

IMMUNOFLUORESCENCE SUR TISSUS INCLUS EN PARAFFINE

Nathalie ACCART

Novartis Pharma, CH-4002 BALE - SUISSE

Anna BENCSIK

*Université de Lyon, ANSES - Unité Maladies Neurodégénératives,
31 Avenue Tony Garnier - 69364 LYON CEDEX 07*

Laurent PENO-MAZZARINO

Laboratoire Bio-EC, 1 chemin de Saulxier - 91160 LONGJUMEAU

RESUME

En 2015, la 2^{ème} journée à thème de l'AFH a réuni six participants venus échanger leurs expériences sur le thème retenu de l'immunofluorescence en coupe paraffine. En effet si le plus souvent la détection d'antigènes par des techniques d'immunofluorescence est pratiquée sur des coupes de tissus congelés, son usage sur des coupes en paraffine est beaucoup plus rare et tient essentiellement au fait de la réputation qu'elle soit limitée par des problèmes d'autofluorescence par exemple. L'application de l'immunofluorescence sur des tissus inclus en paraffine n'en est pourtant pas moins intéressante si ces limites pouvaient être franchies. Aujourd'hui cela est possible avec l'évolution des outils disponibles, moyennant quelques mises au point qui sont rapportées ici et qui résultent du travail d'échanges réalisé par le groupe de participants réuni le 9 octobre 2015 à Paris.

ABSTRACT

Organized in Paris on October 9, 2015, the 2nd AFH thematic workshop brought together six participants who exchanged their experience on the practice of immunofluorescence applied to paraffin embedded tissue sections. Indeed if the detection of antigens by immunofluorescence techniques is generally applied on frozen tissue sections, its use on paraffin-embedded tissue is on the contrary much rarer, because of its reputation of limited applicability due to problems such as autofluorescence. The application of immunofluorescence on tissues included in paraffin is yet no less interesting if these limits could be overcome. Today this is possible with the evolution of the tools available, with a few adaptations too. Here is reported the result of the experience exchanges provided by the group of participants.

INTRODUCTION

L'immunodétection d'antigènes par des techniques basées sur la fluorescence est un outil puissant qui présente certains avantages. L'excellent contraste qui peut être obtenu entre différents fluorochromes de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes, peut être exploité pour des marquages multiples, notamment pour des marquages simultanés de protéines localisées dans le même compartiment subcellulaire. De plus la technique est rapide dans le cas de technique directe par anticorps primaire directement couplé au fluorochrome. Cependant l'immunofluorescence (IF) présente aussi certains inconvénients comme le problème de photoblanchiment pouvant être contrecarré par des incubations en chambre noire et par une analyse rapide des lames. Il est aussi nécessaire de stocker les lames à + 4 °C et de bien choisir son milieu de montage contenant un « anti-fading ». Une autre limitation est la nécessité d'un accès à un microscope à épifluorescence ou confocal pour l'observation des lames. Mais en cas d'application de l'IF sur coupes incluses en paraffine il convient de prendre en compte des problèmes majeurs qui sont 1) l'autofluorescence qui distingue la fluorescence intrinsèque des cellules et tissus, de la fluorescence obtenue par traitement des spécimens avec des marqueurs fluorescents exogènes. L'autofluorescence peut provenir de structures tissulaires (élastine et collagène (1), lipofuscine (2), mélanine,

flavines endogènes, la nicotinamide-adénine dinucléotide réduite et la forme phosphate (3)), ce phénomène pouvant être intrinsèque ou induit par la fixation ou d'autres étapes de la préparation du tissu ; 2) le bruit de fond fluorescent généré par une liaison non-spécifique des différents réactifs fluorescents utilisés lors de l'immunodétection ou les sérums bloquants.

Les tissus et leurs composés autofluorescents

Quelques soient les tissus étudiés (peau, rate, nodule lymphoïde, muscle, cerveau) ou l'espèce d'origine du tissu (souris, rat, lapin, singe, humain), les techniques de préparation pour l'inclusion en paraffine sont quasiment identiques. De même les composés autofluorescents listés ci-dessous sont retrouvés dans de nombreuses espèces (**Figure 1**).

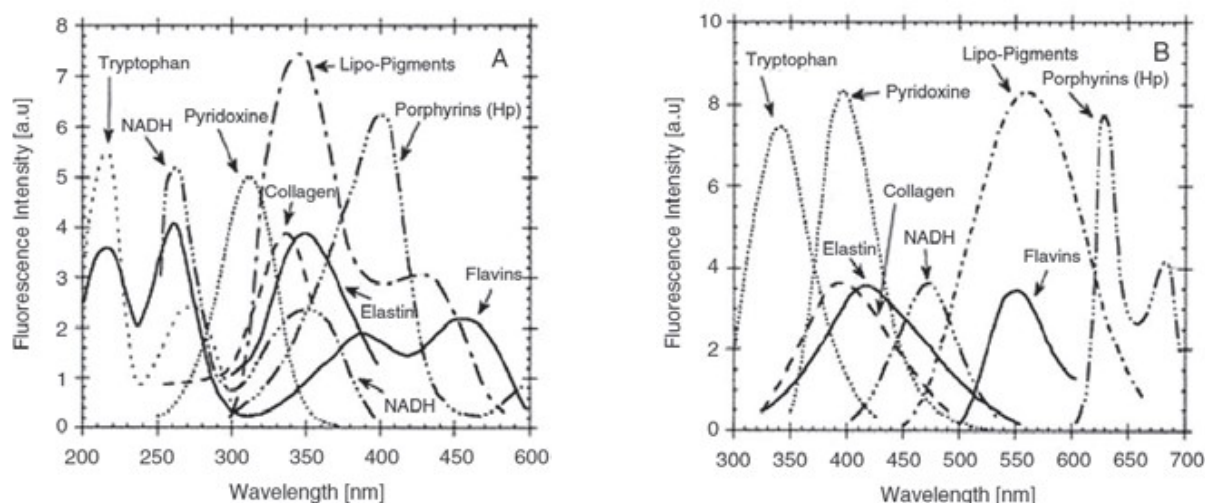


Figure 1 : Spectres d'excitation (A) et d'émission (B) des principaux fluorophores endogènes. Dérivé de Wagnieres et al.

L'élastine contient plusieurs fluorophores, l'un d'eux est un acide aminé tricarboxylique cross-linké avec un anneau de pyridine (4). C'est un fluorophore similaire à ce qui est trouvé dans le collagène. Son excitation entre 350 nm et 480 nm (UV-vert) donne une émission entre 500 et 550 nm (vert-jaune). Typiquement l'élastine est retrouvée autour des vaisseaux sanguins et dans la peau.

La lipofuscine est un lipo-pigment cellulaire composé de débris résiduels lysosomiaux avec une prédominance sur des cellules post-mitotiques. Les neurones, le cœur et la peau contiennent des quantités particulièrement importantes de lipofuscine. Ce pigment est aussi retrouvé dans la coloration de l'iris de certains yeux verts. La lipofuscine présente une fluorescence sous une gamme d'excitation

entre 360 nm et 647 nm. La couleur est orange sous une excitation UV, vert ou jaune sous excitation bleu, ou rouge sous excitation verte. La lipofuscine est moindre dans les animaux plus jeunes et peut être quenchée soit par le sulfate de cuivre soit par le Soudan Noir B (5).

Les mélanines sont des macromolécules biologiques parmi les principaux pigments responsables de la coloration des téguments chez les animaux. On les retrouve chez l'homme dans la peau, les cheveux et poils, l'épithélium pigmentaire de l'iris, la surrénale, la strie vasculaire de l'oreille interne, le cerveau (neuromélanine dans le corps strié et la substance noire). On les retrouve aussi dans les plumes des oiseaux, de nombreux champignons et certains protozoaires. Les mélanocytes sont les principales cellules productrices par addition ou condensation de monomères formés à partir de la tyrosine (eumélanine) ou de la tyrosine et de la cystéine (phéomélanine), avec le concours de l'enzyme tyrosinase.

Les flavines endogènes sont des co-enzymes impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction intracellulaires menant à la production d'ATP. Elles sont une source d'autofluorescence quand elles sont dans leur état oxydé. A contrario, c'est dans leur état réduit que la nicotinamide-adénine dinucléotide devient une source d'autofluorescence intracellulaire (6).

La nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) réduite (NADH) est une coenzyme d'oxydoréduction présente dans toutes les cellules vivantes. La NAD phosphate est aussi une source d'autofluorescence. La NAD⁺ possède un maximum d'absorption en ultraviolet à 260 nm et la forme réduite NADH quant à elle possède deux maxima d'absorption en UV, un premier à 260 nm et un second à 340 nm.

Pour assurer le succès d'une IF sur des tissus inclus en paraffine, plusieurs éléments sont à considérer : en dehors de la nature de l'échantillon, comme par exemple la forte autofluorescence de la peau, le traitement des échantillons a également une grande importance. Notamment la fixation, l'imprégnation en paraffine, le déparaffinage. Les éléments directement en lien avec l'application du protocole d'IF lui-même, telles que les étapes de démasquage, de saturation et blocages des sites non spécifiques ont aussi leur importance. Il n'y a pas une méthodologie spécifique pour l'IF sur coupes en paraffine, mais plusieurs protocoles pour lesquels les points techniques qui fonctionnent sont résumés dans cet article. Ces divers points techniques sont illustrés avec l'exemple de prélèvements de peau, sur

laquelle comme pour de nombreux autres types d'échantillons, l'autofluorescence est problématique (**Figure 2**). Cependant on peut relever que l'autofluorescence des tissus n'a pas que des côtés négatifs puisqu'elle est maintenant exploitée grâce à l'imagerie de spectroscopie, et a permis de développer un véritable outil de diagnostic et de recherche biomédicale (7, 8).

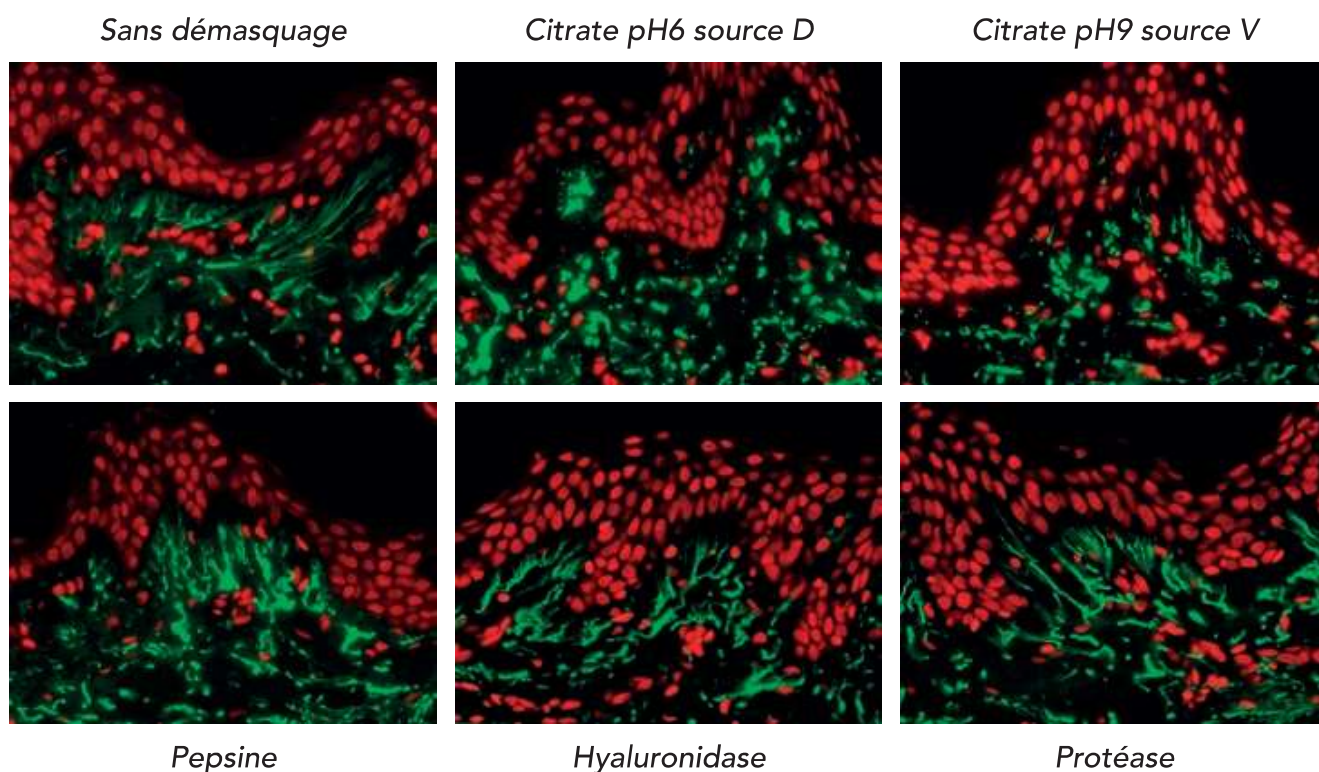


Figure 2 : Influence du démasquage antigénique sur une expérience d'immunomarquage de l'élastine dans la peau. Anticorps primaire dilué au 1/100^{ème} et incubé pendant 1 heure, révélation par un système couplé à l'AlexaFluor® 488.

La fixation des tissus

La fixation peut être faite après perfusion de l'animal entier par injection intracardiaque ou par immersion directe après autopsie. Globalement elle doit être rapidement réalisée après la mort de l'animal. Les fixateurs utilisés usuellement pour une inclusion en paraffine sont soit un tampon à 10 % formaline (incubation maximale de 48 heures à température ambiante sauf pour des tissus particuliers comme le tendon), soit une solution de formol tamponnée préparée selon Carson. Malheureusement la fixation par une solution contenant un aldéhyde entraîne une autofluorescence des tissus accrue par réaction des aldéhydes avec les amines des protéines, formant des bases de Schiff (9). Le glutaraldéhyde accroît l'autofluorescence de manière

plus importante que le formol. L'autofluorescence observée apparaît alors comme un marquage diffus et plus généralisé qu'un marquage spécifique.

Il est possible d'éliminer ou de diminuer l'autofluorescence des aldéhydes en réduisant les bases de Schiff formées. Différents réactifs peuvent être utilisés et éventuellement être combinés pour une meilleure efficacité. Cependant il faut garder en tête que ces réactifs peuvent inhiber ou masquer partiellement l'immunoréaction.

Un autre moyen de réduire la fluorescence induite par les aldéhydes est d'éviter leur utilisation (10). Ce protocole alternatif décrit une fixation avec 50 mM dimethyl suberimidate (DMS) dans un tampon contenant 100 mM de tampon sodium borate (pH 9,5) et 1 mM $MgCl_2$ pour 1 heure. Après lavage les tissus sont incubés dans du PBS pH 7,4 additionné de 2 % de paraformaldéhyde (PFA) pendant 15 à 30 minutes. La réaction est arrêtée par la glycine à 0,1 M en PBS pH 7,4 pour 1 heure à température ambiante.

Une autre alternative consiste à utiliser d'autres fixateurs de pourcentage de formaldéhyde inférieur comme le Periodate Lysine Paraformaldéhyde (PLP) dont le pourcentage est égal à 0,25 % ou encore un tampon de formaldéhyde à 2 % et 0,2 % d'acide picrique. Le tissu fixé est clarifié par une série d'alcools jusqu'au DMSO ou xylène. Ou encore des fixateurs ne contenant pas d'aldéhydes comme le Carnoy, le Methacarn, ou le fixateur Tris Zinc. Une fixation à l'acide picrique est aussi possible pour la diminution de l'autofluorescence de la lipofuscine.

Les conditions de fixation comme le temps et la température sont liées. Le temps de fixation sera réduit à température ambiante et plus long à + 4°C. La durée de la fixation est aussi liée à la taille des échantillons. La théorie de Medawar donne une profondeur de pénétration de 1 mm par heure de fixation pour une solution à 4 % de formaldéhyde mais cela varie en fonction du fixateur. Cela signifie qu'il faudra approximativement 25 heures pour pénétrer au centre d'un échantillon d'une épaisseur de 10 mm. Il est possible d'améliorer le processus de fixation par fixation sous vide ou par chauffage aux micro-ondes.

Les réactifs permettant de réduire ou d'éliminer l'autofluorescence liée aux aldéhydes

Parmi ces réactifs on trouve l'éthanol 70 % ammoniacal (0,25 % NH_3), le borohydrure de sodium à 0,1 % ou 10 mg/mL et le Soudan Black B à 0,1 % en éthanol 70 % qui

ont été testés sur des coupes de tissus fixés en formaldéhyde ou glutaraldéhyde et inclus en paraffine (2).

L'éthanol ammoniac est considéré comme réduisant l'autofluorescence par extraction des molécules fluorescentes et par inactivation des fluorochromes sensibles au pH. Une étape dans l'éthanol à 70 % contenant 0,25 % d'ammoniac est intercalée lors de la réhydratation des coupes en paraffine dans des concentrations d'éthanol décroissantes. Puis la réhydratation se poursuit par de l'éthanol à 50 % et se termine dans le tampon utilisé pour la réaction d'immunofluorescence.

Le borohydrure de sodium est connu pour son efficacité liée à sa capacité à réduire les bases de Schiff formées et à l'origine d'émissions de fluorescence, par dégagement d'hydrogène. Les sections déparaffinées sont immergées avant l'immunomarquage dans de l'eau distillée (ou du tampon) contenant 10 mg/mL de NaBH_4 pendant 40 min à 0 °C. La solution doit être préparée extemporanément. Il est à noter que le borohydrure de sodium est explosif et présente une réaction exothermique au contact des tampons phosphate (PBS) ou tris (TBS), entraînant la production de gaz extrêmement inflammable. Il est donc nécessaire de travailler sous hotte, le flacon doit être fermé et les conditions de protection doivent être extrêmement bien respectées.

Le Noir Soudan B agit en masquant les composants tissulaires autofluorescents comme la lipofuscine dont le spectre de fluorescence est similaire à celui de la fluorescéine. Cependant cette technique ne réduit pas le signal émis par le FITC et l'AlexaFluor® 594 de manière notable (11). La technique présentée est dérivée de Schnell et al. 1999 ou Baschong et al. 2001. Après l'immunomarquage, les coupes sont immergées pendant 10 à 30 minutes dans une solution à 0,1 – 1 % de Noir Soudan B dans 70 % d'éthanol (ou de méthanol) préparée 2 heures avant utilisation. Après différenciation à l'éthanol 70 % (ou méthanol), les coupes sont réhydratées jusqu'au tampon de montage des coupes.

Il existe des méthodes plus spécifiques pour inhiber l'autofluorescence de certaines molécules. Nous citerons en exemple :

Le sulfate ou chlorure de cuivre, le réactif principal d'une technique proposée par Schnell et al. 1999 pour réduire l'autofluorescence des lipofuscines, se fait après le marquage immunohistologique. Le CuSO_4 (ou CuCl_2) est utilisé à la concentration de 1 à 10 mM en tampon acétate d'ammonium (50 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,0) pendant 10 à 90 minutes.

Le borohydrure de sodium est utilisé pour la réduction de l'autofluorescence induite par le glutaraldéhyde. Pour cela, une solution fraîchement préparée de NaBH_4 à 0,1% dans le tampon d'immunomarquage (PBS, TBS, etc.) est appliquée pendant 10 à 30 minutes à température ambiante ou à froid.

Le tétroxyde d'osmium peut être inclus dans une post-fixation. L'observation de coupes de blocs de tissus fixés au glutaraldéhyde et à l'osmium, montre une forte autofluorescence au centre du tissu et pas d'autofluorescence sur les bords. Cela s'explique par la différence de vitesse de diffusion plus faible du tétroxyde d'osmium par rapport à celle du glutaraldéhyde. Une post-fixation des tissus au tétroxyde d'osmium est donc un moyen très efficace pour réduire l'autofluorescence due au glutaraldéhyde.

Il n'y a malheureusement pas de recette générale pour le contrôle de l'autofluorescence et chacun doit appliquer ces réactifs sur ses propres préparations.

D'autres réactifs ont été décrits précédemment, comme l'Eriochrome Noir T (12), la Pontamine Sky Blue (13) appelée aussi 6,6'-((3,3'-dimethoxy(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl)bis(azo))bis(acide 4-amino-5-hydroxy-1,3- Naphthalenedisulfonique), sel tétrasodique) utilisée pour la réduction de l'autofluorescence engendrée par l'élastine et le collagène. Leur spectre d'émission est similaire à la fluorescéine et l'incubation dans une solution à 0,5 % de Pontamine Sky Blue 5BX (C.I. 24400) dans PBS ou TBS pendant 10 minutes. Ce réactif entraîne un décalage de l'autofluorescence de l'élastine dans le vert vers une émission rouge. Une autre suggestion pour la réduction de l'autofluorescence des vaisseaux est basée sur l'utilisation du Bleu de Toluidine à 0,1 % pour 1 à 5 minutes mais cette technique n'est pas efficace sur tous les vaisseaux.

Enfin le Bleu Trypan à 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 4,4 ((13), (14), (5)) et le Bleu Evans ont été utilisés pour l'immunofluorescence directe et l'étude des auto-anticorps. Chacun a été utilisé sur tissus et cellules à 0,001 % jusqu'à 0,1 % dans l'eau ou dans un tampon pendant 1 minute. Ils sont solubles en milieu de montage aqueux et diffusent rapidement. Cela réduit le bruit de fond de manière significative aussi bien que la fluorescence due au conjugué. Les colorants fluorescent en rouge, évitant le marquage non-spécifique du conjugué par transfert d'énergie mais a peu d'effet sur le marquage spécifique. Cependant cette technique n'est pas envisageable pour les expériences de marquages multiples (14).

Les traitements des tissus et l'inclusion en paraffine

Les tissus sont généralement déshydratés dans des bains d'alcool successifs de pourcentage croissant jusqu'à atteindre 100 %. Puis la déshydratation est poursuivie par des bains dans des solvants de la paraffine comme le Toluène ou le Xylène, ou des alternatifs comme l'OTIX Plus et l'OTIX Shaper. Ces étapes sont ensuite suivies par des étapes d'imprégnation à la paraffine. Il est possible de baisser ces temps d'imprégnation en utilisant une méthode sous-vide. L'inclusion se fait ensuite en paraffine qui peut être de différentes qualités avec des températures de fusion de 55 °C à 58 °C. Il est aussi possible de traiter des cellules en culot en utilisant des cassettes à biopsie à pores nanoscopiques.

Le stockage des blocs à court terme peut se faire à température ambiante ou à + 4 °C pour un stockage à plus long terme. Un point important concerne le stockage des blocs à long terme après coupe : il est conseillé de recouvrir le tissu coupé par une fine couche de paraffine pour le préserver de l'oxydation des tissus par l'air ambiant.

On retiendra que pour une application en IF, le déparaffinage qu'il soit classique par solvants ou combiné avec le démasquage, comme ce qui est réalisé avec certains automates de marquage, fonctionnent bien.

Démasquage antigénique

Pour illustrer l'influence des paramètres propres au démasquage, la **figure 2** montre l'exemple de la détection de l'élastine par un anticorps dilué au 1/100 et incubé pendant une heure puis révélé par un système couplé à l'AlexaFluor®488 sur des

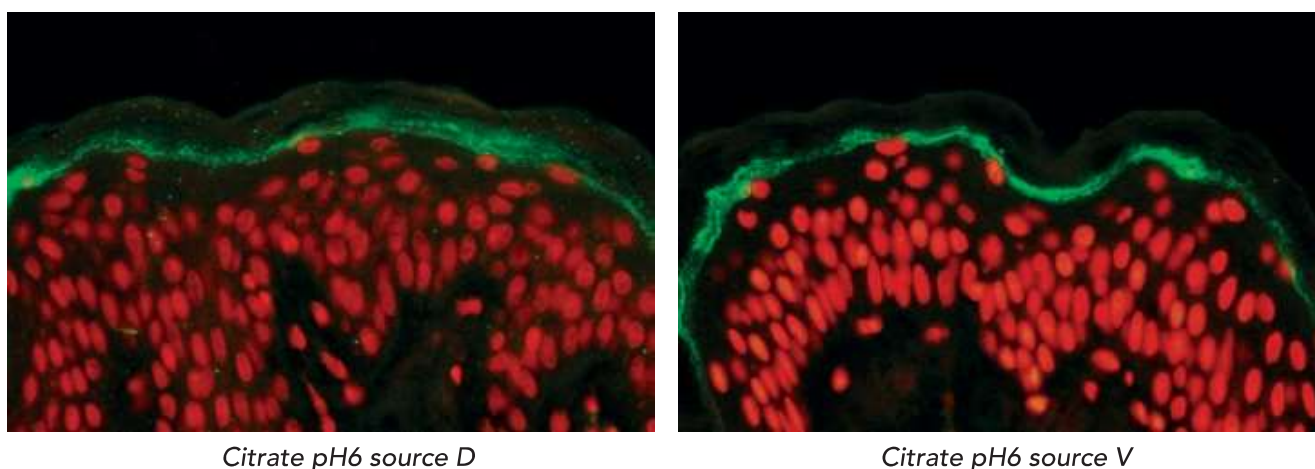


Figure 3 : Influence de la source du tampon de démasquage antigénique sur une expérience d'immunomarquage de IDE dans la peau. Anticorps primaire dilué au 1/25^{ème} et incubé pendant 1 nuit, révélation par un système couplé à l'AlexaFluor® 488.

échantillons de peau. Elle compare l'effet sur la réussite de l'immunomarquage d'un démasquage enzymatique (pepsine, hyaluronidase, protéase) au démasquage chimique dans des conditions de pH acide ou basique (pH6 versus pH9). La nature des solutions de démasquage peut influencer le résultat final. La **figure 3** démontre qu'une solution tampon du fournisseur D donne de moins bons résultats qu'avec la même solution du fournisseur V. Pour d'autres immunomarquages, cela peut être l'inverse. Il faut donc ne pas hésiter à essayer plusieurs solutions identiques de fournisseurs différents.

Blocage des sites de fixation non spécifiques

Pour une application en IF, les principes classiques en termes de réactifs, temps et conditions d'application peuvent être appliqués. On peut relever l'utilisation de sérum bloquant, de l'albumine, de caséine, du Blocking reagent (source R) dilué au 1/10 dans un tampon d'acide maléique pour une bonne saturation dans le cas d'anticorps de souris sur tissu murin. Il est possible d'ajouter de la gélatine de poisson pendant tout le protocole, ou du lait en poudre (là encore, il faut faire attention à la marque).

Réduction des réactions non spécifiques par réduction des activités enzymatiques endogènes

De même pour une application réussie en IF, lorsque l'on utilise des traceurs enzymatiques il est indispensable de s'assurer que ce que l'on observe n'est pas dû à la présence d'enzymes endogènes, par le recours à des contrôles de spécificité appropriés. Si ces réactions sont gênantes pour l'observation des marquages spécifiques, on peut tenter de les inhiber en utilisant l'une ou l'autre des techniques suivantes :

Le blocage des peroxydases endogènes est souvent pratiqué pour améliorer l'aspect des images. En fait il n'est vraiment indispensable que si les marquages dûs aux activités peroxydasiques endogènes peuvent être confondus par leur forme et leur intensité avec les marquages spécifiques, ou s'ils se superposent aux marquages spécifiques. On met en effet très facilement en évidence ces réactions parasites en comparant une coupe immunomarkuée avec une coupe contrôle traitée uniquement avec la solution de révélation de la peroxydase.

De nombreuses recettes de blocage ont été proposées. Les plus courantes

consistent à traiter les coupes pendant 10 min à 1 heure avec l'un des inhibiteurs suivants :

L'eau oxygénée peut être utilisée en excès, par exemple à 0,3 % dans le tampon de réaction (15). Il existe une variante de ce traitement, par la dilution de l'eau oxygénée dans du Méthanol absolu. Dans ce cas, le traitement est réalisé au cours de la réhydratation des coupes, incluse après les étapes de déparaffinage et le premier bain d'Ethanol absolu. On poursuit ensuite par un deuxième bain d'Ethanol absolu puis par la réhydratation graduelle des coupes.

Le Méthanol/Nitroferricyanure (16) est préparé par un ajout de Nitroferricyanure de sodium dans du méthanol absolu.

La Phénylhydrazine peut être utilisée à 0,5 % dans le tampon de réaction (17).

La méthode de Li (18) permet d'inactiver les activités peroxydasiques par un bain de 10 à 30 minutes d'eau oxygénée à 0,3 % et d'azide de sodium à 0,1 %. A noter que dans cette technique seule l'eau oxygénée est probablement efficace car l'action de l'azide de sodium est en effet réversible.

La méthode de Heyderman et Neville (19) est considérée comme le procédé le plus puissant pour inactiver les activités peroxydasiques endogènes. Il s'agit de rincer les coupes à l'eau après déparaffinage et hydratation puis d'inactiver les activités peroxydasiques endogènes avec 2,28 % d'acide périodique dans l'eau distillée pendant 5 minutes, suivi d'un lavage à l'eau.

Le blocage des aldéhydes formés par l'acide périodique est possible avec 0,02% de borohydrure de potassium dans l'eau distillée pendant 2 minutes, induisant la transformation des groupements aldéhydes en alcools.

Le blocage des phosphatases endogènes peut être réalisé par l'action du levamisole (240,76 daltons) ajouté à des concentrations allant de 0,1 à 10 mM dans le milieu de révélation de la phosphatase alcaline. Le levamisole bloque les phosphatases endogènes mais n'a pas d'effet inhibiteur sur la phosphatase alcaline utilisée comme traceur.

Choix de l'anticorps primaire

Primordial, le choix de l'anticorps (Ac) primaire est facilité par l'accès à des sites de recherche d'anticorps comme Labome, BioCompare, Human Protein Atlas ou directement chez les fournisseurs. Le groupe a recensé les Ac primaires qui fonctionnent

dans leurs entités et la liste est donnée à titre indicatif (**Tableau 1**). On recense tous les types de marquage possible, -nucléaire, -cytoplasmique, -membranaire, -extracellulaire, de toute nature (espèce animale, -polyclonal, -monoclonal).

Les utilisateurs font non seulement appel à des anticorps primaires directement couplés au fluorochrome mais aussi à l'utilisation de systèmes de révélation ou d'amplification variés (**Tableau 1**). De même, plusieurs types de tampon de dilution sont possibles, les utilisateurs ayant une expérience positive avec des tampons de compositions variables, avec colorant vert intégré ou non, que le tampon soit fait maison ou commercial.

Choix de l'anticorps secondaire et système de révélation

En tout premier lieu il convient de bien choisir le type de fluorochrome, on peut distinguer les fluorochromes de 1^{ère} génération : FITC, PE... ; les fluorochromes de 2^{ème} génération : alexa, cy, dye...et plus récemment le quantum dot (QD). Sans être exhaustif voici les fluorochromes évoqués par le groupe : AlexaFluor®350, 488, 546, 594, 647, FITC, R-PE, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5 et Quantum dots.

La **figure 4** illustre un immunomarquage obtenu à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor® et la **figure 5** illustre un immunomarquage révélé par un anticorps secondaire biotinylé suivi d'une streptavidine couplée au FITC.

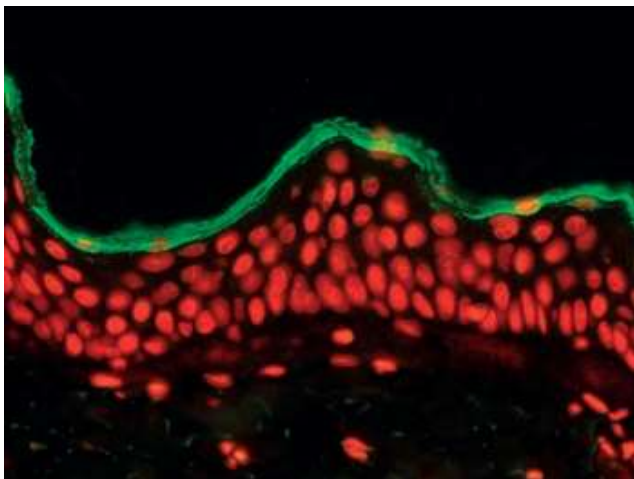


Figure 4 : Immunomarquage de filaggrine 2 dans le stratum corneum. Démasquage antigénique au tampon citrate pH6 de source V, anticorps primaire dilué au 1/800^{ème} et incubé pendant 1 heure, couplé directement à l'AlexaFluor® 488.

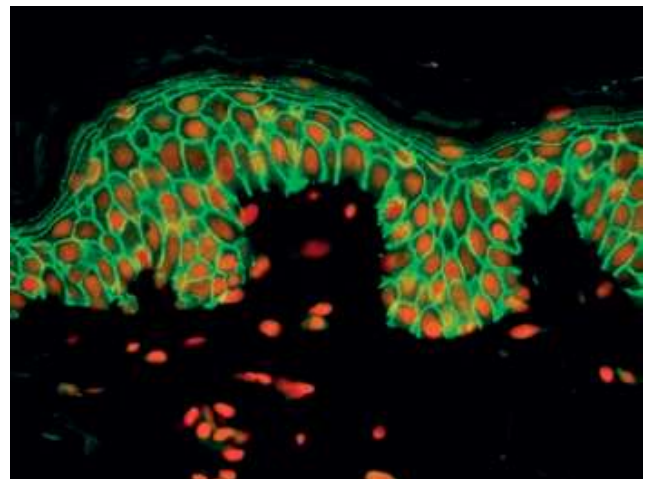


Figure 5 : Immunomarquage de desmogleine dans l'épiderme. Démasquage antigénique au tampon citrate pH de source D, anticorps primaire dilué au 1/800^{ème} et incubé pendant 1 heure, révélation par un anticorps secondaire biotinylé suivi d'une streptavidine-FITC.

Cible	Marquage (nucléaire, cytoplasmique, membranaire...)	Monoclonal- ou Polyclonal (clone)	Espèce	Dilution	Incubation
Béta-actine	Cytoplasmique	Polyclonal	Lapin	1/50	1 h
Béta-endorphines	Cytoplasmique	Monoclonal	Souris	1/25	1 nuit
				1/300	2 h (Autostainer)
Desmogléine	Membranaire	Polyclonal	Lapin	1/800	1 nuit
				1/800	2 h (Autostainer)
Fibronectine	Matrice extracellulaire	Monoclonal	Souris	1/600	1 nuit
				1/200	2 h (Autostainer)
Filaggrine	Membranaire	Monoclonal	Souris	1/100	1 h
				1/3200	1 h (Autostainer)
Filaggrine 2	Membranaire	Monoclonal	Souris	1/800	1 h (Autostainer)
IDE	Cytoplasmique	Polyclonal	Souris	1/25	1 nuit
LEKTI	Membranaire	Polyclonal	Lapin	1/200	1 nuit
		Monoclonal	Souris	1/200	1 nuit
Mucin 4	Membranaire	Polyclonal	Souris	1/50	1 nuit
Pro-collagène 1	Matrice extracellulaire	Monoclonal	Rat	1/50	1 nuit
Vinculine	Membranaire ± Cytoplasmique	Monoclonal	Souris	1/100	1 h
				1/400	1 h (Autostainer)
GFAP	Cytosquelette	Polyclonal	Lapin	1/200	
Oligodendrocytes	Cytoplasmique	Polyclonal	Lapin	1/1000	
α-Synucléine	Cytoplasmique	Monoclonal (clone 42)	Souris		
α-Synucléine (phospho Sérine129)	Cytoplasmique	Monoclonal	Lapin	1/300	
Iba-1	Cytoplasmique	Polyclonal	Lapin	1/500	
NeuN	Nucléaire	Polyclonal	Lapin	1/500	
F4/80	Membranaire et cytoplasmique	Monoclonal (clone A3)	rat	1/100	
GFP	selon promoteur	Polyclonal	Lapin		
CD4 humain	Membranaire	Monoclonal (clone 4B12)	Souris	0,1 µg/ml	1 h
CD3 humain	Membranaire	Monoclonal (clone F7.2.38)	Souris	0,1 µg/ml	1 h
CD163 humain	Membranaire	Monoclonal (clone EDHu-1)	Souris	0,1 µg/ml	1 h
HLA-E humain	Membranaire	Monoclonal (clone MEM-E/02)	Souris	0,05 µg/ml	1 h

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés en routine dans les laboratoires d'accueil des participants et dont certains ont servi à illustrer cet article.

Dans tous les cas les paramètres techniques à considérer sont à nouveau le tampon de dilution, la durée et la température d'incubation.

Les systèmes d'amplification tels que les systèmes polymères (Envision), HRP + Tyramide (TSA) ou Biotine (ABC) sont compatibles avec la mise en œuvre de l'IF sur coupes de tissus inclus en paraffine.

Le groupe relève la possibilité d'utiliser un Anticorps anti-HRP-DyLight (source J. I.), qui nécessite une étape préalable de blocage des HRP à l' H_2O_2 .

De même la technique Opale (P. E.) peut être utilisée mais il faut faire attention pour les marquages multiples avec une saturation intermédiaire par traitement aux micro-ondes (possible jusqu'à 5 fois). La **figure 6** illustre un exemple de co-marquage appliqué à de la rate humaine, et utilisant ce système. L'UltraMap de source V. est un anti-goat polymer qui est très puissant et est très concentré. Dans ce cas il faut faire attention à la durée d'application qui doit être très courte (12-16 min) et attention à l'utilisation de détergent dans le tampon de lavage.

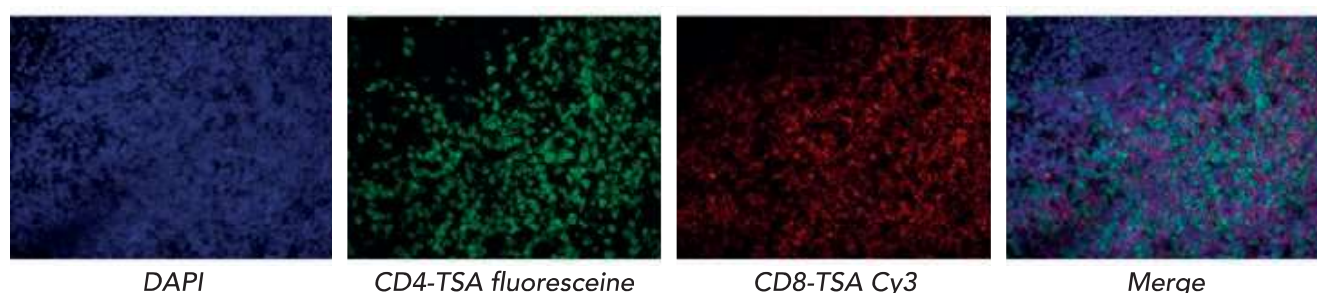


Figure 6 : Co-marquage de CD4 et CD8 sur de la rate humaine avec deux anticorps de la même espèce (mIgG1), révélation avec le système OPAL et contre-coloration au DAPI.

Pour la contre coloration, on peut utiliser des marqueurs comme le DAPI qui se lie de façon sélective à l'ADN double brin. Le Hoeschst qui se lie de façon spécifique sur des régions riches en bases A/T de l'ADN double brin. L'iodure de propidium qui s'intercale entre les bases sans préférence de liaison, est un très bon colorant nucléaire pour les fluorochromes verts ou UV. D'une façon générale, il faut faire une étape spécifique pour la contre coloration et éviter le mélange dans le milieu de montage. On peut noter un retour d'expérience dans l'utilisation de la coumarine plus puissant que le DAPI dans les longueurs d'onde UV.

Par ailleurs la **figure 7** montre un bel exemple de double marquage utilisant de la TSA (amplification du signal avec la tyramide). Cette technologie TSA permet d'utiliser un marquage HRP et de le convertir en marquage fluorescent.

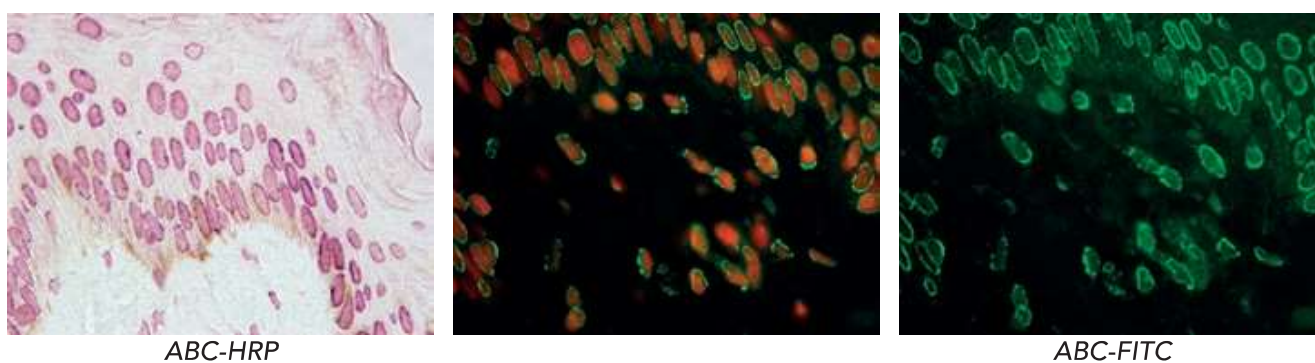


Figure 7 : Immunomarquage de la vinculine dans la peau. Démasquage au tampon citrate pH6 (source V), anticorps primaire au 1/50^{ème} pendant 1 nuit, révélation par le système ABC-HRP ou ABC-FITC.

Milieus de montage et conservation des lames

Le groupe de travail a recensé plusieurs milieux de montages qui sont utilisés avec succès, qu'ils soient commercial ou maison.

ProLong Gold	Commercial, cher
Vectashield (hardset)	Commercial
Fluoromount (hardset)	Commercial
Fluoromount G	Contient le DAPI
Aquamount	Contient le DAPI mais nécessite un luttage au vernis à ongles
Mowiol®	A préparer soi-même, bon marché Excellente conservation

En ce qui concerne la conservation des lames, il y a plusieurs usages : à + 4 °C ou à -20 °C en fonction du milieu de montage.

Spécificité-sensibilité

L'immunofluorescence en paraffine est tout aussi spécifique qu'un marquage réalisé en peroxydase. La **figure 7** montre un bel exemple du marquage de la vinculine. Celui-ci apparaît identique dans la peau qu'il soit révélé en peroxydase ou en fluorescence.

Par contre il peut y avoir des problèmes de sensibilité entre une expérience d'immunofluorescence sur coupe congelée ou en paraffine, comme l'illustre la **figure 8** avec des marquages de bêta-actine dans la peau.

Il est ainsi primordial d'adapter la durée d'incubation de l'anticorps primaire pour obtenir le même résultat, avec le même anticorps comme l'illustre la **figure 9**. On retrouve le même niveau de détection en passant d'1 heure d'incubation à 1 nuit.

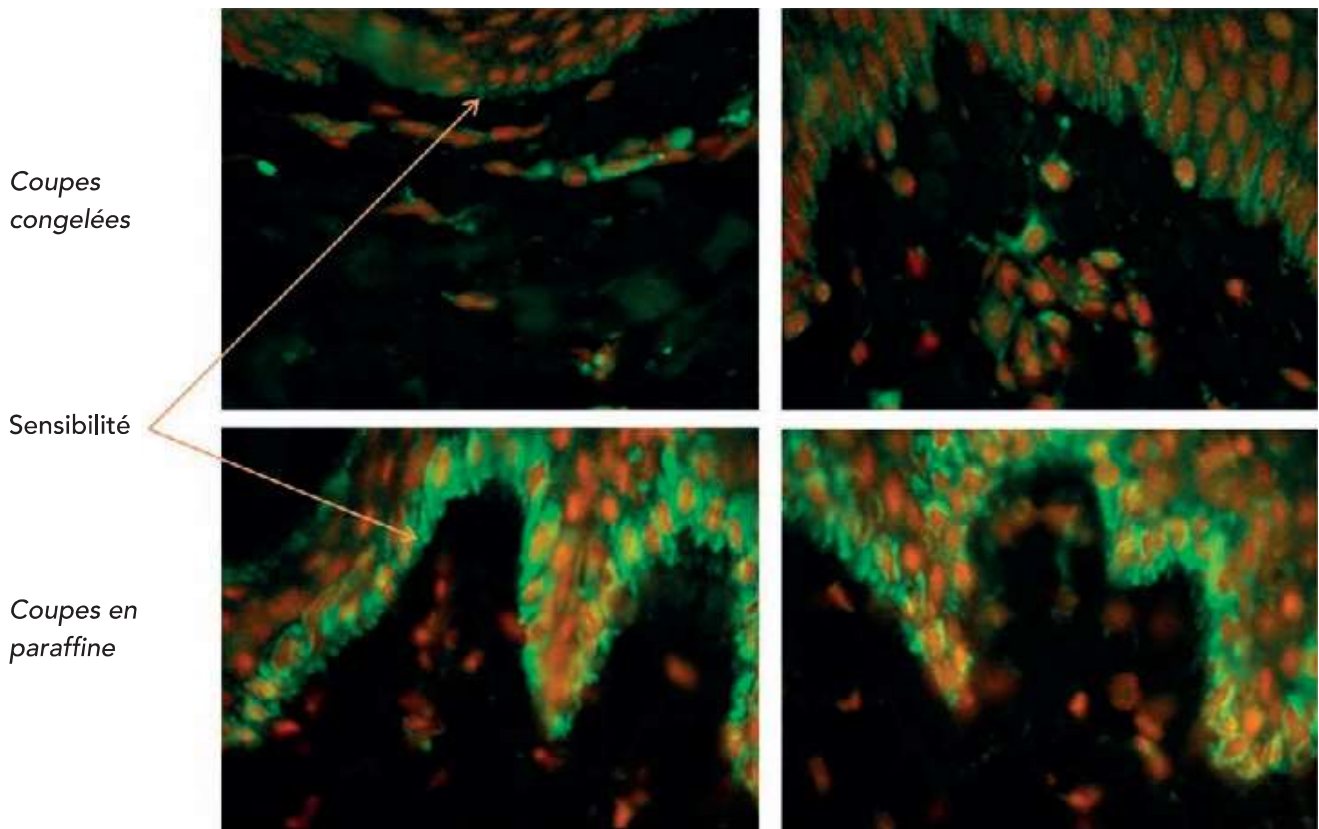
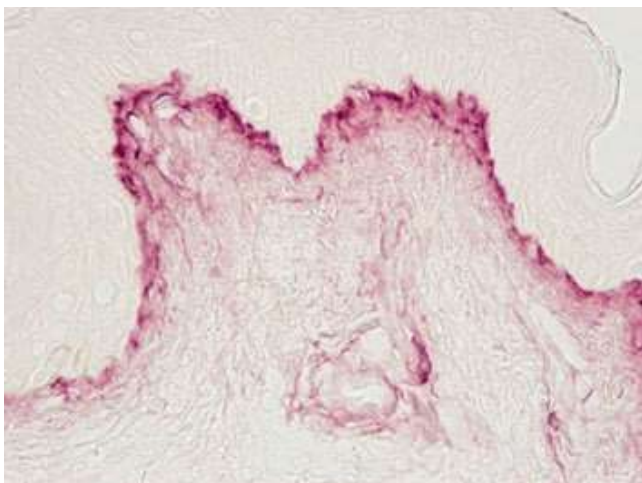
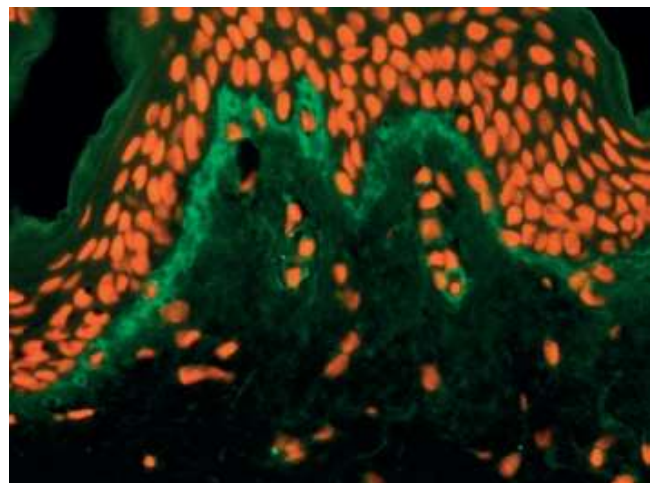


Figure 8 : Immunomarquage de la bêta-actine dans la peau sur coupes congelées et coupes en paraffine, anticorps primaire au 1/25^{ème} pendant 1 heure ou 1 nuit, révélation ABC-FITC.



Incubation 1 nuit - révélation ABC-HRP



Incubation 1 heure - révélation ABC-FITC

Figure 9 : Influence de la durée d'incubation. Immunomarquage du pro-collagène I, démasquage protéase, anticorps primaire au 1/200^{ème} pendant 1 heure ou 1 nuit, révélation ABC-HRP (VIP) ou ABC-FITC.

CONCLUSION

Cet article repose sur le partage des connaissances des six participants (Arnaud Dujardin, Innate Pharma, Marseille, Anna Bencsik, ANSES – Unité Maladies Neurodégénératives, Lyon, Laurent Peno-Mazzarino, Laboratoire Bio-EC, Longjumeau, Alhassan Casse, Sanofi, Paris, Catherine Rochereau, Citoxlab, Evreux, Nathalie Accart, Novartis, Bâle). Ainsi nous avons pu dégager quelques points importants qui feront le succès de votre IF sur coupes paraffine. Les principaux points à retenir pour réussir une IF sur coupes incluses en paraffine sont :

- la fixation à froid ne doit pas être trop longue (48 heures),
- les coupes doivent être plutôt fines (4-5 micromètres d'épaisseur)
- le déparaffinage classique par bain de solvants donne de meilleurs résultats qu'en automate (éviter le bain unique déparaffinage/démasquage)
- des temps de 6 min/bain donnent de meilleurs résultats que 3 min/bain
- le démasquage contribue à diminuer l'autofluorescence (enzymatique, protéasique, traitement chimique, et/ou à la chaleur)
- le tampon citrate pH6 préparation maison est parfois plus efficace que le tampon pH6 de source D ou de source V.
- l'utilisation de tensioactifs (Tween 20...) permet de perméabiliser les membranes et d'augmenter le facteur de dilution de l'anticorps primaire
- il est profitable de travailler sur des fenêtres de fluorescence hors réémission dans le vert
- il est important de bien faire une dose réponse pour trouver la meilleure concentration de l'anticorps primaire
- enfin, pour les co-marquages, il faut tester l'ordre des marquages comme l'indique un retour d'expérience pour l'exemple du triple marquage CD4-CD8-CD3 qui présente un problème si le CD3 est le dernier à être détecté.

Le travail collecté au cours de cette journée à thème a démontré que l'application de l'IF sur des tissus inclus en paraffine est non seulement possible mais très intéressante car elle offre plusieurs avantages. Elle produit des images

d'immunomarquage de qualité supérieure par rapport à l'application de l'IF sur du tissu congelé avec une très bonne spécificité et une bonne sensibilité. Grâce à cette préservation des tissus, elle représente également un avantage sérieux pour les marquages multiples. Les auteurs de cette restitution écrite espèrent que ce compte rendu saura être profitable aux lecteurs de la Revue en stimulant l'envie de pratiquer l'IF sur des tissus inclus en paraffine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'AFH pour avoir proposé cette journée à thème et tout particulièrement Sophie Luccantoni pour l'organisation de cette journée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BILLINTON, N. and KNIGHT A.W. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.*, 2001, **291**(2), 175-97.
2. BASCHONG W., SUETTERLIN R., and LAENG R.H. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J. Histochem. Cytochem.*, 2001, **49**(12), 1565-72.
3. ANDERSSON H. et al. Autofluorescence of living cells. *J. Microsc.*, 1998, **191**(Pt 1), 1-7.
4. DEYL Z., et al. Studies on the chemical nature of elastin fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **625**(2), 248-54.
5. SCHNELL S.A., STAINES W.A., and WESSENDORF M.W., Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, **47**(6), 719-30.
6. CROCE A.C. and BOTTIROLI G. New light in flavin autofluorescence. *Eur. J. Histochem.*, 2015, **59**(4), 2576.
7. CROCE A.C. and BOTTIROLI G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *Eur. J. Histochem.*, 2014, **58**(4), 2461.
8. MONICI M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2005, **11**, 227-56.

9. BEISKER W., DOLBEARE F., and GRAY J.W. An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometry*, 1987, **8**(2), 235-9.
10. TOKUMASU F. and DVORAK J. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J. Microsc.*, 2003, **211**(Pt 3), 256-61.
11. ROMIJN H.J. et al. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, **47**(2), 229-36.
12. DAVIS A.S. et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 2014, **62**(6), 405-423.
13. Cowen T., HAVEN A.J. and BURNSTOCK G. Pontamine sky blue: a counterstain for background autofluorescence in fluorescence and immunofluorescence histochemistry. *Histochemistry*, 1985, **82**(3), 205-8.
14. MOSIMAN V.L. et al. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. *Cytometry*, 1997, **30**(3), 151-6.
15. BURNS J. Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry*, 1975, **43**(3), 291-4.
16. STRAUS W. Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1971, **19**(11), 682-8.
17. STRAUS W. Phenylhydrazine as inhibitor of horseradish peroxidase for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1972, **20**(11), 949-51.
18. LI C.Y., ZIESMER S.C. and LAZCANO-VILLAREAL O. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. *J. Histochem. Cytochem.*, 1987, **35**(12), 1457-60.
19. HEYDERMAN E. and NEVILLE A.M. A shorter immunoperoxidase technique for the demonstration of carcinoembryonic antigen and other cell products. *J. Clin. Pathol.*, 1977, **30**(2), 138-40.