

UTILISATION DE LA MICRODISSECTION LASER COMME OUTIL PERFORMANT POUR L'ANALYSE ANATOMO- FONCTIONNELLE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-LIQUIDIENNE

CABEZA Lidia ¹, HOUDAYER Christophe ^{1,2} & BOURASSET Fanchon ¹

¹ *Université de Franche-Comté, UMR INSERM 1322 LINC, 25000, Besançon, France.*

Laboratoire de Recherches Intégratives en Neurosciences et Psychologie Cognitive (LINC), Université de Franche-Comté, 25030, Besançon Cedex, France

² *Université de Franche-Comté, UMR INSERM 1322 LINC, 25000, Besançon, France ; Plateforme Technique DIMACELL – Microdissection à capture laser / Histopathologie*

Auteurs correspondants : lidia.cabeza_alvarez@univ-fcomte.fr
& fanchon.bourasset@univ-fcomte.fr

THE USE OF LASER MICRODISSECTION AS AN EFFECTIVE TOOL FOR ANATOMO-FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE BLOOD-CEREBROSPINAL FLUID BARRIER

ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is protected from the general circulation by two barriers, the blood-brain barrier (BBB) and the blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier. The blood-cerebrospinal fluid barrier (BCFSB) separates the blood from the CSF. It is located in the choroid plexus (CP) and in the arachnoid. It is composed of the endothelial and epithelial cells of the CP, which are highly conserved structures at the phylogenetic and ontogenetic level, located in the cerebral ventricles. The epithelial tissue at this level is monostratified, cubiform, highly vascularized (blood flow ~10 times higher than in the cerebral cortex) and covered with apical microvilli. The endothelial cells of the CP are fenestrated whereas the epithelial cells are linked together by tight junctions, giving this interface the barrier-like phenotype. The CP are responsible for the production of CSF, but also participate in the secretion of molecules and the reabsorption of substances from the CSF. These properties suggest a role for these structures in controlling cerebral homeostasis, and their alteration could be at the origin of the pathophysiology of neurologic or neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. In practice, the anatomical and functional study of the CP is not simple. Immunohistological approaches, although informative, are not conclusive due to the nature of the tissue. Indeed, the CP float in the CSF of the ventricles and on histological sections they appear folded on themselves. We propose the use of laser microdissection as a high-resolution method for locating and sampling these structures, in order to quantify the expression of key proteins in the functioning

of the BCSFB, in particular tight junction proteins (ZO-1, claudins) and transport proteins (SLC and ABC proteins). In conclusion, the use of laser microdissection seems to be an efficient and complementary method to immunohistology for assessing alterations in the BCSFB in pathological conditions.

KEY WORDS

Alzheimer's disease, Blood-cerebrospinal fluid barrier, Choroid plexus, Laser microdissection.

RESUME

Le système nerveux central (SNC) est protégé de la circulation générale par deux barrières, la barrière hémato-encéphalique (BHE) d'une part et la barrière hémato-liquidienne (BHL), d'autre part. La BHL sépare le sang du liquide céphalo-rachidien (LCR). On la retrouve au niveau des plexus choroïdes (PC) et de l'arachnoïde. Les PC sont des structures fortement conservées au niveau phylogénétique et ontogénique, se trouvant au niveau des ventricules cérébraux. Le tissu épithélial est, à ce niveau, monostratifié, cubiforme, fortement vascularisé (flux sanguin ~10 fois plus élevé qu'au niveau du cortex cérébral) et couvert de microvillosités apicales. Les cellules endothéliales des PC sont fenêtrées tandis que les cellules épithéliales sont, à ce niveau, liées entre elles par des jonctions serrées étanches, qui confèrent à cette interface un phénotype de barrière. Les PC sont responsables de la production de LCR, mais participent également à la sécrétion de molécules et à la réabsorption de substances provenant du LCR. Ces propriétés suggèrent un rôle de ces structures dans le contrôle de l'homéostasie cérébrale et leur dérèglement pourrait être à l'origine de la physiopathologie de maladies neurologiques ou neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Dans la pratique, l'étude anatomo-fonctionnelle des PC n'est pas simple. Les approches immunohistologiques, bien qu'informatives, ne sont pas concluantes, notamment en raison de la nature même du tissu. En effet, les PC flottant dans le LCR des ventricules, ils apparaissent souvent repliés sur eux-mêmes sur des

coupes histologiques. Nous proposons l'utilisation de la microdissection laser comme méthode à haute résolution pour la localisation et le prélèvement de ces structures, afin de quantifier l'expression des protéines clés dans le fonctionnement de la BHL, notamment les protéines de jonctions serrées (ZO-1, claudines) et de transport (protéines SLC et ABC). En conclusion, l'utilisation de la microdissection laser semble être une méthode adaptée, efficace et complémentaire à l'immunohistologie pour l'évaluation des altérations de la BHL dans des conditions pathologiques.

MOTS CLES

Barrière hémato-liquidienne, Maladie d'Alzheimer, Microdissection laser, Plexus choroïdes.

INTRODUCTION

Afin de garantir l'homéostasie et le bon fonctionnement du système nerveux central (SNC), les échanges (énergétiques, ioniques, moléculaires) entre le sang et le cerveau doivent être finement régulés. Pour ce faire, deux principales interfaces assurent un rôle de barrière, permettant d'isoler le cerveau de la circulation générale. Il s'agit de la barrière hémato-encéphalique (BHE) d'une part, qui régule les échanges entre le sang et le liquide extracellulaire cérébral (LECC) dans lequel baignent les cellules neuronales et gliales, et la barrière hémato-liquidienne (BHL) d'autre part qui régule les échanges entre le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR) [1] (**Figure 1**).

La BHE est située au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECCs). La BHL est située d'une part au niveau de l'arachnoïde et en particulier des villosités arachnoïdiennes qui forment des saillies dans le sinus sagittal supérieur (sinus veineux), que l'on appelle BHL arachnoïdienne (BHL externe) et d'autre part au niveau des plexus choroïdes (PC ; BHL interne). Le phénotype de barrière de la BHE et de la BHL résulte d'une part de la présence de jonctions serrées (JS) étanches, que l'on retrouve au niveau des CECCs, de l'épithélium des PC et des cellules arachnoïdiennes, et d'autre part de

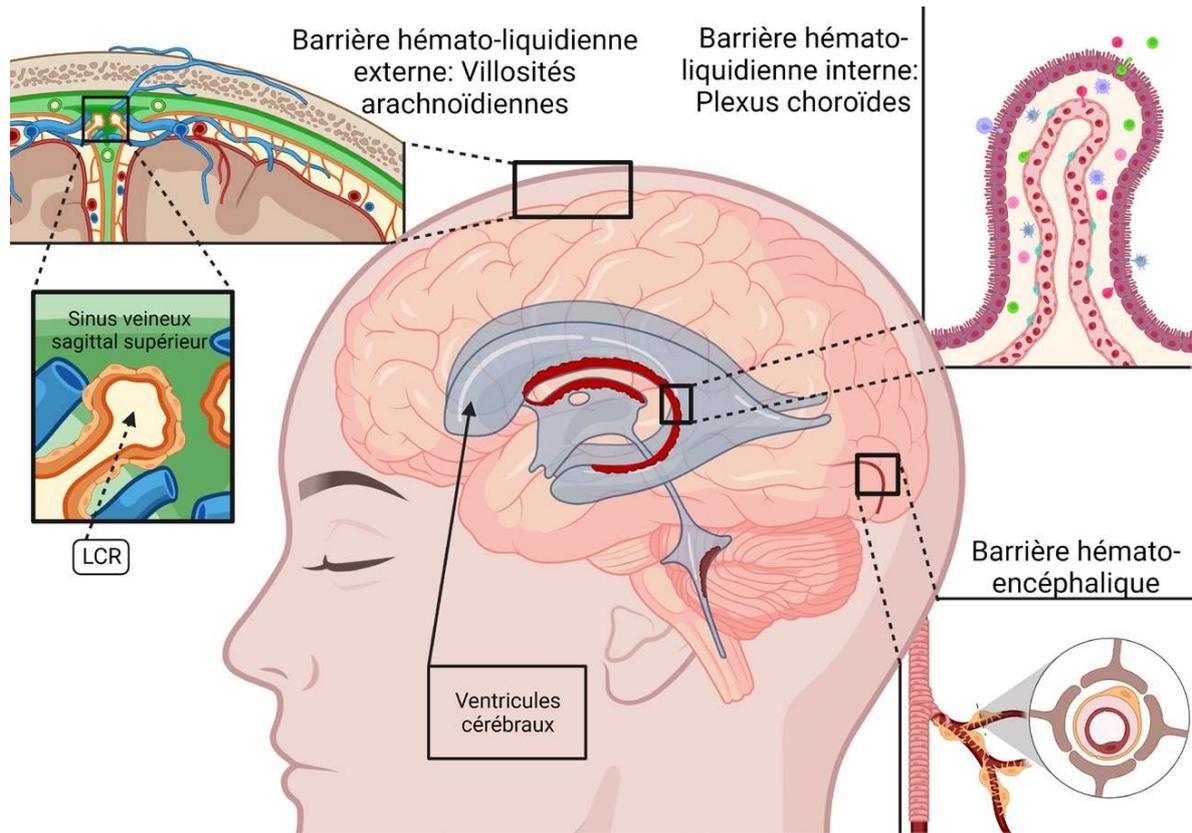


Figure 1. Illustration schématique des barrières cérébrales. La barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière hémato-liquidienne (BHL) protègent le système nerveux central de la circulation générale. La BHE (en bas et à droite de la figure) est située au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et régule les échanges entre le sang et le liquide extracellulaire cérébral. La BHL régule les échanges entre le sang et le liquide céphalo-rachidien. La BHL externe ou barrière hémato-arachnoïdienne (en haut et à gauche de la figure) est située au niveau des cellules épithéliales arachnoïdiennes. La BHL interne est située au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes (en haut et à droite de la figure). Fait avec BioRender.

l'expression de récepteurs et transporteurs membranaires qui participent à la distribution des molécules dans les différents espaces liquidiens cérébraux (sang, LCR, LECC et liquide intracellulaire cérébral – LICC) [1–5]. La surface d'échange de la BHL est plus faible que celle de la BHE. Cependant, les échanges moléculaires entre le LCR et le sang sont importants et nécessaires pour protéger et détoxifier le cerveau. Ces barrières cérébrales jouent donc un rôle privilégié dans la distribution cérébrale des molécules exogènes, tels que les médicaments, mais aussi endogènes tels que les nutriments, les stérols, certains peptides ou encore les hormones. Elles sont ainsi associées à la

physiopathologie de plusieurs maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives. Il est donc nécessaire de pouvoir réaliser des études anatomiques, moléculaires et biochimiques de ces barrières. Plusieurs méthodes existent pour isoler les microvaisseaux cérébraux [6], sièges de la BHE, mais aussi pour isoler les différentes cellules de l'unité neuro-vasculaire (UNV), à savoir les CECCs, les péricytes, les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes [7–10]. Ces méthodes permettent une étude assez complète de la BHE et de l'UNV. En revanche, l'étude de la BHL s'avère plus complexe, du fait notamment de la nature même du tissu la composant et de sa localisation. Des méthodes de dissection des PC sur tissus frais ont été décrites dans la littérature [11,12]. La résolution temporelle de ces méthodes dépend fortement de l'habileté des expérimentateurs et peuvent être réalisées à froid afin de limiter l'impact sur la qualité des biomolécules extraites en vue de réaliser des études de type -omiques. Cependant, l'étude individuelle des différents types cellulaires composant les PC est limitée par ces méthodes.

Barrière hémato-liquidienne : structure et fonction

1. BHL arachnoïdienne (externe)

La membrane arachnoïdienne est constituée de cellules épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées ; elle sépare le LCR contenu dans l'espace sous-arachnoïdien de la dure mère. Par endroit, la membrane arachnoïdienne forme des villosités qui saillent dans le sinus sagittal supérieur, permettant alors des échanges entre le LCR contenu dans la villosité et le sang veineux du sinus sagittal supérieur (**Figure 1**). Cette interface est appelée la BHL arachnoïdienne ou encore BHL externe [13–16].

2. BHL des plexus choroïdes (interne)

Bien qu'il s'agisse de la principale interface d'échange entre le sang et le LCR [17], les PC situés dans les ventricules cérébraux (latéraux, troisième et quatrième), sont encore assez peu étudiés par rapport à d'autres structures du SNC (**Figure 2**). Cependant, l'intérêt pour la BHL grandit depuis que plusieurs études ont mis en évidence son rôle dans la neuroinflammation et la pathogenèse de

plusieurs maladies neurologiques et neurodégénératives (pour revue, voir [18]). D'un point de vue anatomo-morphologique, les PC sont composés de tissus convolutés de nature épithélio-endothéliale présentant un stroma très vascularisé et du tissu connectif. Dans le stroma, les capillaires provenant des branches antérieures et postérieures des artères choroïdes sont entourés de tissu connectif et communiquent avec des cellules immunitaires résidentes. Cette population de capillaires, à la différence des capillaires parenchymateux qui constituent la BHE, présente des fenestrations de 60-80 nm et ne présente donc pas de JS, ce qui rend les capillaires perméables à ce niveau [19,20]. Ainsi, le plasma peut être transporté rapidement vers l'interstice des PC par pression hydrostatique et faire face alors aux cellules épithéliales qui, par la présence de JS (occludines, claudines et zonula-occludens) à leur pôle apical, confèrent le phénotype de barrière à la BHL interne. La monocouche épithéliale des PC est constituée de cellules cubiformes. Elles sont dans la continuité de l'épendyme ventriculaire et présentent des microvillosités au niveau du pôle apical, permettant d'augmenter leur surface d'échange. Les PC sont en interaction avec des cellules résidentes à activité phagocytaire, appelées cellules de Kolmer, qui peuvent adhérer aux cellules épithéliales sur leur face ventriculaire [18].

Les PC sont les principaux responsables de la production de LCR, qui est d'environ 600 mL par jour chez l'Homme (0.2 mL/min x g de tissu). Le processus de sécrétion de LCR par les PC est fortement dépendant du gradient osmotique créé par l'épithélium (transport d'ions HCO_3^- , Na^+ , Cl^- et K^+) et qui facilite le mouvement d'eau *via* des aquaporines ou par passage paracellulaire. Le fonctionnement de la pompe Na^+-K^+ ATPase, localisée dans le pôle apical des cellules épithéliales, est fortement lié à la production de LCR au niveau des PC, comme démontré à partir de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Aussi, le transport de Cl^- est couplé au transport de cations (Na^+ et/ou K^+) par co-transporteurs de la famille SLC (*solute-carrier* ; SLC12) localisés au niveau des deux pôles des cellules épithéliales des PC. Le transport de HCO_3^- est aussi très important dans le processus de sécrétion de LCR et plusieurs transporteurs de la famille SLC4 semblent participer au contrôle de la régulation du pH intracellulaire de l'épithélium (pour revue, voir [21]).

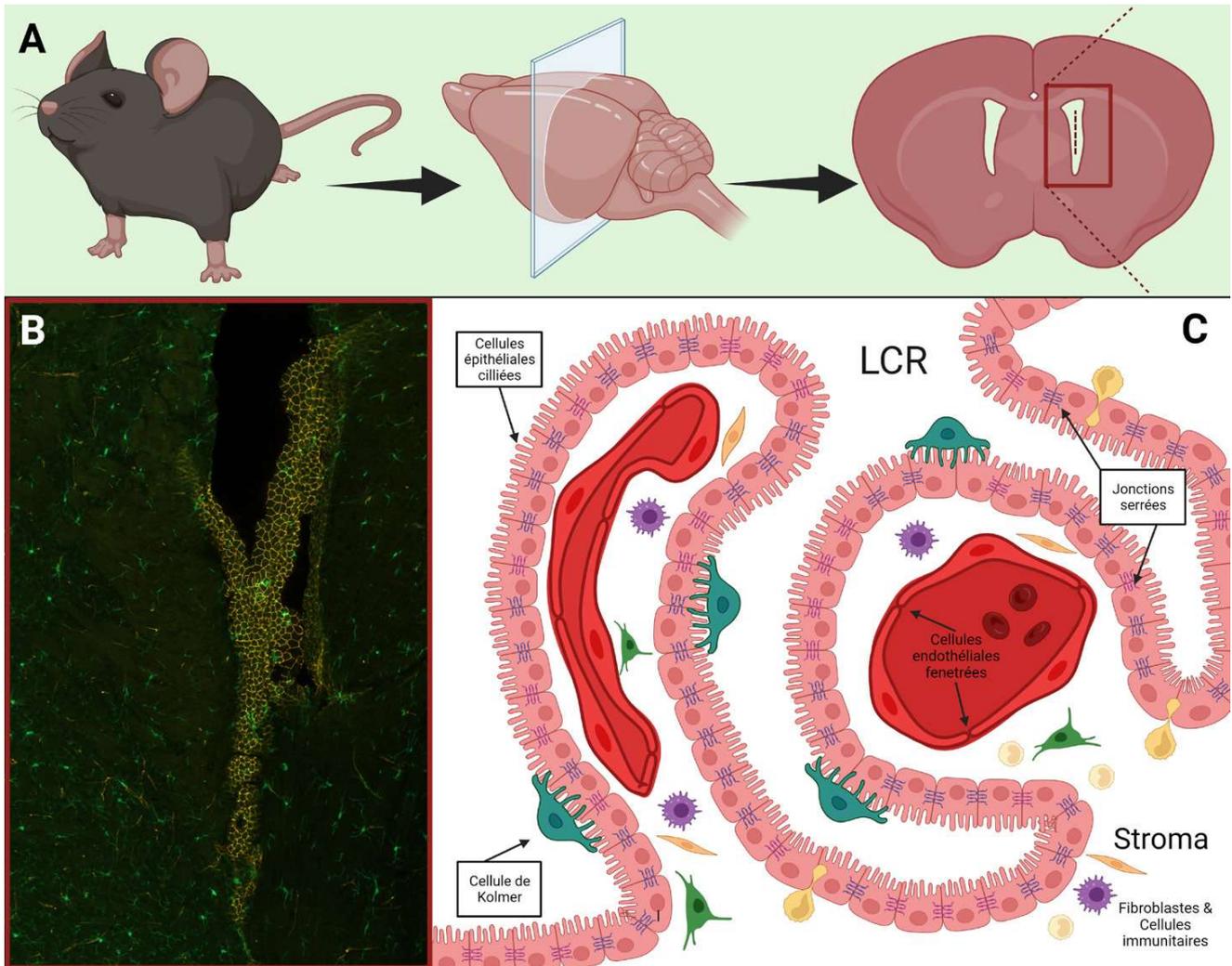


Figure 2. Illustration schématique de la localisation anatomique et de la morphologie des plexus choroïdes chez la souris. (A) Les plexus choroïdes (PC) flottent dans le liquide céphalorachidien (LCR) dans les ventricules cérébraux. Ainsi, les PC chez la souris sont facilement identifiables à partir de coupes coronales cérébrales. (B) Microphotographie des PC de souris après co-immuno-marquage anti-IBA1 (vert ; microglie et cellules de Kolmer) et anti-ZO-1 (rouge ; jonctions serrées). L'image a été acquise à partir d'un microscope équipé d'un ApoTome.2 ZEISS Axio Imager.Z2 et une caméra Hamamatsu C11440 (Zeiss, Allemagne). (C) Les cellules endothéliales des capillaires des PC sont fenêtrées et ne présentent pas de jonctions serrées. C'est la monocouche de cellules épithéliales cubiformes qui apporte le phénotype de barrière à la BHL interne grâce à l'expression de jonctions serrées. Fait avec BioRender.

Concernant le phénotype de barrière de la BHL, les mécanismes d'échanges moléculaires sont sélectifs et restrictifs. Différents types de protéines transmembranaires participent au transport de molécules endogènes et exogènes entre le sang et le LCR. On retrouve des récepteurs appartenant

notamment à la famille LRP (*Lipoprotein receptor-related protein*) tels que LRP1 et LRP8, mais aussi le récepteur FR α (*Folate receptor α*) ou encore TfR1 (*Transferrin receptor 1*). Des transporteurs membranaires appartenant aux familles ABC (*ATP-binding cassette*) et SLC sont aussi retrouvés au niveau de la BHL [2,18,22]. Ces transporteurs et récepteurs participent au maintien de la balance homéostatique cérébrale en condition physiologique mais aussi à la protection du cerveau vis-à-vis de molécules potentiellement toxiques, soit en empêchant leur entrée cérébrale soit en favorisant leur clairance. Ainsi, la BHL participe à la clairance cérébrale du peptide A β impliqué dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer [23]. On voit donc que la présence de transporteurs/récepteurs spécifiques et la capacité d'adaptation morphologique unique des PC, telle que leur forme convolutive particulièrement adaptée à leur état « flottant » dans le LCR ventriculaire, confèrent à la BHL interne un rôle prépondérant dans le contrôle de l'homéostasie cérébrale. La BHL pourrait ainsi participer à la physiopathologie de certaines maladies cérébrales, notamment celles dans lesquelles la clairance cérébrale de protéines anormales est altérée.

Problématique méthodologique dans l'étude de la barrière hémato-liquidienne chez le rongeur

Le développement de modèles animaux, le plus souvent murins, pour l'étude de pathologies a pris ces dernières décennies une place prépondérante dans l'étude des aspects étiologiques et physiopathologiques des maladies cérébrales, notamment neurodégénératives. Comme évoqué précédemment, des altérations des barrières cérébrales pourraient participer à l'apparition et/ou au développement de ces pathologies. Des méthodologies expérimentales sont donc nécessaires pour pouvoir étudier l'intégrité physique et fonctionnelle des barrières cérébrales sur ces modèles animaux. La BHL interne a la particularité anatomique de se trouver dans un espace liquidien, le LCR, dans lequel flottent les PC, rendant leur étude histologique et structurelle complexe. Des méthodes consistent à prélever, sous loupe binoculaire, les PC [11]. Cette méthode est largement utilisée pour étudier l'expression, la fonction et la

régulation cellulaire de diverses protéines à partir d'analyses -omiques (e.g. RT-qPCR, Western Blot...). D'autres méthodes comme l'hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) et la transcriptomique spatiale permettent l'analyse des éléments structuro-fonctionnels des PC, leur coût étant la limitation la plus directe pour son application. Des approches immunohistologiques sur cerveau entier sont également utilisées afin d'étudier les acteurs protéiques de la BHL d'un point de vue qualitatif et/ou quantitatif [20]. Cependant, l'immunohistologie n'offre qu'une vision partielle des PC. En effet, sur les coupes histologiques, les PC apparaissent repliés sur eux-mêmes, parfois comprimés et endommagés, disposés sur le tissu parenchymateux qui les entoure (**Figure 3**).

Ces problèmes sont la source d'artefacts et d'imprécisions lors du marquage des antigènes ciblés et par conséquent, constituent un biais aussi bien qualitatif que quantitatif, pouvant nécessiter une augmentation du nombre d'échantillons pour atteindre une puissance statistique satisfaisante. Cette limitation est d'autant plus problématique que les études sont souvent réalisées de manière longitudinale sur des modèles animaux afin d'explorer les différents stades pathologiques. Le manque de reproductibilité quantitative va donc avoir un impact à la fois sur le nombre d'animaux utilisé et sur les coûts expérimentaux. Pour faire face à cette limitation, nous proposons l'utilisation de la MicroDissection Laser (MDL) [24] comme méthode à haute résolution pour la localisation et le prélèvement des PC, afin d'assurer une quantification optimale de l'expression d'éléments clés du fonctionnement de la BHL interne. Même si les informations apportées par les techniques d'immunohistologie et de MDL à des fins transcriptomiques ne sont pas directement comparables, les microdissécats permettent de répondre au besoin d'une quantification biomoléculaire affinée compte-tenu de la résolution et de la précision de la méthode. De plus, la méthode d'échantillonnage permet d'associer à la MDL des approches immunohistologiques classiques en récupérant des coupes des PC isolés. Autrement dit, notre méthode permet à la fois la récupération optimale des PC, leur analyse quantitative, notamment transcriptomique et la réalisation en parallèle d'études immunohistologiques classiques dans les différentes couches de PC isolés. L'objectif de notre travail est d'une

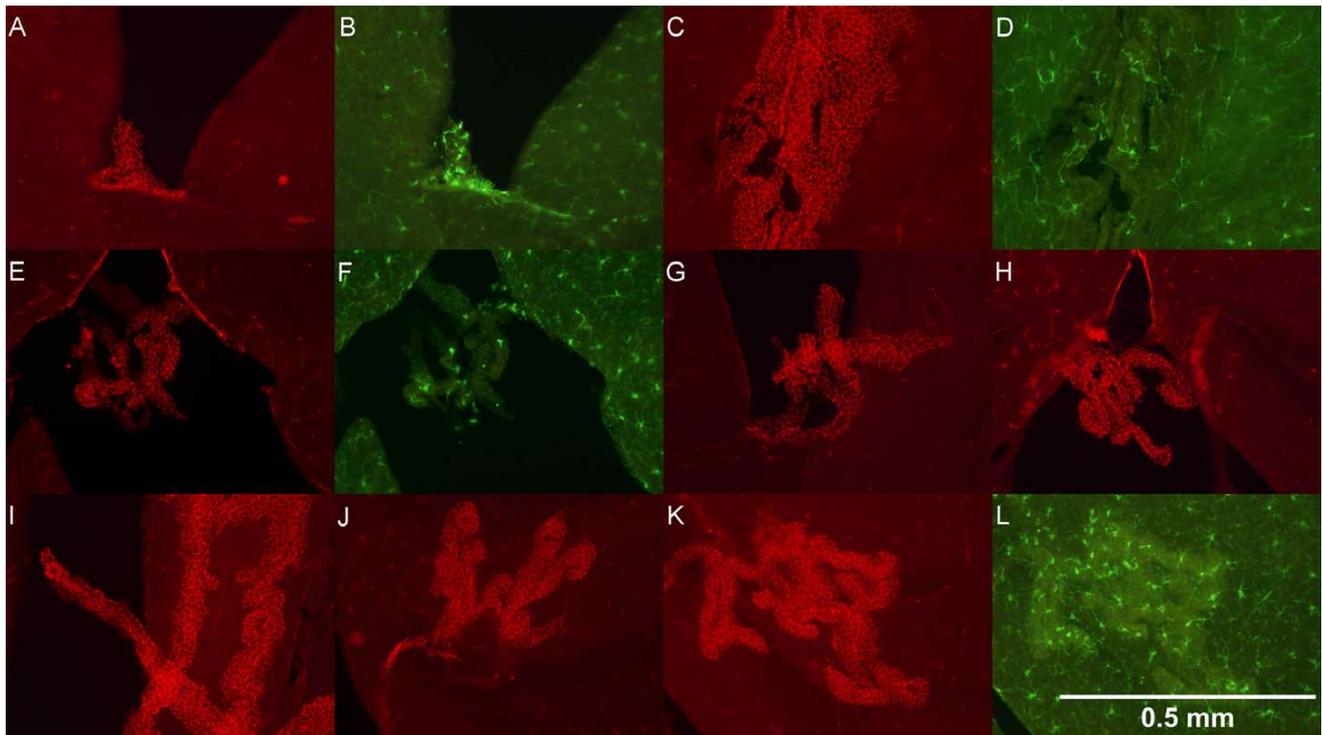


Figure 3. Illustration des problèmes souvent rencontrés lors de l'étude des PC à des fins analytiques qualitatives et quantitatives par des approches immunohistologiques. Les images ont été acquises avec un microscope à fluorescence Olympus Bx51 équipé d'une caméra Olympus DP50 après co-immuno-marquage anti-IBA1 (vert ; cellules de Kolmer) et anti-ZO-1 (rouge ; jonctions serrées). Sur des préparations histologiques, les PC peuvent (A-B) se perdre ou se scinder facilement, ou au contraire, (C-D) se retrouver fortement concentrés et repliés sur eux-mêmes sur un espace ventriculaire limité. (E-F) La nature convolutive du tissu choroïdien rend particulièrement difficile la définition de régions d'intérêt à des fins comparatives (par exemple, la comparaison des intensités de fluorescence), car il se trouve souvent superposé sur plusieurs plans de l'image. (G-H) Les PC apparaissent aussi parfois comprimés et endommagés, ou encore (I-L) disposés sur le tissu parenchymateux qui les entoure.

part de démontrer la faisabilité et l'intérêt anatomo-histologique de notre approche de MDL pour la localisation et le prélèvement des PC de souris, et d'autre part de démontrer que notre approche permet la réalisation d'études transcriptomiques sur des PC de souris saines et pathologiques. Cette première approche vise à valider la technique de MDL sur PC pour échantillonnage ultérieur individualisé de types cellulaires spécifiques (e.g. cellules de Kolmer, cellules épithéliales...), dans des limites spatiales plus difficilement abordables par d'autres approches méthodologiques (e.g. partie rostrale vs. caudale des PC dans les ventricules latéraux). Nous avons

utilisé pour cela le modèle murin 3xTg-AD [25]. L'intérêt d'utiliser ce modèle animal de la maladie d'Alzheimer est fondé sur le développement à la fois des dépôts intracellulaires de protéine Tau hyperphosphorylée (pTau) formant des enchevêtrements neurofibrillaires (pathologie Tau) et des plaques extracellulaires cérébrales composées d'agrégats de peptide A β (pathologie amyloïde). Des travaux antérieurs ont mis en évidence des modifications de la BHE dans ce modèle [26,27] par rapport à des souris contrôles.

MATERIEL ET METHODES

1. Animaux et prélèvements

Les animaux (contrôles C57BL/6JR et modèle 3xTg-AD de la maladie d'Alzheimer), mâles et femelles âgés de 13 semaines ou plus, ont été hébergés à l'Animalerie Centrale de Besançon, dans un environnement maintenu à 22 ± 2 °C avec une humidité contrôlée et un cycle alternatif de lumière et d'obscurité de 12 h. Les souris avaient accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Toutes les expériences ont été réalisées dans le respect des règles d'éthique de la réglementation européenne (210/63/EU) relative aux soins et à l'utilisation des animaux de laboratoire, et les procédures acceptées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de Besançon (CEBEA-58 ; C-25-056-10 ; projet MESRI-APAFIS#28240).

2. Préparation des échantillons pour microdissection laser

Après une injection intra-péritonéale de pentobarbital (55 mg/kg, Exagon®, Med'Vet, France) et la perte successive des réflexes, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les cerveaux ont été prélevés, immédiatement congelés par immersion dans l'isopentane (2-méthylbutane, Roth®, Karlsruhe, Germany) à -74 °C et stockés à -80 °C. La congélation des cerveaux sans fixation est la méthode à privilégier pour la MDL à des fins d'analyse transcriptomique (ARN messagers), car elle évite des étapes d'extractions agressives qui sont nécessaires lorsque l'on fixe les cerveaux dans du paraformaldéhyde.

Les cerveaux sont coupés au cryostat (température de chambre de -14 °C et

température de couteau de -16 °C) avec une épaisseur de coupe de $20\text{ }\mu\text{m}$ (MICROM HM 560, *Thermo Scientific*, France). Une fois les PC visualisés dans les ventricules cérébraux latéraux, les coupes sont récupérées sur des lames spécifiques pour la MDL qui ont la particularité de présenter une membrane en polyéthylène naphthalate (PEN membrane LCM0522, *Excilone*, France). Cette membrane en polymère permet de découper la zone d'intérêt à l'aide du laser Ultraviolet (UV). Les coupes récupérées sur les lames PEN sont ensuite déshydratées par des bains successifs d'éthanol (95%, 100% et 100%) pendant 30 sec à 4 °C . Elles sont ensuite incubées dans du xylène à température ambiante (1 min + 3 min ; *VWR*) sous la sorbonne. Une fois l'excès de xylène retiré, la lame est laissée à sécher, sous la sorbonne, à l'abri de la poussière. Entre chaque bain successif d'éthanol et de xylène, les lames sont rapidement épongées sur du papier absorbant.

3. Microdissection laser des plexus choroïdes

Les deux principaux avantages des PC qui en font un tissu particulièrement adapté à l'utilisation de la MDL sont d'une part leur localisation, et d'autre part leur visualisation au microscope en absence de coloration. Ainsi, ils sont facilement repérés dans les ventricules cérébraux, normalement centrés et dans leur conformation originale car la congélation des cerveaux conserve le LCR dans lequel ils flottent. Le fait de procéder à la MDL sans coloration préalable optimise la méthode - en réduisant le temps d'exposition du tissu aux ARNases et donc - en conservant la qualité des biomolécules.

Une fois les coupes séchées, les lames sont immédiatement placées sous le microdissecteur. Pour cette expérience, nous avons utilisé un système *Laser Capture Microdissection* (LCM) ARCTURUS (*Excilone*, France) qui permet la récupération des échantillons à partir d'une capsule collectrice (LCM0214 CAPSURE HS LCMCAPS, *Excilone*, France). Le microdissecteur est associé à un microscope inversé NIKON ECLIPSE Ti avec une platine motorisée et pilotée depuis le logiciel ARCTURUS. Après une étape de scan de la lame, les PC sont identifiés et la capsule collectrice est placée stratégiquement. Pour cela, le contour de la région d'intérêt est dessiné à l'aide d'un stylet sur une tablette graphique et des points de « colle » sont disposés à l'intérieur de cette région

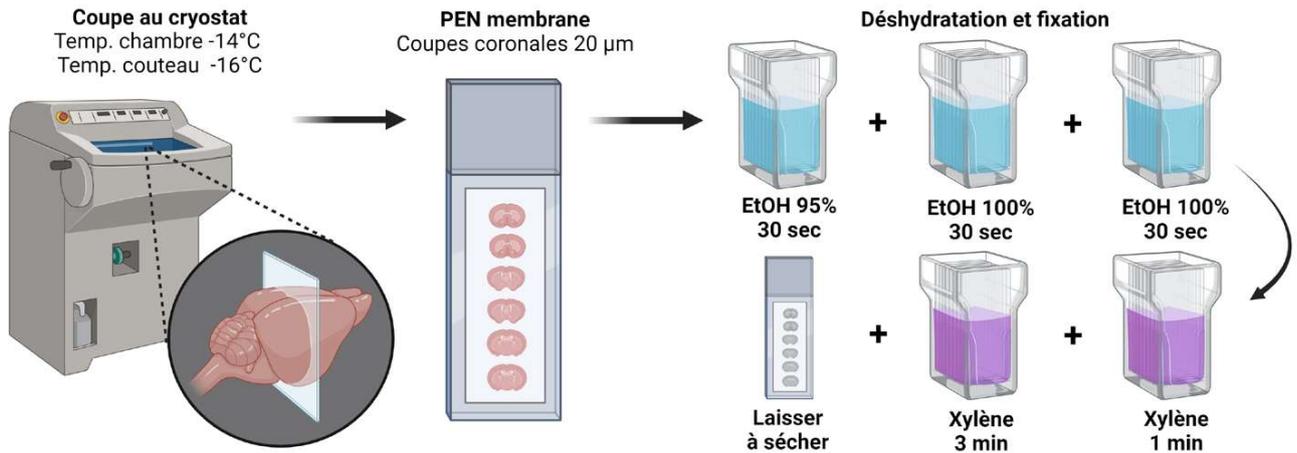
afin de permettre au laser diode Infrarouge (IR, 810 nm) de réaliser l'adhésion de l'échantillon sur le film thermosensible des capsules collectrices. Le laser UV (349 nm) découpe alors la membrane en polymère en suivant le contour préalablement défini, puis les échantillons sont prélevés lors du soulèvement de la capsule collectrice (**Figure 4**).

4. Transcriptomique : extraction d'ARN pour RT-qPCR et ddPCR

Afin de comparer le transcriptome des échantillons issus de la MDL, c'est-à-dire des PC, entre les conditions pathologiques (modèle 3xTg-AD de la maladie d'Alzheimer) et non-pathologiques (animaux contrôles C57BL/6JR), une première étape d'extraction des ARNs a été réalisée à partir du Kit d'extraction PicoPure™ (KIT02204, *Arcturus*). La quantité d'ARN dans le microdissécat doit être suffisante pour être détectable par fluorimétrie (Qubit®, *Invitrogen*) ou autre méthode. Cette extraction constitue l'une des étapes limitantes de la MDL puisqu'elle détermine la quantité de matériel final disponible.

Les microdissécats sont récupérés dans des microtubes adaptés aux capsules collectrices (6-8 microdissécats par microtube) puis ils sont incubés et lysés dans du tampon d'extraction pour ARN (50 µL, 30 min à 42 °C). Les lysats sont centrifugés (2 min à 800 x g) et stockés à -80 °C jusqu'à l'extraction des ARNs. Pour l'isolement des ARNs, des colonnes de purification possédant une membrane à filtre ont été utilisées. Les colonnes sont d'abord incubées dans du tampon de conditionnement (250 µL, 5 min) puis centrifugées (1 min à 16000 x g). Les échantillons sont traités à l'éthanol 70% (50 µL) avant d'être transférés dans des colonnes de purification. Les échantillons sont alors centrifugés (2 min à 100 x g, puis 30 sec à 16000 x g). Des tampons de lavage sont ajoutés aux colonnes de purification qui sont alors centrifugées 3 fois successivement (100 µL Tampon de lavage 1, 1 min à 8000 x g + 2 min à 16000 x g, puis 100 µL Tampon de lavage 2, 1 min à 8000 x g, et encore 100 µL Tampon de lavage 2, 1 min à 16000 x g). Les colonnes de purification sont ensuite transférées dans des microtubes de 0,5 mL fournis dans le Kit d'extraction PicoPure™, et les ARNs élués dans du tampon d'éluion (11 µL). Après une minute d'incubation, les colonnes de purification sont centrifugées (1 min à 1000 x g + 1 min à 16000xg) afin de récupérer les ARNs totaux et les doser.

Préparation des échantillons pour microdissection laser



Microdissection laser des plexus choroïdes

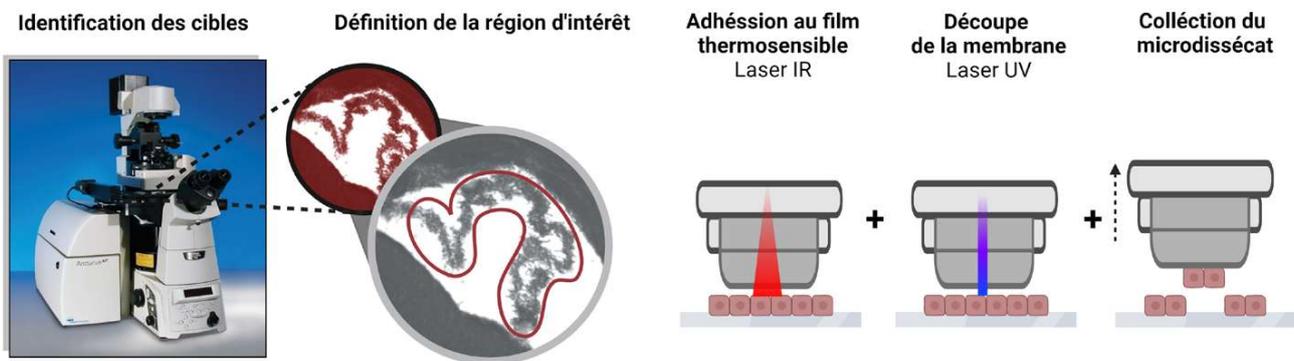


Figure 4. Protocole de microdissection laser des plexus choroïdes pour analyse transcriptomique.

Les cerveaux des souris stockés à -80°C sont placés dans un cryostat avec une température de chambre de -14°C et une température de couteau de -16°C . Une fois les plexus choroïdes (PC) visualisés dans les ventricules cérébraux latéraux, des coupes d'une épaisseur de $20\ \mu\text{m}$ sont récupérées sur des lames PEN LCM0522. Ces coupes sont ensuite déshydratées par des bains d'éthanol croissants de 30 sec à 4°C , et incubées dans du xylène à température ambiante. L'excès de xylène est retiré et la lame est laissée à sécher. Une fois placée sous le microdissecteur, la lame est scannée, les PC sont identifiés et la capsule collectrice LCM0214 placée stratégiquement. Le contour de la région d'intérêt est ensuite dessiné et des points de « colle » sont disposés afin que le laser diode Infrarouge adhère l'échantillon sur le film thermosensible. Pour finir, le laser Ultraviolet découpe la membrane des lames puis les échantillons sont prélevés avec la capsule collectrice. Fait avec BioRender.

Notre protocole de MDL adapté au prélèvement des PC nous permet de récupérer des quantités suffisantes d'ARNs totaux (5 à 8 ng d'ARNs totaux par μL d'élution) qui peuvent ainsi être amplifiés et étudiés par des méthodes de RT-qPCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) ou ddPCR (*droplet digital PCR*).

Des expériences de RT-qPCR et de ddPCR ont été réalisées à la Plateforme Technique d'Épigénétique et Expression Génétique (EPIGENExp - Right) de Besançon, au Laboratoire Interactions hôte-greffon-tumeur et ingénierie cellulaire et génique de l'Université de Franche-Comté. Nous présentons dans cet article des résultats préliminaires pour démontrer la faisabilité de la technique. Nous avons mesuré l'expression de divers éléments clés de la structure et de la fonction de la BHL interne. La protéine de jonction serrée ZO-1 a été choisie parmi les éléments structurels impliqués dans l'étanchéité de la BHL. Alors que la famille des claudines est plus représentée parmi les protéines des JS, des études précliniques ont démontré que l'altération d'éléments structurels des jonctions adhérentes dans les PC induit la délocalisation de ZO-1 des JS, en augmentant en conséquence la perméabilité de la barrière [28]. Le récepteur membranaire LRP-1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*) ainsi qu'un transporteur membranaire de la famille ABC (ABCA2) ont été choisis en tant qu'éléments fonctionnels de la BHL, impliqués notamment dans le transport du peptide A β [29,30]. Dans le cas particulier du transporteur ABCA2, nos données préliminaires issues d'approches immunohistologiques montrent sa présence au niveau des cellules épendymaires des ventricules latéraux et des PC chez le rat, en accord avec une étude réalisée sur du tissu embryonnaire [31].

RESULTATS

Localisation et visualisation des plexus choroïdes

L'optimisation du protocole de préparation des échantillons pour la MDL était le principal objectif de notre étude. En effet, la qualité des échantillons détermine la qualité des biomolécules à analyser, dans notre cas les ARNs. Ainsi, le prélèvement cérébral après sacrifice, la vitesse et la méthode de congélation immédiate, ainsi que la préparation des échantillons représentent les principales étapes limitantes de la méthode à des fins transcriptomiques, étant donnée la haute sensibilité des ARNs et la rapidité à laquelle ils se dégradent. Nous avons appliqué toutes les recommandations standards permettant la préservation des biomolécules [32], notamment (i) la congélation rapide

des cerveaux à une température ne dépassant pas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin d'éviter la brûlure des tissus obtenue par exemple lors de leur immersion immédiate dans de l'azote liquide ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), et (ii) le nettoyage des outils et dispositifs à l'éthanol et à l'aide de solutions décontaminantes de type *RNAse Zap*. Nous avons également évalué l'apport de la coloration histologique de nos échantillons pour localiser et visualiser les PC (**Figure 5**). Des coupes histologiques contenant des PC ont été à cet effet colorées ou non au crésyl violet 1% RNAse free (15 sec), ce qui nécessite une étape préalable de fixation par immersion dans l'éthanol 70% (30 sec) avant d'initier la déshydratation des tissus comme expliqué précédemment. Comme le montre la **Figure 5**, les PC dans les ventricules cérébraux latéraux sont aussi bien identifiés avec (**Figure 5A**) et sans coloration (**Figure 5B**), démontrant que la coloration n'est pas indispensable à la localisation des PC. L'exclusion de l'étape de coloration nous a permis d'alléger considérablement le protocole de préparation des échantillons et de réduire ainsi le temps d'exposition des tissus avant la lyse pour l'extraction des ARNs.



Figure 5. Identification et dissection des plexus choroïdes des souris par microdissection laser. Notre protocole de préparation des échantillons pour microdissection laser permet d'identifier et de différencier les plexus choroïdes (PC) du parenchyme cérébral aussi bien sur des préparations (**A**) avec et (**B**) sans coloration préalable au crésyl violet 1%. Notre protocole permet aussi de réaliser de nombreux microdissécats (**C-D**) et de profiter au maximum de la surface de la capsule collectrice. L'optimisation de notre protocole, en minimisant le temps d'exposition du tissu après fixation, permet d'augmenter la quantité des biomolécules d'intérêt extraites. Fait avec BioRender.

Microdissection laser des plexus choroïdes

Classiquement, les coupes histologiques destinées à être microdisséquées ont une épaisseur d'environ 10 μm , avec la possibilité de la réduire ou de l'augmenter légèrement en fonction du type de tissu et des objectifs de l'étude. Concernant le tissu cérébral, cette étape devient limitante lorsque les cibles anatomiques à microdisséquer font partie du parenchyme cérébral et se confondent donc avec les autres types cellulaires. En effet, cette contrainte réduit l'épaisseur des coupes, et, de ce fait, la quantité de biomolécules présente dans les prélèvements. Dans notre cas, la localisation flottante des PC dans les ventricules cérébraux devient un avantage anatomique. En effet, les PC sont le plus souvent séparés du parenchyme cérébral, ce qui nous permet d'augmenter l'épaisseur des coupes à 20 μm sans entraîner de contraintes supplémentaires, ni pour l'exposition au laser IR pour les points de « colle », ni pour la découpe de la membrane polymère par le laser UV, ni pour la capture du tissu par la capsule collectrice. Cette augmentation d'épaisseur de coupe permet aussi de réaliser plusieurs microdissécats et ainsi d'optimiser l'utilisation de la surface de la capsule collectrice et, au final, d'augmenter la quantité de biomolécules d'intérêt extraite (**Figure 5C-D**).

Expression altérée d'éléments-clés de l'intégrité anatomo-fonctionnelle de la BHL dans le modèle murin 3xTg-AD de la maladie d'Alzheimer : approche transcriptomique

Les approches immunohistologiques classiques révèlent des informations morphologiques et structurelles pertinentes sur la nature et l'état de la BHL dans une perspective qualitative. En revanche, l'analyse quantitative est souvent complexe et difficilement reproductible, en particulier pour des éléments fonctionnels tels que des JS, des récepteurs ou encore des transporteurs. Ainsi, notre protocole de MDL s'est montré adapté pour l'étude des PC à des fins transcriptomiques. La quantité d'ARNs totaux présente dans les microdissécats est suffisante pour être rétro-transcrite en ADNc et pour détecter les cibles d'intérêt.

Dans notre étude pilote, nous avons étudié l'expression de ZO-1, LRP-1 et ABCA2 chez des souris 3xTg-AD en comparaison avec des souris contrôles

C57BL/6JR. La quantité d'ARNs extraite permet de réaliser des études par RT-qPCR ou ddPCR sur chaque individu. La **Figure 6** montre les résultats obtenus par ddPCR pour une souris 3xTg-AD et une souris contrôle. Cette étude pilote permet de démontrer la faisabilité de notre méthode pour quantifier des quantités d'ADNc à partir de l'extraction d'ARNs sur nos échantillons de PC microdisséqués. L'approche par ddPCR paraît particulièrement adaptée aux besoins de notre étude, car elle est réalisable à partir de faibles quantités d'échantillon, elle offre une bonne sensibilité et permet une quantification absolue des gènes d'intérêt, ce qui est particulièrement intéressant pour comparer un état physiologique et un état pathologique [33].

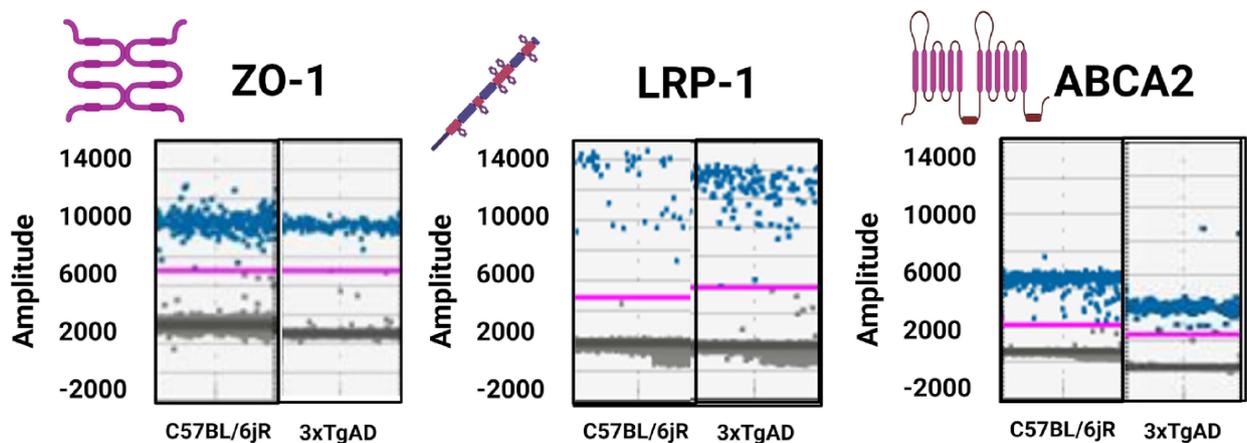


Figure 6. Illustration des résultats transcriptomiques préliminaires sur l'expression d'éléments de la barrière-hématoliquidienne. L'expression de ZO-1, LRP-1 et ABCA2 chez une souris 3xTg-AD en comparaison avec une souris contrôle C57BL/6jR a été étudiée par la technique de ddPCR (*droplet digital PCR*). L'amplitude fait référence au nombre de gouttelettes quantifiées comme positives (portant une copie du gène d'intérêt – en bleu) ou négatives (en absence de copie 28 du gène d'intérêt – en gris). La ligne rose représente le seuil de détection pour les gouttelettes contenant une copie génique d'intérêt. Fait avec BioRender.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats montrent que notre protocole de MDL pour l'isolement et le prélèvement des PC permet d'optimiser l'obtention d'échantillons contenant des quantités suffisantes d'ARNs totaux pour des analyses transcriptomiques ultérieures. Notre protocole permet donc la quantification de gènes d'intérêt

dans les PC de souris sauvages et transgéniques pour la maladie d'Alzheimer, ce qui ouvre des perspectives quantitatives pour l'étude de l'expression de gènes d'intérêt dans un contexte neuropathologique.

D'un point de vue méthodologique, un nombre croissant de travaux montre les avantages de l'utilisation de la MDL dans l'étude du rôle des populations cellulaires cérébrales spécifiques dans des conditions pathologiques diverses [20,34,35]. Néanmoins, chaque question scientifique nécessite un design expérimental adapté afin d'optimiser les coûts associés aux techniques utilisées ainsi que le nombre d'animaux utilisés. Ce dernier point prend une importance majeure dans les études précliniques réalisées sur des modèles animaux à phénotype invalidant, qui sont très souvent associés à des évaluations comportementales comprises dans des designs longitudinaux. Nous avons tiré profit des caractéristiques anatomo-morphologiques des PC pour optimiser la préparation des échantillons et la MDL. Ainsi, les possibilités d'augmenter l'épaisseur de coupe et d'éliminer l'étape de coloration, rendues possibles par le fait que les PC sont faciles à localiser et à isoler dans les ventricules latéraux, nous ont permis d'une part de réduire le temps de manipulation et d'exposition du tissu avant la MDL à proprement parler, et d'autre part d'optimiser la qualité des biomolécules à analyser. Etant donné que le temps est la variable à plus fort impact lors de l'utilisation de la MDL à des fins transcriptomiques et qu'il dépend fortement de la capacité des expérimentateurs à isoler correctement les populations cellulaires d'intérêt du reste du tissu, notre protocole est adapté pour l'obtention de microdissécats purs (e.g., sans contamination) et a probablement un impact positif sur la qualité des biomolécules. Cependant, un contrôle de la qualité des ARNs sur système type *Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*) serait nécessaire pour confirmer ce dernier point.

Nous avons observé que les désavantages retrouvés lors de l'étude des PC par des approches immunohistologiques classiques, fondamentalement associés à la nature même du tissu qui est souvent replié sur lui-même, peuvent être transformés en avantages en utilisant la MDL.

L'objectif de ce type d'approches est d'apporter des solutions méthodologiques à des questions scientifiques spécifiques. La littérature a largement montré,

en utilisant différentes approches, que le fonctionnement cérébral est progressivement dégradé dans des pathologies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Les barrières cérébrales constituent des portes d'entrée pour des substances nocives dans le cerveau, mais sont aussi des portes de sortie pour de nombreux métabolites. Nous montrons que la quantification d'éléments clés de la BHL interne peut être étudiée par la méthode de MDL. Une perspective serait de continuer notre travail pour mettre au point un protocole de microdissection de la BHL arachnoïdienne.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'Animalerie Centrale de Besançon pour le soin des animaux au quotidien. Nous tenons à remercier aussi Pierre-Yves Risold pour tous ses conseils et son expertise en immunohistologie et neuroanatomie.

Nous remercions Anne Peigney et Eric Hervouet de la Plateforme Technique d'Epigénétique et Expression Génétique (EPIGENExp - Right) de Besançon, au Laboratoire Interactions hôte-greffon-tumeur et ingénierie cellulaire et génique de l'Université de Franche-Comté, pour leur expertise et participation aux expériences de RT-qPCR et ddPCR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOURASSET, F., AUVITY, S., THORNE, R.G. & SCHERRMANN, J.-M. Brain Distribution of Drugs: Brain Morphology, Delivery Routes, and Species Differences. Cader Z, Neuhaus W, In *Physiology, Pharmacology and Pathology of the Blood-Brain Barrier*, Vol**273**, edited by: Springer International Publishing, 2020: 97-120.
2. STRAZIELLE, N. & GHERSI-EGEA, J.-F. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Frontiers in Neuroscience*, 2015, **9**.
3. SAUNDERS, N.R., HABGOOD, M.D., MØLLGÅRD, K. & DZIEGIELEWSKA, K.M. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Research*, 2016, **5**: 313.

4. ZHANG, Z., TACHIKAWA, M., UCHIDA, Y. & TERASAKI, T. Drug Clearance from Cerebrospinal Fluid Mediated by Organic Anion Transporters 1 (Slc22a6) and 3 (Slc22a8) at Arachnoid Membrane of Rats. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, **15** (3) 911–22.
5. GOMEZ-ZEPEDA, D., TAGHI, M., SCHERRMANN, J.-M., DECLEVES, X. & MENET, M.-C. ABC Transporters at the Blood–Brain Interfaces, Their Study Models, and Drug Delivery Implications in Gliomas. *Pharmaceutics*, 2019, **12** (1) 20.
6. DODACKI, A., WORTMAN, M., SAUBAMÉA, B., CHASSEIGNEAUX, S., NICOLIC, S., PRINCE, N., LOCHUS, M., RAVEU, A.-L., DECLÈVES, X., SCHERRMANN, J.-M., PATEL, S.B. & BOURASSET, F. Expression and function of Abcg4 in the mouse blood–brain barrier: role in restricting the brain entry of amyloid- β peptide. *Scientific Reports*, 2017, **7** (1) 13393.
7. KINNECOM, K. & PACHTER, J.S. Selective capture of endothelial and perivascular cells from brain microvessels using laser capture microdissection. *Brain Research Protocols*, 2005, **6**:1–9.
8. AL FETEISI, H., AL-MAJDOUB, Z.M., ACHOUR, B., COUTO, N., ROSTAMI-HODJEGAN, A. & BARBER, J. Identification and quantification of blood–brain barrier transporters in isolated rat brain microvessels. *Journal of Neurochemistry*, 2018, **6** (6) 670–85.
9. DION-ALBERT, L., CADORET, A., DONEY, E., KAUFMANN, FN., DUDEK, K.A., DAIGLE, B., PARISE, L.F., CATHOMAS, F., SAMBA, N., HUDSON, N., LEBEL, M.; signature consortium; CAMPBELL, M., TURECKI, G., MECHAWAR, N. & MENARD, C. Vascular and blood–brain barrier–related changes underlie stress responses and resilience in female mice and depression in human tissue. *Nature Communications*, 2022, **13** (1) 164.
10. GIANNONI, P., ARANGO-LIEVANO, M., NEVES, I.D., ROUSSET, M.-C., BARANGER, K., RIVERA, S., JEANNETEAU, F., CLAEYSEN, S. & MARCHI, N. Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 2016, **8**:107–17.
11. BOWYER, J.F., THOMAS, M., PATTERSON, T.A., GEORGE, N.I., RUNNELLS, J.A. & LEVI, M.S. A Visual Description of the Dissection of the Cerebral Surface Vasculature and Associated Meninges and the Choroid Plexus from Rat Brain. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, **14**: (69):e4285.

12. SPENNATO, P., ONORINI, N., VITULLI, F., CINALLI, M.A., DI COSTANZO, M., MIRONE, G. & CINALLI, G. Pure endoscopic ultrasonic removal of choroid plexus papillomas of the third ventricle: technical report of two cases. *Child's Nervous System*, 2023, **39**(12): 3415–3420.
13. DERK, J., COMO, C.N., JONES, H.E., JOYCE, L.R., KIM, S., SPENCER, B.L., BONNEY, S., O'ROURKE, R., PAWLIKOWSKI, B., DORAN, K.S. & SIEGENTHALER, J.A. Formation and function of the meningeal arachnoid barrier around the developing mouse brain. *Developmental Cell*, 2023, **58**: 635–644.e4
14. BRØCHNER, C.B., HOLST, C.B. & MØLLGÅRD, K. Outer brain barriers in rat and human development. *Frontiers in Neuroscience*, 2015, **9**.
15. YASUDA, K., CLINE, C., VOGEL, P., ONCIU, M., FATIMA, S., SORRENTINO, B.P., THIRUMARAN, R.K., EKINS, S., URADE, Y., FUJIMORI, K. & SCHUETZ, E.G. Drug Transporters on Arachnoid Barrier Cells Contribute to the Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier. *Drug Metabolism and Disposition*, 2013, **41**: 923–931.
16. RASMUSSEN, M.K., MESTRE, H. & NEDERGAARD, M. Fluid transport in the brain. *Physiological Reviews*, 2022, **102**: 1025–1151.
17. GONZALEZ-MARRERO, I., HERNÁNDEZ-ABAD, L.G., CASTAÑEYRA-RUIZ, L., CARMONA-CALERO, E.M. & CASTAÑEYRA-PERDOMO, A. Changes in the choroid plexuses and brain barriers associated with high blood pressure and ageing. *Neurología (English Edition)*, 2022, **7** (5): 371–82.
18. SOLÁR, P., ZAMANI, A., KUBÍČKOVÁ, L., DUBOVÝ, P. & JOUKAL, M. Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2020, **17**: 35.
19. GIÃO, T., TEIXEIRA, T., ALMEIDA, M.R. & CARDOSO, I. Choroid Plexus in Alzheimer's Disease – The Current State of Knowledge. *Biomedicines*, 2022, **10** (2): 224.
20. MURUGESAN, N., PAUL, D., LEMIRE, Y., SHRESTHA, B., GE, S. & PACHTER, J.S. Active induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by MOG35–55 peptide immunization is associated with differential responses in separate compartments of the choroid plexus. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2012, **9**: 15.
21. BROWN, P.D., DAVIES, S.L., SPEAKE, T. & MILLAR, I.D. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 2004, **29** (4): 955–68.

22. STRAZIELLE, N. & GHERSI-EGEA, J.-F. Potential Pathways for CNS Drug Delivery Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 2016, **22** (35): 5463–76.
23. MATSUMOTO, K., CHIBA, Y., FUJIHARA, R., KUBO, H., SAKAMOTO, H. & UENO, M. Immunohistochemical analysis of transporters related to clearance of amyloid- β peptides through blood-cerebrospinal fluid barrier in human brain. *Histochemistry and Cell Biology*, 2015, **4** (6): 597–611.
24. MURRAY, G.I. An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochemica*, 2007, **9** (3): 171–6.
25. ODDO, S., CACCAMO, A., SHEPHERD, J.D., MURPHY, M.P., GOLDE, T.E., KAYED, R., METHERATE, R., MATTSON, M.P., AKBARI, Y. & LAFERLA, F.M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, 2003, **9** (3) 409–21.
26. BELFIORE, R., RODIN, A., FERREIRA, E., VELAZQUEZ, R., BRANCA, C., CACCAMO, A. & ODDO, S. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, 2019, **18**: e12873.
27. DO, T.M., DODACKI, A., ALATA, W., CALON, F., NICOLIC, S., SCHERRMANN, J.-M., FARINOTTI, R. & BOURASSET, F. Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- β Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *Journal of Alzheimer's Disease*, 2015, **49** (2): 287–300.
28. SOTTOCORNOLA, R., ROYER, C., VIVES, V., TORDELLA, L., ZHONG, S., WANG, Y., RATNAYAKA, I., SHIPMAN, M., CHEUNG, A., GASTON-MASSUET, C., FERRETTI, P., MOLNÁR, Z. & LU, X. ASPP2 Binds Par-3 and Controls the Polarity and Proliferation of Neural Progenitors during CNS Development. *Developmental Cell*, 2010, **19**: 126–137
29. PASCALE, C.L., MILLER, M.C., CHIU, C., BOYLAN, M., CARALOPOULOS, I.N., GONZALEZ, L., JOHANSON, C.E. & SILVERBERG, G.D. Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2011, **8**:21.
30. DAVIS, W. & TEW, K.D. ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) as a therapeutic target. *Biochemical Pharmacology*, 2018, **151**: 188–200.

31. ZHOU, C., INAGAKI, N., PLEASURE, S.J., ZHAO, L., KIKUYAMA, S. & SHIODA, S. ATP-binding cassette transporter ABCA2 (ABC2) expression in the developing spinal cord and PNS during myelination. *Journal of Comparative Neurology*, 2002, **451** (4) : 334–45.
32. MAITRE, M. & FAVIER, M. Microdissection laser de coupes histologiques : passé, présent et futur. *Revue Française d'Histotechnologie*, 2023, **35** (1): 195–222.
33. TAYLOR, S.C., LAPERRIERE, G. & GERMAIN, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*, 2017, **7** (1): 2409.
34. MACDONALD, J.A., MURUGESAN, N. & PACHTER, J.S. Validation of immunolaser capture microdissection coupled with quantitative RT-PCR to probe blood–brain barrier gene expression in situ. *Journal of Neuroscience Methods*, 2008, **174**: 219–226.
35. MISHRA, P.K. & TEALE, J.M. Transcriptome analysis of the ependymal barrier during murine neurocysticercosis. *Journal of Neuroinflammation*, 2012, **9**: 733.

