

2m11.2570.9

Université de Montréal

Identification cytochimique des cellules blanches  
infiltrant le nerf sciatique de souris, *in vitro*.

par

France Leclaire

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

Août, 1997

©France Leclaire, 1997



P. 0526-1168

w  
4  
U58  
1998  
v.003

Université de Montréal

Identification cytochimique des cellules blanches  
indiquant le sexe sexuelles de source, in vitro

par

François Lachance

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences biomédicales

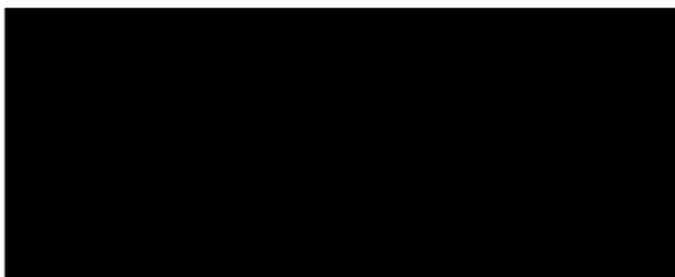
en sciences biomédicales

1998

François Lachance (1998)



## IDENTIFICATION DES JURY



président du jury

membre du jury

Mieczyslaw Marcinkiewicz.....

directeur de recherche

---

*mémoire accepté le 15.12.1997*

## SOMMAIRE

La dégénérescence Wallérienne de la partie distale des nerfs périphériques lésés forme un environnement propice pour stimuler et guider la partie proximale en croissance. Dans cet environnement, plusieurs protéines sont produites ainsi que leurs enzymes de maturation (convertases). Certaines protéines, telle que le *Nerve Growth Factor* (NGF), sont connues pour supporter la régénérescence du système nerveux périphérique. Différents types cellulaires produisent NGF, et les convertases associées, dans les nerfs périphériques lésés. Il est possible que les monocytes infiltrants et/ou les macrophages résidents représentent le premier groupe de cellules fournissant NGF, alors que d'autres cellules incluant les cellules de Schwann produisent NGF dans un deuxième temps. Le but de cette étude est de déterminer si des cellules blanches sanguines infiltrant le nerf lésé expriment NGF. L'expression hâtive de NGF après la lésion pourrait être cruciale pour la régénérescence nerveuse. Cependant, aucun marqueur cellulaire spécifique permettant de différencier les macrophages résidents des monocytes infiltrants n'est disponible. Pour cette raison, nous avons essayé différentes méthodes pour marquer les cellules infiltrantes incluant un marqueur moléculaire du chromosome Y dans un modèle expérimentale mâle/femelle.

Afin de prouver que NGF est exprimé par des cellules blanches sanguines infiltrantes, le marqueur du chromosome Y a été utilisé comme marqueur d'infiltration cellulaire sur des segments de nerfs sciatiques femelles incubés en présence de cellules blanches sanguines mâles. Les sondes faites à partir de l'ADN complémentaire 145SC5 (don du Dr Y. Nishioka de l'Université McGill) reconnaissent spécifiquement une séquence répétée plus de 200 fois sur le chromosome Y de souris. Les analyses de buvardage à la Southern montrent l'hybridation spécifique de fragments de 1,5 kb de l'ADN génomique de souris mâles digéré aux sites EcoRI. L'hybridation *in situ* avec des sondes biotinylées a été mise au point sur des cellules blanches isolées de la circulation sanguine et des nerfs sciatiques de souris mâles versus femelles. Cette hybridation *in situ* est révélée par la présence d'un point bleu foncé dans un quartier du noyau des

cellules mâles et d'un bruit de fond bleu pâle dans le reste du noyau, sans colorer le cytoplasme. Les noyaux des cellules femelles montrent seulement le bruit de fond bleu pâle. Dans les segments de nerfs femelles co-incubés avec des cellules blanches sanguines mâles, des cellules infiltrantes ont été localisées dans le périnèvre et l'épinèvre. La colocalisation de NGF, par immunocytochimie, avec le chromosome Y, par hybridation *in situ*, révèle la présence de cellules doublement marquées. Ces résultats confirment que NGF est retrouvé dans les leucocytes infiltrants. L'hybridation *in situ* du chromosome Y est une technique efficace pour localiser les cellules infiltrantes du tissu nerveux *in vitro*, et potentiellement, pourrait être utilisée pour des études *in vivo*.

## TABLE DES MATIÈRES

1.	PAGE TITRE .....	i
2.	IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
3.	SOMMAIRE .....	iii
4.	TABLE DES MATIÈRES .....	v
5.	Liste des figures .....	ix
6.	Liste des tableaux .....	xi
7.	INTRODUCTION .....	1
8.	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	8
8.1	Matériel .....	8
8.1.1	Principaux produits et appareils .....	8
8.1.2	Tampons .....	9
8.2	Méthodes .....	9
8.2.1	Transection du nerf sciatique <i>in vivo</i> .....	9
8.2.2	Isolation des cellules blanches sanguines .....	9
8.2.3	Coloration May-Grünwald-Giemsa .....	10

8.2.4	Système <i>in vitro</i> de co-culture des cellules blanches sanguines et des segments de nerfs sciatiques .....	11
8.2.5	Mise en évidence de l'activité de la myéloperoxidase .....	11
8.2.6	Transfection .....	11
8.2.7	Réaction de la luciférase .....	12
8.2.8	Infection .....	12
8.2.9	Réaction de la $\beta$ -galactosidase .....	12
8.2.10	Sondes ARNc-S <sup>35</sup> pour l'hybridation <i>in situ</i> .....	13
8.2.11	Hybridation <i>in situ</i> d'ARNc .....	14
8.2.12	Sondes ARNc-P <sup>32</sup> pour le buvardage à la Northern .....	15
8.2.13	Buvardage à la Northern .....	15
8.2.14	Sondes d'ADNc-P <sup>32</sup> pour le buvardage à la Southern .....	16
8.2.15	Buvardage à la Southern .....	16
8.2.16	Immunocytochimie .....	17

8.2.17	Biotinylation des ADNc pour l'hybridation <i>in situ</i> .....	18
8.2.18	Hybridation <i>in situ</i> d'ADNc .....	18
9.	RÉSULTATS .....	20
9.1	Caractérisation des cellules blanches sanguines isolées .....	20
9.2	Mise en évidence de l'activité de la myéloperoxidase .....	24
9.3	Analyses par buvardage à la Northern .....	27
9.4	Hybridation <i>in situ</i> de NGF .....	35
9.5	Marquage des cellules blanches sanguines .....	37
9.6	Marquage du chromosome Y .....	40
9.7	Colocalisation de NGF et du chromosome Y, marqueur de cellules infiltrantes .....	43
10.	DISCUSSION .....	48
10.1	Population de leucocytes isolés .....	48
10.2	Activité de la myéloperoxidase .....	49
10.3	Analyses de buvardage à la Northern de NGF .....	49
10.4	Analyses de buvardage à la Northern de la furine .....	50

10.5	Hybridation <i>in situ</i> de NGF .....	51
10.6	Immunocytochimie de NGF .....	51
10.7	Marquage des leucocytes infiltrants .....	52
10.8	Colocalisation de NGF et des leucocytes infiltrants .....	54
10.9	Perspectives .....	55
11.	CONCLUSION .....	56
12.	RÉFÉRENCES .....	58
13.	REMERCIEMENTS .....	65

---

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 .....	6
Figure 2 .....	21
Figure 3 .....	23
Figure 4 .....	26
Figure 5 .....	28
Figure 6 .....	29
Figure 7 .....	31
Figure 8 .....	32
Figure 9 .....	33
Figure 10 .....	34
Figure 11 .....	36
Figure 12 .....	39
Figure 13 .....	41
Figure 14 .....	41
Figure 15 .....	42

Figure 16 .....44

Figure 17 .....46



**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I .....	22
Tableau II .....	25
Tableau III .....	38

---

## INTRODUCTION

Le but de cette étude est de démontrer le rôle de certains leucocytes à exprimer NGF, incluant possiblement les monocytes/macrophages, en situation d'infiltration du système nerveux périphérique après lésion. L'infiltration a été étudiée dans un modèle de co-culture des leucocytes et du nerf sciatique de souris. Le marquage des leucocytes infiltrants a été mis au point afin de les colocaliser avec la détection de NGF *in situ*.

Le nerf sciatique a été choisi pour représenter le système nerveux périphérique à cause de son accessibilité et de sa taille. Le nerf sciatique est le plus long nerf du corps qui origine du plexus sacral entre les vertèbres L5 et S2. Le nerf sciatique est un nerf mixte composé de fibres motrices qui innervent les muscles de la jambe, et de fibres sensorielles qui recueillent les stimuli sensoriels de la peau. Le nerf est organisé en compartiments: l'endonèvre, le périnèvre et l'épinèvre. L'endonèvre contient des axones myélinisés et non-myélinisés et leurs cellules de Schwann associées, des vaisseaux sanguins avec les cellules musculaires lisses l'entourant, des fibroblastes, des fibres de collagènes, des mastocytes et des macrophages résidents. Le périnèvre isole l'endonèvre par des couches de cellules squameuses qui maintiennent un microenvironnement constant (de la Motte, D.J. et al. 1975). Le tout est enrobé de l'épinèvre qui est composé de tissus conjonctifs lâches entrelacés de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de fibroblastes, de mastocytes, de macrophages, de monocytes et de polymorphonucléaires (PMN).

Les leucocytes sont les cellules blanches de sang. Ils représentent les cellules mononucléaires et polymorphonucléaires du sang. Les cellules mononucléaires du sang sont les lymphocytes et les monocytes. Les cellules polymorphonucléaires, appelées communément par leur abréviation PMN, se divisent en trois types cellulaires: les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les monocytes et les neutrophiles sont deux types leucocytaires reconnus pour leur capacité à infiltrer les tissus. Les monocytes infiltrants ont la

propriété de se différencier en macrophages d'où l'appellation monocytes/macrophages utilisée pour éviter de distinguer l'un ou l'autre des états.

La lésion du nerf sciatique provoque deux phénomènes principaux: la dégénérescence Wallérienne des fibres nerveuses distales à la lésion, suivie de la réinitiation des processus de croissance axonale de la partie proximale (Fawcett, J.W. et Keynes, R.J. 1990). La dégénérescence Wallérienne est caractérisé par l'enlèvement et le recyclage des matériaux de l'axone et du manchon de myéline en préparant l'environnement nécessaire à la régénérescence de l'axone. La perte de la myéline et de l'axone laisse des cellules de Schwann en prolifération dans le tube de la lame basale formant des colonnes appelées bandes de Büngner ou tube endoneural. La formation de ce tube permet de guider la croissance axonale ainsi que de la stimuler. La stimulation de la croissance nerveuse repose principalement sur la synthèse de facteurs protéiques dits neurotropines. Les neurotropines ont donc une importance toute particulière dans la régénérescence nerveuse. Chez le nerf sciatique, la neurotropine *Nerve Growth Factor* (NGF) est régulée à la hausse dans la partie distale de la lésion, ainsi que le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) (Meyer, M. et al. 1992). Dans le cas de NGF, les cellules de Schwann expriment des récepteurs de NGF qui prennent place à la surface cellulaire. Ces récepteurs appelés p75NGF ne sont pas internalisés (Yashuda, T. et al. 1987). Ils captent les facteurs NGF sécrétés dans le milieu et les exposent sur la face interne du tube endoneural (Tanuichi, M. et al. 1988). Les molécules de NGF serviraient de pont entre les récepteurs de l'axone et ceux des cellules de Schwann (Johnson, E.M. et al. 1988). Les récepteurs de la famille de gènes Trk de l'axone internalisent le NGF qui est transporté de façon rétrograde (Claude, P. et al. 1982). La partie proximale de l'axone en croissance est ainsi stimulée à croître et guidée correctement vers la cible à innover.

NGF est le prototype des facteurs neurotrophiques, découvert dans les années 1950 par Levi-Montalcini et ses collègues (Levi-Montalcini, R. 1987) et est la

neurotrophine la plus largement étudiée. Les autres neurotrophines connues sont BDNF, NT-3 (*Neurotrophin-3*), NT-4/NT-5 et NT-6. NGF influence la croissance des neurones sensoriels et sympathiques (Albers, K.M., et al. 1994). BDNF agit sur les fibres motrices (Meyer, M. et al. 1992).

Les neurotrophines sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et sont activées par le clivage de la pro-séquence par des enzymes de maturation. Les convertases (furine, PC1/PC3, PC2, PACE4, PC4, PC5/PC6 et PC7) sont une classe d'enzymes de maturation qui activent différentes protéines par le clivage de leur précurseur à des sites dibasiques (Seidah, N.G. et al. 1993; Steiner, D.F. et al. 1992). Plusieurs éléments permettent de supposer que certaines convertases auraient la capacité d'effectuer la maturation NGF. Les pro-neurotrophines contiennent le site de clivage spécifique aux convertases en position appropriée pour libérer la neurotrophine active (Bresnahan, P.A. et al. 1990; Seidah, N.G. 1995). *In vitro*, la furine et, à un niveau moindre, PACE4 et l'isoforme PC5/6-B ont la capacité de cliver le pro-NGF (Seidah, N.G. et al. 1996). La capacité de la furine à cliver le pro-NGF a aussi été observée *in vivo* (Bresnahan, P.A. et al. 1990). Chez le rat, NGF a été colocalisé avec PC1 et PC2 dans les ganglions spinaux (Marcinkiewicz, M. et al. 1993) et avec la furine et PC7 dans les nerfs sciatiques de rat en co-culture avec des leucocytes (Marcinkiewicz, M. et al. 1997 soumis). Étant donné que notre but est de démontrer que les leucocytes expriment NGF en situation d'infiltration du nerf lésé, il est intéressant de montrer que certaines convertases nécessaires à la maturation du pro-NGF y sont aussi surexprimées. Parmi les convertases, la furine semble être la plus importante responsable de la maturation du pro-NGF *in vivo*.

L'expression des ARN messagers (ARNm) de NGF dans la partie distale du nerf sciatique de rat sectionné *in vivo* est représentée par une courbe biphasique dont le premier maximum est atteint dans les premières 12 heures et le second après 72 heures (Heumann, R. et al. 1987a; 1987b). NGF est synthétisé par plusieurs types cellulaires.

La synthèse de NGF par les fibroblastes (Lindholm, D. et al. 1988) et par les cellules de Schwann (Heumann, R. et al. 1987b; Lindholm, D. et al. 1987; Liu, H.M. et al. 1995) est bien documentée et correspond à la deuxième phase d'expression de NGF dans le nerf sciatique lésé.

Dans ces mêmes conditions de lésion du nerf sciatique, le nombre de macrophages dans la partie distale atteint un maximum entre 3 et 5 jours (Perry, V.H. et al. 1987). Diverses rôles sont attribuées à ces macrophages: la phagocytose des débris de myéline et d'axones (Stoll, G. et al. 1989), l'induction la prolifération des cellules de Schwann (Beuche, W. et Friede, R.L. 1984; Baichwal, R.R. et al. 1988) et la stimulation de la synthèse de NGF par les cellules de Schwann via la sécrétion de l'interleukine-1 (Lindholm, D. et al. 1987). Ce processus de stimulation des cellules de Schwann par les macrophages serait responsable en grande partie de la deuxième augmentation de l'expression de NGF (Beuche, W. et Friede, R.L. 1984; Perry, V.H. et al. 1987; Heumann, R. et al. 1987b). D'autre part, les macrophages ont eux-mêmes la capacité d'exprimer NGF dans différentes conditions. Les macrophages activés du péritoine de rat synthétisent NGF (Otten, U. et al. 1987) ainsi que les macrophages du cerveau de rat stimulés par LPS (lipopolysaccharides) (Mallat, M. et al. 1989). Dans le nerf sciatique sectionné, NGF a été observé chez les monocytes infiltrant l'épinèvre de la partie proximale au site de lésion (Liu, H.M. et al. 1995). Pour ce qui a trait à la partie distale, notre laboratoire a tout récemment colocalisé NGF et des marqueurs spécifiques de macrophages dans l'endonèvre et ce, une heure après sa transection (Marcinkiewicz, M. et al. 1997 soumis). Cette synthèse hâtive de NGF par les macrophages correspond à la première vague d'expression de NGF dans la partie distale du nerf sciatique lésé.

Dans la partie distale du nerf sciatique, des PMN sont retrouvés en quantité appréciable 12 heures après la lésion, leur nombre augmente dans les premiers jours et demeure stable pour 3 semaines au moins (Perry, V.H. et al. 1987). L'observation de la partie distale du nerf sciatique quatre jours après sa transection montre des macrophages et des PMN localisés dans le périnèvre et

l'épinèvre (Figure 1 b) et ayant infiltré l'endonèvre (Figure 1 a). Plusieurs mécanismes d'expressions moléculaires sont activés chez les neutrophiles lorsqu'ils sont en situation d'adhérence (Aida, Y. et Pabst, M.J. 1991; Cioffi, W.G. et al. 1993) par opposition aux neutrophiles en circulation dans le sang. D'ailleurs, NGF a aussi été observé dans les neutrophiles infiltrant l'épinèvre de la partie proximale du nerf sciatique au site de lésion (Liu, H.M. et al. 1995). Mais, les fonctions exactes exercées par les neutrophiles dans la dégénérescence Wallérienne demeurent obscures.

La première vague d'expression de NGF dans la partie distale pourrait être cruciale pour stimuler hâtivement la croissance axonale et ainsi optimiser les chances de régénérescence. Les cellules responsables de la synthèse de NGF lors du premier maximum d'expression ne sont pas totalement identifiées, exception faite des macrophages qui ont été démontrés récemment dans notre laboratoire (Marcinkiewicz, M. et al. 1997 soumis). L'origine de ces macrophages n'est toutefois pas connue. Ils pourraient provenir des macrophages contenus normalement dans les structures nerveuses dits résidents, ou des monocytes de la circulation sanguine différenciés en macrophages lors de leurs infiltrations dans les tissus nerveux. Dans le cas où les macrophages exprimant NGF seraient ceux qui infiltrent le nerf, il est possible d'envisager une application thérapeutique qui viendrait stimuler les monocytes de la circulation sanguine et possiblement assurer la régénérescence des nerfs périphériques lésés immédiatement après la lésion en autant que cette stimulation cible expressément la régulation de NGF. Dans un but fondamental, il est important de connaître tous les acteurs de la dégénérescence et de la régénérescence du système nerveux périphérique afin de mieux cerner les diverses interactions cellulaires.

Nous avons cherché à déterminer si les monocytes/macrophages et les neutrophiles infiltrant les nerfs périphériques lésés expriment NGF. Les leucocytes ont été d'abord étudiés dans leur ensemble dans un modèle expérimental d'infiltration du nerf sciatique *in vitro*. Pour différencier l'origine des leucocytes, c'est-à-dire résidents ou infiltrants, il fallu mettre au point une

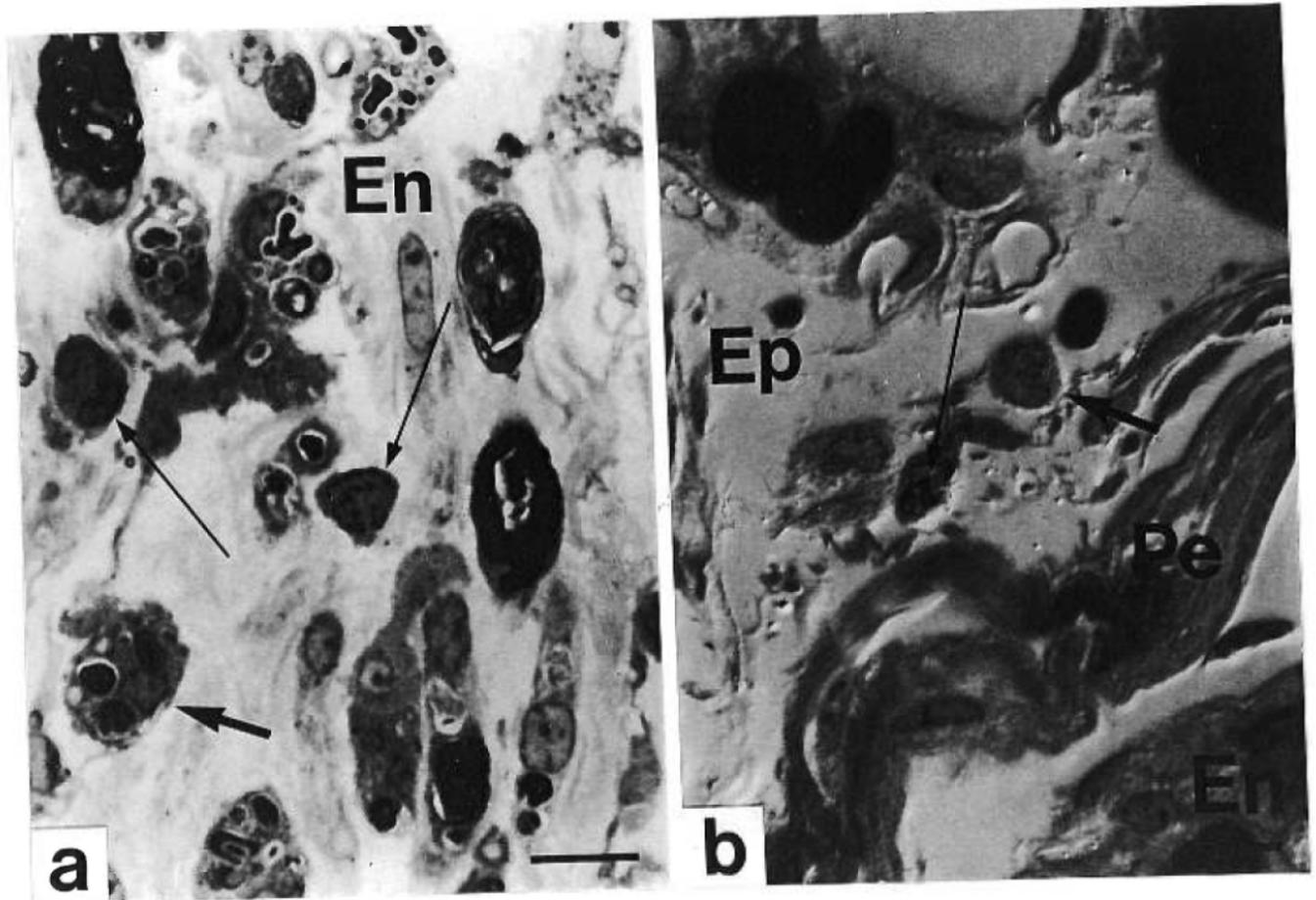


Figure 1: Présence de monocytes/macrophages (flèches grasses) et de polymorphonucléaires (flèches fines) dans l'endonèvre (En), le périnèvre (Pe) et l'épinèvre (Ep) de la partie distale du nerf sciatique de souris, quatre jours après la transection. Coupe longitudinale semi-fine observée à fort grossissement. Barre (a, b) = 20  $\mu\text{m}$ .

technique de marquage des leucocytes mis en co-culture. Ainsi, les leucocytes marqués seront qualifiés d'infiltrants. La colocalisation des marqueurs d'infiltration et de NGF permettra de répondre à la question posée.

Le modèle de co-culture des leucocytes et du nerf sciatique a été mis au point dans des conditions similaires à celles utilisées pour la co-culture de segments de nerfs sciatiques et de macrophages activés par Thoenen et ses collègues (Heumann, R. et al. 1987a). Les paramètres d'incubation ont été établis en fonction de plusieurs analyses dont la mise en évidence de la myéloperoxidase. La myéloperoxidase est induite dans les neutrophiles dès les premiers stades de différenciation (Berliner, N. et al. 1995) et est associée à la phagocytose chez les macrophages (Shellito, J. et al. 1987; Perry, V.H. et al. 1987). La mise en évidence de la myéloperoxidase est utilisée dans les travaux présentés pour identifier rapidement les conditions qui représentent un maximum d'infiltration. Les analyses de buvardage à la Northern ont permis de confirmer la surexpression des ARNm de NGF dans ces conditions de co-culture établies. Des analyses de buvardage à la Northern ont aussi servi à déterminer si la régulation des ARNm de la furine peut suivre la dynamique de régulation de NGF dans le nerf sciatique en culture. La détection de NGF *in situ* est effectuée par hybridation des ARNm et par immunocytochimie.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel

#### Principaux produits et appareils:

Souris CD-1 reproducteurs retirés (Charles River, St-Hyacinthe, Qc)

Souris transgéniques TgR(ROSA26)26Sor (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)

Plasmides pGL3 control contenant des régions *enhancer*, promotrice et codante pour le gène reporter de la luciférase dans un plasmide vecteur Bluescript (Promega Biotech, Madison, WI)

Lipofectin® (Promega Biotech)

Virus Ad5CMVLacZΔHdz fourni par le Dr Claude Gravel de l'Université Laval

Plasmide Bluescript contenant la séquence 145SC5 fourni par le Dr Y. Nishioka de l'Université McGill

Anticorps NGF (cat. # SC-549, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

Sérum normal de chèvre non-dyalisé (cat. # SH30071.03, Hyclone, Logan, Utah)

May-Grünwald (BDH)

Giemsa (BDH)

TRIzol® *Reagent* (Life Technologies, Burlington, On)

Trousse de biotinylation BioPrime™ *DNA Labeling System* (Life Technologies)

Sac de Teflon™ (Cat. # FL3, American Fluoroseal Corp., Columbia, MD)

Flacon de polystyrène (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)

Lames ProbeOnPlus™ (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)

Luminomètre LKB (Pharmacia)

*Cytospin 2* (Shandon, Pittsburg, PA)

Incubateur digital Microprobe™ (Biomedex, Foster City, CA)

### Tampons:

MOPS-EDTA : MOPS 50 mM, EDTA 1 mM, pH7 avec NaOH

PBS : NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 13 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 2 mM

PBS-A : NaCl 170 mM, KCl 3,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1,9 mM,  
pH 7,2

PBS-D : NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1,5 mM

Sörensen : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 67 mM et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 67 mM en proportion 2:1  
(monosodique:disodique); pH 6,5

SSC : 20X: NaCl 3 M, NaCitrate·H<sub>2</sub>O 300 mM

STE : NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM

Milieu de culture Joklik (Life Technologies)

Milieu de culture RPMI-1640 (Life Technologies)

### **Méthodes**

#### **Transection du nerf sciatique *in vivo***

La transection du nerf sciatique *in vivo* a été effectuée chez des souris CD-1 suivant le protocole de chirurgie animale décrit précédemment (Marcinkiewicz, M. et al. 1997 soumis) en utilisant les doses d'anesthésiant prescrites pour la souris (voir Isolation des cellules blanches sanguines). Après le sectionnement du nerf sciatique, les deux bouts sont séparés afin d'empêcher la régénérescence.

---

#### **Isolation des cellules blanches sanguines**

Le sang de souris mâles CD-1 est récupéré à l'aide d'une seringue dont l'aiguille est introduite directement au coeur sans ouvrir la cage thoracique de l'animal. Celui-ci est préalablement anesthésié par une dose de 6,5 mg de pentobarbital de sodium (Somnotol®) par 100 g de poids de l'animal. La seringue contient du

EDTA·K<sub>3</sub> agissant comme anticoagulant pour une concentration finale de 7,5 mg par ml de sang. Les globules rouges sédimentent par gravité terrestre pendant 1 heure à la température de la pièce après que le sang ait été mélangé à un agent d'aggrégation, soit le méthylcellulose 15 centipoises (2 % dans 0,9 % NaCl), dans une proportion 10:1 sang:méthylcellulose. La phase supérieure est récupérée contenant les cellules blanches qui sont lavées 2 fois au PBS-D 1X puis resuspendues dans le milieu de culture.

### **Coloration May-Grünwald-Giemsa**

Utilisée pour les frottis sanguins, cette coloration permet d'identifier les types cellulaires selon leurs critères morphologiques. Cette méthode panoptique est basée sur l'emploi successif de deux colorants: le May-Grünwald et le Giemsa. Le premier fixe les cellules par son alcool méthylique et colore les éléments acidophiles et les granulations spécifiques des leucocytes. Le second colore surtout les noyaux et les parties azurophiles. Les cellules blanches sanguines sont appliquées sur des lames microscopiques par un appareil à *cytospin* basé sur la centrifugation de petits volumes de cellules lesquelles adhèrent à l'enrobage des lames. Les lames peuvent être enrobées dans la gélatine ou dans l'APES (3-AminoPropyltriEthoxySilane). Les cellules adhérentes aux lames sont conservées à -80°C. Pour décongeler, les lames sont plongées dans le tampon PBS 1X à température pièce dès la sortie du congélateur. Les lames sont égoutées et recouvertes du colorant May-Grünwald 0,25 g / 100 ml de méthanol pendant 3 min. Autant de gouttes de tampon de Sørensen 67 mM pH 6,5 sont ajoutées et mélangées délicatement au premier colorant suivi d'un repos de 2 min. Le pH du tampon de Sørensen détermine la coloration résultante soit un pH alcalin accentuant le bleu de méthylène aux dépens de l'éosine et vice versa. Le liquide est rejeté et, sans rincer, la lame est couverte par le colorant Giemsa 0,8 g/100 ml de méthanol:glycérine 1:1 pour une durée de 5 min. Les lames sont rincées à l'eau vive, laissées à sécher et peuvent être observées sans lamelle.

### **Système *in vitro* de co-culture des cellules blanches sanguines et des segments de nerfs sciatiques**

Les cellules blanches sanguines fraîchement isolées sont ressuspendues dans le milieu RPMI-1640 supplémenté en sérum fœtal bovin 10 % pour une concentration finale de 2 millions de cellules par ml. Cette suspension cellulaire est incubée en présence de segments de nerfs sciatiques de souris CD-1 d'une longueur approximative de 1,5 cm à raison d'un segment par 2 ml de milieu de culture, à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> 5 %.

### **Mise en évidence de l'activité de la myéloperoxidase**

La réaction enzymatique s'effectue sur des tissus hydratés mis en présence de DAB (diaminobenzidine) 0,015 % et de peroxyde d'hydrogène 0.0225 % dans le tampon PBS pendant 10 min à l'obscurité. Après rinçage au tampon PBS, les tissus sont fixés par la formaldéhyde 4 % dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,2. Rincés à nouveau, les tissus peuvent être couverts d'un film de glycérol et d'une lamelle.

### **Transfection**

Les cellules blanches sanguines isolées sont ressuspendues dans le milieu RPMI-1640 sans sérum à une concentration de 3,25 millions de cellules par ml. Deux ml de suspension cellulaire sont mis en culture par sac de Teflon™, non-adhérent aux cellules. Après une incubation d'une heure à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> 10 %, la Lipofectin® est ajoutée aux suspensions cellulaires (0,17 et 30 µg/sac) et est laissée agir durant une heure aux conditions d'incubation. Le contenu de chaque sac est divisé en deux afin de recevoir de l'eau déminéralisée ou 20 µg de plasmides pGL3 (voir section Matériel, division Principaux produits et appareils). La transfection se fait pendant 4 heures d'incubation suivie d'une augmentation du volume de 4 fois et d'une incubation pour la nuit. Ensuite, les tests d'activité enzymatique du gène *reporter* de la luciférase sont effectués.

### Réaction de la luciférase

Les cellules transfectées sont lavées au tampon PBS-A additionné de EDTA 6 mM et ressuspendues dans 50 µl de Tris 100 mM pH 7,9 , DTT 1 mM et de détergent NP-40 0,5 %. Après un repos de 5 min sur glace, la suspension est centrifugée 5 min à 4°C à 12000 g. Le surnageant contenant l'extrait cellulaire est gardé à 4°C pour dosage ou conservé à -80°C. La solution d'ATP, le tampon LAB (*Luciferase Assay Buffer*) et la solution de D-luciférine doivent être fraîchement préparées. Le tampon LAB est un mélange dans un rapport 2:2:1 d'ATP 50 mM, de MgCl<sub>2</sub> 100 mM et de Tris 2 M pH 7,9. La D-luciférine est conservée en solution 10X soit 5 mM dans le tampon K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM pH 7,9 à -20°C, et est diluée à 1X dans le tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,9. La luciférase est dosée au luminomètre LKB immédiatement après le mélange de 12,5 µl de tampon LAB, 40 µl d'extrait cellulaire et 100 µl de luciférine 1X.

### Infection

Dans chacun des tubes, 3 millions de cellules blanches sanguines fraîchement isolées sont ressuspendues dans 570 µl de milieu Joklik auquel différentes quantités de virus Ad5CMVLacZΔHdz sont ajoutées soient 63, 25 ou 2,5 µl. Le stock viral est titré à  $1,2 \times 10^{10}$  pfu/ml et conservé dans le glycérol 10 %. Les virus sont en contact avec les leucocytes pendant une incubation d'une heure à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> 5 % en agitant à toutes les 15 minutes. Les milieux d'infection sont complétés à 3 ml avec du milieu Joklik et transférés dans un sac de Teflon™ pour une incubation de 24 heures. Les cellules sont appliquées sur des lames microscopiques par *cytospin* (technique décrite dans la section: Coloration May-Grünwald-Giemsa) pour des analyses immunologiques ou enzymatiques ultérieures.

### Réaction de la β-galactosidase

Les cellules et les coupes de tissus sur lames microscopiques sont fixées respectivement 10 et 15 min à 4°C par la formaldéhyde 4 % dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,2 et rincées au tampon PBS additionné de Triton X-100 0,2 %. Le mélange réactionnel de la β-galactosidase contient le

substrat X-gal 1 mg/ml, du ferricyanide de potassium 5 mM, du ferrocyanide de potassium 5 mM, du  $MgCl_2$  2 mM et du Triton X-100 0,2 % dans le tampon PBS. La réaction enzymatique peut durer entre une heure et une nuit à 37°C, et est arrêtée par le rinçage au tampon PBS. Les lames sont recouvertes du milieu de montage *Aqueous Mounting Medium* (Electron Mounting Medium, Washington, PA) et d'une lamelle pour l'observation.

### **Sondes ARNc-S<sup>35</sup> pour l'hybridation *in situ***

L'ADNc de la séquence de l'ARNm de NGF (nt 210-785) est contenu dans le plasmide pGEM3Z. La sonde sens (SS) est produite en utilisant le site d'initiation à la transcription de l'enzyme ARN polymérase SP6; la sonde anti-sens (AS), l'enzyme ARN polymérase T7. Les ARNc radioactifs sont synthétisés *in vitro* dans le milieu de transcription contenant l'UTP-S<sup>35</sup> 250 µCi (Amersham, Arlington Heights, IL), l'ATP 1 mM, le CTP 1 mM, le GTP 1 mM, l'enzyme ARN polymérase appropriée 3 U/µl en présence d'inhibiteurs de RNAses (RNAsin; Gibco BRL) 2 U/µl, de DTT (dithiothréitol) 10 mM et de tampon de transcription IX (TSC Buffer; Gibco BRL) dans un volume final de 10 µl à 37°C pendant 90 min. L'ajout 0,5 µl de DNAses (Promega Biotech) pendant 15 min à 37°C élimine la matrice d'ADN. Le milieu réactionnel est stabilisé en complétant à 100 µl par du DTT 40 mM. L'incorporation de la radioactivité est vérifiée sur 1 µl de milieu réactionnel en précipitant la sonde une minute sur glace avec du TCA froid 20 %, du pyrophosphate de sodium 17 mM et de l'ARNt 0,8 mg/ml (Sigma). Le milieu de précipitation est filtré sur un film millipore 0,45 µm préhumecté de TCA 5 % à l'aide d'une pompe à vide. Le filtre est rincé par 3 ml de TCA 5 %. Le précipité est dissous dans le liquide à scintillation et les rayons β sont comptés. La sonde est considérée lorsqu'il y a plus de 50 % d'incorporation. Les ARNc marqués sont séparés de la radioactivité non-incorporée sur colonne de gel Sephadex® G-50 (Gibco BRL) en éluant avec du DTT 40 mM. Les fractions correspondant aux sondes sont regroupées et diluées dans le milieu d'hybridation afin d'obtenir un million de cpm pour 25 µl. Cette solution d'hybridation peut être conservée à -80°C. Le milieu d'hybridation contient du

tampon SSC 3X, du Dextran sulfate 10 %, du détergent Denhardt's 1X (Sigma), des ARNt 0,1 mg/ml, de la formamide 75 % (Sigma) et du tampon de phosphate de sodium 50 mM pH 7,4.

### **Hybridation *in situ* d'ARNc**

L'intensité de la réponse est doublement plus forte lorsque la réaction est faite sur des tissus coupés au cryostat que sur des tissus coupés dans la paraffine; cette variable revêt une importance particulière pour la détection d'ARNm produits en faible quantité. Les tissus sont inclus dans un bloc d'OCT (Tissue-Tek Miles, Elkhart, IN) et figés par l'isopentane à -30°C. Ils sont ensuite coupés au cryostat à 5-7 µm d'épaisseur et conservés à -80°C sur lames. Pour décongeler, les lames sont plongées délicatement dans la solution de fixation de formaldéhyde 4 % dans le tampon de phosphate de sodium 100 mM pH 7,2 pour 15 min, pour les coupes de nerf sciatique, ou jusqu'à une heure pour des tissus comme le cerveau. Après des lavages au tampon PBS, les tissus sont acétylés 10 min par l'acide acétique anhydre 0,5 % (v/v) dans une solution de TEA (triéthanolamine) 100 mM. Ils sont ensuite lavés dans le tampon PBS et déshydratés par des bains successifs d'alcool de 50 à 100 %. Lorsque les lames sont sèches, 20 µl de la solution d'hybridation contenant la préparation de sondes radioactives sont ajoutés sur le tissu et recouvert d'une lamelle. L'hybridation s'effectue à 55°C dans un atmosphère de formamide 75 % pour la nuit. Le trempage des lames dans un tampon SSC 2X avec DTT 1 mM permet aux lamelles de se décoller. Les tissus sont lavés dans un second bain de tampon SSC 2X avec DTT 1 mM pour 15 min, suivi d'un autre lavage dans le tampon SSC 1X avec DTT 1 mM pour 15 min aussi. La majorité des sondes hybridées non-spécifiquement sont enlevées par le traitement à la RNase A 200 µg/ml de 15 min à 37°C. Le lavage est poursuivi en accentuant la stringence des bains: 15 min dans le tampon SSC 0,5X avec DTT 1 mM à 50°C et 40 min dans le tampon SSC 0,1X à 55°C. Les tissus sont finalement déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de 50 à 100 %. Lorsque les lames sont sèches, elles sont exposées à un film XAR 5 (Kodak) pour quelques jours afin d'estimer le temps d'autoradiographie nécessaire selon ces résultats préliminaires. L'autoradiographie est effectuée

dans l'émulsion NTB-2 (Kodak) pour 3 semaines à 4°C et le développement dans la solution D19 (Kodak). Les coupes de tissus sont colorées à l'Hématoxyline-Éosine et observées sur fond noir et sur fond clair.

### **Sondes ARNc-P<sup>32</sup> pour le buvardage à la Northern**

Les sondes d'ARNc-P<sup>32</sup> pour hybrider les membranes de Northern sont fabriquées à partir des mêmes plasmides dont proviennent les sondes anti-sens marquées au S<sup>35</sup> utilisées en hybridation *in situ*. Le milieu de réaction est complété à 70 µl avec le tampon STE et la sonde est purifiée sur colonne NucTrap (Stratagen, La Jolla, CA). Avant et après le dépôt du milieu de réaction sur la colonne, un volume de 70 µl de tampon STE est appliqué pour mouiller la colonne, et ensuite, pour éluer les sondes. L'incorporation du P<sup>32</sup> dans les ARNc formés est estimé par le comptage de la radioactivité de 1 µl d'éluat. Les manipulations des ARN sont exécutées dans des conditions sans contamination aux RNAses (*RNase free*).

### **Buvardage à la Northern**

L'ARN des tissus est extrait en utilisant la solution TRIzol® selon la méthode suggéré par le fabricant. La quantité d'ARN totaux est calculée à partir de la densité optique, 8 µg d'ARN dénaturé sont déposés par puit sur un gel d'agarose 1 % contenant la formaldéhyde 6,6 % dans le tampon MOPS-EDTA. L'ARN est dénaturé par le chauffage à 70°C pendant 5 min en présence de formaldéhyde 6,6 % et de formamide 50 % dans le tampon MOPS-EDTA. Le transfert des ARN migrés dans le gel à la membrane de nylon (0,45 µm, Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Keene, NH) se fait par capillarité mais, dans le même sens que la gravité (Ming, Y.Z. et al. 1994). La membrane est séchée et colorée au bleu de méthylène 0,02 % dans l'acétate de sodium 0,3 M pH 5,5. La membrane est préhybridée une heure à 67,5°C dans la solution d'hybridation composée de SDS 5 %, de NaPO<sub>4</sub> 0,4 M, de EDTA 1 mM, de BSA 0,1 % et de formamide 50 %. Les sondes fabriquées sont ajoutées à la solution d'hybridation et hybrident la membrane pendant la nuit à 67,5°C. La membrane est lavée de la radioactivité en excès par un premier lavage de 20 min à température de la pièce

SSC 0,2X. Un second lavage d'une heure à 67,5°C s'effectue dans le tampon SSC 0,1X avec 0,1 % de SDS. La membrane est soumise à un dernier lavage dans le tampon SSC 0,1X à 67,5°C jusqu'à ce que le bruit de fond de radioactivité ait suffisamment baissé. La membrane humide est scellée sous une pellicule plastique et exposée à un film radiographique (Kodak) contre un écran intensifiant à -80°C.

### **Sondes d'ADNc-P<sup>32</sup> pour le buvardage à la Southern**

Les sondes sont fabriquées par amorçage multiple de la Klenow (large fragment de l'ADN polymérase I, Gibco BRL). Cent ng d'ADN dissous dans l'eau sont bouillis pendant 5 min avec des hexamères aléatoires 0,125 U ( $A_{260}$ ) (Pharmacia) et refroidis sur glace. Aux matrices d'ADN et aux amorces, sont ajoutés, pour un volume final de 25 µl, les éléments suivants: fragments Klenow 6 U, dATP-P<sup>32</sup> 100 µCi, dCTP 20 µM, dGTP 20 µM, TTP 20 µM, 2-mercaptoéthanol 4,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, HEPES 200 mM pH 6,6. Après 2 heures d'incubation à 21°C, l'ADN marqué est séparé de la radioactivité libre sur colonne NucTrap. La radioactivité est comptée sur un µl. La solution de sondes est considérée de qualité lorsque la quantité de cpm (coups par minute) par µg d'ADN utilisé est plus grand ou égal à 10<sup>8</sup>. Cinq millions de cpm par 10 ml de solution d'hybridation sont utilisés pour hybrider la membrane.

### **Buvardage à la Southern**

L'ADN génomique est extrait de bouts de queues de souris suivant une technique simple et rapide d'extraction (Couse, J.F. et al. 1994) qui a la particularité de s'effectuer à l'aide de tubes SST (Serum Separation Tube, Becton Dickinson, Lincoln, NJ). L'ADN digéré en EcoRI est migré sur gel d'agarose 0,6 % à raison de 5 µg par puit selon des calculs basés sur la densité optique. Le gel d'agarose est coloré dans une solution de bromure d'éthidium 25 µg/ml pendant 10 min et décoloré pendant 20 min dans l'eau ce qui permet de visualiser la qualité de la digestion de l'ADN génomique. Le traitement acide du gel d'agarose, 10 min dans HCl 0,25 M, brise les longs brins d'ADN afin de faciliter le transfert sur membrane. Le gel est rincé à l'eau et son pH est augmenté par deux

trempages de 10 min dans NaOH 0,4 M. La membrane GeneScreenPlus (Dupont, Boston, MA) est équilibrée pendant 10 min dans la solution de transfert de NaOH 0,4 M. L'ADN est transféré sur membrane par capillarité dans le sens contraire à la gravité, en 3 heures maximum. La membrane est rincée dans le tampon SSC 2X et conservée humide à 4°C. La membrane est préhybridée une heure à 65°C dans 10 ml de solution d'hybridation contenant NaPO<sub>4</sub> 250 mM pH 7,2, SDS 7%, EDTA 0,15 mM. Les sondes d'ADN radioactives sont bouillies 10 min, refroidies 2 min sur glace et ajoutées à la solution d'hybridation. La membrane en présence des sondes est incubée en mouvement rotatif à 65°C pour la nuit. La post-hybridation de la membrane est effectuée à 10°C de plus que la température d'hybridation, soit à 75°C, dans le tampon SSC 0,1X additionné de SDS 0,1%.

### **Immunocytochimie**

Le tissu est fixé par la formaldéhyde 4% dans le tampon phosphate 100 mM pH 7,2, une nuit à 4°C. La déshydratation du tissu se fait par des passages successifs de 30 min dans l'éthanol 50, 70, 80, 90, 95 et 100%. Une période prolongée dans l'éthanol 70% permet d'éliminer la formaldéhyde résiduelle qui nuit à l'immunoréaction. Trois bains de 45 min dans le xylène saturent complètement le tissu ce qui permet à la paraffine de pénétrer le tissu par trois bains d'une heure dans la paraffine liquide à 70°C. Les tissus inclus dans les blocs de paraffine sont coupés à 3 µm d'épaisseur. Les coupes sont déparaffinées dans trois bains de xylène, le xylène est chassé par deux bains d'éthanol 100% et les coupes sont hydratées dans des bains d'éthanol de pourcentages décroissants jusqu'à 50% pour être amené ensuite dans le tampon PBS: tous les bains sont d'un minimum de 10 min. De longs lavages au tampon PBS à 4°C précèdent la réaction immunologique soit de 24 heures ou davantage. L'immunoréaction et sa révélation se font en quatre étapes intercalées par des lavages au PBS. Les tissus sont recouverts par l'anticorps NGF (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1/300 dans le sérum normal de chèvre pour la nuit à 4°C dans un milieu humide; par la solution d'anticorps secondaire *Biotinylated Antibody* (Vector Laboratories, Burlingame, CA) pour 30 min à température

pièce; par la solution d'avidine-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) pour 45 min à température pièce suivi de la mise en évidence de la myéloperoxidase (décrite précédemment).

### **Biotinylation des ADNc pour l'hybridation *in situ***

L'insert de l'ADNc 145SC5 a d'abord été retiré du plasmide et purifié. La digestion par l'enzyme de restriction EcoRI permet de libérer un insert de 1,5 kb représentant uniquement la séquence 145SC5 (Nishioka, Y. 1993) qui est contenue dans le plasmide vecteur Bluescript. La purification de l'insert est basée sur la propriété des brins d'ADN à se lier au verre (Vogelstein, B. et Gillespie, D. 1979); et il a été démontré que le sicilone remplace efficacement le verre (Boyle, J.S et Lew, A.M. 1995) à cet effet. Des billes de silicone (No. # S-5631, Sigma) ont été utilisé suivant le protocole Geneclean II (Bio/Can Scientific, Mississauga, On). La concentration de la sonde purifiée est approximativement de 4 ng/ $\mu$ l.

La fabrication de sondes d'ADNc biotinylées a été effectuée selon le protocole suggéré par le manufacturier Gibco BRL sur l'utilisation du système BioPrime™ *DNA Labeling System*. Cette technique de biotinylation de l'ADN est un système d'amplification des sondes marquées utilisant un type de nucléotides biotinylés, des fragments Klenow de l'ADN polymérase I et des hexamères aléatoires. Ce système permet de produire une quantité appréciable de sonde marquée grâce à la haute concentration d'enzymes actives soit 40 unités par  $\mu$ l.

### **Hybridation *in situ* d'ADNc**

La technique d'hybridation a la particularité d'utiliser la capillarité pour échanger les solutions ce qui a permis d'avoir été automatisée (Unger, E.R. et Brigati, D.J. 1989; Reed, J.A. et al. 1992). Cette technique d'hybridation *in situ* a été appliquée pour localiser rapidement le génome du virus humain papilloma (HPV) sur des coupes de tissus fixés et parafinés afin d'améliorer le diagnostic du cancer du col utérin (Gorska-Flipot, I. et al. 1996).

La technique a été mise au point pour l'hybridation *in situ* des sondes biotinylées 145SC5 sur des coupes de nerfs sciatiques paraffinés et des *cytopins* de cellules blanches sanguines de souris CD-1 mâles et femelles. Les sondes Alu et pBR (Life Technologies) ont été utilisées respectivement comme sondes contrôles positives et négatives. Les coupes de tissus sont appliquées sur des lames ProbeOnPlus™ montées face à face, deux à deux, ce qui laisse un espace suffisant pour que les solutions entrent en contact avec les tissus par capillarité. Cette technique permet d'utiliser une quantité minimale de sonde. L'appareil d'incubation Microprobe™ permet le chauffage des lames et les échanges des différentes solutions. Les coupes sont déparaffinées par le chauffage à 72°C dans une solution xylène:Hémo-De (1:3). Les tissus sont rincés à l'éthanol 100 % et 95 % avant l'étape de la digestion dans la pepsine 7,5 mg/ml (préparation du jour) pendant 15 min à 37°C qui permet de briser les complexes nucléo-protéiques. Après le rinçage dans le tampon Tris pH 7,5, les tissus sont déshydratés à l'éthanol 95 % et 100 % et séchés. La solution de sondes 145SC5 de 0,016 ng par µl de solution d'hybridation *Probe Diluent* (Life Technologies) est appliquée suivi d'un temps de chauffage intense de 20 min à 106°C dans un atmosphère humide qui a pour effet de dissocier les doubles brins d'ADN. L'abaissement de la température à 37°C pour 3 heures permet l'hybridation des sondes. La stringence des lavages au tampon SSC 0,1X permet d'éliminer presque totalement l'hybridation non-spécifique. La révélation des sondes hybridées est effectuée par l'attachement du complexe streptavidine-phosphatase alcaline (Gibco BRL) en dilution 1/800 pendant 20 min à 37°C, suivi de lavages au tampon SSC 2X et de la réaction enzymatique de la phosphatase alcaline aux substrats NBT/BCIP (Gibco BRL) pendant 30 min à 37°C. L'excédent de colorant est rincé à l'eau et les tissus sont couverts d'une lamelle montée sur le milieu *Aqueous Mounting Medium* et observés en microscopie optique.

## RÉSULTATS

Le but est de démontrer le rôle de certains leucocytes à exprimer NGF en situation d'infiltration du système nerveux périphérique après lésion. L'infiltration des leucocytes est étudiée dans un système de co-culture du nerf sciatique et de leucocytes. Les leucocytes sont d'abord isolés du sang.

### **Caractérisation des cellules blanches sanguines isolées**

Les cellules blanches sanguines sont isolées par la sédimentation des globules rouges agrégés par le méthylcellulose; et sont caractérisées.

Une population hétérogène est obtenue comprenant tous les types leucocytaires dont les monocytes (M); les lymphocytes (L); les polymorphonucléaires (PMN) comprenant les éosinophiles (PMNé), les neutrophiles (PMNn) et basophiles (Figure 2). La coloration May-Grünwald-Giemsa spécifique aux frottis sanguins permet d'identifier les types cellulaires sanguins. Les PMN ont un noyau multilobé très caractéristique; les éosinophiles se distinguent par de gros granules cytoplasmiques rosés (apparaissant bleus foncés sur la photographie). Les neutrophiles qui possèdent de fins granules presque invisibles représentent la majeure partie des PMN. Les basophiles (non-montrés) ont un noyau bilobé assombri par la présence de nombreux granules basophiles. Les monocytes sont les plus volumineux et leur noyau en forme de fer à cheval (ou de fève) est décentré dans la cellule. Les lymphocytes sont les plus petits leucocytes et possèdent un noyau rond violacé entouré d'un mince cytoplasme. Les proportions des différents types leucocytaires isolés varient de celles que l'on retrouve normalement dans le sang de souris *Mus musculus* (Tableau I). La technique d'isolation des cellules blanches du sang concentre légèrement les monocytes et les neutrophiles. La demi-vie des cellules blanches sanguines mises en culture est de 3 jours. Après 9 jours, 38 % d'entre elles sont toujours vivantes (Figure 3).

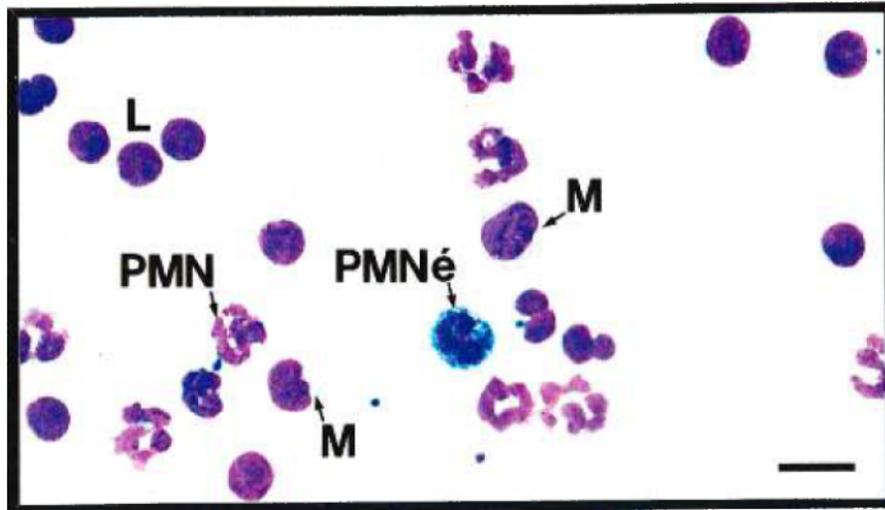


Figure 2: Cellules blanches sanguines isolées et identifiées grâce à la coloration May-Grünwald-Giemsa comme des monocytes (M), des lymphocytes (L) et des polymorphonucléaires (PMN) incluant les éosinophiles (PMNé). Les cellules sont appliquées sur lame microscopique par *cytospin* (voir Méthodes: Isolation des cellules blanches sanguines). Barre = 15  $\mu$ m.

TYPES DE LEUCOCYTES	LEUCOCYTES ISOLÉS DE SOURIS CD-1	VALEURS THÉORIQUES <i>Mus musculus</i>
LYMPHOCYTES	55 %	80 %
MONOCYTES	5 %	0,2 %
PMNs	34 %	20,9 %
CELLULES NON-IDENTIFIÉES	6 %	-

Tableau I: Proportions des différents types cellulaires des leucocytes isolés du sang de souris CD-1, identifiés morphologiquement, en comparaison aux valeurs théoriques répertoriées de l'espèce murin *Mus Musculus* (Melby, E.C. et Altman, N.H. 1974).

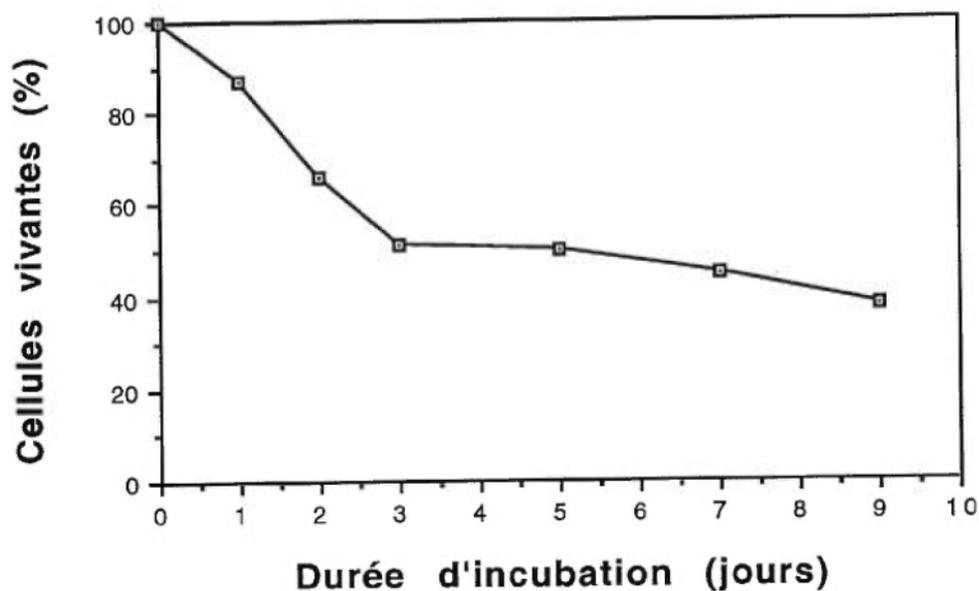


Figure 3: Viabilité des cellules blanches sanguines en culture pendant 9 jours à une concentration de 2 millions de cellules par ml de milieu de culture RPMI-1640 supplémenté en sérum fœtal bovin 10 % à 37°C et en présence de CO<sub>2</sub> 5 %. La viabilité a été testée par la coloration *Trypan Blue* (Sigma) selon les recommandations du fabricant. Les pourcentages sont calculés sur 200 cellules pour chaque jour.

La population des cellules blanches isolées du sang contient une proportion appréciable de leucocytes ayant la capacité d'infiltrer les tissus (39 %), soient les monocytes et les neutrophiles. La population obtenue est suffisamment viable pour la culture primaire à court terme.

### **Mise en évidence de l'activité de la myéloperoxidase**

La mise en évidence de la myéloperoxidase est utilisée pour identifier rapidement les conditions de co-culture des cellules blanches sanguines et des segments de nerfs sciatiques qui représentent un maximum d'infiltration. La proportion des cellules qui expriment l'activité myéloperoxidase par coupe de segment de nerf est montrée dans le Tableau II.

Comme le montre ce tableau, le nombre de cellules exprimant l'activité de la myéloperoxidase dans le nerf sciatique en culture augmente lorsque le segment de nerf est incubé en présence de leucocytes, en comparaison à son incubation seul. L'augmentation la plus marquée s'observe après 4 heures d'incubation et s'atténue radicalement dès la 5<sup>ième</sup> heure jusqu'à 24 heures tout en demeurant observable. Deux types de support de culture ont été étudiés: i) les sacs de Teflon™ représentant un support non-adhérent et ii) les flacons de culture cellulaire représentant un support adhérent. Après 4 heures d'incubation sur un support non-adhérent, le nombre de cellules exprimant l'activité de la myéloperoxidase est augmentée de 6 fois dans le segment de nerf incubé en présence de leucocytes par rapport à ce nombre dans le segment de nerf incubé seul. Sur un support adhérent, ce nombre est augmenté de 40 fois. Les conditions d'incubation choisies sont celles dans lesquelles l'écart du nombre de cellules exprimant l'activité de la myéloperoxidase dans le segment de nerf incubé avec et sans leucocytes est le plus marqué. Dans les conditions d'incubation choisies, les cellules exprimant l'activité de la myéloperoxidase s'observent dans le périnèvre des segments de nerfs co-incubés avec des leucocytes (Figure 4 b) ainsi que dans les segments de nerfs incubés en absence de leucocytes (Figure 4 a).

TYPE DE SUPPORT	DURÉE (h)	CONDITIONS D'INCUBATION	
		NS SEUL	NS + CBS
NON-ADHÉRENT	4	10 ± 5	59 ± 10
ADHÉRENT	4	1 ± 1	42 ± 7
	5	4 ± 2	8 ± 5
	8	3 ± 1	18 ± 5
	12	1 ± 1	14 ± 4
	24	4 ± 2	15 ± 7

Tableau II: Quantités moyennes de cellules mettant en évidence l'activité de la myéloperoxidase par coupe de segment de nerf sciatique murin en absence (NS seul) ou en présence de cellules blanches sanguines (NS + CBS) en fonction de la durée d'incubation (4, 5, 8, 12 ou 24 heures) et de la qualité du support de culture (adhérent: polystyrène; ou non-adhérent: Teflon™) dans le milieu de culture RPMI-1640 supplémenté en sérum fœtal bovin 10 %, à 37°C et en présence de CO<sub>2</sub> 5 %. L'échantillonnage pour chacune des conditions est de 10 coupes de segments de nerfs différents. Il est à noter que NS signifie Nerf Sciatique lequel est plus fréquemment abrégé SN pour Sciatic Nerve; CBS, Cellules Blanches Sanguines au lieu de WBC pour White Blood Cells.

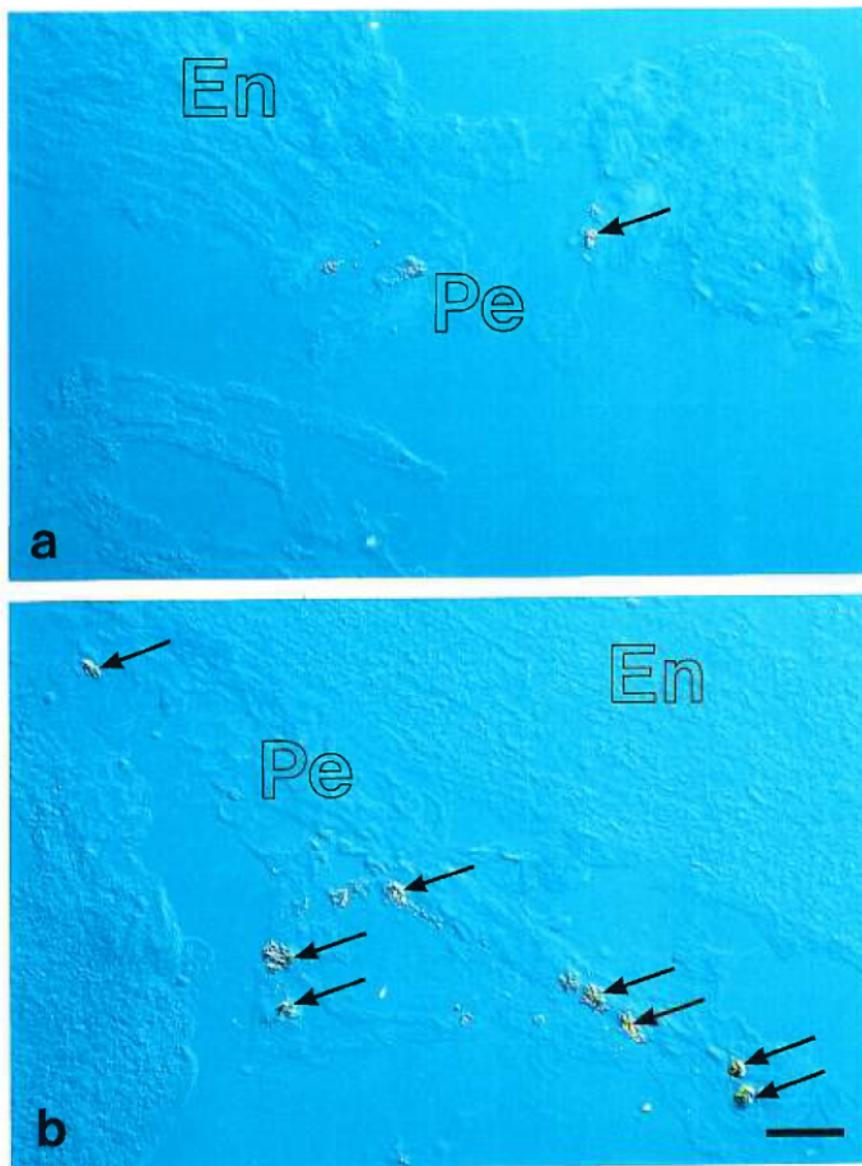


Figure 4: Mise en évidence des sites de l'activité de la myéloperoxidase dans le segment de nerf sciatique de souris incubé seul (a) et incubé en présence de cellules blanches sanguines isolées (b) dans les conditions d'incubation décrites dans Méthodes: Système *in vitro* de co-culture. L'activité de la myéloperoxidase (flèches) se retrouve exclusivement dans le périnèvre (Pe), et non dans l'endonèvre (En). Barre = 25  $\mu$ m.

La mise en évidence de la myéloperoxidase a permis de déterminer deux conditions du système de co-culture: le temps d'incubation et le type de support de culture. Les segments de nerfs sciatiques seront donc incubés et co-incubés pendant 4 heures sur un support adhérent. Toutes les analyses subséquentes seront effectuées selon ces conditions de co-culture.

### **Analyses par buvardage à la Northern de NGF et la furine**

Les concentrations des ARN messagers de NGF et de la furine ont été analysées par buvardage à la Northern des ARN totaux isolés des segments de nerfs sciatiques et des cellules blanches sanguines mis en culture et en co-culture. Ces analyses permettent d'évaluer les changements dans la quantité d'ARNm de NGF et furine exprimés dans les segments de nerfs lorsqu'ils sont co-incubés avec des leucocytes par rapport à leur incubation seul. Des variantes du modèle de co-culture empêchant tout contact et toutes possibilités d'infiltration des leucocytes dans le nerf, permettent d'étudier l'effet du contact entre ces deux éléments en co-culture sur l'expression des ARNm de NGF et de la furine dans les segments de nerfs, et parallèlement, dans les leucocytes.

Dans les segments de nerfs sciatiques non-incubés, les ARNm de NGF sont détectables en faible quantité mais leur expression n'est pas perceptible dans la Figure 5 a (ligne A) à cause de la courte durée d'exposition de ce film photographique. En revanche, le temps d'exposition utilisé était suffisant pour bien visualiser les ARNm de NGF de 1,5 kb ainsi que les différences dans leur niveau d'expression dans les segments de nerfs incubés (Figure 5 a). Les intensités des réponses à l'hybridation ont été normalisées par rapport aux ARN ribosomiaux par quantification densitométrique (Figure 6). Chez le nerf incubé seul, l'expression de NGF est similaire en présence ou non de sérum fœtal bovin 10 % dans le milieu d'incubation RPMI-1640 (Figure 6: B et C). La présence de cellules blanches sanguines dans le milieu d'incubation supplémenté en sérum engendre une augmentation dramatique du niveau d'expression de NGF dans le nerf incubé (Figure 6 D). Cette expression est réduite lorsqu'on empêche le

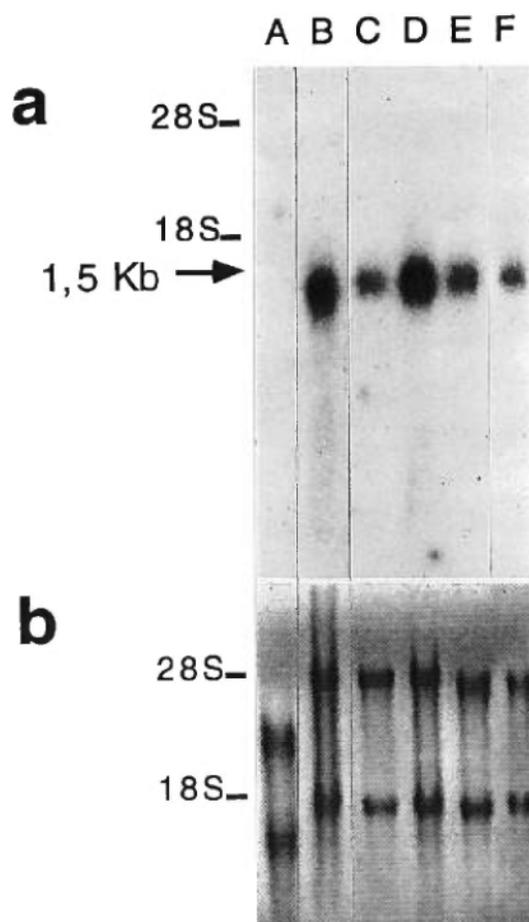


Figure 5: Analyses des taux d'expression des ARNm de NGF par buvardage à la Northern (a) avec  $P^{32}$ -ARNc NGF nt 1-20 de segments de nerfs sciatiques non-incubés (A), incubés seuls (sans sérum) (B), incubés seuls (C), incubés en présence de leucocytes isolés (D), incubés dans un milieu de culture conditionné par l'incubation de leucocytes pendant 4 heures (E) et enveloppés dans un sac à dialyse Spectrapor® no. 4 et incubés en présence de leucocytes (F) et ce, selon les conditions d'incubation décrites dans Méthodes: Système *in vitro* de co-culture. La forme détectée d'ARNm de NGF est d'une longueur de 1,5 kb. Huit  $\mu$ g d'ARN totaux ont été déposés par puit et colorés au bleu de méthylène (b). Les positions des ARN ribosomiaux 18S et 28S sont indiquées.

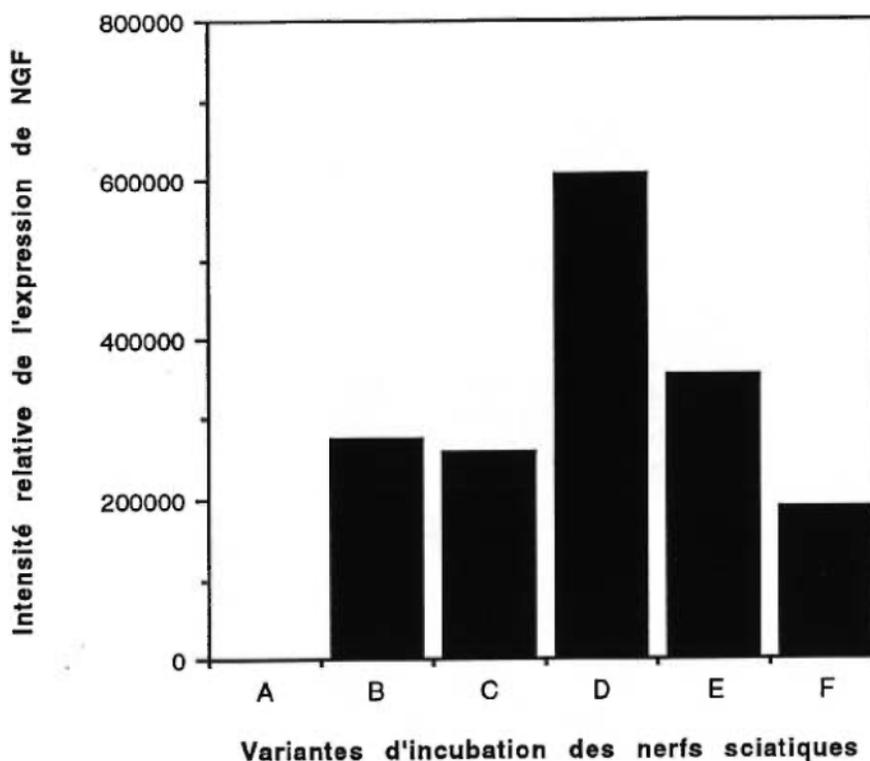


Figure 6: Évaluation semi quantitative des taux d'ARNm de NGF montrés à la Figure 5 a après normalisation (Figure 5 b). Les lettres majuscules (A-F) représentent les variantes d'incubation énumérées à la Figure 5. Cette expérience a été effectuée à quatre reprises sur les six conditions. Les unités d'intensité relative sont la densité de la bande radioactive calculée par le logiciel "NIH Image 1.55" sur la densité des bandes 18S et 28S colorées au bleu de méthylène.

contact physique entre le nerf et les leucocytes en isolant les segments de nerfs dans un sac à dialyse (figure 6 F). Des segments de nerfs sciatiques ont été incubés dans un milieu ayant incubé au préalable des leucocytes pendant quatre heures en supposant que ceux-ci aient possiblement libérés certaines molécules. Ce milieu n'a pas d'effet significatif sur l'expression de NGF par le nerf (Figure 6 E). Ces résultats démontrent que le contact physique entre les éléments (les leucocytes et le nerf) semble avoir une influence sur l'expression de NGF par le nerf.

Il s'avère que l'expression des ARNm de NGF n'est pas détectable chez les leucocytes dans les conditions d'analyses à la Northern et ce, dans toutes les variantes du modèle *in vitro* (résultats non-montrés).

Les analyses par buvardage à la Northern détectent des ARNm de la furine dans les segments de nerfs sciatiques et dans les leucocytes (Figure 7 et 9). Chez le nerf sciatique, le niveau d'ARNm de la furine augmente dans toutes les variantes d'incubation par comparaison aux nerfs non-incubés (Figure 8). La présence de sérum fœtal bovin 10 % dans le milieu de culture ne semble pas avoir d'effet notable sur le niveau d'expression de la furine (Figure 8: B et C). L'expression des ARNm de la furine est davantage stimulée dans la variante où les segments de nerfs sciatiques sont incubés en présence de cellules blanches sanguines (Figure 8 D). Le milieu de culture ayant incubé les leucocytes au préalable influence légèrement à la hausse cette expression (Figure 8 E) mais, celle-ci diminue lorsque les tissus nerveux sont isolés dans le sac à dialyse (Figure 8 F).

En ce qui concerne les ARNm de la furine dans les leucocytes, leur niveau d'expression est relativement bas lorsque les leucocytes sont incubés seuls (Figure 10 H) et non-incubés (Figure 10 G). Le niveau d'expression des ARNm de la furine augmentent dans les leucocytes lorsqu'ils sont incubés avec des segments de nerfs sciatiques (Figure 10 I), dans le milieu d'incubation de nerfs (Figure 10 J) et avec des segments de nerfs isolés dans un sac à dialyse (Figure 10 K).

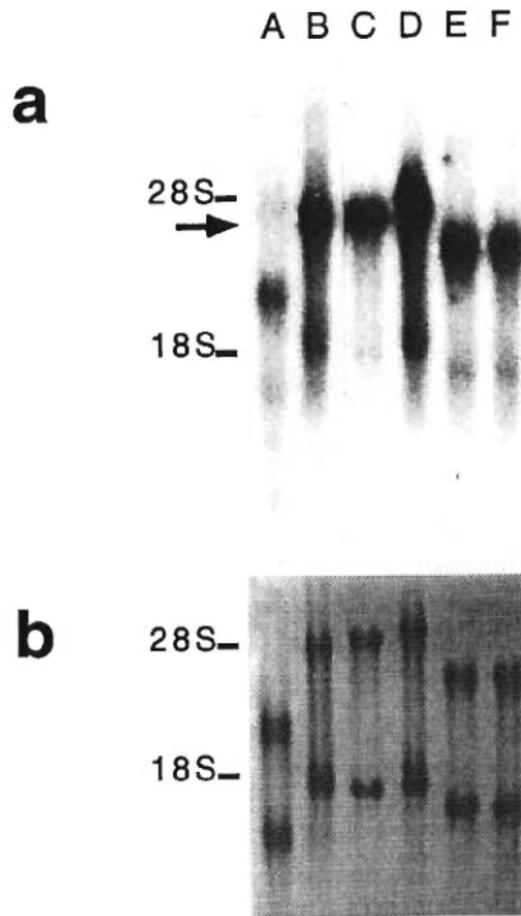


Figure 7: Analyses des taux d'expression des ARNm de la furine par buvardage à la Northern (a) avec  $P^{32}$ -ARNc furine (1,1 kb) 5'-3'-ADNc (Seidah, N.G. et al. 1991) de segments de nerfs sciatiques dans les variantes A, B, C, D, E et F énumérées à la Figure 5. La forme détectée d'ARNm de la furine est d'une longueur de 4,4 kb. Huit  $\mu$ g d'ARN total ont été déposés par puit et colorés au bleu de méthylène (b). Les positions des ARN ribosomiaux 18S et 28S sont indiquées.

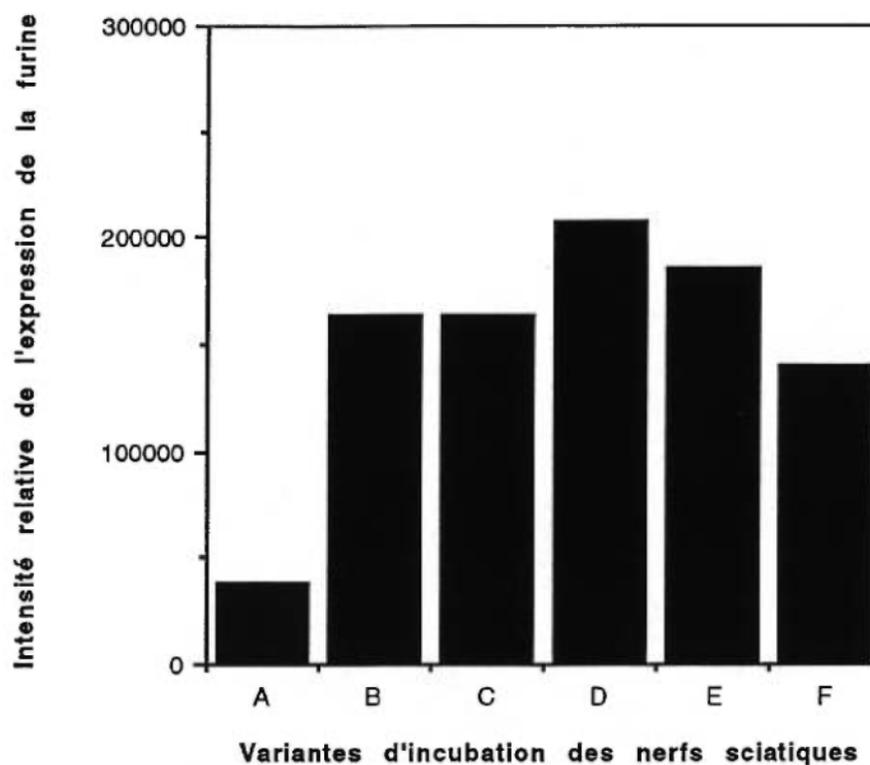


Figure 8: Évaluation semiquantitative des taux d'ARNm de la furine montrés à la Figure 7 a après normalisation (Figure 7 b). Les lettres majuscules (A-F) représentent les variantes d'incubation énumérées à la Figure 7. Cette expérience a été effectuée à trois reprises. Les unités sont détaillées à la Figure 6. L'attachement non-spécifique aux ARN 18S et 28S n'altère en rien les résultats, car on suppose que leur quantité est stable et parce que les résultats sont analysés de façon comparative.

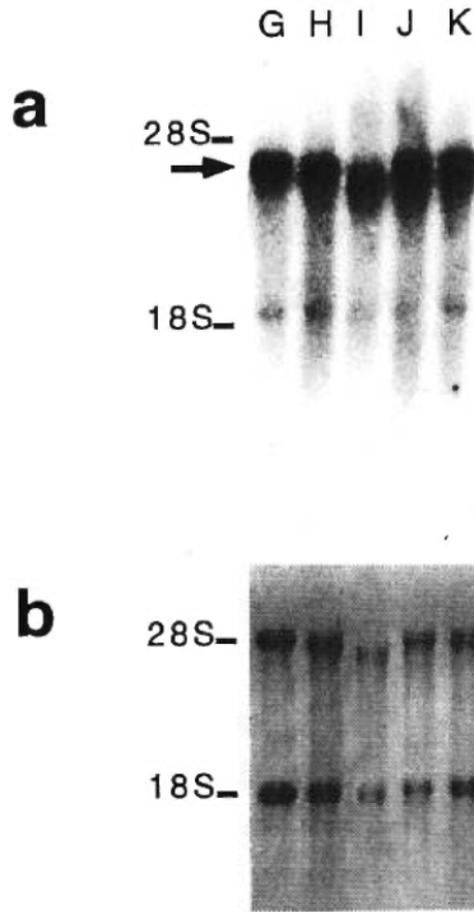


Figure 9: Analyses des taux d'expression des ARNm de la furine par buvardage à la Northern (a) avec  $P^{32}$ -ARNc furine (voir Figure 7) de leucocytes non-incubés (G), incubés seuls (H), incubés en présence de segments de nerfs sciatiques (I), incubés dans un milieu de culture conditionné par l'incubation de segments de nerfs sciatiques pendant 4 heures (J) et incubés en présence de segments de nerfs sciatiques qui sont enveloppés dans un sac à dialyse Spectrapor® no. 4 (K) et ce, dans les conditions d'incubation décrites dans Méthodes: Système *in vitro* de co-culture. La forme détectée d'ARNm de la furine est d'une longueur de 4,4 kb. Huit  $\mu$ g d'ARN totaux ont été déposés par puit et colorés au bleu de méthylène (b). Les positions des ARN ribosomiaux 18S et 28S sont indiquées. Les lettres majuscules désignant les variantes d'incubation des leucocytes sont de G à K pour différencier de ceux des segments de nerfs sciatiques.

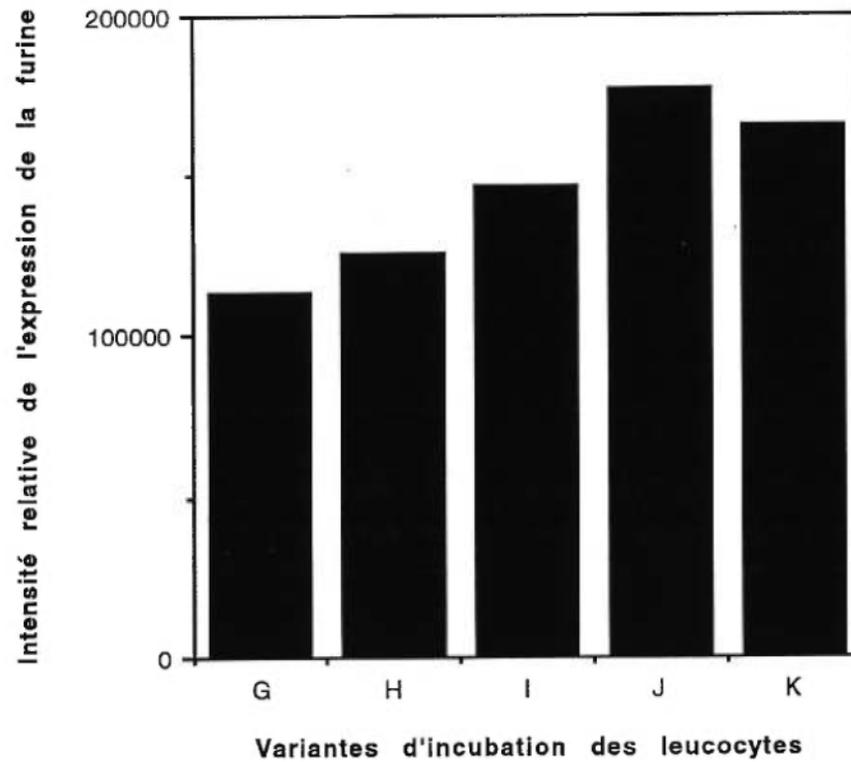


Figure 10: Évaluation semiquantitative des taux d'ARNm de la furine montrés à la figure 9 a (Figure 9 b). Les lettres majuscules (G-K) représentent les variantes d'incubation énumérées à la Figure 9.

Dans les conditions d'incubation déterminées par la mise en évidence de la myéloperoxidase, les analyses de buvardage à la Northern ont permis de confirmer que la quantité d'ARNm de NGF est supérieure de 2,5 fois dans les segments de nerfs sciatiques incubés en présence de leucocytes que dans ceux incubés seuls. Cette surexpression des ARNm de NGF dans le nerf nécessite le contact des leucocytes, même si les ARNm de NGF n'ont pas été détectés directement dans les leucocytes. La régulation des ARNm de la furine dans le nerf est modulée de façon similaire que celle de NGF selon les différentes variantes d'incubation mais, de façon moins accentuée. La régulation des ARNm de la furine est différente dans les leucocytes.

### **Hybridation *in situ* de NGF**

L'hybridation *in situ* de NGF permet de corréler les taux d'expression des ARNm de NGF analysés par buvardage précédemment et leur localisation dans le segment de nerf sciatique aux niveaux anatomique et cellulaire. La variante d'incubation où l'expression des ARNm de NGF est maximale est celle qui permet le contact entre les leucocytes et les segments de nerf et ainsi, offre la possibilité d'infiltration. Dans cette variante du modèle *in vitro*, l'hybridation *in situ* du segment de nerf permet de localiser les ARNm de NGF surexprimés et d'obtenir des informations sur les types cellulaires qui les expriment. Une seule expérience a fourni des résultats publiables et ceux-ci reproduisent ceux obtenus chez le rat ce qui nous rassure sur la validité des résultats.

Dans cette variante où le segment de nerf sciatique est co-incubé avec des cellules blanches sanguines, les ARNm de NGF sont exprimés de façon significative dans certaines cellules du périnèvre et de l'épinèvre, et de l'endonèvre (Figure 11 a et a'). Les types cellulaires ne peuvent pas être déterminés facilement après l'hybridation *in situ* seulement. Certains critères tels que l'emplacement cellulaire, la forme de noyaux et la proximité des vaisseaux sanguins, suggèrent que les ARNm de NGF sont présents dans plusieurs types cellulaires y compris dans les cellules de Schwann (dans l'endonèvre) et les monocytes/macrophages (dans le périnèvre et l'épinèvre). L'hybridation des tissus avec la sonde sens (Figure 11 b et b') permet de

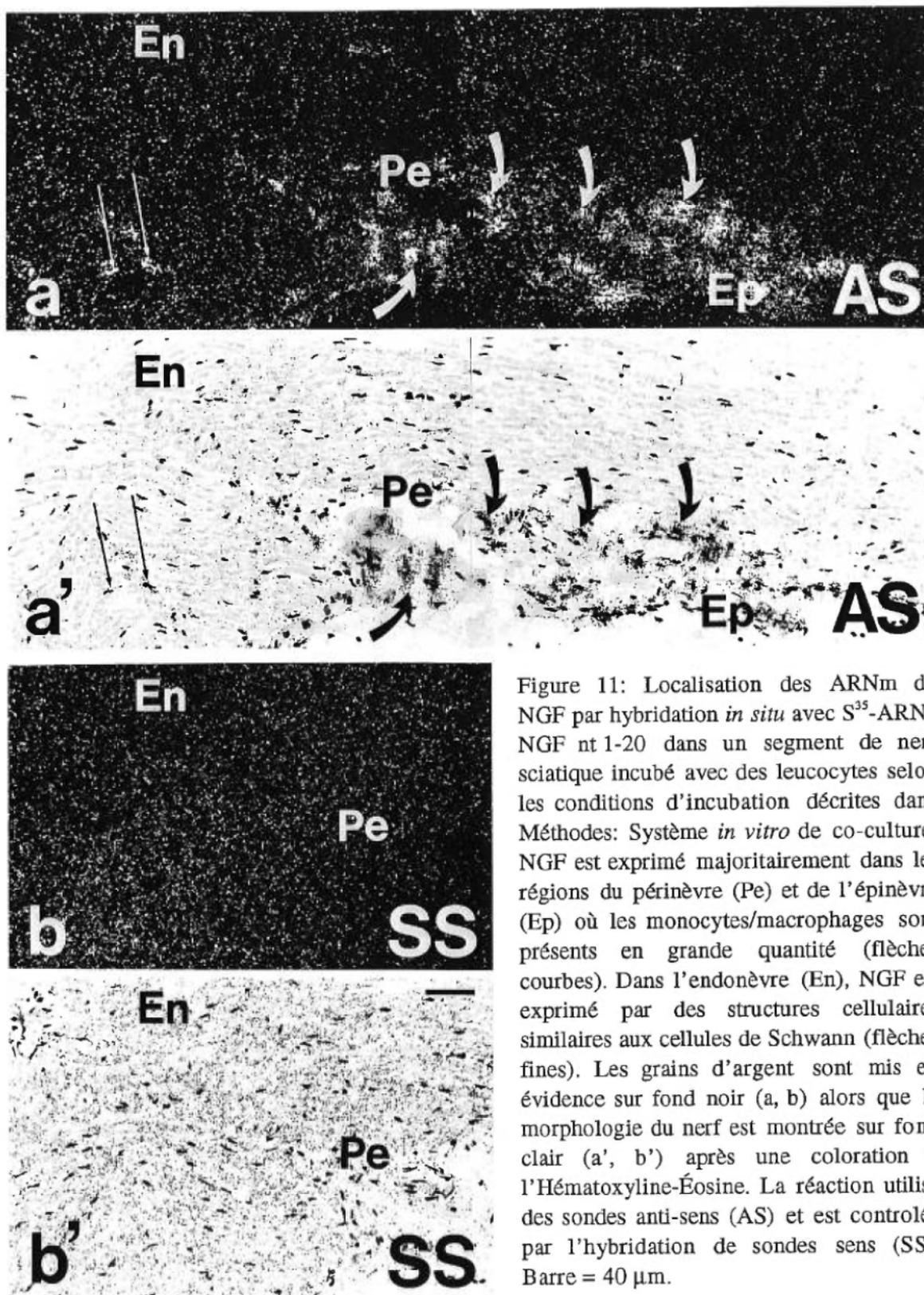


Figure 11: Localisation des ARNm de NGF par hybridation *in situ* avec  $S^{35}$ -ARNc NGF nt 1-20 dans un segment de nerf sciatique incubé avec des leucocytes selon les conditions d'incubation décrites dans Méthodes: Système *in vitro* de co-culture. NGF est exprimé majoritairement dans les régions du périnèvre (Pe) et de l'épinèvre (Ep) où les monocytes/macrophages sont présents en grande quantité (flèches courbes). Dans l'endonèvre (En), NGF est exprimé par des structures cellulaires similaires aux cellules de Schwann (flèches fines). Les grains d'argent sont mis en évidence sur fond noir (a, b) alors que la morphologie du nerf est montrée sur fond clair (a', b') après une coloration à l'Hémaroxyline-Éosine. La réaction utilise des sondes anti-sens (AS) et est contrôlée par l'hybridation de sondes sens (SS). Barre = 40  $\mu$ m.

rendre compte de l'hybridation non-spécifique des sondes dans les conditions expérimentales, et apparaît comme une faible densité de grains d'argent répartis de façon uniforme sur tout le tissu.

Les informations obtenues par l'hybridation *in situ* suggèrent que les cellules de Schwann et les monocytes/macrophages soient les cellules responsables de la surexpression des ARNm de NGF, observée par les analyses par buvardage, dans les segments de nerfs sciatiques co-incubés avec des cellules blanches sanguines.

### **Marquage des cellules blanches sanguines**

L'hybridation *in situ* de NGF retrouvée dans les monocytes/macrophages du péricrème et de l'épincrème des segments de nerfs incubés en présence de leucocytes a mené à déterminer si ces monocytes/macrophages sont des macrophages résidents ou s'ils originent des monocytes mis en co-culture ayant infiltré le nerf. L'origine des macrophages ne peut être distinguée sur une base morphologique. Dans le but de déterminer l'origine des monocytes/macrophages positifs à l'hybridation *in situ* de NGF, plusieurs techniques de marquage des leucocytes isolés ont été utilisées. Les leucocytes sont marqués afin de les incuber en présence de segments de nerfs sciatiques et de les localiser dans le nerf après leur infiltration.

Plusieurs techniques de marquage des leucocytes ont été testées et sont résumées dans le Tableau III. La transfection par lipofection des leucocytes et leur infection par adénovirus ont été tentées mais, sans succès. La mise en évidence de l'activité de la myéloperoxidase, de l'activité du transgène  $\beta$ -galactosidase et du chromosome Y ont été testé dans les leucocytes. D'abord, l'activité de la myéloperoxidase n'est pas spécifique aux leucocytes infiltrants. Ensuite, les leucocytes de la souris transgéniques TgR(ROSA26)26Sor n'expriment pas la protéine du transgène  $\beta$ -galactosidase (Figure 12).

---

Tableau III: Résumé des techniques envisagées pour le marquage des leucocytes infiltrants dans le modèle de co-culture *in vitro*: les avantages, les limites et les observations de leurs applications ainsi que les références qui ont permis d'envisager ces techniques. [Voir page 38]

MARQUAGE DES LEUCOCYTES INFILTRANTS	RÉFÉRENCES DE BASE	AVANTAGES	LIMITES ET OBSERVATIONS
Révélation de l'activité de la myéloperoxidase	Shellito, J. et al. 1987; Perry, V.H. et al. 1987; Tableau II	Significatifs de la présence des leucocytes en co-culture. Détection par réaction enzymatique simple et rapide.	Spécifique aux PMNs et aussi exprimée par les macrophages en phagocytose et non par les monocytes.
Transfection de pGL3 control par lipofection	Alam, J. et Cook, J.L. 1990; Felgner, P.L. et al. 1987; Felgner, P.L. et Rhodes, G. 1991.	Possibilité de stimuler spécifiquement les leucocytes par un jeu de plasmides. Sensibilité du dosage du gène reporter luciférase. Technique de transfection efficace.	Résultats préliminaires négatifs. Pourcentage élevé de mort cellulaire. Nombre limité de leucocytes isolés d'une souris.
Infection par l'adénovirus Ad5CMVLacZΔHdz	Haddada, H. et al. 1993; Guerette, B. et al. 1996.	Technique de transfert de gènes plus efficace que la transfection. Détection par réaction enzymatique simple.	$\beta$ -galactosidase non-détectée par réaction enzymatique, ni par immunocytochimie. Réaction inflammatoire chez des cellules nerveuses infectées par ce virus.
Mise en évidence de l'activité du transgène $\beta$ -galactosidase de TgR(ROSA26)26Sor	Friedrich, G. et Soriano, P. 1991.	Leucocytes non-traumatisés par le transfert de gène. Détection par réaction enzymatique simple.	Pas d'activité de la $\beta$ -galactosidase dans les leucocytes de la souris transgénique TgR(ROSA26)26Sor (Figure 12).
Hybridation des séquences 145SC5 spécifiques au Chromosome Y	Grounds, M.D. et al., 1991; Harvey, A.R. et al. 1992; Nishioka, Y. 1988; Gorska-Flipot, I. et al. 1996.	Séquence répétée environ 200 fois permet haute intensité de réponses à l'hybridation sans radioactivité.	Marquage spécifique aux leucocytes mâles (Figure 15).

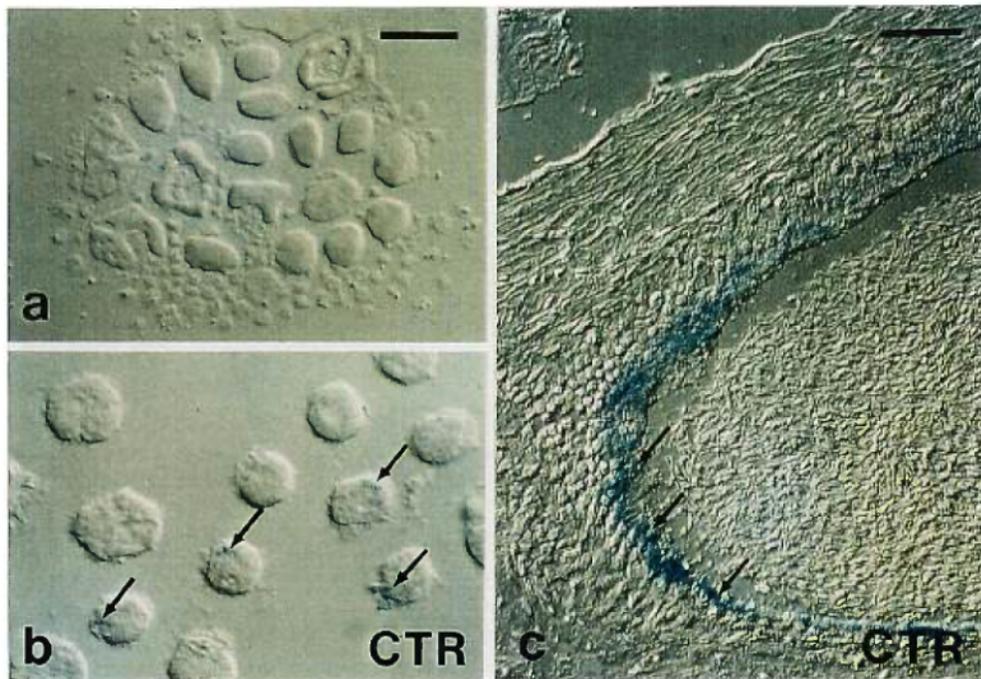


Figure 12: L'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase dans les cellules blanches sanguines isolées des souris transgéniques TgR(ROSA26)26Sor (Friedrich, G. et Soriano, P. 1991) (flèches) n'a pas été détectée (a). Les comparaisons à un contrôle positif cellulaire tel qu'une lignée de cellules embryonnaires (fournie par le Dr D. Lohnes, IRCM) dont 30 % d'entre elles expriment la  $\beta$ -galactosidase lorsque différenciées par l'acide rétinoïque (b) et à un contrôle positif tissulaire tel que l'épididyme de souris qui possède une activité  $\beta$ -galactosidasique endogène (Pearse, A.G.E. 1972.) (c) confirment la réaction négative en a. Les cellules (a, b) sont appliquées par *cytospin* et leur taille correspond à la barre en a. Barre (a) = 10  $\mu$ m. Barre (c) = 40  $\mu$ m.

Finalement, l'hybridation *in situ* d'une séquence répétée du chromosome Y marque de façon spécifique les leucocytes de souris mâles (Figure 15).

Les procédures testées, leurs avantages ainsi que leurs limites sont résumés brièvement (Tableau III). La technique de la mise en évidence du chromosome Y dans les leucocytes a les avantages d'être spécifique, de générer un marquage robuste et de pouvoir être conjuguée à d'autres techniques cytochimiques.

### **Marquage du chromosome Y**

Le marquage du chromosome Y est utile pour localiser les leucocytes infiltrants dans un modèle de co-incubation mâle/femelle; c'est-à-dire l'incubation de segments de nerfs femelles en présence de leucocytes mâles. La technique du marquage du chromosome Y par hybridation *in situ* a été mise au point pour marquer assez fortement les cellules mâles en laissant un bruit de fond minimal sur les cellules femelles afin d'identifier sans ambiguïté les cellules mâles.

L'ADNc 145SC5 reconnaît une séquence répétée plus de 200 fois sur le chromosome Y de différentes lignées de souris (Nishioka, Y. et al. 1993). Les analyses de buvardage à la Southern confirment la spécificité de la sonde 145SC5 pour l'ADN de souris mâles puisqu'elle s'hybride à des brins d'environ 1,5 kb de l'ADN génomique digéré aux sites EcoRI de deux lignées de souris mâles: BALB/C et C57BL6; sans reconnaître l'ADN génomique des souris femelles (Figure 13). La biotinylation de la sonde produit une quantité appréciable de sonde d'une taille de plus ou moins 100 pb tel que le montre la Figure 14. La technique a été optimisée sur des nerfs sciatiques et des leucocytes isolés de souris mâles versus femelles. Une concentration finale de 0,016 ng de sondes par  $\mu$ l permet de marquer fortement les noyaux cellulaires des tissus mâles tout en conservant un bruit de fond minimal sur les tissus femelles. Dans ces conditions optimales, l'hybridation *in situ* avec l'ADNc 145SC5 produit un marquage sous forme d'un gros point bleu foncé correspondant à l'emplacement du chromosome Y dans le noyau. La procédure laisse une teinte de fond bleuâtre sur tout le noyau mais, le cytoplasme des leucocytes isolés reste incolore

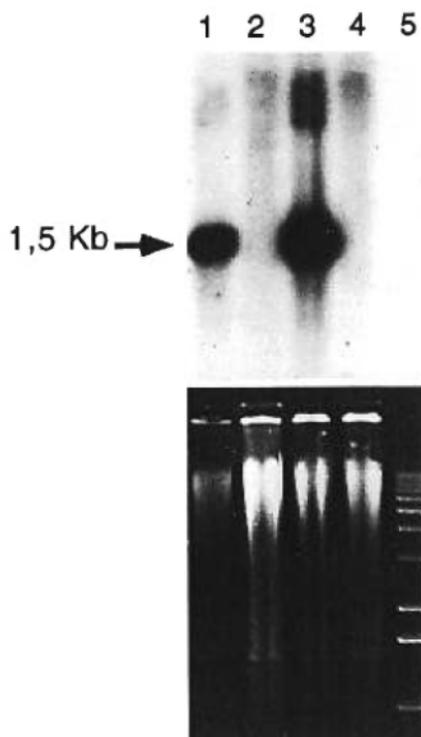


Figure 13: L'analyse par buvardage à la Southern (a) montre la spécificité de la séquence 145SC5 (Nishioka, Y. et al. 1993) pour l'ADN génomique mâle des espèces murins BALB/C (1) et C57BL6 (3) en reconnaissant des fragments de 1,5 kb de l'ADN digéré en EcoRI. L'ADN femelle de ces espèces (2, 4 respectivement) n'est pas marqué. Dix  $\mu\text{g}$  d'ADN génomique ont été déposés et colorés au bromure d'éthidium (b). Le marqueur de poids moléculaire 1 kb *DNA ladder* (5) a été retiré avant l'hybridation.

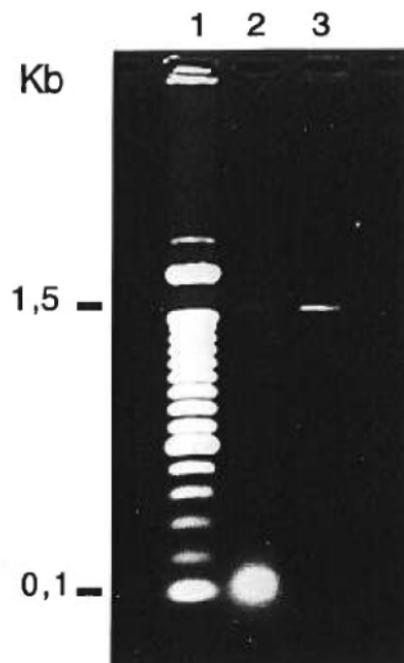


Figure 14: La biotinylation des séquences 145SC5 de 1,5 kb génère des fragments d'environ 100 pb (2) en comparaison au contrôle de la réaction sans enzyme (3) et au marqueur de poids moléculaire 100 pb *DNA ladder* (1). L'ADN est coloré au bromure d'éthidium.

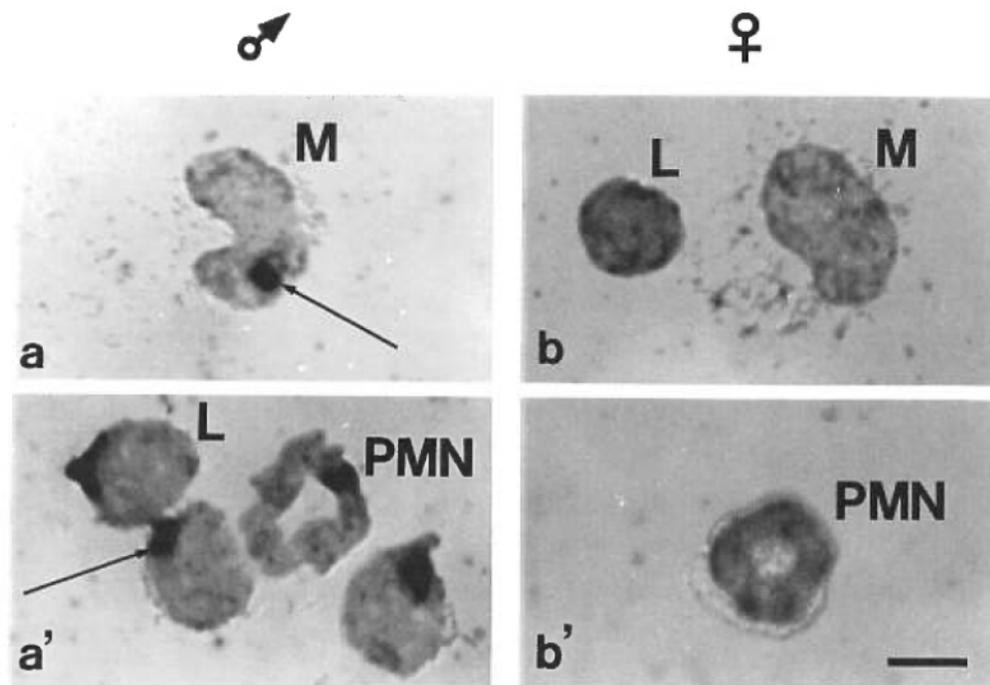


Figure 15: Marquage du chromosome Y par hybridation *in situ* des séquences 145SC5 biotinylées sur des cellules blanches sanguines, comprenant monocytes (M), lymphocytes (L) et polymorphonucléaires (PMN), isolées de souris CD-1 mâles (a, a') et femelles (b, b') appliquées sur lames microscopiques par *cytospin*. Le marquage spécifique du chromosome Y s'identifie par un point bleu foncé confiné dans le noyau (flèches). Barre = 5  $\mu$ m.

(Figure 15 a et a'). Une hybridation non-spécifique est tout de même présente sous la forme de minuscules points parsemés dans le noyau des cellules des deux sexes (Figure 15). Quant au marquage du chromosome Y dans le tissu du nerf, il est produit dans les noyaux des cellules qui composent le nerf sciatique mâle (Figure 16 a) et est absent chez son homologue femelle (Figure 16 b).

Le marquage du chromosome Y permet de distinguer les cellules mâles des cellules femelles.

### **Colocalisation de NGF et du chromosome Y, marqueur de cellules infiltrantes**

Dans le modèle de co-culture des segments de nerfs sciatiques femelles en présence de leucocytes mâles, le marquage du chromosome Y est utilisé pour cibler les leucocytes infiltrants dans le nerf. Sur la même coupe de nerf, l'immunocytochimie de NGF est jumelée à l'hybridation *in situ* du chromosome Y.

Le marquage en bleu foncé du chromosome Y se retrouve à l'intérieur du noyau et l'expression de NGF est révélée par la coloration brune dans le cytoplasme, ce qui permet d'observer simultanément ces deux colorations distinctes. Les contrôles positif (Figure 16 c) et négatifs (Figure 16 d et e) de l'immunocytochimie de NGF sur la glande sous-maxillaire de souris mâle confirment la spécificité de l'anticorps NGF.

---

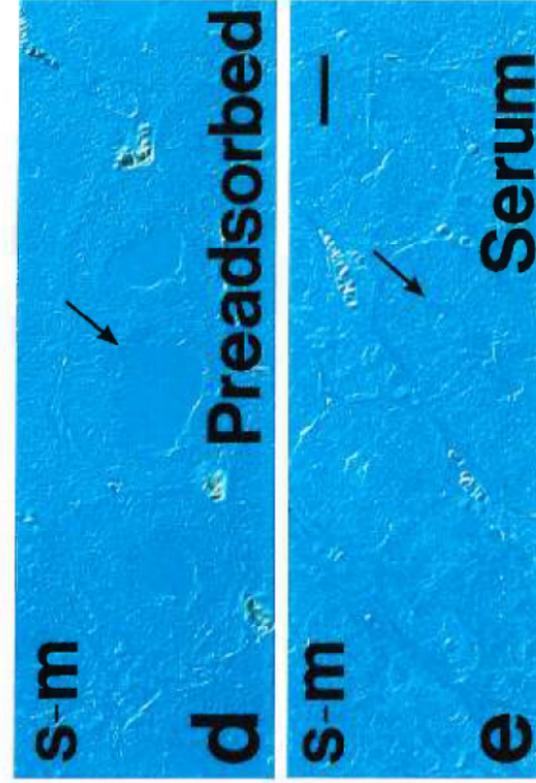
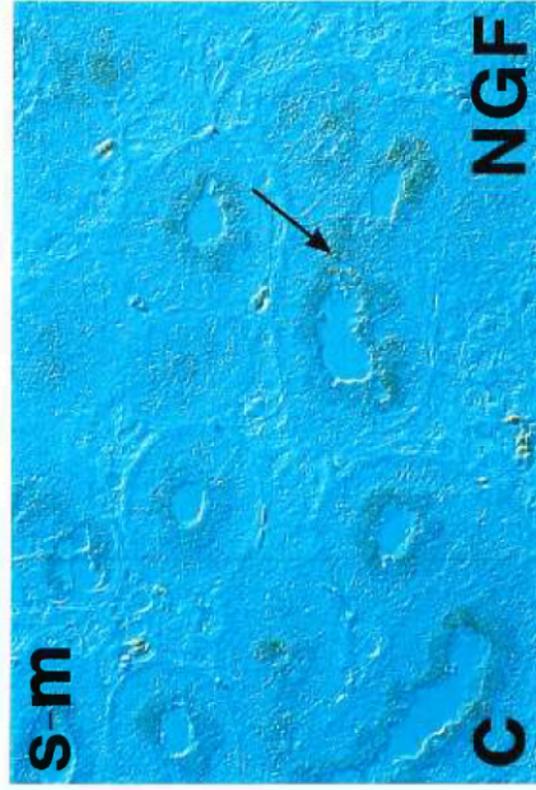
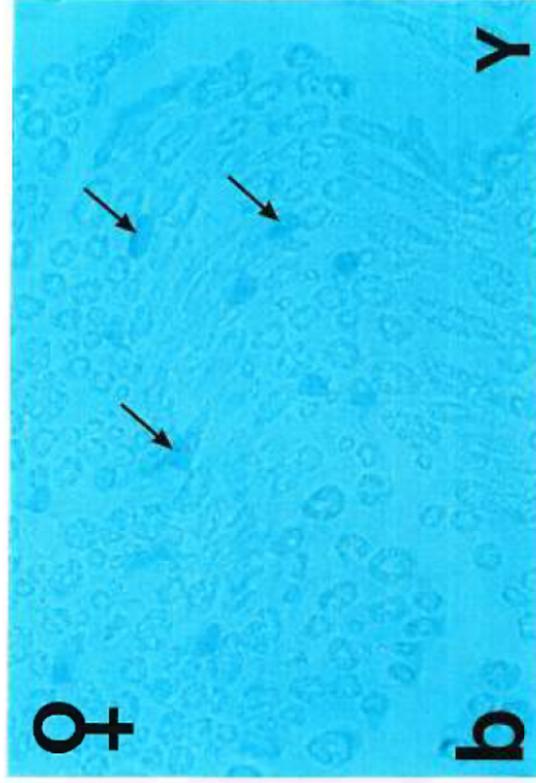
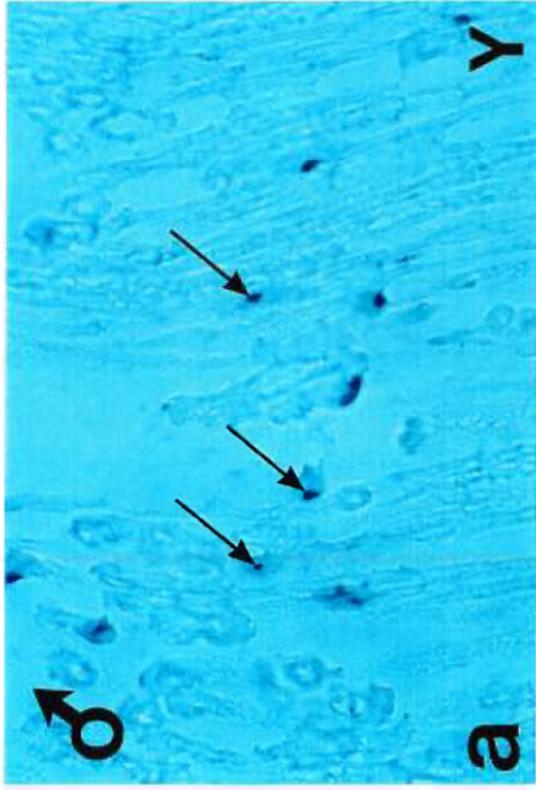
Figure 16: L'hybridation *in situ* du chromosome Y (a, b) montre le marquage spécifique (flèches longues) des noyaux des cellules de nerfs sciatiques mâles de souris (a) et le bruit de fond (flèches courtes) des noyaux des cellules de nerfs sciatiques femelles de souris (b). L'immunocytochimie de NGF dans la glande sous-maxillaire de souris mâle (c, d, e) montre la spécificité de la réaction pour la protéine NGF murine (c), la réaction contrôle de déplacement par la préadsorption de l'anticorps avec le peptide 1-20 N-terminal (d) et la réaction non-spécifique due au sérum de lapin normal (e). Les sites d'expression de NGF sont indiqués par les flèches. Barre = 25  $\mu$ m. [Voir page 44]

L'immunoréaction de NGF est détectée aux niveaux de cellules de l'épinèvre et du périnèvre, et rarement de l'endonèvre (Figure 17 c, e, f et g). Dans l'épinèvre et le périnèvre, le patron de NGF révélé par immunocytochimie se superpose au patron des ARNm de NGF obtenu par hybridation *in situ*. Plusieurs cellules positives à l'immunoréaction de NGF sont identifiées comme étant des macrophages selon des critères de morphologie et d'emplacement cellulaire. Le nombre de cellules où NGF est détecté, est au moins 3 fois supérieur dans les nerfs en co-incubation avec des leucocytes que dans ceux incubés seuls, répétant ainsi les résultats observés lors de la co-culture de tissus mâles uniquement.

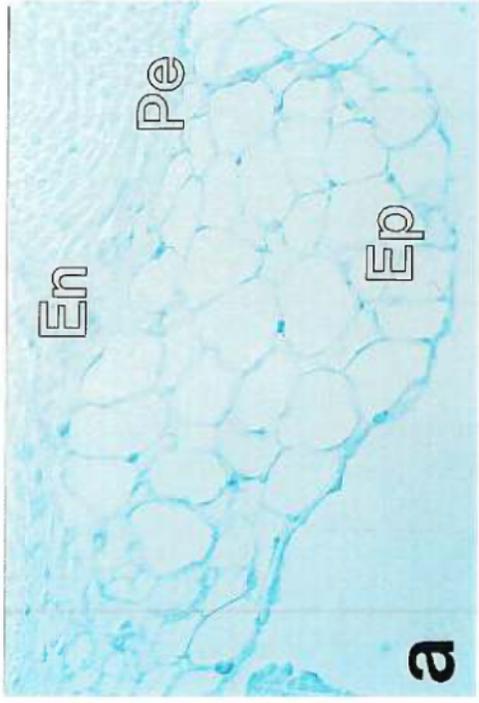
Le marquage du chromosome Y est retrouvé dans quelques cellules de l'épinèvre dans le segment de nerf sciatique femelle incubé en présence de leucocytes mâles (Figure 17 b, b', d, f et g); soit une à six cellules sont marquées par coupe de segment de nerf. Aucune cellule n'exhibe le marquage du chromosome Y dans le segment de nerf incubé seul (Figure 17 a et c). Les cellules marquées par l'hybridation *in situ* du chromosome Y sont dites infiltrantes. Dans les segments

---

Figure 17: Colocalisation de NGF et des leucocytes infiltrants identifiés par le marquage au chromosome Y. L'hybridation *in situ* du chromosome Y, marquée par la coloration bleue, a été effectuée sur des segments de nerfs sciatiques femelles incubés seuls (a) et incubés en présence de leucocytes mâles (b) selon les conditions d'incubation décrites dans Méthodes: Système *in vitro* de co-culture. Cette hybridation a aussi été effectuée après l'immunocytochimie de NGF, marquée par la coloration brune, dans les deux variantes d'incubation précédentes (c et d, e, f, g respectivement). La région d'infiltration est localisée dans l'épinèvre (Ep) des segments de nerfs (b), et non dans le périnèvre (Pe) et l'endonèvre(En). Le nombre total de cellules exprimant NGF est augmenté dans le segment de nerf incubé en présence de leucocytes (e, f, g) en comparaison à son incubation seul (c). L'immunoréaction de NGF est observée dans le cytoplasme de leucocytes infiltrants contenant le marquage spécifique du chromosome Y dans leur noyau (f, g). Des cellules contenant uniquement le marquage du chromosome Y (d) ou le marquage de NGF (e) sont observées. Les photos d, e, f, g ont été prises dans l'épinèvre. Barre en c = 25 µm pour les vues d'ensemble (a, b, c). Barre en g = 10 µm pour les vues agrandies (b', d, e, f, g). [Voir page 46]

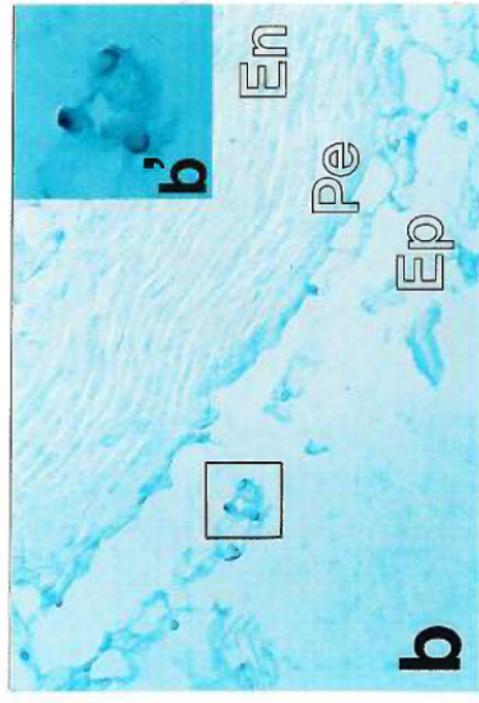


♀ SN

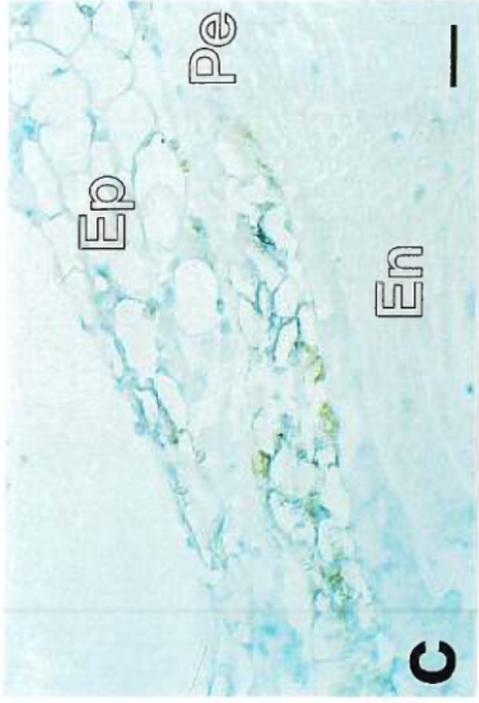


Y

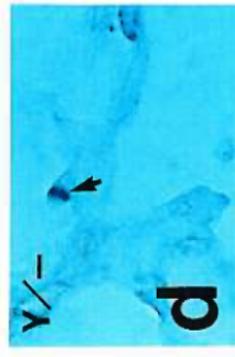
♀ SN + ♂ WBC



NGF/Y



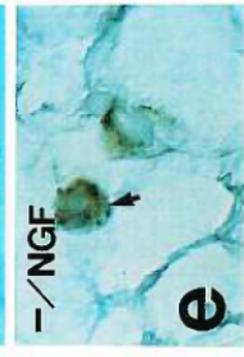
Y/-



Y/NGF



-/NGF



Y/NGF



de nerfs femelles incubés en présence de leucocytes mâles, environ un leucocyte infiltrant sur deux a réagi positivement à la détection de NGF par immunocytochimie. Ces leucocytes infiltrants positifs au marquage de NGF représentent 1/20 à 1/50 des cellules totales marquées par l'anticorps NGF (Figure 17 e). De façon individuelle, chacune des expériences d'immunocytochimie de NGF et d'hybridation *in situ* du chromosome Y ont été reproduites plus de trois fois chacune sur ces tissus (Fig. 17). Cependant, de façon juxtaposée, ces expériences ont été réalisées une seule fois et ce, sur plusieurs coupes pour chacune des conditions.

NGF a été colocalisé dans les leucocytes infiltrants. Même si le NGF détecté dans les leucocytes infiltrants n'est pas suffisant pour expliquer l'augmentation de NGF dans le segment de nerf incubé en présence de leucocytes, le contact des leucocytes par infiltration de l'épinèvre du segment de nerf stimule les cellules résidentes à exprimer NGF.

## DISCUSSION

Le principal résultat obtenu dans ces travaux est la colocalisation de NGF dans les leucocytes ayant infiltré le nerf sciatique *in vitro*. Cette observation suggère que le système immunitaire participe aux processus de régénérescence du système nerveux périphérique comme porteur de NGF. Le système de co-culture ne permet pas de déterminer jusqu'à quel point ce rôle des leucocytes infiltrants est important pour supporter les processus de régénérescence des tissus nerveux périphériques. Cependant, les résultats permettent de leur attribuer un nouveau rôle dans les nerfs périphériques lésés. Le but ultime de ces travaux est de déterminer l'origine des leucocytes porteurs de NGF à savoir s'ils proviennent des cellules résidentes du nerf ou des leucocytes de la circulation sanguine ayant infiltrés le nerf. Toute l'hypothèse de recherche a été abordée par le modèle *in vitro* de co-culture des segments de nerfs sciatiques et de leucocytes.

### **Population de leucocytes isolés**

La technique choisie pour récupérer les cellules blanches de la circulation sanguine permet d'isoler rapidement tous les types leucocytaires. Ceci rend possible la communication moléculaire entre les éléments du système immunitaire telle qu'effectuée *in vivo* lors des processus de réponses aux lésions; comme par exemple la sécrétion des cytokines: interleukine (IL) 4, IL-10 et interféron (IFN)- $\gamma$  par les lymphocytes influencent l'état d'activation des macrophages (Griffin. J.W. et al. 1993; Lopez, M. et al. 1993). Des types leucocytaires isolés, les monocytes et les neutrophiles sont surreprésentés par rapport à leurs proportions dans le sang et sont reconnus pour leur capacité à infiltrer les tissus. Les tests de viabilité confirment que la technique d'isolation n'est pas dommageable pour les leucocytes et que ceux-ci peuvent demeurer en culture dans les conditions d'incubation choisies pendant plusieurs jours soit bien au-delà de la durée des expériences de co-culture.

### **Activité de la myéloperoxidase**

La mise en évidence de l'activité de la myéloperoxidase s'avère rapide et pratique pour sélectionner les conditions optimales de co-culture. L'activité de la myéloperoxidase n'est détectée que dans les PMN (Berliner, N. et al. 1995) et non dans les monocytes isolés du sang (résultats observés au laboratoire). Cependant, elle est détectable dans les macrophages faisant de la phagocytose (Shellito, J. et al. 1987; Perry, V.H. et al. 1987). Dans les nerfs en co-culture, la myéloperoxidase est associée à des cellules identifiées morphologiquement comme étant des macrophages mais, il n'est pas démontré si ces macrophages proviennent de l'infiltration des monocytes ou représentent des macrophages résidents. Donc, l'activité de la myéloperoxidase n'est pas nécessairement associée aux leucocytes infiltrants. Quoiqu'il en soit, le nombre de cellules exprimant l'activité de la myéloperoxidase augmentent lorsque le segment de nerf est incubé en présence de leucocytes en comparaison à son incubation seul (Tableau II). La myéloperoxidase a donc été utilisée comme indicateur de l'activation de divers phénomènes survenant dans le nerf lors de son incubation dans différentes conditions. Sur cette base, deux paramètres expérimentaux ont été déterminés: (i) la durée des expériences de co-culture a été établie à 4 heures et (ii) le type de support de culture utilisé est de type adhérent (polystyrène) et non, non-adhérent (Teflon™).

### **Analyses de buvardage à la Northern de NGF**

Les analyses à la Northern ont été normalisés par la quantification des ARN ribosomiaux colorés au bleu de méthylène. L'intensité de la coloration au bleu de méthylène par rapport à la quantité d'acides nucléiques n'est linéaire que pour un certain intervalle, et se sature rapidement. Par conséquent, l'ajustement des intensités d'hybridation par la quantification des ARN déposés est plus ou moins juste mais, n'en demeure pas moins très significative. Il a été tenté de quantifier les réponses de l'hybridation des ARNm de NGF par l'hybridation d'ARN constitutifs tels que les ARN ribosomiaux S18 mais, les résultats obtenus étaient aberrants dans certaines conditions où les cellules blanches sanguines sont en culture ou en co-culture. Dans ces situations, l'hybridation aux ARN

S18 est anormalement élevée et non-représentative de la quantité réelle des ARN totaux. La quantification des ARN totaux par l'hybridation à d'autres ARN constitutifs sont à envisager comme par exemple ceux de la  $\beta$ -actine.

Les analyses de buvardage à la Northern ont montré que, dans les conditions de co-culture établies par la mise en évidence de la myéloperoxidase, la présence des leucocytes dans le milieu d'incubation provoque une hausse prononcée du niveau d'expression des ARNm de NGF par les segments de nerfs. Le contact physique entre les leucocytes et les segments de nerfs sciatiques est nécessaire à cette surexpression puisque le milieu d'incubation des leucocytes incubés seuls ne provoque pas une expression semblable. En admettant que les leucocytes agissent différemment en présence du nerf qu'en leur absence, les leucocytes ont été incubés avec des nerfs enveloppés d'une membrane à dialyse restreignant le passage des protéines globulaires de 12-14 kDa et plus. Dans cette condition, les segments de nerfs ne surexpriment pas NGF ce qui confirme l'importance du contact physique. Ces observations suggèrent la possibilité que les leucocytes infiltrent les segments de nerf sciatiques et soient responsables de l'augmentation du niveau d'expression de NGF dans le nerf. Sans la localisation des ARNm de NGF, cette augmentation peut être attribuée à l'expression de NGF par les leucocytes eux-mêmes et/ou par les cellules résidentes stimulées par les leucocytes infiltrants via des molécules intermédiaires. Diverses molécules peuvent être susceptibles de stimuler cette expression comme IL-1, IL-6, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), et *transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta_1$ ) qui sont des inducteurs potentiels de la synthèse de NGF dans les tissus périphériques (Lindholm, D. et al. 1987; Steiner, P. et al. 1991; Hattori, A. et al. 1993).

---

### **Analyses de buvardage à la Northern de la furine**

La furine est une des convertases candidates pour la maturation du pro-NGF *in vivo* dans le système nerveux périphérique. La régulation de la furine suit une dynamique semblable à celle de NGF dans le nerf en culture. Mais, ces données

ne permettent pas de conclure sur l'implication de la furine dans la production de NGF actif.

### **Hybridation *in situ* de NGF**

Dans les segments de nerfs sciatiques en co-culture avec des leucocytes, la localisation de NGF par hybridation *in situ* révèle que des cellules de l'endonèvre semblables à des cellules de Schwann expriment NGF. Ceci corrobore avec les études publiées montrant l'apport de NGF par les cellules de Schwann dans la dégénérescence Wallérienne des nerfs périphériques *in vivo* (Heumann, R. et al. 1987b; Lindholm, D. et al. 1987). De plus, la majorité de l'hybridation se situe dans le périnèvre et l'épinèvre où les monocytes/macrophages et les PMN sont présents en grande concentration dans les segments de nerfs *in vitro* tout comme dans les nerfs lésés *in vivo* (Figure 1). Les macrophages sont porteurs de NGF dans le nerf sciatique lésé *in vivo* (Marcinkiewicz, M. et al. 1997 soumis). Les monocytes/macrophages et les PMN sont deux candidats potentiels pour le rôle de porteur de NGF dans le périnèvre et le périnèvre du nerf en co-culture. Mais, il reste à démontrer que ces porteurs de NGF proviennent des leucocytes mis en co-culture.

### **Immunocytochimie de NGF**

NGF a aussi été localisé par immunocytochimie dans les segments de nerfs en culture. Le patron de NGF révélé par immunocytochimie se superpose au patron des ARNm de NGF obtenu par hybridation *in situ* dans le périnèvre et l'épinèvre des segments de nerfs sciatiques incubés en présence de cellules blanches sanguines. Le fait que les ARNm de NGF se superposent aux protéines de NGF permet d'assumer que le NGF détecté dans les cellules a été synthétisé par ces cellules.

Dans l'endonèvre des segments de nerfs incubés en présence de leucocytes, NGF n'est pas détecté par l'anticorps. La qualité de l'anticorps n'est pas remise en question puisque les immunoréactions contrôles positives et négatives sont concluantes. L'amélioration de l'immunoréaction dans l'endonèvre pourrait être

possible en rendant l'antigène plus accessible par une technique nommée *Antigen Retrieval* basée principalement sur l'effet du chauffage et du pH (Shi, S.-R. et al. 1997). L'accessibilité de l'antigène NGF dans l'endonèvre peut être différente de celle dans les régions du périnèvre et de l'épinèvre où l'accessibilité de NGF semble être suffisante pour sa détection par immunocytochimie. C'est particulièrement dans les régions du périnèvre et de l'épinèvre qu'il est le plus probable de rencontrer des leucocytes ayant infiltrés le nerf *in vitro*.

En comparaison à l'hybridation *in situ* ARN-ARN, l'immunocytochimie est techniquement plus facile à conjuguer à des méthodes cytochimiques telles que l'enzymologie, l'immunocytochimie elle-même ou l'hybridation *in situ* ADN-ADN. Étant donné que le but de ces travaux est de colocaliser NGF et les marqueurs de cellules infiltrantes, l'immunocytochimie a été préférée comme technique pour détecter le NGF lors de la colocalisation.

#### **Marquage des leucocytes infiltrants**

La localisation de l'infiltration leucocytaire a été envisagée par différentes techniques de marquage (Tableau III).

Rappelons que l'activité de la myéloperoxidase, utilisée comme réaction signalitique de l'infiltration, n'est pas spécifique aux leucocytes infiltrants car les macrophages résidents en phagocytose peuvent l'exprimer (Shellito, J. et al. 1987). La révélation de l'activité de la myéloperoxidase ne peut être utilisée pour le marquage de l'infiltration bien que sa variation semble indiquer des situations de stimulations du nerf.

La transfection par lipofection aurait permis de mieux suivre les leucocytes infiltrants en plus de pouvoir agir sur leurs expressions moléculaires. Mais, le fait que cette technique engendre un taux de transformation des cellules relativement bas a orienté les travaux vers une technique de transfert de gènes plus efficace; l'infection.

Le virus utilisé pour l'infection des leucocytes isolés est un adénovirus contenant le gène *reporter* LacZ. La  $\beta$ -galactosidase n'a pas été détectée dans les leucocytes infectés ni son activité enzymatique, ni son immunoréaction. La cause peut être multiple; soit que le promoteur ne soit pas approprié pour les leucocytes tout en étant fonctionnel dans les cellules nerveuses (Cayouette, M. et Gravel, C. 1996); soit que les leucocytes n'aient pas exprimé assez de protéines pour atteindre le seuil de détectabilité; soit que l'infection n'a pas eu lieu. Pour savoir si l'infection a eu lieu, il aurait été possible de retracer les protéines virales par des analyses de buvardage à la Western. Au-delà de ces vérifications, il a été observé sur des cellules musculaires que l'infection par un adénovirus très semblable à celui utilisé sur les leucocytes, génère une réaction inflammatoire (Guerette, B. et al. 1996). Les effets secondaires des techniques de transfert de gènes ont mené les recherches de marquage de l'infiltration cellulaire vers la mise en évidence de marqueurs endogènes.

L'utilisation de leucocytes isolés de souris transgéniques était possible par la commercialisation de la lignée de souris TgR(ROSA26)26Sor (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) contenant la  $\beta$ -galactosidase pouvant être visualisée par la coloration X-gal. La description de cette lignée mentionne que LacZ est exprimé dans tous les tissus à l'état embryonnaire et dans la plupart des tissus à l'état adulte incluant les cellules T et B. Les résultats obtenus à partir de ces souris sont contradictoires avec la description puisque la  $\beta$ -galactosidase n'est pas détectable dans les leucocytes isolés (contenant 55 % de lymphocytes voir Tableau I) par la coloration X-gal, alors qu'elle donne des résultats positifs sur deux types de tissus considérés comme contrôles positifs (Figure 12). Bien que d'autres tissus de ces souris expriment LacZ, l'activité de la  $\beta$ -galactosidase demeure indétectable dans les leucocytes isolés. Pour cette raison, ces souris ne sont pas utiles dans le cadre de nos études.

Par la suite, un autre marqueur endogène a été envisagé soit le chromosome Y de leucocytes de souris mâles dans un modèle de co-culture mâle/femelle. La sonde utilisée reconnaît la séquence 145SC5, spécifique au chromosome Y murin

(Nishioka, Y. 1988). Cette séquence a été utilisée pour suivre la transplantation de cellules musculaires et de cellules gliales en utilisant des sondes marquées à la digoxigénine révélées par un anticorps anti-digoxigénine et la phosphatase alcaline (Grounds, M.D. et al. 1991; Harvey, A.R. et al. 1992). La méthode qui a été préconisée est celle utilisée par l'Hôtel-Dieu de Montréal pour détecter le virus du papillome humain (HPV) dans l'évaluation des lésions précancéreuses du col utérin et qui emploie des sondes biotinylées révélées par la streptavidine et la phosphatase alcaline (Gorska-Flipot, I. et al. 1996). Cette méthode d'hybridation *in situ* a été semi-automatisée et se réalise en une journée de travail, alors qu'au moins deux jours sont nécessaires au groupe australien (Grounds, M.D. et al. 1991). Divers paramètres ont été ajustés pour mettre au point la technique de marquage du chromosome Y sur le nerf sciatique et les leucocytes isolés avec les sondes biotinylées tout en minimisant le bruit de fond des tissus femelles. Le marquage ainsi obtenu est bien identifiable, robuste et confiné dans le noyau, ce qui permet sa conjugaison à d'autres marquages cytochimiques. Cet aspect est primordial pour nos études et ne semble pas s'appliquer au marquage de la sonde à la digoxigénine qui recouvre presque toute la cellule, chez les cellules gliales en culture du moins (Harvey, A.R. et al. 1992).

### **Colocalisation de NGF et des leucocytes infiltrants**

La mise en évidence du chromosome Y rend possible le double marquage de l'infiltration cellulaire et de NGF (Figure 17). L'infiltration observée se situe seulement au niveau de l'épinèvre des segments de nerfs incubés en présence de leucocytes. Parmi ces leucocytes infiltrants, certains expriment NGF et d'autres non. Le nombre de leucocytes infiltrants exprimant NGF est tout à fait insuffisant pour expliquer l'augmentation d'ARNm de NGF observée dans les nerfs co-incubés par comparaison aux nerfs incubés seuls (Figure 6). L'infiltration des leucocytes dans le segment de nerf a pour effet de stimuler d'autres cellules résidentes à exprimer NGF. Chez les monocytes et les PMN en situation d'infiltration des tissus lésés, plusieurs mécanismes sont activés (Cioffi, W.G. et al. 1993; Lennon V.A. 1994; Otten, U. et al. 1994). Mais, les molécules

exactes intervenant dans la communication entre le système immunitaire et le système nerveux périphérique ne sont pas totalement connues. L'activation de cette communication par l'infiltration des leucocytes dans le nerf stimule l'expression de NGF par celui-ci.

### **Perspectives**

L'application *in vivo* du marquage de l'infiltration leucocytaire dans le nerf sciatique lésé revêt un grand intérêt. La réalisation d'un modèle *in vivo* mâle/femelle pourraient être envisagée par la transfusion sanguine, ou par l'injection dans l'artère fémorale de leucocytes isolés ou d'un type leucocytaire déterminé, comme par exemple les monocytes, et ce, chez une souris hôte femelle à partir du sang de son homologue mâle d'une lignée consanguine. Afin de favoriser les leucocytes mâles dans leur compétition avec les leucocytes femelles de l'hôte, la souris femelle pourrait être préalablement irradiée ou être *knock out* pour le gène de la sélectine L (Arbones, M.L. et al. 1994). La technique de marquage du chromosome Y peut s'appliquer aussi à des études de l'inflammation, de transplantation et de l'embryologie par des modèles de chimères.

## CONCLUSION

Deux importants aspects sont à retenir de ce travail: l'aspect scientifique et l'aspect technique. Les résultats scientifiques démontrent la capacité de cellules blanches sanguines à exprimer NGF en situation d'infiltration du nerf sciatique en culture. La technique de marquage du chromosome Y est spécifique et se conjugue à des analyses cytochimiques. Cette technique de marquage de l'infiltration cellulaire peut être utilisée dans un modèle *in vivo* et appliquée à d'autres sujets de recherche.

Ce travail a permis de mettre au point une technique de co-culture des cellules blanches sanguines et de nerfs sciatiques de souris où un certain niveau de cellules blanches infiltrent le nerf. Une technique de marquage de ces cellules infiltrantes a été développée. Dans ce système *in vitro*, l'augmentation du niveau d'expression de NGF dans le nerf incubé en présence de leucocytes par rapport aux contrôles sans leucocytes, a été observé par buvardage à la Northern, par hybridation *in situ* et par immunocytochimie. Bien que les cellules blanches infiltrant le nerf expriment NGF, ces expériences *in vitro* démontrent que le principal apport de NGF provient des cellules intrinsèques du nerf, et également, que cet apport de NGF par les cellules du nerf est induit par l'infiltration des cellules blanches.

Grâce à ce travail, on peut arriver à une meilleure compréhension des mécanismes de régénérescence et de dégénérescence, et construire l'hypothèse suivante. *In vivo*, les leucocytes, qui sont connus pour infiltrer rapidement le nerf après la lésion, pourraient jouer un rôle important en fournissant NGF à court terme, alors que à long terme, l'apport de NGF provient des cellules du nerf et principalement des cellules de Schwann nouvellement formées. À court terme, les cellules de la partie distale dégèrent (dégénérescence Wallérienne) et sont remplacées par des cellules de Schwann en prolifération qui adoptent une conformation propice à l'accroissement de l'axone proximal et, également, qui fournissent les neurotrophines nécessaires à la stimulation de cet accroissement. À court terme, la

présence des cellules blanches infiltrantes fournissant NGF tout juste en amont de la partie proximale, viendrait alors sécuriser l'axone en attente pendant la dégénérescence Wallérienne. Donc, les monocytes et/ou les PMN seraient les premiers à soutenir la régénérescence du nerf, et en conséquence, viendraient conditionner la croissance neuronale après lésion.

L'application *in vivo* de la technique de marquage des leucocytes infiltrants pourrait permettre de conclure davantage sur cette hypothèse.

---

## RÉFÉRENCES

- Aida**, Y. et Pabst, M.J. Neutrophil responses to lipopolysaccharide. Effect of adherence on triggering and priming of the respiratory burst. *J. Immunol.* 146 (1991) 1271-1276.
- Alam**, J. et Cook, J.L. Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188 (1990) 245-254.
- Albers**, K.M., Wright, D.E. et Davis, B.M. Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 14 (1994) 1422-1432.
- Arbones**, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J. et Tedder, T.F. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1 (1994) 247-260.
- Baichwal**, R.R., Bigbee, J.W. et DeVries, G.H. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 85 (1988) 1701-1705.
- Berliner**, N., Hsing, A., Graubert, T., Sigurdsson, F., Zain, M., Bruno, E. et Hoffman, R. Granulocyte colony-stimulating factor induction of normal human bone marrow progenitors results in neutrophil-specific gene expression. *Blood* 85 (1995) 799-803.
- Beuche**, W. et Friede, R.L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.* 13 (1984) 767-796.
- Boyle**, J.S et Lew, A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *TIG* 11 (1995) 8.
- Bresnahan**, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.J., Brake, A.J., Barr, P.J. et Thomas, G. Human fur gene encodes a yeast Kex2-like endoprotease that cleaves pro-b-NGF *in vivo*. *J. Cell Biol.* 111 (1990) 2851-2859.
- Cayouette**, M. et Gravel, C. Adenovirus-mediated gene transfer to retinal ganglion cells. *Invest. Ophth. & Visual Sc.* 37 (1996) 2022-2028.

**Cioffi**, W.G. Burlison, D.G. et Pruitt, B.A. Leukocyte responses to injury. *Arch. Surg.* 128 (1993) 1260-1267.

**Claude**, P., Hawrot, E., Dunis, D.A. et Campenot, B.B. Binding, internalization, and retrograde transport of  $^{125}\text{I}$ -nerve growth factor in cultured rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 2 (1982) 431-442.

**Couse**, J.F., Davis, V.L., Tally, W.C. et Korach, K.S. An improved method of genomic DNA extraction for screening transgenic mice. *BioTechniques* 17 (1994) 1030-1032.

**Fawcett**, J.W. et Keynes, R.J. Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13 (1990) 43-60.

**Felgner**, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. et Danielsen, M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7413-7417.

**Felgner**, P.L. et Rhodes, G. Gene therapeutics. *Nature* 349 (1991) 351-352.

**Friedrich**, G. et Soriano, P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & Dev.* 5 (1991) 1513-1523.

**Gorska-Flipot**, I., Nolet, S., Boivin, Y., Lambert, B. et Gaboury, L. Approche moléculaire du diagnostic des lésions précancéreuses du col utérin. *Ann. Biochim. Clin. Qué.* 35 (1996) 66-70.

**Griffin**, J.W. George, R. et Ho, T. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.* 52 (1993) 553-560.

**Grounds**, M.D., Lai, M.C., Fan, Y., Codling, J.C. et Beilharz, M.W. Transplantation in the mouse model: the use of a Y-chromosome-specific DNA clone to identify donor cells *in situ*. *Transplantation*, 52 (1991) 1101-1105.

**Guerette**, B., Vilquin, J.T., Gingras, M., Gravel, C., Woods, K.J. et Tremblay, J.P. Prevention of immune reactions triggered by first-generation adenoviral vectors

by monoclonal antibodies and CTLA4Ig. *Human Gene Therapy* 7 (1996) 1455-1463.

**Haddada, H., Lopez, M., Martinache, C., Ragot, T., Abina, M.A. et Perricaudet, M.** Efficient adenovirus- mediated gene transfer into human blood monocyte-derived macrophages. *Biochem and Biophys. Res. Comm.* 195 (1993) 1174-1183.

**Harvey, A.R., Fan, Y., Beilharz, M.W et Grounds, M.D.** Survival and migration of transplanted male glia in adult female mouse brains monitored by a Y-chromosome-specific probe. *Mol. Brain Res.* 12 (1992) 339-343.

**Hattori, A., Tanaka, E., Murase, K., Ishida, N., Chatani, Y., Tsujimoto, M., Hayashi, K. et Khon, M.** Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2577-2582.

**Heumann, R., Lindholm, D., Bandtlow, C., Meyer, M., Radeke, M.J., Misko, T.P., Shooter, E.M. et Thoenen, H.** Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: Role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987a) 8735-8739.

**Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C. et Thoenen, H.** Changes of nerve growth factor synthesis in neuronal cell in response to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.* 104 (1987b) 1623-1631.

**Johnson, E.M., Tanuichi, M. et DiStefano, P.S.** Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.* 11 (1988) 299-304.

**Lennon, V.A.** Cross-talk between nervous and immune systems in response to injury. *Prog. Brain Res.* 103 (1994) 289-292.

**Levi-Montalcini, R.** The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237 (1987) 1154-1162.

**Lindholm, D., Heumann, R. et Thoenen, H.** Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature (Lond.)* 330 (1987) 658-659.

**Lindholm, D., Heumann, R., Hengerer, B. et Thoenen, H.** Interleukin-1 increases stability and transcription of mRNA encoding nerve growth factor in cultured rat fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 16348-16351.

**Liu, H.M., Lei, H.Y. et Kao, K.-P.** Correlation between NGF levels in wound chamber fluid and cytological localization of NGF and NGF receptor in axotomized rat sciatic nerve. *Exp. Neurol.* 132 (1995) 24-32.

**Lopez, M., Martinache, C., Canepa, S., Chokri, M., Scotto, F. et Bartholeyns, J.** Autologous lymphocytes prevent the death of monocytes in culture and promote, as do GM-CSF, IL-3 and M-CSF, their differentiation into macrophages. *J. Immunol. Methods* 159 (1993) 29-38.

**Mallat, M., Houlgatte, R., Brachet, P. et Prochiantz, A.** Lipopolysaccharides-stimulated rat brain macrophages release NGF *in vitro*. *Dev. Biol.* 133 (1989) 309-311.

**Marcinkiewicz, M., Seidah, N.G. et Chrétien, M.** Les convertases des prohormones et le système nerveux. *Médecine/Sciences* 9 (1993) 553-561.

**Marcinkiewicz, M., Marcinkiewicz, J., Chen, A., Leclaire, F., Chrétien, M. et Richardson, P.** NGF in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: presence in macrophages and other cells; colocalization with proprotein convertases furin and PC7. *J. Compar. Neurol.* (1997) soumis.

**Melby, E.C. et Altman, N.H.** *CRC Handbook of laboratory animal science.* CRC Press, Cleveland, Vol. III, 1974.

**Meyer, M., Matsuoka, I., Wetmore, C., Olson, L. et Thoenen, H.** Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: Different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J. Cell Biol.* 119 (1992) 45-54.

**Ming**, Y.Z., Xue, D., Gomez-Sanchez, E.P. et Gomez-Sanchez, C.E. Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Biotechniques* 16 (1994) 58-59.

**de la Motte**, D.J., Hall, S.M. et Allt, G. A study of the perineurium in peripheral nerve pathology. *Acta neuropathol.* 33 (1975) 257-270.

**Nishioka**, Y. Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology.* 38 (1988) 181-185.

**Nishioka**, Y., Dolan, B.M., Prado, V.F., Zahed, L. et Tyson, H. Comparison of mouse Y-chromosomal repetitive sequences isolated from *Mus musculus*, *M. spicilegus*, and *M. spretus*. *Cytogenet Cell Genet* 64 (1993) 54-58.

**Otten**, U., Weskamp, G., Hardung, M. et Meyer, D.K. Synthesis and release of nerve growth factor by rat macrophages. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13 (1987) 184.

**Otten**, U., Scully, J.L., Ehrhard, P.B. et Gadiant, R.A. Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog. Brain Res.* 103 (1994) 293-305.

**Reed**, J.A., Manahan, L.J., Park, C.-S., et Brigati, D.J. Complete one-hour immunocytochemistry based on capillary action. *Biotechniques* 13 (1992) 434-443.

**Pearse**, A.G.E. *Histochemistry: theoretical and applied*. Troisième Édition, Churchill Livingstone, Edinburgh et London, Vol. II, pp. 822-823, 1972.

**Perry**, V.H., Brown, M.C. et Gordon, S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.* 165 (1987) 1218-1223.

**Seidah**, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M. et Chrétien, M. Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. End.* 5 (1991) 111-122.

**Seidah**, N.G., Day, R. et Chrétien, M. The family of pro-hormone and pro-protein convertases. *Review. Biochem. Soc. Trans.* 21 (1993) 685-691.

**Seidah**, N.G. dans *Intramolecular Chaperones and Protein Folding*. Shinde, U. and Inouye, M., Eds., R.G. Landes Cie, Austin, TX, pp. 181-203, 1995.

**Seidah**, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, D., Goulet, B., Laliberté, J., Lazure, C., Chrétien, M. et Murphy, R.A. Cellular processing of nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* 314 (1996) 951-960.

**Shellito**, J., Sniezek, M. et Warnock, M. Acquisition of peroxidase activity by rat alveolar macrophages during pulmonary inflammation. *Am. J. Pathol.* 129 (1987) 567-577.

**Shi**, S.-R., Cote, R.J. et Taylor, C.R. Antigen retrieval immunocytochemistry: past, present, and future. *J. Histochem. & Cytochem.* 45 (1997) 327-343.

**Steiner**, P., Pfeilschifter, J., Boeckh, C., Radeke, H. et Otten, U. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  synergistically stimulate nerve growth factor synthesis in rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 261 (1991) F792-798.

**Steiner**, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S. et Chan, S.J. The new enzymology of precursor processing endoproteases. Review. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23435-23438.

**Stoll**, G., Griffin, J.W., Li, C.Y. et Trapp, B.D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* 18 (1989) 671-683.

**Tanuichi**, M., Clark, H.B., Schweitzer, J.B. et Johnson, E.M. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J. Neurosci.* 8 (1988) 664-681.

**Unger**, E.R. et Brigati, D.J. Colorimetric *in situ* hybridization in clinical virology: development of automated technology. *Current Topics in Microbiol. & Immunol.* 143 (1989) 21-31.

**Vogelstein**, B. et Gillespie, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 615-619.

**Yashuda, T., Sobue, G., Mokuno, K., Kreider, B. et Pleasure, D.** Cultured rat Schwann cells express low affinity receptors for nerve growth factor. *Brain Res.* 436 (1987) 113-119.

---

## REMERCIEMENTS

Je remercie

pour leur générosité,

leurs conseils judicieux et

leurs encouragements

Tous les gens avec qui j'ai travaillé et plus particulièrement à

Andrew Chen

Jadwiga Marcinkiewicz

Dr Isabella Gorska-Flipot

Dr Claude Gravel

et bien sûr, Dr Mieczyslaw Martin Marcinkiewicz

Des gens qui m'ont fourni des ressources techniques importantes

Dr Paul Jolicoeur

Dr David Lohnes

Dr Y. Nishioka

Le Réseau de Neurosciences du Canada pour m'avoir accordé  
une bourse tout au long de ma maîtrise

Sans oublier, les collègues et amis sans qui rien de tout ça n'aurait  
été possible

Juliette Lusson

Étienne Decroly

Dany Gauthier

Alain Boudreau

... et j'en passe.