

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

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' α -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' α -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

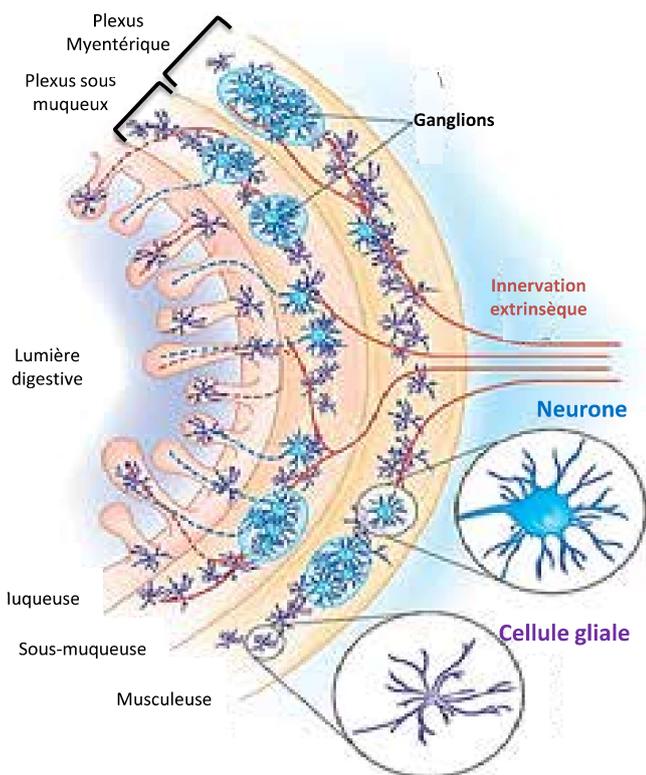


Figure 1 : Schéma d'une coupe transversale de tube digestif présentant l'organisation du système nerveux entérique d'après Rescigno Mucosal Immunology 2008.

d'Auerback), localisé entre les couches musculaires longitudinales et circulaires de la musculature, 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 interneurons 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 artérioles et modulent l'activité glandulaire pariétale du tube digestif, les neurones moteurs agissent sur la musculature circulaire ou sur la musculature longitudinale. Ces motoneurons 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 100 nm) 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 30 µg/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 (TiO₂) (85% anatase, 15% rutile, 22 nm) et le dioxyde de silice (SiO₂) (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) 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^{ème} 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

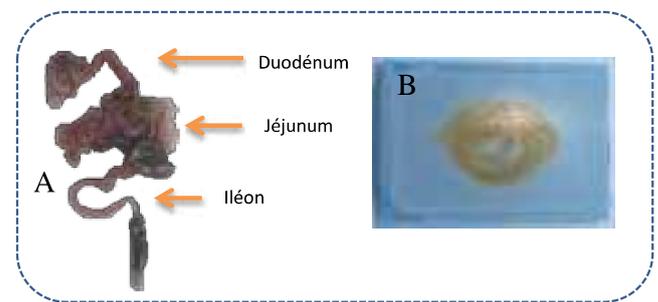


Figure 2 : Préparation des intestins de souris.

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	Démasquage	Marquage attendu
GFAP	Polyclonal lapin	Dako	1/200	aucun	Cellules gliales (fibrocytes astrocytaires)
NeuN	Polyclonal lapin	Abcam	1/500	Micro-Ondes Tampon Citrate pH 6,2	Neurones (noyaux)

Tableau I : 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^{ème} dans du tampon d'acide maléique (pH 7,5). L'Ac I dilué dans du tampon phosphate salin (PBS 0,1 M 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^{ème} dans du PBS 0,1 M et NaCl 0,09% + 0,1% Triton X100, les lames sont incubées 1 à 2 h 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 30 min 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

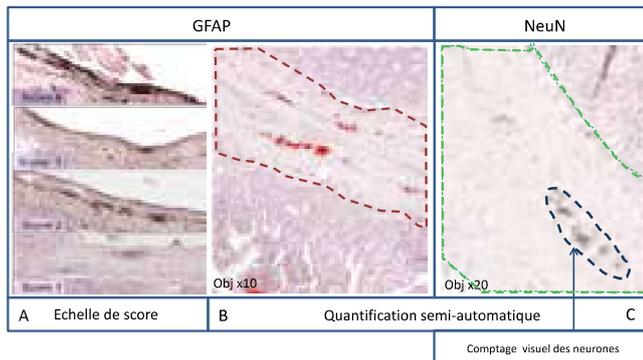


Figure 3 :

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 x 20, 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

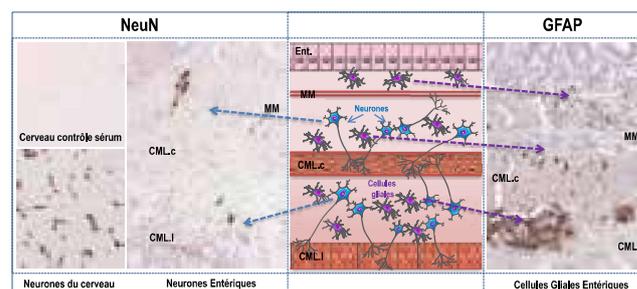


Figure 4 : Illustration de la caractérisation des cellules gliales et neuronales entériques par IHC. Le marquage spécifique apparaît en brun/noir (DAB intensifiée au chlorure de nickel). Les cellules gliales sont associées étroitement à la localisation des neurones des plexus myentériques et sous muqueux 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-TiO₂ et SiO₂ 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-

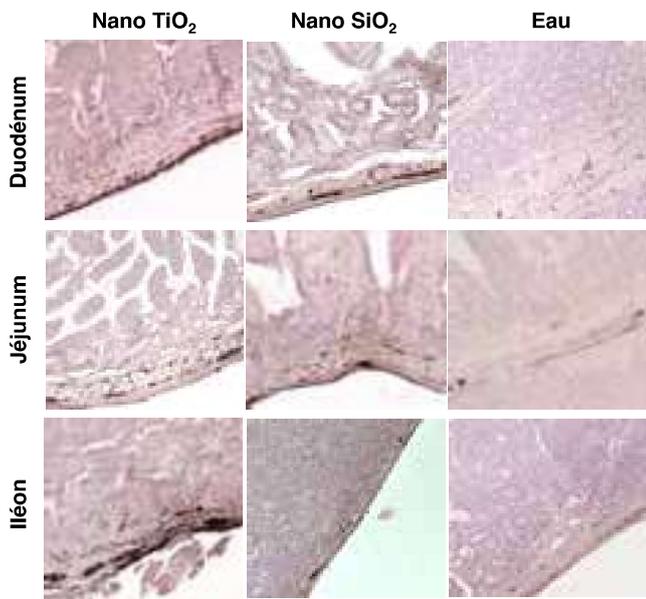


Figure 5 : Illustration représentative de l'intensité d'expression de la GFAP (en noir) dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La GFAP apparaît surexprimée chez les souris exposées aux nanomatériaux, quelle que soit la section intestinale considérée.

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.

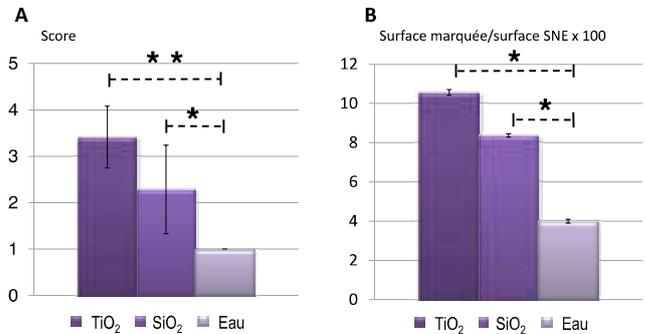


Figure 6 :

A. Intensité moyenne de l'expression GFAP dans le jéjunum quantifiée 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 x100) 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

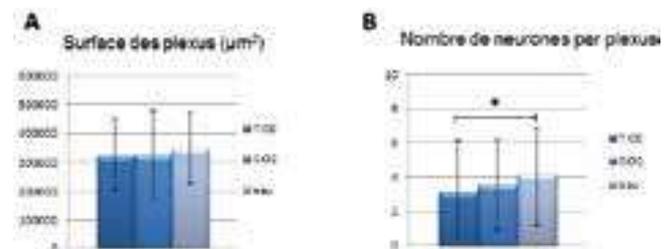


Figure 7 :

A. Moyenne de la surface totale des plexus (μm^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 β 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^{ème} 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