

Immunocytochimie

2.1. Principe de l'immunoréaction

Il repose sur la détection d'une substance cellulaire par l'utilisation d'un anticorps spécifique couplé à un système révélateur (ou traceur) et dirigé contre l'antigène d'intérêt. Cet anticorps est soit directement en contact avec le traceur, soit relié à ce dernier par un ligand.

♣ Le système révélateur

Il existe différentes catégories de traceurs : fluorescents, enzymatiques, métalliques.

➤ Les traceurs fluorescents

Albert H. Coon a été le premier à introduire l'immunofluorescence en 1941 utilisant la fluorescéine, un colorant fluorescent pour localiser des substances dans les tissus [40]. La technique de marquage par un fluorochrome est utilisée dans plusieurs domaines tels que l'IHC/ICC, la cytométrie en flux... La disponibilité des fluorochromes avec différents spectres d'émission a aujourd'hui rendu possible la détection de deux ou plusieurs antigènes sur la même préparation cellulaire. Quatre fluorochromes sont communément utilisés : Fluorescéine, Rhodamine, Rouge-Texas et Phycoérythrine.

Cependant, bien que le marquage fluorescent ait l'avantage d'être très sensible avec une haute résolution, il présente quelques inconvénients, en particulier la nécessité d'avoir un matériel spécial (microscope à fluorescence, cytomètre en flux...).

➤ **Les traceurs enzymatiques**

✓ **La peroxydase**

C'est l'enzyme la plus couramment utilisée [4,40]. Elle possède une fonction oxydative qui, lorsque mise en présence d'une source d'oxygène, transfère un électron à une molécule qui devient alors oxydée. La peroxydase la plus utilisée est le HRP (Horseradish Peroxydase) [40]. La fonction oxydative de l'enzyme permet ainsi l'utilisation de chromogènes qui, lorsqu'ils sont oxydés forment un précipité coloré visible au microscope. Le substrat chromogénique le plus utilisé est le 3,3'diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB). Il s'agit d'un composé qui, en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) donne un précipité brun. Le DAB possède l'avantage d'être insoluble dans l'alcool et dans le xylène. Cependant, le principal inconvénient réside dans la ressemblance avec certains pigments endogènes tels que la mélanine, pouvant ainsi être à l'origine de faux-positifs. D'autres chromogènes sont disponibles avec des colorations différentes : 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC), tétraméthylbenzidine (TMB)...

✓ **D'autres enzymes peuvent être utilisées**

Phosphatases alcalines (PAL), glucose oxydase, β-galactosidase...

➤ **Les traceurs métalliques**

Il s'agit essentiellement de la ferritine et de l'or colloïdal.

♣ **Le ligand**

Il permet de relier le système révélateur à l'anticorps spécifique. Différents types de ligands sont utilisés en IHC/ICC (cf chapitre 2.2.2.)

2.2. Différents types de méthodes immunocytochimiques

2.2.1. Méthode directe

Dans cette méthode, l'anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt (anticorps primaire) est directement couplé au traceur sans ligand. (Figure 4). Il s'agit d'une immunoréaction simple et rapide, permettant une localisation précise de l'antigène. Cependant, la sensibilité est réputée inférieure à celle des techniques en plusieurs étapes car la réaction antigène – anticorps est souvent faible et le bruit de fond n'est pas négligeable.

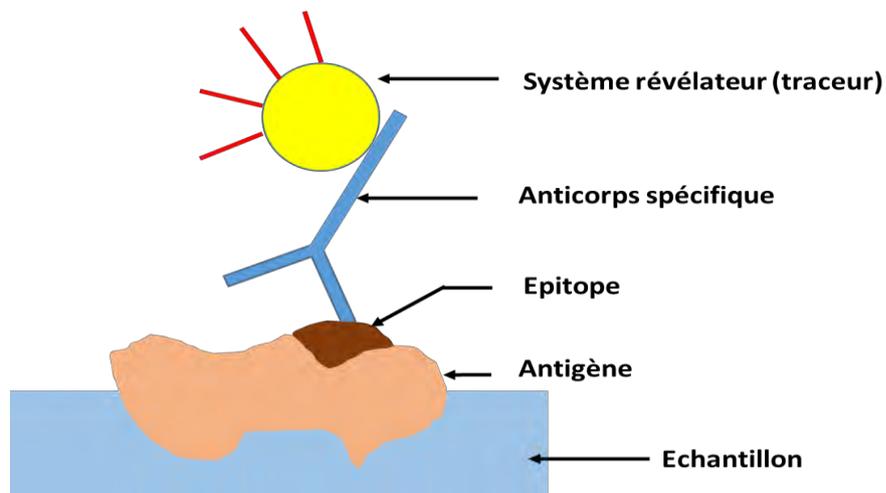


Figure 4: Méthode directe

2.2.2. Méthodes indirectes ou à plusieurs étapes.

Ces méthodes utilisent un ou plusieurs ligands qui relient le traceur à la molécule d'immunoglobuline utilisée pour détecter l'antigène. Les méthodes indirectes sont plus sensibles car il existe une légère amplification. Ces méthodes varient en fonction du ligand utilisé.

♣ Pontage par un anticorps secondaire

C'est une technique à deux étapes. Dans un premier temps, il y a une fixation de l'anticorps primaire qui reconnaît la protéine cible. Puis, dans un second temps, on ajoute l'anticorps secondaire couplé au traceur et qui reconnaît le premier anticorps (Figure 5).

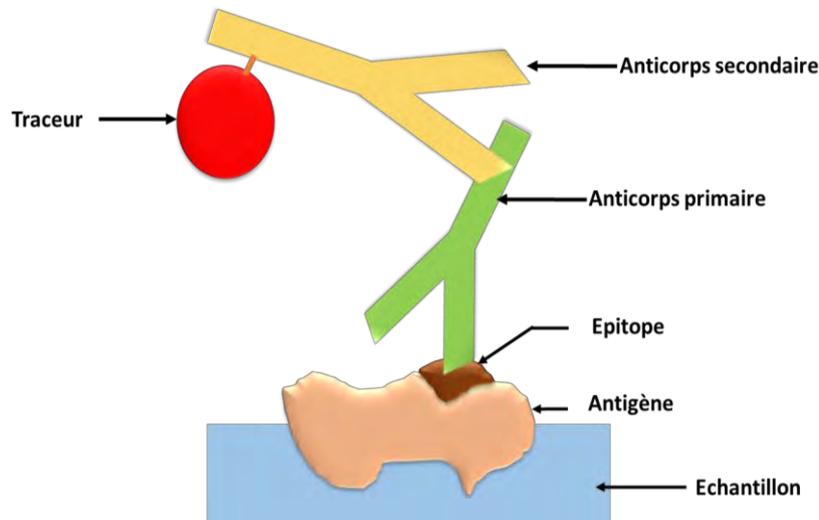


Figure 5: Méthode indirecte : pontage par un anticorps secondaire

♣ Immunoréaction « sandwich » (bridge)

Cette méthode utilise comme ligand un anticorps secondaire et un anticorps tertiaire (Figure 6). Il s'agit d'une technique à trois étapes : d'abord il y a fixation de l'anticorps primaire sur l'antigène cible ; ensuite, l'anticorps secondaire se lie à l'anticorps primaire et enfin on ajoute un troisième anticorps couplé au traceur qui vient se fixer sur le deuxième anticorps.

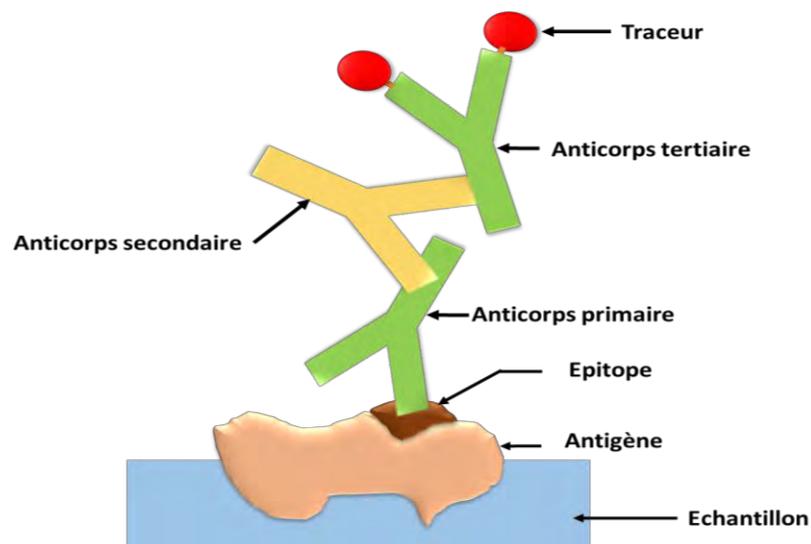


Figure 6: Méthode indirecte : pontage par un anticorps secondaire et un anticorps tertiaire

♣ Pontage par un polymère de dextran

Les anticorps secondaires sont attachés à une large molécule de polymère de dextran marquée avec le HRP qui est la peroxydase la plus utilisée (Figure 7). Cette méthode possède l'avantage d'être rapide avec une bonne amplification et une réduction du bruit de fond.

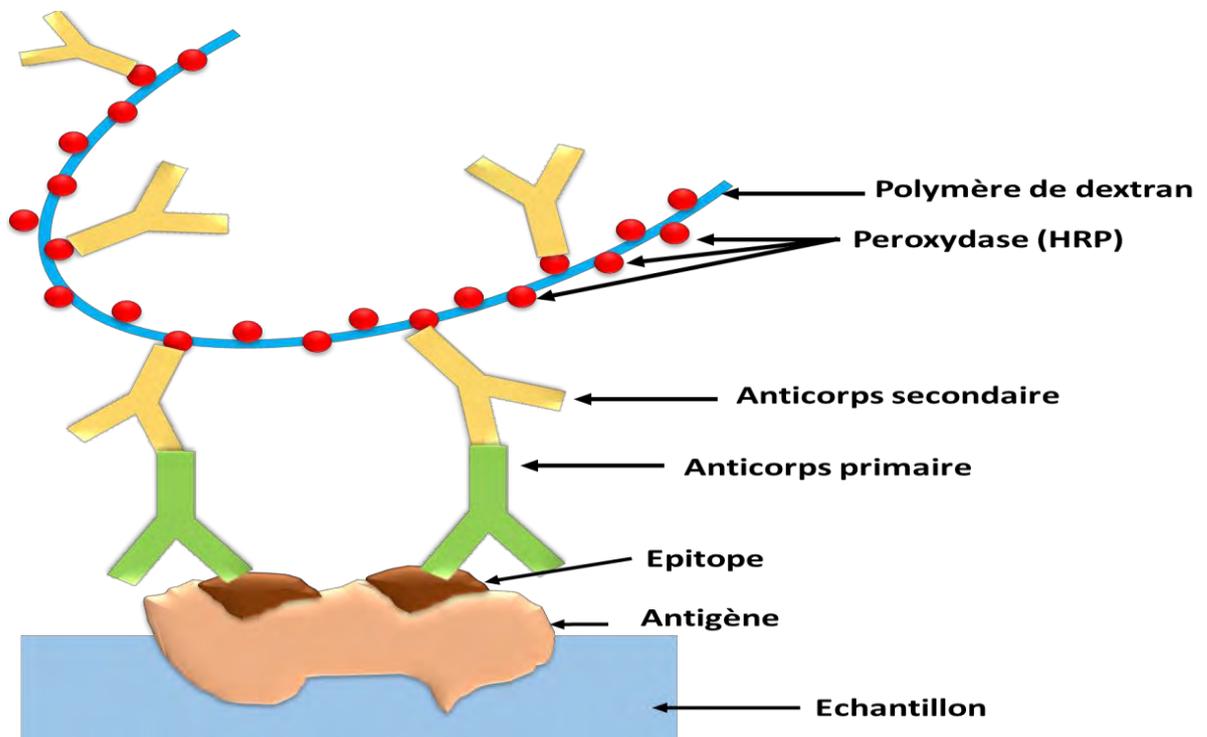


Figure 7: Méthode indirecte : pontage par un polymère de dextran

♣ Système biotine-streptavidine

Dans cette méthode, l'anticorps (primaire ou secondaire) est relié au traceur par l'intermédiaire du système biotine-streptavidine. Il existe différentes modes de liaison biotine-streptavidine (Figure 8A). Ainsi, plusieurs types de réactions sont possibles : soit c'est l'anticorps primaire qui est biotinylé, soit c'est l'anticorps secondaire qui est biotinylé ; le traceur peut être couplé soit à la biotine, soit à la streptavidine (Figure 8 B-C-D-E).

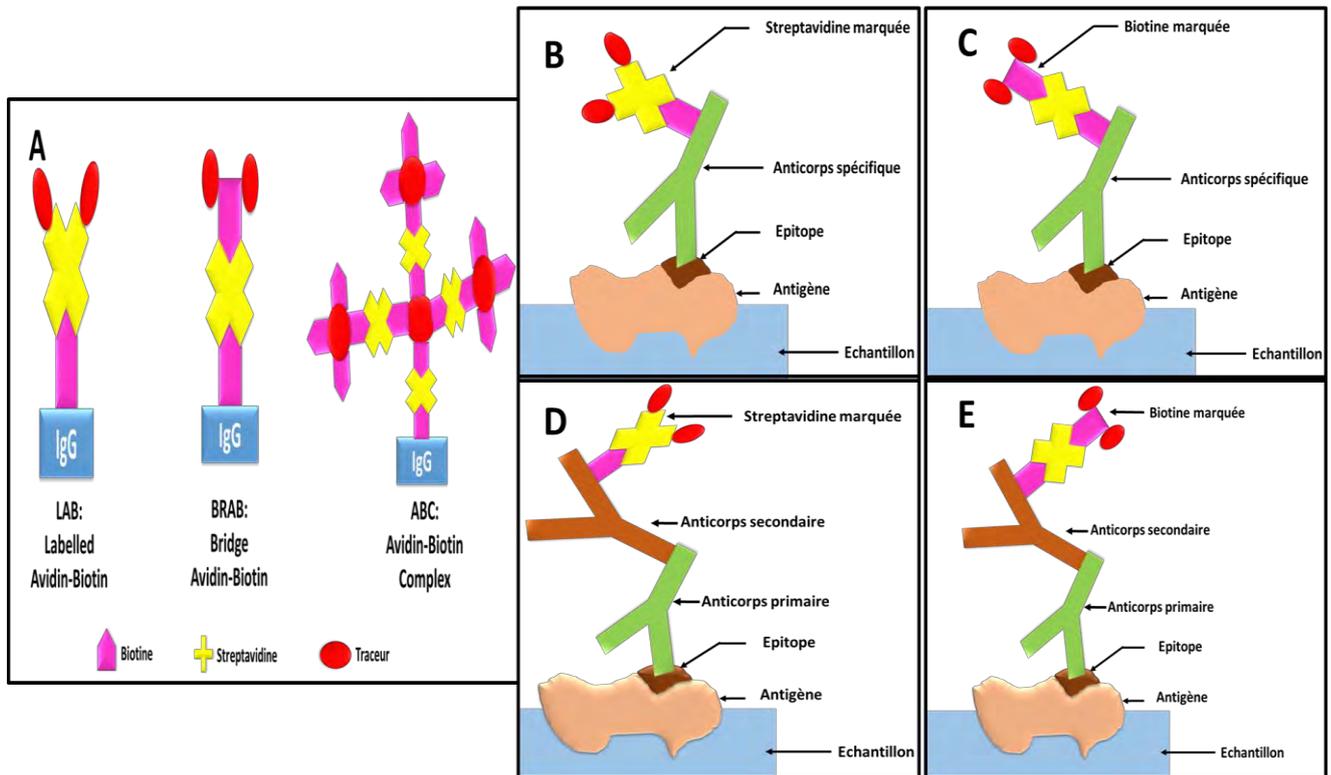


Figure 8: Méthode indirecte : pontage par le système biotine-streptavidine.

A= Modes de liaison biotine-streptavidine ; B= Anticorps primaire biotinylé et Streptavidine marquée (Labelled Avidin-Biotin) ; C= Anticorps primaire biotinylé et biotine marquée (Bridged Avidin-Biotin) ; D= Anticorps secondaire biotinylé et streptavidine marquée ; E= Anticorps secondaire biotinylé et biotine marquée.