

## Mise au point du marquage immunohistochimique du Fluororuby®, traceur des voies neuronales efférentes, chez la brebis

Mélody MORISSE, Maryse MEURISSE, Elodie CHAILLOU



Mélody MORISSE

*Unité Mixte de Recherche Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRAE Val de Loire, Université de Tours, CNRS, IFCE*

*melody.morisse@inrae.fr*

Arrivée à l'INRA en septembre 2014, dans l'équipe Neuroéthologie & Développement des Comportements Socio-émotionnels (NDCS), j'y ai d'abord réalisé mon stage de Licence Professionnelle Biologie Analytique et Expérimentale (IUT de Tours) par apprentissage en alternance pour étudier l'organisation des circuits neuronaux en lien avec le comportement des animaux. Après mon apprentissage, j'ai réussi le concours de technicienne de recherche dans le cadre des campagnes handicap en 2016, mon premier défi ayant été la création d'un gant jetable adapté à l'anatomie de ma main pour poursuivre mes missions dans mon équipe. Titularisée en 2017, je partage mon activité entre histologie au laboratoire et analyses d'images. Dans le cadre de l'histologie, j'adapte, j'améliore et je mets au point différents protocoles d'immunohistochimie et de colorations. Les tâches relatives à l'analyse d'images concernent à la fois l'imagerie cellulaire pour étudier la distribution de marquages neuronaux et l'imagerie par résonance magnétique pour étudier l'anatomie des encéphales (agneaux, brebis, caillies...). Sensible au bien être animal, je rejoins le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val-de-Loire n°19 en 2016 dans lequel ma mission vise à évaluer les demandes d'autorisation à expérimenter. Soucieuse de partager mes connaissances, je participe à différentes actions de médiation scientifique dans le cadre de la semaine du cerveau, de formations et d'accueils d'étudiants.

	<p>Maryse MEURISSE,</p> <p>Ingénieur d'études, j'ai intégré l'équipe NDCS de l'Inrae Centre Val de Loire en 1993. Ma mission est de caractériser, principalement chez la brebis, le réseau neuronal impliqué dans différentes situations comportementales (relations sociales, apprentissage, émotions), en analysant par imagerie cellulaire (microscopie optique classique et confocale, logiciels d'analyse d'images) l'expression des marqueurs cérébraux d'intérêt (protéines d'activation cellulaire, marqueurs de neurogenèse...) et leur localisation au sein des structures cérébrales. J'ai souhaité, en complément de cette mission, prendre une part active au développement et à l'animation de la plateforme d'Imagerie Cellulaire (PIC) créée en 2011 dans l'Unité. Dans ce cadre je forme les utilisateurs à la prise en main des microscopes confocaux, du scanner de lames et du logiciel de cartographie histologique Mercator.</p>
	<p>Elodie CHAILLOU</p> <p>Chercheuse en neurobiologie du comportement des animaux domestiques à INRAE, je suis coresponsable de l'équipe NDCS depuis le 1er janvier 2019.</p> <p>Ingénieure agronome de formation, j'ai été recrutée en 2001 pour étudier le fonctionnement cérébral des animaux domestiques. Focalisée sur le réseau cérébral des émotions, j'étudie les réactions émotionnelles des ovins pour mieux comprendre leur sensibilité aux changements d'environnement. Ses résultats contribuent à une meilleure connaissance du cerveau et visent à améliorer les conditions de vie des animaux.</p> <p>Soucieuse de partager mes connaissances et ma passion des sciences, je mène depuis plus de 10 ans des actions de médiation scientifique et me suis engagée dans les sciences participatives avec le soutien de nombreux partenaires tels que La maison pour la science, Centre•Sciences, La région Centre Val de Loire, les bibliothèques de Tours et Beauval Nature.</p>

**Résumé.** Dans cet article, nous proposons d'exposer la mise au point du marquage immunohistochimique du Fluororuby®, utilisé pour mettre en évidence les voies neuronales efférentes de la substance grise périaqueducale chez la brebis. Ce traceur étant utilisé pour la première fois dans cette espèce, nous avons d'abord testé différentes conditions pour optimiser le marquage immunohistochimique, dont nous avons tenu à valider la spécificité par un test d'inhibition et un test sans incubation avec l'anticorps primaire. A l'issue de ce travail de mise au point, nous avons pu décrire les connexions neuronales efférentes de la substance grise périaqueducale, structure cérébrale impliquée dans les stratégies d'adaptation comportementale au stress.

**Mots clés :** Brebis, ovin, traçage de voie, spécificité, test d'inhibition

**Abstract.** In this article, we try to explain the immunocytochemistry labelling setting out of the Fluororuby® used to highlight efferent neuronal routes of the periaqueducal grey substance on ewes. This is the first time this tracing is used on ewes. First we have tested different conditions to optimise the immunocytochemistry. Our goal was to validate the specificity by an inhibition test and a test without incubation of the primary antibody. After this focus work, we are able to describe efferent neuronal connections of the periaqueducal grey substance which is a cerebral structure involved in the adaptation behavioural strategies of the stress.

**Keywords :** Ewe, ovine, tracing route, specificity, inhibition test

### Abréviations :

Ac : Anticorps

Ac I<sup>re</sup> : Anticorps primaire

Ac II<sup>re</sup> : Anticorps secondaire

Ag : Antigène

Ag-Ac : Complexe antigène-anticorps

Aq : Aqueduc de Sylvius

BDA : *Ang. Biotinylated Dextran Amine*

BSA : (*Ang. Bovine serum albumin*) Albumine sérique bovine

CC : Corps cellulaire

CIRE : (Plateforme) Chirurgie et Imagerie pour la Recherche et l'Enseignement

Da : Dalton

DAB : Diaminobenzidine tetrahydrochloride

Fb : Fibre

FF : Faisceau de fibres

FG : Fluorogold®

FR : Fluororuby®

HCl : Chlorure d'hydrogène

HRP : *Ang. Horseradish peroxydase*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Eau oxygénée

IgG : Immunoglobuline G  
NaCl : Chlorure de sodium  
PAG : Structure grise périaqueducule  
PAP : Peroxydase-anti-peroxydase  
PBS : *Ang. Phosphate Buffer Saline* - Tampon phosphate salin  
PBS-TA : Tampon phosphate salin avec Triton et Azide  
SA : Sous agitation  
SMAL : Sérum de Mouton Anti-Lapin  
SNM : Sérum Normal de Mouton  
TAmb : Température ambiante  
Tris HCL : Tampon Tris avec Chlorure de sodium  
TRITC : *Ang. Tetramethylrhodamine*  
WGA : *Ang. Wheat germ agglutinin*

## Introduction

La compréhension des régulations de la plupart des grandes fonctions et de la mise en place des comportements passe par l'étude du système nerveux central (Menant et al., 2016). Les méthodes d'investigation sont multiples pour identifier et étudier l'implication des différentes structures du système nerveux central (Nowak et al., 2016). Outre l'étude fonctionnelle de ces structures, l'étude de leur anatomie est cruciale, spécialement pour mettre en évidence les circuits neuronaux qui les connectent. En particulier, les connexions neuronales peuvent être étudiées de différentes manières : par traçage de voies ou par tractographie d'imagerie par résonance magnétique (Menant et al., 2016). Ces différentes méthodes diffèrent par les propriétés physico-chimiques sur lesquelles elles sont fondées, par leur niveau de précision, leur fiabilité et leur rapidité d'exécution. En utilisant le traçage de voies, selon les propriétés des traceurs, rétrograde ou antérograde et fluorescents ou non (Figure 1, Tableau 1), il est possible de décrire les connexions neuronales afférentes ou efférentes d'une structure après que cette dernière ait reçu une injection de traceur. Parmi ces traceurs, certains sont fluorescents et peuvent être observés directement (exemple du Fluorogold, FG), d'autres nécessitent d'être révélés par une réaction enzymatique (exemple de la Horseradish peroxydase, HRP) ou immunohistochimique (Tableau 1). Chez le mouton, les connexions neuronales ont surtout été étudiées après injection d'un traceur rétrograde, le FG (Tableau 1). En revanche, très peu d'études ont concerné les traceurs antérogades pour identifier les connexions neuronales efférentes d'une structure. A notre connaissance, seul le biotinylated dextran amine (BDA) (Meurisse et al., 2009), la HRP (Jansen et al., 1998) et le microruby (Pereira et al., 2010) ont déjà été utilisés. L'utilisation de traceurs fluorescents peut présenter plusieurs désavantages, d'une part pour leur caractère labile, et d'autre part à cause de la présence d'une forte auto-fluorescence du tissu issu de sujets âgés (Mochizuki et al., 1995). C'est pourquoi, pour dépasser cette limite, des protocoles de révélation à la peroxydase de traceurs fluorescents ont été envisagés (Meurisse et al., 2009 ; Tableau 1). C'est dans cette démarche que s'est inscrit le travail réalisé pour étudier, chez la brebis, les connexions neuronales de la substance grise périaqueducule (Menant et al., 2018), structure connue pour être impliquée dans l'expression de comportements émotionnels comme la fuite, l'immobilité tonique ou l'agressivité (Menant et al., 2016 ; Zelena et al., 2018). Dans cette étude des connexions de la substance grise périaqueducule, nous avons décrit les connexions neuronales afférentes en utilisant le FG et les connexions neuronales efférentes en utilisant le Fluororuby® (FR). C'est la mise au point du marquage immunohistochimique de ce dernier traceur qui fait l'objet de ce présent article. Nous présenterons les différentes étapes de mise au point du marquage du FR et de sa validation notamment en démontrant sa spécificité. La mise au point du marquage a concerné trois paramètres d'incubation : la dilution des anticorps, le temps et la température. La spécificité du marquage a été testée par omission de l'anticorps primaire (Ac I<sup>re</sup>) et après saturation de l'Ac I<sup>re</sup> par son antigène.

## Matériel et méthodes

La mise au point et la validation du marquage du Flurororuby® est décrite ici pour la première fois chez la brebis. Toutefois, pour faciliter la compréhension du travail, nous reprenons la description de la préparation des animaux, des tissus et la coloration au crésyl violet, étapes précédemment décrites dans Menant et al. 2018.

### Préparation des animaux

Pour le traçage des voies neuronales efférentes, cinq brebis adultes âgées de 7-8 ans de race Île de France ont été utilisées dans cette expérience après validation du comité d'éthique (Agrément #2010-3-2) et conformément à la directive Européenne (2010/63/EU). Trois brebis ont reçu une injection d'un mélange des traceurs FG/FR (Animaux notés : 40331, 40337 et 42057) et deux ont reçu une injection de FR seul (notés 42065 et 42185). Afin de cibler la substance grise périaqueducale, ces injections ont été réalisées par neurochirurgie stéréotaxique sur les brebis anesthésiées par voie gazeuse. Après leur réveil, les brebis ont reçu les soins post-opératoires habituels et ont été maintenues en élevage pendant 15 jours, temps nécessaire à la migration du traceur dans tout l'encéphale.

### Préparation des tissus

Après ces 15 jours de migration, les brebis ont été euthanasiées par une injection létale de barbiturique puis décapitées par un boucher dans un abattoir agréé de la plateforme CIRE de Nouzilly (UMR-PRC 085, INRAE Val de Loire). Chaque tête a été perfusée par les carotides avec 2 L de nitrite de sodium (1 % en NaCl à 37°C) pour rincer et dilater les vaisseaux sanguins puis avec 4 L de paraformaldéhyde (4 % en tampon phosphate à 4°C) pour fixer les tissus. Chaque encéphale a ensuite été extrait de la boîte crânienne puis disséqué selon des repères anatomiques externes en 4 blocs : le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale et le tronc cérébral. Chaque bloc a alors été post-fixé 24 h en paraformaldéhyde puis immergé dans une solution cryoprotectrice de sucrose 20 % en tampon phosphate.

### Préparation des coupes

Après congélation de chaque bloc, des coupes frontales de 30 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome à congélation (Microm HM 430®, Thermo Scientific, Walldorf, GERMANY). Toutes les coupes flottantes ont été collectées et conservées dans du tampon PBS-TA avant d'être soumises aux différents traitements histochimiques.

### Traitements histochimiques

#### Coloration au violet de crésyl

L'utilisation de la coloration au violet de crésyl a pour but de colorer les corps de Nissl, soit les agrégats de réticulum endoplasmique rugueux présents dans le cytoplasme des cellules. Ainsi, cette coloration histologique permet de distinguer les différentes structures cérébrales en fonction de l'intensité de la coloration, de la densité et de la forme des cellules colorées (Figure 2). Cette coloration nous a permis d'identifier précisément les structures anatomiques d'intérêt afin de localiser les marquages immunohistochimiques.

Dans le cas présent, la coloration au violet de crésyl a été réalisée sur 1 coupe sur 10 pour le mésencéphale (bloc contenant la substance grise périaqueducule) et 1 coupe sur 20 pour les autres blocs de chaque encéphale. Les coupes concernées ont été étalées sur lames lavées et gélatinées, avant d'être séchées en étuve à 37°C pendant au moins une nuit. Pour améliorer la qualité de la coloration, les coupes ont été délipidées dans un bain d'alcool à 95 % puis réhydratées dans un bain d'eau déminéralisée. Après avoir été bien égouttées, les coupes ont été immergées 15 à 25 minutes dans la solution de violet de crésyl (*Cresyl Violet Acetate*, 5042-10G, SIGMA 3050, Saint Louis, USA) puis rincées dans de l'eau déminéralisée. Pour distinguer les différents types cellulaires sur la base de la coloration, les coupes ont été graduellement décolorées par trois bains successifs d'alcool à 95 %, puis différenciées dans trois bains successifs d'alcool absolu. Les coupes ont ensuite été immergées dans trois bains successifs de toluène avant d'être montées sous lamelle avec du Depex® (DPX mounting medium for microscopy, Batch : HX379492R, VWR PROLABO).

Les coupes ont toutes été numérisées à l'aide du scanner de lame (AxioScan Z1, Zeiss, Allemagne). Ce scanner permet de numériser des coupes histologiques à fond clair ou à fluorescence. C'est un système composé d'un microscope droit équipé d'objectifs x 5 à x 40 et d'un chargeur de 100 lames standard. Il est relié à un ordinateur équipé du logiciel de pilotage de visualisation Zen Blue (Zeiss, Allemagne), ce qui permet d'observer le tissu biologique à la fois dans son ensemble et jusqu'au niveau cellulaire sans perte d'information.

### Mise au point du marquage immunohistochimique du FR

La mise au point du marquage a été réalisée sur les coupes de mésencéphale des 5 animaux. Pour obtenir les meilleurs résultats et observations des essais, nous avons choisi de travailler sur des coupes présentant le site d'injection du FR (Figure 3). En effet, ces coupes sélectionnées disposent d'une densité de marquage suffisante nous permettant de mieux comparer nos différentes conditions d'incubation.

Pour limiter le bruit de fond et les marquages aspécifiques lors d'un immunomarquage révélé par peroxydase, des étapes préliminaires à l'incubation dans l'Ac I<sup>re</sup> sont nécessaires (Figure 4.1-2). Il s'agit d'abord d'épuiser les peroxydases endogènes en incubant les coupes flottantes dans une solution d'eau oxygénée (1 %) en tampon PBS-TA pendant 1 h à 4°C (Figure 4.1), puis de saturer les sites de liaisons aspécifiques en incubant les coupes dans une solution protéique. Dans notre cas, deux types de saturation ont été testés : par l'albumine sérique bovine (BSA) et le sérum normal de mouton (SNM) (Figure 4.2).

Le marquage immunohistochimique repose sur la formation d'un complexe antigène-anticorps (Ag-Ac, Figure 4.3). Dans notre étude, l'antigène est le FR (*tetramethylrhodamine-dextran amine conjugate* ; Millipore, AG335, NG1897008) injecté dans la substance grise périaqueducule. L'Ac I<sup>re</sup> est un anticorps commercial anti-FR fabriqué chez le lapin (*polyclonal, rabbit anti-tetramethylrhodamine*, ref. ab3518, Abcam, France). Pour amplifier le signal, le complexe Ag-Ac I<sup>re</sup> est couplé avec un anticorps secondaire (Ac II<sup>re</sup>), produit dans notre unité (UMR PRC 085, INRAE Val de Loire, Nouzilly) et fabriqué chez le mouton (Sérum de Mouton Anti-Lapin, SMAL) (Figure 4.4). Le complexe Ag-Ac I<sup>re</sup>-Ac II<sup>re</sup> est révélé après incubation avec le complexe peroxydase-anti-peroxydase (*Rabbit PAP*, Code N° Z0113, Dako, France) en présence d'eau oxygénée, substrat des peroxydases, et de DAB (*3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*, D5905-100TAB, Sigma Aldrich, St Louis, USA)-Nickel, qui précipite après oxydation (Figures 4.5-6). L'ensemble de ces étapes est réalisé en excès d'anticorps (I<sup>re</sup>, II<sup>re</sup>) et de complexe PAP, excès qu'il faut éliminer par des étapes de rinçages entre chaque étape d'incubation avec l'Ac I<sup>re</sup> (PBS-TA), l'Ac II<sup>re</sup> (PBS) ou le PAP (Tris-HCl) (Figure 4.3-6). Enfin, les coupes sont montées sur lames, séchées à l'étuve (37°C), déshydratées dans des bains successifs d'alcool, puis immergées dans trois bains de toluène pour être montées sous lamelle avec du Depex (DPX mounting medium for microscopy, Batch : HX379492R, VWR PROLABO).

## Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (100)

A partir de ce protocole type, nous avons réalisé des mises au point relatives à l'incubation avec l'Ac I<sup>re</sup> et l'Ac II<sup>re</sup> (Figure 4.3-4). Trois essais testant différentes conditions de dilution, de durée et de température d'incubation ont été nécessaires pour obtenir un marquage satisfaisant, résumés dans le tableau 2.

Après avoir défini les meilleurs paramètres pour l'obtention d'une qualité du marquage optimale, c'est-à-dire bien contrasté et sans bruit de fond, nous avons vérifié la spécificité du marquage avant d'appliquer le protocole mis au point sur l'ensemble des blocs d'encéphale à raison d'une coupe sur 20 (Menant et al., 2018).

### Spécificité du marquage

#### Test d'omission de l'Ac I<sup>re</sup>

Nous avons testé la spécificité de l'Ac II<sup>re</sup> pour le marquage du marquage du FR en omettant l'Ac I<sup>re</sup> à partir du protocole retenu lors de la mise au point. Le résultat attendu est une absence de marquage qui montre que l'Ac II<sup>re</sup> ne reconnaît aucun élément antigénique présent dans le tissu. Ce test d'omission a été réalisé sur des coupes de tronc cérébral d'une brebis ayant reçu une co-injection de FR-FG (Brebis #42057).

#### Test d'inhibition

Ici, il s'agit d'incuber les coupes avec l'Ac I<sup>re</sup> épuisé par son antigène. Pour cela, il faut évaluer la quantité d'antigène nécessaire pour saturer tous les épitopes de l'Ac I<sup>re</sup> selon le principe décrit par Calas (2010). La validité d'un tel test repose sur l'estimation de la quantité d'Ag nécessaire pour épuiser l'Ac I<sup>re</sup>. Par principe, on estime qu'un anticorps, ou immunoglobuline G (IgG), a une masse moléculaire approximative de 150000 Da (g/mole) et présente deux sites de liaison. Généralement, il est considéré qu'un sérum contient 10 mg/ml d'immunoglobuline soit une concentration en IgG de  $0,66 \times 10^{-7}$  mole/ml. Les anticorps étant bivalents, il est nécessaire de multiplier par 2 la quantité d'antigène nécessaire pour saturer les 2 sites de fixation de l'anticorps. Ainsi, pour saturer 1 ml d'anticorps « pur », il faut l'incuber avec  $1,32 \times 10^{-7}$  mole de son antigène spécifique.

Dans le cas de notre étude, il s'agit de définir la quantité de FR nécessaire pour saturer son anticorps dans nos conditions expérimentales. La masse moléculaire du FR étant de 10500 Da (Fiche annexe 1), la quantité d'antigène nécessaire pour saturer 1 ml d'anticorps « pur » est donc de  $10500 \times 1,32 \times 10^{-7} = 1,386 \times 10^{-3}$  g soit 1386 µg. En tenant compte de la dilution de l'Ac I<sup>re</sup> anti-FR (1/10000) retenue après mise au point du protocole de marquage, 1 ml d'Ac I<sup>re</sup> dilué doit être saturé avec 0,1386 µg d'antigène. Sur cette base de calculs, l'Ac I<sup>re</sup> anti-FR (1/10000) a été pré-incubé avec son antigène pendant 24 h à +4°C avant d'être utilisé selon le protocole résumé Figure 5. Dans ces conditions d'épuisement de l'Ac I<sup>re</sup>, il est attendu une baisse importante du signal d'immunomarquage après la révélation. Ce test d'inhibition a été réalisé sur des coupes de mésencéphale d'une brebis ayant reçu une injection de FR (Brebis #42067) et d'une brebis ayant reçu une co-injection FR-FG (Brebis #42057).

## Résultats

### Validation du protocole d'immunomarquage anti-FR

Le marquage attendu concerne les fibres visibles à un grossissement d'au moins 200. Ces fibres ont l'aspect d'une succession de points marqués qui correspondent aux varicosités de la fibre (Figure 6). Dans ce contexte, la validation du protocole d'immunomarquage repose sur la distinction des fibres marquées ou de structures en panier par rapport au fond de la coupe, et l'absence de corps cellulaires.

Le 1<sup>er</sup> essai a consisté à tester le protocole d'immunomarquage couramment utilisé au laboratoire en respectant les recommandations du fournisseur pour la dilution de l'Ac I<sup>re</sup> (Tableau 2). Dans ces conditions, le bruit de fond était beaucoup trop important pour distinguer les fibres immunomarquées pour le FR. Pour diminuer le bruit de fond et améliorer le contraste, nous avons testé deux conditions de saturation des sites de liaisons : la pré-incubation des coupes en BSA 1 % et en SNM au 1/15, en diluant davantage les Ac I<sup>re</sup> et II<sup>re</sup> (Tableau 2). La comparaison entre ces deux conditions de saturation révèle un bruit de fond plus important en présence de SNM qui rend l'observation des fibres difficile avec la présence de nombreux précipités de DAB-Nickel (Figure 7). Avec l'usage de la BSA et les nouvelles dilutions d'Ac I<sup>re</sup> et II<sup>re</sup>, le contraste du marquage a été amélioré. Pour confirmer ce dernier point, un 3<sup>ème</sup> essai a été réalisé, en saturant les sites de liaison avec une préincubation des coupes en BSA et en comparant deux dilutions d'Ac I<sup>re</sup> tout en diluant encore davantage l'Ac II<sup>re</sup> (Tableau 2). Ce dernier essai a confirmé que la dilution au 1/8000 de l'Ac I<sup>re</sup> était associée à un marquage moins contrasté et un bruit de fond plus important qu'avec la dilution au 1/10000 pour laquelle les sites d'injection étaient distinctement observables avec peu de bruit de fond.

Quel que soient l'animal et le bloc d'encéphale, à l'exception du tronc cérébral, les différents essais ont conduit à définir le protocole d'immunomarquage décrit dans la figure 5.

Le marquage du FR observé au microscope à fond clair, après validation du protocole, est apparu sous la forme d'un précipité noir-violet formé par la DAB oxydée en présence de Nickel. Quelle que soit la région du mésencéphale et dans les autres régions cérébrales étudiées, le marquage est net et sans bruit de fond. Il était principalement localisé dans les varicosités des axones. Les fibres immunomarquées (Figure 6) sont de longueur et de densité variables selon les régions étudiées. Des structures dites en « panier » ont été observées (Figure 6A). Il s'agissait de corps cellulaires négatifs formés par les varicosités qui entrent en contact avec ces derniers. Plus rarement, des corps cellulaires marqués ont été observés (Figure 6B), en particulier à proximité des sites d'injection.

### Spécificité du marquage immunohistochimique anti-FR

Comme indiqué précédemment, deux tests ont été réalisés : le test d'omission de l'Ac I<sup>re</sup> et le test d'inhibition par saturation de l'Ac I<sup>re</sup> avec son antigène.

Le test d'omission de l'Ac I<sup>re</sup> a été réalisé sur des coupes de tronc cérébral pour lequel un bruit de fond très important, un marquage aspécifique et l'absence de marquage de fibres avaient été constatés. En l'absence d'Ac I<sup>re</sup>, le marquage disparaît laissant quelques précipités de DAB-Nickel visibles (Figure 7).

Le test d'inhibition a été réalisé sur des coupes incluant le site d'injection et sur des coupes de tronc cérébral plus postérieures. Au niveau du site d'injection, le test d'inhibition entraîne une baisse très importante du signal pour un animal (Brebis #42057, co-injecté FR-FG, Figure 8A, B) et une absence complète de marquage pour un animal (Brebis #42065, simple injecté FR, Figure 8C, D).

### Discussion

Dans cette étude, nous avons voulu mettre au point le marquage immunohistochimique du FR chez la brebis. Nous avons voulu tester cette mise au point sans utiliser la fluorescence du fait de l'auto-fluorescence due à la présence de lipofuschines chez les animaux âgés (Mochizuki et al., 1995). De plus, pour valider notre marquage, nous avons aussi expérimenté différents tests de spécificité.

La mise au point a montré que le marquage le plus satisfaisant a été obtenu après le choix, dans un premier temps, de pré-incuber les coupes en albumine bovine sérique vs le sérum normal de mouton et dans un

deuxième temps, d'incuber les coupes avec l'Ac I<sup>re</sup> concentré au 1/1000 et l'Ac II<sup>re</sup> au 1/2000. Ceci peut s'expliquer par le fait que la BSA et le SNM n'ont pas la même action biologique. L'albumine est un additif connu pour entrer en compétition avec les IgG, diminuer l'adsorption non spécifique des anticorps sur les coupes et bloquer les sites réactifs éventuellement présents dans le tissu provenant, par exemple, des fixateurs (Garaud et al., 2007). La dilution de l'Ac I<sup>re</sup> préconisée par le fabricant n'a pas montré de bons résultats, avec la présence de beaucoup de bruit de fond. Ce constat peut être lié à l'espèce étudiée puisque la notice du fabricant fait référence à des essais réalisés sur le rat et non sur la brebis, notre modèle d'étude. En modifiant la dilution de l'Ac I<sup>re</sup> et celle de l'Ac II<sup>re</sup>, nous avons pu réduire au maximum le bruit de fond et obtenir un contraste de marquage satisfaisant. La présence de corps cellulaires (hors structures en panier) sur des coupes immunomarquées avec le protocole validé peut s'expliquer par la possibilité que le traceur du FR ne soit pas exclusivement antérograde comme discuté dans la littérature mais présenterait également un léger transport rétrograde (Hoover et al., 2012).

Pour vérifier la spécificité du marquage du FR, nous avons réalisé deux tests de spécificité. L'omission de l'Ac I<sup>re</sup> qui, peut être considéré comme un contrôle négatif, a montré que l'Ac II<sup>re</sup> est pur et bien dirigé contre un antigène non présent à l'origine dans le tissu. Le test d'inhibition a montré des résultats proches pour les deux animaux. Cependant, incubée préalablement avec l'anticorps saturé par son antigène, la coupe d'un animal présentait une absence totale de marquage contrairement au second animal qui en présentait en faible quantité. La coupe sur laquelle le marquage a totalement disparu avec le test d'inhibition était un animal co-injecté FR-FG alors que l'autre coupe avec du marquage en faible quantité provenait d'un animal ayant reçu seulement l'injection du FR. Cela laisse à penser que le mélange FR-FG aurait peut-être masqué certains épitopes.

### Conclusion

L'ensemble de notre travail a permis de mettre au point et de valider le protocole d'immunomarquage du FR sur du tissu cérébral de brebis. Grâce à ce protocole fondé sur des essais et tests de spécificité sûrs, nous avons pu décrire l'ensemble des structures neuronales recevant des connexions neuronales efférentes de la PAG (structures du télencéphale, du diencephale et du mésencéphale, Menant et al., 2018).

### Remerciements

Nous souhaitons remercier l'ensemble des personnes qui nous ont aidées dans ce travail : Ophélie MENANT pour son aide formatrice dans les débuts de l'expérimentation et pour la démonstration de l'utilisation du microtome à congélation, Thierry DELPUECH pour son aide technique dans la préparation des solutions tampons, la Plateforme PIC pour son précieux accompagnement dans les analyses d'images et utilisations de logiciels ainsi que Houda BRAHAM, formatrice de Sciences Impact pour ses précieux conseils de rédaction.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

## Bibliographie

Barazzoni AM, Clavenzani P, Chiocchetti R, Bompadre GA, Grandis A, Petrosino G, Costerbosa GL, Bortolami R (2004) Localisation of recurrent laryngeal nerve motoneurons in the sheep by means of retrograde fluorescent labelling. *Res Vet Sci.* **78(3)**:249-53.

Bortolami R, Calzà L, Lucchi ML, Giardino L, Callegari E, Manni E, Pettorossi VE, Barazzoni AM, Lalatta Costerbosa G (1991) Peripheral territory and neuropeptides of the trigeminal ganglion neurons centrally projecting through the oculomotor nerve demonstrated by fluorescent retrograde double-labeling combined with immunocytochemistry. *Brain Res.* **547(1)**:82-8.

Calas A. (2010) Peut-on prouver la spécificité d'un marquage immunohistochimique ? *Rev. Fr. Histotechnol.* **23(1)**:73-80.

Coolen LM, Jansen HT, Goodman RL, Wood RI, Lehman MN (1999) A new method for simultaneous demonstration of anterograde and retrograde connections in the brain: co-injections of biotinylated dextran amine and the beta subunit of cholera toxin. *J Neurosci Methods* **91(1-2)**:1-8.

Dufourny L, Caraty A, Clarke IJ, Robinson JE, Skinner DC (2005a) Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology* **81(3)**:139-49.

Dufourny L, Caraty A, Clarke IJ, Robinson JE, Skinner DC (2005b) Progesterone-receptive dopaminergic and neuropeptide Y neurons project from the arcuate nucleus to gonadotropin-releasing hormone-rich regions of the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology* **82(1)**:21-31.

Garaud JC, Roussel G (2007) Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique, théorie et pratique.

Goubillon M, Delaleu B, Tillet Y, Caraty A, Herbison AE (1999) Localization of estrogen-receptive neurons projecting to the GnRH neuron-containing rostral preoptic area of the ewe. *Neuroendocrinology* **70(4)**:228-36. *J Neuroendocrinol.* **14(2)**:95-100.

Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct.* **217(2)**:191-209.

Iqbal J, Manley TR, Yue Q, Namavar MR, Clarke IJ (2005) Noradrenergic regulation of hypothalamic cells that produce growth hormone-releasing hormone and somatostatin and the effect of altered adiposity in sheep. *J Neuroendocrinol.* **17(6)**:341-52.

Jansen HT, Hileman SM, Lubbers LS, Kuehl DE, Jackson GL, Lehman MN (1997) Identification and distribution of neuroendocrine gonadotropin-releasing hormone neurons in the ewe. *Biol Reprod.* **56(3)**:655-62.

Jansen HT, Iwamoto GA, Jackson GL (1998) Central connections of the ovine olfactory bulb formation identified using wheat germ agglutinin-conjugated horseradish peroxidase. *Brain Res Bull.* **45(1)**:27-39.

Lévy F, Meurisse M, Ferreira G, Thibault J, Tillet Y (1999) Afferents to the rostral olfactory bulb in sheep with special emphasis on the cholinergic, noradrenergic and serotonergic connections. *J Chem Neuroanat.* **78**:245-263.

Menant O, Andersson F, Zelena D, Chaillou E (2016) The benefits of magnetic resonance imaging methods to extend the knowledge of the anatomical organisation of the periaqueductal gray in mammals. *J Chem Neuroanat.* **77**:110-120.

Menant O, Destrez A, Deiss V, Boissy A, Delagrangé P, Calandreau L, Chaillou E (2016) Régulation des émotions chez l'animal d'élevage : focus sur les acteurs neurobiologiques. *INRA Productions Animales*, **29** (4):241-245.

Menant O, Prima MC, Morisse M, Cornilleau F, Moussu C, Gautier A, Blanchon H, Meurisse M, Delagrangé P, Tillet Y, Chaillou E (2018) First evidence of neuronal connections between specific parts of the periaqueductal gray (PAG) and the rest of the brain in sheep: placing the sheep PAG in the circuit of emotion. *Brain Struct Funct.* **223**(7):3297-3316.

Meurisse M, Chaillou E, Lévy F (2009) Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *J Chem Neuroanat.* **37**(2):87-97.

Mochizuki Y, Park MK, Mori T, Kawashima S (1995) The difference in autofluorescence features of lipofuscin between brain and adrenal. *Zoolog Sci.* **12**(3):283-8.

Nowak R, Chaillou E, Gaudin S, Lévy F (2016) Diversité des relations affiliatives chez les ovins en situation d'élevage : mécanismes comportementaux et neurobiologiques. *INRA Productions Animales.* **29**(4):267-278.

Pereira A, Rawson J, Jakubowska A, Clarke IJ. (2010) Estradiol-17beta-responsive A1 and A2 noradrenergic cells of the brain stem project to the bed nucleus of the stria terminalis in the ewe brain: a possible route for regulation of gonadotropin releasing hormone cells *Neuroscience.* **165**(3):758-73.

Pompolo S, Rawson JA, Clarke IJ (2001) Projections from the arcuate/ventromedial region of the hypothalamus to the preoptic area and bed nucleus of stria terminalis in the brain of the ewe; lack of direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Brain Res.* **904**(1):1-12.

Pompolo S, Pereira A, Scott CJ, Fujjyma F, Clarke IJ (2003) Evidence for estrogenic regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glutamatergic neurons in the ewe brain: An immunohistochemical study using an antibody against vesicular glutamate transporter-2. *J Comp Neurol.* **465**(1):136-44.

Qi Y, Namavar MR, Iqbal J, Oldfield BJ, Clarke IJ (2009) Characterization of the projections to the hypothalamic paraventricular and periventricular nuclei in the female sheep brain, using retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroendocrinology.* **90**(1):31-53.

Scott CJ, Rawson JA, Pereira AM, Clarke IJ (1999) Oestrogen receptors in the brainstem of the female sheep: relationship to noradrenergic cells and cells projecting to the medial preoptic area. *J Neuroendocrinol.* **11**(10):745-55.

Tillet Y. (1992) Serotonergic projections from the raphe nuclei to the preoptic area in sheep as revealed by immunohistochemistry and retrograde labelling, *J Comp Neurol.* **320**(2):267-72.

Torrealba F, Parraguez VH, Reyes T, Valenzuela G, Serón-Ferré M (1993) Prenatal development of the retinohypothalamic pathway and the suprachiasmatic nucleus in the sheep. *J Comp Neurol.* **338(2)**:304-16.

Zelena D, Menant O, Andersson F, Chaillou E (2018) Periaqueductal gray and emotions: the complexity of the problem and the light at the end of the tunnel, the magnetic resonance imaging. *Endocr Regul.* **52(4)**:222-238.

Annexe 1 : Fiche technique Fluororuby®

	 <small>THE EXPERTISE OF UPSTATE®, CHEMICON® AND LINCO® IS NOW A PART OF MILLIPORE</small>
<b>FLUORO-RUBY®</b>	
<b>CATALOG NUMBER:</b>	AG335
<b>LOT NUMBER:</b>	NG1897008
<b>QUANTITY:</b>	30 mg
<b>DESCRIPTION:</b>	Fluoro-Ruby®
<b>APPEARANCE:</b>	Pink to crimson colored powder.
<b>PURITY:</b>	Thin layer chromatography using cellulose plates and a solvent system of acetonitrile and water (6:4) revealed no detectable free TRITC dye.
<b>MOLECULAR WEIGHT:</b>	10,500
<b>EXCITATION PEAK:</b>	540 nm
<b>EMISSION PEAK:</b>	600 nm
<b>FILTER SYSTEM:</b>	Standard TRITC filter.
<b>SOLUBILITY:</b>	Highly soluble in aqueous solutions.
<b>STORAGE/HANDLING:</b>	The powder should be stored well sealed at room temperature or refrigerated. The liquid solution can be stored at 2-8°C when not in use.
<b>TOXICITY:</b>	Although the compound appears to be of low toxicity, it has not been extensively evaluated and therefore routine laboratory caution should be exercised. Not intended for human consumption.
<b>METHODS REFERENCE:</b>	Schmued, L., Kyriakidis, K., Heimer, L., In vivo anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine dextran-amine, Fluoro-Ruby, within the CNS. <i>Brain Res.</i> , 526, (1990) 127-134.
<b>REFERENCES:</b>	Bowyer, J.F. and Schmued, L., Fluoro-Ruby labeling prior to an amphetamine neurotoxic insult shows a definitive massive loss of dopaminergic terminals and axons in the caudate-putamen. <i>Brain Res.</i> , 1075, (2006) 236-239.
<small>28820 Single Oak Drive • Temecula, CA 92590 Technical Support: T: 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476) • F: 1-800-437-7502 www.millipore.com</small>	
<small>AG335/12-JUL-2011/TM/Formatting</small>	

Annexe 2 : Fiche technique de l'anticorps primaire (Anti-TRITC)



abcam®  
discover more



abcam®  
discover more

  

**Anti-TRITC antibody ab35181**

**Overview**

**Product name**  
Description  
Specificity

Anti-TRITC antibody  
Rabbit polyclonal to TRITC  
This antibody shows minimal reactivity with human serum proteins. Others have not been evaluated.

**Tested applications**  
Immunogen  
Positive control

ELISA, IHC  
Chemical/ Small Molecule: TRITC conjugated to KLH.  
IHC: Rat brain.

**Properties**

**Form**  
Liquid

**Storage instructions**  
Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze / thaw cycles.

**Storage buffer**  
Preservative: 0.09% Sodium azide  
Constituent: Whole serum

**Purity**  
Whole antiserum

**Clonality**  
Polyclonal

**Isotype**  
IgG

**Applications**

Our Abpromise guarantee covers the use of **ab35181** in the following tested applications. The application notes include recommended starting dilutions; optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

Application	Abreviews	Notes
ELISA		
IHC		

**Application notes**

ELISA: Use at a concentration of 1 µg/ml. TRITC-BSA coated.  
IHC-PAP (peroxidase anti-peroxidase method): Use at an assay dependent dilution. Has been used an IHC PAP method, staining nerve cell endings in rat brain after pre administration of rhodamine dextran at 1/8000.  
Not yet tested in other applications.  
Optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.

**Target**

**Please note:** All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"

Our Abpromise to you: Quality guaranteed and expert technical support

- Replacement or refund for products not performing as stated on the datasheet
- Valid for 12 months from date of delivery\*\*

**Terms and conditions**

- Response to your inquiry within 24 hours
- We provide support in Chinese, English, French, German, Japanese and Spanish
- Extensive multi-media technical resources to help you
- We investigate all quality concerns to ensure our products perform to the highest standards

If the product does not perform as described on this datasheet, we will offer a refund or replacement. For full details of the Abpromise, please visit <http://secure.abcam.com/abpromise> or contact our technical team.

- Guarantee only valid for products bought direct from Abcam or one of our authorized distributors
- \*\*Regional variations to our Abpromise may apply to the following countries: China, Korea, Singapore, Malaysia, Taiwan and Thailand, which operate a 120 day guarantee. Please contact your regional office for further details