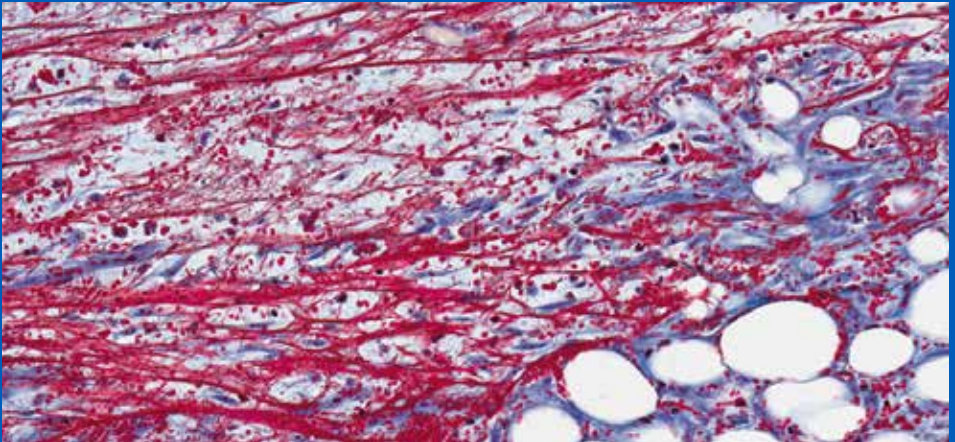


*REVUE FRANÇAISE*

*D' HISTO*

**TECHNOLOGIE**

2016, Vol 28, n°1





# REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

[www.afhisto.com](http://www.afhisto.com)

2016, VOL **28**, N° 1



ASSOCIATION FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE  
N° 8397, J.O. du 17 février 1988, n°7

*OBJET* : promouvoir les échanges d'information, la communication dans tous les domaines de la technique histologique, par l'organisation de congrès, de groupes de travail, ainsi que par l'édition d'une revue.

*COMPOSITION DU BUREAU :*

Nathalie Accart, Bâle, *Présidente*

Nicolas Gadot, Lyon, *Trésorier*

Sophie Luccantoni-Freire, Fontenay-Aux-Roses, *Secrétaire*

Patricia Cavelier, Montpellier, *Secrétaire adjointe, spécialisée en communication*

Alain Fautrel, Rennes, *Relation avec les firmes*

Lydie Venteo, Reims, *Rédactrice en chef de la Revue*

Gwénaëlle Randuineau, St. Gilles, *Chargée de communication, Site Internet*

Sophie Luccantoni-Freire, Fontenay-Aux-Roses, *Responsable Reportage*

Nombre d'adhérents au 31 décembre 2015: 97

*Siège social :*

Association Française d'Histotechnologie

Mairie d'Amboise, BP 247

37402 AMBOISE CEDEX



# REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

Publication annuelle référencée dans la base Pascal de l'INIST.

***La Revue Française d'Histotechnologie*** est l'organe officiel de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH). Elle publie des revues, des notes techniques, des éditoriaux, des articles originaux ainsi que le courrier à l'éditeur.

L'appartenance à l'Association Française d'Histotechnologie comprend l'abonnement à la revue. Numéro supplémentaire 20 euros.

*Courrier, courriel, manuscrits :*

Lydie VENTEO  
Label Histologie  
8 rue Belin, 51100 REIMS  
lydie.venteo@orange.fr

*Présidente du comité de lecture :*

Lydie VENTEO, Label Histologie, Reims

Membres du comité de lecture :

Pour chaque manuscrit, deux à trois lecteurs sont choisis pour leur compétence dans le domaine considéré.

## ***Revue Française d'Histotechnologie***

Editeur : Association Française d'Histotechnologie

Imprimeur : Imprim'lingo, 67540 OSTWALD

Directrice de publication : Nathalie ACCART

Publicité : Alain FAUTREL

Rédactrice en chef : Lydie VENTEO

Tirage : 300 exemplaires

ISSN 0997-6434

© : toute reproduction totale ou partielle des articles est soumise à l'autorisation préalable de l'Editeur.

## RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Les articles soumis doivent être approuvés par leurs auteurs et éventuels co-auteurs et ne **doivent pas avoir été publiés auparavant**.

### **I. Soumission des manuscrits**

*par voie postale à :*

Lydie VENTEO  
Label Histologie  
8 rue Belin - 51100 REIMS

*Par messagerie électronique à :*

lydie.venteo@orange.fr

Dans tous les cas, fournir le nom, les adresses postale ET électronique de l’auteur en charge de la correspondance.

Il est nécessaire de fournir un résumé en français ET en anglais.

### **II. Présentation générale des manuscrits.**

#### ***Dactylographie***

La première page du manuscrit indique le titre de l’article (éventuellement sous-titre), le nom et prénom de chaque auteur, son affiliation avec ses adresses postale complète et électronique.

Les manuscrits doivent être saisis dans un logiciel de traitement de texte, de préférence Microsoft Word et si possible en police de caractère «Times New Roman» de taille 12.

Les médicaments doivent être mentionnés selon leur dénomination commune ou leur nom chimique. Les références commerciales des réactifs (référence et fournisseur) et matériel (modèle et fabricant) utilisés sont citées clairement, ainsi que les conditions expérimentales des travaux décrits.

#### ***Acronymes***

Dans le corps du texte, il est indispensable d’expliciter les acronymes utilisés lors de leur première apparition (sauf s’il s’agit d’une unité de mesure internationale). Le terme entier précède l’acronyme inscrit entre parenthèses : Association Française d’Histotechnologie (AFH). Pour les unités de mesure internationales, les 7 unités de base du Système International d’Unités (SI) sont : le mètre (m), le kilogramme (kg), la seconde (s), l’ampère (A), le kelvin (K), la mole (mol) et le candela (cd).

#### ***Les documents iconographiques (Figures et Tableaux)***

- **Les Figures** sont numérotées en chiffres arabes et par ordre d’apparition dans le texte : (Figure 1).
  - **Les Tableaux** sont numérotés en chiffres romains par ordre d’apparition dans le texte : (Tableau I).
- Les légendes des Figures et Tableaux sont portées les unes à la suite des autres, en fin d’article.

**L'iconographie et le texte, sous forme papier**, doivent être adressés par courrier, à l'adresse précédemment mentionnée. Les illustrations sont clairement identifiées (*Figure 1, Tableau I*). Ils seront restitués à l'auteur après édition de la revue.

**L'iconographie et le texte, sous forme numérique**, doivent être transmis

- *soit en doc attaché par courriel et formuler ainsi :*

\*1 fichier (**Word** de préférence, caractères «**Times New Roman, taille 12**»), avec uniquement le texte et les légendes photos **et**

\*1 fichier au format **TIFF** avec une résolution minimum de **300 dpi** pour l'iconographie seule, clairement identifiée et nommée dans le texte (*Figure 1a, Figure 2...*)

- *soit sur CD portant le nom de l'auteur*

Le support numérique sera restitué à l'auteur après édition de la revue.

**Quelques recommandations concernant l'iconographie numérique :** elle ne doit pas être élaborée avec des logiciels bureautiques (Powerpoint, paintbrush...) ni être compressée. Sous ces formats, elle n'est pas ou peu exploitable par l'imprimeur.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Les références bibliographiques, sont numérotées en chiffres arabes, classées selon l'ordre d'apparition dans le texte et portées en fin d'article. Le numéro de la référence bibliographique citée est mentionné entre parenthèses. Le nom de la revue doit correspondre aux abréviations disponibles dans les catalogues de l'**Institut de l'Information Scientifique et Technique (INIST)**. **<http://services.inist.fr/public/fre/conslt.htm>**. Elle doit de plus correspondre au style et dactylographie suivants :

*Pour les articles :*

1. KOLOPP M: Le sujet roux. *Rev.fr.histotechnol.*, 2008, **21** (1), 29-38.

*Pour les livres :*

1. TERNYNCK T. & AVRAMEAS S.- Techniques immunoenzymatiques. 2<sup>e</sup> éd. Inserm, Paris, 1987.



## ÉDITORIAL

# ROLE DE L'HISTOLOGIE DANS LES APPROCHES BIOMARQUEURS

Au cours des 20 dernières années, les marqueurs biologiques ou biomarqueurs ont gagné en intérêt sur le plan de la compréhension scientifique et clinique des pathologies et de leurs traitements. Le biomarqueur est défini comme une caractéristique d'un tissu, d'un ensemble de cellules ou d'un fluide corporel mesurée objectivement et évaluée comme un indicateur de tout état physiologique d'un organisme incluant les processus biologiques normaux, pathogéniques ou pharmaceutiques comme une réponse à une intervention thérapeutique (source National Institute of Health NIH (1) et World Health Organization WHO (2)). Un biomarqueur a donc des applications dans au moins 5 domaines comme le criblage, le diagnostic, le pronostic, la prédiction de la récurrence et le monitoring thérapeutique. Un biomarqueur peut être une substance introduite dans l'organisme comme moyen d'examiner une fonction d'un organe. Un exemple de ce type de biomarqueur est le chlorure de rubidium utilisé dans l'évaluation de la perfusion du muscle cardiaque. Un biomarqueur peut aussi être une substance dont la détection indique un état pathologique particulier comme par exemple la présence d'anticorps pouvant être le témoin d'une infection. Plus spécifiquement un biomarqueur indique un changement dans l'expression ou l'état d'une protéine qui corrèle avec le risque ou la progression d'une pathologie, ou avec la susceptibilité d'une maladie à un traitement donné. Les biomarqueurs peuvent être des cellules spécifiques, des molécules, des modifications de gènes, des produits d'expression de gènes, des enzymes, ou des hormones. Les fonctions d'un organe complexe ou des changements des caractéristiques générales de structures biologiques peuvent aussi servir de biomarqueurs.

Bien que le terme de biomarqueur soit relativement récent, les biomarqueurs ont été utilisés en recherche préclinique comme en diagnostic clinique depuis des décennies. Depuis le 14<sup>ème</sup> siècle, les praticiens examinent la couleur et les sédiments de l'urine de leurs patients. La température corporelle est un biomarqueur bien connu de la fièvre. Tout comme la pression artérielle ou la mesure du cholestérol comme marqueur de maladies cardio-vasculaires, ou enfin la protéine C-réactive (CRP) comme marqueur d'inflammation. En 1960, les chercheurs ont découvert que les patients atteints de leucémie myéloïde chronique présentaient une version courte du chromosome 22. Cette anomalie appelée chromosome de Philadelphie est en fait causée par une translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22, résultant en la production d'une protéine à activité tyrosine kinase élevée, définissant l'oncogène Breakpoint Cluster Region-Abelson murine Leukemia (BCR-ABL). Le chromosome de Philadelphie fut le premier biomarqueur utilisé pour la sélection des pa-

tients pouvant bénéficier d'un traitement basé sur l'administration d'inhibiteurs de tyrosine kinases comme l'imatinib. Des mutations spécifiques de cet oncogène ont même pu sélectionner les patients résistant à ce traitement et ont mené au développement de nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinases. Plus tard, dans les années 1980, la charge virale des patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience acquise (HIV), a défini un biomarqueur de la progression de la maladie et a permis de développer les thérapies anti-virales utilisées encore actuellement. Enfin, dans la même décennie, le gène Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER-2) et son récepteur sont devenus les biomarqueurs les plus connus dans le cadre du cancer du sein, définissant les catégories de patients à haut ou bas risque. Ce biomarqueur a notamment permis le développement de nouvelles thérapies comme les anticorps thérapeutiques. C'est ainsi que le trastuzumab également connu sous le nom de herceptine fut commercialisé en 1998.

L'oncologie est une discipline qui a fortement contribué à étendre l'utilisation des biomarqueurs. Elle a utilisé des biomarqueurs génétiques et protéomiques pour prédire la réponse au traitement, d'abord pour le trastuzumab en 1998 puis l'imatinib (Gleevec) en 2001. Ces développements dans le domaine des biomarqueurs conduisent maintenant vers le chemin de la médecine personnalisée. La molécule de chimiothérapie qu'est l'irinotecan (Camptosar) est un exemple de médecine personnalisée. Certains patients présentant une homozygotie pour une version mutée du gène UGT1A1 (\*28) ont ainsi démontré une clairance de l'irinotecan plus lente, les rendant ainsi plus susceptibles à la drogue avec des effets secondaires importants comme la neutropénie ou des diarrhées importantes. Ce constat a donc permis de réajuster les doses de la drogue pour certains patients après utilisation de ce biomarqueur génétique. De nombreux autres exemples sont disponibles dans le domaine de l'oncologie : je citerai les biomarqueurs diagnostics Breast Cancer Antigen-1 et -2 (BRCA-1, BRCA-2) utilisés comme marqueurs prédictifs de la réponse à des agents de chimiothérapie comme les Anthracyclines. L'antigène tumoral Cancer Antigen 125 (CA125) est le meilleur biomarqueur jamais utilisé dans le diagnostic et le pronostic des carcinomes ovariens. Le Cancer Antigen 15-3 (CA15-3) est un biomarqueur de faible sensibilité pour le cancer du sein car il est aussi retrouvé dans les cas d'affections bénignes du sein, dans la cirrhose hépatique et dans l'hépatite chronique. Le Cancer Antigen 19-9 (CA19-9) est utilisé dans le cancer du pancréas et de la vessie, mais certains patients atteints de pancréatite chronique ont démontré une augmentation de ce biomarqueur. Enfin je citerai le biomarqueur Prostate Specific Antigen (PSA) qui en soi, n'est pas un biomarqueur efficace de la détection précoce du cancer de la prostate, mais qui associé à d'autres techniques, est considéré comme utile dans l'identification des adénocarcinomes précoces et curables de la prostate (3, 4).

L'intérêt des biomarqueurs en oncologie a encore grandi récemment, par la relevance donnée à certains biomarqueurs comme le rôle de l'oncogène Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) muté dans le cancer colorectal ou les autres cancers associés à l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Chez les patients dont les tumeurs expriment la forme mutée de KRAS, la protéine KRAS qui entre en jeu dans la voie de signalisation liée à l'EGFR, est toujours liée, rendant le signal par EGFR toujours activé. Même si le signal en amont est bloqué par un inhibiteur de l'EGFR comme le cetuximab (Erbiximab), le signal en aval de la voie de signalisation continue et résulte en une prolifération des cellules et une croissance tumorale continue. Tester les tumeurs pour le gène KRAS sauvage ou muté permet de sélection

tionner les patients qui pourront bénéficier du traitement par le cetuximab.

Réalisant l'importance des biomarqueurs notamment en développement de nouveaux composés thérapeutiques, la tâche d'identification de nouveaux biomarqueurs reste un challenge dû aux demandes de plus en plus drastiques imposées par les autorités de santé. Le développement d'un composé associé au co-développement d'un biomarqueur compagnon est essentiel pour définir un composé comme sûr. Il y a de nombreuses manières de conduire des investigations dans la recherche de biomarqueurs, mais la majorité des études biomarqueurs cliniquement pertinentes a utilisé l'immunohistochimie (IHC).

L'immunohistochimie (IHC) est une plateforme technologique essentielle pour l'analyse d'échantillons tissulaires. Une demande croissante en biomarqueurs tissulaires basés sur une IHC reproductible et quantitative a été observée dans le domaine de la recherche et développement (R&D) en oncologie clinique. Cependant au cours des dernières décennies, l'IHC comme plateforme de biomarqueurs a été challengée par des essais moléculaires plus quantitatifs utilisant des standards de référence. Pour que l'IHC apparaisse dans les trois premières méthodologies utilisables pour la définition de biomarqueurs, il a fallu qu'elle s'adapte à des critères de qualité, qu'elle devienne quantitative et qu'elle définisse des standards de référence. Cependant créer de tels référentiels demande d'optimiser tous les aspects de la collection des tissus, leur fixation, l'épaisseur de la coupe, les processus de coloration, la digitalisation de l'image et enfin la quantification (5).

La collecte des échantillons doit être faite pour minimiser la variabilité pré-analytique. Cependant il a été démontré que les profils d'expression de gènes ou de protéines changent seulement 5 minutes après résection de l'échantillon. Après 30 minutes, 20% des gènes et protéines détectables diffèrent de ceux observés au temps 0 (6). Il est donc nécessaire de connaître et de standardiser le temps passé entre la résection et le début de la fixation. La fixation par une solution de formaline à 10% est la mieux caractérisée. La fixation complète par la formation de ponts méthylène stables entre les protéines et les acides nucléiques, de pièces de taille moyenne (1 cm<sup>2</sup>) prend entre 24 et 48h. Là encore, il est nécessaire d'ajuster le temps de fixation non seulement par rapport à la taille de la pièce opératoire mais aussi en fonction de la cible à détecter. Par exemple il a été démontré que la fixation entre 1h et 168h dans une solution de formaline n'entraîne aucun changement dans la détection des récepteurs aux oestrogènes (ER) ou progestérone (PR) (7). Puis les tissus sont recoupés pour une bonne orientation, déshydratés puis inclus en paraffine dans la plupart des cas. La standardisation passe par la qualité de l'éthanol utilisé ou par la paraffine dont les trois principaux types utilisés ont des points de fusion différents ou une capacité variable à infiltrer les tissus. De même une mauvaise déshydratation peut engendrer la dégradation de certains antigènes. Ensuite vient la coupe qui doit être régulière. Plus la coupe sera épaisse, plus le marquage sera intense mais moins la résolution de celui-ci sera fine. Généralement les épaisseurs de coupes varient entre 3 et 5 µm, le test Hercept recommande d'utiliser des coupes de 4 µm (8). Puis vient la méthode d'IHC elle-même. En théorie, cette méthode semble simple à réaliser mais elle est en fait un enchaînement de réactions biochimiques que l'opérateur doit comprendre afin de pouvoir améliorer les protocoles ou résoudre les problèmes. Ce qui n'est pas toujours le cas avec les utilisateurs de machines automatiques. Elles ne sont donc pas la garantie de la qualité ou de la reproductibilité. D'où l'intérêt de développer des standards de référence pour une meilleure reproductibilité des

protocoles entre les laboratoires, étant donné la diversité des réactifs, des machines et finalement des méthodes. Le choix de l'anticorps spécifique, anticorps secondaires et/ou tertiaire, le démasquage antigénique, les tampons, les températures et temps d'incubation, les dilutions d'anticorps, les systèmes d'amplification, le choix du chromogène ou du fluorophore sont autant de critères pouvant influencer la réussite de l'expérience et sa reproductibilité. Que dire de l'étape suivante qui sera d'intégrer la détection d'une protéine dans une voie de signalisation par le développement d'IHC multiplexées (9). La quantification du signal doit aussi être standardisée par l'utilisation d'algorithmes d'analyse d'images entières obtenues par des automates d'acquisition d'images virtuelles, équivalents au microscope optique conventionnel. Là encore l'IHC multiplexée peut être un grand avantage pour la définition des régions d'intérêt mais ne peut pas toujours résoudre l'hétérogénéité démontrée par les tissus, notamment les tumeurs. En résumé, il faut donc établir que le test fonctionne de la même manière dans des échantillons contrôles précliniques. Puis établir que le test fonctionne comme attendu sur un panel d'échantillons cliniques. Enfin établir que l'évaluation du test est comparable entre les différents sites expérimentaux.

Les biomarqueurs sont une partie essentielle du développement clinique. La possibilité de l'industrie pharmaceutique à prédire précocement la performance d'une drogue candidate avec un fort degré de confiance est très faible, ce qui peut expliquer le plus faible nombre d'enregistrement de nouveaux médicaments par la Food and Drug Administration (FDA) depuis 1983. Cet effort de développement de biomarqueurs compagnons a induit une forte augmentation du coût de développement d'un produit, de plus de 50% entre 2002 et 2007. D'où la nécessité de développer des tests fiables et reproductibles pour accélérer le développement et l'approbation des médicaments de demain. Malgré toutes ces difficultés, le développement de 130 biomarqueurs basés sur l'IHC, supportant un nombre important de projets en oncologie, a permis de définir une approche pratique pour le développement de ce type de biomarqueurs. Ainsi une grille matricielle a été créée pour permettre aux chercheurs de développer leur biomarqueur, incorporant 16 points de décision qui relient l'anticorps et la spécificité, sensibilité et performance du test sur des échantillons précliniques et cliniques, à différents stades de développement du produit thérapeutique. Cette matrice est un moyen d'assurer que les informations pertinentes sur un test IHC en développement sont bien enregistrées et communiquées afin de minimiser les efforts de revalidation (10).

1. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*. 2006;113(19):2335-62.
2. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003;3(5):525-9.
3. Bates SE, Longo DL. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Semin Oncol*. 1987;14(2):102-38.
4. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(2):17-31.
5. Dunstan RW, Wharton KA, Jr., Quigley C, Lowe A. The use of immunohistochemistry for biomarker assessment--can it compete with other technologies? *Toxicologic pathology*. 2011;39(6):988-1002.
6. Burns JA, Li Y, Cheney CA, Ou Y, Franlin-Pfeifer LL, Kuklin N, et al. Choice of fixative is crucial to successful immunohistochemical detection of phosphoproteins in paraffin-embedded tumor tissues. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(3):257-64.

7. Apple S, Pucci R, Lowe AC, Shintaku I, Shapourifar-Tehrani S, Moatamed N. The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma. American journal of clinical pathology. 2011;135(4):592-8.
8. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Archives of pathology & laboratory medicine. 2007;131(1):18-43.
9. Chung JY, Hewitt SM. Transfer and multiplex immunoblotting of a paraffin embedded tissue. Methods Mol Biol. 2009;536:139-48.
10. Smith NR, Womack C. A matrix approach to guide IHC-based tissue biomarker development in oncology drug discovery. The Journal of pathology. 2014;232(2):190-8.

Je ne voudrais pas finir cet éditorial sans rendre hommage à tous ceux qui quotidiennement contribuent à ces avancées technologiques notamment dans le domaine de l'histologie et l'immunohistochimie appliquées au développement de nouveaux biomarqueurs. Je pense aussi à ceux qui nous ont quittés cette année. Je joindrai ainsi à cet éditorial les mots de Monique Lemesle en hommage à Brigitte Arbeille, qui fut une pionnière dans ces domaines et qui apporta sa contribution à l'Association Française d'Histotechnologie :

*« Quelques mots en accord avec ceux qui ont travaillé pendant des dizaines d'années à tes côtés. Nous étions ton équipe mais aussi très proches de Toi, et finalement tes amis. Bien sûr depuis 3 ans tu avais un peu décroché puisqu'à la retraite, mais tu suivais néanmoins toujours le devenir du laboratoire. C'est peu dire que tu nous manques !*

*Admettre que ton enthousiasme, ton aura, ton sourire et ta joie de vivre ne sont plus désormais que des souvenirs, est vraiment difficile à supporter. Ta famille micro, mais aussi tous ceux avec lesquels tu as partagé des moments si riches ont le sentiment d'être un peu orphelins. Pas facile de dire en quelques mots comment tu as toujours soutenu ton équipe technique pour adhérer et participer à l'AFH. Tes multiples tâches de responsable du laboratoire, d'enseignante, de membre actif des instances hospitalo-universitaires, ne t'ont jamais empêchée de nous consacrer un temps précieux pour nous guider et nous inciter à participer aux échanges dans le cadre de l'AFH. Dès sa création, c'est avec enthousiasme que tu nous as encouragés à adhérer et à participer aux premiers congrès. Pour avoir pendant toute ma carrière travaillé à tes côtés, j'ai pu apprécier ta passion, ton engagement, ta détermination à nous faire partager ton savoir, ton expérience, ta foi en ce métier. Morphologiste convaincue, tu te réjouissais toujours quand nous partagions des techniques, des trucs avec nos collègues techniciens de divers horizons. Et quand on nous a proposé d'organiser les 10 ans puis les 20 ans de l'AFH, à la faculté de médecine de Tours, c'est sans hésiter que tu nous as encouragés puis aidés à mettre en place ces congrès marquants pour l'Association.*

*Tous ceux qui t'ont rencontrée, gardent à l'évidence le souvenir d'un être lumineux, ouvert aux autres, et qui avait encore beaucoup d'amour, d'amitié et d'affection à donner. Merci Brigitte, nous te devons tant !!! »*

**Nathalie ACCART**

*Présidente de l'Association Française d'Histotechnologie*



**Participants de la Journée à Thème AFH du 17 Octobre 2014**

1	GUTKNECHT	Lise	<i>lgutknecht@histalim.com</i>	MONTPELLIER	HISTALIM
2	THILLOU	Fabienne	<i>fthillou@rd.loreal.com</i>	LYON	EPISKIN l'Oréal
3	BARAIGE	Fabienne	<i>fabienne.baraige@unilim.fr</i>	LIMOGES	Université
4	FONTAINE	Lucie	<i>lucie.fontaine@inserm.fr</i>	TOULOUSE	INSERM
5	CAPILLA	Florence	<i>florence.capilla@inserm.fr</i>	TOULOUSE	CHU Purpan
6	DOVERO	Sandra	<i>sandra.dovero@u-bordeaux.fr</i>	BORDEAUX	CNRS
7	RIPOLL	Chantal	<i>chantal.ripoll@inserm.fr</i>	MONTPELLIER	INSERM
8	MOREL	Gérard	<i>germorel@hotmail.com</i>	LYON	CNRS
9	LUCCANTONI	Sophie	<i>sophie.freire@me.com</i>	PARIS	CEA



# PROBLEMES LIES AUX COUPES DE TISSUS CONGELES ET SOLUTIONS

Baraige F.<sup>1</sup>, Capilla F.<sup>2</sup>, Fontaine L.<sup>3</sup>, Gadot N.<sup>4</sup>, Gutknecht L.<sup>5</sup>,  
Morel G.<sup>6</sup>, Ripoll C.<sup>7</sup>, Thillou F.<sup>8</sup>

*<sup>1</sup>Université de Limoges*

*<sup>2</sup>CHU Purpan, Toulouse*

*<sup>3</sup>INSERM, Toulouse*

*<sup>4</sup>Centre Léon Bérard, Lyon*

*<sup>5</sup>Histalim, Montpellier*

*<sup>6</sup>CNRS, Lyon*

*<sup>7</sup>INERM, Montpellier*

*<sup>8</sup>Episkin Loréal, Lyon*

## **INTRODUCTION**

La première journée à thème de l'AFH s'est organisée sous forme de table ronde pour des échanges sur la congélation des tissus et des cryocoupes. Qui n'a pas déjà rencontré des difficultés à la coupe d'un tissu congelé ? Problématiques dues à la préparation des échantillons, à la congélation ou à la coupe elle-même, sans oublier le stockage de la pièce congelée ou des coupes... La finalité recherchée pour l'usage de ces coupes est généralement

l'immunohistochimie, mais ces considérations générales restent valables pour la plupart des applications possibles des coupes congelées. Voici quelques éléments de réponse présentés lors de la réunion qui s'est tenue à Paris le 17 octobre 2014.

## **PRÉPARATION DES TISSUS DESTINÉS À ÊTRE CONGELÉS**

Dans le cas d'une étude destinée à la détection de macromolécules par immunomarquage, il est préférable de procéder à

une congélation des tissus en évitant toute fixation par des agents chimiques ou physiques. Cependant il est possible de préfixer les tissus dans le cas de la détection d'antigènes non modifiés par la fixation et d'épitopes non conformationnels.

### ***But de la fixation***

Le but de la fixation est de maintenir les tissus ou les organes prélevés dans un état le plus proche possible de l'état ante mortem en évitant les conséquences de la privation en oxygène après la mort et le dessèchement après le prélèvement. La fixation empêche donc à la fois la dégradation du tissu par les enzymes cellulaires libérées au moment de la mort des cellules, et sa putréfaction liée à la prolifération bactérienne. Elle consiste à immobiliser/stabiliser les tissus *in-situ*, en particulier les antigènes, en préservant l'aspect structural du tissu. La fixation dépend de la nature chimique des molécules à détecter (glucides, lipides, protéines, acide nucléiques, ...)

Elle peut être physique, par le froid (congélation), par une déshydratation ou lyophilisation (chaleur-micro-onde) ou chimique. Les fixateurs chimiques les plus couramment utilisés sont les solutions coagulantes ou précipitantes (alcools, cétones, acide picrique, acide acétique...), ou les agents pontants (formaldéhyde, glutaraldéhyde).

### ***Choix du fixateur chimique***

Le choix du fixateur est orienté par le type d'observation envisagée, la fixation doit préserver des détails d'autant plus fins que

le pouvoir de résolution du microscope utilisé est élevé (structures à préserver, molécules à immobiliser). En effet les glucides, les lipides et les protéines ne vont pas réagir de manière identique vis-à-vis d'un fixateur.

De manière générale, le fixateur le plus couramment utilisé est le formaldéhyde préparé à partir d'une poudre de paraformaldéhyde. Cette fixation permet la préservation des structures les plus fines. La solution de formol doit être tamponnée et utilisée rapidement car le formol (méthanal) est facilement oxydé par le dioxygène de l'air pour former de l'acide formique. C'est pourquoi il faut conserver le formol dans des récipients bien étanches et l'utiliser rapidement.

Durée de fixation, tampon, température sont les paramètres à optimiser pour l'étude envisagée.

Si la fixation se fait par immersion : le volume du liquide fixateur doit représenter 20 fois celui de l'échantillon, la durée de fixation dépend de la consistance et de l'épaisseur de l'échantillon : 5 mn pour les cellules isolées, 1 à 2 h pour des fragments de 1 mm, sous agitation modérée et à 4°C pour éviter le phénomène d'autolyse.

Si la fixation se fait par perfusion intracardiaque : c'est la méthode la plus rapide qui préserve au mieux les tissus car les organes à prélever sont immédiatement fixés *in situ*. Le fixateur le plus utilisé est le paraformaldéhyde (microscopie photonique) ou le glutaraldéhyde (microscopie élec-

tronique). Cette méthode permet une très bonne pénétration du fixateur via les vaisseaux et les capillaires. C'est une méthode de choix pour la fixation du cerveau et de la moelle épinière chez les rongeurs. Elle peut également être suivie par une fixation par immersion à 4°C, sous agitation douce (mais attention à la surfixation).

### ***Contraintes de la fixation chimique***

Il est indispensable de respecter au mieux les caractéristiques physico-chimiques des fluides cellulaires pour éviter que les mouvements d'eau et d'ions n'affectent les cellules avant la réticulation.

Les caractéristiques physico-chimiques prises en considération avant et pendant la fixation sont l'osmolarité, la force ionique et le pH.

Le rôle de l'osmolarité : elle joue un rôle très important. La fixation doit être effectuée en légère hyperosmolarité pour compenser la dilution du fixateur par l'eau libérée par les tissus. Chez les mammifères (rongeurs) l'osmolarité de référence est de 300 mosmol. Le tampon phosphate (mono-diphosphate) à 0,1 M correspond au milieu ionique circulant.

Le réajustement osmotique nécessaire peut être réalisé uniquement à l'aide du tampon. La correction peut alors être faite par addition de sucre (glucose ou saccharose).

Le pH a un rôle essentiel au niveau des protéines : il agit sur la conformation, la

polymérisation et la dissolution. Des modifications structurales à tous les niveaux de la cellule peuvent apparaître en fonction du pH. Le pH au voisinage de la neutralité (7,2-7,4) doit être maintenu tout au long de la fixation. Etant donné que la fixation peut acidifier le milieu, il faut utiliser un système tampon efficace pour l'absorption des ions H<sup>+</sup> libérés. En effet, la propriété d'un tampon est la capacité à résister aux changements de concentrations en ions H<sup>+</sup> et de maintenir le milieu à un pH déterminé.

### ***Pré-fixation chimique - avantages***

Cette méthode permet de préserver l'architecture de l'échantillon aussi proche que possible de l'état natif, tout en rendant les antigènes accessibles. Une fixation chimique avant congélation permet également de procéder aux dissections fines sans engendrer d'autolyse des tissus. La préservation de l'architecture des tissus est obtenue au cours de ces manipulations. Les blocs de tissus sont conservés à -80°C dans de bonnes conditions (peu de formation de cristaux au cours du temps, ≤ 3 mois, si le prélèvement est enrobé de TissuTek). Une cryoprotection de l'échantillon peut être également réalisée avant sa congélation (voir ci-dessous). Ce n'est qu'en cas d'insuccès que l'on choisira des fixations plus douces, voir l'absence de fixation par agent chimique.

### ***Pré-fixation chimique - inconvénients***

La fixation chimique peut entraîner des effets pervers sur l'étude histologique comme 1) une modification chimique des antigènes pouvant réduire la réaction anti-

gène-anticorps, 2) une modification des charges du tissu et/ou de l'antigène avec une répulsion des anticorps, 3) une réticulation du tissu pouvant nuire à la diffusion des réactifs, 4) la formation de molécules auto-fluorescentes (certains neurotransmetteurs comme la sérotonine ou la noradrénaline).

Une sur-fixation stabilise les structures tissulaires mais réduit la sensibilité des détections possibles. Quoiqu'il en soit ce problème « insoluble » est à résoudre pour chaque cas expérimental.

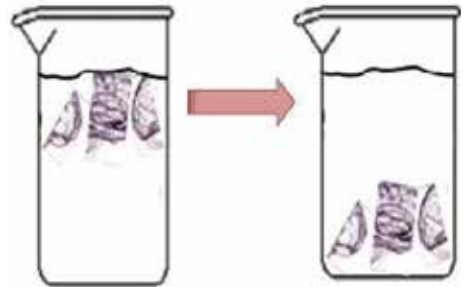
Si la fixation est nécessaire, celle-ci devra être en adéquation pour ne pas réduire les avantages apportés par la congélation c'est-à-dire la sensibilité.

### **Cryoprotection**

La formation des cristaux de glace peut être minimisée en imprégnant le tissu d'un liquide cryoprotecteur (toujours sur tissu ayant subi une fixation chimique préalable), en réalisant une congélation ultra-rapide qui ne laisse pas le temps aux cristaux de glace de se former et de grandir, ou encore en congelant les tissus sous très forte pression (supérieure ou égale à 2 000 atmosphères). Notons cependant que la formation de microcristaux peut avoir un effet bénéfique sur l'immunoréaction en facilitant la diffusion des réactifs dans l'épaisseur des tissus et des coupes. Parmi ces substances, on trouve le saccharose, le dextran, le glycérol ou encore le DMSO. L'utilisation de solutions hyperosmolaires peut cependant provoquer, si les tissus sont peu ou pas fixés, des perturbations

osmotiques avec leur cortège d'artefacts (condensation du cytoplasme, dilatation des espaces extracellulaires).

La substance la plus utilisée est le saccharose à des concentrations variant, suivant les auteurs, de 0,4M (en tampon phosphate, ce qui correspond à l'osmolarité du tissu), jusqu'à 2,3M, (concentration de saturation, à déconseiller car s'accompagne du phénomène d'hyperosmolarité). Des bains dans un gradient progressif de sucrose permettent une bonne imprégnation du tissu pour des concentrations hyperosmolaires (30-50%). La chute du tissu au fond du contenant étant la confirmation de l'imprégnation du prélèvement (Figure 1).



**Figure 1:** Principe de l'incubation d'un tissu dans une solution d'agent cryoprotecteur. L'imprégnation est totale lorsque le prélèvement est tombé au fond du contenant.

Un exemple : l'embryon est constitué de plus de 90% d'eau. Pour éviter la formation de cristaux de glace qui par augmentation de volume déchireraient les membranes cellulaires lors de la congélation, il est nécessaire d'incuber le prélèvement dans des concentrations de sucrose pouvant atteindre 50%. L'eau est rempla-

cée par le cryoprotecteur, véritable «anti-gel» cellulaire. L'embryon est plongé dans des bains successifs contenant le cryoprotecteur à des concentrations croissantes. Le sucrose rend le milieu hypertonique par rapport à l'embryon, ce qui entraîne la sortie de l'eau et la rentrée du cryoprotecteur.

### ***Méthodes de congélation possibles***

Le tissu à congeler, imprégné de milieu cryoprotecteur, est d'abord refroidi à une température proche du point de congélation (température de surfusion) : c'est le palier de congélation. Cette température est environ de  $-4^{\circ}\text{C}$  pour du saccharose 0,4 M en tampon phosphate 100 mM pH 7,4. Puis la température est abaissée brutalement, de façon à obtenir une congélation sans cristaux de glace, comme par exemple en isopentane refroidi sur vapeurs d'azote. Le passage de l'état liquide à l'état solide se fait donc plus rapidement que dans le cas précédent puisque avant d'être congelé le tissu est à une température juste au-dessus du point de congélation. Il est à noter que l'immersion directe en azote liquide peut générer des artefacts comme des bulles d'air ou un bloc fragmenté.

Une autre méthode possible consiste à orienter le tissu cryoprotégé dans un moule, à l'enrober d'OCT Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (milieu d'enrobage qui polymérise à froid) et à le plonger immédiatement dans de l'isopentane refroidi sur vapeurs d'azote pour être congelé. L'enrobage peut se faire également avec de la gélatine ou de l'agarose pour les petites pièces. Le rouge neutre peut être utilisé pour colorer les petites pièces difficiles à

visualiser lors de la coupe.

### ***Fixateurs physiques***

Dans l'objectif d'une détection de molécule avec une sensibilité optimale (i.e. un antigène, un acide nucléique faiblement exprimé). Il est possible d'utiliser un tissu congelé, mais la congélation est délicate avec perte d'information morphologique.

La congélation évite l'inclusion dans un milieu hydrophobe préservant au mieux l'antigénicité et les acides nucléiques.

La congélation, par abaissement brutal de la température en azote liquide, empêche l'autolyse et, le prélèvement durci peut être coupé directement au cryostat.

### ***Congélation rapide par immersion directe dans un liquide refroidi***

La congélation directe dans l'azote liquide est déconseillée à cause du phénomène de caléfaction. En effet, l'azote liquide étant à sa température d'ébullition ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), il se forme instantanément au contact du tissu des bulles d'azote gazeux qui ralentissent considérablement le transfert du froid et ainsi la congélation. Il est préférable d'utiliser un milieu cryogénique intermédiaire (éthane, propane, isopentane, Fréon 2299, etc.) qui sera refroidi dans l'azote liquide à  $-80^{\circ}\text{C}$  (pour l'isopentane en phase liquide). Il existe aujourd'hui des appareils munis d'un groupe froid  $-80^{\circ}\text{C}$  (SNAPFROST®) permettant d'éviter l'utilisation de l'azote liquide et de travailler dans des conditions de sécurité plus favorables pour le manipulateur.

En passant à l'état de glace, l'eau

s'organise en cristaux d'autant plus gros que le refroidissement est lent. Ces cristaux endommagent la structure des tissus. Si le refroidissement de l'échantillon est suffisamment rapide, les cristaux de glace n'ont pas le temps de croître : leur taille reste en dessous du pouvoir séparateur du microscope. On estime que pour une bonne préservation ultrastructurale la vitesse de refroidissement doit atteindre 100 000 °C/seconde.

L'avantage de cette technique : Elle est rapide. Si nécessaire des résultats peuvent être fournis moins d'une heure après le prélèvement. De plus, sans fixation, ni milieu d'inclusion, il n'y a pas de perturbation de la reconnaissance antigène-anticorps par l'élution éventuelle des antigènes lors des nombreuses étapes comme l'hydratation/déshydratation du tissu, les traitements chimiques, les solvants (absence de molécules chimiquement réactives dans le milieu d'inclusion).

C'est une technique de choix d'une part pour la mise en évidence d'antigènes « difficiles » (pour lesquels on ne dispose pas de « bons » anticorps, mais également lors d'une étude sur des antigènes liposolubles (pas de solvants organiques).

Les coupes réalisées dans les blocs de tissus pré-fixés montrent souvent des artefacts de congélation alors que la préservation des coupes obtenues à partir de blocs non fixés semble meilleure. Cette observation *a priori* surprenante s'explique facilement. Les cristaux de glace créent des trous. La structure des tissus fixés est

rigide : après la fonte de la glace les trous persistent. Au contraire les tissus non fixés restent fluides et les trous disparaissent à la décongélation.

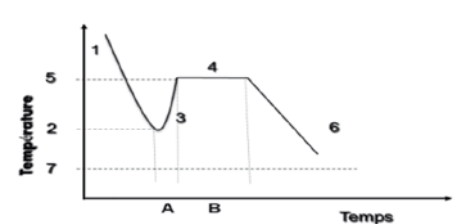
Les inconvénients de cette technique : notons que les tissus congelés doivent être stockés à une température aussi basse que possible (-80 °C ou mieux). A -20 °C, les cristaux de glace ont tendance à augmenter en taille au cours du temps. Le temps de conservation des blocs est limité (quelques mois à -80 °C). En général, les phénomènes qui peuvent abîmer les cellules pendant la cryoconservation se produisent lors du gel, et comprennent les effets de solution, la formation de glace hors et au sein des cellules, la déshydratation. La formation de glace hors des cellules se produit lorsque les tissus se refroidissent lentement, l'eau s'échappe des cellules et la glace se forme dans l'espace intercellulaire. Trop de glace entre les cellules peut produire un effet d'écrasement. La fuite d'eau (qui forme la glace extracellulaire) entraîne également la déshydratation de la cellule. De plus, si le niveau de glace au sein des cellules est élevé, l'effet est toujours dévastateur pour la structure.

## **PRINCIPE DE LA CONGÉLATION (PASSAGE D'UN ÉTAT LIQUIDE À SOLIDE)**

La définition de la congélation donnée par Wikipédia est la suivante : « *On appelle congélation toute technique visant à faire passer un produit à l'état solide par des techniques de refroidissement forcé. On parle de congélation principalement pour l'eau et les produits qui en contiennent* ».

Celle du Larousse donne : « *Transition de phase au cours de laquelle un corps passe de l'état liquide à l'état solide* ». La congélation n'est pas un état spontané, elle est induite par un apport de froid, c'est un changement de phase dépendant de la température. Pour les tissus animaux ou végétaux, elle ne concerne que l'eau et les solutés qu'elle contient.

La principale difficulté de l'étude de ce phénomène réside dans le fait que l'eau d'un organisme n'est pas l'eau pure contenue dans le récipient d'un laboratoire. Considérons dans un premier temps ce cas simplifié. Omettons le contenant et les interactions potentielles. Que se passe-t-il lors d'un apport de froid constant et régulier sur de l'eau pure ? Un enregistreur thermique, n'interférant pas avec le système, montre la courbe de refroidissement suivante (Figure 2).

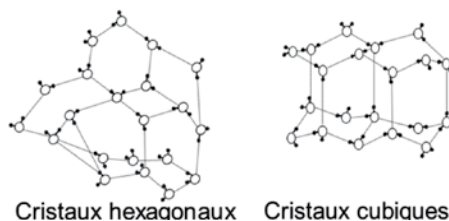


**Figure 2 :** Descente en température de l'eau pure : étapes de sa congélation. Les températures 1-7 correspondent aux différentes phases de refroidissement. A et B respectivement à la multiplication et à l'accroissement de la taille des cristaux.

En refroidissant un volume d'eau avec une vitesse constante, l'eau en phase liquide descend en température suivant une courbe que l'on peut considérer comme linéaire (1), bien que sa masse volumique

est minimale à 4°C, mais sa température descend au-delà de 0°C jusqu'au point 2 (qui n'est pas une constante mais dépend des conditions expérimentales) tout en restant en phase liquide. Ce point est appelé « point de surfusion » (2), et délimite le pic de surfusion. En ce point 2 apparaît le premier cristal de glace. C'est ce phénomène, dit de nucléation, qui est exergonique entraînant la remontée en température (3). Puis la stabilisation du mélange à la température de 0°C (4) correspond au mélange eau-glace. Les cristaux augmentent de taille (B) mais ne se multiplient plus. Lorsque toute l'eau liquide est agglomérée en cristaux, la glace est prise en masse et peut se refroidir à nouveau (6) jusqu'à la température de l'agent cryogénique utilisé comme source de froid (7).

Les cristaux ainsi formés sont dit hexagonaux (Figure 3). Le volume que l'eau occupe dans cet état est supérieur à celui de sa phase liquide. Une bouteille d'eau éclate si elle gèle. Au cours de la congélation d'une cellule celle-ci subira des contraintes mécaniques dues à la dilatation de l'eau constituant son milieu intérieur lorsqu'elle se solidifiera. Mais il existe



**Figure 3 :** Etat cristallin des molécules d'eau. Après une congélation lente les cristaux de glace forment des cristaux hexagonaux. A vitesse rapide les cristaux formés sont cubiques.

d'autres cristaux de glace, les cristaux cubiques (Figure 3). Ces derniers sont obtenus par des vitesses de congélation dites « rapides » (e.g.  $\geq 100^\circ\text{C}/\text{minute}$ ). L'augmentation volumique est moindre et donc les conséquences mécaniques réduites.

La vitesse de refroidissement augmente et la taille des cristaux diminue. Cette constatation a des limites techniques facilement vérifiables. Jeter un prélèvement dans l'azote liquide ( $-196^\circ\text{C}$ ) n'a jamais permis de congeler correctement un prélèvement. Les échanges thermiques sont limités par la vaporisation de l'azote autour du prélèvement qui crée une couche isolante limitant son refroidissement.

Toutefois il existe une méthode théoriquement parfaite : la congélation haute pression. C'est la méthode qui permet de passer de la phase liquide de l'eau à la glace amorphe, phase solide de l'eau sans cristaux, idéale pour l'observation directe (2). Différents appareils ont été développés, un seul persiste sur le marché. Cependant cette technique présente deux inconvénients majeurs : la petite taille des prélèvements nécessaire et son coût.

Un autre inconvénient de la congélation est qu'elle ne correspond pas à un état stable. Des remaniements de la glace existent dans le temps en fonction de sa température. En dessous de  $-100^\circ\text{C}$  la glace est stable. A  $-80^\circ\text{C}$  son remaniement sera plus lent qu'à  $-20^\circ\text{C}$ . Le remaniement n'est pas instantané mais se développe dans le temps et est d'autant plus rapide que la température est proche de  $0^\circ\text{C}$ . Ce

remaniement cristallin se caractérise par la croissance des cristaux de glace. Plus un prélèvement congelé est stocké longtemps, plus sa morphologie se dégrade. Et ceci d'autant plus qu'il est stocké à une température supérieure à  $-100^\circ\text{C}$ . Ce phénomène est caractéristique de la glace amorphe où les cristaux peuvent apparaître sous le faisceau du microscope.

La théorie de l'eau pure est une chose, les cellules et les tissus en sont d'autres. Les structures animales ou végétales ne sont pas constituées que par de l'eau, ni des solides flottant dans de l'eau. Il est possible de congeler des cellules, des tissus, même des organismes vivants et de les décongeler avec un taux de survie important. Mais là n'est pas la question, puisque nous congelons des « structures » pour les observer. Une cellule par exemple est une individualité caractérisée par son enveloppe, son noyau, ses organites d'une part et, sa position dans le tissu, l'organisme d'autre part. La finalité de l'étude peut être primordiale. La morphologie dans son état le plus proche possible de la réalité est essentiellement le but de la congélation en microscopie électronique. Pour plus de détails consultez l'ouvrage [2]. En microscopie photonique cela n'a qu'un intérêt restreint.

Ceci est la théorie, des expériences personnelles peuvent être présentées pour tous les cas particuliers avec succès. La congélation est une méthode avec ses avantages, ses inconvénients et ses applications. Des bases physiques existent, des expériences et des réalisations pour des cas particuliers.

## **LES CONDITIONS RÉDHIBITOIRES OÙ IL FAUT ABANDONNER TOUTE TENTATIVE...**

### ***Décongélation et/ou re-congélation***

Quelle que soit la raison ayant entraînée une décongélation du prélèvement, même suivi d'une recongélation, ce prélèvement est perdu pour une étude «raisonnable». La congélation conduit à une modification du tissu qui est irréversible. Même avec cryoprotecteur, ou même à cause de celui-ci, les cellules sont perméabilisées mécaniquement par l'augmentation de volume de l'eau au cours de la congélation ou, par diffusion d'une solution souvent hyperosmolaire, ces deux cas vont entraîner des artefacts. Sur une coupe fine de tissu, les cellules ne sont plus entières et les contraintes mécaniques de la décongélation sont beaucoup moins évidentes.

### ***Séchage du prélèvement***

Une coupe de tissu congelé est fine pour être observée facilement au microscope. Sa masse est faible et son séchage rapide dans de bonnes conditions. Une durée de 10 à 30 mn, la température ambiante, une atmosphère sèche, une ventilation sont de bonnes conditions, comme le rebord d'une hotte ventilée par exemple. A l'inverse, de mauvaises conditions (chambre du cryostat froid, rebord d'une fenêtre un jour de pluie, un rangement immédiat) vont laisser des traces d'humidité et permettre à des enzymes lytiques de faire leur œuvre et de détruire les composants du tissu. Un stockage au froid, lors de l'ouverture de la boîte, entraîne une condensation sur les autres lames qui resteront stockées.

### ***Mauvaise cryoprotection***

Le but de la cryoprotection étant la préservation des structures après congélation, une mauvaise cryoprotection se caractérise par une mauvaise congélation (e.g. présence de cristaux de glace, cassure...).

Mais hélas elle ne s'arrête pas là. Comme cela a été montré précédemment deux facteurs sont capitaux pour un effet optimum : la durée d'incubation et la concentration de l'agent cryoprotecteur.

- Comme l'a montré la figure 1, tant que le prélèvement n'est pas imprégné totalement, il ne tombe pas au fond du récipient. Seule cette chute garantit l'imprégnation.

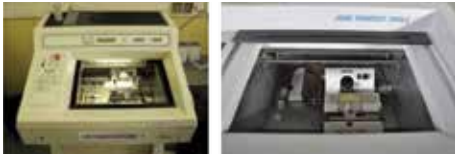
- La concentration de l'agent cryoprotecteur dans le tampon est beaucoup plus complexe. En microscopie électronique, l'osmolarité est capitale [2]. En microscopie photonique l'œil s'accommode de la présence d'artéfact compris dans l'épaisseur de la coupe. Mais des dilata-tions des espaces intercellulaires ou de l'espace nucléaire sont parfois visibles et entraînent des problèmes au niveau de la coupe. Les cellules et/ou les noyaux sont moins jointifs et montrent des cassures ou même la disparition de certains noyaux.

Certains agents cryoprotecteurs peuvent aussi interférer avec les étapes suivantes (immunohistochimie, hybridation *in situ*, analyse...) et la nature de cet agent cryoprotecteur doit être neutre avec la finalité de ces coupes. Le saccharose est le plus utilisé en routine mais il en existe de nombreux autres : DMSO (propriété d'extraction), glycérol (tissu mou, nécessité de

couper à des températures plus basses), tréhalose (non réducteur à l'inverse du saccharose)...

## LA CRYOCOUCPE

Les échantillons congelés vont pouvoir être coupés à l'aide d'un cryostat (Figure 4). Le cryostat est constitué d'une en-



**Figure 4 :** Exemples de cryostat actuellement commercialisés.

ceinte réfrigérée équipée d'un microtome à moteur pas à pas permettant de garantir la précision de l'épaisseur des coupes. Différents modèles d'appareils existent dont certaines caractéristiques techniques peuvent varier. Le choix se fera alors en fonction de la nature des échantillons, du débit d'analyses.... Différents paramètres pourront être réglés tels que la température du porte-objet, la température de l'enceinte, l'épaisseur de coupe depuis le pupitre de contrôle.

En fonction des modèles utilisés, la température du porte objet n'est pas forcément indépendante de celle de l'objet mais attention à l'inertie de réponse dans ce cas. Il sera important de faire varier la température de l'enceinte et/ou du porte objet en fonction de la dureté de l'échantillon.

Quelques exemples :

- cerveau : de  $-15^{\circ}\text{C}$  à  $-25^{\circ}\text{C}$
- foie : de  $-15^{\circ}\text{C}$  à  $-25^{\circ}\text{C}$
- poumon : de  $-25^{\circ}\text{C}$  à  $-35^{\circ}\text{C}$
- testicule : de  $-10^{\circ}\text{C}$  à  $-15^{\circ}\text{C}$

En fonction du fabricant, ces températures pourront être modulées et de façon courante, le réglage se fera à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour un 1<sup>er</sup> essai et, selon les résultats obtenus, la température sera modifiée si besoin.

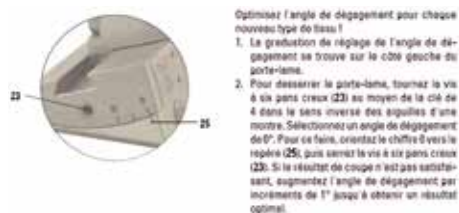
Les coupes fines obtenues avec le cryostat (généralement entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ ) peuvent être utilisées pour :

- des études de morphologie (mais le système paraffine/microtome est préférable)
- des immunomarquages et les immunofluorescences, car les coupes congelées permettent une très bonne préservation des antigènes cytoplasmiques et membranaires
- la mise en évidence des lipides
- les études d'histoenzymologie
- l'hybridation *in situ*.

Pour réaliser ces coupes, on pourra utiliser des lames jetables ou bien des couteaux (dans le cas des couteaux, il faudra alors les affûter régulièrement). L'un des paramètres également important à régler sur le cryostat est l'angle de dégagement qu'il faut adapter en fonction de la dureté du prélèvement. Plus l'objet est dur, plus l'angle de dégagement est grand ; par contre plus l'angle de dégagement est grand, plus la compression de coupe est importante. Un angle de dégagement trop petit peut entraîner des coupes d'épaisseur irrégulière. Un angle de dégagement trop plat ou trop raide ne permet pas d'obtenir des résultats de coupes optimaux et détériore les échantillons.

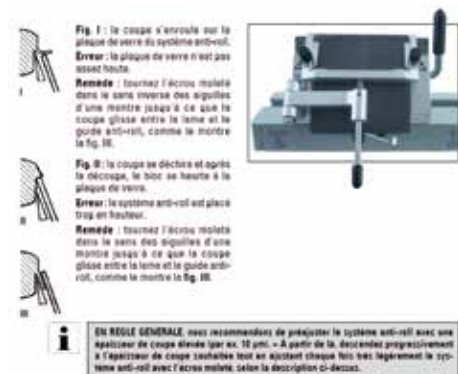
Après le réglage de l'angle de dégage-

ment, la position du tranchant par rapport à l'objet peut être modifiée. C'est pourquoi, il faut toujours positionner l'objet au-dessus du couteau lors du réglage de l'angle de dégagement. Dans le cas contraire, l'objet risque de heurter le couteau lors de la montée (Figure 5).



**Figure 5 :** Schéma des réglages possibles sur un cryostat.

Enfin, pour avoir des coupes de bonne qualité, il faudra être attentif au réglage de la lame anti-roll (Figure 6). Cette lame de verre permet aux coupes de s'étaler bien à plat dès leur formation. Si le système anti-roll est mal positionné par rapport au tranchant, les problèmes suivants peuvent se produire.



**Figure 6 :** Principe de réglage de la lame anti-roll.

## LA CONSERVATION DES COUPES

### Les tissus restants

Les tissus restants doivent être conservés à -80 °C ou dans l'azote liquide (durée indéterminée).

### Les coupes flottantes

Un « certain » temps, quelques heures, quelques jours au réfrigérateur si le tampon contient de l'azide de sodium. La durée d'attente est inverse à la qualité des résultats obtenus.

### Les lames

Après un séchage à température ambiante d'une heure au minimum, les lames doivent être conservées au sec dans un emballage étanche et peuvent être conservées à -20° C pour un usage à court terme, sinon il faut les conserver à -80°C. Avant utilisation on laisse les lames revenir à température ambiante. Il faut se souvenir que seule l'eau est « congelable » dans une coupe de tissu. Si la lame est sèche, son stockage à température ambiante est possible dans un emballage étanche.

## QUELQUES CAS PARTICULIERS

### Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est majoritairement composé de lipides qui figent à basse température. Ce qui les rend difficile à couper. La température de coupe doit être très basse et l'épaisseur doit alors être réduite. Plus la température de coupe est basse, plus il faut couper fin pour obtenir des coupes qui ne se « hâchent » pas. Le tissu adipeux est aussi plus facile à couper s'il est préparé avec un autre organe.

### ***Les tissus embryonnaires***

Les tissus embryonnaires sont très riches en eau. Ce qui rend la congélation délicate. Il faut donc les cryoprotéger au maximum et bien les laisser couler dans le sucrose 30 % voire 40 %. La congélation doit par ailleurs être très rapide pour empêcher les gros cristaux de se former.

### ***Les poumons***

Le poumon est un organe qui est souvent rempli d'air à l'autopsie. Les bronches et bronchioles qui le composent sont aussi « vides » et peuvent donc être collapsées, ce qui rend l'observation difficile. Pour bien observer les structures du poumon il faut donc « remplir » le poumon afin de dilater les bronches et alvéoles. Pour cela on peut soit insuffler dans le poumon frais du formol afin de le fixer en position gonflée puis de le cryoprotéger dans du sucrose. Il est aussi possible de garder les poumons frais avant de les congeler et dans ce cas de tenter d'insuffler de l'OCT dans l'organe. L'OCT étant un liquide visqueux cela peut être difficile et endommager le tissu. Il faut savoir que plus l'OCT est chaud moins il est visqueux, il est donc possible de chauffer un peu l'OCT avant de l'insuffler. L'organe est ensuite enrobé puis congelé.

### ***L'os***

L'os étant un tissu calcifié il nécessite une décalcification avant de pouvoir être coupé au cryostat. La décalcification implique que le tissu doit être fixé. La méthode de décalcification est au choix : EDTA, acide, micro-ondes. Comme tout tissu fixé l'os doit alors être cryoprotégé avant d'être congelé. La cryoprotection se

fait dans des bains successifs de sucrose 20 % puis 30 %.

### ***L'œil***

L'œil contient l'humeur vitrée qui est composée à 98-99 % d'eau. Cette substance est contenue dans l'œil ce qui fait que lors de la congélation l'humeur vitrée formera un glaçon à l'intérieur de l'œil. Cela rendra le prélèvement difficile à couper par la suite et pourrait aussi endommager les structures. Lors de la cryoconservation de l'œil il est alors indispensable de percer la cornée avec une aiguille pour laisser l'humeur vitrée s'en échapper. L'œil ainsi percé pourra alors être immergé dans le fixateur, le trou permettra alors aussi au fixateur de pénétrer dans l'organe. Ensuite l'œil devra être cryoprotégé avant d'être congelé.

## **LES ARTÉFACTS**

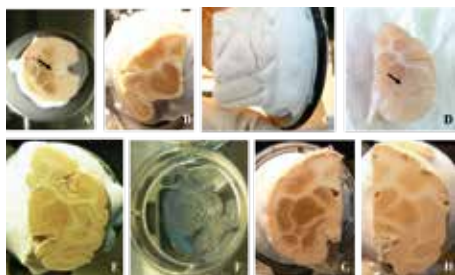
Les artéfacts observés sur les coupes de matériel congelé se manifestent de différentes manières mais sont dus essentiellement à deux étapes : la congélation et la coupe. Les artéfacts dus au prélèvement, à la fixation et aux autres étapes précédant l'observation ne sont pas abordés ici.

### ***De congélation (macroscopiques et microscopiques, Figure 7)***

Les fissures sont essentiellement dues à une congélation dont la vitesse est inadéquate ou à une coupe à trop basse température. Les fissures telles qu'elles sont observables macroscopiquement, sont souvent présentes dans le prélèvement et sont accentuées par la coupe.

Les trous sont principalement le résultat d'une mauvaise congélation, ce qui veut dire congélation inadéquate au tissu étudié. Le cerveau est un exemple typique. Il en existe de nombreux autres, en général des tissus hétérogènes. Le cerveau à l'échelle macroscopique est constitué de substance blanche, essentiellement constitué de lipides et de substance grise constituée de matériel cellulaire. Les tissus riches en lipides ne se congèlent pas de la même façon que les autres organes car les lipides nécessitent une température de congélation plus basse.

Le front de congélation caractérise une



**Figure 7** : Artéfacts observables sur le bloc de tissu congelé, ici le cerveau. Problèmes de congélation pour un tissu hétérogène :

- A : La flèche indique un front de congélation, limite du tissu correctement congelé ;
- B : Problème de vitesse de congélation, des trous sont visibles dans la substance blanche et grise ;
- C : Fissure, le cerveau risque de se casser pendant la coupe ;
- D : Front de congélation apparent (flèche), trous liés à des cristaux de glace dus à une congélation trop lente ;
- E : Trous liés aux cristaux dans la substance blanche et grise ;
- F : Coupe flottante de tissu congelé (bloc E), les artéfacts de congélation sont manifestes ;
- G : Hétérogénéité de congélation tissulaire et présence de fissures ;
- H : Artéfacts dus à la coupe sur une congélation convenable.

congélation hétérogène ou une décongélation partielle (Figures 7A et 7D). Le prélèvement n'était pas correctement immergé dans l'agent cryogénique (en particulier lors de l'usage de l'isopentane). Ou il a subi une décongélation partielle au cours du stockage, du montage sur le support ou dans le cryostat. Les causes sont variables et nombreuses. Le résultat est similaire : la coupe est difficile et souvent inexploitable.

### ***De découpe (Figure 8)***

Les bulles peuvent être générées lors du montage des coupes sur les lames. Que ce soit sur coupe en paraffine ou à congélation, ce problème de montage reste identique. La coupe n'a pas été collée à un support généralement une lame de verre et une bulle d'air est emprisonnée (Figure 8B). Un trou avec une pointe lancéolée peut réduire cet artéfact de montage à un trou. Laisser cette bulle conduira au décollement de la coupe au cours des manipulations ultérieures.

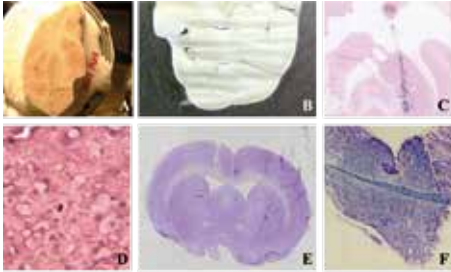
Les plis sont des artéfacts de coupe plus courants qu'en paraffine et les coupes à congélation sont alors friables, cassantes... Le coup de main du manipulateur est capital.

Les stries sont au départ dues au couteau qui serait lui-même strié par des impacts sur le fil. En congélation d'autres causes sont aussi à prendre en compte :

- Une congélation hétérogène,
- Un problème d'hétérogénéité du tissu après congélation,
- Des cristaux de glace présents dans certaines zones du tissu.

Le plus souvent ce sont des débris de coupe qui restent accrochés au couteau qui peuvent entraîner ces stries (Figure 8B).

Les vibrations sont fréquentes lors de la coupe de tissu congelé (Figure 8C).



**Figure 8** : Artéfacts obtenus sur des coupes de tissus congelés :

- A : Bloc de cerveau sur lequel une strie est apparente;
- B : Coupe congelée sur le couteau, montrant des vibrations, des trous, des cassures et des stries ;
- C : Coupe de cerveau congelé sur laquelle des vibrations, des bulles et des plis sont visibles ;
- D : Coupe colorée qui révèle de nombreux espaces lacunaires ;
- E : Coupe de cerveau colorée qui présente des bulles, des plis et des trous ;
- F : Coupe de muscle révélant les ATPases montrant des plis et des bulles.

Les principales causes sont la vitesse de coupe irrégulière et la fixation du couteau ou de l'échantillon. Le passage du bloc de tissu congelé contre le couteau entraîne un réchauffement de celui-ci. La coupe très fine absorbe cette chaleur et se réchauffe.

Certaines zones plus que d'autres d'où les modifications de tension et les artéfacts mécaniques. Ils seront additionnels à ceux du réchauffement final lors de l'application de la coupe froide sur la lame de verre chaude.

## CONCLUSION

La coupe à congélation a une longue histoire tant en anatomie pathologique qu'en recherche. Tout d'abord utilisée en microscopie photonique pour sa rapidité d'obtention, elle l'est maintenant pour sa sensibilité pour de nombreuses techniques de détection moléculaire. Nous sommes loin des années où le microtome était placé dans un congélateur. L'appareillage s'est développé ainsi que les systèmes connexes qui ont simplifié la réalisation des coupes de tissu congelé. Persiste la difficulté de la congélation qui reste encore empirique. Ses inconvénients majeurs sont la pauvreté morphologique, le matériel spécifique nécessaire à cette méthode et la dextérité du manipulateur pour les réaliser.

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements à Sophie Luccantoni et à Sandra Dovéro pour l'organisation de cette journée de thème, ainsi que pour avoir fourni les images qui illustrent certains points de cet article.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Gulik Thaddée Congélation des échantillons biologiques. In : Microscopie électronique : cryométhode, immunocytologie, autoradiographie, hybridation *in situ*. G. Morel ed., Editions INSERM, 1991, pp 5-30.
2. Handbook of Cryo-Preparation, Methods for electron microscopy. A. Cavalier, D. Spohner, B. M. Humbel eds. CRC Press, Boca Raton, 2009, 682 p.

# PRE-ORIENTATION CHONDROGENIQUE DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES : VALIDATION PAR ANALYSE QUANTITATIVE ET TRAITEMENTS D'IMAGERIE DE PHASE EN LUMIERE TRANSMISE

\*Hupont S.<sup>1,2</sup>, \*Henrionnet C.<sup>3</sup>, Dumas D.<sup>2,3</sup>, Mainard D.<sup>1,3</sup>, Gillet P.<sup>3</sup>, Pinzano A.<sup>3</sup>

\*Contribution égale en tant que premier auteur

<sup>1</sup> *Bio-ingénierie Moléculaire Cellulaire et Thérapeutique FR3209 CNRS, Biopôle, Campus Biologie Santé, 9 av. de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy.*

<sup>2</sup> *PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire PTIBC-IBISA, Campus Biologie-Santé, Biopôle 9 av. de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy.*

<sup>3</sup> *Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaires, IMoPA UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, 9 av. de la Forêt de Haye, CS 50184, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy France.*

Adresse pour la correspondance : [sebastien.hupont@univ-lorraine.fr](mailto:sebastien.hupont@univ-lorraine.fr)  
[christel.henrionnet@univ-lorraine.fr](mailto:christel.henrionnet@univ-lorraine.fr)

## RÉSUMÉ

Le cartilage articulaire est un tissu très spécialisé et différencié. De ce fait, ses capacités de réparation sont limitées. L'ingénierie tissulaire du cartilage est un domaine en plein développement dont le

but est de réparer ou de remplacer le cartilage lésé en associant des cellules à des biomatériaux.

Cela suppose notamment de choisir le biomatériau idéal, de maîtriser le cycle de

vie des cellules choisies (prolifération et différenciation chondrogénique), d'y adjoindre les molécules capables de favoriser leur croissance et d'intégrer les contraintes mécaniques auxquelles doit se plier le nouveau tissu, de façon à obtenir des biomatériaux fonctionnalisés qui vont posséder des propriétés similaires au tissu natif et donc qui pourront être réimplantés en site lésionnel.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) se sont révélées être d'excellents candidates pour l'ingénierie articulaire. Comme toutes les cellules souches, les CSMs ont des propriétés d'auto-renouvellement, et de différenciation en plusieurs types cellulaires, notamment en chondrocytes.

Ce travail est le fruit d'une étude de faisabilité dans le cadre d'un prêt de matériel et repose sur une étude morphométrique de différenciation cellulaire par analyse quantitative et traitements d'images à contraste de phase. Cette technologie innovante et non-invasive permet d'observer des échantillons biologiques en conditions stériles, rapides et sans agent de contraste. Elle fournit des informations quantitatives sur le changement de phase de la lumière transmise selon la différence des trajets optiques induits par les constituants de la cellule et de la matrice extracellulaire (MEC).

L'analyse finale est basée sur l'étude morphologique des CSMs en monocouche sur plusieurs passages successifs et plusieurs jours en fonction du milieu de culture (additif proline acide ascorbique

dexaméthasone) en imagerie de phase de façon à établir une similarité entre les aspects morphologiques des cellules et leur potentiel de différenciation en système 3D.

**Mots clés :** Cellules souches mésenchymateuses (CSMs), différenciation, chondrocyte, imagerie de phase quantitative, microscopie, analyse d'images, morphologie

## **ABSTRACT**

Articular cartilage is a highly specialized and differentiated tissue. Therefore, its capacities of repair are limited. The tissue engineering of the cartilage is an approach in full development, the purpose of which is to repair or to replace the damaged cartilage by associating cells with biomaterials. It requires in particular to choose the ideal biomaterial, to master the life cycle of chosen cells (proliferation and chondrogenic differentiation), to add growth factors and to integrate the mechanical constraints with which the new tissue has to comply, so as to obtain functionalized biomaterials which will exert similar properties in the native tissue and thus which can be re-implanted in the lesional site. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) seem to be promising. As with all stem cells, bone MSC have properties of auto-renewal and differentiation into several different cellular types, in particular chondrocytes.

This work is the result of a feasibility study as a part of an equipment loan. It is based on a morphological study of cellular differentiation by analysis and treatment of a series of images acquired by interfero-

metry in a multilateral gap. This innovative and non-invasive technology allows the observation of biological samples in sterile, fast conditions and without contrast agents. It integrates the transmitted light passing through the cellular matrix and measures the difference of the refractive index of the various constituents of the cell and the extracellular matrix (ECM). This index is represented as a gap of phase with regard to the transmitted light.

The final analysis is based on the morphological observation of MSCs in a monolayer in imaging of phase due to medium (added dexamethasone, proline and ascorbic acid) so as to establish a direct correlation between the morphological aspects of cells and their differentiation potentialities in 3D systems.

**Key Words** : Mesenchymal Stem Cell, differentiation, chondrocyte, quantitative phase imaging, image processing, morphometry, phase imaging microscopy

## INTRODUCTION

Le cartilage articulaire est un tissu très spécialisé et différencié. De ce fait, ses capacités de réparation sont limitées. L'ingénierie tissulaire du cartilage est un domaine en plein développement dont le but est de réparer ou de remplacer le cartilage lésé en associant des cellules, choisies en fonction de leurs capacités de différenciation, à des biomatériaux.

Cela suppose notamment de choisir le biomatériau idéal, de maîtriser le cycle de vie des cellules (prolifération, différen-

ciation et fonctionnalisation de chondrocytes), d'y adjoindre les molécules et les conditions capables de favoriser leur croissance et leur différenciation. Il est également important d'intégrer les contraintes mécaniques auxquelles doit se plier le nouveau tissu, de façon à obtenir des biomatériaux fonctionnalisés qui vont posséder des propriétés similaires au tissu natif et donc qui pourront être réimplantés en site lésionnel.

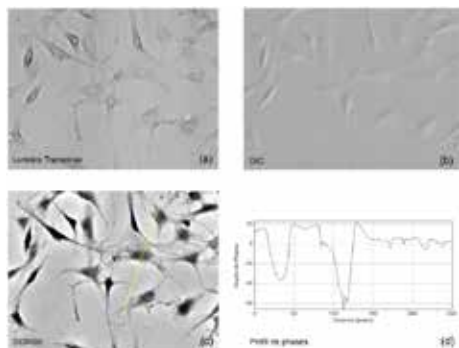
Les chondrocytes, cellules du cartilage, peuvent sembler *a priori* les plus adaptés pour coloniser le biomatériau utilisé. Mais ces cellules présentent plusieurs inconvénients. D'une part, leur obtention par prélèvement dans le cartilage nasal, auriculaire ou articulaire est un acte invasif, ne produisant qu'une quantité réduite de chondrocytes. D'autre part, la culture des chondrocytes *in vitro* induit une perte de leur spécificité cellulaire et tend à produire un fibroblaste peu différencié.

Aussi de nouvelles sources de cellules se sont révélées être d'excellents candidates : les cellules souches mésenchymateuses (CSMs). Comme toutes les cellules souches, les CSMs ont des propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation et la capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires différents, et notamment en chondrocytes.

Les conditions de cultures en monocouche restent une étape primordiale pour favoriser une différenciation de bonne qualité. En effet, un milieu de base (DMEM), Sérum de veau Fœtal ± Facteurs de crois-

sance (FGF-1 ou 2), augmente la prolifération et le potentiel de différenciation ostéogénique et chondrogénique. De même, la densité d'ensemencement, le nombre de passage ainsi que le temps de doublement de la population sont des limites de la culture cellulaire dans le temps et sont donc responsables de la variabilité du potentiel de différenciation des cellules (1).

Nous proposons dans ce travail d'étudier la différenciation cellulaire par analyse de séries d'images acquises par interférométrie à décalage multilatéral (2). Cette technologie, que l'on peut également appeler « imagerie à contraste de phase » offre la possibilité d'obtenir une information quantitative (cf figure 1) à l'instar de



**Figure 1 :** Comparatifs d'observation de CSM en Lumière Transmise (a) simple, DIC (b), imagerie de phase quantitative (c) et profil d'épaisseurs optiques lié aux angles de déphasage mesuré (d).

la microscopie Nomarski/contraste de différentes interférences (DIC). Elle fournit des informations liées aux changements de phase de la lumière transmise selon la différence des trajets optiques induits par les constituants de la cellule et de la matrice

extracellulaire (MEC). En conséquence, elle révèle les caractéristiques morphométriques de l'échantillon biologique concerné, et permet d'extraire d'importants paramètres biophysiques tels que la masse sèche (3), le volume optique, l'indice de réfraction moyen intracellulaire...

Dans notre étude, les critères morphométrique (élongation, circularité, opacité...) seront utilisés comme facteurs discriminants. En effet, cette technologie non-invasive permet d'observer des échantillons biologiques en condition stérile, rapide et sans agent de contraste exogène, en mesurant la différence de l'indice de réfraction des différents constituants et ainsi les représenter en nuances de gris. Nous pouvons ainsi mesurer l'épaisseur optique réelle de chaque constituant. L'unité de mesure s'exprime en degré, qui correspond à l'écart de phase induit entre la MEC et un fond référant. L'analyse finale est basée sur l'observation morphologique des cellules en monocouche en imagerie à contraste de phase de façon à établir une similarité entre les aspects morphologiques des cellules et leur potentiel de différenciation en système 3D. Cette approche nous a ainsi permis de comparer l'effet de différents additifs dans le milieu de culture de façon à pré-orienter les CSMs vers une différenciation chondrocytaire avant l'ensemencement en biomatériaux, en sachant que les cellules mésenchymateuses non différenciées sont de petite taille et allongées. Leur noyau ovoïde est central et leur cytoplasme peu abondant (4).

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### ***Isolation et expansion des cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine***

Les CSMs sont obtenues à partir de moelle osseuse prélevée lors de remplacement total de hanche en collaboration avec le Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (Pr D. Mainard et Pr. L. Galois) et l'Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus de Centre Hospitalo-Universitaire de Nancy (UTCT, CHU Nancy). Les échantillons sont placés dans des tubes de 50 mL contenant 1 mL de tampon phosphate salin (PBS) supplémenté avec 625 UI/mL d'héparine. Les cellules nucléées sont comptées etensemencées à une densité de 50000 cellules/cm<sup>2</sup> dans une flasque de culture T75 à 37 °C en atmosphère humidifiée contenant 5% (v/v) de dioxyde de carbone. Le milieu est changé deux fois par semaine jusqu'à ce que les cellules arrivent à confluence. Le milieu utilisé pour le passage 0 au passage 2 est une base de milieu Dulbecco Eagle modifié avec un faible taux de glucose (DMEM-LG 1g/mL, 31885, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Sigma), 1 ng/mL de bFGF/(RD), de la glutamine et de la pénicilline-streptomycine (Gibco). Lorsque les cellules adhérentes ont atteint environ 80% de confluence, les cellules souches mésenchymateuses sont trypsinisées et réensemencées à une densité de 0,5 x 10<sup>7</sup> cellules/flasque. Au cours du dernier passage, avant l'ensemencement dans des biomatériaux (passage 3), les cellules sont cultivées avec du milieu de différenciation composé de DMEM 4,5 g/mL de glucose, additionné de pyruvate de

sodium (110 µg/mL), de bFGF (1 ng/mL), de pénicilline-streptomycine, de proline (P), d'acide L-ascorbique-2-phosphate (A) et de dexaméthasone (D).

### ***Imagerie à Contraste de Phase***

Pour ces travaux nous avons utilisé un système d'acquisition composé d'un microscope optique inversé Olympus IX70 muni d'un objectif 20x (0.4 NA) autorisant une imagerie en lumière transmise et muni d'un port caméra de type montage C sur lequel nous avons installé une caméra SID4bio de la société Phasics S.A. Cette caméra dispose d'une matrice de 1600 x 1200 pixels de 7,4 mm<sup>2</sup>. Elle couvre une gamme de longueur d'onde du proche UV à l'infrarouge (350 à 1100 nm) et est utilisée comme un capteur de front d'onde basé sur l'interférométrie à décalage multilatéral (5) dont l'image résultante sera de 396 x 296 pixels. Cette technique mesure la différence de chemin optique introduite par le matériel biologique en référence à une image acquise au préalable, appelée interférogramme de référence. Cette référence est en quelques sortes la fonction de transfert optique du système. Par déconvolution de l'image de l'objet avec cette référence, le logiciel d'acquisition SID4 recalcule une image d'intensité en lumière transmise, une imagerie DIC dont on peut faire varier l'angle d'interférence, et une image à contraste de phase qui est en quelques sortes un projeté de tous les angles d'interférence/déphasage mesurés en fonction de l'indice réfraction (ou épaisseur optique) des matériels biologiques traversés. La dynamique de l'image est de 32 bits en raison des valeurs décimales positives, négatives

tives ou nulles des déphasages mesurés (cf figure 1c et 1d représentant en nuances de gris le profil de déphasages successifs induits par une cellule en lumière transmise).

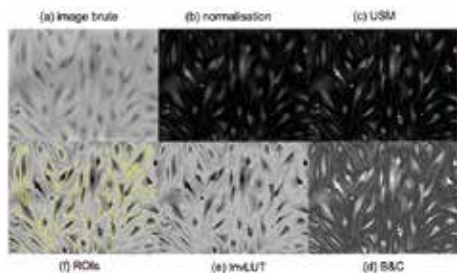
## ANALYSE D'IMAGE QUANTITATIVE

Nous avons fait le choix de ne pas utiliser les informations d'épaisseur optique ou de calcul de matière sèche, les indices de réfraction de chacun des constituants de la cellule et de la matrice extracellulaire n'étant à ce jour pas connus. Nous avons utilisé les informations quantitatives des nuances de gris ainsi que les paramètres morphométriques pour montrer l'orientation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes.

Nous avons choisi Image J (6), un logiciel libre de droits, comme outil pour l'analyse et le traitement des images. Cependant, tous les logiciels permettant un travail sur l'image possèdent les algorithmes utilisés et décrits dans ce travail.

Dans un premier temps, nous avons appliqué à chaque image une série d'algorithmes qui ont eu pour effet d'améliorer le contraste, la netteté et d'optimiser la répartition des niveaux de gris pour que chaque image puisse être comparée l'une à l'autre (cf figure 2).

Une valeur de déphasage (cf figure 1d) nulle indique que le fond de l'image est similaire à l'interférogramme de référence. Une pente de déphasage négatif est liée à la présence d'un indice de réfraction supplémentaire donc que l'épaisseur optique augmente tandis qu'une pente positive indique une diminution de cet indice. A l'interface,



**Figure 2 :** Clichés représentant les différentes étapes de traitement de l'image pour rehausser le contraste et améliorer la détection de contour en vue d'obtenir une région d'intérêt la plus fidèle possible à l'occupation de la cellule et de sa matrice extracellulaire. (a) image brute ; (b) après normalisation des valeurs quantitatives de déphasage ; (c) déflouage de l'image ; (d) rehausse de contraste ; (e) inversion de lut pour une meilleure appréciation de la dynamique ; (f) régions d'intérêts avec un rendu plus fidèle aux contours des cellules

on peut observer un artéfact (changement de pente) directement lié à la diffusion de la lumière non cohérente en transmission et qui crée un halo. Cela a pour incidence de fausser la délimitation de la cellule et donc de sa taille. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 2, différentes étapes successives ont été nécessaires pour discriminer le contour des cellules de façon exhaustive. Nous avons appliqué un changement d'origine de l'amplitude de ces niveaux de gris (figure 2b) pour s'affranchir de ce phénomène de diffusion pour chaque pixel de l'image selon la formule suivante :

$$V_{\text{final},x,y} = \text{Abs}(V_{\text{initial},x,y} - V_{\text{max}})$$

Avec  $V_{x,y}$  la valeur d'un pixel,  $\text{Abs}()$  le calcul de la valeur absolue et  $V_{\text{max}}$  la valeur maximum atteinte pour un pixel sur l'image et correspondant à cette brillance artéfactuelle.

Une seconde étape a consisté à appliquer un filtre de type passe-haut qui a pour conséquence d'accentuer le contraste et améliorer les bords en soustrayant une version floue de l'image à son originale. Il s'agit d'un algorithme mathématique appelé « Unsharp Mask ou USM » qui s'utilise en calcul matriciel en définissant le rayon de flou gaussien (augmente le contraste de façon proportionnel) et le poids du masque ou force du filtrage dont l'augmentation rehausse les bords. Nous avons utilisé les paramètres (figure 2c) : Radius 2.0 Mask Weight 0.70.

Grâce à ce traitement de l'image, le détournage cellulaire est rendu aussi plus simple tandis que les zones semi-transparentes contenues dans la matrice extracellulaire rendent le seuillage impossible. Les contours exacts des cellules (figure 2f) définissent des régions d'intérêt dont nous pouvons extraire des critères morpho-géométriques comme l'aire, la circularité (*rondeur de la cellule*), la mesure de l'élongation cellulaire (*aussi appelé A.R. pour aspect ratio qui est le rapport entre l'axe majeur elliptique et l'axe mineur elliptique*). Pour une région d'intérêt (ROI) donnée, nous calculons la somme de tous les niveaux de gris de la façon suivante :

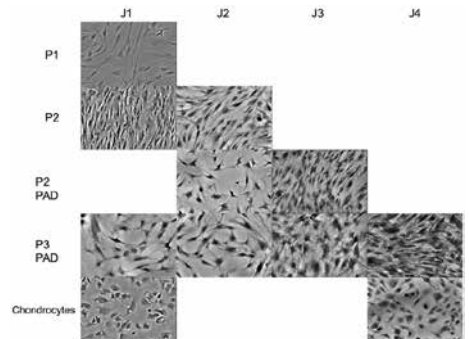
$$\int V_{ROI} = \int \text{Abs}(V_{\text{initial}_{x,y}} - V_{\text{max}}) - (V_{\text{min}} * \text{Aire}_{ROI})$$

Avec  $V_{x,y}$  la valeur d'un pixel, Abs() le calcul de la valeur absolue,  $V_{\text{max}}$  la valeur maximum atteinte pour un pixel sur l'image et correspondant à cette brillance artificielle,  $V_{\text{min}}$  la valeur seuil rehaussée due à la normalisation et Aire<sub>ROI</sub> l'aire de

la région d'intérêt (ROI) donnée (une cellule détournée). Cette valeur vraie obtenue, nous utilisons d'autres critères morphométriques basés sur l'analyse des niveaux de gris vrais tels que le niveau de gris moyen, l'écart-type des niveaux de gris, la variance.

## RÉSULTATS

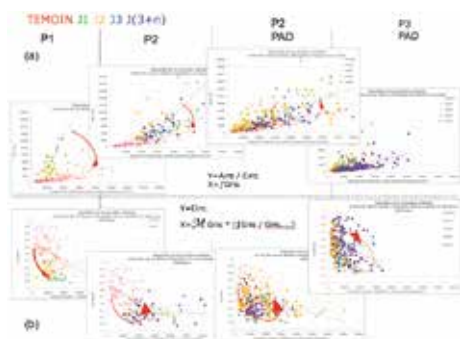
Après avoir appliqué différents filtres successifs pour améliorer le contraste puis la netteté de l'image, l'analyse s'est déroulée selon plusieurs méthodes en vue d'automatiser le résultat du traitement. La figure 3 est une illustration des étapes successives



**Figure 3 :** Images représentatives des différents passages successifs (P1, P2, P3), et de l'influence du PAD (proline, acide ascorbique et dexaméthasone) en « imagerie de phase quantitative » en comparaison avec des chondrocytes en passage 0, pour montrer un changement morphologique des CSMs (pré-différenciation chondrocytaire) en fonction du temps de culture (J1, J2, J3, J4)

de culture cellulaire nécessaires selon les jours (J1 ; J2 ; J3 ; J4 en abscisses) et selon les passages (P1 ; P2 ; P3PAD en ordonnées) pour orienter les CSMs vers la différenciation chondrogénique. Près de 24 paramètres résultants de combinai-

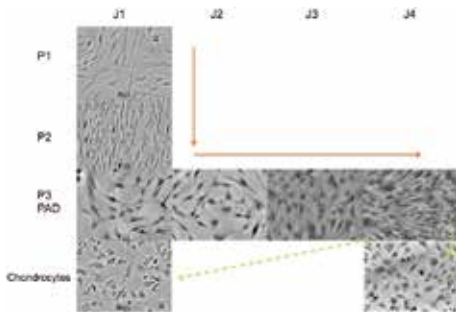
sons de critères morphométriques ont été évalués sur plus de 100 images représentatives de cellules souches mésenchymateuses issues de quatre patients différents. Quatre de ces paramètres se sont révélés discriminants dans l'analyse de ces images pour chaque étape correspondant à chaque image de la figure 3. La synthèse graphique de ces résultats sont reproduits sur la figure 4 en deux parties : (4a) les critères



**Figure 4 :** Orientation des cellules souches mésenchymateuses (1point = 1 cellule) selon les jours successifs de cultures cellulaires (gradient de couleur vert J1 ; jaune J2 ; Bleu J3 et violet J4 et plus) et selon les passages successifs (P1 ; P2 ; P2PAD ; P3PAD) vers la différenciation chondrocytaire (référence en rouge) – (a) critères morphométriques mettant en relation des variables caractérisant la forme, le rapport aire-circularité de chaque cellule, en fonction de variables représentant l'intensité globale (b) critères morphométriques mettant en relation des variables caractérisant la forme, la circularité, en fonction de variables représentant la variance relative de l'intensité de chaque cellule.

morphométriques mettant en relation des variables caractérisant la forme, le rapport aire-circularité de chaque cellule, en fonction de variables représentant leur intensité globale ; (4b) les critères morphométriques mettant en relation des variables caractérisant

la forme, la circularité, en fonction de variables représentant la variance relative de l'intensité de chaque cellule. Chaque point représente une cellule ; chaque couleur représente un jour de culture cellulaire (vert J1 ; jaune J2 ; Bleu J3 et violet J4 et plus). Les points rouges sont identiques quelque soit le graphique respectivement pour les figures 4a et 4b, puisqu'ils représentent les chondrocytes comme cellules "de référence". Pour chaque nuage de points, nous avons calculé une courbe de tendance linéaire pour mieux apprécier la répartition de population selon les critères retenus. Chaque graphique correspond aux passages successifs (P1 ; P2 ; P2PAD ; P3PAD) de la gauche vers la droite pour montrer la progression du processus. Ainsi on peut constater que chaque population tend un peu plus chaque jour et selon les passages successifs vers une morphologie chondrocytaire (flèches rouges). Ce phénomène est accentué par l'adjonction de PAD après quoi on ne peut pratiquement plus distinguer les populations selon ces mêmes critères morphométriques. Nous avons donc réussi à montrer quantitativement et qualitativement une orientation cellulaire des CSMs vers la différenciation chondrocytaire corroborée par deux méthodes de discrimination utilisant des combinaisons de paramètres différents. La figure 5 est un montage d'images illustrant ces résultats, selon les jours successifs de culture cellulaire (en abscisse : J1 ; J2 ; J3 ; J4 et plus) et selon les passages successifs (en ordonnées : P1 ; P2 ; P3PAD).



**Figure 5** : Effet du PAD lors du passage P3 en fonction du nombre de jours de culture des CSMs (J1, J2, J3 et J4), en comparaison avec des chondrocytes en passage 0 : Images représentatives des différents passages successifs (P1, P2 et P3), et de l'influence du PAD (proline, acide ascorbique et dexaméthasone) en «imagerie de phase quantitative» pour montrer un changement morphologique des CSMs (pré-différenciation chondrocytaire).

## DISCUSSION

Plusieurs techniques chirurgicales, notamment des greffes de chondrocytes, sont capables de restaurer le cartilage. Elles se heurtent toutefois à de nombreuses limites : difficulté de mise en œuvre, réparation parfois médiocre du tissu lésé, variabilité de la réponse des patients. Ainsi, de nouvelles techniques d'ingénierie sont en développement. Le principe de l'ingénierie tissulaire du cartilage consiste à utiliser un biomatériau en tant que matrice, à l'ensemencer avec des cellules appropriées et à y ajouter des molécules biologiquement actives (*facteurs de croissance*) permettant aux cellules de se différencier et se multiplier vers le tissu à régénérer.

Un certain nombre de paramètres reste incontournable, comme le choix des cellules ainsi que le choix des biomatériaux. A l'heure actuelle, l'utilisation des CSMs

présente une bonne alternative à l'utilisation des chondrocytes de par leur obtention facile ainsi que leur grand potentiel de différenciation (7).

Il est cependant très important d'évaluer le potentiel de différenciation des CSMs de chaque patient de façon à standardiser et à optimiser la chondrogenèse en biomatériaux et l'implantation par la suite d'un implant de bonne qualité en site articulaire lésionnel. Banfi et col. ont d'ailleurs mis en évidence des variabilités importantes du potentiel de différenciation des CSMs en fonction de la densité d'ensemencement (1), du nombre de passage ainsi que du temps de doublement de la population. La différenciation chondrogénique des CSMs est également dépendante de l'âge du patient, ainsi que de la quantité de cellules prélevées (8).

Des études antérieures réalisées au laboratoire ont également démontré qu'une pré-orientation chondrogénique avec un cocktail de facteurs (dexaméthasone, proline, acide ascorbique) lors du troisième et dernier passage en monocouche était essentiel à une différenciation des CSMs de bonne qualité par la suite (9, 10). Ces résultats sont en accord avec ceux de Jürgen (11) qui utilise également l'acide ascorbique et la dexaméthasone tout au long de la culture en monocouche pour obtenir une différenciation chondrocytaire.

Ce travail a donc pour but de développer une technique basée sur l'étude morphologique de différenciation cellulaire par analyse d'images à contraste de phase.

Nous avons donc pu suivre quotidiennement, tout au long de la culture en monocouche, l'aspect morphologique des cellules récupérées en fonction des passages. Nous avons ainsi pu suivre les changements morphologiques résultant de l'ajout du PAD lors du passage 3, en comparaison avec des chondrocytes. Les chondrocytes nous ont servi de témoin de morphologie d'une cellule très différenciée (*de forme hexagonale*), en comparaison avec des cellules dites indifférenciées comme les CSMs (*de forme fibroblastique très allongée*).

Nous avons pu obtenir, grâce à cette technologie innovante, non-invasive et stérile des informations quantitatives sur le changement de phase de la lumière transmise selon la différence des trajets optiques induits par les constituants de la cellule et de la matrice extracellulaire (MEC).

Nous avons donc pu quantifier les différences morphologiques entre les CSMs en passage 1 et 2 et les CSMs en passage 3 avec l'ajout du PAD. Clairement, les cellules passent d'un aspect très allongé et orienté à un aspect plus hexagonal, se rapprochant de la morphologie du chondrocyte (*cellule de référence*), avec l'ajout du PAD. Nous avons déjà remarqué dans de précédentes études que ce changement morphologique était essentiel à une différenciation chondrocytaire de bonne qualité en système 3D.

Ce changement morphologique, quantifiable par cette technique, permet donc d'évaluer le potentiel de différenciation

des CSMs avant la mise en biomatériaux et offre donc un outil de contrôle qualité pour l'utilisation des cellules récupérées. Ce paramètre est extrêmement important en ingénierie tissulaire du cartilage puisqu'il permettrait de gagner un temps considérable pour l'implantation d'un biomatériau fonctionnalisé de bonne qualité au sein d'une lésion. Il serait bien évidemment souhaitable d'établir un seuil acceptable de réponse au PAD et donc d'établir un seuil de prédifférenciation chondrocytaire de façon à adapter les conditions de culture, comme par exemple un temps de culture plus long, pour les cellules les moins répondantes au PAD.

Cet outil, basé sur de l'observation simple, rapide, non invasive, offre également de nombreuses possibilités pour d'autres types cellulaires, dans d'autres applications et pour une plus grande robustesse, mériterait d'être couplé à une approche statistique pour réaliser une analyse en composante principale, compte-tenu du nombre de paramètres morphométriques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BANFI A, MURAGLIA A, DOZIN B, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, QUARTO R. : Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*, 2000 Jun, 28 (6), 707-15.
2. BON P, MAUCOURT G, WATTELIER B, MONNERET S: Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells, *Optics Express*, 2009, 17 (15), 13080-13094.
3. BARER R: Interference microscopy and mass determination, *Nature*, 1952, 169, 366 – 367.
4. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 1999 Apr 2, 284 (5411), 143-7.
5. BON P, SAVATIER J, MERLIN M, WATTELIER B and MONNERET S: Optical detection and measurement of living cell morphometric features with single-shot quantitative phase microscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17 (7), 076004.
6. RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.
7. PELTTARI K1, STECK E, RICHTER W: The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis, *Injury*, 2008 Apr, 39 (1), 58-65.
8. LI Y, CHARIF N, MAINARD D, BENSOUSSAN D, STOLTZ JF, DE ISLA N: Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity, *Biomed Mater Eng.*, 2014, 24(1 Suppl), 47-52.
9. HENRIONNET C, ROEDER E, GILLET R, GALOIS L, BENSOUSSAN D, MAINARD D, NETTER P, GILLET P, PINZANO A: Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology, *Biomed Mater Eng.*, 2010, 20 (3), 175-81.
10. HENRIONNET C, WANG Y, ROEDER E, GAMBIER N, GALOIS L, MAINARD D, BENSOUSSAN D, GILLET P, PINZANO A: Effect of dynamic loading on MSCs chondrogenic differentiation in 3-D alginate culture, *Biomed Mater Eng.*, 2012, 22 (4), 209-18.
11. JÜRGEN M: Quality control for mesenchymal stromal cells: chondrogenesis as a standard condition ?, *Rheumatology: Current Research*, 2012



## ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES CELLULES DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE DE LA SOURIS

Leja C. et Bencsik A.\*

*Unité Maladies Neurodégénératives (MND), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), 31 avenue Tony Garnier  
69364 Lyon cedex 07*

\* Adresse de correspondance : [anna.bencsik@anses.fr](mailto:anna.bencsik@anses.fr)

### **ABSTRACT**

Our laboratory uses experimental models such as the C57Bl/6 wild-type mouse to study the possible neurotoxic impact of chemical substances ingested chronically, such as pesticides or nanomaterials (NM). They are suspected to participate in the occurrence of some neurodegenerative diseases. More precisely, to verify the hypothesis of a first impact of these chemicals on the enteric nervous system present in the gut, we have set up a protocol for glial and neuronal basic detection using immunohistochemistry. Here we report how it is possible to use this approach to evaluate the impact of chronically ingested chemicals on the enteric nervous system, by introducing quantitative measurements of these neuronal and glial markers.

### **RESUME**

Pour évaluer le rôle de substances chimiques potentiellement neurotoxiques, comme les pesticides ou certains nanomatériaux (NM), dans les maladies neurodégénératives humaines associées à l' $\alpha$ -synucléine (maladie de Parkinson, démence à corps de Lewy, atrophie multi-systématisée), notre laboratoire s'appuie sur l'étude d'expositions réalistes notamment par voie alimentaire, menées sur des analogues expérimentaux tels que la souris C57Bl/6. En effet, dans les hypothèses les plus récentes du développement de ces maladies, un déclenchement précoce d'un processus neurodégénératif a été suggéré dans le système nerveux présent dans le tube digestif, représentant le premier compartiment nerveux avec lequel les subs-

tances chimiques ingérées pourraient interagir et exercer un potentiel neurotoxique. Dans ce contexte, il convient en premier lieu de caractériser le système nerveux entérique (SNE) dans sa composition gliale et neuronale. Ainsi, nous rapportons ici la mise en place des protocoles de détection immunohistochimique des astrocytes et des neurones, ainsi que la démarche quantitative développée pour permettre d'étudier un impact neurotoxique dans le SNE.

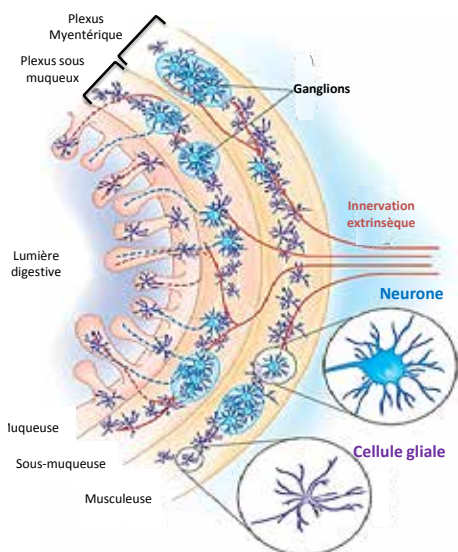
## INTRODUCTION

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative progressive d'origine multifactorielle. Elle est caractérisée par une longue période préclinique, c'est-à-dire sans les symptômes moteurs classiques, au cours de laquelle cependant des modifications cellulaires et moléculaires se produisent et se propagent dans le cerveau. En revanche certains symptômes non moteurs comme les dysfonctionnements gastro-intestinaux se produisent dans les premiers stades de la maladie et de façon remarquable, à ce stade précoce, des agrégats d'alpha-synucléine (ASYN), marqueur classique de la maladie de Parkinson, ont été décrits dans le système nerveux entérique (SNE) du tube digestif des patients (2). Ces études histologiques suggèrent que le processus pathologique progresse selon un mode spatio-temporel, du SNE vers le cerveau (6). Dans ce contexte, notre laboratoire étudie le rôle de substances chimiques potentiellement neurotoxiques, comme les pesticides (12) ou certains nanomatériaux (NM), dans les maladies neurodégénératives humaines associées à l' $\alpha$ -synucléine (maladie de

Parkinson, démence à corps de Lewy, atrophie multi-systématisée). Nos travaux s'appuient sur l'étude d'expositions réalistes notamment par voie alimentaire, menées sur des analogues expérimentaux telle que la souris C57Bl/6. Pour tester l'hypothèse d'une réponse neurotoxique au sein du SNE il convient d'étudier de façon systématique l'histologie du tube digestif des souris et en particulier le compartiment nerveux. Dans ce but, nous avons établi un référentiel d'expression de marqueurs neuronaux et gliaux, à l'aide d'anticorps spécifiques des cellules gliales (GFAP) et neuronales (NeuN). Nous rapportons ici la possibilité d'utiliser ce référentiel pour étudier l'impact possible d'une exposition à des agents chimiques sur le compartiment du SNE par immunohistochimie, en appliquant une méthode de quantification assistée par ordinateur.

### *Le système nerveux entérique (SNE)*

L'ensemble des fonctions intestinales sont régulées grâce au système nerveux entérique. Il est composé de deux types d'innervations. L'innervation extrinsèque, en rouge sur la figure 1, qui désigne les prolongements axonaux provenant des neurones du système nerveux central (SNC) (innervation sympathique et parasympathique) et se projetant sur les neurones du SNE. Une innervation intrinsèque, la plus abondante, qui consiste en des prolongements nerveux issus des neurones interconnectés, en bleu sur la figure 1, formant un réseau dense appelé plexus nerveux. L'intestin comporte deux plexus, le plexus myentérique (PM) et le plexus sous muqueux (PSM). Le PM (ou plexus



**Figure 1** : Schéma d'une coupe transversale de tube digestif présentant l'organisation du système nerveux entérique d'après Rescigno Mucosal Immunology 2008.

d'Auerback), localisé entre les couches musculaires longitudinales et circulaires de la musculeuse, est responsable du contrôle moteur. Le PSM (ou plexus de Meissner), situé entre la couche musculaire circulaire et la sous muqueuse intervient dans la régulation des sécrétions gastro-intestinales et du débit sanguin local. Le PM et le PSM se présentent comme un maillage serré de faisceaux de fibres nerveuses présents en continu sur l'ensemble du tractus digestif. Les ganglions du PM sont en général plus volumineux et possèdent plus de neurones que ceux du PSM. Ce tissu nerveux est individualisé au sein de la paroi du tube digestif, par une lame basale et une enveloppe inconstante de cellules interstitielles et conjonctives permettant aux neuromédiateurs et aux hormones d'agir sur le tissu

nerveux de façon paracrine. D'ailleurs, beaucoup de neuromédiateurs entériques sont des molécules de petite taille, comme la noradrénaline, l'acétylcholine (ACh), la sérotonine (5HT), des peptides (substance P, neurokinine A, vasointestinal peptide (VIP), calcitonine gene-related peptide (CGRP), la somatostatine (Som)), des bases puriques (adénosine, adénosine triphosphate (ATP)) voire des gaz (protoxyde d'azote (NO)).

### **Les cellules neuronales**

Chez l'Homme, au sein du SNE, le nombre total de neurones est estimé jusqu'à 200 millions (3). Quatre types neuronaux sont décrits et expriment un ou plusieurs neuromédiateurs. Les neurones sensoriels répondant aux stimuli mécaniques (déformation de la muqueuse) et chimiques (variation du pH intraluminal) sont le plus souvent cholinergiques et expriment également le CGRP. Les interneurones modulateurs ascendants et descendants de la muqueuse sont complexes et expriment plusieurs neuromédiateurs ACh/5HT voire ACh/NO/VIP/Som. Les neurones sécrétomoteurs agissent sur les artéioles et modulent l'activité glandulaire pariétale du tube digestif, les neurones moteurs agissent sur la musculeuse circulaire ou sur la musculeuse longitudinale. Ces motoneurones sont soit excitateurs (cholinergiques) ou inhibiteurs (nitroergiques) et peuvent exprimer également le VIP ou l'ATP. Chez l'Homme, 90% des neurones sont cholinergiques ou nitroergiques ; identifiables par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine (choline acetyltransfé-

rase, ChAT) et de l'oxyde nitrique (nitric oxide synthase, NOS), il semblerait qu'une minorité de neurones co-expriment ces 2 marqueurs. De façon notable la proportion de neurones cholinergiques décroît de l'estomac vers le colon, et inversement pour la proportion de neurones nitrergiques. Dans l'intestin grêle, il y aurait environ 60% de neurones cholinergiques pour environ 30% de neurones nitrergiques. Ces 2 types de neurones peuvent co-exprimer par ailleurs le VIP identifié par immunohistochimie (IHC) à l'aide d'anticorps anti-VIP. De façon beaucoup moins présente, certains neurones du SNE identifiés à l'aide d'un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (TH), identifiant l'enzyme de synthèse des catécholamines (noradrénaline, adrénaline, dopamine), sont dopaminergiques. De façon notable, la nature neurochimique des neurones et leur proportion varie en fonction des espèces. Ainsi le VIP est très peu présent au sein des neurones du SNE de la souris. En conséquence la mise en place d'un moyen simple mais sensible d'identifier un impact neurotoxique sur ce compartiment neuronal est difficile. C'est pourquoi pour contourner cette spécificité, nous avons opté pour mettre en évidence les neurones du SNE par IHC à l'aide de marqueurs neuronaux plus génériques. Le plus souvent, les anticorps utilisés sont dirigés contre des marqueurs métaboliques ou constitutionnels des neurones comme par exemple le NSE (Neuron Specific Enolase), le NF (Neurofilament), ou le NeuN (Neuronal nucleus). Dans notre étude nous avons retenu en première intention, l'utilisation de l'anticorps NeuN, en espérant faciliter le comptage des neurones sur la

base des noyaux marqués spécifiquement.

### ***Les cellules gliales entériques (CGE)***

Les cellules gliales ont été décrites dès 1891 par Dogiel (9), qui a noté la présence de cellules satellites nucléées à proximité des neurones entériques. Ces cellules, considérées comme les astrocytes du tube digestif, sont reconnaissables par leur forme étoilée et leurs extensions. Elles peuvent être mises en évidence par IHC à l'aide d'un anticorps anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Quatre fois plus nombreuses que les neurones, elles sont localisées le long des fibres nerveuses, en périphérie des corps cellulaires neuronaux ainsi qu'au contact intime avec le pôle basal de l'épithélium digestif comme avec les vaisseaux de la sous muqueuse comme illustré en violet dans la figure 1. Il n'y a que peu de travaux décrivant précisément ces cellules et leurs fonctions. Cependant il est admis qu'elles exercent des fonctions physiologiques équivalentes à celles présentes au sein du SNC : fonctions trophiques, de soutien mécanique, cytoprotection, régulation de l'activité neuronale en assurant notamment la synthèse des précurseurs de neuromédiateurs (7). Si les CGE liées aux plexus nerveux participent à la régulation de la neurotransmission, les autres CGE jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la barrière muqueuse épithéliale comme l'a montré un modèle de souris transgénique ne présentant plus de cellules gliales dans le SNE (14). Enfin, les CGE participent à la réponse inflammatoire (en sécrétant des cytokines) comme à la différenciation des cellules souches en entérocytes. Nous avons choisi d'utiliser cet anti-

corps anti-GFAP pour mettre en évidence les CGE dans le SNE de la souris.

### ***Les nanomatériaux manufacturés (NM)***

Les nanomatériaux manufacturés (NM) sont produits intentionnellement pour leurs propriétés particulières, dans le cadre des nanotechnologies. Les NM constitués d'une très grande diversité de nanoparticules, - en taille, forme, nature des atomes qui les constituent -, montrent en effet à cette échelle de dimension (entre 1 et 100nm) des propriétés physico-chimiques spécifiques offrant des applications nouvelles dans des secteurs d'activité variés : électrique, catalytique, mécanique, optique, biologique... Ces potentialités nouvelles sont ainsi susceptibles de lever des verrous technologiques aussi bien dans le secteur de la santé, de l'énergie, de l'environnement, du transport ou de la communication, et en conséquence ont suscité l'enthousiasme des industriels pour ces produits. L'essor considérable des nanotechnologies peut se mesurer par les nombreux produits aujourd'hui commercialisés dans divers secteurs tels que le bâtiment, l'automobile, l'emballage, la chimie, l'environnement, l'énergie, le bien-être, la cosmétologie, l'alimentation, issues du développement de l'usage de nanomatériaux ; sans oublier les applications médicales, en particulier dans le diagnostic, le traitement des cancers, l'imagerie moléculaire, la chirurgie, les dispositifs médicaux et l'ingénierie tissulaire. En France, le recensement annuel obligatoire (R-nano) des NM permet d'identifier que les plus courants sont composés de carbone (nanotube, fullerène), de dioxyde de silice, carbonate

de calcium, dioxyde de titane et d'oxyde d'aluminium (5). En parallèle de cet essor, les nanotechnologies soulèvent aussi des interrogations d'ordre scientifiques et sanitaires notamment sur leur impact sur la santé et l'environnement. L'usage des nanomatériaux dans les produits courants cités ci-dessus conduit à une exposition humaine par inhalation, ingestion, contact cutané ou encore une combinaison de ces voies. Si plusieurs travaux ont déjà pu identifier une atteinte possible des voies respiratoires ou cardio-vasculaires, en revanche très peu d'études se sont intéressées à une atteinte possible du cerveau en dépit du fait qu'il soit une cible potentielle vis-à-vis d'un effet nanotoxique (4, 5). C'est dans ce contexte que l'unité maladies neurodégénératives (MND) de l'ANSES de Lyon a initié une série d'expositions à des NP dans des modèles *in vivo*, en vue d'étudier plus précisément l'impact possible de ces NM sur les compartiments nerveux.

## **MATERIELS ET METHODES**

### ***Animaux***

Des souris femelles de la lignée C57Bl/6 (Laboratoire Charles River, L'Arbresle) (5 à 7 souris par groupe) ont été exposées par voie orale en continu sur 18 mois à deux nanomatériaux, le dioxyde de titane et le dioxyde de silice présents à une concentration de 30µg/mL dans leur eau de boisson quotidienne. Un groupe contrôle consiste en des animaux exposés à une eau de boisson habituelle sans ajout de NP. Les expérimentations ont été menées au sein de la plateforme d'expérimentation de l'ANSES de Lyon, après l'obtention d'un avis favorable du comité d'éthique

(ComEth Anses/ENV Maisons Alfort/ UPEC, N°11-0042) et dans le respect de la réglementation française et européenne en vigueur.

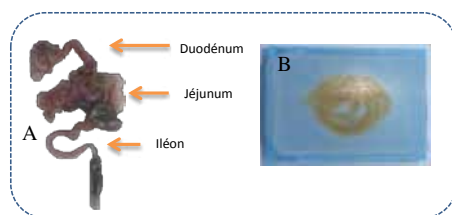
### **Nanomatériaux étudiés**

Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) (85% anatase, 15% rutile, 22nm) et le dioxyde de silice (SiO<sub>2</sub>) (5-35 nm, stable à pH 7) ont été choisis pour leur usage courant dans l'industrie alimentaire notamment comme agent blanchissant pour le titane et comme antiagglomérant pour la silice. Ces NP ont été fournies dans le cadre d'un parrainage de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) et sont exactement les mêmes que celles utilisées à l'échelle européenne dans le cadre d'une action conjointe Nanogenotox ([www.nanogenotox.eu](http://www.nanogenotox.eu)) visant à étudier le potentiel génotoxique de ces particules. Une solution mère est préparée selon un protocole de référence établi par Nanogenotox. Les solutions sont diluées au 1/20<sup>ème</sup> dans une solution d'albumine bovine sérique (BSA) à 0,05% filtrée, dispersés par l'application de 3 cycles d'ultra-sons de 24 min à 500W afin d'éviter la formation d'agrégats. Puis la solution mère est diluée dans l'eau du robinet pour remplir les biberons des souris d'une solution concentrée en NP à 30µg/mL.

### **Préparations histologiques**

A l'issue des 18 mois d'exposition, l'expérience est arrêtée. Le cerveau et les organes périphériques des animaux sont prélevés puis fixés dans une solution tamponnée de formol à 10%. Les intestins sont prélevés entre le duodénum et l'iléon

(figure 2). Soigneusement ouverts sur



**Figure 2** : Préparation des intestins de souris.

A. Repérages anatomiques,

B. Aspect d'un bloc de paraffine après application de la méthode du Swiss-roll. Clichés Anses Lyon.

toute leur longueur, le contenu est rincé à l'aide de tampon phosphate (0.1M) salin (0,09%), puis l'intestin est enroulé sur lui-même selon la technique du Swiss-roll (11) et mis à plat dans une cassette d'inclusion. Après 48h de fixation minimum, les organes sont ensuite inclus en paraffine selon un protocole de routine à l'aide d'un automate. A partir des intestins inclus en blocs de paraffine, des coupes de 5µm d'épaisseur sont recueillies sur lames de verres chargées positivement (X-Tra, Surgipath) puis séchées 1h à 37°C. Pour les mises au point liées à cette étude, des coupes de cerveau de souris ont été également utilisées comme tissu de référence pour l'expression des marqueurs gliaux et neuronaux.

### **Immunohistochimie**

Avant d'être colorées, les coupes histologiques sont déparaffinées et réhydratées à l'aide d'un automate selon un protocole classique de routine. Les différents anticorps primaires (Ac I) utilisés dans le cadre de cette étude sont présentés dans le tableau I. Un démasquage antigénique a été nécessaire uniquement pour la détection de

AcI	Type	Fournisseur	Dilution	Démarquage	Marquage attendu
GFAP	Polyclonal lapin	Dako	1/200	aucun	Cellules gliales (filaments intermédiaires)
NeuN	Polyclonal lapin	Abcam	1/500	Micro-Ondes Tampon Citrate pH 6,2	Neurones (noyaux)

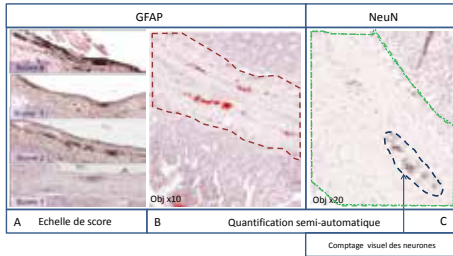
**Tableau 1 :** Récapitulatif et caractéristiques des Ac utilisés dans cette étude.

la protéine Rbfox3 par l'anticorps NeuN. Il consiste en un traitement thermique au four micro-ondes dans du tampon citrate 10mM (pH 6,2) (5 min puissance maximum puis 5 min position décongélation). La mise en œuvre du protocole de détection par IHC est identique pour les 2 anticorps primaires et suit le principe appliqué pour les coupes d'encéphales tels que déjà publié précédemment (8). En premier lieu les peroxydases endogènes sont bloquées dans un bain d'eau oxygénée à 3%. Afin de limiter les réactions non spécifiques, une saturation est effectuée à l'aide d'une solution bloquante du commerce (Blocking reagent, Roche) diluée selon les recommandations du fournisseur au 1/10<sup>ème</sup> dans du tampon d'acide maléique (pH 7,5). L'Ac I dilué dans du tampon phosphate salin (PBS 0,1M et NaCl 0,09%) et 0,1% Triton (X-100) est alors déposé et incubé une nuit en chambre humide à température ambiante (TA). En parallèle, en guise de contrôles, des coupes de tube digestif sont exposées à un sérum normal (SN) de lapin, en lieu et place des Ac I, pour vérifier la spécificité des signaux détectés. Après une nouvelle étape de saturation qui précède le dépôt d'Ac II (Ac anti-lapin biotinylé) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du PBS 0,1M et NaCl 0,09% + 0,1% Triton X100, les lames sont incubées 1 à 2h en chambre humide à TA. Le complexe ABC (Vector) est utilisé afin d'amplifier le signal ; il correspond au

complexe Avidine-Biotine (ABC), pré-incubé (30 min à 1h) à TA dans l'obscurité, puis déposé 30min dans l'obscurité à TA. L'avidine sur laquelle sont fixées les biotines du complexe ABC se couple à la biotine pour amplifier le signal. La présence de HRP (horse radish peroxydase) dans le complexe ABC permet la révélation de la présence d'antigène par l'oxydation d'un substrat de l'enzyme. Nous avons utilisé la diaminobenzidine (DAB, peroxydase substrate kit, Clinisciences) intensifiée au chlorure de nickel (dépôts noirâtres). Après un dernier rinçage, l'application d'hématoxyline aqueuse permet la coloration du tissu. Enfin après déshydratation, le montage des lames s'effectue à la résine (Eukitt) à l'aide d'une colleuse de lames. Après séchage, les lames sont observées à l'aide d'un microscope Olympus BX51 équipé d'une caméra numérique et couplé à une station d'analyse d'image équipée des logiciels Mosaic et Morpho Strider (Explora Nova). Ces logiciels permettent non seulement la capture d'images mais aussi leur traitement en vue de quantifier les immunomarquages observés.

### *Quantification des cellules gliales*

Pour la quantification des cellules gliales, nous avons d'abord appliqué une approche visuelle, en faisant référence à une échelle semi-quantitative (figure 3A), qui permet d'attribuer un score d'intensité de marquage compris entre 1 (marquage faible) et 4 (marquage très fort). Le score 0 n'existe pas, la GFAP étant exprimée à l'état basal dans l'ensemble du SNE comme c'est le cas dans le cerveau. La quantification de l'intensité des marquages



**Figure 3 :**

A. : Echelle de score appliquée à la quantification d'un immunomarquage à la GFAP dans le SNE.  
 B. : Mesure automatique de la surface (en rouge) correspondant au marquage spécifique de la GFAP.  
 C. : Mesure automatique de la surface (en bleu) correspondant au plexus nerveux identifié par le marquage spécifique NeuN. Le comptage du nombre de neurones reste manuel.

est effectuée sur la portion du jéjunum. Au sein d'un même groupe, les scores sont recueillis pour chaque souris et le score rapporté par groupe représente une moyenne. En parallèle nous avons utilisé le logiciel Morpho Strider en vue de standardiser et de préciser l'approche quantitative. Pour cela, la quantification est appliquée après capture d'images à l'objectif x10 de portions de jéjunum représentatives. La surface de la musculature est délimitée et sélectionnée comme région d'intérêt (pointillés rouges sur la figure 3B). Au sein de ce compartiment ainsi délimité, le logiciel permet de sélectionner directement par segmentation des couleurs les dépôts colorés correspondant au marquage que l'on souhaite quantifier (apparaît en rouge dans la figure 3B). Nous avons choisi de mesurer la surface totale de ce marquage spécifique par rapport à la surface totale de la musculature qui contient spécifiquement le compartiment du SNE. Le logiciel délivre un tableau Excel distinguant la surface totale

analysée de la surface du marquage. Ainsi dans ce cas nous obtenons une proportion de surfaces de marquage comparables entre les groupes.

### ***Quantification des cellules neuronales***

La population neuronale présente au sein du SNE a été estimée après application d'une IHC pour la détection d'un marqueur général des populations neuronales, l'anticorps NeuN. Cet anticorps est dirigé contre une protéine nucléaire exprimée seulement dans les neurones (Rbfox3), et qui permet notamment d'estimer la disparition des neurones et donc de vérifier l'hypothèse d'une mort neuronale. Cette quantification s'appuie pour chaque échantillon, sur 10 captures consécutives, au grossissement x20, de la musculature du jéjunum. A nouveau la musculature est délimitée comme région d'intérêt (pointillés verts sur la figure 3C). Puis les différents plexus sont délimités afin d'estimer leur surface (pointillés bleus figure 3C) et leur nombre mis en évidence dans le champ étudié, le choix de ces paramètres ayant été inspiré d'une approche quantitative appliquée à l'exploration du SNE humain (1). En revanche, le nombre de neurones est évalué par un comptage manuel, le marquage ne permettant pas de délimiter automatiquement chaque cellule marquée. Les résultats exprimés en surface et nombre de plexus, nombre de neurones pour un champ examiné sont ensuite comparés entre les groupes disponibles.

### ***Analyses statistiques***

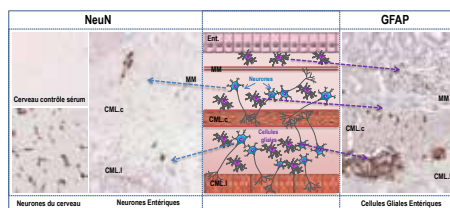
Toutes les données quantitatives (score, surface, nombre) ont été soumises

à des tests statistiques dans le but d'identifier l'existence de différences significatives entre les souris exposées et les souris contrôles. En particulier un test de Mann-Whitney pour des échantillons indépendants et un test de Student ont été appliqués à l'aide du logiciel en libre accès (logiciel R). Un risque de 5% étant fixé, une différence significative entre les moyennes sera confirmée avec une p-value <0,05. Les barres d'erreur représentant l'écart type ont été introduites dans chaque histogramme.

## RESULTATS

### *Caractérisation du SNE par IHC*

L'objectif de cette étude était de caractériser le SNE afin de pouvoir étudier l'impact possible de différentes substances chimiques absorbées par voie orale sur les différents composants cellulaires du SNE. Pour cela, nous avons utilisé des échantillons biologiques représentatifs (cerveau et tube digestif) issus de souris exposées ou non à des nanomatériaux, en appliquant une approche immunohistochimique à l'aide de différents anticorps spécifiques des cellules gliales (GFAP) et neuronales (NeuN). Nous avons suivi un protocole classique employé pour identifier ces types cellulaires dans le cerveau. Aucun ajustement du protocole en termes de démasquage antigénique ou de concentration d'anticorps n'a été nécessaire, comme nous l'a montré l'usage de coupes de cerveau en parallèle. La figure 4 illustre les résultats obtenus. Le marquage NeuN est moins intense dans le SNE que celui mis en évidence dans le cerveau mais reflète l'organisation de ce premier. Les neurones



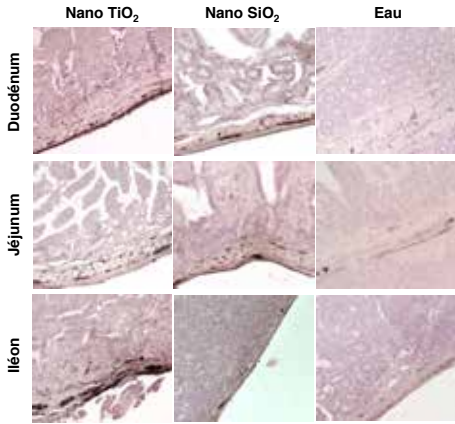
**Figure 4** : Illustration de la caractérisation des cellules gliales et neuronales entériques par IHC. Le marquage spécifique apparaît en brun/noir (DAB intensifiée au chlorure de nickel). Les cellules gliales sont associées étroitement à la localisation des neurones des plexus myentériques et sous muqueux mais aussi intimement liées aux entérocytes des villosités. Ent : entérocytes, MM muscularis mucosa ; CMLc : couche musculaire circulaire ; CMLl : couche musculaire longitudinale.

sont en effet regroupés au sein de ganglions nerveux enchâssés dans les couches mésentériques et sous muqueuses. La quantification de ces marquages indique qu'en moyenne chez une souris témoin il y a 4 neurones +/- 2 identifiables par plexus. Les résultats d'analyse des cellules gliales entériques identifiées par l'anticorps anti-GFAP confirme leur présence en plus grande quantité comparativement aux neurones.

### *Recherche d'un impact des nanomatériaux sur le SNE*

Pour identifier un impact possible des nanomatériaux sur le SNE, une quantification des cellules gliales et neuronales a été réalisée. Pour les cellules gliales, l'observation attentive des lames a révélé une surexpression de la GFAP dans les cellules gliales entériques des souris exposées aux nano-TiO<sub>2</sub> et SiO<sub>2</sub> comparativement aux souris contrôles. Comme au sein du SNC, cette surexpression suggère une multipli-

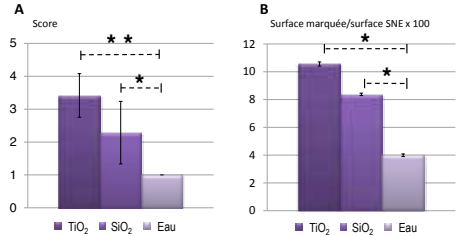
cation de ces cellules gliales entériques accompagnée d'une multiplication de leurs prolongements. La forte intensité de marquage GFAP illustrée figure 5 est équiva-



**Figure 5 :** Illustration représentative de l'intensité d'expression de la GFAP (en noir) dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La GFAP apparaît surexprimée chez les souris exposées aux nanomatériaux, quelle que soit la section intestinale considérée.

lente dans le duodénum, jéjunum et iléon. Nous avons donc choisi de quantifier les cellules gliales que dans le jéjunum. Dans un premier temps, à l'aide d'une échelle de score allant de 1 à 4, l'analyse statistique des scores moyens indique une différence significative des groupes exposés par rapport au groupe contrôle. L'exposition au titane induit une expression trois fois plus importante par rapport au contrôle. De même, le groupe exposé aux nano-silice exprime deux fois plus de GFAP que les témoins. Dans un second temps nous avons également voulu éprouver la possibilité de quantifier les marquages à l'aide du logiciel d'analyse d'images Morpho Strider. Dans ce cas, la quantification se base sur

des mesures de surface du marquage par rapport à la surface totale considérée qu'il est possible de comparer entre les groupes. La figure 6 illustre les résultats obtenus.



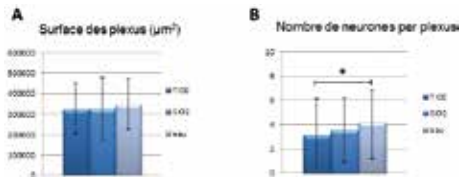
**Figure 6 :**

A. Intensité moyenne de l'expression GFAP dans le jéjunum quantifié à l'aide d'une échelle de score de 1 à 4. n = 7 pour chaque groupe. Test Mann Whitney - différence significative, \*\* à  $p < 0,01$  \*à  $p < 0,05$ .

B. Densité d'expression de la GFAP dans le jéjunum (surface marquage GFAP/surface totale du SNE  $\times 100$ ) n = 7 pour chaque groupe. Test Student - différence significative \*à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique confirme la surexpression significative de la GFAP dans les groupes exposés comparativement aux témoins.

L'analyse statistique du nombre de ganglions et de neurones dans le jéjunum quantifié à l'aide du logiciel Morpho Strider (figure 7) montre l'absence d'effet



**Figure 7 :**

A. Moyenne de la surface totale des plexus ( $\mu\text{m}^2$ )  
 B. Nombre de neurones par plexus, dans la même portion de jéjunum étudié. Test Student - différence significative \* à  $p < 0,05$

significatif sur la moyenne de la surface totale des plexus étudiés dans le jéjunum. En revanche le nombre moyen de neurones par plexus myentérique est significativement plus faible dans le groupe exposé au titane comparativement au groupe témoin.

## DISCUSSION

L'unité MND étudie le lien possible entre une exposition à des produits phytosanitaires ou des nanomatériaux et le déclenchement de processus neurodégénératifs en particulier. Pour cela des modèles d'expositions chroniques sur la souris ont été développés, tels que des groupes de souris C57Bl/6 exposées à 2 types de nanomatériaux, (dioxyde de silice et dioxyde de titane) délivrés pendant 18 mois par l'eau de boisson comparativement à des sujets non exposés. Au cours de cette exposition qui mime une condition réaliste, il est possible que ces produits chimiques, avant même d'impacter le système nerveux central, puissent induire diverses altérations neurotoxiques au sein même du compartiment nerveux du système digestif. Pour cela, il est nécessaire d'étudier de façon systématique l'histologie du compartiment nerveux du tube digestif de ces groupes de souris. A cette fin, le jéjunum a été démontré représentatif de l'ensemble de l'intestin grêle.

Pour caractériser le SNE présent au sein du tube digestif de ces souris, nous avons validé l'identification des 2 principaux types cellulaires du système nerveux, les cellules gliales et neuronales en faisant appel à des anticorps spécifiques utilisés en routine dans l'étude du cerveau (anti-

GFAP et anti-NeuN). Nous avons décrit précisément la distribution de ces cellules au sein du SNE. Le marquage neuronal permet d'identifier aisément les plexus nerveux myentériques et sous muqueux. Nous avons estimé à 4 neurones plus ou moins 2 le nombre moyen de neurones par plexus chez les individus contrôles qui correspond bien à la littérature rapportant chez la souris 3 à 8 neurones par plexus (10). Les variations s'expliquent par le plan de coupe passant par le plexus. La description des immunomarquages des cellules gliales à l'aide de la GFAP est d'autant plus précieuse qu'elle n'est que très peu rapportée chez la souris. En effet, la protéine S100 $\beta$  est plus fréquemment utilisée comme marqueur des cellules gliales. Elle fait partie de la famille des protéines de liaison du calcium intracytosolique et présente un caractère spécifique de solubilité. Cette protéine n'est donc pas constitutive de la cellule comme l'est la GFAP qui reconnaît des éléments du cytosquelette, ce qui a suggéré de compléter ces travaux par ce marqueur complémentaire des cellules gliales entériques.

Pour pouvoir étudier l'impact d'une exposition chronique à ces nanomatériaux, nous avons voulu quantifier l'intensité des marquages observés à l'aide de la GFAP. En effet, il est quasi impossible de compter les cellules individuellement, en revanche le taux d'expression de cette protéine fibrillaire peut être directement corrélée à l'activation de ces cellules, et ce critère est classiquement utilisé comme indicateur d'une réponse à une situation pathologique. Dans la mesure où une dif-

férence de niveau d'expression est apparue de façon évidente entre les groupes exposés et les témoins, nous avons privilégié dans un premier temps une approche basée sur l'attribution d'un score d'intensité que nous avons défini par une échelle de référence, concrétisée par une planche photographique (figure 3). Cette quantification ciblée sur le compartiment du jéjunum, nous a permis d'établir que l'exposition au dioxyde de titane conduit à une expression de GFAP 3 fois supérieure à la normale et celle au dioxyde de silice à une expression 2 fois plus importante par rapport au témoin. Nous avons voulu conforter cette observation avec le recours au logiciel d'analyse d'images Morpho Strider. Dans ce cas, la quantification repose sur l'étendue du marquage spécifique de la GFAP rapportée à une surface étudiée correspondant en l'occurrence au compartiment du SNE. C'est une densité relative d'expression de ce marqueur que nous avons comparé d'un groupe à l'autre. Cette approche sous-entend une quantification dans le jéjunum, limitée à quelques champs successifs mais sans chevauchement. En dépit d'une approche somme toute différente, nous avons confirmé la surexpression de la GFAP dans les groupes exposés par rapport au groupe témoin. En routine, le scoring visuel est efficace et rapide, mais en cas de marquage de faible intensité proche de la normale, le recours à cette 2<sup>ème</sup> approche assistée par ordinateur est à privilégier, pour mettre en exergue des différences d'intensité plus subtiles.

Pour mesurer l'impact sur le compartiment neuronal nous avons également cherché à quantifier l'intensité du mar-

quage neuronal observé. En s'inspirant d'une méthode de quantification appliquée à l'exploration du SNE humain (1), nous avons quantifié en parallèle à la fois la surface des plexus et le nombre de neurones par plexus. Nos résultats suggèrent un impact modeste d'une exposition au dioxyde de titane sur le nombre moyen de neurones par plexus avec une perte d'un neurone seulement par plexus, qui sera sans doute à confirmer par l'usage d'un autre marqueur générique de neurones. Compte tenu de l'absence de différence sur la surface totale des plexus, il apparaît d'emblée que ces expositions qui conduisent à une perte d'environ 25 % des neurones n'expliquent pas l'intensité de la réaction gliale observée. Ainsi, au-delà de cette perte neuronale, il est possible qu'un autre type de souffrance neuronale puisse être mise en relation avec la surexpression de GFAP. En particulier le niveau d'expression de certains neurotransmetteurs pourrait être altéré. Pour tester cette hypothèse il conviendrait d'étudier des marqueurs spécifiques comme la ChAT, marqueur des neurones cholinergiques majoritaires au sein du jéjunum.

## CONCLUSION

Nous avons déterminé les conditions permettant d'étudier le SNE chez la souris, à l'aide de marqueurs des neurones et des cellules gliales entériques. Nous avons montré que plusieurs approches quantitatives sont possibles. De façon remarquable nous avons mis en évidence un impact majeur sur les intestins des souris exposées aux nanomatériaux. Cet impact se traduit par une surexpression de la GFAP par les

cellules gliales entériques. Cette réaction gliale suggère une réponse inflammatoire qui n'apparaît pas accompagnée d'une forte perte neuronale, en particulier dans le cas de l'exposition à la silice. Il conviendrait de vérifier si d'autres altérations neuronales ne pourraient pas être identifiées notamment en ciblant les principales classes neurochimiques présentes dans le SNE. Dès à présent, ce travail rapporte une stratégie utile reposant sur l'étude immunohistochimique du SNE pour identifier l'impact neurotoxique possible de produits chimiques ingérés de façon chronique.

## **REMERCIEMENTS**

Les auteurs remercient tout particulièrement les techniciens de la plateforme d'expérimentation animale de l'ANSES de Lyon, Émilie Antier, Rabah Belkheir, Damien Gaillard, qui ont pris en charge l'administration des solutions nanoadditivées, le suivi des animaux et les prélèvements des organes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ANNERINO D., «Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss» *Acta Neuropathol*, 2012,124:665-680
2. BEACH T.G. et. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2010;119:689-702
3. BENARROCH E.E. Enteric nervous system : functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007;69:1953-1957
4. BENCSIK A. Is the brain protected from the impact of nanomaterial exposure? *Biologie aujourd'hui* 2014. 208, 159-165.
5. BENCSIK A. «Les nanoparticules nuisent-elles au cerveau?» *Questions ouvertes. Pour la Science* n°448- février 2015p.14-17
6. BRAAK H., DE VOS R.A., BOHL J., DEL TREDICI K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; 396:67-72.
7. CLAIREMBAULT T. & al, «Enteric Glial Cells: New Players in Parkinson's Disease?», *Mov Disorders*, 2015 30,4;494-498
8. COUDERC, A., MUSELLI, L., LEBOIDRE, M. and BENCSIK, A. Etudes histopathologiques du système nerveux central et des organes périphériques de souris exposées à des nanomatériaux: choix des marqueurs et des méthodes. *Rev Fr Histotechnol* 2013. 26, 63-75.
9. DOGIEL AS. Über den Bau der Ganglien in den Gelf echten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt Jg*, 1899:130-158
10. GABELLA G., «The number of neurons in the small intestine of mice, guinea pigs and sheep», 1987, *Neuroscience*
11. MOOLENBEEK C, RUITENBERG EJ. The «Swiss roll»: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Animal*, 1981; 15:57-59.
12. MORETTO A. and COLOSIO, C. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. *Toxicology* 2013. 307, 24-34.

13. RESCIGNO M. Don't forget to have a «second brain» *Mucosal Immunology* 2008;1, 328–329.

14. SAVIDGE T. et al «Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione» *Gastroenterol*, 2007, 132;1344-1358



# CARACTERISATION D'UNE REPONSE IMMUNE ADAPTATIVE DANS LES TUMEURS COLORECTALES DE TYPE MSI : DE L'ANALYSE MOLECULAIRE A L'ANALYSE D'IMAGES

Boissière-Michot F.<sup>1</sup>, Lazennec G.<sup>2</sup>, Frugier H.<sup>1</sup>, Jarlier M.<sup>1</sup>,  
Roca L.<sup>1</sup>, Du Paty E.<sup>2</sup>, Laune D.<sup>2</sup>, Blanchard F.<sup>3</sup>, Le Pessot F.<sup>3</sup>, Sabourin J.-C.<sup>3</sup>, Bibeau F.<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM) - Val d'Aurelle,  
34298 Montpellier, France*

*<sup>2</sup>UMR 3145 SYSDIAG CNRS, 34093, Montpellier, France*

*<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire Rouen, 76038, Rouen, France*

Auteur correspondant :

Unité de Recherche Translationnelle, Institut régional du Cancer de Montpellier  
208 rue des Apothicaires, 34298 Montpellier Cedex.  
Florence.Boissiere@icm.unicancer.fr, Tél. 04 67 61 85 66

## RESUME

Qu'elles se développent dans un contexte héréditaire ou sporadique, les tumeurs colorectales (CRC) présentant une instabilité microsatellitaire (MSI) sont fréquemment associées à un recrutement local de cellules immunes. D'un point de vue clinique, à stade équivalent, les CRC MSI

présentent un meilleur pronostic que ceux avec microsatellites stables (MSS). Le but de cette étude était de caractériser les mécanismes immuns dans les CRC MSS et MSI. Pour ce faire, nous avons analysé par immunohistochimie les différentes populations immunes (lymphocytes T, T cytotoxiques, T mémoires, Th1, T rég-

lateurs, lymphocytes B, macrophages) et par technique Bioplex® l'expression intratumorale de 48 cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance. Nous avons ainsi pu mettre en évidence, dans les tumeurs MSI, un profil d'expression cytokinique particulier qui est impliqué dans une réponse de type Th1. Il se traduit par un recrutement de cellules participant à la réponse antitumorale (T cytotoxiques, T mémoires) et pourrait être à l'origine du meilleur pronostic de ces tumeurs.

## INTRODUCTION

En France, le cancer colorectal (CRC) se situe, tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents : le deuxième chez les femmes et le troisième chez les hommes (<http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/11-cancer-colorectal/43-epidemiologie-du-cancer-colorectal-en-france-metropolitaine-incidence.html#ind2>). Environ 85% de ces cancers se produisent dans un contexte d'instabilité chromosomique alors que 15% sont dus à la déficience d'une protéine du système de réparation des mésappariements de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) (système MMR pour Mismatch Repair), en particulier hMLH1, hMSH2, hMSH6 ou PMS2, impliquée dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN (1). Cette déficience peut être liée soit à une mutation germinale d'un des gènes codant pour ces protéines soit à un contexte global d'hyperméthylation tumorale (2). Dans cette dernière situation, la méthylation du promoteur de certains gènes, dont hMLH1, va conduire à inhiber l'expression des dits gènes. Dans tous les

cas, l'absence d'expression d'une protéine du système MMR se traduira par l'accumulation de mutations, en particulier dans des séquences appelées microsatellites (3). Il s'agit de séquences mono-, bi-, ou trinuécléotidiques répétées en tandem intra- ou extra-géniques, qui sont très sensibles aux erreurs de réplication. En l'absence de réparation, les mutations accumulées vont se traduire par une instabilité de la taille des microsatellites au niveau de l'ADN tumoral. La tumeur sera alors caractérisée comme MicroSatellites Instable (MSI), par opposition à MSS, MicroSatellites Stable. Lorsque ces mutations sont intra-géniques, elles peuvent conduire à un décalage du cadre de lecture et être à l'origine de néo-antigènes potentiellement immunogènes (4-6).

Les tumeurs MSI présentent fréquemment une forte réaction inflammatoire péri-tumorale (réaction Crohn-like), une infiltration importante par des lymphocytes intratumoraux (TILs, pour Tumor Infiltrating Lymphocytes) et un plus grand nombre de ganglions lymphatiques, le plus souvent réactionnels (7). Cette immunogénicité des tumeurs MSI pourrait ainsi expliquer leur bon pronostic.

Cependant, le rôle du système immunitaire dans le contrôle tumoral est extrêmement ambigu. En effet, la réponse immunitaire est toujours la résultante d'une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs. La localisation particulière de certains lymphocytes dans les tumeurs colorectales est un facteur pronostique majeur (8,9) alors que l'inflammation chronique de l'intes-

tin est reconnue pour être un facteur de risque (10). Ainsi, une réponse immunitaire non contrôlée peut conduire à une inflammation pathologique en créant un environnement favorable à la croissance cellulaire. Dans un environnement tumoral, elle peut également participer à la phase d'échappement de l'immunosurveillance en agissant à divers niveaux tels que le recrutement de nouvelles populations immunes (macrophages M2, Lymphocytes T-régulateurs...), l'induction de l'expression de facteurs inhibant une réponse anti-tumorale effective (CTLA4, PD1, PDL1...) ou de facteurs pro-angiogéniques.

L'objectif de notre étude était de caractériser le microenvironnement inflammatoire dans des tumeurs colorectales de type MSS et MSI. Pour ce faire, nous avons analysé une cohorte de 48 CRC MSI et 62 CRC MSS. Les différentes populations immunes infiltrant la tumeur ont été caractérisées par immunohistochimie (IHC) sur des Tissus MicroArrays (TMA) spécifiquement conçus pour cette étude et quantifiées par analyse d'images. Le contenu intra tumoral en divers facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines a été analysé à partir de broyats tumoraux par technique multiplexée.

## **MATERIEL ET METHODES**

### ***Echantillons***

Tous les cancers colorectaux ayant un statut MMR documenté et pour lequel un échantillon FFPE et congelé était disponible dans les tumorothèques de l'Institut du Cancer de Montpellier et du CHU de Rouen ont été identifiés. Une cryosection

de chaque échantillon congelé a été réalisée, colorée par Hématéine Eosine Safran (HES) et son contenu en cellules tumorales a été analysé par un pathologiste. Seuls les échantillons congelés comportant au moins 50% de cellules tumorales ont été conservés pour l'analyse. Au total, 110 tumeurs coliques ont été analysées, 48 MSI et 62 MSS. Un échantillon fixé en formol et inclus en paraffine (FFPE), apparié avec chacune des tumeurs congelées, a été sélectionné pour constituer les TMA.

### ***Détermination du statut MMR***

Le statut MMR a été réalisé par analyse immunohistochimique de hMLH1, hMSH2, hMSH6 et PMS2 ainsi que par analyse PCR des séquences microsatellitaires comme déjà décrit (11).

### ***Construction des TMA***

Une lame HES de chaque bloc FFPE a été analysée. Pour chaque tumeur, six zones étaient identifiées : 3 en bordure de tumeur et 3 au centre de la tumeur. Une carotte de 600µm de diamètre était prélevée au niveau de chaque zone et intégrée dans un bloc receveur en utilisant le TMA arrayer MTA1 (Beecher Instrument, Excilone, France).

### ***Immunohistochimie***

Les différents marqueurs analysés ainsi que les anticorps utilisés sont décrits dans le tableau I. Après démasquage antigénique et inhibition des peroxydases endogènes, les lames ont été incubées avec les différents anticorps. La liaison spécifique de l'anticorps à son antigène a été mise en évidence avec le système d'amplification

Marqueur	Type cellulaire	Clone	Source	Démasquage antigénique	Dilution	Durée d'incubation	Protocole de marquage
CD3	Lymphocytes T	LN10	Menarini	EDTA	1/200	20 min	Envision™ FLEX
CD8	Lymphocytes T cytotoxiques	C8/144B	Dako	EDTA	1/100	20 min	Envision™ FLEX
CD45R0	Lymphocytes T mémoires	UCHL1	Dako	EDTA	1/100	20 min	Envision™ FLEX+
FOXP3	Lymphocytes T régulateurs (Tregs)	236A/E7	Abcam	Citrate	1/100	20 min	Envision™ FLEX
T-Bet	T helper 1	4B10	SCB	EDTA	1/200	20 min	Envision™ FLEX+
CD20	Lymphocytes B	L26	Dako	EDTA	1/800	20 min	Envision™ FLEX
CD68	Macrophages	KP1	Dako	EDTA	1/4000	20 min	Envision™ FLEX

**Tableau I :** Caractéristiques des anticorps utilisés pour immunophénotyper les CRC MSS et MSI.

Flex® ou Flex®+ et révélée par le chromogène diaminobenzidine. Après déshydratation et montage entre lame et lamelle, les lames ont été analysées avec le logiciel SpotBrowser® (Excilone, France) en appliquant un protocole d'imagerie intégrant seuillages et critères de forme et de taille (détails sur demande). Les résultats étaient ensuite exportés sous format Excel et la moyenne des trois spots (même localisation et même échantillon) calculée. Les résultats des immunomarquages étaient exprimés en nombre de cellules positives par mm<sup>2</sup> de tissu.

### **Extraction protéique**

Plusieurs coupes de 15 µm d'épaisseur, consécutives à la cryosection initiale ayant permis de valider le pourcentage de cellules tumorales, étaient réalisées de manière à obtenir 25 à 100mg de tissu. Ces coupes étaient collectées dans des tubes Lysing Matrix (MP Biomedicals) permettant le broyage, après rajout d'un tampon de lyse TEG, avec un MagNA Lyser

(Roche Diagnostics). Après centrifugation à 13000 g à +4 °C pendant 20 min, les surnageants étaient récupérés et la concentration en protéines totales mesurée par la technique de Bradford.

### **Dosage des protéines par technique Multiplex**

Pour mesurer simultanément 48 facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines, nous avons utilisé deux kits Bio-Plex (BioRad #171-A11127 et #171-A11171) en suivant les recommandations du fournisseur. Le premier kit permettait la détection de 27 protéines (27 plex assay: IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, IL-12 [p70], IL-13, IL-15, IL-17, CCL11 (Eotaxin), b-FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), PDGFbb, CCL5 (RANTES), TNF-α, VEGF) et le second de 21 facteurs supplémentaires (21 plex assay: IL-1α, IL-2Ra, IL-3, IL-12 (p40), IL-16, IL-18, CCL27 (CTACK), CXCL1

(GRO- $\alpha$ ), HGF, IFN- $\alpha$ 2, LIF, CCL7 (MCP-3), M-CSF, MIF, CXCL9 (MIG),  $\beta$ -NGF, SCF, SCGF- $\beta$ , CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ), TNF- $\beta$ , TRAIL).

Chaque tube, contenant des billes couplées à des anticorps spécifiques, était incubé avec 25  $\mu$ g de protéines totales dans un volume final de 50  $\mu$ l. Les données étaient recueillies sur la plateforme Bio-Rad, basée sur un lecteur à double laser de microplaques. Les concentrations de chacune des protéines mesurées étaient exprimées en pg/ $\mu$ g de protéines totales.

### Analyse statistique

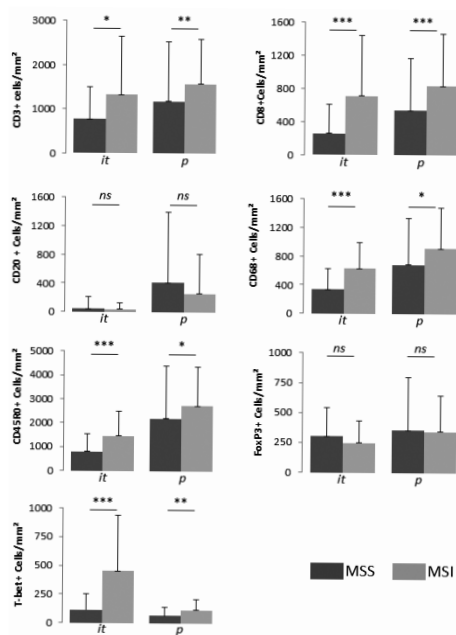
Les variables continues étaient exprimées par la moyenne, la médiane, l'écart type et l'étendue. Selon le type de données à analyser, les données étaient analysées en utilisant le test du  $\chi^2$ , le test de Fischer ou de Mann Whitney. Une différence était considérée comme statistiquement significative lorsque  $P < 0,05$ , à l'exception de l'analyse des cytokines pour laquelle le seuil de significativité était ramené à 0,001 avec la correction de Bonferroni, pour tenir compte des multiples comparaisons effectuées. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur STATA 10.0 (StataCorp).

## RESULTATS

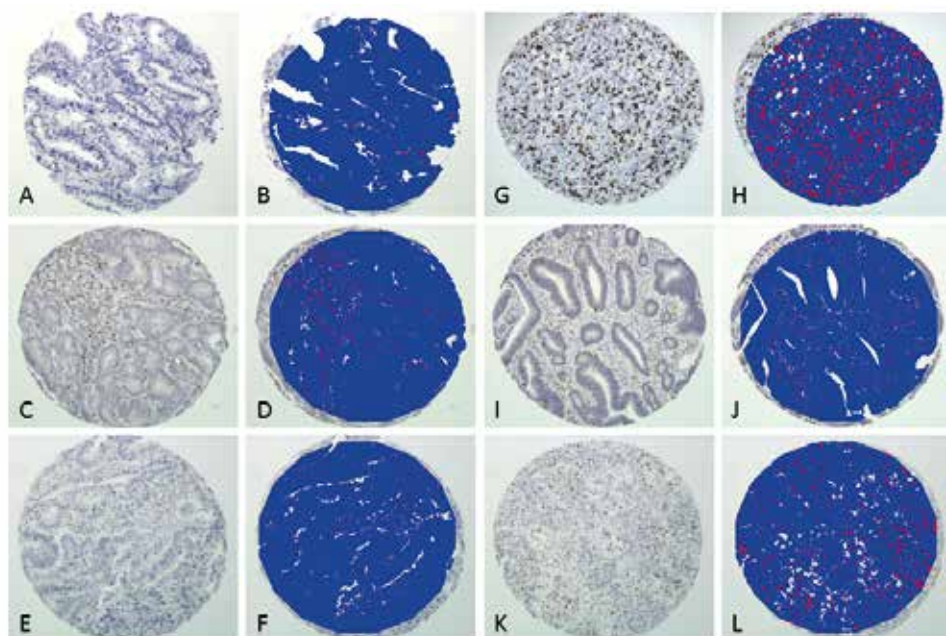
### Infiltrat inflammatoire

L'analyse par immunohistochimie a permis de mettre en évidence un recrutement intra- et péri-tumoral des lymphocytes T (CD3+), en particulier cytotoxiques (CD8+), mémoires (CD45RO), et de la voie Th1 (T-Bet+) dans les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS. A l'inverse,

les densités de lymphocytes T régulateurs (FoxP3+) et de lymphocytes B (CD20+) n'étaient pas significativement différentes (Figures 1 et 2). Nous avons également pu noter un recrutement plus important de macrophages CD68+ dans les tumeurs de type MSI (Figure 1).



**Figure 1 :** Analyse quantitative de l'infiltrat immunitaire au centre (it) ou en périphérie (p) des tumeurs colorectales MSS ou MSI. Le nombre de cellules immunoréactives a été évalué sur chaque spot par analyse d'images.



**Figure 2** : Spots tissulaires immunomarqués par CD8 (A, G), FoxP3 (C, I) et T-Bet (E, K) dans des tumeurs colorectales MSS (A, C, E) ou MSI (G, I, K). L'analyse d'images correspondant à chacun des spots est illustrée en parallèle (B, H, D, J, F, L). Les cellules détectées par le système d'analyse d'images sont colorées en rouge.

### *Expression cytokinique*

La plupart des facteurs analysés n'étaient pas (médiane = 0; IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, CCL3, G-CSF, TNF $\alpha$ , PDGFbb) ou peu détectables (médiane <1pg/ $\mu$ g de protéines totales ; IL-1 $\alpha$ , IL2-P $\alpha$ , IL-6, IL-7, IL-12(p70), IL-17, IL-18, LIF, CCL11, CCL27, IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL7, CCL4,  $\beta$ -FGF,  $\beta$ -NGF, IFN- $\alpha$ 2, GM-CSF, M-CSF, SCF, TNF $\beta$ , TRAIL), aussi bien dans les échantillons MSS que MSI (Tableau II).

Parmi les cytokines mesurables, CCL5, CXCL8, CXCL9, IL-1 $\beta$ , CXCL10, IL-16, CXCL1 et IL-1ra étaient significative-

ment surexprimées dans les tumeurs MSI contrairement à MIF qui était plus fortement exprimé dans les tumeurs MSS (Tableau II). CCL5, CXCL10, CXCL8, CXCL9 et IL-1 $\beta$  montraient les plus fortes variations entre les deux groupes de tumeurs (entre 12,9 et 2,3 fois).

Marqueur	MSS (n=62)				MSI (n=48)				Ratio (MSI/MSS)	p
	Moy	DS	Méd	Etendue	Moy	DS	Méd	Etendue		
CCL5	0.40	0.80	0.13	[0-4.29]	5.16	18.13	1.37	[0-125.92]	12.9	<0.001
CXCL8	14.62	40.13	2.19	[0-284.63]	77.05	149.22	12.70	[.01-507.61]	5.3	<0.001
CXCL9	6.17	8.77	3.20	[0-49.9]	28.51	35.39	14.16	[0-154.09]	4.6	<0.001
IL1-β	2.24	8.87	0.13	[0-68.39]	5.13	8.86	1.78	[0-41.93]	2.3	<0.001
CXCL10	5.84	9.07	1.70	[0-44.67]	61.36	238.43	8.49	[0-1652.31]	10.5	<0.001
IL-16	9.53	8.03	7.91	[1.75-53.59]	14.90	14.89	12.10	[0-87.05]	1.6	0.011
CXCL1	1.89	2.58	0.94	[0-12.89]	2.84	3.58	1.40	[0-18.59]	1.5	0.033
MIF	106.66	53.64	92.40	[47.68-319.81]	89.23	60.19	76.16	[0-350.63]	0.8	0.039
IL-1ra	80.72	116.43	37.96	[.27-506.35]	105.98	123.77	58.83	[5.61-567.4]	1.3	0.049
CCL4	0.55	0.97	0.28	[0-5.92]	1.31	2.08	0.45	[0-10.25]	-	-
LIF	0.08	0.10	0.07	[0-0.65]	0.05	0.07	0.01	[0-0.33]	-	-
CCL3	0.00	0.01	0.00	[0-0.04]	0.02	0.05	0.00	[0-0.24]	-	-
IFNγ	0.08	0.17	0.00	[0-0.89]	0.25	0.44	0.02	[0-1.97]	-	-
IL-18	13.32	47.74	0.85	[.02-270.58]	6.33	24.73	0.31	[0-160.42]	-	-
HGF	8.25	10.86	5.42	[1.55-63.03]	6.16	5.96	3.85	[0-23.19]	0.7	0.108
IL-13	0.02	0.04	0.00	[0-0.16]	0.01	0.03	0.00	[0-0.18]	-	-
IL-1α	0.26	0.49	0.15	[0-3.02]	0.38	0.62	0.16	[0-3]	-	-
βFGF	0.95	1.29	0.38	[0-4.6]	1.00	1.99	0.17	[0-9.14]	-	-
IL-12p40	2.14	2.72	1.24	[0-14.2]	1.81	2.69	0.69	[0-12.86]	0.8	0.258
CCL11	0.22	0.37	0.05	[0-1.71]	0.19	0.37	0.02	[0-1.73]	-	-
GM-CSF	0.03	0.05	0.00	[0-0.19]	0.03	0.04	0.00	[0-0.15]	-	-
IL-7	0.59	1.56	0.00	[0-8.9]	0.83	1.72	0.01	[0-9.39]	-	-
CXCL12	2.17	3.05	1.54	[0-16.09]	1.55	1.93	0.43	[0-7.67]	0.7	0.342
CCL7	0.97	1.93	0.16	[0-10.74]	1.01	1.38	0.63	[0-7.81]	-	-
CCL27	0.28	0.21	0.26	[0-1.17]	0.23	0.22	0.22	[0-0.84]	-	-
TNFβ	0.02	0.02	0.03	[0-0.1]	0.02	0.03	0.00	[0-0.08]	-	-
SCF	0.65	0.71	0.48	[0-3.29]	0.90	0.98	0.60	[0-3.47]	-	-
IL-12p70	0.18	0.31	0.04	[0-1.72]	0.10	0.14	0.02	[0-0.53]	-	-
SCFGB	2.54	3.21	1.28	[0-15.46]	2.57	3.70	1.13	[0-18.79]	1.0	0.404
CCL2	0.16	0.25	0.08	[0-1.47]	0.16	0.31	0.01	[0-1.53]	-	-
βNGF	0.06	0.10	0.04	[0-0.59]	0.05	0.08	0.00	[0-0.38]	-	-
IL-10	0.00	0.01	0.00	[0-0.03]	0.00	0.00	0.00	[0-0.01]	-	-
IL-17	0.05	0.08	0.00	[0-0.33]	0.08	0.15	0.00	[0-0.55]	-	-
IL-6	0.35	0.76	0.01	[0-4.03]	0.74	1.72	0.02	[0-7.86]	-	-
IL-3	2.98	4.41	1.42	[0-20.35]	3.20	3.93	2.52	[0-18.77]	1.1	0.549
IFN-α2	0.45	0.30	0.43	[0-1.25]	0.42	0.32	0.44	[0-1.33]	-	-
PDGFbb	0.02	0.06	0.00	[0-0.32]	0.06	0.27	0.00	[0-1.74]	-	-
IL-2	0.01	0.02	0.00	[0-0.12]	0.00	0.01	0.00	[0-0.05]	-	-
TRAIL	0.33	0.41	0.21	[0-1.89]	0.33	0.44	0.16	[0-2.24]	-	-
VEGF	12.94	20.97	5.10	[.26-120.91]	9.18	9.98	5.16	[.09-46.65]	0.7	0.786
IL-2Rα	0.32	0.37	0.23	[0-1.83]	0.34	0.38	0.21	[0-1.66]	-	-
TNFα	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-
G-CSF	0.02	0.05	0.00	[0-0.24]	0.05	0.13	0.00	[0-0.7]	-	-
IL-9	0.01	0.02	0.00	[0-0.11]	0.00	0.01	0.00	[0-0.08]	-	-
M-CSF	0.43	0.51	0.33	[0-2.96]	0.36	0.30	0.35	[0-1.1]	-	-
IL-4	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-
IL-15	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-
IL-5	0.00	0.00	0.00	[0-0]	0.00	0.00	0.00	[0-0]	-	-

Abréviations: Moy : moyenne ; DS : déviation standard ; Méd : médiane

**Tableau II :** Quantification des cytokines, chemokines et facteurs de croissance dans les CRC MSS et MSI

### *Corrélations cellules inflammatoires / cytokines*

Nous avons pu corrélérer significativement des sous-populations inflammatoires et l'expression de cytokines, en particulier CXCL9 et CXCL10 (Tableau III).

Par exemple, dans les tumeurs MSS, de forts niveaux de CXCL9 étaient significativement associés à une augmentation de la densité intra-tumorale de lymphocytes CD3+, CD8+ et T-Bet+. De manière intéressante, dans les tumeurs MSI, cette corrélation persistait, était encore plus

		CXCL8			CXCL9			IL1-β			CXCL10			IL-16			MIF		
		Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p	Faible	Fort	p
MSI	CD3 <i>it</i>	1019	751	0.145	404	1577	<0.0001	1007	715	0.307	639	1201	0.056	751	1074	0.069	841	956	0.874
	CD3 <i>p</i>	1746	1249	0.114	910	1592	0.032	1479	1350	0.526	1612	1336	0.248	1612	1303	0.741	1609	1324	0.934
	CD8 <i>it</i>	525	473	0.351	147	952	<0.0001	613	294	0.166	276	882	0.010	312	760	0.010	474	525	0.803
	CD8 <i>p</i>	764	632	0.409	480	1000	0.004	725	598	0.313	598	894	0.020	617	787	0.465	661	680	0.953
	CD45RO <i>it</i>	1362	1356	0.519	779	1710	0.001	1394	1228	0.318	981	1618	0.039	1059	1565	0.045	1521	1172	0.182
	CD45RO <i>p</i>	2474	2754	0.962	1517	3280	0.053	3245	2073	0.139	2007	3018	0.509	2354	3245	0.777	3303	2449	0.318
	T-Bet <i>it</i>	319	231	0.509	148	411	0.000	277	214	0.540	154	325	0.038	199	321	0.097	231	279	0.892
	T-Bet <i>p</i>	94	110	0.556	49	148	0.001	112	90	0.589	103	119	0.212	91	120	0.126	104	114	0.916
	FoxP3 <i>it</i>	207	211	0.604	194	239	0.358	198	230	0.404	197	224	0.850	159	246	0.124	190	224	0.690
	FoxP3 <i>p</i>	259	272	0.697	222	262	0.981	208	348	0.109	302	209	0.129	222	262	0.788	222	325	0.733
	CD68 <i>it</i>	627	506	0.570	401	691	0.084	705	408	0.188	532	650	0.363	415	691	0.139	677	501	0.633
	CD68 <i>p</i>	921	609	0.509	602	942	0.164	1070	550	0.023	771	921	0.777	848	778	0.962	858	775	0.664
CD20 <i>it</i>	8	4	0.539	3	12	0.127	10	6	0.555	8	7	0.909	7	12	0.065	10	3	0.089	
CD20 <i>p</i>	42	67	0.443	18	88	0.031	69	34	0.725	65	44	0.751	18	82	0.126	50	82	0.679	
MSS	CD3 <i>it</i>	510	637	0.281	499	698	0.051	540	588	0.451	540	698	0.060	556	674	0.418	417	674	0.050
	CD3 <i>p</i>	741	828	0.482	612	845	0.206	751	808	0.994	759	808	0.589	624	898	0.246	746	818	0.416
	CD8 <i>it</i>	108	155	0.379	82	174	0.014	142	155	0.314	108	163	0.058	127	159	0.342	82	189	0.051
	CD8 <i>p</i>	314	328	0.954	254	369	0.445	329	294	0.594	271	334	0.718	254	353	0.535	219	382	0.042
	CD45RO <i>it</i>	529	664	0.207	553	623	0.380	529	664	0.388	579	494	0.513	521	563	0.786	389	722	0.044
	CD45RO <i>p</i>	1228	1723	0.149	1598	1862	0.133	1144	1722	0.348	1598	1722	0.348	1144	1722	0.264	1610	1808	0.554
	T-Bet <i>it</i>	50	58	0.897	44	143	0.001	62	53	0.762	44	138	0.001	50	85	0.106	41	114	0.116
	T-Bet <i>p</i>	34	45	0.693	34	53	0.229	31	53	0.447	31	59	0.028	42	36	0.569	32	60	0.149
	FoxP3 <i>it</i>	255	233	0.588	230	255	0.379	255	233	0.598	161	291	0.035	200	319	0.015	276	233	0.961
	FoxP3 <i>p</i>	239	186	0.851	184	203	0.708	318	157	0.226	210	187	0.507	166	2377	0.480	218	152	0.614
	CD68 <i>it</i>	212	318	0.356	195	353	0.038	243	283	0.468	212	353	0.188	209	283	0.364	218	402	0.098
	CD68 <i>p</i>	507	531	0.420	441	708	0.099	519	500	0.842	501	531	0.773	531	500	0.706	475	633	0.399
CD20 <i>it</i>	6	7	0.349	4	21	0.018	6	15	0.257	6	15	0.213	5	11	0.223	4	11	0.058	
CD20 <i>p</i>	50	50	0.448	61	47	0.638	39	54	0.255	61	45	0.565	46	64	0.844	49	54	0.413	

La densité de cellules immunopositives localisées au centre (*it*) ou en périphérie (*p*) de la tumeur est donnée en nombre de cellules /mm<sup>2</sup> en fonction du niveau d'expression des chimiokines

**Tableau III :** Quantification des cytokines, chemokines et facteurs de croissance dans les CRC MSS et MSI.

significative, ne se limitait pas au centre de la tumeur et impliquait d'autres populations que les lymphocytes T mémoires CD45RO+.

## DISCUSSION

Les tumeurs de type MSI sont caractérisées par un microenvironnement tumoral inflammatoire qui pourrait expliquer leur bon pronostic (7). Dans cette étude, nous avons documenté le type de cellules inflammatoires recrutées au site tumoral et analysé leur contenu cytokinique. En utilisant un système d'analyse d'images permettant d'objectiver et de quantifier l'infiltrat immun, nous avons mis en évidence un recrutement de cellules inflammatoires orientées vers une réponse anti-tumorale (lymphocytes T cytotoxiques, helpers et mémoires) dans les tumeurs de type MSI alors que la densité en lymphocytes FoxP3,

qui contrecarrent cette réponse et sont plutôt orientés vers une tolérance immunologique, n'était pas modifiée par rapport aux tumeurs MSS.

Un des mécanismes impliqués dans le recrutement des cellules inflammatoires au site tumoral est l'expression, par les cellules tumorales et/ou par le microenvironnement tumoral, de facteurs de croissances, de chimiokines ou de cytokines (12). Nous avons montré un profil cytokinique particulier dans les mêmes échantillons que ceux pour lesquels un recrutement lymphocytaire existait. Ainsi, les chimiokines CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CCL5 étaient significativement surexprimées dans les tumeurs MSI par rapport aux tumeurs MSS. Ces chimiokines, pouvant être produites aussi bien par les cellules inflammatoires que par les cellules

tumorales, pourraient à leur tour participer au recrutement de cellules inflammatoires (12,13).

En résumé, nos données suggèrent l'existence d'une régulation fine du microenvironnement tumoral dans les tumeurs de type MSI conduisant à un re-

crutement de populations lymphocytaires spécifiques au travers de l'expression de chimiokines (14). En particulier, dans les CRC MSI, l'axe CXCL9/CXCL10 impliqué dans la polarisation d'une réponse immune de type Th1 est activé et participe très probablement au bon pronostic de ce type tumoral.

## BIBLIOGRAPHIE

1. SAMEER AS, NISSAR S, FATIMA K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 2014;23:246–57.
2. GEIERSBACH KB, SAMOWITZ WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:1269–77.
3. WOERNER SM, YUAN YP, BENNER A, KORFF S, VON KNEBEL DOEBERITZ M, BORK P. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D682–9.
4. LINNEBACHER M, GEBERT J, RUDY W, ET AL. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer J Int Cancer* 2001;93:6–11.
5. SCHWITALLE Y, KLOOR M, EIERMANN S, ET AL. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 2008;134:988–97.
6. SAETERDAL I, BJØRHEIM J, LISLERUD K, ET AL. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13255–60.
7. OGINO S, GOEL A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn JMD* 2008;10:13–27.
8. PAGÈS F, BERGER A, CAMUS M, ET AL. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2654–66.
9. GALON J, COSTES A, SANCHEZ-CABO F, ET AL. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960–4.
10. WANG K, KARIN M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res* 2015;128:173–96.
11. BOISSIÈRE-MICHOT F, DENOUEËL A, BOULLE N, ET AL. The non-crosslinking fixative RCL2®-CS100 is compatible with both pathology diagnosis and molecular analyses. *Pathol Oncol Res POR* 2013;19:41–53.

12. VERBEKE H, STRUYF S, LAUREYS G, VAN DAMME J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:345–58.
13. CHANG L-Y, LIN Y-C, MAHALINGAM J, ET AL. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- $\beta$ -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells. *Cancer Res* 2012;72:1092–102.
14. BOISSIÈRE-MICHOT F, LAZENNEC G, FRUGIER H, ET AL. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-instable colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2014;3:e29256.



## CULTURES DE FIBROBLASTES ISSUES DE BERGES DE FENTES LABIO-PALATINE : DESCRIPTION DU PROTOCOLE ET EXTRACTION D'ADN

François C.<sup>1,2,3,4</sup>, Dard R.<sup>1</sup>, Landais E.<sup>1</sup>, Laffon L.<sup>1</sup>, Birembaut P.<sup>5</sup>, Ta Phi Than N.<sup>1</sup>, Mangeonjean C.<sup>1</sup>, Feucher P.<sup>1</sup>, Gaillard D.<sup>1</sup>, Poli-Merol M.-L.<sup>2</sup>, NGuyen P.<sup>4</sup>, Doco-Fenzy M.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> *Génétique, Hôpital Maison Blanche, CHU Reims FRANCE*

<sup>2</sup> *Chirurgie pédiatrique American Memorial Hospital, CHU Reims France*

<sup>3</sup> *Chirurgie plastique et reconstructrice, hôpital maison Blanche, CHU Reims France*

<sup>4</sup> *EA 3801, Université de Reims Champagne Ardenne*

<sup>5</sup> *Histologie-Embryologie et biologie cellulaire. U903*

Auteur correspondant:

Caroline FRANCOIS, Service de chirurgie plastique et reconstructrice  
Hopital Maison Blanche, 45 rue Cognacq Jay, 51092 REIMS, FRANCE  
E-mail: caroline\_francois@icloud.com, Mobile: + 33 (0)6 82 87 38 93

### INTRODUCTION

Les fentes labiales et/ou palatines (FL/P) sont les anomalies cranio-faciales congénitales les plus fréquentes. Leurs origines étiologiques sont multiples (toxiques, génétiques ou environnementales). Fogh-Andersen en 1942 fut le premier à souligner le rôle de la génétique dans les fentes faciales. Depuis de nombreuses approches ont été utilisées pour définir ce rôle :

modèles animaux, analyse des réarrangements chromosomiques (caryotype), étude de liaison, études cliniques, séquençage de gènes candidats (1).

L'histoire de la culture cellulaire remonte à 1912 quand Carrel décrit la culture de tissu. Plus tard, en 1956, Tjio and Levan utilisèrent la culture de tissu fœtal humain et le choc hypotonique pour observer 46

chromosomes dans les cellules somatiques (2). La Cytogénétique humaine est devenue une science médicale en 1959 lors de la découverte de la trisomie 21. Les travaux reposent sur la préparation des chromosomes, obtenus sur des tissus à croissance rapide comme la moelle osseuse et les tissus néoplasiques ; mais également après culture cellulaire. Ces cellules sont des lymphocytes, des fibroblastes, ou des cellules amniotiques par exemple. De nombreuses méthodes de culture cellulaire ont été décrites, toutefois la technique décrite en 1960 par Moorhead reste une référence (3). Les premières cultures de fibroblastes furent réalisées à partir de biopsies cutanées. Par la suite d'autres tissus ont été utilisés comme les aponévroses, les muscles, les reins ou les organes génitaux d'animaux (4).

La plupart des études génétiques de FL/P ont été faites à partir d'échantillons de sang. A l'inverse, très peu d'études se concentrent sur les échantillons de tissus issus de berges de fentes labio-palatines. Pourtant, cette région est un support d'étude particulièrement intéressant, pour l'étude de l'expression génique en cas de mosaïcisme germinal mais également pour des études pharmacologiques ou thérapeutiques futures.

Cependant, si cette zone est accessible, les échantillons sont uniques, petits et peuvent être uniquement obtenus lors de la première chirurgie réparatrice.

De par la nature mixte (peau, muqueuse et parfois muscle) des prélève-

ments de berges de fente faciale le choix de la culture de fibroblaste nous a paru être le plus approprié. Cette technique, standardisée pour les biopsies cutanées n'est pas bien décrite pour les fentes, même si certains auteurs s'y réfèrent dans leurs études (5,6,7,8).

L'objectif de ce travail était le développement et la description précise d'un protocole simple, efficace et reproductible pour la culture de fibroblastes à partir d'excisions de berges de fentes labiales et/ou palatines.

## **MATERIELS & METHODE**

### ***Patients***

Cette étude prospective monocentrique, a inclut 48 patients opérés d'une chirurgie primaire de fente labio-palatine entre 2010 et 2012.

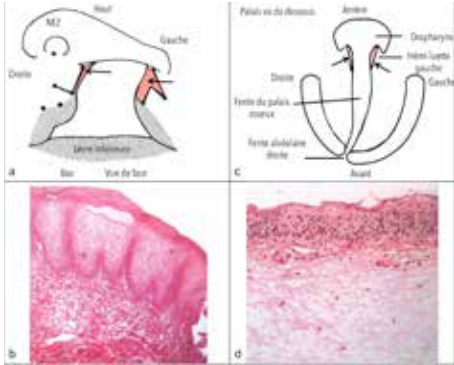
La population cible était constituée de patients avec fente labiale, fente labio-palatine (uni ou bilatérale), et fente palatine, requérant une chirurgie primaire réparatrice de la lèvre et/ou du palais. Les critères d'exclusion étaient les chirurgies secondaires ou le refus des parents à participer à l'étude génétique.

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique du CHU de Reims et les patients inclus dans l'étude après information complète des parents et signature du consentement.

### ***Prélèvement d'échantillon***

Les échantillons de tissu étaient prélevés pendant l'intervention chirurgicale

pour réparation primaire de fente labio-palatine (selon Tennison, modifiée par Malek, ou Millard, Figures 1a et 1c).



**Figure 1 :** Schémas opératoires et Histologie des prélèvements réséqués.

1a : Schéma opératoire de la cheiloplastie primaire. Après incision cutanéomuqueuse à la lame froide, les fragments opératoires réséqués issus de la plastie de la fente labiale ont été gardées (flèches noires). Les berges externes et internes ont été identifiées.

1b : Aspect externe de fentelabiale (HESx63), versant muqueux, surface muqueuse malpighienne hyperplasique et chorion fibreux.

1c : Schéma opératoire d'une fente labio-palatine. Lors de la chirurgie primaire du voile (Veau Wardill Kilner ou Furlow), les fragments opératoires réséqués issus de l'avivement de la luette aux ciseaux ont été gardés.

1d : Œdème du chorion sur berges de fentes vélo-palatines (HESx250).

### **Anatomopathologie**

Une analyse anatomopathologique a été réalisée sur 135 prélèvements, dont 111 berges de FL (berges externes et/ou internes) et 24 berges de FP.

Dans les FL (Fig. 1b), l'épithélium malpighien est hyperplasique dans 18% des cas mais décrit physiologiquement comme plus épais du côté buccal. L'hyperplasie des glandes sébacées dans 22% est fréquemment retrouvée dans d'autres contextes. La présence de muscle lisse sur quelques pré-

lèvements est surprenante. Il n'existe pas de différence anatomopathologique entre les berges externes et internes, même pour la vascularisation. Des nerfs ont été observés dans le cas des formes unilatérales. Parfois hypertrophiques, ils ont rarement été retrouvés au niveau des bourgeons médians des formes bilatérales.

Dans les prélèvements palatins, en l'absence de fente, le voile (dans sa partie membraneuse) et la luette sont constitués par une double lame de muscles striés composée du muscle pharyngostaphylin et du muscle palato-staphylin. Sur les deux faces de ce plan musculaire, on trouve une couche presque continue de glandes salivaires. La muqueuse proprement dite comporte un épithélium malpighien épais du côté buccal et beaucoup plus mince du côté pharyngien. Dans les FP (Fig. 1d) le chorion était fréquemment œdématié (secondairement à l'infiltration de xylocaïne?). La présence de muscle était inconstante, les vaisseaux sanguins et lymphatiques fréquemment congestifs. Une inflammation modérée était retrouvée pour 71% des cas.

### **Transport**

Au bloc opératoire, en salle, les échantillons étaient placés dans des flacons stériles préalablement remplis de milieu HAM/DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12, HiMedia Laboratories, Inde) avec substitut de sérum de veau foetal (Ultrosor G, Pall Life Science, USA), et antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine et Gentamycine, Invitrogen, Fischer Bioblock, USA), puis acheminés immédiatement au laboratoire de génétique.

## Culture cellulaire

Toutes les étapes ont été réalisées en environnement stérile. Nous avons fait le choix d'une dissociation mécanique. Au laboratoire, les échantillons étaient découpés au scalpel en fragments de quelques millimètres, puis placés dans une solution de dissociation à 37 °C composée de Collagénase de type II de Clostridium histolyticum à 1,25 g/L (Sigma Aldrich), de désoxyribonucléase I de pancréas de bœuf à 250 mg/L (Sigma Aldrich), dans le milieu de culture à 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Cette solution était filtrée et transférée dans des tubes de 100 mL (congelés si besoin). La durée de la dissociation dépendait de la taille de l'échantillon (entre 1 et 4 heures avec agitation douce toutes les 30 minutes). Une fois dissociées, les cellules étaient lavées avec le milieu HAM/DMEM F12 supplémenté en SVF pour inhiber l'action de la collagénase. Les échantillons étaient centrifugés à 1000rpm, 10min. Après décantation, le culot était ensemencé dans 6 mL de milieu de culture (HAM/DMEM F12) dans des boîtes de 25 cm<sup>3</sup> (GREINER type, Dominique Dutscher, France).

Le milieu de culture était constitué de :

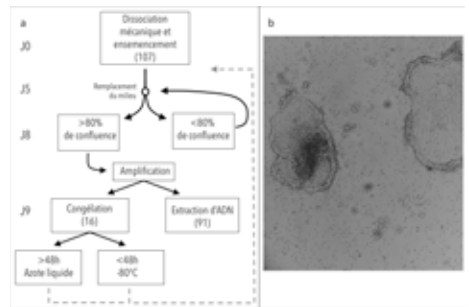
- DMEM/F12 Glutamax 1x, GIBCO (Fischer Bioblock Scientific, USA) supplémenté avec 4% de substrat de SVF ULTROSER G et reconstitué dans 20 mL de solution saline injectable.
- 20 mL de Pénicilline-Streptomycine à 0,5 % ( Invitrogen, Fischer Bioblock, 10000 unités par mL de Pénicilline et 10000 mg/mL de Streptomycine)

- 20 mL de Gentamycine à 0,1%, (Fischer Bioblock).

Les boîtes étaient placées dans un incubateur à 37 °C régulé en atmosphère humide 3 gaz (CO<sub>2</sub> 5 %, O<sub>2</sub> 5 % N<sub>2</sub> 90 %).

Le milieu était remplacé à J5 en vidant lentement les boîtes pour éliminer les cellules mortes non adhérentes, en suspension et en ajoutant 8 mL de milieu de culture frais.

Les boîtes étaient observées au microscope inversé (x40) à partir du 8<sup>ème</sup> jour afin d'apprécier la croissance des îlots cellulaires. Si le nombre et la taille de ces îlots atteignait 80% de confluence, la culture était amplifiée. Sinon, les boîtes étaient replacées dans l'incubateur et observées tous les jours jusqu'à obtenir une pousse satisfaisante des cellules. Le milieu de culture était ensuite changé tous les 2 jours à partir du 9<sup>ème</sup> jour (Fig. 2).



**Figure 2 :** Culture cellulaire.

2a : Etapes de culture.

2b : Îlots cellulaires en culture observés en inversion de phase.

L'amplification des cultures était réalisée en séparant les cellules des îlots de croissance où les mitoses se produisent

uniquement en périphérie. Une fois détachées les cellules étaient remises en culture comme décrit précédemment. Le but était d'obtenir une densité cellulaire homogène sur toute la surface de la boîte et d'augmenter ainsi la division cellulaire. Le détachement des cellules était réalisé avec une solution de PBS, trypsine-EDTA à 0,5 %. Le jour suivant le traitement par trypsine la confluence cellulaire était évaluée par observation au microscope inversé. Le milieu était remplacé par 8 mL de HAM/DMEM+ULTROSER G. Le lendemain, la confluence cellulaire atteignait souvent 70 à 80 % preuve d'une activité mitotique intense.

Certains échantillons étaient congelés à cette étape pour étudier la faisabilité d'une culture cellulaire après décongélation (comme décrit dans le protocole ci-après). D'autres échantillons étaient utilisés pour l'extraction d'ADN.

### ***Etape de congélation, décongélation et culture cellulaire***

Dans le but de réaliser une cryopréservation, après traitement des boîtes par la trypsine, les cellules dans le milieu de croissance étaient centrifugées et le surnageant avec les cellules mortes en suspension était éliminé. Nous ajoutions un agent cryoprotecteur, le « Recovery Cell Culture Freezing Medium » (InVitrogen F GIBCO, Fischer Bioblock) contenant du DMSO, du DMEM, et du SVF. Après suspension au vortex, le milieu était placé 24 h à 4 °C. Puis, les échantillons étaient transférés dans des cryotubes de 1,8 mL (NUNC by Dutscher) et placés à -80 °C pour au

moins 48 h. Puis dans l'azote liquide pour la conservation à long-terme.

La décongélation était réalisée rapidement à 37 °C au bain marie juste après avoir retiré le tube de l'azote liquide. Après décongélation, le milieu de culture avec du SVF était ajouté goutte à goutte et centrifugé. Les cellules étaient ensuite remises en suspension, transférées dans des boîtes et placées dans l'incubateur à 37 °C. Le milieu de culture était remplacé le lendemain. La suite du protocole était strictement similaire au protocole de culture cellulaire initiale.

### ***Extraction d'ADN***

L'extraction d'ADN des cultures cellulaires était réalisée sur colonnes QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit, Pays-Bas) en centrifugation suivant les recommandations du fournisseur.

### ***Contrôle***

Pour chaque extraction nous avons étudié le volume, la concentration en µg/mL (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) et la quantité d'ADN obtenue. Le contrôle de la qualité d'ADN était évalué par électrophorèse en gel d'agarose 1 % avant et après traitement par RNase.

## **RESULTATS**

Après recueil des consentements éclairés, 48 patients furent inclus consécutivement. 108 échantillons ont été prélevés (23 berges de fente palatine et 85 berges de fentes labiales). Sur les 108 échantillons, 107 ont été utilisés pour la culture cellulaire (1 échantillon n'ayant pas été placé

correctement dans le flacon de recueil en salle d'opération à été exclu). 91 des 107 échantillons ont suivi le protocole de culture directe sans congélation (protocole 1) et les 16 autres échantillons ont suivi le protocole de culture après congélation (protocole 2). La durée moyenne de la culture secondaire après décongélation était de 8j (5 à 17 jours).

Il y eut 5 échecs de culture suivant le premier protocole et 1 échec suivant le 2<sup>nd</sup> protocole (après culture primaire, congélation, décongélation et tentative de remise en culture). Il n'y a pas de différence significative au regard de la fréquence d'échecs entre les 2 types d'échantillons : palais ou lèvres (Fisher test  $p=0,525$ ).

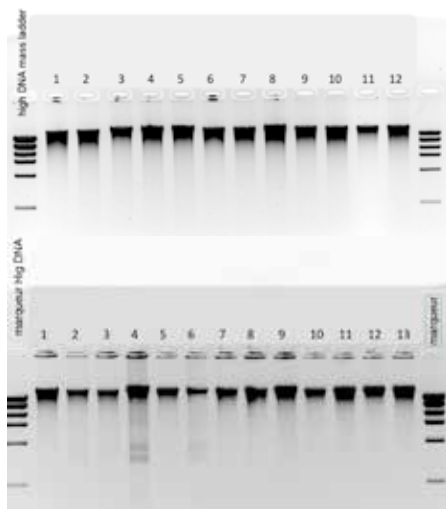
La durée moyenne de culture cellulaire était de 18 jours +/- décongélation (Tableau I). Il n'y a pas de différence significative dans la durée de culture entre les bords externes et internes des fentes labiales (Student t-test  $p=0,52$ ).

Nature du prélèvement	Nombre de prélèvements	Durée moyenne de culture (j)	Nombre d'extractions d'ADN	Quantité d'ADN (µg)	Concentration d'ADN (µg/µL)	Volume (µL)
Total FL/P	108	18 (7-54)	102	42 (1,9-191)	133 (9,6-273,6)	313 (100-1000)
FP	23	17 (8-39)	23	48 (3,5-96)	154,5 (23,5-273,6)	308,5 (150-500)
FL	85	18 (7-54)	79	41 (1,9-191)	127,7 (9,6-205,4)	314,2 (100-1000)
Dont bord externe de FL	42	19 (7-54)	40	45 (1,9-191)	126,5 (9,6-205,4)	334,21 (100-1000)
Dont bord interne de FL	43	17 (7-45)	39	37 (1,2-74)	127,8 (52,2-248,2)	292,9 (100-450)

**Tableau I** : Résultats de la culture cellulaire

Nous avons réalisé 102 extractions d'ADN (Tableau I). La quantité moyenne d'ADN obtenue après extraction était

42,31 mg par échantillon, avec un volume moyen de 312,98 µL et une concentration moyenne de 133,17 µg/µL. La qualité de l'ADN était satisfaisante après traitement par RNase (Figures 4 et 5).



**Figures 4 et 5** : Contrôle de la qualité des ADN par migration sur gel d'agarose, avant (4) et après (5), traitement par RNase.

## DISCUSSION

Nous nous sommes inspirés des protocoles de culture de fibroblastes de peau pour développer notre protocole. La petite taille de nos pièces d'exérèse chirurgicale s'est révélé ne pas être un facteur limitant. Ainsi ces tissus rares et précieux représentent une source d'ADN de bonne qualité, accessible, et réutilisable en quantité suffisante. Ces cultures peuvent être réutilisées à la demande puisque les cellules peuvent être remises en culture.

### *Echec de culture*

Nous avons recensé 5 échecs de culture

sur culture native (sans congélation initiale). 3 ont eu lieu sur une même semaine dont deux prélèvements issus d'un même malade. Ces échecs peuvent être liés à la manutention des cultures. Toutefois d'autres prélèvements réalisés au même moment et traités de la même manière ont correctement évolué. La taille initiale de l'échantillon est un facteur de réussite de la technique.

Nos cultures ont été réalisées par différents techniciens et techniciennes avec le même taux de réussite ce qui souligne la reproductibilité de cette technique.

Un échec de culture s'est produit après l'étape de congélation/décongélation. Le risque est connu et nécessiterait d'être étudié sur une plus grande série.

### ***Quantité et qualité d'ADN***

La qualité et la quantité de l'ADN issues de nos extractions est satisfaisante pour réaliser différentes techniques de cytogénétique comme la CGH-array.

### ***Perspectives***

Les fentes labio-palatines résultent d'un défaut de fusion des bourgeons primitifs de la face (frontonasal, maxillaire et mandibulaires). L'anomalie observée à la naissance révèle la localisation et la sévérité des défauts de fusion. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués individuellement ou en association durant la pathogenèse de la fente, comme la migration cellulaire, la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose.

De nombreux éléments ont été identifiés comme essentiels à la fusion : interaction épithélio-mésenchymateuse et molécules de signalisation (FGFs, BMPs, TGFs, MSX, DLX, PAX, TBX)<sup>2</sup>. L'étude de l'expression des gènes aux sites de fusion semble une voie de recherche intéressante. Grâce à la validation de ce protocole nous sommes désormais capables de poursuivre vers des études comparatives en 2 berges, ou entre fentes labiales et palatines depuis les cultures de fibroblastes issus des berges de fentes. Les cultures pourront permettre de tester différentes molécules ou protéines impliquées dans le développement des fentes sur les cellules cibles comme cela est déjà le cas en cosmétologie.

### **CONCLUSION**

La culture de fibroblastes issue des berges des fentes labio-palatines est une méthode intéressante pour obtenir de l'ADN et des cellules de bonne qualité en grande quantité au regard de la zone malformée. Malgré les risques connus de dérivation génétique des cultures, cette approche reste intéressante car les prélèvements accessibles sont très petits et uniques. Notre étude montre que cette technique est simple, fiable et reproductible. Cela en fait un outil très utile pour des études plus approfondies sur les modèles animaux et fœtaux.

### ***Conflits d'intérêt***

L'auteur ne déclare aucun conflit d'intérêt.

## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été réalisé avec le soutien de l'AOL 2011-2012 fentes labio-palatine du CHU REIMS.

We wish to thank the the American Memorial Hospital Fondation Inc (Boston USA) for their aid in the field of research on facial clefts.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BOSI G ET AL. Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. *J Dent Res*, 1998 ;77(8) :1613-21.
2. MARINUCCI L ET AL. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. *Toxicology*, 2009 ;257(1-2) :10-6.
3. LONGO LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. The chromosome number in man. Joe Hin Tjio and Albert Levan. *Hereditas*, vol. 42, 1956 . *Am J Obstet Gynecol*. 1978 Mar 15 ;130(6) :722.
4. MOORHEAD PS ET AL. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, 1960 ;20 :613.
5. DE GROUCHY J ET AL. Cytogenetic, biochemical and morphological studies of a continuous cell line (Cy-LMC-1). *Ann Genet*, 1970 ;13 :141-143.
6. FOGH-ANDERSEN ET AL. Inheritance of harelip and cleft palate. *Nyt Nordisk Forlag*. Arnold Busk.Copenhagen, 1942.
7. BARONI ET AL. Human cleft lip and palate fibroblasts and normal nicotine-treated fibroblasts show altered *in vitro* expressions of genes related to molecular signaling pathways and extracellular matrix metabolism. *J Cell Physiol*, 2010 ;222(3) :748-56.
8. BUENO DF ET AL. Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls. *Stem Cell Rev*, 2011 ;7(2) :446-57.



## METHODE D'ORIENTATION DE L'ŒIL POUR L'ANALYSE HISTOLOGIQUE DE ZONES CIBLEES DE LA RETINE CHEZ LA SOURIS

Nabholz N., Kalatzis V., Pequignot M.-O.

*Inserm U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, CHU St Eloi, 80 rue Augustin  
Fliche 34000 Montpellier*

### INTRODUCTION

La rétine tapisse le fond de l'œil et est composée de deux feuillets, la neurorétine (NR) et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), ces 2 couches étant séparées par un espace virtuel (1). La neurorétine est elle-même formée de différentes couches cellulaires dont, de l'extérieur vers l'intérieur du globe, la couche nucléaire externe (CNE), qui contient les noyaux des photorécepteurs (PR), la couche nucléaire interne (CNI), contenant la majorité des interneurons, et la couche des cellules ganglionnaires (CCG), qui contient les cellules ganglionnaires et des interneurons. La lumière traverse toute la neurorétine pour être captée par les PR, qui transforment le signal lumineux en signal électrophysiologique. Ce signal est ensuite trans-

mis aux interneurons qui le transmettent eux-mêmes aux cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique qui achemine le signal au cerveau. L'épithélium pigmentaire rétinien, qui se trouve en arrière de la NR, en regard des PR, est une couche de soutien cruciale pour la survie et le bon fonctionnement des PR et forme avec eux un couple interdépendant pour leur survie. Tout dysfonctionnement de l'une des couches entraîne le dysfonctionnement de l'autre et souvent la dégénérescence plus ou moins rapide des deux, ce qui aboutit à la cécité.

En France, plus de 130 000 personnes souffrent de cécité légale (acuité visuelle < 1/20 selon l'OMS). Plus de 50 % de ces cécités sont dues à des pathologies réti-

niennes héréditaires dont les rétinopathies pigmentaires, caractérisées par une dégénérescence des PR et/ou de l'EPR (2) et à ce jour, ils ne bénéficient d'aucun traitement. Le but de l'équipe est de mettre au point des thérapies innovantes pour ces maladies (telle que la thérapie génique) (3). Les produits thérapeutiques sont préférentiellement administrés localement par injection sous-rétinienne, c'est-à-dire dans l'espace virtuel entre les PR et l'EPR. Suite à cette administration, la toxicité éventuelle du produit doit être étudiée en analysant dans le temps le nombre de PR tout le long de la zone injectée par rapport à la zone non injectée et par rapport à des yeux non injectés ou ayant reçu des injections contrôles.

Lors de l'injection, la NR est séparée de l'EPR par le liquide puis se ré-accole dans les heures qui suivent par résorption de ce liquide à travers l'EPR. Il est possible de voir la zone injectée dans les quelques semaines qui suivent, cependant cette visualisation s'estompe avec le temps et il n'est plus possible de reconnaître la zone injectée de la zone non injectée à deux mois post-injection. De plus, même si nous notons précisément l'emplacement de la zone injectée le jour de l'injection, l'œil, une fois extrait de son orbite, est complètement symétrique par rapport au nerf optique, qui se trouve dans le pôle postérieur, il n'est donc pas possible après dissection de déterminer la zone ventrale de la zone dorsale.

Nous avons donc mis au point une méthode simple permettant d'orienter

l'œil d'un bout à l'autre du traitement de l'échantillon afin d'obtenir des coupes sagittales de globe oculaire contenant à coup sûr la zone rétinienne d'intérêt (hémirétine injectée) et une zone contrôle (hémirétine non injectée).

## **MATÉRIEL ET MÉTHODE**

Les souris utilisées sont des C57BL/6J mâles de 8 semaines (Harlan, France). Elles sont hébergées dans des cages en plastiques transparents avec un environnement enrichi dans une ambiance lumineuse de 12 heures à 90 lux/12 heures d'obscurité, et nourries ad libitum avec un régime alimentaire standard pour rongeurs. La saisine d'éthique correspondante porte le numéro 01815.01.

Les injections se font après anesthésie générale par injection intra-péritonéale d'un mélange de xylazine (28 mg/kg, Bayer Healthcare, Allemagne) et de kétamine (70 mg/kg, Merial, France). L'administration d'une goutte de tropicamide collyre (0,5 %, Théa, France) permet d'obtenir une mydriase puis l'anesthésie locale est réalisée par l'administration cornéenne d'une goutte de chlorhydrate d'oxybuprocaine (0,4 %, Bausch + Lomb, France). La cornée est protégée de l'assèchement pendant toute l'anesthésie par instillation d'une couche de gel ophtalmique (Alcon, France).

Les yeux sont injectés soit avec du NaCl 0,9 % (témoin d'un possible effet délétère de l'injection), soit avec la GFP (Green Fluorescent Protein, connue pour avoir un effet toxique dose-dépendant sur

les photorécepteurs, codée dans un vecteur viral) (4).

L'expérience se fait sous un microscope chirurgical (M80, Leica) dont l'axe de la lumière et l'axe optique sont confondus, ce qui permet d'éclairer le fond de l'œil. Pour l'injection, afin d'obtenir une surface plane, une lamelle de verre (lamelle ronde d'histologie) est déposée sur la couche de gel ophtalmique, et l'œil est maintenu à l'aide d'une pince par la sclère. L'injection sous-rétinienne de 2  $\mu$ l se fait par une approche trans-vitréenne par l'intermédiaire d'une aiguille de 34 gauges. Le décollement de la rétine apparaît sous la forme d'un dôme blanc, sa taille et sa position (naso-temporale et dorso-ventrale) sont immédiatement notées sur le compte rendu papier de l'expérience. L'animal est ensuite placé sur une plaque chauffante et surveillé jusqu'au réveil. Aucune infection n'a été observée suite à cette procédure. La NR et l'EPR se ré-accolent très rapidement après l'injection.

L'aspect de la rétine peut être étudié à différents temps (par exemple 1 mois, 2 mois et plus de 6 mois) post-injection par photographie du fond d'œil à l'aide d'un Micron III (Phoenix, Etats-Unis). Cet appareil possède une caméra permettant de visualiser le fond d'œil chez le rongeur anesthésié, en lumière visible et en fluorescence verte (GFP).

Pour l'analyse histologique, 2 mois post-injection, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. L'œil de la souris étant parfaitement symétrique dans toutes

les directions par rapport au centre, une incision dans la cornée de chaque œil est pratiquée en regard du centre de la zone injectée, en se référant au compte-rendu des injections, afin de la repérer. Puis l'œil est extrait de l'orbite et immergé dans une solution de formaldéhyde 4% sur la nuit. Le lendemain, l'œil est rincé dans du PBS 1X, puis disséqué sous loupe binoculaire (Leica) et orienté, à l'aide d'un fil chirurgical (Novosyn, Braun, référence 0069206) placé à travers la rétine et la sclère puis noué. Le cristallin, inutile pour notre étude, est extrait afin de permettre une imprégnation plus efficace de l'intérieur de l'œil et de faciliter la coupe. L'œil est placé dans une solution d'éthanol 70%, première étape de déshydratation en vue de l'inclusion en paraffine, et coupé (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM), France). Seize coupes successives de 4  $\mu$ m passant par le nerf optique (ou proches) sont alors colorées en hématoxyline/éosine/safran selon un protocole standard (RHEM), puis scannées sur nanozoomer (Hamamatsu, Plateforme Montpellier RIO Imaging (MRI), France). Pour chaque globe oculaire, 4 coupes histologiques sont choisies pour leur intégrité (il peut y avoir présence de plis, de petits défauts) et leur netteté après scan, et analysées.

## RÉSULTATS – DISCUSSION

Le but premier de ce travail était de mettre au point une technique permettant d'orienter l'œil pour des études histologiques post-administration sous-rétinienne d'un produit d'intérêt. Il s'agissait d'obtenir des coupes histologiques sagittales du

segment postérieur des globes oculaires passant par le nerf optique et par le plus grand diamètre de la zone injectée.

L'objectif scientifique était ensuite de réaliser une étude histopathologique analytique de la zone injectée afin d'évaluer une toxicité potentielle du produit administré. Cette étude a été effectuée par comptage du nombre de noyaux de photorécepteurs et comparaison des résultats entre la zone rétinienne injectée et la zone non injectée d'un même globe oculaire, et par comparaison avec des yeux non injectés (NI) ou injectés avec du NaCl 0,9 % (NaCl).

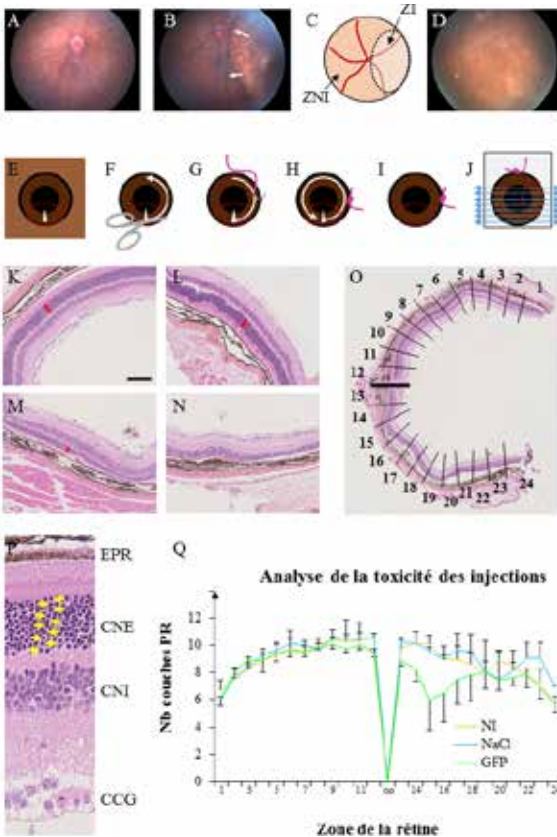
Après 15 jours, lors de l'observation au micron III, qui permet de voir le fond d'œil et donc l'aspect de la rétine, la zone injectée est clairement délimitée, par la fluorescence verte dans le cas des yeux exprimant de la GFP (non montré) mais aussi dans les yeux injectés par NaCl 0,9 % car elle est bordée d'une ligne noire non observable chez les yeux contrôles (Fig. 1A), correspondant vraisemblablement à un ré-accolement imparfait de la NR sur l'EPR (Fig. 1B et 1C) dans les heures qui suivent l'injection. Cependant, cette ligne noire s'estompe au cours des semaines et a disparu dans la plupart des cas à 2 mois, au temps correspondant à la dissection (Fig. 1D).

Nous avons donc cherché une solution simple pour orienter les yeux de la dissection jusqu'à la coupe. Pour cela, lors de l'injection, la position de la zone de décollement, à la fois dans le sens naso-temporal et dorso-ventral a été soigneusement

notée. Cette position a été vérifiée lors de l'observation des rétines au micron III à 15 jours.

Lors de la dissection, une incision dans la cornée de chaque œil est pratiquée en regard du plus grand diamètre (passant par le nerf optique) de la zone injectée (Fig. 1E) puis l'œil est délicatement sorti de l'orbite en sectionnant soigneusement les muscles oculo-moteurs et le nerf optique, avant fixation. Le lendemain, la cornée est découpée en périphérie sur la moitié dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Fig. 1F). À l'aide d'une aiguille chirurgicale passant dans le globe oculaire, un fil est placé à travers la rétine et la sclère à 90° de la zone injectée (Fig. 1G) et un nœud plat est fait (Fig. 1H). La cornée est ensuite complètement découpée le long du limbe (anneau blanc sur le pourtour de l'œil) et le cristallin et l'iris enlevés (Fig. 1I). Lorsque l'œil est inclus en paraffine, le fil, bien visible, est placé vers le haut dans la cassette d'inclusion (Fig. 1J). L'œil est ensuite coupé en commençant par le bas. Les coupes passant par le nerf optique sont colorées en hématoxyline/éosine/safran, puis scannées.

L'analyse se fait sur 4 coupes par œil. Grâce à l'orientation, la zone injectée se trouve toujours à la même place sur la lame. Les héli-rétines non injectées, comme les rétines des yeux non injectés, n'ont pas de remaniements (Fig. 1K), alors que pour les autres héli-rétines, l'aspect varie d'une structure normale (Fig. 1L) à un affinement des couches de la NR (Fig. 1M), voire un remaniement de la NR et de



**Figure 1 :**

**A.** Photographie du fond d'un œil non injecté. La structure arrondie blanchâtre correspond au nerf optique.

**B.** Photographie du fond d'un œil injecté à 15 jours post-injection, montrant une ligne noire bordant la zone d'injection (flèches blanches).

**C.** Schéma représentant la zone injectée correspondant à la photographie de la figure B.

**D.** Photographie du fond d'un œil injecté à 3 mois post-injection, ne présentant plus de zone d'injection identifiable.

**E à J.** Schémas des différentes étapes de l'orientation de l'œil. La zone d'injection est délimitée par des pointillés rouges E. Incision de la cornée dans l'alignement du plus grand diamètre (passant par le nerf optique) de la zone d'injection (tête de flèche blanche).

**F.** Découpe de la moitié de la cornée dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.

**G.** Pose d'un point, à l'aide d'une aiguille chirurgicale à travers la rétine, la choroïde et la sclère, permettant de réaliser un nœud plat à 90° du plus grand diamètre de la zone d'injection.

**H.** Découpe complète de la cornée.

**I.** Séparation et extraction du cristallin avant imprégnation en paraffine.

**J.** Orientation de l'œil dans la cassette à l'étape d'inclusion avec le nœud en haut, et le bord opposé positionné contre le fond du moule. Le nerf optique est placé en arrière, l'œil étant en position «debout», ce qui permet l'obtention de coupes passant par le plus grand diamètre de la zone d'injection après avoir dégrossi le bloc jusqu'à la zone d'intérêt.

**K à P.** Coupes des globes oculaires colorées à l'hématoxyline/éosine/safran montrant les différentes couches de l'œil.

**K à N.** Les 4 photographies sont prises au même grossissement. La barre rouge indique l'épaisseur de la couche d'intérêt : la couche des noyaux des PR (couche nucléaire externe). La barre noire indique 100µm.

**K.** Portion de coupe d'un œil injecté dans l'hémi-rétine contrôle, non injectée.

**L à N.** Portions de coupe d'un œil injecté dans la partie injectée.

**L.** La couche d'intérêt est de taille normale.

**M.** La couche d'intérêt est d'épaisseur réduite.

**N.** La couche d'intérêt est réduite à un noyau à gauche et est totalement absente à droite.

**O.** Photographie d'une coupe de rétine colorée à l'hématoxyline/éosine/safran. La barre noire épaisse, placée sur le nerf optique, sépare la coupe en 2 hémi-rétines, l'hémi-rétine injectée se situant toujours en bas. Chaque hémi-rétine est ensuite découpée en 12 portions dans lesquelles sont comptés les noyaux des PR.

**P.** Photographie d'une portion de coupe de rétine montrant les couches de noyaux. La CNE est formée de l'empilement des noyaux des PR, qui sont comptés en colonne. Exemple donné par les flèches jaunes montrant une colonne de 10 noyaux.

**Q.** Courbe représentant, pour chaque groupe, la moyenne du nombre de couches de PR dans chaque portion de rétine. Au niveau du nerf optique (no), les couches rétinienne s'interrompent (voir Figure 1O), d'où le «V» du milieu de courbe. Noter la plus grande variabilité des résultats dans l'hémi-rétine injectée (barres d'erreurs plus grandes), ainsi qu'une zone de toxicité due à l'injection du vecteur GFP (courbe verte).

l'EPR (Fig. 1N). Pour chaque coupe analysée, chaque héli-rétine est séparée manuellement, sur photographie de la coupe, en 12 portions par l'ajout de barres régulièrement espacées (Fig. 1O). Le nombre de couches de noyaux de PR qui forment la couche nucléaire externe (CNE) est compté manuellement (exemple en Fig. 1P) sur les 12 segments définis. La moyenne du nombre de couches de PR pour chaque héli-rétine est ensuite calculée pour chacun des yeux puis la moyenne de chaque groupe est représentée sous forme de courbe (Fig. 1Q).

L'analyse de cette expérience permet de voir, d'une part, la différence entre les héli-rétines injectées et non injectées lorsqu'elle existe. En particulier dans notre étude, une plus grande variabilité des données est observée dans les héli-rétines injectées. D'autre part, l'injection de NaCl 0,9% n'induit pas de dégénérescence des photorécepteurs à 2 mois post-injection. Enfin, les héli-rétines exprimant la GFP montrent un plus faible nombre de couches de noyaux de photorécepteurs, ce qui est cohérent avec la toxicité connue de cette protéine sur la rétine (exemple dans (4)).

## CONCLUSION

Le protocole technique d'orientation, de recoupe, d'inclusion et de coupe de globes oculaires de souris fixés au formol décrit est simple à mettre en œuvre et permet de visualiser et donc de pouvoir comparer dans un même globe oculaire une zone rétinienne injectée et une zone non injectée, cette dernière constituant un contrôle interne intrinsèque. Ceci est

indispensable en particulier pour analyser les yeux d'un même groupe en comptant toujours le nombre de couches de noyaux de PR le long du plus grand diamètre (passant par le nerf optique) de l'injection.

L'histologie conventionnelle en coloration H&E, couplée à ce protocole, permet en particulier d'étudier la toxicité de divers produits thérapeutiques injectés par voie sous-rétinienne, grâce à un comptage du nombre de noyaux constituant l'épaisseur de la couche nucléaire externe de la rétine.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel de l'animalerie de l'INM, le RHEM et son personnel, MRI et son personnel, et l'ensemble de l'équipe Génétique et Thérapies des cécités rétinienne et du nerf optique de l'INM. Nous remercions la Fondation de France, Rétina France et France Choroi-démie pour leur soutien financier.

## BIBLIOGRAPHIE

1. SIMO R, VILLARROEL M, CORRALIZA L, HERNANDEZ C, GARCIA-RAMIREZ M (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the bloodretinal barrier—implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*.
2. HAMEL CP (2013). Inherited retinal dystrophies: contributions of molecular genetics *Biol Aujourdhui*.
3. CERESO N\*, PEQUIGNOT MO\*, ROBERT L, BECKER F, DE LUCA V, NABHOLZ N, RIGAU V, DE VOS J, HAMEL CP, KALATZIS V (2014). Proof of concept for AAV2/5-mediated gene therapy in iPSC-derived retinal pigment epithelium of a choroideremia patient. *Mol Ther Methods Clin Dev*. \* co-premiers auteurs.
4. TOLMACHOVA T, TOLMACHOV OE, BARNARDAR, DE SILVA SR, LIPINSKI DM, WALKER NJ, MACLAREN RE, SEABRA MC (2013). Functional expression of Rab escort protein 1 following AAV2-mediated gene delivery in the retina of choroideremia mice and human cells ex vivo. *J Mol Med (Berl)*.



# ILLUSTRATION DE L'UTILISATION DE LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION *IN SITU* POUR LA CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTS SOUS-TYPES DE NEURONES SENSORIELS DANS LE GANGLION RACHIDIEN DE SOURIS

Ventéo S.

*Inserm U1051, Institut des Neurosciences de Montpellier, Hôpital St Eloi,  
80 rue Augustin Fliche, 34091 Montpellier cedex 5  
vente@univ-montp2.fr*

## RÉSUMÉ

Le système somatosensoriel permet le traitement de diverses modalités sensorielles telles que la mécanoreception, la proprioception, la nociception et la thermoreception. Au niveau du tronc, la perception de ces diverses sensations met en jeu des récepteurs neuronaux périphériques spécialisés dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens ou ganglions de la racine dorsale (GRDs). Par différentes approches transcriptomiques, nous avons identifié plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans la mise en place et/ou le fonctionnement de ce système en conditions normales et pathologiques. Cet article illustre comment la technique d'hybridation *in situ* a permis la validation

des gènes candidats issus de ces criblages en établissant leur profil d'expression au sein des GRDs. La caractérisation fine des populations de neurones sensoriels dans lesquelles ils sont exprimés a été réalisée grâce à des marquages en double hybridation *in situ* et/ou en hybridation *in situ* couplée à une immunohistochimie. Ainsi, ces études nous ont permis d'identifier et de caractériser : 1) des marqueurs spécifiques de populations de neurones sensitifs au sein des GRDs ; 2) une population fine de neurones impliquée dans la perception du toucher ; 3) un nouvel acteur de la régénération des nerfs périphériques après lésion ; et 4) une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques.

The somatosensory system processes several sensory modalities including mechanoreception, proprioception, nociception and thermoception. At trunk levels, the perception of these diverse sensations involves highly specialized peripheral neuronal receptors whose cell bodies are located in the dorsal root ganglia (DRGs). Through various transcriptomic approaches, we have identified new molecular determinants involved in the development and/or functioning of the somatosensory system in normal and pathological conditions. This article illustrates how the *in situ* hybridization technique allowed the validation of candidate genes issued from these screens by establishing their expression profiles in the DRGs. To precisely characterize the sensory neuron subtypes in which they are expressed, we performed double *in situ* hybridization analyses and/or *in situ* hybridization coupled with immunostaining. Altogether these studies have allowed us to identify and characterize: 1) several molecular markers expressed in specific DRG sensory neuron subtypes; 2) a discrete population of mechanoreceptive neurons involved in touch sensations; 3) a new molecular actor involved in peripheral nerve regeneration after lesion; and 4) a new potential therapeutic target for chronic neuropathic pain treatment.

## INTRODUCTION

La technique d'hybridation *in situ* (HIS), mise au point en 1969 pour la localisation chromosomique des gènes (1), a été ensuite adaptée afin d'étudier la localisation des ARN messagers d'un gène donné dans un tissu biologique, avec une

résolution cellulaire. Elle permet une analyse spatiale et temporelle de l'expression génique et représente une méthode alternative ou complémentaire de l'immunohistochimie. Cet article a pour but de présenter comment la technique d'HIS a constitué une méthode de choix pour nos études du système somatosensoriel.

Le système somatosensoriel est la composante du système nerveux qui nous fait prendre conscience de l'état de notre corps dans l'espace et des stimuli qu'il subit de la part de l'environnement. Il regroupe les mécanismes nerveux chargés de détecter les sensations du corps, communément appelées «sensations somatiques», et de les transmettre vers le système nerveux central où elles seront traitées de façon à engendrer une réponse adaptative adéquate. La somesthésie regroupe 4 grandes modalités que sont la mécanoreception, la proprioception, la nociception et la thermoception. La nociception englobe les mécanismes qui permettent la perception des stimuli douloureux détectés en périphérie. La thermoception est le sens qui permet la perception de la chaleur (entre 30 et 45 °C) et du froid (entre 10 et 30 °C). La mécanoreception désigne les mécanismes nerveux mis en jeu afin de percevoir les sensations du toucher correspondant à des stimuli mécaniques non douloureux. La proprioception représente le sens qui nous permet de connaître à tout instant la position et les mouvements de chaque partie de notre corps dans l'espace de sorte à ajuster les contractions musculaires et ainsi d'assurer des mouvements coordonnés et fluides. La perception de ces diverses sensations met en jeu des

récepteurs neuronaux périphériques spécialisés dont les corps cellulaires se localisent dans les ganglions de la racine dorsale (GRDs) au niveau du tronc. Les GRDs sont localisés dans l'espace péri-dural de la colonne vertébrale, contre la paroi osseuse. Ils forment deux chaînes situées de part et d'autre de la moelle épinière et sont situés sur le trajet de la racine dorsale des nerfs spinaux entrant dans la moelle au niveau de chaque métamère.

Afin d'étendre nos connaissances sur la mise en place et le fonctionnement du système somatosensoriel en conditions normales et pathologiques, nous avons entrepris le criblage différentiel de différentes banques SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) générées à partir 1) de GRDs à différents stades du développement (prélevés au jour embryonnaire 13 (E13), à la naissance (P0) et au stade adulte) ; 2) de GRDs dépourvus de neurones thermoceptifs (prélevés à partir de souris mutantes pour le gène *TrkA* codant pour le récepteur du Nerve Growth Factor) ou 3) de GRDs prélevés en condition traumatique après lésion du nerf sciatique (2) (3). Notre choix s'est porté sur la technologie SAGE car elle présentait l'avantage de fournir une analyse globale et quantitative de l'expression génique dans un tissu donné à un stade donné, mais aussi d'appartenir aux stratégies qualifiées d'«open system» c'est à dire permettant l'identification de gènes encore inconnus (4) (5). Les résultats issus de ces analyses transcriptomiques ont été dans un premier temps validés par PCR quantitative en temps réel. Dans un deuxième temps, l'expression des ARN mes-

sagers des gènes d'intérêt a été étudiée au niveau cellulaire par la technique d'HIS.

Les neurones sensoriels du GRD forment une population hétérogène et sont distinguables sur la base de critères anatomiques (taille de leur soma, diamètre et degré de myélinisation de leur axone, morphologie de leur terminaison axonale à la périphérie et le site de leur projection au sein du système nerveux central), fonctionnels (vitesse de conduction des potentiels d'action) et moléculaires (expression de marqueurs moléculaires appartenant à diverse familles : facteurs de transcription, récepteurs membranaires, canaux ioniques, neuropeptides). Une classification simplifiée des différents sous-types de neurones sensoriels des ganglions spinaux chez la souris adulte est présentée dans le Tableau I. De nombreux travaux se sont attachés à identifier des gènes exprimés dans les diverses sous-populations neuronales au sein des GRDs. Cependant le nombre de ces marqueurs, même s'il est en constante augmentation, reste encore relativement limité. La mise au point d'un protocole fiable, rapide et économique d'identification histologique des différents sous-types de neurones sensoriels dans le GRD, a été essentielle pour nos travaux. En particulier, par la technique d'HIS en double marquages ou couplée à un marquage immunohistochimique, nous avons pu déterminer précisément sur coupe de tissus dans quelles populations de neurones sensoriels étaient exprimés les gènes candidats révélés par le criblage des différentes banques SAGE.

	<b>Nociceptifs</b>	<b>Mécanosensitifs</b>	<b>Proprioceptifs</b>
<b>Taille soma (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	20-30	30-40	40-50
<b>Type de fibre principale</b>	Ad, C	Ab, Ad	Aa
<b>Diamètre de la fibre (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	1-5	6-12	13-20
<b>Vitesse de conduction (m/s)</b>	5-30	35-75	80-120
<b>Terminaisons périphériques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terminaisons libres</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disques de Merkel</li> <li>• Corpuscules de Meissner</li> <li>• Terminaisons de Ruffini</li> <li>• Corpuscules de Pacini</li> <li>• Follicule pileux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuseau neuromusculaire</li> <li>• Organes tendineux de Golgi</li> <li>• Récepteurs articulaires</li> </ul>
<b>Terminaisons centrales</b>	Lamina I et II-III	Lamina III et IV	Lamina VI-VII et IX
<b>Récepteurs aux facteurs neurotrophiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Récepteur TrkA pour le NGF (P)</li> <li>• Récepteur Ret (NP), GFR-<math>\alpha</math>1 et <math>\alpha</math>2 pour le GDNF et la neurturine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Récepteur TrkB pour le BDNF et la NT4/5</li> <li>• Récepteur Ret pour le GDNF et la neurturine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Récepteur TrkC pour la NT3</li> </ul>
<b>Récepteurs couplés aux protéines G</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• récepteurs au NPY</li> <li>• PARs</li> <li>• récepteur à la bradykinine</li> <li>• récepteurs à la prostaglandine</li> <li>• récepteurs aux opioïdes</li> <li>• Mrgprs</li> </ul>		
<b>Marqueurs structuraux</b>	Périphérie (NM)	NF200 (M)	NF200 (M)
<b>Neuropeptides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropeptide Y (P)</li> <li>• Substance P (P)</li> <li>• CGRP (P)</li> <li>• Cholécystokinine (P)</li> <li>• Somatostatine (P)</li> </ul>		
<b>Protéines liant le calcium</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calbindine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calbindine</li> <li>• Calrétinine</li> <li>• Parvalbumine</li> </ul>
<b>Glycoprotéines</b>	se lie à l'IB4 (NP)		
<b>Enzymes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phosphatase acide, FRAP</li> <li>• TMP</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anhydrase carbonique</li> </ul>
<b>Facteurs de transcription</b>	Runx1 (TrkA-/IB4+/Ret+)	c-Maf, MafA	ER81, Runx3
<b>Canaux ioniques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9</li> <li>• Canaux calciques de type T bas seuil (TrkA-/IB4-)</li> <li>• aKv1.4 (NP)</li> <li>• TREK1</li> <li>• TRPV1</li> <li>• ASIC1, ASIC2 et ASIC3</li> <li>• P2X3 (NP et IB4+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nav1.1 et Nav1.6</li> <li>• Kv1.1 et Kv1.2</li> <li>• TRPV2</li> <li>• Cav3.2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nav1.1 et Nav1.6</li> <li>• Kv1.1 et Kv1.2</li> <li>• TRPV2</li> </ul>

**Tableau I** : Classification simplifiée des neurones sensoriels des ganglions spinaux de souris adultes.  
P : Peptidergique ; NP : Non Peptidergique ; M : Myélinisé ; NM : Non Myélinisé

Ainsi, l'ensemble de cette étude nous a permis d'identifier et de caractériser : 1) des marqueurs spécifiques de populations de neurones sensitifs au sein des GRDs ; 2) une population fine de neurones impliquée dans la perception du toucher ; 3) un nouvel acteur de la régénération des nerfs périphériques après lésion ; et 4) une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### ***Animaux et chirurgie***

Toutes les expériences ont été approuvées par la direction départementale des services vétérinaires de l'Hérault (autorisation d'expérimentation animale n°34-376, 17 février 2009) et réalisées selon les directives de l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP).

Des souris issues de la lignée C57BL/6 et âgées de 8 semaines sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (induction 4-5 %, maintien 1,5-2 %) pendant la chirurgie d'axotomie. La patte arrière gauche de l'animal est immobilisée en position latérale. La peau est incisée à mi-cuisse et les couches de muscle sont séparées afin d'atteindre le nerf sciatique. Une portion de 2 à 4 mm de nerf est sectionnée et retirée. Afin de visualiser les neurones lésés par l'axotomie dans le GRD, l'extrémité de la portion proximale du nerf sectionné est immergée dans une goutte de solution de traceur rétrograde (Fluorogold à 1%). Les couches de muscle sont ensuite délicatement repositionnées et la plaie est refermée par un point de suture. Une injection

sous-cutanée de NaCl 0,9% (10 ml/kg) est réalisée afin d'éviter la déshydratation de l'animal.

### ***Préparation des tissus***

Les souris sont préalablement anesthésiées (Ketamine à 100 mg/kg et Xylazine à 10 mg/kg) puis euthanasiées par dislocation cérébrale. La colonne vertébrale est disséquée puis coupée en deux dans le sens de la longueur. Après avoir retiré la moelle épinière, les GRDs lombaires 4 à 6 logés contre la paroi osseuse sont prélevés dans du PBS stérile. Les ganglions sont ensuite fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 1 h à température ambiante (TA) et cryopréservés dans une solution de sucrose à 25 % pendant une nuit à 4 °C avant d'être inclus dans un milieu d'enrobage (OCT compound, Tissue-Tek). Des coupes de 14 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat et sont collectées sur des lames Super Frost Plus (Fisher Scientific) et conservées à -80 °C.

### ***Synthèse des ribosondes***

Les ARN totaux extraits de GRDs de souris sont rétro transcrits par RT-PCR. Les séquences d'ADNc sont amplifiées par PCR à l'aide des couples d'oligonucléotides spécifiques des séquences nucléotidiques à visualiser et correspondant aux gènes recherchés. Les fragments amplifiés ainsi obtenus sont clonés sur le principe du «TA cloning» dans le vecteur pGEM-T easy en utilisant le «pGEM-T Easy Vector System I» (réf. A1360, Promega). Le «TA cloning» est une méthode de clonage simple et rapide. Le principe de cette méthode repose sur le fait que les ADN

polymérasés dépourvues d'activité exonucléasique de 3' vers 5', comme la Taq polymérase, ajoutent préférentiellement une Adénine (A) supplémentaire en 3' en fin d'élongation. Par le biais d'un vecteur de clonage linéarisé avec une Thymine (T) sortante à chaque extrémité 3'OH (comme le vecteur pGEM-T fournis dans le kit), l'insertion du fragment d'intérêt sera facilitée grâce à la complémentarité des bases. Les ribosondes, d'une taille de 400 à 600 nucléotides et marquées à la Digoxigénine (DIG) ou à la Fluorescéine, sont synthétisées à l'aide des «DIG- ou Fluorescein RNA labeling kit» (réf. 11175025910 et 11685619910 respectivement, Roche) selon les instructions du fabricant. Notre protocole utilise des ribosondes antisens dont la séquence est complémentaire de celle de l'ARNm que l'on veut détecter ainsi que deux types de témoins. Sur les mêmes tissus d'intérêt, une ribosonde sens est utilisée comme témoin négatif puisqu'elle ne peut pas s'hybrider avec l'ARNm ciblé. De plus, un témoin positif est réalisé avec la ribosonde antisens sur d'autres tissus connus pour exprimer fortement le gène étudié. En fin de synthèse, les ribosondes marquées à la DIG ou à la Fluorescéine sont purifiées par chromatographie d'exclusion diffusion sur colonne G-50 (réf. 27-5330-01, GE Healthcare).

#### ***Hybridation in situ en simple marquage sur coupes congelées de GRDs***

Les lames obtenues précédemment sont hybridées pendant une nuit à 65 °C avec la ribosonde diluée dans du tampon d'hybridation (formamide 50 %, sulfate de dextran 10 %, yeast tRNA 1 mg/ml,

denhardt's 1X), lavées deux fois pendant 30 min à 65 °C avec du tampon SSC 1X, 50 % formamide et 0,1 % Tween-20, deux fois pendant 30 min à TA avec du tampon MABT (acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, 0,1 % Tween-20, pH 7,5) puis saturées pendant 2 h à TA avec une solution de blocage (MABT, 20 % de sérum de mouton désactivé et 2 % de « Blocking reagent » (réf. 11096176001, Roche)). Les lames sont ensuite incubées une nuit à 4 °C avec l'anticorps anti DIG couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, réf. 11093274910, Roche) dilué au 1/2000 dans la solution de blocage et révélées après lavages avec la solution de révélation NBT/BCIP (réf. 11383213001 et 11383221001 respectivement, Roche). La révélation est arrêtée avec deux lavages à l'eau.

#### ***Double hybridation in situ sur coupes congelées de GRDs***

Les doubles hybridation *in situ* sont réalisées sur coupes congelées de 14 µm d'épaisseur préparées comme indiqué au-dessus. Les ribosondes marquées à la DIG et Fluorescéine sont diluées et mélangées dans le tampon d'hybridation puis déposées sur les coupes de tissu. Après hybridation pendant une nuit à 65 °C, les lames sont lavées deux fois pendant 30 min à 65 °C avec du tampon SSC 1X, 50 % formamide et 0,1 % Tween-20, deux fois pendant 30 min à TA avec du tampon MABT puis saturées pendant 2 h à TA avec une solution de blocage (MABT, 20 % de sérum de mouton désactivé et 2 % de « Blocking reagent » (Roche)). Les lames sont ensuite incubées une nuit à 4 °C avec l'anticorps

anti Fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Fluorescein-AP, Fab fragments, réf. 11426338910, Roche) dilué au 1/2000 dans la solution de blocage. Après lavages, la ribosonde marquée à la Fluorescéine est visualisée par réaction enzymatique en utilisant les tablettes Fast Red (réf. 11496549001, Roche) selon les instructions du fabricant. La réaction colorée est arrêtée avec deux lavages à l'eau et les lames sont montées temporairement avec une solution de glycérol à 90 %, Tris 0,1 M, pH 8,2. Les images de la révélation sont acquises sur un microscope optique.

Après lavage pendant 15 min à TA avec une solution de Tris 0,1M à pH 8,2, l'activité de la phosphatase alcaline est inhibée pendant 30 min avec une solution de glycine à 100 mM, 0,1% Tween-20, pH 2,2. Les lames sont ensuite lavées deux fois pendant 15 min dans du PBS, 0,1% Tween-20, post-fixées dans du PFA 4% pendant 10 min à TA, lavées pendant 20 min à TA dans du PBS, 0,1% Tween-20 puis deux fois pendant 30 min dans du tampon MABT. Les lames sont à nouveau saturées avec la solution de blocage pendant 2 h à TA et incubées la nuit à 4 °C avec l'Ac anti DIG-PA dilué au 1/2000. Les lames sont lavées comme précédemment et incubées cette fois avec la solution de révélation NBT/BCIP selon les instructions du fabricant. La réaction colorée est arrêtée avec deux lavages à l'eau.

Les précipités colorés obtenus avec la révélation Fast Red sont décolorés en incubant les lames dans des concentrations croissantes d'éthanol et deux incubations

finales dans de l'éthanol 100% pendant 10 min. Les marquages obtenus avec la révélation NBT/BCIP sont photographiés au microscope afin de les comparer à ceux obtenus avec la révélation Fast Red sur les mêmes coupes. Les signaux obtenus avec la révélation Fast Red sont alors transformés, grâce au logiciel Adobe Photoshop, en fausse couleur fluorescente rouge et les signaux obtenus avec la révélation NBT/BCIP sont eux transformés en fausse couleur fluorescente verte. Les marquages ainsi convertis en fausse couleur peuvent alors être superposés et les co-localisations apparaissent en jaune. Cette approche séquentielle permet l'identification claire de co-localisation au niveau d'une seule cellule.

### ***Hybridation in situ combinée à un immunomarquage***

Pour une hybridation *in situ* combinée à un immunomarquage, les lames sont d'abord hybridées avec la ribosonde marquée à la DIG. Les lames sont ensuite saturées avec une solution de blocage (PBS, BSA 1%, Triton 0,1%) pendant 1 h à TA puis incubées avec la solution d'anticorps primaire suivie de la solution d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Après acquisition au microscope des marquages fluorescents, les lames sont saturées avec 20% de sérum de mouton, incubées avec l'Ac anti DIG-PA et révélées avec la solution NBT/BCIP comme indiqué précédemment. Les signaux obtenus en hybridation *in situ* sont alors photographiés au microscope puis convertis en fausse couleur fluorescente et peuvent être alors superposés aux marquages im-

munohistochimiques fluorescents acquis à l'étape précédente. La co-localisation au niveau d'une seule cellule peut alors être identifiée.

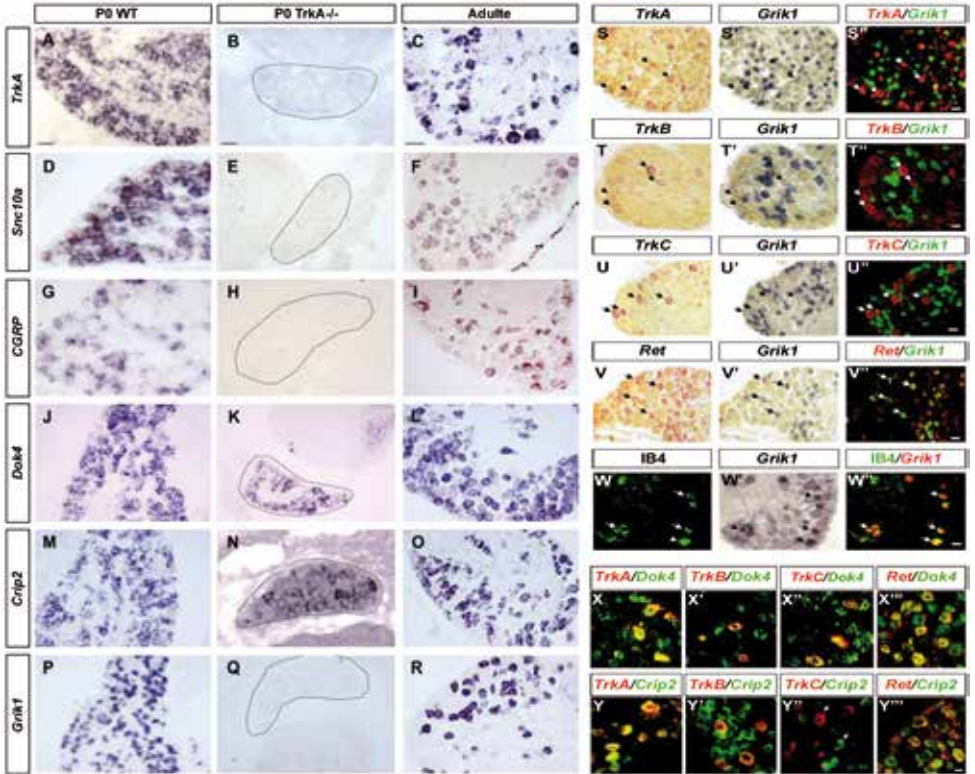
## RÉSULTATS

### *Identification de gènes marqueurs de sous-populations neuronales du GRD*

L'analyse par criblage différentiel des banques SAGE de GRDs sauvages versus GRDs dépourvus de neurones thermo-nociceptifs (à partir des souris mutantes *TrkA*<sup>-/-</sup>) a permis de mettre en évidence l'expression différentielle de 240 gènes entre les deux conditions. Parmi eux, des marqueurs connus de sous-populations de neurones sensoriels comme CGRP ou *Scn10a*, exprimés dans les neurones nociceptifs, ont été retrouvés dans cette liste validant ainsi la méthodologie employée.

Les gènes *Crip2*, *Dok4* et *Grik1* dont l'expression semblait être restreinte à une sous-population de neurones sensoriels ont pu être révélés par cette analyse (3). *Crip2* (Cysteine-rich intestinal protein 2) est une protéine adaptatrice intracellulaire qui pourrait interagir avec l'actine du cytosquelette (6). *Dok4* (Downstream of tyrosine kinase/Docking proteins) est connue pour son rôle dans la voie de signalisation des récepteurs tyrosine kinase (7). *Grik1*, alias *GluR5* (Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1), est un récepteur du glutamate dont l'expression a été associée à celle des canaux P2X3 dans les neurones nociceptifs non-peptidergiques des GRDs (8) et joue un rôle dans la nociception (9). Ces données issues de l'analyse des banques SAGE ont été dans un premier temps validées par

l'utilisation de la technique de PCR quantitative. Dans un deuxième temps, les profils d'expression de ces gènes établis par HIS sur des coupes de GRDs « sauvages » et *TrkA*<sup>-/-</sup> à P0 ainsi qu'à l'âge adulte ont permis de mettre en évidence leur expression restreinte dans ces structures. (Figure 1 A-R). Un travail essentiel à cette étape a été de pouvoir déterminer précisément et aisément dans quelle(s) sous-population(s) fonctionnelle(s) de neurones sensoriels étaient exprimés ces 3 gènes d'intérêt. Pour cela la mise au point d'un protocole fiable, rapide et économique d'identification histologique des différents sous-types de neurones sensoriels dans le GRD (nociceptifs, mécanoceptifs et proprioceptifs) a été indispensable. Dans cette optique, des techniques de doubles marquages ont été développées : double HIS et HIS suivie d'un immunomarquage sur coupes de GRDs en utilisant des marqueurs de référence pour chacune des populations de neurones. Parmi ces marqueurs de référence, plusieurs récepteurs tyrosine kinase des facteurs neurotrophiques appartenant à différentes familles (*Trk* et *Ret*) ont notamment été utilisés : *TrkA* pour identifier la population de neurones nociceptifs dits « peptidergiques », *TrkB* pour les neurones mécanoceptifs, *TrkC* pour les neurones proprioceptifs et *Ret* pour une population de neurones mécanoceptifs de gros diamètre mais aussi pour l'ensemble des neurones nociceptifs dits « non-peptidergiques » de petite taille. Il est à noter que cette dernière population est également identifiable histologiquement sur la base des propriétés biochimiques de sa membrane et notamment la présence de glycoprotéines



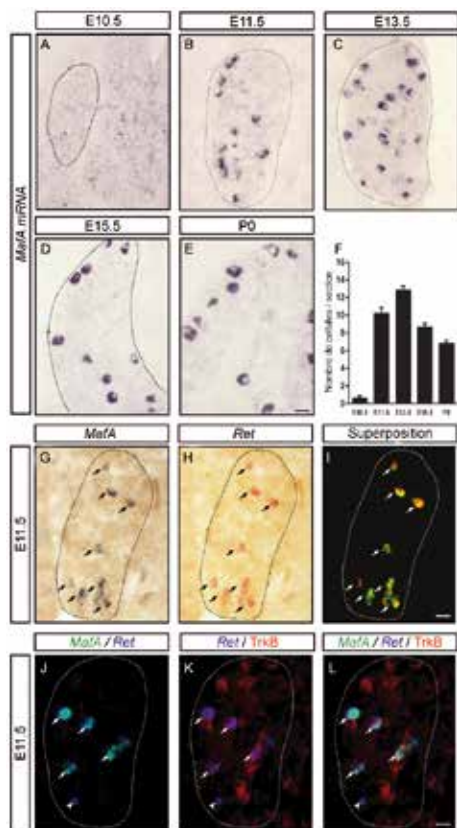
**Figure 1** : Profils d'expression et co-localisation des gènes *Grik1*, *Dok4* et *Crip2* avec les marqueurs de référence des sous populations de neurones sensitifs. D'après (3).

HIS sur coupes de GRDs P0 sauvages (P0 WT) (A, D, G, J, M et P), P0 *TrkA* mutant (P0 *TrkA*<sup>-/-</sup>) (B, E, H, K, N et Q) et adultes (C, F, I, L, O et R) avec les ribosomes marquées à la DIG spécifiques de *TrkA* (A, B et C) ; *Scn10a* (D, E et F) ; *CGRP* (G, H et I) ; *Dok4* (J, K et L) ; *Crip2* (M, N et O) et *Grik1* (P, Q et R). Les GRDs *TrkA* mutants sont entourés en B, E, H, K, N et Q. Les résultats montrent que *Dok4* est exprimé dans la majorité des neurones et quelques cellules négatives ont été observées. *Crip2* est largement exprimé bien qu'un nombre substantiel de cellules négatives ait été noté. *Grik1* est exprimé dans une sous-population de neurones et est complètement absent dans le GRD *TrkA* mutant.

Des doubles HIS ont été réalisées sur des coupes de GRDs adultes en utilisant le système de détection Fluorescein/Fast Red pour *TrkA* (S, X et Y), *TrkB* (T, X' et Y'), *TrkC* (U, X'' et Y'') et *Ret* (V, X''' et Y''') et la détection immunohistochimique pour l'isolectine B4 (W). L'ARNm des gènes *Grik1* (S', T', U', V' et W'), *Dok4* (X-X''') et *Crip2* (Y-Y''') a été par la suite révélé en utilisant le système de détection DIG/ NBT-BCIP. Les marquages obtenus en HIS ont été convertis en couleurs pseudo fluorescentes afin de les superposer pour révéler les co-localisations cellulaires. *Grik1* est exclu de la population *TrkA*<sup>+</sup> (S'), *TrkB*<sup>+</sup> (T') et *TrkC*<sup>+</sup> (U'') mais co-localise avec les populations *Ret*<sup>+</sup> (V'') et IB4<sup>+</sup> (W''). *Dok4* co-localise avec tous les sous-types neuronaux majeurs du GRD (X-X'''). *Crip2* est spécifiquement exclu de la population *TrkC*<sup>+</sup> (Y'').

particulières capables de fixer l'isoelectine B4. La co-détection ou l'exclusion de ces différents marqueurs et de nos gènes candidats a permis d'établir leur localisation précise au sein des GRDs. Le gène *Grik1/GluR5* est en effet exprimé spécifiquement dans l'ensemble de la population des neurones nociceptifs non-peptidergiques *Ret+ / IB4+* (Figure 1 S-W'''), confirmant et étendant les données de la littérature (8). Le gène *Dok4* quant à lui est exprimé de manière restreinte dans le GRD, mais dans tous les sous-types de neurones sensoriels (Figure 1 X-X'''). Enfin, le gène *Crip2* est exprimé dans des sous-populations de neurones nociceptifs et mécanocéptifs mais est totalement exclu des neurones proprioceptifs (Figure 1 Y-Y'''). Ces marqueurs de sous-populations ont permis d'étendre nos connaissances de la diversité moléculaire des différents types de neurones sensitifs dans le GRD pour une meilleure compréhension de leurs spécificités fonctionnelles.

D'autre part, la présence dans les GRDs du gène *MafA* qui code pour un facteur de transcription à domaine leucine zipper a pu être également révélée par l'analyse comparative des banques SAGE à différents stades du développement et chez adulte. Le profil d'expression du gène *MafA* a dans un premier temps été établi par simple marquage en utilisant la technique d'HIS. Ceci nous a permis de déterminer que *MafA* est exprimé dans une sous-population très discrète de neurones du GRD de grande taille dès le stade embryonnaire 11,5 jours (E11,5) jusqu'à la naissance (Figure 2 A-F). Une fois encore, afin de caractériser



**Figure 2** : Profil d'expression du facteur de transcription *MafA* au cours du développement du GRD. D'après (11).

Analyse de l'expression de l'ARNm de *MafA* par HIS sur coupes de GRDs aux stades E10,5, E11,5, E13,5, E15,5 et P0 (A-E). Des cellules exprimant *MafA* apparaissent au stade E11,5 et sont retrouvées à tous les autres stades. Quantification du nombre de cellules exprimant *MafA* aux différents stades de développement du GRD (F).

Double HIS pour *MafA* (G) et *Ret* (H) et superposition des images converties en couleur pseudo-fluorescente (I). Tous les neurones exprimant *MafA* au stade E11,5 expriment le récepteur *Ret*.

Triple marquage pour *MafA*, *Ret* et *TrkB* (J-L), double HIS pour *MafA* et *Ret* (J), HIS pour *Ret* combinée à un immunomarquage pour *TrkB* (K) et superposition des images converties en couleur pseudo fluorescente (L). Les neurones exprimant *MafA* co-expriment partiellement *TrkB*.

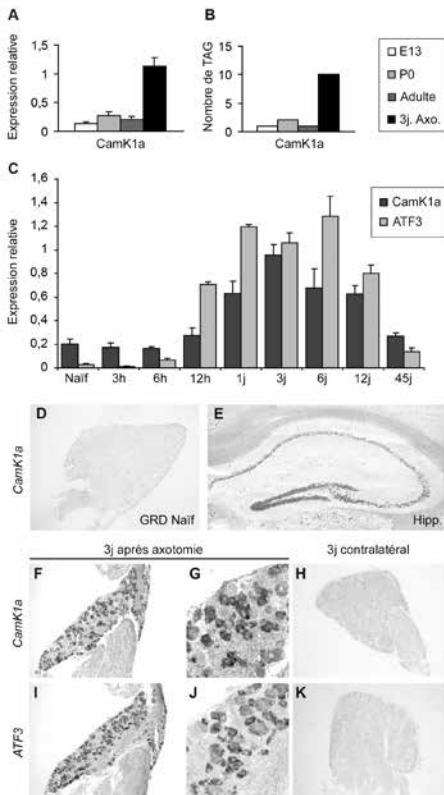
les sous-populations du GRD l'exprimant, la mise au point de la technique de doubles marquages utilisant les marqueurs de référence Trk et Ret a été mise à profit. Nous avons pu ainsi quantifier le nombre de cellules MafA+ et MafA+/Ret+ et démontrer que toutes les cellules MafA expriment le récepteur Ret à E11,5 (Figure 2 G-I), stade auquel les petits neurones nociceptifs Ret+ ne sont pas présents. Par ailleurs, cette population n'exprime ni TrkA ni TrkC (10) démontrant ainsi que ce ne sont ni des neurones nociceptifs ni des proprioceptifs. De plus, au stade E11,5, la quantification des doubles marquages obtenus avec MafA et TrkB nous a permis de déterminer que 80 % des neurones MafA+ co-expriment TrkB (Figure 2 J-L). Cette analyse du profil spatio-temporel d'expression du gène MafA ainsi que sa co-expression et/ou exclusion avec plusieurs marqueurs de références ont permis d'associer le facteur de transcription MafA à une population précoce de gros neurones mécanosensitifs Ret+ (11).

### ***Identification de gènes régulés après lésion périphérique***

L'analyse des transcriptomes de GRDs de souris au stade adulte et après lésion du nerf sciatique a permis de révéler des gènes connus et déjà décrits dans la littérature comme étant régulés après axotomie ; c'est le cas par exemple de Atf3 (Activating Transcription Factor 3), Gadd45a (Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha), Sprr1a (Small proline-rich protein 1a), Hsp27 (Heat shock protein 1) ou encore le Neuropeptide Y (NPY) (12) (13) (14) (15) (16). Il était important de

retrouver de tels gènes dans nos banques puisqu'ils représentent un critère de validation de la méthodologie utilisée. Cette analyse présentait un intérêt tout particulier dans l'étude de la réponse des neurones de GRDs à une lésion périphérique et notamment d'identifier de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans les processus de pousse régénérative.

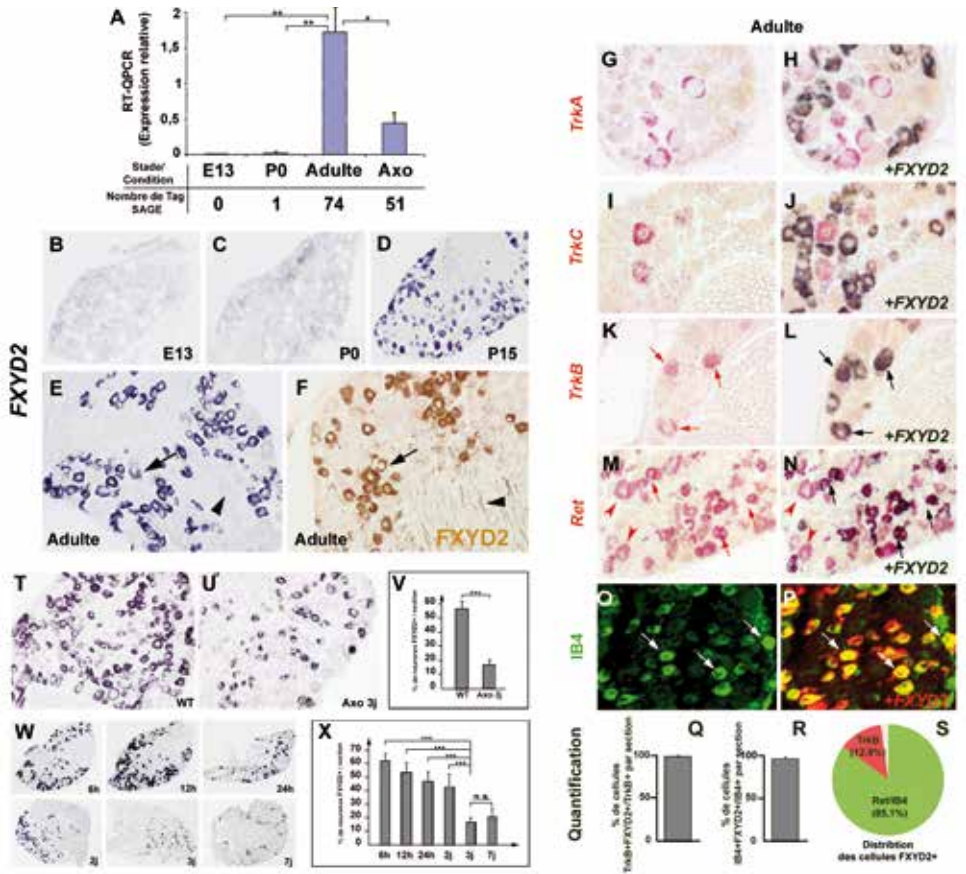
Parmi les gènes révélés par cette analyse, une protéine kinase a particulièrement retenu notre attention : CaMKIIa (Calcium-Calmodulin dependant Kinase I alpha). L'expression de cette kinase n'ayant jusque-là jamais été décrite dans le système nerveux périphérique, son induction dans les GRDs après un traumatisme du nerf était une donnée inédite. Par ailleurs CaMKIIa est connue dans le système nerveux central pour intervenir dans le développement neuronal et la synaptogenèse (17). La confirmation de son profil d'expression dans les GRDs par PCR quantitative (Figure 3 A-C) et ces données bibliographiques en ont fait un excellent candidat pour l'étude des événements moléculaires nécessaires à la régénération post-lésionnelle des neurones périphériques. La caractérisation précise de son profil d'expression dans différents tissus (Figure 3 D et E) et après plusieurs types de traumatismes périphériques a été établie par la technique d'HIS. Les résultats obtenus ont validé l'induction de l'expression de *CaMKIIa* dans les neurones de GRDs 3 jours après une axotomie (Figure 3 F-K). De manière intéressante, cette induction ne concerne pas tous les neurones lésés, mais préférentiellement des neurones de



**Figure 3** : L'expression du gène *CaMK1a* est induite après axotomie du nerf sciatique. D'après (18). Analyse de l'expression de l'ARNm de *CaMK1a* à différents stades de développement du GRD (E13, P0 et Adulte) et trois jours après axotomie (3j. Axo.) par RT-PCR quantitative (A) et la technologie SAGE (B). Une forte augmentation de l'expression de *CaMK1a* est observée après section de nerf sciatique en comparaison des niveaux de base pendant le développement et au stade adulte du GRD. La cinétique d'expression des gènes *CaMK1a* et *ATF3* réalisée en RT-PCR quantitative montre une augmentation de l'expression de *CaMK1a* dès 12h après axotomie, un pic d'expression entre 1 à 12 jours et un retour proche du niveau basal à 45 jours. *ATF3* présente un profil similaire sauf que l'induction de son expression commence plusieurs heures avant *CaMK1a* (C). L'HIS utilisant la ribosonde *CaMK1a* montre une absence d'expression sur les coupes de GRDs adultes naïfs (D) et une expression dans les couches neuronales de l'hippocampe (E). L'HIS sur des coupes de GRDs prélevés 3 jours après axotomie du nerf sciatique révèle que le gène *CaMK1a* est détecté dans les neurones des GRDs ipsilatéraux (F et G) mais est absent dans les GRDs controlatéraux (H). Nous avons utilisé comme contrôle positif le gène *ATF3* qui est connu pour être induit après axotomie. Comme attendu, *ATF3* est exprimé dans les neurones des GRDs ipsilatéraux (I et J) mais pas dans les GRDs controlatéraux (K).

moyenne et grande tailles. La localisation subcellulaire de *CaMK1a* étudiée par immunofluorescence, dans le cytoplasme et les axones au niveau du nerf sciatique, suggère un transport de la kinase vers le site de lésion, et donc un rôle potentiel de cette protéine dans la pousse axonale post-traumatique. Des études *in vitro* d'inhibition pharmacologique de la voie *CaMKK/CaMK1a* et d'extinction de *CaMK1a* par siRNA ont appuyé cette hypothèse, révélant une baisse significative de la vitesse de pousse des neurones de GRDs lésés. Ces données indiquent donc que la voie *CaMKK/CaMK1a* contribue à la capacité intrinsèque des neurones périphériques à repousser à la suite d'une lésion nerveuse (18).

Lors de cette même analyse des données SAGE de GRDs adultes «sauvages» versus adultes «axotomisés», le gène *Fxyd2* a été identifié dans le groupe de gènes dont l'expression présentait un pic au stade adulte et chutait après axotomie (Figure 4 A), au contraire de *CAMK1a*. Ce gène appartient à la famille des molécules *Fxyds* qui ont la capacité d'interagir avec la pompe *Na,K-ATPase* et d'en réguler la fonction. En 2012, nos résultats ont permis de décrire pour la première fois son expression dans le système nerveux périphérique (19). Les profils d'expression de ce gène ont été également établis par HIS sur des coupes de GRDs embryonnaire à E13 jusqu'au stade adulte (Figure 4 B-E). En accord avec les résultats obtenus par SAGE et par PCR quantitative, aucune expression significative de *Fxyd2* n'a pu être détectée avant la première semaine



**Figure 4 :** Profil d'expression du gène *Fxyd2* au cours du développement du GRD et après section du nerf sciatique. D'après (19).

Analyse de l'expression de l'ARNm de *Fxyd2* à différents stades de développement du GRD (E13, P0 et Adulte) et trois jours après axotomie (Axo) par RT-PCR quantitative et la technologie SAGE (A).

HIS de *Fxyd2* sur des coupes de GRDs aux stades E13, P0, P15 et adulte (B-E). Les flèches et têtes de flèche en E indiquent les neurones *Fxyd2+* et *Fxyd2-* respectivement. Marquage immunohistochimique de la protéine Fxyd2 sur coupes de GRDs adultes (F). Les flèches et têtes de flèche indiquent respectivement les corps cellulaires et fibres nerveuses positifs.

Doubles marquages pour *Fxyd2* et *TrkA*, *TrkB*, *TrkC*, *Ret* ou *IB4* sur coupes de GRDs adultes (G-P). Aucune co-localisation n'est observée entre *Fxyd2* et *TrkA* ou *TrkC* (H et J). Des doubles marquages sont observés pour les neurones *TrkB+* (flèches en L) et *Ret+/IB4+* (flèches en N et P). Les têtes de flèche en M et N indiquent les neurones *Ret+* de grande taille qui sont *Fxyd2* négatifs. Les pourcentages des neurones *TrkB+* (Q) ou *IB4+* (R) exprimant *Fxyd2* indiquent que virtuellement tous les neurones mécanoceptifs *TrkB+* et tous les neurones nociceptifs non peptidergiques sont *Fxyd2+*. Distribution des neurones *Fxyd2+* dans deux principaux types neuronaux : les *TrkB+* (13%) et les *Ret+/IB4+* (85%) (S).

L'HIS de *Fxyd2* sur des coupes de GRDs adultes naïfs (WT) (T) et 3 jours après axotomie (Axo 3j) (U) montre une perte d'expression de *Fxyd2* dans les GRDs après 3 jours d'axotomie. La quantification du pourcentage de neurones *Fxyd2+* chez le GRD naïf et 3 jours après axotomie indique une réduction de 57% à 16% après lésion du nerf sciatique (V). Cinétique d'expression de *Fxyd2* dans les GRDs de 6h jusqu'à 7 jours après axotomie par HIS (W). La quantification révèle une importante diminution de l'expression de *Fxyd2* entre 2 et 3 jours pour rester stable à 7 jours après axotomie (X).

post-natale. En effet l'expression de ce gène dans le GRD apparaît environ 7 jours après la naissance et semble concerner l'ensemble des neurones. Cependant cette expression de Fxyd2 se restreint progressivement au cours du temps pour ne concerner chez l'adulte plus que 60% des neurones. Ces résultats ont été confirmés et étendus par l'utilisation d'un anticorps polyclonal spécifique de la protéine Fxyd2. Au sein des neurones, la protéine Fxyd2 est détectée aussi bien au niveau du corps cellulaire que dans les axones (Figure 4 F). Par la suite, la caractérisation des sous-populations du GRD adulte exprimant le gène Fxyd2 a été réalisée grâce à différentes techniques de doubles marquages. Les résultats obtenus ont ainsi révélé que le gène Fxyd2 est exprimé principalement dans deux grandes populations de neurones sensitifs chez l'adulte : la population TrkB+ identifiant les neurones mécanosensitifs, et la population de neurones Ret+/IB4+ correspondant aux petits neurones nociceptifs « non-peptidergiques » (Figure 4 G-S). Par ailleurs, les résultats de l'analyse des banques SAGE adultes révélaient que l'expression de Fxyd2 chutait après section de nerf sciatique. Afin d'étudier plus en détail ce phénomène, nous avons analysé l'expression de Fxyd2 à différents temps après axotomie (6 heures, 12 heures, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 7 jours) par HIS sur les GRDs adultes. La technique d'HIS nous a également permis de quantifier finement la chute d'expression de Fxyd2. Cette expérience nous a montré que dès 3 jours après axotomie, le pourcentage de neurones Fxyd2+ au sein du GRD passe de 60% à 16% (Figure 4 T-X). De plus,

nous avons démontré que l'administration *in vivo* de facteurs neurotrophiques de la famille GDNF, ligand du récepteur Ret permet le maintien de l'expression de Fxyd2 au sein des neurones nocicepteurs IB4+ lésés. Ce résultat démontre donc que la voie de signalisation Ret participe au maintien de l'expression de Fxyd2 dans les neurones nocicepteurs non peptidergiques chez l'adulte (19).

## CONCLUSION

L'analyse des banques d'expression SAGE à partir de GRDs de souris dans différentes conditions nous a permis d'identifier des acteurs moléculaires du système somatosensoriel. L'HIS a été la technique essentielle à la validation des différents résultats issus de l'analyse de ces différentes banques. En effet, les profils d'expression précis des différents gènes candidats ont pu être établis par simple marquage en HIS sur coupes de GRDs aux différents stades de développement, mais également en condition pathologique (en l'occurrence, après axotomie). De plus, des marquages par double HIS ainsi que par combinaison d'HIS suivie d'un immunomarquage ont permis de déterminer précisément et aisément dans quelle sous-population de neurones sensoriels étaient exprimés nos gènes d'intérêt.

L'analyse comparative des banques SAGE de GRDs sauvages versus GRDs dépourvus de neurones thermoceptifs a révélé le gène Grik1/GluR5 comme un marqueur permettant d'identifier l'ensemble des neurones nociceptifs non peptidergiques. Ce résultat est en accord avec des

études pharmacologiques précédemment réalisées sur des cultures de neurones de GRDs au stade P0. En effet, Lee et collaborateurs avaient identifié le gène *Grik1* dans les cellules liant l'isolectine B4 (20). D'autre part, Lucifora et collaborateur avaient également montré par doubles marquages immunohistochimiques que la protéine *Grik1* était fortement exprimée dans la population nociceptive P2X3-positive (8). Nos résultats confirment et étendent ces données puisque nous avons pu montrer en HIS que le gène *Grik1* ne co-localise jamais avec le récepteur *TrkA* et que son expression est restreinte aux neurones nociceptifs de petit diamètre *Ret+/IB4+* jusqu'au stade adulte.

Cette analyse a également permis de mettre en évidence l'expression du gène *Crip2* dans le GRD. Son expression est certes large mais, de façon frappante, elle est totalement exclue des neurones proprioceptifs. Le rôle de la voie de signalisation *TrkC*-dépendante dans les neurones proprioceptifs est connu depuis longtemps. Au-delà d'une fonction essentielle dans la survie neuronale, cette voie intervient également dans la spécification de l'identité des neurones proprioceptifs, notamment en étant indispensable à l'induction de l'expression du facteur de transcription *ER81* qui contrôle la formation du circuit réflexe monosynaptique proprioceptif (21). Il a par ailleurs été démontré que le facteur de transcription *Runx3* joue un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype proprioceptif (10) et dans la mise en place des projections proprioceptives dans la région ventrale de la moelle épinière (22).

Il y agit notamment en réprimant l'expression du marqueur des neurones mécanoceptifs *TrkB*. Ainsi, le gène *Crip2* pourrait, de manière similaire à *TrkB*, être réprimé par *Runx3* et/ou par la signalisation *TrkC* dans cette population.

Par ailleurs, cette analyse a permis de révéler l'expression du gène *Dok4* au sein de tous les sous-types de neurones sensoriels du GRD adulte. Cette expression est majoritaire dans les neurones nociceptifs *Ret+/IB4+*. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où une interaction entre *Dok4* et *Ret* a été mise en évidence dans un système d'expression cellulaire hétérologue (7). Il pourrait donc avoir un rôle dans la transmission du signal passant par ce récepteur tyrosine-kinase.

L'analyse comparative des banques SAGE de GRDs à différents stades du développement (E13, P0 et adulte) a permis de mettre en évidence l'expression du facteur de transcription *MafA* au sein des ganglions rachidiens. L'établissement de son profil d'expression par HIS aux premiers stades du développement des GRDs a été essentiel et a révélé son expression dès le stade embryonnaire 11,5 jours. Des manipulations complémentaires nous ont permis d'identifier le gène *MafA* comme un marqueur d'une population fine de neurones responsables de la perception du toucher au cours du développement embryonnaire.

D'autre part, l'analyse différentielle des banques adultes sauvages et post-axotomie nous a permis quant à elle de

caractériser des gènes candidats potentiellement impliqués dans les capacités régénératives des neurones du GRD et/ou dans les remaniements fonctionnels à l'origine des douleurs neuropathiques. En effet, le traumatisme du nerf périphérique induit de profondes modifications moléculaires et cellulaires conduisant à un processus de régénération. Cependant cette régénération est dans la plupart des cas incomplète et conduit souvent à des troubles moteurs, neurovégétatifs et sensitifs comme les douleurs dites neuropathiques. La recherche de telles molécules présente donc un intérêt important pour une meilleure compréhension des événements moléculaires induits après un traumatisme et notamment afin d'identifier les déterminants et voies de régulation/signalisation clés impliqués dans le déclenchement d'un programme de croissance axonale dans le neurone adulte périphérique. Nos résultats de cette analyse indiquent que la voie CaMKK/CaMKIIa contribue à la capacité intrinsèque des neurones périphériques à repousser à la suite d'une lésion nerveuse et révèlent le gène CaMKIIa comme un nouvel acteur de la régénération des nerfs périphériques après lésion.

Cette même analyse a également permis d'identifier l'expression du gène *Fxyd2* dans le système nerveux périphérique. En effet, nous avons pu montrer que ce gène est exprimé dans deux sous-populations spécifiques de neurones du GRD au stade adulte : les neurones mécanocceptifs *TrkB+* et les neurones nociceptifs non-peptidergiques qui lient l'isolectine B4 et qui expriment le récepteur *Ret*. D'autre part, nous avons

démonstré que 3 jours après section du nerf sciatique, l'expression de *Fxyd2* s'éteint dans les neurones effectivement axotomisés et que la voie de signalisation *Ret* est nécessaire au maintien de son expression dans les neurones nocicepteurs non peptidergiques de GRDs adultes. Des manipulations complémentaires encore en cours au laboratoire révèlent ce gène comme un candidat à haut potentiel en tant que cible thérapeutique pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques.

Parmi les différentes techniques d'analyse d'expression génique, l'HIS est la principale méthode pour mettre en évidence la présence d'une séquence d'acides ribonucléiques déterminée au sein d'un tissu ou d'une population cellulaire. Dans notre analyse transcriptomique du GRD de souris dans différentes conditions, elle a constitué notre méthode de référence pour la validation de nos résultats et l'établissement des profils d'expression précis des nombreux gènes candidats. En effet, la mise au point de protocoles robustes et reproductibles d'HIS en double marquage ou couplée à un marquage immunohistochimique sur GRDs a été essentielle. Il nous ait possible aujourd'hui de caractériser, de manière fiable et aisée, les populations de neurones sensoriels où est exprimé un gène d'intérêt. Les méthodes d'analyse du transcriptome ont beaucoup évolué ces dernières années et la technique d'hybridation reste aujourd'hui notre méthode de prédilection pour valider nos résultats obtenus par exemple en séquençage de seconde génération (NGS Next-generation sequencing) ou encore pour l'identifica-

tion de cibles de facteurs de transcription (par Chromatin Immunoprecipitation). Enfin, le recours à l'HIS s'avère encore aujourd'hui une technique de choix qui complémente efficacement l'utilisation d'anticorps. En effet, dans certains cas, si les immuno-marquages sont très utiles pour caractériser la localisation subcellulaire d'une protéine d'intérêt, ils peuvent s'avérer difficiles à interpréter lorsqu'il s'agit d'identifier clairement les types cellulaires qui les expriment. C'est en particulier le cas pour les neurones sensoriels regroupés dans les GRDs qui envoient de

longs prolongements vers la périphérie et la moelle épinière. Certaines protéines étant par exemple localisées spécifiquement dans les axones ou au niveau des synapses, l'HIS constitue une technique complémentaire indispensable pour l'identification des corps cellulaires correspondants. Par ailleurs, malgré le nombre en constante augmentation d'anticorps disponibles, leurs coûts restent encore élevés et certains s'avèrent encore inefficaces en analyses histochimiques. L'HIS constitue une solution de repli relativement moins onéreuse et la plupart du temps efficace.

## BIBLIOGRAPHIE

1. PARDUE M. L., GALL J. G.: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, 64 (2), 600–604.
2. MECHALY I., BOURANE S., PIQUEMAL D., AL-JUMAILY M., VEN-TEO S., PUECH S., SCAMPS F., VALMIER J., CARROLL P.: Gene profiling during development and after a peripheral nerve traumatism reveals genes specifically induced by injury in dorsal root ganglia. *Mol. Cell Neurosci.*, 2006, 32 (3), 217-29.
3. BOURANE S., MECHALY I., VEN-TEO S., GARCES A., FICHARD A., VALMIER J., CARROLL P.: a sage-based screen for genes expressed in subpopulations of neurons in the mouse dorsal root ganglion. *BMC Neurosci.*, 2007, 8, 97.
4. VELCULESCU V. E., ZHANG L., VOGELSTEIN B., KINZLER K. W.: Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, 270, 484-487.
5. VIRLON B., CHEVAL L., BUHLER J. M., BILLON E., DOUCET A., ELA-LOUF J. M.: Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 15286-15291.
6. VAN HAM M., CROES H., SCHEPENS J., FRANSEN J., WIERINGA B., HENDRIKS W.: Cloning and characterization of mCRIP2, a mouse LIM-only protein that interacts with PDZ domain IV of PTP-BL. *Genes Cells*, 2003, 8, 631-644.
7. GRIMM J., SACHS M., BRITSCH S., DICESARE S., SCHWARZ-ROMOND T., ALITALO K., BIRCHMEIER W.: Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J. Cell. Biol.*, 2001, 154, 345-354.
8. LUCIFORA S., WILLCOCKSON H. H., LU C. R., DARSTEIN M., PHEND K. D., VALTSCHANOFF J. G., RUSTIONI A.: Presynaptic low- and high-affinity kainate receptors in nociceptive spinal afferents. *Pain*, 2006, 120, 97-105.
9. KERCHNER G. A., WILDING T. J., LI P., ZHUO M., HUETTNER J. E.: Pre-synaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 59-66.
10. KRAMER I., SIGRIST M., DE NOOIJ J. C., TANIUCHI I., JESSELL T. M., ARBER S.: A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron*, 2006, 49, 379-393.

11. BOURANE S., GARCES A., VEN-TEO S., PATTYN A., HUBERT T., FICHARD A., PUECH S., BOUKHADDAOUI H., BAUDET C., TAKAHASHI S., VALMIER J., CARROLL P.: Low-threshold mechanoreceptor subtypes selectively express MafA and are specified by Ret signaling. *Neuron*, 2009, 64 (6), 857-70.
12. TSUJINO H., KONDO E., FUKUOKA T., DAIY., TOKUNAGA A., MIKI K., YONENOBU K., OCHI T., NOGUCHI K.: Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol. Cell Neurosci.*, 2000, 15, 170-182.
13. BEFORT K., KARCHEWSKI L., LANOUE C., WOOLF C. J.: Selective up-regulation of the growth arrest DNA damage-inducible gene Gadd45 alpha in sensory and motor neurons after peripheral nerve injury. *Eur. J. Neurosci.*, 2003, 18, 911-922.
14. BONILLA I. E., TANABE K., STRITTMATTER S. M.: Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J. Neurosci.*, 2002, 22, 1303-1315.
15. COSTIGAN M., BEFORT K., KARCHEWSKI L., GRIFFIN R. S., D'URSO D., ALLCHORNE A., SITARSKI J., MANNION J. W., PRATT R. E., WOOLF C. J.: Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.*, 2002, 3, 16.
16. MARCHAND J. E., CEPEDA M. S., CARR D. B., WURM W. H., KREAM R. M.: Alterations in neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase, and Y-receptor subtype distribution following spinal nerve injury to rats. *Pain*, 1999, 79, 187-200.
17. SANEYOSHI T., WAYMAN G., FORTIN D., DAVARE M., HOSHI N., NOZAKI N., NATSUME T., SODERLING T. R.: Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron*, 2008, 1, 94-107.
18. ELZIERE L., SAR C., VEN-TEO S., BOURANE S., PUECH S., SONRIER C., BOUKHADDAOUI H., FICHARD A., PATTYN A., VALMIER J., CARROLL P., MECHALY I.: CaMKK-CaMK1a, a new post-traumatic signalling pathway induced in mouse somatosensory neurons. *PlosOne*, 2014, 9 (5), e97736.

19. VENTEO S., BOURANE S., MECHALY I., SAR C., ABDEL SAMAD O., PUECH S., BLOSTEIN R., VALMIER J., PATTYN A., CARROLL P.: Regulation of the Na,K-ATPase gamma-subunit FXYD2 by Runx1 and Ret signalling in normal and injured nonpeptidergic nociceptive sensory neurons. *PlosOne*, 2012, 7 (1), e29852.
20. LEE C. J., KONG H., MANZINI M. C., ALBUQUERQUE C., CHAO M. V., MACDERMOTT A. B.: Kainate receptors expressed by a subpopulation of developing nociceptors rapidly switch from high to low Ca<sup>2+</sup> permeability. *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4572-4581.
21. PATEL T. D., KRAMER I., KUCERA J., NIEDERKOFER V., JESSELL T. M., ARBER S., SNIDER W. D.: Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron*, 2003, 38, 403-416.
22. CHEN A. I., DE NOOIJ J. C., JESSELL T. M.: Graded activity of transcription factor Runx3 specifies the laminar termination pattern of sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron*, 2006a, 49, 395-408.

COMMENT L'HISTOLOGIE ET L'IHC ONT PERMIS DE  
NOUVELLES AVANCEES DANS LA CARACTERISATION  
DE L'ARTHRITE EXPERIMENTALE :  
ETUDE DE L'IMPACT DE L'ACTIVATION DU RECEPTEUR  
«PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR»  
GAMMA (PPAR $\gamma$ ) SUR LA PERTE OSSEUSE  
INFLAMMATOIRE

Koufany M.<sup>1</sup>, Bastien C.<sup>2</sup>, Bianchi A. <sup>1</sup>, Jouzeau J.-Y.<sup>1,3</sup> et Moulin D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR-7365 CNRS-Université de Lorraine (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire IMoPA), Biôpole de l'Université de Lorraine, campus Biologie-santé, avenue de la forêt de Haye, CS50184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Pôle Laboratoires, Service d'Anatomie et de cytologie pathologiques, rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Pôle Laboratoires, Département de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, CO n°34, 54035 Nancy, France.

M. Koufany meriem.koufany@univ-lorraine.fr

C. Bastien c.bastien@chu-nancy.fr

A. Bianchi arnaud.bianchi@univ-lorraine.fr

JY. Jouzeau jean-yves.jouzeau@univ-lorraine.fr

D. Moulin david.moulin@univ-lorraine.fr

## INTRODUCTION

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie auto-immune dont l'étiologie demeure mal connue. C'est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par la prolifération anormale des cellules de la membrane synoviale, conduisant à un épaississement et une désorganisation de cette membrane. Il se forme alors un pannus érosif responsable du gonflement articulaire, de la douleur et de la destruction progressive des tissus articulaires tels que le cartilage, l'os, et des éléments de voisinage (les ligaments et les tendons) pouvant conduire à la perte de fonction des articulations (1). Cette synovite est caractérisée par la prolifération du tissu de granulation conjonctivo-vasculaire, avec un infiltrat cellulaire massif constitué majoritairement de lymphocytes. Au niveau systémique, l'inflammation chronique est responsable d'une perte osseuse généralisée pouvant aller jusqu'à l'ostéoporose, due à un déséquilibre du processus de remodelage osseux au bénéfice de la résorption.

Le processus d'inflammation chronique dans la PR associe une réponse inflammatoire exacerbée à un déficit du contrôle de la réponse immunitaire. Ainsi Wang et al. (2) ont montré que le rapport des lymphocytes T auxiliaires effecteurs (notamment la sous-population Th17)/T régulateurs (Treg) circulants était relativement bas chez des patients sains alors qu'il est fortement augmenté chez les patients atteints de PR active. Ce déséquilibre joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la PR puisque les Th17 induisent non seulement la production de Tumor Necrosis

Factor (TNF- $\alpha$ , d'interleukine-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), d'interleukine-6 (IL-6), de chimiokines et de metalloprotéases, mais exercent également une forte activité pro-inflammatoire via la production d'interleukine-17 (IL-17) (3).

De plus, les études réalisées chez l'animal de laboratoire suggèrent que l'IL-17 pourrait être un médiateur clé des dégradations articulaires puisque son blocage par des anticorps spécifiques diminue la sévérité de l'arthrite expérimentale [4]. Il est bien établi que le potentiel ostéoclastogénique de l'IL-17 humaine s'exprime au travers de la modulation de la voie Receptor Activator of Nuclear factor-KappaB Ligand (RANKL) / osteoprotegerin (OPG) (5), ce rapport étant un régulateur essentiel du remodelage osseux.

L'arthrite induite chez le rat par l'injection d'adjuvant complet de Freund (AIA) est un modèle expérimental qui reproduit certains aspects immunologiques de la PR, notamment le rôle majeur des lymphocytes T, ainsi que certains aspects pathologiques. Ainsi, ce modèle se caractérise notamment par une inflammation chronique, une polysynovite et une destruction progressive du cartilage et de l'os, cette dernière pouvant être locale ou généralisée [6]. Même si, à l'instar des autres modèles, il ne reproduit pas la récurrence de la maladie, ces caractéristiques en font un modèle validé pour l'étude de molécules potentiellement anti-arthritiques, tels que les agonistes du récepteur nucléaire activé par les proliférateurs de peroxydase gamma (PPAR $\gamma$ ).

Le récepteur PPAR $\gamma$  appartient à la super-famille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription activables par des ligands. PPAR $\gamma$  est un facteur clé de la différenciation adipocytaire et de l'homéostasie du glucose dont l'activation est également capable de moduler la réponse inflammatoire (7). De nombreuses équipes de recherche portent un intérêt aux potentialités pharmacologiques associées de cet isotype et beaucoup ont déjà démontré que des agonistes spécifiques avaient la capacité de réduire la sévérité d'arthrites expérimentales (8, 9), faisant de PPAR $\gamma$  une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'un traitement par la pioglitazone, un agoniste synthétique hautement sélectif de PPAR $\gamma$ , réduisait la sévérité de l'arthrite expérimentale via la diminution de l'expression articulaire et systémique de l'IL-17 et modulait le rapport RANKL/OPG en faveur d'une réduction de la perte osseuse. L'étude histologique a également permis de démontrer, pour la première fois, que les cellules produisant localement l'IL-17 étaient majoritairement des Polynucléaires Neutrophiles (PMN) dans notre modèle expérimental de PR.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODE**

### ***Animaux***

22 rats mâles Lewis de 150-175 g ont été utilisés (Charles River France). Après une période d'acclimatation d'une semaine, les groupes de traitement ont été formés en sélectionnant au hasard 7 à 8 rats par groupe avec un accès sans restriction à

l'eau courante et à une nourriture standardisée (Scientific Animal Food & Engineering A04, Villemoison-sur-Orge, France).

L'animalerie était thermorégulée à 21°C  $\pm$  1°C et les animaux soumis à un cycle jour/nuit de 12h (avec éclairage de 6h à 18h). Toutes les expériences sur les animaux ont été réalisées en accord avec les recommandations nationales de soin des animaux et ont été acceptées au préalable par le comité local d'éthique (CERLEA). L'induction de l'arthrite, les prélèvements sanguins ainsi que la mise à mort avant prélèvement des tissus ont été réalisés sous anesthésie générale par isoflurane (AErrane<sup>TM</sup>, Baxter SA, Maurepas, France) au sein de l'animalerie du laboratoire (autorisation n° A54-547-25).

### ***Induction de la polyarthrite et protocole expérimental***

L'arthrite a été induite au jour 0 (J0) par une injection intra-dermique à la base de la queue de 0,1 ml d'une émulsion d'adjuvant complet de Freund (ACF) contenant 10 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis H37Ra inactivé (Difco Laboratory, Detroit, MI) en suspension dans 45 % d'huile de paraffine, 45 % de sérum physiologique et 10 % de Tween 80. Les animaux ont reçu la pioglitazone une fois par jour à partir de J0 et jusqu'à la mise à mort à J21. La pioglitazone (Actos<sup>TM</sup>, Takeda) a été administrée par voie orale dans une suspension à 0,5 % de carboxyméthylcellulose à la posologie de 30 mg/kg/j. Les animaux ont été divisés en trois groupes : contrôles (animaux naïfs non arthritiques), AIA (animaux arthritiques ne recevant que le véhicule) et

AIA+PIO (animaux arthritiques traités par la pioglitzone).

### ***Evaluation de la sévérité de la polyarthrite***

Un score clinique a été réalisé selon (10) : une valeur comprise entre 0 (aucun signe) et 4 (lésions les plus sévères) a été attribuée à chacune des quatre pattes en fonction de la sévérité et de l'étendue de l'érythème, de l'œdème des tissus mous péri-articulaires, du gonflement et de la déformation de l'articulation. L'évaluation clinique a été réalisée en insu deux fois par semaine par deux expérimentateurs.

### ***Analyse histologique des articulations***

Les articulations de la cheville ont été prélevées à J21 et fixées immédiatement pendant 24h dans une solution tamponnée à 4% de paraformaldéhyde (PFA) avant d'être décalcifiées pendant 6h à température ambiante, dans une solution décalcifiante commerciale (RDO, Apex engineering, Plainfield, USA) contenant de l'acide chlorhydrique, de la quinoléine et des Furaldéhydes. Les tissus ont ensuite été re-fixés pendant 24h dans du PFA avant d'être inclus dans la paraffine. Les coupes de 5 µm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un microtome à rotation (Leica RM 2135, LEICA Microsystems, France) ont été réhydratées dans un gradient décroissant d'éthanol et colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES, automate de colorations multiparamétrique, Tissue-Tek® DRST™, Sakura®). Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante et montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage organique (Per-

tex, Leica Biosystems®). Chaque articulation a fait l'objet de cinq lames sur lesquelles l'évaluation des lésions du cartilage articulaire et de l'os de la cheville a été effectuée en insu, en utilisant un score global adapté de celui décrit par Helyes (11). La dégradation du cartilage a été évaluée sur une échelle de 0 (pas de lésion) à 3 (destruction importante de la couche de cartilage). Les critères morphologiques suivant ont été utilisés pour apprécier l'érosion osseuse : 0 = normale, 1 = faible perte localisée de l'os cortical, 2 = perte modérée de l'os cortical et trabéculaire, 3 = perte importante généralisée de l'os.

### ***Analyse immunohistochimique (IHC) des tissus articulaires***

Les lames ont été déparaffinées par passages successifs dans du Tissue Clear®, de l'alcool absolu, de l'alcool à 95% en enfin de l'alcool à 70%. Les épitopes ont ensuite été démasqués par incubation des lames pendant 6-8h dans du tampon citrate pH6 (Zytomed Systems) à 70°C. Après plusieurs rinçages au PBS, les échantillons ont été recouverts d'eau oxygénée à 3% pendant 10min pour inhiber les peroxydases endogènes. Après rinçage, un sérum bloquant a été déposé afin de saturer les sites de liaison aspécifiques puis les anticorps primaires dilués dans un tampon commercial de saturation (Antibody Diluent Zytomed Systems) ont été ajoutés aux coupes de tissus. L'anticorps polyclonal de lapin anti-IL-17 (Abbiotec) a été dilué au 1/200<sup>ème</sup>, les anticorps polyclonaux de chèvre anti-RANKL et anti-OPG (Santa Cruz Biotechnology) ont été dilués respectivement au 1/400<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup>.

La réaction antigène-anticorps a eu lieu toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, les lames ont été lavées dans du PBS puis mises en contact avec un anticorps secondaire couplé à de la peroxydase de raifort (Vectorlabs). Après plusieurs rinçages, le chromogène AEC permanent® (Permanent AEC Kit Zytomed Systems) a été ajouté permettant de détecter notre protéine d'intérêt au bout de 8-10 min. Une contre-coloration du tissu a été effectuée par de l'hématoxyline (Hematoxylin solution Mayer's, Sigma-Aldrich) et les lames ont été bleuies dans de l'eau lithinée. Les échantillons ont alors été déshydratés dans des bains d'alcool croissants et montés entre lame et lamelle dans le milieu de montage organique cité précédemment.

### Dosage des médiateurs de l'ostéoclastogénèse par immuno-enzymologie

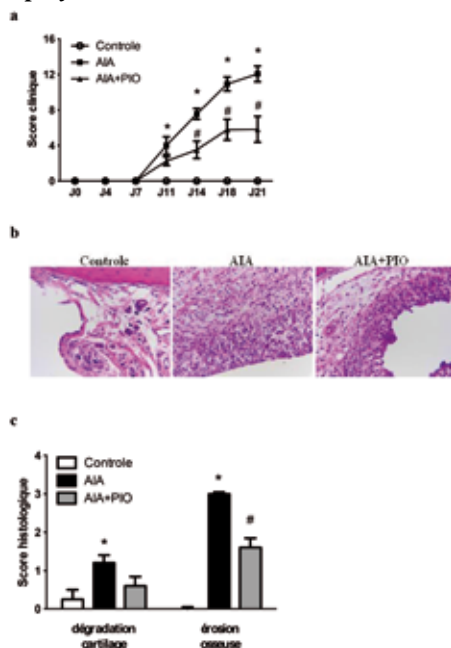
Les taux sériques d'IL-17, de RANKL soluble (sRANKL) et d'OPG ont été dosés à J21 par une méthode ELISA selon les recommandations du fournisseur du kit (Millipore, France). Les données ont été traitées grâce au système d'analyse Bio-Plex® (Bio-Rad). Les limites de quantification étaient de 1,6 pg/ml pour l'IL-17, 1,0 pg/ml pour sRANKL et 2,3 pg/ml pour OPG.

### Analyse statistique

Les résultats correspondant à l'index arthritique et au score histologique ont été analysés avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Toutes les autres données ont été comparées avec le test paramétrique de Bonferroni, après analyse de la variance (Stat View version 5, SAS Institute). Les différences ont été considérées comme significatives pour une valeur de  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### Effet de la pioglitazone sur la sévérité de la polyarthrite



**Figure 1** : Effet de la pioglitazone sur la sévérité de la polyarthrite par adjuvant chez le rat. Les rats Lewis ont été immunisés avec 1 mg d'adjuvant complet de Freund à la base de la queue. Les groupes contrôle (n = 7) et AIA (n = 8) ont été traités avec le véhicule seul, le groupe AIA+PIO (n = 7) a été traité une fois par jour avec 30 mg/kg/j de pioglitazone (PIO).

a : score arthritique, b : coupe de cheville représentative de l'inflammation synoviale,

c : score histologique sur le cartilage et l'os. Grossissement original X400. \*  $p < 0,05$  vs contrôle, #  $p < 0,05$  vs AIA (d'après l'image originale publiée dans Arthritis Rheum. 2013 Dec;65(12):3084-95).

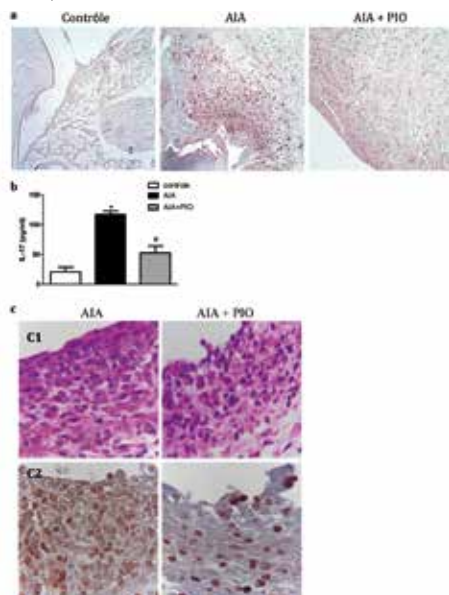
La polyarthrite a débuté à partir du 11<sup>ème</sup> jour et a atteint son maximum 20 jours après l'immunisation (Figure 1a). Les animaux arthritiques non traités ont présenté un score clinique moyen supérieur à 12, ce qui reflète une arthrite sévère atteignant à la fois les membres antérieurs

et postérieurs. La pioglitazone administrée à 30mg/kg/j a réduit le score global de moitié comparativement aux animaux arthritiques non traités (-49% à J21). Ceci a été confirmé par l'analyse histologique des chevilles colorées à l'HES qui montre une nette diminution de l'inflammation du tissu synovial chez les animaux traités (Figure 1b). Le score histologique réalisé sur le cartilage et l'os a mis en évidence une dégradation du cartilage ainsi qu'une érosion osseuse importante dans les chevilles des animaux arthritiques non traités comparés aux animaux sains. Le traitement par la pioglitazone a permis de réduire de façon significative l'érosion osseuse, alors que son effet sur la dégradation du cartilage s'est révélé plus modéré (figure 1c).

### ***Effet de la pioglitazone sur l'expression et la régulation de l'IL-17***

L'analyse immunohistochimique des coupes de cheville des animaux a montré que l'IL-17 était faiblement exprimée dans la synoviale des animaux sains alors que chez les animaux arthritiques non traités, 70% des cellules étaient IL-17 positives (Figure 2a). L'expression de l'IL-17 a été nettement réduite chez les animaux traités par la pioglitazone (44%). Ceci a été confirmé par le dosage sérique de l'IL-17 mettant en évidence une réduction de 50% des taux circulants chez les animaux arthritiques traités (Figure 2b). L'analyse à fort grossissement de coupes sériées colorées à l'HES a permis de mettre en évidence que les cellules positives pour l'IL-17 étaient majoritairement des Polynucléaires Neutrophiles (PMN) (Figure 2c). Le traitement par la pioglitazone a réduit de façon signi-

ficative le pourcentage de PMN positifs pour l'IL-17 dans la synoviale (86% vs 96%).



**Figure 2 :** Effet de la pioglitazone sur l'expression de l'IL-17 dans la polyarthrite par adjuvant chez le rat. Les rats Lewis ont été immunisés avec 1mg d'adjuvant complet de Freund à la base de la queue. Les groupes contrôle (n = 7) et AIA (n = 8) ont été traités avec le véhicule seul, le groupe AIA+PIO (n = 7) a été traité une fois par jour avec 30 mg/kg/j de pioglitazone (PIO).

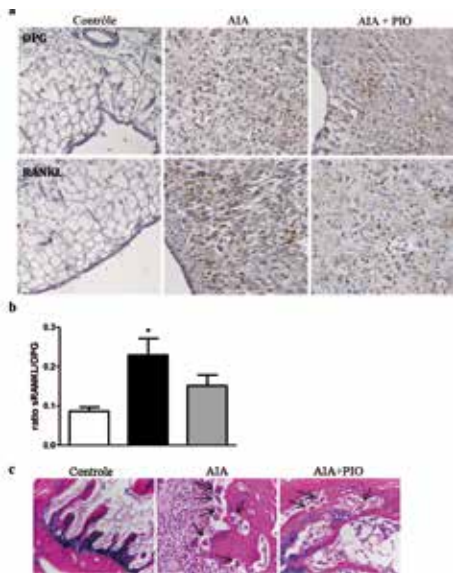
a : production d'IL-17 analysée par IHC dans le tissu synovial de la cheville X400,

b : taux circulants d'IL-17,

c analyse histologique et IHC de la synoviale X1000, avec c1 = coloration à l'HES, c2 = immunomarquage pour l'IL-17. \* p < 0,05 vs contrôle, # p < 0,05 vs AIA (c : d'après l'image originale publiée dans Arthritis Rheum. 2013 Dec;65(12):3084-95).

### ***Effet de la pioglitazone sur la balance RANKL/OPG***

L'analyse immunohistochimique du tissu synovial a montré une surexpression de RANKL chez les animaux arthritiques non traités comparativement aux animaux sains, alors que la production d'OPG ne



**Figure 3** : Effet de la pioglitazone sur le ratio sRANKL/OPG dans la polyarthrite par adjuvant chez le rat. Les rats Lewis ont été immunisés avec 1 mg d'adjuvant complet de Freund à la base de la queue. Les groupes contrôle (n = 7) et AIA (n = 8) ont été traités avec le véhicule seul, le groupe AIA+PIO (n = 7) a été traité une fois par jour avec 30 mg/kg/j de pioglitazone (PIO).  
 a : production d'OPG et de RANKL analysée par IHC dans le tissu synovial de la cheville X400,  
 b : ratio des taux circulants de sRANKL et d'OPG,  
 c : coupe de cheville représentative du nombre d'ostéoclastes présents. \*p<0,05 vs contrôle (d'après l'image originale publiée dans *Arthritis Rheum.* 2013 Dec;65(12):3084-95).

variait pas de façon significative (Figure 3a). Chez les animaux traités par la pioglitazone, nous avons observé une réduction importante du nombre de cellules positives pour RANKL, mais peu d'effet sur la production d'OPG. Le dosage sérique de sRANKL et d'OPG a confirmé l'augmentation du rapport sRANKL/OPG au cours de la polyarthrite et sa diminution par la pioglitazone (Figure 3b). De plus, l'analyse du tissu osseux de la cheville coloré

à l'HES suggère une réduction importante du nombre d'ostéoclastes chez les animaux traités comparés aux animaux arthritiques non traités (Figure 3c)

## DISCUSSION

La pioglitazone, qui est une molécule insulinosensibilisatrice de la famille des thiazolidinedione (TZD), est un agoniste de haute affinité du récepteur PPAR. Malgré la limitation de l'utilisation des TZDs chez les patients diabétiques, en raison d'effets indésirables cardiovasculaires, du risque de cancer de la vessie et d'une possible altération du métabolisme osseux, il demeure beaucoup de controverses à propos de leur impact sur le remodelage osseux. En effet, PPAR $\gamma$  active la différenciation des progéniteurs issus de la moelle osseuse vers la voie adipocytaire au détriment de la voie ostéoblastique (12). Cependant, d'autres études suggèrent que l'activation de PPAR $\gamma$  par son agoniste naturel, la 15-Désoxy-Delta-12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) inhibe la différenciation ostéoclastique (3). Les propriétés anti-arthritiques de la pioglitazone ont fait l'objet de nombreuses études mais peu se sont intéressées aux conséquences de l'activation sélective de PPAR $\gamma$  par cette TZD sur le métabolisme osseux en condition inflammatoire.

Lors de cette étude, nous avons évalué la capacité de la pioglitazone à réduire le processus arthritique, en nous intéressant particulièrement à son impact sur la voie ostéoclastogénique IL-17/RANKL/OPG dans un modèle expérimental de polyarthrite chez le rat. Nous confirmons les potentia-

lités anti-arthritiques de la pioglitazone décrites dans la littérature, notamment sur le score clinique de sévérité de l'arthrite. L'analyse histologique a montré que cette activation très sélective de PPAR réduisait également l'hyperplasie synoviale et les lésions des tissus cartilagineux et osseux dans les articulations périphériques.

Chez les patients atteints de PR, des quantités importantes d'IL-17 sont retrouvées dans le liquide synovial. Cette interleukine a été récemment démontrée comme étant un facteur clé de régulation de la physiopathologie articulaire, capable d'induire la production de TNF $\alpha$  et d'IL-1, de réguler positivement la production de RANKL et de stimuler l'expression des métalloprotéases (14). Nous avons démontré, grâce à l'analyse immunohistochimique, que l'IL-17 était abondamment produite dans la synoviale inflammatoire, ce qui était cohérent avec les taux d'IL-17 sérique. Le traitement par la pioglitazone a significativement diminué la production locale et systémique d'IL-17 chez les animaux arthritiques. De plus, l'observation anatomopathologique des coupes de chevilles inflammatoires colorées à l'HES nous a permis de démontrer que, parmi les populations infiltrant la synoviale, les PMN étaient majoritairement responsables de la production locale d'IL-17. Nos résultats sont en accord avec une étude récente démontrant que l'IL-17A, un des sous-types majeur de l'IL-17, pouvait être exprimée par plusieurs sous-populations de cellules immunitaires dans la synoviale inflammatoire de patients atteints de PR, y compris les mononucléaires et les PMN (15). Nos résultats confirment éga-

lement des études récentes en faveur d'un rôle régulateur de PPAR $\gamma$  sur l'expression de l'IL-17 et/ou l'activation des Th17 (16). Le potentiel ostéoclastogénique de l'IL-17 au travers de la voie sRANKL/OPG est bien établi et une augmentation de ce rapport dans la synoviale a été corrélée à la sévérité des lésions articulaires et à la perte osseuse dans un modèle d'arthrite induite au collagène (17). Nous avons démontré que l'activation de PPAR $\gamma$  réduisait à la fois le ratio de sRANKL/OPG circulant ainsi que la production locale de RANKL, mise en évidence par immunohistochimie. De plus, l'analyse histologique des articulations périphériques (chevilles) a montré une réduction significative des cellules multinucléées de morphologie ostéoclastique chez les animaux traités par la pioglitazone. L'ensemble de ces données nous amène à émettre l'hypothèse que la pioglitazone diminue la perte osseuse associée à l'arthrite via une modulation directe de l'ostéoclastogénèse.

En conclusion, notre étude a montré que la pioglitazone, en plus de réduire la sévérité de l'arthrite, avait un effet suppresseur majeur sur la production articulaire et systémique d'IL-17 et de RANKL, suggérant un rôle modulateur de l'ostéoclastogénèse dépendante de ces médiateurs dans l'arthrite chronique. Malgré leur rôle controversé chez les patients diabétiques, les TZDs pourraient avoir un intérêt thérapeutique chez des patients atteints de PR lors de poussées inflammatoires de la maladie en prévenant la destruction osseuse responsable des déformations secondaires des articulations.

## BIBLIOGRAPHIE

1. LEE, D.M. AND M.E. WEINBLATT, Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2001. 358(9285): p. 903-11.
2. WANG, W., ET AL., The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2012. 32(4): p. 887-93.
3. VOLIN, M.V. AND S. SHAHRARA, Role of TH-17 cells in rheumatic and other autoimmune diseases. *Rheumatology (Sunnyvale)*. 2011 oct. 20 ; 1(104). pii : 2169
4. LUBBERTS, E., M.I. KOENDERS, AND W.B. VAN DEN BERG, The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*, 2005. 7(1): p. 29-37.
5. DAOUSSIS, D., A.P. ANDONOPOULOS, AND S.N. LIOSSIS, Wnt pathway and IL-17: novel regulators of joint remodeling in rheumatic diseases. Looking beyond the RANK-RANKL-OPG axis. *Semin Arthritis Rheum*. 39(5): p. 369-83.
6. WHITELEY, P.E. AND S.A. DALRYMPLE, Models of inflammation: adjuvant-induced arthritis in the rat. *Curr Protoc Pharmacol*, 2001. Chapter 5: p. Unit5 5.
7. STRAUS, D.S. AND C.K. GLASS, Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 2007. 28(12): p. 551-8.
8. GIAGINIS, C., A. GIAGINI, AND S. THEOCHARIS, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. *Pharmacol Res*, 2009. 60(3): p. 160-9.
9. KOUFANY, M., ET AL., Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2008. 10(1): p. R6.
10. PHILIPPE, L., ET AL., Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol*, 1997. 273(4 Pt 2): p. R1550-6.
11. HELYES, Z., ET AL., Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(5): p. 1677-85.

12. GIMBLE, J.M., ET AL., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol*, 1996. 50(5): p. 1087-94.
13. MBALAVIELE, G., ET AL., Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 2000. 275(19): p. 14388-93.
14. KOENDERS, M.I., L.A. JOOSTEN, AND W.B. VAN DEN BERG, Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65 Suppl 3: p. iii29-33.
15. MORAN, E.M., ET AL., IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One*. 6(8): p. e24048.
16. KLOTZ, L. AND P. KNOLLE, Nuclear receptors: TH17 cell control from within. *FEBS Lett*. 585(23): p. 3764-9.
17. LUBBERTS, E., ET AL., IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol*, 2003. 170(5): p. 2655-62.

---

**NOTES**

---

---

**NOTES**

---



# REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

Rev. Fr. Histotechnol., 2016, **28**, n°1

## SOMMAIRE

### EDITORIAL :

#### Rôle de l'histologie dans les approches biomarqueurs

N. ACCART

page 11

### ARTICLES :

#### Problèmes liés aux coupes de tissus congelés et solutions

F. BARAIGE, F. CAPILLA, L. FONTAINE, N. GADOT, L. GUTKNECHT, G. MOREL, C. RIPOLL, F. THILLOU

page 17

#### Pré-orientation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines : validation par analyse quantitative et traitements d'imagerie de phase en lumière transmise

S. HUPONT, C. HENRIONNET, D. DUMAS, D. MAINARD, P. GILLET, A. PINZANO

page 33

#### Etude immunohistochimique des cellules du système nerveux entérique de la souris

C. LEJA, A. BENCSIK

page 45

#### Caractérisation d'une réponse immunitaire adaptative dans les tumeurs colorectales de type MSI : de l'analyse moléculaire à l'analyse d'images

F. BOISSIÈRE-MICHOT, G. LAZENNEC, H. FRUGIER, M. JARLIER, L. ROCA, E. DU PATY,

D. LAUNE, F. BLANCHARD, F. LE PESSOT, J.-C. SABOURIN, F. BIBEAU

page 61

#### Cultures de fibroblastes issues de berges de fentes labio-palatine : description du protocole et extraction d'ADN

C. FRANÇOIS, R. DARD, E. LANDAIS, L. LAFFON, P. BIREMBAUT, N. TA PHI THAN,

C. MANGEONJEAN, P. FEUCHER, D. GAILLARD, M.L. POLI-MEROL, P. NGUYEN, M. DOCO-FENZY

page 73

#### Méthode d'orientation de l'œil pour l'analyse histologique de zones ciblées de la rétine chez la souris

N. NABHOLZ, V. KALATZIS, M.-O. PEQUIGNOT

page 83

#### Illustration de l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* pour la caractérisation des différents sous-types de neurones sensoriels dans le ganglion rachidien de souris

S. VENTÉO

page 91

#### Comment l'histologie et l'IHC ont permis de nouvelles avancées dans la caractérisation de l'arthrite expérimentale : étude de l'impact de l'activation du récepteur « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor » gamma (PPA R $\gamma$ ) sur la perte osseuse inflammatoire

M. KOUFANY, C. BASTIEN, A. BIANCHI, J.-Y. JOUZEAU, D. MOULIN

page 111

### ILLUSTRATION DE LA COUVERTURE :

Coupe de tendon de rat montrant une nécrose avancée du tissu adipeux après ténotomie. Coloration au trichrome de Masson.

Source Nathalie ACCART - Novartis Institute for Biomedical Research – Bâle