Les oligodendrocytes sont-ils concernés par l'accumulation d'alpha-synucleine pathologique dans le cerveau de souris TGM83 : études immunohistochimiques comparées

Julie Valantin, A. Bencsik, Mickael Leboidre

▶ **To cite this version:**

Julie Valantin, A. Bencsik, Mickael Leboidre. Les oligodendrocytes sont-ils concernés par l'accumulation d'alpha-synucleine pathologique dans le cerveau de souris TGM83 : études immunohistochimiques comparées. Revue Française d'Histotechnologie, 2015, 27 (1), pp.29-45. anses-01874783

HAL Id: anses-01874783

https://anses.hal.science/anses-01874783

Submitted on 18 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Rev. Fr. Histotechnol., 2014-2015, **27**, n°1, p. 29 à 45

LES OLIGODENDROCYTES SONT-ILS CONCERNÉS PAR L'ACCUMULATION D'ALPHA-SYNUCLEINE PATHOLOGIQUE DANS LE CERVEAU DE SOURIS TGM83 : ETUDES IMMUNOHISTOCHIMIQUES COMPAREES

Julie VALANTIN, Mikael LEBOIDRE et Anna BENCSIK*

*anna.bencsik@anses.fr

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

RESUME

Pour évaluer le rôle de substances chimiques potentiellement neurotoxiques, comme les pesticides ou les nanoparticules (NP), 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'analogues expérimentaux. Des expositions réalistes par voie alimentaire sont menées sur des lignées de souris sauvage C57Bl/6 et transgénique TgM83, celle-ci exprimant une α-synucléine humaine mutée A53T. Dans les études pilotes de l'impact potentiel des NP sur les maladies neurodégénératives, l'analyse histopathologique des cerveaux des souris exposées se traduit par l'apparition d'une gliose réactionnelle, d'une inflammation cérébrale, et d'une accumulation d'α-synucléine pathologique. Si le plus souvent le marquage immunohistochimique de cette α-synucléine pathologique concerne diverses régions de substance grise et témoigne d'une accumulation intraneuronale, un marquage identifié dans la substance blanche rappelant celui des oligodendrocytes a aussi été observé sur quelques cerveaux de souris de la lignée TgM83 exposées aux NP. Cette observation évoque le marquage rapporté pour un type d'α-synucléinopathies humaines, l'atrophie multi-systématisée. Ainsi pour éprouver l'hypothèse d'une implication possible des oligodendrocytes dans l'accumulation d'α-synucléine pathologique dans le modèle TgM83, nous avons mis en place un protocole de détection immunohistochimique des oligodendrocytes, en déterminant les conditions

optimales (démasquages antigéniques et dilution) avant de l'appliquer dans une stratégie de marquages multiples. Pour faire face à une difficulté méthodologique reposant sur l'usage d'anticorps primaires produits chez la même espèce, nous avons testé l'usage d'un kit dédié. Nous rapportons ici les modalités d'application de ce kit en soulignant les avantages mais aussi les limites identifiées de ce kit.

ABSTRACT

To study the possible impact of chemical substances, like pesticides or nanoparticules (NP), on human neurodegenerative diseases associated to abnormal expression of the α-synuclein protein (Parkinson's disease, Lewy body dementia, multi-systematized atrophy), our laboratory uses experimental analogues. Among them the C57Bl/6 wild-type mouse line and the TgM83 transgenic mouse line that expresses a mutant A53T form of human α-synuclein are studied. Realistic exposures are performed using oral route. First histological analyses of brains of exposed TgM83 mice reveal the presence of gliosis, brain inflammation as well as accumulation of pathological form of α-synuclein. Beside classical neuronal expression of this abnormal α-synuclein in various gray matter areas, a labeling identified in the white matter points out that oligodendrocytes may be also concerned by the α-synuclein related disorder. This observation evokes the typical labeling reported in the brain of humans with multi-systematized atrophy. Thus to test the assumption of a possible implication of the oligodendrocytes in the pathological accumulation of α-synuclein in the TgM83 model, we set up a protocol of oligodendrocyte detection using immunohistochemistry. Here we report the optimal conditions determined for an application on fixed paraffin embedded tissue samples that was used consecutively in a strategy of multiple labeling. To deal with a major methodological difficulty resting on the use of primary antibodies produced in the same species, we tested the use of a dedicated commercial kit. We report here not only the principle and details of application of this kit, but also the advantages and the limits identified.

INTRODUCTION

L'α-synucléine est une protéine neuronale de 140 acides aminés, présente principalement sous forme soluble dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses pré-synaptiques qui peut aussi adopter une conformation secondaire en hélice α et se lier aux membranes, en particulier celles des vésicules, régulant ainsi la libération de neurotransmetteurs (NT) en particulier catécholaminergiques dans les jonctions synaptiques (Larsen et al. 2006). Son rôle physiologique reste cependant mal connu et l'α-synucléine est surtout étudiée pour son implication dans un groupe de maladies neurodégénératives, appelé « synucléinopathies », parmi lesquelles on peut citer la maladie de Parkinson (MP), l'atrophie multi-systématisée et la démence à corps de Lewy. Ces pathologies humaines sont toutes caractérisées par la présence de corps d'inclusions, composés d'agrégats insolubles d'α-synucléine fibrillaire, phosphorylée, s'accumulant dans le cytoplasme des neurones ou des cellules

gliales (atrophie multi-systématisée). De plus, certaines formes héréditaires de ces protéinopathies (formes familiales de la MP) sont dues à des mutations ponctuelles dans le gène de l'α-synucléine, voire à des variations du nombre de copies de celui-ci, renforçant le lien entre l'apparition de formes altérées ou surabondantes de cette protéine et le développement de troubles neurodégénératifs (Devine et al. 2011).

L'étiologie de la maladie de Parkinson (MP) est multi-factorielle et met en jeu des interactions gènes-environnement. Le rôle des pesticides dans la survenue de la maladie est maintenant avéré et des études d'expositions professionnelles, notamment en milieu agricole, soutiennent cette hypothèse. Certains pesticides comme le paraquat (herbicide), le maneb (fongicide), la roténone (insecticide), ayant une influence sur les molécules d'α-synucléine (Moretto and Colosio 2013) exercent des effets toxiques par la production de dérivés réactifs de l'oxygène (stress oxydatif). La mitochondrie semble jouer un rôle majeur dans cette production, pour la roténone il a été montré qu'elle agit en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Seaton et al. 1997), alors que le paraquat pourrait agir en inhibant soit le complexe I soit le complexe II (Cocheme et Murphy 2008, Drechsel et Patel, 2009). D'autres facteurs chimiques de plus en plus présents dans notre environnement pourraient également participer au développement des α-synucléinopathies (Bencsik 2014). Ainsi le fait que des nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre soient capables d'augmenter de 3 fois la vitesse normale d'agrégation de l'alpha synucléine et ce à une concentration aussi faible que 20 nM (Alvarez et al. 2013) suggère que les nanoparticules pourraient être de nouveaux facteurs environnementaux à étudier. Plusieurs modèles animaux d'intoxication par des pesticides ou composés apparentés ont été développés et ont pu démontrer plus précisément un lien entre l'exposition à des pesticides et une altération de l'expression de l'α-synucléine. Parmi les modèles *in vivo* d'altérations de l'α-synucléine, l'usage de souris transgéniques est particulièrement adapté.

Le laboratoire de l'ANSES de Lyon utilise la lignée de souris transgénique TgM83 qui surexprime une α-synucléine humaine mutée en A53T (Giasson et al. 2002) sous le contrôle du promoteur de la protéine prion. De ce fait, ces souris développent spontanément un processus neurodégénératif au cours de leur vieillissement, s'exprimant par des atteintes neurologiques et motrices entre 12 et 18 mois, conduisant à la mort en une dizaine de jours après l'apparition des premiers signes cliniques. Ces atteintes neurologiques se traduisent par l'accumulation d'α-synucléine phosphorylée en sérine 129, formant des agrégats sous la forme d'inclusions intra-cytoplasmiques typiques et par un phénomène de neuro-inflammation mis en évidence dans le cerveau des souris malades. Dans ce modèle, les inclusions sont particulièrement denses dans la moelle épinière, le tronc cérébral, le cervelet et quelques régions du thalamus. L'analyse immunohistochimique des cerveaux de souris TgM83 symptomatiques révèle aussi une gliose

astrocytaire accompagnée d'une inflammation cérébrale identifiée par une réaction microgliale.

Des expositions réalistes par voie alimentaire ont été menées parallèlement sur la lignée de souris sauvage C57Bl/6 et la lignée transgénique TgM83. Dans les études pilotes de l'impact potentiel des NP sur les maladies neurodégénératives, l'impact histopathologique sur les cerveaux des souris se traduit par une gliose réactionnelle et une inflammation cérébrale accrue par rapport au témoin. Dans le modèle TgM83, si le plus souvent le marquage immunohistochimique identifiant la forme pathologique de l'α-synucléine correspond au marquage habituel déjà décrit dans des régions de substance grise et témoignant d'une accumulation intraneuronale, un marquage rappelant celui des oligodendrocytes a aussi été observé sur quelques cerveaux. Cette observation évoque le marquage caractéristique rapporté pour un type d'α-synucléinopathies humaines (Spillantini and Goedert 2000), l'atrophie multi-systématisée et qui pourrait donc être également observé dans le modèle de souris TgM83.
Pour répondre à l'hypothèse d'une implication possible des oligodendrocytes dans l'accumulation d'α-synucléine pathologique dans le modèle TgM83, nous avons d'abord mis en place un protocole de détection immunohistochimique des oligodendrocytes, en déterminant les conditions optimales à appliquer sur des coupes de cerveaux fixés inclus en paraffine (démasquages antigéniques et dilution). Les oligodendrocytes, population cellulaire majoritaire du SNC, représentent 75% de la population totale des cellules gliales. D'origine neuroectodermique, ils sont responsables de la myélinisation des fibres nerveuses du SNC, indispensable à l'efficacité de transmission de l'influx nerveux. Un oligodendrocyte est capable de myéliniser plusieurs axones et est co-localisé au niveau de ces prolongements. Ils participent également à un rôle nourricier par passage transcellulaire des nutriments. Sur une coloration hématoxyline et éosine (H&E), on les distingue des astrocytes par un noyau plus petit avec une chromatine dense et une zone péricentriolaire claire, avec peu de prolongements cytoplasmiques courts et ramifiés. Pour un marquage spécifique, il est possible de recourir à des anticorps reconnaissant des immunogènes membranaires des oligodendrocytes, y compris ceux situés dans la gaine de myéline (Schira et al. 2012). Nous avons sélectionné un anticorps reconnaissant une protéine membranaire appartenant à la famille des claudines, impliquée dans le maintien des jonctions serrées entre cellules ; cet anticorps, produit à partir d'un peptide synthétique humain peut-être appliqué à l'étude de tissus de souris (Murakami et al. 2013). Puis nous avons appliqué plusieurs stratégies de marquages multiples en immunohistochimie (IHC), et en immunofluorescence (IF). La difficulté liée à l'usage de 2 anticorps primaires produits chez la même espèce nous a conduit a éprouvé l'usage d'un kit dédié, récemment mis sur le marché. Le but de cet article est de décrire cette application en soulignant les apports et les limites que nous avons pu identifier.

MATERIELS ET METHODES

Animaux et nanoparticules

Deux lignées de souris sont utilisées, des souris C57Bl/6 (Laboratoire Charles River, L'Arbresle) et des souris transgéniques TgM83, produites par la plateforme d'expérimentation animale (PFEA) de l'Anses de Lyon. Les souris TgM83 expriment l'α-synucléine humaine mutée en A53T (Giasson et al. 2002) sous le contrôle du promoteur de la protéine prion comparativement à la lignée sauvage C57Bl/6 qui n'exprime que l'α-synucléine murine. Le recours à cette lignée transgénique permet de cibler l'impact possible des produits chimiques sur l'altération de l'expression de l'α-synucléine humaine. Cinq à sept souris par lot sont exposées à des NP par voie orale, à l'aide de l'eau de boisson quotidienne contenant les NP à une concentration de 30 µg/mL. La préparation des solutions est la même que celle déjà décrite en détails dans un article précédent publié dans la revue de l'AFH (Couderc et al. 2013). Une solution mère est préparée au 1/20ème dans une solution d'albumine bovine sérique (BSA) filtrée, puis les échantillons sont dispersés par sonification : 3 cycles de 24 minutes à 500W, afin d'éviter la formation d'agrégats selon un protocole de dispersion validé par une action conjointe européenne Nanogenotox (www.nanogenotox.eu). Les deux NP testées sont le dioxyde de titane TiO_2 (85% anatase ; 15% rutile ; 22 nm) et le dioxyde de silice SiO_2 (5-35 nm ; stable à pH 7), choisis pour leur usage courant dans l'industrie alimentaire, le TiO_2 comme colorant blanc et le SiO_2 comme anti-agglomérant. Les lots témoins sont constitués de souris exposées à une eau de boisson normale.

Les procédures utilisées sont compatibles avec la règlementation française et européenne en vigueur (Décret 2013/118 et 2010/63/UE) et ont reçu un avis favorable des comités d'éthique (saisine n°11-0042). Les souris sont euthanasiées, soit dans le cadre d'un protocole de temps d'exposition déterminé, soit au stade terminal de la maladie programmé par l'expression du transgène. Les cerveaux sont prélevés et fixés dans du formol tamponné (10%). Après 48h de fixation minimum, les cerveaux sont recoupés macroscopiquement dans un sens coronal selon des sites de référence, de manière standardisée afin de permettre l'accès aux principales régions cérébrales à partir d'un même bloc, avant d'être inclus en paraffine à l'aide d'un automate. A partir des cerveaux inclus en blocs de paraffine, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont recueillies sur lames de verres traitées à la poly-L-lysine puis sont séchées 1h à 37°C. Pour les mises au point liées à cette étude, des coupes histologiques « contrôles positifs » ont été plus particulièrement sélectionnées. Ainsi des coupes de cerveaux de souris TgM83 malades c'est-à-dire exprimant avec certitude les marqueurs d'une accumulation d'α-synucléine phosphorylée, d'une réaction gliale et microgliale ont été plus particulièrement utilisés.

Immunohistochimie et colorations

Avant d'être colorées, les coupes histologiques sont déparaffinées et réhydratées à l'aide d'un automate selon un pro-

tocole classique de routine. Les différents anticorps primaires (Ac I) utilisés dans le cadre de cette étude sont présentés dans le Tableau I.

Ac I	Type	Fournisseur	Immunogène	Dilutions testées
anti oligodendrocyte	Polyclonal lapin	Abcam	Peptide synthétique humain	1/250 1/500 1/1000 1/2000 1/4000
anti GFAP	Polyclonal lapin	Dako	GFAP isolée de moelle épinière de vache	1/200
anti α-synucléine phosphorylée	Monoclonal lapin (clone 123)	Abcam	Phospho-peptide synthétique α-synucléine humaine autour du site de phosphorylation en sérine 129	1/300

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

Plusieurs anticorps secondaires (Ac II) ont été utilisés, un Ac anti-lapin biotinylé dilué au 1/200ème et pour les protocoles d'immunofluorescence des Ac anti-lapin couplés à un fluorochrome (AlexaFluor A488 ou A555).

L'anticorps anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) permet d'identifier la présence d'une réaction gliale. L'observation d'une forme pathologique d'α-synucléine est rendue possible à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée (Ser129). Ce marqueur est particulièrement pertinent dans le modèle de souris transgénique TgM83 exprimant une forme humaine mutée de l'α-synucléine. Pour identifier les cellules oligodendrocytaires un anticorps produit à partir d'un peptide de synthèse humain a été sélectionné sur la description de son application possible sur le rongeur. Pour déterminer les meilleures conditions d'application de cet anticorps, le matériel biologique étant fixé et inclus en paraffine, il est nécessaire de déterminer les meilleures conditions de démasquage antigénique. Plusieurs techniques ont été testées : un démasquage thermique par autoclavage dans du tampon citrate 10 mM (pH 6,2) (20 min à 121°C), au four micro-ondes dans du tampon citrate 10 mM (pH 6,2) (5 min puissance maximum puis 5 min position décongélation), ou par un démasquage enzymatique à la Protéinase K (15 min à 37°C). De même, plusieurs concentrations d'Ac I ont été appliquées afin de trouver la concentration optimale d'utilisation. La gamme de dilution choisie a été : 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000 et 1/4000ème dans du tampon phosphate salin (PBS 0,1M et NaCl 0,09%) et Triton (0,1X).

Après détermination et application du démasquage optimal, les peroxydases endogènes sont bloquées par un bain dans de l'eau oxygénée à 3%. Puis la technique s'effectue grâce à la méthode du Coverplate (Thermo Electron) qui permet d'optimiser et de standardiser l'analyse par IHC. En effet les lames sont montées sous coverplate dans du PBS 0,1M (pH 7,4) + Tween 20 à 0,1% (PBST), pour s'assurer de la répartition homogène des réactifs sur les lames histologiques. Afin de limiter les réactions non spécifiques qui pourraient occasionner un signal de type bruit de fond, une saturation est effectuée à l'aide d'une solution bloquante du commerce diluée au 1/10ème dans du tampon d'acide maléique (pH 7,5). L'Ac I dilué est alors déposé et incubé une nuit en chambre humide à température ambiante (TA).

Après une nouvelle étape de saturation qui précède le dépôt d'Ac II dilué (dans

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 à l'obscurité, puis déposé 30 min à 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. Trois chromogènes de la peroxydase ont été utilisés pour la révélation : la diaminobenzidine (DAB) intensifiée au chlorure de nickel (dépôts noirâtres), l'amino-éthylcarbazole (AEC) (rouge) ou le Novared (rouge brique). Après un dernier rinçage, l'application d'hématoxyline aqueuse permet la coloration du tissu. En fonction du chromogène utilisé la déshydratation est effectuée (DAB/Novared) ou non (AEC). En effet l'AEC est soluble dans les alcools et dans ce cas le montage des lames reste en milieu aqueux. Pour les autres chromogènes le montage des lames s'effectue à la résine (Eukitt) à l'aide d'une colleuse de lames. En parallèle, en guise de contrôles, des lames sont exposées à un sérum normal (SN) de lapin, en lieu et place des Ac I, pour vérifier la spécificité des signaux détectés.

Marquage multiple

Pour analyser la co-expression ou non de ces différents marqueurs gliaux et neuronaux des marquages multiples ont été réalisés. Plusieurs stratégies ont été testées, par immunohistochimie avec une combinaison DAB-$NiCl_2$/AEC et DAB-$NiCl_2$/Novared, en IF et par l'utilisation d'un kit permettant des marquages multiples IHC. Pour chacune de ces approches des contrôles ont été mis place. Chaque Ac I a été remplacé par du sérum normal (SN) correspondant à l'espèce dont il était issu, séparément d'une part, conjointement d'autre part, tel que décrit dans le Tableau II.

Combinaisons Ac I /Ac I et SN	Témoins des marquages multiples	
Ac anti-oligodendrocyte/SN	SN/Ac anti-GFAP	SN/SN
Ac anti-GFAP/SN	SN/Ac anti-oligodendrocyte	SN/SN
Ac anti-oligodendrocyte/SN	SN/ Ac anti-α-syn phosphorylée	SN/SN
Ac anti-α-syn phosphorylée/SN	SN/Ac anti-oligodendrocyte	SN/SN

Tableau II : Récapitulatif des témoins réalisés dans les différentes stratégies de marquages multiples. SN = sérum normal.

1. Protocole IHC DAB-$NiCl_2$/AEC ou DAB- $NiCl_2$/Novared

L'IHC est appliquée comme décrite en marquage simple. La révélation s'effectue en priorité à l'aide de la DAB-$NiCl_2$. Après un rinçage des lames dans du tampon PBS 0,1M (pH 7,4) et une nouvelle saturation des sites non spécifiques, l'Ac anti-α-synucléine phosphorylée est appliqué selon le protocole habituel mais la révélation finale s'effectue avec l'AEC. Enfin, l'hématoxyline aqueuse permet de colorer le tissu, puis les lames sont montées à l'aide d'un milieu aqueux.

Cette technique s'est révélée inefficace pour déterminer la présence ou non de co-marquage des Ag d'intérêt, notamment les combinaisons témoin mises en place ont souligné le double inconvénient de l'usage d'Ac I produits chez la même espèce et

l'usage d'Ac II révélés par un système enzymatique identique (HRP). C'est pourquoi en 2ème intention, le recours à des Ac II directement couplés à des fluorochromes différents a été testé dans un protocole d'immunofluorescence (IF).

2. Protocole d'IF

Pour les doubles marquages, l'IF est une technique qui présente en plus l'intérêt d'être plus rapide que l'IHC (pas d'amplification) et qui offre une grande sensibilité. Cependant elle présente aussi l'inconvénient d'un signal labile dans le temps. Le principe du protocole appliqué est illustré en Figure 1 A.

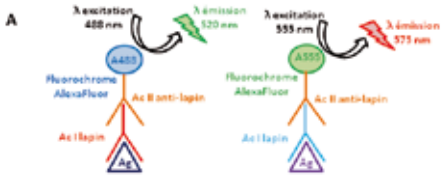

Figure 1 A : Principe du double marquage réalisé en IF. Les 2 anticorps primaires sont appliqués successivement.

Afin d'essayer d'éviter les croisements antigéniques, les Ac I sont appliqués de façon successive. Après application des prétraitements de démasquage compatibles pour les deux Ac I, une saturation des sites non spécifiques est réalisée à l'aide d'une solution bloquante diluée au 1/10ème dans le tampon acide maléique (pH 7,5).

Le premier Ac I dilué dans du PBS (0,1M et NaCl 0,09%) et du Triton (0,1X) est incubé 2h en chambre humide à TA. Les rinçages sont réalisés avec du PBST. Puis l'Ac II dilué au 1/1000ème (dans PBS 0,1M et NaCl 0,09% + 0,1X Triton) couplé au fluorochrome AlexaFluor A488 est déposé et incubé 1h en chambre humide à l'obscurité à TA. A partir de cette étape il est indispensable de continuer à l'obscurité afin de ne pas exciter le fluorochrome. Après une nouvelle saturation des sites non spécifiques, le second Ac I dilué est appliqué 2h en chambre humide à TA. Puis l'Ac II dilué au 1/1000ème couplé à un autre fluorochrome, AlexaFluor A555 est déposé sur les lames. Enfin après 1h d'incubation en chambre humide à TA, les lames sont montées avec le milieu de montage contenant du DAPI (marqueur nucléaire : noyaux fluorescents en bleu) et peuvent être directement observées sous le microscope à épifluorescence.

Même dans ces conditions, nos observations ont confirmé la difficulté de garantir l'absence de croisements antigéniques. C'est pourquoi nous avons mis en œuvre une alternative avec l'introduction d'un nouveau kit dédié aux marquages multiples proposant une solution tenant compte du couple d'Ac I à étudier.

3. Kit IHC marquage multiple

Nous avons ainsi réalisé des tests à l'aide d'un kit dédié aux doubles marquages et spécifiquement développé pour éviter le problème des réactions croisées, assurant un marquage spécifique et sensible (Diagomics, Blagnac, France, ref DS204C-6). Ce kit permet de plus une révélation définitive avec un potentiel d'appréciation du niveau d'expression (semi-quantitatif). Il se base sur l'usage d'un couple de chromogènes très contrasté : le GBI-Red permanent (rose/rouge) substrat de la phosphatase alcaline (PA) et l'Eme-

rald (vert), substrat de la HRP. En cas de co-marquage une nouvelle teinte distincte et spécifique permet d'estimer l'Ag surexprimé : marquage violet pour une surexpression de l'Ag révélé par le GBI-Red Permanent, et un marquage bleu pour une surexpression de l'Ag révélé par l'Emerald. L'apport potentiel de ce kit permet donc la résolution du problème de spécificité avec une approche semi-quantitative du marquage observé en plus. La Figure 1 B illustre le principe sur lequel repose ce kit.

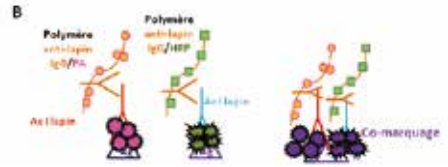

Figure 1 B : Principe du kit marquage multiple. D'après Diagomics.

Après le démasquage antigénique, un blocage des peroxydases endogènes suivi d'une saturation des sites antigéniques non spécifiques est réalisée à l'aide d'une solution bloquante issue du kit, diluée au 1/10 ème dans un tampon d'acide maléique (pH 7,5) pendant 30 min à TA ; l'Ac I dilué dans du PB 0,1M et NaCl 0,09% + 0,1% Triton X100 est incubé 1h à TA. Les étapes de rinçage se font au tampon Tris salin (TBS) 1X (pH 7,4) + Tween 20 à 0,05% (TBST), le PBST pouvant inhiber la phosphatase alcaline.

Le réactif PA-Polymère anti-lapin est ensuite appliqué pendant 20 min à TA, puis est révélé au GBI-Permanent Red pendant 10 min à TA, plus 5 min avec ce qui reste de la préparation du chromogène. Après deux étapes de blocage avec les réactifs du kit (3A) 30 min à TA et (3B) 5 min à TA, le second Ac I dilué est déposé pendant 1h à TA. Après application du réactif HRP-Polymère anti-lapin pendant 20 min à TA, une coloration à l'hématoxyline de Mayer (5s) est réalisée et l'Ac est révélé par le chromogène Emerald pendant 5 min à TA. Après un rinçage 10s dans l'eau (le chromogène étant soluble dans l'eau), une déshydratation manuelle (pas plus de 20s) est effectuée. Enfin les lames sont montées avec l'aide d'un milieu de montage organique fourni dans le kit. Après séchage, elles sont observées au microscope couplé à un logiciel d'analyse d'images (Explora Nova, MorphoExpert).

RESULTATS

Dans le but d'étudier la possible implication des cellules oligodendrocytaires dans les processus d'accumulation d'α-synucléine pathologique dans le cerveau des souris de la lignée TgM83, nous avons d'abord déterminé un protocole de détection immunohistochimique de ces cellules gliales à l'aide d'un anticorps primaire spécifique produit chez le lapin. Des 2 types de démasquage antigénique testé (enzymatique versus thermique), le traitement thermique est le plus efficace. Pour un gain de temps notable (35 min), les résultats n'indiquant pas de différence significative entre autoclave et micro-ondes, la condition retenue pour la suite a été le démasquage thermique par micro-ondes. Le résultat de l'application d'une gamme de dilution (1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000 ème, (Figure 2)), nous a permis de retenir les dilutions au 1/500 ème et 1/1000 èmecomme étant optimales. Si la dilution au 1/1000 ème a été appliquée pour les

Figure 2 : Illustration de l'effet de l'application d'une gamme de dilution de l'Ac anti-oligodendrocyte sur coupes paraffine de cerveaux de souris au microscope optique (x10). Légende des intensités de l'IHC : absence de marquage -, marquage faible +, marquage intermédiaire ++, marquage fort +++. Cx : cortex, Cc : corps calleux (substance blanche), Hip : hippocampe.

marquages simples, la dilution au 1/500 ème a été adoptée dans les stratégies de marquages multiples, une perte de sensibilité au 1/1000 ème ayant été identifiée dans ces conditions. Les trois chromogènes différents testés au cours de l'optimisation de la détection des oligodendrocytes: DAB-$NiCl_2$, AEC et Novared, ont donné des niveaux de détection satisfaisants et équivalents (Figure 3 A, B, C) les validant de fait pour un usage dans une stratégie de marquage multiple.

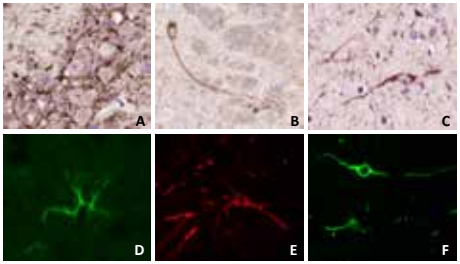

Figure 3 : Illustration des différents chromogènes utilisés en IHC (A, B, C) et des fluorochromes utilisés en IF (D, E, F) lors des simples marquages sur des coupes de cerveaux (objectif x40). A, marquage des oligodendrocytes révélés à l'aide de DAB-$NiCl_2$ dans l'hippocampe. Marquage de l'α-synucléine phosphorylée révélée d'une part par la DAB (B), d'autre part par le Novared (C) dans le thalamus. D, Oligodendrocytes révélés par IF (fluorochrome AlexaFluor A488). E et F, α-synucléine phosphorylée révélée par IF : fluorochrome AlexaFluor A555 (E) et AlexaFluor A488 (F).

Nous avons ensuite testé plusieurs stratégies de marquages multiples combinant les Ac anti-oligodendrocyte, anti-GFAP et anti-α-synucléine phosphorylée en sérine 129. Les essais en double marquage IHC n'ont pas fourni de résultats clairs, quelque soit la combinaison de chromogènes et d'ordre d'application des Ac, les lames contrôles soulignant au contraire des possibles réactions croisées. Faisant appel à des Ac II directement marqués, les essais en IF n'ont pas résolu pour autant ce problème. Si l'utilisation des fluorochromes appliqués individuellement nous ont en effet permis d'identifier les oligodendrocytes et les dépôts d'α-synucléine avec une grande spécificité (Figure 3 D, E, F), en marquages multiples nous avons pu à nouveau constater un croisement des réactions liées à la nature des Ac I produits chez la même espèce.

De plus, une perte de sensibilité a également été observée au niveau de l'Ac anti-oligodendrocyte, révélant la nécessité d'appliquer une dilution plus saturante à savoir 1/500 ème.

L'introduction d'un nouveau kit d'IHC (Diagomics) nous a permis de résoudre les difficultés liées aux réactions croisées, tout en conservant la spécificité de chaque Ac. Ce kit repose sur l'usage d'Ac II couplés à des enzymes différentes et donnent lieu à l'utilisation de 2 chromogènes contrastés. Cependant entre les chromogènes GBI-Permanent Red (rose) et Emerald (vert), des variations de teintes ont été observés lors de l'application des témoins en les opposant chacun à un sérum normal (SN) (Figure 4).

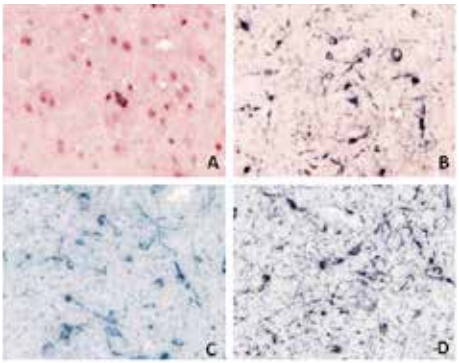

Figure 4 : Illustration des chromogènes GBI Permanent Red (A, B) et Emerald (C, D) à partir des contrôles du marquage multiple avec un seul Ac I (anti-α-synucléine phosphorylée et un sérum normal (SN). A et B SN/Ac I, C et D Ac I/SN.

Ainsi, sur le témoin α-synucléine phosphorylée/SN, nous avons pu observer un marquage violet de certains neurones (Figure 4 B), teinte qui témoigne normalement d'avantage d'un co-marquage des Ag d'intérêts. Pour le témoin SN/oligodendrocyte (Figure 4 D), la même observation a pu être faite avec une coloration bleue, illustrant théoriquement aussi un co-marquage. L'intensité des marquages obtenus démontre une excellente sensibilité des chromogènes de ce kit, qui nous a conduit à re-tester les dilutions au 1/500 et 1/1000ème pour l'Ac anti-oligodendrocyte, sur différentes régions.

La Figure 5 illustre les résultats de ces tests qui indiquent que la dilution au 1/1000ème correspond à une condition saturante lorsque l'Ac est révélé par le chromogène GBI-Permanent Red. En revanche lorsque celui-ci est révélé par l'Emerald, la dilution au 1/500ème correspond à une dilution optimale. Cette observation indique que le chromogène Emerald est moins sensible, peut-être est-ce dû au fait qu'il est appliqué en moindre quantité que le GBI-Permanent Red, avec une durée d'incubation plus courte. De plus, ce chromogène Emerald est soluble dans l'eau, ce qui conduit à réaliser en fin d'application à un lavage très bref (10 s) et il est possible que cette étape, malgré le temps très court d'immersion des lames, puisse avoir un impact sur le rendu final du marquage. Dans tous les cas, ces observations pour l'Ac anti-oligodendrocyte soulignent l'importance de l'ordre d'application des Ac I, en fonction duquel, la dilution optimale pourrait être différente.

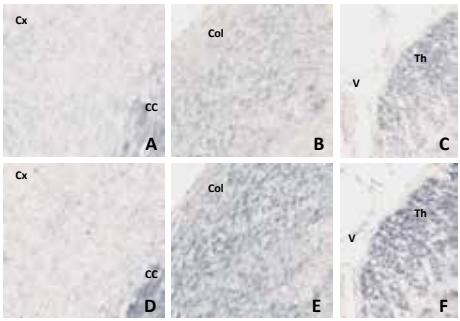

Figure 5 : Illustration de l'effet dilution 1/1000ème (A, B, C) et 1/500ème (D, E, F) de l'Ac anti-oligodendrocyte (dépôts vert émeraude) avec le kit marquage multiple (SN-Ac I). Cx : cortex, cc : corps calleux, Col : collicule, V : ventricule, Th : thalamus.

Cette stratégie a été éprouvée pour deux couples d'Ac I produit chez le lapin, oligodendrocyte/GFAP versus α-synucléine phosphorylée/oligodendrocyte. Les résultats illustrés par la Figure 6 démontrent l'intérêt et l'efficacité du kit pour contourner la difficulté potentielle liée à l'usage de deux Ac I de même espèce dans une

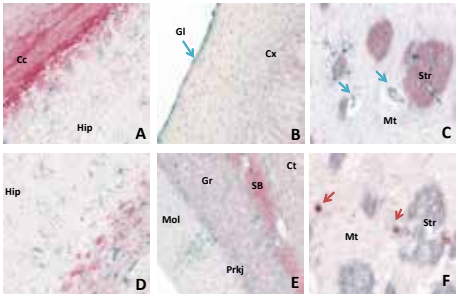

Figure 6 : Illustration de marquages multiples : en rouge Ac anti-oligodendrocyte (1/1000 ème), en vert Ac anti-GFAP (1/200 ème). A et D, cellules gliales dans l'hippocampe (Hip) et oligodendrocytes dans le corps calleux (Cc) ; B, bordant le cortex (Cx) marquage de la glie limitante (Gl) flèche verte, E, cellules gliales activées dans la couche moléculaire (Mol) du cervelet (Ct). Les oligodendrocytes sont détectés dans la substance blanche (SB) mais pas dans les cellules de Purkinje (Prkj) ni dans la couche granulaire (Gr). C, dans le striatum les cellules gliales activées sont observées dans les striosomes (Str) ou à leur périphérie dans la matrice (Mt). Les flèches vertes indiquent des cellules gliales périvasculaires. Les oligodendrocytes sont présents dans les striosomes exclusivement. F, dans le striatum de la même souris, l'α-synucléine phosphorylée est également détectée (flèches roses) soit dans les striosomes marqués par l'anticorps anti-oligodendrocyte soit dans la matrice de façon comparable aux cellules gliales activées (objectif x20).

problématique de marquages multiples. Dans un premier temps, la combinaison anti-oligodendrocyte et anti-GFAP permet d'observer de façon parfaitement distincte les 2 types de populations gliales sans aucune superposition de marquage. La glie limitante, les astrocytes activés, les astrocytes péri-vasculaires se détachent parfaitement du marquage des oligodendrocytes identifiés dans toutes les régions de substance blanche comme le corps calleux, les commissures antérieures et postérieures, la substance blanche du cervelet. Dans un 2 ème temps, la combinaison anti-oligodendrocyte et anti-α-synucléine phosphorylée a été appliquée. De façon intéressante, dans le striatum nous avons pu éprouver à nouveau les 2 ordres possibles d'application de l'Ac I anti-oligodendrocytes, marquant spécifiquement les striosomes (Figure 6 C et F), alors que les dépôts d'α-synucléine phosphorylée sont identifiés soit dans les striosomes soit dans la matrice de façon similaire aux cellules gliales mises en évidence sur une coupe successive mais sans co-expression avec le marqueur des oligodendrocytes. L'application de ce kit sur des cerveaux issus de lots de souris différents nous a permis de constater que le plus souvent les deux Ag apparaissent strictement juxtaposés (Figure 7 A-C, Figure 8).

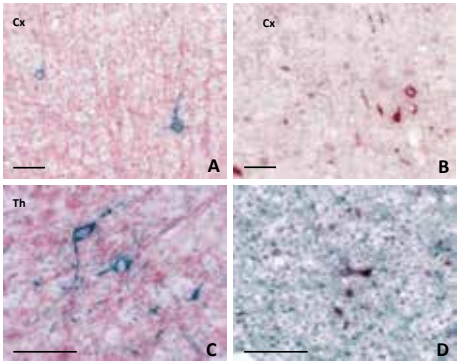

Figure 7 : Illustration de marquages multiples réalisés en changeant l'ordre d'application des 2 Ac I. A et C, en rouge Ac anti-oligodendrocyte (1/500 ème), en vert Ac anti-α-synucléine phosphorylée (1/300 ème). B et D, en rouge Ac anti-α-synucléine phosphorylée (1/300 ème), en vert Ac anti-oligodendrocyte (1/500 ème). Dans le cortex (A et B) comme dans le thalamus (C) l'α-synucléine phosphorylée est détectée uniquement dans des neurones sans marquage des cellules oligodendrocytaires. D, dans la racine sensorielle du nerf trijumeau, riche en cellules oligodendrocytaires pour lesquelles on distingue aisément un marquage intracytoplasmique (en vert), une couleur violette indique une co-expression d'α-synucléine phosphorylée avec le marqueur oligodendrocytaire. Barre d'échelle : 65 µm.

Figure 8 : Illustration de marquages multiples réalisés sur une section de cerveau de souris passant par l'hippocampe ; les flèches en rouge souligne les régions riches en oligodendrocytes identifiées à l'aide de l'Ac anti-oligodendrocyte (1/500ème) ; sur la même coupe, les flèches en vert soulignent les régions riches en α-synucléine phosphorylée (Ac anti-α-synucléine phosphorylée (1/300 ème)). Cette figure souligne l'observation la plus courante d'une α-synucléine phosphorylée détectée uniquement dans des neurones, sans co-expression dans les cellules oligodendrocytaires.

Dans un cas cependant, nous avons pu identifier une coloration violette témoignant d'un co-marquage (Figure 7 D). La teinte suggère que l'α-synucléine phosphorylée, révélée au GBI-Permanent est surexprimée par rapport au marqueur de l'oligodendrocyte, révélé à l'Emerald. Il semblerait donc qu'il soit possible que certains oligodendrocytes puissent accumuler de l'α-synucléine phosphorylée. L'usage de ce kit sur d'autres cerveaux devrait permettre de consolider ces premières observations.

DISCUSSION

La principale thématique de recherche du laboratoire fait appel à des modèles expérimentaux qui permettent d'évaluer le rôle de substances neurotoxiques, dans les maladies neurodégénératives humaines appartenant aux α-synucléinopathies (maladie de Parkinson, démence à corps de Lewy, atrophie multi-systématisée). Dans ce contexte, le marqueur principal de la pathologie, l'α-synucléine, devient insoluble, phosphorylée et forme des agré-

gats intra-cytoplasmiques dans les neurones. Cependant au-delà des neurones, et comme cela a été décrit pour l'atrophie multi-systématisée, il est possible que cette forme pathologique concerne également les cellules oligodendrocytaires. En conséquence, il est nécessaire de mettre au point une détection immunohistochimique des oligodendrocytes, dans l'idée d'appliquer une stratégie de marquages multiples entre α-synucléine phosphorylée et oligodendrocytes.

Dans ce contexte, nous avons défini les conditions optimales d'application d'un anticorps anti-oligodendrocyte (démasquage antigénique thermique, dilution au 1/500) pour une application sur ces cerveaux de souris fixés et inclus en paraffine. Pour répondre aux hypothèses scientifiques posées sur l'expression possible d'α-synucléine phosphorylée dans les cellules oligodendrocytaires, plusieurs stratégies de marquages multiples ont été testées : IHC, IF et kit dédié aux marquages multiples en IHC.

Les échecs observés en lien avec les essais d'application d'IHC ou d'IF classiques fondés principalement sur la difficulté d'avoir deux Ac I produits chez la même espèce ont été balayés par l'introduction d'un kit nouveau dédié aux marquages multiples notamment dans le cas d'une combinaison d'Ac I produits chez la même espèce. Nos essais nous ont permis de valider l'intérêt de ce kit mais aussi de souligner certaines limites.

L'application systématique de conditions contrôles nous ont permis d'apprécier la grande sensibilité et spécificité des immunomarquages, basées notamment sur l'excellent contraste des chromogènes, qui permet de distinguer sans équivoque les deux Ag d'intérêts. Nous avons pu valider cet usage sur 2 couples d'anticorps produits chez le lapin et dans toutes les combinaisons possibles. Ce kit offre en outre l'avantage d'être mis en œuvre de façon rapide (1 seul jour contre 3 jours en IHC classique), donnant des colorations qui peuvent être conservées et observées aussi aisément que des immunomarquages révélés par la DAB par exemple (recul de 6 mois). Cependant il pourrait être pertinent de vérifier la stabilité des teintes sur un plus long terme notamment pour le marquage le moins intense (Emerald). Un autre avantage potentiel de ce kit réside dans la possibilité de déduire quel est l'antigène le plus exprimé, car en cas de double marquage, la teinte finale obtenue est unique et traduit directement le rapport d'intensité des 2 antigènes. Dans nos conditions, nous n'avons pas eu suffisamment de cas de double marquage pour réellement apprécier ce potentiel. Nous avons cependant identifié aussi des points critiques. En tout premier lieu, nous avons relevé des variations dans la teinte finale de nos conditions contrôles qui pourraient peut-être, être liées à la répartition des réactifs, et ce, malgré un montage sous coverplate. En effet les quantités du kit ne permettent pas de rajouter du réactif et il est arrivé qu'en particulier lorsqu'il y a plusieurs échantillons sur une même lame (dans nos conditions, pour le cerveau, il y a 5 coupes frontales par lame) que le réactif ne couvre pas de façon homogène toute la lame, indiquant

une limite potentielle à l'usage de ce kit. Cet effet peut également être relevé pour la fin du protocole où la répartition du chromogène pourrait également avoir une portée non sans conséquence sur le rendu final. Nous avons ainsi pu aborder cette question en réalisant l'application du chromogène Emerald soit sur lame à plat ou sur lame encore montée sous coverplate. Une autre possibilité serait que cette teinte de semblant de co-marquage pourraient traduire une réaction croisée entre les 2 Ac II couplés chacun à une enzyme différente (HRP/PA). En effet, tout se passe comme si les deux Ac II (appliqués chacun 20 min seulement) pouvaient s'accrocher sur les sites anti-lapin du premier Ac I, y compris ceux où le premier Ac II s'est fixé. Pour aller plus loin, une perspective immédiate serait de vérifier cette hypothèse, en appliquant par exemple les premiers Ac I et II-couplé PA, observer la couleur du marquage obtenue avant de passer à la seconde étape (SN/Ac II couplé à la HRP) ainsi nous pourrions déterminer si la coloration violette du GBI-Permanent Red est due au premier Ac II ou au second. De même, nous pourrions jouer sur les temps d'incubation des Ac II ou sur la concentration des Ac I, voire plus simplement jouer sur les temps d'application du 2ème blocage présent dans le kit. Nous n'avons pas pu effectuer ces essais d'autant plus que le kit présente l'inconvénient d'être couteux. De façon notable nous avons aussi constaté l'importance de déterminer l'ordre dans lequel seront appliqués les Ac I, et pour une application optimale du kit, l'Ac révélé au GBI Permanent Red correspond à l'Ac le moins exprimé, ce chromogène étant plus fort que l'Emerald. Dans notre cas, les oligodendrocytes étant majoritairement présents dans le cerveau, nous avons déterminé qu'il convient mieux de les révéler par l'Emerald, tandis que l'α-synucléine phosphorylée doit être révélée par le GBI Permanent Red.

CONCLUSION

Nous avons déterminé les conditions optimales d'application IHC d'un anticorps anti-oligodendrocyte sur le cerveau de souris afin d'identifier cette classe de cellules gliales majoritairement exprimée au sein de la substance blanche du système nerveux central. Pour répondre à un problème technique particulier lié à l'usage d'anticorps primaires produits chez la même espèce, nous avons pu également tester l'usage d'un kit dédié au marquage multiple par IHC qui permet de garantir une analyse spécifique et sensible. De façon utile, ce travail débouche dès à présent sur des applications aux questions scientifiques actuelles liées aux axes de recherche de l'unité MND de l'Anses de Lyon.

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, Coralie Pulido qui ont pris en charge la production des souris transgéniques, l'administration des solutions nanoadditivées, le suivi des animaux et les prélèvements des organes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALVAREZ Y.D., FAUERBACH J.A., PELLEGROTTI J.V., JOVIN T.M., JARES-ERIJMAN E.A., STEFANI F.D. : Influence of gold nanoparticles on the kinetics of alpha-synuclein aggregation. Nano letters 2013. 13, 6156-6163.

2. BENCSIK A. : Is the brain protected from the impact of nanomaterial exposure? Biologie aujourd'hui 2014. 208, 159-165.

3. COUDERC A., MUSELLI L., LEBOIDRE M., 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.

4. COCHEME H.M., MURPHY M.P. : Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. J Biol Chem 2008, 283:1786-1798.

5. DEVINE M.J., GWINN K., SINGLETON A., HARDY J. : Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 2011. 26, 2160-2168.

6. DRECHSEL D.A., PATEL M. : Differential contribution of the mitochondrial respiratory chain complexes to reactive oxygen species production by redox cycling agents implicated in parkinsonism. Toxicol Sci 2009, 112:427-434.

7. GIASSON B.I., DUDA J.E., QUINN S.M., ZHANG B., TROJANOWSKI J.Q., LEE V.M. : Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. Neuron 2002. 34, 521-533.

8. LARSEN K.E., SCHMITZ Y., TROYER M.D., MOSHAROV E., DIETRICH P., QUAZI A. Z., SAVALLE M., NEMANI V., CHAUDHRY F. A., EDWARDS R. H., STEFANIS L., SULZER D. : Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. J Neurosci 2006. 26, 11915-11922.

9. MORETTO A., COLOSIO C. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. Toxicology 2013. 307, 24-34.

10. MURAKAMI K., JIANG Y.P., TANAKA T., BANDO Y., MITROVIC B., YOSHIDA S. : *In vivo* analysis of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) function in oligodendrocyte development and the expression of myelin proteins. Neuroscience 2013. 236, 1-11.

11. SCHIRA J., GASIS M., ESTRADA V., HENDRICKS M., SCHMITZ C., TRAPP T., KRUSE F., KOGLER G., WERNET P., HARTUNG H.P., MULLER, H.W. : Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood. Brain : a journal of neurology 2012. 135, 431-446.

12. SEATON T.A., COOPER, J.M. SCHAPIRA A.H. : Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. Brain Res.1997, 777: 110-118

13. SPILLANTINI M.G., GOEDERT, M. : The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. Annals of the New York Academy of Sciences 2000. 920, 16-27.