



HAL
open science

Immunohistochimie du tissu lymphoïde des bovins : neutralisation des réactivités non spécifiques des sérums anti-immunoglobulines d'espèce par du sérum bovin

Maxence Delverdier, P Pradeau, Nathalie Bourgès Abella, François Schelcher, J
Espinasse, P Cabanié

► **To cite this version:**

Maxence Delverdier, P Pradeau, Nathalie Bourgès Abella, François Schelcher, J Espinasse, et al.. Immunohistochimie du tissu lymphoïde des bovins : neutralisation des réactivités non spécifiques des sérums anti-immunoglobulines d'espèce par du sérum bovin. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1992, 23 (4), pp.371-379. <hal-00902097>

HAL Id: hal-00902097

<https://hal.science/hal-00902097v1>

Submitted on 11 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.



HAL Authorization

Article original

Immunohistochimie du tissu lymphoïde des bovins : neutralisation des réactivités non spécifiques des sérums anti-immunoglobulines d'espèce par du sérum bovin

M Delverdier ^{1*}, P Pradeau ¹, N Abella ¹,
F Schelcher ², J Espinasse ², P Cabanié ¹

¹ *École nationale vétérinaire, laboratoire associé INRA, physiopathologie respiratoire des ruminants, service d'anatomie pathologique;*

² *Service de pathologie du bétail, 23, chemin des capelles, 31076 Toulouse Cédex, France*

(Reçu le 6 février 1992; accepté le 5 juin 1992)

Résumé — La richesse du tissu lymphoïde en éléments protéiques libres et en immunoglobulines, conduit fréquemment à l'observation de réactivités non spécifiques lors de réactions immunohistochimiques. Les sérums anti-immunoglobulines d'espèce utilisés dans ces réactions sont susceptibles d'identifier les immunoglobulines sécrétées ou hébergées par les cellules du tissu étudié, conduisant à un marquage non spécifique. Une préincubation des antisérums en présence d'un sérum de l'espèce dont on étudie le tissu lymphoïde neutralise les réactivités non spécifiques liées à la présence des immunoglobulines tissulaires.

immunohistochimie / tissu lymphoïde / bovin / méthodologie

Summary — **Immunohistochemistry of bovine lymphoid tissue: neutralization of non-specific reactivities with bovine serum.** *In lymphoid tissue, the presence of high amounts of free proteins and immunoglobulins frequently leads to the observation of non-specific reactivities during immunohistochemical reactions. The types of anti-immunoglobulin sera utilized in these immunohistochemical reactions may be capable of identifying immunoglobulins secreted or harboured by the tissue cells under study, leading to non-specific marking. Incubation of these antisera with serum from the species in which the lymphoid tissue is studied neutralizes the non-specific reactivities connected with the presence of tissue immunoglobulins.*

immunohistochemistry / bovine lymphoid tissue / methodology

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

L'utilisation de plus en plus répandue des techniques immunohistochimiques par les histopathologistes ne doit pas faire perdre de vue les modalités techniques et méthodologiques qui garantissent la qualité et la fiabilité des résultats.

Dans notre laboratoire, nous développons l'étude immunohistochimique des populations leucocytaires des bovins et, en particulier, celle du tissu lymphoïde. La richesse de ce tissu en éléments protéiques libres dans le plasma ou la lymphe, et notamment en immunoglobulines, pose un certain nombre de problèmes méthodologiques en raison des positivités artefactuelles auxquelles elle peut conduire (Delsol *et al*, 1984).

De manière similaire, les cellules qui élaborent des immunoglobulines (plasmocytes) ou qui en hébergent (macrophages) sont susceptibles d'être marquées non spécifiquement par les sérums anti-immunoglobulines d'espèce utilisés dans les réactions immunohistochimiques.

En l'absence de données bibliographiques sur le sujet, nous nous proposons de rendre compte d'une étude démontrant l'intérêt, pour la spécificité des résultats, d'une préincubation des anticorps anti-globulines d'espèce avec du sérum bovin. Les cellules qui feront l'objet d'un marquage immunocytochimique spécifique sont les macrophages. En effet, ces cellules pouvant revêtir des aspects variés (macrophages au repos, macrophages actifs, macrophages sinusaux bordant la lumière des sinus lymphatiques...), il est important de pouvoir les identifier avec certitude pour établir, par comparaison, la nature des cellules qui peuvent être marquées de manière non spécifique par les sérums anti-immunoglobulines d'espèce. Les plasmocytes quant à eux, en raison d'un aspect cytologique très caractéristi-

que sont toujours aisément identifiables qu'ils soient ou non l'objet d'un marquage non spécifique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a été réalisée sur le nœud lymphatique cervical superficiel (ganglion préscapulaire droit) de 3 bovins adultes de sexe femelle âgés de 4-5 ans.

La préparation des échantillons a compris les temps suivants : prélèvement à l'abattoir, fixation d'une durée de 8 h dans le Susa (fixateur mercurique doux) (Ganter et Jolles, 1969), inclusion en paraffine, réalisation de coupes sagittales de 4 μ m d'épaisseur.

Après déparaffinage (toluène, acétone) et inhibition des peroxydases endogènes par le méthanol et le peroxyde d'hydrogène (Heyderman, 1979), 4 types de réaction immunohistochimique ont été mis en œuvre sur les coupes obtenues (selon une technique utilisant 2 sérums anti-immunoglobulines d'espèce conjugués à la peroxydase, préconisée pour les études en immunoperoxydase du tissu lymphoïde par Delsol *et al* (1984).

Réaction A

Anticorps primaire

Anticorps monoclonal MB2 (surnageant de culture, Unipath, Dardilly, France) (Poppema *et al*, 1987) reconnaissant les macrophages dans l'espèce bovine : dilution au 1/10. Cet anticorps est spécifique des macrophages dans l'espèce humaine (épitope de poids moléculaire 28 kDa).

Chez les bovins, des travaux préliminaires nous ont montré qu'il est spécifique des macrophages (marquage diffus du cytoplasme) et des cellules centrofolliculaires (marquage juxtancéaire sous la forme d'une ponctuation arrondie très fortement marquée). La localisation exclusive des cellules centrofolliculaires au centre germinatif des follicules lymphoïdes secondaires et les caractères très particuliers de leur marquage permettent de distinguer sans ambiguïté les macrophages de ces cellules.

Anticorps secondaire

Immunoglobulines de lapin, anti-immunoglobulines de souris, conjuguées à la peroxydase (P161 Dako SA Trappes France) : dilution au 1/15.

Anticorps tertiaire

Immunoglobulines de porc, anti-immunoglobulines de lapin, conjuguées à la peroxydase (P217 Dako SA Trappes, France) : dilution au 1-15.

Les anticorps primaire, secondaire et tertiaire ont été utilisés dilués dans un tampon phosphate salé (TPS) (K_2HPO_4 0,09 M, KH_2PO_4 0,01 M, NaCl 1,5 M à pH 7,4–7,6 additionné de sérum albumine bovine 0,1%).

Pour chaque anticorps, l'incubation a été de 30 min, à température ambiante. Entre chaque incubation, les lames ont été soigneusement rincées avec le TPS contenant 0,2% de poudre de lait.

Réaction B

- Première étape : pas d'anticorps monoclonal MB2 primaire mais uniquement du TPS;
- anticorps secondaire et tertiaire identiques à ceux de la réaction A.

Réaction C

Étapes identiques à la réaction A mais ici les anticorps secondaire et tertiaire ont été utilisés dilués dans le TPS avec du sérum de bovin à la dilution de 1/10.

Le sérum de bovin a été obtenu après une centrifugation de 10 min (1 300 g) de sang prélevé sur tube sec et laissé à 37 °C pendant 1 h.

Pour chaque lame (300 µl), la proportion des différents réactifs a donc été la suivante : 20 µl de sérum conjugué + 30 µl de sérum bovin + 250 µl de TPS.

Pour chaque anticorps, l'incubation a été de 30 min, à température ambiante. Entre chaque incubation, les lames ont été soigneusement rincées avec le TPS contenant 0,2% de poudre de lait.

Réaction D

Première étape : pas d'anticorps monoclonal MB2 mais uniquement du TPS.

Anticorps secondaire et tertiaire identiques à ceux de la réaction C, c'est-à-dire mis en présence de sérum bovin. Dans toutes les réactions, la diaminobenzidine et le peroxyde d'hydrogène ont été employés comme système chromogène de révélation dans un tampon Tris-HCl 0,02 M (pH 7,6).

Une contre-coloration des noyaux par l'hématoxyline a été réalisée pour faciliter l'analyse cytologique.

RÉSULTATS

Réaction A (anticorps primaire MB2, antisérums de lapin et de porc non préincubés dans du sérum de bovin)

Les macrophages ont présenté un marquage cytoplasmique diffus mais de nombreuses cellules lymphoïdes dans le cortex et les cordons médullaires du nœud lymphatique ont également été marquées (fig 1). Cytologiquement, la plupart de ces cellules avaient l'aspect de plasmocytes (avec un marquage cytoplasmique diffus très intense). Elles correspondaient aussi, mais moins fréquemment, à des centroblastes ou à des immunoblastes (avec un marquage cytoplasmique diffus d'intensité modérée).

Réaction B (première étape composée de TPS, antisérums de lapin et de porc non préincubés dans du sérum de bovin)

Comme pour la réaction précédente, il existait un marquage des territoires thymo-indépendants (cortex, médullaire) qui concernait les mêmes types de cellules

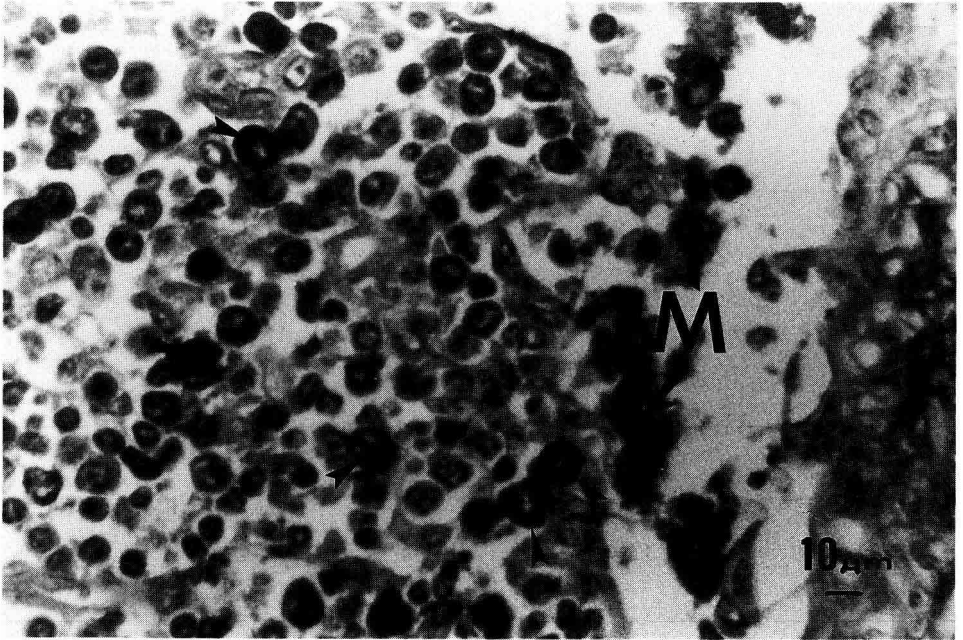


Fig 1. Nœud lymphatique – bovin (immunoperoxydase, x360 – réaction A : anticorps primaire MB2, antisérums conjugués de lapin et de porc non préincubés dans du sérum bovin). Les macrophages (M) des sinus médullaires présentent un marquage homogène de leur cytoplasme mais les cellules lymphoplasmocytaires des cordons médullaires sont également marquées (►).

(plasmocytes, cellules centroblastiques et immunoblastiques).

De nombreux macrophages ont également été marqués mais les caractères du marquage différaient de ceux de la réaction A : modéré et homogène pour la plus grande partie du cytoplasme, il est apparu plus intense en périphérie (fig 2).

Réaction C (anticorps primaire MB2, antisérums de lapin et de porc préincubés dans du sérum de bovin)

Seuls les macrophages ont été identifiés par cette réaction. En particulier, dans la

zone médullaire du ganglion, les sinus riches en macrophages ont été fortement marqués alors que les cordons médullaires essentiellement composés d'éléments lymphoplasmocytaires ne l'ont pas été cytologiquement (fig 3), le marquage des macrophages de la lumière des sinus lymphatiques est apparu cytoplasmique, diffus et relativement homogène, quelquefois légèrement granuleux. Les macrophages bordants des sinus ont été quant à eux très fortement marqués. Les cellules lymphoplasmocytaires, à de rares exceptions près n'ont pas été marquées. Quand elles l'ont été le marquage a été d'intensité très faible.

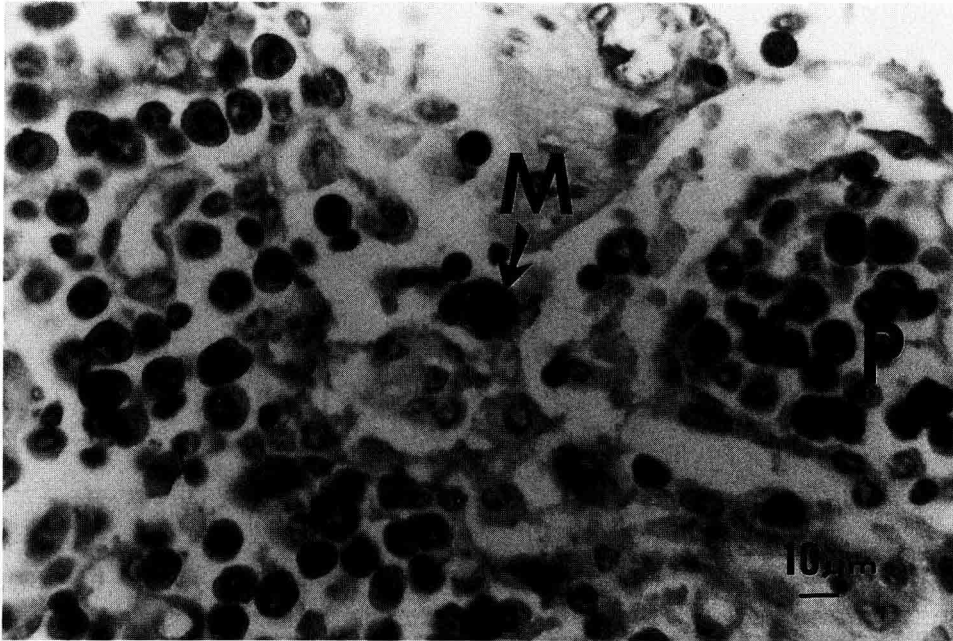


Fig 2. Nœud lymphatique – bovin (immunoperoxidase, x360–réaction B : pas d'anticorps primaire, antisérums conjugués de lapin et de porc non préincubés dans du sérum bovin). Marquage des cellules lymphoplasmocytaires (P) et d'un macrophage (M --->).

Réaction D (première étape composée de TPS, antisérums de lapin et de porc préincubés dans du sérum de bovin)

Ni les macrophages, ni les cellules lymphoïdes n'ont été marqués dans cette réaction.

DISCUSSION

Des 3 premières réactions immunohistochimiques que nous avons réalisées, seule la troisième (sérum anti Ig d'espèce préincubés dans du sérum bovin, réaction C) a donné des résultats conformes au but re-

cherché eu égard à la nature de l'anticorps primaire utilisé. En effet, l'anticorps monoclonal MB2 a reconnu les macrophages et seules ces cellules présentaient une réactivité positive.

La réaction A utilise cet anticorps avec en deuxième et en troisième étape des antisérums anti-immunoglobulines d'espèce non préincubés dans du sérum bovin. Les macrophages ont été identifiés par cette réaction, mais également de nombreuses cellules lymphoïdes du cortex et de la médullaire du nœud lymphatique. Pour ces dernières, l'examen cytologique a révélé qu'il s'agit essentiellement des plasmocytes, et à un degré moindre, de centroblastes et d'immunoblastes. Toutes ces

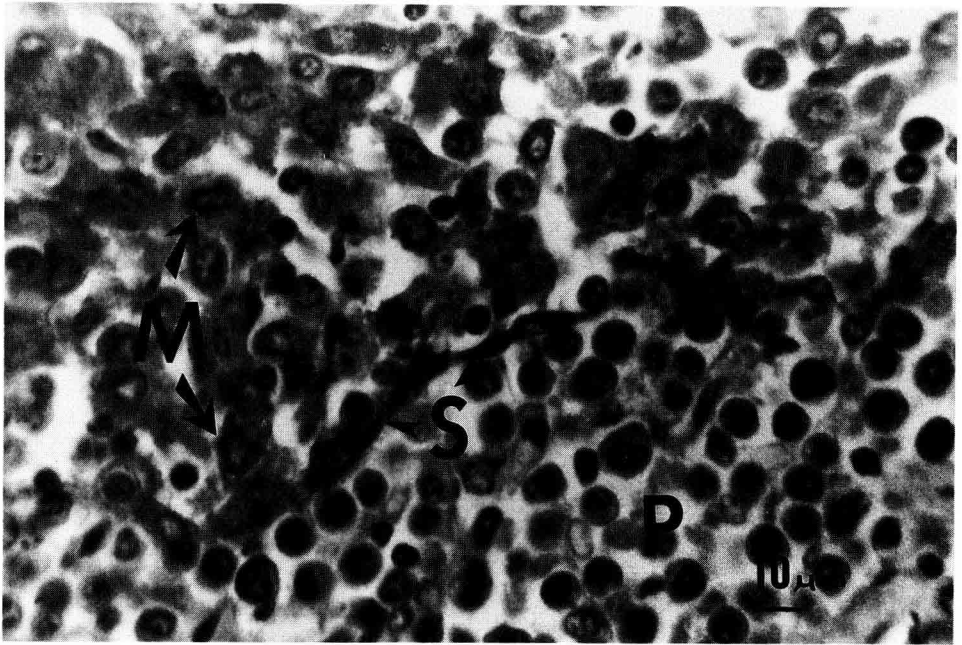


Fig 3. Nœud lymphatique – bovin (immunoperoxydase, x360 – réaction C : anticorps primaire MB2, antisérums conjugués de lapin et de porc préincubés dans du sérum bovin). Les macrophages (M) de la lumière des sinus lymphatiques et les macrophages bordants (S) sont marqués alors que les cellules lymphoplasmocytaires (P) ne le sont pas.

cellules ont comme caractère commun de posséder des immunoglobulines intracytoplasmiques (Femenia *et al*, 1990).

Pour la réaction B (pas d'anticorps primaire, antisérums conjugués de lapin et de porc non préincubés dans du sérum bovin), l'absence d'anticorps primaire pouvait laisser supposer qu'aucun marquage ne serait obtenu. En effet, les anticorps secondaire et tertiaire (sérum anti-immunoglobulines d'espèce non préincubés dans du sérum bovin) ne constituent que des réactifs de révélation de la présence d'immunoglobulines fixées de souris et de lapin. Or, avec cette réaction, non seulement les cellules lymphoïdes qui possèdent des immunoglobulines cy-

toplasmiques ont été marquées mais de plus, les macrophages présentaient un marquage cytoplasmique très net en périphérie.

Enfin dans la réaction D (pas d'anticorps primaire, antisérums conjugués de lapin et de porc préincubés dans du sérum bovin), ni les macrophages ni les cellules lymphoïdes n'ont été marqués.

Il apparaît donc que la préincubation dans du sérum bovin des sérums secondaires et tertiaires anti-immunoglobulines d'espèce a permis de prévenir efficacement certaines réactivités non spécifiques.

Plusieurs considérations méritent d'être prises en compte pour comprendre les rai-

sons de l'effet neutralisant du sérum bovin vis-à-vis de ces réactivités.

Peut-on expliquer la réactivité non spécifique par le «bruit de fond» qui est fréquent dans le tissu lymphoïde ?

On qualifie de «bruit de fond» une coloration légère, plus ou moins diffuse, que l'on ne peut attribuer à une réactivité de nature précisable, spécifique ou non.

Ce «bruit de fond» ne peut être invoqué car le marquage non spécifique des cellules lymphoïdes (plasmocytes en particulier) et des macrophages dans la réaction B était de forte intensité. Ceci autorise une distinction nette entre ces cellules et la matrice extracellulaire.

D'autre part, le fixateur utilisé est le Susa. Il appartient à la catégorie des fixateurs mercuriques qui sont caractérisés par un bruit de fond faible ou absent pour les réactions immunohistochimiques du tissu lymphoïde (Mason *et al*, 1980). Enfin les conditions de fixation ont été les mêmes dans toutes les réactions immunohistochimiques, cette fixation a affecté tous les prélèvements de manière identique. Or, aucun marquage cellulaire non spécifique ni «bruit de fond» importants n'ont été constatés dans les réactions C et D.

Hormis l'hypothèse du «bruit de fond», les réactivités non spécifiques constatées dans notre étude pourraient s'expliquer par des liaisons non spécifiques des anticorps utilisés à divers constituants tissulaires. En fait, l'utilisation de la sérumbumine bovine dans le tampon phosphate salé a pour effet d'accroître la concentration protéique du milieu (comme l'utilisation de poudre de lait dans les tampons de lavage) et de masquer les sites électronégatifs (certains groupements basiques des fibres de collagène par exemple) susceptibles de fixer de manière non spécifique les immunoglobulines utilisées comme réactifs.

En raison de la richesse en immunoglobulines des cellules marquées de façon

non spécifique dans les réactions A et B de notre étude et du rôle neutralisant du sérum de bovin dans les réactions C et D, il apparaît plutôt que la réactivité non spécifique que nous avons observée s'explique par une reconnaissance par les sérums anti-immunoglobulines d'espèce, d'immunoglobulines appartenant au tissu étudié et présentes dans le cytoplasme de cellules qui peuvent soit les sécréter soit les héberger.

Pour ce qui est des cellules lymphoïdes marquées de manière non spécifique, la topographie du marquage (cortical, médullaire) comme l'aspect cytologique (plasmocytes, centroblastes notamment) indiquent qu'il s'agit de cellules thymo-indépendantes également dites «B-dépendantes» et qui présentent donc la propriété de pouvoir élaborer des immunoglobulines. Les immunoglobulines cytoplasmiques qui sont conservées par la fixation dans le Susa et l'inclusion en paraffine peuvent donc être révélées par les sérums antiglobulines d'espèce du fait de l'existence d'une réactivité croisée entre les immunoglobulines de bovins et les anticorps utilisés dans les réactions immunohistochimiques. La préincubation des antisérums dans du sérum bovin neutralise donc les anticorps de l'antisérum susceptibles de se fixer sur les immunoglobulines présentes *in situ* dans certaines cellules du tissu lymphoïde bovin.

Le marquage des macrophages dans la réaction B (absence d'anticorps primaire) pose le problème des cellules qui sont capables d'héberger des immunoglobulines (et donc de constituer des faux positifs) sans être capables pour autant de les élaborer.

Cette réactivité non spécifique des macrophages est essentiellement liée à l'adsorption et/ou absorption d'immunoglobulines extracellulaires (Delsol *et al*, 1984). Ce phénomène constitue une cause d'erreur fréquente et sous-estimée (Mason et Biberfeld, 1980). L'adsorption d'immuno-

globulines extracellulaires peut se faire de manière «active». En effet, le macrophage présente des sites récepteurs pour le fragment Fc des IgG susceptibles de fixer des immunoglobulines et donc de conduire à des positivités non spécifiques. En principe, ce problème ne devrait se poser que pour des coupes à congélation dans lesquelles les récepteurs membranaires sont préservés. Nous avons vu dans notre étude qu'en fait le marquage non spécifique est souvent nettement plus accusé en périphérie de la cellule, ce qui accrédite l'hypothèse d'une fixation des immunoglobulines sur la membrane, ou tout au moins d'une partie d'entre elles puisqu'il existe tout de même un marquage cytoplasmique non spécifique dans les macrophages. Cette fixation pourrait concerner les immunoglobulines des antisérums dans la mesure où le fixateur mercurique que nous avons utilisé épargnerait suffisamment de récepteurs pour le fragment Fc sur la membrane des macrophages. Elle pourrait, d'autre part, survenir *in vivo* et concerner des immunoglobulines présentes dans la lymphe.

De manière similaire, l'internalisation *in vivo* dans le cytoplasme des macrophages d'immunoglobulines présentes dans la lymphe pourrait rendre compte du marquage cytoplasmique non spécifique.

Enfin l'absorption d'immunoglobulines extracellulaires peut se faire de manière «passive», notamment lors de fixation de mauvaise qualité (Delsol *et al*, 1984). Dans le cas présent, les conditions de réalisation de notre étude permettent d'éliminer cette hypothèse.

Un dernier paramètre peut intervenir dans les techniques d'immunoperoxydase du tissu lymphoïde pour conditionner les réactions non spécifiques : il tient au choix de la méthode utilisant la peroxydase comme marqueur. Essentiellement, 3 méthodes sont disponibles : le système Biotine-avidine-peroxydase (Warnke et Levy,

1980), l'utilisation d'antisérums conjugués à la peroxydase (Stein *et al*, 1982) ou la méthode PAP (peroxydase-antiperoxydase) (Gratter *et al*, 1982). Nous avons choisi d'utiliser 2 antisérums conjugués à la peroxydase car cette méthode est préconisée par Delsol *et al* (1984) pour les études en immunoperoxydase du tissu lymphoïde humain. Cette méthode pose le problème de neutralisation des réactivités non spécifiques que nous avons évoquées, puisque chacun des antisérums utilisés est susceptible de se lier de manière non spécifique au tissu étudié.

Néanmoins, en pratique, par rapport à la méthode PAP, l'utilisation d'antisérums conjugués présente l'avantage d'augmenter la sensibilité de la méthode et l'intensité du marquage.

Le système biotine-avidine-peroxydase constitue une méthode très sensible et dans laquelle le risque de réactivités non spécifiques liées à la présence d'immunoglobulines tissulaires est réduit par rapport à l'utilisation de 2 antisérums conjugués non préincubés en présence de sérum bovin. Néanmoins, à l'usage il n'est pas non plus dénué d'inconvénients. La biotine est une vitamine présente dans de nombreux tissus ce qui accroît les possibilités de résultats faussement positifs. D'autre part, certaines préparations de biotine et d'avidine montrent des variations très importantes dans leur affinité respective, ce qui nécessite un contrôle très rigoureux préalablement à l'utilisation de chaque nouveau jeu de réactifs.

Il apparaît donc que la présence au sein du tissu lymphoïde d'immunoglobulines «autochtones» est susceptible de provoquer de nombreuses réactivités non spécifiques. La préincubation des sérums anti-globulines d'espèce utilisés dans les réactions immunohistochimiques, par un sérum provenant de l'espèce dont on étudie le tissu lymphoïde permet de neutraliser ces réactivités de manière satisfai-

sante en pratique. Nous envisageons de perfectionner ce procédé de neutralisation des réactivités non spécifiques des antiglobulines d'espèce en utilisant le sérum bovin sous forme d'immunoabsorbant (Avraméas et Ternynck, 1969) car dans ce cas il ne se pose plus les problèmes de l'élimination des complexes immuns et des conditions d'équilibre des réactions antigène-anticorps.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Mesdames MF Amardeilh, B Rouvellac (ENVT) et C Carstaingts (INRA) pour leur contribution technique à ce travail.

RÉFÉRENCES

- Avrameas S, Ternynck T (1969) The cross-linking of protein with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbants. *Immunochemistry* 6, 53
- Delsol G, Al Saati T, Caverivière P, Voigt JJ, Ancelin E, Rigal-Huguet F (1984) Étude en immunopéroxydase du tissu lymphoïde normal et pathologique. *Ann Pathol* 4, 165-183
- Femenia F, Alogninouwa T, Perre J, Parodi AL (1990) Étude histologique du ganglion lymphatique du bovin avant et après stimulation antigénique : 2. Immunocytochimie et microscopie électronique. *J Vet Med A*, 37, 81-94
- Ganter P, Jolles G (1969) *Histochimie normale et pathologique*. Gauthier-Villars, Paris, 1, 1394 p
- Gatter KC, Abdulaziz Z, Beverley P, Corvalan JFR, Ford C, Lane EB, Mota M, Nash JRG, Pulford K, Stein H, Taylor-Papadimitriou J, Woodhouse C, Mason DY (1982) Use of monoclonal antibodies for the histopathological diagnosis of human malignancy. *J Clin Pathol* 35, 1253-1267
- Heyderman E (1979) Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods and controls. *J Clin Pathol* 32, 971-978
- Mason DY, Biberfeld P (1980) Technical aspects of lymphoma immunohistology. *J Histochem Cytochem* 28, 731-745
- Mason DY, Bell JI, Christensson B, Biberfeld P (1980) An immunohistological study of human lymphoma. *Clin Exp Immunol* 40, 235-248
- Poppema S, Hollema H, Visser L, Vos H (1987) Monoclonal antibodies (MT1, MT2, MB1, MB2, MB3) reactive with leukocyte subsets in paraffin-embedded tissue sections. *Am J Pathol* 127 (3), 418-429
- Stein H, Uchanska-Ziegler B, Gerdes J, Ziegler A, Wernet P (1982) Hodgkin and Sternberg-Reed cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis. *Int J Cancer* 29, 283-290
- Warnke R, Levy R (1980) Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-Avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 28, 771-776