

Apport d'un modèle murin de neuropathie démyélinisante inflammatoire au développement de thérapeutiques : caractérisations fonctionnelle et morphologique

par Evelyne Benoit****, Carmen Cifuentes-Diaz** & Jordi Molgó*

*CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR9040, Gif-sur-Yvette, F-91198, France. E-mail : Evelyne.Benoit@nbcn.cnrs-gif.fr ;

**Inserm U536 et Université Pierre et Marie Curie, Institut du Fer à Moulin, Laboratoire de transduction du signal et plasticité dans le système nerveux, Paris, F-75005, France.

**** Auteur à qui la correspondance doit être adressée

Reçu le 26 février 2007

RÉSUMÉ

Afin de mettre au point un modèle murin de neuropathie démyélinisante inflammatoire, nous avons injecté une solution contenant une protéase active à pH neutre, provenant du pancréas bovin, dans l'espace périneural du nerf sciatique gauche de souris (nerf composé d'axones myélinisés). Le comportement locomoteur des animaux a été suivi quotidiennement et, entre 3 et 45 jours après l'injection, les nerfs sciatiques ont été prélevés et étudiés en électrophysiologie classique puis, pour certains d'entre eux, en microscopie. Le nerf sciatique droit, qui n'a pas subi d'injection, est un très bon témoin puisqu'il provient du même animal que le nerf sciatique gauche qui a subi l'injection. Les résultats obtenus montrent

que, dans nos conditions expérimentales, *i*) une démyélinisation des fibres nerveuses est détectable entre 6 et 15 jours après l'injection de protéase, résultant en une conduction axonale déficiente des potentiels d'action, et *ii*) 45 jours sont suffisants pour restaurer une conduction axonale normale. Ces résultats sont intéressants car ils indiquent que ce modèle murin pourra être utilisé pour tester l'aptitude de nouveaux agents pharmacologiques à contrebalancer la conduction nerveuse déficiente des potentiels d'action survenant après une démyélinisation axonale, dans l'optique de développer de nouvelles molécules utilisables dans le traitement de neuropathies démyélinisantes inflammatoires.

SUMMARY A mouse model of inflammatory demyelinating neuropathy for the development of therapeutics: electrophysiological and morphological characterizations

To finalize a mouse model of inflammatory demyelinating neuropathy, we injected a solution containing a bovine pancreas protease, active at neutral pH, in the perineural space of the mouse left sciatic nerve (a nerve consisting of myelinated axons). The locomotive behaviour of animals was daily followed and, between 3 and 45 days after the injection, the sciatic nerves were removed from animals, studied using classical electrophysiological techniques and then, at least for some of them, examined using conventional microscopy. The right sciatic nerve, which did not receive a perineural injection, is a very good control, because it comes from the same animal as the left sciatic nerve which underwent the injection.

The results obtained show that, under our experimental conditions, *i*) a demyelination of nerve fibres can be detected between 6 and 15 days after the injection of protease, resulting in a defective axonal conduction of action potentials, and *ii*) 45 days are sufficient to restore a normal axonal conduction. These results are interesting since they indicate that this mouse model can be used to test the ability of new pharmaceutical agents to counteract the defective nerve conduction of action potentials arising after an axonal demyelination, in the perspective of developing new useful molecules for the treatment of inflammatory demyelinating neuropathies.

INTRODUCTION

Les neuropathies périphériques sont des atteintes des nerfs périphériques, par opposition au système nerveux central. En effet, le système nerveux central comprend

l'encéphale (cerveau, cervelet, bulbe rachidien) et la moelle épinière alors que le nerf périphérique est constitué d'une racine nerveuse qui est issue de la moelle (corne antérieure de la substance grise) et d'un ou plusieurs troncs nerveux ou nerfs proprement dits. Ce type

de neuropathies a été trop souvent négligé et son incidence a longtemps été sous-estimée. Parmi ces neuropathies, les neuropathies démyélinisantes inflammatoires, *i.e.* associées à des processus infectieux tels que la lèpre ou encore le SIDA, représentent le groupe le plus important de neuropathies dans le monde. En particulier, elles touchent plus de 30 % des malades atteints du SIDA. Il est indubitable que les souffrances qu'elles peuvent engendrer ont un effet dévastateur sur la qualité de la vie des personnes atteintes.

Ce sont les produits sécrétés par les cellules immunitaires activées au cours des processus infectieux qui sont responsables des lésions observées au niveau du système nerveux périphérique (Said & Hontebeyrie-Joskowicz, 1992). Parmi les produits sécrétés, les plus importants sont les protéases actives à pH neutre qui, en particulier, dégradent les protéines de la myéline (Johnson, 1983 ; Cammer *et al.*, 1978). Il a été montré, en utilisant des techniques de microscopie, que l'injection de protéases neutres dans le nerf sciatique de rat produit une démyélinisation spectaculaire des fibres nerveuses (Said & Hontebeyrie-Joskowicz, 1992).

Afin d'étudier l'utilisation potentielle de nouveaux agents dans le traitement des neuropathies démyélinisantes inflammatoires, nous avons mis au point un modèle murin de ce type de neuropathie.

PROCÉDURES EXPERIMENTALES

Le modèle murin de neuropathie démyélinisante inflammatoire a été mis au point en utilisant des souris femelles Swiss-Webster adultes (âgées de 5 à 6 semaines), pesant entre 20 et 30 g.

Injection *in vivo* de la protéase de pancréas bovin

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de 88,2 mg/kg d'animal de pentobarbitol dissout dans du PBS ("Phosphate Buffer Saline"; 0,1 M; pH = 7,4). Après avoir anesthésié les souris, une incision de la peau a été effectuée sur environ 1 cm de façon à exposer leur nerf sciatique gauche au niveau de l'embranchement des nerfs péronéal et tibial (Fig. 1). Au niveau de cet embranchement et à l'aide d'une micropipette (dont la pointe a un diamètre de 10 µm environ) reliée à une seringue, 50 µL d'une solution de Krebs-Ringer Mammifère (154 mM de NaCl ; 5 mM de KCl ; 2 mM de CaCl₂ ; 5 mM de tampon HEPES ; 1 mM de MgCl₂ et 11 mM de glucose ; pH ajusté à 7,4 avec du NaOH) contenant de la protéase provenant du pancréas bovin (type I, Sigma-Aldrich) ont été injectés, sous un microscope à dissection, dans l'espace périneural du nerf sciatique. La quantité de protéase injectée avait une activité de 31 unités c'est-à-dire, par définition, qu'elle hydrolyserait la caséine de façon à produire 31 µmoles de tyrosine par minute à pH = 7,5 et à 37° C. Dans certains cas, seuls 50 µL de la solution de Krebs-Ringer Mammifère ont été injectés afin de pouvoir observer les conséquences d'un éventuel traumatisme lié à la méthode

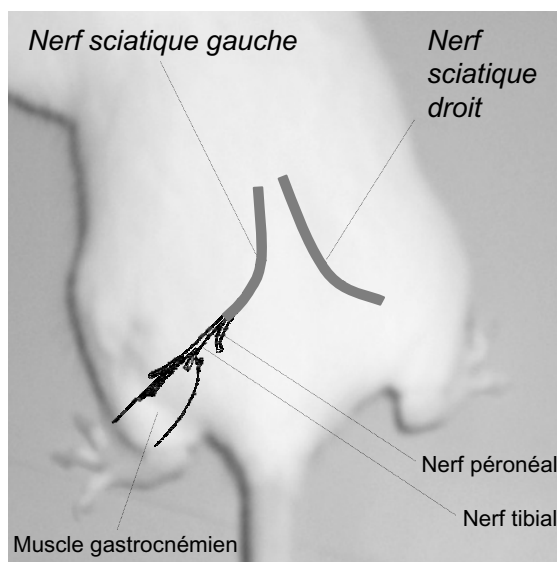


FIG. 1. – Localisation des nerfs sciatiques chez la souris.

d'injection. Après l'injection, la peau a été suturée et les souris ont été remises à l'animalerie où leur poids et leur comportement locomoteur ont été suivis quotidiennement jusqu'au sacrifice des animaux (entre 3 et 45 jours après l'injection).

Électrophysiologie

Après avoir euthanasié la souris par dislocation des vertèbres cervicales, les nerfs sciatiques gauche (injecté) et droit (non injecté) ont été prélevés. Chaque nerf a ensuite été placé dans une petite fiole contenant la solution de Krebs-Ringer Mammifère oxygénée, à température ambiante (22-24° C), pendant environ 30 minutes avant le début des mesures.

Le nerf sciatique gauche ou droit a été placé sur deux paires d'électrodes (fils de platine ayant un diamètre de 0,5 mm) fixées dans une chambre en Plexiglas et espacées de 10,08 mm (Fig. 2). Une paire (électrodes de stimulation espacées de 2,15 mm) était reliée à un stimulateur (S88, Grass Instruments) qui délivre des impulsions rectangulaires de courant variables en amplitude et en durée. L'autre paire (électrodes d'enregistrement espacées de 4,26 mm) était connectée aux entrées d'un amplificateur différentiel à haut gain, afin d'enregistrer la propagation du potentiel d'action global (PAG) qui résulte de l'activité de l'ensemble des fibres nerveuses constituant le nerf. Un cinquième fil de platine, fixé entre les paires d'électrodes de stimulation et d'enregistrement, était relié à la terre. Les nerfs ont été stimulés et les signaux électriques collectés, digitalisés et analysés à l'aide d'un ordinateur PC, équipé d'un convertisseur analogique-numérique, grâce au logiciel "Pclamp 6.0" (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Les expériences ont été réalisées à température ambiante.

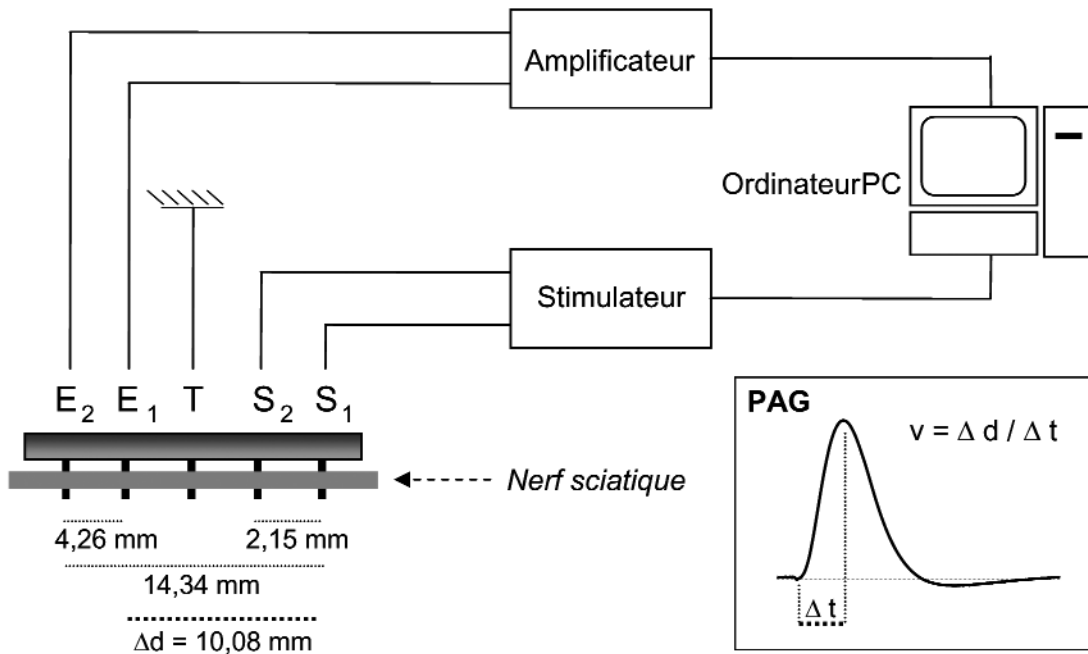


FIG. 2. – Schéma simplifié du dispositif expérimental utilisé pour enregistrer le potentiel d'action global (PAG) au niveau du nerf sciatique. E_1 et E_2 : électrodes d'enregistrement ; S_1 et S_2 : électrodes de stimulation ; T : électrode de platine reliée à la terre (voir le texte pour plus de détails). La vitesse de propagation (v) du PAG est déterminée par le rapport de la distance (Δd) entre E_1 et S_1 sur la différence de temps (Δt) entre l'artefact de stimulation et l'amplitude maximale du PAG.

Pendant les périodes d'enregistrement, le nerf n'était au contact d'aucune solution afin d'éviter les courts-circuits. Cependant, la chambre d'expérience était couverte et l'humidité à l'intérieur était assurée par des boules de coton imbibées de la solution de Krebs-Ringer Mammifère.

Microscopie

Après les enregistrements électrophysiologiques, certains nerfs sciatiques ont été préparés afin d'être étudiés en microscopies optique et électronique à transmission. Pour cela, le nerf était épinglé de façon à ce que ses faisceaux de fibres soient droits, sur le fond recouvert de Rhodorsil d'une cuve en Plexiglas. La fixation de la préparation a été effectuée en remplaçant la solution physiologique par une solution de fixation contenant 0,2 M de cacodylate de sodium, 4 % de paraformaldéhyde et 3 % de glutaraldéhyde (pH = 7,4), pendant environ 1 heure à 4° C. Le nerf était ensuite préservé, pendant environ 12 heures à 4° C, dans une solution contenant 0,1 M de tampon phosphate et 0,6 % de glutaraldéhyde (pH = 7,4), puis découpé en fragments (d'environ 2 mm de longueur). Ces fragments étaient ensuite post-fixés, pendant 1 heure à température ambiante, dans une solution de tampon phosphate (0,2 M) contenant 2 % de tétroxyde d'osmium (acide osmique), puis déshydratés dans des solutions d'alcool graduel (de 70 à 100 %) avant d'être finalement enrobés et inclus dans de l'épon. Pour l'observation en microscopie optique, des coupes semifines (0,5 μ m), colorées au bleu de toluidine, ont été

effectuées. Pour l'observation en microscopie électronique à transmission (FEI CM100, 80 kv au), des coupes ultrafines (40 nm) ont été réalisées et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le potentiel d'action global (PAG), enregistré au niveau du nerf sciatique de souris, résulte de l'activité de l'ensemble des fibres nerveuses qui constituent le nerf. Dans un premier temps, nous avons donc recherché les conditions optimales d'enregistrement du PAG, c'est-à-dire les valeurs d'intensité et de durée de stimulation nécessaires pour provoquer l'activité de toutes les fibres nerveuses. Pour cela, le PAG a été enregistré au niveau de nerfs sciatiques non injectés en réponse à des stimulations d'intensité et de durée variables. Pour une valeur donnée de durée de stimulation (de 0,10 à 0,01 ms), l'amplitude du PAG augmente en fonction de l'intensité appliquée (0,1 à 15 V), ce qui traduit le recrutement d'un nombre croissant de fibres nerveuses (Fig. 3A et B). Lorsque la durée de stimulation est de 0,05 ou 0,10 ms, l'amplitude du PAG atteint une valeur stationnaire, similaire dans les deux cas, en réponse à des intensités de stimulation supérieures ou égales à environ 7 V : toutes les fibres du nerf répondent à la stimulation. En revanche, une stimulation de 0,01 ms est insuffisante pour recruter l'ensemble des fibres nerveuses puisque, dans ces conditions, l'amplitude maximale du PAG n'est que de 92 % comparée à celle obtenue après une stimulation de

0,10 ms (Fig. 3B et Tableau I). Il est à souligner que l'intensité de stimulation correspondant à 50 % de l'amplitude maximale du PAG est d'autant plus importante, et sa vitesse de propagation d'autant moins importante, que la durée de stimulation est faible (voir Tableau I). Par la suite, pour étudier les paramètres caractéristiques du PAG, nous avons donc appliqué aux nerfs sciatiques

injectés et non injectés des stimulations de 0,05 ms de durée et d'intensité variable (0,1 à 15 V). Cependant, dans chaque cas, nous avons systématiquement vérifié que ces conditions étaient bien des conditions optimales d'enregistrement du PAG, en appliquant également des stimulations de 0,10 ms de durée et d'intensité variable (0,1 à 15 V).

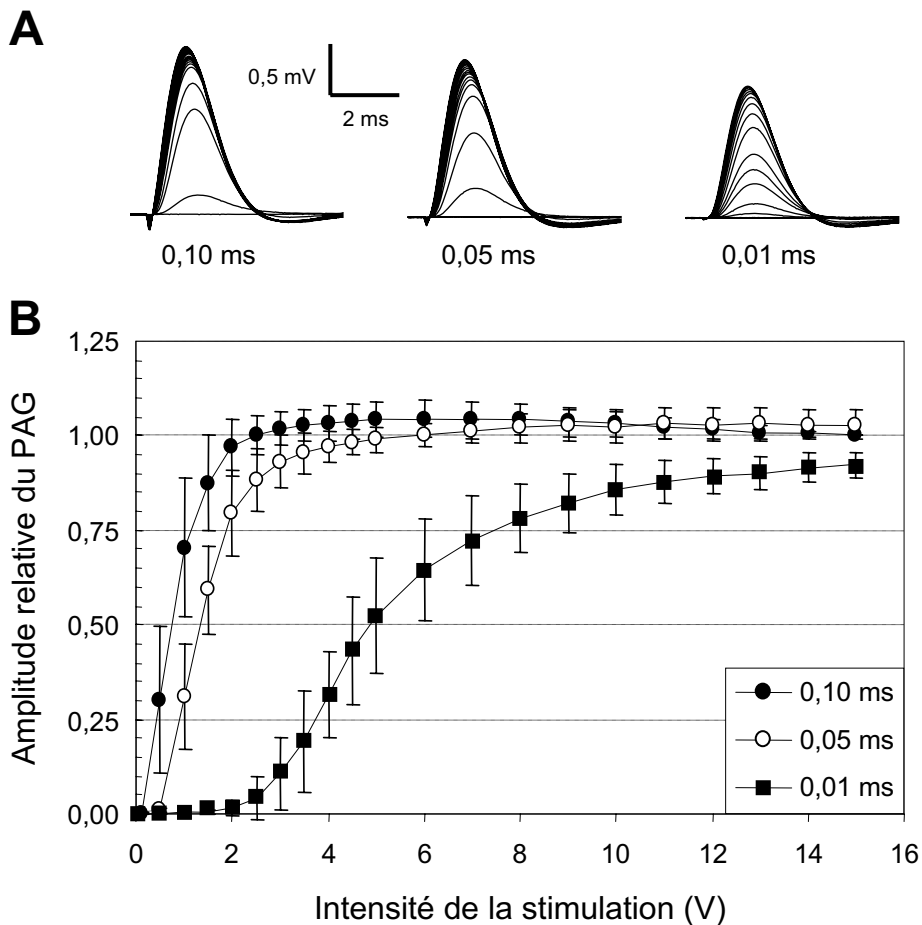


FIG. 3. – Effets de la durée et de l'intensité de la stimulation sur le PAG enregistré au niveau de nerfs sciatiques non injectés, isolés de souris. (A) Traces de PAG en réponse à des stimulations de 0,10 à 0,01 ms de durée et d'intensité variable (0,1 à 15 V). (B) Courbes exprimant l'amplitude du PAG en fonction de l'intensité de la stimulation. Pour chaque durée de stimulation, l'amplitude du PAG est exprimée par rapport à celle obtenue en réponse à une stimulation de 0,10 ms et de 15 V. Moyenne \pm ESM de 6 nerfs sciatiques.

TABLEAU I. – Paramètres caractéristiques déterminés d'après les PAG enregistrés en réponse à des stimulations de 0,10 à 0,01 ms de durée et d'intensité variable (0,1 à 15 V).

Durée de la stimulation	0,10 ms	0,05 ms	0,01 ms
Amplitude maximale du PAG (mV) (1)	1,92 \pm 0,46	1,97 \pm 0,05	1,78 \pm 0,05
Amplitude relative du PAG (2)	1,00 \pm 0,00	1,03 \pm 0,04	0,92 \pm 0,03
Intensité de stimulation correspondant à 50 % de l'amplitude maximale du PAG (V)	0,79 \pm 0,22	1,40 \pm 0,20	4,83 \pm 0,84
Vitesse de propagation du PAG (m/s)	7,50 \pm 0,46	6,49 \pm 0,87	6,47 \pm 0,99

(1) Amplitude mesurée après une stimulation de 15 V d'intensité.

(2) Amplitude mesurée après une stimulation de 15 V de durée variable et exprimée par rapport à celle mesurée après une stimulation de 15 V et de 0,10 ms. Moyenne \pm ESM de 6 nerfs sciatiques.

Jusqu'à 3 jours après l'injection de protéase (n = 28) ou de solution de Krebs-Ringer Mammifère (n = 6), les souris semblent gênées par la plaie suturée mais aucun trouble marquant de leur comportement locomoteur n'a été détecté. De plus, au niveau du PAG, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les nerfs sciatiques gauche et droit provenant de souris injectées avec la protéase (Fig. 4). L'amplitude maximale du PAG au niveau du nerf sciatique injecté (gauche), comparée au nerf sciatique non injecté (droit) est de $0,956 \pm 0,061$ (n =

4), ce qui indique que la conduction axonale n'est pas modifiée (voir aussi Fig. 6). Il est à noter que le nerf sciatique droit, qui n'a pas subi d'injection, est un très bon témoin puisqu'il provient du même animal que le nerf sciatique gauche qui a subi l'injection. Ces résultats suggèrent fortement que, dans nos conditions expérimentales, 3 jours ne sont pas suffisants pour que la protéase produise une démyélinisation apparente des fibres nerveuses.

Six jours après l'injection de protéase (n = 24), les souris se déplacent en traînant la patte gauche qui, de

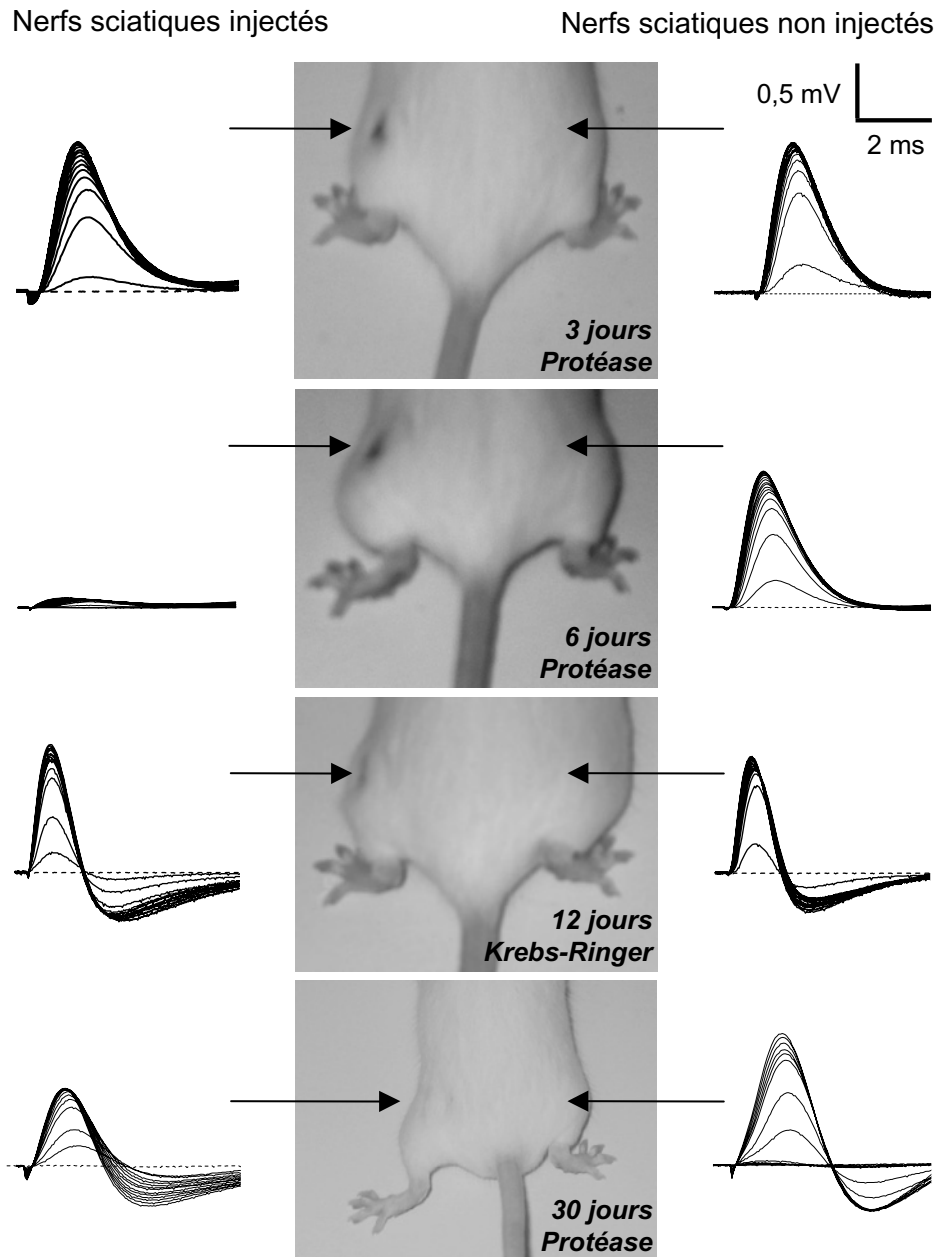


FIG. 4. – Effets d'une injection intrapérineurale de protéase de pancréas bovin (31 unités) ou de solution de Krebs-Ringer Mammifère (50 μ L) sur le comportement locomoteur des souris et le PAG enregistré au niveau de leurs nerfs sciatiques. Les photos et les enregistrements de PAG, en réponse à des stimulations de 0,05 ms de durée et d'intensité variable (0,1 à 15 V), ont été effectués aux temps indiqués.

plus, est fortement dissymétrique par rapport à la patte droite dont le nerf sciatique n'a pas été injecté (Fig. 6). De plus, l'amplitude maximale du PAG enregistré au

niveau des nerfs sciatiques injectés avec la protéase est fortement diminuée puisqu'elle est de $0,443 \pm 0,105$ ($n = 5$) par rapport aux nerfs sciatiques non injectés, ce

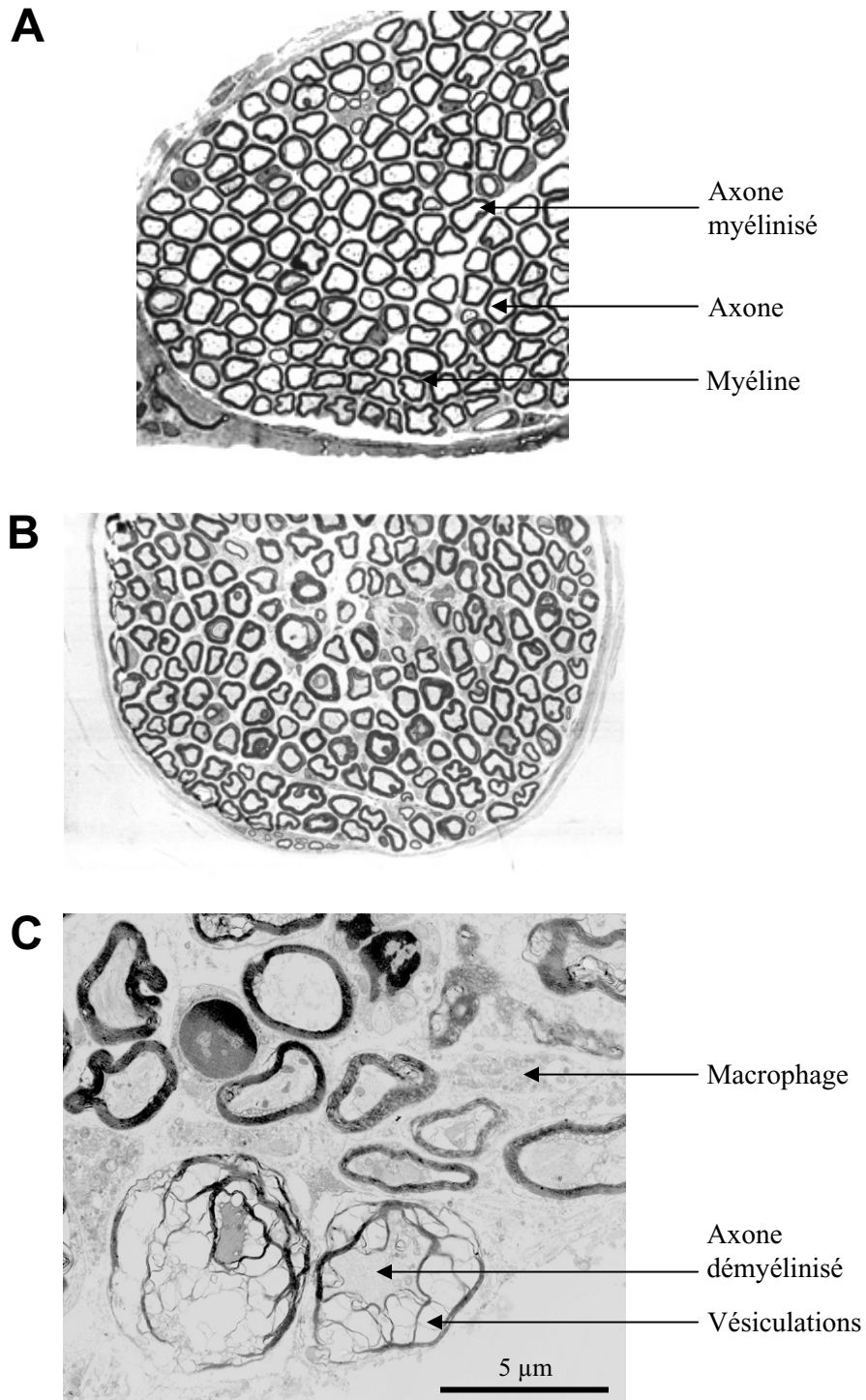


FIG. 5. – Photos de coupes transversales de nerfs sciatiques non injecté (A) et ayant subi (B et C) une injection intrapériéurale de protéase de pancréas bovin (31 unités) 6 jours auparavant. (A et B) Photos acquises par microscopie optique ($\times 100$). (C) Photo acquise par microscopie électronique à transmission.

qui indique une très forte modification de la conduction axonale (voir aussi Fig. 6). Ces résultats ne peuvent pas être la conséquence d'un éventuel traumatisme lié à la méthode d'injection. En effet, les souris ayant subi, 6 à 12 jours au préalable, une injection de solution de Krebs-Ringer Mammifère ($n = 6$) ne présentent aucun trouble dans leur comportement locomoteur. De plus, aucune différence significative entre leurs nerfs sciatiques gauche et droit n'est détectée au niveau du PAG (Fig. 4 et 6). Il apparaît donc que, dans nos conditions expérimentales, 6 jours sont suffisants pour que la protéase produise une démyélinisation des fibres nerveuses.

Afin de confirmer ces résultats, des coupes transversales ont été préparées à partir des nerfs sciatiques de souris ayant subi 6 jours auparavant une injection de protéase, puis observées en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission. L'observation des coupes de nerfs non injectés montre que la myéline est normale et que les espaces entre les axones sont réguliers (Fig. 5A). Au contraire, l'observation des coupes de nerfs injectés avec la protéase permet de mettre en évidence des altérations importantes (Fig. 5B et C). Ces altérations consistent en une fragmentation de la myéline, associée à des vésiculations, et en une augmentation d'éléments cellulaires, tels que des macrophages, dans l'interstice séparant les axones.

La démyélinisation des fibres nerveuses est toujours apparente 9 à 15 jours après l'injection de protéase dans l'espace périmérial et est qualitativement et quantitativement similaire à celle observée 6 jours après l'injection. En effet, les souris ($n = 3-19$) présentent encore des problèmes locomoteurs qui se traduisent par des déplacements en traînant la patte gauche dont le nerf sciatique a subi l'injection et qui, de plus, reste fortement dissymétrique par rapport à la patte droite. De plus, l'amplitude maximale du PAG enregistré au niveau des nerfs sciatiques injectés avec la protéase est toujours fortement

diminuée, de plus de 50 %, par rapport aux nerfs sciatiques non injectés. Elle est de $0,415 \pm 0,130$ ($n = 7$) après 9 jours, de $0,460 \pm 0,152$ ($n = 6$) après 12 jours et de $0,497 \pm 0,119$ ($n = 3$) après 15 jours (voir Fig. 6). Dans nos conditions expérimentales, la démyélinisation des fibres nerveuses, qui apparaît environ 6 jours après l'injection de protéase, est détectable jusqu'à environ 15 jours après l'injection. On note, pendant cette période, une surcharge pondérale d'environ 30 % chez les animaux ayant subi une injection de protéase, conséquence probable de la mobilité réduite.

Finale, 30 et 45 jours après l'injection de protéase dans l'espace périmérial, les souris ($n = 3$) se déplacent normalement malgré le fait que la très forte dissymétrie entre leurs pattes gauche et droite soit toujours apparente (voir Fig. 4). En revanche, l'amplitude maximale du PAG enregistré au niveau des nerfs sciatiques injectés avec la protéase n'est diminuée que d'environ 25 % ($0,733 \pm 0,102$) par rapport aux nerfs non injectés après 30 jours (voir Fig. 4), et n'est plus modifiée de façon significative ($0,982 \pm 0,028$) après 45 jours (voir aussi Fig. 6). Ces résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, 30 à 45 jours sont suffisants pour restaurer une conduction axonale normale.

CONCLUSION

En conclusion, les souris dont un des nerfs sciatiques est injecté avec de la protéase de pancréas bovin sont un bon modèle de neuropathie démyélinisante inflammatoire. Ce modèle murin pourra être utilisé pour tester l'aptitude de nouveaux agents pharmacologiques à contrebalancer la conduction nerveuse défectueuse des potentiels d'action survenant après une démyélinisation axonale, dans l'optique de développer de nouvelles molé-

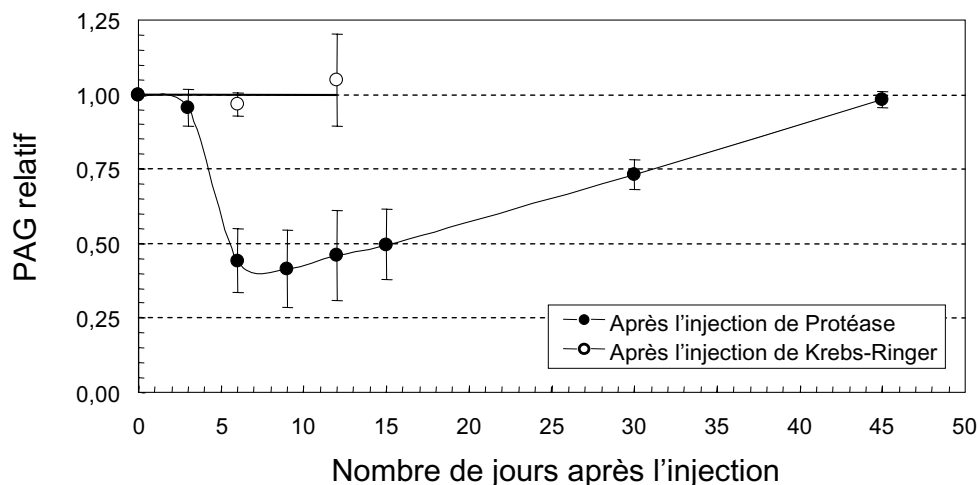


FIG. 6. – Effets d'une injection intrapérinéurale de protéase de pancréas bovin (31 unités) ou de solution de Krebs-Ringer Mammifère (50 μ L) sur l'amplitude maximale du PAG au niveau des nerfs sciatiques injectés, par rapport aux nerfs sciatiques non injectés. Le PAG, à des temps variables après l'injection, a été enregistré en réponse à des stimulations de 0,05 ms de durée et de 15 V d'intensité. Moyenne \pm ESM de 3 à 7 nerfs sciatiques.

cules utilisables dans le traitement de ce type de neuropathies.

Le principe utilisé pour contrebalancer une conduction axonale défectueuse au niveau d'un nerf, *i.e.* pour augmenter l'amplitude du PAG, consiste à prolonger la réponse individuelle des fibres nerveuses qui composent ce nerf, c'est-à-dire à inhiber les processus responsables de la phase descendante du potentiel d'action. Dans le cas des axones démyélinisés de mammifère, cette phase résulte à la fois de l'activation de canaux K^+ et de l'inactivation de canaux Na^+ . Les deux stratégies qui peuvent donc être envisagées pour contrebalancer une conduction axonale défectueuse, au niveau d'un nerf, sont d'inhiber spécifiquement soit le processus d'activation des canaux K^+ , soit le processus d'inactivation des canaux Na^+ . Il est à souligner que la première stratégie est actuellement la plus utilisée bien que la seconde soit très probablement plus efficace. C'est dans cette optique que nous allons

étudier les effets d'inhibiteurs de l'inactivation des canaux Na^+ en utilisant le modèle murin que nous avons mis au point.

Remerciements. – Nous tenons à remercier Morgane ROULOT (INAF, CNRS, Gif-sur-Yvette) pour son aide précieuse concernant l'expérimentation sur les souris.

BIBLIOGRAPHIE

- Cammer W., Bloom B. R., Norton W. T. & Gordon S., Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1978, 75, 1554-1558.
- Johnston R. B., Monocytes and macrophages. *New Engl. J. Med.*, 1983, 318, 747-752.
- Said G. & Hontebeyrie-Joskowicz M., Nerve lesions induced by macrophage activation. *Res. Immunol.*, 1992, 143, 589-599.