

Différenciation et étude fonctionnelle des précurseurs ostéoclastiques humains sur disque de dentine et sur la surface Corning® Osteo Assay



A. Fawad Faruqi et James Beltzer
Corning Incorporated Park Sullivan, NY 14831

Introduction

Les essais in vitro qui peuvent mesurer à la fois la différenciation et la fonctionnalité des ostéoclastes sont essentiels pour l'approfondissement des recherches sur le remodelage osseux normal et pathologique. L'accroissement de la résorption osseuse est un mécanisme clé dans des maladies telles que l'ostéoporose, les cancers métastatiques et la maladie de Paget. Le protocole de référence pour évaluer l'activité des ostéoclastes est à la fois long et difficile à quantifier. Les essais classiques utilisent des ostéoclastes primaires sur des coupes d'os ou de dentine pour évaluer la différenciation cellulaire. Un revêtement inorganique, développé spécifiquement par Corning sur des microplaques de polystyrène standard, peut être utilisé pour les essais in vitro et relève les défis généralement associés aux expérimentations sur l'activité des ostéoclastes. Les résultats de cette étude montrent que la nouvelle surface de culture peut constituer une alternative intéressante pour les essais de différenciation et d'analyse fonctionnelle des ostéoclastes primaires humains.

Une comparaison a été réalisée entre des cultures sur la surface Corning Osteo Assay et sur disques de dentine en utilisant des cultures des précurseurs primaires des ostéoclastes humains cultivés en présence de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), et de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand) qui stimulent la différenciation des ostéoclastes et leur activité. Les résultats démontrent que la différenciation des ostéoclastes peut être évaluée rapidement et avec précision sur la surface Corning Osteo Assay grâce à la coloration de la phosphatase acide tartrate résistante (TRAP). La visualisation en microscopie optique classique des cellules multi nucléées TRAP positives sur les disques dentine est difficile. L'activité des ostéoclastes peut être évaluée en mesurant la surface de disparition du revêtement minéral sur les plaques Corning Osteo Assay suivant un modèle de « lacunes de résorption », alors que cette activité est extrêmement difficile à visualiser sur des disques de dentine. En résumé, à la fois la différenciation et la fonctionnalité des ostéoclastes peuvent être facilement mesurés sur les surfaces Corning Osteo Assay, et les résultats sont cohérents et reproductibles pour les essais utilisant des précurseurs d'ostéoclastes tandis que l'utilisation de disques dentine pour des expériences similaires peut être problématique.

Matériels et méthodes

Cellules précurseurs des ostéoclastes humains

Des précurseurs ostéoclastiques humain (Cat Lonza. No. 2T110) sont rapidement décongelées et lavées avec le milieu Osteoclast Precursor Basal Medium (Cat Lonza. No. PT8201) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS), 2 mM de L glutamine et 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont été comptées et leur viabilité déterminée par coloration au bleu trypan. Les précurseurs ostéoclastiques humain ne peuvent pas être repiqués, toutefois les cellules peuvent se différencier en ostéoclastes en présence de ligand RANK (66 ng/mL) et de M-CSF (33 ng/mL). Les cellules précurseurs cultivées en présence de M-CSF mais sans ligand RANK soluble se diviseront, mais ne se différencieront pas en ostéoclastes fonctionnels. Toutes les cellules, y compris pour la culture de contrôle non différenciée, sont remises en suspension à une concentration finale de 50 000 cellules/mL. 100 μ l/puits de la suspension cellulaire sont déposés sur une plaque 96 puits Corning Osteo Surface Assay (Cat Corning. 3988XX1 n°) ou en plaque 96 puits polystyrène standard à laquelle est ajouté un disque de dentine (Immunodiagnostic Systems

Cat. AE8050 n °). Les cellules sont cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Après 5 à 7 jours de culture, les ostéoclastes se présentent sous la forme de grandes cellules multi nucléées en microscopie de phase. Le milieu est changé le jour 3 de la culture.

Dentine disques IDS

Les disques de dentine sont fournis stériles et sont manipulés en PSM pour maintenir la stérilité. Le contenu du récipient stérile est déposé sur une boîte de Pétri pour faciliter la manipulation. Des pinces sont utilisés pour transférer soigneusement les disques dans les microplaques 96 puits. Les disques ont été préalablement humidifiés pendant au moins une heure avec une solution tampon phosphate et la solution a été enlevée avant d'ajouter les cellules.

Quantification de l'activité phosphatase acide tartrate résistante et coloration des cellules

Afin d'analyser la présence du marqueur TRAP spécifique des ostéoclastes, un kit de coloration de B-Bridge international (Cat. n° AK04) a été utilisé. En bref, 30 uL de surnageant de culture a été ajouté à 170 ul de substrat chromogène qui a été dilué dans un tampon contenant du tartrate (3 mg / 5 ml comme décrit dans le kit). Les plaques ont été incubées pendant 3 heures à 37 ° C et l'absorbance lue à 540 nm dans un lecteur de microplaques (PerkinElmer ® victor3). Pour la coloration TRAP, les cellules ont été lavées avec 100 ul de PBS et fixées pendant 5 minutes avec le réactif fixateur à température ambiante. Les cellules ont été lavées trois fois avec de l'eau distillée, puis colorées pendant 20 à 60 minutes à 37 ° C avec le substrat chromogène et enfin lavée à l'eau distillée pour arrêter la réaction quand la couleur optimale a été obtenue. De plus longues incubations avec le chromogène provoquent une précipitation.

Mesure des lacunes de résorption

Pour analyser la surface des lacunes formées, le milieu est aspiré dans les puits au jour 5 et 100 ul d'une solution d'eau de Javel à 10% est ajouté. Les cellules sont incubées avec l'eau de Javel pendant 5 minutes à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés deux fois avec de l'eau distillée et séchés à température ambiante pendant 3 à 5 heures. Les lacunes individuelles ou par groupe sont observées en utilisant un microscope à un grossissement de 25 à 100x. Afin d'observer les lacunes de résorption à la surface de la dentine, les disques ont d'abord été colorés avec du bleu de toluidine 1% pendant 5 minutes (1).

Observation de la dentine

La coloration TRAP des cellules et les lacunes de résorption sur les disques de dentine sont visualisées à l'aide d'un microscope vertical (Nikon Eclipse ® 50iPOL) équipé du logiciel d'imagerie ColorView.

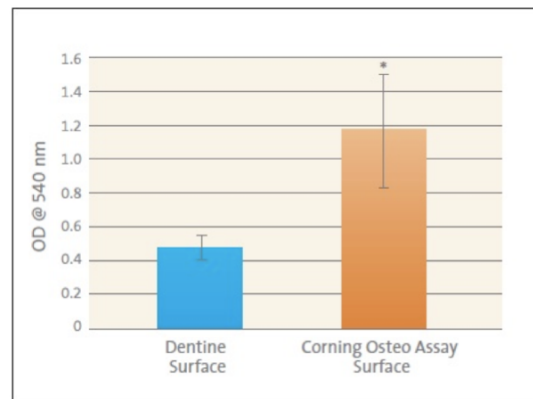
Résultats et discussion

Le test sur coupe osseuse, dans lequel les ostéoclastes en culture forment des lacunes de résorption sur un substrat minéral, a été largement utilisé pour étudier les effets de nombreux facteurs agissant sur la résorption osseuse et est considéré comme la méthode de référence (2,3). Cette technique a été largement utilisée pour étudier la résorption par les ostéoclastes humains soit isolés directement à partir d'os ou à partir de culture de moelle osseuse. Une avancée récente dans ce domaine a été le développement d'une technique d'induction de la formation d'ostéoclastes à partir de cellules du sang périphérique par l'ajout de ligand RANK (4). En utilisant cette technique un grand nombre d'ostéoclastes fonctionnels peuvent être générés qui forment des lacunes de résorption dans les substrats minéralisées.

Les précurseurs d'ostéoclastes humain Poietics®, qui ont été cultivés dans un milieu contenant du M-CSF et transférés en plaque 96 puits Corning ® Assay Osteo surface ou sur disque de dentine ont été traités sur 5 à 7 jours en présence de ligand RANK, puis testés

pour la production de TRAP soluble en utilisant le kit B-Bridge (décrit ci-dessus). La figure 1 montre une comparaison de l'activité TRAP dans le milieu de culture des précurseurs d'ostéoclastes humains cultivés sur Corning Osteo Assay Surface ou sur des disques dentine. Les cellules cultivées sur la surface Corning Osteo Assay expriment plus de deux fois l'activité TRAP dans le milieu par rapport à celles cultivées sur disques de dentine. Les disques de dentine présentent plusieurs contraintes pour la culture de tissus ; en particulier ils peuvent facilement être endommagés lors des manipulations. En outre, les disques peuvent flotter et ne pas remplir complètement le fond d'un puits de plaque 96 puits. Ces facteurs pourraient contribuer à la perte de cellules adhérentes à la surface de la dentine le résultat étant une valeur TRAP inférieure.

Figure 1 : activité TRAP dans le milieu de culture dérivés des précurseurs d'ostéoclastes humains cultivés sur Corning Osteo Assay Surface ou sur des disques dentine ($p < 0,05$)



Les ostéoclastes actifs et entièrement différenciés sont caractérisés par de grandes cellules multi nucléées qui sont positives à la coloration de la TRAP. La figure 2A montre les précurseurs des ostéoclastes humains qui ont été cultivés pendant 5 jours sur Corning Osteo Assay Surface puis fixés et colorés pour la détection de la TRAP comme décrit ci-dessus. Les cellules ont été colorées uniformément et présentent plus de 3 noyaux par cellule, ce qui caractérise les ostéoclastes différenciés. Les cellules préparées exactement de la même manière sur disques de dentine ne peuvent pas être visualisées ainsi car les disques de dentine ne sont pas transparents. Les observations sur disques de dentine nécessitent un équipement de microscopie particulier. La Figure 2B montre des cellules positives pour la coloration de la TRAP sur disques de dentine. La taille et le nombre de cellules sur la surface de la dentine sont beaucoup plus faibles que sur les cultures en plaques Corning Osteo Assay Surface. La surface de la dentine est très inégale et montre de nombreuses marques et rayures. Bien qu'il soit possible de visualiser cellules colorées positives pour la TRAP sur les disques, il est très difficile - voire impossible - de distinguer les différents noyaux, ce qui rend difficile la quantification des cellules avec 3 noyaux ou plus.

La résorption d'un substrat minéral tel que des coupes d'os ou des disques de dentine est la méthode de référence pour évaluer la fonction des ostéoclastes. La figure 3A montre les lacunes de résorption des précurseurs d'ostéoclastes humains cultivés sur les plaques Corning Osteo Assay Surface pendant 5 jours, puis supprimé par traitement à l'eau de Javel. Les lacunes sont nombreuses et bien visibles. Comme il a été indiqué ci-dessus, il n'est pas possible de visualiser ces lacunes de résorption sur des disques de dentine en utilisant un microscope inversé standard. En fait, l'utilisation d'un microscope droit en éclairage à fond clair n'est pas suffisante. La figure 3B montre les lacunes de résorption sur les disques de dentine qui ont été colorés au bleu de toluidine. La coloration donne des lacunes bleu foncées observables en dépit du bruit de fond important et les nombreuses marques et rayures mais rend la quantification difficile voir impossible.

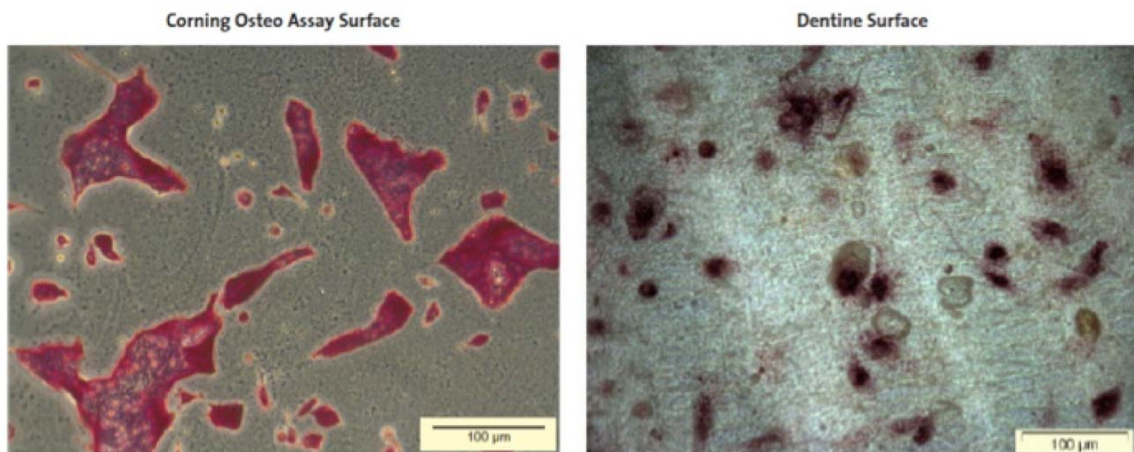


Figure 2 : précurseurs des ostéoclastes humains qui ont été cultivés pendant 5 jours sur Corning Osteo Assay Surface ou sur disque de dentine puis fixés et colorés pour la détection de la TRAP.

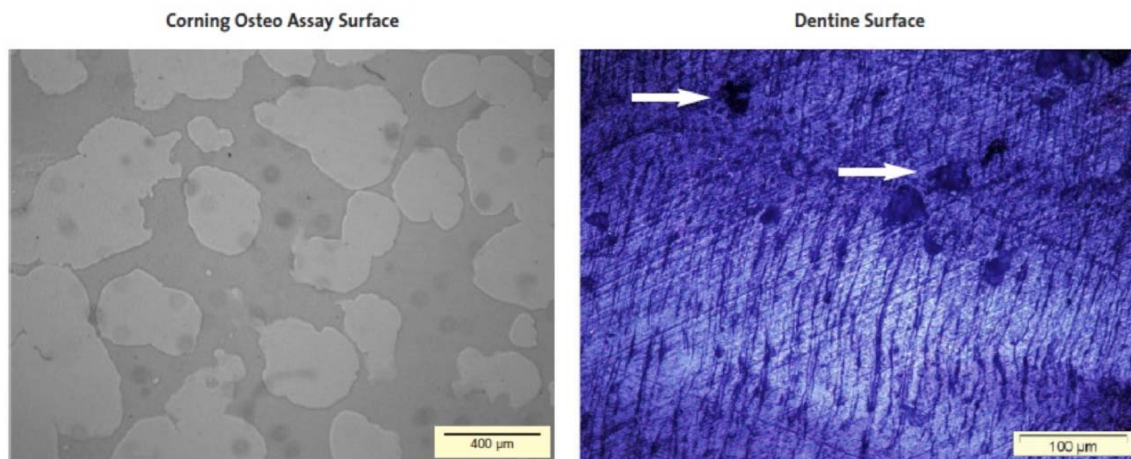


Figure 3 : lacunes de résorption des précurseurs d'ostéoclastes humains après 5 jours de cultures sur les plaques Corning Osteo Assay Surface ou sur disques de dentine. L'observation est effectuée sur la dentine après coloration au bleu de toluidine.

Conclusions

Il est démontré que la surface Corning Osteo Assay peut être utilisée pour mesurer aisément l'activité TRAP soluble, visualiser et quantifier les ostéoclastes différenciés multi nucléés présentant une coloration de la TRAP positive, et enfin visualiser les lacunes de résorption créées. A l'inverse, les disques de dentine sont difficiles à manipuler, fragiles et ne couvrent pas tout le fond des puits des plaques de culture. Nous pensons que ces contraintes de manipulation entraînent une limitation du nombre de cellules sur les disques de dentine et donc une valeur beaucoup plus faible de la TRAP soluble détectée. En fait, cette valeur a été plus de deux fois plus élevée sur la surface Corning Osteo Assay par rapport à ce qui a été observé sur disques de dentine.

La surface Corning Osteo Assay est une solution pratique pour la mesure du nombre d'ostéoclastes différenciés, car la coloration de la TRAP peut être facilement visualisée à l'aide d'un microscope inversé. L'uniformité et la clarté de la surface des plaques Corning rend le comptage des noyaux très aisé. Lorsque les cellules colorées sont observées sur les disques de dentine à l'aide d'un microscope vertical et un éclairage fond clair, les cellules sont beaucoup plus petites et moins nombreuses par rapport à ce qui a été observé avec la

surface Corning Osteo Assay. En outre, les imperfections de la surface des coupes rendent le dénombrement des noyaux impossible.

La visualisation et la quantification des lacunes de résorption induites par les ostéoclastes différenciés sont également faciles à réaliser sur la surface Corning Osteo Assay après enlèvement des cellules. Les lacunes sont nombreuses et assez grandes lorsqu'on les examine sous un microscope inversé, sans avoir à réaliser une coloration supplémentaire. Comme indiqué plus haut, la visualisation des lacunes sur les disques de dentine nécessite l'utilisation d'un microscope droit et d'un éclairage à fond clair. Il est en plus nécessaire de colorer les disques de dentine au bleu de toluidine. Les lacunes de résorption sont moins nombreuses et apparaissent plus petites. En raison du bruit de fond très important, il est également très difficile de déterminer leurs surfaces.

Références

Saftig, P. et al. Al. (1998). PNAS 95:1345313458.

Boyde, A., Ali, NN et Jones, SJ (1984). Br. Dent. J. 156:216220.

Chambers, TJ, Revell, PA, Fuller, K., et Athanasou, N. (1984). Sci J. Cell. 55:383399.

Itonaga, I., Sabokbar, A., Neale, SD, et Athanasou, NA (1999). Biochem. Biophys. Res. Comm. 264:590595.