



HAL
open science

La Microspectroscopie Infra-Rouge : une méthode innovante pour suivre l'évolution de la maladie de Pompe dans le modèle murin GAA-KO 6neo/6neo

Lydie Lagalice, Elliot Gougeon, Laurence Dubreil, Sylvie Durand, Johan Deniaud, Francesca Franzoso, Karl Rouger, Marie-Anne Colle

► To cite this version:

Lydie Lagalice, Elliot Gougeon, Laurence Dubreil, Sylvie Durand, Johan Deniaud, et al.. La Microspectroscopie Infra-Rouge : une méthode innovante pour suivre l'évolution de la maladie de Pompe dans le modèle murin GAA-KO 6neo/6neo. XXXème congrès de l'AFH: les nouveaux mondes de l'histologie, Jun 2017, Nantes, France. 2017. hal-01595126

HAL Id: hal-01595126

<https://hal.science/hal-01595126>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

La Microspectroscopie Infra-Rouge : une méthode innovante pour suivre l'évolution de la maladie de Pompe dans le modèle murin GAA-KO 6^{neo}/6^{neo}

Lydie Lagalice^{1,5}, Eliot Gougeon^{1,5}, Laurence Dubreil¹, Sylvie Durand², Johan Deniaud¹, Francesca Franzoso¹, Karl Rouger^{1,*} et Marie-Anne Colle^{1,*}

¹ PanTher, INRA, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Université Bretagne Loire (UBL), Nantes, 44307, France ; ² UR1268 BIA (Biopolymères Interactions Assemblages), INRA, Nantes 44300, France ; ⁵ Les deux premiers auteurs et deux derniers auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.

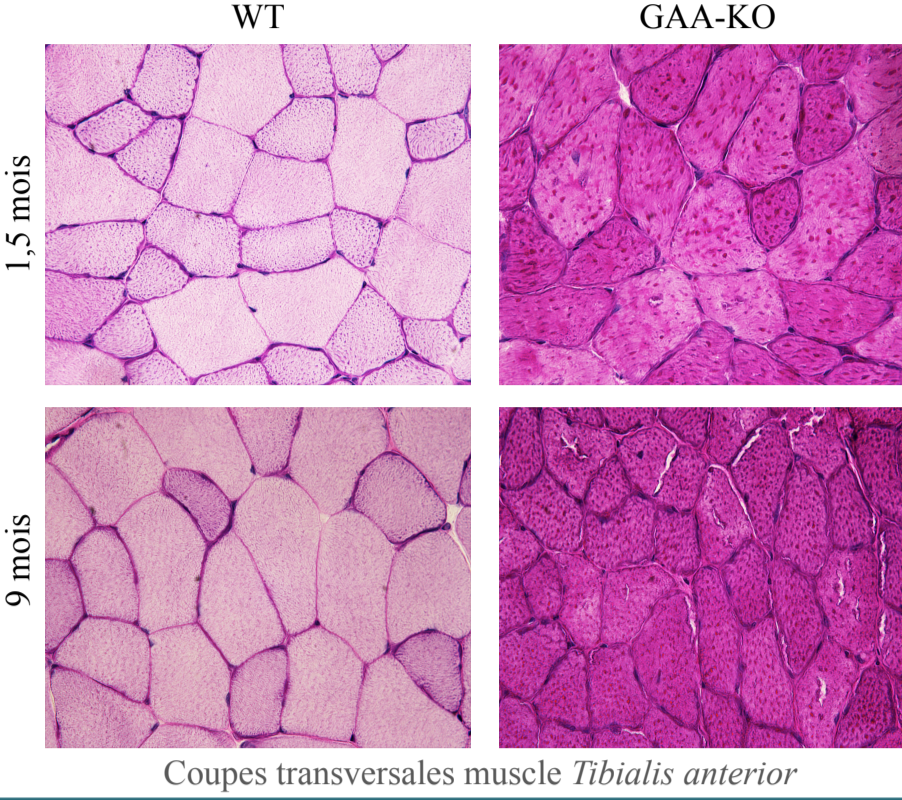
Contexte scientifique et objectifs

La **maladie de Pompe** (glycogénose de type II) est une maladie autosomique récessive rare, causée par le **déficit en alpha-glucosidase acide (GAA)**, seule enzyme permettant la dégradation du glycogène en glucose dans les lysosomes. Il en résulte une **accumulation lysosomiale ubiquitaire de glycogène**, qui est particulièrement sévère dans le cœur et les muscles squelettiques.

L'enzymothérapie substitutive, seul traitement actuellement disponible, a permis d'augmenter l'espérance de vie des patients atteints de la forme infantile en corrigeant efficacement la surcharge cardiaque. Cependant, cette thérapie s'avère très peu efficace sur le muscle squelettique dont la pathogénie n'est encore que partiellement connue.

Objectifs : → Pour renseigner plus finement l'évolution de la pathogénie, nous avons caractérisé l'atteinte physiopathologique du muscle squelettique d'une **cohorte de souris Pompe malades (GAA-KO 6^{neo}/6^{neo})** en fonction de la progression de la maladie.
→ Afin d'obtenir une **vision globale des modifications biochimiques** ayant lieu dans le muscle squelettique pathologique, nous avons appliqué une technique de **microspectroscopie infra-rouge** sur ces souris.

Evaluation de la surcharge en glycogène par la coloration au PAS



Coloration de référence à l'Acide Périodique de Schiff (PAS) : mise en évidence des polysaccharides des tissus

- ✓ Coloration rapide permettant d'observer la surcharge en lumière blanche
- ✗ Coloration non spécifique du glycogène
- Variabilité de coloration entre les séries de lames traitées
- Quantification difficile

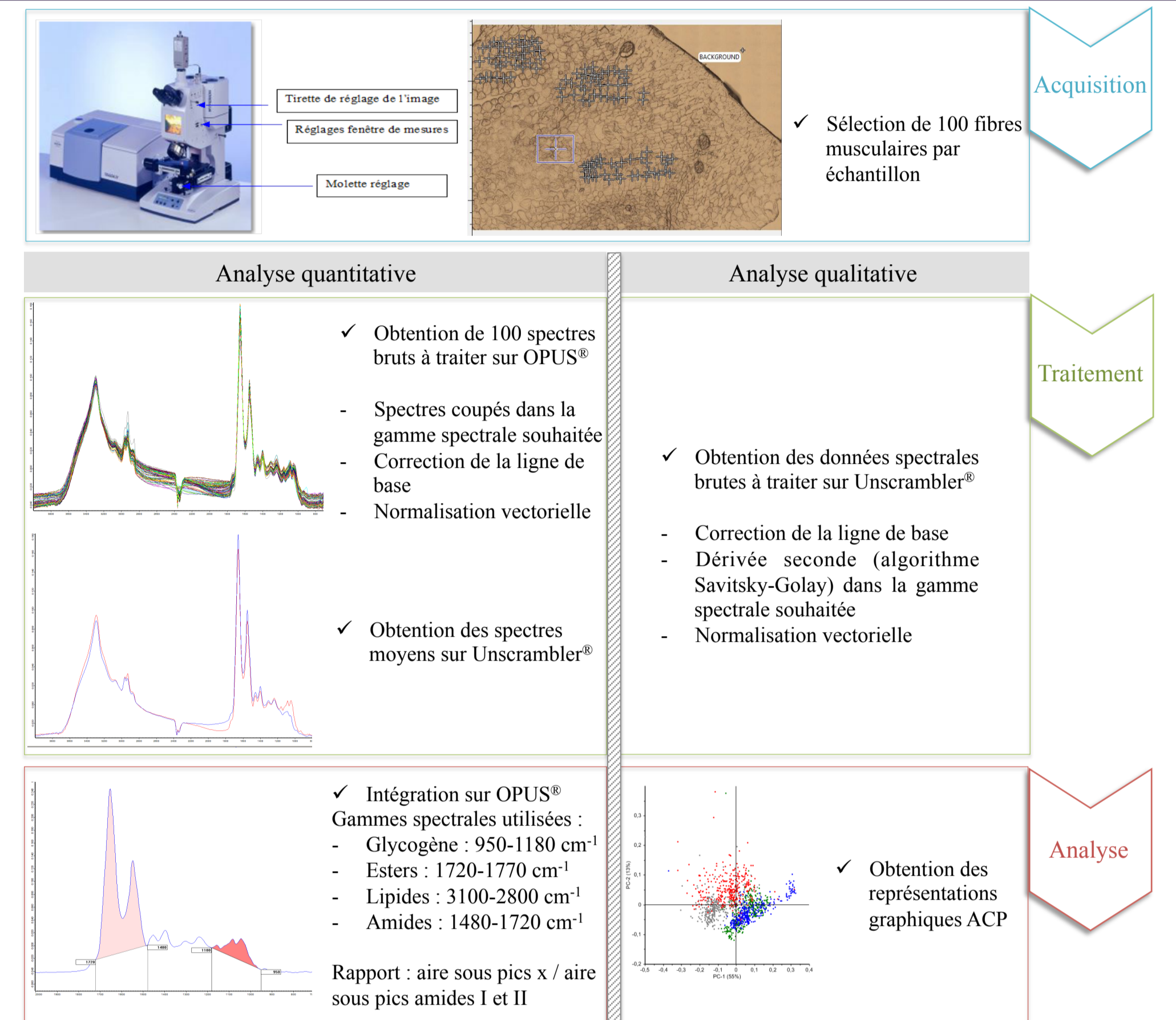
⇒ Muscles des souris GAA-KO : surcharge en glycogène dès 1,5 mois. La coloration ne permet pas d'évaluer l'évolution de la surcharge entre les âges précoce et tardif

Principe de la Microspectroscopie Infra-Rouge

La spectroscopie infra-rouge permet de déterminer la **nature des liaisons chimiques** présentes dans une molécule à partir de leurs **fréquences de vibration**. Les protéines, les acides nucléiques, les glucides et les lipides sont ainsi caractérisés par des **bandes d'absorption spécifiques** dans le domaine de l'infra-rouge (Movasaghi *et al.*, 2008). La microspectroscopie infra-rouge combine la spectroscopie infrarouge et la microscopie permettant de déterminer la **carte chimique** d'un échantillon biologique avec une résolution spectrale de 8 cm⁻¹ et une résolution spatiale proche de 20 μm pour les systèmes utilisés en laboratoire.

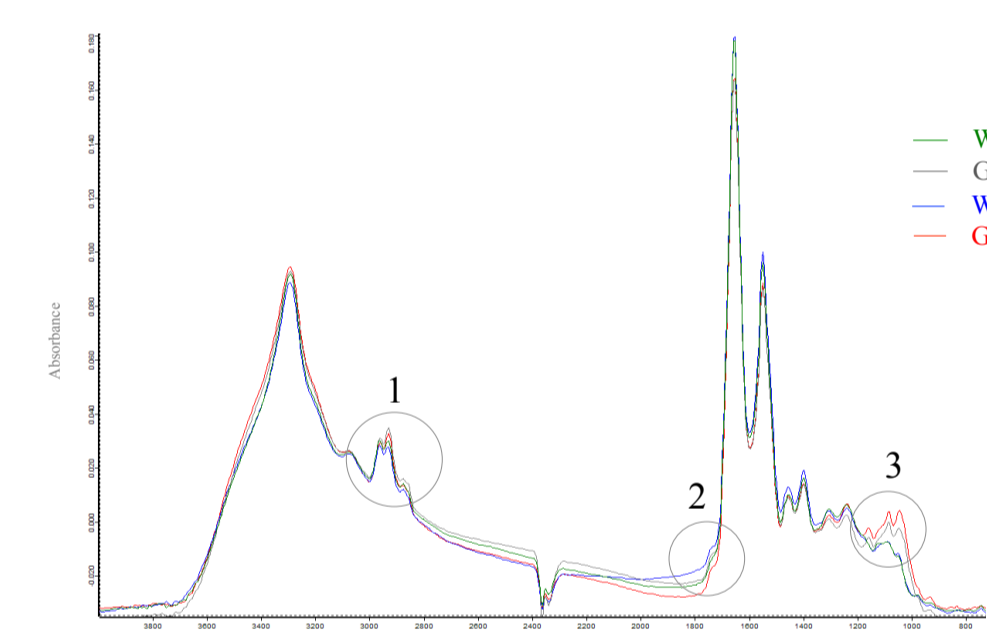
Matériel et Méthodes

- **Animaux** : des souris Pompe malades (GAA-KO 6^{neo}/6^{neo}; Raben *et al.*, 1998) et des souris saines sauvages (WT) ont été euthanasiées à l'âge de 1,5 et 9 mois (n=3 souris par groupe). Le muscle *Tibialis anterior* (TA) a été prélevé.
- **Congélation des échantillons** : le TA a été congelé à -150°C (dans l'isopentane refroidi par azote liquide) sur gomme adhérente, puis a été stocké à -80°C.
- **Cryosections** : des cryosections d'une épaisseur de 10 μm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat et déposées sur des lames multispectrales de sulfate de zinc polies (Crystran Limited).
- **Acquisition et traitement des spectres** : un spectromètre infra-rouge Tensor 27 (Bruker) équipé avec un microscope Hyperion 2000 a été utilisé pour collecter les spectres dans la gamme spectrale 4000 – 700 cm⁻¹ avec une résolution spectrale de 8 cm⁻¹ et une résolution spatiale de 20 μm x 20 μm. Une centaine de fibres a été analysée par coupe (300 scans par fibre moyennés pour obtenir 100 spectres par coupe). Les logiciels OPUS® et Unscrambler® ont été utilisés pour traiter les spectres bruts. Le processus d'obtention des spectres est illustré ci-contre.
- **Analyse en composantes principales (ACP)** : l'ACP permet de faire une **représentation graphique** à partir de données comportant un nombre élevé de variables quantitatives, en revenant à un espace de dimension réduite tout en déformant le moins possible la réalité. Cela est réalisé en effectuant un changement de repère défini par de nouveaux axes, appelés composantes principales. L'ACP donne ainsi une **modélisation des données spectrales** en révélant les différences entre les spectres. Chaque fibre musculaire est représentée par un point sur le graphique.
- **Rapport d'aire des pics** : les données spectrales peuvent être **quantifiées** en réalisant des rapports d'aires de pics. Par exemple, pour quantifier la surcharge en glycogène, une intégration a été réalisée, portant sur les pics attribués au glycogène (1025, 1080 et 1152 cm⁻¹) et les pics attribués aux amides I et II (1550 et 1650 cm⁻¹) (Movasaghi *et al.*, 2008), ces derniers étant choisis comme référence car ils ne varient pas avec la maladie.
- **Statistiques** : les résultats sont représentés en "moyenne ± SEM". Des ANOVA bi-variées ont été réalisées, suivies d'un test de comparaisons multiples (Newman-Keuls). Une p-value ≤ 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Le degré de significativité est présenté comme *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, ****p<0,0001



Spectre IR spécifique des fibres musculaires des souris GAA-KO

➤ Gamme spectrale entière



⇒ Les différences observées sur les spectres entiers mettent en évidence plusieurs régions discriminantes, parmi lesquelles :

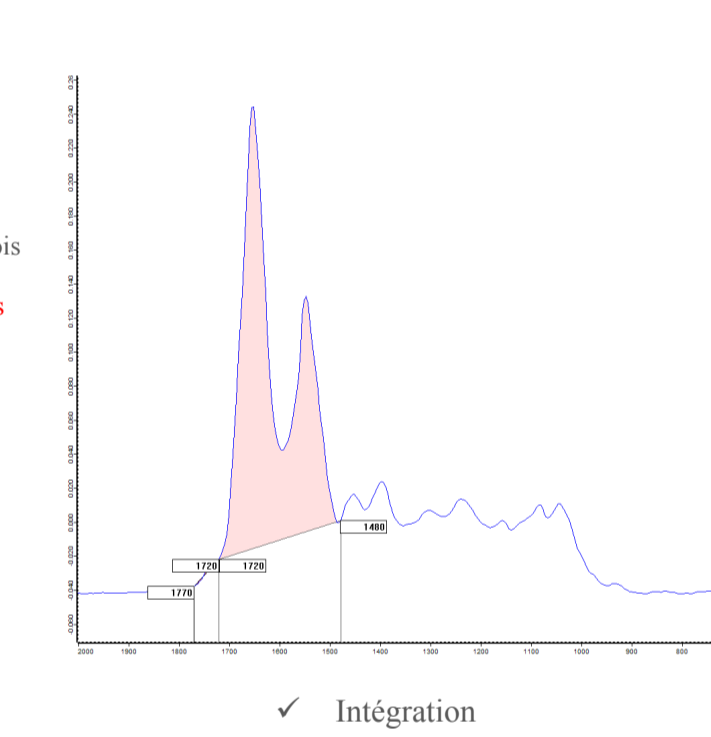
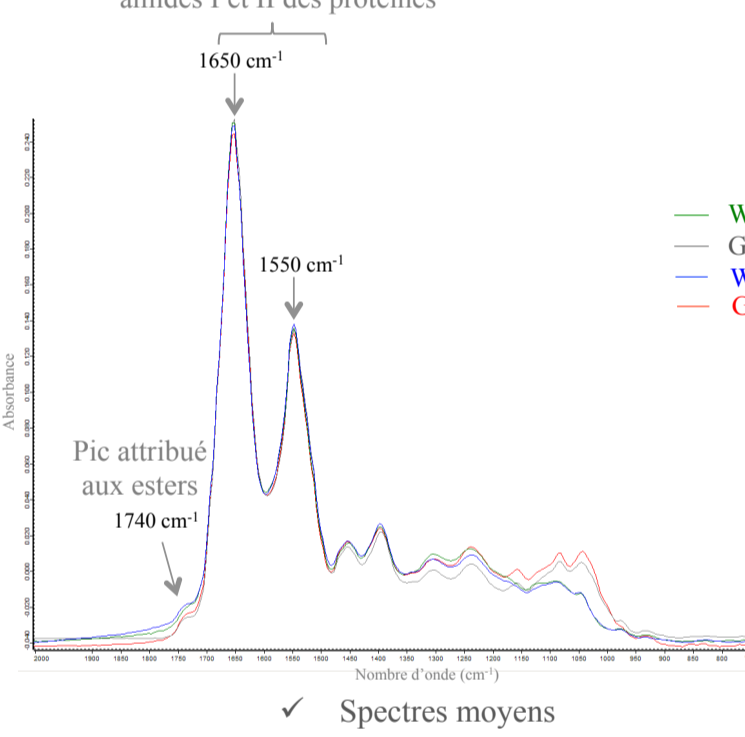
- 1- Pics des liaisons C-H des lipides
- 2- Pics des liaisons esters
- 3- Pics du glycogène

(Attribution des pics d'après Movasaghi *et al.*, FTIR Spectroscopy of Biological Tissues, 2008)

Nouveaux biomarqueurs potentiels de la maladie de Pompe

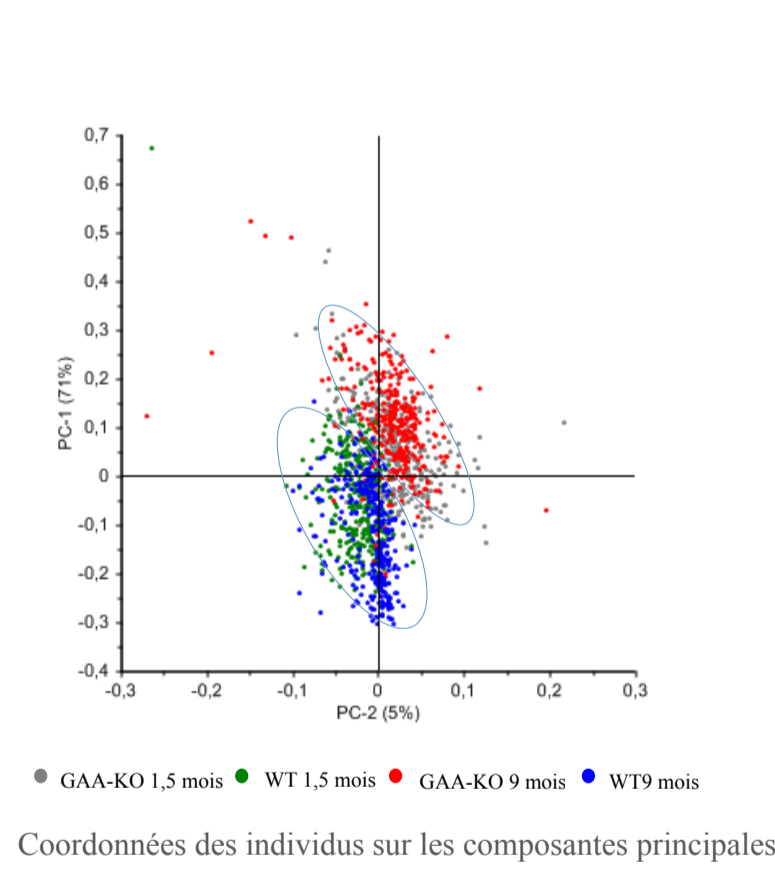
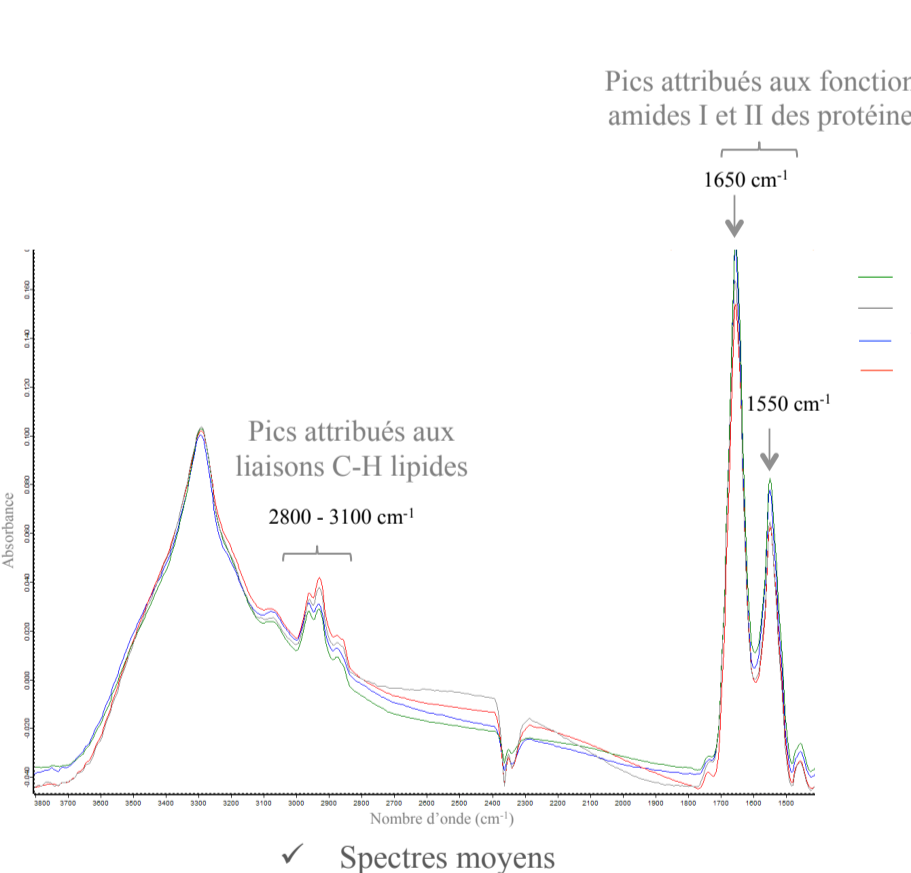
➤ Gamme spectrale des esters

Pics attribués aux fonctions amides I et II des protéines



⇒ **Augmentation des liaisons esters chez les souris GAA-KO âgées par rapport aux souris saines. Progression avec la pathologie**

➤ Gamme spectrale des lipides

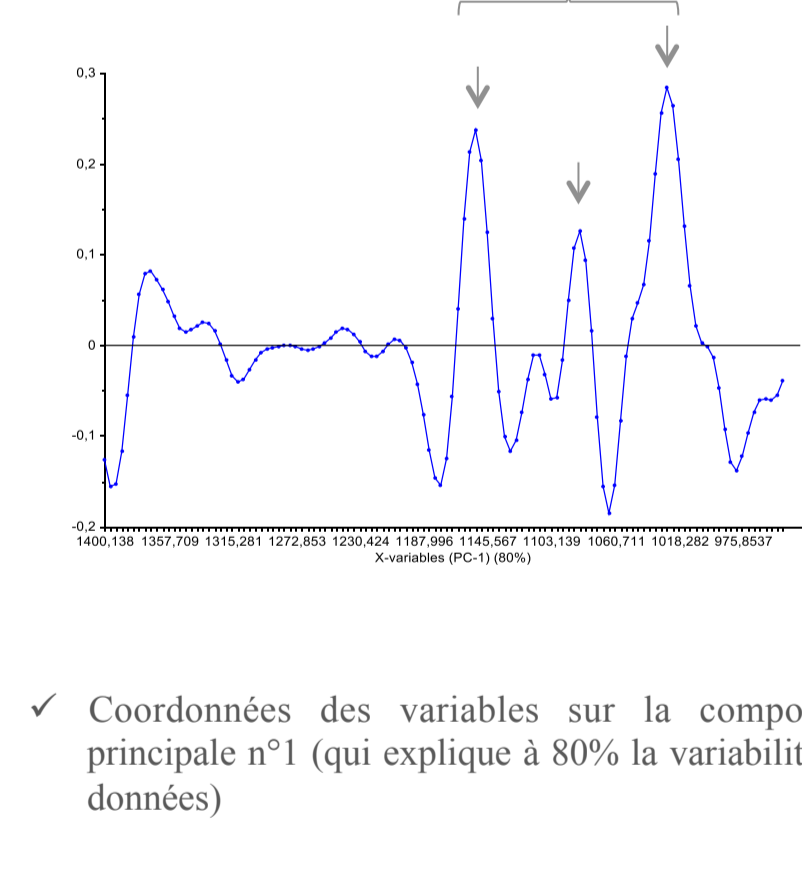
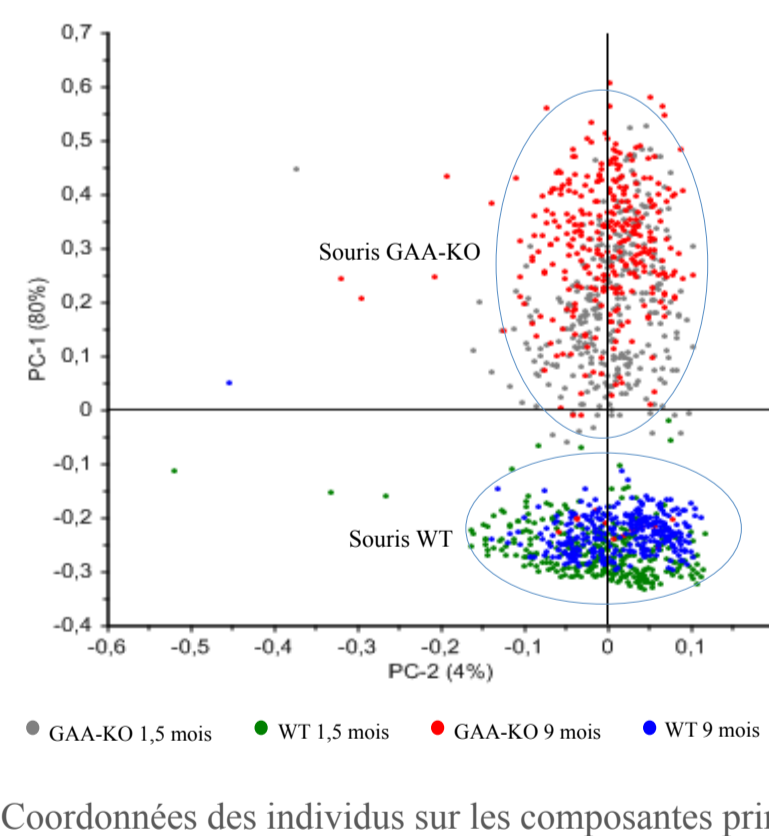
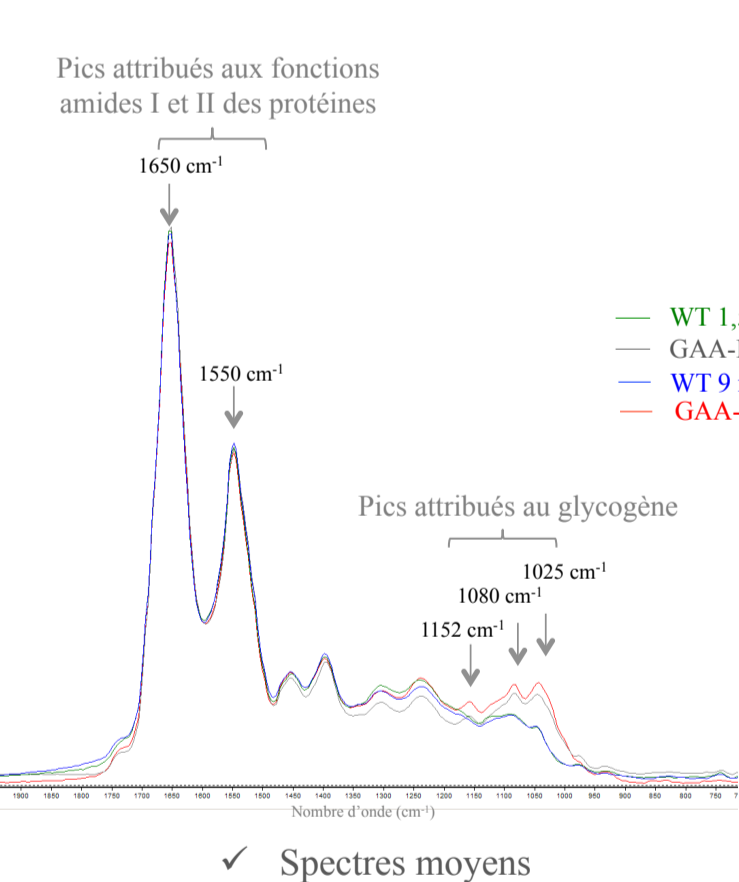


⇒ **Augmentation des lipides chez les souris GAA-KO âgées par rapport aux souris saines**

⇒ Les esters et les lipides pourraient constituer de nouveaux biomarqueurs de la maladie. **Hypothèse** : les liaisons esters ayant une signature entre 1739 et 1744 cm⁻¹ sont attribuées aux triglycérides et au cholestérol (Ozek *et al.*, 2014). L'accumulation dans le muscle des souris GAA-KO de vésicules lysosomiales et autophagiques (Lim *et al.*, 2015), dont les membranes sont notamment composées de cholestérol (Bagshaw *et al.*, 2005), pourrait être à l'origine des augmentations observées.

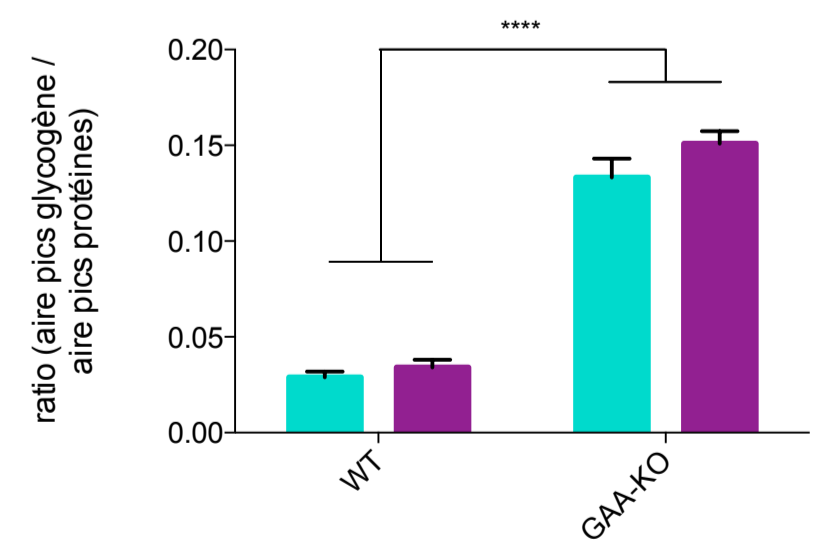
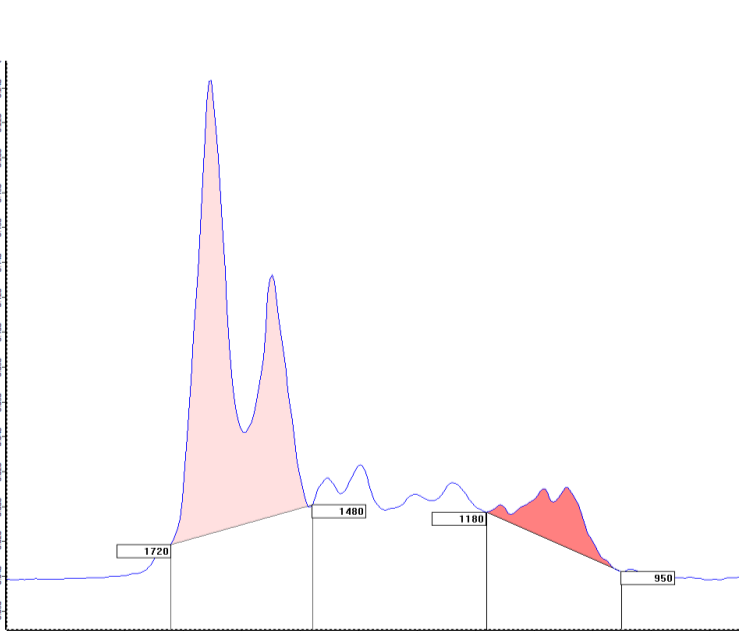
Détection et quantification de la surcharge en glycogène

➤ Gamme spectrale du glycogène



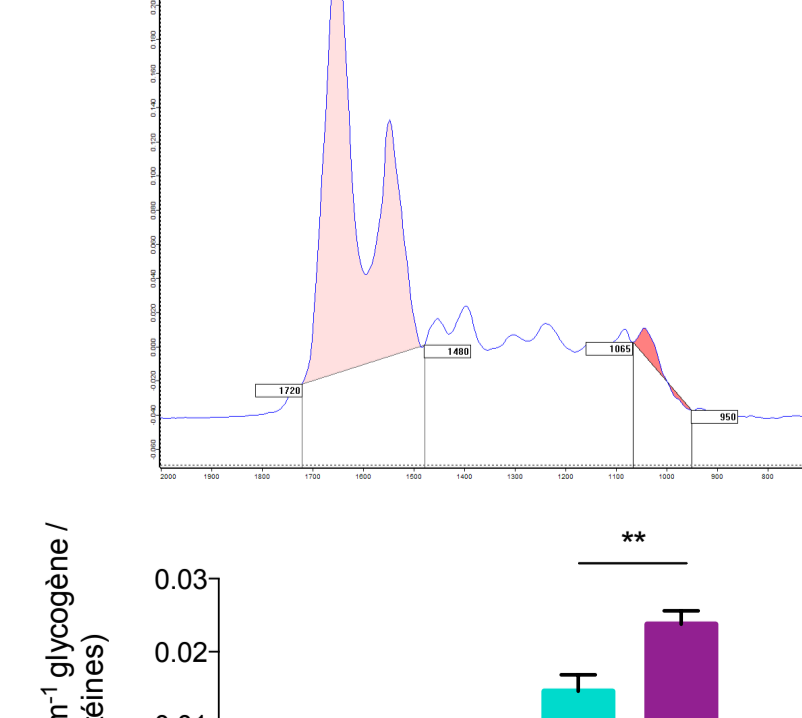
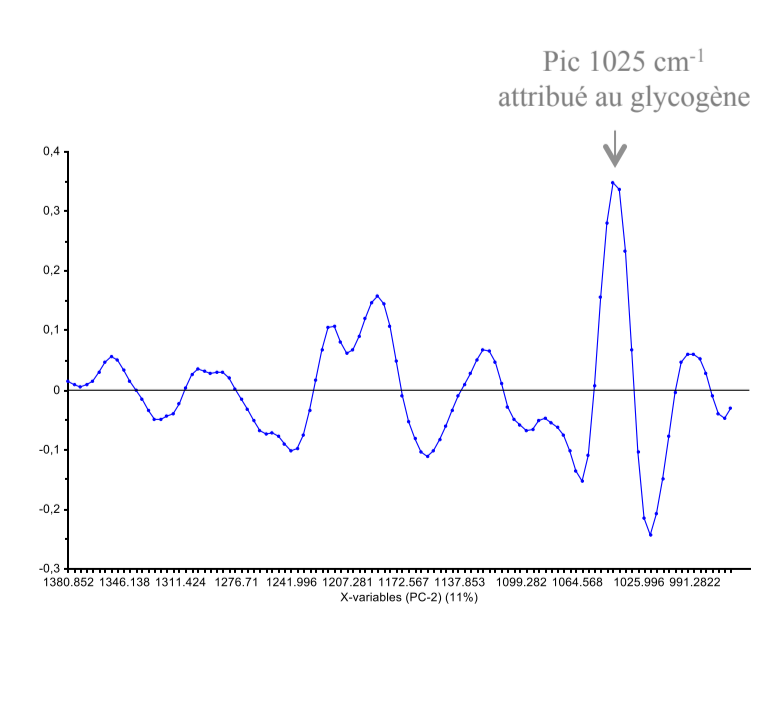
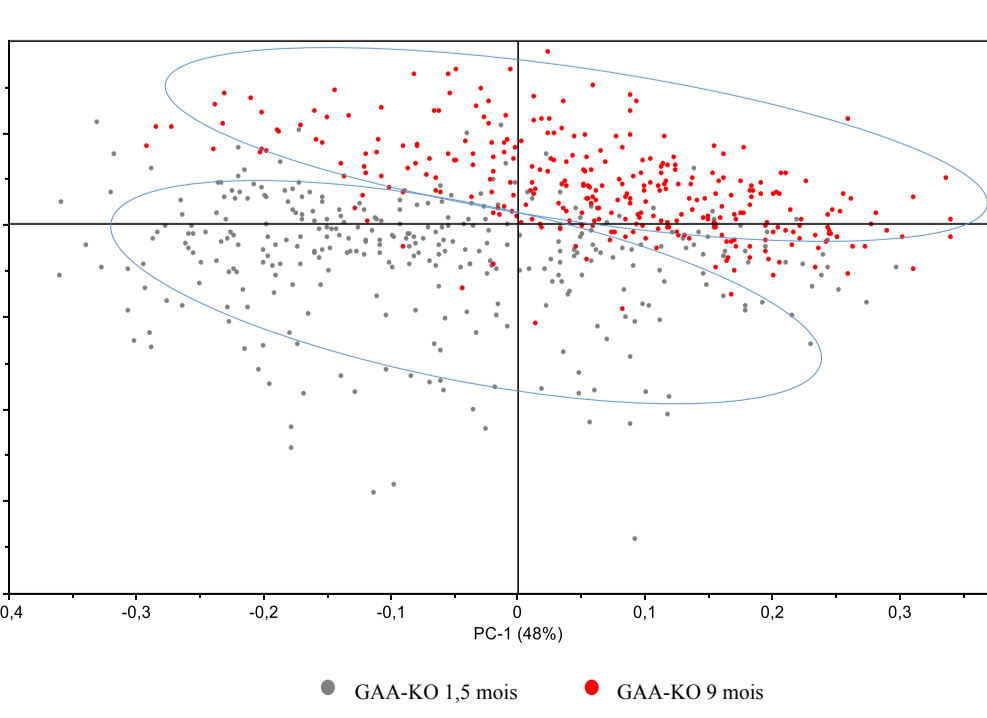
✓ Coordonnées des variables sur la composante principale n°1 (qui explique à 80% la variabilité des données)

➔ Quantification



⇒ **Observation de deux nuages de points attestant de la présence d'une surcharge en glycogène dans le muscle squelettique des souris GAA-KO, qui est confirmée par quantification des aires sous pics**

Différence spectrale du glycogène avec la progression de la maladie



✓ Coordonnées des variables sur la composante principale n°2 (qui explique à 11% la variabilité des données)

⇒ **Observation de deux nuages de points différenciant les souris GAA-KO selon leur âge**, avec l'augmentation du rapport associé au pic 1025 cm⁻¹ du glycogène. Ceci pourrait attester d'une évolution de la structure du glycogène avec la progression de la pathologie.

Conclusion

La microspectroscopie infra-rouge a permis de :

- **Cartographier le glycogène** sur des coupes de muscle de souris GAA-KO versus souris saines sans réaliser de coloration préalable grâce à la détection des trois pics d'absorption en infra-rouge spécifiques du glycogène 1025, 1080 et 1152 cm⁻¹.
- **Chiffrer les différences observées** entre les souris saines et malades par l'intégration des pics attribués au glycogène, ce qui est très difficile à réaliser à partir d'une coloration PAS.
- Mettre en évidence le pic à 1025 cm⁻¹ qui apparaît comme étant un marqueur discriminant entre les souris GAA-KO jeunes et les souris GAA-KO adultes. Cette différence de signature spectrale du glycogène en fonction de l'âge des souris malades n'a pour l'instant jamais été décrite dans la littérature.
- Mettre en évidence de **nouveaux biomarqueurs potentiels de la maladie de Pompe**, en exploitant le spectre infra-rouge en dehors du glycogène : à 2935 cm⁻¹ (région des C-H) et 1730 cm⁻¹ (région des esters). L'imagerie par spectrométrie de masse est une piste envisagée pour identifier la nature de ces biomarqueurs dont certains sont probablement liés aux dysfonctionnements lysosomiaux et autophagiques.

⇒ La microspectroscopie infra-rouge apparaît être une méthode prometteuse pour suivre l'évolution de la maladie et un outil puissant pour évaluer l'efficacité d'agents thérapeutiques.

Remerciements : Nous remercions le soutien de la région Pays de la Loire et NeurATRIS