



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 16503

**To cite this version :**

Bernard, Julie. *Contribution à l'identification des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : validation de protocoles d'immunohistochimie sur os décalcifiés*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 104 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE : VALIDATION DE PROTOCOLES D'IMMUNOHISTOCHEMIE SUR OS DÉCALCIFIÉS

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**BERNARD Julie**

Née, le 03 décembre 1990 à Orléans (45)

Directeur de thèse : **Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

## JURY

PRESIDENT :

**M. Janick SELVES**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

**M. Fabrice CONCHOU**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**M. Frédéric DESCHASEAUX**

**M. Philippe KEMOUN**

Maître de recherches de l'Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée

Maître de Conférences à l'Université Paul Sabatier – Service Odontologie

*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

## REMERCIEMENTS

### **A Madame le Professeur Janick SELVES**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse  
Praticien hospitalier au CHU Oncopole de Toulouse  
*Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,  
Hommages respectueux.*

### **A Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Service anatomie pathologique  
*Qui m'a proposé ce sujet et m'a guidée dans la réalisation de ce travail,  
Qui m'a permis de découvrir au cours de l'année ce beau et prenant  
métier de vétérinaire en anatomie pathologique,  
Qu'elle trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance.*

### **A Monsieur le Docteur Fabrice CONCHOU**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Service d'imagerie médicale  
*Qui m'a fait l'honneur de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse,  
Sincères remerciements.*

### **A Monsieur le Docteur Frédéric DESCHASEAUX**

Maître de Recherche de l'Etablissement Français du Sang Pyrénées-  
Méditerranée  
Laboratoire STROMALab  
*Pour votre participation à l'élaboration de ce travail, vos conseils et votre  
gentillesse,  
Sincères remerciements.*

### **A Monsieur le Docteur Philippe KEMOUN**

Maître de Conférences à l'Université Paul Sabatier – Service Odontologie  
Praticien Hospitalier d'Odontologie  
*Pour votre participation à l'élaboration de ce travail, vos idées et votre  
enthousiasme ainsi que celle de votre équipe,  
Sincères remerciements.*

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	4
TABLE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES .....	9
INTRODUCTION.....	10
Partie I : Introduction du projet .....	12
1. Histologie du tissu osseux et place des CSM.....	12
1.1 Organisation générale du tissu osseux .....	12
1.2 Organisation cellulaire du tissu osseux et place des CSM .....	14
2. Etapes spécifiques à l'étude histologique du tissu osseux en microscopie optique.....	20
2.1 Enjeux de l'élaboration du protocole de décalcification du projet expérimental .....	20
2.2 Les différents décalcifiants et leurs différents impacts sur les prélèvements	21
2.3 Influence de paramètres physiques sur la durée de décalcification.....	33
2.4 Outils permettant l'évaluation du stade de décalcification du prélèvement ...	37
2.5 Différentes méthodes de fixation rencontrées dans la littérature .....	41
2.6 Recommandations établies par l'« International Council for Standardization in haematology » <sup>48</sup> .....	43
BILAN DE LA PARTIE I .....	45
Partie II : Etude expérimentale .....	46
Introduction : .....	46
1. Matériel et méthode.....	49
1.1 Etude n°1 Validation d'un protocole optimal de décalcification.....	49
1.2 Etude n°2 : Tests de marquages immunohistochimiques après décalcification .....	56
2. Résultats.....	62
2.1 Etude n°1 Validation d'un protocole optimal de décalcification.....	62
2.2 Etude n°2 : Tests de marquages immunohistochimiques après décalcification .....	68
3. Discussion .....	79
<i>Concernant l'étape de fixation.....</i>	79
<i>Facteurs susceptibles d'améliorer la décalcification des mandibules canines ....</i>	81

<i>Décalcification et résultats d'immunohistochimie</i> .....	83
Conclusion .....	85
Bibliographie .....	87
Annexes .....	93

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Observation des ostéocytes*, d'un ostéoclaste dans une lacune de Howship (flèche) (à droite) et d'ostéoblastes (à gauche) sur coupes histologiques d'os long observées au microscope optique.....	14
Figure 2 : Chronologie des étapes nécessaires à l'étude du tissu osseux en microscopie optique .....	20
Figure 3 : Forme semi-développée de l'EDTA.....	21
Figure 4 : Marquage Mib1 réparti de manière homogène après décalcification par l'EDTA (A) et hétérogène après utilisation d'un décalcifiant acide (B) (Reineke et al. , 2006).....	26
Figure 5 : Cellules stromales marquées avec l'anticorps anti-vimentine (flèches) sur coupe histologique de moelle osseuse ; Bar de 10µm (LOYSON et al. (1997) <sup>13</sup> ) ....	27
Figure 6 : Schéma du dispositif utilisé pour la décalcification électrolytique en 1958 (Verdinus et al.) .....	33
Figure 7 : Observation au microscope à transmission (x45400) des cellules d'os temporaires décalcifiés à l'aide d'un four à micro-ondes. (Maden et al.).....	35
Figure 8 : Contrôles radiographiques des cubes d'os de chevaux décalcifiés à différents stades (Verdinus et al., 1958) .....	38
Figure 9 : Casette contenant un fémur (à gauche) et un tibia (à droite) de souris ...	51
Figure 10 : SAKURA TDE 30 du laboratoire INSERM de Toulouse (photographie réalisée au cours de la procédure de décalcification électrolytique) .....	51
Figure 11 : Prélèvement d'os canins : zones de découpes et sections obtenues .....	53
Figure 12 : Tranches découpées pour la seconde approche (face à gauche, profil à droite).....	53
Figure 13 : Appareil Precision Diamond Wire Saw 3241 Well.....	54
Figure 14 : Schéma de coupe des tranches à décalcifier (traits colorés : coupe avec le fil diamanté; traits noirs : coupe à la scie oscillante) .....	55
Figure 15 : Série n°1, frise chronologique des différentes étapes réalisées .....	59
Figure 16 : Série n°2, frise chronologique des différentes étapes réalisées .....	59
Figure 17 : Déroulement de l'injection intra-tibiale .....	60

Figure 19 : Ki-67, coupe histologique du groupe n°7, vingt quatre heures de fixation, quarante huit heures de décalcification; (Photographies réalisées au grossissement x100).....	62
Figure 18 : Coupe histologique marquée au Ki-67 par immunohistochimie, groupe 1 .....	62
Figure 20 : Marquage Ki-67, coupes histologiques des os de souris de l'étude n°1 après une durée de décalcification variable (1. 48heures ; 2. Trois jours ; 3. Quatre jours; 4. Cinq jours; 5. Six jours et 6. Sept jours) Photographies réalisées au grossissement x100. ....	64
Figure 21 : Marquage Ki-67, coupes histologiques de fémurs de souris après une durée de décalcification variable (1. 24 heures ; 2. 48 heures ; 3. Trois jours ; 4. Quatre jours ; 5. Cinq jours et 6. Six jours) Photographies réalisées au grossissement x100. ....	64
Figure 22 : Coupes histologiques obtenues après décalcification d'un os fémoral murin par l'EDTA. (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x400 à droite). A = adipocyte ; C = capillaire ; Flèche = ostéocytes ; M = mégacaryocyte ; MO = moelle osseuse ; S=spicule. ....	66
Figure 23 : Coupe histologique de moelle osseuse murine après décalcification des os par l'EDTA à gauche et par décalcification électrolytique au centre et à droite. (Photographies réalisées au grossissement x40) .....	66
Figure 24 : Coupe histologique de moelle osseuse murine après décalcification électrolytique. (Photographie réalisée au grossissement x100) .....	66
Figure 25 : Coupe histologique de fémur murin après décalcification électrolytique. (Photographie réalisée au grossissement x40).....	66
Figure 26 : Coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par décalcification électrolytique à gauche et par l'EDTA à droite.....	67
Figure 27 : Marqueur CD45 sur nœud lymphatique de souris (à gauche), marqueur CD34 (au milieu) sur capillaires d'une zone musculaire de souris et marqueur CD3 (à droite) sur nœud lymphatique de souris (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche à droite et x200 au centre).....	69
Figure 28 : Marqueur CD34, moelle osseuse de fémur de souris après décalcification par l'EDTA à gauche et au centre, et décalcification électrolytique à droite. ....	72



Figure 29 : Marqueur CD45, moelle osseuse de fémur de souris NUDE après décalcification EDTA (à gauche et au centre) et décalcification électrolytique (à droite).....	72
Figure 30 : $\alpha$ SMA, coupes histologiques de moelle osseuse murine après décalcification des os par l'EDTA. (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x400 au centre et x10 à droite) .....	72
Figure 31 : $\alpha$ SMA, coupes histologiques de moelle osseuse murine après décalcification électrolytique des os. (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et x200 à droite) .....	72
Figure 32 : CD3, coupes histologiques de moelle osseuse murine après décalcification par l'EDTA des os. (Photographies réalisées aux grossissements x40 à gauche et x200 à droite).....	73
Figure 33 : CD3, de gauche à droite : nœud lymphatique, thymus, rate murins après exposition à l'EDTA des tissus. (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et au centre et x40 à droite) .....	73
Figure 34 : De gauche à droite : anticorps anti-CD45 sur nœud lymphatique murin, anticorps anti-Ki67 sur nœud lymphatique murin thymus, anticorps anti- $\alpha$ SMA sur tissu musculaire murin. Coupe histologie après exposition des tissus murins à l'EDTA. (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et au centre et x400 à droite)(Flèche = artériole) .....	73
Figure 35 : Tissus contrôles positifs : cellules endothéliales d'un capillaire marqué par l'anticorps CD34 à gauche, cellules des tubules contournés marquées par l'anticorps PTHR au centre, et fibres musculaires marquées par l' $\alpha$ SMA à droite (photographies réalisées aux grossissements x200, x100 et x400) .....	74
Figure 36 : Coupe histologique de moelle osseuse humaine après décalcification par l'EDTA des os. A gauche: $\alpha$ SMA clone 1A4 ; à droite : $\alpha$ SMA clone HFF35 ; Flèche = structure vasculaire de taille moyenne (Photographies réalisées au grossissement x100).....	77
Figure 37 : $\alpha$ SMA, clone HFF35, coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par l'EDTA (Photographies réalisées au grossissement x100).....	77
Figure 38 : Vimentine, coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par l'EDTA (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x40 à droite). .....	77
Figure 39 : CD34 (à gauche et au centre) et $\alpha$ SMA (à droite, clone HFF35), coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par l'EDTA (Photographies réalisées au grossissement x100). .....	77

Figure 40 : Coupe histologique de moelle osseuse humaine après décalcification par l'EDTA des os. A gauche: PTHR1 ; à droite : témoin négatif pour PTHR1 (Photographies réalisées au grossissement x200) .....78

Figure 41 : Coupe histologique de moelle osseuse humaine après décalcification par l'EDTA des os. ....78

Figure 42 : NGFR, coupe histologique de moelle osseuse humaine décalcifiée (à gauche) et de tissu cérébral humain (à droite) (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et x400 à droite).....78

Figure 43 : CD200, coupe histologique de moelle osseuse humaine décalcifiée .....78

Sources des photographies de la figure n°1 :

A gauche : Dr. med. F. SCHONI-AFFOLTER. *Division of Histology*. (2004)  
<https://www.unifr.ch/anatomy/assets/files/elearning/fr/stuetzgewebe/knochen/zellen/f-osteoklast.php>

A droite : Yves CLERMONT, Michael LALLI & Zsuzsanna BENCSATH-MAKKAI.  
*Atlas d'histologie en microscopie optique.*)  
[http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/bc\\_9\\_F.html](http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/bc_9_F.html) 24/08/16

Source de la représentation de la molécule EDTA de la figure n°3 :

« Chelates and chelating agents »

<http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/chelates/chelates.html>

Source de l'image de crâne de chien des figures n°13 et n°16 :

« La dentition du chien par Dr LOTH et Dr BALER »

<http://cunse.fr/utile/coin%20sante/la%20dentition%20du%20chien/La%20dentition%20du%20chien.htm>

## TABLES DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Résultats obtenus en IHC après utilisation de différents décalcifiants....	28
Tableau 2 : Résultats obtenus en PCR, RT PCR et hybridation <i>in situ</i> après utilisation de différents décalcifiants (fixation par le formol).....	29
Tableau 3 : Durées de décalcification requises retrouvées dans la littérature pour l'EDTA.....	32
Tableau 4 : Récapitulatif des différents avantages et inconvénients des techniques de décalcification décrites .....	37
Tableau 5 : Comparaison des méthodes de détermination du point final de la réaction .....	39
Tableau 6 : Différents temps de fixation des prélèvements retrouvés dans la littérature .....	41
Tableau 7 : Protocoles recommandés par l'ICSH pour la fixation et décalcification de la moelle osseuse .....	44
Tableau 8 : Récapitulatif des groupes (deux tibias et deux fémurs par groupe) constitués pour l'étude n°1 .....	50
Tableau 9 : Répartitions des tranches réalisées sur la Figure 16 entre les différentes procédures de décalcification .....	56
Tableau 10 : Marqueurs testés sur os murins après décalcification.....	57
Tableau 11 : Marqueurs testés sur tissus mous murins après immersion dans la solution d'EDTA.....	57
Tableau 12 : Marqueurs testés pour l'étude n°2 sur os humains .....	61
Tableau 13 : Protocoles de décalcification établis sur os murins .....	63
Tableau 14 : Protocoles de fixation et de décalcification utilisés sur os murins pour cette partie .....	65
Tableau 15 Protocoles de fixation et de décalcification utilisés sur os humains pour cette partie .....	67
Tableau 16 : Protocoles de fixation et de décalcification utilisés sur os murins pour cette partie .....	68
Tableau 17 : Tableau récapitulatif des marqueurs validés chez la souris .....	71

## TABLE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

**$\alpha$ SMA** : alpha smooth muscle actine  
**AZF** : acid zinc formalin  
**CD** : cluster de differentiation  
**CEA** : carcinoembryonic antigen  
**Cf** : se référer  
**CFU-F** : colony-forming units-fibroblasts  
**cm<sup>3</sup>** : centimètre cube  
**CSH** : cellule souche hématopoïétique  
**CSM** : cellule souche mésenchymateuse  
**EDTA** : acide ethylène diamine tétraacétique  
**EGF / ECFR** : epithelial growth factor / epithelial growth factor receptor  
**EMA** : epithelial membrane antigen  
**etc** : *et cetera*  
**HCl** : acide chlorhydrique  
**HE** : hemalun eosin  
**HLA DR** : human leucocyte antigen DR  
**HNO<sub>3</sub>** : acide nitrique  
**IF** : immunofluorescence  
**ICSH** : International Council for Standardization in Haematology  
**IHC** : immunohistochimie  
**MCSF** : macrophage-colony stimulating factor  
**MET** : microscope électronique à transmission  
**MEB** : microscope électronique à balayage  
**MEC** : matrice extra cellulaire  
**MIB1** : index mitotique B1  
**min** : minute  
**mL** : millilitre  
**mm** : millimètre  
**NP** : non précisé  
**NGFR** : neuronal growth factor receptor  
**OPN** : ostéopontine  
**OCN** : ostéoclastine  
**(RT) PCR** : (Reverse transcriptase) polymerase chain reaction  
**PTHr** : parathormone receptor  
**sp** : spécificité  
**TA** : température ambiante  
**x** : fois  
**+** : positif

## INTRODUCTION

Chaque tissu contient, au sein de notre organisme, des cellules souches adultes qui assurent leur renouvellement tout au long de la vie. Pour les tissus osseux et adipeux ce sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM), qui sont aujourd'hui au centre de nombreux projets de recherches scientifiques. Leur intérêt pour l'élaboration de nouvelles thérapies médicales n'est plus discuté. A titre d'exemple, d'après le site de *clinicaltrials.gov* de l'*U.S National Institutes of Health*, 635 essais cliniques utilisant des CSM sont en cours dans le monde. Les CSM issues du tissu adipeux sont potentiellement plus faciles à étudier de part la facilité d'accès de ce tissu et l'innocuité de son prélèvement *in vivo*. L'objectif de cette thèse expérimentale est d'apporter des outils supplémentaires aux chercheurs s'intéressant aux cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse dont l'accès et la quantité sont plus restreints.

Le but de ce travail est de pouvoir visualiser l'organisation générale de ce tissu, notamment à l'aide de colorations standards, mais aussi de localiser certaines cellules de la moelle osseuse à l'aide de marqueurs immunohistochimiques. Cependant, il est important de noter que pour réaliser des coupes histologiques du tissu osseux, des protocoles différents de ceux pour les autres tissus sont nécessaires. En effet la matrice minérale ne permet pas la découpe de ce tissu directement après fixation en raison de sa rigidité. Soit un matériel très spécifique doit être utilisé, mais cette méthode est peu adaptée pour être pratiquée en routine dans la plupart des laboratoires, soit le prélèvement doit être traité spécifiquement après la fixation afin de permettre sa décalcification. Une fois décalcifié il est noté un ramollissement du tissu permettant ainsi sa découpe au microtome. Cette approche est plus adaptée pour l'étude en routine du tissu osseux. Le problème principal de celle-ci est que la plupart des décalcifiants du commerce ne détruit pas seulement la matrice minérale, mais abime aussi les antigènes de surface des cellules. L'utilisation de marqueurs immunohistochimiques est alors impossible ou limitée, ce qui n'est pas adapté pour l'étude histologique du tissu.

Après une introduction des notions nécessaires à la compréhension des termes employés au cours de l'étude expérimentale, une présentation des techniques de décalcification rencontrées dans la littérature sera réalisée. Concernant le projet expérimental, le protocole de décalcification le moins agressif possible, tout en étant d'une durée raisonnable pour pouvoir être utilisé en routine est d'abord recherché sur des os murins, humains et canins (Etude n°1).

Une fois ce protocole mis en place, des marqueurs immunohistochimiques, d'intérêts dans le cadre de l'étude des CSM de la moelle osseuse, sont testés afin de valider ou non leurs utilisations après décalcification. Les modèles d'études sont des os longs (fémur, tibia) murins et des fragments de biopsie de têtes fémorales humaines. Le protocole de décalcification et les marqueurs validés sont utilisés, pour

localiser les cellules souches mésenchymateuses humaines, injectées *in vivo* par voie intra osseuse chez la souris. (Etude n°2).

Ces études sont réalisées grâce à la collaboration du laboratoire d'anatomie pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) ; en particulier grâce à Isabelle RAYMOND-LETRON (Enseignant chercheur de l'ENVT) ; et le laboratoire STROMALab ; en particulier Frédéric DESCHASEAUX (Maître de Recherche de l'Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée). STROMALab est un laboratoire labélisé au CNRS (UMR 5273) et à l'Inserm (U1031) ainsi qu'à l'Université Paul Sabatier et à l'EFS-PM. Il est issu du regroupement de deux groupes : Le premier groupe était un laboratoire de recherche de l'EFS de Toulouse sous la direction du Dr Philippe BOURIN et le deuxième était un laboratoire CNRS sous la direction du Pr Louis CASTEILLA. Le thème général du laboratoire de recherche STROMALab, est la régénération tissulaire via les cellules stromales/souches mésenchymateuses de la moelle osseuse ou du tissu adipeux.

Au cours de la première étude, des tests de décalcification sur des structures de taille plus importante et de composition plus dense que les os de souris et biopsies de tête fémorales humaines sont effectués afin d'étudier les limites des décalcifiants et les alternatives envisageables pour l'étude du tissu osseux. Pour cela des os d'origines canines (mandibules et dents) sont utilisés.

Cette étude est réalisée grâce à la collaboration entre laboratoire d'anatomie pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) ; en particulier grâce à Isabelle RAYMOND-LETRON (Enseignant chercheur de l'ENVT) ; et le laboratoire de recherche de la faculté dentaire de Toulouse ; en particulier avec Philippe KEMOUN (Enseignant chercheur à la faculté dentaire de Toulouse). Cette étude est une étape préliminaire d'un projet de recherche sur le traitement de la parodontite par les cellules souches, qui sera mené ultérieurement par la coopération entre ces deux établissements.

# Partie I : Introduction du projet

Comme précisé en introduction, l'étude de différents procédés de décalcification de tissus osseux sera réalisée au cours du projet expérimental, permettant ensuite d'étudier les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse sur coupes histologiques de celle-ci par immunohistochimie. Cette première partie a pour but d'introduire les notions qui seront utilisées au cours de la présentation des résultats du projet expérimental et d'expliquer les choix effectués lors de la mise en place des protocoles de décalcification testés.

Une première partie sera consacrée à la présentation des notions concernant l'histologie du tissu osseux et la place des CSM au sein de celui-ci.

Puis le choix des techniques de décalcification testées au cours du projet expérimental sera justifié dans une seconde partie par la présentation de résultats d'études publiées dans la littérature.

## 1. Histologie du tissu osseux et place des CSM

Les structures osseuses étudiées au plan histologique au cours du projet expérimental sont des os de fémurs et tibias murins et des os de fémurs humains. Il sera donc d'abord rappelé l'organisation générale du tissu osseux et les particularités liées à l'espèce humaine ou murine (1.1).

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse représentent une très petite fraction des cellules observées sur les coupes histologiques de tissu osseux. Pour les identifier et étudier leurs rôles, il est important de connaître la nature des autres cellules de la moelle osseuse. De ce fait les principales cellules du tissu osseux et les cellules de la moelle osseuse ainsi que la place des CSM au sein de celles-ci seront abordées dans un second paragraphe. Il y sera présenté également les marqueurs choisis pour le projet expérimental permettant d'identifier certaines de ces cellules (1.2).

### 1.1 Organisation générale du tissu osseux

Le tissu osseux est retrouvé dans les différents os du squelette humain et murin. Ces os présentent des caractéristiques morphologiques très variées en terme de forme et de taille. Il peut être distingué les os du squelette axial (crâne, vertèbres, côtes) et ceux du squelette appendiculaire. Parmi les os du squelette appendiculaire, il peut être distingué les os plats (os du bassin par exemple), les os courts tubulaires (phalanges), les petits os tels que ceux des mains et des pieds (os naviculaires) ou ceux présents sur les trajets des tendons au niveau de certaines articulations (os sésamoïdes) et enfin les os longs (fémur, tibia, humérus etc..). Ces différents os sont retrouvés dans les espèces murines et humaines, bien que leurs tailles soient très

différentes compte tenu des différents gabarits de celles-ci<sup>1</sup>. Les os longs sont ceux étudiés dans le projet de recherche.

Concernant les os longs des deux espèces, ceux-ci sont composés d'un tissu conjonctif vasculaire constitué de cellules et de matériaux extracellulaires calcifiés. Il peut être distingué l'os spongieux, présent dans les épiphyses des os longs, et l'os compact qui se retrouve au niveau diaphysaire.

L'os spongieux est constitué de larges cavités constituant les espaces médullaires, et de fines plaques osseuses constituées de lamelles. Ces fines plaques sont aussi appelées travées. L'os compact présente aussi des cavités mais plus petites, et ses lamelles sont plus épaisses.

La matrice calcifiée est composée de matière minérale, cristaux d'hydroxyapatite de calcium majoritairement, et de matière organique, collagène de type I, protéoglycanes et protéines associées des glycosaminoglycanes, dans des proportions équivalentes.

Le périoste recouvre la surface de l'os, il est constitué d'une couche externe fibreuse, composée de collagène et de fibroblastes, et d'une couche interne ostéogénique où l'on retrouve en particulier les ostéoblastes. Il est relié à l'os via les fibres de Sharpey, paquet de fibres de collagène.

La cavité médullaire est délimitée par un endoste composé de cellules progénitrices, d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, dont le rôle sera détaillé dans le paragraphe suivant **(1.2.1)**.

Concernant l'os décalcifié, l'organisation lamellaire consiste en spicules et en trabécules d'os et la moelle osseuse occupe les espaces à l'intérieur entre les trabécules<sup>2</sup>.

La moelle osseuse est située dans l'espace médullaire. Elle contient un mélange de moelle « jaune » composée de tissu adipeux et de moelle « rouge » hématopoïétique constituée des précurseurs des cellules sanguines en contact avec de nombreux vaisseaux sanguins. Les différentes cellules de la lignée hématopoïétique seront décrites dans le paragraphe **1.2.2**. Les cellules souches mésenchymateuses représentent une fraction minimale allant de 0,0001% à 0,1% des cellules nucléées de la moelle osseuse.<sup>3</sup> Leur rôle et leur place au sein de la moelle osseuse seront présentés au paragraphe **1.2.3**.

Avec l'âge, la moelle osseuse des os périphériques devient moins active et contient de plus en plus d'adipocytes. La moelle jaune peut néanmoins être réactivée en cas de besoin d'augmentation de l'hématopoïèse.<sup>2</sup> Chez la souris, la moelle osseuse des os longs tels que le fémur ou le tibia contient plutôt de la moelle rouge avec quelques adipocytes, tandis que la cavité médullaire des vertèbres ou du radius et de l'ulna est plus riche en moelle jaune. Chez l'homme au contraire la moelle hématopoïétique est plutôt située dans les os du squelette axial (vertèbres, bassin) et dans la partie proximale du fémur et de l'humérus, le reste du squelette appendiculaire contient plutôt de la moelle jaune<sup>1</sup>.



## 1.2 Organisation cellulaire du tissu osseux et place des CSM

### 1.2.1 Cellules responsables du remodelage du tissu osseux

Ces cellules sont communes aux espèces murines et humaines. Les cellules ostéogéniques (cellules aplaties, non différenciées) sont situées dans la couche cellulaire du périoste, dans l'endoste, et bordant les canaux de Havers. Sous l'influence de facteurs de croissance et de la protéine morphogénique osseuse (BMP), elles donnent naissance aux ostéoblastes (cellules cubiques ou cylindriques). Les ostéoblastes produisent la matrice osseuse puis s'y retrouvent emprisonnés et deviennent des ostéocytes que l'on peut retrouver dans les lacunes aussi appelées espaces lenticulaires.

Les ostéoclastes, de grandes cellules plurinucléées d'origine hématopoïétique dérivées des précurseurs monocytaires, résorbent l'os. Ils sont retrouvés au niveau des dépressions superficielles de la surface trabéculaire appelée lacunes de Howship.

Les ostéoblastes possèdent des récepteurs à la parathormone, en sa présence ils libèrent du M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) entraînant la formation de précurseurs d'ostéoclastes. Ils sont également responsables de la différenciation des pré ostéoclastes en ostéoclastes et de l'activation de ces derniers. L'interaction intégrée entre ostéoblastes, formant l'os, et ostéoclastes, résorbant l'os, assure ainsi le remodelage de l'os<sup>2</sup>.

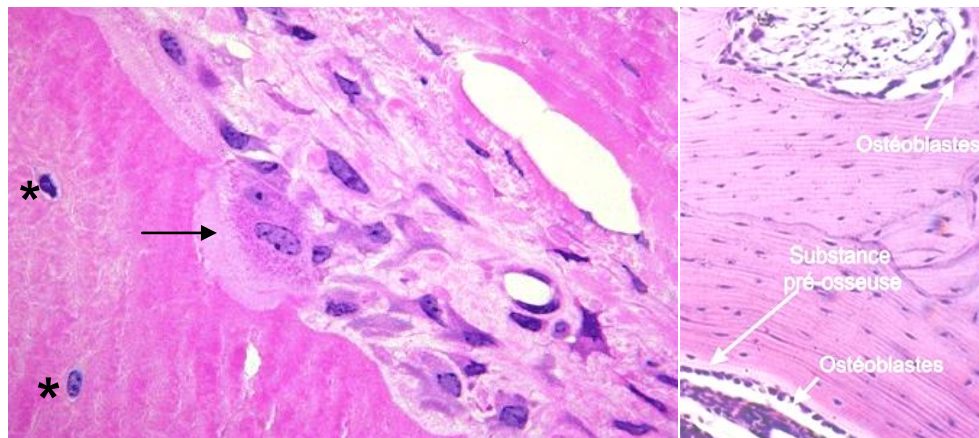


Figure 1 : Observation des ostéocytes\*, d'un ostéoclaste dans une lacune de Howship (flèche) (à droite) et d'ostéoblastes (à gauche) sur coupes histologiques d'os long observées au microscope optique. (crédit photo : Dr. med. F. SCHONI-AFFOLTER. *Division of Histology*. (2004) ; Yves CLERMONT, Michael LALLI & Zsuzsanna BENCSETH-MAKKAI. *Atlas d'histologie en microscopie optique*. (Coupe transversale de la diaphyse d'un os long de chien, au grossissement x300, en coloration hemalun éosine))

### 1.2.2 Cellules souches hématopoïétiques et leur microenvironnement<sup>2</sup>

Parmi les cellules sanguines se trouvent les érythrocytes, les granulocytes, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes. La moelle osseuse hématopoïétique contient les différents précurseurs de ces cellules.

L'ensemble des cellules hématopoïétiques évoluent dans un micro environnement qui est composé de différentes structures.

Tout d'abord se trouve un système de sinusoides anastomosées qui se drainent dans une veine centrale. Les sinusoides sont de type endothélial mais ils présentent une membrane basale discontinue. Ils contrôlent le passage de toutes les substances allant vers l'intérieur ou l'extérieur du compartiment hématopoïétique. Par endroit ils sont à peine plus épais que les feuillets d'une membrane plasmique et peuvent fournir une voie d'accès à la circulation pour les cellules sanguines matures. Ensuite se trouve un squelette de réticuline et de fibroblastes spécialisés, appelés cellules réticulaires médullaires ou cellules de soutien. Ces fibroblastes recouvrent la face externe des sinusoides et peuvent donner des adipocytes par accumulation de lipides. Il se trouve également des éléments de soutien non cellulaires spécifiques comme des fibres de collagène et des protéines de haut poids moléculaire ainsi qu'une matrice de protéoglycanes qui pourrait jouer un rôle de fixateur des régulateurs de l'hématopoïèse. Enfin se trouvent des macrophages impliqués dans la phagocytose des débris cellulaires et cellules éliminées.

Ce microenvironnement médullaire joue un rôle capital dans la croissance des cellules souches injectées chez un individu. Ces dernières expriment des marqueurs de surfaces spécifiques qui doivent interagir avec des chimiokines exprimées à la surface des cellules endothéliales médullaires pour que la prise de la greffe soit assurée.

L'érythropoïèse a lieu au sein des îlots érythroblastiques constitués d'un ou deux macrophages dont la membrane plasmique émet de longues expansions cytoplasmiques et invaginations où se logent les cellules érythroïdes en division. Le premier précurseur identifiable est le proérythroblaste. Les cellules des stades suivants sont appelés normoblastes, on distingue les normoblastes précoces, intermédiaires et tardifs dont la concentration en hémoglobine augmente progressivement et dont le nombre d'organites diminue. Le stade suivant est appelé érythroblaste. Au fur et à mesure de leurs évolutions ces cellules migrent le long des expansions du macrophage, l'érythroblaste mature entre alors en contact avec l'endothélium des sinusoides où il perd son noyau pour donner un réticulocyte. Celui-ci est le dernier précurseur de l'érythrocyte et il rejoint la circulation sanguine.

Concernant la lignée blanche, les monocytes et granulocytes dérivent d'un précurseur commun, le progéniteur granulocyte-monocytaire, la croissance des colonies requiert des facteurs de stimulation comme le GM-CSF ou le M-CSF.

La formation des granulocytes se fait ensuite à partir des myéloblastes donnant successivement les promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, jusqu'à la forme mature de granulocytes. Au cours de la maturation de ces derniers, il est observé une segmentation nucléaire, les « band cells » présentant un noyau en fer à cheval qui sont les cellules précédant le stade mature. La moelle possède une importante réserve de neutrophiles rapidement mobilisables.

La formation des monocytes passe, elle, par les monoblastes puis les promonocytes dont la taille diminue progressivement. Les monocytes matures quittent eux rapidement la moelle osseuse, il n'y a donc pas de réserve comme pour les neutrophiles.

La formation du lymphocyte se fait à partir des lymphoblastes, puis des prolymphocytes, dont la taille diminue elle aussi progressivement. Contrairement aux autres cellules sanguines, les lymphocytes peuvent se multiplier dans d'autres tissus du système immunitaire.

Enfin les plaquettes sont formées à partir des mégacaryocytes provenant des mégacaryoblastes. Les mégacaryocytes sont reconnaissables par leur taille supérieure aux autres cellules, ils forment des pseudopodes appelés proplaquettes dans la lumière des sinusoides qui se fragmentent ensuite dans la circulation, soit au niveau de la moelle, soit au niveau du lit vasculaire pulmonaire.

### **1.2.3 Cellules souches mésenchymateuses (CSM)**

La notion de « cellule souche mésenchymateuse » est complexe et discutée en fonction des différents articles scientifiques retrouvés dans la littérature. De plus elle évolue selon les nouvelles découvertes des chercheurs travaillant sur ces cellules. Dans une revue parue en 2014<sup>4</sup>, Paolo BIANCO et al. exposent deux grandes descriptions actuellement discutées. La première attribue aux CSM les propriétés de cellules souches multipotentes pour le squelette, post natales et capables d'auto renouvellement. Ces cellules coïncideraient avec un type spécifique de cellules périvasculaires. Elles participeraient au maintien et à la croissance de l'os ainsi qu'à celle des cellules souches hématopoïétiques notamment en participant à la régulation du microenvironnement de celles-ci. La seconde les présente comme cellules ubiquitaires des tissus conjonctifs et les définit par des caractéristiques *in vitro* et leur faculté à moduler la fonction des tissus de l'hôte.

Le but de ce projet n'est pas de discuter de la définition pouvant être donnée à ces cellules ni de la liste exhaustive de leurs propriétés. En effet en entrant « *mesenchymal stem cell* » dans le moteur de recherche de *PubMed* au 1<sup>er</sup> août 2016, 42 048 publications s'affichent.

Nous retiendrons la définition de l'INSERM ([www.inserm.fr](http://www.inserm.fr)) : Ces cellules sont présentes dans tout l'organisme : au sein du tissu adipeux, de la moelle osseuse, des tissus de soutien des organes, mais également au sein des os, des cartilages, des muscles... L'INSERM les caractérise par leur pouvoir de donner naissance à d'autres cellules ; comme les cellules cartilagineuses (chondrocytes), osseuses (ostéoblastes), graisseuses (adipocytes), les fibres musculaires (myocytes, cardiomyocytes)... ; et par celui de sécréter, en outre, des facteurs de croissance favorables aux cellules environnantes ainsi que des facteurs anti-inflammatoires qui entraînent une immunosuppression locale et favorisent la fonction de cellules régulatrices de l'immunité.

Concernant l'aspect et la répartition de ces cellules au sein de la moelle osseuse, les auteurs s'accordent sur le fait que ce sont des cellules d'aspect fusiforme qui se situent en périphérie des vaisseaux, dans un microenvironnement appelé « niche ». <sup>4</sup>

#### **1.2.4 Identification des cellules lors de l'étude de l'histologie du tissu osseux en microscopie optique : choix des marqueurs d'intérêts pour le projet expérimental**

Un des objectifs du projet expérimental est de pouvoir étudier les CSM de la moelle osseuse murine et humaine. Comme il l'a été précisé au cours du paragraphe précédent, celles-ci évoluent dans un microenvironnement et elles constituent une toute petite proportion des cellules de la moelle osseuse.

Concernant les observations pouvant être réalisées en microscopie optique après décalcification et coloration hémalum éosine, seules certaines cellules peuvent être correctement identifiées. Les cellules les plus matures des lignées myéloïde (lignée blanche) et érythroïde (lignée rouge), les mégacaryocytes, les adipocytes et les mastocytes peuvent être identifiés.

Les cellules de la lignée érythroïde sont petites, avec un noyau arrondi, dense et très basophile. Le cytoplasme est lui aussi basophile pour les formes immatures et devient plus éosinophile pour les formes matures. Les granulocytes de la lignée myéloïde présentent un noyau en forme de haricot, moins basophile et plus vésiculaire que les cellules de la lignée érythroïde.

Les mégacaryocytes sont facilement identifiables par leurs grandes tailles et leurs noyaux multilobés.

Les lymphocytes matures peuvent être identifiés mais les autres cellules de la lignée lymphoïde ne peuvent être distinguées de manière certaine. <sup>5</sup>

Ainsi pour identifier les CSM de manière plus précise *in situ* au sein de leur microenvironnement en microscopie optique, il est nécessaire d'avoir recours à l'utilisation de techniques de marquage telles que l'immunohistochimie comme il l'a été choisi pour le projet expérimental.

Le choix des marqueurs immunohistochimiques d'intérêts du projet a été établi en coopération avec le Dr F. DESCHASEAUX (STROMALab) sur la base de ses recherches<sup>6-8</sup> sur les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses.

A partir de ces résultats ont été choisis des marqueurs susceptibles de révéler directement des CSM natives sur les coupes histologiques de moelle osseuse :  **$\alpha$ SMA, CD49a, vimentine, CD200 PTHR, NGFR, et LeptineR**. Les marqueurs **CD34, CD45, CD3** sont choisis pour permettre de décrire l'environnement des CSM et potentiellement les reconnaître de manière directe ou indirecte. En effet les CSM cultivées sont décrites comme **CD34, CD45 et CD3** négatives<sup>6</sup>. Cependant il est à noter qu'il ne peut pas être fait de transposition directe des résultats des travaux de recherche sur le phénotype des CSM cultivées vers celui des CSM natives. Ces

résultats sont plus à utiliser comme point de départ ou comme hypothèses à tester. A titre d'exemple, des cellules situées sur la face abluminale de vaisseaux sanguins, identifiées comme CSM natives, ont été décrites **CD34** positives chez l'homme<sup>9</sup>. Une faible positivité pour le marqueur **CD45** des CSM natives est également rapportée<sup>6</sup>. Les phénotypes des CSM cultivées sont plus documentés que ceux des CSM natives. Le but du projet de recherche expérimentale est d'apporter des outils nécessaires aux chercheurs travaillant sur ces CSM natives. Il est intéressant de pouvoir valider l'utilisation sur coupes histologiques de moelle osseuse après décalcification des marqueurs utilisés pour identifier les CSM *in vitro*, afin de rechercher ces cellules *in situ* et de pouvoir évaluer la corrélation des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. Le choix des marqueurs à tester est donc basé sur des études réalisées sur les CSM natives ou cultivées.

Afin de distinguer *in vitro* les CSM prélevées chez un individu, l'équipe du Dr F. DESCHASEAUX, ainsi que d'autres équipes de recherche ayant publiées des articles sur l'étude des CSM (*cf infra*) utilisent leur capacité d'adhésion au plastique et leur capacité à former des CFU-F (colony-forming units-fibroblasts). A partir de ces critères, les phénotypes des CSM cultivées sont étudiés.

Sur ce principe, il est constaté en 1993 par GALMICHE et al. que les CSM humaines *in vitro* sont après culture **CD45** négatives et acquièrent l'expression du marqueur vasculaire  **$\alpha$ SMA** à partir de la troisième semaine de culture<sup>10</sup>. Ces cellules stromales,  **$\alpha$ SMA** positives, adhérentes au plastique des flacons de culture sont capables de former et de maintenir une niche fonctionnelle pour les CSH pendant plusieurs semaines. Le marqueur  **$\alpha$ SMA** est un marqueur de l'isoforme alpha de l'actine. C'est un marqueur de la voie de différenciation vasculaire musculaire lisse. Les cellules de la moelle osseuse  **$\alpha$ SMA** positives *in vivo* sont des cellules musculaires lisses de la media des artérioles et artères, des péricytes en périphérie des capillaires, des cellules bordant les sinus sur la face abluminale des cellules endothéliales mais aussi des cellules se trouvant dans les logettes hématopoïétiques ou à proximité des trabécules osseux<sup>10</sup>. Ce marqueur est donc intéressant mais non strictement spécifique des CSM.

Dans le cadre d'une étude phénotypique des CSM réalisée *in vitro* en 2003 par l'équipe du Dr F. DESCHASEAUX<sup>7</sup>, un marqueur plus spécifique est recherché. Le marqueur **CD49a** est très conservé entre les mammifères et son utilisation pour l'identification des CSM cultivées humaines est essayée. Il est constaté que toutes les cellules cultivées (obtenue à partir de cellules de la moelle osseuse) ayant la capacité de former des CFU-F, font partie de la petite fraction des cellules **CD49a** positives. Ces cellules étaient également concernant les stades précoces de culture **CD34 et CD45** faiblement positives, puis elles conservaient leur positivité pour le marqueur **CD49a** et devenaient **CD34 et CD45** négatives. L'utilisation de ces marqueurs pour trier les CSM est donc envisageable *in vitro*. Il est donc intéressant de pouvoir rechercher la localisation des cellules de phénotypes comparables *in vivo*. Le marqueur **CD34** est exprimé par certaines cellules endothéliales<sup>11</sup> et est également un marqueur des cellules souches hématopoïétiques.

Un article, paru en 2015, s'appuyant sur des tests *in vitro* et *in vivo*, avance même que ce marqueur pourrait permettre de différencier spécifiquement les cellules souches mésenchymateuses ostéoprogénitrices<sup>12</sup> par rapport à celles étant à l'origine d'adipocytes. Chez l'homme adulte la majorité des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est **CD34** négative et deviennent **CD34** positives après activation. Chez la souris aussi, le **CD34** est principalement exprimé chez le jeune (avant huit semaines). Contrairement aux CSH, les CSM natives isolées lors des travaux de recherche précédents du Dr DESCHASEAUX sont en grande majorité **CD34** négatives ou faiblement positives pour des stades précoces de culture<sup>7</sup>.

La **vimentine** est un marqueur dont l'expression par les cellules mésenchymateuses cultivés et natives de la moelle osseuse est décrite<sup>10</sup>. D'autres cellules de la moelle osseuse sont également décrites *in situ* **vimentine** positives telles que les cellules granulopoïétiques et les cellules endothéliales des capillaires et sinusoides<sup>13</sup>.

Le **CD200** est un marqueur dont l'expression par les CSM est également décrite. Celui-ci est exprimé de manière hétérogène, les CSM **CD200** positives auraient un rôle particulier dans la régulation du remodelage osseux<sup>14</sup>.

Le marqueur **NGFR** (nerve growth factor, CD271) est un marqueur pas seulement exprimé par les cellules nerveuses, il est également retrouvé par exemple sur des cellules périvasculaires, des cellules de la pulpe dentaire, des cellules de la muqueuse buccale, des cheveux et les cellules basales de la prostate<sup>15</sup>. Une étude publiée en 1993 par CATTORETTI et al.<sup>16</sup>, des cellules de la moelle osseuse humaine vimentine positives, possédant des dendrites (en contact avec des cellules **CD34** positives mais elles même **CD34** et **CD45** négatives) et étant situées sur la face abluminale des cellules endothéliales des sinus, sont révélées par le marqueur **NGFR**. Dans une étude de 2015 (ALVARES et al.), son utilisation pour détecter des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire est rapportée et il est qualifié de marqueur de choix pour leur identification<sup>17</sup>.

Concernant les marqueurs choisis **LeptineR** et **PTHR1**, non encore évoqué jusqu'ici, une étude de 2014, a mis en évidence des cellules **LeptineR** (Leptine receptor) positives en position périvasculaire, étant également positives pour des marqueurs usuellement utilisés par le laboratoire des chercheurs à l'origine de cette étude pour identifier des CSM<sup>18</sup>. Le marqueur **PTHR1** (parathormone receptor 1) est un marqueur des ostéoblastes, son expression par les CSM cultivées est également décrite<sup>19</sup>.

Pour identifier les cellules lymphocytaires, le **CD45** et le **CD3** sont utilisés. Le marqueur **CD3** est décrit comme spécifique des lymphocytes T<sup>13</sup>. Ces deux derniers marqueurs ne sont pas spécifiquement choisis dans le but d'identifier les CSM mais pour participer à la description de leur environnement. Il sera cependant noté, comme il l'a été évoqué précédemment, qu'au cours des travaux de recherche effectués *in vitro* par DESCHASEAUX et al. (2003), une faible positivité pour le **CD45** est constatée pour les stades de culture précoce des CSM.

## 2. Etapes spécifiques à l'étude histologique du tissu osseux en microscopie optique

### 2.1 Enjeux de l'élaboration du protocole de décalcification du projet expérimental

De manière générale, lors de travail sur os décalcifié, la phase de décalcification ayant pour objectif de diminuer la dureté des prélèvements pour permettre leur coupe, se doit d'être la moins agressive possible, afin de ne pas abimer les structures cellulaires à étudier. La rapidité de la phase de décalcification est un élément important, notamment pour les équipes de recherches ayant pour objectif d'apporter un diagnostic. Pour correspondre à ces objectifs, différents décalcifiants, dans différentes conditions physiques peuvent être utilisés.

Un des premiers choix réalisé au cours de l'élaboration du protocole de décalcification lors du projet expérimental est celui du **type de décalcifiant**. La pertinence des différents types de décalcifiants disponibles sera présentée au cours de la **partie 2.2**. Les résultats de différents articles scientifiques seront pour cela utilisés, justifiant le choix des décalcifiants du projet.

Il doit ensuite être choisi dans quelles **conditions** la phase de décalcification va être réalisée. Il sera discuté, au cours de la **partie 2.3**, des avantages et inconvénients de différentes méthodes utilisées par des groupes de recherche ayant publié leurs travaux ; par exemples telles que l'utilisation d'agitation mécanique de la solution, l'augmentation de sa température de la solution ou le recours à des incubateurs. L'impact de ces méthodes sur les résultats en IHC est également abordé au cours de cette partie.

La phase de décalcification précède généralement celle de déshydratation et elle fait suite à celle de fixation. Le choix du **fixateur** pour le projet expérimental a été effectué en fonction des pratiques du laboratoire de recherche de l'ENVT et de l'expérience de ses chercheurs. L'étude bibliographique présentée au cours de la **partie 2.4** est réalisée *a posteriori* afin de présenter les données disponibles sur ce fixateur et d'aborder les alternatives possibles.

Enfin quelque soit le protocole, il est important de **suivre le prélèvement** et de pouvoir évaluer si l'étape de décalcification est achevée, c'est ce qui est couramment appelé la détermination du point final. Pour cela différentes techniques peuvent être utilisées et sont abordées au cours de la **partie 2.5**. Leurs avantages et inconvénients sont ensuite évalués afin de pouvoir envisager leur utilisation dans le cadre du projet d'expérimental.

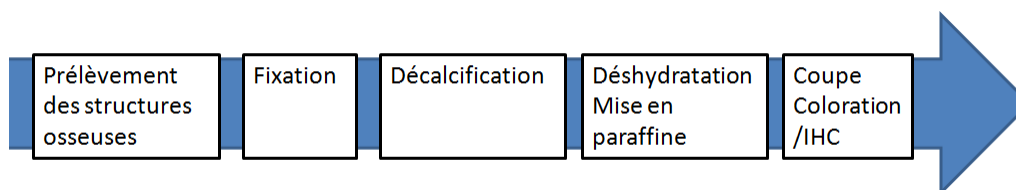


Figure 2 : Chronologie des étapes nécessaires à l'étude du tissu osseux en microscopie optique

L'étude histologique du tissu osseux nécessite en général le passage par une étape de décalcification mais travailler sur os non décalcifié n'est pas impossible. Cela implique l'utilisation de matériaux et matériels spécifiques, tels que des résines (à la place de la paraffine) et des couteaux de verre ou de carbure de tungstène (à la place des lames de rasoirs du microtome)<sup>20</sup>.

ISLAM et al. publient en 1985 un protocole simplifié<sup>21</sup> utilisant de la résine de méthylmétacrylate pour travailler sur biopsie de moelle osseuse non décalcifiée, ils obtiennent de très bons résultats concernant les détails cellulaires obtenus. Des difficultés sont souvent rencontrées en immunohistochimie avec l'utilisation de cette résine, du fait d'exposition des prélèvements à de fortes températures pendant le processus de mise en bloc, due à une réaction de polymérisation hautement exothermique. Des améliorations du protocole ont permis toutefois une bonne gestion de la température et des modifications de la composition des résines à base de méthylmétacrylate ont été effectuées. Des résultats en IHC satisfaisants sont publiés avec ces nouvelles méthodes<sup>22,23</sup>. L'utilisation de ces techniques nécessite un personnel formé et des équipements spécifiques. Ces conditions ne sont pas retrouvées dans la majorité des laboratoires et ces techniques ne seront pas plus détaillées ici car non envisagées en première intention dans le cadre du projet expérimental.

## 2.2 Les différents décalcifiants et leurs différents impacts sur les prélèvements

### *Propriétés des décalcifiants*

Deux catégories de décalcifiants sont à distinguer : les agents chélateurs et les agents acides.

L'EDTA agit en tant que **chélateur** et séquestre les ions calcium dans une solution aqueuse. Il agit uniquement sur le calcium situé sur les couches externes des cristaux d'apatites et a donc une action très progressive<sup>24</sup>. Son utilisation doit être réalisée à pH proche de la neutralité. Il possède en effet deux fonctions amines (NH) et quatre fonctions carboxyliques (COOH) (**Figure 3**). A bas pH ces fonctions sont toutes protonnées, ce qui ne permet pas d'action en temps que chélateur et donc pas de décalcification. En augmentant progressivement le pH, le nombre de formes non protonnées est de plus en plus important et le taux de décalcification augmente. Cependant, en pH alcalin, certains ponts protéiques risquent d'être endommagés, ce qui mène donc à une utilisation de l'EDTA en pH proche de la neutralité (7,4).<sup>25</sup>

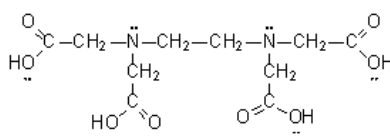


Figure 3 : Forme semi-développée de l'EDTA



Parmi les **agents acides**, sont distingués les acides forts et les acides faibles. Ces agents forment des sels calciques solubles à partir d'échanges ioniques entre l'échantillon et la solution de décalcification. Les sels de calcium sont solubles à partir d'un pH de 4,5. Ces décalcifiants agissent plus rapidement que l'EDTA mais ils nécessitent un suivi plus rapproché et ils peuvent parfois être à l'origine d'endommagements des prélèvements.

Plusieurs groupes de recherche ont publié des études comparatives de décalcifiants au cours des années 1980 à 2016, dans le but de choisir celui le plus adapté à leur projet. Ces publications ne s'accordent pas sur le choix du décalcifiant même si l'EDTA est fréquemment préféré aux autres. Les résultats sont difficiles à comparer car les protocoles présentés possèdent presque systématiquement des différences. Les paramètres variant le plus fréquemment sont : la nature des solutions testées, les conditions de réalisation de la décalcification (température, agitation, matériel spécifique de type micro-onde, etc...), la fréquence de changement des solutions, la méthode de suivi de la décalcification, le type de structures osseuses considéré, l'espèce étudiée et la durée de l'étape de fixation. Le fixateur le plus utilisé reste le formol tamponné mais d'autres sont aussi utilisés. De plus certains détails du protocole sont parfois omis et la composition des solutions de décalcification trouvées dans le commerce n'est pas toujours indiquée, ce qui rend plus difficile l'interprétation des résultats.

De manière générale, la phase de décalcification a des effets secondaires non recherchés sur le prélèvement, parfois minimes, mais parfois trop importants pour pouvoir réaliser certaines techniques histologiques. L'impact des décalcifiants sur les **caractéristiques morphologiques et la qualité de coloration** en hémalun éosine des prélèvements est présenté en premier, suivi des résultats obtenus lors d'**immunohistochimie** sur prélèvements décalcifiés. Seule cette technique ainsi que la coloration hémalun éosine sont réalisées au cours du projet expérimental. Cependant, dans le cadre de la recherche de décalcifiants dont l'agressivité pour les structures cellulaires est la plus faible possible, une brève présentation des résultats obtenus lors de l'utilisation des techniques telles que l'hybridation *in situ*, la PCR/RT-PCR et la microscopie électronique à balayage sur prélèvements décalcifiés est réalisée. Enfin la **durée nécessaire à la décalcification** fait partie des enjeux importants lors de l'élaboration d'un protocole de décalcification. Celui-ci sera abordé dans le dernier paragraphe de cette partie.

### ***Impacts des décalcifiants sur les caractéristiques morphologiques microscopiques et la qualité de coloration des prélèvements***

Différents critères peuvent être utilisés pour évaluer cet impact, tel que l'aspect des cellules et de la matrice extra cellulaire (MEC), le respect de la topographie<sup>24,26</sup>, l'aspect des noyaux<sup>25</sup>, le contraste entre le noyau et le cytoplasme<sup>27</sup>, la rétraction des ostéocytes<sup>27</sup>.

Lors d'études de la structure calcifiée de la dent, d'autres critères spécifiques de cette structure tels que la préservation de la morphologie de la pulpe, la préservation de la couche d'odontoblaste<sup>27,28</sup>, la préservation de l'épithélium sulculaire de la gencive, la dislocation de la jonction os - ciment<sup>29</sup> et la clarté des tubules de la dentine<sup>28</sup> sont retrouvés.

Ces observations restent toutefois plus ou moins subjectives. Pour minimiser ce caractère subjectif, certaines études des coupes histologiques sont réalisées en aveugle par rapport à la nature du décalcifiant<sup>24,29</sup> pour ne pas influencer l'examineur. Des grilles de scoring sont aussi instaurées, simples avec une gradation de un à trois des caractéristiques cellulaires (exemple : pauvres, correctes, bonnes<sup>30</sup>) ou plus complexes avec un nombre de critères et de grades plus important<sup>26,27,31</sup>. Différents observateurs peuvent alors évaluer les lames avec ces grilles<sup>28</sup>. Ces résultats scorés sont alors statistiquement analysés ce qui permet d'évaluer ensuite la significativité des résultats obtenus.

Les résultats restent variables, ceux concernant les os longs sont présentés en premier, suivi de ceux obtenus sur les dents.

Dans l'étude de CALLIS et STERCHI (1998)<sup>25</sup>, de nombreux décalcifiants sont comparés sur échantillons d'os fémoraux ou huméraux canins. Parmi ceux-ci se trouvent l'EDTA, des acides forts (acides nitrique et chlorhydrique) et des acides faibles tels que l'acide formique, combiné avec du citrate de sodium, du formaldéhyde ou avec un acide fort (acide chlorhydrique). La cinétique est monitorée très attentivement et les coupes histologiques ne montrent pas de différences marquées; toutes présentent des caractéristiques histologiques et une coloration satisfaisante. En revanche dans une étude plus ancienne de 1987<sup>32</sup>, sur os humains (nature exacte non précisée) reprenant ces décalcifiants auxquels sont ajoutés d'autres acides faibles, la cinétique est moins suivie et les temps de décalcification sont fixés arbitrairement à vingt quatre heures ou trois jours (sauf pour l'EDTA où un test à sept jours est réalisé). Il est alors constaté des différences concernant la conservation des détails cellulaires et la qualité de coloration. L'EDTA et les acides faibles (acide acétique et acide formique) procurent des résultats de meilleure qualité par rapport aux acides forts (acide nitrique et chlorhydrique) où des altérations de la morphologie tissulaire microscopique et de la coloration sont observées. Pour ces acides forts, les prélèvements restés trois jours en immersion sont plus sévèrement altérés que ceux laissés vingt quatre heures.

L'étude de VELOT et al. publiée en 2011<sup>20</sup> compare également l'EDTA à différentes solutions de décalcifications acides du commerce (DC3 (Labonord), le microDEC (MMFrance), l'OsteoRAL (RAL diagnostics), TBD-2 (Thermo Fisher Scientific) (cf **Tableau 1** pour le détail de la composition des solutions). Elles sont testées sur os et cartilage de souris (genoux). Malgré un suivi attentif, les résultats obtenus dans cette étude sont aussi différents de ceux de CALLIS et STERCHI. Les décalcifiants acides entraînent parfois un tissu d'aspect lysé et les colorations sont toutes moins

contrastées ou de plus faible intensité qu'avec l'EDTA qui permet les meilleurs résultats. GONZALEZ et al. (2013)<sup>26</sup> comparent également l'EDTA à d'autres décalcifiants acides (acide formique, acide nitrique) concernant la morphologie microscopique de membres de rats. L'EDTA en immersion procure également les meilleurs caractéristiques cellulaires et il conserve globalement le mieux l'attachement des tissus entre eux.

MA et al.<sup>33</sup> (2008) travaillent également sur des fémurs de rats. Concernant la conservation de la morphologie microscopique des tissus, ils préfèrent une solution à base de citrate et d'acide formique à l'EDTA, qui présente tout de même des résultats corrects mais moins de détails cellulaires. Les décalcifiants à base d'acide chlorhydrique présentent le plus d'altération des tissus et une perte importante des ostéocytes. Un mélange d'acide formique, d'EDTA et de formaldéhyde, est aussi comparé, ce mélange permet de fixer et décalcifier le prélèvement en même temps. Cependant des défauts de décalcification et une perte des détails cellulaires sont constatés après son utilisation.

Dans l'étude de MATUELLA et al. (2007)<sup>24</sup>, l'EDTA est comparé à la solution « Ana Morse » (mélange de 50% acide formique et 20% citrate de sodium) sur dents de lait humaines. La topographie et le tissu fragile de la pulpe dentaire sont bien conservés, toutefois ce groupe préfère la solution « Ana Morse » pour une meilleure conservation de l'aspect des cellules et de la matrice extra cellulaire. Dans l'étude de FERNANDES et al. (2007)<sup>29</sup>, la solution « Anna Morse » est comparée à l'acide nitrique, également dans le cadre de décalcification de dents (modèle d'étude : dents de rats). Elle est aussi préférée pour une meilleure conservation des structures et de leurs topographies.

En revanche dans l'étude GUPTA et a. (2014)<sup>28</sup>, toujours dans le cadre de la décalcification de dents (modèle d'étude : dents humaines), l'acide formique présente les plus mauvais résultats par rapport aux quatre autres décalcifiant testés. L'EDTA et l'acide nitrique fournissent les meilleurs résultats.

Dans l'étude de SRINIVASYAIAH et al. (2016)<sup>30</sup>, le groupe de recherche préfère aussi les caractéristiques morphologiques et de coloration des dents décalcifiées (modèle de l'étude : dents humaines) par l'acide nitrique par rapport à celles obtenues par l'acide trichloracétique ou l'acide formique. De plus, moins de déchirures ou de pliures sont constatées avec l'acide nitrique. Mais le groupe de recherche SANJAI et al. (2012)<sup>31</sup> préfère la conservation des structures et la qualité de fixation du colorant après décalcification des dents (modèle de l'étude : **dents humaines**) par l'EDTA. Dans leur étude, l'acide nitrique est le décalcifiant qui obtient les moins bons résultats, derrière l'acide formique qui fournit des résultats satisfaisants.

DOS SANTOS NEVES et al. (2011)<sup>34</sup> s'intéressent uniquement à l'impact sur les tissus mous d'une immersion dans le décalcifiant. Ils incluent pour cela, une glande mandibulaire dans la solution de décalcification de mandibules de rat, durant le temps nécessaire à sa décalcification. L'EDTA permet d'obtenir les meilleures caractéristiques, proches des glandes non soumises à la décalcification. En revanche une solution à base d'acide nitrique 5% et de formaldéhyde 4% entraîne de fortes altérations des structures. L'acide trichloroacétique donne lui des résultats intermédiaires considérés comme satisfaisants.

### ***Décalcifiants et immunohistochimie (IHC) :***

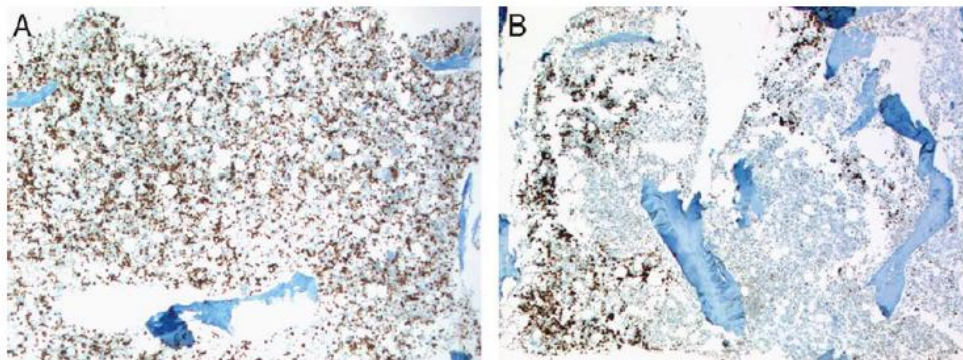
Un des objectifs du projet expérimental étant de pouvoir utiliser l'immunohistochimie pour identifier des cellules de la moelle osseuse, l'impact des décalcifiants sur la conservation des sites antigéniques est donc un élément particulièrement important. Un tableau récapitulatif des résultats en immunohistochimie présentés dans cette partie, regroupant les décalcifiants du commerce cités en fonction de leur composition (type d'acide ou de chélateur et concentration si précisée dans l'étude), est présenté à la fin de ce paragraphe (**Tableau 1**). La phase de décalcification est réalisée à température ambiante pour toutes les études citées. Les espèces étudiées, si elles sont précisées, sont indiquées au cours des paragraphes ci-dessous.

Une des premières études sur l'impact de la décalcification sur la conservation des sites de marquage est celle d'ATHANASOU et al. en 1987<sup>32</sup> (modèle d'étude : humain). Quinze marqueurs sont testés après décalcification par des acides forts (HCl, HNO<sub>3</sub>), des acides faibles (acide acétique, acide formique), un chélateur (EDTA), et un mélange entre un agent chélateur et un acide fort (EDTA - HCl). L'ensemble des marqueurs est conservé après décalcification par les acides faibles et l'EDTA, avec une coloration forte des sites marqués. Le mélange EDTA-HCl et l'acide trichloroacétique fournissent également de bons résultats mais un marqueur, le CEA (antigène carcino-embryonnaire, monoclonal) n'est pas validé, et le marqueur EMA (antigène de la membrane épithéliale, monoclonal) présente un signal plus faible (absent pour l'acide trichloroacétique, monoclonal) qu'avec les décalcifiants précédents. Concernant les acides forts, l'EMA, le CEA et le HLA DR (Human leucocyte antigène DR, monoclonal) ne sont pas retrouvés, et parmi les autres marqueurs, six apparaissent plus faiblement marqués.

L'étude de VELOT et al (2011)<sup>20</sup> (modèle d'étude : rat) s'intéresse également à la conservation des épitopes antigéniques et teste l'anticorps Ki-67, marqueur nucléaire ne faisant pas partie de l'étude précédente, sur les prélèvements décalcifiés avec l'EDTA 10% ou des décalcifiants acides du commerce (DC3 (Labonord), le microDEC (MMFrance), l'OsteoRAL (RAL diagnostics), TBD-2 (Thermo Fisher Scientific)). Seuls les prélèvements décalcifiés à l'EDTA ou le TBD-2 présentent un signal nucléaire positif, et ceux de l'EDTA présentent un marquage plus intense.

MA et al (2008)<sup>33</sup> testent le marqueur CD68 (marqueur d'ostéoclastes et de macrophages) sur fémurs de rats après décalcification par l'EDTA 10% ou d'autres solutions du commerce à base d'acide chlorhydrique ou d'acide formique. Un décalcifiant à base d'acide formique supposé permettre de bons résultats en IHC est également testé, l'Immunocal (Decal Chemical Corporation). De même que dans l'étude précédente, hormis l'EDTA, aucun des décalcifiants ne fournit des résultats satisfaisants.

REINEKE et al. (2006)<sup>26</sup> testent les marqueurs Anti CD20, CD3, Mib1, Glycophorine A (DAKO) après décalcification soit à l'acide nitrique 5% soit à l'EDTA 10% (modèle d'étude : humain). Un marquage est constaté après décalcification par l'acide nitrique mais il est plus faible et non homogène par rapport à l'EDTA, en particulier pour le marqueur nucléaire MIB1 (**Figure 4**).



**Figure 4 : Marquage Mib1 réparti de manière homogène après décalcification par l'EDTA (A) et hétérogène après utilisation d'un décalcifiant acide (B) (Reineke et al. , 2006)**

En revanche le marquage par immunofluorescence de l'ostéopontine et de l'ostéoclastine réalisé par GONZALES et al. (2013)<sup>26</sup>, est optimal lors de décalcification par l'acide nitrique (modèle d'étude : rat). L'EDTA 10% fournit toutefois des résultats corrects et les moins bons résultats sont obtenus avec la solution HCl 7% EDTA 2%. La solution « Anna Morse » présente des résultats de qualité intermédiaire entre l'EDTA et cette dernière solution.

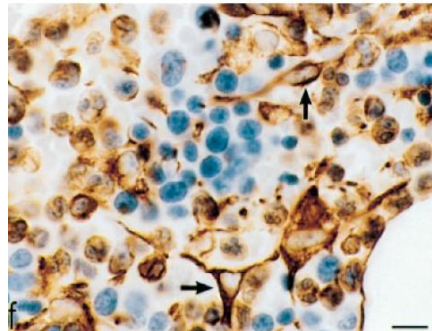
DOS SANTOS NEVES et al. (2011)<sup>34</sup> valident aussi les marqueurs EGF et EGFR (site membranaire) sur tissus mous de rats soumis à des décalcifiants pendant la durée nécessaire pour décalcifier une mandibule de rat. Un signal positif est observé aussi bien après l'immersion dans l'EDTA 10% que dans l'acide trichloroacétique ou dans un mélange d'acide nitrique et de formaldéhyde.

En 2006 est publié le « *Hammersmith Protocol* »<sup>35</sup> comme étant le protocole idéal pour l'étude des biopsies de la moelle osseuse humaine. Il est utilisé l'AZF (acid zinc formalin) en fixateur pendant vingt à vingt quatre heures, suivi d'une décalcification par un mélange d'acide formique 10% et de formaldéhyde 5% pendant six heures. Un panel large de marqueurs (plus de soixante marqueurs) est validé parmi lesquels sont retrouvés le CD68 et le Ki-67. La courte durée d'exposition du fait de la petite

taille des échantillons explique très probablement ces résultats. Le choix de cette solution n'est pas basé sur l'obtention de meilleurs résultats qu'avec l'EDTA mais plutôt des résultats aussi satisfaisants dans un temps réduit. L'EDTA nécessite en effet vingt quatre heures pour décalcifier les biopsies, or à l'échelle de ce laboratoire travaillant avec un grand nombre d'échantillons quotidiens et effectuant des tests à visées diagnostiques, ce délai n'est pas adapté.

Certains auteurs rapportent également la validation de marqueurs immunohistochimiques après décalcification par l'EDTA. Ils ne comparent cependant pas la qualité obtenue par rapport à d'autres décalcifiants. C'est le cas de LOYSON et al. (1997)<sup>13</sup> qui travaillent sur biopsies de moelles osseuses humaines. Ce groupe valide plus de vingt marqueurs permettant d'étudier les cellules et les éléments de la moelle osseuse après quarante huit heures de décalcification par l'EDTA (125g/L, température ambiante). Par exemple les cellules périvasculaires (marqueurs CD34, FactVIIIrg et  $\alpha$ SMA), les lymphocytes T (marqueur CD3), les lymphocytes B (marqueur CD20) et des cellules stromales (marqueurs vimentine, **Figure 5** et desmine) sont identifiées grâce à ces marqueurs.

CUNNINGHAM et al. (2001)<sup>36</sup> et KEITHLEY et al. (2000)<sup>37</sup> (modèle d'étude : humain) obtiennent également des résultats en IHC satisfaisants avec l'utilisation de l'EDTA.



**Figure 5 : Cellules stromales marquées avec l'anticorps anti-vimentine (flèches) sur coupe histologique de moelle osseuse ; Bar de 10 $\mu$ m (LOYSON et al. (1997)<sup>13</sup>)**

**Tableau 1 : Résultats obtenus en IHC après utilisation de différents décalcifiants**

Décalcifiants, type d'acide	Marque si précisée / détail composition	Résultats en IHC	Référence de l'étude
EDTA pH neutre	Solution 10% EDTA	Ki 67 positif, optimal	VELOT et al (2011)
		CD68 optimal	MA et al (2008) <sup>33</sup>
	USEDECALC (Médite) et solution EDTA 10% pH neutre	Anti CD20, CD3, Mib1, GlycophorinA positif	REINEKE et al. (2006) <sup>38</sup>
	Solution 10% EDTA	OPN , OCN en IF Positif, Moins bien qu'avec acide nitrique	GONZALES et al. (2013) <sup>26</sup>
	%EDTA de la solution non précisé	15/15 anticorps validés	ATHANASOU et al. (1987) <sup>32</sup>
Mélange EDTA/HCL	DC3 (Labonord)	Ki-67 négatif	VELOT et al (2011)
	EDTA 2% HCl 7%	OPN , OCN en IF Moins bien qu'avec acide nitrique ou EDTA ou acide formique	GONZALES et al. (2013) <sup>26</sup>
	EDTA-HCl 10%	EMA signal faible; CEA négatif 13/15 anticorps validés	ATHANASOU en 1987 <sup>32</sup>
Mélange HCl / Acide formique	MicroDEC (MMFrance)	Ki-67 négatif	VELOT et al (2011)
A base d'acide formique	TBD-2 (Thermo Fisher Scientific)	Ki-67 +, moins intense qu'avec EDTA	VELOT et al (2011)
	Buffered Formic Acid (Poly Scientific R&D Corp.) + tampon citraté	CD68 non optimal	MA et al (2008) <sup>33</sup>
	Formical-4 (Decal Chemical Corporation) + Formaldéhyde 4%, EDTA	CD68 non optimal	MA et al (2008) <sup>33</sup>
	50% acide formique 20% citrate de sodium	OPN, OCN en IF + Moins bien qu'avec acide nitrique ou EDTA	GONZALES et al. (2013) <sup>26</sup>
	Solution à 10%	15/15 anticorps validés	ATHANASOU en 1987 <sup>32</sup>
A base d'acide nitrique	OsteoRAL (RAL diagnostics)	Ki-67 négatif, présence d'un signal non spécifique	VELOT et al (2011)
	Acide nitrique + Formaldéhyde 4%	EGF, EGFR +	DOS SANTOS NEVES et al. (2011) <sup>34</sup>
	USERAPID (Médite) et solution 5% acide nitrique	Anti CD20, CD3, Mib1, GlycophorinA + Plus faible, non homogène par rapport EDTA	REINEKE et al. (2006) <sup>38</sup>
	Acide nitrique solution 5%	OPN, OCN en IF + Mieux qu'avec EDTA	GONZALES et al. (2013) <sup>26</sup>
		6/15 anticorps comme EDTA 6 avec signal faible EMA ; CEA ; HLA DR négatifs	ATHANASOU en 1987 <sup>32</sup>
A base d'acide chlorhydrique	RDO et RDO Gold (Apex Engineering Products Corporation)	CD68 non optimal	MA et al (2008) <sup>33</sup>
	RDO10% et solution HCl à 5%	6/15 anticorps comme EDTA 6 avec signal faible EMA ; CEA ; HLA DR négatifs	ATHANASOU (1987) <sup>32</sup>
Acide trichloroacétique	Solution à 5% d'acide trichloroacétique	EGF, EGFR +	DOS SANTOS NEVES et al. (2011) <sup>34</sup>
		EMA ; CEA négatifs 13/15 anticorps validés	ATHANASOU (1987) <sup>32</sup>

+ = résultats positifs ; IF = immunofluorescence

**Décalcifiants et conservation des acides nucléiques et ribonucléiques.  
Evaluation par PCR, RT PCR et hybridation *in situ* :**

Concernant l'étude des acides ribonucléiques en général, les auteurs s'accordent davantage sur le choix de l'EDTA comme décalcifiant pour pouvoir appliquer des techniques telles que l'hybridation *in situ* ou la PCR.

En effet des résultats décevants sont obtenus avec d'autres décalcifiants tels que le RDO (acide chlorhydrique) dans l'étude de ALERS et al. <sup>39</sup>(1999), le DC3 (Labonord), le microDEC (MMFrance), l'OsteoRAL (RAL diagnostics), et le TBD-2 (Thermo Fisher Scientific) dans l'étude de VELOT et al. (2011)<sup>20</sup>.

REINEKE et al. (2006)<sup>38</sup> utilisent la PCR après décalcification à l'acide nitrique et obtiennent tout de même des résultats, mais seul l'EDTA permet l'amplification des séquences longues. Lors d'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* après décalcifiant acide, le signal est moins intense qu'avec l'EDTA et un bruit de fond est constaté.

**Tableau 2 : Résultats obtenus en PCR, RT PCR et hybridation *in situ* après utilisation de différents décalcifiants (fixation par le formol)**

Décalcifiants	PCR/ RT PCR	Hybridation <i>in situ</i>	Référence de l'étude
EDTA 10% pH neutre		Positif	Alers et al. <sup>39</sup> (1999)
		Positif net, spécifique, intense	Velot et al. (2011) <sup>20</sup>
	- PCR + (jusqu'à 590bp) - RT PCR + (jusqu'à 485pb)	Positif	Reineke et al. (2006) <sup>38</sup>
	PCR + (jusqu'à 643pb)		Wichkam et al. (2000) <sup>40</sup>
RDO		Négatif	Alers et al. <sup>39</sup> (1999)
Acide nitrique 5%	- PCR + (jusqu'à 290pb) - RT PCR + (jusqu'à 174pb)	Positif mais signal diminué Bruit de fond présent	Reineke et al. (2006) <sup>38</sup>
DC3, TB2, microDEC, OsteoRAL		Négatif	Velot et al. (2011) <sup>20</sup>

WICKHAM et al. (2000)<sup>40</sup> réussissent également à amplifier des fragments jusqu'à 643 pb après décalcification de biopsie de moelle osseuse par l'EDTA.

Ces techniques sont, comme l'IHC, validées sur biopsie de moelle osseuse, avec le « *Hammersmith protocol* »<sup>35</sup>, évoqué dans le paragraphe précédent.



### **Décalcifiants et altérations de surface des échantillons :**

VELOT et al. (2011)<sup>20</sup> utilisent la microscopie à balayage pour évaluer les modifications de surfaces des échantillons décalcifiés. Une altération de la surface cellulaire de tous les prélèvements est constatée au grossissement x500. Au grossissement x2000, les altérations par l'EDTA et le TBD-2 sont moins sévères qu'avec les autres décalcifiants.

### **Durée de décalcification en immersion :**

La durée de la phase de décalcification est un paramètre important pour les groupes de recherche. Le temps pouvant être consacré à cette phase dépend des objectifs de chaque groupe. Par exemple, pour des laboratoires établissant des protocoles de décalcification ayant pour application la réalisation de diagnostics en routine, la durée de cette phase doit être la plus courte possible. En revanche, dans le cadre de projets sur un petit nombre d'échantillons, réalisés en parallèle d'autres projets de recherche, des durées plus importantes peuvent être envisagées.

Le **Tableau 3** permet d'observer des ordres de grandeurs de la durée nécessaire pour décalcifier différents types de prélèvements par l'EDTA. Il peut être constaté que pour de petits prélèvements tels que des biopsies de moelle osseuse, la durée reste de l'ordre de quelques heures à quelques jours. En revanche pour des prélèvements d'os plus denses ou de dents, les délais sont beaucoup plus importants et peuvent atteindre jusqu'à plusieurs mois. Même pour un projet dont l'échéance n'est pas urgente, plusieurs mois peuvent être un frein important. Pour accélérer ce processus, différentes techniques peuvent être utilisées en conservant l'EDTA comme décalcifiant. Elles seront abordées dans le paragraphe **2.3**. La durée de la phase de décalcification en fonction des différentes techniques permettant d'accélérer le processus figure également sur le **Tableau 3**.

Concernant la rapidité des autres décalcifiants, les acides forts sont plus rapides que les acides faibles. L'acide nitrique est souvent en tête de file lors de comparaison avec les autres décalcifiants<sup>26,28,30,31,34,41</sup>. Dans l'étude de CALLIS et al.<sup>25</sup>, ce sont les décalcifiants à base d'acide chlorhydrique qui arrivent en tête, dix fois plus rapides que l'EDTA. C'est aussi le cas dans l'étude de VELOT et al.<sup>20</sup>, le DC3 s'avère 42 fois plus rapide que l'EDTA et dans l'étude de MA et al.<sup>33</sup> où le RDO s'avère 88 fois plus rapide.

Les acides faibles permettent souvent des durées de décalcification intermédiaires entre l'EDTA et les acides forts. Les décalcifiants à base d'acide formique sont trois fois plus rapides que l'EDTA dans l'étude de CALLIS et al.<sup>25</sup>, deux fois plus dans l'étude de MATUELLA et al.<sup>24</sup>, trois fois et demie plus dans l'étude de VELOT et al.<sup>20</sup>, trois fois plus dans l'étude de GUPTA et al.<sup>28</sup>, deux fois plus dans l'étude de MA et al.<sup>33</sup> et 1,3 fois plus vite dans l'étude de SANJAI<sup>31</sup>.

En revanche dans l'étude de FRANK et al.<sup>42</sup> où la décalcification est réalisée à 4°C, l'acide formique présente une durée nécessaire de décalcification comparable à l'EDTA (respectivement quatorze et quinze jours pour des fémurs de rats).

Il peut être noté que la présence de tissus mous autour du prélèvement augmente considérablement la durée de décalcification. Dans l'étude de GONZALEZ et al. (2013)<sup>26</sup>, des os longs de rats sont décalcifiés avec ou sans dissection des tissus mous, avec différents décalcifiants. En comparant les durées nécessaires (toutes pièces et tous décalcifiants confondus) à la décalcification, celles-ci augmentent de 28% lorsque les tissus mous ne sont pas disséqués. Concernant l'EDTA, les membres postérieurs de rat avec peau ont par exemple nécessité soixante quatorze jours de plus que ceux où la peau avait été retirée.

Tableau 3 : Durées de décalcification requises retrouvées dans la littérature pour l'EDTA

Études (Dates, auteurs)	Os décalcifiés	Durées de décalcification EDTA	Conditions	Changement de la solution
Frank et al. (1993)	Fémurs de rats	15 jours	4°C	NP
Madden et al. (1997)	Appareils cochléaires et os de singes	3 mois 15 heures	Sous agitation, TA Micro-onde 45°C (sessions de 90 min)	Tous les jours Après chaque session
Loyson et al. (1997)	Biopsies de moelle osseuse	48 heures	TA	Non nécessaire
Callis et al. (1998)	Os de chiens 44x38x6mm humérus 13x13x3mm humérus Têtes fémorales	40 jours 40 heures 40 heures	TA Sonication (sessions de 30 min) Micro-onde (sessions de 20 min)	Une fois par jour Après chaque session Après chaque session
Keithley et al. (2000)	Tibias de cochons d'inde	23 jours 17 heures	TA Micro-onde 45°C (sessions de 6 h)	NP Toutes les 6 heures
	Appareil cochléaire de cochons d'inde	19-25 jours 14-20 heures	TA Micro-onde 45°C (sessions de 6 h)	NP Toutes les 6 heures
	Os temporaux humains (1-2cm3)	14 mois 190-400 heures	Sous agitation, TA Micro-onde NP (sessions de 6 h)	NP Toutes les 6 heures
Wickham et al. (2000)	Biopsies moelle osseuse	48 heures	Sous agitation TA	Non nécessaire
Cuningham et al. (2001)	Os temporaux humains	6-9 mois 8 jours (8 heures X 5 jours x 5 semaines)	TA Micro-onde 42°C (sessions de 60 min)	NP Après chaque session
Reineke et al. (2006)	Biopsies de corps vertébraux humains	2 heures 2 heures	Sonication Immersion après mise en bloc de paraffine	Non nécessaire
Matuella et al. (2007)	Dents laits humaines	8 à 12 mois	Sous agitation 12 heures par jour, TA	Deux fois par semaine
Ma et al. (2008)	Fémurs de rats	11 jours	NP	NP
Dos Santo Neves et al. (2011)	Mandibules de rats	27 jours	TA	Une fois par jour
Velot et al. (2011)	Genoux, vertèbres de souris	7 jours	Sous agitation, TA	NP
Sanjai et al. (2012)	Dents humaines	94 jours	Sous agitation, TA	Tous les 5 jours
Gonzales et al. (2013)	Postérieurs de rats Avec peau Sans peau	100 jours 26-59 jours	4°C 4°C	Une fois par semaine
Gupta et al. (2014)	Dents humaines	28-30 jours	Sous agitation, TA	Une fois par jour

TA= à température ambiante ; micro-onde = four à micro-ondes sous agitation, température si précisée dans la parenthèse ; NP = non précisé ; h = heures ; min = minutes

## 2.3 Influence de paramètres physiques sur la durée de décalcification

L'impact de paramètres physiques sur le processus de décalcification fait l'objet de recherche depuis le début des années 50. L'objectif étant de diminuer le temps de décalcification tout en conservant des résultats de bonne qualité. Les avantages et inconvénients des différentes méthodes évoquées au cours de cette partie sont présentés à la fin de celle-ci par un tableau récapitulatif (**Tableau 4**)

En 1958, VERDENIUS et al.<sup>41</sup> mettent en place un protocole standardisé pour quantifier l'influence de différents paramètres retrouvés dans la littérature de leur époque : la température, la mise en agitation de la solution, la mise en place d'un courant électrique dans la solution et la mise sous vide. Les trois premiers paramètres évoqués permettent d'augmenter la diffusion du réactif, et le dernier joue sur l'équilibre de la réaction chimique de décalcification selon le principe de Le CHATELIER (Acide + sel calcique insoluble  $\leftrightarrow$  CO<sub>2</sub> + sel calcique soluble).

L'équipe travaille sur des cubes d'os de fémurs de chevaux. Leurs résultats montrent l'intérêt d'une augmentation de température avec un temps de décalcification deux fois moins élevé à 40°C qu'à 13°C. La mise sous agitation permet également de réduire de 33% le temps de décalcification. La mise en place d'un courant électrique (30mA) améliore considérablement le temps de décalcification (trois fois plus rapide) (**Figure 7**). Il a été supposé par les chercheurs de son époque que le courant électrique n'agissait que par l'augmentation de température de la solution, cependant un groupe contrôle à l'étuve a été réalisé dans l'étude de VERDENIUS et al., et les résultats montrent qu'à même température, la décalcification est achevée deux fois plus rapidement lorsque les prélèvements sont immergés dans une solution soumise à un courant électrique.

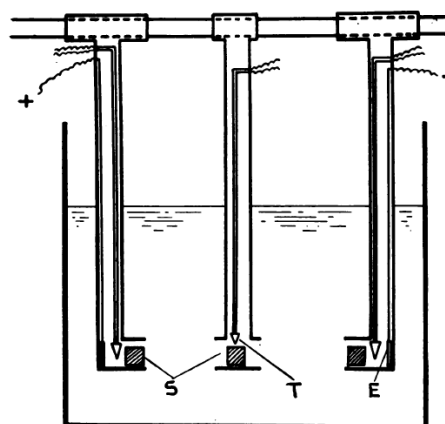


FIG. 3.—Apparatus used for experiments with electric current.  
S=specimen; E=electrode; T=thermopoint.

Figure 6 : Schéma du dispositif utilisé pour la décalcification électrolytique en 1958 (Verdinius et al.)

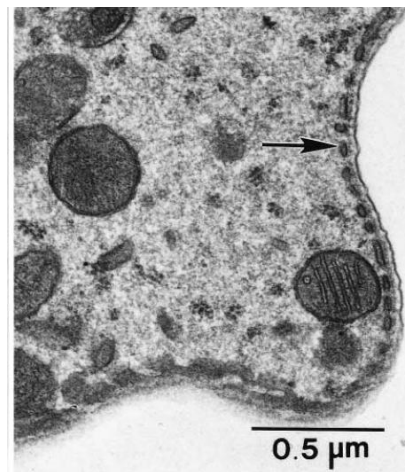
L'utilisation d'un courant électrique pour accélérer la décalcification a donné lieu à plus d'une dizaine de publications jusqu'en 1982. Ensuite peu d'articles évoquent cette technique. Aucune publication utilisant cette méthode n'est retrouvée sur

pubmed après les années 2000. Une des plus récentes est celle de LOYSON et al. (1997)<sup>13</sup>. Le groupe de recherche travaille sur des biopsies humaines de crête iliaque. Un panel de vingt anticorps évoqués dans la partie 2.2 est validé en utilisant le décalcifiant « Decalcifiant osseux » (BAYER Diagnostics, composition non disponible) et une chambre de décalcification électrolytique (Miles). La décalcification est achevée en une heure à une heure et demie. Les résultats sont similaires à ceux obtenus en quarante huit heures avec l'EDTA, aussi bien en terme de qualité de marquage, qu'en terme de conservation des caractéristiques des cellules. Les lamelles osseuses sont même un peu mieux préservées avec cette méthode.

Les impacts de l'augmentation de la température et de la mise sous agitation sont réévalués par KAPILA et al. en 2015<sup>27</sup>. Des fragments d'os et de dents de chèvres sont décalcifiés avec un mélange à base d'acide formique et de formaldéhyde. Ils constatent qu'une augmentation de la température à 45°C ou la mise sous agitation, six heures par jour, permet de réduire le temps de décalcification d'environ 30%. Sept à huit jours sont nécessaires dans ces conditions contre dix à onze jours sans. L'impact de ces procédés est évalué en observant les caractéristiques microscopiques des coupes obtenues, colorées à l'hémalun éosine. L'augmentation de la température entraîne une altération de la couche d'odontoblastes des dents décalcifiées. Des altérations du contraste des noyaux des cellules de la pulpe dentaire et des cellules de la moelle osseuse sont également constatées lors de l'utilisation de l'agitation ou de l'élévation de la température. En revanche la rétraction des ostéocytes est moins marquée avec l'utilisation d'agitation qu'en méthode conventionnelle. Les résultats obtenus concernant les caractéristiques microscopiques des échantillons soumis à ces deux techniques restent tout de même satisfaisants pour le groupe de recherche.

L'utilisation d'un four à micro-ondes est aussi rapportée dans certaines études s'intéressant à la décalcification par l'EDTA d'os temporaux, en particulier dans le cadre de l'étude de l'appareil cochléaire humain. En 1997, MADEN et al.<sup>43</sup> publient la première étude s'intéressant à l'impact de cette utilisation sur la préservation des structures cellulaires observées par microscopie à transmission. Un protocole détaillé est présenté, consistant à, après calibration du four à micro-ondes et sous contrôle de la température de la solution, immerger les prélèvements (os temporaux de singes) dans la solution d'EDTA placée au four à micro-ondes durant des cycles de quatre vingt dix minutes, à 800 W / 2,45 GHz. La solution est soumise à un système d'agitation et la température est maintenue à 45°C par un système de refroidissement continu. Après chaque cycle les zones décalcifiées entourant l'appareil cochléaire sont retirées au scalpel et la solution est renouvelée. La décalcification est achevée après dix cycles soit quinze heures. Les temps de décalcification de cette structure rapportés dans la littérature citée dans l'article sont de deux mois minimum. Le groupe contrôle réalisé dans son étude est placé sous agitation, à température ambiante, avec dissection des zones décalcifiées et renouvellement de la solution toutes les vingt quatre heures. Trois mois sont alors

nécessaires pour accomplir la décalcification. L'utilisation du four à micro-ondes permet donc également une diminution considérable du temps de décalcification (quinze heures au lieu de trois mois). De plus, les structures décalcifiées ne montrent pas de dommages cellulaires en microscopie à transmission (**Figure 7**).



**Figure 7 : Observation au microscope à transmission (x45400) des cellules d'os temporaux décalcifiées à l'aide d'un four à micro-ondes. (Maden et al.)**

En 2000, KEITHLEY<sup>37</sup> et al. reprennent cette technique utilisant le four à micro-ondes pour décalcifier des os temporaux humains, nécessitant en routine jusqu'à quatorze mois de décalcification en solution d'EDTA. Ils parviennent à réduire ce temps à deux à trois semaines. Ils montrent de plus une bonne préservation des sites antigéniques après ce procédé. Des résultats similaires concernant la conservation antigénique après utilisation de four à micro-ondes sont obtenus par CUNNINGHAM et al. en 2001<sup>36</sup>.

L'étude la plus récente sur l'intérêt de la décalcification en utilisant un four à micro-ondes est celle de l'équipe de SRINIVASYAIAH et al.<sup>30</sup> (2016). Ils présentent des résultats très satisfaisants en terme de conservation des caractéristiques des structures cellulaires de dents humaines, comparables à celles obtenues par immersion. Ils n'utilisent pas l'EDTA mais des décalcifiants acides et ne réalisent pas d'IHC. L'acide nitrique combiné à des cycles de deux minutes à 41-43°C, huit fois par jour à une heure d'intervalle, permet les meilleurs résultats. Il s'avère également le plus rapide avec une décalcification achevée en deux jours.

Enfin en 2006, REINEKE et al.<sup>38</sup> s'intéressent à la possibilité de réaliser des techniques d'immunohistochimie, d'immunofluorescence et de PCR/RT PCR après décalcification avec un « décalcifieur à ultrasons » (USE33, Medite) du commerce. Des biopsies de corps vertébraux humains sont immergées dans une solution d'EDTA 10%, soumise à une puissance de 200W sur deux à trois heures. Les trois techniques sont réalisées avec succès suite à ce protocole.

Ces résultats encourageants sont cependant à nuancer d'après la revue publiée par CALLIS et al.<sup>25</sup> (1998) sur les méthodes de décalcification. Cette revue présente les résultats d'une expérience comparant les impacts des différentes méthodes de

décalcification sur les structures cellulaires (modèle d'étude : chien). A la coloration rouge safran, il est constaté une altération de celles-ci lors d'utilisation de techniques de sonication ou de four à micro-ondes par rapport à l'immersion, malgré un suivi de la cinétique de décalcification très rigoureux. De plus, malgré ce suivi, un prélèvement est retrouvé complètement désintégré après sonication. En cas d'alternative possible, ils ne conseillent pas l'utilisation de ces processus pour une conservation des structures cellulaires de manière optimale. De plus le calibrage des appareils, le temps passé à suivre la température des prélèvements pour éviter les brûlures des tissus et les importantes fumées dégagées par ces processus restent pour eux des inconvénients à considérer.

L'utilisation d'un courant électrique dans une solution décalcifiante (mélange d'acide chlorhydrique et formique) est également reprise. Les lésions cellulaires constatées sont beaucoup moins importantes qu'avec la sonication ou le four à micro-ondes. Il est cependant rappelé qu'une attention particulière doit être accordée au suivi de la température de la solution pour éviter l'endommagement du prélèvement.

Enfin une méthode permettant l'augmentation des échanges ioniques est aussi présentée. Celle-ci fait intervenir l'interaction entre une résine (WIN 3000) placée au fond d'une petite cuve et une solution d'acide formique 10%. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et de ne pas altérer les cellules mais présente l'inconvénient de ne pas être adaptée pour des études nécessitant la décalcification de nombreux prélèvements ; la taille de la cuve étant le facteur limitant. Le coût et la difficulté de se procurer cette résine sont aussi des limites à considérer.

**Tableau 4 : Récapitulatif des différents avantages et inconvénients des techniques de décalcification décrites**

Techniques	Avantages	Inconvénients
Four micro-ondes <sup>37,43 25,30,36,37</sup>	Rapidité +++ Conservation des structures pour observation au MET Préservation des sites antigéniques	Risques de brûlure des tissus Difficulté de la calibration de l'appareil Nombreux changements de solutions Vapeurs
Sonication <sup>25,38</sup>	Rapidité Possibilité d'IHC, IF, PCR, RT PCR	Risques de brûlure des tissus Vapeurs
Electrolytique <sup>13,25,41</sup>	Rapidité ++ Préservation des sites antigéniques	Risques de brûlure des tissus
Echanges ioniques <sup>25</sup>	Rapidité ++	Coût de la résine Difficulté de procuration de la résine Nombre de prélèvements limités
Augmentation de la température <sup>27,41</sup>	Rapidité + Facilité de mise en œuvre	Pas aussi rapide que les méthodes précédentes
Agitation <sup>20,27,28,31,40,41</sup>	Facilité de mise en œuvre Sécurité, qualité	Lent avec EDTA
Immersion simple	Facilité de mise en œuvre Sécurité, qualité	Très lent pour les prélèvements de tailles importantes avec l'EDTA <sup>37</sup>

MET = microscope électronique à transmission

## 2.4 Outils permettant l'évaluation du stade de décalcification du prélèvement

Comme il a pu être présenté dans les paragraphes précédents, l'étape de décalcification peut avoir une durée très variable selon le protocole utilisé et la pièce osseuse de départ (cf **Tableau 3**). Un suivi attentif doit être réalisé, aussi bien pour optimiser le temps de décalcification et la quantité de solution nécessaire, que pour éviter une dégradation du prélèvement.

La méthode de suivi doit être choisie en fonction des moyens mis à disposition et de l'importance des prélèvements étudiés.

Des méthodes dites « physiques » et des méthodes dites « chimiques » sont décrites dans la littérature (**Tableau 5**).

Parmi les méthodes physiques se trouvent : la pesée, les tests à la lame ou à l'aiguille fine, les tests de pression/flexion du prélèvement et la radiographie (Figure 9).



Concernant les méthodes physiques, la radiographie est mentionnée dans de nombreuses études (cf références du **Tableau 5**). Comparée aux autres méthodes physiques tels que les tests de flexion ou à l'aiguille, elle présente l'avantage de ne quasiment pas manipuler le prélèvement et donc de ne pas risquer de l'endommager. Elle permet une plus grande sensibilité que ces dernières méthodes ou bien par exemple que la pesée, en particulier pour des petits prélèvements sur les derniers stades de décalcification.

La fréquence de suivi est à adapter selon le protocole de décalcification employé. Par exemple dans l'étude de CALLIS et al.<sup>25</sup>, des radiographies sont réalisées toutes les demi-heures lors d'utilisation de méthodes de sonication et micro-ondes (puis toutes les quinze minutes en fin de procédure), toutes les heures pour la méthode électrolytique et toutes les quatre heures pour la méthode d'échange ionique. Hormis pour cette dernière technique, la méthode chimique est associée dans cette étude à chaque contrôle radiographique. Dans l'étude de SANJAI et al.<sup>31</sup>, des contrôles à l'aiguille sont réalisés régulièrement et la radiographie est réalisée en fin de procédure, pour confirmer la fin du processus. Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite un appareillage en général non disponible en laboratoire d'anatomie pathologique. Certains fixateurs contenant des métaux lourds rendent également son utilisation impossible<sup>25</sup>.

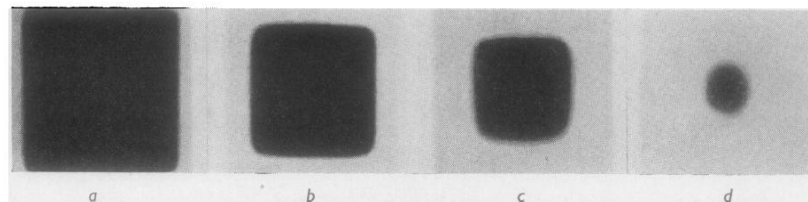


FIG. 1.—Radiographs of different stages of decalcification (about  $\times 4$ ). a, Marginal area of bone block decalcified. b and c, Intermediate stages. d, Last stage, where only the centre of the bone block still contains calcium.

**Figure 8 : Contrôles radiographiques des cubes d'os de chevaux décalcifiés à différents stades (Verdinius et al., 1958)**

La technique de pesée permet d'établir des cinétiques de décalcification en quantifiant la perte de substance comme dans l'étude de VERDENIUS<sup>41</sup>. Mais elle n'est pas très citée dans la littérature, probablement à cause de la difficulté d'obtenir une pesée précise pour de petits éléments.

Les méthodes chimiques consistent à évaluer la présence de sels de calcium à partir du mélange de la solution de décalcification avec des réactifs entraînant la formation d'un précipité en présence de calcium. Elles sont également fréquemment retrouvées dans la littérature (cf références du **Tableau 5**).

En 1981, ROSEN et al.<sup>44</sup> publient un protocole pour évaluer la présence de calcium en solution de décalcification lors d'utilisation de l'EDTA comme décalcifiant. Cela consiste à mélanger 0,5 mL de solution de décalcification avec 1 mL de tampon citrate – phosphate (0,2M acide citrique – 0,16M phosphate de potassium pH 3,2-3,6) et 2,5 mL d'oxalate d'ammonium. En cas de formation d'un précipité blanc la solution est changée. En cas d'absence de précipité blanc au bout de vingt minutes,

le prélèvement est laissé vingt quatre heures et la solution est testée de nouveau : en cas d'absence de sels calciques après ces vingt quatre heures, la décalcification est considérée comme achevée, sinon la solution est renouvelée.

En 2011, VELOT et al.<sup>20</sup> se servent également d'une méthode chimique pour suivre l'évolution de la décalcification des prélèvements par l'EDTA. Ils utilisent un mélange d'hydroxyde d'ammonium et d'oxalate d'ammonium en proportion identique et suivent les mêmes critères que ROSEN et al..

SANJAI et al.<sup>31</sup> réservent la technique chimique pour suivre la décalcification des prélèvements par des solutions acides. Une liqueur d'ammoniaque forte est dans ce cas appliquée au goutte à goutte dans un volume de 5 cm<sup>3</sup> de la solution de décalcification jusqu'à obtenir une solution de pH alcalin. Si la solution se trouble alors elle est renouvelée. En cas d'absence d'opacité après l'atteinte d'un pH basique, 5 cm<sup>3</sup> d'oxalate d'ammonium saturée sont rajoutés. En cas d'absence de formation d'un précipité blanc après trente minutes, le point final est considéré comme atteint. MA et al.<sup>33</sup> réservent aussi la méthode chimique aux décalcifiants acides, dans leur protocole, un volume de 1mL d'oxalate d'ammonium est simplement ajouté à un volume de 5 mL de solution et la formation du précipité est évaluée après dix minutes.

Les méthodes chimiques sont vraisemblablement plus précises que les méthodes physiques (hormis la radiographie) mais légèrement plus longues. Elles ne peuvent pas être utilisées dans le cas de méthodes de décalcification par échanges ioniques avec une résine, les ions calcium ne se trouvant alors plus en solution mais piégés dans la résine<sup>25</sup>.

Les avantages et inconvénients des différentes méthodes sont récapitulés dans le **Tableau 5** ci-dessous.

**Tableau 5 : Comparaison des méthodes de détermination du point final de la réaction**

Méthode	Avantages	Inconvénients
Tests à l'aiguille <sup>26,28,29</sup> , lame <sup>24,34,36,37</sup>	Simple, rapides, peu coûteux	Risques d'abimer le prélèvement Très peu sensibles
Radiographie <sup>25,26,28,29,31,37,41,42</sup>	Sensible, pas de manipulation des prélèvements, rapide	Matériel parfois peu accessible
Pesée <sup>41</sup>	Possibilité de réaliser des cinétiques, simple, rapide, peu coûteux	Moins sensible que la radiographie Difficile si petits prélèvements
Méthodes chimiques <sup>20,25,27,28,30,31,33</sup>	Simple, sensible	Nécessité d'avoir les réactifs

L'étude de GUPTA et al. (2014)<sup>28</sup> évoque toutefois les limites de ces contrôles. Dans leur projet, des tests chimiques et à l'aiguille sont réalisés quotidiennement. Des clichés radiographiques jusqu'à radio transparence sont effectués une fois les tests chimiques en faveur de l'atteinte du point final. Cependant des prélèvements ont nécessité deux jours d'immersion supplémentaires après des résultats aux trois tests en faveur de la fin du processus.

## 2.5 Différentes méthodes de fixation rencontrées dans la littérature

Les solutions de formol 10% tamponnées à la neutralité sont retrouvées comme solutions de fixation dans la majorité des études. La durée de la fixation varie selon les études et la pièce osseuse considérée, parfois différents temps de fixation sont testés.

Par exemple dans l'étude de FERNANDES et al. (2007)<sup>29</sup>, des différences sont constatées, avec dans leur cas une préférence pour quarante huit heures plutôt que vingt quatre ou soixante douze heures pour des os maxillaires de rats de 4mm<sup>3</sup>. Dans l'étude de REINEKE et al. (2006)<sup>33</sup>, le temps de fixation le plus approprié pour des biopsies de corps vertébraux humains est de vingt quatre heures avec une solution de formol tamponnée 4% plutôt que douze ou quarante huit heures. Ce groupe de recherche évalue également l'impact d'une fixation prolongée sur la possibilité de réaliser des PCR. Il constate qu'après une semaine de fixation le taux d'amplification diminue, et que l'amplification est ne se produit plus après trois semaines de fixation.

En 2007, MATUELLA et al.<sup>24</sup> publient une étude comparative du formol 10% et du paraformaldéhyde 4%. Des dents de laits humaines sont fixées sur vingt quatre heures. Le groupe préfère la fixation par le formol, qui semble permettre une meilleure conservation des structures telles que la pulpe, après décalcification.

Tableau 6 : Différents temps de fixation des prélèvements retrouvés dans la littérature

Prélèvements	Durée de la fixation	%	Référence
Morceaux d'os fémoraux et huméraux canins (10cm <sup>3</sup> )	10 jours	F10%	Callis et al. (1998)
Morceaux de dents et d'os caprins	48 heures	F10%	Supriya et al. (2015)
Genoux et vertèbres de souris	24 heures	F10%	Velot et al. (2011)
Os maxillaires de rats	48 heures	F10%	Fernandes et al. (2007) <sup>29</sup>
Dents humaines	24 heures	F10%	Gupta et al. (2014)
Fémurs de rats	24 à 72 heures	F10%	Ma et al. (2008)
Biopsies de corps vertébraux humains	24 heures	F4%	Reineke et al. (2006)
Biopsies de moelle osseuse humaine	20-24 heures	F10%	Wichkam et al. (2000)
Biopsies de moelle osseuse humaine	24heures	F10%	Loyson et al. (1997)
Fémur de rats	48 heures	PF 4%	Frank et al. (1993)

FX% : solution de formol tamponnée X% ; PF : solution de paraformaldéhyde

Le B5 est agent fixateur cité dans la littérature. Cependant ce fixateur contient du mercure (HgCl<sub>2</sub>) et son utilisation n'est pas recommandable pour des raisons de sécurité et environnementales. Un laboratoire l'utilisant en routine a décidé de mener

une étude comparative pour trouver un fixateur de remplacement<sup>45</sup>. Des solutions dérivées du B5 sans mercure sont testées (mélange de zinc, formaldéhyde, chlorure, acide acétique) ainsi qu'un fixateur à base d'alcool et un fixateur déjà sous forme de solution de travail, l'AZF (acid zinc formalin). Les caractéristiques cellulaires de divers échantillons sont testées, avec ou sans décalcification. L'AZF obtient les meilleurs résultats parmi les nouveaux fixateurs testés, mais le B5 reste en tête de liste. Cependant la facilité d'utilisation de l'AZF par rapport au B5 est un avantage majeur. Les protocoles d'hybridation *in situ*, de PCR et d'IHC du laboratoire ont été validés avec ce fixateur. Des difficultés sont rencontrées avec les marqueurs nucléaires, toutefois ce laboratoire utilise des décalcifiants rapides acides dont le RDO, qui sont plus probablement à l'origine de ces difficultés que le fixateur AZF. Le formol ne fait pas partie des fixateurs testés dans cette étude, mais la possibilité d'immerger deux heures des prélèvements fixés préalablement au formol est évoquée, cela permettrait d'améliorer les détails cellulaires des coupes histologiques. L'AZF est retrouvé dans le « Hammersmith Protocol » publié en 2006 évoqué précédemment (2.2), aucune difficulté en IHC avec des marqueurs nucléaires n'est spécifiée.

Concernant le B5, des limites de ses avantages sont évoquées dans une étude de 2015<sup>46</sup> travaillant sur des blocs de paraffine de biopsie de moelle osseuse archivés. Une impossibilité de réaliser des techniques de PCR sur les prélèvements archivés ayant été fixés par le B5 est constatée alors que ceux fixés par le formol fournissent des résultats satisfaisants. Avec la fréquence d'utilisation de ces nouvelles méthodes, cette constatation n'est pas sans importance. Concernant l'hybridation *in situ*, le groupe de recherche de MIRANDA et al. (1994) ne relève pas de différence entre les résultats des biopsies de moelle osseuse fixées par le formol ou le B5<sup>47</sup>.

Dans certaines études, la solution de décalcification contient en plus un agent fixateur. Une étape de fixation préalable est parfois tout de même réalisée. Des résultats satisfaisants semblent être constatés.<sup>25,27</sup> Toute fois une perte des détails cellulaires et des défauts de décalcification sont rapportés avec le produit Formical – 4 (Decal Chemical Corporation, Tallman, NY), mélange de formaldéhyde, d'EDTA et d'acide formique, utilisé sans fixation préalable dans l'étude de MA et al.<sup>33</sup>,. Des résultats peu optimaux en IHC (marqueur CD68) et avec la coloration enzymatique TRAP sont également constatés avec ce mélange décalcifiant-fixateur.

La perfusion terminale des animaux, suivie d'une immersion dans un fixateur est aussi décrite. Elle est retrouvée par exemple dans l'étude de DOS SANTOS NEVES et al. (2011) où les rats sont anesthésiés puis perfusés avec une solution de paraformaldéhyde 2%, glutaraldéhyde 0,25% et acide picrique 0,1%, puis les prélèvements de mandibules sont immergés dans la même solution deux fois plus concentrée pendant vingt quatre heures. Une solution proche en composition avec ou sans acide picrique est utilisée sur les singes de l'équipe de MADEN et al. (1997)<sup>43</sup>. Enfin KEITHLEY et al. (2000)<sup>37</sup> utilisent également cette technique sur des cochons d'inde avec une solution de paraformaldéhyde 4%. Des perfusions de

fixateur post mortem sur cadavres humains sont aussi rapportées.<sup>36</sup> Le paraformaldéhyde 4% est aussi un agent fixateur utilisé seul<sup>42</sup>.

Dans le cadre de l'étude du tissu calcifié de la dent, l'injection, sans pression de formol 10% par le canal de la racine pour faciliter la diffusion de celui-ci est évoquée.

Il est important de noter que parmi la diversité des associations entre fixateurs et décalcifiants, une association entre une fixation par le paraformaldéhyde suivi d'une décalcification par un décalcifiant à base d'acide chlorhydrique, doit nécessiter une étape de rinçage approfondie. Un composé carcinogène, le bis-chlorométhyle éther peut en effet se former par une réaction entre ces deux substances.<sup>20</sup>

Par ailleurs, l'ICSH, dont les recommandations vont être abordées dans le paragraphe suivant, rappelle également que l'acide picrique est une substance pouvant être explosive.

## **2.6 Recommandations établies par l'« International Council for Standardization in haematology »<sup>48</sup>**

« *International Council for Standardization in haematology* » a publié des recommandations dans l'*International Journal of Laboratory Hematology* en 2015, concernant l'immunohistochimie de la moelle osseuse. Il est reconnu que plusieurs protocoles sont possibles. Les différents agents de fixation, de décalcification et le temps de décalcification varient selon les laboratoires. Concernant l'ensemble du protocole, les auteurs reconnaissent qu'une standardisation n'est pas encore possible. Leurs recommandations sont établies à partir de l'étude rétrospective des articles publiés dans la littérature et de consensus d'experts. Devant la diversité des résultats présentés au cours des parties précédente, il paraît intéressant de conclure cette partie par la présentation de cette publication.

Il est rappelé que les prélèvements doivent être immergés dans une solution de fixation le plus rapidement possible après prélèvement. Pour permettre une bonne diffusion des agents de fixation et de décalcification, la présence de sang doit être minimisée. En cas de transport ou d'impossibilité de fixation immédiate, des solutions salines, de PBS ou de RPMI peuvent être utilisées pour éviter la déshydratation du prélèvement.

Une fixation par une solution de formol tamponnée à 10%, sur une période de six à soixante douze heures reste la recommandation de choix. La solution AZF (Glacial acetic acid, <1%; formaldehyde, 5.6% zinc chloride, 3%) sur deux à soixante douze heures peut également être utilisée.

Il est recommandé de ne pas combiner les solutions de fixation et de décalcification si une étape de fixation n'a pas été précédemment réalisée par l'AZF ou le formol.

Trois types de décalcifiants sont présentés :

- A base d'EDTA 14% pour le protocole standard (précédé d'une fixation au formol 10%), le temps de décalcification conseillé est entre 6 et 24 heures.
- A base de 10% d'acide formique et de 5 % de formaldéhyde (appelée « *Gooding and Stewart's decalcification fluid* ») pour le protocole dit « *Hammersmith protocol* », avec un temps de décalcification de six heures.
- A base d'une solution « *Shandon™ TBD-1™ Decalcifier* » pour un protocole rapide, avec un temps de décalcification entre trente et quarante minutes.

Ces recommandations sont résumées dans le tableau ci-dessous. Il est précisé qu'en cas d'absence de prélèvements supplémentaires disponibles pour l'étude de la morphologie alors des protocoles plus courts ne doivent pas être envisagés.

**Tableau 7 : Protocoles recommandés par l'ICSH pour la fixation et décalcification de la moelle osseuse**

Table 1. Recommended protocols for bone marrow (BM) fixation and decalcification					
Turnaround time (TAT)*	Fixative	Fixation time	Decalcification	Decal time	Comments
Very short TAT	Acetic acid-zinc-formalin (AZF)	2-72 h†	Shandon™ TBD-1™ Decalcifier	30-40 min†	Whenever possible, longer fixation (within the range) is preferred
Intermediate TAT	AZF	Overnight	Gooding and Stewart's decalcification fluid (10% formic acid and 5% formaldehyde)‡	6 h	So-called 'Hammersmith Protocol'
Standard TAT	10% buffered formalin = 3.7% formaldehyde	8-72 h (overnight fixation is preferred)†	14% EDTA	16-24 h†	Preferred protocol for BM biopsy fixation and decalcification

Qu'il s'agisse de la phase de fixation ou de décalcification, une agitation et un placement des prélèvements à l'étuve (37°C) améliorent la rapidité de ces étapes. Il est conseillé de les envisager systématiquement.

La mise en bloc peut se faire avec de la paraffine ou des résines plastiques, des résultats similaires, voire parfois de meilleurs qualités sont obtenus après utilisation de résines plastique. Toutefois leur utilisation nécessite une habitude des opérateurs et ne peut pas encore être automatisée, de ce fait la paraffine reste pour l'instant recommandée en premier choix.

Les lames obtenues après la coupe des blocs de paraffine doivent être rapidement colorées. Une conservation à -80°C dans de l'aluminium est recommandée pour mieux conserver les sites antigéniques.

## BILAN DE LA PARTIE I

Tout d'abord, concernant le choix du décalcifiant, il peut être noté d'après le partie **2.2**, que les résultats publiés dans la littérature scientifique ne s'accordent pas toujours. L'EDTA apparaît tout de même, de par son mode d'action et les résultats évoqués, être un décalcifiant permettant de bien conserver les caractéristiques microscopiques des cellules de la moelle osseuse. De plus dans les études s'intéressant aux résultats en immunohistochimie (partie **2.3**) après décalcification, celui-ci apparaît être parmi ceux les plus adaptés pour conserver les sites antigéniques, en particulier dans l'étude de VELOT et al. qui est réalisée sur un modèle proche de celui du projet de recherche (os longs de rongeurs). L'EDTA fait également parti des recommandations de l'ICSH. Sur ces critères, l'EDTA a donc été choisi comme décalcifiant pour le projet expérimental. Son principal inconvénient réside dans la durée nécessaire à la décalcification, qui reste supérieure à celle des autres décalcifiants, et qui peut être un frein à son utilisation, notamment lors de travail sur des structures osseuses de taille et de densité importantes. Pour les os canins, il est donc envisagé des alternatives.

Concernant les méthodes permettant d'accélérer la vitesse de la décalcification, évoquées dans la partie **2.4**, l'augmentation de la température est retenue, pour des raisons de simplicité. Malgré les résultats encourageants des publications concernant l'utilisation d'un four à microonde, la calibration du matériel et la surveillance nécessaire lors de ce procédé font qu'elle n'a pas été envisagée en première intention pour ce projet expérimental. La décalcification électrolytique avec un appareil prêt à l'emploi est essayée en alternative à l'EDTA, en particulier en raison des résultats encourageants en immunohistochimie de l'équipe de LOYSSON et al., cités précédemment (partie **2.2**), dont les marqueurs utilisés sont proches de ceux du projet expérimental, et aussi en raison de l'accès facile à cet équipement. Enfin l'agitation de la solution est testée sur les prélèvements canins.

Pour le suivi de la réaction, la méthode du test à l'aiguille fine est retenue, en raison de l'accès impossible à un équipement radiographique et de l'indisponibilité des réactifs de la méthode chimique. Cependant ces méthodes auraient été envisagées en cas de résultats non satisfaisants.

Enfin comme il l'a déjà été expliqué, le choix du fixateur a été effectué en fonction de l'habitude du laboratoire où le projet a été réalisé et également parce qu'il est recommandé par l'ICSH.



## Partie II : Etude expérimentale

### Introduction :

Le travail réalisé dans cette thèse s'intègre dans plusieurs projets de recherche de l'unité STROMAab, avec des enjeux importants pour la caractérisation des CSM natives issues de la moelle osseuse. Les principales limitations viennent des contraintes techniques spécifiques inhérentes à l'os, tissu dur minéralisé qui ne peut pas être traité au plan de l'histologie comme les autres tissus.

Les objectifs de ce travail de recherche expérimental sont (voir page suivante) :

- D'une part établir un protocole optimal de décalcification sur des os de différentes espèces (souris, homme et chien). Ce protocole optimal de décalcification est particulièrement important pour trois projets de recherche en cours dans l'unité STROMALab et impliquant le LabHPEC : le projet d'étude et de caractérisation des CSM natives de l'os (responsable Dr. F. Deschaseaux), le projet de mise au point d'un modèle organotypique dans la pathologie du myélome Multiple (responsable Dr. N. Espagnol), et le projet ANR ASC-PARO d'utilisation thérapeutique d'ASC dans la parodontite (Responsable Pr. P. Kemoun).
- D'autre part, la validation de protocoles d'IHC pour ces différents projets de recherche, permettant d'identifier les CSM natives de la moelle osseuse chez la souris et chez l'homme

L'EDTA apparait dans de nombreuses études comme étant un agent de décalcification de choix pour la conservation des épitopes antigéniques<sup>13,20,32-34,36-38</sup> et la conservation de la morphologie des cellules<sup>20,26,31,32,34</sup>. Pour l'ensemble des raisons évoquées au cours du paragraphe précédent (Bilan de la partie I), l'EDTA est donc choisi pour décalcifier les prélèvements de cette étude expérimentale. La conservation de différents épitopes antigéniques devra être vérifiée après son utilisation.

Deux alternatives à l'EDTA seront considérées en parallèle :

- L'étude bibliographique<sup>13</sup> a montré la possibilité d'obtenir des résultats satisfaisants en utilisant la technique de décalcification électrolytique. Cela a donc été la première alternative considérée.
- Le plateau d'histologie de l'US006-CREFRE de Toulouse rapporte également une réduction importante du temps de décalcification tout en obtenant *a priori* des coupes histologiques de qualité très satisfaisante, et nous permet d'avoir accès à cet équipement
- Des solutions commerciales existent également dans le double but d'obtenir une décalcification satisfaisante, en préservant la réactivité pour l'IHC. L'OSTEOSOFT<sup>ND</sup>, met en avant l'obtention d'une décalcification sur un temps

raisonnable, tout en conservant les caractéristiques morphologiques et IHC des prélèvements. Cette solution a été la seconde alternative à l'EDTA considérée dans ce projet, et elle a été testée sur les prélèvements canins.

La fixation par une solution de formol tamponné 10% reste la recommandation de choix de l'International Council for Standardization in haematology. Elle est utilisée pour fixer tous les prélèvements de cette étude. C'est le seul fixateur avec lequel les protocoles d'IHC du laboratoire sont validés.

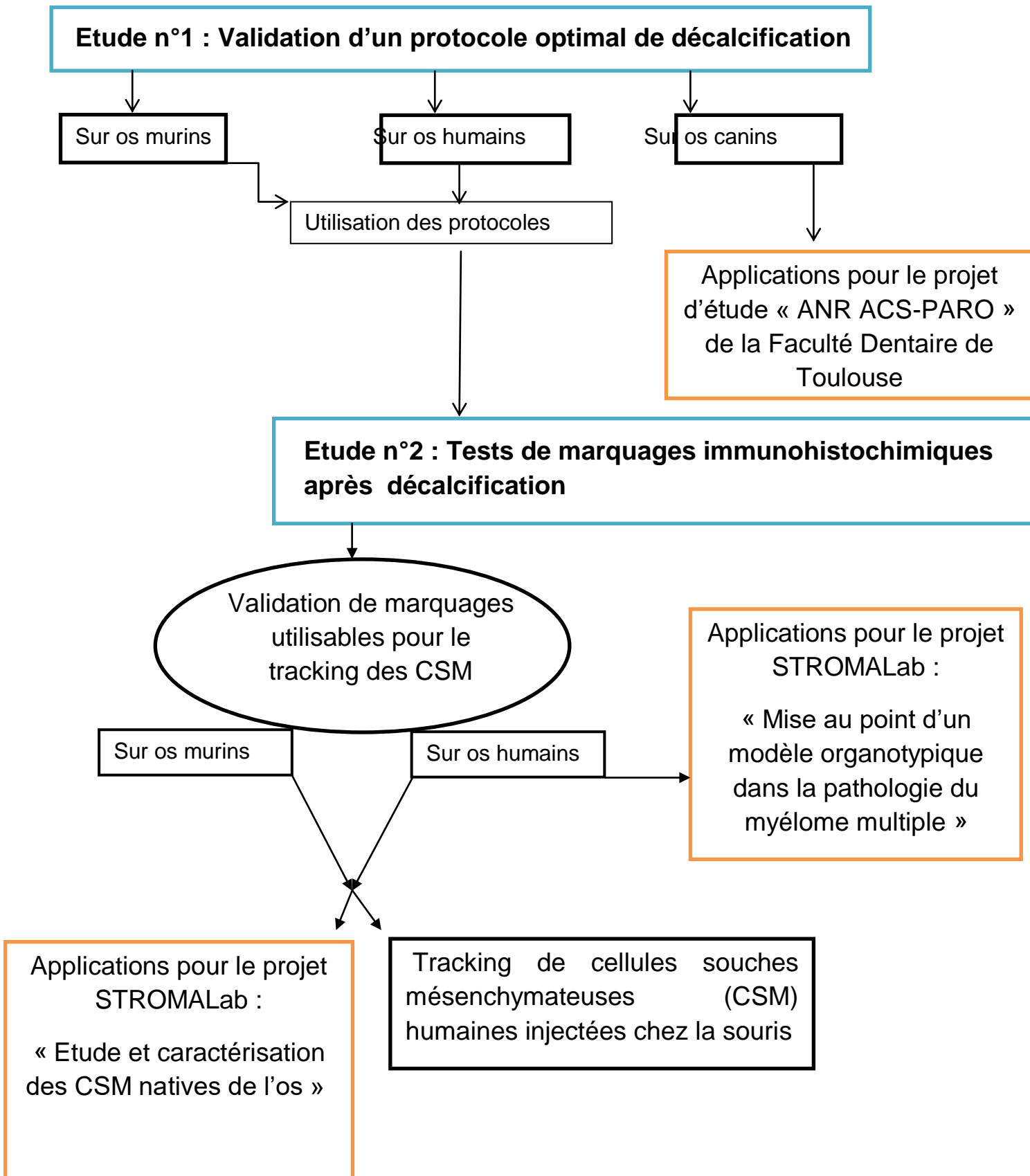
Le projet expérimental est organisé en deux études avec des objectifs distincts successifs.

- La première étude a pour but de définir dans un premier temps des protocoles de décalcification sur trois types de prélèvements : murins, humains et canins. L'EDTA et la décalcification électrolytique sont évalués sur os murins et humains. L'EDTA et l'OSTEOSOFT<sup>ND</sup> sont essayés sur os canins.
- L'objectif de la seconde étude est de tester, dans un deuxième temps, différents marquages immunohistochimiques, sur des prélèvements d'os murins et humains, fixés et décalcifiés selon le protocole validé dans la première étude.

Dans cette seconde étude nous comparerons aussi les résultats de l'IHC sur os murins, après une décalcification électrolytique et une décalcification par l'EDTA. Pour la validation des marqueurs d'IHC, des CSM humaines seront administrées en *intra* tibial à quelques souris NUDE, afin d'appliquer l'ensemble des protocoles validés à la détection des cellules injectées dans les os de souris.

Enfin, au cours de cette seconde étude, il est également évalué l'impact de la solution de décalcification d'EDTA 10% sur la conservation des épitopes antigéniques des cellules de tissus mous murins.

## Présentation du projet



# 1. Matériel et méthode

## 1.1 Etude n°1 Validation d'un protocole optimal de décalcification

### 1.1.1 Etude sur os murins

#### ***Evaluation de l'impact de la durée de fixation par le formol et du temps de décalcification par l'EDTA sur la qualité histologique des os de souris***

Cette étude compare dans un premier temps, deux durées de fixation différentes, vingt quatre heures et quarante huit heures, l'agent de fixation utilisé est une solution de formol 10% tamponnée à la neutralité

Le temps de décalcification optimal par l'EDTA 10% adapté aux os de fémurs et tibias murins en immersion est ensuite recherché. Les résultats des coupes histologiques seront comparés à ceux obtenus lors d'une étude préalable au projet de thèse réalisée au sein du laboratoire de l'ENVT.

#### *Animaux et prélèvements:*

Conformément à la règle des trois R (réduire, raffiner, remplacer) de l'expérimentation animale, et pour des raisons éthiques évidente, les prélèvements utilisés dans ce travail expérimental proviennent de souris sacrifiées dans le cadre d'autres études de l'unité STROMALab pour lesquelles les os des membres n'étaient pas utilisés. Ils nous ont permis d'accéder à ces échantillons biologiques sans l'utilisation d'animaux supplémentaires. Les fémurs et tibias de sept souris NUDE sont prélevés *post mortem*, dans l'heure suivant leur euthanasie au laboratoire STROMALab de Toulouse. Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. La peau en regard des membres postérieurs est incisée et retirée. L'articulation coxo-fémorale est repérée par taxis, puis dégagée par dissection des muscles. Le fémur est alors désarticulé par mouvements de rotation. Le tibia et le fémur sont séparés après l'incision du ligament patellaire. L'extrémité distale du tibia est libérée par mouvements de rotation, la fibula n'est pas conservée en raison de sa fragmentation fréquente. Les muscles restant attachés aux structures osseuses sont disséqués à l'aide d'une pince et de ciseaux, puis la surface osseuse est nettoyée avec du papier absorbant. Les os sont ensuite immédiatement placés par paires tibia-fémur dans une solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité, dans des cassettes d'histologie identifiées selon le code du laboratoire, comme cela est présenté sur la **Figure 9** page 51.

## Groupes d'études

Sept groupes sont constitués, chaque groupe réunissant deux fémurs et deux tibias provenant du même animal.

Les cassettes des six premiers groupes sont laissées dans la solution de fixation pendant quarante huit heures, puis elles sont immergées dans une solution d'EDTA 10%, pH 7,6 (composition en Annexe 1 : PBS, eau distillée et EDTA disodium salt RPE-for analysis-ACS, CARLO ERBA) à l'étuve à 37°C (pots de 80 mL, cinq à six cassettes par pot) pendant des temps variant de deux à sept jours. La solution d'EDTA 10% est renouvelée tous les deux jours.

Les cassettes du dernier groupe sont laissées vingt quatre heures dans le formol puis placées dans une solution d'EDTA 10%, pH 7,6 à l'étuve (37°C) pendant quarante huit heures. (**Tableau 8**)

Tableau 8 : Récapitulatif des groupes (deux tibias et deux fémurs par groupe) constitués pour l'étude n°1

28 os	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6	Groupe 7
Temps Formol	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	24 heures
Temps EDTA	48 heures	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours	7 jours	48 heures

## Déshydratation et mise en paraffine

Après décalcification, les os sont disposés dans des cassettes individuelles (les couples fémur/tibia sont donc séparés) puis déshydratés dans un automate d'imprégnation, le protocole de l'automate est présenté en annexe n°2. Les prélèvements sont ensuite inclus dans de la paraffine manuellement. Une fois les blocs de paraffine réalisés, ils sont conservés en attente de la coupe. La coupe est réalisée les deux jours précédant les tests immunohistochimiques, et tous les blocs sont découpés en même temps. Il est réalisé des coupes longitudinales, l'os est positionné comme sur la figure 10.

## Immunohistochimie (IHC), anticorps Ki-67

Pour évaluer la conservation des épitopes (ou sites antigéniques), une lame (3µm d'épaisseur) par fémur est ensuite coupée longitudinalement au microtome et un marquage par l'anticorps Ki-67 (clone Sp6, référence RM-9106-S ; Thermo-Scientific) est réalisé. Le protocole général utilisé pour l'immunohistochimie est détaillé à l'annexe n°3. Les protocoles spécifiques à chaque anticorps sont présentés à l'annexe n°4.

Une photographie de chaque lame est réalisée grâce à un microscope équipé de caméra numérique (Nikon DSFi1 ; logiciel d'acquisition d'image NIS – Element D 4.20.00 64-bit). La zone photographiée est une zone représentative de la lame concernée. La facilité de coupe au microtome des structures osseuses est renseignée par les techniciennes. La qualité générale des tissus est évaluée au plan histologique. La netteté du marquage et sa localisation nucléaire stricte sont évaluées.

### *Etude préalable*

Une étude préalable a été réalisée six mois avant le début du projet. Selon le même protocole que celui présenté ci-dessus avec une fixation au formol de quarante huit heures, des os de fémurs de souris ont été décalcifiés par immersion dans l'EDTA, à l'étuve 37°C, pendant un temps variant de un à six jours. L'anticorps Ki-67 a été appliqué sur les lames obtenues et celles-ci ont été conservées à température ambiante. Afin d'évaluer si le protocole est répétable, nos résultats seront comparés à ceux obtenus lors de cette étude préalable.

### ***Evaluation de l'impact de la décalcification électrolytique sur la qualité histologique des os de souris***

L'équipement du plateau d'histologie de l'INSERM (Service d'histopathologie US006 CREFRE) est utilisé pour tester la décalcification électrolytique. Les prélèvements sont placés en cassette dans la cuve d'un automate dédié (SAKURA TDE 30) où ils sont immergés dans une solution de décalcification (Solution TDE 30 ; composition non précisée par le laboratoire). Des électrodes sont disposées à chaque extrémité du bac de solution (**Figure 10**). Le dispositif s'actionne à l'aide d'un interrupteur.

Les fémurs et tibias de trois souris sont prélevés dans l'heure suivant l'euthanasie. Ils sont fixés dans le formol pendant trente six heures, puis conservés dans du PBS pendant trois jours en attendant l'accès à l'équipement.

Les six os murins sont transportés au plateau d'histologie de l'INSERM. Ils sont placés dix minutes dans la solution TDE 30 afin qu'elle se répartisse autour des prélèvements. Pour cette étape le laboratoire utilise une solution TDE 30 déjà utilisée pour d'autres expériences. Les cassettes sont ensuite immergées dans une solution neuve pour l'étape de décalcification électrolytique dans l'appareil SAKURA TDE 30. L'appareil est mis en marche pendant quarante cinq minutes (temps choisi d'après l'expérience des techniciennes du plateau d'histologie de l'INSERM) puis les cassettes sont rincées à l'eau pendant trente minutes.

Les os murins décalcifiés au SAKURA sont disposés dans des cassettes individuelles. Ils sont rapportés à l'ENVT où ils suivront le même procédé de déshydratation, d'imprégnation et d'enrobage que celui des études précédentes.



**Figure 9 :** Cassette contenant un fémur (à gauche) et un tibia (à droite) de souris



**Figure 10 :** SAKURA TDE 30 du laboratoire INSERM de Toulouse (photographie réalisée au cours de la procédure de décalcification électrolytique)

### **1.1.2 Etude sur os humains**

Les prélèvements osseux proviennent de patients (Service orthopédique du CHU de Toulouse Purpan) ayant donné leur consentement pour l'utilisation des reliquats opératoires lors d'une exérèse de la tête fémorale suite à une fracture du col du fémur. Ces fragments issus de têtes fémorales sont fournis au laboratoire de l'ENVT dans le cadre d'un projet de recherche du Dr. N. ESPAGNOLLE, sur la mise au point d'un modèle organotypique pour l'étude du myélome multiple. Certains de ces prélèvements sont mis en culture avant fixation, et parmi ceux-ci des cellules de myélome multiple (MOLP-6) sont parfois ajoutées. Les fragments utilisés pour l'étude d'IHC n'ont pas été mis en culture avec des cellules de myélome. Ils sont de petites tailles (environ 0,5cm<sup>3</sup>)

A leur arrivée au laboratoire de l'ENVT les prélèvements sont fixés pendant trente six à quarante huit heures dans une solution de formol 10% tamponnée à la neutralité, puis décalcifiés.

Un seul des prélèvements a été séparé en deux morceaux. Le premier est décalcifié par l'EDTA et le second est soumis à une décalcification électrolytique. Les résultats obtenus permettent une étude comparée des deux procédés de décalcification. La décalcification électrolytique est effectuée selon le même protocole que dans l'étude précédente.

La déshydratation et l'enrobage se font selon une procédure identique à celle des études n°1 et n°2. Des coupes histologiques colorées à l'émalun éosine sont effectuées afin d'évaluer la qualité des tissus.

Une photographie de chaque lame est réalisée grâce à un microscope équipé de caméra numérique (Nikon DSFi1 ; logiciel d'acquisition d'image NIS – Element D 4.20.00 64-bit).

### **1.1.3 Etude sur os canins**

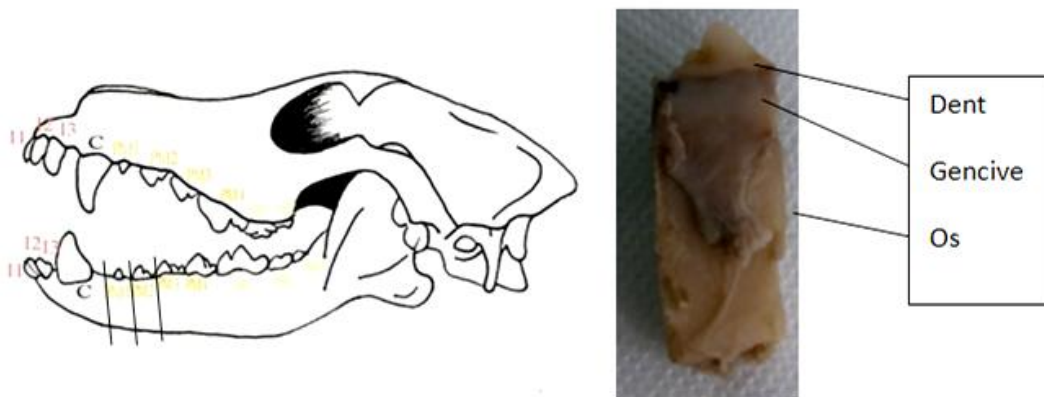
#### ***Première approche***

##### *Animaux et prélèvements*

Des mâchoires inférieures de chiens sont prélevées à l'ENVT lors d'autopsies pédagogiques (avec accord des propriétaires). Trois chiens respectivement de race Boxer (onze ans), Berger allemand (huit ans) et Cavalier King Charles (treize ans) sont prélevés en première intention. Des sections de mâchoires et mandibules sont réalisées à la scie oscillante de part et d'autre d'une prémolaire, à gauche et à droite de manière symétrique sur chaque animal. Les sections sont donc constituées d'une dent, de la gencive et de son os mandibulaire sous-jacent. Les prélèvements mesurent environ 6 cm<sup>3</sup>. (**Figure 11**)

### Fixation et décalcification

Les prélèvements sont fixés par une solution de formol 10% tamponnée à la neutralité pendant quarante huit heures. La décalcification est réalisée par immersion des prélèvements dans une solution d'EDTA 10% pH 7,4, à l'étuve (37°C). Des contrôles à l'aiguille fine sont réalisés. La solution de décalcification est changée toutes les vingt quatre heures.



1. Schéma de mâchoire de chien, les lignes représentent les axes de coupe réalisés (prélèvement de la prémolaire 1 ou 2, de manière symétrique à gauche et à droite)
2. Photographie d'une des sections obtenues

Figure 11 : Prélèvement d'os canins : zones de découpes et sections obtenues

### Seconde approche

Pour cette seconde approche, il est décidé de travailler sur des prélèvements de volumes plus réduits. Pour cela deux sections (os mandibulaire-gencive-dent) sont prélevées sur un chien Basset Hound femelle (10 ans) à l'ENVT lors d'autopsies pédagogiques (avec accord du propriétaire) selon la même procédure que pour la première approche. Elles sont fixées au formol, puis des tranches de 3 mm d'épaisseur sont découpées sur les sections prélevées (**Figure12**).

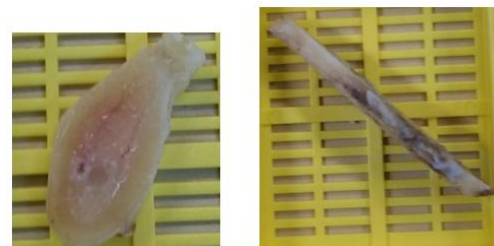


Figure 12 : Tranches découpées pour la seconde approche (face à gauche, profil à droite)

Pour cela, un appareil (Precision Diamond Wire Saw 3241 Well) pouvant découper des sections fines grâce à un fil diamanté est utilisé sur la plateforme de recherche de la Faculté Dentaire de Toulouse (**Figure 13**). Il était auparavant utilisé pour couper des implants en titane et il permet donc une découpe de prélèvements denses. Le fil diamanté est mis en action par un système de rotation alternée de deux poulies, l'une (en haut) permettant un mouvement alternatif et entraînant le fil, l'autre (en bas) réalisant la mise en tension du fil. La lubrification et le refroidissement

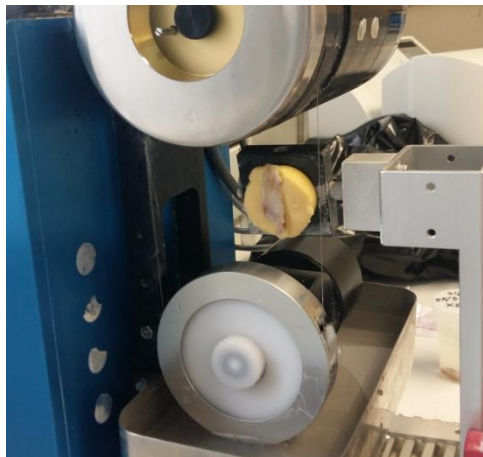


du fil sont réalisés grâce à un bac d'eau (immersion de 3mm de la partie inférieure de la poulie située en bas).

L'avancement du fil diamanté au cours de la découpe se fait par la gravité. Il est possible de régler la section de coupe avec une précision de 0,1mm. Le système de fixation du prélèvement est situé latéralement au fil.

Pour améliorer la phase ultérieure de décalcification, l'émail de la dent est retiré à l'aide d'une fraiseuse, sans abimer la gencive. Le prélèvement est ensuite inclus dans une résine appelée IVOLEN, utilisée en prothèses dentaires, afin de pouvoir être rattaché au système de fixation (ou porte objet) et être découpé dans sa longueur.

Le fil est positionné sur la surface externe du prélèvement puis décalé du nombre de mm souhaité pour régler l'épaisseur de la tranche. L'appareil est ensuite actionné et le fil progresse d'arrière en avant. Il permet une découpe du prélèvement en environ une minute.



**Figure 13 : Appareil Precision Diamond Wire Saw 3241 Well**

**Le prélèvement, inclus dans la résine et rattaché au système de fixation, est observé entre les deux poulies**

Deux tranches de 3 mm d'épaisseur par pièce prélevée sont effectuées. Les quatre tranches obtenues sont ensuite décalcifiées.

Deux tranches sont immergées dans l'EDTA 10% et placées à l'étuve (37°C) avec renouvellement de la solution toutes les quarante huit heures jusqu'à présenter un ramollissement satisfaisant.

La décalcification électrolytique est étudiée sur les deux autres tranches, la procédure est la même que pour les études n°1 et n°2, excepté le temps de décalcification qui est prolongé à quatre heures.

### Troisième approche

#### Principe

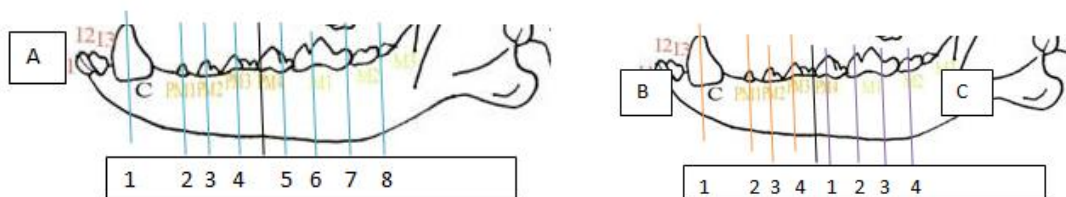
Pour cette dernière approche, il est décidé de comparer l'EDTA et un décalcifiant du commerce l'OSTEOSOFT<sup>ND</sup> (à base d'EDTA, composition complète non accessible, TITRIPAC, réf 101728), concernant le temps de décalcification et la qualité des résultats obtenus. De nouvelles tranches fines sont réalisées (cf *infra*).

Elles sont immergées soit dans une solution d'EDTA 10% pH 7,4 à l'étuve 37°C, soit dans l'OSTEOSOFT<sup>ND</sup> sous agitation magnétique à température ambiante. Les changements de la solution d'EDTA sont réalisés tous les deux ou quatre jours afin d'observer l'impact de la fréquence de changement de la solution sur la vitesse de décalcification. La solution OSTEOSOFT<sup>ND</sup> est changée toutes les quarante huit heures.

#### Répartition des prélèvements

La mâchoire inférieure d'un chien d'autopsie de race Boxer (quinze ans) est prélevée pour ce protocole. La mâchoire est découpée à la scie oscillante en quatre morceaux et fixée quarante huit heures dans une solution de formol 10% tamponnée à la neutralité (un morceau par pot de 60mL). Les morceaux fixés sont ensuite transférés dans du PBS au réfrigérateur 4°C pendant sept jours, en attente de découpe au fil diamanté.

Huit tranches identifiées sont réalisées selon le schéma de la **Figure 14** présentée ci-dessous :



**Figure 14 : Schéma de coupe des tranches à décalcifier (traits colorés : coupe avec le fil diamanté; traits noirs : coupe à la scie oscillante)**

La majorité de la surface des tranches est composée d'os, de gencive et de dent, certaines tranches contiennent uniquement de l'os mandibulaire et de la gencive. La taille des prélèvements est légèrement variable en fonction de sa localisation rostrale ou caudale. Afin de ne pas biaiser les temps de décalcification avec ces facteurs de variation, les prélèvements sont répartis équitablement entre les différentes procédures, des prélèvements de composition et structure comparables sont disposés dans chaque pot (**Tableau 9**).

**Tableau 9 : Répartitions des tranches réalisées sur la Figure 16 entre les différentes procédures de décalcification**

POT 1	POT 2	POT 3	POT 4
- Protocole <b>EDTA</b> - Changement de solution tous les <b>deux jours</b>	- Protocole <b>EDTA</b> - Changement de solution tous les <b>deux jours</b>	- Protocole <b>EDTA</b> - Changement de solution tous les <b>quatre jours</b>	- Protocole <b>OSTEOSOFT<sup>ND</sup></b> - Changement de solution tous les <b>deux jours</b>
Prélèvements : A 1 ; A 2 ; A 5 ; A 6	Prélèvements : A 3 ; A 4 ; A 7 ; A 8	Prélèvements : B 2 ; B 4 ; C 2 ; C4	Prélèvements : B 1 ; B 3 ; C 1 ; C 3

L'évolution de la décalcification des prélèvements est suivie à l'aiguille fine. Des pressions en différents points du prélèvement sont réalisées pour en évaluer la dureté. Lorsqu'un ramollissement estimé suffisant est constaté, un prélèvement par pot est déshydraté, enrobé dans de la paraffine et testé à la coupe tous les quinze jours.

## **1.2 Etude n°2 : Tests de marquages immunohistochimiques après décalcification**

### **1.2.1 Etude sur os murins**

#### **1.2.1.1 Tests de marquage immunohistochimiques**

##### *Animaux et prélèvements*

Les fémurs et tibias de sept souris NUDE sont prélevés *post mortem*, selon la même procédure que pour l'étude n°1. Les animaux prélevés proviennent également de projets d'études de STROMALab. Les os sont ensuite fixés pendant quarante huit heures au formol 10% tamponné à la neutralité, puis décalcifiés par l'EDTA 10% pH 7,6 (pots de 80mL, cinq à six cassettes par pot, 37°C) pendant quarante huit heures. Les prélèvements sont ensuite déshydratés, imprégnés en paraffine et inclus en blocs (même procédure que pour l'étude n°1). Les blocs sont archivés en attendant la réalisation des lames. Les lames blanches sont en général dans les vingt-quatre heures précédant le marquage ou la coloration.

Un os de fémur de souris NUDE, décalcifié par décalcification électrolytique lors de l'étude n°1, est utilisé pour ces tests, afin de pouvoir comparer la qualité des marquages obtenus après décalcification électrolytique ou par l'EDTA.

Des tissus additionnels, autres que les os, d'une souris C57bl6, également utilisée dans le cadre d'une autre étude de STROMALab ont été prélevés, fixés pendant quarante-huit heures au formol à 10% tamponné à la neutralité, puis immergés dans une solution d'EDTA à 10%, pH 7,6 pendant quarante huit heures. Ces tissus permettent de tester la réactivité des anticorps choisis pour l'étude n°2, après le

protocole de fixation et décalcification validé dans l'étude n°1, sur des tissus témoins variés. Il s'agit de nœud lymphatique, thymus, muscle cardiaque et rate.

### Marqueurs immunohistochimiques

Les marqueurs immunohistochimiques testés sont présentés dans le tableau 9 ci-dessous. Pour chaque marqueur, la dilution est fixée selon les données de la littérature et l'expérience acquise au laboratoire de l'ENVT. Les lames sont déparaffinées, puis un démasquage antigénique est réalisé avec une solution tampon à haut ou bas pH pour évaluer celui le plus adapté à l'anticorps. Les lames sont ensuite exposées à l'anticorps primaire pendant une période d'incubation variable selon l'anticorps testé (celle-ci est indiquée à l'annexe n°4).

**Tableau 10 : Marqueurs testés sur os murins après décalcification**

Marqueurs	Références, spécificité (sp) et caractéristiques		Dilution	Contrôles
<b>CD34</b>	Abcam référence ab81289 sp : souris, humain...	anticorps monoclonal de lapin	1/150 <sup>eme</sup>	Tissus musculaires, cutanés et tumoraux
<b>CD45</b>	Santa Cruz référence sc53665 sp : souris.	anticorps monoclonal de rat	1/100 <sup>eme</sup>	Tissus ganglionnaires spléniques et abcès
<b>CD3</b>	AbDSerotec référence MCA1477 sp : souris, humain...	anticorps monoclonal de rat	1/100 <sup>eme</sup>	Tissus ganglionnaires
<b>αSMA</b>	Dako référence HHF35 sp : souris, humain...	anticorps monoclonal de souris	1/25 <sup>eme</sup>	Témoin intrinsèque : Fibres musculaires lisses des parois vasculaires

**Tableau 11 : Marqueurs testés sur tissus mous murins après immersion dans la solution d'EDTA**

Tissus mous	Durée d'exposition à l'EDTA 10%	Marqueurs testés
<b>Muscle cardiaque</b>	Quarante huit heures	<b>αSMA</b>
<b>Nœud lymphatique médiastinal</b>		<b>CD45, CD3, Ki-67</b>
<b>Rate</b>		<b>CD45, CD3</b>
<b>Thymus</b>		<b>CD3</b>

### Contrôles positifs et négatifs

Afin de juger de la validité des marquages obtenus, des contrôles positifs et négatifs sont nécessaires et réalisés en fonction de chaque anticorps testé.

Les contrôles positifs sont réalisés à partir de tissus de référence positifs pour les marqueurs. Ainsi en cas de marquage peu satisfaisant sur les coupes histologiques des os murins, ces contrôles permettent d'évaluer la qualité des réactifs utilisés et de vérifier qu'il n'y pas eu d'incident au cours de la procédure d'IHC. Ils sont réalisés

pour tous les marqueurs en même temps que la procédure d'IHC sur les os murins, excepté pour l' $\alpha$ SMA en raison des contrôles intrinsèques et de sa validation antérieure au laboratoire.

Les contrôles négatifs sont des lames sur lesquelles l'anticorps primaire n'est pas appliqué, ce qui permet de détecter d'éventuels artéfacts ou des réactivités non spécifiques. En cas de marquage aberrant, ces contrôles permettent d'observer s'ils sont liés à de la réactivité non spécifique et donc retrouvés également sur les lames où l'anticorps primaire n'a pas été appliqué. Des contrôles négatifs sont réalisés sur les tissus de référence et sur les os murins, le tissu contrôle est spécifié dans le **Tableau 10**. Le principe de l'utilisation des contrôles positifs et négatifs est repris par les annexes n°5 et 6. Des contrôles intrinsèques peuvent également être utilisés, notamment pour l' $\alpha$ SMA, en cas de persistance de fibres musculaires autour de l'os, celles-ci peuvent servir de témoins positifs pour le marqueur.

Une photographie de chaque lame est réalisée grâce à un microscope équipé de caméra numérique (Nikon DSFi1 ; logiciel d'acquisition d'image NIS – Element D 4.20.00 64-bit).

### 1.2.1.2 Application au tracking de CSM humaines injectées chez la souris

#### *CSM*

Les cellules souches mésenchymateuses sont obtenues à partir de cellules humaines provenant de têtes fémorales. Elles sont cultivées et amplifiées sur un milieu spécifique pendant dix jours au laboratoire STROMALab puis elles sont récupérées. Elles sont injectées sous la forme d'une suspension liquide de 10 à 15 $\mu$ L après numération au microscope optique (lecture sur hémocytomètre Malassez) afin d'en connaître la concentration.

#### *Animaux*

Afin de réaliser cette étude, six souris NUDE arrivant en fin d'étude pour un autre projet de recherche sont utilisées.

Série n°1 (**Figure 15**) : Trois premières souris NUDE reçoivent une injection unilatérale de CSM par voie *intra-tibiale* à JO le 3 décembre 2015. Les CSM injectées sont obtenues après culture sur un milieu standard FGF2. Chaque souris reçoit  $10^6$  cellules par voie intra tibiale, membre postérieur droit. Les fémurs et tibias de ces souris sont prélevés *post mortem* à J11, le 14 décembre 2015.

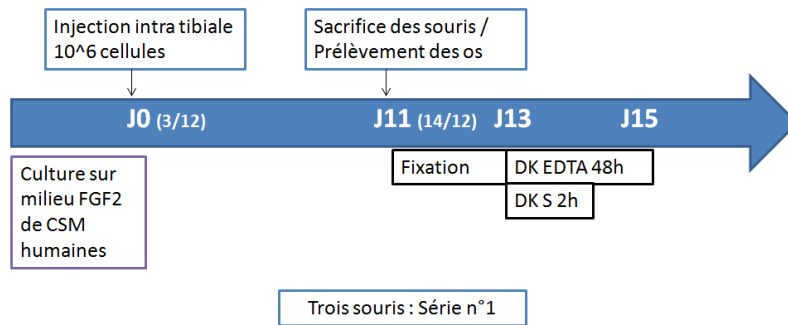


Figure 15 : Série n°1, frise chronologique des différentes étapes réalisées

Série n°2 (Figure 16) : Trois autres souris NUDE reçoivent une injection unilatérale de CSM par voie *intra-tibiale* à JO le 14 décembre 2015. Les CSM injectées sont obtenues après culture sur un milieu EGM 2, spécifique des péricytes. Chaque souris reçoit 500 000 cellules par voie intra tibiale, membre postérieur gauche. Les fémurs et tibias de ces souris sont prélevés *post mortem* à J7, le 21 décembre 2015.

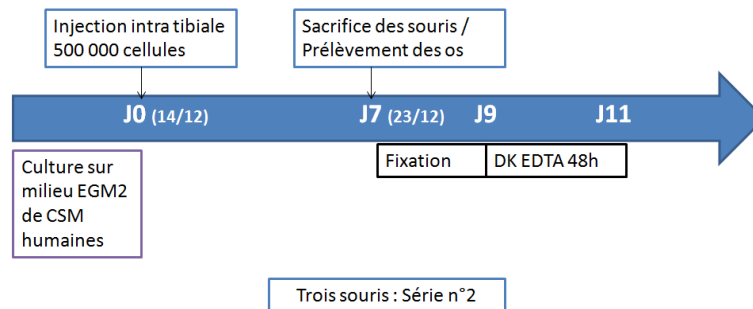
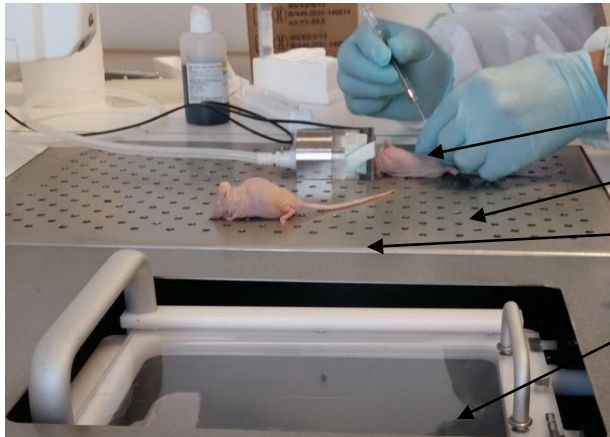


Figure 16 : Série n°2, frise chronologique des différentes étapes réalisées

#### Déroulement de l'injection intra tibiale:

L'injection est réalisée *in vivo* sous anesthésie générale. L'induction de l'anesthésie est réalisée par le gaz isoflurane, en cage, où les souris sont ensemble pour minimiser le stress. L'anesthésie est ensuite maintenue à l'isoflurane au masque durant l'injection. La procédure se déroule sur tapis chauffant afin de minimiser les effets secondaires de l'anesthésie et de permettre un réveil rapide.

La souris est placée en décubitus dorsal. La zone d'injection est désinfectée avec une solution de bétadine. Le site d'injection est repéré par taxis externe, il se situe en face crâniale du membre postérieur, juste au-dessus de l'extrémité proximale du tibia. Une incision horizontale de petite taille, (ne nécessitant pas de suture) peut être réalisée pour mieux visualiser le site. L'aiguille est ensuite introduite perpendiculairement au membre puis pivotée dans l'axe de l'os tibial et introduite progressivement plus profondément jusqu'à obtenir la mobilisation du membre lors du mouvement de celle-ci. Une seringue d'Hamilton est utilisée afin de pouvoir mesurer précisément la quantité de suspension injectée.



Zone de procédure, entretien de l'anesthésie au masque à l'isoflurane

Tapis chauffant

Zone de réveil

Cage à isoflurane (Zone d'induction)

**Figure 17 : Déroulement de l'injection intra-tibiale**

La souris est ensuite laissée sur tapis chauffant jusqu'au réveil, elle reprend directement un comportement et une démarche normale (pas de grattage, de boiterie ou de prostration en post injection).

### *Tracking des CSM injectées*

A J11 (série n°1) et J7 (série n°2), les prélèvements sont fixés immédiatement après leurs prélèvements dans une solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité pendant quarante huit heures. Ils sont identifiés par un code afin de distinguer le membre ayant reçu l'injection du membre controlatéral. Pour cinq souris, les os sont décalcifiés par immersion dans une solution d'EDTA 10% pH 7,6 pendant quarante huit heures à 37°C. Une décalcification électrolytique est réalisée sur les os de la sixième souris avec la même procédure que pour l'étude n°2.

Un marquage immunohistochimique anti-vimentine humaine est réalisé sur les coupes histologiques de tous les os décalcifiés (cf annexes) afin de marquer les cellules injectées (CSM jumaines) au sein du tissu murin.

### **1.2.2 Etude sur os humains :**

Des marqueurs immunohistochimiques sont testés sur les prélèvements décalcifiés par l'EDTA (**Tableau 12**). Pour les marqueurs déjà testés dans l'étude n°1, donnés pour réagir sur les tissus humains et murins, les résultats obtenus dans cette étude sont utilisés pour adapter le pH du tampon utilisé pour l'étape de démasquage et la dilution de l'anticorps primaire (I). Ainsi le démasquage est effectué avec une solution tampon de haut pH pour l'anticorps anti-CD34 et de bas pH pour l'anticorps anti-CD45. Pour les marqueurs non testés dans l'étude n°1, le démasquage est réalisé à différents pH et la dilution est fixée selon les données de la littérature. Il peut être noté deux anticorps anti- $\alpha$ SMA provenant de fournisseurs différents sont testés, celui utilisé dans l'étude précédente et un clone spécifique humain. L'anticorps anti-CD49a est dirigé contre des cellules de rats d'après la description du fabricant, mais son utilisation chez l'homme a montré des résultats satisfaisants sur tissus humains au cours de projet de recherche au laboratoire STROMALab.

Des contrôles positifs et négatifs sont également réalisés selon le même principe que pour les tests d'IHC réalisés sur os murins. La nature des tissus contrôles est spécifiée dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12 : Marqueurs testés pour l'étude n°2 sur os humains**

Marqueurs	Références, spécificité et caractéristiques		Dilutions Anticorps I	Contrôles positifs
<b>CD34</b>	Abcam référence ab81289 sp : humain, souris...	anticorps monoclonal de lapin	1/2000 <sup>ème</sup>	Tissus vascularisés (peau et tissus sous cutanés, muscles) humains
<b>CD200</b>	R&D référence AF 2724 sp : humain, souris...	anticorps polyclonal de chèvre	1/20 <sup>ème</sup>	Os et moelle osseuse humains
<b>αSMA</b>	Dako référence HHF35 sp : souris, humain.	anticorps monoclonal de souris	1/25 <sup>ème</sup>	Tissus musculaires humains
<b>αSMA</b>	R&D clone 1A4 référence MAB1420 sp : humain.	anticorps monoclonal de souris	1/50 <sup>ème</sup>	Tissus musculaires humains
<b>CD49a</b>	Merk Millipore référence MAB2513 sp : rat.	anticorps monoclonal de souris	1/100 <sup>ème</sup>	Tissus vascularisés (peau et tissus sous cutanés, muscles) humains
<b>PTHR1</b>	Abcam Référence ab104832 sp : humain.	anticorps monoclonal de souris	1/200 <sup>ème</sup>	Tissu rénal humain
<b>NGFR (CD271)</b>	R&D référence Mab 367 sp : humain, rat.	anticorps monoclonal de souris	1/50 <sup>ème</sup>	Tissu cérébral humain
<b>Leptine R</b>	GeneTex référence GTX 37636 sp : humain, souris...	anticorps polyclonal de lapin	1/100 <sup>ème</sup>	Tissu cérébral humain
<b>Vimentine</b>	Dako référence M0725 sp : humain.	anticorps monoclonal de souris	1/50 <sup>ème</sup>	Xénogreffe murine d'une lignée tumorale humaine
<b>CD45</b>	Santa Cruz référence sc53665 sp : souris.	anticorps monoclonal de rat	1/100 <sup>ème</sup>	Tissu ganglionnaire humain



## 2. Résultats

### 2.1 Etude n°1 Validation d'un protocole optimal de décalcification

#### 2.1.1 Etude sur os murins

##### *Evaluation de l'impact de la durée de fixation par le formol et du temps de décalcification par l'EDTA sur la qualité histologique et les marquages IHC*

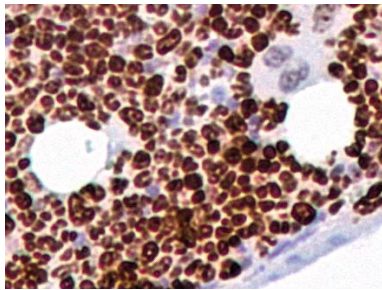


Figure 18 : Coupe histologique marquée au Ki-67 par immunohistochimie, groupe 1

L'observation au microscope de l'ensemble des lames d'immunohistochimie montre, un marquage nucléaire brun et net d'une grande majorité des cellules. Les cytoplasmes et noyaux des mégacaryocytes ne sont jamais marqués et apparaissent bleus comme on peut l'observer sur la **Figure 18** ci-contre. Les cellules endothéliales fusiformes bordant les vaisseaux sanguins apparaissent également non marquées.

La coupe histologique du groupe sept, pour lequel vingt quatre heures de fixation ont été réalisées par rapport aux autres groupes pour lesquels la durée de la phase de fixation était de quarante huit heures, montre une fixation satisfaisante et une absence de modification du marquage par rapport aux autres groupes (**Figure 19**). Les différentes coupes histologiques des six autres groupes, soumis à des temps de décalcification variant de deux à sept jours, ne semblent pas présenter de variation de la qualité et de la répartition du marquage Ki-67. Aucune diminution de l'intensité du marquage ou du nombre de cellules marquées n'est constatée entre les groupes un à six (**Figure 20**).

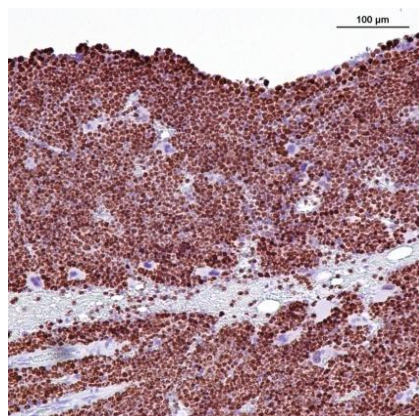


Figure 19 : Ki-67, coupe histologique du groupe n°7, vingt quatre heures de fixation, quarante huit heures de décalcification; (Photographies réalisées au grossissement x100)

Ainsi cette étude n'a pas mis en évidence de variation de la qualité du marquage immunohistochimique en fonction de la durée d'exposition à l'agent décalcifiant ou à l'agent fixateur.

Les lames d'immunohistochimie de l'étude préalable à cette thèse montrent des résultats similaires pour vingt quatre à quarante huit heures de décalcification. A ces deux cinétiques, le marquage nucléaire est de très bonne qualité. Cependant pour des cinétiques plus prolongées, après trois à six jours de décalcification, une diminution progressive du nombre de cellules marquées avait été constatée (**Figure 21**) mais n'a pas été reproduite dans cette thèse.

Le but de cette étude était d'établir un protocole standard dans le cadre du tracking de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse sur os de membres pelviens murins. Les résultats de l'étude préalable et de l'étude réalisée s'accordent sur une fixation des os des membres de souris satisfaisante dès vingt quatre heures, une décalcification à l'EDTA 10% 37°C satisfaisante dès quarante huit heures. L'étude réalisée pour cette thèse montre une conservation satisfaisante des épitopes antigéniques pour le marqueur Ki-67 après quarante huit heures d'immersion dans la solution d'EDTA 10%, pH 7,4, à l'étuve 37°C et jusqu'à sept jours. A partir des résultats obtenus et compte tenu du mode de fonctionnement du laboratoire, il est retenu le protocole figurant sur le tableau ci-dessous.

**Tableau 13 : Protocoles de décalcification établis sur os murins**

Agent fixateur	Solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité
Durée de fixation des os des membres pelviens murins	Vingt quatre à quarante huit heures
Agent de décalcification	Solution d'EDTA 10% tamponnée pH 7,6
Durée de décalcification des os des membres pelviens murins	Quarante huit heures
Conditions particulières de décalcification	Etuve à 37°C, sans changement de solution

## Résultats de l'étude de la thèse (Figure 20) et de l'étude préalable (Figure 21)

Figure 20 : Marquage Ki-67, coupes histologiques des os de souris de l'étude n°1 après une durée de décalcification variable (1. 48heures ; 2. Trois jours ; 3. Quatre jours; 4. Cinq jours; 5. Six jours et 6. Sept jours) Photographies réalisées au grossissement x100.

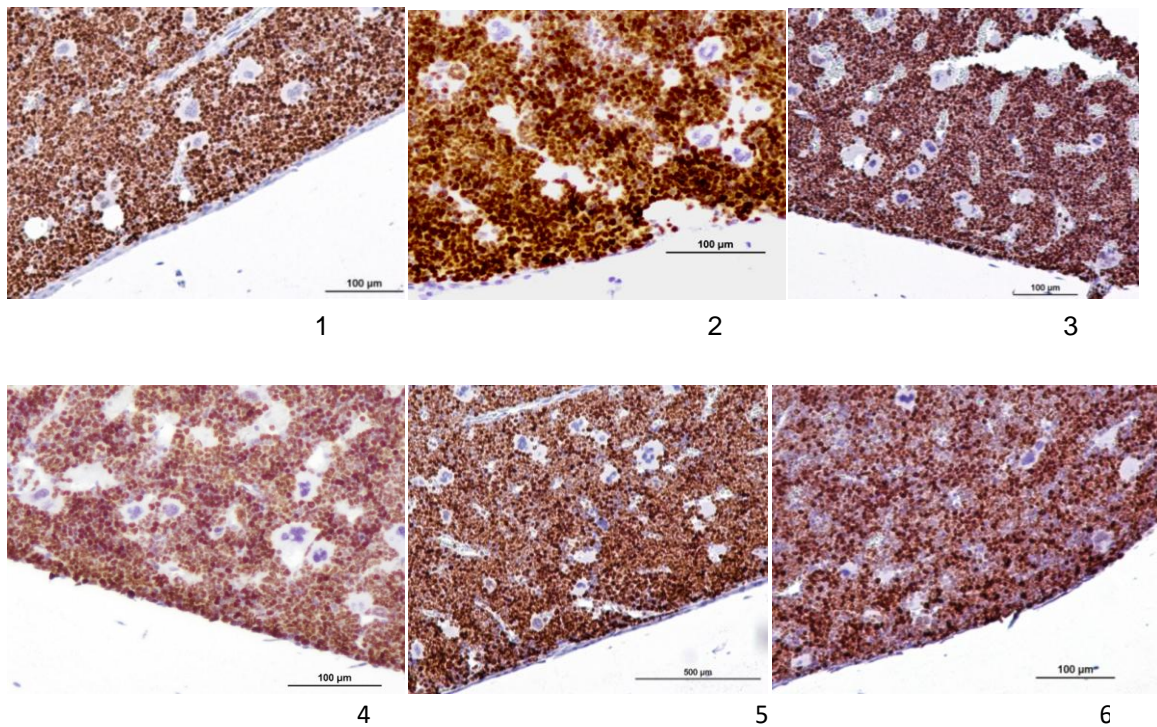
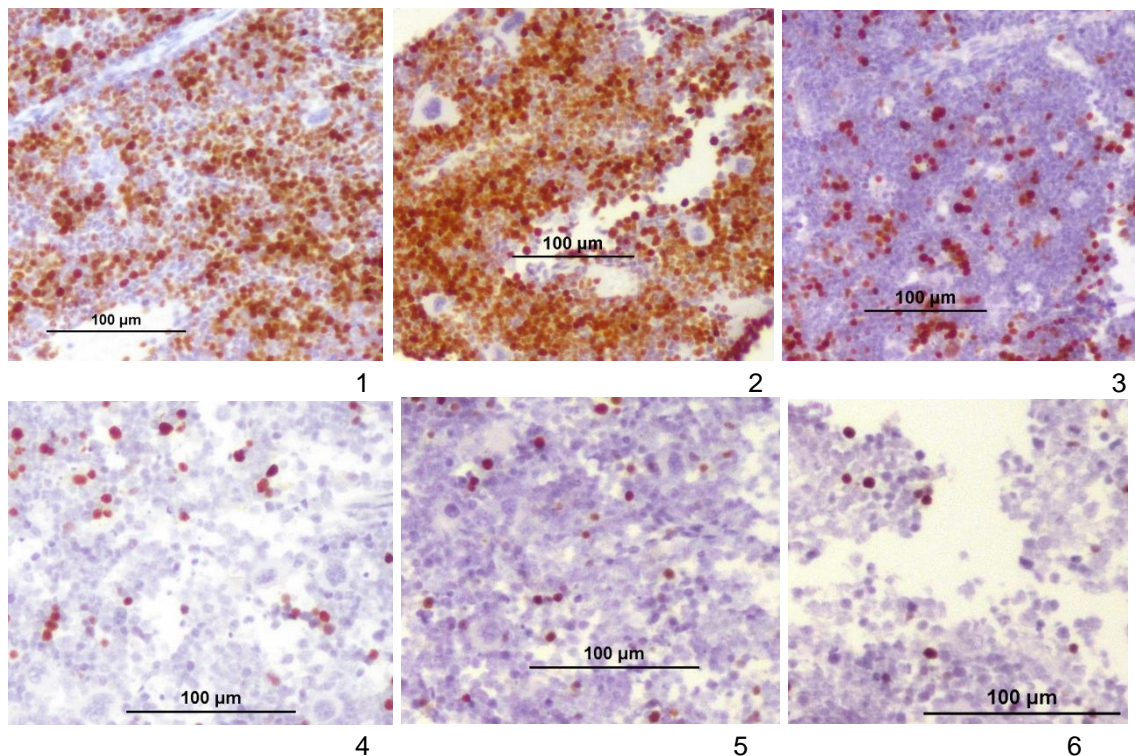


Figure 21 : Marquage Ki-67, coupes histologiques de fémurs de souris après une durée de décalcification variable (1. 24 heures ; 2. 48 heures ; 3. Trois jours ; 4. Quatre jours ; 5. Cinq jours et 6. Six jours) Photographies réalisées au grossissement x100.



## ***Evaluation de l'impact de la décalcification électrolytique sur la qualité histologique des os de souris***

Tableau 14 : Protocoles de fixation et de décalcification utilisés sur os murins pour cette partie

<b>Agent fixateur</b>	Solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité	
<b>Durée de fixation des os des membres pelviens murins</b>	Quarante huit heures	
<b>Agent de décalcification</b>	Solution d'EDTA 10% tamponnée pH 7,6	Solution TDE 30
<b>Durée de décalcification des os des membres pelviens murins</b>	Quarante huit heures	Une heure
<b>Conditions particulières de décalcification</b>	Etuve 37°C, sans changement de solution	Cuve électrolytique SAKURA TDE 30
<b>Nombre de coupes histologiques en coloration HE</b>	Treize coupes histologiques	Six coupes histologiques

Des coupes de très bonne qualité concernant la netteté des détails cellulaires parviennent à être obtenues après décalcification électrolytique comme avec l'EDTA. La coloration HE est aussi de bonne qualité. L'intensité de la coloration varie parfois entre les différentes coupes, indépendamment du type de processus de décalcification effectué. Les noyaux sont colorés en violet et le cytoplasme en rose, les contrastes observés sont satisfaisants. Il n'est pas constaté de zones calcifiées résiduelles. Des fibres musculaires, provenant de fragments de muscles restés attachés en périphérie des structures osseuses, sont parfois retrouvées et présentent une coloration de très bonne qualité également.

Différentes photographies sont présentées sur les **Figures 22 à 25**. Sur les photographies de la **Figure 22** ci-dessous, il peut être observé les spicules osseux, contenant des ostéocytes, et la moelle osseuse. Celle-ci est très riche en cellules, dont la forme des noyaux est bien conservée, et parmi lesquelles des adipocytes et des mégacaryocytes sont facilement reconnus. De petits capillaires sont également observés.

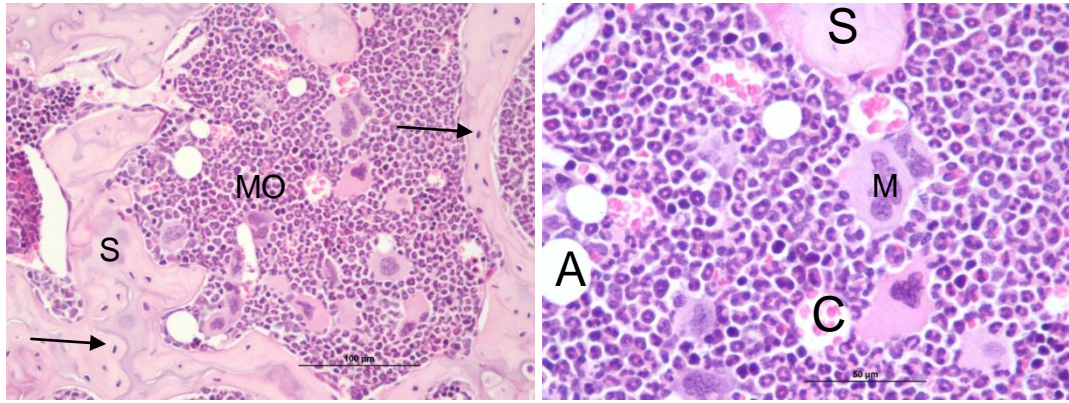


Figure 22 : Coupes histologiques obtenues après décalcification d'un os fémoral murin par l'EDTA. (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x400 à droite). A = adipocyte ; C = capillaire ; Flèche = ostéocytes ; M = mégacaryocyte ; MO = moelle osseuse ; S=spicule.

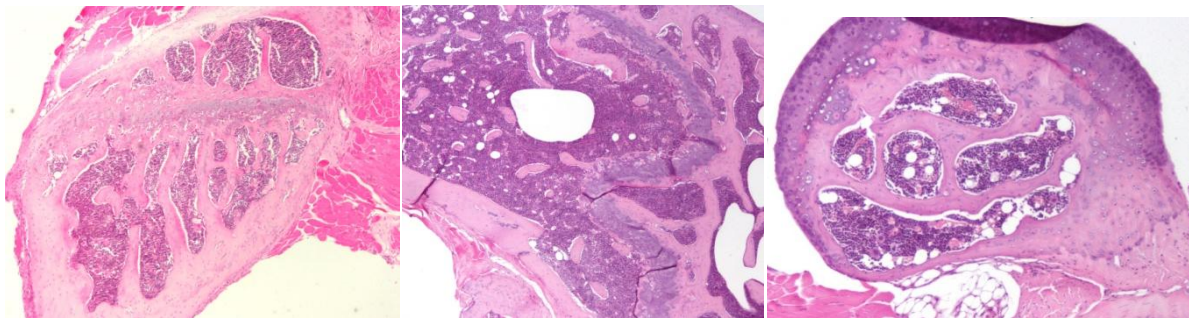


Figure 23 : Coupe histologique de moelle osseuse murine après décalcification des os par l'EDTA à gauche et par décalcification électrolytique au centre et à droite. (Photographies réalisées au grossissement x40)

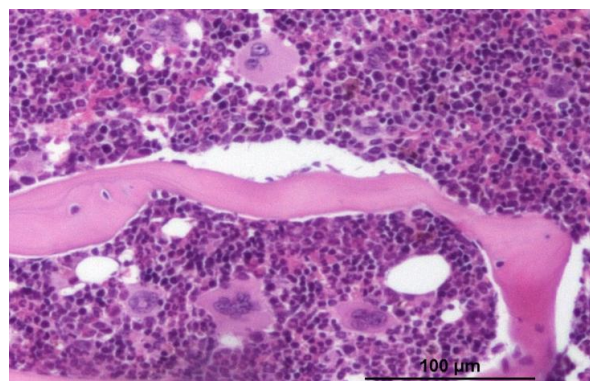


Figure 24 : Coupe histologique de moelle osseuse murine après décalcification électrolytique. (Photographie réalisée au grossissement x100)

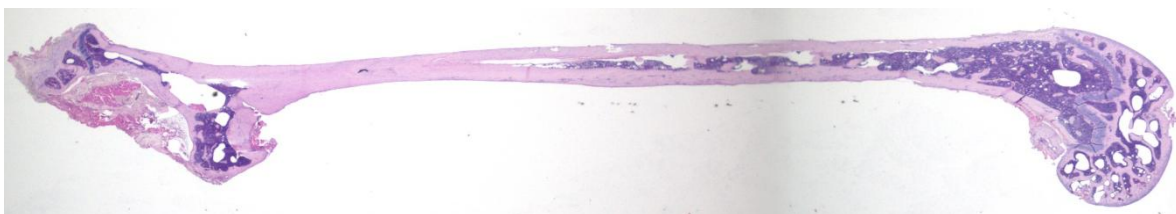


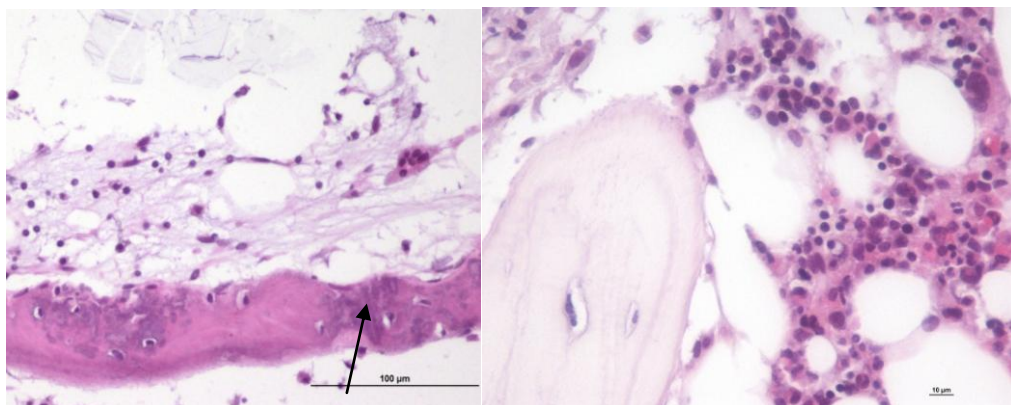
Figure 25 : Coupe histologique de fémur murin après décalcification électrolytique. (Photographie réalisée au grossissement x40)

## 2.1.2 Etude sur os humains

Tableau 15 Protocoles de fixation et de décalcification utilisés sur os humains pour cette partie

<b>Agent fixateur</b>	Solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité	
<b>Durée de fixation des os humains</b>	quarante huit heures	
<b>Agent de décalcification</b>	Solution d'EDTA 10% tamponnée pH 7,6	Solution TDE 30
<b>Durée de décalcification des os humains</b>	Quarante huit heures	1 heure
<b>Conditions particulières de décalcification</b>	Etuve à 37°C, sans changement de solution	Cuve électrolytique SAKURA TDE 30
<b>Nombre de coupes histologiques en coloration HE</b>	Quinze coupes histologiques	Une coupe histologique

La coupe des fragments d'os humain est facilement réalisée après décalcification. Le fragment décalcifié par décalcification électrolytique présente cependant des zones de décalcification insuffisantes constatées après la coloration des coupes histologiques. Elles peuvent être observées sur le spicule osseux en bas de la photographie de gauche de la **Figure 26 (flèche)**, les zones sous décalcifiées apparaissent violettes par rapport au reste du spicule décalcifié qui apparaît plus rose. La richesse en cellules de différents fragments varie et elle est parfois insuffisante en fonction des donneurs et des zones prélevées, pour réaliser des tests immunohistochimiques. Les coupes histologiques sont donc évaluées en coloration hémalum éosine avant d'envisager l'IHC. Des tests d'IHC sont réalisés uniquement après décalcification des os par l'EDTA, pour des raisons d'échéance du projet. La décalcification par l'EDTA permet d'obtenir des coupes histologiques de colorations et de morphologies satisfaisantes comme il peut être observé sur la photographie de gauche de la **Figure 26** ci-dessous.



**Figure 26 : Coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par décalcification électrolytique à gauche et par l'EDTA à droite. (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x400 à droite)**

### 2.1.3 Etude sur os canins

La première approche est réalisée pendant une semaine, mais devant l'absence d'évolution de la consistance des prélèvements, il est décidé de passer à la seconde approche. Après un mois de décalcification par l'EDTA, la réalisation de coupes histologiques n'a pas pu être réalisée. Des problèmes techniques et d'organisation (vacances scolaires, rupture de stock d'EDTA au laboratoire) ont entraîné un changement moins régulier de la solution de décalcification au cours du deuxième mois, et il n'était toujours pas possible de découper les prélèvements par microtome à la fin de celui-ci. Une fragmentation de la coupe sur le ruban de paraffine, ou un détachement du prélèvement par rapport au bloc de paraffine lors de la coupe étaient en effet observés.

Cela a motivé l'essai de la troisième approche avec un respect strict de son protocole rigoureusement construit. Après collecte des nouveaux fragments et découpe des seize nouveaux prélèvements. La décalcification par l'EDTA 10% à l'étuve (37°C) avec changement de la solution toutes les vingt quatre ou quarante huit heures est essayée sur trois mois. La décalcification par l'OSTEOSOFT<sup>ND</sup> sous agitation magnétique continue, avec changement toutes les quarante huit heures de la solution est essayée sur un mois. Cependant, malgré un important ramollissement, aucun des prélèvements avec présence de dents n'a pu être coupé au microtome. Certain de ceux constitués uniquement d'os mandibulaires ont pu être découpés après les trois mois d'immersion dans l'EDTA 10%, mais la cohésion entre l'os et les tissus mou était fortement altérée. Des propositions d'amélioration du protocole et de nouvelles alternatives seront présentées au cours de la partie discussion.

## 2.2 Etude n°2 : Tests de marquages immunohistochimiques après décalcification

### 2.2.1 Etude sur os murins

#### 2.2.1.1 Tests de marquages immunohistochimiques

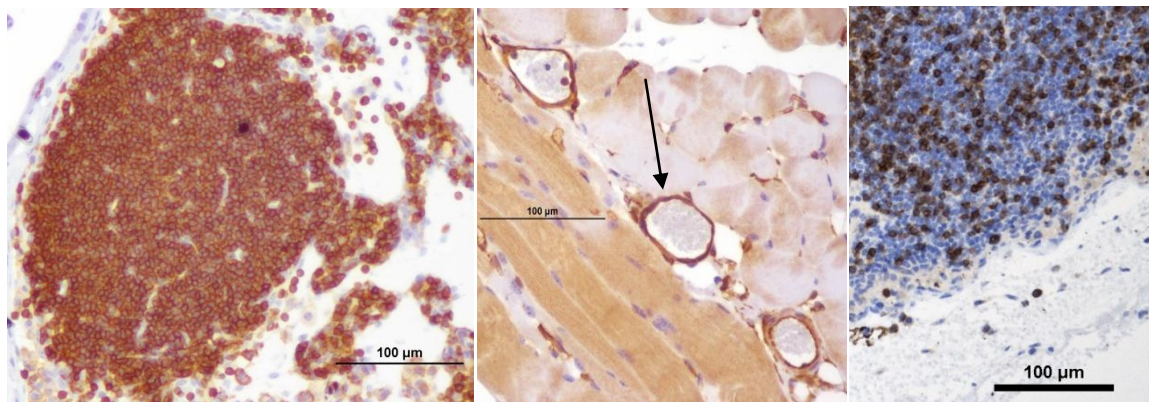
Tableau 16 : Protocoles de fixation et de décalcification utilisés sur os murins pour cette partie

<b>Agent fixateur</b>	Solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité	
<b>Durée de fixation des os des membres pelviens murins</b>	Quarante huit heures	
<b>Agent de décalcification</b>	Solution d'EDTA 10% tamponnée pH 7,6	Solution SAKURA
<b>Durée de décalcification des os des membres pelviens murins</b>	Quarante huit heures	Deux heures
<b>Conditions particulières de décalcification</b>	Etuve à 37°C, sans changement de solution	Cuve électrolytique

Deux coupes histologiques par marqueur ont été réalisées, une dont le démasquage est réalisé à bas pH et une dont le démasquage est réalisé à haut pH (tampon citrate pH 6 ou EDTA pH 8 respectivement). Les cellules positives pour les anticorps présentent une coloration brune au site de réactivité de l'anticorps, et les autres cellules montrent seulement une coloration bleue.

Lors de marquage non spécifique les termes de « bruit de fond » et d' « effet bord » sont employés. Le terme de « bruit de fond » est employé lorsqu'une coloration brune peu intense, non homogène et non spécifique est observée sur des plages mal délimitées, aussi bien sur le cytoplasme des cellules que sur la matrice extracellulaire. Le terme d' « effet bord » est employé lorsqu'une lame de coloration, pouvant être intense, est constatée sur les bords du prélèvement ou à l'inverse lorsqu'une absence de marquage des bords des structures est constatée.

Une positivité avec les anticorps anti-CD34, anti-CD45 anti- $\alpha$ SMA et anti-CD3 est observée sur les cellules de la moelle osseuse après décalcification électrolytique ou par l'EDTA. La **Figure 27** ci-dessous présente les résultats obtenus sur les tissus contrôles positifs, ils seront expliqués au cours des paragraphes suivants.



**Figure 27 : Marqueur CD45 sur nœud lymphatique de souris (à gauche), marqueur CD34 (au milieu) sur capillaires d'une zone musculaire de souris et marqueur CD3 (à droite) sur nœud lymphatique de souris (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche à droite et x200 au centre)**

### **Réactivité de l'anticorps anti-CD34 (Figure 28, p72) :**

Une coloration brune nette membranaire est observée sur les cellules endothéliales des vaisseaux de taille moyenne et des petits capillaires (image centrale). Une sous population de cellules de la moelle osseuse présentant des caractéristiques morphologiques similaires (rondes, mononuclées et de taille moyenne) sont aussi marquées en brun. Ces cellules peuvent correspondre à des cellules hématopoïétiques. Elles sont retrouvées en densité équivalente après décalcification électrolytique ou par l'EDTA. Un bruit de fond léger est constaté, celui semble plus marqué après décalcification par l'EDTA. Il peut être observé sur l'image centrale, caractérisé par une coloration brune de faible intensité et non spécifique, facilement distinguable de la coloration plus intense des cellules cibles. Les cytoplasmes des mégacaryocytes apparaissent légèrement bruns de manière aléatoire.

La présence de l'antigène CD34 est également remarquée sur les blocs contrôles positifs. La paroi des capillaires du tissu murin utilisé (tissu prélevé en région



inguinale contenant la peau, le plan sous cutané et le plan musculaire) présentent une coloration brune intense, comme il peut l'être observé sur l'image centrale de la **Figure 27**. Une coloration modérée des fibres musculaires est constatée. La présence d'un bruit de fond est également retrouvée sur les contrôles positifs.

Pour cet anticorps, l'étape de démasquage antigénique a été testée avec deux solutions : un tampon de haut pH et un de bas pH. Les coupes histologiques de moelle osseuse et du tissu contrôle ne présentent pas de différences très marquées, toutefois une plus grande intensité du marquage est observée lorsque le démasquage est effectué avec une solution tampon de haut pH. Les **Figures 27 et 28** présentées sont des coupes histologiques obtenues après le démasquage avec une solution tampon de haut pH, qui est retenue pour l'utilisation de cet anticorps anti-CD34.

#### **Réactivité de l'anticorps anti-CD45 (Figure 29, p72):**

Sur la moelle osseuse, une coloration brune nette membranaire est observée sur une population importante de cellules rondes mononuclées ou granuleuses, regroupées et de tailles variables. Il ne semble pas y avoir de bruit de fond mais parfois la coloration brune des cellules est plus ou moins intense. Les noyaux des mégacaryocytes et des cellules endothéliales apparaissent bleus, non marqués.

Sur les coupes histologiques des tissus spléniques, ganglionnaires et de l'abcès utilisées comme contrôles positifs, une coloration brune intense des cellules leucocytaires cibles est observée. Sur la **Figure 29**, le tissu ganglionnaire marqué peut être observé sur la photographie de gauche. Contrairement à l'anticorps anti-CD34, des différences sont constatées selon l'utilisation d'une solution tampon de bas ou de haut pH pour le démasquage antigénique. Les figures présentées (27, 29) sont des coupes histologiques obtenues après utilisation d'une solution tampon de bas pH. La présence des antigènes CD45 de la moelle osseuse n'est pas révélée lors d'utilisation d'une solution tampon de haut pH, la moelle apparaît alors uniformément bleue. Les différences sont également marquées sur les tissus contrôles où la densité des cellules marquées est très diminuée à haut pH. Contrairement à l'anticorps anti-CD34, la solution tampon de bas pH est retenue pour l'étape de démasquage lors de l'utilisation de l'anticorps anti-CD45.

#### **Réactivité de l'anticorps anti- $\alpha$ SMA (clone HHF35) (Figure 30 et 31, p72) :**

La révélation est réalisée selon deux protocoles : envision peroxydase pour le premier protocole et utilisation du kit ARK pour le deuxième (cf annexe). Des témoins positifs n'ont pas été spécifiquement réalisés car des contrôles intrinsèques sont possibles avec cet anticorps (en utilisant la présence ou non de marquage des fibres musculaires résiduelles en périphérie des os, ou le marquage des cellules musculaires lisses des parois artérielles). Les coupes histologiques obtenues à partir des os décalcifiés par l'EDTA présentent des capillaires dont les cellules endothéliales sont marquées. Un bruit de fond léger est constaté et les cytoplasmes de certains mégacaryocytes apparaissent bruns après coloration par le kit ARK. Un bruit de fond plus important est présent sur les coupes de moelle osseuse des os

décalcifiés par la décalcification électrolytique. Un vaisseau de taille plus important est observé sur une de ces coupes, un marquage en périphérie du vaisseau est présent mais l'intensité du bruit de fond gêne à l'interprétation. Les fibres musculaires présentes en périphérie de l'os apparaissent brunes aussi bien après décalcification par l'EDTA qu'après décalcification électrolytique. Les résultats obtenus avec cet anticorps sont globalement satisfaisants.

### Réactivité de l'anticorps anti-CD3 (Figure 32 p 73) :

Des cellules rondes, éparses et peu abondantes sont révélées sur la moelle osseuse par une coloration brune membranaire, correspondant très probablement aux lymphocytes T. Sur le tissu contrôle, ces cellules cibles de l'anticorps sont colorées d'un brun intense (Figure 27, à droite). La solution tampon de haut pH est retenue pour l'étape de démasquage lors de l'utilisation de l'anticorps anti-CD3.

### Réactivité des anticorps sur des tissus témoins exposés à l'EDTA 10% (Figure 33 et 34)

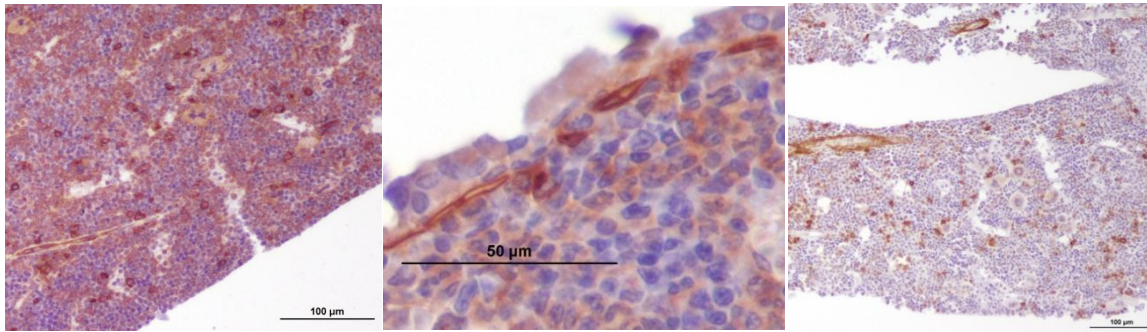
Comme il peut l'être observé sur les coupes histologiques dont les photographies sont présentées p73, la réactivité des anticorps n'est pas altéré sur les tissus mous exposés au décalcifiant EDTA, sur lesquelles les cellules cibles de chaque anticorps sont colorées d'un brun intense.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des marqueurs validés chez la souris

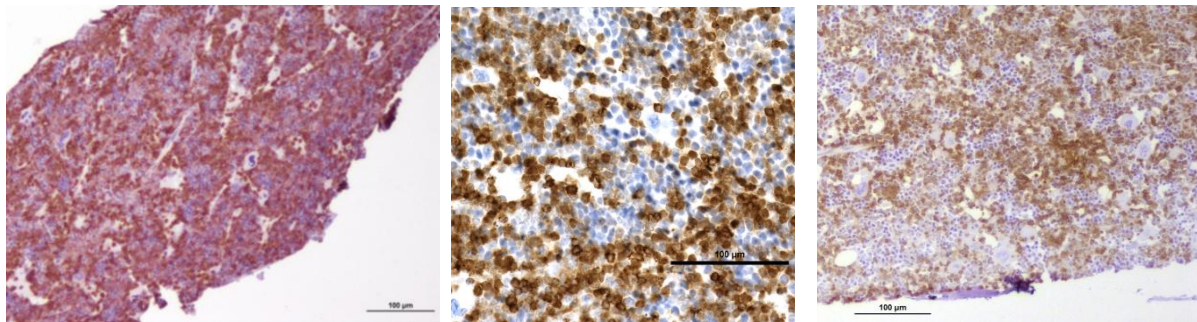
Marqueurs	Références et caractéristiques		Dilution testée	Validation après décalcification	pH recommandé pour la solution tampon de l'étape de démasquage
<b>CD34</b>	Abcam référence ab81289	anticorps monoclonal de lapin	1/150 <sup>eme</sup>	oui	pH 8
<b>CD45</b>	Santa Cruz référence sc53665	anticorps monoclonal de rat	1/100 <sup>eme</sup>	oui	pH 6
<b>CD3</b>	AbDSerotec référence MCA1477	anticorps monoclonal de rat	1/100 <sup>eme</sup>	oui	pH8
<b>αSMA</b>	Dako référence HHF35	anticorps monoclonal de souris	1/25 <sup>eme</sup>	oui	

#### 2.2.1.2 Application au tracking de CSM humaines injectées chez la souris

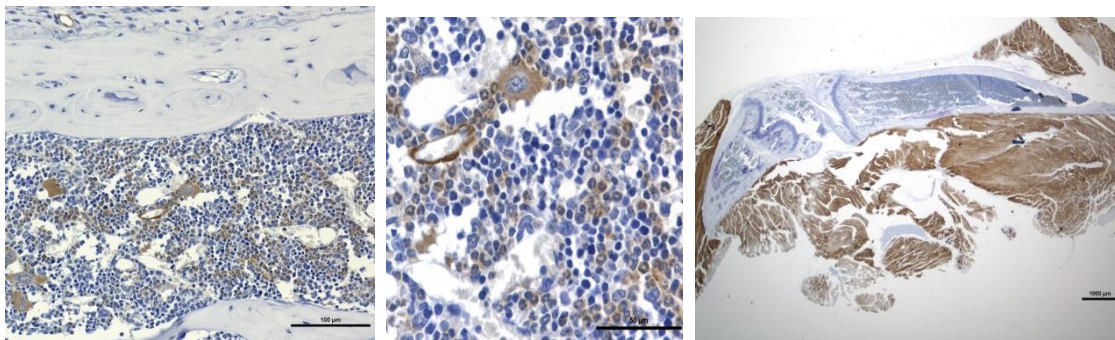
Les coupes réalisées à partir des os des souris ayant reçu l'injection *intra* tibiale de CSM sont de très bonne qualité histologique, comme apprécié à l'hémalun-éosine. Un marquage par l'anticorps anti-vimentine humaine est réalisé sur les fémurs et tibias des deux membres des six souris. Malheureusement, aucune cellule mésenchymateuse injectée n'est retrouvée à cette cinétique.



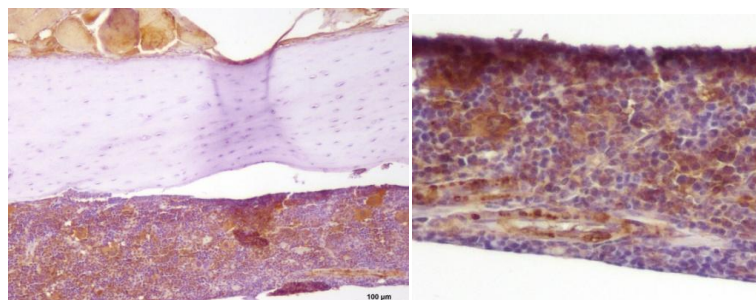
**Figure 28 : Marqueur CD34, moelle osseuse de fémur de souris après décalcification par l'EDTA à gauche et au centre, et décalcification électrolytique à droite. (Photographie réalisée au grossissement x100 à gauche et au centre et x400 à droite)**



**Figure 29 : Marqueur CD45, moelle osseuse de fémur de souris NUDE après décalcification EDTA (à gauche et au centre) et décalcification électrolytique (à droite). (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et à droite, x200 au centre)**



**Figure 30 :  $\alpha$ SMA, coupes histologiques de moelle osseuse murine après décalcification des os par l'EDTA. (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x400 au centre et x10 à droite)**



**Figure 31 :  $\alpha$ SMA, coupes histologiques de moelle osseuse murine après décalcification électrolytique des os. (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et x200 à droite)**

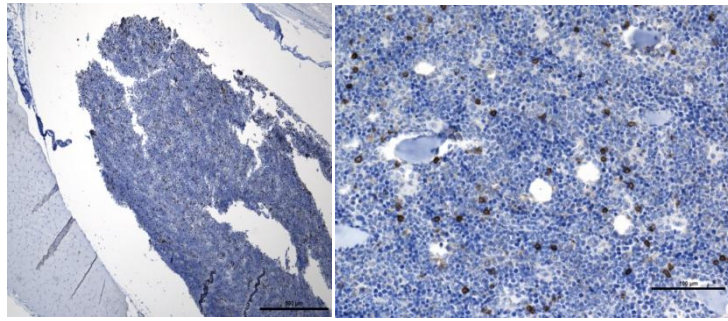


Figure 32 : CD3, coupes histologiques de moelle osseuse murine après décalcification par l'EDTA des os. (Photographies réalisées aux grossissements x40 à gauche et x200 à droite)

### Réactivité des anticorps sur des tissus témoins exposés à l'EDTA 10%

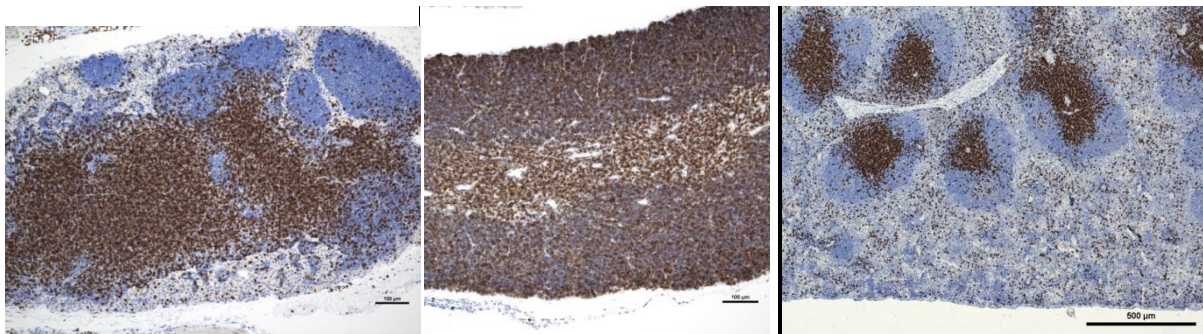


Figure 33 : CD3, de gauche à droite : nœud lymphatique, thymus, rate murins après exposition à l'EDTA des tissus. (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et au centre et x40 à droite)

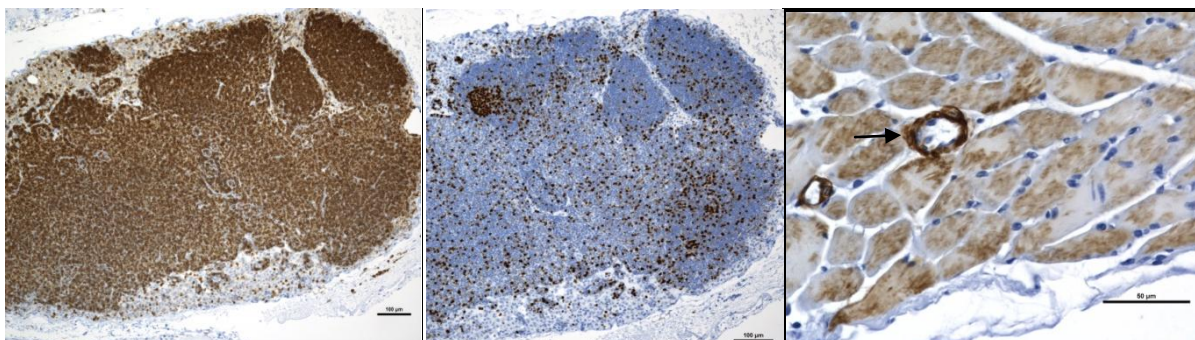


Figure 34 : De gauche à droite : anticorps anti-CD45 sur nœud lymphatique murin, anticorps anti-Ki67 sur nœud lymphatique murin thymus, anticorps anti-  $\alpha$ SMA sur tissu musculaire murin. Coupe histologie après exposition des tissus murins à l'EDTA. (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et au centre et x400 à droite)(Flèche = artériole)

## 2.2.2 Etude sur os humains

### Tests de marqueurs immunohistochimiques sur os humains après décalcification par l'EDTA.

Tableau 18 : Protocoles de fixation et de décalcification sur os humains pour cette partie

<b>Agent fixateur</b>	Solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité
<b>Durée de fixation des os des membres pelviens murins</b>	Quarante huit heures
<b>Agent de décalcification</b>	Solution d'EDTA 10% tamponnée pH 7,6
<b>Durée de décalcification des os des membres pelviens murins</b>	Quarante huit heures
<b>Conditions particulières de décalcification</b>	Etuve à 37°C, sans changement de solution
<b>Nombre de coupes histologiques sur os humains</b>	
<b>Vimentine</b>	Dix sept coupes histologiques
<b><math>\alpha</math>SMA HHF35, CD200</b>	Neuf coupes histologiques
<b>PTH1R, NGFR, CD45, CD34, LeptineR, <math>\alpha</math>SMA 1A4</b>	Deux coupes histologiques par marqueur

Des coupes sériées à partir d'un bloc de paraffine sont réalisées pour tester les marqueurs PTHR1, NGFR, CD45, CD34, LeptineR et  $\alpha$ SMA. Des coupes sériées d'autres fragments sont réalisées pour comparer les marqueurs vimentine, CD200 et  $\alpha$ SMA. Ainsi les résultats des différents marqueurs peuvent être comparés quant à la topographie des marquages observés sur les lames successives de blocs. La qualité des cellules marquées de la moelle osseuse varie de très satisfaisante pour les anticorps anti-vimentine et anti-CD34, satisfaisante pour l'anti- $\alpha$ SMA, à insuffisante pour les anticorps anti-PTH1R, anti-NGFR, anti-CD45 et anti-LeptineR.

La **Figure 35** ci-dessous présente les résultats obtenus sur les tissus contrôles positifs, ils seront expliqués au cours des paragraphes suivants.

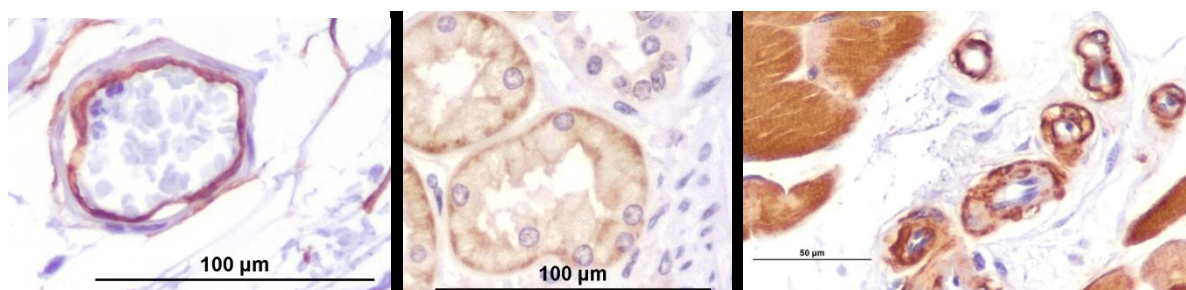


Figure 35 : Tissus contrôles positifs : cellules endothéliales d'un capillaire marqué par l'anticorps CD34 à gauche, cellules des tubules contournés marquées par l'anticorps PTHR au centre, et fibres musculaires marquées par l' $\alpha$ SMA à droite (photographies réalisées aux grossissements x200, x100 et x400)

### **Réactivité de l'anticorps anti- $\alpha$ SMA :**

Deux clones de l'anticorps anti- $\alpha$ SMA ont été testés, le clone 1A4 et le clone HHF35. La présence de structures vasculaires de différents calibres permet une évaluation de la conservation de ces sites plus facile qu'avec les coupes histologiques de moelles osseuses murines.

Un contrôle positif est réalisé en même temps que l'IHC sur fragments osseux humains afin de pouvoir également interpréter les résultats plus facilement que sur les tissus murins.

Les épitopes antigéniques de l'  $\alpha$ SMA sont conservés après décalcification mais un bruit de fond très important est retrouvé, celui-ci empêche quasiment toute interprétation lors de l'utilisation du clone 1A4 (**Figure 36**). Les coupes histologiques de moelle osseuse apparaissent quasiment en nuances brunes avec le clone HHF35, mais l'intensité du marquage est très augmentée sur les cellules cibles. Les vaisseaux de tailles moyennes sont alors facilement reconnus, mais ceux de petits calibres ne sont pas d'intensité suffisamment différente du reste des cellules pour être facilement identifiés (**Figure 37**). Sur le tissu musculaire non décalcifié, le même bruit de fond est constaté, de façon également plus marqué avec le clone 1A4. Les petits vaisseaux sont marqués par une coloration brune plus intense que sur les coupes histologiques de moelle osseuse (**Figure 35**, image de droite).

### **Réactivité de l'anticorps anti-vimentine :**

L'anticorps anti-vimentine révèle des cellules mésenchymateuses, fusiformes, à cytoplasme effilés. Les cellules mésenchymateuses marquées peuvent être observées sur la photographie de droite de la **Figure 36**. Les cellules endothéliales des petits capillaires sont également marquées (**Figure 36** image centrale). En revanche, la paroi des vaisseaux de plus gros calibres apparaît bleue (**Figure 36**, image de gauche).

### **Réactivité de l'anticorps anti-CD34 :**

L'anticorps anti-CD34 révèle, comme chez la souris les cellules endothéliales de la couche interne des capillaires. Un marquage net et intense est constaté. La **Figure 39** permet d'observer la différence des caractéristiques de coloration obtenues après utilisation de l'anticorps anti-CD34 ou anti- $\alpha$ SMA.. L'anticorps anti- $\alpha$ SMA cible les fibres musculaires lisses, un marquage intense est constaté sur les couches moyennes de la paroi des vaisseaux tandis que seule la couche la plus interne apparaît marquée lors d'utilisation de l'anticorps anti-CD34. Les petits capillaires sont plus facilement identifiés avec ce dernier, du fait de l'absence de bruit de fond qui existe un peu avec l' $\alpha$ SMA.

Ce marquage fin est observé sur les capillaires des tissus contrôles positifs comme il peut être observé sur la **Figure 35** (image de gauche).

### **Réactivité de l'anticorps anti-PTHR1 :**

L'anticorps anti-PTHR1 n'a pas permis d'obtenir des résultats validés sur le tissu osseux. En effet des cellules brunes sont observées en faible densité aussi bien sur la coupe histologique où l'anticorps primaire n'a pas été appliqué, que sur la coupe histologique incubée avec l'anticorps (**Figure 40 et 41**). Par contre sur le tissu rénal utilisé comme contrôle positif, une coloration brune cytoplasmique des cellules de l'épithélium cubique des tubules contournés est observée. Ces cellules sont celles où le marquage est attendu et les coupes histologiques de rein où l'anticorps primaire n'est pas appliqué ne présentent pas de coloration brune (**Figure 35**, au centre). Le marquage semble donc spécifique sur le rein humain, ce qui démontre sa réactivité spécifique. Le marquage des cellules rénales n'est pas modifié par l'utilisation d'une solution tampon de bas ou de haut pH pour l'étape de démasquage.

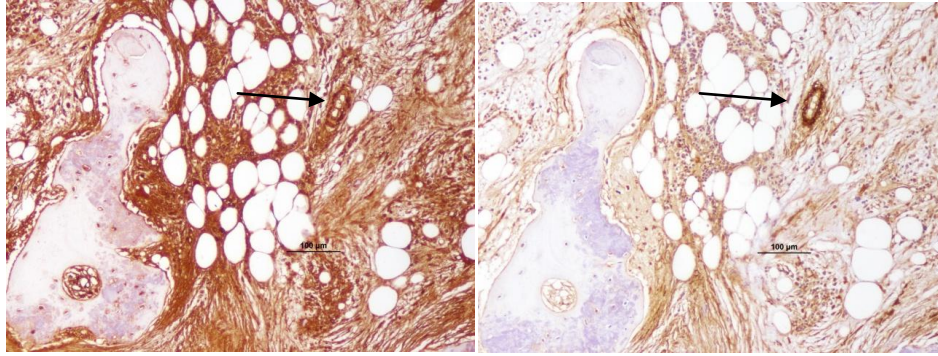
### **Réactivité de l'anticorps anti-NGFR :**

L'anticorps anti-NGFR n'a pas permis de valider des résultats sur la moelle osseuse du fait d'une coloration brune de l'ensemble des structures de la coupe. Cette coloration semble liée à l'anticorps primaire car une absence de réactivité qui se traduit par une coloration bleue uniforme est retrouvée sur les contrôles négatifs. Sur la coupe histologique de tissu cérébral humain, le marquage semble plus spécifique. Des cellules rondes de taille moyenne présentent une coloration cytoplasmique brune (**Figure 42**). Les mêmes caractéristiques sont obtenues après l'utilisation d'une solution tampon de bas ou de haut pH pour l'étape de démasquage.

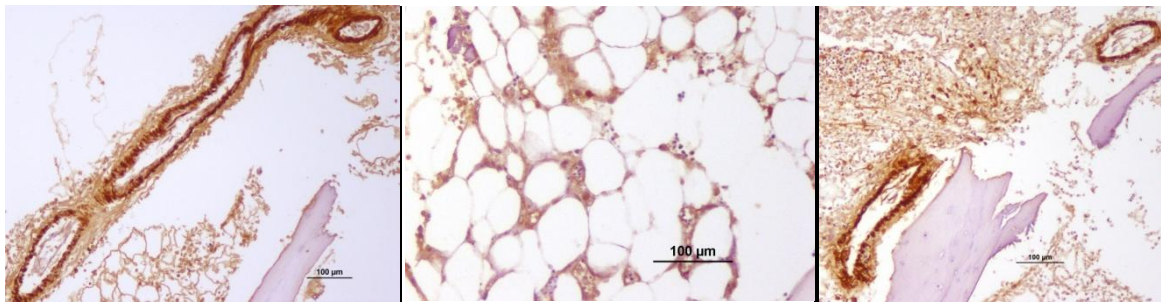
### **Réactivité de l'anticorps anti CD200 :**

L'anticorps anti-CD200 révèle, tout comme l'anticorps anti-vimentine, des cellules mésenchymateuses, fusiformes, à cytoplasme effilés. Ces cellules mésenchymateuses marquées peuvent être observées sur les photographies de la **Figure 43**.

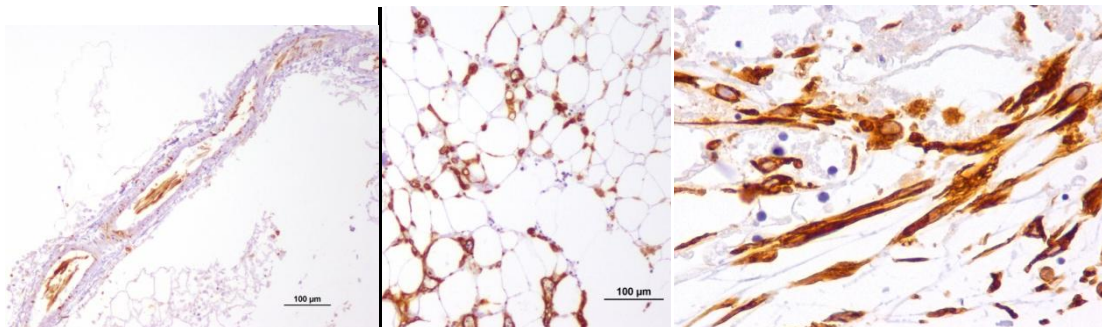
Les anticorps anti-LeptineR et anti-CD45 ne révèlent aucune cellule, ni sur leurs tissus contrôles positifs, ni sur les coupes histologiques de moelle osseuse. Ils n'ont donc pas pu être validés sur os décalcifiés lors de cette étude.



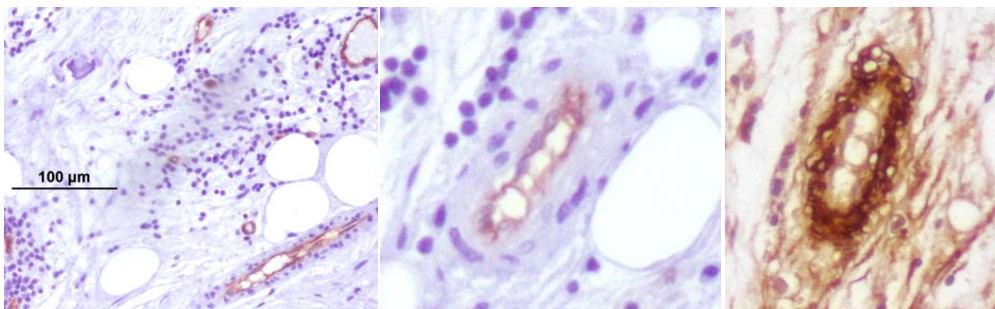
**Figure 36 : Coupe histologique de moelle osseuse humaine après décalcification par l'EDTA des os. A gauche:  $\alpha$ SMA clone 1A4 ; à droite :  $\alpha$ SMA clone HHF35 ; Flèche = structure vasculaire de taille moyenne (Photographies réalisées au grossissement x100)**



**Figure 37 :  $\alpha$ SMA, clone HHF35, coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par l'EDTA (Photographies réalisées au grossissement x100).**



**Figure 38 : Vimentine, coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par l'EDTA (Photographies réalisées aux grossissements x200 à gauche et x40 à droite).**



**Figure 39 : CD34 (à gauche et au centre) et  $\alpha$ SMA (à droite, clone HHF35), coupe histologique de fragments d'os humains décalcifiés par l'EDTA (Photographies réalisées au grossissement x100).**



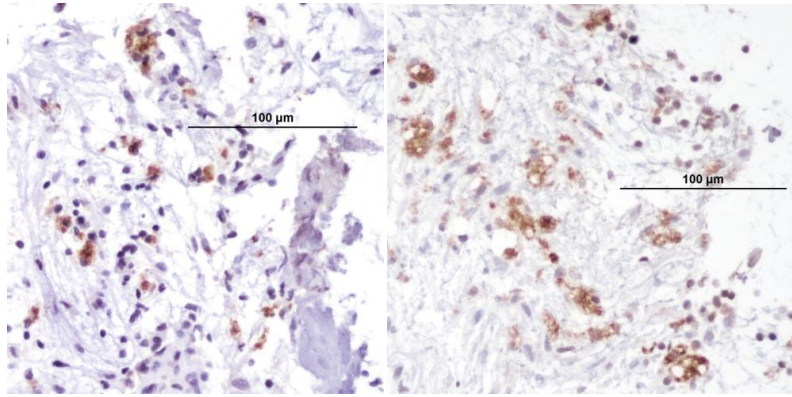


Figure 40 : Coupe histologique de moelle osseuse humaine après décalcification par l'EDTA des os. A gauche: PTHR1 ; à droite : témoin négatif pour PTHR1 (Photographies réalisées au grossissement x200)

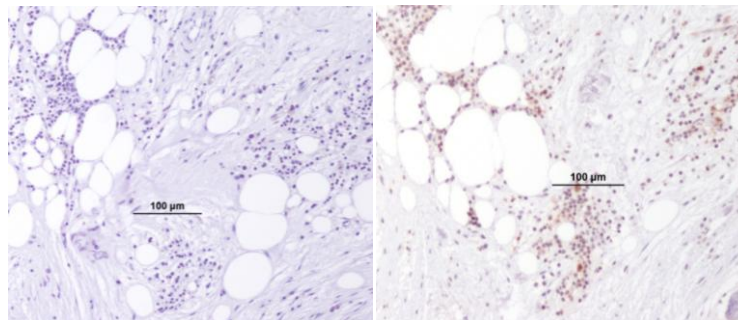


Figure 41 : Coupe histologique de moelle osseuse humaine après décalcification par l'EDTA des os. A gauche: témoin négatif pour l'αSMA; à droite : témoin négatif pour le PTHR1 (Photographies réalisées au grossissement x100)

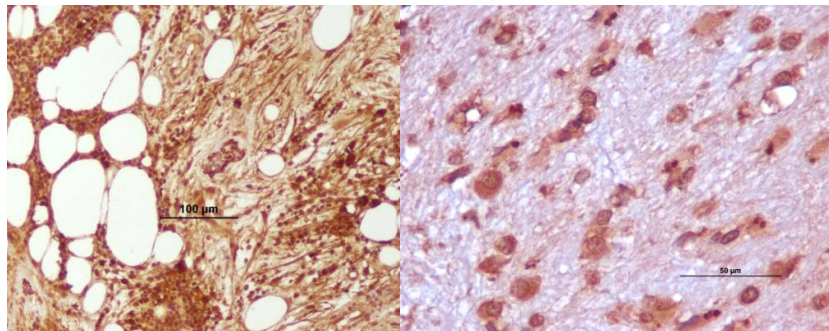


Figure 42 : NGFR, coupe histologique de moelle osseuse humaine décalcifiée (à gauche) et de tissu cérébral humain (à droite) (Photographies réalisées aux grossissements x100 à gauche et x400 à droite)

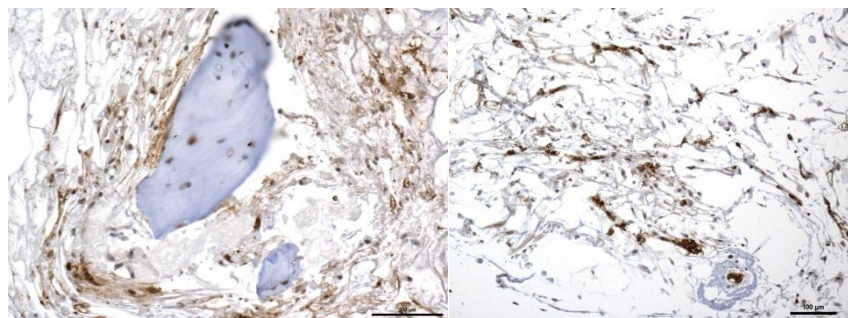


Figure 43 : CD200, coupe histologique de moelle osseuse humaine décalcifiée (Photographies réalisées au grossissement x100)

### 3. Discussion

Comme présenté dans la première partie du manuscrit, ce travail expérimental a été réalisé afin de valider au laboratoire des protocoles d'étude histologique et immunohistochimiques sur tissu osseux, chez la souris et l'homme, afin de pouvoir étudier une population cible : les CSM de moelle osseuse dans leur environnement natif. Nous avons donc envisagé successivement les étapes de fixation, de décalcification et de réactivité immunohistochimique sur tissu osseux.

#### ***Concernant l'étape de fixation***

Les résultats de cette étude n'ont pas révélé d'impact de la durée de fixation par le formol (vingt quatre ou quarante huit heures) sur la qualité des coupes histologiques observées, ainsi que sur l'intensité du marquage Ki-67. Ces durées ont été choisies pour répondre à deux objectifs principaux : une fixation suffisante afin de garantir la qualité tissulaire, et une fixation minimale, afin d'éviter toute surfixation et d'interférer le moins possible avec les techniques d'immunohistochimie. De plus, il fallait que les conditions soient compatibles avec le rythme de travail du laboratoire et le caractère aléatoire de l'arrivée des prélèvements.

Pour les études sur moelle osseuse murine, des souris de laboratoire arrivant en fin d'étude sont utilisées, afin de ne pas sacrifier d'animaux spécifiquement pour ce projet. Les sacrifices ne peuvent pas toujours être prévus à l'avance. De même, la réception des fragments de têtes fémorales humaines est fonction des plannings de chirurgie orthopédique. La réception des prélèvements peut donc se faire à n'importe quel moment de la semaine.

Une durée de fixation inférieure n'a pas été recherchée car vingt quatre heures est une durée minimale conseillée dans tous les protocoles d'histopathologie. Cette étape préanalytique est fondamentale et une fixation insuffisante induit des altérations morphologiques irréparables. Cette durée permet par ailleurs la préparation de la solution de décalcification d'EDTA par le laboratoire. Dans le cadre d'un fonctionnement plus intensif, l'utilisation d'un système d'agitation magnétique pourrait être envisagée pendant la phase de fixation comme par l'ICSH<sup>48</sup>. Une durée de fixation de 48 heures permet de laisser les prélèvements du vendredi au dimanche dans le formol, avec un départ de l'automate le dimanche soir pour une arrivée des blocs le lundi matin.

Pour l'étude des os canins qui sera poursuivie, la question d'une prolongation possible du temps de fixation est importante car le lieu de réalisation des prélèvements et le lieu d'utilisation de la scie à diamant est différent et la coordination des équipes n'est pas toujours possible. Lors de notre étude certains prélèvements ont été conservés dans du PBS après 48 heures de fixation en attendant d'être recoupés. Des temps de fixation beaucoup plus longs avec des prélèvements de densité comparable sont décrits<sup>25</sup>. Ils n'interfèrent pas sur la

morphologie en technique de routine mais peuvent altérer la réactivité en immunohistochimie.

Dans le cadre du travail expérimental, il est primordial de standardiser les étapes de fixation afin que les techniques d'histologie et d'immunohistochimie soient les plus reproductibles possible d'une étude à une autre et même au sein d'une même étude.

D'autres agents fixateurs sont évoqués dans la littérature, mais ils n'ont pas été étudiés ici, car la solution de formol à 10% tamponnée à la neutralité est celle couramment utilisée par le laboratoire. Il pourrait être cependant intéressant de tester les avantages de la solution AZF, notamment en y immergeant les prélèvements pendant deux heures après fixation par le formol, comme il l'est conseillé dans la littérature<sup>45</sup>, pour essayer d'améliorer les caractéristiques microscopiques des structures fixées, pour la morphologie de routine. Pour l'immunohistochimie, le formol reste le fixateur de référence avec lequel tous les protocoles du laboratoire sont validés. Il ne peut donc pas être remplacé par un autre dans le cadre des marquages immunohistochimiques.

### ***Durée de décalcification pour les prélèvements murins et humains lors d'utilisation d'EDTA***

Concernant le temps décalcification nécessaire par l'EDTA, l'étude réalisée montre que quarante huit heures sont suffisantes pour les os murins, ce qui est sensiblement plus court que les sept jours décrits<sup>20</sup> sur articulations fémoro-tibiales de souris dans la littérature.

Cette différence souligne l'importance d'étudier et de valider les procédures techniques au laboratoire afin de les adapter aux objectifs du laboratoire. Dans notre cas, nous avons souhaité atteindre une décalcification suffisante mais sans prolongation après le temps déterminé, notamment pour des questions de temps de rendu de résultats, mais aussi afin de limiter les interférences possibles avec la réactivité en immunohistochimie. Il est possible que dans notre protocole, la mise à l'étuve (37°C) des prélèvements tout au long de l'étape au lieu de la température ambiante, même sous agitation, accélère le processus.

Toutefois, une autre étude comparant l'agitation et l'élévation de la température ne présente pas de telles différences de temps de décalcification entre ces deux procédés<sup>27</sup>. Le temps décrit sur fémurs de rats, varie de onze jours<sup>33</sup> à température ambiante, à soixante jours à 4°C<sup>26</sup>. Pour des structures de densités comparables, la taille du prélèvement et la décalcification à 37°C semblent donc avoir un impact important sur le temps nécessaire à la décalcification. Des signes d'endommagements des prélèvements par la chaleur à 37°C n'ont pas été constatés dans notre étude, contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature<sup>27</sup> à 45°C, cependant des contrôles à température ambiante n'ont pas été réalisés. Cette approche pourrait être envisagée, mais comme les prélèvements décalcifiés à 37°C présentent des caractéristiques satisfaisantes, les bénéfices apportés par une décalcification à température ambiante devraient être comparés au temps de

décalcification supplémentaire nécessaire à cette température. Les plis et détachements des spicules et/ ou de la corticale osseuse se produisent parfois, mais peuvent être liés à la forme des os de souris à partir desquelles réaliser des coupes sur toute la longueur est difficile. Ces os sont de petite taille, fins et légèrement incurvés. Le nombre de sections réalisables au microtome dans la zone contenant la corticale et la moelle osseuse est donc restreint, ce qui limite le nombre d'essais possibles pour obtenir une lame de paraffine parfaite sur toute la longueur. Nous avons cependant pu réaliser des coupes intéressant une épiphyse et une partie suffisante de la diaphyse pour évaluer notamment les marquages immunohistochimiques.

Concernant le temps d'exposition à l'EDTA des fragments de têtes fémorales humaines, il est identique à celui des os murins. Ce temps de quarante huit heures est supérieur aux recommandations de l'ICSH (qui conseille vingt quatre heures). Une période plus courte pourrait être testée, notamment dans le cas de petits fragments. Nous avons noté une variabilité importante de la taille et de la structure des fragments, notamment sur la taille et l'épaisseur des travées osseuses et de la composition adipeuse ou hématopoïétique de la moelle osseuse, liée à la variabilité des individus donneurs (âge, sexe, état de santé). La standardisation à la même durée que pour les os de souris nous permet donc de faire face à ces variations. L'exposition standardisée est également un critère important pour la validation des protocoles d'immunohistochimie.

### ***Facteurs susceptibles d'améliorer la décalcification des mandibules canines***

Concernant le temps nécessaire à la décalcification des dents et mandibules canines par l'EDTA, celui-ci n'a pas pu être déterminé, l'expérience ayant été arrêtée au bout de trois mois. Des temps inférieurs pour décalcifier des dents humaines étaient pourtant rapportés dans la littérature, de l'ordre de un<sup>28</sup> à trois mois<sup>31</sup>. Cependant des temps beaucoup plus longs sont aussi retrouvés<sup>24</sup>. Une durée de décalcification supérieure à trois mois n'est pas envisageable en première intention pour la suite du projet d'étude de la parodontite.

Les obstacles rencontrés pour atteindre notre objectif sont liés à la structure osseuse très dense de la mandibule ainsi qu'à la dureté particulièrement importante de la dent pour la couche d'émail notamment. Sur les prélèvements de fin d'étude, nous avons donc fait réaliser à la faculté dentaire un fraisage de la dent afin de limiter au maximum le volume d'émail sur le prélèvement. En effet, la conservation de la couronne de la dent n'a pas d'intérêt dans l'étude de la parodontite.

Afin d'améliorer le protocole, de nouvelles approches doivent être considérées.

Tout d'abord, la réduction de la taille des pièces à décalcifier. Nous avons effectué une découpe en tranches fines, de 2 à >3 millimètres d'épaisseur à la scie à diamant afin de faciliter la pénétration du décalcifiant et de réduire le volume du prélèvement. La partie basse de l'os mandibulaire n'a pas d'intérêt dans le cadre de l'étude de la parodontite. Elle avait été conservée pour pouvoir évaluer les caractéristiques de la moelle osseuse contenue dans cet os. Une recoupe supplémentaire pourrait être réalisée, elle permettrait de diminuer encore la taille des prélèvements et donc certainement de gagner du temps.

Ensuite, si la solution d'EDTA est conservée comme décalcifiant pour la suite de ce projet, des techniques particulières, autres que la mise sous agitation ou l'augmentation de la température réalisées ici, devront être envisagées telles que la décalcification avec l'utilisation d'un four à micro-ondes ou d'un décalcifieur à ultrasons (partie I ; 2.4).

Enfin d'autres solutions pourraient aussi être testées sur ces prélèvements, telles que les solutions à base d'acide nitrique, qui permettent une décalcification très rapide et qui ont permis d'obtenir de bons résultats en terme de conservation de la morphologie de la dent dans certaines études<sup>28,30</sup>. Pour les marquages immunohistochimiques souhaités, des solutions à base d'acide formique, comme la solution « Anna morse » (50% acide formique ; 20% citrate de sodium) pourraient aussi être essayées. Cette solution permet de réaliser la décalcification sur une durée intermédiaire entre les acides forts (comme l'acide nitrique) et l'EDTA, et une bonne conservation de la morphologie des tissus de la dent est aussi rapportée dans certaines études<sup>24,29</sup>. De plus, les résultats après son utilisation sur d'autres prélèvements osseux, où des essais d'immunohistochimie ont été réalisés, sont encourageants<sup>20,32</sup>.

En cas d'études de nouvelles techniques ou de nouvelles solutions, des prélèvements de faibles importances (dans le sens où ils peuvent être facilement remplacés) devront être réalisés pour effectuer des tests, car les résultats trouvés dans la littérature restent très différents d'une étude à l'autre. En cas d'utilisation de l'acide nitrique, des tests chimiques à intervalles réguliers seraient à prévoir pour suivre la cinétique rapide de la décalcification par les acides forts. Lors de travail sur des prélèvements plus précieux (par exemple sur des chiens ayant reçu des injections de cellules souches dans le cadre du traitement de la parodontite), des clichés radiographiques (en cas d'autorisation d'accès au matériel) pourraient aussi permettre d'évaluer si les prélèvements sont prêts à être découpés et ainsi de minimiser le risque de les endommager inutilement. Il peut être remarqué que des tests chimiques n'ont pas été réalisés dans notre étude sur os murins. En effet ceux-ci présentant tous des tailles similaires, les résultats de l'étude n°1 ont permis d'établir un temps d'exposition adapté qui a ensuite été standardisé. Cette approche ne peut pas être envisagée pour les prélèvements canins dont la taille est plus variable et dont la présence de dent n'est pas systématique ce qui change la composition du prélèvement.

Si les approches énoncées ne conviennent pas, des essais sur os non décalcifiés avec les nouvelles résines à base de méthylmétacrylate pourraient également être envisagés.

### **Décalcification et résultats d'immunohistochimie**

La variabilité de la nature des anticorps utilisés en recherche et leur moindre robustesse de réactivité, comparé aux anticorps de diagnostic représentent des éléments critiques pour la validation des protocoles sur les tissus osseux, nécessitant une décalcification. Notre étude s'est attachée à valider les protocoles de marqueurs d'intérêt pour le laboratoire.

Les tests d'immunohistochimie réalisés après décalcification ont permis de valider les anticorps anti-CD45, anti-CD34, anti-CD3, anti- $\alpha$ SMA et anti-Ki-67 sur tissu osseux murins et les anticorps anti-CD34, anti-vimentine, anti-CD200 et anti- $\alpha$ SMA sur tissu osseux humains au sein du laboratoire. Le marqueur NGFR pourrait être travaillé à des dilutions beaucoup plus importantes pour essayer d'observer si les cellules cibles ressortent à travers cette coloration de tous les tissus.

Dans la littérature, les anticorps d'antigènes nucléaires semblent plus altérés par la décalcification que les autres<sup>20,38</sup>. La conservation des épitopes antigéniques du Ki-67 après décalcification par l'EDTA est donc encourageante, cependant il avait été constaté avec les résultats d'une étude préalable, qu'en cas de surexposition ces sites peuvent toutefois être endommagés par cet agent. Il est surprenant que dans notre étude les épitopes antigéniques du Ki-67 ne soient pas affectés. Le nombre de prélèvements par pot de solution était peut-être plus important, conduisant à une saturation de la solution plus rapide et finalement à une durée d'exposition moindre. Il pourrait être intéressant de répéter l'expérience. Une seule souris serait nécessaire, chaque os serait placé dans un pot unique de 60mL de solution d'EDTA pendant un, deux, trois ou quatre jours, en changeant la solution quotidiennement, puis un test à l'anticorps Ki-67 serait réalisé. Si dans ce contexte, le marquage se trouvait diminué, l'hypothèse de la saturation de la solution serait renforcée. Cependant le nombre de cassettes par pot utilisé pour l'étude n°1, est plus économique et plus proche de la réalité quotidienne du laboratoire où les os de plusieurs souris sont prélevés en même temps. Notre protocole ayant tenu compte des résultats des deux études, il reste à choisir pour le laboratoire.

L'anticorps anti-CD34 a révélé des cellules endothéliales et d'autres cellules de la moelle osseuse, probablement des cellules souches ou progénitrices de la lignée hématopoïétique. La vimentine permet d'observer les cellules stromales mais aussi les cellules endothéliales des fins capillaires. De nombreuses cellules se sont révélées CD45positives, elles appartiennent a priori à la lignée lymphocytaire, mais des stades immatures de la lignée des granulocytes sont aussi décrits comme pouvant présenter ce marquage. Ces résultats sont comparables à ceux décrits par LOYSON et al.<sup>13</sup>. Contrairement à l'anticorps anti-CD34, des cellules CD45positives n'ont pas été constatées sur tissus humains avec l'anticorps murin, il n'y a donc pas

de croisement entre les espèces, un clone spécifique humain doit donc être utilisé pour rechercher les cellules CD45 positives humaines. Comme dans l'étude de LOYSON et al., il a été observé des cellules CD3 positives sur tissus murins, correspondant au lymphocytes T, avec des résultats positifs également constatés sur les tissus contrôles. La densité de ces cellules est similaire à celle décrite dans cette étude. Des problèmes sont observés avec l'utilisation de l'anticorps anti-CD49a sur tissu humain. Les observations sont plutôt en faveur d'un problème avec l'anticorps utilisé que de l'absence de conservation des épitopes antigéniques

Concernant l'anticorps anti-PTHR1, les résultats des tissus humains contrôles positifs ne sont pas en faveur d'un problème avec l'anticorps lui-même. L'expression du gène du PTHR a été montrée *in vitro* sur des cellules stromales<sup>19</sup>, la présence de cellules marquées sur la moelle osseuse était donc attendue. Mais les artéfacts constatés gênent à l'interprétation et les caractéristiques de cellules marquées ne correspondent pas à celles attendues. Il ne peut pas être écarté que les artéfacts observés soient liés à la phase de décalcification. Toutefois, il n'est pas rapporté dans la littérature consultée, de cas où des anticorps n'ayant pas fonctionné après décalcification par l'EDTA, s'avèrent fonctionner avec d'autres décalcifiants. Une alternative pour l'observation des cellules PTHR1 positives en IHC est donc difficilement envisageable.

Il est dommage de ne pas avoir pu retrouver les cellules injectées chez la souris. La durée entre l'injection et le prélèvement des animaux était peut-être trop longue, et les cellules ont pu être détruites par l'organisme. Il pourrait à l'avenir être intéressant de prélever des souris plus précocement, voire à différentes cinétiques pour mieux évaluer l'évolution de ces cellules au sein de la moelle osseuse. Des contrôles positifs pourraient aussi être envisagés en utilisant une technique mise au point au cours d'une thèse expérimentale menée en parallèle de ce projet, utilisant de l'histogel, permettant d'obtenir des blocs de paraffine à partir de suspension de CSM cultivées.

Enfin la décalcification électrolytique a permis d'obtenir des résultats préliminaires satisfaisants et le temps de décalcification requis est effectivement considérablement réduit (deux heures uniquement pour les os murins). Plus d'essais doivent cependant être réalisés en IHC avant d'envisager son utilisation en routine.

## Conclusion

L'étude bibliographique réalisée dans la première partie montre la diversité des cellules contenues dans la moelle osseuse, et la fraction très restreinte de cette population constituée par les cellules souches mésenchymateuses. L'identification et la caractérisation de ces cellules passent par l'utilisation de différents marqueurs immunohistochimiques. Cette recherche est principalement réalisée sur os décalcifiés or l'étape de décalcification est une étape critique pour la conservation des épitopes antigéniques, indispensable pour l'utilisation de marqueurs immunohistochimiques. De nombreux projets de recherche sont menés depuis longtemps pour permettre d'établir des protocoles de décalcification douce, les plus conservateurs des prélèvements tout en étant les plus rapides possibles. Ces protocoles aboutissent à des résultats très variables voire parfois même contradictoires d'une étude à l'autre, et s'intéressent à de nombreuses structures osseuses nécessitant toutes des procédures de décalcification spécifiques. Ils nécessitent ensuite en plus des validations spécifiques pour chacun des anticorps utilisés sur les prélèvements décalcifiés.

Dans le cadre des projets de recherche sur les cellules souches mésenchymateuses menés au sein du laboratoire de l'ENVT, de STROMALab et de la Faculté Dentaire de Toulouse, des protocoles de décalcification spécifiques de leurs modèles d'études devaient être établis. Cela a été l'objet du travail expérimental présenté dans la seconde partie de cette étude.

L'utilisation de l'EDTA comme décalcifiant a permis d'obtenir des résultats satisfaisants et de valider plusieurs des marqueurs immunohistochimiques d'intérêt sur la moelle osseuse avec son utilisation. Nous avons été néanmoins confrontés à son principal inconvénient, rapporté dans la littérature, qui est le temps nécessaire à ce décalcifiant doux pour la décalcification de prélèvements de tailles importantes.

Si les temps de décalcification validés sur le modèle murins étaient inférieurs à ceux rencontrés dans la littérature, cela n'a pas été le cas pour le modèle canin dont la décalcification des prélèvements mandibulaires comprenant os et dent n'a pas pu aboutir. Ce dernier projet a cependant été l'occasion de réfléchir à d'autres protocoles envisageables et nous espérons que nos résultats permettront de faire gagner du temps aux chercheurs de la Faculté Dentaire de Toulouse.

Une alternative à l'EDTA a été explorée, la décalcification électrolytique. Un nombre réduit d'échantillons a été testé, et des résultats très satisfaisants ont été constatés avec cette technique, qui s'avère beaucoup plus rapide que la décalcification par l'EDTA. Il est maintenant nécessaire d'appliquer ce protocole d'étude à un plus grand nombre d'échantillon pour pouvoir le valider définitivement au laboratoire.



Les résultats de ce travail de validation vont maintenant être appliqués à la caractérisation de la population de CSM natives dans le modèle murin et sur tissus humains, au laboratoire de l'ENVT et Stromalab, et contribueront à la production de données scientifiques critiques en médecine régénérative.

## Bibliographie

1. Christopher JEROME & Benjamin HOCH. *Comparative Anatomy and Histology ; A mouse and Human Atlas*. (Piper M. TREUTING ; Suzanne M. DINTZIS).
2. James L. HIATT & Leslie P. GARTNER. *Atlas en couleur d'histologie*. (Pradel, 2012).
3. Walter BREHM, Claudia GITTEL, Janina BURK & Iris RIBITSCH. Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics. *Cell and Tissue Research ; Vol. 347* p 677–688 (2012).
4. Paolo BIANCO. 'Mesenchymal' Stem Cells. **30**, p 677 – 704 (2014).
5. Gregory S. TRAVLOS. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology ; Vol. 34* p 548–565 (2006).
6. Frédéric DESCHASEAUX, Charalampos PONTIKOGLOU & Luc SENSEBE. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. p103 – 115 (2010).
7. Frederic DESCHASEAUX *et al.* Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med,low phenotype. p 506 – 517 (2003).
8. Frédéric DESCHASEAUX & Pierre CHARBORD. Human Marrow Stromal Precursors Are a1 Integrin Subunit-Positive. *Journal Of Cellular Physiology ; Vol. 184* p 319 – 325 (2000).
9. P.J. SIMMONS & B. TOROK-STORB. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood. ; Vol. 78* p 55 – 62 (1991).
10. Marie C. GALMICHE, Victor E. KOTELIANSKY, Josette BRIBRE, Patrick HERVE & Pierre CHARBORD. Stromal Cells From Human Long-Term Marrow Cultures Are Mesenchymal Cells That Differentiate Following a Vascular Smooth Muscle Differentiation Pathway. *Blood ; Vol. 82, n°1* p 66–76 (1993).

11. Annette M. MULLER *et al.* Expression of the Endothelial Markers PECAM-1, vWf, and CD34 in Vivo and in Vitro. *Experimental and Molecular pathology* ; Vol. 72 p 221–229 (2002).
12. Basem M. ABDALLAH *et al.* CD34 defines an osteoprogenitor cell population in mouse bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research* ; Vol. 15 p 449–458 (2015).
13. S. A. J. LOYSON, L. H. P. M. RADEMAKERS , & P. JOLING, T.M. VROOM & J. G. VAN DEN TWEEL. Immunohistochemical analysis of decalcified paraffin-embedded human bone marrow biopsies with emphasis on MHC class I and CD34 expression. *Histopathology* ; Vol. 31 p 412–419 (1997).
14. Charalampos PONTIKOGLOU *et al.* CD200 expression in human cultured bone marrow mesenchymal stem cells is induced by pro-osteogenic and pro-inflammatory cues. *J. Cell. Mol. Med.* Vol. 20, n°4 p 655 – 665 (2016).
15. Jorge S. REIS-FIHO *et al.* Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR) in normal, benign and malignant breast tissue. *Modern Pathology* ; Vol. 19 p 307–319 (2006).
16. Giorgio CATTORETTI, Raffaella SCHIRO, Attilio ORAZI, Davide SOLIGO & Mario P. COLOMBO. Bone Marrow Stroma in Humans : Anti-Nerve Growth Factor Receptor Antibodies Selectively Stain Reticular Cells In Vivo and In Vitro. p 1726 –1738 (1993).
17. Ruth ALVAREZ, Hye-Lim LEE, Christine HONG & Cun-Yu WANG. Single CD271 marker isolates mesenchymal stem cells from human dental pulp. *International Journal of Oral Science* ; Vol. 7 205–212 (2015).
18. Bo O. ZHOU, Rui YUE, Malea M. MURPHY, James PEYER & Sean J. MORRISON. Leptin Receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* ; Vol. 15, n°2 p 154 – 158 (2014).
19. Chihiro YOSHIDA, Satoshi YAMAGUCHI, Shigehiro ABE & Kiyoshi HARADA. Property of Human Bone Marrow Stromal Cells Derived From Bone Fragments

- Removed in Sagittal Split Ramus Osteotomy. *J Craniofac Surg* ; Vol. 27 p 1104 – 1109 (2016).
20. Emilie VELOT, Nadia MESSADDEQ, Jean-Luc WEICKERT, Arnaud BIANCHI & Lydie VENTEO. Evaluation de différentes solutions de décalcification pour l'étude du cartilage : compatibilité avec les techniques d'histologie, d'immunohistochimie et d'hybridation in situ. *Rev. Fr. Histotechnol* **24**, p 115 – 127 (2011).
21. A. ISLAM et B. FRISCH. Plastic embedding in routine histology I: Preparation of semi-thin sections of undecalcified marrow cores. p 1263–1274 (1985).
22. R. YANG, C.M. DAVIES, C.W. ARCHER & R.G. RICHARDS.  
Immunohistochemistry Of Matrix Markers In TECHNOVIT 9100 NEW®-  
Embedded Undecalcified Bone Sections. *European Cells and Materials* ; Vol. 6 p 57–71 (2003).
23. Samirah Abreu GOMES *et al.* Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl metacrylate: an improved method for immunohistochemistry. *J Bone Miner Metab* ; Vol. 26 p 110–113 (2008).
24. Letícia Grando MATTUELA, Letícia Westphalen BENTO, Fabiana Vieira VIERPELISSER, Fernando Borba ARAUJO & Anna Christina Medeiros FOSSATI.  
Comparative analysis of two fixating and two decalcifying solutions for processing of human primary teeth with inactive dentin carious lesion. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS* ; Vol. 22, n°56 p 100 – 107 (2007).
25. Gayle CALLIS et Diane STERCHI. Decalcification of Bone : Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents. Methods. and Their Effects on Bone Histology. *J. Histotechnol. Vol 21 N°1* p 49–58 (1998).
26. Susana A GONZALEZ-CHAVEZ, César PACHECO-TENA, Cristina E MACIAS-VAZQUEZ & Eduardo LUEVANO-FLORES. Assessment of different decalcifying protocols on Osteopontin and Osteocalcin immunostaining in whole bone specimens of arthritis rat model by confocal immunofluorescence. *Int J Clin Exp Pathol* ; Vol. 6, n°10 p 1972–1983 (2013).

27. Supriya Nikita KAPILA, Srikant NATARAJAN, Karen BOAZ, Jay Ashokkumar PANDYA & Shanmukha Raviteja YINTI. Driving the Mineral out Faster: Simple Modifications of the Decalcification Technique. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* ; Vol 9, n°9 p 93 – 97
28. Sonia GUPTA, Manveen Kaur JAWANDA, S. M. MANJUNATH & Achla BHARTI. Qualitative Histological Evaluation of Hard and Soft Tissue Components of Human Permanent Teeth Using Various Decalcifying Agents - A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* ; Vol. 8, n°9 p 69 – 72 (2014).
29. Marilene Issa FERNANDES, Eduardo José GAIO, Cassiano Kuchenbecker ROSING, Rui Vicente OPPERMANN & Pantelis Varvaki RADO. Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. *Braz Oral Res* ; Vol. 21, n°2 (2007).
30. Archana SRINIVASYAIAH, Priyanka NITIN & Usha HEGDE. Comparison of Microwave Versus Conventional Decalcification of Teeth Using Three Different Decalcifying Solutions. *J Lab Physicians.* ; Vol. 8, n°2 p 106 – 111 (2016).
31. Karpagaselvi SANJAI *et al.* Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol.* ; Vol. 16 p 222–227 (2012).
32. N. A. ATHANASOU, J. QUINN, A. HERYET, C. G. WOODS & J. O'D McGEE. Effect of decalcification agents on immunoreactivity of cellular antigens. *J Clin Pathol* ; Vol. 40 p 874 – 878 (1987).
33. Hong MA, Yingli YANG, Emily YANDL & Errin ROBERTS. Comparison of Decalcification Methods on Rodent Femurs. *Histologic Technical Bulletin for Histochemistry* **XLI**, p 32–35 (2008).
34. Juliana DOS SANTOS NEVES *et al.* Influence of different decalcifying agents on EGF and EGFR immunostaining. *Acta Histochemica* ; Vol. 113 p 484 – 488 (2011).
35. K. N. NARESH *et al.* Optimal processing of bone marrow trephine biopsy: the Hammersmith Protocol. *J Clin Pathol* ; Vol. 59 p 903 – 911 (2006).

36. Calhoun D. CUNNINGHAM III, Bradley A. SCHULTE, Lynne M. BIANCHI, Peter C. WEBER & Barbara N. SCHMIEDT. Microwave Decalcification of Human Temporal Bones. *Laryngoscope* ; Vol. 111 p 278–282 (2001).
37. Elizabeth M. KEITHLEY, Tim TRUONG & Peter B. BILLINGS. Immunohistochemistry and microwave decalcification of human temporal bones. *Hearing Research* ; Vol. 148 p 192–196 (2000).
38. Tanja REINEKE *et al.* Ultrasonic Decalcification Offers New Perspectives for Rapid FISH, DNA, and RT-PCR Analysis in Bone Marrow Trepine. *J Surg Pathol* ; Vol. 30 p 892–896 (2006).
39. JC. ALERS, PJ. KRIJTENBURG, KJ. VISSERS & H. van Dekken. Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization and comparative genomic hybridization. EDTA is highly preferable to a routinely used acid decalcifier. *J Histochem Cytochem.* ; Vol. 47, n°5 p 703 – 710 (1999).
40. C. L. WICKHAM *et al.* Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies. *J Clin Pathol Mol Pathol* ; Vol. 53 p 19–23 (2000).
41. H. H. W. VERDENIUS *et L.* ALMA. A quantitative study of decalcification methods in histology. *J. clin. Path.* ; Vol. 11 p 229 – 236 (1958).
42. J. D. FRANK, R. BALENA, P. MASARACHIA, J. G. SEEDOR & M. E. CARTWRIGHT. The effects of three different demineralization agents on osteopontin localization in adult rat bone using immunohistochemistry. *Histochemistry* ; Vol. 99, n°4 p 295 – 301 (1993).
43. Victoria J. MADDEN & Miriam M. HENSON. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. *Hearing Research* ; Vol. 111 p 76–84 (1997).
44. A.D ROSEN. End-point determination in EDTA decalcification using ammonium oxalate. *Stniz Tchrzol* ; Vol. 56 p 48–49 (1981).

45. Lian A. BONDS, Pat BARNES, Kathryn FOUCAR & Cordelia E. SEVER. Acetic Acid–Zinc-Formalin : A Safe Alternative to B-5 Fixative. *Am J Clin Pathol* ; Vol.124 p 205– 211 (2005).
46. Tetsuro NAGASAKA *et al.* The Use of Archival Bone Marrow Specimens in Detecting B-Cell Non-Hodgkin’s Lymphomas Using Polymerase Chain Reaction Methods. *Leukemia & Lymphoma* ; Vol. 36, n°3-4 p 347 – 352 (2000).
47. Roberto N. MIRANDA, Hon Fong L. MARK & L. Jeffrey MEDEIROS. Fluorescent in Situ Hybridization in Routinely Processed Bone Marrow Aspirate Clot and Core Biopsy Sections. *American Journal of Pathology* ; Vol. 145, n°6 (1994).
48. E. E. TORLAKOVIC *et al.* ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, p 431–449 (2015).

# **Annexes**

**Annexe n°1 : Composition de la solution d'EDTA 10% pH 7,6, utilisée lors des différentes études de la partie II**

**Annexe n°2 : Déshydratation : Etapes de l'automate (MICROM, HMP 110)**

**Annexe n°3 : Protocole général pour l'immunohistochimie suivi au laboratoire de l'ENVT**

**Annexe n°4 : Protocoles spécifiques adaptés les marqueurs testés au laboratoire de l'ENVT**

**Annexe n°5 : Utilisation des contrôles positifs et négatifs. Cas de l'absence de marquage cellulaire**

**Annexe n°6 : Utilisation des contrôles positifs et négatifs. Cas de la présence de marquage cellulaire**



## **Annexe 1**

### **Composition de la solution d'EDTA 10% pH 7,6, utilisée lors des différentes études de la partie II**

1. Préparation d'une solution « stock » 20% pH 7,6 à partir de poudre d'EDTA disodium salt RPE-for analysis-ACS, CARLO ERBA
2. Préparation d'une solution « travail » :
  - 54mL de la solution EDTA « stock »
  - 10mL de PBS 10x
  - 36mL eau distillée

## **Annexe 2**

### **Déshydratation : Solutions d'immersion de l'automate (MICROM, HMP 110)**

#### **Prélèvements non décalcifiés :**

1. Formol 1 heure
2. Eau 30 minutes

#### **Prélèvements décalcifiés et non décalcifiés**

3. Alcool 80° 1 heure
4. Alcool 95° - bac n°1 – 1 heure
5. Alcool 95° - bac n°2 – 1 heure
6. Alcool 95° - bac n°3 – 1 heure
7. Alcool 100° - bac n°1 – 1 heure
8. Alcool 100° - bac n°2 – 1 heure et 30 minutes
9. Toluène - bac n°1 – 1 heure et 30 minutes
10. Toluène - bac n°2 – 1 heure et 30 minutes
11. Paraffine liquide – bac n°1 - 2 heures
12. Paraffine liquide – bac n°2 - 2 heures

## Annexe 3



### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

#### PROTOCOLE IHC SUR COUPES EN PARAFFINE : METHODE GENERALE

##### Matériel requis :

- Pipettes automatiques bio hit
- Ptlink ou bain-marie DAKO
- Autostainer DAKO
- Vortex

##### Réactifs communs à la technique IHC

- Peroxydase blocking (réf 2023 DAKO)
- PBS rinçage wash buffer (réf ZUC020-2500 DIAGOMICS)
- PBS diluant anticorps I et II (réf ABB500 MICROM)
- DAB (réf DAB530 DIAGOMICS)
- 

##### Autres réactifs

- Polymer HRP dual envision + (réf K4061 DAKO)
- Streptavidine – HRP (réf P0397 DAKO)
- Anticorps secondaire biotynylés :  
Chèvre anti lapin biotynilé (réf ABK125 MICROM)  
Lapin anti rat biotynilé (réf E0468 DAKO)  
Lapin anti chèvre biotynilé (réf E0466 DAKO)
- Target retrieval solution low (réf K8005- DAKO) pH et high pH (réf K8000- DAKO)

#### **Premières étapes : déparaffinage, réhydratation et démasquage**

##### Technique sans Pt link :

##### **Déparaffinage et réhydratation des coupes**

- 3x5minutes toluène
- 2x5minutes acétone
- 1x5minutes sous eau courante

##### **Démasquage antigénique (au choix):**

- 30minutes tampon citrate pH6
- 30minutes tampon EDTA pH8
- 10minutes tampon urée 6N
- Aucun démasquage

Le choix du tampon se fait en fonction de l'anticorps primaire, le démasquage est réalisé à chaud au bain marie 94-96°C puis suit un temps de refroidissement à température ambiante sur 20minutes, puis un passage dans l'eau distillée puis le PBS.

##### **Technique avec Pt link (une étape unique pour déparaffinage et démasquage) :**

30 minutes dans un tampon high ou low pH selon l'anticorps primaire, puis passage directement dans le PBS à température ambiante.

## Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

### Technique d'IHC à température ambiante

- Inhibition par peroxydase endogène (cinq minutes)
- Rinçage par l'eau distillée
- Passage dans le PBS
- Vingt minutes d'incubation dans du sérum normal pour blocage si nécessaire (même anticorps que l'anticorps secondaire)
- Soufflage du sérum sans rinçage
- Cinquante minutes d'exposition à l'anticorps primaire (ou over night 4°C, dans ce cas technique manuelle) puis rinçage par le PBS
- Trente minutes d'exposition à l'anticorps secondaire (polymer-HRP ou secondaire biotinylé) puis rinçage par le PBS
- Trente minutes d'exposition à la streptavidine – HRP si utilisation secondaire biotinylé, sinon passage en DAB
- Rinçage PBS
- Dix minutes d'exposition au chromogène DAB ou autre (AEC 20minutes)
- Rinçage à l'eau
- Contre coloration hématoxyline (temps en fonction du colorant)
- Rinçage à l'eau courante
- Déshydratation par l'éthanol 95 puis absolu puis par le toluène
- Montage des lames (collage des lamelles)

## Annexe 4



### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

#### PARTICULARITE DU PROTOCOLE IHC PAR MARQUEUR

Nom de l'anticorps	KI-67 clone sp6	
Référence	RM-9106-S (thermo-scientific)	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal lapin	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	aucun
	- Anticorps I	- Nature : lapin - Dilution : 1/200 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature : porc a-lapin biot réf ABK125-MICROM - Dilution : RTU - Temps incubation : 25min TA
	HRP	- Dilution : 1/500 réf P0397 – DAKO - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

Nom de l'anticorps	CD3-12	
Référence	MCA1477 (Abd serotec)	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal rat	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink high pH 30minutes ref K8000- DAKO
	- Démasquage	En même temps que Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : rat - Dilution : 1/100 - Temps incubation : overnight ON 4°C
	- Anticorps II	- Nature : lapin a- rat biot réf E0468-DAKO - Dilution : 1/200 - Temps incubation : 25min TA
	- HRP	- Dilution : 1/500 réf P0397 – DAKO - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

Nom de l'anticorps	CD45	
Référence	Sc-53665 (santa cruz)	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal rat	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : rat - Dilution : 1/200 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature : a- rat biot réf E0468-DAKO - Dilution : 1/200 - Temps incubation : 25min TA
	- HRP	- Dilution : 1/500 réf P0397 – DAKO - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

Nom de l'anticorps	CD34	
Référence	ab-81289 (abcam)	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal lapin	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink high pH 30minutes ref K8000- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : lapin - Dilution : 1/2000 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature : a-lapin biot réf ABK125-MICROM - Dilution : RTU - Temps incubation : 25min TA
	- HRP	- Dilution : 1/500 réf P0397 – DAKO - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB30-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

Nom de l'anticorps	Vimentine	
Référence	M0725 (DAKO)	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal de souris	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : souris - Dilution : 1/50 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature poly env dual réf K4061-DAKO - Dilution : RTU - Temps incubation : 30min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

Nom de l'anticorps	CD49a	
Référence	MAB2513	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal souris	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min Ptlink high pH 30minutes ref K8000- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : souris - Dilution : 1/100 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature poly env dual réf K4061-DAKO - Dilution : RTU - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

Nom de l'anticorps	Leptine	
Référence	GTX37636	
-Espèce -Mono ou poly	Polyclonal lapin	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min Ptlink high pH 30minutes ref K8000- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : lapin - Dilution : 1/100 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature : a-lapin biot réf ABK125-MICROM - Dilution : RTU - Temps incubation : 25min TA
	- HRP	- Dilution : 1/500 réf P0397 – DAKO - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

Nom de l'anticorps	PTHR1	
Référence	Ab104832	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal souris	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min Ptlink high pH 30minutes ref K8000- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : souris - Dilution : 1/200 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature poly env dual réf K4061-DAKO - Dilution : RTU - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

Nom de l'anticorps	NGFR	
Référence	Mab367	
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal souris	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min Ptlink high pH 30minutes ref K8000- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : souris - Dilution : 1/50 - Temps incubation : 50min TA
	- Anticorps II	- Nature poly env dual réf K4061-DAKO - Dilution : RTU - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

Nom de l'anticorps	CD200	
Référence	AF2724	
-Espèce -Mono ou poly	Polyclonal chèvre	
Technique	- Déparaffinage	Ptlink low pH 30minutes ref K8005- DAKO – 30min
	- Démasquage	En même temps Ptlink
	- Sérum normal	
	- Anticorps I	- Nature : chèvre - Dilution : 1/20 - Temps incubation : ON 4°C
	- Anticorps II	- Nature a-chèvre biot réf E0466-DAKO - Dilution : 1/400 - Temps incubation : 25min TA
	- HRP	- Dilution : 1/500 ref P0397-DAKO - Temps incubation : 25min TA
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530-DIAGOMICS - Temps d'incubation : 10min TA

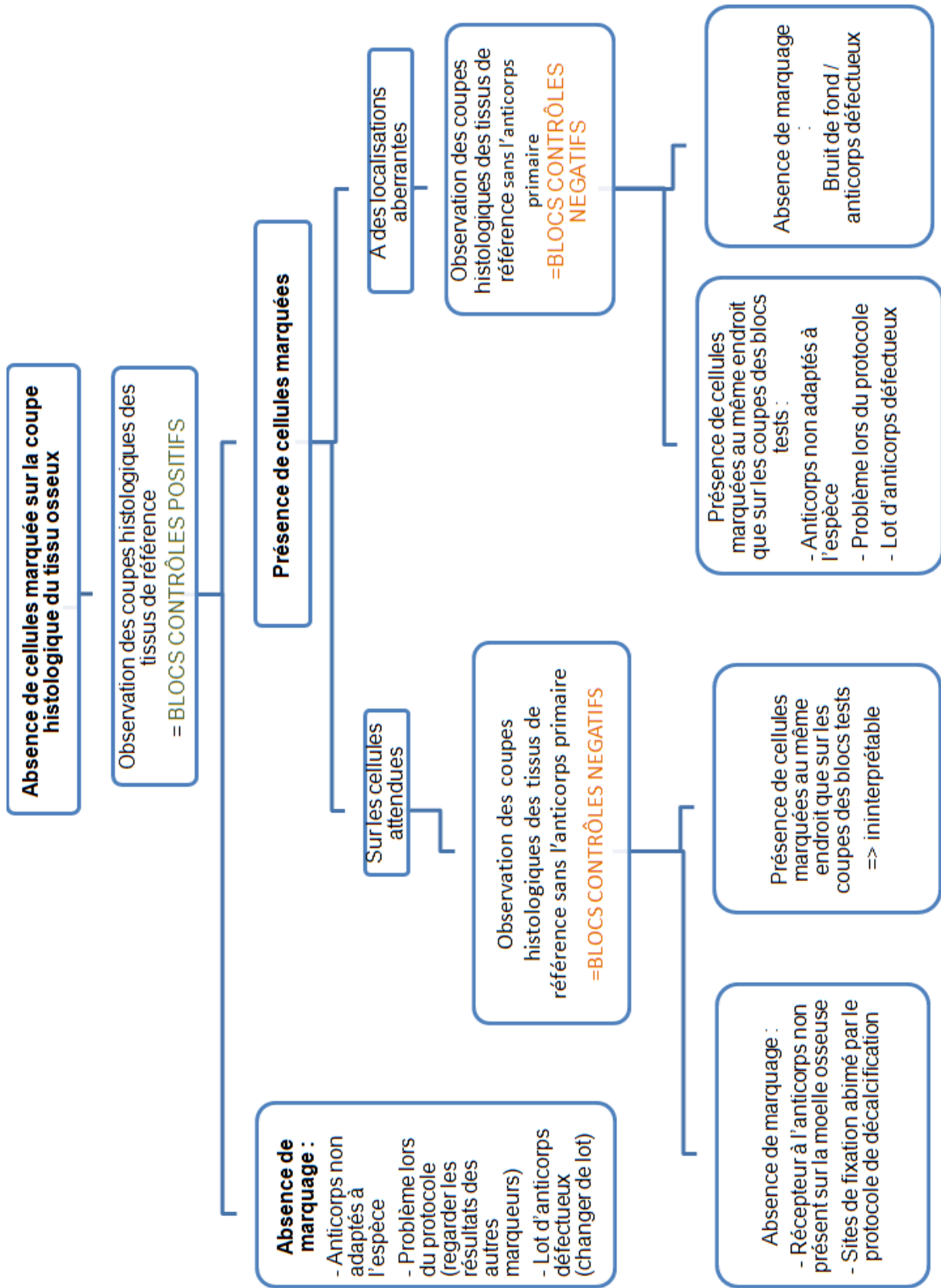


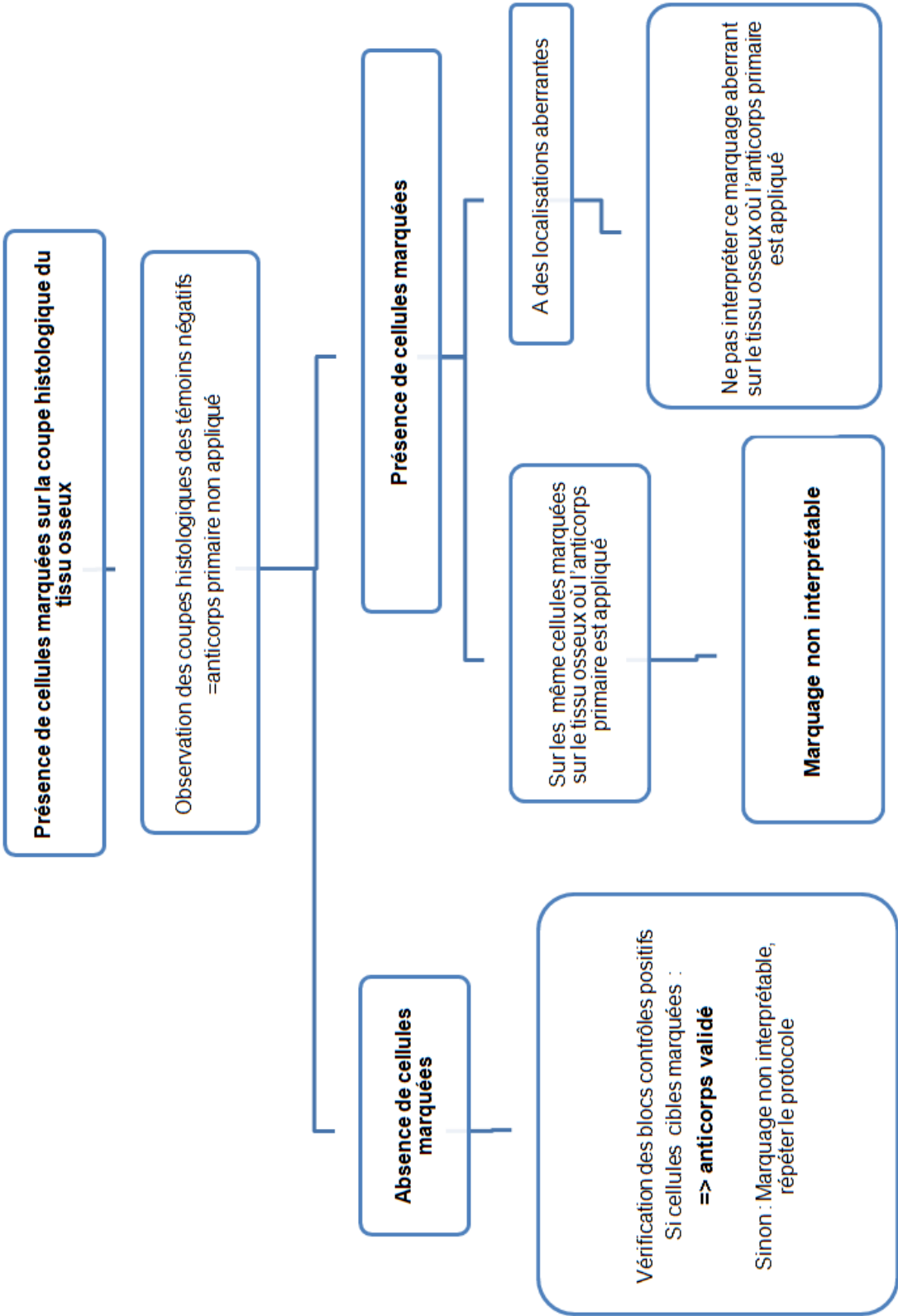
### Laboratoire d'histopathologie expérimentale et comparée

Nom de l'anticorps	$\alpha$ SMA
Référence	1A4 (rnd)
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal souris
-Dilution	1/50
Technique	envison peroxydase

Nom de l'anticorps	$\alpha$ SMA
Référence	HHF35 (DAKO)
-Espèce -Mono ou poly	Monoclonal souris
Dilution	1/25
Technique	Kit ARK ou envison peroxydase

Technique Kit ARK (lors d'anticorps anti souris utilisés chez la souris)	- Déparaffinage	
	- Hydratation	
	- Démasquage	
	- Inhibition peroxydase endogène 5min	
	- Rinçage eau distillée	
	- Anticorps I	- Nature : souris, biotinylé - Dilution : 1/25 pour HHF35 ; 1/50 pour 1A4 - Temps incubation : 15min TA
	- Rinçage	- Buffer 2x5min
	- Incubation	- Streptavidine – peroxydase - Temps incubation : 15min TA
	- Rinçage	- Buffer 2x5min
	Révélation	- Chromogène utilisé : DAB530- DIAGOMICS - Temps d'incubation : 5min TA
	- Rinçage eau distillée	
- Contre coloration		





**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Isabelle RAYMOND-LETRON, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BERNARD Julie** intitulée « **Contribution à l'identification des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse : validation de protocoles d'immunohistochimie sur os décalcifiés.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 12 octobre 2016  
Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Janick SELVES



Melle BERNARD Julie  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 23/06/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

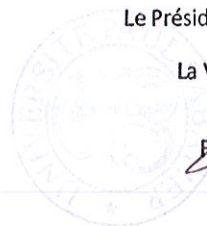
Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU

  
Régine ANDRE-OBRECHT



**Nom : BERNARD**  
**Prénom : Julie**

**CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE LA MOELLE OSSEUSE ; VALIDATION DE PROTOCOLES D'IMMUNOHISTOCHEMIE SUR OS DECALCIFIES**

**Thèse vétérinaire**, soutenue à Toulouse le 24 octobre 2016

**RESUME :** L'étape de décalcification est une étape critique lors de l'étude histologique de la moelle osseuse, en particulier pour la réalisation des marquages d'immunohistochimie. Dans cette étude nous réalisons une présentation des techniques actuelles de décalcification, et nous proposons d'adapter des protocoles de décalcification douce autorisant ensuite les marquages immunohistochimiques. Cette étude est centrée sur l'identification et la caractérisation des cellules souches mésenchymateuses natives de la moelle osseuse d'os décalcifiés humains et murins. Les marqueurs immunohistochimiques CD45, CD34, CD3,  $\alpha$ SMA et Ki-67 sur moelle osseuse murine et les marqueurs immunohistochimiques CD34, vimentine, CD200 et  $\alpha$ SMA sur moelle osseuse humaine, sont validés après décalcification par l'EDTA. Les marqueurs immunohistochimiques CD45 et CD34 sont également validés sur moelle osseuse murine après décalcification électrolytique. Ces méthodes s'appliquent à des coupes histologiques fixées au formol et incluses en paraffine.

Cette étude propose également différentes approches pouvant permettre la décalcification d'une structure calcifiée particulière : la dent.

**Mots clés :**

Cellule souche mésenchymateuse de la moelle osseuse (BM-MSC)  
Décalcification  
EDTA  
Immunohistochimie  
Moelle osseuse

**CONTRIBUTION TO THE IDENTIFICATION OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS ; VALIDATION OF IMMUNOCHEMISTRY PROTOCOLS ON DECALCIFIED BONES**

**ABSTRACT :** The decalcification step is a key step for examination of bone marrow histology, especially when immunohistochemistry needs to be performed. In this study, we present usual decalcifying techniques and we propose to adapt protocols to identify and characterize native bone marrow mesenchymal stem cells on decalcified human and murine. The immunohistochemical CD45, CD34, CD3,  $\alpha$ SMA and Ki-67 markers on murine bone marrow, and of immunochemistry CD34, vimentin, CD200 and  $\alpha$ SMA markers on human bone marrow are validated after decalcification with EDTA. Immunochemistry for CD45 and CD34 markers are also validated after electrolytic decalcification. We designed this techniques for histopathological analysis in formalin fixed - paraffin embedded tissues. This study proposed also different protocols for the special teeth structure decalcification.

**Key Words :**

Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC)  
Decalcification  
EDTA  
Immunohistochemistry  
Bone marrow