième technique est alors requise pour détecter sans ambiguïté la présence des colorants : la décomposition spectrale (*unmixing* en anglais).

Nous détaillerons d'abord les fondements théoriques de la TIRFM puis rappellerons brièvement le principe des marquages spécifiques à l'aide des protéines fluorescentes. De même, la technique du *unmixing* sera présentée de manière générale dans la mesure où le premier chapitre de la deuxième partie lui est entièrement consacré.

2.2 La réflexion totale interne

Nous renvoyons le lecteur aux *classiques* de l'optique [57, 58] pour une analyse détaillée de la réflexion totale interne. De même, il trouvera des explications sur l'application de ce phénomène à la TIRFM dans la revue de 2001 de Daniel Axelrod [59]. Enfin, les articles originaux [55, 56] et les revues (par exemple, [60]) sur le développement de l'imagerie uni-vésiculaire lui permettront de connaître les diverses configurations expérimentales et les possibilités de cette technique. C'est pourquoi nous nous contenterons dans ce chapitre d'un bref rappel théorique qui présente notre synthèse de la question et les caractéristiques de la TIRFM indispensables à connaître pour

comprendre nos travaux présentés dans la deuxième partie. La description du poste expérimental a été placée en annexe pour faciliter la lecture de cette première partie introductive.

Le phénomène de la réflexion totale interne ne peut être pleinement décrit qu'à l'aide des équations de Maxwell. Cependant, nous allons d'abord l'aborder à l'aide de la loi de Snell-Descartes qui en prédit déjà une partie.

2.2.1 La loi de Snell-Descartes

Tout le monde a observé qu'un objet partiellement immergé dans l'eau semble tordu. C'est une manifestation de la *réfraction* de la lumière à l'interface — ou dioptre — entre deux milieux homogènes isotropes d'indices optiques différents illustrée par la figure 2.1 où nous nous intéressons à une région du dioptre suffisamment petite pour considérer que ce dernier est plan.

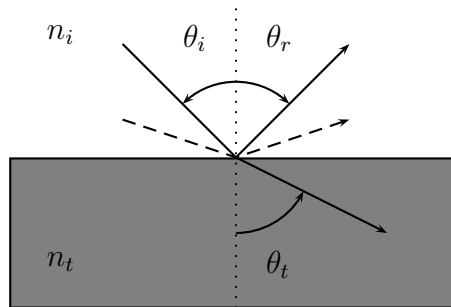
Le faisceau lumineux incident est en partie réfléchi (réflexion) et en partie transmis en changeant de direction (réfraction). La loi mathématique décrivant la réfraction a été proposée par Snell en 1621 :

$$n_i \sin \theta_i = n_t \sin \theta_t \quad (2.1)$$

où n_i et n_t sont les indices optiques des milieux de l'onde incidente et de l'onde transmise et θ_i et θ_t les angles d'incidence et de transmission par rapport à la normale au dioptre. L'angle de la réflexion, θ_r , est opposé à θ_i . Les rayons incident, réfléchi et transmis appartiennent à un même plan perpendiculaire au dioptre que l'on nomme plan d'incidence.

Dans le cas de la figure 2.1, n_i est supérieur à n_t (cas d'une interface eau-air par exemple). Ainsi θ_i est-il inférieur à θ_t (trait continu). On en déduit que θ_t peut atteindre 90° à partir d'un certain angle d'incidence nommé *angle critique* $\theta_c = \arcsin n_t/n_i$ (trait discontinu). Au-delà, la loi de Snell-Descartes prévoit qu'il n'y a plus de faisceau transmis : il y a *réflexion totale*. C'est le phénomène mis en jeu lorsque l'on observe ses doigts à travers la surface de l'eau — ou de tout autre liquide consommable transparent — contenue dans un verre.

FIG. 2.1 – Réfraction par un dioptre plan



Un faisceau lumineux incident (trait plein) vient frapper l'interface entre un milieu linéaire homogène et isotrope (LHI) d'indice optique n_1 et un autre milieu LHI d'indice optique n_2 . Sa direction fait un angle θ_i avec la normale au dioptre (pointillés verticaux). Il est partagé en deux nouveaux faisceaux : un faisceau réfléchi vers le milieu originel et un faisceau transmis dans l'autre milieu selon un angle θ_t différent de θ_i . Si θ_i excède l'angle critique, il n'y a plus de faisceau transmis (trait en pointillés).

2.2.2 Considérations énergétiques

Quand on atteint l'angle critique, le faisceau réfracté sort donc parallèle au dioptre. Il est facile de montrer que dans ces conditions, il ne peut pas y avoir de transmission de l'énergie vers le second milieu. Prenons comme comparaison le cas de l'éclairement de la terre par le soleil. Il fait plus chaud à l'équateur qu'aux pôles parce que les rayons du soleil y frappent la terre avec un angle d'incidence plus faible, c'est-à-dire moins rasant. De même, si c'était la terre qui éclairait le soleil, l'équateur lui apporterait plus d'énergie que les pôles. Ainsi, le flux d'énergie électromagnétique émis par une surface irradiante est-il d'autant plus faible que la direction d'émission est plus inclinée par rapport à sa normale. A la limite, pour une incidence rasante, le flux est nul. C'est pourquoi il ne devrait pas y avoir de transmission de l'énergie dans le second milieu au-delà de l'angle critique...

2.2.3 L'onde évanescente

Si aucune énergie n'est transmise dans le second milieu, il est aisé de montrer grâce aux équations de Maxwell que cela ne signifie pas l'absence d'un champ électrique. Ce dernier est en effet continu à la traversée du dioptré non chargé, ce qui rend impossible sa présence dans un seul des deux milieux. Il y a donc de la lumière transmise malgré la réflexion totale et à l'angle critique, l'amplitude du champ électrique juste de l'autre côté de l'interface est même supérieure à celle de l'onde incidente. Il reste à savoir sous quelle forme l'onde est présente dans le second milieu. On montre facilement que si l'onde incidente est plane, progressive et monochromatique (OPPM), on obtient, en un point M quelconque repéré dans le second milieu par les coordonnées z sur l'axe perpendiculaire au dioptré et x sur l'axe parallèle au dioptré et au plan d'incidence, une onde réfractée de la forme :

$$\vec{E}_t(M) = \vec{E}_t(0)e^{-z/d}e^{j(k_x x - \omega t)} \quad (2.2)$$

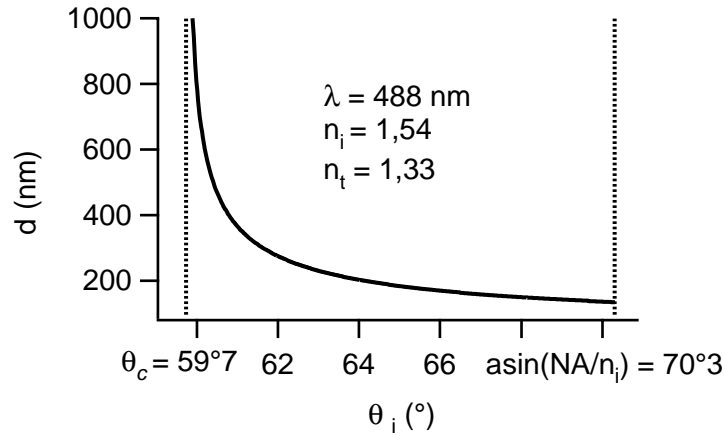
avec $\vec{E}_t(0)$ l'amplitude du champ \vec{E} transmis à l'interface, k_x la composante selon x du vecteur d'onde transmis, ω la pulsation de l'onde incidente et t le temps. d , homogène à une longueur, s'exprime par :

$$d = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_i^2 \sin^2 \theta_i - n_t^2}} \quad (2.3)$$

La réflexion totale donne ainsi naissance de l'autre côté du dioptré à une onde se propageant parallèlement à l'interface (axe x) et dont l'amplitude décroît exponentiellement dans la direction perpendiculaire à l'interface (axe z). Elle "s'évanouit" en quelques d , *i.e.* sur une distance de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde, comme le montre la figure théorique 2.2. Les deux traits pointillés verticaux représentent les limites accessibles à θ_i imposées par l'angle critique θ_c et l'ouverture numérique de l'objectif NA (cf annexe A).

Remarque : Nous avons dit qu'au-delà de l'angle critique, aucune énergie n'entre dans le second milieu. Pourtant le champ évanescent contient de l'énergie électromagnétique. La solution de ce paradoxe dépasse le cadre de

FIG. 2.2 – Profondeur de l'onde évanescente en fonction de l'angle d'incidence



La profondeur de pénétration (d) de l'onde évanescente dans le second milieu dépend de l'angle d'incidence (θ_i) du faisceau incident. À l'angle critique (θ_c), elle est en théorie infinie et décroît très rapidement au delà. L'ouverture numérique de l'objectif (NA) qui transmet le faisceau incident détermine la valeur minimale de l'épaisseur du champ évanescent.

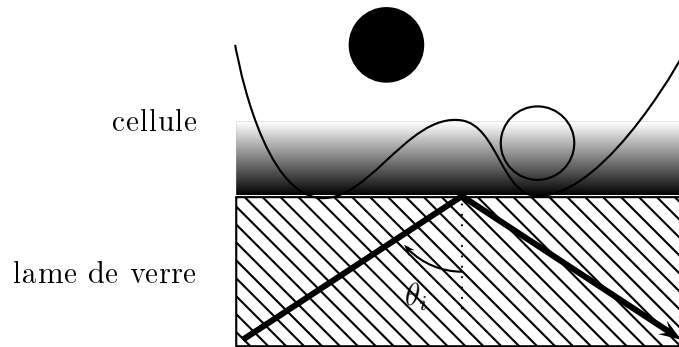
ce rapport et se réfère à l'effet GOOS-HÄNCHEN. Disons seulement que nous avons considéré une onde incidente plane monochromatique ce qui suppose des plans d'onde infinis et la présence de l'onde de toute éternité. Le lecteur comprendra que ces deux infinis ne nous sont pas encore facilement accessibles expérimentalement.

2.2.4 Application

Une microscopie basée sur ce phénomène permet d'observer des cellules attachées sur une lame de verre dont l'interface avec la solution saline sert de dioptré (cf figure 2.3). Lorsque l'angle d'incidence dépasse θ_c de quelques degrés, un champ évanescent est généré du côté des cellules et seuls les marqueurs fluorescents présents à moins de 200 nm de la membrane sont excités par l'onde évanescente tandis que le volume des cellules reste dans le noir. Deux résultats en découlent : un très bon contraste qui permet

de voir individuellement des objets fluorescents juxta-membranaires et un *photobleaching* très faible des colorants à l'intérieur de la cellule.

FIG. 2.3 – *Principe de la microscopie à onde évanescente*



Le champ évanescent est généré par la réflexion totale d'un faisceau incident sur la lame de verre (zone hachurée) où sont cultivées les cellules. Seuls les compartiments intra-cellulaires assez proches de l'interface (blanc) sont excités par l'onde évanescente. L'excellent contraste qui en résulte permet d'observer des organelles individuels juxta-membranaires sans être gêné par un fond fluorescent (noir).

2.3 Marquage des organelles

L'identification des organelles dont la TIRFM permet d'observer l'exocytose requiert des marqueurs spécifiques des différentes catégories d'organelles présents dans une cellule. Il y a deux sortes de colorants fluorescents qui correspondent plus ou moins à cet objectif. Les marqueurs chimiques synthétiques et les protéines fluorescentes.

2.3.1 Colorants chimiques

D'après les catalogues commerciaux, certains composés fluorescents marquent sélectivement des compartiments intra-cellulaires. Ainsi le lysotracker marquerait-il plutôt les lysosomes tandis que Rhod-2 entre préférentiellement dans les mitochondries comme en témoigne sa colocalisation avec le

Mitofluor Green [61]. Par ailleurs, les conditions d'incubation de ces produits peuvent favoriser l'entrée dans certains compartiments. Cependant, la spécificité de ces marquages doit toujours être vérifiée.

Par ailleurs, de nombreux colorants ne sont pas adaptés à l'imagerie de l'exocytose. Celle-ci est en effet grandement facilitée par un colorant *fonctionnel* dont la fluorescence est sensible à la variation du pH et de sa concentration qui surviennent lors de la sécrétion hors de la lumière des organelles vers le milieu extra-cellulaire. C'est pourquoi l'acridine orange est souvent utilisée dans de telles études [55, 56, 37, 38]. Cependant, cette base faible colore indistinctement tous les compartiments acides, l'identification de la nature des organelles marqués par l'acridine orange nécessite donc un marquage supplémentaire *spécifique*.

2.3.2 Protéines fluorescentes

Principe

L'utilisation des protéines fluorescentes permet de réaliser ces deux tâches : vérifier la spécificité du marquage d'un colorant et identifier un organelle déjà coloré par un marqueur fonctionnel mais non spécifique.

La spécificité des organelles réside dans l'expression de protéines particulières. En effet, à toute protéine est associé un message (par exemple une séquence signal) qui indique à la cellule où elle doit la placer. Ainsi les lysosomes, spécialisés dans la dégradation, contiennent-ils des enzymes digestives alors que les vésicules synaptiques expriment les protéines SNARE nécessaires à la fusion. Comme nous le verrons dans la deuxième partie, cette distinction mérite d'être nuancée et il faudrait plutôt dire que les vésicules expriment des SNARE spécifiques tandis que les lysosomes en expriment d'autres. De même les granules à cœur dense. L'idée d'utiliser des protéines fluorescentes repose sur ce principe. Or, les protéines naturellement présentes dans les organelles ne sont pas ou peu fluorescentes. Il a donc fallu imaginer des méthodes de génie génétique pour leur adjoindre une partie fluorescente. La Protéine Fluorescente Verte (*Green Fluorescent*

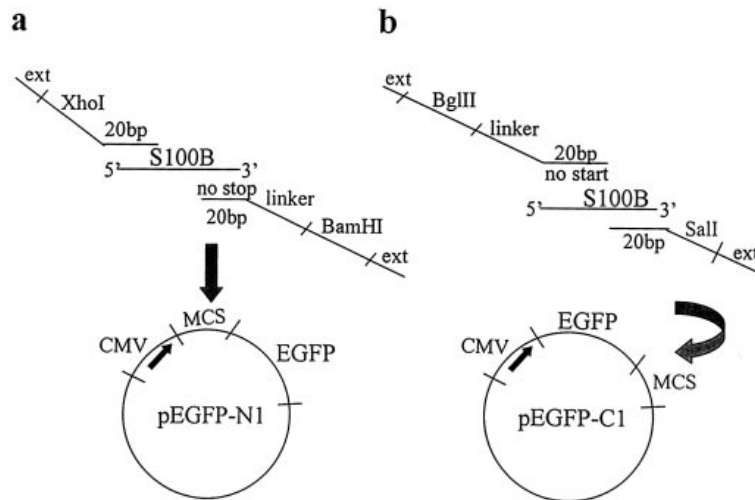
Protein, GFP en anglais) a en ce domaine révolutionné la biologie cellulaire. C'est une protéine fluorescente qui se trouve naturellement dans un type de méduse (*Aequora Victoria*). Des centaines de protéines ont en effet été synthétisées en l'associant à des protéines que l'on souhaitait étudier.

Méthode

L'expression des protéines par une cellule dépend entre autres de l'information contenue dans son ADN. La lecture d'une séquence d'ADN codant pour une protéine (*i.e.* un gène) conduit ainsi à la production de la protéine associée. En pratique, on ajoute donc au patrimoine génétique d'une cellule — temporairement ou définitivement — une molécule d'ADN constituée d'une partie codant pour la protéine naturellement présente dans la cellule et d'une autre codant pour la protéine fluorescente. Chaque plasmide ou morceau d'ADN circulaire est synthétisé en isolant la partie intéressante de l'ADN et en la multipliant en de très nombreux exemplaires. Une fois associés les deux plasmides après des séquences de coupure et de ligation, il reste à injecter le plasmide complet contenant les deux séquences d'ADN (endogène et exogène) dans les cellules en culture et à attendre qu'elles expriment les protéines correspondantes. Nous montrons dans la figure 2.4 extraite de [62] deux exemples d'une telle construction associant la protéine S100B et la EGFP (dérivée de la GFP). Pour ajouter la protéine S100B à une extrémité de la EGFP (au début *i.e.* à l'extrémité N ou à la fin *i.e.* à l'extrémité C), sa séquence d'ADN est fusionnée à l'une ou l'autre des extrémités de la séquence d'ADN de la EGFP. Par ailleurs, pour que la cellule puisse transcrire puis traduire un gène en protéine, il faut qu'elle reconnaisse une séquence d'amarrage et de mise en fonctionnement de sa machinerie. Cette séquence porte le nom de promoteur. C'est ici le promoteur du cytomégalovirus (CMV) qui a été utilisé comme dans les constructions que nous présentons dans la deuxième partie. Puis la production de la protéine débute à la lecture d'un message de départ. De même, la lecture d'un gène se termine quand la machinerie de la cellule rencontre un message d'arrêt ou

de stop. Il faut donc veiller à supprimer ces messages pour que la protéine synthétique ne s'arrête pas à sa première partie.

FIG. 2.4 – Fusion d'une protéine fluorescente à une protéine endogène



Le gène de *S100B* a d'abord été isolé et amplifié par une méthode nommée en anglais *polymerase chain reaction*. a La séquence d'ADN codant pour *S100B* a été ensuite liée à la terminaison N de celle de la *EGFP*. Le signal stop a été éliminé et remplacé par un morceau d'ADN permettant l'association des deux plasmides. b Ici, *S100B* a été fusionnée à la terminaison C de la *EGFP*. Il a donc fallu remplacer le message de départ par une séquence de liaison au gène de la *EGFP*. *CMV* : *cytomegalovirus*.

Dans le cas d'une protéine vésiculaire comme par exemple une *SNARE*, l'association avec la *GFP* ou une de ses variantes — de spectre, d'intensité ou de sensibilité à l'environnement différents — permet que certains organelles deviennent fluorescents. Deux contrôles s'imposent néanmoins quant à l'influence de la partie exogène fluorescente sur la partie endogène. Il faut d'une part vérifier que la cellule a bien reconnu dans la nouvelle protéine la séquence signal de la protéine vésiculaire endogène et de façon plus générale qu'elle a été correctement acheminée vers les bons types d'organelles [63]. D'autre part, la présence de la protéine fluorescente ne doit

pas perturber le fonctionnement de la protéine endogène. C'est pourquoi, dans la construction que nous utilisons et présentons dans la deuxième partie, la partie fluorescente a été ajoutée à la partie intra-vésiculaire de la protéine vésiculaire trans-membranaire synaptobrevine afin de ne pas gêner la formation du complexe *trans-SNARE* (voir figure 1.7).

2.4 Décomposition spectrale (*Unmixing*)

2.4.1 Principe

Après avoir détaillé le principe des techniques permettant de marquer sélectivement et d'observer les organelles au moment de leur exocytose, il nous reste à présenter une méthode qui évite de tomber dans l'écueil de fausses identifications des organelles à cause du recouvrement spectral des colorants ou de la présence d'autofluorescence : le *unmixing*.

Comparaison avec l'imagerie deux couleurs

Cette technique consiste en la détermination des quantités de colorants dans une image, grâce à la mesure de son spectre considéré comme la composition des spectres des colorants recherchés. Par exemple, si une région ne peut contenir qu'une protéine fluorescente et l'autofluorescence, son spectre global est un mélange des spectres de la protéine et de l'autofluorescence dont la forme dépend de leur quantité. Le *unmixing* calcule ces quantités.

En fait, comme la prose inconsciente de M. Jourdain, l'imagerie simultanée de deux colorants grâce à deux bandes spectrales est du *unmixing* qui s'ignore. L'image deux couleurs de deux colorants consiste en effet en un spectre à deux dimensions (une pour chaque couleur, par exemple vert, V et rouge, R) avec deux inconnues (la quantité de chaque colorant, par exemple la GFP verte et la RFP rouge). En notant

$$\vec{w} = \begin{pmatrix} w_V \\ w_R \end{pmatrix} \quad (2.4)$$

le signal des deux canaux spectraux V et R présent dans l'image et

$$\begin{cases} \overrightarrow{X_{GFP}} = \begin{pmatrix} X_{GFP,V} \\ X_{GFP,R} \end{pmatrix} \\ \overrightarrow{X_{RFP}} = \begin{pmatrix} X_{RFP,V} \\ X_{RFP,R} \end{pmatrix} \end{cases} \quad (2.5)$$

le signal des deux canaux spectraux V et R que nous aurions s'il n'y avait que de la GFP ou de RFP, *i.e.* les spectres de référence des colorants purs, nous obtenons en l'absence d'erreur :

$$\overrightarrow{w} = \alpha_{GFP} \overrightarrow{X_{GFP}} + \alpha_{RFP} \overrightarrow{X_{RFP}} \quad (2.6)$$

où α_{GFP} et α_{RFP} sont les quantités inconnues des deux colorants. Dans le cas de colorants totalement distincts spectralement, *i.e.* dans la configuration où l'imagerie à deux couleurs est suffisante, chaque colorant GFP et RFP n'émet de la fluorescence que dans son canal vert et rouge respectivement, donc leur contribution dans l'autre bande spectrale est nulle, ce qui s'écrit :

$$\overrightarrow{X_{GFP}} = \begin{pmatrix} X_{GFP} \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad \overrightarrow{X_{RFP}} = \begin{pmatrix} 0 \\ X_{RFP} \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

L'équation (2.6) s'écrit donc tout simplement :

$$\begin{cases} w_V = \alpha_{GFP} X_{GFP} \\ w_R = \alpha_{RFP} X_{RFP} \end{cases} \quad (2.8)$$

L'observation d'un canal spectral V ou R contient la fluorescence émise par un seul colorant aussi, la résolution du système (2.8) est immédiate et passe même inaperçue ! Mais l'analyse de l'image n'en est pas moins du *unmixing*.

Principe du *unmixing* linéaire

En général, les deux colorants n'ont pas des spectres parfaitement séparés et le signal d'un canal contient la contribution des deux. Par ailleurs, toute image est bruitée (au moins par le bruit photonique). Si nous supposons encore que les signaux des deux colorants s'ajoutent (linéarité), nous pouvons reprendre l'équation (2.6) mais en ajoutant l'erreur — inconnue — par rapport au modèle idéal, \vec{n} .

$$\vec{w} = \alpha_{GFP} \overrightarrow{X_{GFP}} + \alpha_{RFP} \overrightarrow{X_{RFP}} + \vec{n} \quad (2.9)$$

Le *unmixing* linéaire cherche les quantités α_{GFP} et α_{RFP} qui permettent *au mieux* de reconstituer le signal \vec{w} à partir des spectres des deux colorants \vec{X}_{GFP} et \vec{X}_{RFP} . Il va de soi que cette opération n'a de sens que si \vec{n} est *petit*. Aussi certains algorithmes de *unmixing* introduisent-ils une inconnue (éventuellement matricielle) supplémentaire pour tenir compte de la présence d'un ou de plusieurs colorants non déterminés qui influencent trop le modèle, à deux colorants dans notre exemple [64]. Il s'agit alors de *unmixing* partiel dans la mesure où l'on ne détermine pas la quantité de tous les colorants présents dans l'image, mais seulement de ceux dont on connaît le spectre. Dans le cas des astrocytes en culture, les images ne peuvent contenir que de l'autofluorescence plus les colorants exogènes (protéines fluorescentes ou colorants chimiques). Comme le spectre de l'autofluorescence est assez constant (voir le premier chapitre de la deuxième partie), nous connaissons les spectres purs de tous les colorants en présence. La source de l'erreur \vec{n} non expliquée par le modèle peut donc être considérée comme du bruit d'espérance mathématique nulle et de variance suffisamment petite¹.

À cause de l'erreur \vec{n} , il n'y a pas de solution exacte, mais seulement approchée. Aussi, plus le nombre de canaux spectraux est élevé, plus l'estimation est fiable (voir l'annexe E). S'il y a moins de canaux que de colorants, il y a une infinité de solutions, ce qui n'est pas acceptable, mais d'un autre côté, le nombre de canaux est limité par le signal disponible ou la durée de l'acquisition. Un optimum est donc à trouver [65].

La méthode de résolution du système d'équations linéaires dépend ensuite en toute rigueur de la statistique suivie par le bruit qui introduit l'erreur [65]. Nous avons supposé une statistique gaussienne (vérifiée a posteriori, voir la deuxième partie). En outre, nous avons supposé que la variance du bruit était identique dans tous les canaux spectraux². Nous avons donc

¹Nous précisons à la fin du premier chapitre de la deuxième partie quelle contrainte sur le rapport signal-sur-bruit cette hypothèse suppose.

²En réalité, l'examen de quelques exemples montre que les variances sont légèrement différentes, ne serait-ce qu'en raison du bruit photonique qui est plus grand dans les canaux plus intenses. Cependant, le rapport entre les variances dépend des organelles et

appliqué la méthode de résolution par les moindres carrés ordinaires. Celle-ci consiste à minimiser l'erreur quadratique entre le signal et sa reconstitution, *i.e.* à minimiser

$$\left\| \vec{w} - \left(\widehat{\alpha}_{GFP} \overrightarrow{X}_{GFP} + \widehat{\alpha}_{RFP} \overrightarrow{X}_{RFP} \right) \right\|^2$$

en faisant varier $\widehat{\alpha}_{GFP}$ et $\widehat{\alpha}_{RFP}$ qui sont les estimations des quantités des deux colorants.

On peut montrer [66] que si les spectres de référence sont indépendants, la solution est analytique et s'exprime par :

$$\widehat{\vec{\alpha}} = ({}^t X X)^{-1} {}^t X \vec{w} \quad (2.10)$$

avec X la matrice rassemblant les spectres de références. Notons au passage que la matrice ${}^t X X$ doit être inversible. Il est facile de montrer que cette condition est équivalente à l'indépendance des spectres de référence [67].

Le *unmixing* linéaire fournit donc une estimation des quantités de colorants dans une image si les spectres de référence des colorants purs sont connus. Les deux premiers chapitres de la deuxième partie exposent comment les obtenir dans le cas de protéines fluorescentes ou de colorants chimiques.

2.4.2 Cas particulier du *unmixing* uni-vésiculaire

Le *unmixing* est très utilisé en imagerie satellitaire pour caractériser des zones topographiques [64] et en biologie cellulaire pour extraire le signal provenant d'un colorant parmi plusieurs ou étudier leur colocalisation [65].

Dans ces deux applications, le rapport de taille entre les pixels du détecteur et les composants dont le *unmixing* détermine la quantité — forêt ou protéine fluorescente — est très supérieur à un³. Mais si l'unité de travail des colorants aussi, la prise en compte de ces différences par les moindres carrés pondérés n'a pas produit de meilleurs résultats en terme de qualité de la reconstitution des images.

³Évidemment, nous ne parlons pas ici des satellites à haute résolution spatiale qui ne nécessitent pas le *unmixing* puisqu'ils voient les objets individuellement, maison ou merkaba.

en topographie peut être le pixel individuel, l'imagerie en biologie cellulaire s'applique habituellement à étudier la composition d'ensembles — noyau ou cytoplasme — en rassemblant l'information des pixels qu'ils contiennent. Tout à fait différent est le cas de la caractérisation d'organelles individuels qui sont décrits par quelques pixels seulement. De plus, leur taille est proche de la résolution optique. Leur image est donc étalée par la diffraction. À cause du bruit, en particulier électronique, les pixels qui la composent ne sont donc certes pas corrélés, mais ils contiennent une information commune qui est le spectre de l'organelle étalé par la diffraction. L'application du *unmixing* à la colocalisation de colorants au niveau uni-vésiculaire requiert donc la prise en compte de ces particularités.

Par ailleurs, les résultats du *unmixing* souffrent traditionnellement du manque d'information sur leur fiabilité. La différence entre l'image et sa reconstitution fournit un moyen de comparer la validité de deux estimations entre elles mais comment quantifier la fiabilité absolue d'un résultat du *unmixing*? Nous verrons dans le premier chapitre de la deuxième partie (et plus en détails dans l'annexe E) comment nous avons introduit un moyen quantitatif d'évaluer cette fiabilité.

2.5 Conclusion

Ce second chapitre de la première partie nous a permis de détailler les méthodes utilisées dans cette thèse pour résoudre les questions soulevées dans le chapitre précédent :

- existe-t-il dans les astrocytes des organelles capables d'exocytose régulée ?
- Si oui, quelle est leur identité ?

Dans la partie suivante, nous présentons les résultats que nous avons obtenus dans cette optique. Nous avons rencontré au cours de notre investigation des problèmes techniques liés à la présence d'autofluorescence et au recouvrement spectral des marqueurs vésiculaires. Nous avons donc d'abord élaboré des méthodes pour éliminer ces problèmes puis, grâce à elles, nous avons

considéré l'autofluorescence non plus comme un obstacle technique mais en tant qu'objet biologique digne d'intérêt dans le cadre de l'exocytose.

Le premier chapitre est ainsi consacré à l'application du *unmixing* à l'imagerie uni-vésiculaire dans le but de mettre au point une méthode quantitative pour détecter la présence et la colocalisation de marqueurs fluorescents sur des organelles individuels en présence d'autofluorescence, autrement dit pour être capable d'identifier des organelles individuels. Ces résultats ont été publiés dans *European Biophysics Journal*.

Le deuxième chapitre donne un exemple des performances de notre méthode en mettant en évidence les erreurs systématiques de colocalisation commises par plusieurs auteurs à cause du recouvrement spectral de leurs marqueurs. Concrètement, nous montrons que l'identité des organelles libérables dans les astrocytes telle qu'elle a été réalisée dans les études de Bezzi et al. et Crippa et al. [37, 38] n'a pas été faite correctement. Cette étude a fait l'objet d'un article actuellement soumis à *Biophysical Journal*.

Enfin, l'autofluorescence dans les astrocytes en culture fait l'objet d'une étude particulière dans le troisième et dernier chapitre. Nous y présentons des résultats préliminaires non publiés sur l'identification des composés autofluorescents et des organelles qui les contiennent ainsi que sur la capacité des astrocytes à les sécréter par la voie de l'exocytose régulée. Pour faciliter la lecture, nous avons renvoyé en annexes la présentation détaillée du poste expérimental et des calculs relatifs au *unmixing*.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 1

Mise au point de la méthode : décomposition linéaire spectrale uni-vésiculaire

1.1 Introduction

1.1.1 Applications du *unmixing*

Les méthodes de classification reposant sur l'imagerie spectrale sont courantes en imagerie satellitaire¹. Appliquée à la microscopie en fluorescence, l'imagerie spectrale et la décomposition (*unmixing*) linéaire (SILU en anglais) améliore la détection de la fluorescence dans le transfert d'énergie par résonance (FRET) ainsi que la séparation de fluorophores dont l'imagerie simultanée avec deux ou trois bandes spectrales est impossible à cause d'un recouvrement spectral trop important.

Le but de cette étude était d'évaluer les performances de SILU pour déterminer l'expression et la colocalisation de fluorophores sur des objets ponctuels de taille proche de la résolution optique. Cette situation est typique pour un nombre croissant d'applications biologiques, bioanalytiques et

¹Les références bibliographiques sont données dans l'article en anglais inséré page 73. Les figures et tableaux cités s'y réfèrent également.

biophysiques où l'on détecte du FRET émis par des molécules individuelles, des microdomaines calciques, des nanocristaux de semiconducteurs ou des chromosomes lors de génotypages spectraux.

On rencontre une situation similaire dans les expériences de marquages doubles ou multiples qui reposent sur les variantes spectrales de la Protéine Fluorescente Verte (GFP). Ainsi, bien qu'une gamme de couleurs plus large devient sans cesse disponible, le choix de colorants bien séparés spectralement est encore très restreint. Par exemple, une étude récente dans des animaux transgéniques démontrait que la formation de précipités limite l'utilisation de la protéine rouge issues des coraux. Aussi, les meilleures protéines fluorescentes ont un recouvrement spectral considérable et ne peuvent pas être séparées par des jeux de filtres spécifiques. Cependant, même si l'on pouvait utiliser deux protéines fluorescentes bien distinctes spectralement, le signal des protéines serait perturbé dans de nombreuses préparations par la présence d'autofluorescence (AF). C'est pourquoi, bien que dans une expérience typique le nombre de colorants soit limité à deux ou trois, les spectres des fluorophores en présence se recouvrent souvent en grande partie et le *unmixing* devient nécessaire.

1.1.2 Principe du *unmixing*

Le *unmixing* spectral est une technique qui quantifie la présence de plusieurs fluorophores dans des pixels composites, *i.e.* contenant plusieurs colorants. Elle assigne à chaque pixel la fluorescence qu'il aurait reçue s'il n'avait contenu qu'une seule composante spectrale pure. A cause de leur simplicité, les modèles linéaires ont acquis une grande popularité face aux modèles de moments d'ordre supérieur et sont maintenant disponibles dans les logiciels de microscopie commerciaux. Le spectre de chaque pixel est considéré comme la superposition linéaire de spectres purs présents dans ce pixel, pondérés par leur quantité qu'il s'agit de déterminer. Il faut donc résoudre un système d'équations linéaires à coefficients constants dont le nombre d'équations est égal au nombre de canaux spectraux et le nombre

d'inconnues égal au nombre de colorants recherchés. À cause de la présence de bruit, le modèle ne peut évidemment pas être exact et la solution sera une estimation. Dans le cas d'un modèle vrai, *i.e.* si les spectres de référence sont corrects et si le bruit a une variance nulle (en pratique, pas de lumière transmise qui introduit une erreur systématique dans la mesure des spectres), la méthode des moindres carrés ordinaires donne une estimation non biaisée minimisant l'erreur quadratique.

1.1.3 Cas particulier du *unmixing* uni-vésiculaire

L'imagerie d'objets de taille proche de la résolution optique — ce qui est le cas des organelles de sécrétion — serait enrichie par la possibilité d'enregistrer leur signature spectrale. L'enregistrement de ces objets ponctuels requiert une utilisation efficace des quelques photons émis avant le blanchiment photo-induit (*photobleaching*) irréversible. C'est pourquoi, au lieu de diviser le signal déjà faible en plusieurs canaux spectraux totalement distincts, nous avons optimisé la fraction collectée de la fluorescence totale émise (sur-échantillonnage) avec quelques canaux larges se recouvrant partiellement et acquérant le signal successivement.

Par ailleurs, compte tenu de la taille des pixels du détecteur, l'image d'un organelle s'étale sur quelques pixels seulement qui définissent le disque d'Airy. Les pixels de ce disque contiennent des informations liées entre elles par la diffraction et ne peuvent pas être considérés comme indépendants. Pour chaque organelle, nous avons d'abord extrait un spectre moins bruité en moyennant le signal de tous les pixels de cette région après en avoir exclu par un test statistique les pixels aberrants².

Une librairie spectrale de référence contenait les spectres expérimentaux moyens des composantes spectrales pures mesurées dans des cellules vivantes après transfection cytoplasmique. Nous avons vérifié que ces spectres n'étaient pas altérés par le pH inférieur des organelles de sécrétion. La performance de SILU pour la classification d'organelles individuels a été

²voir annexe C

évaluée dans deux scénarii réalistes :

- la colocalisation sur le même organelle d’une protéine fluorescente verte (EGFP) avec une protéine jaune (citrine)
- leur exclusion mutuelle en dirigeant la citrine et la EGFP vers des organelles de type différent, respectivement des vésicules synaptiques et des lysosomes.

Dans les deux cas, les cellules contenaient une autofluorescence de spectre très large recouvrant ceux des deux protéines.

Nous avons aussi déduit une expression statistique pour quantifier la précision de l’estimation des quantités de colorants par SILU et cherché la relation entre la précision obtenue et le rapport signal-sur-bruit des images spectrales.

Finalement, SILU nous a permis de déterminer l’expression et la colocalisation sur des organelles individuels juxta-membranaires de protéines fluorescentes malgré un important recouvrement spectral et la présence d’autofluorescence.

1.2 Résultats

1.2.1 Observation des organelles - figure 1

Marquages fluorescents Pour marquer les organelles avec une protéine fluorescente, nous avons utilisé la technique de la transfection transitoire de cellules en culture secondaire³. Le plasmide contient l’ADN codant pour la synthèse d’une protéine vésiculaire attachée à une protéine fluorescente (GFP ou dérivée). Son incubation en présence de lipofectamine induit la formation d’un complexe qui traverse les membranes plasmique et nucléaire. Au cours des deux jours suivant la transfection, une certaine fraction des

³*i.e.* des cellules qui se sont développées à partir d’extraits de cerveau et qui restent fonctionnelles pendant environ deux semaines. Certains nomment ces préparations cultures primaires en opposition avec les cellules immortalisées comme les CHO ou les PC12. La mise en culture de cellules change leur phénotype au fur et à mesure que les jours passent [34, 52].

cellules (environ 70 % dans nos expériences) transcrit le plasmide et exprime la protéine. Si la cellule reconnaît la partie non fluorescente de la protéine, *i.e.* si elle produit naturellement la protéine vésiculaire, alors elle dirige l'ensemble de la protéine transfectée vers les organelles spécifiques qui deviennent fluorescents. Nous montrons en **fig.1a,b** l'image en champ évanescent d'astrocytes respectivement transfectés par la synaptobrevine 2 (Sb) fusionnée à la citrine et par la sialine couplée à la EGFP. Les contrôles encadrés consistent en la transfection par la sonde fluorescente seule : la cellule ne reconnaît plus la protéine qui finit dans le cytoplasme.

Résolution du microscope Nous présentons en **fig.1c** le profil spatial en trois dimensions de l'image d'une bille de taille inférieure à la résolution théorique du microscope. Il s'agit de la réponse impulsionnelle du microscope appelée couramment *Point Spread Function* ou PSF en anglais.

La largeur de la PSF latérale est 340 nm. Or, les pixels de la camera CCD mesurent 23 μm de côté, leur image dans le plan objet fait donc 190 nm (grossissement 120x). Un objet ponctuel s'étale donc sur un disque de rayon 1,8 pixels. C'est pourquoi nous avons choisi de modéliser chaque organelle par une région carrée de 3*3 pixels contenant l'information de l'organelle central étalée par la diffraction. Autour de cette région centrale, une région de 15*15 pixels définit l'environnement — le fond — de l'organelle. Nous avons rejeté les organelles de taille supérieure à 1,5 fois la taille du disque d'Airy.

1.2.2 *Unmixing* des pixels - figure 2

Champ évanescent et épifluorescence La sélection des organelles juxta-membranaires s'est faite en microscopie à onde évanescente. Ensuite, l'acquisition du spectre a été réalisée en épifluorescence. En effet, la variation de l'intensité en fonction de la profondeur dans la cellule caractéristique de la TIRFM fausserait la mesure du spectre à cause du mouvement potentiel

des organelles entre deux acquisitions⁴.

Pour que le signal dans le carré central provienne essentiellement de la vésicule analysée et non des voisins, nous avons exclu les cas où un autre objet fluorescent était présent à l'intérieur du carré de 9*9 pixels autour du spot.

Normalisation et dénormalisation Nous renvoyons à l'annexe B pour le détail des calculs sous-jacents à ce paragraphe.

Nous mesurons un spectre d'émission discret à cinq points définis par les cinq filtres d'émission qui se succèdent lors de l'acquisition. Les coefficients α_{AF} , α_{EGFP} et $\alpha_{citrine}$ ou quantités de colorants issus du *unmixing* ont une signification qui dépend de la normalisation des spectres. Nous avons opté pour une normalisation qui assure l'égalité de l'énergie entre tous les spectres en divisant les spectres bruts par la somme de leurs composantes. La somme des composantes des spectres normalisés est donc égale à un.

On montre facilement que dans ce cas, la somme des coefficients α vaut également un en théorie, l'écart étant lié à l'erreur du modèle (à cause du bruit ou de l'inexactitude des spectres de référence). Cette propriété peut faire faussement passer les coefficients α pour les quantités relatives de colorants : leur somme fait un, mais ce ne sont en fait que les quantités des spectres de référence normalisés contenues dans le spectre normalisé du pixel étudié.

En multipliant ces coefficients par *l'énergie du pixel*, *i.e.* par la somme des composantes de son spectre brut, on obtient les quantités des spectres de référence normalisés contenues dans le spectre brut du pixel étudié (dénormalisation), ce qui permet de réaliser une image reconstituée de la quantité de chaque colorant en unités de spectres normalisés. Si l'on voulait représenter ces images en concentration, il suffirait de connaître la concentration de

⁴L'imagerie spectrale en champ évanescent est en cours de développement. Elle présente l'immense avantage de fournir le spectre de tous les organelles visibles en TIRFM et non de ceux également visibles en épifluorescence qui ne représentent qu'une fraction des organelles visibles en TIRFM.

colorant présente dans les spectres de référence normalisés.

1.2.3 Spectres de référence et pH - figure 3

Nous avons mesuré le spectre de référence de l'AF dans des organelles de cellules non transfectées. En revanche, nous ne pouvions pas acquérir le spectre de la EGFP et de la citrine dans des organelles car ils auraient pu contenir de l'AF. Nous avons donc mesuré leur spectre dans le cytoplasme de cellules transfectées par la seule protéine fluorescente. L'observation du canal rouge permettait de vérifier l'absence d'organelles AF dans les régions d'intérêt.

Il a donc fallu vérifier que le spectre cytoplasmique (pH \sim 7,3) était le même que le spectre dans les organelles (pH \sim 5).

1.2.4 Validité des spectres de référence - figure 4

Le test scalaire des valeurs aberrantes utilisé à plusieurs reprises dans l'article est une opération classique d'analyse de données. En revanche, le test vectoriel employé pour le rejet des pixels aberrants dans le disque d'Airy est une adaptation personnelle du précédent. Nous renvoyons à l'annexe C pour sa démonstration.

Le *unmixing* des régions ayant servi à la mesure des spectres de référence confirme leur validité (cf. **tableau 1**). La **fig.4** montre en outre que l'estimation des quantités de colorants suit une statistique gaussienne, ce qui justifie dans l'emploi des tests statistiques d'exclusion des valeurs aberrantes l'utilisation de variables de Student pour les scalaires et de Fisher pour les vecteurs.

1.2.5 Détection de l'expression et de la colocalisation des protéines - figure 5

Principe de la détection La détection des protéines dans un organelle individuel se fait en trois étapes qui répondent à trois questions :

- le voxel⁵ est-il marqué ou ne contient-il que de l'AF ?
- s'il est marqué, est-ce par la EGFP, la citrine ou les deux ?
- les colorants présents sont-ils localisés dans l'organelle ou seulement dans le voxel, *i.e.* autour⁶ ?

Les deux premières étapes (**fig.5a**) sont réalisées par l'application du test des valeurs aberrantes⁷. La première entre le spectre de l'organelle et l'ensemble des spectres d'organelles AF qui ont permis d'obtenir le spectre de référence de l'AF. La deuxième entre les coefficients du *unmixing* trouvés dans le voxel de l'organelle d'une part et dans les voxels qui ont servi pour l'obtention des spectres de référence des deux protéines d'autre part. Par exemple, un voxel contenant les deux protéines aura des quantités normalisées de EGFP et de citrine statistiquement différentes des quantités de ces protéines trouvées dans les voxel EGFP purs ou citrine purs.

La nécessité de la troisième étape est évidente dans le cas de la synaptobrevine dont une partie se retrouve dans la membrane ou si la protéine transfectée n'est pas reconnue par la cellule et finit dans la cytoplasme. Afin de déterminer la localisation des colorants, nous comparons sur les images reconstituées de chaque fluorophore le signal au centre avec le signal périphérique, *i.e.* le signal du voxel central par rapport aux voxels voisins. Il s'agit d'un rapport signal-sur-bruit qui est encore un test des valeurs aberrantes entre le signal du carré central de 3*3 pixels et le signal de la périphérie divisée en carrés de même taille (cf. **fig.5b**).

Résultats de la détection Nous avons testé notre méthode sur deux exemples opposés. Le premier est le marquage des astrocytes par la EGFP et la citrine sur les mêmes types d'organelle (transfection par Sb-EGFP et Sb-citrine). Nous attendions donc un grand taux de colocalisation entre les deux colorants. 52 % des organelles portaient la EGFP et la citrine. Dans le

⁵L'objet à trois dimensions correspondant au signal collecté par un pixel est nommé *voxel*. Par abus de langage, nous utiliserons ce terme pour désigner l'organelle et le volume alentour dont l'image se projette sur le carré central de 3*3 pixels.

⁶voir annexe D

⁷voir annexe C

second exemple, nous avons transfecté les cellules avec Sb-citrine et EGFP-sialine. Sialine est une protéine lysosomale tandis que Sb est présente dans la membrane des vésicules synaptiques. La colocalisation devait donc être inférieure au premier cas : elle fut de 28 %.

*Remarque : la **fig. 5d** montre la nécessité de la détection de la présence des colorants non seulement dans le voxel mais aussi dans l'organelle. Les voxels de tous les organelles de cette figure contiennent la EGFP et la citrine mais seule une fraction des organelles contient vraiment les deux colorants.*

1.2.6 Intervalle de confiance et SBR - figure 6

La dernière question abordée fut l'influence de l'intensité du signal sur la faisabilité du *unmixing* uni-vésiculaire. Nous avons représenté en **fig. 6** l'intervalle de confiance de l'estimation des coefficients α d'organelles co-transfectés par Sb-EGFP et Sb-citrine en fonction de leur intensité divisée par le fond extra-cellulaire (*signal-to-background ratio*, SBR). Il apparaît clairement qu'un signal suffisant est requis pour obtenir une estimation fiable, avec un SBR supérieur à 3 pour garantir un intervalle de confiance inférieur à 0,1 (les coefficients α sont compris entre 0 et 1).

1.3 Conclusion

Des populations hétérogènes de vésicules ont déjà été étudiées sur des préparations fixées marquées par des anticorps spécifiques à l'aide de la microscopie confocale, de l'imagerie assistée par la déconvolution ou de la microscopie électronique. Par ailleurs, la fractionation sub-cellulaire suivie d'une centrifugation ou de l'isolation de vésicules sur des billes recouvertes d'anticorps sont des méthodes alternatives pour classifier les organelles hors des cellules.

Évidemment, une meilleure compréhension des mécanismes des voies de sécrétion parallèles qui co-existent dans les cellules non excitables électriquement comme les astrocytes mais aussi dans les neurones, requiert l'imagerie

en temps réel de cellules intactes. L'observation en TIRFM de vésicules individuelles mobiles marquées par des protéines spécifiques fusionnées à des protéines fluorescentes est possible depuis quelques années. L'identification d'un organelle passe généralement par une étude de colocalisation entre deux marqueurs. Cependant, la détection simultanée de deux sondes fluorescentes à l'aide de deux filtres optiques sélectionnant deux bandes spectrales nécessite des colorants spectralement distincts et une autofluorescence négligeable. C'est parce que ces conditions sont rarement réunies et en tout cas non remplies pour ce qui est des astrocytes en culture que nous avons développé l'application de SILU à l'identification d'organelles individuels.

L'imagerie spectrale appliquée à la microscopie diffère de l'imagerie satellitaire entre autres par le rapport entre la taille des objets et celle des pixels. En microscopie, l'image d'un objet ponctuel est étalée par la diffraction sur plusieurs pixels adjacents qui ne peuvent plus être considérés comme indépendants. Dans cette étude, nous avons tiré avantage de cette dépendance pour extraire des spectres d'organelles individuels moins bruités grâce au moyennage sur les pixels du disque d'Airy. Pour réaliser le *unmixing*, nous avons utilisé la méthode des moindres carrés, ce qui nous a permis d'introduire l'intervalle de confiance de l'estimation des quantités de colorants. Nous avons par ailleurs adapté le test des valeurs aberrantes pour savoir si un organelle est marqué par une sonde fluorescente exogène ou s'il est seulement autofluorescent. Enfin, nous avons défini un critère qui s'applique aux images reconstituées de la contribution de chaque colorant pour déterminer leur présence dans des organelles individuels.

Une autre différence avec la topographie satellitaire est la quantité de signal restreinte avant le *bleaching*. C'est pourquoi nous avons utilisé des filtres d'émission qui se chevauchent en partie, quitte à devoir acquérir successivement et non simultanément les composantes des spectres. La durée de ces acquisitions est cependant assez courte pour suivre même les organelles mobiles et garantir la constance des spectres entre deux images. On peut ainsi identifier en quelques secondes les organelles d'une cellule puis passer

en TIRFM à haute résolution temporelle pour le suivi des vésicules, par exemple en vue de l'application d'une substance excitatrice.

Le choix de l'épifluorescence pour la mesure des spectres d'émission s'impose par la trop grande sensibilité de la TIRFM au mouvement des organelles selon l'axe optique. Mais le critère de détection des colorants dans les organelles fondé sur la mesure du contraste des images reconstituées corrige en partie la présence de fond inhérente à l'épifluorescence. Cependant, cette méthode ne serait pas adaptée à des cellules où la densité d'organelles est trop élevée. Pour être sûrs que le spectre du voxel d'une vésicule n'était pas contaminé par des organelles voisins hors du plan focal, nous avons sélectionné des régions en rapport avec la PSF du microscope qui définit un volume dans lequel un seul organelle doit être présent. La PSF latérale peut être modélisée par une fonction de Bessel dont le deuxième zéro est à 625 nm (3,3 pixels) du centre. Cette distance correspond à 99,6 % d'atténuation et définit un anneau de diamètre 9 pixels autour du carré central de 3*3 pixels dans lequel aucun autre organelle ne doit être présent. Dans la direction axiale, le deuxième zéro est localisé à une distance $z_2 = 3,4 \mu\text{m}$ du plan focal. Au final, l'organelle analysé doit donc être seul dans un cigare de volume $V = z_2 \pi d^2 / 4 = 8,3 \mu\text{m}^3$. Avec environ 0,01 organelles/ μm^3 dans les astrocytes en culture, nous attendons $n = \rho V \sim 0,08$ organelles dans cet élément de volume. Il y a donc une très faible probabilité qu'un autre organelle y soit présent.

Une importante conclusion de cette étude est que l'expression de la citrine est moins facilement détectable que celle de la EGFP. Cette difficulté est-elle due à une plus grande sensibilité au pH ou à la plus grande similarité entre les spectres de la citrine et de l'AF qu'entre la EGFP et l'AF ? Nous pouvons exclure la dernière possibilité en remarquant que différentes quantités d'AF n'influencent pas l'estimation des coefficients α_{citrine} ou α_{EGFP} ni leur précision (**fig.supp.1**). Par ailleurs, SILU ne détecte pas plus d'AF dans la citrine pure que dans la EGFP pure et ne trouve pas plus de citrine que de EGFP dans les organelles AF purs (**tableau 1**).

De plus, les mesures spectrales à différents pH montre que le spectre de la EGFP ne change pas jusqu'à pH 4,8 de telle façon que le spectre de référence enregistré dans le cytoplasme est un bon modèle du spectre vésiculaire. Nous avons d'ailleurs trouvé 96 % d'organelles Sb-EGFP dans les cellules transfectées par cette protéine seule. Au contraire, un changement dans le spectre de la citrine est perceptible à partir de pH 5,2, introduisant peut-être une légère différence entre le spectre de référence cytoplasmique et le spectre vésiculaire. Nous n'avons détecté que 68 % d'organelles Sb-citrine dans les cellules transfectées par cette protéine seule. Cependant, les mêmes résultats furent obtenus en utilisant le spectre de la citrine à pH 5,2 tandis que les spectres acquis à pH inférieurs ont donné des résultats encore moins bons. Nous avons donc conclu comme pour la EGFP que le spectre de la citrine dans des organelles légèrement acides n'était pas différent du spectre cytoplasmique.

La difficulté à détecter la citrine serait plutôt due à l'intensité moindre de cette protéine, comme le suggère la plus faible luminosité des organelles marqués par Sb-citrine par rapport à ceux portant Sb-EGFP ($0,32 \pm 0,14$ contre $0,67 \pm 0,30$, $N = 25$ organelles). Ce n'est pas un effet plus grand du pH sur cette protéine car les intensités de la citrine et de la EGFP montrent la même dépendance au pH (**fig.3c,d**). Mais la plus faible luminosité absolue de la citrine pourrait conduire à partir de pH 5,2 à des intensité trop faibles par rapport au bruit, ce qui expliquerait la légère variation du spectre de la citrine à ses deux extrémités à partir de ce pH. D'ailleurs, les spots de faible intensité ont généralement un spectre légèrement différent des spots plus brillants (données non présentées). En fait, il était à prévoir que la citrine serait moins intense car l'excitation à 458 nm est plus efficace pour la EGFP. Mais il serait difficile de pallier ce problème en augmentant la longueur d'onde d'excitation dans la mesure où la lumière transmise dans le premier canal (510 nm) augmenterait et avec elle le bruit⁸.

⁸Ici aussi, SILU bénéficierait du *unmixing* en TIRFM car on exciterait successivement à 458, 488 et 514 nm. Les deux protéines seraient ainsi toutes deux éclairées à leur maximum d'excitation. Voir page 128.

Ces considérations s'appuient sur l'hypothèse de bon sens que la détection est plus facile si le signal est plus grand. C'est ce que confirme la **fig.6** qui représente l'intervalle de confiance de l'estimation du coefficient α_{EGFP} en fonction du rapport signal-sur-fond (*signal-to-background ratio*, SBR) des organelles transfectés.

En conclusion, nos résultats démontrent que le SILU de régions de la taille du disque d'Airy contenant des pixels inter-dépendants apporte l'estimation fiable de l'expression et de la colocalisation de protéines sur des organelles de sécrétion individuels dans des cellules vivantes. Nous pensons que notre technique pourra jouer une influence dans une large variété d'applications de biologie cellulaire où les mesures conventionnelles à deux ou trois bandes spectrales ne parviennent pas à produire des données fiables de colocalisation.

1.4 Article

Chapitre 2

Application de la méthode : colocalisation entre l'acridine orange et la EGFP

2.1 Introduction

L'acridine orange (AO) $C_{17}H_{19}N_3$, 3,6-bis(diméthylamino)acridine hydrochloride, est une base faible, un colorant métachromatique et un agent intercalant qui a été utilisé pour étudier l'ADN, le gradient de pH à travers les membranes des vésicules, lysosomes et endosomes¹. L'AO permet de voir la fusion des vésicules de sécrétion mais marque indistinctement tous les compartiments acides, lysosomes et endosomes également. Pour supprimer cette ambiguïté, trois études récentes ont fait exprimer la protéine fluorescente verte (EGFP) fusionnée à des protéines caractéristiques des vésicules de sécrétion et ont observé la perte de fluorescence rouge (soi-disant due à l'AO) à partir d'organelles verts (soi-disant EGFP). Pourtant, l'AO peut émettre de la fluorescence à la fois verte et rouge. Nous avons recherché, grâce à la décomposition spectrale linéaire uni-vésiculaire (SILU), dans quelle mesure l'expression de la EGFP peut être recouverte par le mar-

¹Les références bibliographiques sont données dans l'article en anglais inséré page 79. Les figures et tableaux cités s'y réfèrent également.

quage avec AO. Il est apparu que la détection spectrale corrige les données ambiguës issues d'images deux couleurs et donne une explication des différents résultats entre les études de colocalisation précédentes.

2.2 Résultats

2.2.1 Métachromasie de l'AO dans les organelles - figure 1

Les images en microscopie par onde évanescente (TIRFM) d'astrocytes corticaux chargés en AO ($5 \mu\text{M}$, 15 min à 37°C) montrent une fluorescence punctiforme rouge et verte. L'incubation à 23°C donne le même résultat.

On considère que la métachromasie de l'AO est due à la co-existence de monomères fluorescents verts (m.AO) et de dimères fluorescents rouge (d.AO). Leur relative abondance et donc la forme du spectre composé dépend de la concentration en AO ($[\text{AO}]$). Les spectres d'émission de la EGFP et de l'AO verte présentent un grand recouvrement qui semble compromettre leur séparation dans des images deux couleurs. La question est donc de savoir si les organelles marqués avec la EGFP peuvent être distingués de ceux chargés avec les monomères d'AO.

2.2.2 Obtention des spectres de référence de m.AO et d.AO - figures supplémentaires 1 et 2

Pour séparer les deux formes de l'AO au niveau uni-vésiculaire et détecter la EGFP en présence de m.AO, nous avons utilisé SILU² en acquérant successivement cinq images spectrales (510 ± 10 , 535 ± 25 , 560 ± 20 , $615 \pm 22,5$ et 670 ± 20). Les spectres purs de chaque fluorophore furent obtenus, pour la EGFP à partir d'astrocytes exprimant pEGFP-N1 dans le cytoplasme et pour d.AO et m.AO à partir de solutions aqueuses contenant 20 mM $[\text{AO}]$ et 0,5 mM avec 20 % de Triton-X respectivement. La mesure des temps de vie

²voir le chapitre précédent

de la fluorescence (*lifetime*) de ces échantillons confirment que les spectres sont stables entre pH 5 et pH 7.

2.2.3 *Unmixing* de l'AO - tableau 1 et figure supplémentaire 3

Comparaison des spectres en présence Nous avons montré dans le chapitre précédent que SILU détecte l'expression et la colocalisation de la EGFP et de la citrine au niveau de vésicules individuelles d'astrocytes. En particulier, SILU permet leur détection malgré la présence d'autofluorescence (AF) dont le spectre recouvre en partie ceux des deux protéines fluorescentes. Nous avons eu la surprise de constater que l'on peut trouver une combinaison linéaire de m.AO et d.AO (à environ 0,5 mM [AO]) qui reproduit quasiment le spectre de l'AF. C'est pourquoi nous n'avons gardé que les cellules contenant une autofluorescence de faible intensité (au moins dix fois moindre que l'intensité des organelles AO). En revanche, le spectre d'émission de la EGFP est suffisamment distinct de celui de m.AO et d.AO pour que le SILU de ces trois colorants soit possible d'un point de vue spectral.

***Unmixing* de l'AO seule** Pour vérifier que la métachromasie de l'AO dans les organelles peut être modélisée par la somme pondérée des spectres de référence de m.AO et d.AO, nous avons appliqué SILU à des cellules marquées par l'AO selon différentes conditions de chargement. Effectivement, SILU détecte une progression dans la proportion de m.AO et d.AO qui est compatible avec la dépendance en concentration de la métachromasie. Nous avons aussi remarqué que même à 5 μ M pendant 15 min à 37 ° C, 40 % des organelles AO contenaient m.AO et 55 % après incubation à 23 ° C. A 2 μ M, tous les organelles en contiennent.

2.2.4 *Unmixing* de l'AO en présence d'organelles EGFP - tableau 2 et figure 2

Disposant dès lors de SILU pour l'AO et la EGFP, nous avons cherché si la présence de m.AO dans les organelles pouvait produire de fausses colocalisations sur des cellules transfectées par Sb-EGFP et chargées par l'AO dans les conditions de Crippa et al. Les organelles verts qui auraient été classés par imagerie deux couleurs en 20 % EGFP (verts) et 80 % EGFP-AO (verts et rouges) ne contenaient en fait que de l'AO. L'absence de EGFP pouvait être due aux choix malheureux de cellules non transfectées puisque nous ne les avons analysées qu'après incubation avec l'AO. Aussi avons-nous d'abord sélectionné une cellule transfectée et appliqué ensuite l'AO. Après incubation et rinçage, SILU ne parvint plus à détecter des organelles contenant de la EGFP dans la même cellule. Une autre raison suffisante pour expliquer l'absence de détection de EGFP pourrait être une différence entre les intensités de la EGFP et l'AO. Effectivement, nous avons trouvé que les organelles AO sont dix fois plus lumineuses que les organelles EGFP, ce qui rend impossible l'observation simultanée de ces deux colorants.

2.3 Conclusion

En conclusion, la présence dans les organelles de m.AO verts beaucoup plus intenses que la EGFP empêche la détection de cette protéine fluorescente et suggère de fausses colocalisations entre l'AO rouge et la EGFP. En outre, il est improbable de trouver une meilleure combinaison de filtres puisque le spectre d'émission de m.AO s'étend de 510 à 570 nm.

Ces erreurs systématiques de colocalisation en imagerie deux-couleurs pourraient expliquer les écarts entre deux études récentes utilisant le marquage simultané d'organelles avec l'AO et la EGFP. En outre, nos résultats remettent en question l'identité des organelles libérables dans les astrocytes étudiés dans ces articles, dans la mesure où ils ne contiennent peut-être que de l'AO mais pas de EGFP.

2.4 Article (soumis)

Chapitre 3

Autofluorescence

3.1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons présenté la méthode du *unmixing* uni-vésiculaire en expliquant pourquoi elle est nécessaire dans les études de colocalisation sur des cellules vivantes. Nous avons illustré le problème du recouvrement spectral des colorants dans le chapitre sur l'acridine orange. C'est ici du point de vue de la biologie et non plus de la méthode que nous voudrions aborder la seconde cause d'erreur, à savoir la présence d'organelles autofluorescents (AF).

Un organelle fluorescent peut être une vésicule issue de l'appareil de Golgi, un endosome (précoce ou tardif), un lysosome, une vésicule de sécrétion (synaptique ou à cœur dense), un peroxyosome ou même une mitochondrie. En ce qui concerne les molécules fluorescentes contenues dans les organelles, les sources habituelles sont les flavines, NADH et la porphyrine [68, 69]. Les deux premières participent dans les mitochondries à la chaîne du transport des électrons responsable de la principale production d'ATP dans les cellules eucariotes. La troisième y participe également en formant la structure des hèmes¹ mitochondriaux [48].

Les organelles autofluorescents pourraient donc être à première vue des

¹Les hèmes sont des molécules organiques cylindriques contenant un atome de Fer. Ils transportent l'oxygène dans l'hémoglobine et les électrons dans les mitochondries.

mitochondries. Les expériences préliminaires dont nous présentons les résultats ont été menées afin de répondre à la question de l'identité des organelles et des composés AF. L'étude de l'excitabilité de ces organelles conclura cette investigation sur l'autofluorescence des astrocytes.

3.2 Identité des organelles AF

3.2.1 Intensité

L'intensité de la fluorescence des organelles AF est le premier paramètre que nous présentons. Il n'a pas de rapport immédiat avec leur identité mais permet de mieux caractériser l'autofluorescence.

Dans les astrocytes en culture (du moins dans ceux que nous avons utilisés), l'AF a une intensité très variable non pas tant entre les organelles d'une même cellule, ni entre les cellules d'une même lamelle mais entre les préparations. D'une semaine sur l'autre, malgré l'application du même protocole de culture, les cellules peuvent présenter des niveaux d'autofluorescence dont le rapport peut aller de un à dix. Nous n'avons à présent aucune explication de cette variabilité. En effet, toutes les tentatives pour réduire l'AF ont échoué.

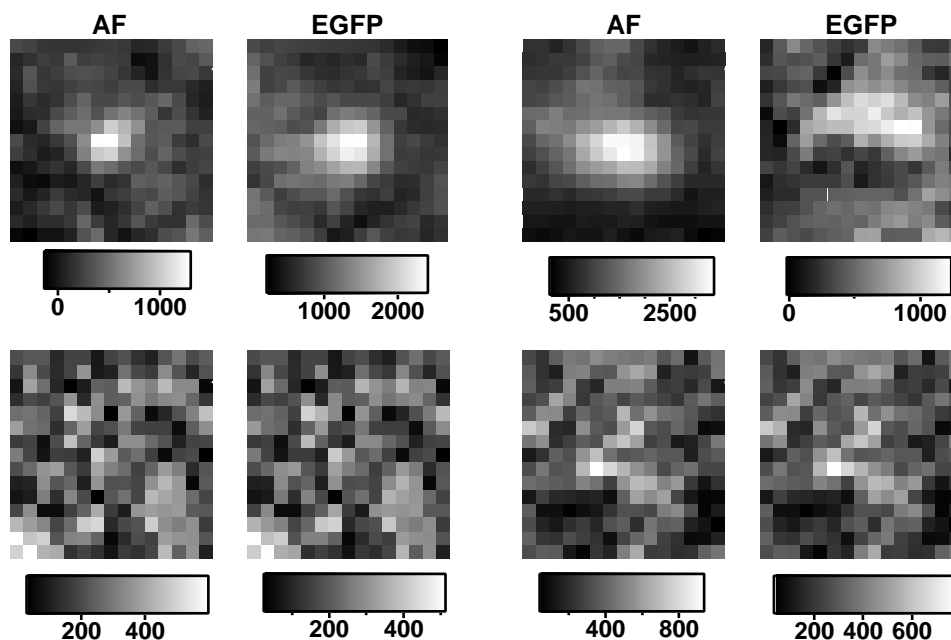
- La déprivation de serum pendant 24-48 h
- Le remplacement du serum de veau (FCS) par celui de cheval
- L'omission de phenol-red
- L'essai d'une autre souche de souris (astrocytes préparés à partir de souris NMRI au lieu des OF-1).

L'AF n'est donc probablement pas due à un artefact de culture facilement contournable. Notons par ailleurs que les astrocytes contiennent de l'autofluorescence *in vivo* (Jean-François Llitjos, communication personnelle).

La variabilité de l'intensité de l'AF a une conséquence évidente d'un point de vue méthodologique : à chaque série de transfections avec des protéines fluorescentes, il faut vérifier sur une lamelle contrôle l'intensité de l'autofluorescence afin de vérifier si elle est négligeable. Dans le cas con-

traire, le *unmixing* est nécessaire. Les images de la figure 3.1 représentent les quantités de EGFP et d'AF issues du *unmixing* dans deux organelles de la même cellule transfectée par EGFP-Sialine. Le premier (à gauche) contient les deux fluorophores tandis que le second (à droite) n'est qu'autofluorescent. L'image des intervalles de confiance est représentée en dessous. L'unité des images est en nombre de spectres purs. Pour les exprimer en intensité dans le canal vert du filtre 535 ± 25 nm, il faut les multiplier par l'intensité des spectres purs dans ce canal ².

FIG. 3.1 – Intensités de l'AF et de la EGFP



Le tableau 3.1 détaille les paramètres du *unmixing* pour les deux organelles. La EGFP du premier est trois fois plus intense que son AF mais du même ordre de grandeur que l'AF du second. En outre, celui-ci ne contient pas de EGFP. L'observation sans *unmixing* de ces organelles conduirait donc faussement à la détection de EGFP dans les deux. En revanche, l'AF peut généralement être négligée lors d'un marquage avec un colorant chimique intense comme l'acridine orange (cf. chapitre 2).

²voir annexe B

TAB. 3.1 – *Unmixing des organelles*

	Test de marquage (limite=2,31)	Détection de AF (limite=1,76)	Détection de EGFP (limite=1,76)	Intensité de AF (cts)	Intensité de EGFP (cts)
organelle 1	23,2 ± 0,4	8,7 ± 2,1	8,5 ± 1,0	320 ± 63	1040 ± 79
organelle 2	2,1 ± 0,1	7,8 ± 1,2	1,9 ± 2,0	982 ± 110	349 ± 137

3.2.2 Répartition dans la cellule et mouvement

L'observation en épifluorescence des astrocytes en culture sans colorant révèle une myriade d'organelles autofluorescents qui peuvent être très mobiles. La figure 3.2 en montre un exemple. L'AF est localisée dans toute la cellule, autour du noyau et dans les prolongements (barre d'échelle : 20 μm). La flèche désigne un organelle dont la figure 3.3 décrit le mouvement (le temps est indiqué en secondes et la barre d'échelle représente 3 μm). Ces images ont été acquises en épifluorescence, excitation 488 nm, dichroïque 500LP, émission 535 ± 25 nm, objectif 60x-NA1.45, temps d'exposition 0,5 s, camera Quantix (Roper Scientific).

Remarque : il semble que trois cellules soient accolées sur cette image comme le montre la présence de trois noyaux. Dans ce rapport, nous utilisons le terme d'îlot pour désigner un tel ensemble.

Trois caractéristiques ressortent de l'observation du mouvement des organelles AF. D'abord, les organelles des prolongements astrocytaires suivent généralement une *trajectoire rectiligne*, comme s'ils étaient guidés par le cytosquelette. C'est le cas des organelles de la région en haut à droite de la figure 3.2. Ensuite, le mouvement est souvent *saccadé*, comme on peut le voir dans la figure 3.3. Enfin, la mobilité est très *variable*. Comme on le voit sur la figure décrivant le mouvement d'un organelle, d'autres restent immobiles.

Potokar et al. ont étudié la cinétique des granules à cœur dense astrocytaires marqués par la protéine fluorescente pro-ANP-Emd [70]. Ils trouvent une vitesse moyenne de 0,4 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. L'organelle de la figure 3.3 a une vitesse

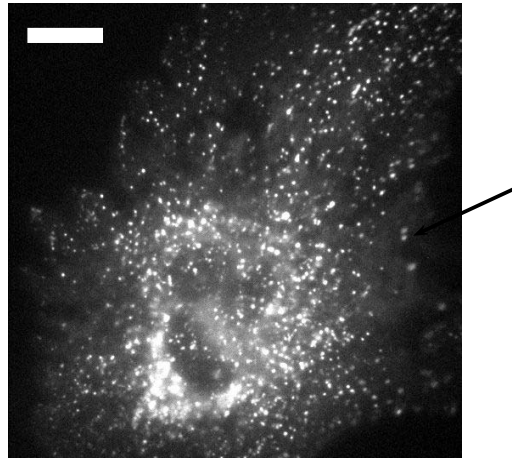
FIG. 3.2 – *Organelles autofluorescents dans les astrocytes*

FIG. 3.3 – Mobilité des organelles AF



moyenne le long de son parcours égale à $0,14 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ avec une vitesse maximale de $0,4 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Les autres organelles de la même cellule ont une vitesse identique ou inférieure. Crippa et al. obtiennent quant à eux une vitesse moyenne de $3,5 \pm 0,4 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les vésicules synaptiques astrocytaires — marquées par la synaptobrevine2-EGFP — en mouvement directionnel [38]. Toutes nos images ont été prises à température ambiante ($21\text{-}23^\circ\text{C}$) tandis que Crippa et al. travaillaient à 37°C et que Potokar et al. ne le précisent pas. Il est donc difficile de comparer la norme des vitesses entre nos données et les leurs. En revanche, les trois caractéristiques du mouvement (rectiligne, saccadé, mobilité variable) coïncident avec les observations de ces deux articles.

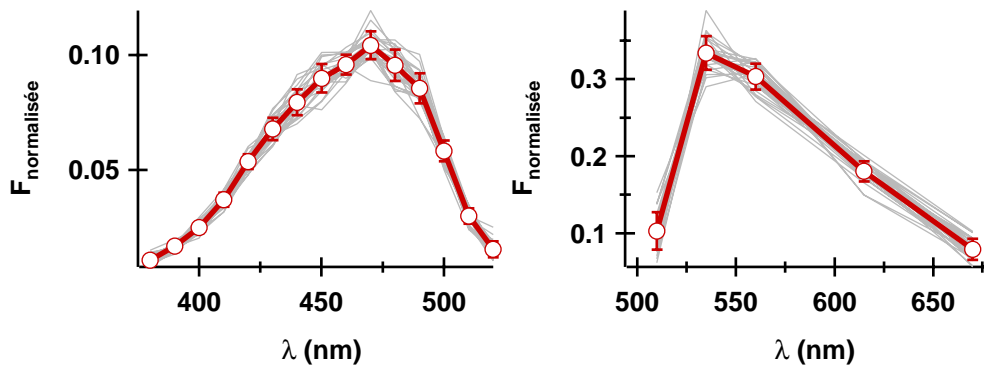
Cette étude sur la mobilité des organelles AF ne permet donc pas de déterminer à quelle catégorie d'organelles ils appartiennent mais elle mon-

tre au moins que ces spots autofluorescents sont vraisemblablement des organelles et non des radeaux lipidiques membranaires par exemple³.

3.2.3 Spectres

Le spectre de l'autofluorescence apporte des informations cruciales pour identifier les composés responsables de ce signal. L'article sur le *unmixing* présenté dans la première partie a déjà utilisé le spectre d'émission de l'autofluorescence. Nous le présentons à nouveau ici pour avoir une description complète de ces organelles (figure 3.4 à gauche). Nous ajoutons par ailleurs le spectre d'excitation (figure 3.4 à droite).

FIG. 3.4 – Spectres d'excitation et d'émission (5 points) de l'autofluorescence



Le spectre d'émission a été obtenu en excitant à 458 nm avec les filtres du *unmixing*. Le spectre d'excitation a été mesuré avec un dichroïque 560DCXR et un filtre d'émission passe bande HQ580±20. L'excitation était assurée par un polychromateur dans lequel un réseau en réflexion et une fente sélectionnent la longueur d'onde d'une lampe blanche à Xenon à environ 5 nm près. Le spectre du fond mesuré en dehors des cellules a été soustrait des spectres bruts puis le résultat a été normalisé comme pour le *unmixing*, *i.e.* en divisant chaque composante du spectre par la somme de ses composantes.

³En particulier, l'orientation rectiligne du mouvement suggère que les organelles AF peuvent circuler sur les microtubules comme les vésicules de sécrétion neuronales ou les organelles de l'exocytose constitutive.

Les courbes continues en gris représentent les spectres d'organelles individuels ($N = 25$ dans les deux cas) et celles en rouge marquées d'un cercle leur moyenne. Les barres d'erreur sont les erreurs quadratiques moyennes. Ces spectres sont influencés par les transmittances des appareils et des composants optiques, en particulier pour l'émission où le filtre à 510 nm a une largeur de bande deux fois moindre que les autres.

La forme des spectres indique cependant de façon certaine que NADH n'est pas responsable de la majorité de l'autofluorescence (excitation vers 350 nm et émission vers 460 nm, [68]). Bien plus, elle indique que c'est une flavoprotéine qui en est vraisemblablement la première source (ex : 420-490 nm et ém : 515-570 nm, [71])⁴. La composante dans le rouge pourrait être due à des dépôts de lipofuscine contenant de la porphyrine comme le suggèrent Chorvat et al. dans leur étude sur les cardiomyocytes [69].

Dans cet article, les auteurs justifient l'origine de l'AF en modulant son spectre par le blocage de certaines étapes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Bien que nous n'ayons pas réalisé de telles expériences, l'analyse comparée des spectres de l'AF suggère donc fortement une origine mitochondriale.

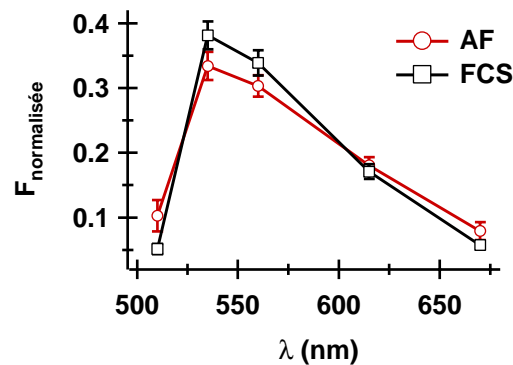
Le fait qu'une flavoprotéine soit fluorescente tandis que NADH ne le soit pas est en outre tout à fait cohérent. En effet, ces composés n'émettent une fluorescence significative que dans leur état oxydé pour le premier et réduit pour le deuxième [68]. La lumière des organelles AF serait donc un milieu oxydant par rapport aux potentiels redox de ces produits.

Enfin, une contribution à ne pas négliger est le serum du milieu de culture (FCS) dont le spectre d'émission de fluorescence est étonnamment proche de l'AF (figure 3.5).

Le spectre du serum est cependant plus étroit que celui de l'AF aussi n'est-il pas suffisant pour l'expliquer. Par ailleurs, nous avons vu en 3.2.1

⁴La forme des spectres permet de conclure avec certitude à l'absence d'un composé mais seulement de supposer sa présence : la combinaison des spectres de deux fluorophores peut en effet produire un spectre de forme voisine du spectre d'un troisième composé, comme nous l'avons vu en 2.2.3 avec l'AO et l'AF.

FIG. 3.5 – Spectres d'émission de l'AF et du serum (FCS)



que la suppression de FCS pendant 48 heures ne change ni le niveau d'autofluorescence ni son spectre. S'il est très probable que le serum participe à l'autofluorescence, d'autres composés comme les flavoprotéines et la porphyrine y contribuent donc vraisemblablement aussi.

3.2.4 Taille

L'analyse de la taille des organelles AF apporte une précision supplémentaire sur leur identité. En effet, la dimension est souvent un paramètre caractéristique des organelles. Ainsi les vésicules synaptiques dans les neurones mesurent-elles moins de 60 nm tandis que les granules à cœur dense ont un diamètre supérieur à 200 nm. La figure 3.6 présente l'histogramme de cinquante-cinq organelles AF observés en TIRFM afin d'éviter l'erreur due à l'étalement de l'image par la diffraction axiale⁵.

La mesure du diamètre d'objets⁶ de l'ordre de grandeur de la PSF latérale ($FWHM_{PSF}$) doit en revanche tenir compte de l'étalement de l'image par la diffraction latérale ($FWHM_{observée}$) pour accéder au diamètre réel

⁵L'épaisseur du champ évanescent est d'environ 200 nm (cf. annexe A) et la FWHM de la PSF axiale du microscope est supérieure à 2 μ m (cf. chapitre 1). Les organelles visibles en TIRFM sont donc trop proches du plan focal pour que leur image soit déformée par la diffraction.

⁶caractérisé par la largeur à mi-hauteur du profil latéral de l'intensité (*Full Width Half Maximum*, FWHM)

($FWHM_{réelle}$). Le profil latéral de l'intensité de petits objets peut être modélisé au voisinage du maximum par une gaussienne. Comme l'image est la convolution de la PSF par l'objet, elle peut être aussi modélisée par une gaussienne de variance la somme des deux variances [58] :

$$FWHM_{observée}^2 = FWHM_{PSF}^2 + FWHM_{réelle}^2 \quad (3.1)$$

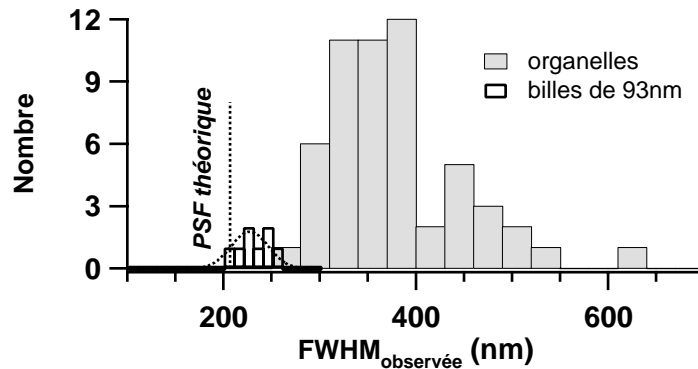
Nous pouvons ainsi extraire une approximation du diamètre réel des organelles AF : $FWHM_{réelle} = 290 \pm 50$ nm (médiane \pm déviation standard absolue, l'histogramme n'est pas gaussien). La figure 3.6 représente aussi l'histogramme des tailles observées de billes fluorescentes qui ont servi à la mesure de la PSF⁷.

Les lysosomes sont des organelles de forme et de taille très variables dont la figure 3.6 pourrait représenter un histogramme et dont la sphéricité fréquente est tout à fait compatible avec celle de la majorité des organelles AF. Bien qu'elles n'aient pas une structure rigide, les mitochondries en revanche sont généralement cylindriques avec un rayon supérieur à 500 nm et forment un réseau filiforme très différent du patron autofluorescent [61]. Les organelles AF étudiés sont au contraire des sphères de diamètre inférieur à 400 nm.

L'AF est aussi présente sous forme de vastes taches fluorescentes entourant le noyau (voir figure 3.2) peut-être dans l'appareil de Golgi mais nous ne nous sommes intéressés qu'au cas majoritaire des organelles sphériques. Sauf exception, les organelles AF étudiés seraient donc plutôt des lysosomes et non des mitochondries.

⁷La valeur théorique de $FWHM_{PSF}$ est la FWHM de la fonction de Bessel qui modélise la diffraction par l'ouverture circulaire du microscope : $\left(\frac{2J_1(2\pi x NA_{max}/\lambda_{em})}{2\pi x NA_{max}/\lambda_{em}}\right)^2$ où x est la distance au centre, NA_{max} l'ouverture numérique maximum des rayons qui sortent du milieu aqueux (1,33) et λ_{em} la longueur d'onde d'émission (560 nm). La FWHM de l'ajustement gaussien de cette fonction vaut 208 ± 1 nm. Pour confirmer cette valeur théorique, nous avons mesuré la taille de billes fluorescentes de diamètre connu (93 nm) et trouvé 227 nm. Appliquée à ces deux valeurs, la relation (3.1) donne : $FWHM_{PSF} = 207$ nm.

FIG. 3.6 – Taille des organelles autofluorescents



3.2.5 Caractérisation moléculaire

Le dernier outil à notre disposition pour cerner l'identité des organelles AF est le marquage par des colorants spécifiques. Nous présentons d'abord l'étude grâce au *unmixing* uni-vésiculaire de la colocalisation entre un marqueur lysosomal et l'AF.

L'AF est en grande partie contenue dans les lysosomes

Dans le premier chapitre, nous avons utilisé la sialine, protéine de transport lysosomale [72], pour marquer les lysosomes en présence d'un marqueur des vésicules synaptiques (synaptobrevine 2). Nous réutilisons ici la sialine fusionnée à la EGFP (EGFP-Si) mais sans autre protéine fluorescente afin d'étudier sa colocalisation avec l'AF. Nous avons vérifié que toutes les cellules analysées exprimaient la protéine fluorescente et contenaient de l'AF.

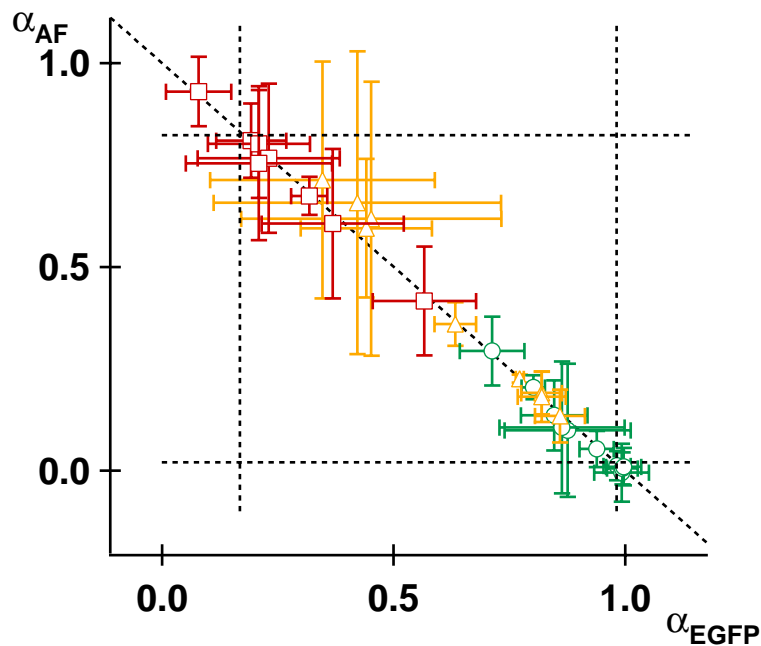
La figure 3.7 présente le résultat du *unmixing* de vingt-sept organelles pris dans six îlots astrocytaires, *i.e.* dans environ dix cellules. Les coordonnées de chaque point sont les quantités normalisées d'AF et de EGFP dans le voxel⁸ d'un organelle. La droite diagonale est le support théorique idéal — en l'absence d'erreur — de tous les points ($\alpha_{AF} + \alpha_{EGFP} = 1$). Les traits en pointillés marquent la limite de colocalisation dans le voxel tandis que les codes de couleur traduisent le résultat de la détection dans l'organelle

⁸voir annexe D

proprement dit⁹. Les ronds verts désignent les voxels ne contenant que de la EGFP, les carrés rouges ceux ne contenant que de l'AF et les triangles jaunes ceux contenant les deux fluorophores. Les barres d'erreur sont les intervalles de confiance à 70 %.

Nous remarquons au passage que les voxels marqués très majoritairement par un seul colorant contiennent effectivement des organelles purs (carrés rouges purs AF en haut à gauche et ronds verts purs EGFP en bas à droite). En revanche, les voxels contenant les deux fluorophores peuvent contenir des organelles purs ou co-marqués. Ces constats ne sont qu'une justification supplémentaire de la nécessité de la détection dans l'organelle et pas seulement dans le voxel.

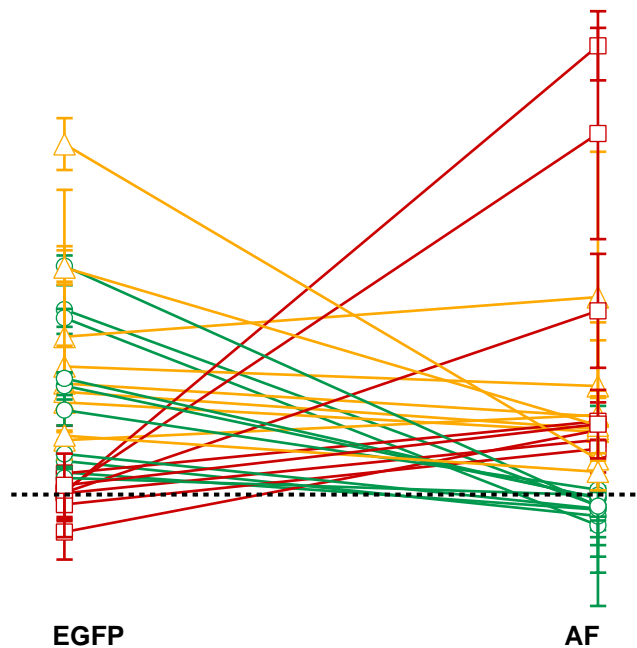
FIG. 3.7 – Colocalisation entre EGFP-Si et AF (voxels)



La figure 3.8 montre la détection des colorants dans l'organelle et non plus dans le voxel seulement, avec les mêmes codes de couleur et de forme que dans la figure précédente. Le trait pointillé horizontal marque la limite de détection (voir le chapitre 1).

Les résultats de ces analyses sont résumés dans le tableau 3.2 page 96.

⁹voir le chapitre 1

FIG. 3.8 – *Colocalisation entre EGFP-Si et AF (organelles)*

La colocalisation entre les organelles AF et ceux contenant la sialine — considérés comme des lysosomes — n'est que partielle. Que la moitié des lysosomes ne contiennent pas d'AF est tout à fait conciliable avec l'origine lysosomale de l'AF : cela pourrait par exemple être expliqué par le fait que la capacité d'élimination des cellules n'est pas saturée et que le recrutement de tous les lysosomes pour dégrader les produits autofluorescents n'est pas nécessaire. En revanche, la moitié seulement des organelles AF colocalise avec les lysosomes. Que sont les autres organelles ? Des lysosomes ne contenant pas la sialine ou d'autres organites comme les mitochondries ? La question reste ouverte et ne s'éclairera peut-être qu'après l'utilisation d'un autre marqueur lysosomal (par exemple, LAMP1 [73]).

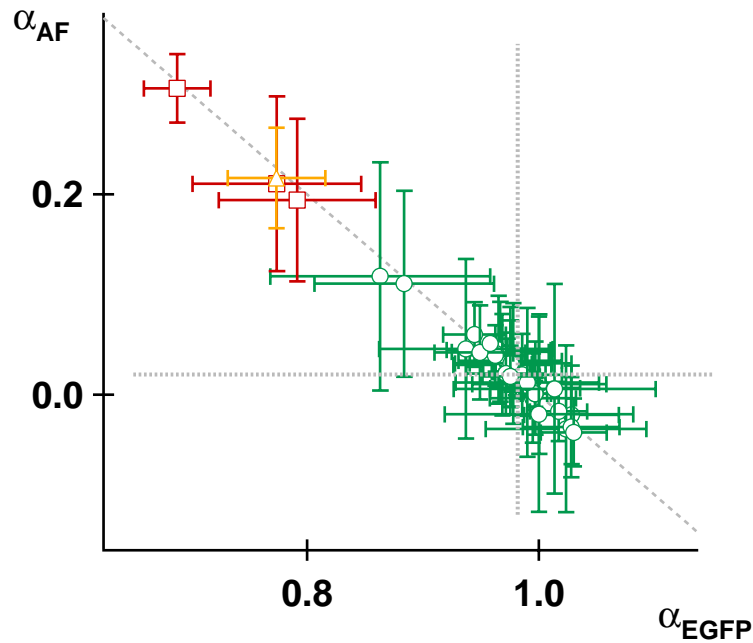
Les vésicules synaptiques ne contiennent pas d'AF

Ne disposant pas de protéine fluorescente spécifique des mitochondries, nous avons testé une autre origine pour l'AF : les vésicules synaptiques. Les astrocytes en culture et *in situ* expriment une grande variété de protéines impliquées dans l'exocytose régulée [51, 34]. Notamment, on trouve

des protéines généralement spécifiques des vésicules synaptiques comme la synaptobrévine 2 [34] même si certains rapportent que c'est plutôt son isoforme, la cellubrevine, qui est présente *in situ* [37]. Nous avons donc testé la colocalisation entre les vésicules synaptiques marquées par la synaptobrévine 2 fusionnée à la EGFP (Sb-EGFP) et les organelles AF.

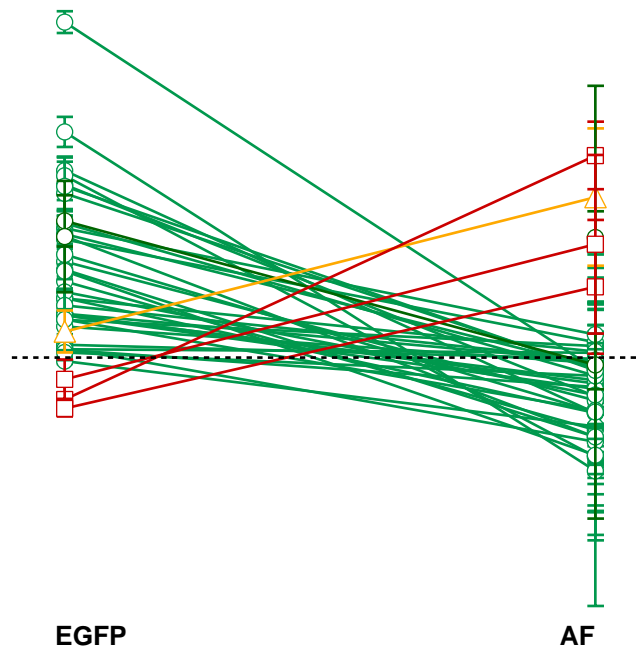
Les figures 3.9 et 3.10 présentant les résultats du *unmixing* de trente-huit organelles sont les analogues des figures présentées pour la sialine. Mais les résultats sont très différents.

FIG. 3.9 – Colocalisation entre *Sb-EGFP* et *AF* (voxels)



Il faut d'abord noter l'échelle des axes sur le graphe des quantités de fluorophores dans les voxels (figure 3.9). Les points sont concentrés dans le coin des grandes valeurs de α_{EGFP} , *i.e.* dans la zone de prédominance de la EGFP. La majorité — en tenant compte des intervalles de confiance — pourraient même se trouver dans la zone de EGFP pure. Cette différence est probablement due en partie à la présence de synaptobrévine 2 dans la membrane plasmique¹⁰ qui induit la présence de EGFP dans tous les voxels. Cependant, elle se retrouve aussi dans la détection des fluorophores à

¹⁰voir le chapitre 1

FIG. 3.10 – Colocalisation entre *Sb-EGFP* et *AF* (organelles)

l'intérieur des organelles qui est déjà signalée sur la figure 3.9 par les codes de couleur.

La figure 3.10 montre en effet que la grande majorité des organelles exprimant *Sb-EGFP* ne contiennent pas d'*AF*, ce qui confirmerait que les organelles *AF* ne sont pas des vésicules synaptiques. Mais il faut aussi constater que très peu d'organelles *AF* ont été détectés dans les cellules analysées. Cette lacune reflète-t-elle la réalité ou un défaut du *unmixing* ?

Il semble que la seconde hypothèse soit à prendre en compte. Non pas à cause de la présence de *EGFP* autour des organelles *AF* qui ne pourraient ainsi pas être détectés au sein d'un colorant plus intense (par exemple, un des organelles *AF* détectés est dans un voxel contenant deux fois plus de *EGFP* que d'*AF*¹¹). Ce n'est pas le rapport des intensités entre l'*AF* et la *EGFP* qui pose problème comme dans le cas de l'acridine orange¹² car les spectres de l'*AF* et de la *EGFP* sont suffisamment différents pour détecter l'*AF* dans le rouge alors que le canal vert est envahi par la *EGFP*.

¹¹voir aussi l'annexe D pour un exemple encore plus frappant

¹²voir le chapitre 2

C'est la valeur absolue de l'intensité de l'AF dans les cellules analysées qui est à l'origine du peu d'organelles AF détectés. Elle est en effet de l'ordre de 300 cts (contre des intensités de EGFP aux environs de 1000 cts). En comparaison, les organelles AF des cellules analysées pour la colocalisation entre la sialine et l'AF avaient une intensité de l'ordre de 1000 cts. Par malchance, nous sommes donc tombés sur des cellules avec une faible autofluorescence pour toutes les expériences avec la Sb-EGFP. Aussi est-il probable que nous ne détectons que de la Sb-EGFP dans certains organelles contenant de la Sb-EGFP et de l'AF à cause d'un intervalle de confiance de l'estimation de la quantité d'AF trop grand¹³.

Ceci dit, la figure 3.10 montre que ce défaut de détection de l'AF à cause d'un *intervalle de confiance* trop grand ne peut concerner que six organelles sur les trente-quatre qui ont été classés purs EGFP. Le test de détection de l'AF sur tous les autres conduit à un *rapport signal-sur-fond* (SBR) inférieur au seuil de détection (1,76 pour 95 % de chance de certitude). Si nous néglignons de prendre en compte l'intervalle de confiance, il faudrait donc au maximum ajouter six organelles contenant à la fois la EGFP et l'AF, ce qui signifierait qu'au maximum 20 % des vésicules synaptiques contiennent de l'AF (contre au moins la moitié pour les lysosomes)¹⁴.

Conclusion de la caractérisation moléculaire

Finalement, nous avons trouvé une grande colocalisation entre les lysosomes et les organelles AF (au moins 50 %). Au contraire, très peu de vésicules synaptiques contiennent de l'AF. Cette dernière étude est moins précise que la première à cause de la faible intensité de l'AF dans les cellules

¹³Nous avons en effet montré dans le chapitre 1 qu'un signal suffisamment important est requis pour assurer un petit intervalle de confiance.

¹⁴On pourrait croire que cette extrapolation conduit aussi à dire qu'au maximum 70 % des organelles AF (ici sept sur dix au lieu de trois sur dix en prenant en compte l'intervalle de confiance) sont des vésicules synaptiques mais ce serait sans compter les organelles AF que nous avons rejetés parce qu'ils ne contenaient pas de EGFP et que leur faible intensité en AF empêchaient de détecter. Le nombre d'organelles contenant de l'AF serait alors bien supérieur à dix et leur fraction contenant aussi de la EGFP diminuerait d'autant.

TAB. 3.2 – Colocalisation entre EGFP-Si et l'AF et entre Sb-EGFP et l'AF

organelles en %	EGFP	AF	EGFP \cap AF
Sialine	37	30	33
Synaptobrévine 2	89	8	3

analysées. C'est un problème récurrent et imprévisible lors des expériences sur l'autofluorescence dont l'intensité, comme nous l'avons dit au début de cette partie (3.2.1), est très variable d'une préparation à l'autre.

Nous avons aussi essayé d'autres protéines fluorescentes pour marquer d'autres types d'organelles. La transfection avec la chromogranine B (de la famille de la sécrétogranine, présente dans les astrocytes, [74]) ou avec NPY [75] devait permettre d'observer les vésicules à cœur dense mais aucune des deux n'a fonctionné. Dans les deux cas, les cellules transfectées présentaient une fluorescence cytoplasmique indiquant que les protéines vésiculaires n'avaient pas été reconnues ou que les plasmides comportaient des défauts. Nous ne les avons pas testés sur d'autres types cellulaires ni cherché à vérifier la présence de ces protéines en culture par immunohistochimie sur des cellules vierges. Aussi est-il difficile de tirer des conclusions de ces échecs de transfection. Tout au plus, ces expériences nous ont convaincus de la nécessité du *unmixing* pour éviter de prendre les organelles AF pour des organelles transfectés !

Des études morphologiques, spectrales et moléculaires, il ressort que les organelles autofluorescents sont probablement des lysosomes. Dans les cellules *non sécrétrices*, l'exocytose régulée qui, pense-t-on, est utilisée pour réparer la membrane, est assurée par les lysosomes [73]. En outre, les organelles AF sont souvent très mobiles et se dirigent vers les prolongements astrocytaires où l'exocytose semble avoir lieu préférentiellement [37, 38]. Nous avons donc cherché si ces organelles pouvaient être libérés par exocytose.

3.3 Exocytose des organelles AF

3.3.1 Introduction

Nous avons présenté en introduction générale les différents moyens de sécrétion probablement utilisés par les astrocytes et souligné l'importance de l'exocytose. Or, nous venons de montrer que les organelles AF sont probablement en grande partie des lysosomes, ce qui les rend a priori moins susceptibles d'être libérables que les vésicules de sécrétion. Cependant, dans l'ensemble des cellules eucariotes, les lysosomes eux-mêmes peuvent fusionner à la membrane plasmique (processus nommé *défécation*) pour aider la cellule à se débarrasser des produits non digérables ou réparer la membrane plasmique [48, 73]. Il ne serait donc pas impossible que la stimulation des astrocytes provoque l'exocytose des lysosomes autofluorescents juxta-membranaires.

Le signe de l'activation astrocytaire adopté dans toutes les études sur l'excitabilité des astrocytes est l'augmentation de $[Ca]_i$. Par ailleurs, comme nous l'avons souligné dans l'introduction générale, l'exocytose est un processus dépendant du calcium. Nous avons donc observé les variations de la concentration calcique des astrocytes en réponse à des stimuli susceptibles de déclencher l'exocytose des organelles autofluorescents.

3.3.2 Vagues calciques

Observation du signal calcique

Il existe aujourd'hui une grande variété de chélateurs synthétiques du calcium qui changent de spectre ou d'intensité de fluorescence en se liant à lui [76]. Par ailleurs, ces indicateurs calciques existent sous des formes estérifiées qui traversent la membrane plasmique des cellules, ce qui évite de percer la membrane pour les injecter. La concentration intra-cellulaire des indicateurs ainsi chargés n'est pas maîtrisée, aussi est-il difficile de tirer du signal fluorescent des valeurs précises de $[Ca]_i$ mais ces enregistrements suffisent pour détecter sa variation relative.

En effet, après avoir soustrait du signal de fluorescence le fond extra-

cellulaire, on peut normaliser le signal de façon à ce qu'il ne dépende que de la variation de $[Ca]_i$. Le signal est en première approximation proportionnel à la concentration de la sonde calcique, à des paramètres relatifs à sa fluorescence intrinsèque (coefficient d'extinction molaire, rendement quantique,...), aux paramètres d'éclairement et de collecte du signal et à $[Ca]_i$, ce que l'on peut résumer en écrivant : $F = A[Ca]_i$ où A contient tous les paramètres sauf $[Ca]_i$. On accède donc à la variation relative de la concentration calcique par la relation :

$$\frac{F - F_0}{F_0} = \frac{[Ca]_i - [Ca]_{i0}}{[Ca]_{i0}}$$

avec l'indice 0 dénotant la moyenne avant la stimulation.

L'observation simultanée de $[Ca]_i$ et des organelles en microscopie à onde évanescente (TIRFM) est très délicate, en particulier parce que le signal calcique juxta-membranaire est très rapide et donc difficile à voir [77]. En outre, les meilleures sondes calciques émettent dans le vert ce qui impose de regarder les organelles AF dans le rouge où ils sont peu fluorescents. C'est pourquoi nous avons dû découpler l'observation de la réponse calcique et des organelles. Nous avons ainsi d'abord cherché comment activer les astrocytes en suivant les variations de $[Ca]_i$ en épifluorescence puis, sur d'autres préparations, nous avons appliqué le même stimulus en observant les organelles en TIRFM.

Dans les figures suivantes, nous présentons un exemple de réponse calcique à trois stimulations différentes :

- mécanique
- glutamatergique
- sérotoninergique.

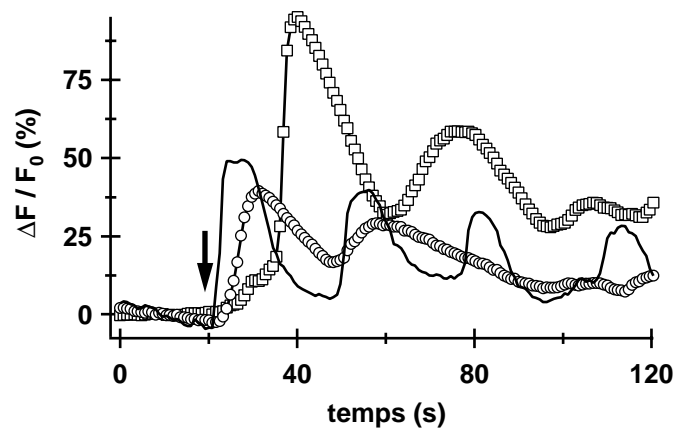
Nous avons utilisé comme sondes calciques l'Oregon Green BAPTA-1 (OGB) et le Fluo-4. Ces deux indicateurs ont des propriétés assez semblables, avec un K_d de l'ordre de 300 nM et un coefficient d'extinction molaire voisin de $20000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Nous avons appliqué les drogues avec une voie de la perfusion assurant le renouvellement de la solution ou directement avec une seringue. Nous avons également essayé d'utiliser une pipette placée juste

à côté d'un astrocyte (non montré ici). Si cette méthode offre l'avantage de n'exciter qu'un petit nombre de cellules sur la lamelle et de renseigner plus précisément sur la cinétique d'application des drogues, elle présente un inconvénient majeur : la pression créée par l'éjection de solution hors de la pipette peut stimuler mécaniquement les cellules.

Stimulation mécanique

La figure 3.11 montre l'initiation d'une vague calcique en réponse à une stimulation mécanique dans un astrocyte chargé avec $2 \mu\text{M}$ d'OGB pendant une heure à 37°C ¹⁵. En pratique, on approche une pipette en verre au plus près de la cellule puis, grâce à un piezzo, on appuie très légèrement sur la membrane et on retire la pipette¹⁶. Il faut bien sûr vérifier a posteriori que l'on n'a pas endommagé la cellule, ce qui est facile à voir en observant son état quelques minutes après (est-ce que $[Ca]_i$ est revenu au niveau initial ? la cellule peut-elle encore répondre ?).

FIG. 3.11 – *Vague calcique en réponse à une stimulation mécanique*



Les trois traces correspondent à trois régions situées à différentes distances de l'endroit de la stimulation. L'augmentation de $[Ca]_i$ survient d'autant plus tard que la région en est éloignée, ce qui est le propre d'une prop-

¹⁵En fait, 30 min sont suffisantes.

¹⁶Certains appliquent un train ultra-rapide de pressions contre la membrane mais on est en droit de se demander si un astrocyte peut supporter un tel traitement [53].

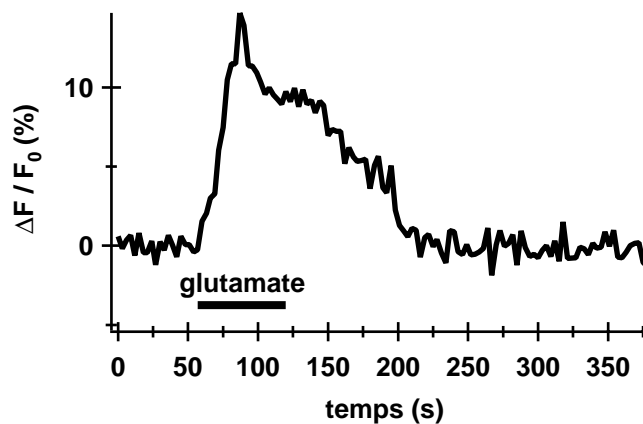
agation du signal. Une région montre en outre clairement des oscillations calciques. La flèche désigne l'instant de la stimulation.

Stimulation glutamatergique

Les stimulations par des neurotransmetteurs sont évidemment plus physiologiques. Le plus étudié aujourd'hui est le glutamate à cause de son importance dans le système nerveux central. De nombreux astrocytes possèdent des récepteurs glutamatergiques *in situ* et en culture (voir l'introduction générale, [8, 41, 37]).

La figure 3.12 montre la réponse calcique à l'application de $100 \mu\text{M}$ de glutamate dans un astrocyte chargé avec $1 \mu\text{M}$ d'OGB pendant 30 min à 37°C . La drogue a été injectée par la perfusion.

FIG. 3.12 – Réponse calcique au glutamate



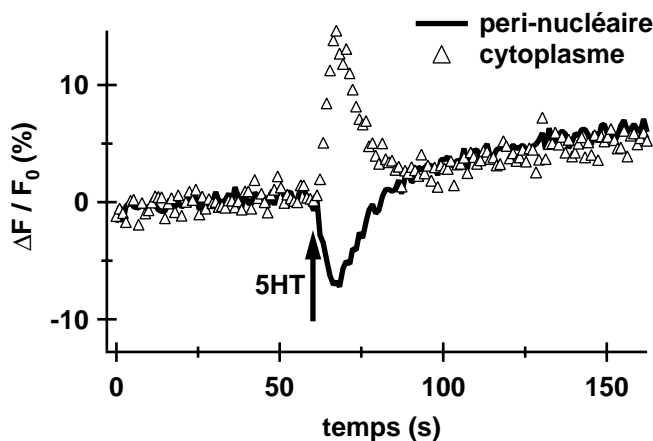
Le signal semble bi-phasique, avec une montée rapide et une composante plus lente ensuite. Ce comportement pourrait être dû à une source double d'ions Ca^{2+} : les réservoirs intra-cellulaires d'abord puis le milieu extracellulaire via des canaux calciques membranaires ensuite [16]. Notons qu'après l'application de glutamate, $[\text{Ca}]_i$ revient à la ligne de base sans donner naissance à une vague calcique et que sa variation relative est plus petite que celle de la réponse déclenchée par la stimulation mécanique, plus violente [53].

Stimulation sérotoninergique (5HT)

Enfin, les astrocytes *in vivo* et en culture expriment des récepteurs sérotoninergiques métabotropiques liés à des protéines G (au moins 5HT_{1A} et 5HT_{2A} [8, 16]). Il était intéressant de tester ce neurotransmetteur car l'activation du récepteur 5HT_{1A} des astrocytes provoque la libération de S100B [78]. Cette protéine qui, à faible concentration, joue un rôle trophique bénéfique pour les neurones, présente des taux anormalement élevés dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la trisomie 21 et participerait à la cascade pro-inflammatoire probablement impliquée dans de nombreuses pathologies cérébrales [6]. Le mode de sécrétion est inconnu et semble indépendant de la voie normale de synthèse des vésicules par le reticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi [62]. La défécation des lysosomes — caractéristique de cellules stressées — chargés en S100B est donc une hypothèse intéressante du mode de sécrétion de S100B par les astrocytes.

Comme il a été déjà observé [16], l'application de sérotonine provoque une augmentation de $[Ca]_i$ dans les astrocytes en culture.

FIG. 3.13 – Réponse calcique à la sérotonine



Dans l'expérience présentée en figure 3.13, les astrocytes ont été chargés avec 5 μM de Fluo-4 pendant 55 min à 37 ° C¹⁷.

¹⁷La concentration vue par la cellule est mal appréciée car dans cette expérience, la

La réponse calcique présente une particularité intéressante. $[Ca]_i$ évolue de façon opposée autour du noyau et dans le cytoplasme. Sa diminution dans la zone péri-nucléaire pourrait refléter la fuite du calcium hors des stocks internes (entre autres le reticulum endoplasmique) vers le cytoplasme (cf. [15] où l'on peut voir une telle dissymétrie grâce à deux colorants calciques). L'instant de l'injection de sérotonine est désigné par une flèche.

Ayant vérifié que nos astrocytes en culture répondent à la stimulation mécanique et à l'application de glutamate et de sérotonine, nous avons testé l'influence de ces stimuli sur le comportement des organelles auto-fluorescents.

3.3.3 Exocytose

Imagerie de l'exocytose en TIRFM

L'exocytose d'un organelle chargé par un colorant se traduit par sa fusion plus ou moins complète avec la membrane plasmique et le passage du fluorophore dans l'espace extra-cellulaire. L'observation de cet événement en TIRFM repose sur quatre phénomènes relatifs au colorant :

- son approche vers la lamelle de microscope, *i.e.* vers le dioptre verre-eau
- la chute de sa concentration qui lève l'inhibition de sa fluorescence (*dequenching*)
- le changement de son environnement entre la lumière de l'organelle et l'espace extra-cellulaire, en particulier la variation du pH de 5-6 à 7,3.

perfusion réservée à l'application des drogues était prise par un autre neurotransmetteur et nous avons appliqué la sérotonine à la seringue sur la lamelle de microscope. Après dilution, la concentration finale aurait été très élevée (2,8 mM). Nous ne savons pas si la cellule a vu une concentration supérieure ou inférieure à cette valeur aussi la spécificité de la stimulation sérotoninergique n'est pas garantie. Cependant, la variation relative de $[Ca]_i$, du même ordre de grandeur que celle déclenchée par 100 μ M de glutamate, suggère que la cellule a vu une concentration de sérotonine bien inférieure à 2,8 mM. Sous réserve bien sûr des différences de sensibilité des astrocytes en culture à ces deux neurotransmetteurs [52].

- sa diffusion entre la membrane et la lamelle.

Les deux premiers phénomènes provoquent l'augmentation de l'intensité de fluorescence au moment de l'ouverture de l'organelle. Le troisième peut agir de même ou faire le contraire selon les colorants. Le quatrième se traduit par l'étalement de la fluorescence dans un nuage de colorant centré sur le site de fusion. Le profil temporel de l'intensité de fluorescence à cet endroit est donc en général constitué d'un pic bref suivi d'une décroissance jusqu'au niveau d'intensité du fond [55].

Ce profil correspond aussi à l'explosion des organelles à cause du *de-quenching* soudain et de la diffusion du colorant dans le cytoplasme. C'est pourquoi il faut être très vigilant avec des sondes susceptibles d'endommager la membrane des organelles¹⁸. La disparition d'un organelle en TIRFM peut aussi arriver sans exocytose à cause d'un mouvement vers le cytoplasme dans la direction perpendiculaire à la lamelle [60]. D'après la variation exponentielle de l'intensité d'excitation du champ évanescent (cf. introduction générale), l'intensité d'un tel organelle décroît jusqu'à s'évanouir lorsqu'il est sorti du champ. Il est ainsi courant de voir des organelles apparaître puis disparaître aussi rapidement. D'après nos observations personnelles, ce mouvement axial est souvent associé à un mouvement latéral. Observé en épifluorescence, ce type de mouvement donne naissance à une figure de diffraction dès que l'organelle sort du plan focal mais en TIRFM, il disparaît avant¹⁹. Enfin, si la cellule bouge, il est tout à fait possible de perdre des organelles qui n'ont pas fusionné mais dont la région s'est éloignée de la lamelle. L'observation de l'exocytose en TIRFM requiert donc une analyse rigoureuse du signal.

Disparition des organelles AF

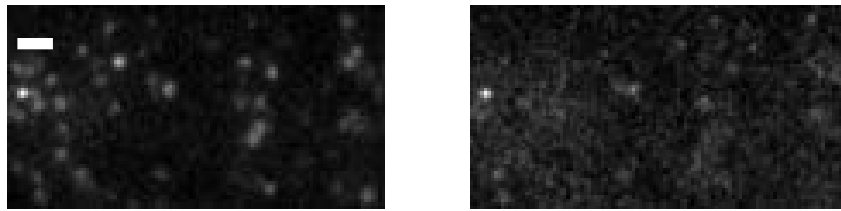
La stimulation mécanique ou l'application de glutamate n'a jamais produit entre nos mains la fusion des organelles AF, ce qui il est vrai ne prouve rien en soi. Au contraire, la sérotonine a provoqué sur plusieurs cellules la

¹⁸C'est le cas de l'acridine orange [79].

¹⁹voir note page 88

disparition brutale des organelles. La figure 3.14 montre l'image en TIRFM d'une partie d'un astrocyte sans autre fluorophore que l'autofluorescence (Laser Ar 488 nm, dichroïque 500LP, émission 500 ± 25 nm, objectif à huile 60x-NA1.45, télescope 2x, camera GenIII-intensifiée PentaMax CCD, temps d'acquisition 30 ms, gain 90x). L'image de gauche est prise avant l'application de sérotonine, celle de droite trente secondes après. La majorité des organelles ont disparu. Barre d'échelle : $2 \mu\text{m}$.

FIG. 3.14 – *Exocytose des organelles AF*



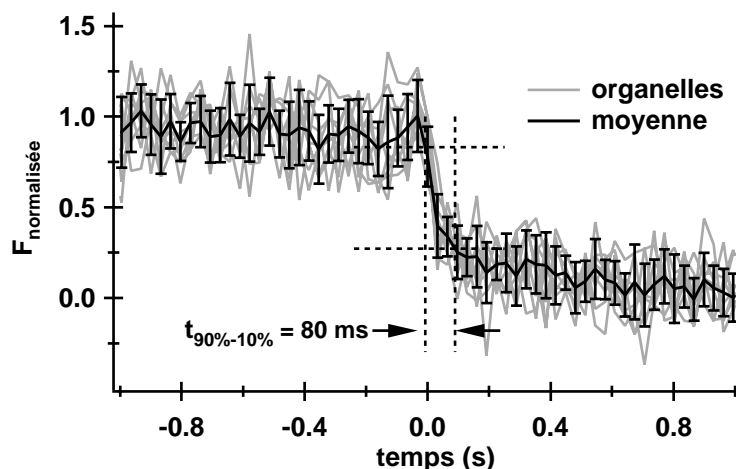
La figure 3.15 représente le profil temporel de la fluorescence de neuf organelles AF pris dans l'image précédente ainsi que leur moyenne. Les barres d'erreur sont les écarts quadratiques moyens. Pour s'affranchir de la luminosité propre de chaque organelle et de celle du fond, nous avons normalisé le signal selon :

$$F_{normalisée} = \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F_{min}}$$

F_{max} et F_{min} ont été mesurées en moyennant le signal avant et après la fusion respectivement. Les profils ont par ailleurs été alignés temporellement en prenant comme origine le point succédant au dernier maximum local avant la disparition²⁰. La sérotonine a été appliquée comme précédemment, en l'injectant directement dans la solution mais avec une concentration trois fois moindre. La disparition des organelles AF a commencé à chaque fois dès l'entrée de la solution contenant la drogue²¹.

²⁰La résolution temporelle est insuffisante pour appliquer un critère plus précis (variation supérieure à deux fois l'écart quadratique moyen par exemple).

²¹Nous avons bien sûr vérifié que l'injection de solution saline à la seringue ne déclenche pas de stimulation mécanique des astrocytes.

FIG. 3.15 – *Cinétique de l'exocytose*

Les organelles disparaissent en 80 ms (durée de la décroissance du signal moyen entre 90 % et 10 % de l'intensité mesurée avant la disparition). Mais avant d'analyser plus précisément ces signaux, trois remarques s'imposent :

- les profils sont tous quasiment identiques alors que les disparitions ont eu lieu à divers moments (dans un laps de temps de dix-huit secondes pour les neuf organelles présentés)
- les disparitions sont très rapides (moins de 100 ms)
- il n'y a pas de pic avant les disparitions.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé de nuage fluorescent après la disparition des organelles.

Est-il possible à l'aide de ces constats de déterminer si les organelles ont explosé, se sont déplacés ou ont fusionné ?

La première possibilité peut être écartée car les organelles AF sont beaucoup moins — voire pas du tout — sensibles à l'explosion que les organelles chargés en acridine orange (observation personnelle).

Le premier constat permet en outre de rejeter l'hypothèse d'un mouvement d'ensemble de la cellule car il ne se répéterait pas avec une telle constance.

En revanche, il est possible que les organelles quittent la zone juxtamembranaire sous l'effet de la stimulation. S'ils fusionnaient, les composés

fluorescents devraient en effet s'échapper dans l'espace extra-cellulaire et produire le nuage caractéristique. On pourrait refaire la même expérience en épifluorescence : tout mouvement y serait détecté par l'apparition des anneaux de diffraction mais le contraste ne serait pas suffisant pour acquérir des images avec la rapidité requise (35 ms entre deux plans). Par ailleurs, l'absence de pic avant la disparition appuie également l'hypothèse du mouvement.

Cependant, la rapidité de la disparition semble trop grande. Ainsi dans les cellules chromaffines par exemple, Oheim et al. rapportent des vitesses maximales et très rarement atteintes de 600 nm.s^{-1} avec une moyenne à $189 \pm 13 \text{ nm.s}^{-1}$ [60]. Pour disparaître en se déplaçant, les organelles AF devraient parcourir tout le champ évanescant, *i.e.* une distance de l'ordre de 200 nm en moins de 100 ms, soit atteindre des vitesses axiales (perpendiculaires à la membrane) supérieures à $2 \mu\text{m.s}^{-1}$. A contrario, les granules à cœur dense des cellules neuroendocrines chargées en acridine orange libèrent leur colorant en moins de 200 ms [56]. La cinétique de la disparition des organelles AF est donc plus compatible avec l'exocytose qu'avec le mouvement.

Mais s'il s'agit d'une exocytose, comment expliquer l'absence du pic avant la disparition et du nuage après ?

Hypothèses

Notons d'abord que tous les colorants ne conduisent pas à la présence d'un pic. Ainsi du FM1-43 dont la fluorescence est insensible aux variations du pH, du potentiel membranaire et de sa propre concentration [80]. De même, nous avons observé l'exocytose d'organelles chargés en quinacrine mais sans pic avant la fusion (données non présentées). Les composés auto-fluorescents peuvent très bien correspondre à ce cas de figure.

En ce qui concerne le nuage autour du site de fusion, sa présence requiert un colorant dont l'intensité de fluorescence reste élevée après l'exocytose et qui est capable de diffuser rapidement avant son *bleaching*. Or, il

faut se rappeler que les composés autofluorescents ne sont probablement pas de petites molécules comme l'acridine orange mais des protéines vraisemblablement attachées aux protéoglycanes de la matrice intra-vésiculaire [81]. Lorsque l'organelle fusionne à la membrane plasmique, les flavines autofluorescentes pourraient ainsi rester ancrées dans la membrane. Dans ce cas, une diffusion beaucoup plus lente serait prévisible car elle serait limitée par l'adhésion à la matrice intra-vésiculaire et par la viscosité du milieu lipidique. C'est d'ailleurs parce que le transporteur vésiculaire du glutamate VGlut — couplé à la EGFP — ne donne pas de variation du signal évidente lors de l'exocytose que Bezzi et al. ont dû marquer les organelles de sécrétion avec l'acridine orange [37]. De même, Crippa et al., qui ont observé la fusion de vésicules portant la synaptobtévine 2-EGFP, n'ont perçu leur disparition que trente secondes après la stimulation [38].

Mais si les composés autofluorescents ne s'échappent pas rapidement après l'exocytose, pourquoi l'intensité de la fluorescence chute-t-elle si brutalement ? Il existe en fait une autre cause possible à la chute du signal après l'exocytose : le changement de milieu. Par exemple, le FM1-43 cité plus haut est fluorescent quand il est inséré dans la membrane mais pas quand il se retrouve en solution aqueuse. Les flavines que nous pensons être à l'origine de l'autofluorescence dans les organelles AF²² ne sont fluorescentes que dans leur état oxydé. Il est possible que l'immersion dans le milieu extra-cellulaire provoque un changement de l'état d'oxydation de ces protéines à cause de la variation du pH et de leur concentration, les rendant non fluorescentes après la fusion.

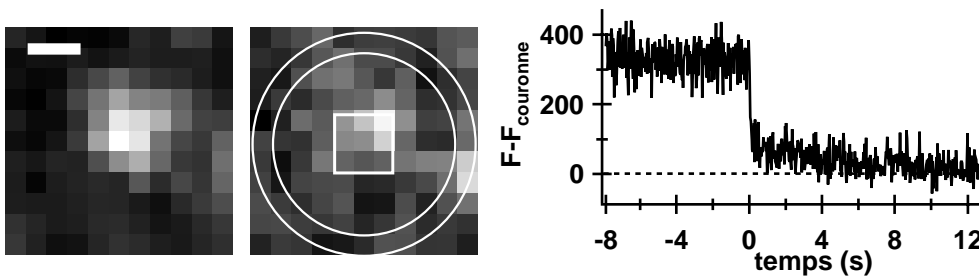
Ces hypothèses mériteraient pour être vérifiées des expériences complémentaires mais l'analyse un peu plus précise des images de la disparition des organelles AF confirme les raisonnements précédents.

²²voir le chapitre 2

Devenir de l'organelle après sa disparition : mouvement ou exocytose ?

L'observation attentive de l'endroit où disparaissent les organelles révèle en effet la persistance d'une tache fluorescente de faible intensité pendant plusieurs secondes. La figure 3.16 montre à gauche l'image en TIRFM d'un organelle 150 ms avant et après sa *disparition*. A droite, la persistance du signal pour le même organelle est mise en évidence par la différence entre le signal fluorescent au centre (carré blanc de 3*3 pixels) et dans une couronne située à 860 nm (4,5 pixels) du centre de l'organelle (couronne blanche). Barre d'échelle : 0,5 μm .

FIG. 3.16 – *Persistance de la fluorescence après la disparition*



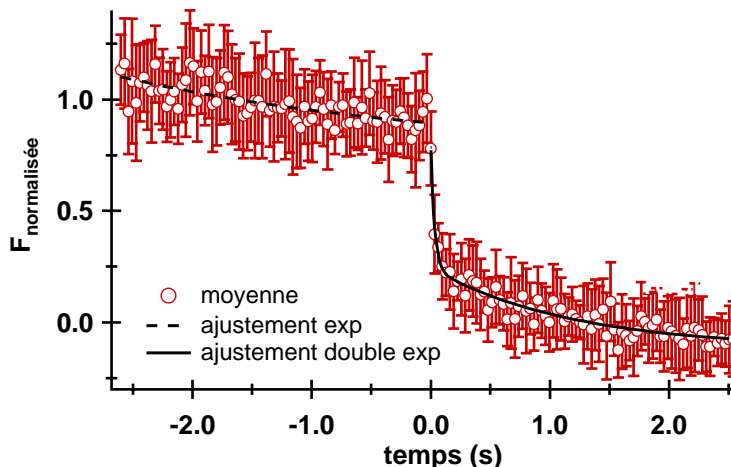
L'endroit où l'organelle a *disparu* met plusieurs secondes avant d'atteindre le niveau de fluorescence de la membrane voisine.

Cette tache persistente de faible intensité est-elle due à l'organelle entré plus profondément dans la cellule ou à son contenu rendu moins fluorescent par son exposition au milieu extra-cellulaire ?

Si nous regardons le profil de l'intensité sur une plus grande échelle de temps, nous constatons un indice appuyant la seconde hypothèse. La figure 3.17 reprend la figure 3.15 mais montre le signal moyen (ronds rouges) sur une période de cinq secondes qui permet de mieux voir sa diminution avant comme après la *disparition*.

Avant, il s'agit très probablement du *bleaching* de l'auto fluorescence car tous les organelles analysés présentent ce phénomène avec une constante de temps reproductible, estimée par un ajustement exponentiel de la moyenne

FIG. 3.17 – *Décroissance du signal avant et après la disparition de l'organelle*



à 2,8 s. Après, on mesure une constante de temps de 1,2 s. Même si ces ajustements ne sont faits qu'à titre indicatif, ils montrent ce que l'œil détecte d'ailleurs, à savoir que la décroissance de la fluorescence après la fusion est plus rapide qu'avant. Il y a donc après la fusion un phénomène qui s'ajoute au *bleaching* pour faire diminuer le signal plus rapidement et qui pourrait être la **diffusion** dans la membrane [82]. Nous avons représenté sur cette figure l'ajustement exponentiel de la première phase en traits pointillés et nous avons ajouté à titre indicatif un ajustement double exponentielle prenant en compte la fusion ($\tau_f = 32$ ms) et la phase présumée de diffusion dans la membrane ($\tau_d = 1,2$ s).

Cependant, l'accélération de la décroissance du signal après la fusion pourrait aussi être due à un *bleaching* plus important du fait du rapprochement des fluorophores vers la lamelle de verre²³ : l'hypothèse du mouvement vers l'intérieur de la cellule serait alors exclue. L'exocytose est donc la seule solution raisonnable compatible avec l'accélération de la décroissance du signal après la *disparition*. Or, l'observation des images des organelles apporte un renseignement qui vient confirmer l'hypothèse de la diffusion dans

²³L'intensité du champ évanescence diminue exponentiellement avec la profondeur dans la cellule (voir le chapitre 2 de l'introduction générale).

la membrane. En moyennant le signal, par exemple pendant une seconde, avant la *disparition* puis après, le contraste devient suffisant pour mesurer le diamètre apparent des organelles par des ajustements gaussiens à deux dimensions. Nous avons constaté une augmentation pour tous les organelles analysés. En moyenne, la tache de fluorescence augmente de 28 ± 6 % ($N=5$ organelles, l'erreur étant l'écart quadratique moyen). La même mesure faite sur un organelle voisin qui n'a pas fusionné donne une variation relative de 1 ± 7 % (l'erreur étant l'écart quadratique moyen de l'ajustement gaussien). Il y a donc bien un étalement du signal — un nuage — après la chute de la fluorescence, qui est difficile à détecter à cause de sa faible intensité et de la lenteur de la diffusion dans la membrane plasmique.

3.3.4 Conclusion

Nous avons donc montré que parmi quelques stimuli classiques des astrocytes qui engendrent une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, seule l'application de sérotonine provoque la disparition des organelles autofluorescents. L'absence de pic et du nuage de fluorescence, généralement caractéristiques de l'exocytose observée en TIRFM via une sonde fluorescente s'échappant de l'organelle au moment de la fusion, pourrait donner à penser qu'il s'agit plutôt d'un mouvement des organelles vers l'intérieur de la cellule. Mais la cinétique de la disparition ainsi que l'analyse de la décroissance et de l'élargissement du signal après la chute de la fluorescence montre qu'il s'agit bien d'une exocytose. La difficulté à détecter la diffusion des fluorophores est expliquée par la baisse de l'intensité de fluorescence des protéines AF qui de plus restent attachés dans la membrane. Pour que cette étude soit complète et pour relier plus sûrement ce résultat à la sécrétion de la protéine S100B, il faudrait évidemment vérifier la spécificité de l'activation sérotoninergique à l'aide d'antagonistes sélectifs des récepteurs $5HT_{1A}$. Il serait aussi intéressant d'effectuer des mesures spectrales avant et après la fusion. Si l'hypothèse de la réduction des flavoprotéines est vraie, alors NADH — qui est peut-être aussi présent dans les organelles AF

mais sous forme réduite — pourrait devenir fluorescent lors de l'exocytose. Le rapport des changements d'intensité entre les flavoprotéines et NADH donnerait une idée de la variation du potentiel redox sous l'effet de l'exposition au milieu extra-cellulaire [68] et permettrait de vérifier l'origine de la chute de l'autofluorescence lors de la fusion.

3.4 Discussion

3.4.1 Identification

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons cherché à identifier les organelles autofluorescents. L'analyse de leur forme, de leur taille et de leur spectre a suggéré qu'il s'agit probablement de lysosomes, résultat qui a été confirmé par l'application du *unmixing* uni-vésiculaire. Au moins la moitié des organelles AF sont ainsi des lysosomes.

Il serait intéressant — mais un peu fastidieux! — d'étudier systématiquement la colocalisation entre l'AF et l'ensemble des compartiments intra-cellulaires marqués par les protéines fluorescentes utilisées par Jaiswal et al. (EYFP-ER pour le reticulum endoplasmique, pECFP-Golgi pour l'appareil de Golgi, H-EGFP pour les vésicules post-Golgi, VAMP8-ECFP pour les endosomes précoces, Rab7-ECFP pour les endosomes tardifs et d'autres marqueurs que la sialine (Synaptotagmin VII, LAMP1,...) pour les lysosomes [73]. Nous pourrions également tester la colocalisation entre l'AF et les mitochondries en marquant ces dernières par Rhod-2 ou MitoFluor Green [61]. Ainsi serait-il peut-être possible d'identifier les organelles AF qui ne sont pas marqués par la sialine.

Les spectres de l'autofluorescence ont montré que les organelles AF contiennent probablement des flavoprotéines et de la porphyrine. Mais la présence de ces protéines dans des lysosomes pourrait sembler paradoxale car elles sont normalement présentes dans les mitochondries.

Les lysosomes, qui sont dédiés dans les cellules eucariotes à la digestion par des hydrolases acides des produits que la cellule doit éliminer, reçoivent

leur contenu à dégrader par trois voies principales :

- l'endocytose
- la phagocytose
- l'autophagocytose.

Lors de l'endocytose, la cellule ingère une partie du volume extra-cellulaire dans des endosomes, organites de formes variables et de pH moyennement acide ($\text{pH} \sim 6$) qui évoluent ensuite en endosomes tardifs s'ils ne sont pas immédiatement recyclés dans la membrane plasmique. On pense que la modification de leur contenu protéique transforme graduellement ces organites en lysosomes ($\text{pH} \sim 5$) pour achever la dégradation des produits ingérés. Ce mode de formation des lysosomes pourrait expliquer l'autofluorescence par la capture de serum dans le milieu de culture. Il serait cependant surprenant que 48 heures après l'ingestion des composants fluorescents du FCS, les lysosomes en contiennent encore²⁴. Mais il serait possible de vérifier une telle hypothèse en étudiant la colocalisation entre un marqueur de l'endocytose comme les colorants FM²⁵ et l'autofluorescence.

La phagocytose est une endocytose régulée pratiquée par certaines cellules spécialisées dans le nettoyage du milieu extra-cellulaire, comme les macrophages ou les cellules microgliales dans le système nerveux. Elle consiste en l'ingestion de grosses particules comme les micro-organismes ou les cellules mortes. Les astrocytes sont peut-être capables de cette activité [83], aussi cette éventualité n'est-elle pas à proscrire d'autant qu'elle pourrait expliquer la variabilité de l'intensité de l'AF par la contamination aléatoire des cultures par des micro-organismes autofluorescents. Mais la présence d'antibiotiques dans le milieu rend peu probable la présence de bactéries — du moins espérons-le!

Moins pessimiste, la troisième hypothèse a l'avantage de résoudre le

²⁴Pour avoir une idée de l'échelle de temps du cycle de dégradation : de l'entrée d'un colorant dans une cellule par endocytose jusqu'à son arrivée dans les lysosomes, il faut environ 3 heures [73].

²⁵Ces molécules bi-polaires s'insèrent dans la membrane plasmique et sont entraînées dans les organelles lors de leur formation par endocytose.

paradoxe soulevé précédemment. Les cellules eucariotes sont capables de supprimer elles-mêmes leurs organites obsolètes en les digérant dans les lysosomes (autophagie). Ainsi, la durée de vie moyenne des mitochondries dans une cellule hépatique est de dix jours et les images en microscopie électronique de cellules normales révèlent des lysosomes contenant entre autres des mitochondries [48].

L'ingestion des mitochondries par des lysosomes qui deviennent ainsi autofluorescents serait en accord avec l'étude de Schipper et al. [84] qui observent un effet inverse sur le nombre des mitochondries d'une part et des organites autofluorescents d'autre part lorsqu'ils appliquent un inhibiteur de la synthèse des hèmes mitochondriaux à base de porphyrine. Ils décrivent en microscopie électronique l'apparition d'inclusions rouge-orange de 1 μm de diamètre et chargées en porphyrine (excitation ~ 405 nm, émission ~ 640 nm), un peu grandes donc pour ressembler parfaitement à nos organites AF mais expliquant la queue dans le rouge de leur spectre d'émission. Ces inclusions contiennent des cavités à double membrane évoquant bien sûr les mitochondries.

De même, l'hypothèse de l'autophagocytose des mitochondries expliquerait la présence des flavoprotéines dans les lysosomes : α -lipoamide dehydrogenase (LipDH) et *Electron Transferring Flavoprotein* (ETF) qui constituent la majeure partie du signal AF dû aux flavoprotéines [69, 85].

En conclusion, les organites autofluorescents dans les astrocytes en culture pourraient être des lysosomes qui ont phagocyté des mitochondries. Les composés responsables de la fluorescence seraient ainsi des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Chorvat et al. [69] montrent des cardiomyocytes sains avec une autofluorescence de spectre très proche de celle que nous avons mesurée. La présence d'AF n'est donc pas nécessairement un signe de mauvais état des cellules. D'ailleurs, nous n'avons pas constaté une augmentation de l'intensité de l'AF ou du nombre d'organites AF avec l'âge des cultures. Cependant, il est actuellement suggéré que les astrocytes en culture sont un modèle d'astrocytes activés, *i.e.* de cellules gliales telles

qu'on les trouve dans le cerveau autour des lésions accidentelles ou neurodégénératives. Par exemple, les astrocytes en culture surexpriment la protéine *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) considérée comme marqueur de leur activation (Annette Koulakoff, communication personnelle). Il est donc possible que le stress de leur activation provoque quelques anomalies qui conduisent entre autres à l'autophagocytose des mitochondries.

3.4.2 Exocytose

Les organelles AF fusionnent à la membrane plasmique lors d'une stimulation et la sérotonine semble être un puissant inducteur de cette exocytose. Nos analyses montrent que les protéines autofluorescentes contenues dans ces organelles perdent leur intensité lors de la fusion et restent ancrées dans la membrane, ce qui rend difficile la détection du nuage de leur diffusion. Afin de confirmer ces résultats, il serait utile de marquer les organelles AF avec une sonde sensible à l'exocytose. Par exemple, et par analogie avec la synapto-pHluorine [86], la transfection par la sialine fusionnée à la GFP-pHluorine qui n'est fluorescente qu'à pH neutre, aiderait à détecter l'exocytose sans ambiguïté.

Les lysosomes contiennent des protéines impliquées dans la régulation de l'exocytose [47] et leur fusion a déjà été observée dans d'autres cellules non sécrétrices. L'étude de Jaiswal et al. en TIRFM sur des lignées cellulaires immortalisées (HeLa, CHO, ...) et sur des fibroblastes issus d'embryons de souris présente en l'occurrence exactement les mêmes résultats que nous.

Ils rapportent que l'augmentation du calcium dans ces cellules induit l'exocytose des seuls lysosomes alors que de nombreux autres types d'organelles sont présents près de la membrane plasmique. Pour marquer la membrane des lysosomes, ils ont transfecté les cellules avec des protéines fluorescentes couplées à différentes protéines spécifiques des lysosomes (LAMP, CD-63, ...) et ils ont aussi marqué la lumière de ces organelles avec un colorant Dextran qui rentre par endocytose et finit en quelques heures dans les lysosomes. Or, ils constatent lors de l'exocytose que le colorant membranaire

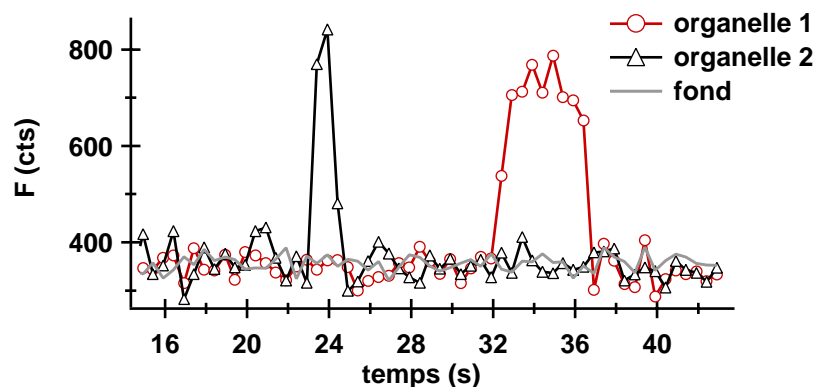
diffuse plus lentement que le colorant intra-vésiculaire. C'est un argument que nous avons utilisé pour justifier la lenteur de la diffusion des protéines autofluorescentes²⁶. Bien sûr, il serait très intéressant de marquer les organelles autofluorescents avec un Dextran pour vérifier si nous obtenons les mêmes résultats. Par ailleurs, Jaiswal et al. ont remarqué que l'augmentation du calcium engendrait trois réponses possibles parmi les lysosomes :

- l'arrêt du mouvement
- l'arrivée dans la zone juxta-membranaire suivie d'un départ rapide
- l'exocytose.

Or, nous avons exactement observé ces trois phénomènes dans les astrocytes en réponse à une stimulation induisant l'augmentation du calcium bien que nous n'ayons présenté ici que le troisième, qui nous intéressait le plus.

Nous montrons en 3.18 un exemple de deux organelles dans une cellule qui a été stimulée quelques secondes auparavant par la sérotonine. Contrairement aux profils d'intensité correspondant à des fusions, le signal revient tout de suite au niveau du fond (en gris, trait continu) après la disparition des organelles qui est cette fois due au mouvement.

FIG. 3.18 – *Mouvements rapides d'organelles déclenchés par la stimulation*



Les organelles AF des cellules au repos présentent aussi une certaine mobilité axiale mais jamais avec une telle rapidité et une telle fréquence d'apparitions-disparitions.

²⁶Le Dextran, qui n'est pas lié à la matrice intra-vésiculaire, met cependant moins de temps à diffuser que les composés AF.

Nous avons aussi observé l'arrêt du mouvement après une stimulation, mais nous ne sommes pas sûrs de la spécificité de l'activation des récepteurs sérotoninergiques. Nous avons en effet utilisé dans ces expériences la perfusion locale au-dessus des cellules qui stimule souvent mécaniquement les astrocytes. Nous pouvons néanmoins conclure qu'une stimulation (sérotoninergique ou mécanique) qui induit l'augmentation de la concentration calcique intra-cellulaire provoque l'arrêt du mouvement orienté des organelles autofluorescents.

Jaiswal et al. arguaient de la présence de l'exocytose des lysosomes dans les fibroblastes de culture primaire pour rejeter l'hypothèse d'un artefact dû aux cellules immortalisées. La correspondance exacte avec nos résultats obtenus sur des cultures primaires d'astrocytes confirme ce point de vue et conforte nos conclusions.

Finalement, quelle serait le rôle physiologique de l'exocytose des organelles AF ? L'exocytose dans les cellules non sécrétrices est considérée comme un moyen de réparer la membrane plasmique en apportant des fractions de membrane supplémentaires [87]. Mais certaines cellules comme les cellules hématopoïétiques utilisent cette voie pour libérer des protéines dans l'espace extra-cellulaire [88]. Dans la mesure où les astrocytes sont de moins en moins considérés comme des cellules non-sécrétrices, mais comme des partenaires actifs des neurones qui envoient des messagers chimiques lors de leur activation calcique, nous pouvons nous demander si l'exocytose régulée des lysosomes n'est pas un des moyens assurant cette communication.

Les astrocytes stimulés par la sérotonine libèrent la protéine S100B mais le mécanisme de la sécrétion est inconnu. La famille de protéines à laquelle appartient S100B est soumise à de nombreuses translocations²⁷ dans les cellules gliales [89]. L'immuno-histochimie révèle un marquage punctiforme autour du noyau (rappelant la majeure partie de la distribution de l'autofluorescence). Mais après une stimulation qui engendre l'augmentation de la concentration calcique intra-cellulaire, S100B est redistribuée vers de

²⁷Déplacement de la protéine entre divers organites de la même cellule.

grandes vésicules — de diamètre maximum $5\ \mu\text{m}$ — qui se forment à la surface de la cellule [62]. Nous avons aussi observé cette formation de grandes excroissances sphériques marquées par l'acridine orange ou par un indicateur calcique mais qui ne semblent pas contenir d'auto fluorescence (données non présentées). Pourtant, ces vésicules géantes ne sont pas considérées comme un moyen de sécréter S100B comme le montre l'absence de corrélation entre sa translocation et sa sécrétion [62]. La libération de S100B par les lysosomes est donc une autre hypothèse possible mais nécessiterait pour être validée des études de colocalisation entre S100B (fusionnée à la GFP) et l'auto fluorescence.

Un autre rôle possible de cette exocytose tient compte de l'identité et des propriétés des composés auto fluorescents. Nous avons souligné la possible identité entre les organelles auto fluorescents et les inclusions lysosomales décrites par Schipper et al. Or, ces lysosomes contiennent du Fer issu du hème de la porphyrine. Le Fer est un agent oxydant intervenant dans la neuro-inflammation où les astrocytes et les cellules microgliales activés pourraient jouer un rôle cytotoxique envers les neurones [90, 91]. Les organelles AF semblent contenir en outre des flavoprotéines oxydées. La possibilité qu'ont les astrocytes — du moins en culture — de libérer ces composés oxydants (Fer et flavoprotéines) dans l'espace extra-cellulaire pourrait représenter un mécanisme de l'action neurotoxique des astrocytes activés lors d'une inflammation d'origine accidentelle ou neurodégénérative.

Troisième partie

Conclusion générale

Chapitre 1

Rappel des résultats

1.1 *Unmixing* uni-vésiculaire

L'étude de l'exocytose dans les astrocytes nous a conduits à étudier la colocalisation entre différents marqueurs vésiculaires. Or, l'imagerie à deux couleurs réalisée en divisant le signal de fluorescence en deux canaux spectraux sensés contenir chacun la contribution d'un colorant s'est révélée insuffisante dans ce type cellulaire à cause de la présence d'autofluorescence punctiforme de spectre très large. Nous avons donc développé dans le premier chapitre une méthode qui consiste en l'application du *unmixing* à l'analyse d'organelles individuels.

Pour des raisons d'optimisation de la collecte du signal, nous avons opté pour l'acquisition séquentielle des spectres d'émission qui prend quelques secondes. Si ce laps de temps n'empêche pas de suivre des organelles même mobiles, il exclut l'utilisation de la microscopie à onde évanescente (TIRFM) pour l'acquisition des spectres. La grande dépendance de l'intensité d'excitation en fonction de la profondeur dans la cellule pourrait en effet fausser la mesure du spectre d'organelles se déplaçant dans le plan perpendiculaire à la membrane plasmique. Le *unmixing* des organelles juxta-membranaires s'est donc fait en deux temps : sélection des organelles près de la membrane en TIRFM puis *unmixing* en épifluorescence.

Nous avons pris en compte les propriétés de la pixelisation des images

d'organelles étalées par la diffraction en moyennant les spectres de tous les pixels du disque d'Airy, sauf ceux que nous détectons comme aberrants — à cause de l'environnement des organelles ou de la génération par la camera intensifiée de pixels décorrélés de l'image réelle.

Pour réaliser la décomposition des images, nous avons opté pour un modèle linéaire, dans la mesure où des interactions entre les colorants ne sont pas à attendre. De plus, nous n'étions pas intéressés par la détermination de quantités de matière mais par la répartition relative des colorants dans l'image. Leur *quenching*, qui provoque une non-linéarité entre la concentration et l'intensité de fluorescence, n'entraîne donc pas en jeu. A posteriori, les résultats du *unmixing* montrent que le modèle linéaire est tout à fait suffisant. En outre, contrairement à l'imagerie satellitaire, nous connaissons par avance les fluorophores en présence. Il était par conséquent inutile d'introduire dans la résolution du *unmixing* une inconnue supplémentaire [64].

Nous avons perfectionné le *unmixing* linéaire en introduisant l'intervalle de confiance du résultat qui permet de rejeter les estimations erronées et qui impose une valeur minimale au rapport signal-sur-bruit (SNR) des images à traiter.

Enfin, à cause de la diffraction tri-dimensionnelle, l'image d'un organelle en épifluorescence est nécessairement contaminée par le signal provenant des plans au-dessus et au dessous du plan focal [57]. Nous avons donc développé un test statistique, fondé sur le rapport signal-sur-fond (SBR) des images reconstituées, qui permet de détecter la présence des colorants fluorescents dans les organelles et non seulement dans le voxel qui les contient.

Notre méthode a été validée sur un exemple très contraignant : la co-localisation de deux protéines de spectres très proches en présence d'auto-fluorescence.

1.2 EGFP et Acridine orange

Le chapitre 2 nous a ramené à l'étude des organelles dans les astrocytes en culture en nous donnant l'occasion d'appliquer le *unmixing* uni-vésiculaire à un sujet très discuté : l'identité dans les astrocytes des organelles capables de fusionner après une stimulation. Les études récentes [37, 38] ont utilisé des marqueurs (acridine orange et EGFP) qu'on ne peut pas observer simultanément en imagerie deux-couleurs pour la bonne raison que le spectre de l'un recouvre celui de l'autre et que son intensité est beaucoup plus grande. Le *unmixing* a ainsi montré que les organelles apparaissant dans les canaux rouge et vert ne contiennent pas pour autant l'acridine orange et la EGFP mais plutôt l'acridine sous ses deux formes monomérique (vert) et dimérique (rouge). Deux conséquences ressortent de cette courte étude.

D'abord, l'isolation des spectres purs de monomère et de dimère et leur capacité à modéliser la métachromasie dépendant de la concentration de l'acridine orange sont une confirmation de l'origine du comportement spectral de cette base faible. Certains, dans les années 1970, pensaient que sa métachromasie n'était due qu'à un équilibre acide-base et, de façon d'ailleurs inconsistante, ne trouvaient pas de dépendance du spectre avec la concentration [92]. Notre étude confirme donc l'hypothèse de la dimérisation.

Ensuite, les résultats de colocalisation entre l'acridine orange et la EGFP obtenus par [37] et [38] n'ont aucune signification. Tout au plus, les écarts entre les deux articles peuvent refléter différentes fractions de monomères dans les organelles. Ce constat a une implication directe sur l'identité des organelles qui fusionnent en réponse à la stimulation des récepteurs glutamatergiques des astrocytes. Bezzi et al. utilisaient en effet l'acridine orange pour sa capacité de révéler l'exocytose, et VGlut-EGFP (un transporteur vésiculaire du glutamate fusionné à la EGFP) comme marqueur des organelles chargés en glutamate. Ils en déduisaient logiquement que l'observation de la fusion de vésicules contenant les deux colorants (rouges et vertes) est la preuve que les astrocytes en culture peuvent libérer du glutamate par exocytose. Notre étude montre que la seule chose que nous sachions de ces

vésicules, c'est qu'elles contenaient de l'acridine orange (rouge et verte).

Ainsi les astrocytes contiennent-ils des organelles capables de fusionner en réponse à une augmentation du calcium intra-cellulaire, mais nous ne connaissons pas leur identité. L'acridine orange marque en effet de façon indistincte tous les compartiments acides (vésicules synaptiques, granules à cœur dense, endosomes, lysosomes, et même le noyau [79]).

Les erreurs de colocalisation entre l'acridine orange et la EGFP pourraient également expliquer la différence de la taille des organelles responsables de la sécrétion de glutamate entre l'étude de Bezzi et al. et celle de Chen et al [53]. En microscopie électronique, la première décrit des vésicules de 30 nm marquées par un anticorps anti-VGlut. Il s'agirait donc de vésicules synaptiques. Au contraire, les auteurs de la seconde observent la fusion d'organelles de 300 nm, en accord avec les résultats de Calegari et al. qui ont mis en évidence des organelles à cœur dense capables de fusionner dans les astrocytes en culture [74]. Une possible explication de cet écart est que les organelles observés en fluorescence par Bezzi et al. ne sont pas les mêmes que ceux qu'ils montrent en microscopie électronique : d'un côté, de nombreux organelles acides marqués par l'acridine orange, de l'autre des vésicules synaptiques en petit nombre. Le même changement d'apparence des organelles est visible sur les figures de Crippa et al. [38] : l'expression de la synaptobrevine 2 couplée à la EGFP révèle des vésicules de petite taille et réparties dans toute la cellule tandis que l'application d'acridine orange produit un marquage surtout péri-nucléaire d'organelles de tailles plus variables. Cette dernière observation confirme le fait que la EGFP n'est plus visible en présence d'acridine orange et montre que dans cet article également, ce colorant marque des organelles qui n'ont peut-être rien à voir avec les vésicules synaptiques exprimant la synaptobrevine 2.

1.3 Identification et exocytose des organelles autofluorescents

Le chapitre 3 apporte peut-être la réponse à la question de l'identité des organelles astrocytaires capables de fusionner. Les résultats de l'étude sur l'autofluorescence (AF) montrent que les composants AF sont probablement des protéines issues des mitochondries mais que les organelles qui les contiennent sont des lysosomes. Nous avons proposé pour résoudre ce paradoxe que ces derniers phagocytent les mitochondries obsolètes. Des auteurs ont en effet décrit la présence dans les astrocytes en culture d'*inclusions lysosomales* riches en porphyrine [84], une des protéines mitochondriales dont le spectre est compatible avec celui de l'AF [69]. Par ailleurs, la présence de nombreux lysosomes dans les astrocytes n'est pas surprenante, étant donné le rôle de nettoyage de l'espace extra-cellulaire que ces cellules jouent probablement à côté des microglies [93]. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer ce résultat, en particulier en marquant les lysosomes avec d'autres protéines spécifiques que la sialine. Nous pourrions ainsi peut-être identifier les organelles AF qui ne semblent pas la contenir.

Ces organelles sont capables de fusionner lors d'une stimulation qui induit l'augmentation du calcium intra-cellulaire. La cinétique de leur exocytose est très rapide (moins de 100 ms) confirmant au passage que les astrocytes aux oscillations calciques si lentes (leur période est de l'ordre de la seconde) sont capables de réagir très vite. C'est en réponse à la sérotonine que ces organelles ont fusionné mais n'ayant pas fait de contrôle de la spécificité de l'activation des récepteurs 5HT, nous ne pouvons pas conclure rigoureusement quant à la voie d'induction de cette exocytose. Aussi, la possibilité que les organelles AF contiennent la protéine S100B, impliquée dans la neuro-inflammation, n'est qu'une hypothèse à vérifier avec des marquages.

Chapitre 2

Perspectives

2.1 *Unmixing* en champ évanescent

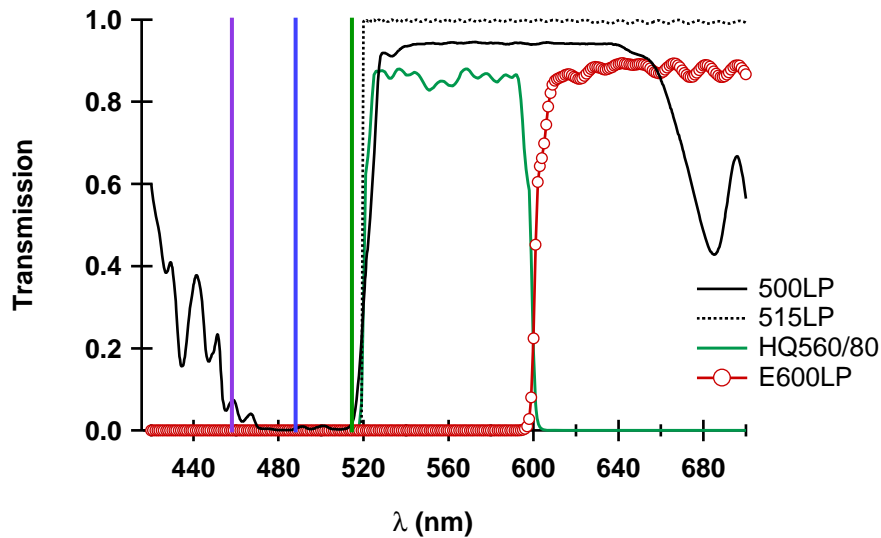
La méthode du *unmixing* uni-vésiculaire souffre de défauts intrinsèques :

- sa lenteur (quelques secondes pour acquérir le spectre des organelles d'une cellule)
- le couplage en deux temps de la sélection des organelles juxta-membranaires en TIRFM et du *unmixing* en épifluorescence. De nombreux organelles ne peuvent ainsi pas être analysés car ils ne sont vus que dans une seule configuration.
- l'excitation préférentielle de certains colorants comme la EGFP par rapport à la citrine
- la nécessité de travailler dans des cellules contenant peu d'organelles pour éviter la contamination du signal par les voisins latéraux.

Le dernier défaut est en fait inévitable dès qu'il s'agit d'analyser des organelles individuels. Mais les autres seraient supprimés dans une méthode que nous avons commencé de développer : le *unmixing* en TIRFM. L'acquisition spectrale se ferait en TIRFM mais pour aller assez vite par rapport à la vitesse de déplacement des organelles, c'est le spectre d'excitation qui serait mesuré. Pour ce faire, il suffit en effet de faire défiler les différentes longueurs d'onde du laser multi-lignes grâce au modulateur acousto-optique

qui change de fréquence ultra-sonore en moins d'une milliseconde¹. Pour augmenter la résolution spectrale, les images seraient vues à travers le *dual-viewer*, *i.e.* avec deux canaux spectraux simultanément en émission : nous disposerions ainsi d'un *spectre* combinant l'excitation (les lignes du laser) et l'émission (*dual-viewer*).

FIG. 2.1 – *Transmission des filtres optiques pour le unmixing en TIRF*



En pratique, nous avons essayé avec trois lignes 458, 488 et 514 nm, un premier dichroïque 514LP puis, dans le *dual-viewer*, un dichroïque 590LP suivi d'un filtre d'émission passe bande 560 ± 40 et d'un passe haut 600LP.

La figure 2.1 montre les courbes de transmission de ces filtres et les trois longueurs d'onde d'excitation. Y est aussi représentée la caractéristique d'un filtre passe haut dont la transmission à moins de 515 nm est inférieure à 10^{-9} et qui est nécessaire pour couper la ligne à 514 nm du laser. Un spectre contiendrait six points : deux en émission pour chaque longueur d'onde d'excitation. Les expériences préliminaires que nous avons réalisées montrent qu'un spectre peut être acquis en moins de 150 ms et que les organelles n'ont pas le temps de se déplacer suffisamment pour que la dépendance de l'intensité du champ évanescent en fonction de la profondeur dans la cellule se manifeste en altérant la mesure (résultats non présentés).

¹cf. annexe A

Cette variante du *unmixing* uni-vésiculaire offrira ainsi tous les avantages de la version actuelle mais sans ses défauts. Un problème technique sera peut-être la mesure reproductible du fond en champ évanescent. Elle requerra en tout cas des lamelles de microscope sans traitement de surface (sans couche de polyornitine par exemple) pour minimiser la fluorescence du substrat sur lequel poussent les cellules². D'un autre côté, l'excitation par des lignes laser à la place du polychromateur réduit énormément la transmission grâce à la cohérence temporelle du laser qui permet l'émission de raies étroites, mieux coupées par les filtres. La méthode actuelle gardera cependant tout son intérêt dans la mesure où elle seule peut analyser des organelles à l'intérieur du cytoplasme. Par exemple, elle pourrait permettre de suivre les endosomes au long de leur cycle qui les conduit de l'endocytose vers les lysosomes ou le retour à la membrane plasmique.

2.2 Identité des organelles de sécrétion dans les astrocytes en culture

Les cellules dont la fonction principale n'est pas la sécrétion utilisent aussi l'exocytose, en particulier pour réparer leur membrane plasmique [87]. Or, les organelles capables de fusionner de façon régulée dans ce type de cellules sont en majorité les lysosomes [73] qui contiennent les protéines nécessaires à l'exocytose [47]. Par ailleurs, ils pourraient aussi être impliqués dans la croissance des neurites [94]. Les astrocytes sont capables de sécréter des messagers chimiques [95] mais possèdent aussi de nombreuses autres fonctions (maintien de l'homéostasie du milieu extra-cellulaire, couplage neuro-vasculaire, transport des neurotransmetteurs libérés par les neurones, guidage des cellules lors du développement,...). Aussi sont-ils encore considérés comme des cellules *non sécrétrices* selon la définition donnée en tête de paragraphe. Il est donc tout à fait cohérent que les lysosomes astrocytaires

²Nous utilisons déjà de telles lamelles pour le *unmixing*. Il faut seulement mettre plus de cellules à développer car elles s'accrochent moins bien.

soient capables de fusionner en réponse à une stimulation. Nous pouvons aller plus loin et émettre l'hypothèse que dans les astrocytes comme dans l'ensemble des cellules dont la sécrétion n'est pas la fonction principale, l'exocytose est en majorité assurée par les lysosomes.

Dans la même optique, les organelles marqués par l'acridine orange dans les articles de Bezzi et al. [37] et Crippa et al. [38], ainsi que ceux marqués par les colorants FM dans l'étude de Chen et al. [53] sont peut-être des lysosomes. Cette hypothèse rendrait compte par ailleurs de la grande taille des organelles capables de fusionner dans toutes ces études. En particulier, Chen et al. montrent en microscopie DIC³ des organelles de 300 nm de diamètre et rapportent que la mesure des organelles marqués par les colorants FM conduit à un diamètre de 800 nm. Ils ont recours à la diffraction pour expliquer cette différence, ce qui semble étonnant vu qu'elle doit intervenir dans les deux procédés d'imagerie. Il est possible en fait que les organelles de 800 nm soient des endosomes qui ont chargé les marqueurs FM lors de leur endocytose. Il s'agirait donc encore de lysosomes ou d'endosomes précoces ou tardifs.

Si la taille des organelles chargés en acridine orange confirme leur possible identité avec les organelles AF, *i.e.* avec les lysosomes ($FWHM_{réelle} = 405 \pm 90$ nm, médiane et déviation absolue de la $FWHM$ ⁴ d'un échantillon de 58 organelles observés en TIRFM, données non présentées), il serait néanmoins difficile de vérifier notre hypothèse en tentant un co-marquage avec l'acridine orange d'une part et des protéines fluorescentes fusionnées à des protéines spécifiques des lysosomes d'autre part. Nous avons en effet montré qu'il est impossible d'étudier la colocalisation entre la EGFP et l'acridine orange. Il serait cependant possible de marquer ces compartiments avec des molécules de Texas-red Dextran qui sont internalisées dans les endosomes lors de l'endocytose et qui finissent pour la plupart dans les lysosomes [73]. Le *unmixing* de cellules chargées par ce colorant en présence d'acridine orange permettrait ensuite de vérifier si les organelles marqués

³*Differential Interference Contrast*

⁴voir chapitre 3.2.4

par l'acridine orange sont effectivement des lysosomes.

En tout cas, nous avons montré que les astrocytes contiennent des organelles autofluorescents, probablement des lysosomes, capables de fusionner lors d'une stimulation physiologique. Ce phénomène est à prendre en compte dans toutes les études sur l'exocytose dans les astrocytes au niveau uni-vésiculaire pour éviter des conclusions erronées. Quant au rôle physiologique de cette fusion des lysosomes, outil pour réparer la membrane plasmique, mécanisme impliqué dans la croissance des cellules ou voie de communication avec les autres cellules gliales et les neurones dans des conditions physiologiques ou pathologiques, cela reste à déterminer.

2.3 Conclusion

Pour conclure, nous remarquerons que l'imagerie quantitative dans des cellules vivantes requiert une grande attention et beaucoup de rigueur. Il est probablement plus facile de voir cinquante organelles en culture que de *patcher* deux neurones connectés en tranche. Mais cette apparente simplicité ne doit pas faire oublier que la fluorescence et le courant électrique sont de même nature, que vert signifie une longueur d'onde de 520 nm et que l'image d'un organelle est grossie par l'interférence des ondes électromagnétiques émises par la désexcitation des molécules fluorescentes... Ajouter à cette complexité la luxuriance de la biologie tiendrait de la gageure si nous négligions déjà ce qui est à notre portée. La contre-épreuve, réalisée par la reproduction des expériences à l'identique, moins un élément, était préconisée avec insistance par Claude Bernard pour sortir la médecine de l'emprise aveugle de la statistique [96]. Si nous la faisons systématiquement, nous ne passerions pas à côté de choses aussi évidentes que la présence d'autofluorescence ou le recouvrement spectral de colorants. La méthode que nous avons mise au point a des limites et pourra être améliorée. Mais si nous pensons qu'elle apportera des informations nouvelles sur les voies d'exocytose (et d'endocytose) des astrocytes et d'autres types cellulaires, nous espérons

surtout que l'esprit de sa conception contribuera un peu à l'édification de l'imagerie quantitative en biologie, prélude indispensable pour soutenir la magnifique gageure d'appréhender la richesse du monde vivant.

Quatrième partie

Annexes

Annexe A

Microscopie à onde évanescente

Nous avons présenté dans la première partie de ce texte la réflexion totale interne d'un point du vue théorique. Nous décrivons ici le montage expérimental que nous avons contribué à contruire et utilisé durant la thèse.

En pratique, il faut envoyer sur la lame de verre où les cellules ont été cultivées un faisceau lumineux collimaté avec un grand angle d'incidence (supérieur à θ_c). Notre microscope utilise la configuration sans prisme, *i.e.* avec un objectif qui sert à l'excitation et à la collection de la fluorescence. Mais considérons d'abord le microscope dans son ensemble tel que nous l'avons représenté dans la figure A.1. On peut le diviser en trois parties : la source de lumière, le dispositif pour générer le champ évanescent et la partie dédiée à la formation de l'image. Sur le dessin, le double trait incliné sur l'axe horizontal du bas symbolise le changement de perspective : on passe d'une vue de haut à une vue de face.

A.1 Description du montage

A.1.1 Source de lumière

Afin d'obtenir un faisceau monochromatique de longueur d'onde ajustable, nous utilisons un laser multi-lignes couplé à un modulateur acousto-optique qui permet de sélectionner la longueur d'onde voulue. Le laser est un Argon-Krypton (modèle MRYGB-A01, Melles-Griot) qui délivre un faisceau com-

prenant entre autres les lignes à 458, 472, 488, 514, 520 et 568 nm. Ce dernier est polarisé grâce à une lame demie-onde suivie d'un polariseur vertical (P1), nécessaire avant l'entrée dans le crystal acousto-optique dont l'ouverture est de 3 mm. La taille du faisceau est donc auparavant réduite par un télescope constitué de deux lentilles L1 et L2. Le crystal du modulateur acousto-optique est taillé de façon à sélectionner un seul angle d'émergence. En sortie du modulateur, il n'y a donc qu'un seul ordre 1 qu'un iris (I3) sépare de l'ordre 0. La longueur d'onde du faisceau diffracté est déterminée par la fréquence ultra-sonore à laquelle vibre le crystal.

A.1.2 Dispositif pour le champ évanescent

Il faut envoyer le faisceau lumineux sur la lame de verre avec un angle d'incidence variable. Pour ce faire, il est focalisé par une lentille achromatique (L3) dans le plan focal arrière de l'objectif à une distance réglable par rapport à l'axe optique (voir en introduction générale la figure A.2 pour le principe). Une vis micrométrique permet de déplacer verticalement l'ensemble (miroir M7-lentille L3) représentés entre crochets sur la figure A.1 et de changer ainsi l'écart r entre le faisceau et l'axe optique. Comme on le voit sur la figure A.2, cet écart détermine l'angle de sortie du faisceau et donc la profondeur de pénétration du champ évanescent.

On comprend pourquoi l'objectif doit avoir une grande ouverture numérique, *i.e.* la capacité de laisser sortir — et entrer — des rayons lumineux avec de grands angles. On pourra ainsi projeter un faisceau avec un angle d'incidence supérieur à l'angle critique θ_c et avoir encore de la marge pour faire varier la profondeur du champ évanescent. La figure théorique 2.2 présentée dans l'introduction générale a été réalisée avec les paramètres de notre objectif ($NA= 1,45$), ce qui donne un angle maximal accessible de $70^\circ3$, largement suffisant pour obtenir un champ évanescent de moins de 200 nm.

FIG. A.1 – Schéma du microscope

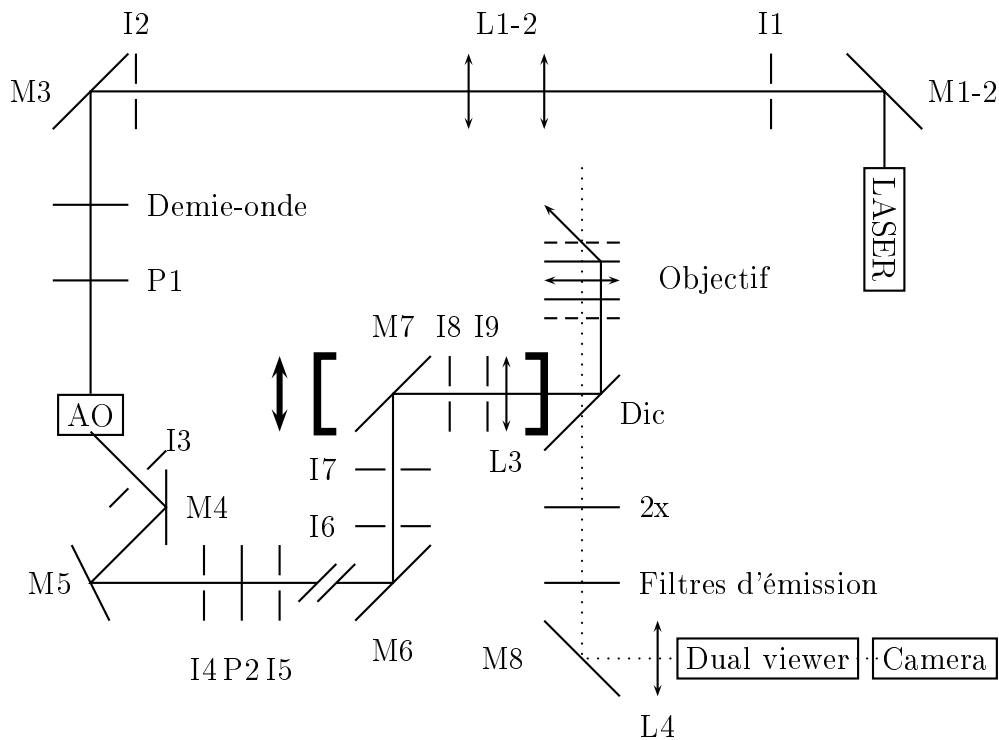
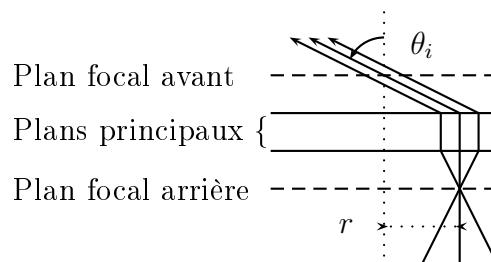


FIG. A.2 – Schéma de l'objectif



A.1.3 Formation de l'image

Le même objectif collecte la fluorescence qui est séparée de l'excitation par un miroir dichroïque (Dic). L'objectif projette l'image à l'infini ce qui permet de placer différents composants avant la camera :

- un télescope 2x qui permet de grossir deux fois l'image afin de satisfaire au critère de Shannon
- une roue à filtre pour sélectionner une partie du spectre d'émission à

l'aide de cinq filtres passe-bande.

Enfin, une lentille de tube focalise l'image sur la camera. Une partie des expériences — en particulier les mesures de taille des organelles — ont été faites avec une camera CCD (Quantix, Roper Scientific) mais nous avons surtout travaillé avec une camera intensifiée (GenIII-Pentamax, Princeton) afin de réduire au maximum le temps d'exposition. Juste avant la camera, nous pouvons aussi installer un *dual-viewer* constitué d'un dichroïque et de deux filtres d'émission. Ce dispositif est utile pour observer en même temps deux colorants de spectres bien séparés. C'est lui qui nous a permis d'étudier la colocalisation entre la EGFP et l'acridine orange en imagerie deux-couleurs.

A.2 Réglage

Cette section pourra paraître fastidieuse mais il nous a semblé important de conserver le protocole de réglage de ce microscope, aussi bien pour ses futurs utilisateurs que pour faire partager notre modeste expérience en la matière. Nous ne nous intéressons qu'à l'acheminement du laser vers la lame de verre en supposant que le montage est légèrement dérégulé.

A.2.1 Laser

L'alignement du laser ne présente aucune particularité. Rappelons néanmoins deux règles essentielles. D'abord, il est fondamental de définir un axe optique sur une grande distance à l'aide de deux iris assez éloignés (I1 et I2). Cela permet de placer des dispositifs optiques alignés avec le faisceau (par exemple un télescope) et d'installer, si besoin est, un autre laser qu'il suffit de rendre colinéaire à cet axe pour l'aligner avec la suite du microscope. Les miroirs M1 et M2 montés en périscope permettent de lever le faisceau et de le faire passer respectivement dans I1 et I2 (seul M1 est représenté pour plus de clarté). Ensuite, il faut se rappeler que pour faire passer le faisceau dans deux iris, c'est-à-dire pour le faire passer par un axe, il faut

deux miroirs en amont.

A.2.2 Polariseurs

Il faut bien vérifier qu'il sont perpendiculaires au faisceau, par exemple en faisant coïncider le faisceau réfléchi avec le faisceau incident (on trouvera la trace du faisceau réfléchi au dos d'un iris (I2). Enfin, il faut bien sûr les orienter correctement ce qui n'est pas si simple vu l'absence fréquente de repaire précis sur les montures de polariseurs. On peut trouver leur axe en observant à travers eux l'image d'un objet lumineux par la réflexion sur une paroi à l'angle de Brewster (par exemple, la réflexion d'un plafonnier par un sol en carrelage). Le faisceau arrive donc polarisé verticalement sur la face d'entrée du modulateur acousto-optique.

A.2.3 Modulateur acousto-optique

Le réglage de cet appareil est expliqué dans le livret d'utilisation. Soulignons juste que nous avons utilisé son mode *blanking* où aucune longueur d'onde n'est transmise comme shutter rapide. En sortie du modulateur, un miroir M4 dirige le faisceau vers l'axe d'entrée du microscope.

Juste avant ce miroir, nous avons placé un iris I3 indispensable au réglage rapide du poste. C'est une règle pour aligner un montage optique : si une partie est déjà alignée et suffisamment stable, alors il suffit de placer un iris devant le miroir d'entrée de cette partie pour régler facilement la partie en amont. En effet, la partie stable est stigmatique entre le centre de l'iris et le dernier point du montage (ici le point focal de l'objectif), il suffit donc de faire passer le faisceau par cet iris pour retomber sur le chemin qui conduit au bout du montage, quitte à retoucher légèrement la position du premier miroir, ici M4.

A.2.4 Entrée dans le microscope

Après avoir orienté M3 pour passer dans I3, les miroirs M4 et M5 permettent de placer le faisceau dans l'axe horizontal perpendiculaire au microscope défini par les iris I4 et I5. On peut placer sur cet axe un polariseur afin de choisir la polarisation du champ évanescent. Viennent ensuite des miroirs à trois vis (et non deux). On peut avec un seul de ces miroirs faire passer le faisceau dans deux iris successifs. On s'en sert pour changer la direction du faisceau afin de le faire passer sur l'axe vertical des iris I6-I7 : les deux vis côte à côte de M6 placent le faisceau dans l'iris le plus loin (I7) tandis que la vis isolée le placent dans I6. Enfin, le dernier miroir M7 (à trois vis également) fait la même chose pour l'axe horizontal d'entrée du microscope défini par les iris I8-I9.

A.2.5 Champ évanescent

Réglons d'abord la vis micrométrique qui permet de déplacer verticalement l'axe d'entrée M7-I8-I9 et mettons-la à la moitié de sa course de telle sorte que l'axe d'entrée horizontal coupe le miroir dichroïque Dic sur l'axe vertical du microscope (en pointillé sur la figure A.1). Si tout est correct, le faisceau doit maintenant passer par l'axe du microscope. Pour affiner le réglage et bien placer la lentille L3 le long de l'axe I8-I9 afin de focaliser le faisceau dans le plan focal arrière de l'objectif, on peut utiliser le microscope droit non représenté sur le dessin pour plus de clarté¹. On règle d'abord plus finement M7 pour obtenir un faisceau vertical en sortie de l'objectif (les deux vis côte à côte de M7 pour la verticalité et la vis isolée pour rester dans l'iris I9).

Pour contrôler la verticalité, il suffit de regarder l'image du faisceau par le microscope droit sans objectif : le faisceau est focalisé par sa lentille

¹Cette partie du microscope sert à l'éclairage des cellules en lumière blanche transmise. Elle est constituée d'une lampe à incandescence focalisée par un condenseur au foyer d'une lentille f200 qui envoie son image à travers la pupille arrière d'un objectif à air au-dessus des cellules.

sur l'iris de la lampe à incandescence. Peu importe la position respective du microscope droit par rapport au microscope inverse : si le faisceau est vertical, il sera focalisé sur l'axe de la lentille, *i.e.* au centre de l'iris.

Le même iris permet d'ajuster L3 que l'on a approximativement placée compte tenu des caractéristiques techniques de l'objectif : si le faisceau est vraiment focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif, il doit ressortir collimaté, *i.e.* non divergent. Dans ce cas, la lentille du microscope droit le refocalise dans son plan focal qui coïncide avec l'iris de la lampe. On ajuste donc la position de L3 de façon à obtenir le spot le plus petit possible au centre de l'iris.

Finalement, tout est réglé et il reste à vérifier que le laser est bien focalisé au centre de l'image grâce à une solution de fluoresceine. Le déplacement de la vis micrométrique permet d'atteindre l'angle critique, ce que l'on observe dans la fluoresceine par l'augmentation de l'intensité suivie de sa chute brutale après θ_c .

Annexe B

Normalisation et dénormalisation des spectres

B.1 Normalisation

La mesure du spectre d'un pixel i donne un vecteur $\vec{w}(i) = {}^t(w_1(i), \dots, w_N(i))$ à $N = 5$ dimensions (une pour chaque filtre)¹. Après lui avoir soustrait le spectre d'une région de 15*15 pixels prise dans une solution saline sans cellules, nous procédons à sa normalisation.

$$\vec{w}^*(i) = \frac{1}{\sum_{k=1}^N w_k(i)} \vec{w}(i) \quad (\text{B.1})$$

La somme des composantes du spectre normalisé $\vec{w}^*(i)$ est donc égale à un. Dans l'article présenté au chapitre 2, nous avons omis l'astérisque quand il n'y avait pas d'ambiguïté avec les spectres non normalisés. Ici, nous la gardons sauf pour les spectres de référence qui sont toujours utilisés dans leur expression normalisée.

¹Dans l'article du chapitre 1, un pixel est décrit par ses coordonnées (x, y) tandis que i désigne un organelle. Comme nous ne sommes concernés ici que par les pixels, nous prenons le symbole i pour désigner un pixel.

On note X la matrice des spectres de référence des m colorants purs :

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & \dots & x_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{N1} & \dots & x_{Nm} \end{pmatrix} \quad (\text{B.2})$$

soit $X = (\vec{x}_1, \dots, \vec{x}_m)$ avec \vec{x}_l le spectre de référence du colorant l pur.

Enfin, le vecteur contenant les quantités normalisées des m colorants est noté :

$$\vec{\alpha}^*(i) = \begin{pmatrix} \alpha_1^*(i) \\ \vdots \\ \alpha_m^*(i) \end{pmatrix} \quad (\text{B.3})$$

En l'absence d'erreur dans le modèle de la combinaison linéaire des spectres de chaque colorant pour constituer le spectre du pixel i , on a donc la relation :

$$\vec{w}^*(i) = X \vec{\alpha}^*(i) \quad (\text{B.4})$$

Soit en développant pour plus de clarté :

$$\vec{w}^*(i) = \begin{pmatrix} \sum_{l=1}^m x_{1l} \alpha_l^*(i) \\ \vdots \\ \sum_{l=1}^m x_{Nl} \alpha_l^*(i) \end{pmatrix} \quad (\text{B.5})$$

Or, d'après la définition (B.1),

$$\sum_{k=1}^N w_k^*(i) = 1 \quad (\text{B.6})$$

Donc, en reportant (B.5) dans (B.6) :

$$\sum_{k=1}^N \sum_{l=1}^m x_{kl} \alpha_l^*(i) = 1 \quad (\text{B.7})$$

qui peut se factoriser par $\alpha_l^*(i)$ pour s'écrire :

$$\sum_{l=1}^m \left(\alpha_l^*(i) \sum_{k=1}^N x_{kl} \right) = 1 \quad (\text{B.8})$$

Comme les spectres de référence $\overrightarrow{x_l}$ sont normalisés, $\sum_{k=1}^N x_{kl} = 1$ pour tout $l \in [1, m]$. L'équation (1.8) s'écrit donc tout simplement :

$$\sum_{l=1}^m \alpha_l^*(i) = 1 \quad (\text{B.9})$$

Nous avons ainsi montré que si les spectres sont normalisés, les quantités de colorants le sont aussi.

B.2 Dénormalisation

Une erreur serait de croire que ces coefficients $\alpha^*(i)$ dont la somme fait un sont les contributions relatives de chaque colorant alors que leur normalisation n'est qu'une conséquence de la normalisation des spectres. Ils représentent en fait par définition la quantité de spectres de référence de chaque colorant l ($\overrightarrow{x_l}$) dans le spectre normalisé ($w^*(i)$) d'un pixel i donné.

Ces coefficients ne tiennent pas compte de l'intensité d'un pixel et sont insuffisants pour reconstituer l'image de la contribution des colorants. Il faut pour cela les *dénormaliser*. D'après les équations (B.1) et (B.4), le vecteur $w^*(i)$ peut être dénormalisé en multipliant le résultat du *unmixing* par la somme des composantes du spectre non normalisé $w(i)$:

$$\overrightarrow{w(i)} = \left(\sum_{k=1}^N w_k(i) \right) X \overrightarrow{\alpha^*(i)} \quad (\text{B.10})$$

Soit

$$\overrightarrow{w(i)} = X \left\{ \left(\sum_{k=1}^N w_k(i) \right) \overrightarrow{\alpha^*(i)} \right\} \quad (\text{B.11})$$

que l'on peut écrire en introduisant les coefficients dénormalisés $\alpha(i)$:

$$\overrightarrow{w(i)} = X \overrightarrow{\alpha(i)} \quad (\text{B.12})$$

Cette dernière relation n'est autre que le *unmixing* du spectre non normalisé. Les coefficients dénormalisés sont maintenant les quantités de spectres de référence (normalisés) présents dans le spectre non normalisé d'un pixel i . Ils tiennent compte de l'intensité du pixel et permettent de représenter la contribution des colorants dans l'image. L'unité est en spectres de

référence. Bien qu'elle ne soit pas très parlante, elle est suffisante pour comparer la quantité de chaque colorant entre différents endroits de l'image afin par exemple de calculer le rapport signal-sur-fond (SBR) utilisé pour la détection des colorants dans les organelles.

Pour comparer les colorants entre eux, il suffit de multiplier ces coefficients dénormalisés par l'intensité des spectres de référence dans tel canal : nous obtenons ainsi la contribution de chaque colorant à l'intensité d'un pixel dans un canal spectral (cf. chapitre 3, tableau 3.1 page 84). Enfin, si nous étions intéressés par la contribution en quantité de matière, il faudrait connaître la concentration en colorants purs des échantillons qui ont permis de mesurer les spectres de référence. Ce serait assez immédiat pour les colorants chimiques comme l'acridine orange mais plus complexe pour les protéines fluorescentes qui sont exprimées par les cellules à une concentration inconnue. Nous pourrions cependant y accéder en tenant compte des caractéristiques optiques de ces protéines (coefficient d'extinction molaire, rendement quantique, ...) et des paramètres d'acquisition du microscope mesurés avec les échantillons de colorants chimiques de concentrations connues.

Annexe C

Test vectoriel des valeurs aberrantes

C.1 Introduction

Lors de la mesure d'une grandeur, on augmente la fiabilité du résultat en moyennant le plus grand nombre possible de mesures faites dans des circonstances identiques [66]. Cette contrainte est évidemment difficile à réaliser et surtout à contrôler. Pour éviter un biais dans l'estimation de la grandeur, il faut trouver a posteriori les mesures faites dans des circonstances différentes. Le test des valeurs aberrantes permet cette détection systématique en cherchant si chaque mesure peut appartenir à l'ensemble des autres compte tenu de leur variabilité [97]. Nous l'avons appliqué à la détection de colorants dans les voxels et les organelles¹ sous la forme du test classique qui compare des grandeurs scalaires. Mais nous avons dû l'adapter au cas vectoriel pour rejeter les pixels aberrants dans le disque d'Airy des organelles d'une part et pour détecter les spectres statistiquement différents de l'autofluorescence lors du test de marquage d'autre part. Nous présentons ci-après la construction de cette adaptation dans le cas de la détection des pixels aberrants. Il suffit de changer les paramètres pour l'appliquer à l'autre cas.

¹cf. chapitre 1

C.2 Notations

Nous omettons ici l'astérisque pour désigner les grandeurs normalisées car nous n'utilisons qu'elles. Le spectre — recherché — d'un organelle est noté \vec{w} et celui — mesuré — de ses pixels i , $w(i)$. Le nombre de canaux spectraux est N et le nombre de pixels dans le disque d'Airy est P . Par abus de langage, nous ne faisons pas de distinction entre les variables aléatoires et leur réalisation.

Le test des valeurs aberrantes compare l'écart entre la mesure et l'ensemble des autres mesures compte tenu de leur variabilité. Il faut donc construire deux termes pour quantifier ces deux grandeurs.

Nous supposons que le spectre de chaque pixel est la réalisation d'une variable aléatoire gaussienne indépendante des autres mais de même variance² :

$$\forall i \in [1, P] \quad \vec{w}(i) \rightarrow \mathcal{N}\left(\vec{\mu}_i, \sigma^2 I_N\right) \quad (\text{C.1})$$

où I_N est la matrice identité en dimension N . Nous nous intéressons au pixel i et cherchons si sa mesure contient une erreur systématique \vec{b} . Nous supposons que tous les autres pixels sont *corrects i.e.* :

$$\forall j \in [1, P] \quad j \neq i \quad \vec{w}(j) \rightarrow \mathcal{N}\left(\vec{w}, \sigma^2 I_N\right) \quad (\text{C.2})$$

Nous posons comme hypothèse que le pixel i est aussi correct, *i.e.* que

$$\mathbb{E}\left(\vec{w}(i)\right) = \vec{w} + \vec{b} \quad \text{avec} \quad \vec{b} = \vec{0} \quad (\text{C.3})$$

Le test consiste à vérifier si cette hypothèse est probable.

C.3 Écart entre le pixel i et ses voisins

Par analogie avec le test scalaire des valeurs aberrantes, nous formons l'écart entre le spectre du pixel i et ceux des autres :

$$z = \vec{w}(i) - \langle \vec{w}(-i) \rangle \quad (\text{C.4})$$

²*idem*

où $\langle w(-i) \rangle$ désigne la moyenne des spectres de tous les pixels sauf i .

Or pour chaque composante k du spectre, $w_k(i)$ est une variable aléatoire gaussienne donc $z_k = w_k(i) - \langle w_k(-i) \rangle$ l'est aussi. Comme les pixels sont indépendants, les paramètres de z_k sont :

$$E(z_k) = w_k - E(\langle w_k(-i) \rangle) \quad (C.5)$$

$$E(z_k) = w_k - \frac{1}{P-1} E\left(\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^P w_k(j)\right) \quad (C.6)$$

$$E(z_k) = w_k - \frac{P-1}{P-1} w_k \quad (C.7)$$

$$E(z_k) = 0 \quad (C.8)$$

et

$$\text{var}(z_k) = \sigma^2 + \frac{1}{(P-1)^2} (P-1) \sigma^2 \quad (C.9)$$

$$\text{var}(z_k) = \frac{P}{P-1} \sigma^2 \quad (C.10)$$

Donc la variable aléatoire $t_k = \frac{z_k}{\sigma \sqrt{P/(P-1)}}$ est une variable aléatoire gaussienne centrée réduite : $t_k \rightarrow N(0, 1)$. Ce résultat est valable pour toutes les composantes (indépendantes) du vecteur \vec{t} de composantes t_k :

$$\vec{t} \rightarrow N\left(\vec{0}, I_N\right) \quad (C.11)$$

où $\vec{0}$ désigne le vecteur nul en dimension N .

Or, par définition, la somme de N variables aléatoires gaussiennes centrées réduites indépendantes est une variable aléatoire de Pearson de degré de liberté (ou de paramètre) N donc :

$$\left\| \vec{t} \right\|_2^2 \rightarrow \chi_N^2 \quad (C.12)$$

où $\|\cdot\|_2$ désigne la norme 2 d'un vecteur (racine carrée de la somme du carré de ses composantes).

C.4 Variabilité des pixels autres que i

Il reste à trouver un paramètre qui décrit la variabilité des spectres des pixels $(j \neq i)_{1 \leq j \leq P}$ entre eux. Encore par analogie avec le test scalaire des

valeurs aberrantes, nous formons le vecteur $\overrightarrow{v(-i)}$ de dimension N :

$$\overrightarrow{v(-i)} = \frac{1}{\sqrt{P-1}} \begin{pmatrix} \sqrt{\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^P (w_1(j) - \langle w_1(-i) \rangle)^2} \\ \vdots \\ \sqrt{\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^P (w_N(j) - \langle w_N(-i) \rangle)^2} \end{pmatrix} \quad (\text{C.13})$$

Remarque : En comparaison avec la définition de \bar{z} (C.4) où nous calculions l'écart entre le spectre d'un pixel $\underline{(i)}$ et une distribution de spectres ne le comprenant pas ($j \neq i$), le vecteur $\overrightarrow{v(-i)}$ fait intervenir la différence entre le spectre d'un pixel j et une distribution le comprenant. C'est la définition de l'écart quadratique moyen qui ici caractérise la dispersion de la distribution des pixels différents de i .

Pour chaque composante de $\overrightarrow{v(-i)}$, *i.e.* chaque $k \in [1, N]$, nous définissons une variable u_k telle que :

$$u_k = \frac{\sqrt{P-1}}{\sigma} v_k(-i) \quad (\text{C.14})$$

D'après (C.13) et (C.14) :

$$u_k^2 = 1/\sigma^2 \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^P (w_k(j) - \langle w_k(-i) \rangle)^2 \quad (\text{C.15})$$

Comme pour chaque k , les $P - 1$ variables $w_k(j)$, ($j \neq i$) sont des variables aléatoires gaussiennes indépendantes de même espérance et de variance identique σ^2 , u_k^2 est une variable de Pearson à $P - 2$ degrés de liberté : $u_k^2 \rightarrow \chi_{P-2}^2$.

Pour revenir en dimension N et tenir compte de toutes les composantes du vecteur $\overrightarrow{v(-i)}$, nous prenons la somme des u_k^2 . La somme de variables de Pearson est une variable de Pearson de degré de liberté la somme des paramètres des variables de Pearson individuelles, donc :

$$\sum_{k=1}^N u_k^2 \rightarrow \chi_{N(P-2)}^2 \quad (\text{C.16})$$

C.5 Synthèse

Le pixel i a une chance d'appartenir à la distribution des pixels *corrects* si son spectre n'est pas trop différent des spectres de cette distribution, compte tenu de sa variabilité. Statistiquement, cette condition peut se mettre en forme en prenant le rapport des deux variables aléatoires de Pearson définies précédemment qui est une variable de Fisher-Snedecor à N et $N(P - 2)$ degrés de liberté :

$$\frac{N(P - 2)}{N} \frac{\left\| \vec{t} \right\|_2^2}{\sum_{k=1}^N u_k^2} \rightarrow F_{N, N(P-2)} \quad (\text{C.17})$$

Soit, d'après la définition de \vec{t} et celle de u_k^2 :

$$\frac{N(P - 2)}{NP} \frac{\sum_{k=1}^N (w_k(i) - \langle w_k(-i) \rangle)^2}{\sum_{k=1}^N \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^P (w_k(j) - \langle w_k(-i) \rangle)^2} \rightarrow F_{N, N(P-2)} \quad (\text{C.18})$$

Remarque : dans cette expression, la variance σ^2 que nous ne connaissons pas a disparu.

Le choix d'un certain risque et la fonction de Fisher-Snedecor définit un intervalle dans lequel cette expression devrait se trouver si l'hypothèse *le pixel i n'est pas aberrant* est vraie. Si le calcul de cette expression conduit à une valeur en dehors de l'intervalle, nous pouvons décider que le pixel i est aberrant avec le risque de nous tromper que nous avons choisi.

Pour appliquer ce test à la détection du marquage des voxels par un colorant exogène (*i.e.* autre que l'autofluorescence), il faut remplacer P par le nombre de spectres autofluorescents (AF) qui ont servi à établir le spectre de référence AF. Nous comparons ensuite le spectre de l'organelle considéré avec l'ensemble de ces spectres et cherchons s'il peut en faire partie.

Annexe D

Justification du *unmixing* de l'organelle (et pas seulement du voxel)

D.1 Principe

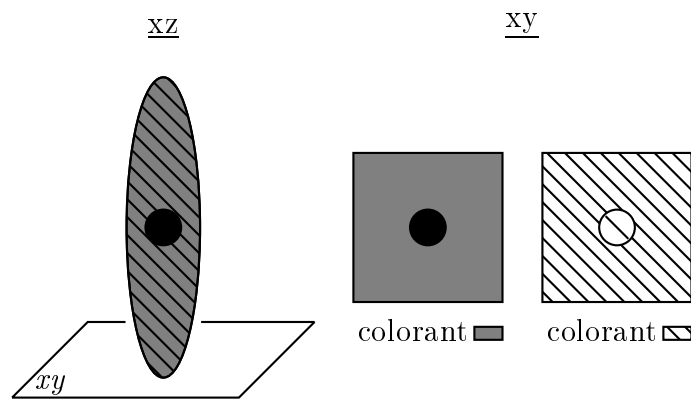
Nous avons vu dans le chapitre 1 et l'article qui s'y réfère que la détection des colorants doit se faire en plusieurs étapes. En particulier, les coefficients trouvés par le *unmixing* ne sont pas suffisants. La figure 3.7 page 91 en montre un exemple : des organelles qui ne contiennent qu'un fluorophore se retrouvent au centre du graphe, *i.e.* que leurs quantités normalisées de AF et de EGFP sont statistiquement différentes des échantillons de référence purs. La raison en est que la camera reçoit du signal de l'organelle mais aussi des plans au-dessus et au dessous. Les coefficients du *unmixing* décrivent en fait le voxel tout entier¹.

Prenons un exemple théorique pour comprendre un peu mieux ce qui se passe. Imaginons un organelle contenant un colorant dans un environnement contenant le même colorant plus un autre. Les deux premières étapes permettront de conclure à la présence des deux colorants mais la troisième est indispensable pour montrer qu'un seul se trouve dans l'organelle. Le

¹voir la note page 68 pour la définition d'un voxel

principe de la détection dans cet exemple est illustré par la figure D.1. Les traits inclinés désignent un colorant, tandis que l'autre est signifié par un fond gris. La densité des traits et le niveau de gris caractérisent la quantité de colorant.

FIG. D.1 – *Principe de la détection d'un colorant dans un organelle*



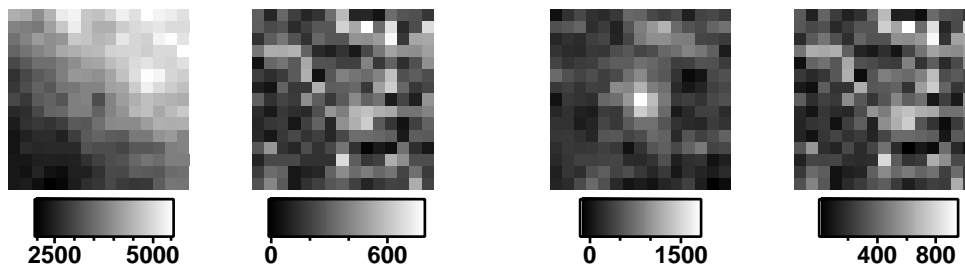
Le voxel vu dans le plan xz perpendiculaire au plan focal montre l'organelle gris environné des deux fluorophores. Si l'on projette le voxel le long du grand axe vertical dans le plan xy , *i.e.* si l'on regarde le signal projeté par le microscope sur le détecteur, on trouvera au centre les deux colorants, mais l'analyse des images reconstituées de la contribution de chaque colorant révélera qu'au centre, il y a plus de gris (l'organelle ajoute du gris en plus du fond) et moins de traits (l'organelle crée un espace vide de traits) qu'en périphérie.

Cet exemple est tout à fait réaliste si l'on remplace le colorant gris par de l'AF et les traits par de la EGFP. On pourrait croire que la EGFP est exprimée dans l'organelle alors qu'il ne contient que de l'AF et que la EGFP est dans le cytoplasme.

D.2 Exemple

C'est justement cet exemple extrême d'un organelle AF dans une cellule transfectée par la EGFP² que nous présentons en figure D.2. Les deux images de gauche montrent la reconstitution de la contribution de la EGFP et son intervalle de confiance (70 %), tandis que l'AF est à droite. Le test

FIG. D.2 – Reconstitution des quantités de EGFP et d'AF dans le cas d'un organelle AF immergé dans un cytoplasme EGFP



de marquage conduit à la détection de EGFP ($30,7 \pm 0,3$, la limite étant à 2,31 pour 95 % de certitude) mais la détection dans l'organelle permet de corriger cette erreur. Le tableau D.1 résume les paramètres trouvés par le *unmixing* : la EGFP est effectivement dominante dans le voxel, mais seule l'AF est détectée dans l'organelle.

TAB. D.1 – Unmixing de l'organelle AF dans le cytoplasme EGFP

	Quantité normalisée	Intensité (cts)	Détection (limite=1,76)
AF	0.22 ± 0.08	1070 ± 400	$7,1 \pm 3,7$
EGFP	$0.78 \pm 0,07$	3800 ± 330	$0,05 \pm 0,33$

²En l'absence de séquence signal reconnaissable par la cellule, la protéine fluorescente finit généralement dans le cytoplasme.

Annexe E

Intervalle de confiance

E.1 Définition de la région de confiance

Nous avons introduit l'intervalle de confiance de l'estimation des quantités de colorants par le *unmixing*¹. L'idée est de considérer chaque composante du spectre comme la valeur de *sortie* d'un système dont les spectres de référence sont les *entrées* et les quantités de colorants les *paramètres* inconnus. Les N mesures spectrales permettent d'estimer le jeu de paramètres qui minimise l'erreur quadratique entre les mesures et la reconstitution des mesures réalisée grâce aux paramètres estimés. Dans ce cas, l'erreur permet d'estimer l'intervalle de confiance de l'estimation des paramètres.

Si \vec{r} est le vecteur (de dimension N) contenant l'erreur dans les N canaux spectraux et $\hat{\vec{\alpha}}$ le vecteur (de dimension m) contenant l'estimation de la quantité des m colorants, nous pouvons former une variable de Fisher-Snedecor en supposant que les N composantes du spectre sont les réalisations de variables aléatoires indépendantes et gaussiennes [66] :

$$\frac{N - m}{m} \frac{{}^t(\hat{\vec{\alpha}} - \vec{\alpha}) X X {}^t(\hat{\vec{\alpha}} - \vec{\alpha})}{{}^t\vec{r} \vec{r}} \rightarrow F_{m, N-m} \quad (\text{E.1})$$

qui est une fonction de $\vec{\alpha}$, vecteur contenant les *vrais* paramètres que nous cherchons à estimer.

Nous pouvons ainsi définir une région de confiance pour $\vec{\alpha}$ qui est déter-

¹voir chapitre 1

minée par le risque choisi θ et par l'inverse de la fonction de répartition de $F_{m,N-m}$, $finv_{m,N-m}$.

$$Proba \left\{ \frac{N-m}{m} \frac{(\hat{\vec{\alpha}} - \vec{\alpha})^t X X (\hat{\vec{\alpha}} - \vec{\alpha})}{{}^t \vec{r} \vec{r}} \leq finv_{m,N-m}(1-\theta) \right\} = 1 - \text{(E.2)}$$

Par exemple, si nous choisissons un risque de $\theta = 30\%$ par analogie avec l'écart quadratique moyen adopté généralement comme barre d'erreur, $finv_{2,3}$ (pour 5 canaux et 2 colorants) fixe comme limite supérieure 1,75 pour la variable de fonction densité de probabilité $F_{2,3}$. Cette valeur se répercute via l'expression (E.2) sur la distance maximale (avec 30 % de chance d'erreur) entre $\vec{\alpha}$ et $\hat{\vec{\alpha}}$ et définit une ellipse à deux dimensions ou une ellipsoïde à trois dimensions à l'intérieur de laquelle $\vec{\alpha}$ a 70 % de chance de se trouver.

Remarque : ainsi, dans le cas d'une erreur \vec{r} importante, $\vec{\alpha}$ peut se trouver loin de son estimation car le dénominateur de (E.2) est grand. Il en est de même si le nombre de mesures N (de canaux spectraux) n'est pas assez élevé par rapport au nombre de colorants m .

E.2 Extraction d'un intervalle de confiance

La définition de la *région* de confiance peut s'appliquer indifféremment à 2 ou 3 dimensions, *i.e.* avec deux ou trois colorants. Mais pour en tirer un *intervalle* de confiance, *i.e.* avec quelle incertitude le *unmixing* a trouvé ces coefficients, il fallait extraire de ces ellipses (ou ellipsoïdes selon la dimension m) des valeurs scalaires caractéristiques. Nous avons choisi de prendre les coordonnées extrémales sur les axes des coefficients α_l . Ainsi, sur le test graphique de détection des colorants à deux dimensions, la région de confiance a été représentée par des barres d'erreur perpendiculaires entre elles et parallèles aux axes $(\alpha_1, \alpha_2)^2$.

²voir chapitre 1

E.3 Calcul de l'intervalle de confiance

Le calcul des coordonnées extrémales des régions de confiance ellipsoïdes est un peu pénible. Nous le présentons ici pour $N = 5$ canaux et $m = 3$ colorants, non pour assommer le lecteur (?) mais pour en garder une trace.

Dans l'équation (E.2), passons à droite les termes dépendant de N , m et \vec{r} et notons B la valeur limite de la région de confiance. L'ellipsoïde décrivant les valeurs extrêmes de $\vec{\alpha}$ a pour équation :

$${}^t(\widehat{\alpha} - \alpha) X X (\widehat{\alpha} - \alpha) = B \quad (\text{E.3})$$

Une fois réalisés la mesure et le *unmixing*, B est fixée. Il reste donc à extraire les intervalles de confiance pour chaque colorant l .

En conservant les mêmes notations que dans l'annexe 2 sur la normalisation des spectres, (E.3) s'écrit :

$$(\widehat{\alpha}_1 - \alpha_1, \widehat{\alpha}_2 - \alpha_2, \widehat{\alpha}_3 - \alpha_3) {}^t \left((x_{kl}) \right)_{\substack{1 \leq k \leq 5 \\ 1 \leq l \leq 3}} \left((x_{kl}) \right)_{\substack{1 \leq k \leq 5 \\ 1 \leq l \leq 3}} \begin{pmatrix} \widehat{\alpha}_1 - \alpha_1 \\ \widehat{\alpha}_2 - \alpha_2 \\ \widehat{\alpha}_3 - \alpha_3 \end{pmatrix} = B \quad (\text{E.4})$$

En notant pour tout l , $\widehat{\alpha}_l - \alpha_l = \Delta\alpha_l$ et en développant le produit matriciel au centre, le terme de gauche s'écrit :

$$(\Delta\alpha_1, \Delta\alpha_2, \Delta\alpha_3) \begin{pmatrix} \sum_{k=1}^5 x_{k1}^2 & \sum_{k=1}^5 x_{k1}x_{k2} & \sum_{k=1}^5 x_{k1}x_{k3} \\ \sum_{k=1}^5 x_{k2}x_{k1} & \sum_{k=1}^5 x_{k2}^2 & \sum_{k=1}^5 x_{k2}x_{k3} \\ \sum_{k=1}^5 x_{k3}x_{k1} & \sum_{k=1}^5 x_{k3}x_{k2} & \sum_{k=1}^5 x_{k3}^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta\alpha_1 \\ \Delta\alpha_2 \\ \Delta\alpha_3 \end{pmatrix}$$

Finalement, nous obtenons un scalaire en développant complètement :

$$\begin{aligned} & \Delta\alpha_1^2 \sum_{k=1}^5 x_{k1}^2 + \Delta\alpha_2^2 \sum_{k=1}^5 x_{k2}^2 + \Delta\alpha_3^2 \sum_{k=1}^5 x_{k3}^2 + 2\Delta\alpha_1\Delta\alpha_2 \sum_{k=1}^5 x_{k1}x_{k2} \quad (\dots) \\ & (\dots) + 2\Delta\alpha_1\Delta\alpha_3 \sum_{k=1}^5 x_{k1}x_{k3} + 2\Delta\alpha_2\Delta\alpha_3 \sum_{k=1}^5 x_{k2}x_{k3} = B \quad (\text{E.5}) \end{aligned}$$

Pour simplifier l'écriture de la suite, nous posons :

$$\begin{aligned}\sum_{k=1}^5 x_{k1}^2 &= A_1^2 \\ \sum_{k=1}^5 x_{k2}^2 &= A_2^2 \\ \sum_{k=1}^5 x_{k3}^2 &= A_3^2 \\ \sum_{k=1}^5 x_{k1}x_{k2} &= A_{12}^2 \\ \sum_{k=1}^5 x_{k1}x_{k3} &= A_{13}^2 \\ \sum_{k=1}^5 x_{k2}x_{k3} &= A_{23}^2\end{aligned}$$

Nous obtenons ainsi une équation du seconde degré à trois inconnues $(\Delta\alpha_1, \Delta\alpha_2, \Delta\alpha_3)$:

$$\begin{aligned}\Delta\alpha_1^2 A_1^2 + \Delta\alpha_2^2 A_2^2 + \Delta\alpha_3^2 A_3^2 + (\dots) \\ 2(\Delta\alpha_1 \Delta\alpha_2 A_{12}^2 + \Delta\alpha_1 \Delta\alpha_3 A_{13}^2 + \Delta\alpha_2 \Delta\alpha_3 A_{23}^2) = B\end{aligned}\quad (\text{E.6})$$

Il s'agit de l'équation d'une ellipsoïde dont nous cherchons les valeurs extrémales sur les axes $(\Delta\alpha_1, \Delta\alpha_2, \Delta\alpha_3)$. Commençons par $\Delta\alpha_1$, puis nous procéderons par analogie pour les deux autres.

Plaçons-nous à l'extremum de $\Delta\alpha_1$, $\Delta\alpha_1(\text{ic})$ qui est une majoration de l'intervalle de confiance de l'estimation de α_1 , et considérons les positions au voisinage de ce(s) point(s). Pour cela, différencions (E.6) par rapport aux trois variables avec $d\Delta\alpha_1 = 0$:

$$\begin{aligned}2\Delta\alpha_2 A_2^2 d\Delta\alpha_2 + 2\Delta\alpha_3 A_3^2 d\Delta\alpha_3 + 2(A_{12}^2 \Delta\alpha_1(\text{ic}) d\Delta\alpha_2 \quad (\dots) \\ + A_{13}^2 \Delta\alpha_1(\text{ic}) d\Delta\alpha_3 + A_{23}^2 \Delta\alpha_2 d\Delta\alpha_3 + A_{23}^2 \Delta\alpha_3 d\Delta\alpha_2) = 0\end{aligned}\quad (\text{E.7})$$

Qui se simplifie en :

$$\begin{aligned}(\Delta\alpha_2 A_2^2 + \Delta\alpha_1(\text{ic}) A_{12}^2 + \Delta\alpha_3 A_3^2) d\Delta\alpha_2 \quad (\dots) \\ + (\Delta\alpha_3 A_3^2 + \Delta\alpha_1(\text{ic}) A_{13}^2 + \Delta\alpha_2 A_{23}^2) d\Delta\alpha_3 = 0\end{aligned}\quad (\text{E.8})$$

Cette égalité doit être vérifiée pour tout $d\Delta\alpha_2$ et tout $d\Delta\alpha_3$ donc les deux termes entre parenthèses sont nuls :

$$\begin{cases} \Delta\alpha_2 A_2^2 + \Delta\alpha_1(\text{ic}) A_{12}^2 + \Delta\alpha_3 A_{23}^2 = 0 \\ \Delta\alpha_3 A_3^2 + \Delta\alpha_1(\text{ic}) A_{13}^2 + \Delta\alpha_2 A_{23}^2 = 0 \end{cases} \quad (\text{E.9})$$

Nous allons exprimer $\Delta\alpha_2$ et $\Delta\alpha_3$ en fonction de $\Delta\alpha_1(\text{ic})$ afin de les reporter dans (E.6). Nous passons les quelques étapes évidentes de la résolution du système (E.9) qui conduisent à :

$$\begin{cases} \Delta\alpha_2 = \frac{A_{13}^2 A_{23}^2 / A_3^2 - A_{12}^2}{A_2^2 - A_{23}^2 / A_3^2} \Delta\alpha_1(\text{ic}) \\ \Delta\alpha_3 = \frac{A_{12}^2 A_{23}^2 / A_2^2 - A_{13}^2}{A_3^2 - A_{23}^2 / A_2^2} \Delta\alpha_1(\text{ic}) \end{cases} \quad (\text{E.10})$$

Bien sûr, les deux expressions sont symétriques. Nous les simplifions en introduisant une matrice $(a_{ij})_{\substack{1 \leq i \leq 3 \\ 1 \leq j \leq 3}}$ dont les coefficients a_{21} et a_{31} sont :

$$\begin{cases} a_{21} = \frac{A_{13}^2 A_{23}^2 / A_3^2 - A_{12}^2}{A_2^2 - A_{23}^2 / A_3^2} \\ a_{31} = \frac{A_{12}^2 A_{23}^2 / A_2^2 - A_{13}^2}{A_3^2 - A_{23}^2 / A_2^2} \end{cases} \quad (\text{E.11})$$

Nous reportons maintenant (E.10) et (E.11) dans (E.6) et obtenons :

$$\left\{ A_1^2 + a_{21}^2 A_2^2 + a_{31}^2 A_3^2 + 2(a_{21} A_{12}^2 + a_{31} A_{13}^2 + a_{21} a_{31} A_{23}^2) \right\} \Delta\alpha_1^2(\text{ic}) = \mathbf{E} \quad (\text{E.12})$$

Cette relation permet d'exprimer $\Delta\alpha_1(\text{ic})$, valeur majorée de l'intervalle de confiance de l'estimation de α_1 .

Nous appliquons par analogie la même relation aux deux autres coefficients et obtenons finalement l'expression de nos trois intervalles de confiance :

$$\begin{cases} \Delta\alpha_1(\text{ic}) = \frac{\sqrt{\mathbf{E}}}{\sqrt{A_1^2 + a_{21}^2 A_2^2 + a_{31}^2 A_3^2 + 2(a_{21} A_{12}^2 + a_{31} A_{13}^2 + a_{21} a_{31} A_{23}^2)}} \\ \Delta\alpha_2(\text{ic}) = \frac{\sqrt{\mathbf{E}}}{\sqrt{A_2^2 + a_{12}^2 A_1^2 + a_{32}^2 A_3^2 + 2(a_{12} A_{12}^2 + a_{32} A_{23}^2 + a_{12} a_{32} A_{13}^2)}} \\ \Delta\alpha_3(\text{ic}) = \frac{\sqrt{\mathbf{E}}}{\sqrt{A_3^2 + a_{13}^2 A_1^2 + a_{23}^2 A_2^2 + 2(a_{13} A_{13}^2 + a_{23} A_{23}^2 + a_{13} a_{23} A_{12}^2)}} \end{cases} \quad (\text{E.13})$$

Nous avons utilisé la matrice $(a_{ij})_{\substack{1 \leq i \leq 3 \\ 1 \leq j \leq 3}}$ dont les termes non diagonaux sont définis par analogie avec a_{21} et a_{31} et dont la diagonale est nulle.

Bibliographie

- [1] F. KIRCHHOFF et al. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251 :159–169, 2001.
- [2] T. TAKANO et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience*, 9(2) :260–267, 2006.
- [3] W. WALZ et al. Astrocytes in primary cultures : membrane potential characteristics reveal exclusive potassium conductance and potassium accumulator properties. *Brain Res*, 292(2) :367–374, 1984.
- [4] D. BERGLES et al. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron*, 19(6) :1297–1308, 1997.
- [5] E. ULLIAN et al. Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504) :657–661, 2001.
- [6] W. GRIFFIN. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*, 83 :470S–474S, 2006.
- [7] A. CORNELL-BELL et al. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes : long-range glial signaling. *Science*, 247 :470–473, 1990.
- [8] J. PORTER et al. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Prog Neurobiol*, 51 :439–455, 1997.
- [9] A. ARAQUE et al. Calcium elevation in astrocytes causes a NMDA-receptor dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18(17) :6822–6829, 1998.

- [10] N. SANDEN et al. 5-Hydroxytryptamine-2B receptors stimulate Ca^{2+} increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int*, 36 :427–434, 2000.
- [11] A. CHARLES et al. Intercellular signaling in glial cells : calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6 :983–992, 1991.
- [12] P. GUTHRIE et al. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci*, 19(2) :520–528, 1999.
- [13] B. INNOCENTI et al. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci*, 20(5) :1800–1808, 2000.
- [14] T. MEYER et al. Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *PNAS*, 85 :5051–5055, 1988.
- [15] N. LI et al. A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J Neurosci*, 23(32) :10302–10310, 2003.
- [16] G. HAGBERG et al. Stimulation of 5HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca^{2+} channels. *Neurochemistry International*, 36 :153–162, 1998.
- [17] C. GIAUME et al. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 24(1) :50–64, 1998.
- [18] S. SUADICANI et al. P_{2X7} receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca^{2+} signaling. *J Neurosci*, 26(5) :1378–1385, 2006.
- [19] G. ULLAH et al. Anti-phase calcium oscillations in astrocytes via inositol(1,4,5)-triphosphate regeneration. *Cell calcium*, 39 :197–208, 2006.
- [20] H. HIRASE et al. Calcium dynamics of cortical astrocytic network *in vivo*. *PLoS Biol*, 2(4) :E96 :0494–0499, 2004.

- [21] X. WANG et al. Astrocytic Ca^{2+} signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature neuroscience*, 9(6) :816–823, 2006.
- [22] G. PEREA et al. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell calcium*, 38 :375–382, 2005.
- [23] V. PARPURA et al. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, 369 :744–747, 1994.
- [24] V. PARPURA et al. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *PNAS*, 97(15) :8629–8634, 2000.
- [25] H. PARRI et al. Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature neuroscience*, 4(8) :803–812, 2001.
- [26] A. KOZLOV et al. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *PNAS*, 2 :185–193, 2006.
- [27] J. KANG et al. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature neuroscience*, 1(8) :683–692, 1998.
- [28] D. AULD et al. Glial cells and neurotransmission : an inclusive view of synaptic function. *Neuron*, 40 :389–400, 2003.
- [29] J. GROSCHE et al. Microdomains for neuron-glia interaction : parallel fiber signaling to bergmann glial cells. *Nature neuroscience*, 2(2) :139–143, 1999.
- [30] P. HAYDON. Glia : listening and talking to the synapse. *Nature rev neurosci*, 2 :185–193, 2001.
- [31] D. EVANKO et al. Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia*, 47 :233–240, 2004.
- [32] V. PARPURA et al. Mechanisms of glutamate release from astrocytes : gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int*, 45 :259–264, 2004.

- [33] V. PARPURA et al. Expression of synaptobrevin II, cellubrevin and syntaxin but not SNAP-25 in cultured astrocytes. *FEBS*, 377 :489–492, 1995.
- [34] A. WILHELM et al. Localization of SNARE proteins and secretory organelle proteins in astrocytes in vitro and in situ. *Neurosci Res*, 48 :249–257, 2004.
- [35] A. ARAQUE et al. SNARE-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 20(2) :666–673, 2000.
- [36] V. MONTANA et al. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 24(11) :2633–2642, 2004.
- [37] BEZZI et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature neuroscience*, 7(6) :613–620, 2004.
- [38] D. CRIPPA et al. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes : insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol*, 570 :567–582, 2006.
- [39] Z. YE et al. Functional hemichannels in astrocytes : a novel mechanisms of glutamate release. *J Neurosci*, 23(9) :3588–3596, 2003.
- [40] D. ATWELL et al. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*, 11 :401–407, 1993.
- [41] D. GRASS et al. Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci*, 24(6) :1358–1365, 2004.
- [42] H. KIMELBERG et al. Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*, 10(5) :1583–1591, 1990.
- [43] S. DUAN et al. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*, 23(4) :1320–1328, 2003.
- [44] A. MONGIN et al. ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002.

- [45] W. VAN DER KLOOT et al. A chloride channel blocker reduces acetylcholine uptake into synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *Brain Res*, 961 :287–289, 2003.
- [46] R. BURGOYNE et al. Secretory granule exocytosis. *Physiol rev*, 83 :581–632, 2003.
- [47] I. MARTINEZ et al. Synaptotagmin VII regulates calcium-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Biol Chem*, 148(6) :1141–1149, 2000.
- [48] B. ALBERTS et al. *Molecular Biology of the Cell*. Médecine-Sciences. Flammarion, 4ème édition, 2004.
- [49] R. SUTTON et al. Crystal structure of a snare complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395 :347–353, 1998.
- [50] C. MONTECUCCO et al. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol*, 13 :1–8, 1994.
- [51] V. MAIENSCHIN et al. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia*, 26 :233–244, 1999.
- [52] H. KIMELBERG et al. Acutely isolated astrocytes as models to probe astrocyte functions. *Neurochem Int*, 36(4-5) :359–367, 2000.
- [53] X. CHEN et al. Kiss-and-run glutamate secretion in cultured and freshly isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci*, 25(40) :9236–9243, 2005.
- [54] S. COCO et al. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem*, 278(2) :1354–1362, 2003.
- [55] J. STEYER et al. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature*, 388 :474–478, 1997.
- [56] M. OHEIM et al. The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy. *Eur Biophys J*, 27 :83–98, 1998.
- [57] M. BORN et al. *Principles of Optics*. Pergamon Press, 6ème édition, 1993.

- [58] E. HECHT. *Optics*. Addison Wesley, quatrième édition, 2002.
- [59] D. AXELROD. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2 :764–774, 2001.
- [60] M. OHEIM et al. Evanescent-wave microscopy : a new tool to gain insight into the control of transmitter release. *Phil Trans R Soc Lond B*, 354 :307–318, 1999.
- [61] E. BOITIER et al. Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca^{2+} waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol*, 145(4) :795–808, 1999.
- [62] G. DAVEY et al. Intracellular Ca^{2+} and Zn^{2+} levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*, 276(33) :30819–30826, 2001.
- [63] M. PENNUTO et al. Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell*, 14(12) :4909–4919, 2003.
- [64] A. NIELSEN. Spectral mixture analysis : linear and semi-parametric full and iterated partial unmixing in multi- and hyperspectral image data. *Int J Comp Vis*, 42 :17–37, 2001.
- [65] R. NEHER et al. Optimizing imaging parameters for the separation of multiple labels in a fluorescence image. *J Microscopy*, 213 :46–62, 2004.
- [66] L. PERSONNAZ. Statistique et modélisation. Cours de statistique de l'École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris (ES-PCI), 2005.
- [67] J. LI. Linear unmixing of hyperspectral signals via wavelet feature extraction. Thèse de PhD de l'Université du Mississippi, 2002.
- [68] B. CHANCE et al. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. *J Biol Chem*, 254(11) :4764–4771, 1979.
- [69] D. CHORVAT et al. Spectral unmixing of flavin autofluorescence components in cardiac myocytes. *Biophys J*, 89(6) :L55–7, 2005.

- [70] M. POTOVAR et al. Vesicle mobility studied in cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Com*, 329 :678–683, 2005.
- [71] K. REINERT et al. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex *in vivo*. *J Neurophysiol*, 92 :199–211, 2004.
- [72] P. MORIN et al. Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *EMBO J*, 23 :4560–4570, 2004.
- [73] J. JAISWAL et al. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol*, 159(4) :625–635, 2002.
- [74] F. CALEGARI et al. A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J Biol Chem*, 274(32) :22539–22547, 1999.
- [75] M. WOLFENBERGER et al. Localization and coexistence of atrial natriuretic peptide (ANP) and neuropeptide Y (NPY) in vertebrate adrenal chromaffin cells immunoreactive to TH, DBH and PNMT. *Cell Tissue Res*, 280(2) :267–276, 1995.
- [76] A. SIMPSON et al. Fluorescent measurement of Ca^{2+} : basic practical considerations. *Methods Mol Biol*, 312 :3–36, 2006.
- [77] U. BECHERER et al. Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nature neuroscience*, 6(8) :846–853, 2004.
- [78] P. WHITAKER-AZMITIA et al. Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulates growth of serotonergic neurons. *Brain Res*, 497(1) :80–85, 1989.
- [79] J. DELIC et al. Impossibility of Acridine Orange intercalation in nuclear DNA of the living cell. *Exp Cell Res*, 194 :147–153, 1991.
- [80] D. ZENISEK et al. A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron*, 35 :1085–1097, 2002.

- [81] S. LILLARD et al. Temporal and spatial monitoring of exocytosis with native fluorescence imaging microscopy. *J Neurosci Methods*, 75 :103–109, 1997.
- [82] Y. OHSUGI et al. Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys J*, Epub ahead august 2006.
- [83] H. ALDSKOGIUS et al. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res*, 58 :33–41, 1999.
- [84] H. SCHIPPER et al. Role of porphyrin sequestration in the biogenesis of iron-loaden astrocytic inclusions in primary cultures. *Dev Neurosci*, 24(2-3) :169–176, 2002.
- [85] S. HUANG et al. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J*, 2 :2811–2825, 2002.
- [86] G. MIESENBOCK et al. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689) :192–195, 1998.
- [87] M. TERASAKI et al. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca^{2+} -dependent vesicle-vesicle fusion events. *J Cell Biol*, 139 :63–74, 1997.
- [88] E. BLOTT et al. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 :122–131, 2002.
- [89] G. DAVEY et al. Calcium-dependent translocation of S100A11 requires tubulin filaments. *Biochim Biophys Acta*, 1498 :220–232, 2001.
- [90] G. BISHOP et al. Iron : a pathological mediator of Alzheimer disease. *Dev Neurosci*, 24 :184–187, 2002.
- [91] K. MIN et al. Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia : a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci*, 26 :1880–1887, 2006.
- [92] J. FERGUSON et al. Absorption studies of acid-base equilibria of dye solutions. *Chem phys letters*, 17(4) :543–546, 1972.

- [93] R. NAGELE. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25 :663–674, 2004.
- [94] R. ARANTES et al. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J Neurosci*, 26(17) :4630–4637, 2006.
- [95] P. HAYDON et al. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, 86 :1009–1031, 2005.
- [96] C. BERNARD. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Champs. Flammarion, 1993.
- [97] V. PLANCHON. Traitement des valeurs aberrantes : concepts actuels et tendances générales. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 9(1) :19–34, 2005.

