



**HAL**  
open science

**Licence 2: Biologie Programmation épigénétique dans le  
bulbe olfactif en lien avec l'environnement maternel:  
cartographie de la 5-méthylation et de la  
5-hydroxyméthylation**

Christine Baly, Sébastien Boyer

► **To cite this version:**

Christine Baly, Sébastien Boyer. Licence 2: Biologie Programmation épigénétique dans le bulbe olfactif en lien avec l'environnement maternel: cartographie de la 5-méthylation et de la 5-hydroxyméthylation. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03338342

**HAL Id: hal-03338342**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03338342>**

Submitted on 8 Sep 2021

**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.

**Licence 2 : Biologie**

**Programmation épigénétique dans le bulbe olfactif en lien avec  
l'environnement maternel : cartographie de la  
5-méthylation et de la 5-hydroxyméthylation**

Soutenu le 20 / 05 / 2021 par Camille BOUBET

Directeur de laboratoire : Pascale CHAVATTE-PALMER

Maître de stage : Christine BALY

Enseignant référent : Sébastien BLOYER

Centre de Recherche INRAE de Jouy-en-Josas, Domaine de Vilvert, 4 avenue Jean Jaurès,  
78352 Jouy-en-Josas Cedex  
Unité de Biologie de la Reproduction, ENvironnement, Épigénétique et Développement -  
UMR 1198

## Remerciements

## **Abréviations**

BO : Bulbe Olfactif

MO : Muqueuse Olfactive

TA : Température Ambiante

ADN : Adénosine DéoxyriboNucléotide

BREED : Biologie de la Reproduction, Environnement, Épigenétique et Développement

PFA : paraformaldéhyde

PBS : Phosphate Buffered Saline

BSA : Bovine Serum Albumine

5 hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5 mC : 5-méthylcytosine

# Sommaire

## Introduction

Le système olfactif .....	1
L'épigénétique.....	2

## Matériels et Méthodes

Animaux et prélèvement des BO .....	3
Immunohistochimie.....	3

## Conclusion

Mise en place d'un protocole d'immunohistochimie.....	?
Cartographie de la 5-méthylation et 5-hydroxyméthylation dans les BO de souris.....	?

Bibliographie.....	?
--------------------	---

## Annexes

Mise en place du protocole d'immunohistochimie.....	?
Fiche des solutions préparées.....	?

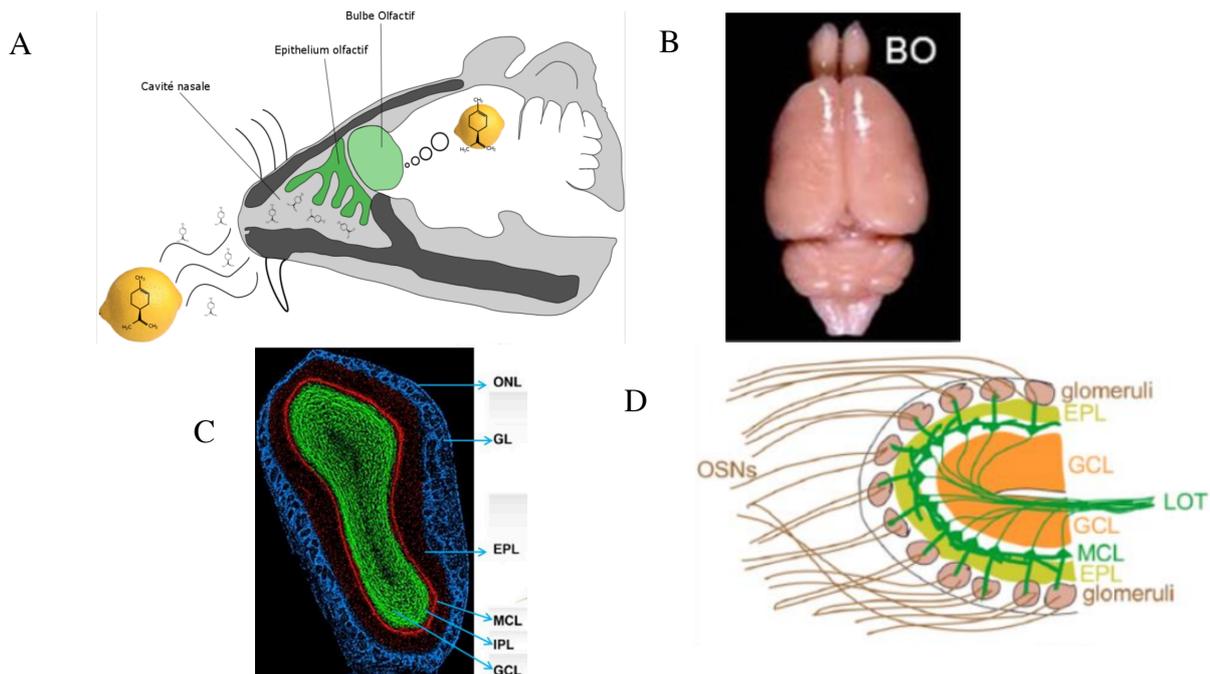
# Introduction

## I. Le système olfactif

L'odorat est un sens majeur chez les animaux car il permet de collecter de nombreuses informations chimiques sur leur environnement et est capable d'impacter leur comportement notamment pour se reproduire, fuir ou encore se nourrir. C'est seulement depuis les années 1990 que l'étude des mécanismes impliqués dans le traitement de l'information olfactive s'est accélérée grâce à la découverte des gènes codant pour les récepteurs olfactifs chez le rongeur par Linda Buck et Richard Axel, qui ont reçu le prix Nobel pour leurs travaux pionniers dans ce domaine [1].

Chez le rongeur, le système olfactif principal est un système pair. De ce fait, on trouve chez l'animal, deux BO et deux MO identiques disposés de part et d'autre du septum, qui est la cloison médiane séparant les deux cavités nasales (**Figure 1A**). La MO se compose de cinq cornets, et chaque cornet forme un repli cartilagineux recouvert d'un neuroépithélium olfactif baignant dans une couche de mucus nasal [1].

Le bulbe olfactif est le premier relai nerveux de l'information olfactive en provenance des neurones sensoriels de la muqueuse. Chez le rongeur, cette structure est la plus antérieure du cerveau, elle est de forme ovoïde et est composée de six couches concentriques de cellules nerveuses et gliales (**Figure 2B et C**).



**Figure 1** : Organisation des différentes couches cellulaires du BO - A. Cerveau entier de rat avec les deux BO en partie antérieure - B. Coupe de BO - adapté de Zou et al, 2009 - ONL : olfactory nerve layer / couche du nerf olfactif, GL : glomerular layer / couche glomérulaire, EPL : external plexiform layer / couche plexiforme externe, MCL : mitral cell layer / couche des cellules mitrales, IPL : internal plexiform layer / couche plexiforme interne, GCL : granule cell layer / couche des cellules granulaires - C. Schéma de l'organisation du BO

A chaque inspiration, les odorants constitutifs d'une odeur se fixent individuellement à des récepteurs olfactifs situés à la surface dendritiques du neurone sensoriel olfactif réceptif (OSN) qui baigne dans le mucus de la cavité nasale. Ceci permet l'activation d'une cascade de transduction

aboutissant à l'émission d'un potentiel d'action qui se propage le long de l'axone vers le BO (**Figure 2D**). Chaque OSN n'exprime qu'un seul récepteur majoritaire et son axone se projette vers une ou deux structures sphériques du BO, le glomérule, où convergent les axones de tous les neurones isoréceptifs. Il existe environ 1300 types de récepteurs olfactifs et 1800 glomérules chez la souris. C'est au sein de ces derniers que les axones des OSN forment des synapses avec des neurones neuromodulateurs locaux qui vont affiner le message sensoriel par la libération de neurotransmetteurs au niveau des neurones périglomérulaires, mitrales ou granulaires. Le signal résultant est envoyé vers le cortex olfactif primaire, qui le relaie au thalamus (perception consciente), à l'amygdale (système limbique = émotion) ou à l'hippocampe (mémoire).

## II. L'épigénétique

Nos cellules contiennent toutes la même information génétique au sein de leur noyau. Cependant, elles remplissent des rôles différents et n'expriment pas les mêmes gènes selon leur état de différenciation. Comment des cellules ayant le même génome n'ont-elles pas le même rôle au sein de notre corps ? Nous pouvons répondre à cette question grâce à la notion de processus épigénétique, émise par C.H. Waddington en 1942. Il propose l'existence de changements induits par l'environnement cellulaire, dans l'activité des gènes, sans modifications de la séquences d'ADN, se manifestant à long terme, pouvant être transmis lors de la division cellulaire [2]. Si certaines de ces modifications sont transitoires, d'autres sont stables, malgré l'arrêt du stimulus qui les a activées. Elles peuvent donc être transmises à la génération suivante à travers des mécanismes non pas génétique, mais épigénétiques [3]. Ces processus participant notamment à la différenciation cellulaire ont été particulièrement étudiés chez l'embryon, ils expliquent aussi la transmission inter-générationnelle de certains phénotypes.

De nombreuses marques épigénétiques potentielles ont été identifiées sur la chromatine. Il s'agit de modifications post-traductionnelles des histones ou de modifications chimiques/enzymatiques de certaines bases de l'ADN. Elles modulent le niveau de compaction de l'ADN et interfèrent avec la transcription des gènes, pour l'inhiber ou l'activer. Parmi elles, l'addition de groupes méthyle sur certaines séquences de l'ADN comme les sites CpG a été étudiée ces dernières années, car elle affecte fortement la transcription des gènes. La découverte récente d'une possible transformation chimique des sites méthylcytosine (5mC) en hydroxyméthylcytosine (5hmC) a ouvert un nouveau champ d'investigation, en particulier dans le cerveau où elles semblent très riches, mais où ses fonctions biologiques sont encore relativement peu connues [4]. Plusieurs études leur attribuent un rôle pour expliquer les effets à long terme de facteurs environnementaux, comme le stress, l'alimentation, ou l'exercice (Kochmanski and Bernstein, 2020). On ne dispose encore que de peu d'outils pour les étudier.

## III. Problématique scientifique

L'unité BREED a pour objectif de comprendre et maîtriser les mécanismes de programmation épigénétique au cours de la vie prénatale permettant la naissance d'un individu en bonne santé, fertile et capable de s'adapter aux changements de son environnement. L'équipe MeCP2 (Mécanismes épigénétiques et construction - prédiction des phénotypes), dans laquelle j'ai fait mon stage, s'intéresse aux effets du contexte gestationnel sur le phénotype métabolique et comportemental des descendants dans un modèle de souris [6].

Avant mon arrivée, C. Baly et A. Gabory ont démontré que la trajectoire pondérale de la mère (obésité ou perte de poids préconceptionnelle) influence les performances olfactives de la descendance [7]. Les animaux nés de mères « perte de poids » présentent des déficits olfactifs à l'âge adulte. L'équipe vise à expliquer les mécanismes de mémorisation de l'environnement précoce dans le système olfactif des descendants, en étudiant le profil de méthylation et

d'hydroxyméthylation des BO issus des souris de cette étude. Ce projet se décompose en trois objectifs principaux :

- mettre en place un protocole d'immunohistochimie permettant de localiser les marques de 5-méthylation et de 5-hydroxyméthylation dans les BO de souris pour identifier les types cellulaires potentiellement touchés.

- développer une méthode de dosage du niveau de méthylation/hydroxyméthylation des ADN des BO de souris pour quantifier leurs niveaux respectifs

- développer une méthode d'identification des sites génomiques 5-hydroxyméthylés dans les tissus cérébraux olfactifs, adaptée de la méthode de la méthylation, RRBS et enfin d'identifier finement le différentiel de méthylation et d'hydroxyméthylation dans les BO d'individus mâles nés de mères contrôle (CTRL) et perte de poids (WL) du projet TPMP.

Lors de ce stage, j'ai essentiellement été impliquée dans la première tâche. J'ai eu comme objectif de mettre au point le protocole d'immunohistochimie afin de réaliser la cartographie de la 5-méthylation et de la 5-hydroxyméthylation dans les BO de souris. Les BO étant des tissus assez hétérogènes, je devais également observer où était présente la marque de 5-hydroxyméthylation en fonction du type cellulaire.

## Matériels et méthodes

### II. Animaux et prélèvement des BO

Les échantillons de BO ont été prélevés directement sur des souris adultes euthanasiées, puis ont été fixés (PFA 4% + PBS 1X ; 48 h à 4°C). Pour les expériences d'immunohistochimie, les BO sont cryoprotégés (sucrose 30% en PBS 1X; 48h à 4°C) puis placés dans une solution d'enrobage (Tissue-Tek O.C.T Compound) que l'on congèle avec les vapeurs d'azote liquide puis sont stockés à -80°C. Les coupes des tissus sont réalisés à l'aide d'un cryostat Leica CM1950 (14 µm ; à -20°C) puis stockées à -80°C.

### II. Immunohistochimie

Cette technique consiste à localiser des protéines et autres antigènes au sein d'une section de tissu à l'aide d'anticorps primaires spécifiques, suivi de la liaison d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore.

La fixation formaldéhyde des tissus crée des ponts de méthylène entre les protéines, ce qui masque partiellement l'antigène et peut empêcher la liaison antigènes-anticorps. La récupération de l'antigène par un démasquage permet de casser ce pont et donc de libérer les sites d'antigènes permettant ainsi à l'anticorps de se fixer.

Les lames sont sorties du congélateur (20 min ; température ambiante (TA)) puis lavées (PBS 1X ; 2x5min ; TA) afin de les réhydrater. Elles sont ensuite plongées dans une solution de saturation (Glycine 0,1M / BSA 1% ; 30 min ; TA) puis dans une solution tampon (Citrate de sodium 0,01M ; pH6 ; 30 min à 90°C) qu'on laisse refroidir pendant 20 min.

Il est ensuite nécessaire de bloquer des protéines afin de prévenir des liaisons non spécifiques entre l'anticorps et le tissu et ainsi limiter les erreurs de résultats. Pour cela on incube nos lames dans une solution dénaturante (HCl 1,5N ; 30 min ; TA). Cette étape de dénaturation de l'ADN permet l'obtention d'un simple brin de ce dernier ce qui permettra une meilleure fixation des anticorps. Les lames sont ensuite lavées (PBS 1X ; 2x5 min ; TA). Les lames sont déposées dans une solution de saturation (PBS 1X/ Triton 0,25%/ BSA 1% ; 2h ; TA) ainsi que du sérum 10% d'âne pour les lames où l'on veut détecter la marque 5 hmC ou du sérum 10% de chèvre pour les lames où l'on veut détecter la marque 5 mC dans le but de réduire les interactions non spécifiques des anticorps.

On incube ensuite nos lames avec les anticorps primaires qui ont été préalablement testés et validés. On utilise un anticorps de lapin pour les lames 5 hmC et un anticorps de souris pour les lames 5 mC. Les deux anticorps sont respectivement dilués au 1/2000e et au 1/500e dans une solution de PBS 1X/ BSA 1%. Les lames sont ensuite incubées dans une solution saturante (PBS 1X/ lait 0,1% ; 4x10 min ; TA).

Les lames sont mises en contact avec l'anticorps secondaire, âne anti-lapin pour les lames 5 hmC et chèvre anti-souris pour les lames 5 mC, tous les deux dilués au 1/2000e dans une solution PBS 1X / BSA 1% (2h ; TA ; dans le noir). On réalise le reste des manipulations sous papier aluminium (dans le noir) car si les anticorps secondaires sont maintenus à la lumière, les photons qu'ils reçoivent vont les exciter et on va perdre en intensité de fluorescence au cours du temps. Les lames sont lavées ( PBS 1X ; 3x15 min ; TA) puis sont placées dans une solution de coloration (Hoechst ; 10 min ; TA), le colorant Hoechst ayant pour cible les acides nucléiques qui seront révélés par une coloration bleue. On effectue un montage lame/ lamelle que l'on fixe avec du vernis transparent puis on laisse nos lames pendant 48h au réfrigérateur.

## Résultats et discussion

### I. Mise au point du protocole d'immunohistochimie

Afin de pouvoir localiser les marques de 5mC et de 5hmC dans les BO de souris adultes, nous avons dû mettre au point un protocole d'immunohistochimie. Notre première immunohistochimie a été réalisée à partir d'un protocole tiré de la littérature (**Annexe 1, Condition A**). Cependant, nous avons observé avec ce dernier un bruit de fond non négligeable sur nos coupes pour les deux marques. En effet, on remarque pour la révélation de la marque 5hmC (**Annexe 3B**) un fort bruit de fond dans le vert voire même un signal dans certains noyaux. Or, l'anticorps secondaire utilisé pour visualiser la marque 5hmC (**Annexe 2**) émet de la fluorescence dans le rouge et non dans le vert. On en déduit que le protocole utilisé dans cette manipulation est à améliorer afin de pouvoir obtenir des coupes avec moins de bruit de fond. De même, pour la marque 5mC (**Annexe 3A**), on visualise un bruit de fond important dans le vert pour les témoins, alors que ces derniers n'ont pas reçu l'anticorps primaire. On ne devrait donc pas avoir de signal dans les noyaux. Le bruit de fond dans le rouge est notamment dû à l'autofluorescence de certaines protéines contenues dans les vaisseaux sanguins à cette longueur d'onde.

Suite à ce premier essai, nous avons mis en place plusieurs autres conditions expérimentales en modifiant certains paramètres par rapport à ce premier protocole dans le but de minimiser au maximum ce bruit de fond (**Annexe 1, Conditions B, C et D**). Une alternative à ce protocole, mise en place pour ces trois nouvelles conditions, a consisté à précéder le démasquage par une étape dans une solution de saturation de glycine pour diminuer le seuil d'autofluorescence du tissu. Ces résultats nous ont permis de tirer plusieurs conclusions.

Tout d'abord pour la marque 5mC, on observe de manière générale dans chaque condition un bruit de fond non négligeable dans les témoins (**Annexe 4A**). Une explication à ceci est le fait que nous avons fait une erreur dans la manipulation en mettant l'anticorps primaire aux coupes contrôles. Néanmoins, le bruit de fond retrouvé dans toutes les conditions n'est pas acceptable pour permettre une conclusion quant à la positivité ou non des noyaux marqués. Le protocole reste donc à améliorer pour cette marque.

Enfin, pour la marque 5hmC (**Annexe 4B**), on remarque en condition D (traitement HCl sans citrate) que l'on perd complètement le signal. En effet, l'anticorps secondaire censé émettre de la fluorescence dans le rouge est invisible. On en déduit donc que le traitement citrate est nécessaire pour visualiser la marque 5hmC au sein des BO de souris. On observe ensuite du signal dans les noyaux pour les deux autres conditions B et C. Nous avons donc décidé de passer à un grossissement plus fort (X40) afin d'avoir plus de précision quant au marquage dans les noyaux (**Annexe 5**). La plus forte intensité du marquage dans les noyaux retrouvée dans la condition B nous a permis de trancher entre ces deux conditions.

Ces trois protocoles différents nous ont permis de déterminer lequel permettait d'avoir le moins de bruit de fond mais également un marquage assez intense afin de conclure sur la positivité ou non des noyaux marqués. La condition retenue est donc la condition B qui est celle ayant un traitement citrate et un traitement HCl. On peut émettre l'hypothèse que l'association de ces deux étapes est nécessaire afin d'obtenir un ADN suffisamment ouvert facilitant ainsi la fixation des anticorps sur ce dernier.

L'immunohistochimie suivante a consisté à reprendre le protocole de la condition B en modifiant une seule étape (trois bains de 5 minutes de PBS après le traitement HCl et non deux) (**Annexe 1 Condition E**). Cependant, en plus de réaliser le marquage de la 5mC et de la 5hmC, nous avons testé d'autres anticorps primaires (**Annexe 2**). L'anticorps IBA 1 permettant de localiser

les cellules gliales, TH qui localise les cellules périglomérulaires, GFAP localisant les astrocytes et enfin  $\beta$ -tub III qui permet la détection des neurones.

En ce qui concerne la marque 5mC, nous avons l'impression au grossissement x20 qu'aucun noyau n'est marqué (**Annexe 6A**). C'est pourquoi nous avons choisi de pousser l'observation des coupes au grossissement X40. Avec ce grossissement, nous pouvons observer que la plupart des cellules périglomérulaires, mitrales et granulaires sont marquées par la 5mC. Néanmoins, nous pouvons tout de même souligner que ce marquage reste relativement faible. De plus, on observe que peu de cellules de la plexiforme externe sont marquées. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces cellules ne sont généralement pas porteuses de la marque 5mC ou alors qu'elles possèdent une quantité très faible de la marque qui fait qu'on ne peut les localiser de manière précise.

Pour la marque 5hmC, on remarque que cette dernière est présente dans beaucoup de types cellulaires du BO des souris adultes (**Annexe 6B**). En effet, la marque visualisée par le signal rouge est fortement localisée au niveau des cellules périglomérulaires et granulaires. De plus, on voit un gradient d'intensité de la marque au sein des cellules mitrales qui laisse penser que toutes les cellules de ce type cellulaire ne possèdent pas la même quantité de 5hmC au sein de leur ADN. Enfin, on peut observer dans la couche plexiforme externe que certaines cellules ne sont quasiment pas marquées. De ce fait, nous pouvons également émettre l'hypothèse qu'il existe un différentiel de cellules marquées par la 5hmC au sein de cette couche cellulaires des BO.

Nous avons profité de cette immunohistochimie pour tester divers anticorps afin de voir si ces derniers résistaient aux différents traitements (**Annexe 7**). Les trois anticorps TH, GFAP et  $\beta$ -tub III ont résisté et nous avons pu identifier les types cellulaires contre lesquels ils étaient dirigés (**Annexe 7A,B et C**). Cependant, l'anticorps IBA 1 n'a pas fonctionné (**Annexe 7D**). L'hypothèse la plus plausible de cet échec est le fait que cet anticorps soit dirigé contre les cellules gliales humaines et non de souris. Ces trois anticorps maintenant vérifiés, nous allons pouvoir essayer d'effectuer un co-marquage entre la 5hmc et ces derniers dans le but de voir une éventuelle co-localisation.

## II. Cartographie de la 5-méthylation et 5-hydroxyméthylation dans les BO de souris

## Bibliographie

- [1] <https://hal.inrae.fr/tel-02790768/document>
- [2] <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/epigenetique#>
- [3] <https://www.jove.com/t/54416/detection-modified-forms-cytosine-using-sensitive>
- [4] <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01163606/document>
- [5] <https://hal.inrae.fr/tel-02790768/document>
- [6] <https://www6.jouy.inrae.fr/breed/Les-Recherches/Les-equipes-de-recherche/Mecanismes-epigenetiques-et-contruction-prediction-des-phenotypes-MECP2>
- [7] <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/5/948>

## Annexes

### Annexe 1

Conditions		A	B	C	D	E
Fixation des tissus	PFA 4% en PBS 48h; 4°C			X		
Inclusion	Sucrose 30% >3j; 4°C			X		
Réhydratation	PBS 1X; 2x5'; TA			X		
Saturation	Glycine 0,1M; 30'; TA	/			X	
Démasquage de l'antigène	Citrate de sodium		X		/	X
Dénaturation ADN/neutralisation	1,5 HCl en H2O/PBS1X	X		/	X	X (2N HCl)
Lavages	PBS 1X ; 2x5' ; TA		X			X (3x5')
Saturation	PBS-Triton 0,25%-BSA 0,1% + sérum	X		X (BSA 1%)		X (Triton 0,5%-BSA2%)
incubation anticorps primaire	PBS-BSA 0,1%	X		X (BSA 1%)		X (BSA2%)
Lavages	PBS-lait 0,1%;4x10'; TA			X		
Incubation anticorps secondaire	PBS-BSA0,1%	X		X (BSA 1%)		X (BSA 2%)
Lavages	PBS1X; 3x15'; TA			X		
Coloration Hoechst	1/1000e en PBS			X		
Montage	Vectashield			X		

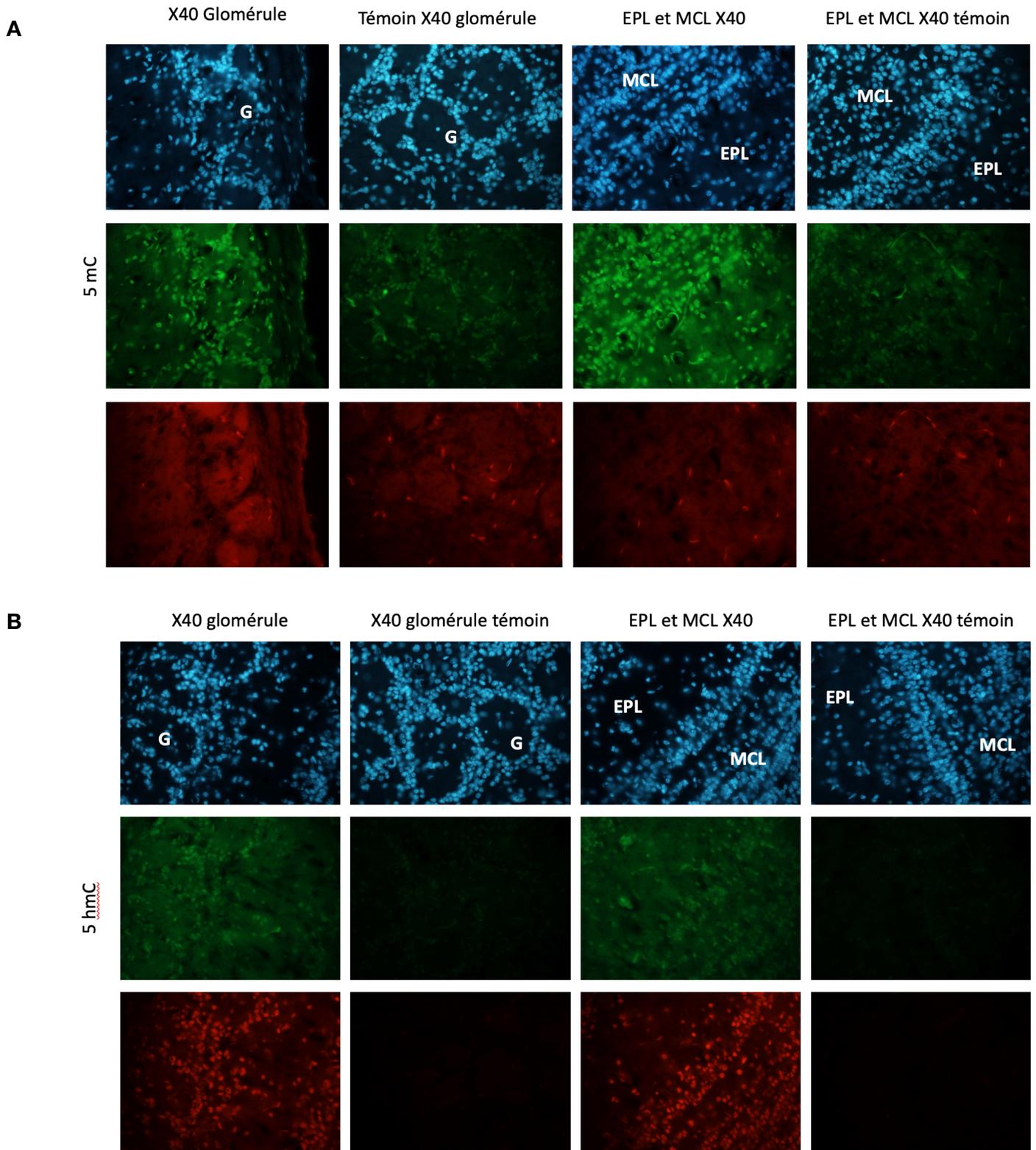
**Tableau 1** : protocoles des immunohistochimies réalisées. X : étape réalisée. / : étape non réalisée. Les annotations dans les cases correspondent aux changements de protocole par rapport à la première immunohistochimie réalisée (condition A).

### Annexe 2

Anticorps testés	Entreprise	Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
5hmC	active motif	Lapin	1/2000e	âne	1/3000e
5mc clone 33D3	abcam	Souris	1/500e	chèvre	1/3000e
Iba 1 ab5076	abcam	chèvre	1/1000e	âne	1/3000e
TH ab129991	abcam	Souris	1/1000e	chèvre	1/3000e
GFAP ga5	invitrogène	Souris	1/1000e	chèvre	1/3000e
β-tub III 2g10	invitrogène	Souris	1/1000e	chèvre	1/3000e

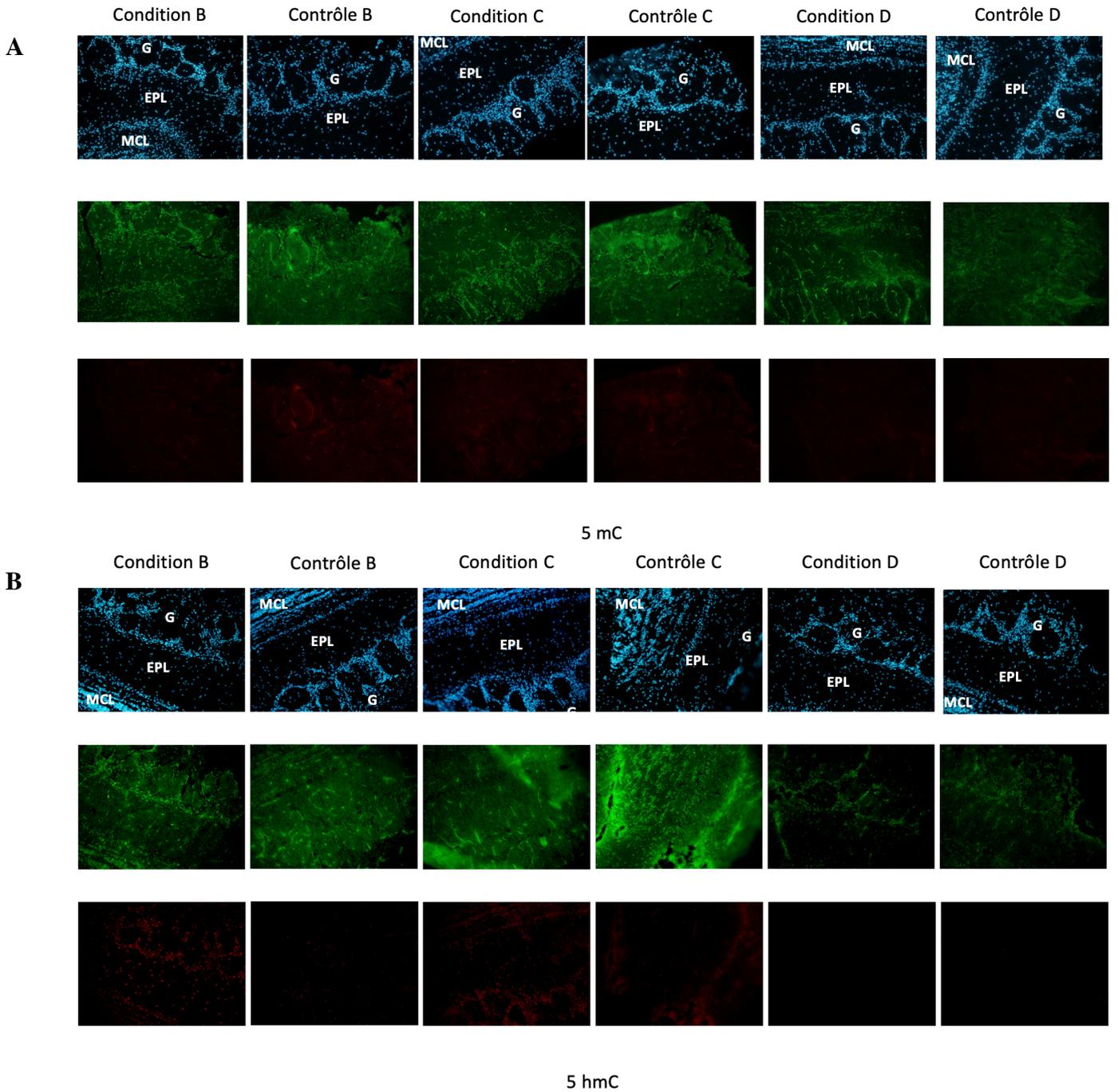
**Tableau 2** : anticorps utilisés dans les protocoles d'immunohistochimie

### Annexe 3



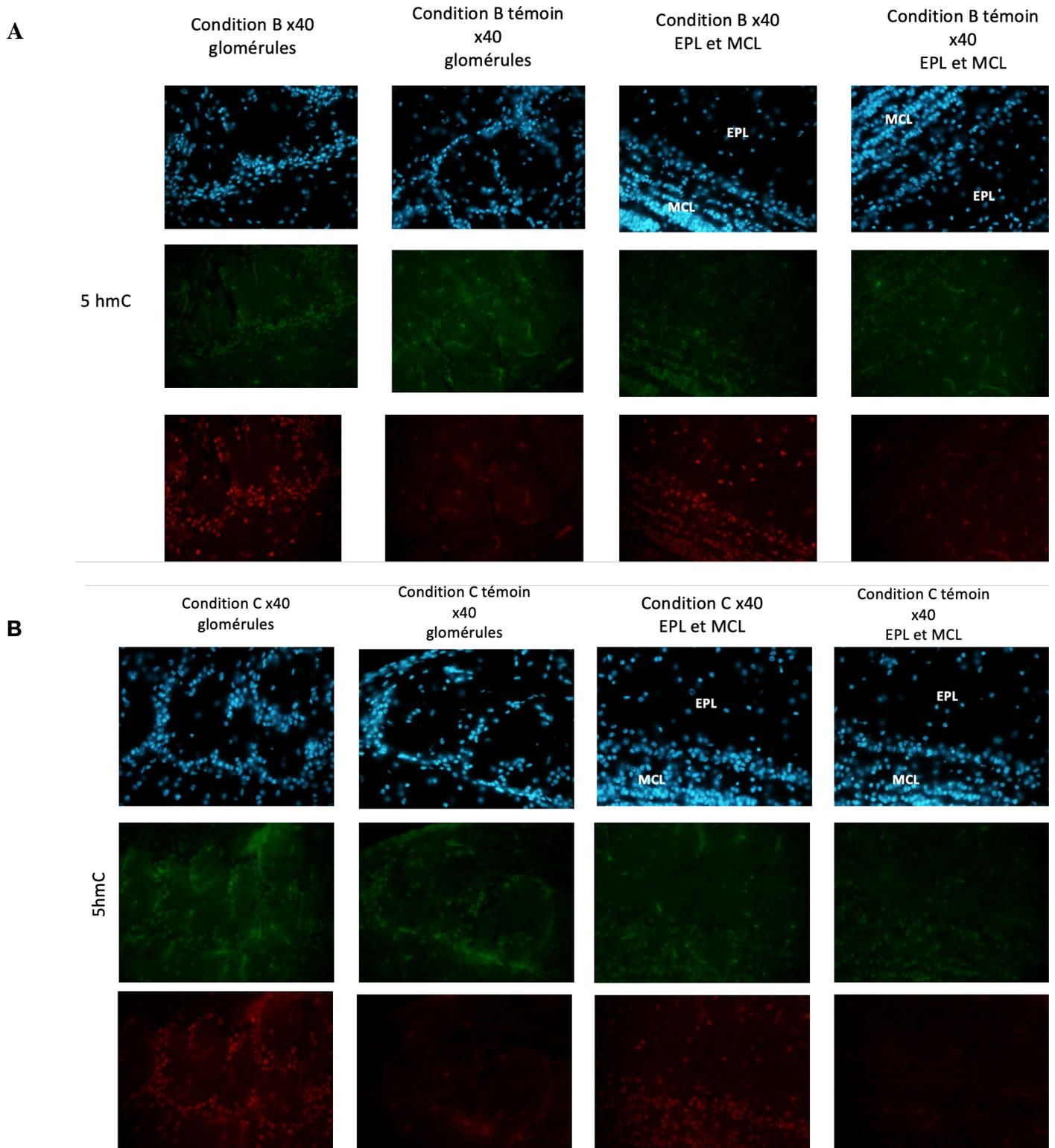
**Figure X :** Planches d'immunohistochimie dans le BO de souris grâce à un microscope à fluorescence, grossissement x40 de la condition A. A - La visualisation de la 5mC est révélée en vert. B - La visualisation de la 5hmC est révélée en rouge. Les témoins n'ont pas reçu l'anticorps primaire. G : glomérules. EPL : couche plexiforme externe. MCL : couche des cellules mitrales

## Annexe 4



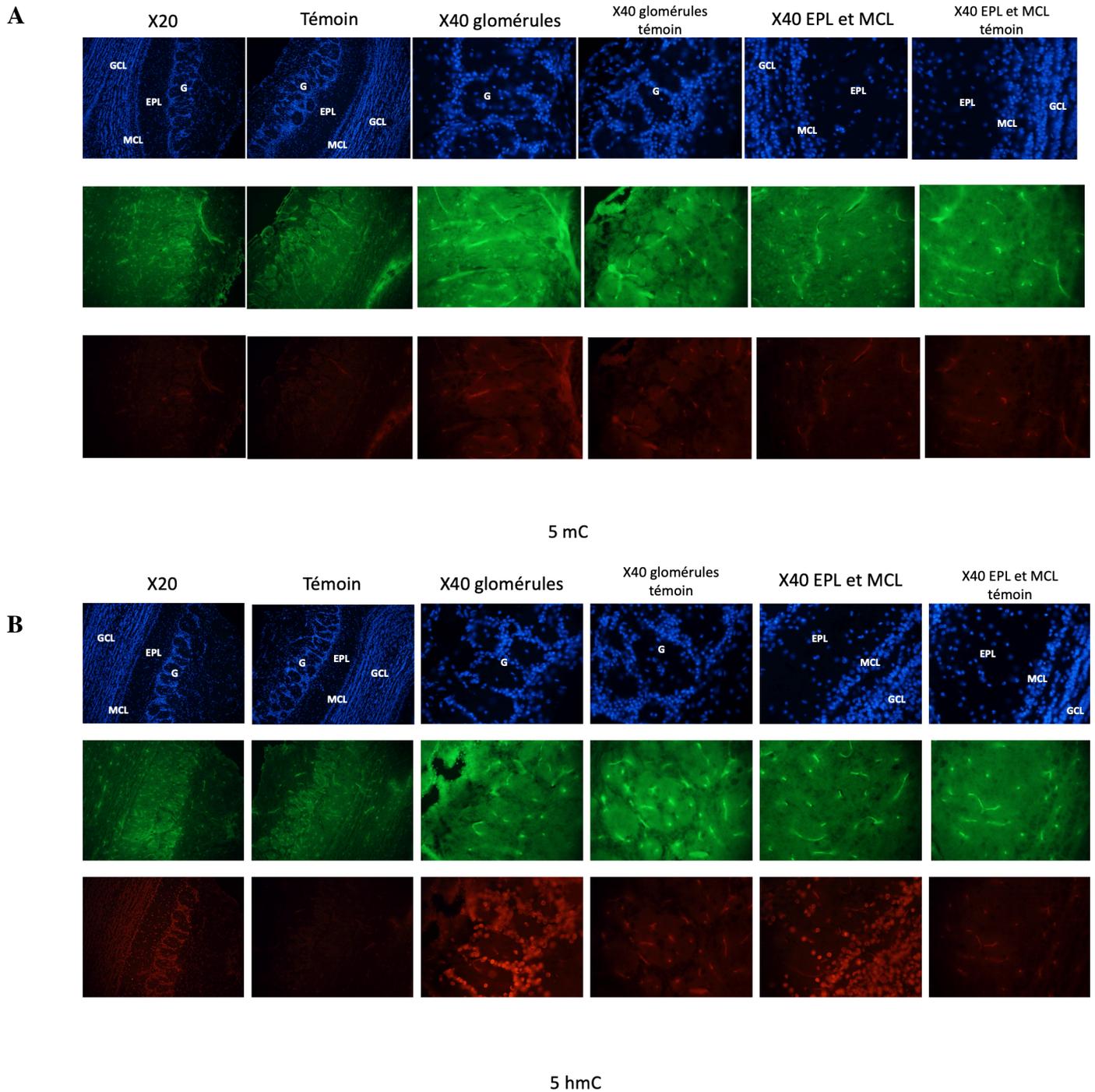
**Figure X :** Planches d'immunohistochimie dans le BO de souris grâce à un microscope à fluorescence, au grossissement x20, des conditions B, C et D. Condition B = Citrate + HCl, Condition C = Citrate sans HCl, Condition D = HCl sans citrate. A - La visualisation de la 5mC est révélée en vert. B - La visualisation de la 5hmC est révélée en rouge. Les témoins n'ont pas reçu l'anticorps primaire. G : glomérules. EPL : couche plexiforme externe. MCL : couche des cellules mitrales

## Annexe 5



**Figure X** : planches d'immunohistochimie dans le BO de souris. La visualisation de la 5hmC est révélée en rouge grâce au microscope à fluorescence au grossissement x40. **A - Condition B** = glycine + citrate + HCl. **B- Condition C** = glycine + citrate sans HCl. EPL : couche plexiforme externe. MCL : couche des cellules mitrales

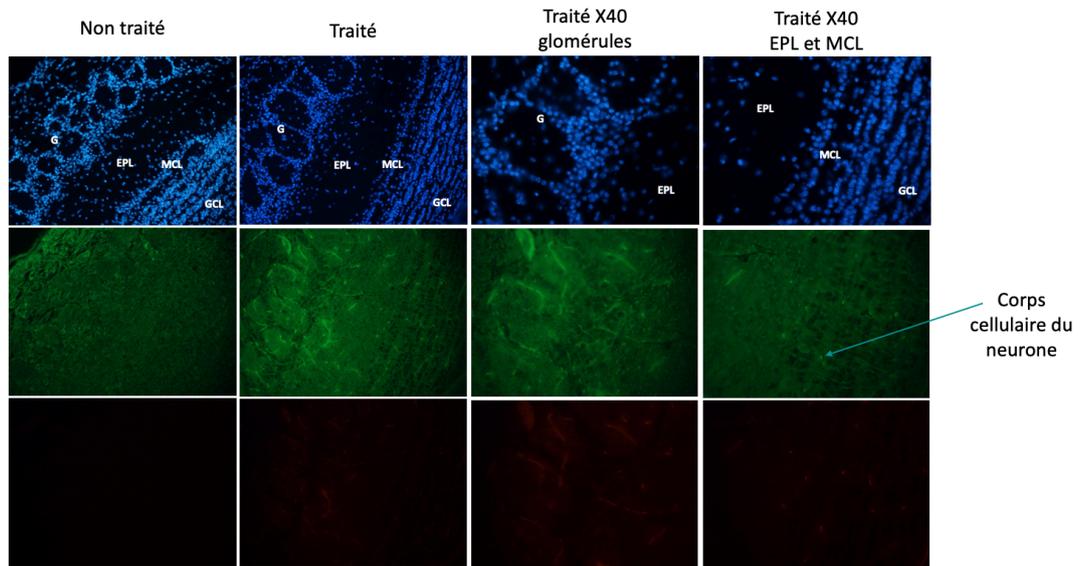
## Annexe 6



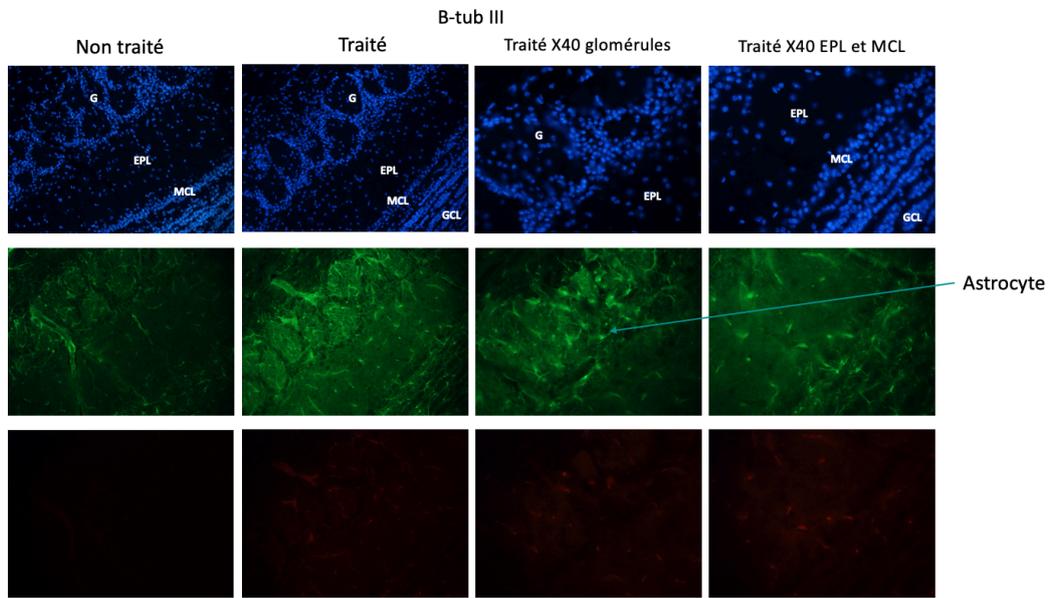
**Figure X :** Planches d'immunohistochimie dans le BO de souris grâce à un microscope à fluorescence, grossissement x20 ou x40. A - La visualisation de la 5hC est révélée en vert. B - La visualisation de la 5hmC est révélée en rouge. Les témoins n'ont pas reçu l'anticorps primaire. G : glomérules. EPL : couche plexiforme externe. MCL : couche des cellules mitrales. GCL : couche des cellules granulaires

**Annexe 7**

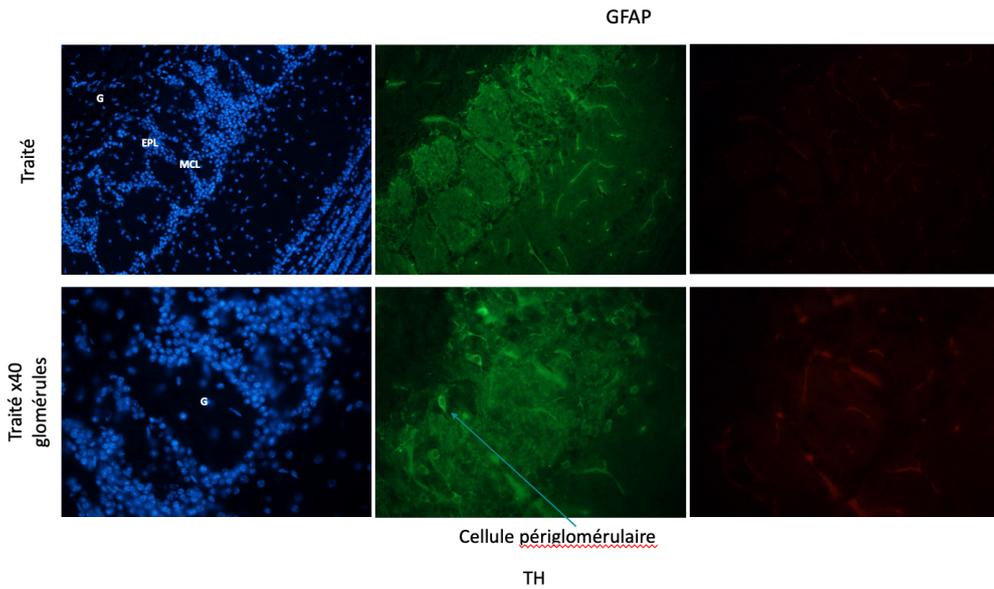
**A**



**B**

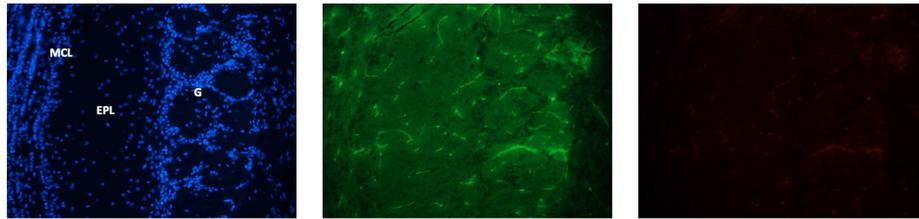


**C**



D

X20



lba 1

**Figure X :** Planches d'immunohistochimie dans le BO de souris grâce à un microscope à fluorescence, grossissement x20 ou x40. A - La visualisation des neurones est révélée en vert. B - La visualisation des astrocytes est révélée en vert. C - La visualisation des cellules périglomérulaires en vert. D - La visualisation des cellules gliales en vert. Les « non-traités » n'ont pas reçu les traitements citrate et HCl. G : glomérules. EPL : couche plexiforme externe. MCL : couche des cellules mitrales. GCL : couche des cellules granulaires.