

L'IMMUNOHISTOCHIMIE : Son principe, ses applications et ses limites.

GENTON C.Y.¹

(Manuscript N° A31. Received 21 February 2006. Accepted in revised form 23 February 2006) Clin Mother Child Health 2006; Vol 3, N° 1 : 477-481

RESUME:

L'immunohistochimie, technique utilisée en histo- et cytopathologie depuis plus de vingt ans, a permis de faire des progrès considérables dans le diagnostic morphologique, en particulier dans celui des maladies cancéreuses. Son but et son principe: mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction antigène – anticorps, le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré. Ses applications sont innombrables.

Parmi les plus importantes, citons le diagnostic différentiel des tumeurs indifférenciées (carcinome ?, sarcome ?, mélanome ?, ou lymphome malin ?), la catégorisation des leucémies et des lymphomes, l'identification de l'origine d'une métastase ainsi que la détection de molécules ayant une importance pronostique et/ou thérapeutique (récepteurs hormonaux d'un cancer mammaire par exemple).

Les limitations de la technique sont d'ordre purement pratique, d'où l'importance cruciale d'une formation adéquate des techniciens dans la manipulation et l'utilisation des anticorps d'une part, et d'une expérience minimale du pathologiste dans l'interprétation des images d'autre part.

L'immunohistochimie ayant un prix, il est indispensable de faire le bon choix parmi les très nombreux anticorps disponibles, leur importance diagnostique étant fort variable.

En bref, l'immunohistochimie permet au pathologiste préciser son diagnostic au maximum, ce qui à son tour, donne au clinicien la possibilité de choisir le traitement optimal pour son patient.

MOTS CLES: Diagnostic - Morphologie - Immunohistochimie - Immunocytochimie - Pronostic.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY: It's principle, applications and limits.

SUMMARY:

Immunohistochemistry, a technique which is used in histo- and cytopathology for the past twenty years, has achieved great progress in morphological diagnosis, especially of malignant tumours.

Its goal and its principle are to reveal particular cellular proteins (cytoplasmic, membranous or nuclear), specific for a cell type or cellular function, with the help of an antigen – antibody reaction. The complex formed is rendered visible and localizable by a coloured marker.

Its applications are innumerable, amongst which are: the differential diagnosis of undifferentiated tumours (carcinoma?, sarcoma ?, melanoma?, malignant lymphoma), the categorization of leukaemias and malignant lymphomas, the identification of the origin of a metastasis as well as the detection of molecules which play a significant prognostic and/or therapeutic role (hormone receptors in mammary carcinoma for instance).

The limitations of this technique are purely practical, thus the importance of adequate training of technicians in handling and using the antibodies, as well as minimal experience of the interpreting pathologist. These are of crucial importance for success. Given that immunohistochemistry is costly, it is therefore essential to make the best choice amongst the numerous available antibody tests, whose diagnostic significance is quite variable.

On the whole, immunohistochemistry helps the pathologist to make the most accurate diagnosis, which in turn gives the opportunity to the clinician to choose the optimal treatment for his patient.

KEY WORDS: Diagnosis - Morphology - Immunohistochemistry - Immunocytochemistry - Prognosis.

¹ Genton C.Y. ; Institut Universitaire de Pathologie, Lausanne – CHUV.

Correspondances: Genton C.Y.; Institut Universitaire de Pathologie, Rue du Bugnon 25
CH-1011 Lausanne – CHUV ; E mail:
claude.genton@bluewin.ch

I- INTRODUCTION

Il serait absurde de nier aujourd'hui le fait que l'avènement de l'immunohistochimie et ses applications dans les domaines du diagnostic histo- et cytopathologique durant les années 80 ont

représenté une véritable révolution pour tous les pathologistes. Il est vrai que les colorations traditionnelles telles que l'hématoxyline-éosine(HE) en histologie et celles de Papanicolaou et/ou de Giemsa en cytologie continuent à jouer un rôle fondamental dans la pratique quotidienne du diagnostic morphologique. Néanmoins, il est de plus en plus évident que l'utilisation de l'immunohistochimie permet de faire des progrès considérables, en particulier dans le diagnostic des maladies cancéreuses en général. En effet, elle permet non seulement de préciser le diagnostic, mais encore de mettre en évidence certaines caractéristiques, aussi importantes pour le pronostic que pour le choix d'un traitement optimal, voire une thérapie ciblée. Bref, cette technique, même si elle n'est pas miraculeuse (elle ne permet qu'exceptionnellement de différencier entre tumeurs bénignes et malignes), elle est devenue un instrument indispensable si l'on veut pouvoir assurer un diagnostic morphologique de qualité dans le domaine de l'oncologie.

Le but de cet article est de présenter les principes mêmes de l'immunohistochimie, ses applications essentielles ainsi que ses limitations.

II- PRINCIPES

Le principe de base de l'immunohistochimie est en fait très simple. Son but est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques (par exemple, filaments intermédiaires), nucléaires (par exemple, récepteurs hormonaux) ou membranaires (par exemple c-erbB2), spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, à l'aide d'anticorps dirigés contre cette protéine aux propriétés antigènes. Les anticorps spécifiques utilisés en immunohistochimie sont obtenus de deux façons différentes :

1- Immuniser un animal (souris, lapin, cobaye) en lui injectant l'antigène donné et recueillir ensuite son sérum pour le purifier et isoler ensuite un anticorps polyclonal,

2- Immuniser un animal (souris), recueillir ses lymphocytes, mettre ceux-ci en culture, et après purification du surnageant de la culture, obtenir un anticorps monoclonal.

L'anticorps spécifique ainsi produit est ensuite soit isolé et marqué par un «révélateur» optique (Figure 1), généralement la fluorescéine pour l'immuno-fluorescence, soit détecté par un second anticorps dirigé contre la partie constante du premier (anti-souris ou anti-lapin) marqué par un enzyme dont l'activité se manifeste par la formation d'un produit coloré (par exemple à partir de la diaminobenzidine et H₂O₂ pour la peroxydase (complexe peroxydase-

antiperoxydase: PAP) ou à l'aide du complexe avitine-biotine (ABC) (Figure 2).

L'anticorps marqué est incubé avec une coupe de tissu après démasquage de l'antigène au moyen du four à micro-ondes ou à l'aide d'enzymes [1]. Durant cette incubation, l'anticorps marqué se fixe sur l'antigène spécifique (Figures 1 et 2) le rendant ainsi visible et localisable, que ce soit dans le cytoplasme, les noyaux ou la membrane cellulaire (Figures 3 et 4).

Actuellement, la très grande majorité des anticorps utilisés dans la pratique quotidienne sont des anticorps pouvant être utilisés sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Toutefois, certains immunomarquages exigent encore d'être réalisés sur du matériel tissulaire frais et immédiatement congelé, mais ces cas restent exceptionnels. A noter encore que le nombre des anticorps disponibles sur le marché, pour la plupart monoclonaux, ne fait que croître de jour en jour [2].

Si d'une façon générale un examen immunohistochimique exige au moins 24h (démasquage de l'antigène, incubation avec l'anticorps etc), il existe actuellement des méthodes rapides, utilisables même lors d'examens extemporanés [3].

III- APPLICATIONS

Il est indiscutable qu'un diagnostic histo- et/ou cytopathologique précis et fiable de toute tumeur maligne représente la condition « sine qua non » pour que le choix thérapeutique soit optimal et offre les meilleures chances de survie, si ce n'est de guérison, au patient. Or grâce à l'immunohistochimie, aussi bien le diagnostic différentiel de certaines tumeurs que la mise en évidence de certaines de leurs propriétés ayant des conséquences thérapeutiques et pronostiques importantes, ont fait des progrès considérables, et cela au bénéfice de tout patient cancéreux.

Une des indications des plus fondamentales et universelles à l'immunohistochimie dans le diagnostic histopathologique est représentée par la situation dans laquelle on se trouve en présence d'une tumeur indifférenciée. En effet, il se pose alors le problème de savoir s'il s'agit d'un carcinome indifférencié, d'un sarcome, d'un mélanome ou d'un lymphome malin. Autre situation embarrassante en morphologie pure : comment faire le diagnostic différentiel entre un adénocarcinome primaire (ou secondaire) du poumon et un mésothéliome de type épithélial ?... Sans immunohistochimie, ces diagnostics différentiels ne sont tout simplement pas possibles, et cela alors qu'une telle distinction est vitale pour le patient, tant le traitement et le pronostic seront différents selon le diagnostic définitif.

Le recours à l'immunohistochimie est également très précieux pour la catégorisation des leucémies et des lymphomes. En effet, l'identification et la classification des tumeurs ayant pour cellules d'origine soit des lymphocytes (T ou B) soit des cellules mononucléées de type phagocytaire (histiocytes), requièrent de nos jours de manière impérative la mise en œuvre de l'immunohistochimie, les schémas thérapeutiques pouvant être très différents selon le type de prolifération néoplasique.

Une autre indication est représentée par la nécessité d'identifier l'origine d'une métastase, la tumeur primaire étant jusque-là restée muette. Pour illustration, le cas d'une femme de 64 ans qui présente une fracture pathologique du col du fémur. Une biopsie osseuse est réalisée et permet de mettre en évidence une métastase d'un carcinome d'origine X. Les examens cliniques et para-cliniques complémentaires ne mettent en évidence aucune tumeur, en particulier pas de tumeur mammaire, pulmonaire ou digestive. Seul un volumineux goitre nodulaire en grande partie calcifié est noté. L'examen de la métastase en immunohistochimie met en évidence une positivité de la majorité des cellules tumorales pour la thyroglobuline (Figure 5). La certitude que cette patiente est porteuse d'un carcinome de la glande thyroïde étant acquise, une thyroïdectomie totale est réalisée et son examen systématique permettra de mettre en évidence un petit carcinome papillaire (Ø maximal de 0.6 cm avec invasion vasculaire) d'un type particulier.

Enfin, la détection de molécules ayant une importance pronostique et/ou thérapeutique représente également une indication largement reconnue pour des examens immunohistochimiques. Le carcinome mammaire est un exemple classique pour illustrer ce fait. D'une part, l'immunohistochimie permet de mettre en évidence la présence ou non de récepteurs hormonaux nucléaires, mais encore de quantifier la proportion de cellules positives (Figure 2). Il est connu de longue date que les tumeurs exprimant les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone ont un meilleur pronostic que celles qui sont négatives. De plus, ce résultat va déterminer la mise en œuvre ou non d'un traitement aux anti-oestrogènes. Enfin, il a été établi, par exemple, que les tumeurs mammaires qui surexpriment la protéine c-erbB2 (ou HER-2, protéine membranaire) ont un pronostic beaucoup plus sombre, car elles se révèlent généralement résistantes aux traitements oncologiques habituels (Figure 3). Par contre, elles sont susceptibles de répondre positivement à une thérapie ciblée, en deuxième intention, par l'Herceptine®, médicament dont la formule est identique à celle de l'anticorps utilisé en immunohistochimie.

L'anticorps monoclonal MIB-1 (Ki-67) permet de mettre en évidence la fraction des cellules en

prolifération, ce qui permet d'évaluer l'activité effective de multiplication cellulaire au sein d'une tumeur, ce qui a un impact certain sur le pronostic [4].

Dans de très rares situations, l'immunohistochimie permet de distinguer, avec un assez grand degré de fiabilité, entre une prolifération cellulaire bénigne et maligne. C'est le cas par exemple lors d'une prolifération lymphocytaire au sein de laquelle on peut mettre en évidence une monoclonalité des cellules grâce à un antigène dirigé soit contre les chaînes légères, soit contre les chaînes lourdes des IgG.

A noter enfin que l'immunohistochimie est une technique qui se révèle aussi utile en cytopathologie, méthode diagnostique moins invasive et moins coûteuse que l'histopathologie [5, 6].

IV- LIMITATIONS

Comme toutes les méthodes, l'immunohistochimie a ses exigences et ses limites. Pour satisfaire aux exigences requises et éviter les pièges, il est bon de rappeler les faits suivants:

a) Exigences techniques

- Tous les anticorps ont une «durée de vie» limitée. Il faut donc pouvoir les stocker dans des conditions adéquates et les utiliser avant la date limite de conservation (risque de faux négatif).
- Il ne faut soumettre à un tel examen que du tissu bien conservé, l'autolyse ainsi que la conservation prolongée du tissu dans le formol causant non seulement une dénaturation de l'antigène (à faux négatif) mais encore une diffusion de celui-ci dans les tissus avoisinants pouvant mener à une image ininterprétable (à imprégnation non spécifique).
- La procédure de démasquage des antigènes est cruciale [1]. Que celui-ci se fasse par voie enzymatique ou au moyen d'un four à micro-ondes, il doit être dosé de façon optimale. Un démasquage insuffisant mène à des résultats faux négatifs, un démasquage excessif peut avoir pour conséquence une fausse positivité plus ou moins diffuse.
- La réalisation d'examen immunohistochimiques exige une excellente formation ainsi qu'une discipline rigoureuse de la part des techniciennes et techniciens chargés de leur exécution. Une période d'apprentissage est donc indispensable.

b) Pièges lors de l'interprétation

- On peut parfois constater une réaction croisée avec d'autres antigènes. De tels résultats faussement positifs doivent être corrigés sur la base des données cliniques et histologiques conventionnelles. Il en va de même pour une fixation non spécifique de l'anticorps aux tissus.

- La présence dans le tissu examiné d'une activité peroxydase endogène ou d'une affinité particulière pour le complexe avidine-biotine peut être à l'origine de faux positifs.

- La présence de cellules normales au sein d'un tissu tumoral peut amener à de fausses conclusions. Ceci est particulièrement vrai pour les tumeurs des tissus mous. La présence de rares cellules positives pour la desmine (anticorps marquant les cellules musculaires squelettiques) au sein d'un sarcome ne doit pas impérativement mener au diagnostic d'un rhabdomyosarcome.

c) Le prix

Enfin, comme tout examen, l'immunohistochimie a un prix. Toutefois le prix des anticorps les plus utiles, donc les plus utilisés, a nettement baissé depuis leur introduction. De plus, pour être à même d'effectuer cette technique, il n'est pas nécessaire de disposer d'un nombre considérable d'anticorps (voir Tableau I).

V CONCLUSIONS

La possibilité de pouvoir recourir à l'immunohistochimie, lorsque cela s'avère nécessaire, représente non seulement un atout considérable pour le pathologiste, mais encore un avantage non négligeable pour le médecin traitant et son patient. Idéalement, cette technique devrait donc être accessible à tous les laboratoires de pathologie. Sa mise en oeuvre implique que certaines conditions indispensables soient remplies, ces conditions étant les seules garantes de fiabilité et de qualité. Même s'il ne dispose que d'un nombre limité d'anticorps, le pathologiste pourra affiner son diagnostic et permettre ainsi au clinicien de choisir le traitement optimal pour ses patients ■

Tableau I- Marqueurs les plus utilisés (en gras, les plus utiles).

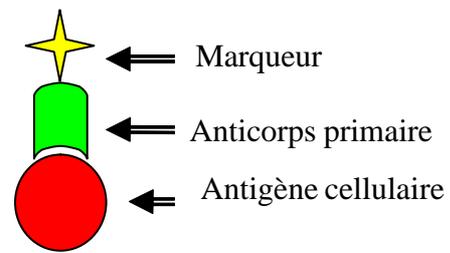


Figure 1- Méthode en une étape : L'anticorps spécifique, marqué par un « révélateur chromogène » se fixe sur l'antigène durant l'incubation, permettant ainsi sa visualisation (coloration brune ou rouge, selon le marqueur et la technique) et précisant sa localisation.

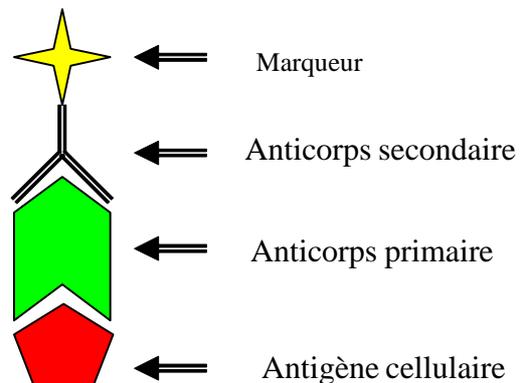


Figure 2- Méthode en deux étapes : Sur l'anticorps primaire (ayant la souris ou le lapin comme origine) vient se greffer un anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin) marqué.

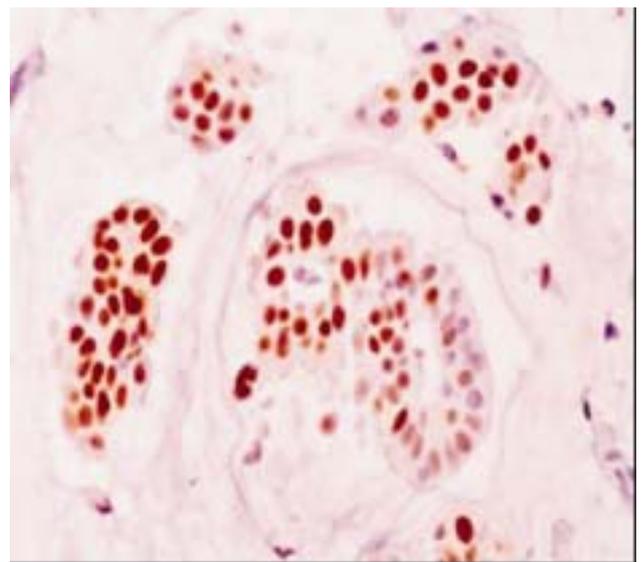


Figure 3- Mise en évidence des récepteurs nucléaires à la progestérone dans un carcinome canalaire invasif du sein.

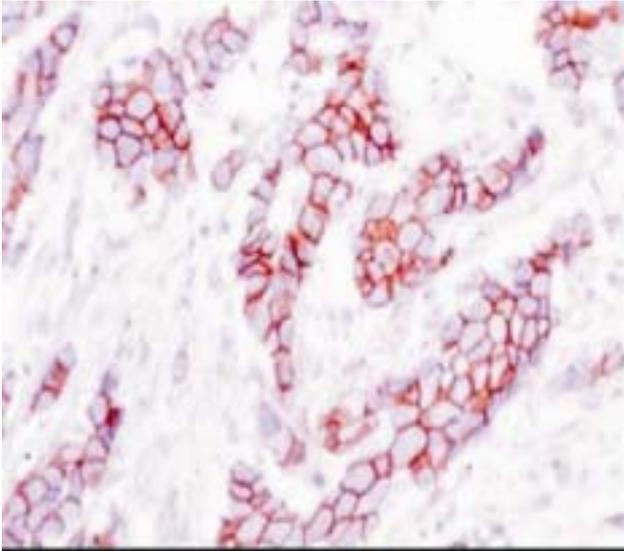
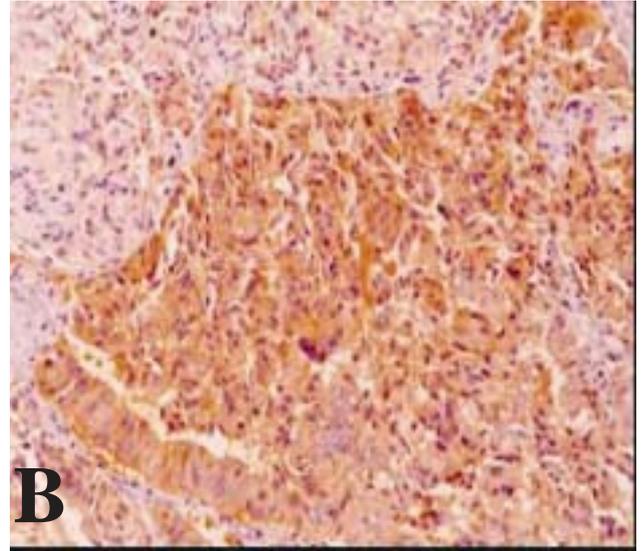


Figure 4- Mise en évidence d'une surexpression de HER-2 dans la membrane des cellules carcinomateuses (carcinome canalaire invasif du sein), surexpression suggérant un mauvais pronostic.



B. Tissu tumoral positif pour la thyroglobuline → Présence certaine d'un carcinome thyroïdien jusqu'ici «occulte»■

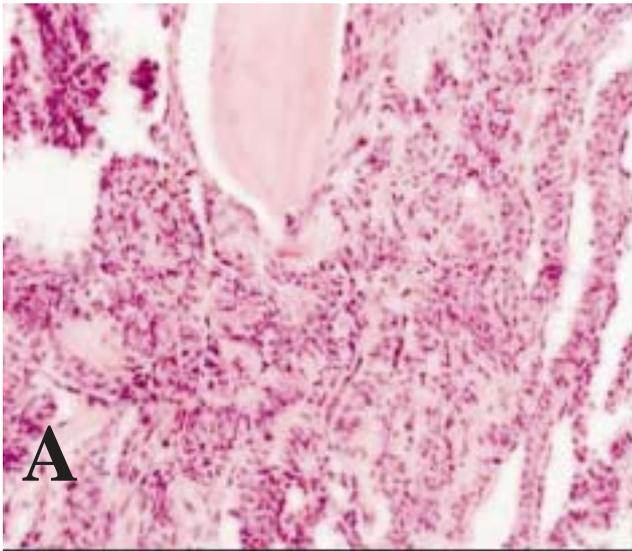


Figure 5- Patiente de 64 ans. Fracture pathologique du col du fémur. **A.** Biopsie osseuse: Métastase d'un adénocarcinome d'origine inconnue.

REFERENCES:

1. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1016-19.
2. Leong ASY, Cooper A, Leong FJW-M. *Manual of diagnostic antibodies for immunohistochemistry*. Greenwich Medical Media, London, 2003.
3. Kammerer U, Kapp M, Gassel AM, Richter T, Tank C, Dietl J et al. A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. *J Histochem Cytochem* 2001;49:623-30.
4. Birner P, Ritzi M, Musahl C, Knippers R, Gerdes J, Voigtlander T et al. Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *Am J Pathol* 200;158:199-6.
5. Nadji M, Gangei P. Special report. Immunocytochemistry in diagnostic cytology: a 12-year perspective. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 470-75.
6. Leung SW, Bedard YC. Simple miniblock technique for cytology. *Mod Pathol* 1993;6:630-32.