



Le TMA comme outil de mise au point des conditions de marquages immunohistologiques. Application à l'étude de la croissance musculaire de la truite arc-en-ciel

Jérôme Bugeon, Parfait Evouna Mengue, Claude Sevellec, Chantal Cauty

► To cite this version:

Jérôme Bugeon, Parfait Evouna Mengue, Claude Sevellec, Chantal Cauty. Le TMA comme outil de mise au point des conditions de marquages immunohistologiques. Application à l'étude de la croissance musculaire de la truite arc-en-ciel. *Revue Française d'Histotechnologie*, 2013, 26 (1), pp.49-53. hal-02643896

HAL Id: hal-02643896

<https://hal.inrae.fr/hal-02643896>

Submitted on 28 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LE TMA COMME OUTIL DE MISE AU POINT DES CONDITIONS DE MARQUAGES IMMUNOHISTOLOGIQUES

Application à l'étude de la croissance musculaire de la truite arc-en-ciel

*Jérôme BUGEON¹, Parfait EVOUNA-MENGUE¹, Claude SEVELLEC¹, Chantal CAUTY¹

*Jerome.Bugeon@rennes.inra.fr

¹ INRA, UR1037, LPGP, Campus de Beaulieu 35042 Rennes cedex

INTRODUCTION

La technique de TMA (Tissue Micro-Arrays) connaît un développement très rapide depuis sa première description dans son concept actuel par Kononen et al (1998) (1). Elle est devenue une technique de choix pour la mise en évidence et la validation de marqueurs tumoraux à partir de collections de blocs de tissus fixés (2). Cette technique permet de disposer dans un même bloc des carottes d'échantillons d'origines diverses. De fait, une comparaison directe et plus fiable de ces tissus peut être réalisée par immunohistologie/immunohistochimie en s'affranchissant des éventuelles différences d'intensité de marquage pouvant survenir entre différentes lames. Lorsque l'on doit tester un nouvel anticorps, les conditions optimales de révélations immunohistologiques/immunohistochimiques sont parfois difficiles à obtenir. En effet et bien que les grandes étapes soient les mêmes pour tous les an-

ticorps, de nombreux ajustements et mises au point sont nécessaires pour chaque anticorps. Nous pouvons citer par exemple, le choix du fixateur, la nécessité ou non de passer par une étape de démasquage, le choix de la solution de saturation, de la dilution des anticorps primaires et secondaires et bien sûr la variabilité pouvant être observée selon la nature des tissus. L'analyse des effets de l'ensemble de ces paramètres peut être fastidieuse si on veut les valider sur plusieurs échantillons car cela nécessite autant de lames que de conditions. Nous proposons donc d'utiliser le TMA comme outil de mise au point rapide des conditions de révélation de la présence d'antigènes à l'aide de techniques immunohistologiques/immunohistochimiques.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude a porté sur des échantillons de muscle de truite arc-en-ciel prélevés à différents stades de développement afin

d’analyser les conséquences de la croissance musculaires sur la présence de protéines d’intérêts. Trois sources de variation croisées : le type de fixateur PAF (paraformaldéhyde) 4 % (24h) ou Carnoy (chloroforme, éthanol, acide acétique, 6: 3: 1, 48h), le type de muscle (muscle entier tronc prélevé devant la nageoire dorsale, blanc constitué de fibres rapides prélevé en dorsal ou rouge constitué de fibre lentes prélevés au niveau de la ligne latérale) et ce à 7 stades de développement de la truite (animal de 50 mg à 2kg) ont été étudiés. Pour cela 54 échantillons différents ont été déshydratés, inclus dans l’histoplast (Thermo scientific ref 6774060) à 56-60°C (automate LSI Citadel 1000), un 55ème échantillon (foie) a servi de repère pour orienter le TMA. Des carottes de 2 mm de diamètre ont été effectuées à l’aide d’un «tissu arrayer» (MiniCore®) dans les blocs donneurs puis déposées dans un bloc receveur (bloc TMA) selon le plan de la figure 1. Des coupes de 10 µm ont été effectuées à l’aide d’un microtome (Microm HM 355S) puis déposées sur lame poly-sine (Menzel–Gläser). Les lames ont en-

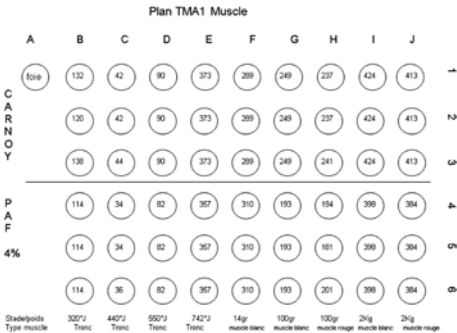
Anticorps	dilution	provenance
BA-D5	1/10	AGRO-BIO
SC-71	1/10	AGRO-BIO
PCNA	1/100	DAKO

Tableau I : Anticorps monoclonaux utilisés

suite été déparaffinées (automate Microm robo-stainer HMS 760X) puis ont suivi un protocole d’immunohistologie dans l’automate Insitu Pro VS (Intavis). Un tampon phosphate (PBS) 0,01 M Tween 20 à 0,2 % a été utilisé pour les lavages et dilution des anticorps, pour la saturation de l’albumine bovine (BSA) à 1 % a été ajouté à ce tampon. Les anticorps primaires (tableau I) ont été incubés une nuit à température ambiante. La révélation de la liaison antigène-anticorps primaire a été effectuée avec le kit DAB (3,3’ Diaminobenzidine) Ultra-vision F/TP- 15-HD (Microm) permettant d’observer une couleur marron brune après environ 5 min d’incubation. Les lames ont été numérisées à l’aide d’un microscope Nikon 80i, muni d’une platine motorisée en XYZ (Marzhauser), l’ensemble étant piloté par la suite logiciel Goodspeed®, Spot Browser® et intégré dans la base de donnée Tisalys® (Alphelys SAS, Plaisir, France).

RESULTATS ET DISCUSSION

Ce TMA a pu être utilisé avec différents anticorps monoclonaux (tableau 1) dirigés contre des protéines cytoplasmiques (SC-71, BA-D5: anticorps contre myosines rapides et lentes), ou des protéines nucléaires (PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen). Nous avons constaté que les marquages des protéines myofibrillaires étaient entièrement dépendants



du type de fixateur. Aucun signal n'a pu être obtenu pour les échantillons fixés au PAF, alors que tout ceux fixés au Carnoy présentaient un marquage répondant à la distribution attendue de ces protéines. Ce résultat souligne l'intérêt de ce TMA pour connaître rapidement le choix du fixateur adapté à ce type d'antigène. Dans nos conditions de révélations immunohistologiques, c'est-à-dire sans démasquage antigénique, il est probable que la fixation au PAF a créé des liaisons (ou pontages) entre les protéines qui ont été préjudiciables à la reconnaissance des antigènes par les anticorps (3). Ce phénomène est probablement accentué dans notre étude par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dont la spécificité envers un épitope précis peut aboutir à une absence de signal si cet épitope n'est pas accessible et/ou est modifié. D'un point de vue biologique, ce TMA a permis d'observer sur des coupes sérieées la présence de deux types de myosines reconnus respectivement par les anticorps BA-D5 et SC-71 (4) et cela dès les premiers stades (éclosion) présents sur ce TMA ; ce marquage est toujours présent sur des animaux de grande taille, âgés de 2 ans. La séparation anatomique des muscles lents et rapides chez les poissons et la truite en particulier permet de valider la spécificité de ces anticorps monoclonaux contre ces fibres musculaires (figure 2). Nous pouvons de plus conclure à une réaction immunologique croisée, ces anticorps ayant été initialement produits contre des myosines de muscles bovins.

Un autre avantage du TMA est de pouvoir quantifier le marquage obtenu en s'affranchissant de la variabilité technique inter-lame. Dans notre exemple, nous avons quantifié le nombre de cellules en prolifération dans le muscle blanc après révélation avec un anticorps anti PCNA. Les résultats sont présentés dans la figure 3. Il apparaît ainsi que la prolifération des cellules est forte dans les jeunes stades puis diminue rapidement, jusqu'à ne plus être détectable ou très rare sur des animaux de grande taille. Il apparaît également que, dans les jeunes stades, une augmentation de la prolifération est observée après la première alimentation (après 550 degrés.jours). Ces



Figure 2 : Copie d'écran du résultat d'une requête dans la base de données image, permettant de mettre en évidence la spécificité du marquage des anticorps monoclonaux BA-D5 (muscle lent, image de gauche) et SC-71 (muscle rapide, image de droite).

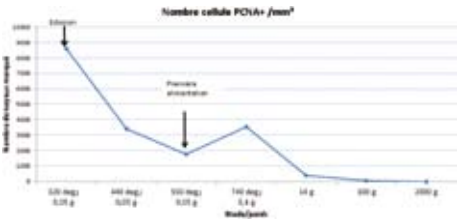


Figure 3 : Quantification du nombre de noyaux présentant un marquage PCNA selon les différents stades de croissance musculaire présent sur le TMA.

résultats sont cohérents avec les mécanismes de la croissance musculaire des poissons qui procède à la fois par hyperplasie (augmentation du nombre de fibres musculaires) et hypertrophie (augmentation de la taille des fibres musculaires). L'hyperplasie est particulièrement prononcée dans les jeunes stades et requiert probablement une prolifération importante des cellules satellites. La quantification d'un marqueur de la différenciation musculaire comme MyoD ou la myogénine serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse (5).

Ces résultats démontrent l'intérêt du TMA pour quantifier la présence d'un marqueur sur plusieurs stades de développement simultanément. La quantification reste toutefois relative et dépendante du protocole utilisé. Dans notre cas par exemple, l'utilisation d'une révélation avec un kit DAB dont on arrête la révélation dès qu'un marquage apparaît, peut conduire à sous-estimer la présence d'une protéine très peu exprimée si l'on arrête la révélation avant qu'elle n'apparaisse. L'utilisation d'anticorps secondaires couplés à un fluorophore pourrait permettre de pallier à ce phénomène.

CONCLUSION

La construction d'un TMA à visée de mise au point de révélations histoinmunologique (immunohistochimiques) se révèle un outil de choix lorsque l'on est amené à tester et/ou valider des anticorps nouveaux au sein d'un laboratoire ou bien à analyser un grand nombre d'échantillon avec le même anticorps. Une réflexion particulière doit être menée sur le choix du ou des fixateurs, étape pré-analytique irréversible, dont l'influence majeure est illustrée ici dans la mise en évidence de l'expression des myosines. L'exemple présenté ici pour caractériser la croissance musculaire de la truite peut être décliné de différentes manières afin de répondre à d'autres questions. Il est aussi possible de sélectionner plusieurs organes d'un même animal pour analyser l'expression d'une protéine et/ou d'un mRNA (en hybridation *in situ*) sur l'ensemble de ces tissus. Il peut être également envisagé de combiner des tissus de plusieurs espèces pour tester si l'anticorps permet des réactions croisées.

BIBLIOGRAPHIE

1. KONONEN J., BUBENDORF L., KALLIONIEMI A., M. BARLUND M., SCHRAML P., LEIGHTON S., TORHORST J., MIHATSCH M.J., SAUTER G., KALLIONIEMI O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, 1998, 4 (7), 844-847.
2. NASRI S., BOULAND N., SCHNEIDER L., PLUOT. Tissue Micro-Arrays: une technique de conception peu coûteuse. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 2008, 21 (1), 87-92.
3. McNICOL A.M. & RICHMOND J. A. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathology*, 1998, 32 (2), 97-103.
4. SCHIAFFINO S., GORZA L., SARTORE S., SAGGIN L., AUSONI S., VIANELLO M., GUNDERSEN K., LOMO T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Moti.*, 1989, 10 (3), 197-205.
5. BRODEUR J.C., PECK L.S., JOHNSTON I. A. Feeding increases MyoD and PCNA expression in myogenic progenitor cells of *Notothenia coriiceps*. *J. Fish Biol.*, 2002, 60, 1475-1485.