DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE MULTIPLEX RNASCOPE® 4 SONDES COMBINÉE À UNE IMMUNOHISTOCHIMIE 2 ANTICORPS POUR LA CLASSIFICATION DE SOUS-POPULATIONS DE MICROGLIE

ACCART Nathalie et LAMBERT Christian
Novartis Pharma AG - Biomedical Research
Diseases of Aging and Regenerative Medicine
Postfach – 4057 BALE - Suisse

nathalie.accart_gris@novartis.com

doi.org/10.25830/afh.rfh.2025.37.1.131

DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX BASED ON A 4 PROBE-RNASCOPE® TECHNIQUE COMBINED WITH A 2 ANTIBODY-IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR THE CLASSIFICATION OF MICROGLIAL SUBPOPULATIONS

ABSTRACT

The simultaneous detection of gene and protein expression on a tissue was a real technological challenge for histologists. However, given the importance of identifying gene expression and co-localization of proteins used as specific markers of certain cell types, we have seen the development of combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry techniques in recent years. The difficulty has therefore been removed, for example by the combination of two technologies, on the one hand the RNAscope® technology provided by Advanced Cell Diagnostics (ACD) which allows the detection and evaluation of messenger RNA expression profiles in identical or adjacent cells using a powerful amplification system coupled with a chromogenic or fluorescent revelation, and on the other hand to a classical immunohistochemistry technique.

In order to classify microglia into different subpopulations, we have been able to develop a multiplex technique allowing the demonstration of the expression of 4 genes coupled to the detection of 2 proteins, on mouse spinal cord sections, fixed and paraffin-embedded, of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), with a mutation in the superoxide dismutase ($SOD1^{G93A}$) gene. We will present here the approach that has led to a validated and reproducible technique.

KEY WORDS

Amyotrophic lateral sclerosis, Immunohistochemistry, *In situ* hybridization, Microglia, Multiplexing.

RÉSUMÉ

La détection simultanée de l'expression de gènes et de protéines sur un tissu était un réel défi technologique pour les histologistes. Cependant, étant donné l'importance d'identifier l'expression d'un gène et la co-localisation de protéines utilisées comme des marqueurs spécifiques de certains types cellulaires ou de certaines voies d'activation par exemple, nous avons vu ces dernières années se développer des techniques combinées d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. La difficulté a donc été levée, par exemple par la combinaison de deux technologies, d'une part la technologie du RNAscope® fournie par Advanced Cell Diagnostics (ACD) qui permet la détection et l'évaluation de profils d'expression d'ARN messagers dans des cellules identiques ou adjacentes en utilisant un puissant système d'amplification couplé à une révélation chromogénique ou fluorescente, et d'autre part à une technique classique d'immunohistochimie.

Dans le but de classifier la microglie en différentes sous-populations, nous avons pu mettre au point une technique multiplex permettant la mise en évidence de l'expression de 4 gènes couplée à la détection de 2 protéines, sur des coupes de moelle épinière de souris, fixées et incluses en paraffine, d'un modèle transgénique de sclérose latérale amyotrophique (SLA), présentant une mutation au niveau du gène de la superoxide dismutase ($SOD1^{G93A}$). Nous présenterons ici la démarche qui a permis d'aboutir à une technique validée et reproductible.

MOTS CLÉS

Hybridation *in situ*, Immunohistochimie, Microglie, Multiplexage, Sclérose latérale amyotrophique.

INTRODUCTION

L'immunohistochimie (IHC) et l'immunofluorescence (IF) sont des méthodes classiquement utilisées en histologie pour la détection des protéines dans des tissus. Elles sont aussi bien utilisées sur tissus congelés que sur des tissus fixés et inclus en paraffine [1][2]. Son principe est basé sur la reconnaissance de protéines cellulaires qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, par une réaction antigène – anticorps, le complexe formé étant rendu visible par une réaction chromogénique ou fluorescente. Les anticorps utilisés sont dirigés contre une partie des protéines d'intérêt ou épitopes, ils peuvent être monoclonaux reconnaissant un seul épitope ou polyclonaux, reconnaissant plusieurs épitopes. La distribution du chromogène ou du fluorophore dans le tissu est ensuite imagée à l'aide d'un microscope et permet de localiser une protéine ou plusieurs types de protéines simultanément, on parle alors de multiplexage [3][4].

Une technique dont le principe est similaire à l'IHC permet de mettre en évidence les acides ribonucléiques (ARN) dans les coupes de tissu. C'est l'hybridation *in situ* (HIS) qui permet de détecter les ARN d'intérêt par une sonde spécifique constituée d'un brin complémentaire d'acides nucléiques directement ou indirectement couplé à un marqueur chromogénique ou fluorescent [5]. On parle d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) ou fluorescente (FISH). Cette technique dont la mise en place était assez contraignante, a été révolutionnée par la fourniture de sondes très spécifiques et par des systèmes d'amplification du signal performants et localisés. Nous citerons la technique du RNAscope™ (Advanced Cell Diagnostics Inc. Newark, CA), technique d'HIS qui utilise des sondes en Z qui ne s'hybrident que par paire avec deux parties adjacentes de l'ARN d'intérêt pour minimiser la fluorescence due à une hybridation partielle sur d'autres séquences similaires, ainsi qu'un système d'amplification du signal comprenant une région d'espacement ainsi qu'une région de séquence nucléotidique complémentaire de la séquence de l'amplificateur de la paire de Z spécifique de la cible. Cela permet d'augmenter la quantité totale de marquage par transcrit (**Figure 1**). Par rapport à la sonde FISH traditionnelle, dans laquelle chaque sonde individuelle est également un rapporteur fluorescent, une sonde Z n'est capable de se lier à un amplificateur et de donner un signal fluorescent que lorsque sa sonde Z partenaire est également liée à la séquence adjacente du même ARN. En l'absence d'une paire de sondes adjacentes qui s'hybrident à l'ARN cible, le signal fluorescent ne se produit pas. Pour cette raison, la fluorescence hors cible est extrêmement faible. De plus l'amplification du signal est tellement importante qu'il est possible de détecter un seul transcrit d'ARN en microscopie optique [6][7]. La détection de chaque transcrit permettrait donc de générer un spot fluorescent.

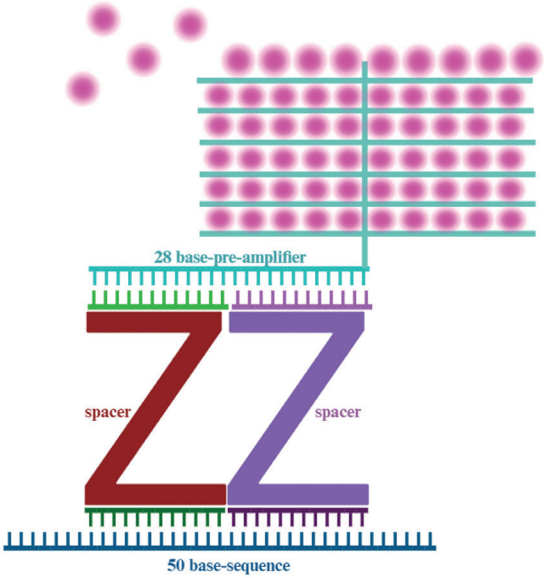


Figure 1 : Schéma décrivant le principe des sondes utilisées dans la technique du RNAscope™ (ACD Inc.). Le site d'hybridation spécifique à la cible est une séquence de 50 nucléotides (bleue) pour laquelle une paire de séquences ZZ (rouge et mauve) est utilisée. La séquence cible peut être au maximum de 1000 bases soit un pool de 20 paires de séquences ZZ. La cible doit avoir une séquence minimale de 300 nucléotides. Chaque Z est constitué d'une séquence basse complémentaire de la séquence-cible d'ARN (verte et vermillon), d'un espaceur, et d'une séquence supérieure de 14 nucléotides (verte et fuschia) correspondant à la moitié du site de liaison du pré-amplificateur (turquoise). Enfin l'amplificateur est construit comme un arbre d'amplification lié aux molécules de révélation du signal (rose).

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), connue sous le nom de maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative à progression rapide causée par la perte des motoneurones supérieurs (cortex moteur) et inférieurs (moelle épinière bulbaire/lombaire). Les patients souffrent d'une perte de la fonction motrice et d'une paralysie progressive. L'espérance de vie est de deux à cinq ans à compter de l'apparition des premiers symptômes et la mort est généralement due à une insuffisance respiratoire. Cet article se focalisera sur la SLA bien qu'il existe un spectre de troubles à chevauchement considérable à des degrés divers entre le dysfonctionnement moteur et cognitif, entre la SLA et la démence fronto-temporale (DFT), cause fréquente de démence dans tous les groupes d'âge et une forme majeure de démence précoce [8].

La pathogenèse de la SLA reste inconnue, avec un large éventail de mécanismes potentiels liés à la neurodégénérescence. Un nombre croissant de facteurs génétiques sont reconnus, comme par exemple la mutation d'expansion répétée C9orf72 qui est la principale cause génétique commune à la SLA et à la DFT [9] [10]. En effet l'expansion d'une séquence hexanucléotidique répétitive (GGGGCC ou G4C2) dans le premier intron du gène C9orf72 est la cause pour ~40% de la SLA familiale et 25% de la DFT. Ces répétitions hexanucléotidiques sont aussi trouvées dans 10% des formes sporadiques de chaque indication. Cette expansion pourrait être à l'origine de l'accumulation d'ARNm dans les noyaux ou d'une translation non-canonique en petits dipeptides répétés toxiques ou tout simplement au manque de transcription du gène C9orf72 [11][12].

Une autre association génétique a été observée avec la SLA/DFT. En effet 97% des patients atteints de SLA et 50 % des patients atteints de SLA/DFT présentent des agrégats cytoplasmiques de la forme phosphorylée de la protéine TDP-43 dans les neurones, associés à des mutations dans le gène TARDBP, le gène codant pour TDP-43, indiquant un lien mécanistique entre TDP-43 et SLA/DFT [13].

Une autre association a également été faite entre une mutation sur le gène de la superoxide dismutase 1 (SOD1) et la pathogénèse de la SLA [9][10].

Enfin la dégénérescence des motoneurones observée dans la SLA a également été décrite comme étant en relation avec l'activation de la population microgliale [14] ainsi que sa polarisation M1/M2 [15]. Au cours de la progression de la maladie, la microglie activée représente un continuum entre le phénotype neuroprotecteur M2, qui favorise la réparation des tissus et soutient la survie des neurones en libérant des facteurs neuroprotecteurs, et le phénotype toxique M1, qui produit des cytokines augmentant l'inflammation et soutenant davantage la polarisation M1, contribuant ainsi à la mort neuronale. Les approches thérapeutiques ciblant la polarisation de la microglie et entraînant l'induction du phénotype M2 sont des stratégies prometteuses pour limiter la neurodégénérescence locale et améliorer le pronostic clinique de la maladie. Des analyses *post-mortem* ont permis de définir les caractéristiques neuroinflammatoires telles que l'activation de la microglie et des astrocytes comme caractéristiques du système nerveux central (SNC) des patients atteints de SLA. L'imagerie clinique, les biomarqueurs solubles combinés à une étude mécanistique préclinique, ont établi que la neuroinflammation est un facteur clé de la progression de la SLA [16][17][18].

C'est cette approche que Novartis a choisie de suivre afin de pallier le manque de thérapies liées à la pathogenèse de la SLA, les progrès les plus importants à ce jour pour le traitement de cette pathologie concernant uniquement la prestation de soins (y compris la prise en charge multidisciplinaire) et les soins de soutien (nutrition et assistance respiratoire) [19].

Les modèles animaux couramment utilisés pour les études précliniques dans le cadre de la SLA et de la SLA/DFT ont été établis sur la base des mutations pathogènes trouvées dans la SLA et la DFT. Les souris mutantes portant le gène de la SOD1 muté en position 93 (mSOD1) sont largement utilisées comme modèle parce qu'elles présentent une paralysie progressive, l'agrégation de protéines, une dégénérescence des motoneurones et la gliose, qui sont des caractéristiques des patients atteints de SLA. Une activation microgliale a également été observée dans les modèles SOD1. À ce jour, le modèle $SOD1^{G93A}$ est le plus exploré [20].

Une des approches envisagées par Novartis est de réduire la neuroinflammation et c'est dans ce cadre que nous avons développé une technique combinant l'HIS et l'IHC dans le but de mieux caractériser les sous-populations de microglie de la moelle épinière. Dans cet article, nous présentons donc une méthode de détection d'ARNs et de protéines sur des coupes de moelle épinière fixées et incluses en paraffine.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

a. Animaux

Les souris $SOD1^{G93A}$ mâles (n = 6, B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J, The Jackson Laboratory, JAX stock# 002726) ainsi que des souris non porteuses de la mutation ("non carrier" B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J, The Jackson Laboratory, JAX stock# 002726, nommées NCAR), ont été maintenues dans une animalerie approuvée par l'AAALAC selon un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Les souris ont été acclimatées aux conditions de l'animalerie pendant un minimum de 7 jours avant la manipulation expérimentale. Toutes les expériences ont été conformes au Guide des *National Institutes of Health* pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le Comité institutionnel de soins et d'utilisation des animaux de la société NOVARTIS (Bâle). Des contrôles ont été effectués quotidiennement afin de garantir la bonne santé des animaux. Les animaux ont été sacrifiés à différents âges afin de suivre la progression de la pathologie au cours du temps, soit à 6 semaines, 12 semaines et 16 semaines d'âge. Les résultats montrés dans cette étude ne concerneront que les souris prélevées à 16 semaines.

Des coupes de moelle épinière d'un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ont également été utilisées pour certaines de nos expériences. Ces animaux ont été maintenus dans les mêmes conditions et sacrifiés selon la méthode décrite ci-dessus.

b. Prélèvement et préparation des tissus

Les tissus ont été prélevés sur des souris âgées de 6 semaines à 16 semaines. Au moment du prélèvement des moelles épinières lombaires, les souris ont été profondément anesthésiées par une dose létale d'isoflurane de 3 à 5 %, suivie d'une perfusion transcardiaque avec une solution saline réfrigérée à 0,9 % dans de l'eau déminéralisée (dH_2O) jusqu'à ce que les extrémités des pattes deviennent blanches, puis du paraformaldéhyde réfrigéré à 4 % dans de l'eau tamponnée au phosphate (PB) de 0,1 M (pH 7,4) pendant 4 min. Les moelles épinières lombaires ont ensuite été isolées et post-fixées par immersion dans une solution tamponnée de formaline à 10% (pH 7,4) pendant 16 heures (hrs) à température ambiante. La post-fixation a été standardisée afin de ne pas induire de problème de destruction des épitopes protéiques ni de variation dans la qualité du marquage des ARNs. Après déshydratation dans des bains d'éthanol de pourcentage croissant, les tissus ont été imprégnés puis inclus en paraffine. Les coupes de moelle épinière de 5 µm d'épaisseur ont été recueillies sur des lames Histobond M+ (Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany). Les lames ont été séchées complètement à 37 °C puis à température ambiante (TA) pendant un minimum de trois jours avant d'être utilisées.

Nous avons également utilisé dans les phases de validation du protocole des lames portant des coupes de culot cellulaire de la lignée cellulaire 3T3 de fibroblastes embryonnaires de souris (Cat. N° 310023, ACD Inc.).

c. Sondes ARN et anticorps

Le **Tableau I** donne les caractéristiques des sondes utilisées dans les expériences menées. La validation de la qualité des tissus a été réalisée à l'aide de sondes-contrôles positifs spécifiques des cellules eucaryotes et négatif spécifique de *Bacillus subtilis* et absent des organismes eucaryotes. Les sondes positives utilisées sont basées sur les gènes *Ppib, Ubc, Polr2a*, et enfin *Hprt*. Ces gènes sont tous présents dans les cellules eucaryotes et exprimés à des niveaux différents, *Ubc* étant le plus fortement exprimé, *Ppib* étant modérément haut, *Hprt* et *Polr2a* étant moyennement à faiblement exprimés. Pour les expériences suivantes, nous avons utilisé les sondes spécifiques de l'ARN murin du *Hexb*, *Jun*, Mm-*RNA3*-C3, et Mm-*RNA4*-C4. Les sondes seront incubées pendant 2 hrs à 40 °C. La dilution des sondes est toujours basée sur la sonde C1 comme solution de dilution et nous avons dilué les autres au minimum au 1/50ème sauf pour Mm-*Jun*-C2 qu'il a été nécessaire de diluer au 1/200ème, étant donné que le signal obtenu après une dilution au 1/50ème était beaucoup trop intense et empêchait une visualisation précise de sa localisation. À noter qu'en absence de sondes-C1, il est possible d'utiliser la solution de dilution de sondes (Cat. N° 300041, ACD Inc.) pour diluer les autres sondes.

Sonde	Protéine correspondante	Référence	Espèce	Marqueur	Dilution
DapB	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	Cat. N° 321831	*Bacillus subtilis*	C1	
Polr2a	RNA Polymerase II Subunit A	Cat. N° 321811	*Eucaryote*	C1	
Ppib	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B		*Eucaryote*	C2	1/50
Ubc	Ubiquitine C		*Eucaryote*	C3	1/50
Hprt	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase		*Eucaryote*	C4	1/50
CDxx	Cluster Designation xx	NC-C1	*Eucaryote*	C1	
CDxxL	Cluster Designation xx Ligand	NC-C2	*Eucaryote*	C2	1/50
Hexb	ß-hexosaminidase sous-unité ß	Cat. N° 314231-C1	*Mus musculus*	C1	
Jun	Jun Proto-Oncogène, AP-1 Transcription Factor Sous-unité 1	Cat. N° 453561-C2	*Mus musculus*	C2	1/200
G17	Protéine nommée G17	NC-C3	*Mus musculus*	C3	1/50
RNA4	Protéine 4	NC-C4	*Mus musculus*	C4	1/50

Toutes les sondes ont été commandées à partir du catalogue ACD, Inc. NC : non communiquée

Tableau I : Caractéristiques des sondes utilisées dans les différentes expériences de RNAscope™ seul ou couplé à l'IF.

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont référencés dans le **Tableau II** ainsi que leurs dilutions respectives qui seront réalisées dans le diluant d'anticorps fourni dans le kit de co-détection (Cat. N° 323160, ACD Inc.).

Anticorps Primaire	Espèce	Référence	Fournisseur	Concentration Initiale	Dilution	Anticorps Secondaire	Espèce	Fluorochrome	Référence	Fournisseur	Dilution
Monoclonal IgG2 anti-Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 IBA1	cobaye	Cat.N° 234308	*Synaptic Systems*	2,46 mg/mL	1/500	anti-IgG de cobaye	chèvre	Alexa Fluor™ 488	Cat. N° A-11073	Life Technologies	1/200
Monoclonal IgG anti-Choline Acétyl-Transférase ChAT	lapin	Cat.N° 178850	*Abcam*	2,46 mg/mL	1/500	anti-IgG de lapin	âne	DyLight™ 405	Cat N° 711-475-152	Jackson Immunoresearch	1/200
Polyclonal IgG anti-protéine G17	chèvre	NC	*R&D Systems*	0,2 mg/mL	1/500	anti-IgG de chèvre	âne	Alexa Fluor™ 488	Cat N° 705-545-147	Jackson Immunoresearch	1/200

Tableau II : Caractéristiques et références des anticorps primaires et secondaires utilisés dans les protocoles d'IHC-IF ou de combinaison HIS-IF

d. Protocole complet de détection des ARNs et des protéines

Différentes méthodes ont été utilisées jusqu'à l'obtention d'un protocole robuste, validé et reproductible. Seule la version finale de ce protocole combinant l'HIS et l'IHC est détaillée ici.

La technique du RNAscope™ nécessite l'utilisation de deux kits : le RNAscope™ Ancillary kit for Multiplex v2 (Cat. N° 323120, ACD Inc.) ainsi que les sondes contrôles 4-plex spécifiques d'espèces (voir la note technique 4-plex Ancillary Tech Note 323120-TN), et le RNAscope™ Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (Cat. N° 323100, ACD Inc.).

Les coupes de tissus montées sur lame ont été préalablement chauffées à plat à 58 °C pendant une heure afin de garantir la bonne adhésion des coupes sur les lames pendant toute la durée de la procédure de marquage. Ensuite les lames sont déparaffinées dans deux bains de 5 minutes (min) dans le xylène suivis de deux bains de 2 min dans l'éthanol à 100%. Les lames sont alors laissées à l'air libre à TA pour séchage complet pendant la nuit ou à 60 °C pendant 5 min. Préalablement à l'hybridation des sondes ARN, des prétraitements des tissus sont nécessaires. Le blocage des peroxydases endogènes est réalisé par dépôt de quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (Cat. N° 322335, ACD, Inc.) incubées pendant 10 min à TA. Après lavage dans dH_2O, le démasquage des cibles est réalisé par un tampon dédié (Cat. N° 322000, ACD, Inc.) préparé par une dilution au 1/10ème dans dH_2O puis chauffé jusqu'à ce qu'il bouille. Les lames sont d'abord immergées dans de l'eau bouillante pendant 15 secondes (sec) puis transférées dans le tampon de démasquage pendant 15 min à 98 °C. Puis les lames sont transférées dans dH_2O pour 15 sec à TA avant d'être déshydratées dans un bain d'éthanol à 100% pendant 3 min à TA. Comme précédemment, les lames sont laissées à TA pour séchage. À ce stade, nous avons utilisé le crayon spécifique (Cat. N° 310018) pour créer une barrière hydrophobe autour des coupes afin de limiter le volume des réactifs utilisés dans les étapes suivantes. Il est alors possible de laisser les lames à TA toute la nuit.

À partir de cette étape, nous avons utilisé le four HybEZ™ (ACD, Inc.) pour les incubations à 40 °C. Pour poursuivre le démasquage des cibles, il est nécessaire de traiter les coupes avec la solution Protease Plus (Cat. N°323281, ACD Inc.) à 40 °C pendant 20 min, temps défini pour les coupes de moelle épinière. Après lavage répété dans dH_2O pour un temps inférieur à 15 min, les lames sont incubées avec les dilutions adéquates des sondes Z spécifiques pour *Hexb, Jun, Mm-RNA3* et *Mm-RNA4* pendant 2 hrs à 40 °C. Pour diluer les sondes, nous avons utilisé la sonde C1 comme solution de dilution et nous avons dilué les autres au minimum au 1/50ème sauf pour Mm-*Jun*-C2 qu'il a été nécessaire de diluer au 1/200ème. Pendant ce temps d'incubation, il est possible de préparer le tampon de lavage par dilution au 1/50ème du tampon de lavage 50X (Cat. N° 320058, ACD Inc.) chauffé à 40 °C pendant 10-20 min avant dilution.

Après incubation des sondes, il est recommandé de stocker les lames à 4 °C pendant la nuit dans une solution saline de 5X citrate de sodium (5X SSC pH 7).

Le jour suivant, les lames sont incubées dans les réactifs qui vont construire l'amplification du signal et sa détection fluorescente. Tous les réactifs doivent être placés à TA avant utilisation et les incubations sont faites dans le four HybEZ™ (Cat. N° 321710/321720, ACD Inc.) réglé à la température de 40 °C. Les lames sont incubées séquentiellement dans AMP1 (Cat. N° ref. 323101, ACD Inc.) pendant 30 min à 40 °C, AMP2 (Cat. N° 323102, ACD Inc.) pendant 30 min à 40 °C, puis AMP3 (Cat. N° 323103, ACD Inc.) pendant 15 min à 40 °C. Des lavages à TA dans le tampon dédié dilué au 1/50ème sont intercalés entre chaque étape d'amplification. La révélation du signal apporté par chaque sonde est faite par une séquence d'étapes. D'abord le développement de la sonde C1 se fait par un réactif HRP-C1 (Cat. N° 323104, ACD Inc.) pendant 15 min à 40 °C. Après lavage à TA, le colorant Opal choisi et resuspendu dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) fourni dans les kits Opal™ (Cat. N° DMSO0100UL, Akoya Biosciences, Delaware) est dilué au 1/1000ème dans le tampon (Cat. N° 322809, ACD Inc.) fourni dans le kit RNAscope® Multiplex Fluorescent Kit V2, et incubé pendant 30 min à 40 °C. Après lavage à TA, un bloqueur de peroxydase de Raifort (HRP blocker, Cat. N° 323107, ACD Inc.) est incubé pendant 15 min à 40 °C. Successivement ces trois étapes sont répétées avec les réactifs HRP-C2 (Cat. N° 323105, ACD Inc.), HRP-C3 (Cat. N° 323106, ACD Inc.), HRP-C4 (Cat. N° 323121, ACD Inc.) ainsi que les Opals de différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Nous avons sélectionné les kits Opal™ 520 (Cat. N° FP1487001KT, Akoya Bio), Opal™ 570 (Cat. N° FP1488001KT, Akoya Bio), Opal™ 620 (Cat. N° FP1495001KT, Akoya Bio), et Opal™ 690 (Cat. N° FP1497001KT, Akoya Bio). Après lavage à TA dans le tampon de lavage dédié à l'HIS, les lames sont lavées dans un tampon salin Tris dilué au 1/10ème (Réf. T5912, Sigma) contenant 0,1 % final de Tween®20 (Réf. P2287, Sigma), que nous nommerons par la suite TBS-T.

Ici commence la seconde partie du protocole concernant l'IF qui se fait donc séquentiellement à l'HIS. Il est mentionné dans le manuel fourni par ACD que cette procédure séquentielle ne peut être mise en œuvre que pour une liste restreinte d'anticorps. Il sera donc nécessaire de valider cette approche pour chaque anticorps utilisé dans nos essais. Les anticorps sont préparés par dilution dans le diluant fourni dans le kit de co-détection. Les lames sont donc lavées dans le TBS-T et les anticorps primaires dilués sont incubés pendant 30 min à 40 °C. Après lavage dans le TBS-T, les anticorps secondaires dilués sont incubés pendant 30 min à TA. Après rinçage dans le TBS-T puis dans un bain de TBS, puis de dH_2O, les préparations sont contre-colorées dans 0,1 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Réf. 323108, Roche) pendant 30 sec à TA.

Il est nécessaire d'appliquer le DAPI sur un nombre restreint de 5 lames maximum afin de gérer au mieux le temps court de marquage. Après lavage dans dH_2O, les lames sont montées au Mowiol® 4-88 (Réf. 47-590-4100GM, Calbiochem-Fischer scientific) et stockées à TA pendant au moins 1 h, puis à 4 °C pour un stockage prolongé.

e. Protocoles alternatifs utilisés tout au long de la mise au point du protocole final

Différents tests ont été effectués en amont de la validation finale du protocole. Pour cela nous avons utilisé un kit de RNAscope™ Duplex avec révélation chromogénique : le RNAscope™ 2.5 VS Duplex Assay développé pour une utilisation dans l'automate d'IHC Discovery Ultra™ (Ventana Medical Systems, Tucson). Ce kit nécessite l'utilisation de sondes RNAscope™ 2.5 VS, de sondes C2 VS et des réactifs VS Duplex, tous disponibles chez ACD, Inc. Deux sondes spécifiques des ARN CDxx et CDxxL (références non-communiquées) ont démontré une sensibilité à la fraîcheur des coupes utilisées pour l'hybridation *in situ* et sont prises comme exemple. La révélation de l'hybridation *in situ* est faite par des chromogènes rouge magenta (mRNA RED Detection Kit Cat. N° 07099037001, ACD Inc.) et bleu turquoise (mRNA Teal Detection Kit Cat. N° 08352941001, ACD Inc.) selon les recommandations du fournisseur (voir la note technique RNAscope® VS Duplex Assay Tech Note 323300-USM-ULT). Ce kit est également utilisé pour un test combinant l'HIS à révélation chromogénique et une IHC avec un anticorps primaire pour la détection de la microglie (IBA1), révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (AlexaFluor™488).

Un autre kit a été utilisé dans nos tests de co-détection ARN-protéine : il s'agit du RNAscope™ RNA-Protein Ancillary co-detection kit (Cat. N° 323180, ACD Inc.). Il a été utilisé selon les recommandations du fournisseur (voir la note technique Tech Note 323180 MK 51-174).

f. Microscopie

Les images concernant les Opals™ ont été acquises à l'aide d'un scanner de lames Vectra Polaris™ (PhenoImager™ HT 2.0, Akoya Biosciences) pour une imagerie multispectrale avec une résolution de 0,25 µm/pixel avec un objectif 40 X d'ouverture numérique de 0,75, couplée à une technologie de déconvolution spectrale. Les images issues des préparations d'HIS chromogénique ont été obtenues par le scanner de lames Aperio (Leica Biosystems). Les images concernant l'IHC seule ont été acquises sur le scanner de lames VS120 (Olympus). Dans ces deux derniers cas, les images ont été acquises avec un objectif 20 X d'ouverture numérique de 0,4. Les images ont été obtenues à partir d'une seule coupe de tissu de chaque animal.

Pour chaque coupe de tissu, un champ de vision a été capturé dans une zone de la corne dorsale, région choisie pour son contenu des types cellulaires d'intérêt, notamment les motoneurones et la microglie. Les paramètres d'image ont été acquis avec 1 028 × 1 028 pixels en XY en utilisant une taille de pixel de 0,21 µm/pixel pour Aperio et Olympus. Les filtres utilisés étaient de 488 nm, 561 nm et 638 nm, associés à des filtres d'émission de 525/50, 600/50 et 685/70, respectivement. Aucune analyse d'images n'a été réalisée étant donné que la portée de cet article est focalisée sur le développement de cette méthode combinée HIS-IHC et non sur la quantification des signaux. Seule la superposition des signaux est commentée dans les résultats afin de déterminer la localisation des transcrits d'ARN par rapport aux types cellulaires d'intérêt.

RÉSULTATS

a. Vérification de la compatibilité du traitement du tissu pour une inclusion en paraffine avec la technologie du RNAscope™

La première étape pour garantir le succès de notre approche a d'abord été de vérifier que la préparation de nos tissus était compatible avec une approche de RNAscope™. Pour cela nous avons utilisé en parallèle de nos coupes de moelle épinière, des lames de coupes de culot cellulaire réalisé à partir de culture de cellules 3T3 comme contrôles positifs et négatifs de l'expérience et des sondes - contrôles positifs et négatif. Nous avons suivi le protocole selon les recommandations du fournisseur. La sonde DapB a été déposée sur une lame et révélée avec les 4 systèmes d'amplification C1, C2, C3 et C4. Les sondes positives ont été incubées simultanément sur une lame consécutive avec comme fluorescence associée, Opal™ 520 pour la sonde Polr2a-C1, Opal™ 570 pour la sonde Ppib-C2, Opal™ 620 pour la sonde Ubc-C3, et finalement Opal™ 690 pour la sonde Hprt-C4. Les résultats sont présentés dans la **Figure 2** pour ce qui concerne les cellules 3T3 et dans la **Figure 3** pour ce qui concerne les coupes de moelle épinière. Nous avons montré une réelle différence de détection des ARNs entre les lames incubées avec les sondes – contrôles positifs et les lames incubées avec la sonde négative DapB, le peu de bruit de fond observé ne gênant en rien l'interprétation des marquages obtenus avec les sondes positives. Ce bruit de fond pourrait être expliqué par une faible contamination de la lame au *Bacillus subtilis* ou plus plausiblement et étant donné qu'il n'apparaît que dans certains canaux de fluorescence, à un bruit de fond électronique de l'appareil d'acquisition d'images. En termes de niveau d'expression relative estimée visuellement, et comme attendu, *Ubc* a la plus forte expression, *Ppib* est considéré comme modéré-haut et *Hprt* et *Polr2a* ont des expressions modérées-basses, validant ainsi la qualité de nos tissus inclus en paraffine.

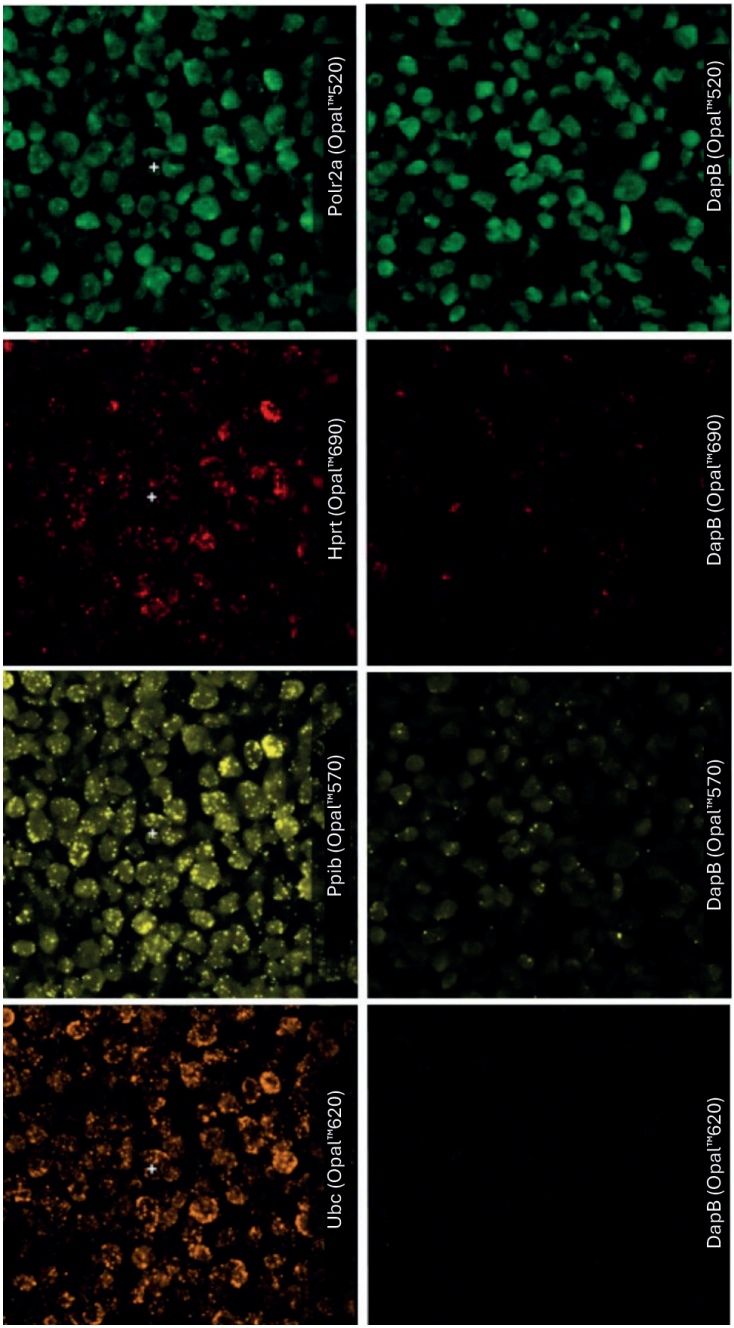


Figure 2 : Validation de la préparation des tissus par l'utilisation de lames et de sondes contrôles. L'HIS a été réalisée sur des lames contrôles de coupes de culots cellulaires de cellules 3T3 et les images ont été acquises sur le scanner de lames Vectra Polaris™. Panneau du haut : cellules 3T3 incubées avec les sondes – contrôles positifs, révélant un signal dans chaque canal de fluorescence. Panneau du bas : cellules 3T3 incubées avec la sonde DapB – contrôle négatif, ne révélant pas ou peu de signal dans chaque canal de fluorescence. La barre d'échelle représente 20 µm.

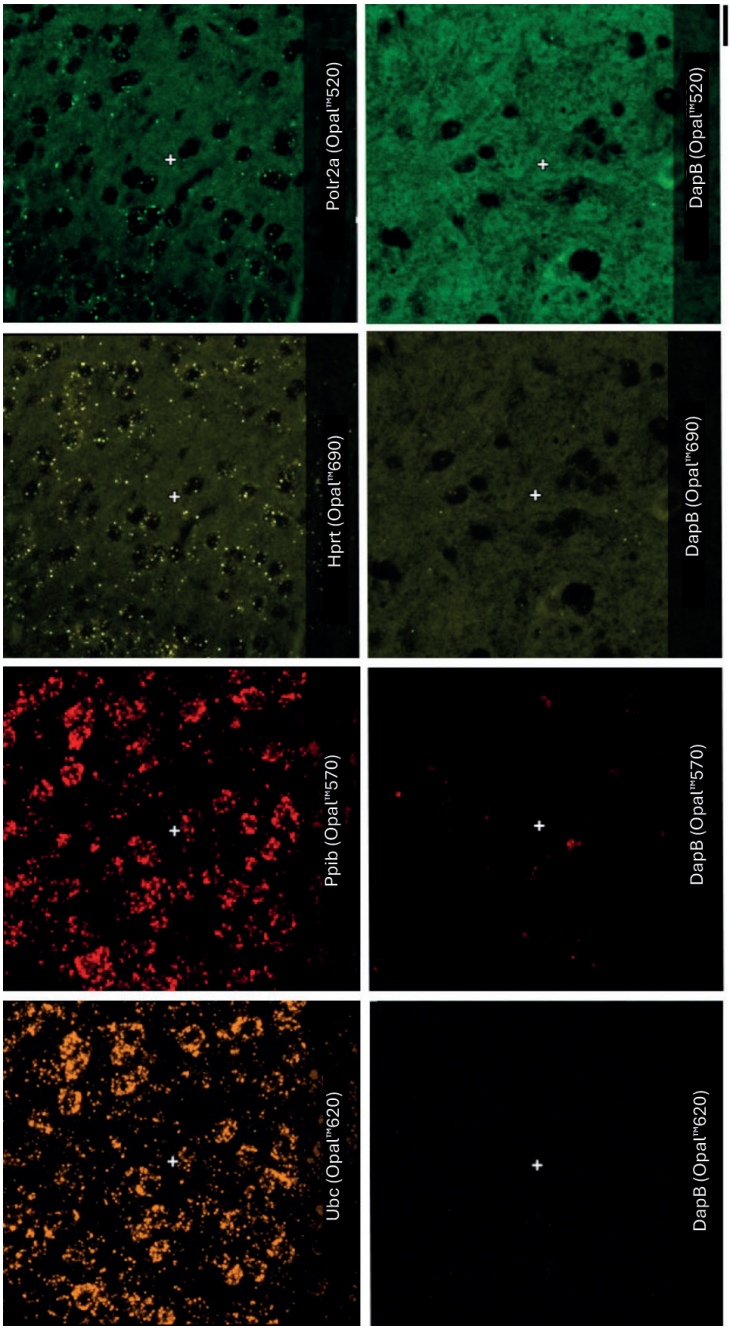


Figure 3 : Validation de la préparation des tissus par l'utilisation de sondes contrôles. L'HIS a été réalisée sur des lames de coupes de moelle épinière de souris NCAR et les images ont été acquises sur le scanner de lames Vectra Polaris™. Panneau du haut : coupe de tissu incubée avec les sondes – contrôles positifs, révélant un signal dans chaque canal de fluorescence. Panneau du bas : coupe de tissu incubée avec la sonde DapB – contrôle négatif, ne révélant pas ou peu de signal dans chaque canal de fluorescence. La barre d'échelle représente 20 µm.

b. Vérification de la qualité du tissu pour l'application de la technologie du RNAscope™

La deuxième étape pour garantir le succès de notre approche a été de vérifier que la fraîcheur de nos coupes n'avait pas d'impact sur la détection des ARNs par la technologie du RNAscope™. En effet, une expérience précédente d'HIS duplex avait démontré l'importance d'utiliser des coupes fraîches sous peine de perdre le signal d'HIS. La **Figure 4** illustre bien cet impact. On voit facilement que les sondes CDxx et CDxxL sont bien détectées par HIS trois jours après la coupe de moelle épinière d'une souris d'un modèle de sclérose en plaques (modèle EAE pour encéphalomyélite auto-immune expérimentale) utilisée comme contrôle positif pour la détection de ces ARNs (**Figure 4A**). Alors qu'on n'observe aucun signal sur une coupe du même tissu préparée un mois plus tôt (**Figure 4B**). Nous avons donc réalisé des coupes fraîches des moelles épinières du modèle SOD1^{G93A} (**Figures 4D et 4E**) et des souris contrôles NCAR (**Figure 4C**), ce qui nous a permis de détecter les ARNs CDxx ainsi que les ARNs CDxxL malgré la rareté des signaux observés. Nous avons ainsi pu voir une augmentation de l'expression de ces gènes dans les souris SOD1^{G93A} par rapport aux souris NCAR.

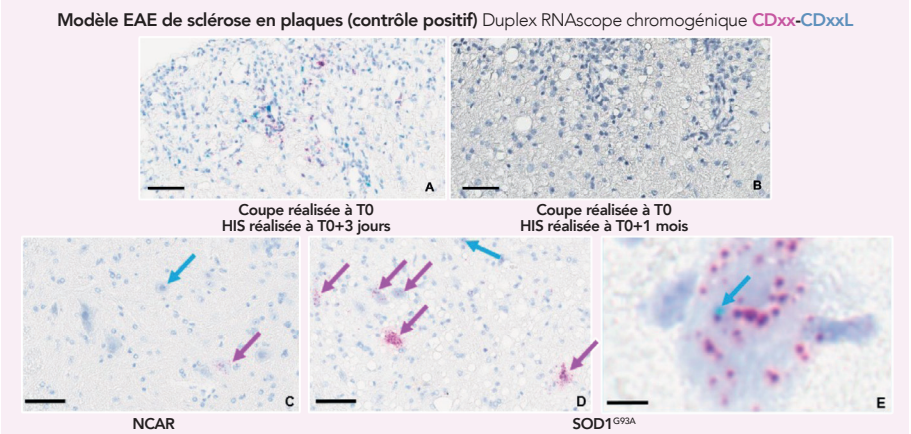


Figure 4 : Démonstration de l'impact de la fraîcheur des coupes sur la réussite de l'HIS. Un modèle de sclérose en plaques (modèle EAE pour encéphalomyélite auto-immune expérimentale) a été utilisé comme contrôle positif pour la détection des ARNs CDxx et CDxxL. L'HIS réalisée trois jours après la coupe des tissus donne un beau signal avec les deux sondes CDxx et CDxxL (A). La même expérience réalisée 1 mois après la coupe des tissus ne donne plus aucun signal avec aucune des deux sondes (B). Des coupes fraîches des moelles épinières du modèle SOD1^{G93A} (animaux de 16 semaines, D et E) et des souris contrôles NCAR (C) nous ont permis de détecter les ARNs CDxx (flèches de couleur magenta) ainsi que les ARNs CDxxL (flèches turquoises) malgré la rareté des signaux observés. Nous avons ainsi pu voir une augmentation de l'expression de ces gènes dans les souris SOD1^{G93A} par rapport aux souris NCAR. La sonde CDxx apparaît en magenta et la sonde CDxxL apparaît en turquoise. Les barres d'échelle (A, B, C et D) représentent 60 µm et la barre d'échelle de (E) représente 10 µm.

c. Validation des anticorps dans les conditions de prétraitement du kit RNAscope™

Etant donné que le prétraitement des tissus est essentiel pour améliorer la pénétration des sondes ARN, nous avons validé les anticorps choisis dans les conditions de prétraitement du kit RNAscope™ de Co-Détection RNA-protéine. Les anticorps permettant de détecter IBA1, ChAT (choline acétyltransférase) et la protéine nommée ici G17 ont été utilisés dans des conditions classiques de démasquage d'antigènes par chauffage à 98 °C dans un tampon 10 mM citrate pH 6 en comparaison des conditions de prétraitement du kit RNAscope™. La **Figure 5** résume les résultats obtenus sur des coupes de moelle épinière de souris NCAR de 16 semaines. Le marqueur de la sous-population microgliale (G17) est détecté par l'anticorps spécifique après démasquage des épitopes protéiques par la solution de démasquage à la chaleur du kit (**Figure 5A**), mais pas dans la condition de démasquage combinée à l'utilisation de la Protease Plus (**Figure 5B**). Les anticorps spécifiques de IBA1 et de ChAT donnent un beau marquage dans les conditions classiques d'IHC (**Figure 5C**) mais les marquages sont totalement perdus dans les conditions de prétraitement du RNAscope™ incluant ou non la protéase (**Figure 5D** pour IBA1 et **Figure 5E** pour ChAT).

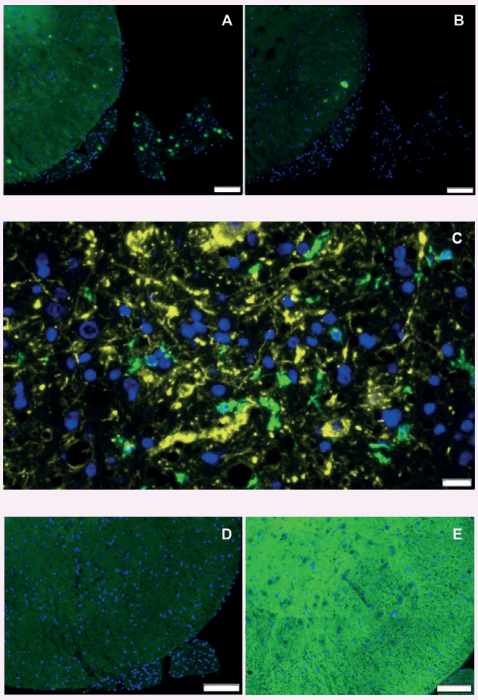


Figure 5 : Validation des anticorps dans les conditions de prétraitement du kit de co-détection RNA-protéine. Des coupes de moelle épinière de souris NCAR de 16 semaines ont été traitées par la solution de démasquage antigénique incluse dans le kit RNAscope™ Ancillary Co-Detection Kit suivie ou non de la Protease Plus. Le marqueur de la sous-population microgliale (G17) est détecté par l'anticorps spécifique après démasquage des épitopes protéiques par la solution de démasquage à la chaleur du kit (A), mais pas dans la condition de démasquage combinée à l'utilisation de la Protease Plus (B). Les anticorps spécifiques de IBA1 et de ChAT donnent un beau marquage dans les conditions classiques d'IHC (C) mais les marquages sont totalement perdus dans les conditions de prétraitement du RNAscope™ incluant ou non la protéase (D pour IBA1 et E pour ChAT). Le DAPI apparaît en bleu sur les images, le marqueur de microglie G17 apparaît en vert ainsi que le marqueur IBA1, le marqueur de motoneurones ChAT apparaît en jaune. Les barres d'échelle représentent 100 µm (A, B, D, E) ou 20 µm (C).

d. Changement de l'approche de co-détection par une approche séquentielle

Etant donné les résultats obtenus avec les anticorps précédemment utilisés, nous avons changé d'approche comme recommandé par le fournisseur et avons adopté une approche séquentielle de la combinaison HIS-IHC. Le kit utilisé est le kit manuel de RNAscope™ Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 combiné au RNAscope™ Ancillary kit for Multiplex v2.

Un premier test a consisté à combiner deux de nos anticorps d'intérêt après avoir suivi le protocole d'HIS en focalisant sur les prétraitements et en omettant les sondes ARN, par souci d'économie. Ainsi les anticorps anti-IBA1 et anti-ChAT ont permis de détecter les types cellulaires correspondant, à savoir la microglie et les motoneurones, respectivement. Le résultat obtenu sur une souris SOD1 est présenté **Figure 6A**. Cela nous a encouragé à poursuivre nos investigations en combinant cette fois deux sondes, *Hexb* et *G17*, avec l'anticorps anti-IBA1.

Le résultat obtenu sur une souris NCAR est présenté **Figure 6B**. Cette approche séquentielle a permis de mettre en évidence la microglie avec l'anticorps IBA1 et les deux ARNs *Hexb* et *G17*.

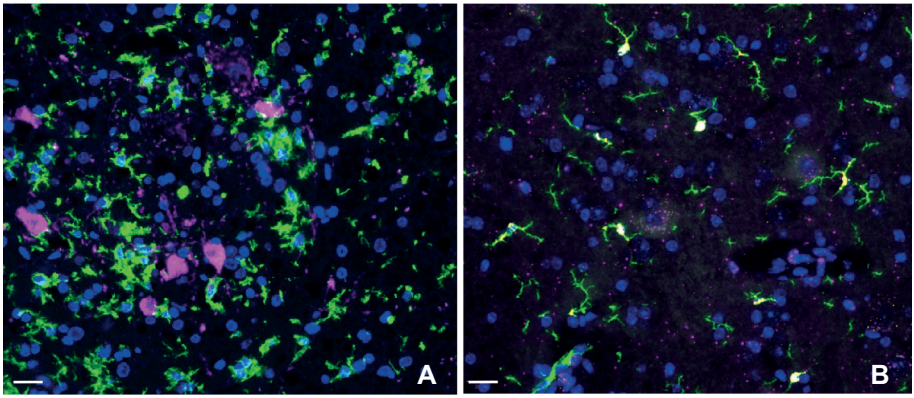


Figure 6 : Validation des anticorps dans les conditions de prétraitement de la méthode séquentielle de co-détection RNA-protéine. Des coupes de moelle épinière de souris SOD1 (A) ou NCAR (B) de 16 semaines ont été traitées par le protocole séquentiel HIS-IHC. (A) Les cellules microgliales sont détectées par l'anticorps spécifique anti-IBA1 en vert et les motoneurones sont détectés par l'anticorps anti-ChAT en magenta, les noyaux sont contre-colorés au DAPI en bleu. (B) Les sondes *HexB* révélée en jaune et G17 révélée en magenta donnent un marquage, colocalisé pour *HexB* avec le marquage obtenu avec l'anticorps spécifique de IBA1 en vert, les noyaux sont contre-colorés au DAPI en bleu. Les barres d'échelle représentent 20 µm.

e. Choix de la révélation dans le cadre d'un multiplexage : chromogénique, fluorescent ou mixte ?

Dans le but de pouvoir combiner puis imager un multiplexage 6 couleurs, et étant donné notre limitation dans les filtres fluorescents disponibles sur notre scanner de lames Olympus VS120, nous avons étudié la possibilité de combiner la révélation fluorescente des anticorps et la révélation chromogénique des sondes d'HIS. Pour cela nous avons réalisé un multiplexage séquentiel de l'anticorps IBA1 pour la détection de la microglie après une détection chromogénique des ARNs *Hexb* et *G17* avec le kit RNAscope™ Duplex. La sonde *Hexb* a été révélée par le chromogène Red, la sonde *G17* par le chromogène Teal puis l'anticorps IBA1 a été révélé par un anticorps secondaire couplé à l'AlexaFluor™ 488, le tout contre-coloré au DAPI. Les résultats obtenus sur une souris SOD1 sont présentés **Figure 7**. L'anticorps spécifique pour IBA1 montre un beau marquage de la microglie (**Figure 7A**) et les deux sondes ont permis de mettre en évidence leurs ARNs respectifs avec une révélation chromogénique (**Figure 7B**). Cependant après une analyse minutieuse des signaux, nous avons pu remarquer que le signal fluorescent est masqué par le dépôt des marqueurs chromogéniques qui ne permet plus à l'AlexaFluor488 d'émettre sa fluorescence (voir astérisques). Un fin liseret fluorescent reste visible en périphérie des cellules microgliales IBA1+ et doublement marquées par *HexB-G17*.

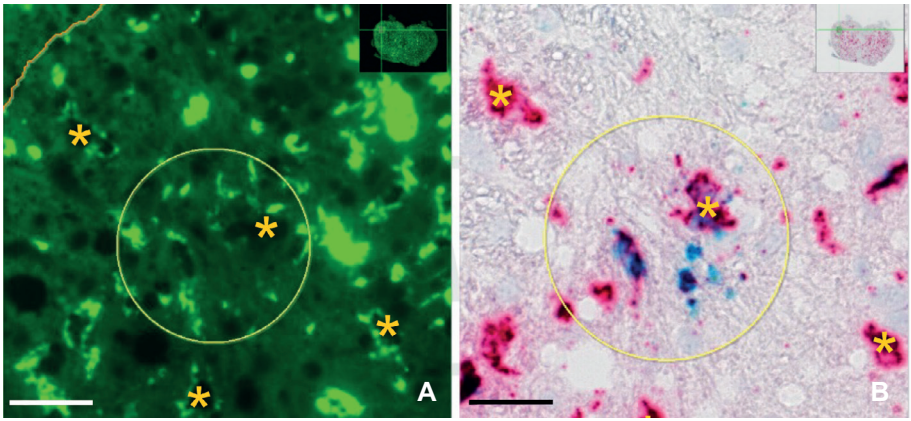


Figure 7 : Choix du système de révélation des marquages d'HIS et d'IHC. Des coupes de moelle épinière de souris SOD1 de 16 semaines ont été traitées par le protocole séquentiel d'HIS RNAscope® DuPlex et d'IHC, combinant les sondes *Hexb* (C1 – chromogène rouge) et G17 (C3 – chromogène turquoise) (B) avec l'anticorps anti-IBA1 révélé en fluorescence par un anticorps secondaire lié à l'AlexaFluor™488 (vert) (A). Les astérisques démontrent l'absence de fluorescence aux endroits où les chromogènes se sont déposés en quantité alors qu'un liseret fluorescent est présent en périphérie de ces cellules microgliales. Les barres d'échelle représentent 20 µm.

Notre choix se tournera donc vers une révélation totale en fluorescence pour éviter tout masquage de signaux positifs. Un exemple est donné en **Figure 8**.

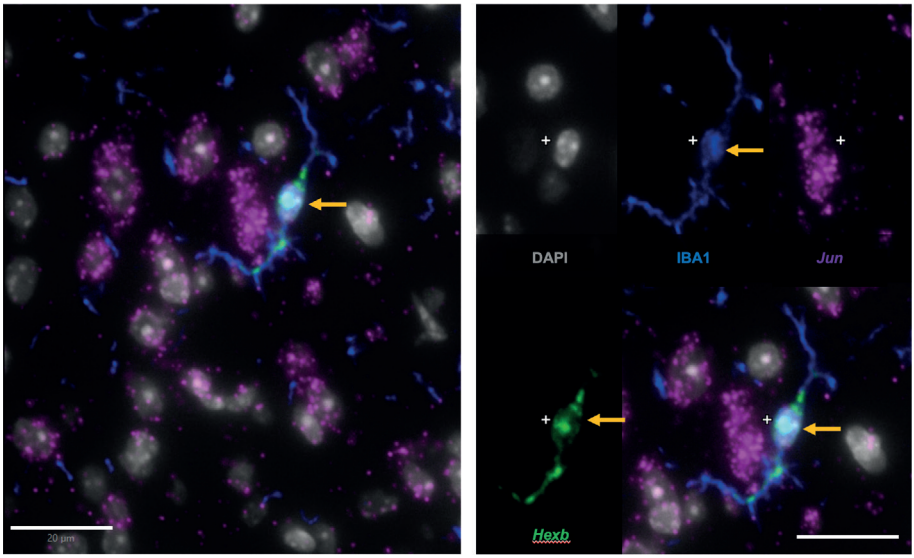


Figure 8 : Superposition des signaux *Hexb* et IBA1 sur les cellules microgliales. Des coupes de moelle épinière de souris NCAR de 16 semaines ont été traitées par le protocole séquentiel d'HIS RNAscope®, combinant les sondes *Hexb* (C1 – Opal™ 520, vert) et *Jun* (C3 – Opal™ 570, magenta), et d'IHC avec l'anticorps anti-IBA1 révélé en fluorescence par un anticorps secondaire lié à l'AlexaFluor™647 (bleu). La contre-coloration au DAPI apparaît sur les noyaux en gris. La flèche orange montre la parfaite colocalisation des marquages relatifs aux cellules microgliales *Hexb* et IBA1. Les barres d'échelle représentent 20 µm.

f. Imagerie d'un multiplex fluorescent

Nous avons finalement pu combiner l'HIS des 4 sondes avec l'IHC des deux anticorps sur une même lame contre-colorée au DAPI pour la détection des noyaux, soit 6 fluorochromes et le DAPI. Le problème de l'imagerie de ces lames s'est alors posé. Plusieurs options se présentent pour obtenir les images de ce type de multiplex. Un microscope confocal à balayage laser permet de choisir précisément de très courtes bandes passantes de longueur d'ondes d'excitation et d'émission, et donc de combiner plusieurs fluorochromes. Un système d'imagerie multispectrale comme le système Vectra Polaris (PhenoImager™ HT 2.0, Akoya) permet de scanner des lames entières. Cependant le système a été optimisé pour imager des échantillons utilisant des réactifs couplés aux Opals (Akoya). Il est possible d'imager d'autres fluorochromes mais il est alors nécessaire de construire sa propre bibliothèque de

déconvolution de signal, ce qui demande un effort supplémentaire non négligeable. L'option que nous choisirons sera une approche combinée, par l'acquisition des images de nos lames avec le PhenoImager™ puis avec un scanner de lames équipé des filtres adéquats aux autres fluorochromes comme les AlexaFluor™. Là encore cette approche combinée demande de choisir les fluorochromes en évitant trop de superposition des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission.

CONCLUSION

L'immunohistochimie et la technique d'hybridation *in situ* sont toutes deux utilisées en histologie pour visualiser des antigènes tissulaires ou des ADNs ou ARNs cellulaires. Chaque technique présente ses avantages et inconvénients.

L'IHC permet la détection d'antigènes spécifiques grâce à des anticorps, avec actuellement un large éventail de marqueurs disponibles, couplés à des systèmes de détection de plus en plus performants qui permettent la détection d'antigènes même faiblement exprimés. Cependant la sensibilité reste variable selon le système d'amplification utilisé, avec toujours une possibilité de faux positifs ou faux négatifs, et une dépendance aux anticorps de bonne qualité, bien caractérisés par les fournisseurs.

La technologie RNAscope™ fournie par Advanced Cell Diagnostics (ACD) permet la détection spécifique de l'ARN à l'échelle cellulaire. La sensibilité de cette technique est élevée même pour des ARNs faiblement exprimés et l'hybridation est également très spécifique grâce aux séquences nucléotidiques complémentaires de la paire de Z spécifiques de la cible. Les kits de technologie RNAscope™ représentent une avancée considérable en termes de puissance et de facilité de réalisation de l'HIS, simplifiant considérablement les méthodes classiques d'HIS tout en offrant des niveaux de sensibilité de détection de molécules uniques. Cependant cela nécessite d'utiliser des sondes spécifiques pour chaque ARN cible, le protocole RNAscope™ est beaucoup plus complexe que celui de l'IHC, ce qui peut augmenter les chances d'erreurs techniques, et son coût est plus élevé pour les réactifs et les équipements nécessaires, comme le four d'hybridation. Il faut également citer une limitation commune aux deux techniques qui est la bonne conservation des antigènes et ARNs par une bonne préparation des tissus, la fixation pouvant affecter la qualité des ARNs ou encore les prétraitements menant à la dégradation des antigènes, entraînant une perte de signal.

Nous avons donc développé un protocole de détection en immunofluorescence multiplex en combinaison séquentielle d'ARNs et de protéines qui a contribué au phénotypage de types de cellules spécifiques, comme le sous-typage des

cellules microgliales de moelle épinière dorsale du modèle de souris transgéniques SOD1^{G93A} par rapport aux souris NCAR. L'HIS par RNAscope™ combinée à l'IHC dans des coupes de tissus fixés et inclus en paraffine s'est révélée efficace pour la détection de transcrits de gènes nouvellement identifiés par d'autres techniques, et leur localisation dans le type cellulaire d'intérêt. Cette combinaison permettra de quantifier les signaux obtenus.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Marie Ronco pour la gestion des animaux, Vincent Romanet pour l'acquisition des images avec le système Polaris, et Heidi Jeker pour la réalisation des expériences d'HIS et IHC-IF et la qualité apportée pour l'obtention de ces résultats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] ORTIZ H. C. Immunohistochemistry in Historical Perspective: Knowing the Past to Understand the Present. *Methods Mol Biol*, 2022, **2422**, 17-31.

[2] WERNER M., CHOTT A., FABIANO A., BATTIFORA H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 2000, **24**, 1016-19.

[3] VENTEO L. et SUTTER A. Les différents systèmes d'amplification en immunohistochimie : avantages, inconvénients et optimisation. *Rev Fr Histotechnol*, 2011, (**24**)1, 114-126.

[4] GENTON C.Y. L'immunohistochimie : son principe, ses applications et ses limites. *Clin Mother Child Health*, 2006, (**3**)1, 477-481.

[5] YOUNG A. P., JACKSON D. J., and WYETH R. C. A technical review and guide to RNA fluorescence *in situ* hybridization. Peer J. 2020, **8**, e8806.

[6] WANG F., et al. RNAscope: a novel *in situ* RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 2012, **14**(1), 22-9.

[7] ATOUT S., SHURRAB S., and LOVERIDGE C. Evaluation of the suitability of RNAscope as a technique to measure gene expression in clinical diagnostics: a systematic review. *Mol Diagn Ther*, 2022, **26**, 19–37.

[8] LING S C., POLYMENIDOU M., and CLEVELAND D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, 2013, **79**(3), 416-38.

[9] GREGORY J. M. *et al*. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Genetic Medicine Reports*, 2020, **8**, 121-131.

[10] RANGANATHAN R. *et al*. Multifaceted Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia. *Front Neurosci*, 2020, **14**, 684.

[11] BALENDRA R. and ISAACS A.M. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol*, 2018, **14**(9), 544-558.

[12] SMEYERS J., BANCHI E.-G., LATOUCHE M. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Front Cell Neurosci*, 2021, **15**, 661447.

[13] NEUMANN M., *et al*. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 2006, **314** (5796), 130-3.

[14] GAO C., JIANG J., TAN Y. and CHEN S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, **8**(1), 359.

[15] GELOSO M.C., *et al*. The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci*, 2017, **9**, 242.

[16] DE MARCHI F., et al. Neuroinflammatory Pathways in the ALS-FTD Continuum: A Focus on Genetic Variants. *Gene*s (Basel), 2023, **14**(8), 1658.

[17] VALORI C.F., SULMONA C., BRAMBILLA L., ROSSI D. Astrocytes: dissecting their diverse roles in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Cells*, 2023, **12**(11), 1450.

[18] HAUKEDAL H. and FREUDE K. Implications of Microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *J Mol Biol*, 2019, **431**(9), 1818-1829.

[19] HOBSON E.V., MAC DERMOTT C.J. Supportive and symptomatic management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 2016, **12**(9), 526-38.

[20] GOIS A.M., *et al*. In vitro and in vivo models of amyotrophic lateral sclerosis: an updated overview. *Brain Res Bull*, 2020, **159**, 32-43.