Rev. Fr. Histotechnol., 2010, **23**, n° 1, p. 73 à 80

PEUT–ON PROUVER LA SPECIFICITE D'UN MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ?

André CALAS

Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, IINS, Unité CNRS 5297
Université Victor Segalen
146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX cedex

RESUME

La spécificité est la caractéristique le plus fréquemment associée à l'immunohistochimie. Elle n'est cependant pas à l'abri des faux positifs qui conduisent à tenter de définir les critères d'un marquage spécifique. On distingue classiquement la spécificité de l'anticorps (reconnaît-il l'épitope contre lequel il a été, en principe, obtenu ?) et celle de la réaction : le marquage observé correspond-il à la liaison de l'anticorps avec l'antigène recherché ?

La première spécificité est généralement testée par le fournisseur mais elle doit l'être par l'expérimentateur pour tout nouvel anticorps par les moyens habituels : RIA, ELISA, immunohistochimie sur tissus où la localisation de l'antigène est connue et, si l'on en dispose, examen d'un témoin négatif sur souris KO pour l'antigène.

La spécificité de la réaction doit être vérifiée chaque fois et pour chaque tissu. Elle dépend notamment en effet du protocole de préparation de l'échantillon biologique et singulièrement de la fixation. Celle-ci peut modifier la structure chimique de l'antigène qui n'est plus dans le tissu fixé l'antigène natif. Après avoir éliminé les réactions liées au seul marqueur (endogène comme exogène) et les liaisons électrostatiques des protéines-anticorps au tissu, il faut tenter de vérifier la spécificité de la réaction en retirant l'anticorps primaire, en utilisant un sérum pré-immun, en tentant de déplacer la liaison par des protéines plasmatiques banales voire par la protéine porteuse dans le cas d'haptènes. On doit enfin tenter de supprimer le marquage par épuisement de l'anticorps avec des concentrations croissantes d'antigène (ou mieux d'immunogène). Cependant, nous le verrons, tous ces contrôles n'éliminent pas la possibilité de réactions croisées des anticorps avec d'autres constituants tissulaires que celui recherché. Finalement les arguments les plus convaincants en faveur de la spécificité d'un marquage immunohistochimique sont sa cohérence avec, quand c'est possible, d'autres

types de marquages, comme les *Western-blots* ou l'hybridation *in situ* pour les peptides et les protéines et, bien sûr, avec les implications fonctionnelles des localisations décrites.

INTRODUCTION

Parmi les caractéristiques des réactions histochimiques (sensibilité, résolution, quantification..), la spécificité est celle que l'on affecte le plus volontiers aux marquages utilisant les anticorps. C'est également une des plus difficiles à démontrer et de nombreux contrôles et témoins sont nécessaires avant de pouvoir écrire que le marquage observé à l'aide d'un anticorps anti-X correspond probablement à X (1). Le but de cette mise au point est, après un rappel sur les partenaires de la réaction antigène-anticorps, de définir les différents types de spécificité puis les tests à réaliser afin de se convaincre soi-même de la validité des marquages observés puis d'en convaincre également les lecteurs de la publication et en premier lieu les referees..

La réaction antigène-anticorps

Elle met en jeu deux partenaires si étroitement dépendants que leur définition est presque tautologique :

- l'antigène (Ag) est une molécule dont un motif (séquentiel ou conformationnel dans le cas des peptides et des protéines), l'épitope, provoque la synthèse d'anticorps par l'organisme auquel il est administré, sous forme native ou lié comme haptène à une macromolécule vectrice (on parle alors d'immunogène).

- l'anticorps (Ac) est une immunoglobuline (Ig) plasmatique produite en réponse à l'administration de l'antigène (ou plus exactement de l'immunogène) et qui lie spécifiquement l'antigène en reconnaissant cet épitope.

Ainsi l'Ac, macromolécule dont la structure est inconnue, est identifié par sa reconnaissance de l'antigène. Réciproquement, l'antigène présent dans les préparations tissulaires ou cellulaires, généralement sur coupes fixées, n'est pas le plus souvent la molécule native ni même celle couplée au sein de l'immunogène (2, 3) et c'est la reconnaissance d'un de ses épitopes par l'anticorps qui permet de l'identifier tout en le localisant. Je dis souvent à mes étudiants que l'immunohistochimie (à la différence de l'hybridation *in situ*) est la recherche d'une molécule qu'on ne connaît guère à l'aide d'un réactif qu'on connaît moins encore, seul leur mariage permettant de les identifier tous les deux. On voit donc l'importance que revêtent la spécificité de la réaction Ag-Ac sur la préparation histologique et les contrôles qui permettent de l'approcher, sinon de l'assurer. Nous parlerons essentiellement ici des réactions les plus utilisées, celles d'immunohistochimie indirecte où le signal repérable est porté par un deuxième anticorps, dit secondaire, dirigé contre l'espèce qui a permis d'obtenir l'anticorps primaire (en fait contre le fragment Fc de ses immunoglobulines).

Les différents types de spécificité

On distingue classiquement deux types de spécificité (4) mais en fait ces deux catégories se chevauchent :

1- Spécificité de l'anticorps : Est-ce que l'anticorps anti-X reconnaît X ? (5)

Ces tests sont en principe réalisés par le fournisseur ou par celui qui a obtenu l'an-

ticorps. Mais certains seront utilement effectués par vous en cas de nouvel anticorps. Il s'agit de tests de compétition par RIA mais surtout ELISA, *dot-blot* ou encore le Biacore. Grâce aux tests ELISA ou, plus simplement, à des gels de gélatine (3), vous pouvez même évaluer la susceptibilité de la réaction aux fixateurs ou déterminer de possibles réactions croisées avec des antigènes hétérologues connus de structure voisine. Vous pouvez aussi, comme avec le Biacore, évaluer l'affinité de vos anticorps. Entrent également ici les tests de spécificité sur des tissus connus et constituant des témoins positifs ou négatifs. Parmi ces derniers, il faut mentionner les souris KO et les autres modèles d'inactivation génique pour une protéine donnée où celle-ci (et éventuellement les métabolites qui en dépendent) ne doit plus être décelable. Il faut aussi noter, pour les neuromédiateurs, les témoins négatifs issus de leur déplétion pharmacologique.

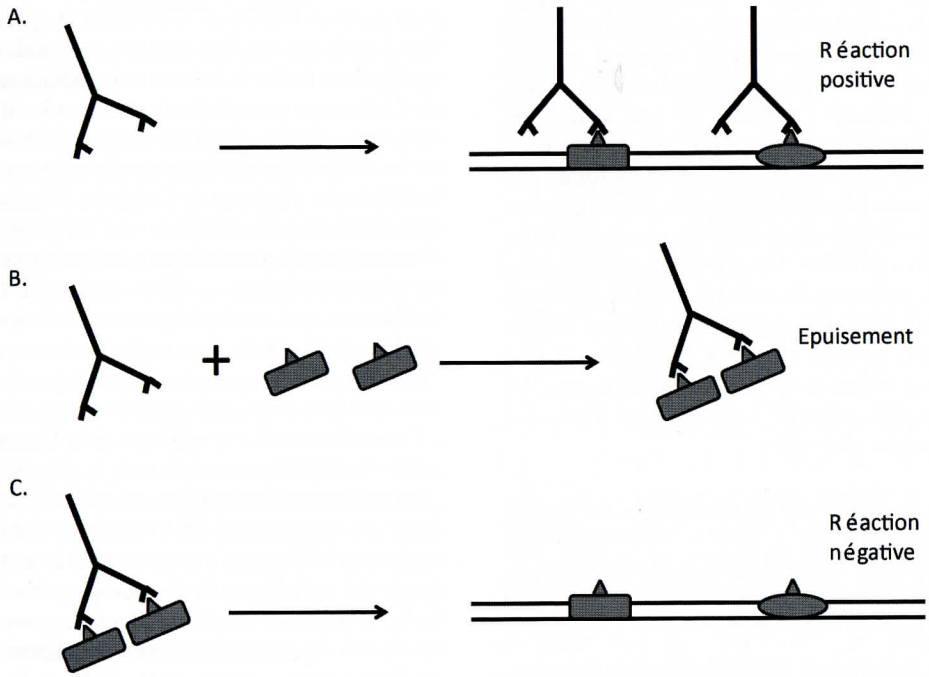
2- Spécificité de la liaison : est-ce que la réaction que j'observe correspond à la liaison de l'anti-X avec X, et seulement X, dans mon tissu ou ma cellule et dans mes conditions expérimentales ?

Il faut tout d'abord éliminer les réactions parasites dues à la présence de marqueurs déjà présents dans le tissu, fluorophores, peroxydase voire biotine endogènes notamment. La comparaison avec des préparations sans anticorps secondaire permet de les identifier et un traitement préalable des coupes par l'eau oxygénée (avec éventuellement 50% de méthanol) d'inactiver les peroxydases tissulaires (hématies..). De même dans le cas d'identification de molécules exogènes *(Green Fluorescent Protein, GFP ; Bromo deoxy-Uridine, BrdU..)* les réactions doivent bien sûr disparaître en leur absence.

Un autre paramètre à éliminer est la liaison non-spécifique de protéines au tissu. On peut la supprimer par des protéines sériques *(Bovine Serum Albumin,* BSA..) et/ou par neutralisation des charges avec un excès de lysine.

Pour les réactions d'IHC indirecte, on peut préciser l'analyse en étudiant la spécificité de la liaison de l'anticorps secondaire (6). Pour éviter la liaison non-spécifique de l'anticorps secondaire (par exemple aux récepteurs de Fc, (6), il est utile de prétraiter les coupes par des immunoglobulines de l'espèce qui a permis de l'obtenir. L'omission de l'anticorps primaire ou l'utilisation d'un sérum pré-immun (qui peuvent apporter d'autres artefacts .., Cf 7) sont des tests minimums qui ne renseignent en fait que sur la spécificité de liaison de l'Ac secondaire. En effet les marquages qui disparaissent sont tous ceux, spécifiques ou non, dus à l'Ac primaire. La spécificité de la liaison entre l'anticorps secondaire et le primaire peut également être vérifiée en utilisant des anticorps secondaires différents (avec éventuellement différents marqueurs : si le marquage est spécifique de l'anticorps primaire, les résultats doivent être identiques avec les divers Ac secondaires mais également en fluorescence, peroxydase, PAP ..). Les contrôles de la spécificité de la liaison de l'anticorps secondaire sont particulièrement importants dans le cas des marquages multiples (6).

La réalisation de *Western-blot* sur votre tissu qui doit, dans l'idéal, ne donner qu'une seule bande est aussi très utile. La présence de plusieurs bandes (qui peuvent être dues aussi à la dégradation de la protéine) doit vous alerter sur de possibles réactions croisées. Attention aux anticorps qui vont reconnaître une protéine native ou dénaturée (selon l'immunogène utilisé) : souvent les



Figures 1 : En cas de croisement (A), l'épuisement par l'antigène (B) abolit toute réaction, spécifique ou croisée (C). Ce résultat n'est donc pas une preuve de la spécificité de la réaction immunohistochimique

Western-blots sont faits en conditions dénaturantes alors que les anticorps ont été obtenus contre une protéine native (7).

Les tests de compétition sont les plus satisfaisants : tenter de déplacer la liaison par des concentrations croissantes de protéines banales ou, en cas d'haptène, de celle ayant servi à fabriquer l'immunogène. Ces tests doivent être négatifs. Par contre la pré-incubation de l'Ac avec des concentrations croissantes d'antigène ou, pour les haptènes, d'immunogène, doivent éteindre la réaction ou la diminuer de façon proportionnelle à la concentration de la molécule en compétition (pour les haptènes, l'adsorption sera moins efficace et nécessitera une concentration dix fois supérieure à celle de l'immunogène). Ce test prouve que la molécule ajoutée s'est fixée sur les sites de liaison de l'anticorps. Il impose bien sûr de disposer de l'antigène. Si ce n'est pas le cas, il faut s'en tenir aux autres tests et notamment à ceux mentionnés ci-après. MAIS, S'IL EST REALISABLE, CE TEST, NECESSAIRE, N'EST PAS SUFFISANT ET, MEME EN CAS D'EXTINCTION, IL NE PERMET PAS D'AFFIRMER QUE VOTRE Ac NE RECONNAIT PAS, DANS VOTRE TISSU ET VOS CONDITIONS EXPERIMENTALES, UN EPITOPE PRESENT DANS D'AUTRES MOLECULES QUE CELLES QUE VOUS RECHERCHEZ *(cf.8)* (Figures 1).

Finalement, les meilleurs contrôles sont ceux qui recoupent vos résultats par d'autres approches : utilisation d'anticorps contre d'autres parties de la molécule ou contre un précurseur, couplage de l'immunocytochimie avec l'hybridation *in situ* ou la RT-PCR sur cellule unique, analyses biochimiques *(immunoblotting,* purification et séquençage des protéines). Quand il ne s'agit pas de peptide ou de protéine, comparaison avec d'autres méthodes de marquage comme, pour l'identification du phénotype chimique des neurones, l'uptake des neuromédiateurs (radioautographie). La comparaison de la distribution des marquages avec des résultats antérieurs et/ou utilisant d'autres anticorps contre la même molécule est également très utile mais pas forcément décisive...

Ainsi, à la question posée : « Peut-on prouver la spécificité d'un marquage immunohistochimique ? », la réponse est négative. On ne peut qu'approcher cette spécificité. La mise en évidence (ou la vérification) de la fonction d'une molécule identifiée à un emplacement donné (si X est là, est ce que son rôle correspond à sa localisation ?) est, *in fine,* la meilleure assurance de la validité de l'immunolocalisation.

Recommandations pour la présentation de résultats d'immunohistochimie (9)

1 - Donner l'information la plus complète possible sur l'anticorps (ou, le plus souvent, l'immun-sérum) :

- Indiquer la source de l'anticorps (Ac) :

• si commercial, nom du fournisseur, ville, n° du catalogue et, si possible, du lot (en conserver une petite fraction pour d'éventuels compléments ou contestations, aucun lot, mélange souvent de plusieurs saignées, n'étant identique à un autre).

• si donné par un collègue, numéro de code et si possible de la saignée

- Décrire l'obtention de l'Ac :

• dire mono - ou polyclonal, l'espèce immunisée et donner la structure de l'immunogène, par exemple *« peptide de synthèse comprenant les amino-acides 121-142 de la tyrosine-hydroxylase »* ou bien : *« cet Ac monoclonal de souris, donné par X, université Y, a été préparé contre la choline acétyl-transférase de placenta humain »*

- Dire comment l'Ac a été caractérisé :

S'il est dirigé contre une grosse protéine : que colore-t-il sur un gel à partir du tissu de l'espèce étudiée? Cette information est généralement donnée par le fournisseur ou par des études antérieures. On pourra écrire par exemple, *« l'Immun Serum (IS) colore une seule bande de 55 kD sur Western blot (fournisseur) »* ou bien : *« l'IS marque la forme de 150 kD mais non celles de 130 et 110 kD de la molécule sur Western-blot ; cf., Figures 1»*

- Dire *« Cet Ac a déjà été caractérisé par X et Y »* n'est pas suffisant

2 - Indiquer les contrôles réalisés pour assurer (ou pour approcher) la spécificité du marquage, sachant qu'aucun contrôle ne permet d'éliminer la possibilité d'une réaction croisée avec un épitope commun à la molécule que vous recherchez et à une autre. Celle-ci peut être voisine (même famille) ou éloignée et l'épitope commun aura pu être créé par les traitements histologiques et notamment la fixation.

L'Editeur de JCN (9) donne une série de phrases-types de valeur variable, les deux dernières étant les plus faibles, concernant les contrôles de spécificité effectués :

- On n'observe pas de marquage si l'Ac est utilisé sur un tissu de souris KO pour la protéine (peut concerner la protéine étudiée ou des molécules métaboliquement en aval). Ce test est généralement réalisé, s'il est possible, par le fabricant de l'anticorps, *cf.* plus haut, spécificité de l'anticorps

- Pas de marquage quand 1ml de l'Ac primaire dilué a été préincubé avec X micro- ou nanogrammes du peptide d'immunisation (cf plus bas, protocoles pour l'épuisement)

- La réaction Immunocytochimique pour ce peptide ou cette protéine est colocalisée avec l'hybridation in situ de son ARNm

- Cet Ac, dirigé contre les 13 aminoacides N-terminaux de la protéine, donne la même distribution du marquage qu'un autre Ac contre le fragment C-terminal de la protéine (cf. X et Y, 2003)

- La distribution du marquage de la Tyrosine Hydroxylase (TH) dans le Tronc Cérébral est identique à celle déjà décrite à ce niveau (X et Y, 1998)

- L'Ac anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) marque seulement des cellules qui présentent la morphologie classique des astrocytes fibreux (Figure 2 ; X et Y, 1993)

Deux ou trois de ces assertions peuvent suffire et figurer dans un tableau. L'essentiel est, comme d'habitude, que votre manip et vos résultats puissent être reproduits par d'autres chercheurs. Il faut rappeler à nouveau que l'omission de l'Ac primaire ne renseigne que sur la spécificité du secondaire.

Epuisement d'un immun-sérum : qu'est ce qu'un « excès » d'antigène ?

Cf (10) (1) et Y. Tillet, com. Pers. (2)

Deux façons simples de définir ce qu'est un antigène en excès pour préadsorber un anticorps :

1 - Diluer l'anticorps de 10 en 10 jusqu'au point où la réaction sur les sites d'intérêt est à peine perceptible. Doubler cette concentration. On a alors une dilution pour laquelle une réduction de 50% ou davantage de la disponibilité en anticorps éliminera presque totalement le marquage. L'addition d'une plus grande quantité d'Antigène (*cf* plus bas) doit bloquer la réaction sur le tissu et dans les conditions observées.

2 - Considérant que les immunoglobulines G (IgG) ont une masse moléculaire approximative de 150.000 et que leur concentration dans le sérum d'un animal immunisé est de l'ordre de 10 mg/ml soit $[IgG] = 10^{-2} / 1,5\ 10^{5} = 0,66\ 10^{-7}$ mole/ml

- comme les Ac sont bivalents, il faudra deux fois plus d'Ag pour les neutraliser soit : $1,32\ 10^{-7}$ mole

- pour un peptide de 10 résidus acides aminés, la masse moléculaire est de l'ordre de 1000 (10 fois 100), la quantité d'antigène nécessaire pour saturer 1 ml d'immun sérum pur est donc de :

$1000 \times 1,32\ 10^{-7} = 1,32\ 10^{-4}$ g soit 132 µg/ml d'immun sérum pur.

- pour 1ml de sérum dilué au 1/1000, cela fait rajouter132 ng

A partir de cette valeur toute théorique (et déjà en excès puisque dans les 10 mg d'IgG sériques il y a seulement 1% de celles d'intérêt) il faut faire quelques points de dilution, 10 à 1000 fois plus et 10 à 100 fois moins par exemple, qui doivent encadrer la quantité réellement inhibitrice. Etant donné que la saturation des anticorps se fait surtout par déplacement (on sature le sérum avant de le mettre sur la coupe) le succès de l'inhibition dépend de l'affinité des anticorps pour l'antigène.

Avec cette méthode de calcul, qui n'est en toute rigueur valable que pour des anticorps monoclonaux mais qui donne d'utiles ordres de grandeur, la quantité d'antigène à rajouter est bien sûr très liée à sa masse moléculaire.

NB : 1) Il n'est pas indispensable d'éteindre totalement la réaction. Une diminution proportionnelle à la quantité d'antigène ajouté est le plus souvent suffisante.

2) Il est fréquent de traiter l'antisérum ou l'anticorps primaire par un trop grand excès d'antigène (de l'ordre du mg /ml) et d'inhiber ainsi par les impuretés présentes dans la préparation antigénique les anticorps développés contre ces impuretés. Il est donc important de faire des gammes de concentrations d'antigène (7).

3) Les tests d'épuisement par tous les antigènes détectés sont particulièrement importants en cas de leur colocalisation dans la même structure.

4) Dans l'idéal il faudrait au préalable épuiser l'anticorps avec tous les antigènes parasites susceptibles d'être présents dans la coupe (11) (c'est parfois possible pour des antigènes hétérologues de structure voisine comme l'ocytocine et la vasopressine, *cf* 12) mais cela suppose le problème résolu et l'on retrouve ici l'obstacle fondamental de la définition tautologique des antigènes et des anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

1. PRADIDARCHEEP W., LABRUYERE W.T., DABHOIWALA N.F. & LAMERS W.H. Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J. Histochem. Cytochem.,* 2008, **56** (12), 1099-1111
2. BURRY R. W. Specificity controls for immunocytochemical methods, *J. Histochem. Cytochem.,* 2000, **48**, 163-166
3. SCHIPPER J. & TILDERS F.J.H. A new technique for studying specificity of immunocytochemical procedures: specificity of serotonin immunostaining. *J. Histochem. Cytochem.,* 1983, **31** (1), 12-18
4. PETRUSZ P., SAR M., ORDONNEAU P. & DIMEO P. Specificity in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.,* 1976, **24**, 1110-1112
5. ADLE-BIASSETTE H., GRASSI J., VERNEY C., WALKER F., CHOUDAT L. & HENIN D. Les contrôles nécessaires en immunohistochimie: de la recherché au diagnostic. Comment valider un anticorps ? *Ann. Path.,* 2007, **27** (1), 16-26
6. BURRY R. W. Controls for immunocytochemistry. An update, *J. Histochem. Cytochem.,* 2011, **59**, 6-12
7. GARAUD J. C. et ROUSSEL Y. Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. Théorie et pratique. 2007, http://myrte.u-strasbg.fr/IHC/IHC_manuel/IHC.pdf
8. HOLMSETH S., LEHRE K.P. & DANBOLT N.C. Specificity controls for immunocytochemistry. *Anat. Embryol.,* 2006, **211** (4), 257-266
9. SAPER C.B. An open letter to our readers on the use of antibodies. *J. Comp. Neurol.,* 2005, **493**, 477-478
10. SAPER C.B. & SAWCHENKO P.E. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.,* 2003, **465**, 161-163
11. SWAAB D.F., POOL C.W. & VAN LEEUWEN F.W. Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining? *J. Histochem. Cytochem.,* 1977, **25** (5), 388-391
12. VAN LEEUWEN F. Pitfalls in immunocytochemistry with special reference to the specificity problem in the localization of neuropeptides *Am. J. Anat.,* 1986, **175**, 363-377

REMERCIEMENTS :

Je remercie vivement Yves Tillet et Philippe Ciofi pour leur relecture du manuscrit ainsi que Cedric Peirs pour son illustration.