

IDENTIFICATION DES CELLULES DU TISSU OSSEUX PAR HISTOCHIMIE ENZYMATIQUE ET IMMUNOHISTOCHIMIE

AMIAUD Jérôme^{1*}, CHARRIER Céline^{1*}, HEYMANN Dominique^{1,2}

¹ Nantes Université, Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté
de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000, Nantes, France

² Nantes Université, CNRS, UMR6286, US2B, Institut de Cancérologie
de l'Ouest, Bd Jacques Monod, 44805 Saint-Herblain, France

* contribution égale

Auteurs correspondants : jerome.amiaud@univ-nantes.fr
& dominique.heyman@univ-nantes.fr

IDENTIFICATION OF BONE CELLS BY HISTOENZYMOMOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

ABSTRACT

Bone tissue is a derivative of connective tissue composed of an extracellular matrix associated with different cell subsets. Bone remodeling is ensured by two cell types: osteoblasts and osteoclasts. Osteoblasts are mononuclear mesenchymal cells responsible for mineralization process and can be detected by histoenzymological (e.g. bone alkaline phosphatase) or immunohistochemical (e.g. Osterix, Runx2) techniques. Osteoclasts originate from hematopoietic cells and are responsible for bone resorption. Histoenzymological (e.g. TRAP) or immunohistochemical (e.g. Cathepsin K) methods can be used for their detection, their enumeration and to follow their resorption activity. In addition to bone cells, cells of the vascular tree are also very strongly involved in bone growth and subpopulations of endothelial cells can be identified by immunohistochemical approaches (e.g. NG2, endomucin). Since bone tissue is constantly changing throughout life, the balance between the number and activity of osteoblasts and osteoclasts varies over time. This parameter must be integrated into any interpretation of tissue markings. This manuscript describes the main histological approaches used for bone cells and microenvironment characterization.

KEY WORDS

Bone resorption, Decalcification, Enzymatic activity, Immunohistochemistry, Mineralization, Osteoblast, Osteoclast.

RESUME

Le tissu osseux est un dérivé du tissu conjonctif composé d'une matrice extracellulaire associée à différentes populations cellulaires. Le remodelage osseux est assuré par deux types cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont des cellules mésenchymateuses mononucléées responsables du processus de minéralisation et peuvent être mises en évidence par des techniques histoenzymologiques (ex. phosphatase alcaline osseuse) ou immunohistochimiques (ex : Osterix, Runx2). Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique responsables du processus de résorption osseuse. Des méthodes d'identification histoenzymologiques (ex: TRAP) ou immunohistochimiques (ex : Cathepsine K) permettent de les quantifier et d'évaluer leur activité de résorption. A ces cellules osseuses, les cellules de l'arbre vasculaire sont également très fortement impliquées dans la croissance osseuse et des sous-populations des cellules endothéliales peuvent être identifiées par des approches immunohistochimiques (ex : NG2, endomucine). Le tissu osseux étant en perpétuel remaniement tout au long de la vie, la balance entre le nombre et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes varie au cours du temps. Ainsi, ce paramètre doit être intégré à toute interprétation des marquages tissulaires. Ce manuscrit décrit les principales approches utilisées pour la caractérisation histologique des cellules osseuses et de leur microenvironnement.

MOTS CLÉS

Activité enzymatique, Décalcification, Immunohistochimie, Minéralisation, Ostéoblaste, Ostéoclaste, Résorption osseuse.

INTRODUCTION

Le squelette est composé de plusieurs éléments qui incluent : 1) le tissu osseux pour 25% ; 2) les espaces médullaires ou conjonctivo-vasculaires qui intègrent

la moelle osseuse hématopoïétique, 3) le cartilage hyalin pour 10% que l'on observe au niveau des surfaces articulaires et composant les maquettes cartilagineuses au cours du développement [1]. Bien que le tissu osseux soit minoritaire au sein du squelette, il exerce deux fonctions clés qui sont en opposition. Sa première fonction est une fonction mécanique, en permettant l'ancrage des tendons et des muscles et en permettant la locomotion, tout en assurant la protection des organes vitaux (encéphale, cœur, poumons, moelle osseuse). Sa seconde fonction est métabolique puisqu'il représente la principale source de stockage d'ions minéraux pour l'organisme (ex : 99% du calcium). La fonction métabolique reste prioritaire en toutes circonstances. Le tissu osseux se compose d'une matrice extracellulaire organique contenant une fraction minérale et des cellules osseuses. La matrice extracellulaire organique est composée à 90% par du collagène de type I auquel viennent s'ajouter d'autres sous-type de collagènes (type III par exemple, mais pas de collagène de type II) et un grand nombre de protéines comme la fibronectine ou la vitronectine qui jouent un rôle non seulement structural mais également dans la régulation des activités cellulaires. Cette matrice organique est minéralisée et des cristaux de phosphate de calcium (cristaux d'hydroxyapatite plus ou moins substitués par des fluors ou des carbonates). L'association de ces deux composantes est responsable de la dureté du tissu osseux et de ses propriétés mécaniques [2].

Cet article a deux objectifs, -1 décrire les principales caractéristiques du tissu osseux, les types cellulaires qui le composent et -2 partager les méthodes histologiques qui permettent son analyse en fournissant des protocoles détaillés.

1. Caractéristiques des cellules osseuses

Les cellules osseuses sont de trois types : 1) les ostéoblastes qui sont responsables de la synthèse des éléments qui composent la matrice organique, 2) les ostéocytes qui sont des ostéoblastes âgés mais toujours fonctionnels, 3) des ostéoclastes en charge de la résorption du tissu osseux minéralisé.

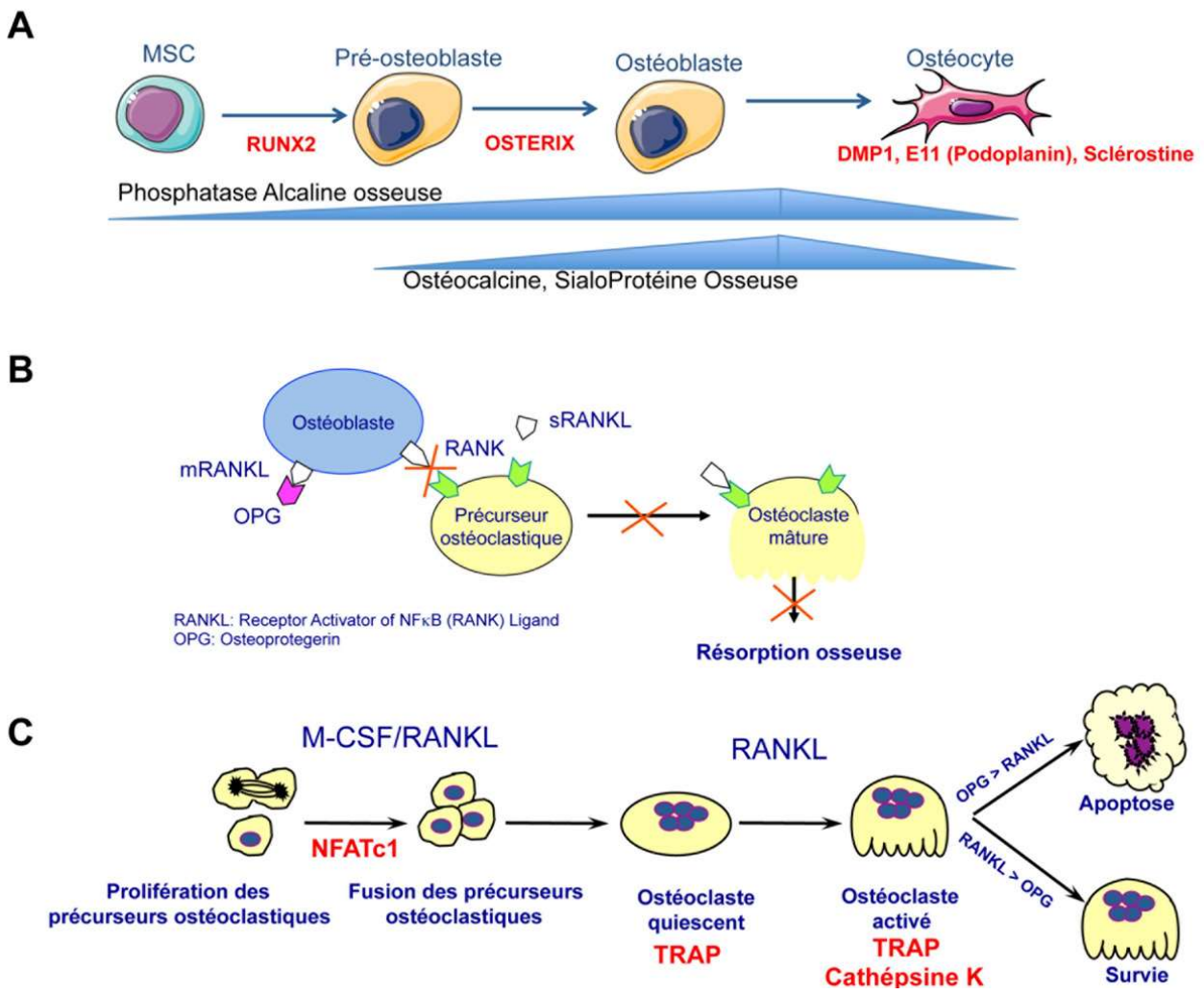


Figure 1. Représentation schématique de l'origine et du processus de différenciation des cellules osseuses. (A) Différenciation des ostéoblastes d'origine mésenchymateuse, responsables de la synthèse de la matrice organique du tissu osseux. La différenciation ostéoblastique est sous la dépendance de facteurs de transcription incluant Runx2 et Osterix. Cette différenciation est associée à l'expression de protéines, tout d'abord la phosphatase alcaline, puis la sialoprotéine osseuse et enfin l'ostéocalcine. Le processus de différenciation terminale des ostéoblastes aboutit à la formation des ostéocytes qui sont emmurés dans la matrice extracellulaire minéralisée et qui expriment la podoplanine, la DMP1 et la sclérostine. (B) La formation des ostéoclastes est sous la dépendance de signaux intracellulaires induits par la cytokine RANKL produit par les cellules stromales de la moelle osseuse, par les ostéoblastes et les ostéocytes. La liaison de RANKL à son récepteur RANK exprimé par les précurseurs ostéoclastiques est responsable de la fusion de ceux-ci et de la formation d'ostéoclastes actifs pouvant résorber le tissu osseux. L'OPG est un récepteur leurre bloquant la résorption osseuse. (C) La différenciation ostéoclastique est induite par la combinaison entre le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) et du RANKL. Le M-CSF soutient la prolifération des précurseurs ostéoclastes et leur survie et RANKL permet leur fusion et leur activation. Ce processus est associé à l'activation du facteur de transcription NFATc1.

1.1. Les ostéoblastes et leurs marqueurs cibles

Pour mettre en évidence les ostéoblastes il convient de connaître les transformations qu'ils connaissent au cours du remodelage osseux, chaque étape se caractérisant par l'expression de marqueurs bien spécifiques. Les ostéoblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse qui présentent un précurseur médullaire commun avec les chondrocytes (cellules du cartilage) et les adipocytes (cellules du tissu adipeux) (**Figure 1A**). Dans la moelle osseuse, une cellule souche mésenchymateuse va s'engager dans la voie de différenciation ostéoblastique en exprimant le facteur de transcription Runx2 (gène *Cbfa1* chez la souris) et permettre la formation d'un pré-ostéoblaste qui exprime la phosphatase alcaline osseuse (PAL) et la sialoprotéine osseuse (BSP). Un second facteur de transcription Osterix prend le relais et induit la différenciation terminale en ostéoblastes qui expriment alors l'ostéocalcine. Les ostéoblastes tapissent la surface des travées osseuses et sont donc en contact avec la matrice extracellulaire minéralisée. Pour des raisons mal connues, certains ostéoblastes vont peu à peu être piégés dans la matrice organique qu'ils synthétisent et se trouvent emmurés dans la matrice en voie de minéralisation. Les ostéoblastes se différencient alors progressivement en ostéocytes et expriment la sclérostine, DMP1 ou la podoplanine. Les ostéocytes jouent un rôle important comme senseurs mécaniques au sein du tissu [3] et régulent négativement l'apposition osseuse par la production de sclérostine [4]. Par ailleurs, ces cellules expriment fortement le Receptor Activator of NF κ B Ligand (RANKL) qui est une cytokine pro-ostéoclastique majeure qui va interagir avec le récepteur Rank des précurseurs ostéoclastiques et induire leur différenciation [5]. Les ostéoblastes peuvent être observés en microscopie optique (**Figure 2**) et les cellules en voie de différenciation ostéoblastique peuvent être mises en évidence par immunohistochimie. La détection du facteur de transcription Sox9 (**Figures 3A-B**) permet d'identifier des progéniteurs mésenchymateux pluripotents, le facteur de transcription Runx2 marque l'engagement des cellules dans la différenciation ostéochondrogénique (**Figures 3C-D**) et le facteur de transcription Osterix marquera les progéniteurs ostéoblastiques (**Figure 3A et Figures 3E-F**).

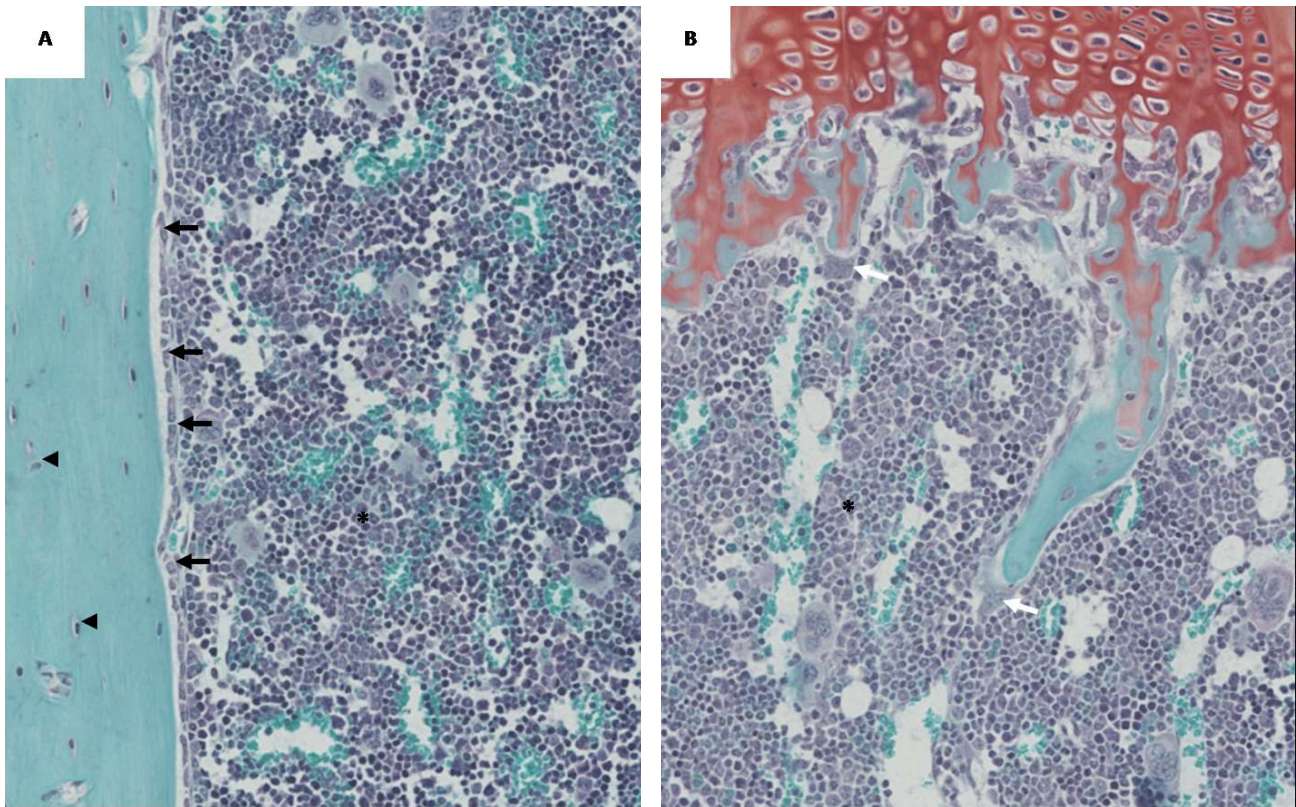


Figure 2 : Ostéoblastes et ostéoclastes observés en microscopie optique de tissu osseux murin.

(A) Les ostéoblastes recouvrent l'ensemble des surfaces des travées osseuses (flèches noires). Les ostéoblastes au repos (appelées cellules bordantes) sont des cellules épithélioïdes aplaties qui deviennent cubiques lorsqu'elles sont actives et synthétisent de la matrice organique (tissu ostéoïde). Les ostéoblastes sont donc à l'interface des travées osseuses et de la moelle osseuse hématopoïétique (astérisques noires). Les ostéocytes (triangles noirs) sont issus de la différenciation terminale des ostéoblastes et sont emmurés dans le tissu osseux minéralisé. Ils restent en contact entre eux et avec les ostéoblastes en surface par des jonctions communicantes. Coloration Safranine O, Fast Green. (B) Les ostéoclastes (flèches blanches) sont des cellules volumineuses multinucléées en contact des travées minéralisées (triangles noirs : travées de cartilage calcifié). Ils sont en beaucoup moins grand nombre que les ostéoblastes. Astérisques noires : moelle osseuse hématopoïétique. (Grossissement x20)

1.2. Les ostéoclastes et leurs marqueurs cibles

Pour mettre en évidence les ostéoclastes il convient de la même façon de connaître leurs transformations au cours du remodelage osseux, chaque étape se caractérisant par l'expression de marqueurs différents. Les ostéoclastes sont des cellules dédiées à la dégradation du tissu osseux par un mécanisme extracellulaire appelé résorption, ils peuvent être directement observés au microscope après une coloration Safranine O - Fast Green (**Figure 2B**). Les ostéoclastes dérivent de précurseurs hématopoïétiques mononucléés

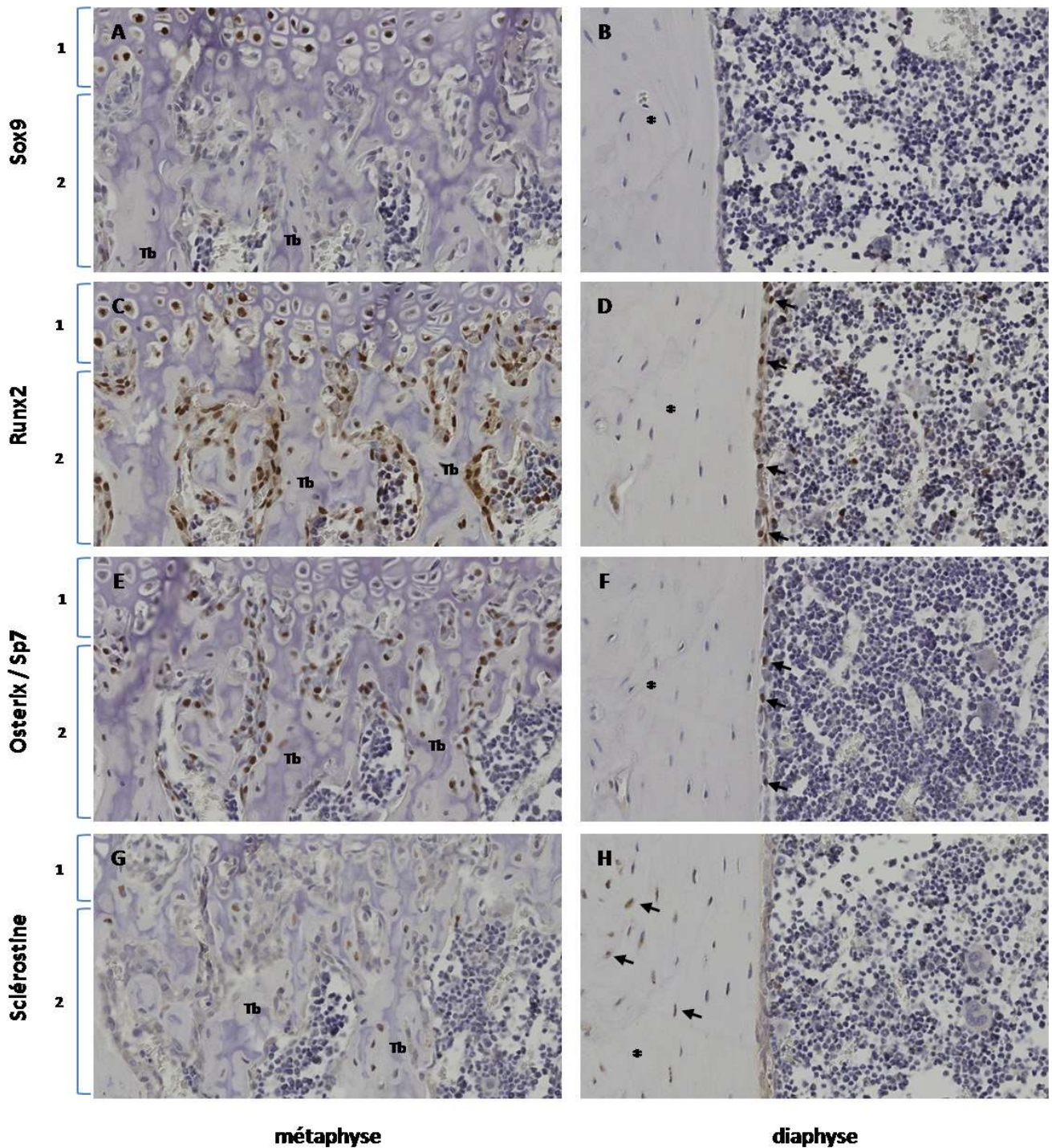


Figure 3 : Mise en évidence des précurseurs mésenchymateux pluripotents et de différenciation ostéoblastique par immunohistochimie sur tissu osseux murin. (A, B) Immunomarquage du facteur de transcription Sox9 mettant en évidence au sein de la plaque de croissance (1) les précurseurs mésenchymateux pluripotents (noyaux DAB+). (C, D) Immunomarquage Runx2 mettant en évidence les progéniteurs engagés dans la différenciation ostéochondrogénique, présents en épiphyse (plaque de croissance (1) et os trabéculaire, Tb, (2)) mais aussi en diaphyse (flèches). (E, F) Immunomarquage Osterix/Sp7 mettant en évidence les précurseurs ostéoblastiques présents dans le long de l'os trabéculaire, mais aussi le long de l'os cortical (astérisque) de la diaphyse (flèches). (G, H) Immunomarquage de la sclérostine mettant en évidence les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse en cours de minéralisation (flèches). (Grossissement x20)

communs à la lignée monocyte/macrophage. La formation des ostéoclastes est dépendante de RANKL, membre de la superfamille du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) produit par les cellules stromales de la moelle osseuse et par les ostéocytes (**Figure 1B**). RANKL produit sous une forme membranaire ou soluble va se lier à son récepteur RANK exprimé par les précurseurs ostéoclastiques. Cette liaison induit des signaux intracellulaires spécifiques activant NF κ B et l'expression du facteur de transcription NFATc1 et est responsable de la fusion des précurseurs et de la formation de cellules multinucléées (5-10 noyaux, jusqu'à 40 μ m de diamètre) en charge de la résorption du tissu osseux. L'interaction entre RANKL et RANK est régulée par l'ostéoprotégérine (OPG), un récepteur leurre soluble de la superfamille du récepteur au TNF- α . L'OPG bloque la liaison entre RANKL et RANK et bloque la formation des ostéoclastes et le processus de résorption osseuse (**Figure 1C**) [6]. L'OPG est considérée comme une protéine ubiquitaire. L'ostéoclastogenèse est sous la dépendance de RANKL comme indiqué précédemment et d'un second signal qui est le plus souvent induit par le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF). Cette voie est appelée voie canonique de l'ostéoclastogenèse. Le M-CSF permet la prolifération des précurseurs ostéoclastiques et leur survie (**Figure 1C**). Le M-CSF peut être substitué par d'autres cytokines constituant la voie non canonique de l'ostéoclastogenèse.

Le mécanisme de résorption osseuse est un processus extracellulaire qui est en lien avec la sécrétion de protons dédiés à la dissolution de la phase minérale et d'enzymes en charge de la dégradation de la phase organique du tissu osseux (**Figure 4**) [7].

Les ostéoclastes quiescents vont être activés par RANKL (**Figure 1C**) et adhérer très fortement au substrat minéralisé par l'intermédiaire d'intégrines se liant à la vitronectine. Ce processus va induire le changement de forme de la cellule qui va établir une zone étanche (zone claire dépourvue d'organite intracellulaire et riche en filaments d'actine) à son pôle basal (contact avec le tissu minéralisé) et développer de nombreuses expansions cytoplasmiques (bordure en brosse) (**Figure 2**). L'anhydrase carbonique de type II va catalyser une réaction chimique qui aboutit à la formation de protons qui seront libérés sous la bordure en brosse par des pompes à protons dépendantes

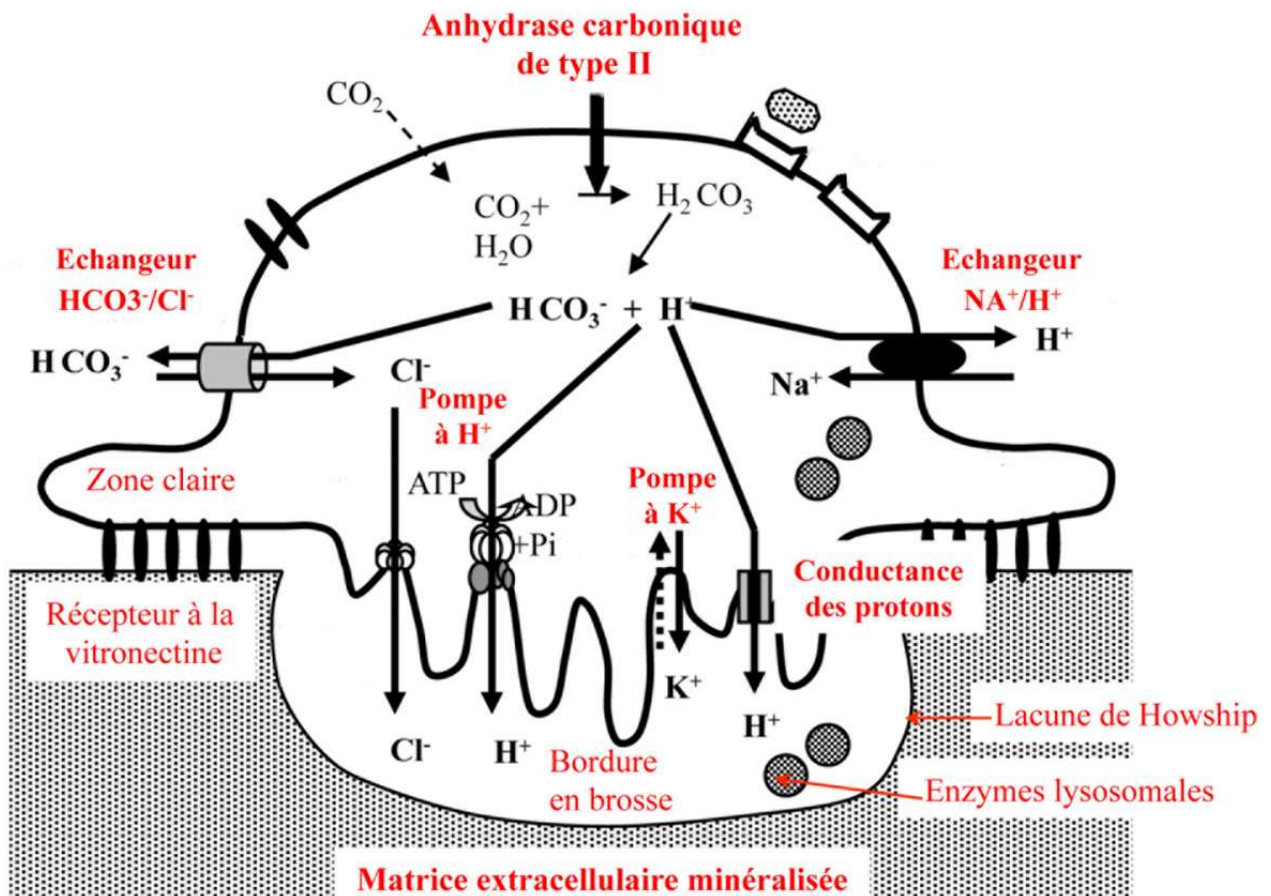


Figure 4 : Représentation schématique du processus de résorption osseuse. La résorption osseuse est assurée par les ostéoclastes et combine la production et libération de protons et d'enzymes lysosomales par la cellule en regard de son pôle basal (contact avec la matrice osseuse minéralisée) au niveau d'une zone étanche appelée bordure en brosse. Les protons libérés de manière active à l'aide de pompe à protons sont issus d'une réaction enzymatique catalysée par l'anhydrase carbonique de type II et permettent la dissolution de la fraction minérale du tissu osseux. Les enzymes lysosomales qui incluent des enzymes de cystéines protéases (Cathepsine K, etc.) et métalloprotéases (MMP-2, MMP-9, etc.) participent à la dégradation de la fraction organique du tissu osseux.

de l'ATP. Cette dépendance d'énergie est à associer à la présence d'un très grand nombre de mitochondries dans le cytoplasme des ostéoclastes. Les protons vont peu à peu dissoudre la fraction minérale du tissu osseux. De manière concomitante, les ostéoclastes sécrètent de nombreuses enzymes lysosomales. La cathepsine K, une cystéine protéase, qui agit à pH acide et dégrade la matrice organique extracellulaire. La phosphatase acide résistante au tartrate (isoforme 5B, TRAP5B) dont le substrat reste mal connu est également libérée. Cette double dégradation est responsable de la formation d'une lacune de résorption appelée lacune de Howship. Au fur et à mesure de

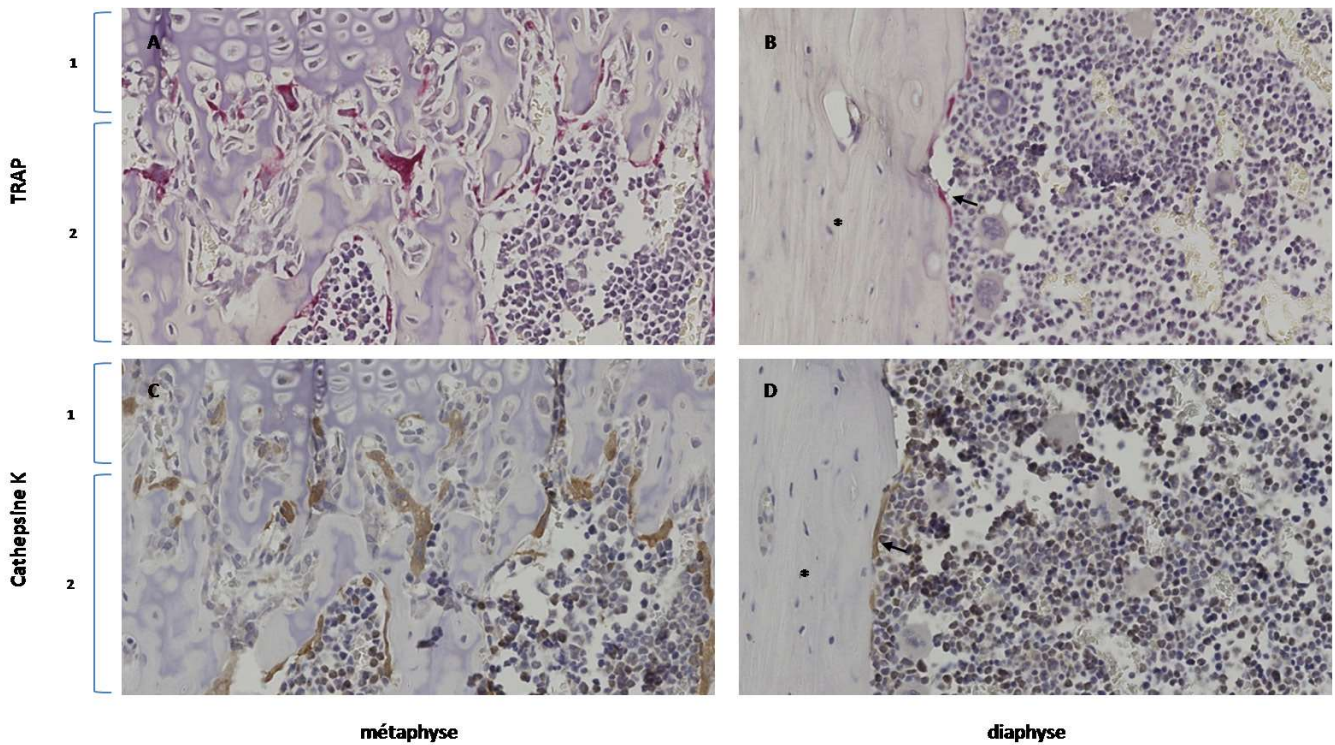


Figure 5 : Mise en évidence des ostéoclastes par histoenzymologie et immunohistochimie sur tissu osseux murin. (A, B) Mise en évidence de l'ensemble des ostéoclastes par histoenzymologie TRAP (flèches noires). (C, D) Mise en évidence des ostéoclastes actifs par immunohistochimie (flèches noires). (Grossissement x20)

la dégradation du tissu osseux, les taux de calcium augmentent peu à peu sous l'ostéoclaste et sont responsables de la dépolymérisation des filaments d'actine de la zone claire. L'étanchéité de la cellule au support se réduit, le pH augmente sous la cellule et les métalloprotéases type MMP-9 vont être actives et permettre à l'ostéoclaste de se mouvoir à la surface du tissu osseux et aller former une nouvelle lacune de résorption à proximité.

Les ostéoclastes expriment les marqueurs suivants : CD14, CD68, RANK, le récepteur à la calcitonine, et sont positifs pour l'activité TRAP et cathepsine K, ce qui permet de les mettre en évidence sur des coupes histologiques (**Figure 5**). L'activité TRAP peut être mise en évidence par une approche histoenzymologique, et met en évidence l'ensemble des ostéoclastes et le nombre de cellules TRAP5B+ reflète le nombre d'ostéoclastes (**Figures 5A et 5B**). La cathepsine K peut être mise en évidence par immunohistochimie. La cathepsine K révèle des ostéoclastes actifs et est donc le reflet de l'activité de résorption (**Figures 5C et 5D**).

2. Aspects méthodologiques

2.1. La décalcification du tissu osseux

La composante minérale du tissu est la fraction qui persiste après la mort lorsque le tissu osseux ne contient plus de cellules [8]. Comme le montre la coupe transversale d'un os long, il est possible de distinguer deux territoires anatomiques osseux sur une pièce osseuse (**Figure 6**). La zone périphérique qui entoure la pièce osseuse et qui apparaît très dense est appelé « os cortical » et est composé de tissu osseux dit compact. Le centre présente une structure en éponge appelée tissu osseux spongieux et constitue « l'os trabéculaire ». L'os trabéculaire résulte d'un assemblage de plaques minéralisées reliées par des piliers [2]. Cette composante minérale apparaît dense aux rayons X et permet de matérialiser les os en radiographie.

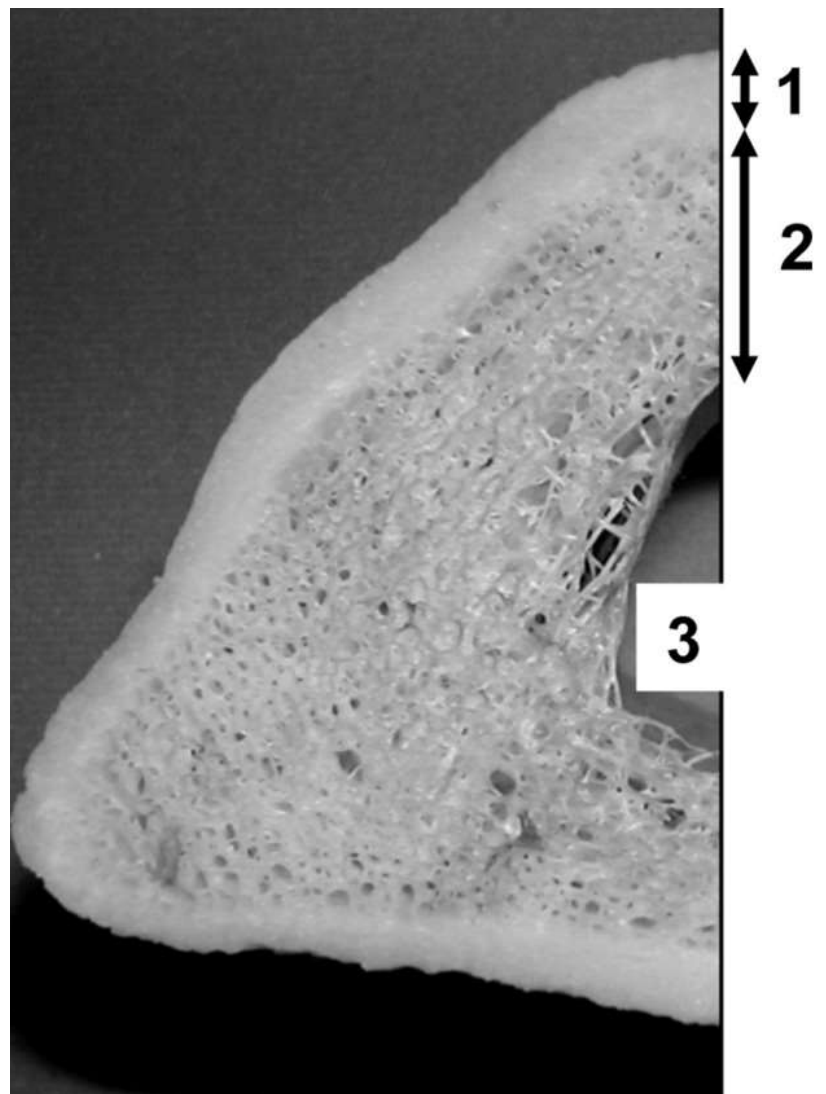


Figure 6 : Vue macroscopie d'une coupe transversale d'os long bovin. (1) os cortical appelé os compact, (2) os trabéculaire aussi appelé os spongieux pour sa ressemblance avec l'organisation structurale d'une éponge, associé étroitement à la moelle osseuse hématopoïétique, (3) cavité médullaire.

Si ce minéral présente des propriétés mécaniques et métaboliques indispensables, il représente une problématique majeure pour son analyse histologique. En effet, il est responsable de la dureté du tissu osseux qui à l'état frais ou fixé reste très difficile à couper à l'aide d'un microtome classique. Il est possible d'inclure des petites pièces osseuses minéralisées dans des résines (ex: méthylmétacrylate) qui permet la réalisation à l'aide d'une scie diamantée, de coupes supérieures à 10 μm d'épaisseur qui peuvent être colorées par la suite [9]. Cependant, l'utilisation de résine limite le champ exploratoire du tissu osseux en rendant complexe la réalisation d'immunohistochimie. Afin de permettre l'inclusion en paraffine de pièces osseuses, il est donc nécessaire de recourir à des méthodes de décalcification (dissolution des éléments minéraux) après fixation qui permettent de garder intacte l'architecture osseuse en n'altérant pas l'organisation tridimensionnelle de la matrice organique. Trois méthodes principales peuvent être utilisées.

1. Utilisation d'acides forts : à base d'acide nitrique 5-10% associé ou non à l'acide chromique et à l'acide chlorhydrique. Cette méthode est principalement utilisée pour la décalcification des grosses pièces anatomiques et lorsque le tissu osseux doit être analysé rapidement. C'est le cas dans les laboratoires d'anatomie pathologique. Si la décalcification est rapide, il y a un risque important d'altération antigénique et de difficulté d'analyse par immunohistochimie.

2. Utilisation d'acides faibles : à base d'acide formique 5-20% associé ou non à du citrate de sodium et du formiate de sodium. Cette approche permet une décalcification rapide du tissu osseux, tout en préservant la grande majorité des sites antigéniques et des acides nucléiques.

3. Utilisation d'un agent chélateur : à base d'une solution d'EDTA (4,13%) contenant 0,2% de paraformaldéhyde en tampon phosphate, pH 7,4. La décalcification est réalisée alors à 4 °C sous agitation pendant trois à quatre semaines selon la taille de la pièce. Une autre approche va consister à placer les os à décalcifier dans cette solution mais à réaliser la décalcification dans un micro-onde dédié, à une température contrôlée de 50 °C (KOS, The Microwave Multifunctional Tissue Processor, Milestone Medical). Cette dernière approche permet de décalcifier un fémur de souris adulte en 96 heures. Afin

de contrôler l'avancée du processus de décalcification, une acquisition à l'aide d'un appareil radio (Faxitron MX-20) est réalisée tous les 4 jours. Ces méthodes de décalcification douces permettent une excellente préservation des sites antigéniques et des acides nucléiques [10,11].

2.2. Les techniques d'immunohistochimie sur tissus décalcifiés en EDTA et inclus en paraffine

L'étude du tissu osseux sur des coupes de tissus fixés en formol, décalcifiés en EDTA et inclus en paraffine nécessite quelques précautions afin de parvenir à mettre en pratique de nouveaux anticorps. La première étape concerne la préparation des tissus. Ainsi une fixation de 48 h maximum en formol tamponné (Microm Microtech, F/40877-41) doit être respectée pour permettre tout type de marquage par la suite. Dans le cas des études nécessitant des acquisitions par microscanner, celle-ci est réalisée le lendemain du prélèvement, et la fixation est poursuivie jusqu'au jour suivant, avant de démarrer l'étape de décalcification. L'imprégnation est réalisée ensuite pour des échantillons de la taille d'une patte de souris sur 22 h dans un carrousel (Microm Microtech, STP 120) en utilisant comme solvant intermédiaire le butan-2-ol, et comme paraffine d'imprégnation l'Histowax (Microm Microtech, F/00403).

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome rotatif automatisé (Leica, RM2255) équipé de lame MX35 Ultra (Epredia, E/3053835) à une épaisseur comprise entre 3 et 5 µm maximum. L'étape de dégrossissage doit se faire à une épaisseur de 15 à 20 µm maximum sur un bloc froid pour éviter d'arracher la corticale ou l'os trabéculaire. Les coupes sont étalées sur un bain d'eau distillée maintenue à 42 °C puis recueillies sur lames Superfrost+ (coloration standard, histoenzymologie, démasquage à la chaleur en tampon citrate pH 6) ou Polylysine (démasquage à la chaleur en tampon Tris EDTA pH 9) nécessairement de type Menzel-Gläser. Une fois réalisées ces coupes sont mises à sécher à l'étuve à 37 °C sur la nuit. Il est alors possible :

- soit de paraffiner celles-ci en les immergeant dans de la paraffine liquide, puis après solidification de les mettre en boîte et les conserver à 4 °C jusqu'à 3 mois.
- soit de procéder directement aux immunomarquages.

Les techniques d'immunohistochimie sur tissu osseux sont globalement

| Cible | Fournisseur | Référence | Espèce | Réactivité testée | Dilution |
|--------------|-------------|-----------|--------|-------------------|----------|
| Runx2 | Abcam | ab192256 | Rb | H, Ms | 1/1600 |
| Osterix | Abcam | ab22552 | Rb | H, Ms, Rt | 1/1000 |
| Sclerostine | R&D Systems | AF1589 | Gt | Ms | 1/200 |
| Sox9 | Abcam | ab185966 | Rb | H, Ms | 1/200 |
| Cathepsine K | Abcam | ab19027 | Rb | H, Ms, Rt | 1/3000 |
| NG2 | Abcam | ab129051 | Rb | Ms | 1/100 |
| CD31 | Abcam | ab28364 | Rb | H, Ms, Rt | 1/50 |
| Endomucine | Abcam | ab106100 | Rt | Ms | 1/100 |
| aSMA | R&D Systems | MAB1420 | Ms | H, Ms, Rt | 1/3000 |

Tableau I : Liste des anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des cellules osseuses et de leur microenvironnement vasculaire en immunohistochimie. Ce tableau présente les références fournisseurs, les espèces et les dilutions des anticorps primaires utilisés pour la caractérisation du tissu osseux et de son microenvironnement vasculaire sur des coupes de tissus inclus fixés au formol.

identiques à celles réalisées sur d'autres tissus à l'exception du démasquage antigénique à la chaleur qui se déroule sur 20 h à 60°C dans la solution adaptée (tampon citrate ou Tris EDTA). Cette singularité de méthodologie permet à la fois une conservation optimale de la morphologie du tissu, mais aussi de préserver les sites antigéniques. Le **tableau I** décrit les anticorps utilisés (référence, condition de pré-traitement, dilution) tant pour la caractérisation des cellules osseuses que pour le microenvironnement vasculaire du tissu osseux.

Dans la plupart des cas une incubation de l'anticorps primaire dilué en solution de blocage pendant une heure à température ambiante donne d'excellents résultats. Le reste de la méthodologie se fera de façon classique par utilisation soit de polymère soit d'anticorps secondaires biotinylés ou directement couplés à un fluorochrome ou une enzyme.

Les résultats présentés dans les **Figures 4 et 5**, utilisent comme complexe de révélation un système StreptABC (StreptAvidin Biotin Complexe) avec comme enzyme la peroxidase de Raifort (HorseRadish Peroxidase, HRP) et comme solution de révélation la DiAminoBenzidine (DAB Liquide Quanto, F/TA-125-QHDX).

2.3. Les techniques d'histoenzymologie pour la mise en évidence des ostéoclastes sur tissus décalcifiés en EDTA et inclus en paraffine

Les ostéoclastes peuvent être mis en évidence sur des coupes de tissus décalcifiés en EDTA et inclus en paraffine. Le substrat utilisé est du naphthol phosphate AS-MX (Sigma, N4875) et la réaction est révélée par des sels de Fast violet LB (Sigma, F3381) en tampon acétate à un pH de 5. Les coupes réhydratées sont incubées dans cette solution 1 h à 37 °C [12].

Une attention particulière devra être portée à la préparation des échantillons en veillant au temps de fixation, à la méthodologie de décalcification employée, et à la conservation des échantillons avant leur imprégnation en paraffine. En effet une fixation prolongée en formol, l'emploi de décalcifiants acides, ou un stockage trop long dans de l'éthanol, entraînent une altération fonctionnelle de l'enzyme et un défaut de marquage.

2.4. La mise en évidence des réseaux vasculaires par immunofluorescence

Des travaux récents ont démontré que la formation osseuse était étroitement couplée à des systèmes vasculaires spécifiques [13,14]. Ces auteurs ont ainsi identifié deux types de micro-vaisseaux sanguins sur la base de leur expression révélée par immunohistochimie en endomucine (marquage des cellules endothéliales hors artères), NG2 (marquages des cellules périvasculaires, péricytes) et α SMA (marquage des léiomyocytes des parois vasculaires). Ces deux types présentent les caractéristiques ci-dessous :

- Micro-vaisseaux de type H (CD31^{High}, Endomucine^{High}), localisés à proximité des ostéoprogéniteurs au niveau de la plaque de croissance,
- Micro-vaisseaux de type L (CD31^{Low}, Endomucine^{Low}). Ce sont des vaisseaux de nature sinusoïde et localisés dans la diaphyse des os longs.

Le protocole de détection de ces antigènes par immunohistochimie est décrit en détails dans les travaux de Kusumbe A.P. de 2015 [15].

Les principales étapes sont résumées ci-dessous :

- 1) Fixation: 4% (wt/vol) paraformaldehyde, 4 °C (4-6 h),
- 2) Décalcification courte et partielle: EDTA 0,5 M, pH 7,4, 4 °C, agitation constante (24-48 h),
- 3) Cryoprotection: 20% (wt/vol) sucrose, 2% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone (PVP),

4) Enrobage: 8% (wt/vol) gélatine, 20% (wt/vol) sucrose, 2% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone,

5) Section: épaisseur 70 – 150 μm ,

6) Immunomarquage :

- Perméabilisation du tissu avec 0,3% (vol/vol) de Triton X-100. Dans le cas de coupes d'épaisseur inférieure à 100 μm la perméabilisation se fait dans 0,05% (vol/vol) de Triton X-100,

- Blocage des sites non spécifiques: réalisé avec un sérum adapté,

- Incubation des anticorps primaires : de 2-3 h à température ambiante ou sur la nuit à 4 °C selon l'anticorps utilisé,

7) Observation à l'aide d'un microscope confocal.

DISCUSSION & CONCLUSION

Le tissu osseux est un tissu vivant en perpétuel remaniement pour lui permettre de s'adapter aux variations de contraintes mécaniques (ex : prise de poids) et aux besoins métaboliques (ex : ménopause) auxquelles il est soumis. Ce remaniement assuré par les activités des cellules osseuses permet le renouvellement annuel d'environ 4% de l'os cortical et de 25% de l'os trabéculaire selon l'âge des individus. D'une manière générale, le squelette se renouvelle *ad integrum* tous les dix ans. Dans des conditions physiologiques, la balance entre la formation osseuse par les ostéoblastes et la perte osseuse par la résorption ostéoclastique est à l'équilibre. Dans des conditions pathologiques, le déséquilibre de cette balance résulte en une perte osseuse (ostéoporose) ou un gain en densité minérale osseuse qui peut aboutir à la disparition des espaces médullaires (ostéopétrose). Il faut donc garder à l'esprit que le processus de remodelage osseux est dynamique et que l'analyse histologique des ostéoblastes et des ostéoclastes doit prendre en compte ces cycles métaboliques. Par exemple, chez des souris ovariectomisées développant une ostéoporose, le nombre et l'activité des ostéoclastes vont augmenter rapidement dans les jours et les premières semaines qui suivent cette dérégulation hormonale. Après plusieurs

semaines, un mécanisme compensatoire se met en place chez la souris, et le nombre d'ostéoclastes est alors proche des souris contrôles non opérées même si celles-ci conservent un phénotype ostéoporotique avec une perte de densité minérale osseuse [16,17]. Les données histologiques doivent donc être interprétées de manière appropriée et un phénotype ostéoporotique peut être associé à une exacerbation de l'ostéoclastogenèse ou à une réduction de l'activité ostéoblastique ou à un ralentissement global affectant ces deux types cellulaires qui aboutit à un ralentissement du remodelage osseux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HEYMANN D. & LEPREUX S. Histologie. Bases fondamentales. Omniscience 2008 (Chap. 6), 191–9.
2. HEYMANN D. & LEPREUX S. Histologie. Bases fondamentales. Omniscience 2008 (Chap. 7), 205–19.
3. YOU, L., TEMIYASATHIT, S., LEE, P., KIM, C.H., TUMMALA, P., YAO, W., KINGERY, W., MALONE, A.M., KWON, R.Y. & JACOBS, C.R. Osteocytes as Mechanosensors in the Inhibition of Bone Resorption Due to Mechanical Loading. *Bone*, 2008, **2** (1) 172–9.
4. WIJENAYAKA, A.R., KOGAWA, M., LIM, H.P., BONEWALD, L.F., FINDLAY, D.M. & ATKINS, G.J. Sclerostin Stimulates Osteocyte Support of Osteoclast Activity by a RANKL-Dependent Pathway. *PLoS ONE*, 2011, **6** (10) e25900.
5. NAKASHIMA, T., HAYASHI, M., FUKUNAGA, T., KURATA, K., OH-HORA, M., FENG, J.Q., BONEWALD, L.F., KODAMA, T., WUTZ, A., WAGNER, E.F., PENNINGER, J.M. & TAKAYANAGI, H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 2011, **17** (10) 1231–4.
6. THEOLEYRE, S., WITTRANT, Y., TAT, S.K., FORTUN, Y., REDINI, F. & HEYMANN, D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2004, **15** (6) 457–75.
7. ROUSSELLE, A.-V. & HEYMANN, D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*, 2002, **30** (4) 533–40.

8. MARQUES, C. Chapter 1 - Cancer: lessons to learn from the past. Heymann D, In *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*, edited by: Academic Press, 2022: 5–15.
9. CHAPPARD, D. Chapter 8 - Technical aspects: how do we best prepare bone samples for proper histological analysis? Heymann D, In *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*, edited by: Academic Press, 2022: 93–104.
10. MORICEAU, G., ORY, B., MITROFAN, L., RIGANTI, C., BLANCHARD, F., BRION, R., CHARRIER, C., BATTAGLIA, S., PILET, P., DENIS, M., SHULTZ, L.D., MÖNKKÖNEN, J., RÉDINI, F. & HEYMANN, D. Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer research*, 2010, **70** (24) 10329–39.
11. ROELOFS, A.J. & DE BARI, C. Immunostaining of Skeletal Tissues. Idris AI, In *Bone Research Protocols*, edited by: Springer, 2019: 437–50.
12. BAUD'HUIN, M., LAMOUREUX, F., JACQUES, C., RODRIGUEZ CALLEJA, L., QUILLARD, T., CHARRIER, C., AMIAUD, J., BERREUR, M., BROUNAIS-LEROYER, B., OWEN, R., REILLY, G.C., BRADNER, J.E., HEYMANN, D. & ORY, B. Inhibition of BET proteins and epigenetic signaling as a potential treatment for osteoporosis. *Bone*, 2017, **4** 10–21.
13. KUSUMBE, A.P. & ADAMS, R.H. Osteoclast progenitors promote bone vascularization and osteogenesis. *Nature Medicine*, 2014, (**11**) 1238–40.
14. KUSUMBE, A.P., RAMASAMY, S.K. & ADAMS, R.H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*, 2014, **507** (7492) 323–8.
15. KUSUMBE, A.P., RAMASAMY, S.K., STARSICHOVA, A. & ADAMS, R.H. Sample preparation for high-resolution 3D confocal imaging of mouse skeletal tissue. *Nature Protocols*, 2015, (**12**) 1904–14.
16. BATOON, L., MILLARD, S.M., RAGGATT, L.J., WU, A.C., KAUR, S., SUN, L.W.H., WILLIAMS, K., SANDROCK, C., NG, P.Y., IRVINE, K.M., BARTNIKOWSKI, M., GLATT, V., PAVLOS, N.J. & PETTIT, A.R. Osteal macrophages support osteoclast-mediated resorption and contribute to bone pathology in a postmenopausal osteoporosis mouse model. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2021, **36** (11) 2214–28.
17. LESCLOUS, Ph., GUEZ, D., LLORENS, A. & SAFFAR, J.L. Time-course of mast cell accumulation in rat bone marrow after ovariectomy. *Calcified Tissue International*, 2001, **68** (5) 297–303.

