

Les contrôles nécessaires en immunohistochimie : de la recherche au diagnostic

Comment valider un anticorps ?

Homa Adle-Biassette^(1,2), Jacques Grassi⁽³⁾, Catherine Verney⁽²⁾, Francine Walker⁽¹⁾, Laurence Choudat⁽¹⁾, Dominique Hénin⁽¹⁾

(1) Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henry Huchard, 75877 Paris.

(2) Inserm, U676, Hôpital Robert-Debré, 75019 Paris.

(3) Programme transversal « Technologies pour la santé », Bâtiment 136, point courrier N° 18, CEA/Saclay, 91191 Gif sur Yvette cedex.

Adle-Biassette H, Grassi J, Verney C, Walker F, Choudat L, Hénin D. Les contrôles nécessaires en immunohistochimie : du diagnostic à la recherche. Comment valider un anticorps ? Ann Pathol 2007 ; 27 : 16-26.

Summary

The importance of controls in immunohistochemistry: how to validate an antibody, from research to diagnosis

The specificity of an immunohistochemical reaction is guaranteed by two sets of controls. Positive controls verify the specificity of the primary antibody and demonstrate that it binds only to the protein which was used as an immunogen. Negative controls ensure that the labelling technique is specific and that

the primary antibody is responsible for generation of the immunostaining. In fact, the production of a labelling may also be related to cross reactivity or to non-specific physical or chemical interactions. This paper reviews the characteristics of various epitopes and antibodies, describes different strategies which prove the specificity of the immunohistochemical reaction in research or diagnostic pathology and point towards the essential information which should be reported in a paper. ♦

Key words: immunohistochemistry, controls, quality, antibodies.

Résumé

La spécificité d'une réaction immunohisto-chimique est vérifiée par deux types de contrôles. Les contrôles positifs attestent la spécificité de l'anticorps, c'est-à-dire démontrent que l'anticorps reconnaît la même protéine que celle utilisée comme immunogène. Les contrôles négatifs garantissent la spécificité de la technique de détection en vérifiant que le marquage identifie bien l'anticorps primaire fixé au tissu. En effet, l'obtention d'une réaction « colorée » peut être liée à la fixation des

anticorps sur des épitopes croisés ou des réactions non spécifiques physiques ou chimiques. Après un rappel sur les différents types d'épitopes, les caractéristiques et la fabrication des anticorps, cet article développe les différentes stratégies permettant de démontrer la spécificité de l'immunohistochimie dans le cadre du diagnostic ou de la recherche et précise les données indispensables à la publication et l'analyse d'un article. ♦

Mots-clés : Immunohistochimie, contrôles, qualité, anticorps.

Accepté pour publication le 3 mars 2007.

Tirés à part :
H. Adle-Biassette,
voir adresse
en début d'article.
e-mail :
homa.adle@bch.aphp.fr

Introduction

L'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation *in situ* sont des outils

essentiels qui permettent de préciser les événements moléculaires à l'échelle cellulaire et tissulaire. Le domaine d'application de l'IHC s'est aujourd'hui considérablement élargi.

Il existe en effet de nombreux anticorps disponibles. La technique est devenue, au moins en apparence, facile et standardisée. Elle reste néanmoins semée d'embûches et les pathologistes savent bien que l'obtention d'une réaction colorée n'est pas suffisante pour prouver la spécificité d'un marquage. Cependant de nombreux articles sont publiés avec des résultats discutables ou erronés. Il faut donc s'assurer de la qualité des techniques et revenir sur les contrôles nécessaires pour valider les résultats, qu'ils soient à visé diagnostique ou expérimentaux. La spécificité de l'IHC est vérifiée par des contrôles négatifs qui garantissent que la technique de marquage identifie bien l'anticorps fixé au tissu et des contrôles positifs qui attestent que l'anticorps est fixé à la molécule appropriée. Le but de cet article, à la suite d'éditoriaux récents, est d'éveiller la vigilance des anatomopathologistes, des chercheurs, des lecteurs et des reviewers dans l'interprétation et la fiabilité des résultats obtenus en IHC pour la recherche ou pour le diagnostic [1-3].

Rappels sur les caractéristiques des anticorps

La plupart des anticorps (IgG, IgD, IgA et IgE) possèdent deux sites de fixation aux antigènes identiques qui peuvent être dissociés et isolés (fragments Fab, Fab') par voie biochimique ou génétique. Le site de reconnaissance de l'antigène par un anticorps est constitué par l'assemblage des domaines variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL). Seules les macromolécules (protéines, polysaccharides, lipides, acides nucléiques de PM > 5 000 Da) ont la capacité de déclencher une réponse immunitaire aboutissant à la sélection d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement « l'antigène » immunisant. Cependant, on sait depuis longtemps produire des anticorps contre des petites molécules (haptènes) en immunisant des animaux avec des préparations « d'immunogènes » contenant l'haptène couplé chimiquement à une macromolécule porteuse. Les macromolécules comportent plusieurs « déterminants » ou « épitopes » qui sont les éléments structuraux présents à la surface des antigènes directement impliqués dans l'interaction avec le site de liaison de l'anticorps. Contrairement aux récepteurs des lymphocytes T qui reconnaissent uniquement des séquences linéaires de petits peptides (on parle aussi d'épitopes continus),

les anticorps reconnaissent souvent des épitopes arrangés selon une certaine conformation spatiale impliquant des acides aminés distants dans la séquence de la protéine (on parle d'épitopes discontinus). Les techniques de fixation, d'inclusion et de démasquage antigénique [4, 5] utilisées en immunohistochimie peuvent modifier la conformation spatiale des chaînes polypeptidiques, pouvant entraîner une dénaturation des épitopes, en révéler d'autres masqués ou créer des néo antigènes (figure 1).

Deux sortes d'anticorps sont utilisés dans le domaine de l'IHC. Il y a, d'une part, les anticorps polyclonaux qui sont un mélange d'anticorps produits par un grand nombre de clones lymphocytaires B reconnaissant différents épitopes d'une molécule et d'autre part, les anticorps monoclonaux qui proviennent d'un unique clone lymphocytaire B.

- *Les anticorps polyclonaux* proviennent du sérum d'un animal immunisé avec un antigène. Dans ce milieu très complexe composé d'un très grand nombre de protéines différentes, les anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt reconnaissent plusieurs épitopes de l'antigène, ce qui augmente potentiellement la sensibilité de l'immunomarquage. Cependant, le problème majeur est la présence dans le sérum de l'animal d'autres anticorps produits en réponse aux stimulations immunologiques naturelles, pouvant reconnaître différentes structures dans un tissu (par exemple, le sérum de lapins et de chèvres non immunisés avec la cytokératine peut contenir des anticorps anti-cytokératines [6]). Pour cette raison, les anticorps polyclonaux sont souvent « purifiés » par chromatographie sur des colonnes d'affinité : l'antigène est fixé sur un support solide qui retient les anticorps « spécifiques » lors du passage du sérum. Les anticorps spécifiques retenus sont par la suite élués (en général par un choc acide). À cette étape, ceux qui sont liés avec une trop forte affinité risquent de rester fixés au support solide ou peuvent être dénaturés par le traitement employé pour les éluer (la purification d'anticorps polyclonaux par chromatographie d'affinité se fait souvent avec un mauvais rendement).

- *Les anticorps monoclonaux* sont généralement fabriqués selon la technique des hybridomes mise au point par Georges Köhler et Cesar Milstein en 1975 [7], bien que de nouvelles techniques soient en cours d'étude [8]. La technique des hybridomes est basée sur le principe que chaque lymphocyte B ne fabrique qu'un clone d'anticorps dirigé par défini-

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4129396>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4129396>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)