

2m11.2700.8

Université de Montréal

**DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES APPROCHES
IMMUNOCYTOCHIMIQUES ULTRASENSIBLES APPLIQUÉES À LA
MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.**

par

Gaétan Mayer

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue

de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Biologie Cellulaire

Juin 1999

© Gaétan Mayer, 1999



W

4

U58

1999

v.060

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES APPROCHES
IMMUNOCYTOCHIMIQUES ULTRASENSIBLES APPLIQUÉES À LA
MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.**

présenté par:

Gaétan Mayer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Allégria Kessous.....président-rapporteur

Docteur Moïse Bendayan.....directeur de recherche

Docteur Lucian D. Ghitescu.....membre du jury

Mémoire accepté le: 99:08:02.....

SOMMAIRE

La méthodologie employée pour approfondir les connaissances des propriétés organisationnelles et fonctionnelles des cellules revêt une importance primordiale. Ce sont les outils techniques et leurs raffinements qui permettent de pousser plus loin les investigations sur les rôles spécifiques joués par chacun des organelles cellulaires.

Notre étude porte sur l'amplification des signaux immunocytochimiques en microscopie. Le but ultime du développement des méthodes immunocytochimiques est la visualisation d'une seule molécule antigénique à un site particulier.

Un compartiment cellulaire peut être constitué de milliers de protéines différentes possédant des rôles essentiels. Toutefois, la quantité de ces protéines varie grandement et les méthodes immunocytochimiques conventionnelles ne permettent pas toujours de détecter des constituants présents en très faibles quantités. C'est pourquoi un grand nombre de recherche a été mené afin d'améliorer la sensibilité des techniques d'immunocytochimie.

Nous nous sommes intéressés à une nouvelle approche qui permet d'amplifier de façon significative les immunomarquages en microscopie optique. L'approche d'amplification du signal par la tyramine ou CARD (Catalyzed Reporter Deposition), est basée sur l'habileté de la peroxydase de raifort (HRP) à catalyser la condensation oxydative de dérivés phénoliques, comme la biotinyloxy- ou la fluorescein-tyramide, sur une surface arborant des complexes antigène-anticorps biotinylés. Cette accumulation de tyramine conjuguée à des indicateurs permet de détecter un site antigénique avec plusieurs marqueurs.

Au cours de nos études sur l'amplification, nous avons modifié et mis en pratique l'approche CARD pour la localisation ultrastructurale d'antigènes. Dans un premier temps, l'application du protocole de biotinyloxy-tyramide a engendré des

filaments denses aux électrons qui ont permis de révéler divers antigènes avec une haute résolution. Ce nouveau type de produit de réaction n'a toutefois pas permis d'analyser les résultats de façon quantitative.

Nous avons donc changé notre approche pour introduire le marqueur à l'or colloïdal dans ce protocole d'amplification. Nous avons construit de nouvelles sondes tyramide-indicateur permettant de combiner la méthode CARD à celle de l'immuno-or colloïdal. La quantification des résultats obtenus avec les systèmes CARD/biotinyl-tyramide (ou biotinyl-LC-LC-tyramide)/streptavidine-or, CARD/tyramide-albumine-or et CARD/tyramide-IgG/protéine A-or a montré que l'intensité du marquage était augmentée de 4 à 13 fois par rapport à la technique de protéine A-or conventionnelle. La méthode utilisant la sonde tyramide-IgG a montré la plus forte augmentation du signal avec un facteur d'amplification de 13. De plus, l'analyse de la résolution du marquage a démontré qu'en dépit de l'amplification la résolution demeure très bonne.

En dernier lieu, nous avons introduit un nouveau substrat de l'HRP conjugué à des amas d'or ultrapetits (Nanogold). Le protocole CARD-Nanogold réunit trois éléments d'amplification: la déposition catalytique de substrats par l'HRP, les particules de Nanogold et l'amplification à l'argent. Cette combinaison a donné lieu à des immunomarquages améliorés, très sensibles et intenses.

Ces nouveaux protocoles ont engendré des marquages spécifiques ayant la résolution des marqueurs à l'or, avec la possibilité d'évaluation quantitative. Donc une fois associée, les techniques CARD et immuno-or génèrent un signal amplifié, spécifique et sensible qui combine les avantages des deux approches.

Mots clés: Immunocytochimie, Amplification du signal, Microscopie électronique, Catalyzed reporter deposition (CARD), Or colloïdal

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	XII
LÉGENDES DES SCHÉMAS	XVIII
DÉDICACE	XIX
AVANT-PROPOS	XX
1. INTRODUCTION	1
1.1 MÉTHODES DIRECTES ET INDIRECTES	3
1.2 SYSTÈMES DE DÉTECTION IMMUNOCYTOCHIMIQUES	4
1.2.1 Immunofluorescence	4
1.2.2 Méthodes immunoenzymatiques	6
1.2.3 Système avidine-biotine	12
1.3 INTENSIFICATION DE LA COLORATION AU DAB	27
1.4 IMMUNOCYTOCHIMIE À L'OR COLLOÏDAL	29
1.4.1 Application à la microscopie électronique	29
<i>1.4.1.1 Propriétés de l'or colloïdal</i>	30

1.4.1.2	<i>Complexes protéine-or</i>	32
1.4.1.3	<i>Évaluation quantitative</i>	34
1.4.1.4	<i>Double marquage</i>	35
1.4.1.5	<i>Immunocytochimie à l'or colloïdal</i>	36
1.4.1.6	<i>Techniques d'amplification de l'immuno-or</i>	37
1.4.2	Application à la microscopie optique	39
1.5	HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE NOTRE ÉTUDE	41
1.5.1	Déposition catalytique de dérivés de tyramine par la peroxydase	42
2.	ARTICLES	46
3.	DISCUSSION	47
3.1	PROTOCOLE DE BIOTINYL-TYRAMIDE	49
3.2	PROTOCOLE DE BIOTINYL-TYRAMIDE/STREPTAVIDINE-OR	53
3.3	PROTOCOLE DE BIOTINYL-LC-LC- TYRAMIDE/STREPTAVIDINE-OR	54
3.4	PROTOCOLE DE TYRAMIDE-ALBUMINE-OR	57
3.5	PROTOCOLE DE TYRAMIDE-IgG/PROTÉINE A-OR	58
3.6	PROTOCOLE DE SUBSTRAT-NANOGOLD/INTENSIFICATION À L'ARGENT	60
3.7	RÉSOLUTION	63

3.8 CONTRÔLES DE SPÉCIFICITÉ	64
3.9 CONCLUSION	66
4. BIBLIOGRAPHIE	71
REMERCIEMENTS	91

LISTE DES TABLEAUX

Article 2

Table 1. Density of labeling for amylase in pancreatic cells: amplification protocols.

Table 2. Controls of the specificity of the immunolabeling and of the amplification protocols.

LISTE DES FIGURES

Mémoire

Figure 1. Méthodes immunocytochimiques directe et indirectes.

Figure 2. Structure chimique de la biotine.

Figure 3. Systèmes de détection immunocytochimique basés sur les interactions avidine-biotine.

Figure 4. Représentation schématique des complexes streptavidine-biotine-peroxydase.

Figure 5. Principe de la méthode de *multilayer peroxidase-labeled antibody* (MLP).

Figure 6. Amplification directe et indirecte à l'aide de chaînes de dextran conjuguées à des anticorps et des enzymes.

Figure 7. Diagramme illustrant les principes de la technique d'amplification avec la protéine A-or.

Figure 8. Structure chimique de la tyramine.

Figure 9. Mécanisme de réaction de la déposition de la biotiny-tyramide à la surface des coupes de tissus.

Figure 10. Principe du protocole de biotiny-tyramide.

Figure 11. Schéma représentant le protocole de biotiny-tyramide/streptavidine-or.

Figure 12. Protocole de biotiny-LC-LC-tyramide/streptavidine-or.

Figure 13. Diagramme représentant le protocole de tyramide-albumine-or.

Figure 14. Schéma du protocole de tyramide-IgG/protéine A-or.

Figure 15. Diagramme représentant le système d'amplification CARD-Nanogold.

Article 1

Figure 1a,b. Thin section of rat pancreatic acinar cell labeled for amylase by the TSA technique.

Figure 1c. Control experiment.

Figure 2. Thin section of rat pancreatic B-cell labeled for insulin by the TSA technique.

Figure 3. Localization of heat shock protein 70 in rat pancreatic acinar cell with the TSA technique.

Figure 4. Thin section of rat liver tissue labeled for carbamoyl phosphate synthetase by the TSA technique.

Figure 5. Thin section of rat liver cell labeled for catalase by the TSA technique.

Article 2

Figure 1. Thin section of rat pancreatic acinar cell labeled for amylase by the CARD technique using the tyramide-IgG and the tyramide-BSA-gold protocols.

Figure 2. Zymogen granules labeled for amylase demonstrating the labeling obtained with simple and amplified protocols.

Figure 3. Thin section of rat liver tissue labeled for CPS by the tyramide-IgG protocol.

Figure 4. Evaluation of the resolution for simple and amplified techniques.

Article 3

Figure 1. Localization of amylase in rat pancreatic acinar cells with the simple indirect labeling technique and the HRP-substrate-Nanogold amplification protocol.

Figure 2. Localization of insulin on serial sections of rat pancreatic tissue at the light microscope level with the simple indirect labeling technique and the amplification protocol.

Figure 3. Localization of insulin in rat pancreatic B-cell at the electron microscope level using the HRP-substrate-Nanogold amplification approach.

Figure 4. Control experiments.

Figure 5. Immunodot assay.

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

Mémoire:

Å	Ångström
ABAP	<i>avidin-biotin-alkaline phosphatase complex</i> complexe avidine-biotine-phosphatase alcaline
ABC	<i>avidin-biotin-peroxidase complex</i> complexe avidine-biotine-peroxydase
ABPAP	<i>avidin-biotin-peroxidase-anti-peroxidase complex</i> complexe avidine-biotine-peroxydase-anti-peroxydase
ADN	acide désoxyribonucléique
AMCA	7-amino-4-méthylcoumarin-3-acide acétique
AP	<i>alkaline phosphatase</i> , phosphatase alcaline
APAAP	<i>alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase complex</i> complexe phosphatase alcaline-anti-phosphatase alcaline
ARN	acide ribonucléique
BRAB	<i>bridged avidin-biotin</i> , pont avidine-biotine
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , albumine de sérum bovin
CARD	<i>catalyzed reporter deposition</i> indicateurs déposés catalytiquement
CBA	<i>biotin-rich complex, biotin-peroxidase-avidin complex</i> complexe riche en biotine, complexe biotine-peroxydase-avidine

Cy	cyanine
Da	Dalton
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMSO	<i>dimethyl sulphoxide</i> , dimethylsulfoxyde
ECA	<i>enzyme complex amplification</i> complexe d'amplification enzymatique
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
EP	<i>end product</i> , produit final
EPOS	<i>enhanced polymer one-step staining</i> coloration améliorée en une étape à l'aide de polymères
Eu ³⁺	europium
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i> hybridation <i>in situ</i> par fluorescence
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , peroxydase de raifort
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IgE	immunoglobulines de type E
IgG	immunoglobulines de type G
kDa	kiloDalton
LAB	<i>labeled avidin-biotin</i> , biotine-avidine marquée
LC	<i>long chain</i> , bras d'espacement
μs	microseconde

M	molaire
MLP	<i>multilayer peroxidase-labeled antibody</i> multicouche d'anticorps marqués à la peroxydase
ng	nanogramme
nm	nanomètre
ns	nanoseconde
PAP	<i>horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase complex</i> complexe peroxydase de raifort-anti-peroxydase de raifort
pg	picogramme
pH	concentration en ions hydrogènes
rABC	<i>reversed avidin-biotin-peroxidase complex</i> complexe avidine-biotine-peroxydase inverse
S	unité Svedberg
SA	streptavidine
SBMC	<i>streptavidin-based macromolecular complex</i> complexe macromoléculaire basé sur la streptavidine
TRFM	<i>time-resolved fluorescence microscopy</i> microscopie à fluorescence retardée
TRITC	isothiocyanate de tétraméthylrhodamine











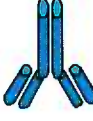
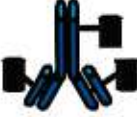












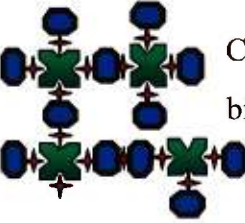
Articles:

BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BT	<i>biotinyl-tyramide</i>
C	<i>Celsius</i>
CARD	<i>catalyzed reporter deposition</i>
CPS	<i>carbamoyl phosphate synthetase</i>
cm	<i>centimeter</i>
g	<i>secretory granules</i>
G	<i>Golgi apparatus</i>
GAG-B	<i>goat anti-guinea pig IgG-biotin</i>
GAM-B	<i>goat anti-mouse IgG-biotin</i>
GAR-B	<i>goat anti-rabbit IgG-biotin</i>
HCL	<i>hydrochloric acid</i>
hr	<i>hour</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
I	<i>islet of Langerhans</i>
ISH	<i>in situ hybridization</i>
µg	<i>microgram</i>
µl	<i>microliter</i>
µm	<i>micrometer</i>

μm^2	<i>micrometer square</i>
mg	<i>milligram</i>
ml	<i>milliliter</i>
mM	<i>millimolar</i>
min	<i>minute</i>
M	<i>mitochondria</i>
M	<i>molar</i>
N	<i>nucleus</i>
NaCl	<i>sodium chloride</i>
PAP	<i>horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase complex</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline, Tween 20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Per	<i>peroxisome</i>
pH	<i>hydrogen ion concentration</i>
RER	<i>rough endoplasmic reticulum</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	<i>room temperature</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Sulfo-NHS-	
LC-LC-biotin	<i>sulfosuccinimidyl-6'-(biotinamido)-6-hexanamido-hexanoate</i>
TRIS	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>

TSA	<i>tyramide signal amplification</i>
Tween 20	<i>polyoxyethylenesorbitan monolaurate</i>
V	<i>condensing vacuoles</i>
v/v	<i>volume:volume ratio</i>
ZG	<i>zymogen granules</i>

LÉGENDES DES SCHÉMAS

	Antigènes		Biotinyl-tyramide
	Coupe de tissu		Biotinyl-tyramide activée
	Anticorps primaire		Biotinyl-long chain-long chain-tyramide
	Anticorps secondaire		Biotinyl-long chain-long chain-tyramide activée
	Marqueur (fluorescent, enzyme, particule)		Streptavidine-or
	Anticorps anti-enzyme		Tyramide-IgG
	Biotine		Tyramide-IgG activée
	Anticorps secondaire biotinylé		Protéine A-or
	Streptavidine		Tyramide-albumine-or
	Peroxydase de raifort (HRP)		Tyramide-albumine-or activée
	Peroxydase biotinylée		Substrat de l'HRP-Nanogold
	Streptavidine-HRP		Substrat de l'HRP-Nanogold activée
	Complexe streptavidine-biotine-peroxydase (ABC)		

DÉDICACE

À Anisara que j'aime beaucoup et à Charles William notre bébé qui s'en vient au monde,

À mes parents, Guy et Suzanne, mes frères, Michel et Stéphane et ma sœur, Martine, qui m'ont toujours encouragé,

Merci pour tout

Gaétan

AVANT-PROPOS

Certains des résultats décrits dans ce mémoire ont été présentés dans les congrès suivants:

Mayer G, Bendayan M (1998) L'approche CARD en immunocytochimie: Introduction du protocole de biotinylyl-tyramide en microscopie électronique. Journée du département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, avril 1998

Mayer G, Bendayan M (1998) Introduction of the biotinylyl-tyramide to electron microscopy immunocytochemistry. Proceedings of the Microscopical Society of Canada. Libro Press Inc. p.47. 25th Annual Meeting of the Microscopical Society of Canada. Montreal, Canada, mai 1998

Mayer G, Leone R, Hainfeld JF, Bendayan M (1998) The CARD approach in immunocytochemistry: Introduction of a new probe using the Nanogold marker for light and electron microscopy. J Histochem Cytochem 46:A6. Fifth Joint Meeting of The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histochemical Society, University of California, San Diego, juillet 1998

Mayer G, Bendayan M (1998) The CARD approach in immunocytochemistry: Introduction of the biotinylyl-tyramide protocol to electron microscopy. J Histochem Cytochem 46:A49. Fifth Joint Meeting of The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histochemical Society, University of California, San Diego, juillet 1998

Prix décernés pour la présentation de ces résultats:

Prix Ralph D. Lillie pour le meilleur travail présenté par un étudiant gradué au Fifth Joint Meeting of The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histochemical Society à San Diego, juillet 1998

Bourse de voyage au Fifth Joint Meeting of The Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry and The Histochemical Society à San Diego, par le Consortium for Plasma Science, mai 1998

1. INTRODUCTION

Notre niveau de compréhension de la composition chimique des cellules et de l'organisation tissulaire évolue en même temps que de nouvelles approches d'études apparaissent. L'analyse biochimique d'un constituant tissulaire demande qu'il soit isolé sous la forme la plus pure possible. Celui-ci peut alors être représenté sous forme de bandes sur un gel d'électrophorèse ou en fractions sur un gradient de densité. Beaucoup de détails très importants sur la composition des substances analysées sont obtenus de cette manière. Toutefois, l'état fonctionnel des molécules biologiques complexes est le résultat de relations spatiales spécifiques et, sous sa forme purifiée, un élément cellulaire est très éloigné des interactions spatiales qu'il a occupées *in situ*, avant son isolation. Il est donc nécessaire de corréler les résultats des études biochimiques avec ceux dérivés des études morphologiques pour comprendre les relations structure-fonction à l'intérieur d'une cellule ou d'un tissu. L'approche principale pour définir les propriétés fonctionnelles des cellules est de connaître la nature chimique des structures cellulaires et d'assigner des sites particuliers aux composantes biologiques spécifiques. Tel est le but de l'histochimie qui permet en quelque sorte d'établir «l'image chimique» des tissus et des cellules au niveau microscopique. Depuis l'invention de la «micro-chimie» par Raspail en 1826, les techniques cytochimiques sont passées par : 1) l'utilisation de centaines de colorations spécifiques, directement dérivées de la chimie pure, pour révéler plusieurs familles de constituants cellulaires, 2) l'autoradiographie qui repose sur le marquage de

composantes cellulaires par l'incorporation de précurseurs métaboliques radioactifs, 3) la cytochimie enzymatique qui fait appel à l'activité lytique de certaines enzymes sur leur substrat, 4) l'immunocytochimie qui permet l'identification d'un constituant cellulaire *in situ* à l'aide des réactions antigène-anticorps spécifiques et 5) l'hybridation *in situ* qui permet de localiser les acides nucléiques dans leur environnement naturel à l'aide de sondes d'ADN et d'ARN complémentaires.

L'immunocytochimie comprend un très grand nombre de techniques qui utilisent des anticorps spécifiques pour localiser divers antigènes à l'intérieur d'un tissu ou d'une cellule particulière. La localisation s'effectue ultimement par le marquage - directe ou indirecte - des complexes antigène-anticorps avec un marqueur qui peut être visualisé en microscopie optique et/ou électronique. L'évolution de ce champ d'étude au cours des cinq dernières décennies reflète le besoin des chercheurs et des cliniciens d'obtenir des résultats précis et toujours plus sensibles. Le nombre de techniques disponibles pour localiser des antigènes spécifiques est grand et continu de croître. La majorité de ces méthodes peut être divisée en plusieurs grandes catégories basées sur le nombre d'étapes et sur le type de marqueur utilisé.

1.1 MÉTHODES DIRECTES ET INDIRECTES

La méthode développée par Albert Coons et coll. en 1941 a été la première technique d'immunochimie appliquée à la microscopie optique par fluorescence. Cette méthode, appelée immunofluorescence directe, utilise un anticorps primaire conjugué à un marqueur fluorescent pour la détection d'un antigène cellulaire spécifique. Cependant, la faible sensibilité de détection des antigènes ainsi que le besoin de marquer chaque anticorps primaire a rendu cette technique désuète dès l'élaboration de l'immunofluorescence indirecte par Coons (1956). Celui-ci a rapporté une augmentation de la sensibilité par un facteur de 10 fois (Coons, 1956) et Pressman et coll. (1958) par un facteur de 4 à 12 fois pour le passage de la méthode directe à l'indirecte.

La méthode indirecte conventionnelle (en deux étapes) fait appel à des anticorps primaires non marqués qui, après avoir lié un antigène tissulaire, servent eux-mêmes d'antigènes pour des anticorps secondaires marqués. Cette méthode comporte plusieurs avantages. Premièrement, les anticorps primaires ne sont pas soumis aux procédures de marquage qui peuvent réduire leur efficacité. Deuxièmement, un petit groupe d'anticorps secondaires marqués (ex. anti-IgG de lapin, anti-IgG de souris etc.) peut être utilisé pour détecter plusieurs anticorps primaires de différente spécificité. Troisièmement, chaque anticorps primaire possède plusieurs épitopes qui peuvent être liés par les anticorps secondaires marqués. Ainsi

un plus grand nombre de marqueurs est associé à chaque site antigénique comparativement à la technique directe. Cette amplification du signal offerte par l'immunocytochimie indirecte (pour les techniques immunoenzymatiques) est de 4 à 5 fois supérieure à la méthode directe (Farr et Nakane, 1981; Larsson, 1988). Le risque d'augmentation du marquage non spécifique ainsi que la perte de résolution dans certaines applications de microscopie électronique font partie des désavantages de la technique indirecte. En dépit de ces inconvénients les méthodes immunocytochimiques indirectes ont été les plus populaires au cours des 30 dernières années. De plus, plusieurs modifications de ces méthodes ont été introduites afin d'augmenter la sensibilité¹ et l'efficacité² de détection des complexes antigène-anticorps.

1.2 SYSTÈMES DE DÉTECTION IMMUNOCYTOCHIMIQUES

1.2.1 Immunofluorescence

La méthode utilisant des anticorps conjugués à des marqueurs fluorescents développée par Coons demeure encore très utilisée pour la localisation de substances cellulaires présentes en faibles quantités. Les techniques d'immunofluorescence directes ou indirectes utilisent aujourd'hui une panoplie de fluorochromes qui permettent la coloration simultanée de plusieurs antigènes ou une plus grande sensibilité de détection des complexes antigène-anticorps. L'isothiocyanate de

¹ La sensibilité est définie par la quantité minimale d'antigène pouvant être détectée par une technique immunocytochimique.

² L'efficacité est définie comme étant la plus haute dilution de l'anticorps primaire avec laquelle il est possible de démontrer un antigène avec une intensité maximale. Source Petrusz et coll., 1980

fluorescéine (FITC), l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine (TRITC), le Texas red, la 7-amino-4-méthylcoumarin-3-acide acétique (AMCA) et les cyanines Cy3 et Cy5, etc. (Brandtzaeg, 1975; Nairn, 1976; Khalfan et coll., 1986; Mujumdar et coll., 1989,1993) sont parmi les plus utilisés en microscopie à fluorescence. Cependant, la sensibilité de détection est limitée. Celle-ci est déterminée par le bruit de fond non spécifique causé par l'autofluorescence des tissus, la fluorescence induite par les fixateurs et la fluorescence naturelle des objectifs du microscope, de l'huile à immersion et des filtres optiques (Aubin, 1979; Jovin et Arndt-Jovin, 1989). Ces désavantages peuvent être éliminés par l'application de la technique de *time-resolved fluorescent microscopy* (TRFM) (Zotikov and Polyakov, 1977; Seveus et coll., 1992; Marriott et coll., 1991,1994; Verwoerd et coll., 1994; Hennick et coll., 1996) qui utilise des lanthanides fluorescents chélatés comme l'euporium, le terbium ou le samarium couplés à des réactifs immunospécifiques. L'excitation en pulse (microsecondes) permet de distinguer les lanthanides fluorescents à longue-vie (1-1000 μ s) et d'éviter la lumière fluorescente endogène de courte-vie (< 100 ns). Un complexe macromoléculaire de thyroglobuline, d'euporium (Eu^{3+}) chélaté et de streptavidine (SBMC) a été utilisé en dosage immunologique pour amplifier la détection d'alpha-fetoprotéine. Une amplification de plus de 400 fois à celle obtenue avec un anticorps conjugué à l'euporium chélaté a été rapportée par Diamandis (1991). Cette technique a aussi été appliquée avec succès en immunohistochimie et en hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) (Marriott et coll., 1994; Seveus et coll., 1992,1994; de Haas et coll., 1996). D'autres marqueurs ayant ces qualités de

luminescence à retardement comme les métalloporphyrines sont utilisés en TRFM (Hennick et coll., 1996; Savitski et coll., 1989). Un marquage phosphorescent de forte intensité a été obtenu avec des complexes anticorps- ou streptavidine-platine-porphyrine en hybridation *in situ* et en immunocytochimie lors de la détection de sondes d'ADN, d'antigènes membranaires et d'ARN 28S (de Haas et coll., 1997).

1.2.2 Méthodes immunoenzymatiques

En vue d'éviter l'utilisation de la microscopie à fluorescence et afin d'appliquer l'immunocytochimie à la microscopie optique conventionnelle et à la microscopie électronique, des tissus ont été immunomarqués avec des enzymes conjuguées à des anticorps (Avrameas et Uriel, 1966; Ram et coll., 1966; Nakane et Pierce, 1966,1967). Les méthodes d'immunocytochimie enzymatique utilisent les propriétés des enzymes pour convertir leurs substrats spécifiques incolores en des produits finaux colorés visibles au niveau microscopique. Ces enzymes permettent une amplification des signaux immunologiques en catalysant la déposition d'un nombre croissant de produits colorés aux sites antigène-anticorps lorsqu'ils sont mis en présence d'une concentration non limitante de substrats. Parmi plusieurs enzymes, la peroxydase de raifort (HRP), la phosphatase alcaline (AP), la glucose oxydase et la β -galactosidase ont été les plus employées (Van Oss, 1994).

L'enzyme la plus fréquemment utilisée est l'HRP à cause de son faible poids

moléculaire (40 KDa), de sa disponibilité, de son faible coût et de sa capacité catalytique élevée. La méthode classique pour la détection de l'HRP repose sur la technique du tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) de Graham et Karnovsky (1966). L'incubation d'un tissu contenant l'HRP (introduit immunologiquement ou utilisé comme traceur de transport tissulaire intra ou extracellulaire) dans un milieu tamponné contenant du DAB et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provoque la déposition d'un produit de réaction insoluble de couleur brune. La réaction s'effectue par la formation d'un complexe entre l'HRP et son substrat H_2O_2 puis par la formation d'un second complexe avec un substrat donneur d'électrons, dans ce cas-ci le DAB. Ce complexe se dissocie éventuellement laissant l'enzyme intacte et le précipité brun insoluble formé du DAB oxydé au site de réaction spécifique (Sternberger, 1979). Plusieurs autres phénols aromatiques peuvent servir de donneurs d'électrons et produire des précipités insolubles de différentes couleurs. Les différents substrats de l'HRP permettent la localisation simultanée de plusieurs antigènes (Tubbs et Sheibani, 1981; Nakane, 1968). De plus, l'ajout de tétroxyde d'osmium au DAB oxydé permet de visualiser le produit de réaction, devenue électron-dense, en microscopie électronique (Graham et Karnovsky, 1966).

À partir des travaux pionniers de Nakane et Pierce (1967), un nombre impressionnant de procédures immunoenzymatiques différentes a été développé. La méthode directe est possiblement la moins efficace des méthodes présentées sur la figure 1 (Figure 1a). Elle est dérivée des techniques initiales utilisant des marqueurs

fluorescents et elle leur est comparable en terme de sensibilité (Avrameas, 1969a; Nakane, 1968; Laurent et coll., 1980). Les méthodes indirectes ont l'avantage d'être plus sensibles puisqu'elles augmentent le nombre de molécules d'enzyme par site de complexes antigène-anticorps primaire. La méthode indirecte la plus simple (deux étapes) utilise un anticorps primaire dirigé contre un antigène spécifique, suivi par un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire, conjugué à l'HRP (Figure 1b). Cette méthode, comme pour la méthode directe, est dérivée des études utilisant les anticorps marqués à des fluorescents et elle leur est aussi équivalente en terme de sensibilité (Avrameas, 1969a; Nakane, 1968). Cette technique nécessite le couplage chimique des enzymes aux anticorps et ceci peut affecter l'immunospecificité ou l'activité de l'enzyme conjuguée. D'autres méthodes sont rapidement venues améliorer la sensibilité tout en évitant la conjugaison covalente des marqueurs.

Plusieurs groupes dont Mason et coll. (1969) et Avrameas (1969b) ont décrit la méthode *enzyme bridge* qui s'effectue en quatre étapes (Figure 1c). Cette méthode implique la formation d'un pont entre un anticorps primaire et un anticorps anti-peroxydase de la même espèce à l'aide d'un anticorps anti-immunoglobuline. Par la suite la peroxydase soluble est ajoutée, se lie à l'anti-peroxydase et peut être utilisée pour localiser l'antigène qui réagit avec l'anticorps primaire. Cette approche a été modifiée par l'utilisation du complexe peroxydase-anti-peroxydase (PAP) introduit par Sternberger et coll. (1970). Cette approche en trois étapes a représenté un avancement majeur en immunocytochimie lors de son apparition (Figure 1d). Cette

technique ne requiert pas l'addition séquentielle d'anti-peroxydase et de peroxydase comme dans la méthode d'*enzyme bridge*. La troisième étape de cette technique repose sur l'addition d'un complexe peroxydase-anti-peroxydase préformé, dans

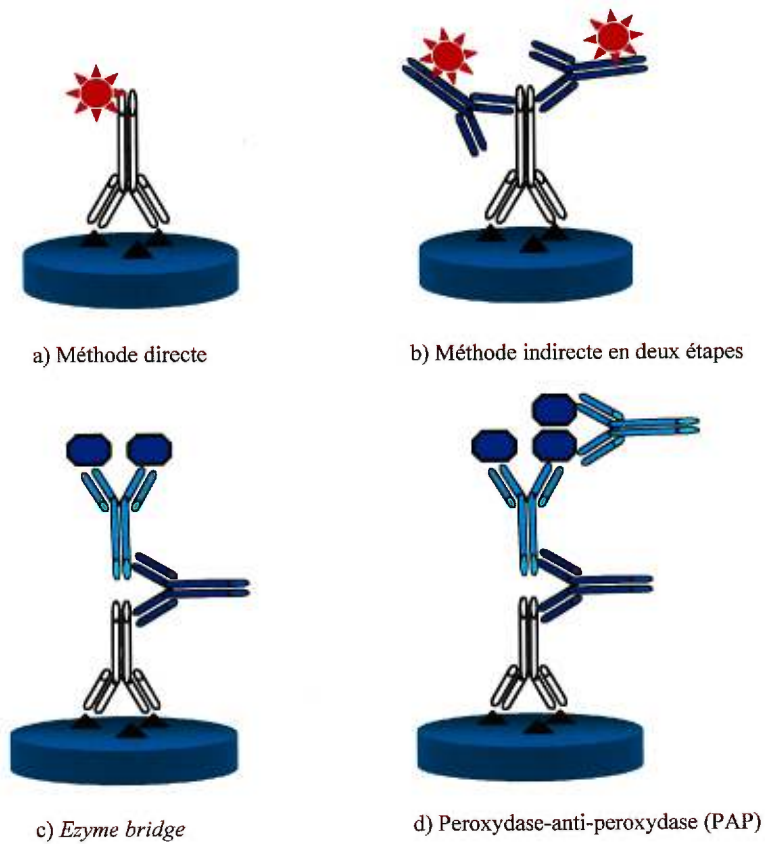


Figure 1. Méthodes immunocytochimiques directe (a) et indirectes (b,c,d).

lequel l'anticorps anti-HRP est de la même espèce que l'anticorps primaire.

La caractérisation des complexes PAP a montré qu'ils étaient cycliques et que chaque complexe consistait en deux anticorps anti-HRP liant trois molécules d'HRP (Sternberger, 1979 ; Sternberger et coll., 1970). La liaison des complexes PAP aux sites de réaction anticorps primaire-antigène augmente le rapport d'HRP par site antigénique produisant ainsi une plus grande quantité de produit de réaction, et donc, augmente la sensibilité de la réaction. Des comparaisons avec l'immunofluorescence indirecte ont montré que la méthode PAP était de 100 à 1000 fois plus efficace en terme de dilutions d'antisérum primaire (Sternberger et coll., 1970). D'autres études faites en microscopie électronique montrent que la méthode de PAP possède une efficacité de détection supérieure à la technique d'immunoperoxydase indirecte de même qu'à la technique de dosage immunologique utilisant des radio-isotopes (Moriarty et coll., 1973; Parsons et Erlandsen, 1974; Hinton et coll., 1973; Sternberger, 1979; Tougard et coll., 1979). Toujours afin d'améliorer la sensibilité et l'efficacité de l'immunoperoxydase, d'autres modifications ont été apportées à la méthode PAP.

La technique de *double bridge PAP* ajoute deux étapes à la méthode de Sternberger (Vacca et coll. 1975, 1980). Après l'introduction du premier complexe PAP, un deuxième pont anti-immunoglobuline est introduit, et ainsi, d'autres complexes PAP peuvent être ajoutés aux sites antigéniques spécifiques. De même, la

procédure développée par Ordronneau et Petrusz (1980) ajoute un pont supplémentaire à la technique d'*enzyme bridge* permettant d'augmenter le nombre d'anticorps conjugués à l'HRP. Ces doubles protocoles augmentent la sensibilité et l'efficacité permettant la détection d'une plus faible quantité d'antigènes avec des antisérums primaires à plus haute dilution (Vacca et coll. 1980). Ceci permet du même coup d'augmenter la spécificité des résultats en favorisant la liaison exclusive des anticorps de haute affinité aux antigènes. Le concept de pont multiples a déjà été proposé par Nairn en 1962 qui suggérait la possibilité théorique d'utiliser une «méthode multicouche infinie» (Nairn, 1962). En principe, la procédure PAP pourrait être triplée, quadruplée, etc. jusqu'à ce qu'une tour d'immunoprécipités presque visible se soit formée (Lansdorp et coll. 1984). Même si la précision est sacrifiée au détriment de l'efficacité de détection, pour certaines applications, l'amplification théorique possible serait énorme. Ces gros complexes formés lors des procédures doubles ou multiples augmentent le risque que de petites structures cellulaires marquées positivement soient cachées et passent inaperçues. En microscopie électronique, l'application de ces procédures d'amplification peut engendrer une perte de résolution et ceci doit être pris en considération lors du choix de la technique de marquage (Ordronneau et coll., 1981). Linsenmayer et coll. (1988) ont observé qu'avec les anticorps primaires monoclonaux il est possible d'obtenir une forte amplification des signaux en effectuant deux, trois et même quatre cycles de réactions anticorps primaire, anticorps secondaire-marqueur, anticorps primaire, anticorps secondaire-marqueur etc. Les résultats amplifiés seraient dus à la multiplication des

épitopes créée par l'arborisation des anticorps appliqués en couches successives. Leur étude a démontré l'utilité de cette méthode en immunofluorescence et en ELISA. Cependant, après quatre cycles de réactions un bruit de fond élevé devient apparent et empêche toute autre augmentation du signal.

Une autre approche, la méthode *self-sandwich* de Hsu et Ree (1980), a été élaborée pour amplifier les réactions antigène-anticorps. Elle s'effectue en répétant l'addition d'anticorps primaire et d'antigène cible, préalablement purifié, plusieurs fois avant l'application de l'antisérum servant de pont et les complexes PAP. La sensibilité de la méthode a été estimée être de 20 à 50 fois celle de la méthode PAP.

1.2.3 Système avidine-biotine

L'interaction non-covalente entre l'avidine et la biotine possède une constante de dissociation de 10^{-15} M et est la plus forte en son genre connue dans la nature. La biotine (vitamine H) est une molécule de faible poids moléculaire (244 Da) nécessaire à plusieurs enzymes catalysant des réactions de carboxylation (Figure 2). L'avidine est une glycoprotéine (68 kDa) de blanc d'œufs qui possède quatre sites de liaison de hautes affinités pour la biotine (Diamandis et Christopoulos, 1991). Cependant, l'avidine possède un très haut point isoélectrique (plus de 10) et se lie de façon non-spécifique à plusieurs constituants cellulaires, notamment aux acides nucléiques. Ceci représente un inconvénient en cytochimie qui peut être évité en utilisant la

streptavidine. Produite par *Streptomyces avidinii*, la streptavidine possède la forte avidité de liaison de l'avidine pour la biotine, un point isoélectrique presque neutre et n'est pas glycosylée (Diamandis et Christopoulos, 1991). N'importe quelle substance conjuguée à la biotine peut être visualisée avec la streptavidine couplée à un marqueur ou avec un complexe streptavidine-biotine-marqueur. Le marqueur peut être une enzyme, un fluorochrome, des particules denses aux électrons (ferritine, or colloïdal) ou un isotope radioactif. La technique de détection streptavidine-biotine peut être appliquée pour: les réactions antigène-anticorps (immunohistochimie, immunofluorescence, microscopie immunoélectronique, Western blots), l'histochimie des lectines, les réactions ligand-récepteur, l'hybridation *in situ* avec des sondes biotinylées, les dosages immunoenzymatiques, la cytométrie en flux, etc. (Diamandis et Christopoulos, 1991).

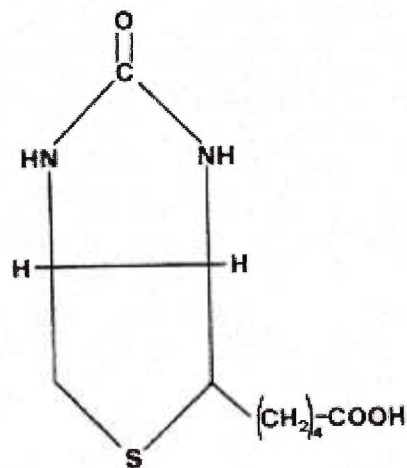


Figure 2. Structure chimique de la biotine.

En 1979 Guesdon et coll. ont développé deux méthodes immunocytochimiques basées sur les interactions avidine-biotine. La première méthode, nommée *bridged avidin-biotin* (BRAB), emploie trois étapes appliquées séquentiellement pour détecter un antigène: 1) incubation avec un anticorps primaire biotinylé; 2) incubation avec l'avidine; 3) incubation avec la peroxydase biotinylée et coloration histochimique de l'enzyme. La procédure est basée sur le principe que l'avidine possède quatre sites actifs qui ne réagiront pas tous avec les résidus biotine de l'anticorps primaire. Les sites actifs libres peuvent alors servir d'accepteurs pour la peroxydase biotinylée. La deuxième méthode, *labeled avidin-biotin* (LAB), s'effectue en deux étapes et utilise séquentiellement un anticorps primaire biotinylé et l'avidine conjuguée à la peroxydase. La méthode BRAB s'est révélée être un peu plus sensible que la méthode LAB qui utilise la conjugaison covalente de l'HRP avec l'avidine. De plus, les auteurs ont trouvé qu'une substitution extensive des amines primaires des anticorps et des enzymes par la biotine n'affectait pas la capacité de liaison ni l'activité catalytique de ces protéines. Une simple modification de ces deux protocoles a été effectuée par Wood et Warnke (1981). Les techniques indirectes BRAB et LAB utilisent un anticorps secondaire biotinylé pour faire le pont entre l'anticorps primaire non-marqué et l'avidine (Figure 3a,b). Toutefois, ces différentes approches ont été quelque peu abandonnées en faveur d'autres méthodes plus sensibles.

Hsu et coll. (1981a,b) ont introduit le complexe avidine-biotine-peroxydase (ABC) qui améliore la méthode indirecte BRAB (Figure 3c). Le protocole de marquage s'effectue en incubant un anticorps primaire non-conjugué suivi par un

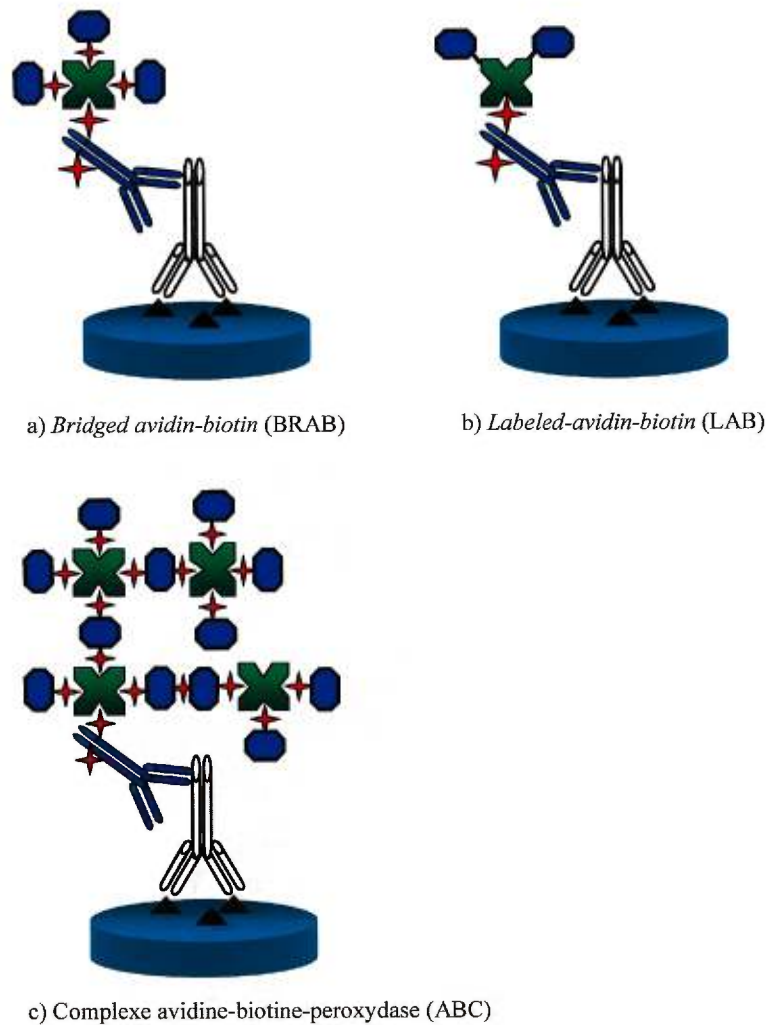


Figure 3. Systèmes de détection immunocytochimique basés sur les interactions avidine-biotine.

anticorps secondaire biotinylé, et, finalement, par le complexe avidine-biotine-peroxydase.

Durant la formation du complexe ABC, l'avidine sert de pont entre les molécules de peroxydase polybiotinylée qui servent elles-mêmes de liens entre les molécules d'avidine. L'avidine tétravalente et la biotinyl-peroxydase sont mélangées dans de telles proportions qu'il y a formation d'un complexe macromoléculaire possédant plusieurs molécules d'enzyme. Parce qu'un excès d'avidine est utilisé, le complexe possède des sites libres de liaison à la biotine lui permettant de se lier aux anticorps secondaires biotinylés. L'introduction d'un plus grand nombre d'enzymes, et donc d'une plus grande activité enzymatique, aux sites de la réaction antigène-anticorps permet l'augmentation de l'intensité du signal immunologique et de la sensibilité de détection des antigènes. L'efficacité de détection (dilution de l'anticorps primaire) de la procédure ABC s'est révélée être de 20 à 40 fois plus élevée que la méthode PAP (Hsu et coll., 1981a). Larsson (1988) a comparé la sensibilité (la quantité minimale d'antigène détectable) des complexes PAP et ABC commerciales sur filtres de papier ou sur membranes de nitrocellulose. La sensibilité de la méthode ABC s'est avérée être quatre à cinq fois supérieure à la méthode PAP.

Hsu et coll. (1981c,d) ont introduit d'autres techniques pour améliorer la sensibilité du complexe ABC. Sur six protocoles d'immunomarquages différents utilisant un anticorps anti-avidine servant de pont entre un anticorps secondaire et

l'avidine ou faisant partie d'un complexe avec l'avidine, les auteurs en ont retenu un seul donnant une plus forte intensité de marquage que la méthode PAP. La séquence d'incubation des réactifs avec le tissu se fait en quatre étapes : anticorps primaire, anticorps secondaire, anti-avidine (développé chez la même espèce que l'anticorps primaire) et incubation du complexe ABC. Cette approche alternative utilise un complexe avidine-biotine-peroxydase saturé où il ne reste plus de sites de liaisons libres pour la biotine sur l'avidine. Donc, la méthode anti-avidine peut être utilisée au lieu de l'ABC indirecte lorsqu'un problème de liaison non-spécifique à la biotine endogène se présente (Hsu et coll., 1981c). Une autre tentative d'amplification des signaux a été élaborée à partir de la protéine A conjuguée à la peroxydase ou à la biotine. Ces réactifs, utilisés comme pont entre anticorps primaires et complexes PAP ou ABC, n'ont toutefois pas égalé l'efficacité de la méthode ABC indirecte (Hsu et Raine, 1981d).

Les protocoles d'incubations PAP et ABC ont aussi été comparés en microscopie électronique. Les résultats ont démontré que la méthode ABC peut produire des colorations intenses avec des anticorps primaires très dilués et ce, en seulement une fraction du temps de réaction optimal pour la méthode PAP (Childs et Unabia, 1982).

Une modification mineure de l'ABC indirecte a été apportée par Gupta et coll. (1985). Même si ce protocole est nommé *double bridge avidin-biotin-peroxidase*

complex, il implique une seule incubation du complexe ABC. Le protocole est effectué en incubant successivement: un anticorps primaire dirigé contre un antigène spécifique, un anticorps secondaire biotinylé, un anticorps tertiaire biotinylé (dirigé contre l'anticorps secondaire) et le complexe ABC préformé suivi par les substrats de l'enzyme. L'ajout de l'anticorps tertiaire biotinylé augmente le nombre de résidus biotine et, donc, le nombre de complexes ABC lié par antigène peut augmenter. Comparé à l'ABC simple, les résultats obtenus lors de cette étude avec l'ABC double montrent une amélioration qualitative et quantitative des marquages immunocytochimiques.

Dans une autre étude, Cattoretti et coll. (1988) utilisent l'addition répétée de complexes avidine-biotine-peroxydase préformés. En alternant deux types de complexes compatibles, un ayant un excès d'avidine (ABC), l'autre un excès de biotinyl-HRP (CBA) comme troisième et quatrième étape après l'anticorps secondaire biotinylé, les auteurs obtiennent des résultats amplifiés qui permettent de localiser des antigènes présents en faible quantité. De plus, en répétant deux ou trois fois les incubations avec l'ABC et le CBA (six ou huit étapes) des antigènes non-déTECTABLES avec la méthode ABC le sont devenus par cette approche. D'autres antigènes ont été détectés avec une intensité dix fois plus forte.

Avec le même but de produire de plus gros complexes et d'introduire plus de molécules d'HRP aux sites antigéniques cibles, les méthodes PAP et ABC ont été

combinées (Swanson et coll., 1987; Krajewski et coll., 1990). La procédure avidine-biotine-peroxydase-anti-peroxydase (ABPAP) emploie un anticorps secondaire biotinylé pouvant reconnaître à la fois l'anticorps primaire et le complexe PAP par son activité immunologique et le complexe ABC par ses résidus biotine. Davidoff et Schulze (1990) ont comparé plusieurs techniques avec l'ABPAP (quatre étapes) et leur nouvelle méthode ABPAP double (six étapes) en microscopie optique et électronique. Les résultats obtenus, en ordre croissant d'intensité de marquage, sont : PAP < ABC < PAP double < ABPAP < ABPAP double. Le protocole ABPAP double est en fait un PAP double dont les anticorps secondaires et quaternaires sont biotinylés et contribuent à la liaison de plusieurs complexes ABC. Le même type de protocole, simple ou double, a été effectué avec les complexes phosphatase alcaline-anti-phosphatase alcaline (APAAP) et avidine-biotine-phosphatase alcaline (ABAP) pour amplifier les réactions immunocytochimiques et pour obtenir des doubles marquages avec l'ABPAP (Davidoff et coll., 1991).

Deux autres approches, publiées en 1995 et 1996, ont amélioré les protocoles d'immunohistochimie qui emploient le complexe ABC sans utiliser de protocole à ponts multiples. Le complexe ABC conventionnel, composé d'un rapport molaire avidine:biotine-peroxydase de 2:1, possède un excès d'avidine pour lier les résidus biotines des anticorps biotinylés (Figure 4a). Toutefois, il est évident que pour obtenir une intensité de marquage maximale le complexe ABC devrait contenir un excès de peroxydase. C'est pourquoi Grumbach et Veh (1995) ont préparé un complexe

avidine-biotine-peroxydase dans un rapport molaire 1:2 qui constitue l'inverse du complexe ABC conventionnel et possède un excès de biotinyloxydase (Figure 4b). Nommée SA/rABC, pour *streptavidin/reversed* ABC, la méthode fait appel à l'introduction d'une étape intermédiaire qui consiste à incuber de la streptavidine non-conjuguée pour lier les complexes rABC aux anticorps biotinylés. Cette approche a permis l'utilisation d'anticorps primaires dix fois plus dilués en plus d'augmenter d'au moins trois fois la sensibilité par rapport à l'ABC conventionnel.

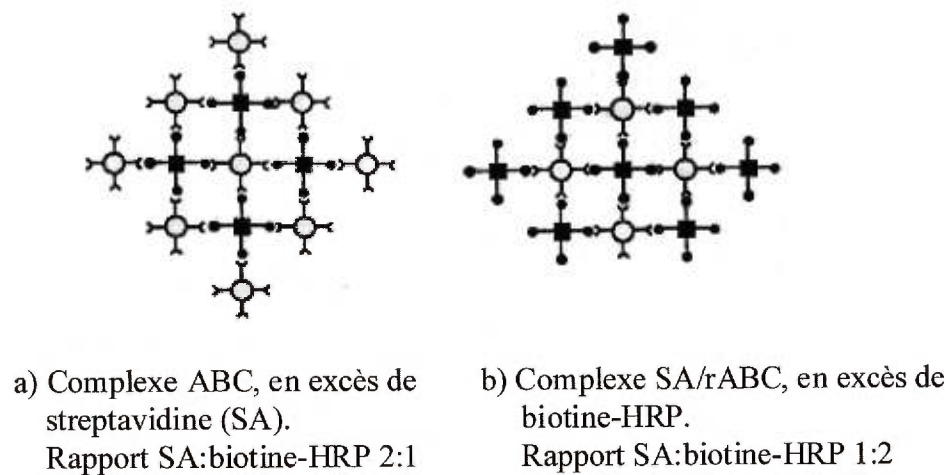


Figure 4. Représentation schématique des complexes streptavidine-biotine-peroxydase. (figure modifiée de Grumbach et Veh, 1995)



Chen et coll. (1996) ont développé une stratégie d'amplification capable d'augmenter l'efficacité de détection des procédures immunoenzymatiques jusqu'à 16

fois celle des systèmes de détection conventionnels. La stratégie emploie un anticorps dirigé contre les produits finaux générés par l'action de l'HRP sur le DAB. Une seule molécule d'enzyme peut convertir plusieurs molécules de substrats en produits. L'*anti-end-product* (anti-EP) peut reconnaître ces produits et engendrer une amplification très considérable. Pour bien comprendre, voici le protocole utilisé lors de cette étude: anticorps primaire, anticorps secondaire biotinylé, complexe ABC, substrat DAB, anticorps de lapin anti-EP, anti-lapin biotinylé, complexe ABC et substrat DAB. De plus, comme il est possible de le constater, l'étape d'amplification avec l'anti-EP peut être répétée une ou plusieurs fois. La méthode est aussi applicable à d'autres types de systèmes enzyme-substrat.

Malgré la haute sensibilité de l'approche ABC, certaines études ont alimenté la controverse en comparant l'efficacité et la sensibilité des différentes techniques d'amplification. Naritoku et Taylor (1982) ont évalué que la méthode PAP était plus sensible que l'ABC et Sternberger en 1986 a utilisé une nouvelle méthode de quantification pour déterminer que le complexe PAP était dix fois plus efficace que l'ABC (Sternberger et Sternberger, 1986). Plusieurs autres études ont cependant trouvé que la technique LAB indirecte (anticorps primaire, anticorps secondaire biotinylé, streptavidine-HRP) était plus sensible et plus efficace que la PAP et l'ABC (Giorno, 1984; Shi et coll., 1988; Milde et coll., 1989; Elias et coll., 1989). Tous ces auteurs invoquent, entre autres, l'encombrement stérique néfaste causé par la grosseur des complexes ABC pour expliquer l'efficacité des plus petits complexes

streptavidine-peroxydase.

Plusieurs autres approches originales, la plupart basées sur le système de détection avidine-biotine et visant à surpasser la méthode ABC, sont apparues au cours des dix dernières années. Quelques unes de ces nouvelles techniques font appel à des protocoles hybrides pour augmenter la sensibilité de détection des sondes biotinylées en hybridation *in situ*.

Le système utilisé par Hoyland et Freemont (1991) est une simple extension de la technique de BRAB directe de Guesdon décrite plus haut. Appliquée en autoradiographie, la méthode fait appel à la liaison de streptavidine radiomarquée aux molécules de biotine des sondes hybridées. Par la suite, ce complexe streptavidine-biotine peut lier des protéines polybiotinylées qui servent de pont pour d'autres molécules de streptavidine radiomarquées. Leur méthode utilisant trois couches de streptavidine reliées par les protéines biotinylées a généré un signal 100 fois meilleur que celui obtenu avec la méthode directe employant la streptavidine radioactive seule.

Speel et coll. (1992) ont étudié une autre approche pour améliorer la sensibilité de détection des sondes biotinylées. De très bons résultats ont été obtenus avec l'incubation d'avidine conjuguée au FITC ou à la peroxydase, suivie par l'introduction d'un pont anti-avidine biotinylée, et une deuxième incubation avec l'avidine-FITC ou l'avidine-peroxydase selon le cas. Ils ont rapporté une

amplification de l'intensité du signal fluorescent de huit fois celui obtenu avec de l'avidine-FITC seule.

Dans une étude de McQuaid et Allan (1992), 11 protocoles de détection des sondes biotinylées ont été comparés. Deux protocoles de cinq étapes, utilisant un anticorps monoclonal anti-biotine, se sont avérés plus sensibles que l'ABC. La première méthode emploie l'anti-biotine monoclonal comme anticorps primaire suivi par un anticorps de lapin anti-IgG de souris biotinylé, l'anti-biotine comme anticorps tertiaire, une deuxième incubation avec l'anti-IgG de souris biotinylé et, finalement, la streptavidine-peroxydase. L'autre protocole est en fait un *double bridge enzyme-anti-enzyme* comme le double PAP déjà mentionné auparavant. La séquence d'incubation s'effectue premièrement avec l'anti-biotine monoclonal, l'anti-IgG de souris et le complexe phosphatase alcaline-anti-phosphatase alcaline (APAAP). Puis, un deuxième pont est ajouté avec l'incubation de l'anti-IgG de souris et du complexe APAAP.

Un système d'amplification incorporant des aspects des méthodes PAP et ABC a été élaboré pour les dosages immunoenzymatiques (Wilson et Easterbrook-Smith 1993). Un complexe (*Enzyme Complex Amplification*, ECA) encore plus gros que le complexe ABC est formé par le mélange de streptavidine, d'HRP biotinylé et d'anti-HRP biotinylé. Ce complexe, qui contient présumément un plus grand nombre de molécules d'HRP que l'ABC, est ensuite utilisé pour détecter des antigènes ou des

anticorps conjugués à la biotine en ELISA ou sur membrane de nitrocellulose. En ELISA, l'application simple du complexe ECA (ECA-1) pour détecter de l'albumine biotinylée a permis d'augmenter la sensibilité de 80 fois par rapport au système de détection conventionnel utilisant la streptavidine-HRP. L'ajout d'un deuxième complexe relié au premier par l'anti-HRP biotinylé (ECA-2) a permis de détecter une quantité d'albumine 700 fois plus petite qu'avec la streptavidine-HRP seule. Pour la détection d'anticorps biotinylé, l'ECA-1 a généré une augmentation de sensibilité huit fois supérieure à la streptavidine-HRP. La quantité minimale d'albumine biotinylée, immobilisée sur membrane de nitrocellulose, détectée par l'ECA-2 (moins de 0.4 ng) s'est trouvée être comparable à celle détectée avec de la streptavidine radiomarquée. Ce résultat montre une sensibilité dix fois supérieure à celle de la streptavidine-HRP.

D'autres approches, appliquées à l'immunohistochimie, qui permettent l'incorporation d'une plus grande quantité d'HRP aux sites antigéniques spécifiques ont été comparées avantageusement à l'ABC.

Comme l'ont fait plusieurs autres, dont Linsenmayer et coll. (1988) et McQuaid et Allan (1992) en ELISA, en immunofluorescence et en hybridation *in situ*, Shin et coll. (1995) ont utilisé une approche à multiple couches d'anticorps pour amplifier les signaux en immunohistochimie. Leur technique, *multilayer peroxidase-labeled antibody* (MLP), implique l'addition de molécules d'HRP à chaque incubation. Voici un exemple de MLP utilisant quatre anticorps couplés à la

peroxydase (MLP 4): application d'IgG de lapin comme anticorps primaire, anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase, anticorps de lapin anti-IgG de chèvre-peroxydase, anticorps de chèvre anti-IgG de lapin-peroxydase et anticorps de lapin anti-IgG de chèvre-peroxydase (Figure 5). Comparées aux techniques de PAP et d'ABC, la méthode MLP 4 de même que celles de MLP 3 et MLP 2, nécessitant moins de temps, ont généré une meilleure sensibilité en immunohistochimie et en ELISA.

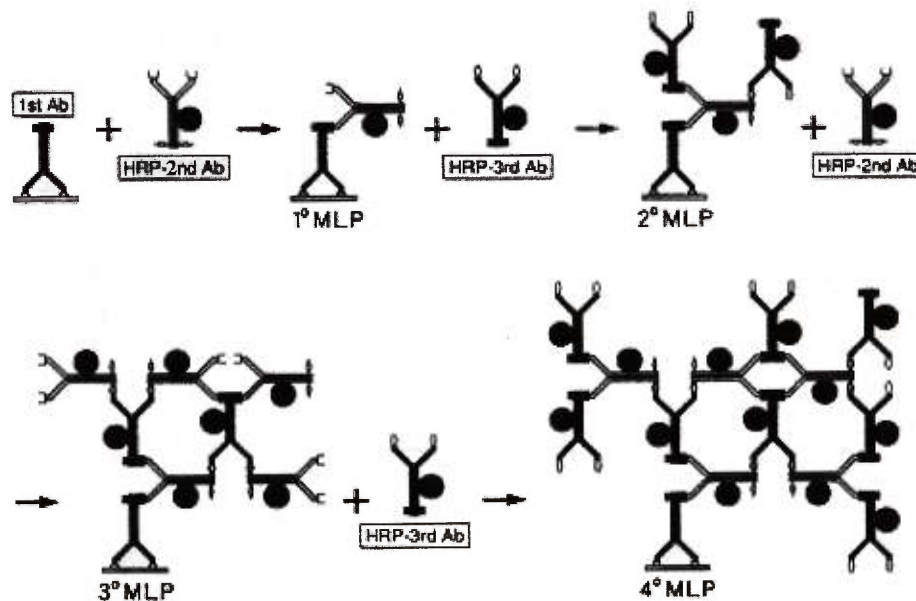


Figure 5. Principe de la méthode de *Multilayer peroxidase-labeled antibody* (MLP). (figure tirée de Shin et coll., 1995)

Enfin, une méthode qui s'effectue en une ou deux étapes a été développée pour augmenter l'efficacité de détection des complexes antigène-anticorps et pour réduire le temps nécessaire à l'obtention d'un signal intense et spécifique. L'EPOS

(*Enhanced Polymer one-step staining*) est une technique d'amplification directe (Figure 6a). La conjugaison d'anticorps primaires spécifiques et d'un grand nombre de molécules de peroxydase à une chaîne de dextran activée constitue le principe de la méthode. L'incubation de ce conjugué polymérique avec l'antigène d'intérêt, en dosage immunoenzymatique ou en immunohistochimie, suivie par la détection histochemique des enzymes permet de générer des signaux amplifiés (Bisgaard et coll., 1993; Chilosi et coll., 1994; Tsutsumi et coll., 1995; Van der Loos et coll., 1996).

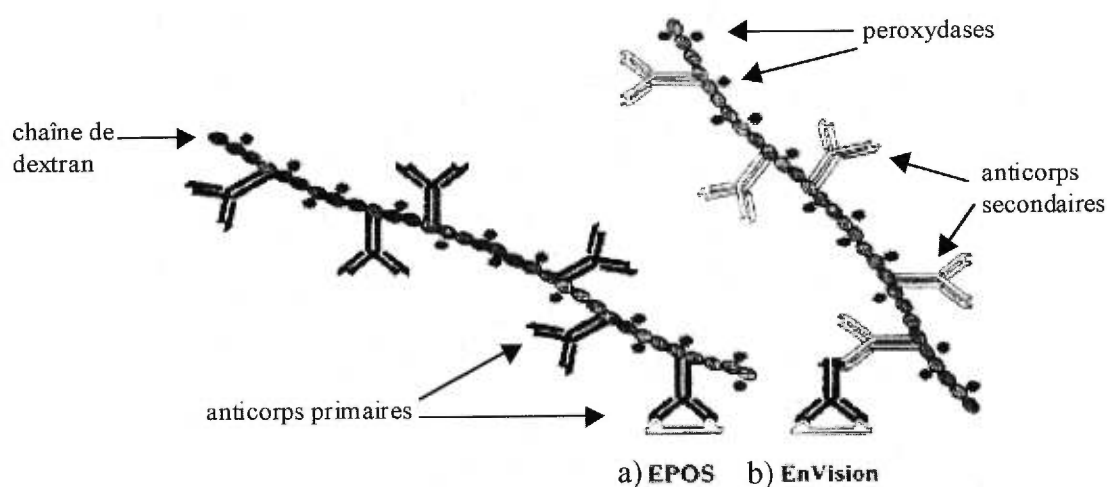


Figure 6. Amplification directe (a) et indirecte (b) à l'aide de chaînes de dextran conjuguées à des anticorps et des enzymes.
(figure modifiée de Mokrý, 1996)

Le système EnVision, dérivé de l'EPOS, est une technique d'amplification indirecte où le conjugué polymérique, formé par des anticorps secondaires espèce spécifique et des molécules de peroxydase couplées au polymère de dextran activé, est appliqué après l'anticorps primaire (Pileri et coll. 1996; Sabattini et coll., 1998) (Figure 6b). La

capacité d'amplification de ces systèmes provient du fait que les conjugués polymériques contiennent jusqu'à 100 molécules d'enzyme et jusqu'à 20 molécules d'anticorps par chaîne de dextran (Sabattini et coll. 1998). La comparaison entre les dilutions optimales de 53 anticorps primaires différents par le système EnVision et par les méthodes LAB, APAAP et ABC a montré que l'EnVision augmente l'efficacité de détection de ces anticorps de deux à cinq fois par rapport aux autres techniques (Sabattini et coll., 1998).

1.3 INTENSIFICATION DE LA COLORATION AU DAB

Un autre champ d'étude, directement relié à l'amplification des signaux, profite des réactions de la peroxydase avec le DAB. Parce que la plupart des réactions enzymatique sont auto-limitantes plusieurs recherches ont été orientées vers l'intensification des produits de réaction HRP-DAB. En premier lieu, la modification des conditions d'incubation du DAB peut permettre la détection de faibles concentrations d'HRP. Par exemple, l'addition d'imidazole 0.01 M à pH 7.0 au milieu DAB + H₂O₂ augmente la sensibilité des réactions cytochimiques entre la peroxydase et le DAB (Malmgren et Olsson, 1977; Straus, 1982). Plusieurs autres modifications du milieu de réaction du DAB ont été proposées et incluent l'addition de sels de p-cresol, de nickel, de cobalt et de cuivre (Adams, 1977; Hancock, 1982; Hsu et Soban, 1982; Streit et Reubi, 1977; Hiort et coll., 1988; Green et coll., 1989; Coventry et coll., 1994). Des traitements avec le sulfate de cuivre, le tétroxyde d'osmium, le

ferrocyanide de potassium, le chlorure d'or ou l'amplification à l'argent ont aussi été utilisés après la réaction du DAB (Graham et Karnovsky, 1966; Hanker et coll., 1979; Gallyas et coll., 1982; Johansson et Backman, 1983; Newman et coll., 1983; Liposits et coll., 1984; Rodriguez et coll., 1984; Lascano et Berria, 1988). La sensibilité de ces nombreuses méthodes et de différentes combinaisons entre elles, a été évaluée par Scopsi et Larsson (1986). Ils ont immobilisé différentes concentrations d'antigène sur des membranes de nitrocellulose et procédé à la coloration immunochimique avec la méthode de PAP. La procédure standard de Graham et Karnovsky a permis de détecter jusqu'à 25 pg de protéines. L'ajout d'imidazole au milieu DAB a augmenté la sensibilité à 5 pg tout comme l'ajout de chlorure de cobalt ou de sulfate de nickel. De tous les modèles cytochimiques évalués lors de cette étude, deux ont généré des marquages plus intenses et plus sensibles. La méthode qui utilise un milieu DAB additionné de sulfate de nickel et suivie par l'amplification à l'argent de Gallyas et coll. (1982) ou celle qui utilise un développement au DAB conventionnel suivi par le traitement au méthèneamine argent de Rodriguez et coll. (1984) ont révélé, de façon très intense, 5 pg de protéines (Scopsi et Larsson, 1986). Plusieurs études ont par la suite confirmé la haute sensibilité de ces techniques (Peacock et coll., 1991; Liposits et coll., 1991; Mullink et coll., 1992). Plus récemment, une étude a fait état d'une augmentation de sensibilité dix fois plus grande que l'amplification à l'argent du DAB, en ajoutant une étape à cette dernière qui consiste à incuber les échantillons dans le nitrate d'uranyle (Goto et coll., 1992). Une autre démonstration de haute sensibilité a été effectuée en combinant deux types de modifications du produit de

réaction HRP-DAB: le traitement avec du tétrachloraurate de sodium et du sulfide de sodium suivi par l'amplification à l'argent avec une solution préalablement optimisée (Newman et Jasani, 1998).

1.4 IMMUNOCYTOCHIMIE À L'OR COLLOÏDAL

1.4.1 Application à la microscopie électronique

Pour la localisation ultrastructurale d'antigènes tissulaires, les anticorps ou autres réactifs doivent être conjugués à des marqueurs denses aux électrons ou morphologiquement distincts. Singer (1959) a été le premier à développer une technique pour coupler un marqueur opaque, la métalloprotéine ferritine, aux anticorps sans perte de leur capacité de liaison. Le marquage d'antigènes avec des anticorps liés à des métaux lourds comme le mercure (Pepe et Finck, 1961; Kendall, 1965), l'iode (Parfanovich et coll., 1965) et l'uranium (Sternberger et coll., 1963,1965) a été très peu utilisé à cause de la préparation difficile des conjugués et du faible contraste qu'ils offrent. Comportant plusieurs avantages, déjà mentionnés précédemment, les techniques d'immunoperoxydase ont été et continuent à être employées en microscopie électronique (Nakane et Pierce, 1966; Mason et coll., 1969; Sternberger et coll., 1970; Childs et Unabia, 1982). En fait, la plupart des systèmes de détection énumérés plus haut peuvent être appliqués à la localisation ultrastructurale d'antigènes cellulaires en microscopie électronique. Cependant, si ces

systemes sont employés avec des enzymes, la diffusion des produits de réaction enzyme-substrat et leur forte opacité aux électrons peuvent empêcher l'identification des structures marquées et donner des résultats ayant de faibles résolutions (Courtoy et coll., 1983).

L'introduction de l'or colloïdal couplé à des anticorps, pour la localisation ultrastructurale d'antigènes par Faulk et Taylor en 1971, constitue un point tournant en immunocytochimie. Depuis, l'or colloïdal est devenu le marqueur de choix en microscopie électronique. Comparé à la peroxydase ou à la ferritine, l'or possède plusieurs avantages. Parce que les particules d'or colloïdal sont très denses aux électrons, très petites et de nature sphérique régulière, leur identification et la délimitation à haute résolution des structures marquées sont possibles. À cause de ces mêmes raisons, il est aussi possible d'effectuer l'évaluation quantitative de l'intensité du marquage ainsi que sa distribution spatiale. De plus, les particules d'or peuvent être préparées en différentes grandeurs permettant le marquage simultané de plusieurs antigènes sur la même coupe de tissu (revue par Bendayan, 1995).

1.4.1.1 Propriétés de l'or colloïdal

L'or colloïdal est généralement préparé par la réduction de l'acide tétrachloroaurique avec, par exemple, le phosphore blanc (Zsigmondy, 1905,1925), le citrate de trisodium (Frens, 1973), ou la combinaison du citrate de sodium et de l'acide tannique

(Slot et Geuze, 1981). La grosseur des particules d'or dépend du taux de nucléation et de la croissance des cristaux. En contrôlant la réduction de l'acide tétrachloroaurique, il est possible d'obtenir des particules d'or de grandeurs uniformes dans un écart de diamètres variant entre 3 et 150 nm. L'or colloïdal, comme plusieurs autres colloïdes inorganiques, est une suspension hydrophobique formée par des particules métalliques denses aux électrons portant à leur surface une charge nette négative. La stabilité de l'or colloïdal dans l'eau est maintenue par la répulsion électrostatique. La liaison de macromolécules biologiques aux particules d'or colloïdal semble se produire par adsorption électrostatique non-covalente lors de leur contact. Cette réaction complexe, encore mal comprise, ferait intervenir les forces électrostatiques de Van der Waals entre les charges à la surface des particules d'or et celles des protéines (Horisberger, 1981). L'adsorption est influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques comme le point isoélectrique et la concentration de la protéine à conjuguer (Geoghegan et Ackerman, 1977). Donc, pour chaque type de macromolécule à adsorber à l'or colloïdal, les conditions optimales de liaison doivent être déterminées. Il est à noter que la formation des complexes protéine-or n'affecte pas, en général, l'activité biologique des protéines adsorbées. À part la catalase (Horisberger et Rosset, 1977) et les IgE (Clerc et coll., 1988), toutes les macromolécules adsorbées aux particules d'or colloïdal ont démontré une bonne rétention de leurs propriétés biochimiques (Bendayan, 1995).

1.4.1.2 Complexes protéine-or

Les principaux complexes protéine-or utilisés en immunocytochimie ultrastructurale sont les complexes immunoglobuline G-or, protéine A-or, protéine G-or et protéine A/G-or. Les protéines A et G font parties des molécules ayant la propriété de se lier aux immunoglobulines. Elles ont été identifiées, caractérisées et purifiées à partir de souches bactériennes. La protéine A origine de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* (Forsgren et Sjöquist, 1966) et est caractérisée par son habileté à interagir avec le fragment Fc des immunoglobulines G de plusieurs mammifères. L'affinité de la protéine A est forte pour les IgG de certaines espèces telles que les IgG de lapin, de cobaye et humain mais diminue pour certaines immunoglobulines ou certaines sous-classes d'immunoglobulines telle que celles du mouton, du rat, de la souris et de la chèvre (Ghitescu et coll., 1991). La protéine G, comme la protéine A, est une molécule de liaison aux immunoglobulines et est présente dans la paroi cellulaire de la souche de streptocoque du groupe G (G 148) (Björck et Kronvall, 1984). Elle possède une grande affinité pour les fragments Fc des immunoglobulines G de plusieurs espèces de mammifères. Comparée à la protéine A, la protéine G a une plus haute affinité pour les molécules d'IgG de chèvres, de souris, de rats et de vaches et se lie à une plus grande variété d'IgG (Åkerström et coll., 1985; Åkerström et Björck, 1986). En plus, la protéine G a une bonne affinité pour les anticorps monoclonaux tandis que la protéine A ne présente pas cette propriété.

La protéine A/G est une protéine chimère construite génétiquement qui combine les propriétés des protéines A et G. Elle a été introduite comme sonde immunologique alternative (Eliasson et coll., 1988) et a démontré une réactivité envers un plus large spectre d'immunoglobulines et de sous-classes d'IgG de différentes espèces que la protéine A ou G (Eliasson et coll., 1988,1989).

Les complexes protéine A-, G- et A/G-or peuvent tous être préparés suivant la même démarche expérimentale, selon leur point isoélectrique et leur concentration optimale propre (Bendayan, 1987; Ghitescu et Bendayan, 1990; Ghitescu et coll., 1991). Cependant, les complexes immunoglobuline-or (Faulk et Taylor, 1971) sont plus difficiles à former (Geoghegan, 1988) que les autres complexes protéine-or, rendant l'utilisation des IgG-or plus problématique. Les raisons possibles de ces difficultés sont que les immunoglobulines purifiées par affinité contiennent un mélange hétérogène de globulines qui ont des points isoélectriques très différents et que plusieurs des anticorps purifiés montrent une faible solubilité dans les solutions à basse force ionique et s'agrègent à pH neutre (De Mey et coll., 1981; Slot et Geuze, 1984). Toutefois, plusieurs protocoles de couplage des immunoglobulines aux particules d'or ont été décrits et peuvent améliorer la qualité des complexes (De Mey, 1984,1986; Slot et Geuze, 1984).

1.4.1.3 Évaluation quantitative

Les évaluations quantitatives des intensités de marquages à l'or colloïdal ont permis d'introduire la morphométrie et les statistiques en immunocytochimie (Bendayan et coll., 1980; Kraehenbühl et coll., 1980; De Harven et Soligo, 1987). Elles permettent une meilleure évaluation des observations qualitatives en validant les changements du marquage qui se produisent entre les compartiments cellulaires ou entre les marquages obtenus lors de conditions contrôles et expérimentales ou lors des conditions pathologiques. À cause des conditions de l'immunomarquage en post-enrobage et de la nature de particule de l'or colloïdal, le marqueur à l'or présent sur les coupes de tissus ou sur les surfaces cellulaires, peut facilement être compté pour déterminer mathématiquement le degré d'intensité du marquage. Au contraire des techniques de pré-enrobage, dans lesquelles les traceurs doivent diffuser à travers les espaces interstitielles et les membranes cellulaires, le marquage en post-enrobage est restreint à la surface des coupes de tissus. Ce sont seulement les sites antigéniques exposés à la surface des coupes qui peuvent interagir avec les réactifs et être révélés par les particules d'or. Pour les évaluations quantitatives, ceci représente un avantage majeur car tous les sites antigéniques exposés ont la même probabilité d'être marqués et aucune limitation comme l'épaisseur des coupes, l'emplacement de l'antigène ou les facteurs de diffusion n'intervient dans le marquage de l'antigène. Alors, puisqu'il n'y a pas de pénétration des particules d'or, les densités de marquage peuvent facilement et précisément être reliées aux surfaces des structures et exprimées en nombre de

particules d'or par unité de surface.

1.4.1.4 Double marquage

La localisation simultanée de divers composants dans le même tissu peut être effectuée en utilisant des coupes sériées ou en effectuant un double marquage sur la même coupe de tissu. Comme il a déjà été mentionné, le marqueur à l'or colloïdal est composé de particules très denses aux électrons et peut être préparé en différentes grosseurs. Ces propriétés le rend utile pour les protocoles de marquage multiple. Les différences de grosseurs des particules peuvent être facilement distinguées et il serait théoriquement possible de marquer autant de sites réactifs qu'il y a de grosseur de sondes différentes. De plus, les particules d'or peuvent être utilisées en combinaison avec d'autres traceurs électron-denses pour la détection simultanée de deux ou plusieurs composants cellulaires.

Parmi les différents protocoles de marquage double ou multiple sur la même coupe, il y a les protocoles utilisant les complexes IgG-or dirigés contre des anticorps primaires développés dans des espèces différentes (Doerr-Schott, 1989) ou dirigés contre des anticorps primaires de même espèce. Cette dernière approche requiert une étape intermédiaire de fixation à la formaline entre l'incubation des complexes (Wang et Larsson, 1985; Nielsen et coll., 1989). Il y a aussi les protocoles de protéine A-or employés pour localiser deux antigènes sur la même face d'une coupe à l'aide

d'anticorps primaires de la même espèce ou non (Slot et Geuze, 1981; Roth, 1982). Pour éviter les réactions croisées, Slot et Geuze (1981) recommandent une étape de blocage avec la protéine A native après le premier marquage. Cependant, cette approche mène tout de même à de fortes réactions croisées entre les réactifs et à des colocalisation artéfactuelles des antigènes ciblés (Bendayan, 1984). La méthode de double marquage utilisant les deux côtés d'une même coupe de tissu permet d'éviter ces artefacts (Bendayan, 1982). Le principe est simple et consiste à marquer chaque antigène sur une face séparée du tissu. En plus d'éviter toutes réactions croisées entre les réactifs, cette approche permet d'éviter le phénomène d'encombrement stérique qui peut se produire lorsque deux antigènes sont localisés très proches l'un de l'autre. D'autres protocoles de colocalisation d'antigènes font appels aux combinaisons de l'immunocytochimie et de la cytochimie enzymatique ou de l'immunocytochimie et de l'autoradiographie (Bendayan et Stephens, 1984; Stephens et coll., 1985; Bendayan et coll., 1986; Velez-Granell et coll., 1994).

1.4.1.5 Immunocytochimie à l'or colloïdal

C'est sous forme de complexes immunoglobuline-or, pour la localisation directe d'antigènes de surface en pré-enrobage, que Faulk et Taylor ont introduit la technique d'immuno-or colloïdal. Par la suite, Romano et coll. ont utilisé des anticorps secondaires et la protéine A de *Staphylococcus aureus* couplés à l'or pour l'immunolocalisation indirecte (deux étapes), en pré-enrobage, de divers antigènes

(Romano et coll., 1974; Romano et Romano, 1977). Puis, Roth, Bendayan et Orci (1978) ont introduit la technique de protéine A-or indirecte en post-enrobage, une des méthodes d'immuno-or la plus utilisée jusqu'à ce jour. La localisation ultrastructurale d'antigènes intracellulaires sur coupes ultrafines avec cette technique est basée sur la propriété particulière qu'a la protéine A d'interagir avec le fragment Fc des immunoglobulines G de plusieurs espèces. Par la suite sont venues s'ajouter les sondes protéine G- et A/G-or et les particules d'or ultrapetites conjuguées à des immunoglobulines ou aux protéines susmentionnées (Baschong et coll., 1985; Bendayan, 1987; Hainfeld, 1987,1988; Ghitescu et coll., 1991; Van de Plas et Leunissen, 1993).

1.4.1.6 Techniques d'amplification de l'immuno-or

Les techniques indirectes d'immunoglobuline-or ou de protéine A-or sont capables de générer des résultats de hautes résolutions et de fortes intensités (Bendayan et Shore, 1982; Baschong et Wrigley, 1990; Ghitescu et Bendayan, 1990). Toutefois, advenant le cas où l'immunomarquage d'un antigène donne un résultat de faible intensité et pour lequel il est important d'obtenir un signal plus convaincant, certaines méthodes d'amplification peuvent être employées.

Par rapport à des particules d'or de 15 ou 20 nm, les petites particules de 1 à 5 nm sont connues pour générer de plus hautes densités de marquage (Lackie et coll.,

1985; Ghitescu et Bendayan, 1990; Hainfeld et Furuya, 1992; Dulhunty et coll., 1993). L'amélioration de l'efficacité du marquage semble être causée par: une diminution de l'encombrement stérique; un plus grand nombre de petites particules d'or en suspension pour la même concentration de grandes particules; un meilleur accès aux antigènes et/ou des forces de répulsions moins grandes; une plus grande liberté de mouvement des anticorps marqués et une diminution des forces requises pour le maintien de la liaison entre les anticorps et les antigènes (Horisberger, 1981,1989; Slot et Geuze, 1984; Kellenberger et Hayat, 1991). Müller-Höcker et coll. (1998) ont combiné les avantages des particules d'or ultrapetites avec l'intensification à l'argent. Leur système est basé sur un anticorps anti-biotine couplé à de l'or de 1 nm de diamètre pour révéler les anticorps secondaires biotinylés. Une amplification significative du marquage de divers antigènes en microscopie électronique et optique a été obtenue lors de cette étude.

L'utilisation de petites particules d'or en microscopie électronique impose cependant l'utilisation de l'amplification à l'argent pour une meilleure visualisation du marquage. Cette augmentation de la grosseur des particules par précipitation d'argent métallique peut toutefois compromettre la quantification des résultats puisque l'amplification n'est pas uniforme (Stierhof et coll., 1991; Takizawa et Robinson, 1994; Humbel et coll., 1995).

Une technique alternative, n'ayant pas recours à l'intensification à l'argent, a

été introduite pour amplifier les signaux obtenus avec la protéine A-or (Bendayan et Duhr, 1986). Cette méthode utilise un anticorps anti-protéine A agissant comme pont pour lier les complexes protéine A-or-anticorps primaire, puis, pour être lui-même reconnu, dans une quatrième étape, par d'autres complexes protéine A-or (Figure 7). Cette modification a donné lieu à une augmentation d'au moins cinq fois la densité du marquage obtenu avec le protocole original.

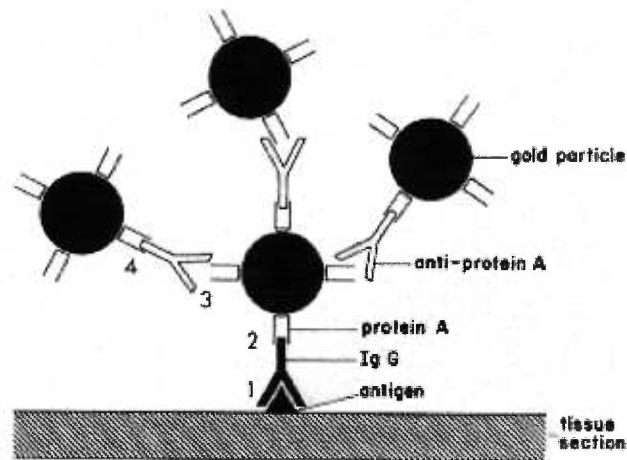


Figure 7. Diagramme illustrant les principes des quatre étapes impliquées dans la technique d'amplification avec la protéine A-or. (figure tirée de Bendayan et Duhr, 1986)

1.4.2 Application à la microscopie optique

En microscopie optique, l'or colloïdal a été utilisé pour le marquage de cellules et de

coupes de tissus enrobés en paraffine (Geoghegan et coll., 1978; Roth et coll., 1980; De Mey et coll., 1981; Gu et coll., 1981), de coupes semifines de tissus enrobés en résine (Roth et coll., 1983; Lucocq et Roth, 1984) et de coupes semifines de tissu congelé (Brown et coll., 1985). Ces applications utilisaient la couleur rouge naturelle de l'or colloïdal pour détecter les sites antigéniques ciblés directement (anticorps primaire-or) ou indirectement (anticorps secondaire-or). Cette méthode n'est pas très employée car elle nécessite des concentrations élevées de réactifs couplés à des particules d'or, en plus d'être peu sensible. Mis à part la technique d'amplification de Bendayan et Duhr (1986) mentionnée plus haut, une autre méthode peut être employée pour l'augmentation des signaux de l'or colloïdal en microscopie optique. L'amplification à l'argent, développée par Danscher pour la détection des métaux endogènes dans les tissus biologiques (Danscher, 1981a,b,c), augmente fortement la visibilité et la sensibilité du marquage à l'or colloïdal (Holgate et coll., 1983; Danscher et Nørsgaard, 1983). Cette technique, qui s'applique aussi en microscopie électronique à transmission et à balayage pour l'amplification des petites particules d'or, a permis l'essor de l'immunohistochimie à l'or colloïdal en microscopie optique ainsi que son utilisation en hybridation *in situ*, en immunoblot et en ELISA (revue par Lackie, 1996). La sensibilité obtenue avec l'amplification à l'argent des particules d'or peut égaler ou excéder celle des méthodes enzymatiques comme la peroxydase-anti-peroxydase ou le complexe avidine-biotine-peroxydase (Holgate et coll., 1983; Moeremans et coll., 1984; Scopsi et Larsson 1985; Roth et coll., 1992). Gee et coll. (1991) et Roth et coll. (1992) ont d'ailleurs combiné l'or colloïdal avec le système

ABC. Avec un anticorps anti-peroxydase couplé à l'or, pour révéler les complexes ABC situés aux sites antigéniques, et l'amplification à l'argent, ils ont obtenu un marquage plus intense que celui généré par la réaction HRP-DAB (Roth et coll., 1992).

1.5 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE NOTRE ÉTUDE

La localisation précise des macromolécules sur des domaines spécifiques à l'intérieur des tissus ou des cellules donne des informations importantes pour la compréhension de leur fonction biologique. Cet aspect des techniques d'immunomarquages est d'autant plus primordial qu'en biologie moléculaire un nombre toujours croissant de molécules sont découvertes, clonées, et séquencées sans que leur fonction soit connue.

Le besoin d'identifier des antigènes tissulaires qui sont présents en faibles quantités ou même à l'état de trace a mené à l'élaboration d'un vaste spectre de systèmes de détection utilisant des interactions immunologiques et non-immunologiques. Ces différents systèmes décrits dans cette introduction ont tour à tour réussi à augmenter la sensibilité de détection des antigènes depuis les travaux de Coons. Toutefois, comme en témoignent les progrès récents effectués avec de nouvelles approches comme l'EPOS, des méthodes plus efficaces et plus sensibles

sont encore recherchées.

1.5.1 Déposition catalytique de dérivés de tyramine par la peroxydase

Bobrow et coll. ont développé une méthode novatrice d'amplification du signal des réactions antigène-anticorps pour les dosages immunoenzymatiques en ELISA, sur membrane de nitrocellulose (*immunodot*) et sur Western blot (Bobrow et coll., 1989, 1991, 1992). Cette méthode a amélioré la limite de détection de ces systèmes de 8 à 200 fois selon le format utilisé. L'approche CARD (*Catalyzed Reporter Deposition*) a par la suite été adaptée avec succès à l'immunocytochimie en microscopie optique (Adams, 1992; Berghorn et coll., 1994; Merz et coll., 1995; Shindler et Roth, 1996), en hybridation *in situ* (Kerstens et coll., 1995; Raap et coll., 1995; van Gijlswijk et coll., 1996; Sano et coll., 1998) et en microscopie électronique (Mayer et Bendayan, 1997,1999). Selon le protocole utilisé et le niveau de résolution, la majorité de ces études ont rapporté une augmentation de la sensibilité et de l'efficacité de détection antigénique variant de 8 à 10 000 fois (Bobrow et coll., 1991; Adams, 1992; Merz et coll., 1995; Hunyady et coll., 1996; Werner et coll., 1996; Erber et coll., 1997). Un des avantages de cette technique est qu'elle peut être utilisée avec n'importe quel système de détection immunologique qui incorpore, au site antigénique, des molécules d'HRP de façon directe ou indirecte en employant des réactions immunologiques ou biochimiques.

La technique d'amplification CARD est basée sur la capacité de la peroxydase à catalyser l'attachement covalent d'un grand nombre de molécules de dérivés de tyramine au site du complexe antigène-anticorps spécifique. La tyramine est une molécule phénolique, substrat de l'HRP, possédant un groupe hydroxyl libre qui réagit avec l'HRP et un groupe aminé libre qui peut servir d'extrémité de liaison avec différents marqueurs ou indicateurs (Figure 8). Au départ, la tyramine a été utilisée couplée à des indicateurs comme la biotine et la fluorescéine (Bobrow et coll., 1989). Elle peut aussi être conjuguée, entre autres, à la digoxigénine (Plenat et coll., 1997), au trinitrophényl (Hopman et coll., 1998), à la rhodamine et à la cyanine Cy-3 (van Gijlswijk et coll., 1997).

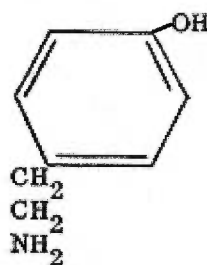


Figure 8. Structure chimique de la tyramine.

En présence de peroxyde d'hydrogène, l'HRP catalyse l'oxydation de la partie phénolique du conjugué tyramide-indicateur par un mécanisme radicalaire. Le conjugué forme donc un radical de très courte demi-vie qui se lie rapidement de façon covalente aux chaînes latérales des acides aminés riches en électrons des protéines de

l'entourage immédiat du site d'immunoréaction (Gross et Sizer, 1959; Bobrow et coll., 1992) (Figure 9). La grande quantité d'indicateurs ainsi déposés peut alors être détectée soit par la streptavidine, par des anticorps spécifiques ou

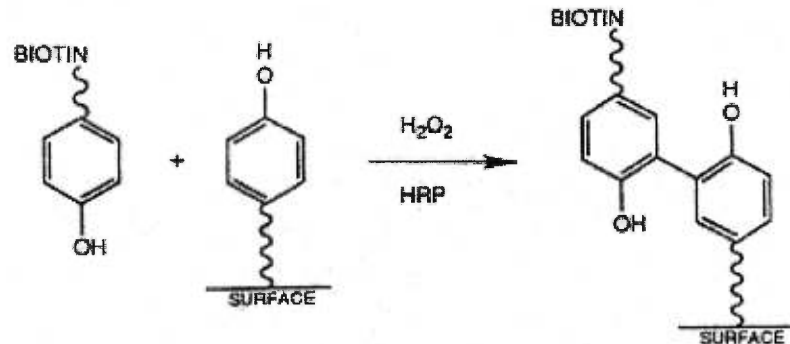


Figure 9. Mécanisme de réaction proposé pour l'attachement covalent de la biotiny-tyramide aux chaînes latérales des acides aminés des protéines de surface entourant les sites antigéniques. (figure tirée de Bobrow et coll., 1992)

directement par leur signal fluorescent. Sauf pour les fluorochromes directement détectés, la streptavidine ou les anticorps anti-haptènes peuvent être conjugués à différents marqueurs pour la visualisation des sites antigéniques. Par exemple, la déposition spécifique de biotiny-tyramide peut être révélée par de la streptavidine-HRP et visualisée avec le DAB, et la déposition de digoxigénine-tyramide par un anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline et visualisé par son substrat chromogène.

Le but de notre étude a été de combiner les avantages d'amplification présentés

par la technique CARD et les avantages de haute résolution et de quantification offerts par la technique d'immuno-or en microscopie électronique.

L'application de la procédure d'amplification CARD avec la biotinyI-tyramide suivie par une étape de détection avec la streptavidine-or devrait, en théorie, donner un marquage de haute intensité, révélé par les particules d'or colloïdal. En plus de l'augmentation du signal, la combinaison de la technique CARD et du marqueur à l'or colloïdal devrait générer un marquage de haute résolution qui peut être quantifié.

C'est à partir de cette hypothèse que nous avons appliqué ce système hybride en microscopie électronique pour l'immunolocalisation ultrastructurale de sites antigéniques. De plus, dans le but de pousser plus loin les limites d'amplification à l'or colloïdal et de comparer les résultats, nous avons introduit une nouvelle sonde, la biotinyI-LC-LC-tyramide, qui incorpore des bras d'espacement entre les molécules de biotine et de tyramine pour réduire les effets négatifs de l'encombrement stérique. Nous avons aussi élaboré des protocoles qui permettent l'utilisation de nouvelles molécules indicatrices couplées à la tyramine. Nous avons construit des sondes tel que la tyramide-IgG qui est révélée par la protéine A-or, la tyramide-albumine-or qui permet une amplification par dépôt catalytique d'or colloïdal et utilisé un nouveau substrat couplé à des amas d'atomes d'or ultrapetits (Nanogold) amplifiés par l'intensification à l'argent (Mayer et Bendayan, 1997,1999; Mayer et Coll., en préparation).

2. ARTICLES

ARTICLE 1

Mayer G, Bendayan M (1997) Biotinyl-Tyramide: A novel approach for electron microscopic immunocytochemistry.
J Histochem Cytochem **45**:1449-1454

ARTICLE 2

Mayer G, Bendayan M (1999) Immunogold Signal Amplification: Application of the CARD approach in electron microscopy.
J Histochem Cytochem **47**:421-430

ARTICLE 3

Mayer G, Hainfeld JF, Bendayan M (1999) Introduction of a novel HRP-substrate-Nanogold probe for signal amplification in immunocytochemistry. En préparation

RAPID COMMUNICATION

Biotinyl–Tyramide: A Novel Approach for Electron Microscopic Immunocytochemistry

Gaétan Mayer and Moïse Bendayan

Department of Anatomy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

SUMMARY The biotinyl–tyramide protocol recently introduced for sensitive light microscopic immunocytochemistry was applied to electron microscopy and revealed various tissue antigens with high resolution. The protocol consists of an indirect method in which thin tissue sections are incubated successively within a specific primary antibody, followed by a biotinylated secondary antibody, streptavidin–HRP, and then finally with biotinyl–tyramide. The reaction product appears as a dense filamentous material that is deposited over particular cellular compartments. The labeling obtained for the antigens tested, amylase and heat-shock protein 70 in pancreatic acinar cells, insulin in pancreatic β -cells, and carbamoyl phosphate synthetase and catalase in liver tissue, was found to be highly specific, with the labeling for each antigen confined to its particular cellular compartment. Background levels and nonspecific deposition of the staining were negligible. The use of biotinyl–tyramide therefore appears to be an alternative sensitive technique for immunoelectron microscopy. (*J Histochem Cytochem* 45:1449–1454, 1997)

KEY WORDS

immunocytochemistry
electron microscopy
biotinyl–tyramide

SINCE the advent of immunocytochemistry in the late 1940s, major progress has been made in methods of labeling and in techniques of tissue preparation. For electron microscopy, two techniques have been quite successful for demonstration of antigen–antibody complexes: the PAP technique, using peroxidase as the agent of labeling (Sternberger et al. 1970), and the immunogold technique, which takes advantage of the physicochemical properties and electron-dense characteristics of colloidal gold particles (for review see Bendayan 1995). Because of its superiority in terms of resolution in detection and possibilities of quantitation, the immunogold approach has become the technique of choice in modern molecular morphology (for review see Bendayan 1995).

Recently, a novel approach for revealing antigen–antibody complexes, the tyramide signal amplification technique, has been reported. First introduced for immunoassays (Bobrow et al. 1989,1991), it was then

extended to immunocytochemistry at the light microscopic level (Adams 1992; Berghorn et al. 1994; Merz et al. 1995; Sanno et al. 1996; Shindler and Roth 1996; Plenat et al. 1997). This technique is based on the ability of HRP from an HRP–avidin complex (or any HRP–protein complex) to catalyze the deposition of biotinyl–tyramide onto a surface displaying biotinylated antigen–antibody complexes. This deposition is believed to take place at the site of the enzyme reaction, thus leading to good resolution (Bobrow et al. 1992). The development of fluorescent tyramide reagents has made possible the application of this technique to fluorescent microscopy, either in immunostainings (Berghorn et al. 1994; De Haas et al. 1996; Hunyady et al. 1996; Plenat et al. 1997; van Gijlswijk et al. 1997; Van heusden et al. 1997) or in situ hybridization (Kerstens et al. 1995; Raap et al. 1995; De Haas et al. 1996; Macechko et al. 1997; Schmidt et al. 1997; van Gijlswijk et al. 1996,1997; Zehbe et al. 1997).

In the present study, we report the use of the tyramide signal amplification approach (TSA) for immunoelectron microscopy. Application of the technique on thin sections of tissues and examination at the electron microscopic level have revealed the presence of a

Correspondence to: Dr. M. Bendayan, Dept. of Anatomy, Université de Montréal, CP 6128 Succ. Centre Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

Received for publication May 8, 1997; accepted July 10, 1997 (7C4330).

dense reaction product at the antigen-antibody reaction sites. This novel technique appears to be simple, reliable, and of high specificity and good resolution. It provides an alternative to existing techniques and could be used in combination with others for multiple staining experiments.

Materials and Methods

Tissue Processing

Small fragments of normal rat pancreatic and liver tissues were fixed by immersion in 0.1 M phosphate-buffered 1% glutaraldehyde for 2 hr at 4°C. After fixation, the tissue fragments were washed in the phosphate buffer and processed for low-temperature embedding in Lowicryl as previously described (Bendayan 1995). Ultrathin sections were cut and mounted on Parlodion-carbon-coated nickel grids and processed for immunocytochemistry using the TSA (Tyramide Signal Amplification) as the electron-dense marker.

Antisera and Reagents

Five different primary antibodies were used to assess the TSA technique: a rabbit anti-human amylase and a mouse monoclonal anti-heat shock protein 70 (HSP-70) from Sigma Chemicals (St Louis, MO), a guinea pig anti-porcine insulin from ICN (Montreal, Quebec, Canada), a rabbit anti-carbamoyl phosphate synthetase (CPS) (Bendayan and Shore 1982), and a rabbit anti-catalase (Bendayan and Reddy 1982). The specificity of these antibodies was previously demonstrated by immunochemical and immunocytochemical techniques (Bendayan and Reddy 1982; Bendayan and Shore 1982; Bendayan 1984, 1989; Velez-Granell et al. 1994). The secondary antibodies were a biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (GAR-biotin), a biotin-conjugated goat anti-mouse IgG (GAM-biotin) (Sigma), and biotin-conjugated goat anti-guinea pig IgG (GAG-biotin) (Amersham Life Science; Oakville, Ontario, Canada). Streptavidin-HRP (SA-HRP), biotinyl-tyramide (BT), and the amplification diluent were kindly provided by NEN Life Science Products (Renaissance TSA-Indirect kit; NEN Life Science Products, Boston, MA).

Immunocytochemistry

Labeling was carried out by floating the grids with tissue sections face down on drops of 1% ovalbumin in 10 mM PBS, pH 7.2, for 30 min at room temperature (RT) and then transferring them directly onto a drop of one of the specific primary antibodies for 2 hr at RT or overnight at 4°C. The antibodies were used at the following dilutions: anti-amylase 1:10; anti-HSP-70 1:10; anti-insulin 1:200; anti-CPS 1:50; and anti-catalase 1:200. The grids were then rinsed with PBS for 15 min, transferred to the 1% ovalbumin solution for 30 min, and then incubated on a drop of one of the corresponding specific biotinylated secondary antibodies for 60 min at RT: GAR-biotin 1:800 for anti-amylase, anti-CPS, and anti-catalase; GAG-biotin 1:500 for the anti-insulin; and GAM-biotin 1:500 for the anti-HSP-70. Tissue sections were then rinsed with PBS for 15 min, transferred to the ovalbumin solution for 15 min, and then incubated on a drop of streptavidin-HRP diluted 1:500 with PBS for 30

min at RT. The grids were then washed for 15 min with PBS and incubated for 10 min at RT with biotinyl-tyramide diluted 1:50 in 1 × amplification diluent. After washing with PBS and distilled water, the tissue sections were stained with uranyl acetate and examined with a Philips 410SL electron microscope.

The specificity of the labeling with tyramide was assessed by several control experiments: omission of either the primary or secondary antibody and omission of the streptavidin-HRP or the biotinyl-tyramide steps, in four separate experiments.

Results

Application of the TSA technique in combination with specific primary antibodies on thin tissue sections prepared for electron microscopy led to the deposition of a dense filamentous material on structures known to contain the different antigens. The specificity of the labelings appeared to be excellent and is supported by the results obtained using various antigens located in different cells and/or different cell compartments. Incubation of pancreatic tissue with the anti-amylase antibody (Figure 1) led to staining of different compartments of the acinar cells, such as the rough endoplasmic reticulum, the Golgi cisternae, the condensing vacuoles, and the zymogen granules. The dense filamentous reaction product was present on the cell compartments with different intensities, the highest being over the zymogen granules known to contain high amounts of amylase. Other compartments, such as mitochondria or nuclei, were devoid of any staining (Figure 1). The use of the anti-insulin antibody resulted in staining of the pancreatic B-cells, particularly in those compartments involved in secretion, the rough endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, and the immature and mature secretory granules (Figure 2). Staining for HSP-70 was found in the Golgi apparatus and condensing vacuoles of the pancreatic acinar cells and was particularly concentrated in the *trans*-Golgi network (Figure 3). For the hepatic cells, labeling for carbamoyl phosphate synthetase was restricted to the mitochondria (Figure 4) and that for catalase to the peroxisomes (Figure 5). In all cases, the reaction product appeared as thin filamentous deposits that overlaid the labeled structures without masking their morphological features. Considering the different labeled compartments, the reaction product remained within the limits of each compartment, thus reflecting good resolution. The specificity of the results, as demonstrated by the very low levels of background, was excellent, the labeling being restricted to the corresponding compartments. It was also supported by the control experiments. Omission of the primary or secondary antibodies in the labeling protocol led to absence of staining except for the presence of some random dense spots (Figure 1C). This indicates that application of the TSA protocol without a

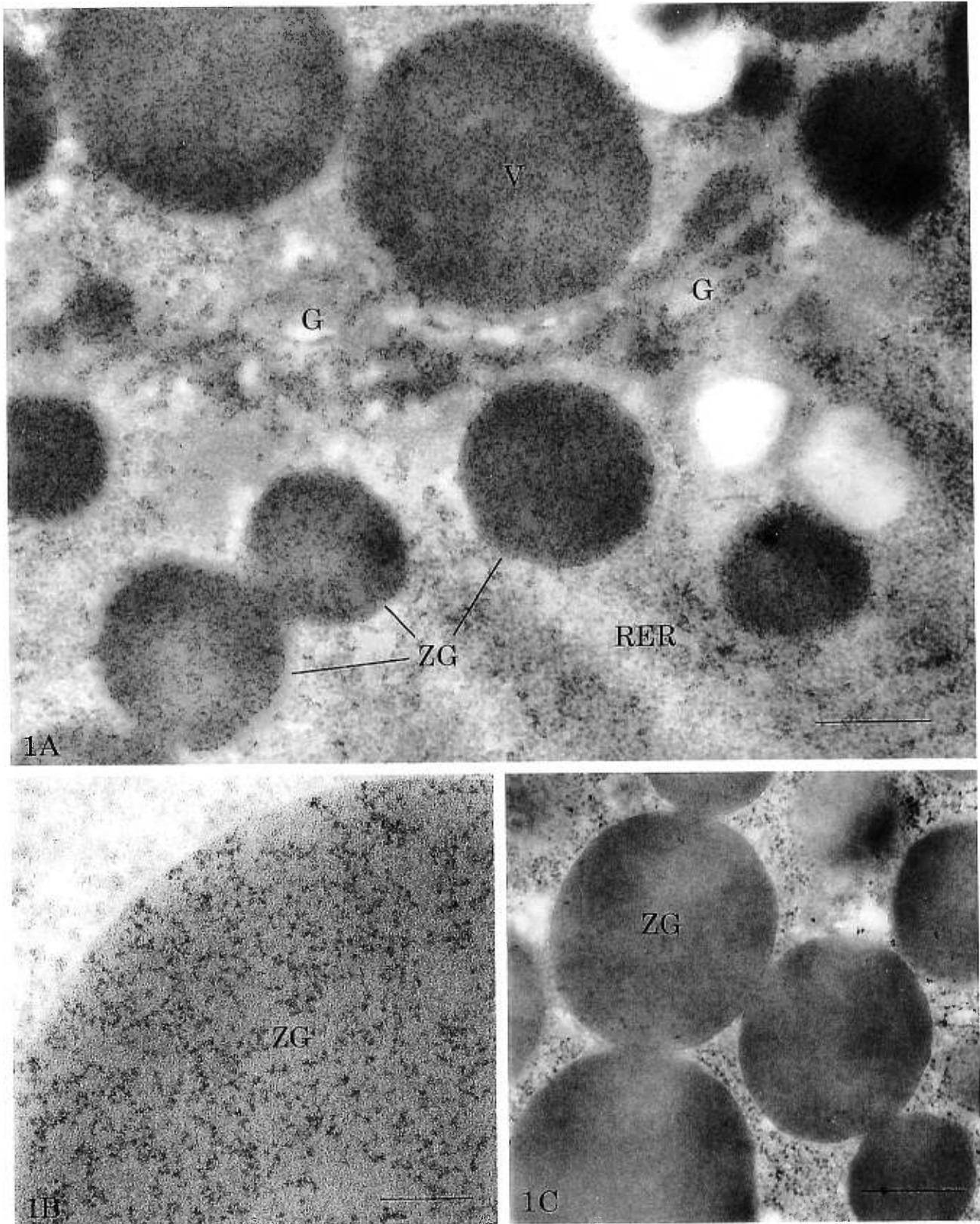
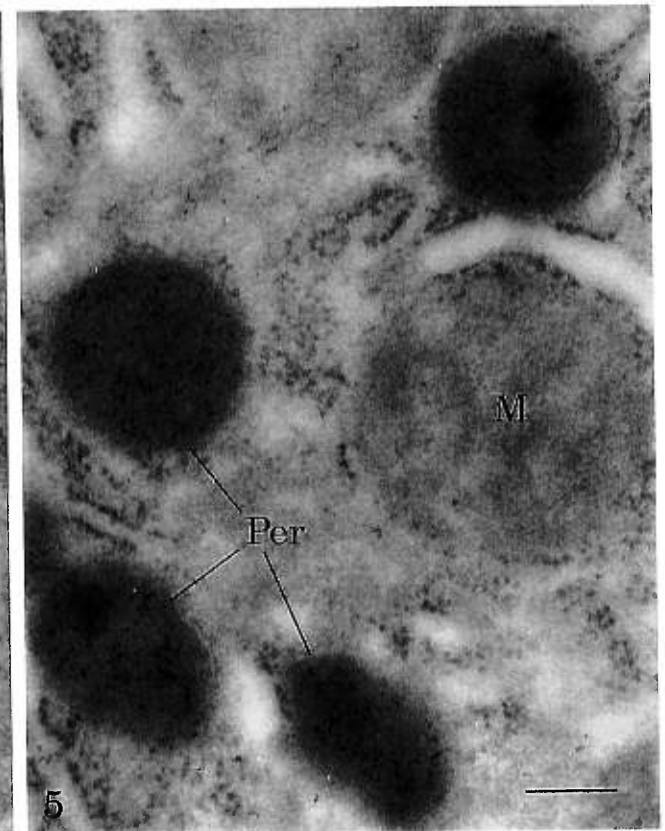
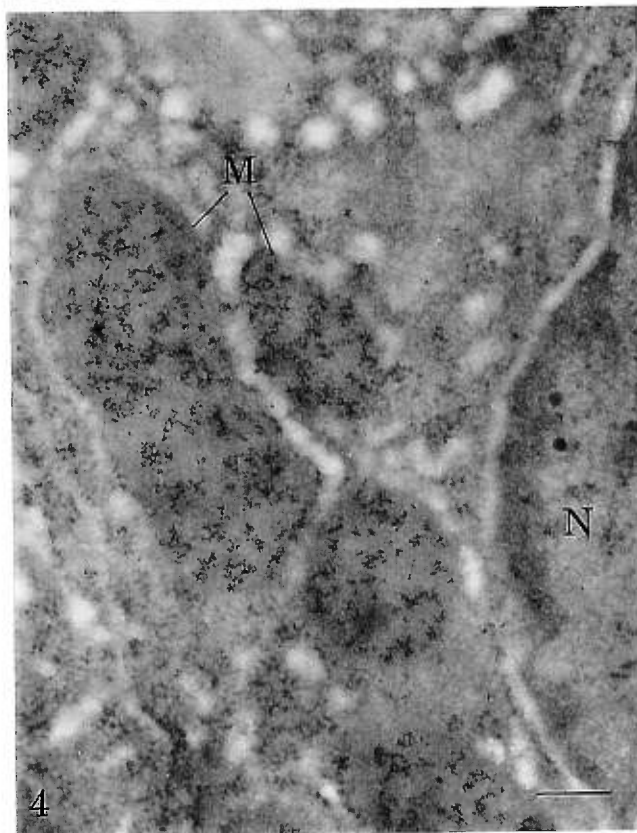
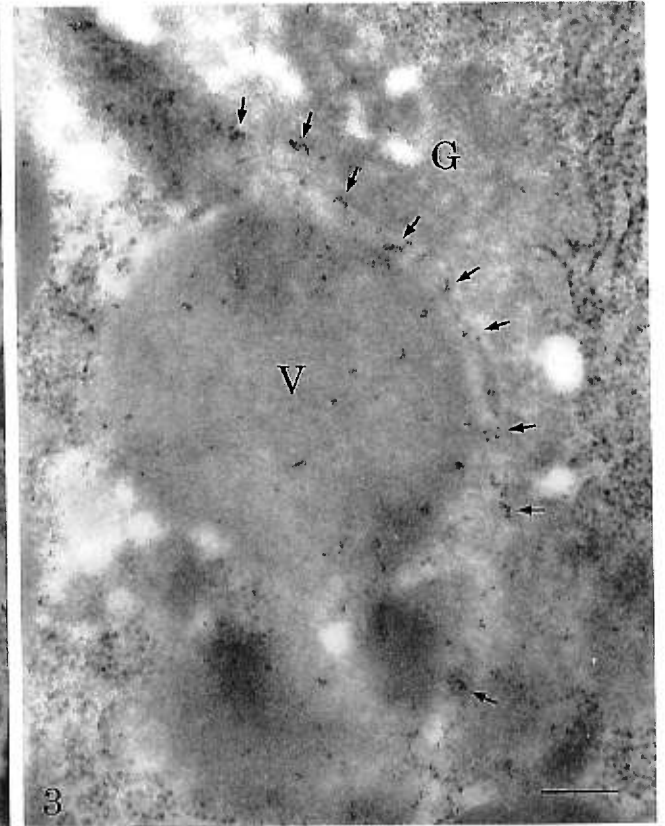
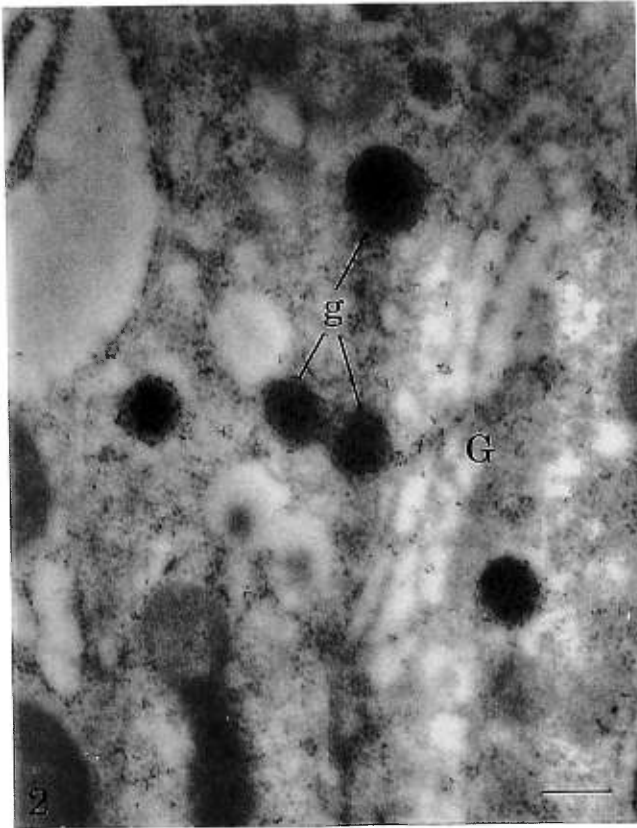


Figure 1 (A) Thin section of rat pancreatic acinar cell labeled for amylase by the TSA technique. Dense filamentous deposits, revealing amylase antigenic sites, are present over the rough endoplasmic reticulum (RER), the Golgi apparatus (G), the condensing vacuoles (V), and the zymogen granules (ZG). Bar = 0.5 μm . (B) Detail of a labeled zymogen granule at higher magnification demonstrating the dense filamentous deposit. Bar = 0.5 μm . (C) Control experiment: omission of the anti-amylase primary antibody in the protocol. The labeling is abolished although some spot deposits are seen randomly on the tissue section. Bar = 0.1 μm .



specific antibody does not generate any staining (Figure 1C). Similar results were obtained when the streptavidin-HRP or the biotinyl-tyramide step was omitted. Nonspecific deposition of the different reagents therefore appears to be negligible. The technique appears reliable and sensitive. However, some precautions must be taken to generate intense and specific stainings. The different solutions should be as fresh as possible, particularly the diluted tyramide solution, which should not be more than 2 weeks old. The use of an old solution affects the chemical reactions and generates labeling of low intensity. Incubation with 1% ovalbumin appears to interfere with the HRP-tyramide reaction and therefore should not be carried out before incubation with the biotinyl-tyramide.

Discussion

The TSA approach was originally introduced for detection of antigens on solid-phase immunoassay (Bobrow et al. 1989,1991) and was then adapted to histochemistry for sensitive detection of tissue antigens at the light microscopic level (Adams 1992; Berghorn et al. 1994). In the present work we have extended the TSA protocol for the ultrastructural localization of tissue antigens by electron microscopy. The technique is an indirect one in which a specific antigen-antibody complex is revealed by a biotinylated secondary antibody, which in turn is reacted with streptavidin-HRP. This HRP reacting with hydrogen peroxide catalyzes the oxidative condensation of tyramide by a free radical mechanism. This activated tyramide binds covalently to the tyrosine residues of the proteins surrounding the HRP. Moreover, since the half-life of the tyramide radicals is very short, the deposition occurs very close to the activating enzyme (Bobrow et al. 1992). Therefore, the HRP catalyzes the deposition of tyramide at the surface of the tissue section, giving rise to an electron-dense deposit at the site of the specific antigen-antibody complex. Details of the biochemical reactions taking place during oxidation of the tyramine have been reported to generate a brown pigment, which was found to contain dityramine and more extensively oxidized and polymerized derivatives (Gross and Sizer

1959). That such polymerized derivatives correspond to our dense filamentous reaction product found at the electron microscopic level remains to be confirmed. Application of this TSA protocol in combination with specific antibodies resulted in the staining of cell compartments with a dense filamentous deposit. This deposit, generated by the HRP-tyramide reaction, appeared to be confined to the labeled structures and thus yielded labeling of good resolution. Because of differences in molecular interactions and reactions, it is quite difficult to perform comparative evaluations between this TSA technique and other techniques. Because it is a reaction product rather than a particulate marker, there are difficulties in providing quantitative evaluations of labeling intensities, as is the case with the colloidal gold marker. Specificity of the results is always based on the characteristics of the primary and secondary antibodies. However, for the TSA reagents, levels of background as well as nonspecific deposition of the reagent product were negligible. Therefore, TSA appears to represent an alternative technique for immunoelectron microscopy that can be applied either for the simple detection of antigens or in combination with other techniques for multiple labeling experiments.

Acknowledgments

Supported by grants from the Medical Research Council of Canada.

We would like to express our gratitude to Patricia Mayer from NEN Life Science Products (Boston, MA) for her kindness in providing us with the different reagents and her interest in this study.

Literature Cited

- Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40:1457-1463
- Bendayan M (1984) Concentration of amylase along its secretory pathway in the pancreatic acinar cell as revealed by high resolution immunocytochemistry. *Histochem J* 16:85-108
- Bendayan M (1989) Ultrastructural localization of insulin and C-peptide antigenic sites in rat pancreatic B-cell applying the quantitative high resolution protein A-gold approach. *Am J Anat* 185:205-216
- Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-163

Figure 2 Thin section of rat pancreatic B-cell labeled for insulin by the TSA technique. Dense filamentous reaction product, revealing insulin antigenic sites, is present over the Golgi apparatus (G) and the secretory granules (g). Bar = 0.25 μ m.

Figure 3 Localization of heat shock protein 70 in rat pancreatic acinar cell with the TSA technique. Labeling by the electron-dense deposits is present mostly in the *trans*-cisternae of the Golgi apparatus (G) and in the condensing vacuoles (V). Bar = 0.25 μ m.

Figure 4 Thin section of rat liver tissue labeled for carbamoyl phosphate synthetase by the TSA technique. Labeling by dense filamentous deposits is present over mitochondria (M). Little background is seen over the nucleus (N) and the cytoplasm. Bar = 0.25 μ m.

Figure 5 Thin section of rat liver cell labeled for catalase by the TSA technique. Labeling by the dense reaction product is present over the peroxisomes (Per). Background levels over mitochondria (M) and cytoplasm are very low. Bar = 0.25 μ m.

- Bendayan M, Reddy JK (1982) Immunocytochemical localization of catalase and heat-labile enoyl CoA hydratase in the livers of normal and peroxisome proliferator-treated rats. *Lab Invest* 47:364-369
- Bendayan M, Shore GC (1982) Immunocytochemical localization of mitochondrial proteins in the rat hepatocyte. *J Histochem Cytochem* 30:139-147
- Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE (1994) cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem* 42:1635-1642
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125:279-285.
- Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J (1992) The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods* 150:145-149
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1991) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* 137:103-112
- De Haas RR, Verwoerd NP, van Der Corput MP, van Gijlswijk RPM, Siitari H, Tanke HJ (1996) The use of peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide in combination with time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 44:1091-1099
- Gross AJ, Sizer IW (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem* 234:1611-1614
- Hunyady B, Krempels K, Harta G, Mezey E (1996) Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* 44:1353-1362
- Kerstens HMJ, Poddighe PJ, Hanselaar AGJM (1995) A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* 43:347-352
- Macechko PT, Krueger L, Hirsch B, Erlandsen SL (1997) Comparison of immunologic amplification vs enzymatic deposition of fluorochrome-conjugated tyramide as detection systems for FISH. *J Histochem Cytochem* 45:359-363
- Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC (1995) Immunomax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab Invest* 73:149-156
- Plenat F, Picard E, Antunes L, Vignaud JM, Marie B, Chalabreysse P, Muhale F (1997) L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. *Ann Pathol* 17:17-23
- Raap AK, van Der Corput MP, Vervenne RA, van Gijlswijk RPM, Tanke HJ, Wiegant J (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet* 4:529-534
- Sanno N, Teramoto A, Sugiyama M, Itoh Y, Osamura RH (1996) Application of catalyzed signal amplification in immunodetection of gonadotropin subunits in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Clin Pathol* 106:16-21
- Schmidt BF, Chao J, Zhu Z, DeBiasio RL, Fisher G (1997) Signal amplification in the detection of single-copy DNA and RNA by enzyme-catalyzed deposition (CARD) of the novel fluorescent reporter substrate Cy3.29-tyramide. *J Histochem Cytochem* 45:365-373
- Shindler KS, Roth KA (1996) Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J Histochem Cytochem* 44:1331-1335
- Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333
- van Gijlswijk RPM, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ (1996) Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J Histochem Cytochem* 44:389-392
- van Gijlswijk RPM, Zijlmans HJMAA, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45:375-382
- Van heusden J, de Jong P, Ramaekers F, Bruwiere H, Borgers M, Smets G (1997) Fluorescein-labeled tyramide strongly enhances the detection of low bromodeoxyuridine incorporation levels. *J Histochem Cytochem* 45:315-319
- Veletz-Granell CS, Arias AE, Torres-Ruiz JA, Bendayan M (1994) Molecular chaperones in pancreatic tissue: presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells. *J Cell Sci* 107:539-549
- Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R (1997) Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-nanogold, and silver acetate autoradiography. *Am J Pathol* 150:1553-1561

ARTICLE

Immunogold Signal Amplification: Application of the CARD Approach to Electron Microscopy

Gaétan Mayer and Moïse Bendayan

Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

SUMMARY Catalyzed reporter deposition (CARD) is a technique that allows amplification of routine immunolabeling in light microscopy. This procedure takes advantage of the horseradish peroxidase (HRP) from an HRP–avidin complex to catalyze the accumulation of reporter-conjugated tyramine (a phenolic compound) onto a surface displaying biotinylated antigen–antibody complexes. The large amount of labeled tyramine deposited allows the detection of an antigenic site with multiple reporter molecules. In this study we modified this amplification protocol to combine it with the immunogold technique for the ultrastructural localization of antigens in electron microscopy. We constructed various tyramide conjugates that permit the combination of this amplification method with a particulate colloidal gold marker. The new probes yield results of high specificity and enhanced intensity. Assessment of the level of resolution of the labeling has demonstrated that, in spite of the amplification, the resolution remains very good. Therefore, once associated, the immunogold and the CARD techniques lead to specific, high-resolution, sensitive and amplified signals that exhibit the advantages of both approaches.

(*J Histochem Cytochem* 47:421–429, 1999)

KEY WORDS

catalyzed reporter deposition
(CARD)
signal amplification
colloidal gold
immunocytochemistry
tyramide conjugates
electron microscopy

POSTEMBEDDING ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION of tissue antigens by the immunogold approach has been widely and successfully used over the past 20 years (for review see Bendayan 1995). The electron-dense colloidal gold marker allows the visualization of antigenic sites with high resolution. Being a particulate marker, it also allows quantitative evaluations of labeling intensity and morphometrical determinations. Owing to its properties, the immunogold approach has become one of the most widely employed techniques in immunoelectron microscopy. However, it also carries its own limitations. For detection of scarce tissue antigens, for example, or for antigens sensitive to fixation, the technique, in its postembedding protocol, may present some limitations in terms of labeling efficiency. Many attempts have been made to amplify the end result. Low-temperature tissue embedding procedures in hydrophilic resins (Kellenberger et al. 1980; Roth et al. 1981; Bendayan 1984), antigen retrieval

techniques (Stirling and Graff 1995; Wilson et al. 1996), use of various fixatives (Karnovsky 1965; McLean and Nakane 1974), introduction of ultrasmall gold markers (Baschong et al. 1985; Slot and Geuze 1985; Hainfeld 1987, 1988; Hainfeld and Furuya 1992), and modification of the protein A–gold technique by the use of the anti-protein A (Bendayan and Duhr 1986), are some of the approaches that enhance colloidal gold-based immunocytochemical signals. Although these succeed in improving the sensitivity of the immunogold methods, more efficient methods are always needed.

In 1989, Bobrow et al. introduced the catalyzed reporter deposition (CARD) for solid-phase immunoassays. This novel approach can enhance the signal up to 30-fold compared to standard membrane immunoassays (Bobrow et al. 1991). The method was later adapted to immunocytochemistry at the light (Adams 1992; Berghorn et al. 1994; Merz et al. 1995; Shindler and Roth 1996) and electron (Mayer and Bendayan 1997; Schöfer et al. 1997; Humbel et al. 1998) microscopic levels and to *in situ* hybridization (Kerstens et al. 1995; Raap et al. 1995; van Gijlswijk et al. 1996; Sano et al. 1998). The CARD amplification system relies on horseradish peroxidase (HRP) molecules, immu-

Correspondence to: Dr. M. Bendayan, Dept. of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, CP 6128 Succ. Centre Ville, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

Received for publication November 2, 1998; accepted November 3, 1998 (8A4818).

nologically introduced at the specific antigen-antibody complex site, to catalyze the covalent attachment of a large number of derivatized tyramine molecules onto tissue sections. On oxidation by HRP in the presence of hydrogen peroxide, the phenol moiety of the tyramine forms a radical with a short half-life. This activated tyramine rapidly binds covalently to electron-rich amino acids of proteins immediately surrounding the site of the immunoreaction. Tyramine can be crosslinked to a variety of reporter molecules, such as biotin (Bobrow et al. 1989), digoxigenin (Plenat et al. 1997), trinitrophenyl (Hopman et al. 1998), FITC, rhodamine, and Cy-3 (van Gijlswijk et al. 1997). These deposited reporter molecules are then detected either by streptavidin, by specific antibodies, or directly by their fluorescent signal. Except for the directly detected fluorochromes, the streptavidin or the anti-hapten antibodies can be conjugated to particular markers for visualization of the antigenic sites.

The application of the biotinyl-tyramide amplification procedure developed by Bobrow, followed by streptavidin-gold as the detection step, should, in theory provide gold particle labeling of high intensity. In addition to the enhancement of the signal through the CARD technique, its combination with the gold marker should generate high-resolution labeling that can be quantitated.

In the present communication, new reporter-conjugated tyramine complexes, i.e., tyramide-IgG, tyramide-albumin-gold, and biotinyl-LC-LC-tyramide, were constructed and introduced into the immunogold labeling protocols to associate the advantages of the CARD technique with those of the colloidal gold particulate marker. The combination of this dual approach for the ultrastructural localization of antigenic sites led to specific amplified signals revealed by gold particles. The resolution of the enhanced signal was found to be high enough for localization of membrane-associated proteins. Moreover, the labeling intensity could be quantitated and demonstrated that the amplified signals were about 10-fold higher than those of the standard protein A-gold protocol.

Materials and Methods

Tissue Processing

Fragments of normal rat pancreatic and liver tissues were fixed by immersion with 1% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 2 hr at room temperature (RT). The pancreatic tissue was processed for low-temperature embedding in Unicryl as previously described (Bendayan 1995), and the liver tissue was postfixed with 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812 according to standard techniques. Thin sections were cut and mounted on Parlodion-carbon-coated nickel grids and processed for immunocytochemistry using different labeling protocols.

Antisera and Reagents

A rabbit anti-amylase antibody (Sigma-Aldrich Canada; Oakville, Ontario, Canada) was used to assess the different amplification protocols on pancreatic tissue. A rabbit anti-carbamoyl phosphate synthetase (CPS) antibody (Bendayan and Shore 1982) was applied on liver tissue to assess the resolution of the labeling. The secondary antibody was a biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (GAR-biotin) (Sigma-Aldrich). Streptavidin-gold (10 nm) was from Sigma. Streptavidin-HRP (SA-HRP), biotinyl-tyramide (BT), and the amplification diluent were provided by NEN Life Science Products (Boston, MA). Protein A- and protein A/G-gold (10 nm) were prepared according to previously described protocols (Bendayan 1995).

Preparation of the Probes

All coupling procedures were carried out at RT.

Biotinyl-LC-LC-Tyramide. The biotinyl-long chain-long chain-tyramide probe (B-LC-LC-T) was constructed through sulfosuccinimidyl-6'-(biotinamido)-6-hexanamide hexanoate (sulfo-NHS-LC-LC-biotin) (Pierce; Rockford, IL) and tyramine-HCl (Sigma-Aldrich). A total of 500 μ l of 10 mM Sulfo-NHS-LC-LC-biotin in distilled water was added to 500 μ l of 10 mM tyramine-HCl in 0.01 M PBS, pH 7.2. The solution was allowed to react for 30 min and was stored at 4C.

Tyramide-IgG. Synthesis of the tyramide-IgG probe was carried out by coupling tyramine-HCl with normal rabbit immunoglobulins (Dako Diagnostics Canada; Mississauga, Ontario, Canada) through the glutaraldehyde method (Harlow and Lane 1988). A total of 250 μ l of 60 mM tyramine-HCl in PBS was mixed with the same volume of 20 mg/ml rabbit immunoglobulins in 100 mM NaCl. The crosslinking was performed with 250 μ l of 0.2% glutaraldehyde in PBS slowly added dropwise over 30 min with constant stirring. Then the solution was allowed to react for 1 hr with stirring. The excess of glutaraldehyde was neutralized by adding 200 μ l of 1 M glycine in PBS (200 mM final concentration) to the mixture which was incubated, under stirring, for 1 hr. The resulting solution was purified and separated through a Sephadex G-25 column (1 \times 60 cm; elution with distilled water) (Pharmacia Biotech; Baie d'Urfé, Québec, Canada). The separation yielded two peaks and the fractions of the first peak, containing the tyramide-IgG complex, were pooled and evaporated to dryness with a Speed Vac Plus centrifugal vacuum concentrator (Savant Instruments; Holbrook, NY). The probe was resuspended in 500 μ l PBS and stored at 4C.

Tyramide-BSA-Gold. The tyramide-BSA-gold probe was constructed by coupling tyramine-HCl to bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and by tagging the tyramide-BSA complex with colloidal gold particles. The procedure involved the preactivation of 2 ml of 60 mM tyramine-HCl in PBS with 2 ml of 0.2% glutaraldehyde in PBS. Then 40 mg of BSA was added to the activated tyramine solution and the mixture was allowed to react for 1 hr with constant stirring. The reaction was stopped by adding 60 mg of glycine (200 mM final concentration) to the coupling solution for 1 hr. The reaction products were separated on a Sephadex

G-25 column (1 × 60 cm; elution with distilled water) and yielded two peaks. The first peak was composed of three subfractions: a translucent fraction, a yellowish fraction, and a clear white one. The translucent subfraction, being the one containing the tyramide-albumin complex, was evaporated to dryness in the centrifugal vacuum concentrator and resuspended in 1 ml of distilled water. To couple this complex to gold particles, 9 ml of 10-nm colloidal gold particle suspension (pH 5.8) was added to 500 μ l of the tyramide-albumin and centrifuged for 30 min at 25,000 × g. The precipitated tyramide-BSA-gold was recovered at the bottom of the tube, diluted with 500 μ l of 0.02% polyethylene glycol in PBS, and stored at 4°C.

Labeling Protocols

All labeling protocols were carried out by floating the grids with tissue sections face down on drops of the different reagents. All incubations were performed at RT unless otherwise specified.

Simple Protein A-Gold Protocol. Pancreatic tissue thin sections mounted on nickel grids were incubated for 30 min on a drop of 10 mM PBS containing 1% ovalbumin and then transferred to a drop of diluted anti-amylase (1:200 in PBS) for an overnight incubation at 4°C. Tissue sections were then rinsed with PBS for 15 min, transferred to 1% ovalbumin for 15 min, and incubated for 30 min on a drop of the protein A-gold or the protein A/G-gold complex. The grids were thoroughly washed with PBS, rinsed with distilled water, dried, and stained with uranyl acetate before examination with a Philips 410 SL electron microscope.

Biotinyl-Tyramide/Streptavidin-Gold Protocol. Labeling was carried out by floating the grids on drops of 2% BSA in PBS for 15 min and then transferring them directly onto a drop of the diluted anti-amylase (1:200 in PBS) overnight at 4°C. The grids were then rinsed with PBS for 15 min, transferred to the BSA solution for 15 min, and incubated on a drop of GAR-biotin diluted 1:100 in PBS for 60 min. Tissue sections were then washed with PBS for 15 min, transferred to the BSA solution for 15 min, and incubated on a drop of streptavidin-HRP diluted 1:500 with PBS for 30 min. The grids were rinsed for 15 min with PBS and incubated for 10 min with the biotinyl-tyramide diluted 1:50 in 1 × amplification diluent. After a 15-min wash with PBS, the tissue sections were incubated on a drop of 1% ovalbumin for 15 min and directly transferred to a drop of streptavidin-gold diluted 1:20 in PBS for 30 min. The grids were then washed with PBS, rinsed with distilled water, dried, and stained with uranyl acetate before examination in the electron microscope.

Biotinyl-LC-LC-Tyramide/Streptavidin-Gold Protocol. The same labeling procedure as described above for the biotinyl-tyramide/streptavidin-gold protocol was applied for the biotinyl-LC-LC-tyramide probe. The only difference was the use of the biotinyl-LC-LC-tyramide (dilution 1:50 in PBS) and the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) to the biotinyl-LC-LC-tyramide solution at a final concentration of 0.03%.

Tyramide-IgG Protocol. The tissue sections were incubated on a drop of PBS containing 1% ovalbumin for 30

min and transferred to a drop of the diluted anti-amylase (1:200 in PBS) for an overnight incubation at 4°C. After rinsing in PBS for 15 min, the sections were incubated with 1% ovalbumin for 15 min and transferred onto a drop of GAR-biotin (1:100 in PBS) for 60 min. The grids were then washed with PBS for 15 min, transferred to the ovalbumin solution for 15 min, and incubated on a drop of streptavidin-HRP (1:500 in PBS) for 30 min. After rinsing for 15 min with PBS, the sections were transferred onto a drop of the tyramide-IgG solution containing 0.03% H_2O_2 and incubated for 10 min. The tissue sections were then washed in PBS for 15 min, transferred to a drop of 1% ovalbumin for 10 min, and then incubated with the protein A/G-gold complex for 30 min. At the end of this incubation, the grids were thoroughly washed with PBS, followed by distilled water, and allowed to dry. Before examination in the electron microscope, the tissue sections were stained with uranyl acetate.

Tyramide-BSA-Gold Protocol. The tissue sections were first incubated on a drop of 1% ovalbumin in PBS for 30 min and then transferred to the diluted anti-amylase (1:200 in PBS) for an overnight incubation at 4°C. The sections were rinsed with PBS for 15 min, transferred to 1% ovalbumin for 15 min, and then incubated on a drop of GAR-biotin (1:100 in PBS) for 60 min. The grids were further rinsed with PBS (15 min), transferred to the ovalbumin (15 min), and incubated with streptavidin-HRP (1:500 in PBS) for 30 min. The sections were then washed with PBS (15 min) and incubated with the tyramide-BSA-gold (10 nm) probe diluted 1:10 in PBS containing 0.03% H_2O_2 , for 10 min. The grids were thoroughly washed with PBS and distilled water, dried, and stained with uranyl acetate before examination.

Control Experiments

The specificity of the labelings was assessed through a number of control experiments. Two types of controls were carried out for (a) assessment of the specificity of the labeling, which included the use of the antigen-adsorbed antibody and the omission of either the primary or secondary antibody, and (b) the assessment of the specificity of the amplification, which included omission of one of the reagents such as the hydrogen peroxide, the streptavidin-HRP, or the conjugated tyramine.

Quantitation

Quantitative evaluations of the labeling over the zymogen granules as well as that over mitochondria, which reflects background staining, were carried out according to previously described protocols (Bendayan 1995). Electron micrographs were recorded and enlarged to a final magnification of ×42,000. Evaluation of the area of the zymogen granules and mitochondria was done by direct planimetry using the Videoplan 2 system (Carl Zeiss Canada; Montréal, Québec, Canada). The number of gold particles present in the granules and mitochondria was counted and the density of labeling was expressed as the number of gold particles/ μm^2 . The labeling densities were evaluated for each of the five protocols and the amplification factor was calculated in reference

to the labeling obtained with the simple protein A-gold protocol.

Assessment of Resolution

CPS is a mitochondrial enzyme associated with the inner mitochondrial membrane (Bendayan and Shore 1982). Because of its close association with the mitochondrial membrane, we selected it as a reference for a membrane-bound protein. The proximity of the labeling to the mitochondrial membrane was chosen as a reference for evaluation of the resolution. Sections of rat liver tissue were immunolabeled with anti-CPS using the simple protein A-gold and the tyramide-IgG protocols, as described above. To increase ultrastructural preservation, labelings were carried out on osmium-postfixed liver tissue embedded in Epon. The use of such material required an additional preliminary step in the labeling protocol, i.e., the use of metaperiodate (Bendayan 1995). Therefore, the tissue sections were incubated with a saturated sodium metaperiodate solution for 60 min and rinsed in water before the first antibody step. Evaluation of the resolution was assessed by measuring the distance between the gold particles and the inner mitochondrial membrane for both the simple and amplified protocols using the Videoplan 2 image analysis system.

Results

Four new tyramide protocols were assessed to evaluate the possibility of combining the CARD amplification approach with the immunogold technique to amplify immunocytochemical signals at the electron microscopic level. Working on a single tissue with the same antibody and maintaining the antibody's dilution as well as all other procedures constant allows the comparative study of the amplification signals obtained with the different probes. The immunolocalization of amylase in pancreatic tissue with the CARD amplification technique using either of the conjugated tyramine probes yielded labeling by colloidal gold particles over cellular compartments of pancreatic cells known to contain this antigen (Figures 1 and 2). The labeling was located over the rough endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, the condensing vacuoles, and the zymogen granules (Figure 2). Labeling was also found in the acinar lumen. Compared to the simple protein A-gold protocol, the use of any of the tyramide protocols yielded more intense labeling. However, differences were detected among the amplified signals obtained with the different CARD protocols. The amplified signal obtained with the biotinyl-tyramide was not as intense as those obtained with the other protocols, and background staining was present over mitochondria and nuclei. In contrast, the use of the biotinyl-LC-LC-tyramide probe led to much higher labeling, indicating that the incorporation of spacer arms between the tyramide and the biotin molecules overcomes the possible problems of steric hindrance presented by the biotinyl-tyramide probe (Table 1).

Nevertheless, staining of amylase with the biotinyl-LC-LC-tyramide probe was also accompanied by relatively high background staining. Levels of background appeared to decrease from regions around zymogen granules to peripheral regions of the cell. The biotinylated probes therefore appear to display problems of diffusion leading to such background. These problems were solved by the addition of 10% dextran sulfate to the tyramide solution (van Gijlswijk et al. 1996), which indeed reduced the background staining. The other two protocols, the tyramide-IgG and the tyramide-BSA-gold, yielded labeling of very high intensity and specificity with adequate background stainings (Figures 1A and 1B).

Quantitative evaluation of the density of labeling for amylase over zymogen granules and mitochondria allowed us to perform a more thorough evaluation of the degree of signal amplification and of levels of background staining. Striking differences were observed among the protocols (Table 1). The immunogold labeling intensity obtained with the CARD system was four- to 13-fold higher than that of the conventional protein A-gold technique, depending on the type of tyramide probe used. The biotinyl-tyramide and the biotinyl-LC-LC-tyramide generated labeling with amplification factors of 4 and 12, respectively, compared to the standard protein A-gold. However, both amplification protocols gave high background over mitochondria. The shortest protocol, which uses the tyramide-BSA-gold, yielded excellent labeling intensity with an amplification factor 7 times that of the nonamplified signal. Moreover, the background over mitochondria remained very low. The method using the tyramide-IgG probe also showed a very high increase in the signal, with an amplification factor of 13 compared to the simple protein A-gold protocol. The background level over mitochondria remained excellent, demonstrating a very high specificity of the reaction.

Several control experiments were carried out to assess the specificity of the results obtained with the different amplification protocols (Table 2). Among them, antigen adsorption and omission of the first or second antibody served as controls for the specificity of the immunolabeling itself. Omission of one of the reagents needed for the amplification, such as the hydrogen peroxide, the streptavidin-HRP, or the tyramide, served as controls for the amplification protocols. The results obtained confirmed the high specificity of the labeling (Table 2). Among the controls of amplification, some resulted in absence of labeling and others displayed low signals. Omission of the biotinyl-tyramide or the biotinyl-LC-LC-tyramide gave low signals, which result from the normal binding of streptavidin-gold with the biotinylated secondary antibody. The tyramide-IgG protocol uses the protein A/G-gold complex to detect the Fc fragments of immunoglobulins. There-

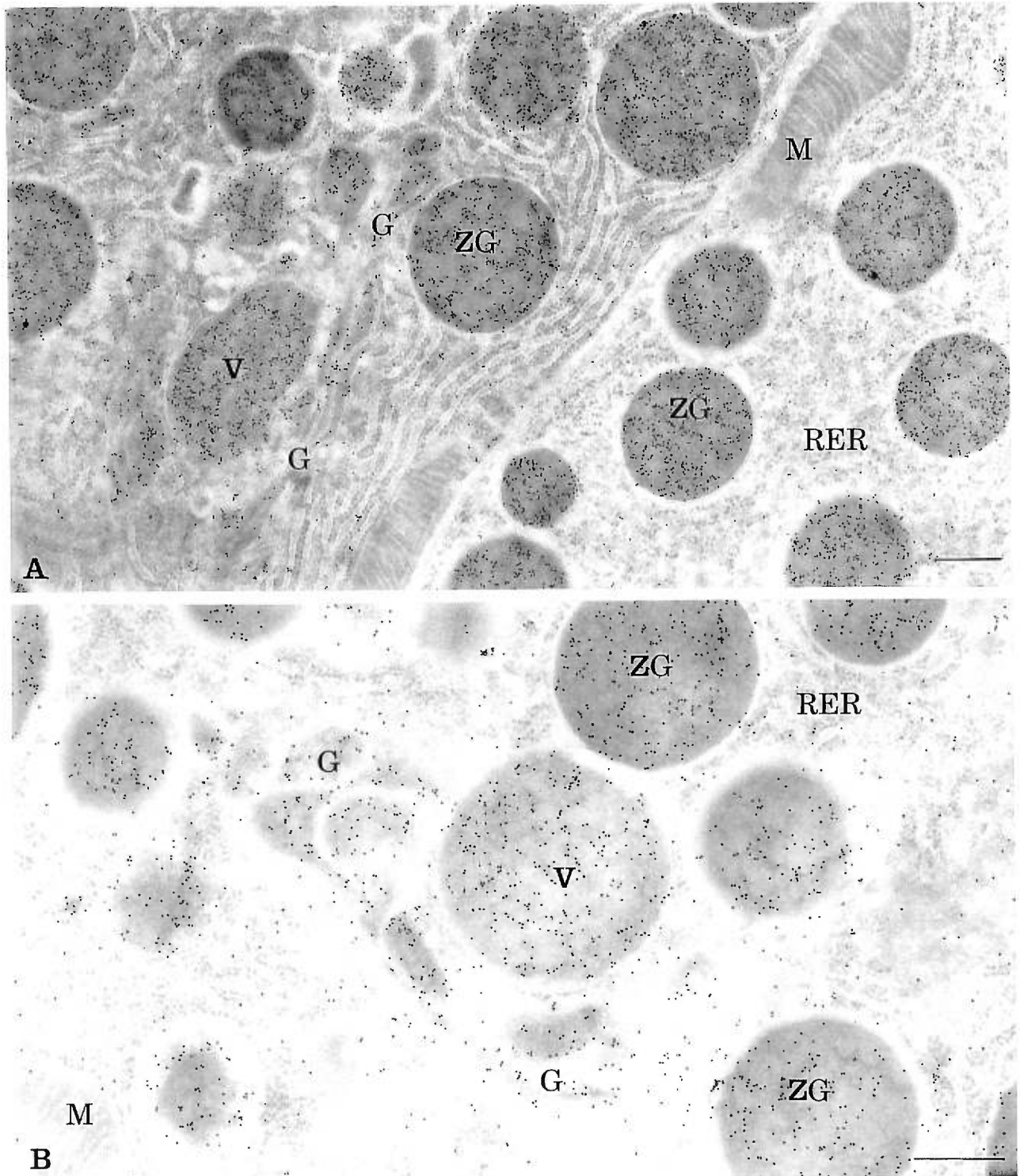


Figure 1 Thin section of rat pancreatic acinar cell labeled for amylase by the CARD technique using the tyramide-IgG (A) and the tyramide-BSA-gold (B) protocols. The amplified colloidal gold signal, revealing amylase antigenic sites, is present over the rough endoplasmic reticulum (RER), the Golgi apparatus (G), the condensing vacuoles (V), and the zymogen granules (ZG). Mitochondria (M) are almost devoid of labeling. Bars = 0.5 μ m.

fore, even in the absence of the secondary antibody, the protein A/G-gold was able to recognize the first antibody giving a low signal, similar to that obtained with the standard protein A-gold protocol (Table 2).

The resolution of the labeling after amplification was assessed by the study of a mitochondrial membrane-associated protein, carbamoyl phosphate synthetase. This enzyme was previously demonstrated to be closely associated with the inner mitochondrial membrane (Bendayan and Shore 1982). Figure 3

shows the labeling obtained after incubation with concentrated (Figure 3A) and diluted (Figure 3B) anti-CPS antibody using the tyramide-IgG protocol. The distances between the cristae membrane and the gold particles were measured (Figure 4), and the distribution of these measurements allowed a good assessment of the level of resolution. Figure 4 shows that for both the simple (protein A-gold) and the amplified technique, the majority of the labeling is indeed located within 10 nm of the membrane. Figure 4 also shows

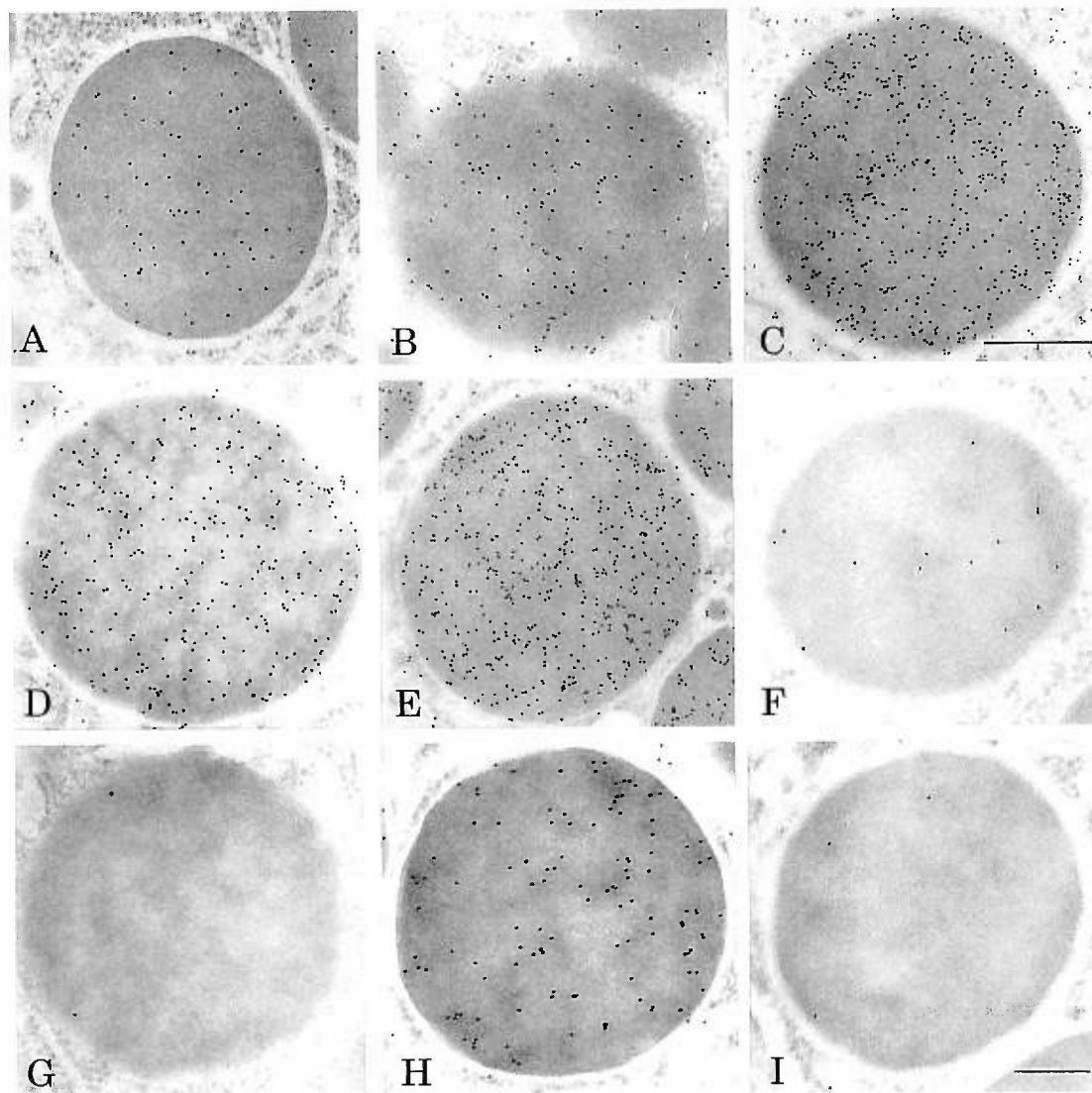


Figure 2 Zymogen granules labeled for amylase demonstrating the labeling obtained with simple (A) and amplified protocols (B-E). (A) The labeling obtained with the standard protein A-gold technique provides a positive control for comparison with the amplified protocols. Enhanced immunogold signals were obtained with the biotinyl-tyramide (B), the biotinyl-LC-LC-tyramide (C), the tyramide-BSA-gold (D), and the tyramide-IgG (E) protocols. (F-I) Results under control of specificity and of amplification. (F) Biotinyl-tyramide protocol; omission of the biotinyl-tyramide incubation. The signal is generated by the binding of streptavidin-gold to the biotinylated secondary antibody. (G) Tyramide-BSA-gold protocol; omission of H_2O_2 prevents deposition of the probe, leading to absence of labeling. (H) Tyramide-IgG protocol; omission of the anti-amylase primary antibody leads to absence of labeling. (I) Tyramide-IgG protocol; omission of the tyramide probe. The labeling is due to the binding of protein A/G-gold to the primary and secondary antibodies. A, C, D, E are at the same magnification. Bars: A, C-E = 0.5 μ m; B, F-I = 0.25 μ m.

Table 1 Density of labeling for amylase in pancreatic cells: amplification protocols^a

Protocols	Zymogen granules	Amplification factor ^b	Mitochondria
Protein A-gold	32.0 ± 0.5	1	3.0 ± 0.2
Biotinyl-tyramide	127.3 ± 3.5	4	9.4 ± 0.6
Tyramide-BSA-gold	219.0 ± 1.6	7	2.4 ± 0.6
Biotinyl-LC-LC-tyramide	390.0 ± 2.5	12	17.5 ± 2.8
Tyramide-IgG	414.8 ± 6.3	13	3.4 ± 0.7

^aGold particles/μm². Mean ± SEM.

^bDensity of labeling over the granules/density of labeling over the granules for the protein A-gold protocol.

that the average distance between the gold particles and the inner mitochondrial membrane is slightly higher for the amplified technique. The average distance between the gold particles and the membrane was found to be 8.7 nm for the simple protocol and 11.2 nm for the amplified protocol. This demonstrates that, in spite of the amplification, the resolution remains quite good.

Discussion

The CARD technique, first described by Bobrow et al. in 1989, was used to enhance the sensitivity of immunoassays and Western blots and to increase signal intensity (Bobrow et al. 1991). The CARD approach was then extended to immunocytochemistry at the light microscopic level (Adams 1992; Berghorn et al. 1994) and to *in situ* hybridization, in which it compared favorably to *in situ* PCR (Zehbe et al. 1997). Recently, the technique was broadened to immunoelectron microscopy (Mayer and Bendayan 1997; Schöfer et al. 1997). The technique uses HRP molecules introduced at specific antigenic sites to catalyze the accumulation of reporter-conjugated tyramine by a radical mechanism.

A number of different reporter-conjugated tyramines, useful in immunocytochemistry and *in situ* hybridization, have been described and are currently used (Plenat et al. 1997; van Gijlswijk et al. 1997;

Hopman et al. 1998). In the present study, new tyramide probes were constructed and tested to combine the CARD with the immunogold approach and to exploit the advantages displayed by the gold marker in an amplification protocol. The studies and the assessment of the new protocols were carried out on well-established systems, the ultrastructural localization of amylase in pancreatic acinar cells and its distribution along the secretory pathway. Using this system under conditions in which tissue preparation and primary antibody dilution were maintained constant allowed a good assessment of the efficiency of each of the new protocols. Successful enhancement of the labeling intensity was registered with all the tyramide probes tested, although differences were detected among them in terms of quality of the end results. The biotinyl-tyramide generated a signal higher than the standard protein A-gold but, probably because of steric hindrance between the biotinyl-tyramide and the streptavidin-gold, the level of amplification remained low. The biotinyl-LC-LC-tyramide probe was therefore constructed to overcome the problem of steric hindrance among reagents. Spacer arms, which are 30-Å hydrocarbon chains, were incorporated between the tyramine and the biotin molecules. The use of this biotinyl-LC-LC-tyramide in combination with the streptavidin-gold complex resulted in a density of labeling threefold higher than that generated by the biotinyl-tyramide probe and 12-fold higher than the standard protein A-gold. However, both biotinylated probes, the biotinyl-tyramide and the biotinyl-LC-LC-tyramide, gave relatively high background levels that appeared to be due to diffusion problems. Indeed, the background was higher over those mitochondria located close to cell compartments containing amylase, indicating that either during incubation or during the washing steps the biotinylated reagents tend to diffuse away from their sites of deposition. To decrease this background, the addition of dextran sulfate was required (van Gijlswijk et al. 1996). The effect was concentration-dependent. Increasing the concentration of dextran to 20% abolished the diffusion artifact and the back-

Table 2 Controls of the specificity of the immunolabeling and of the amplification protocols

Probes	Protein A-gold	Biotinyl-tyramide	Biotinyl-LC-LC-tyramide	Tyramide-BSA-gold	Tyramide-IgG
Normal protocols	+	++	++++	+++	++++
Control protocols					
Antigen adsorption ^a	-	-	-	-	-
Omission of 1st Ab ^a	-	-	-	-	-
Omission of 2nd Ab ^a	n.a.	-	-	-	+ ^c
Omission of H ₂ O ₂ ^b	n.a.	±	±	-	+
Omission of SA-HRP ^b	n.a.	+	+	-	+
Omission of tyramide ^b	n.a.	±	±	-	+

^aControl of specificity.

^bControl of amplification.

^cPositive result (without amplification) due to binding of the protein A-gold to the primary antibody.

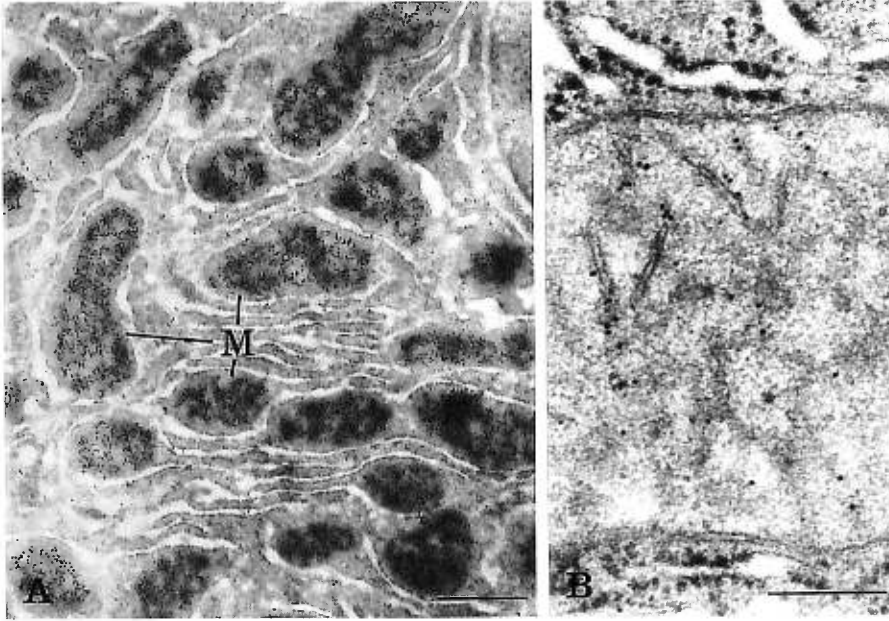


Figure 3 Thin section of rat liver tissue labeled for CPS by the tyramide-IgG protocol using a rather concentrated (A) and diluted (B) anti-CPS. The labeling by gold particles is present over mitochondria (M), particularly associated with the inner mitochondrial membrane. Bars: A = 1 μm ; B = 0.25 μm .

ground but also reduced the amplification. A concentration of 10% dextran sulfate was found to yield the best results, compromising between amplification and background. The overall intensity of the labeling was lower with the use of dextran but still yielded results with very good signal-to-noise ratio.

To overcome the problems displayed by the biotinylated tyramine probes, other tyramide conjugates were developed to enhance the sensitivity of the labeling and to reduce background staining. The tyramide-BSA-gold probe shortens the CARD amplification protocol, the colloidal gold marker being directly coupled to the enzyme's substrate. It is directly catalytically deposited at the specific antigenic site without the need for further steps to detect the reporter molecules. The use of such a probe generated intense labeling with very low background staining. On the other hand, the highest immunocytochemical signal amplification was obtained with the tyramide-IgG complex. When activated by the HRP, this probe led to the accumulation of immunoglobulin molecules at specific antigenic sites. The accumulated tyramide-IgG molecules are then detected by the protein A/G-gold complex, which reacts specifically with the Fc fragment of IgGs, leading to very intense and very convincing labeling. Moreover, mitochondria and nuclei were almost devoid of labeling, reflecting the high specificity of the results. In fact, the specificity of the results generated by all the protocols tested was assessed by a number of control experiments and confirmed the validity of both the antibody steps and the amplification protocols.

Concerning the resolution of the amplified signals, one could wonder if, because of the various steps in

the protocols, the distance between the gold label and the real antigenic site would increase significantly. To assess this, distances between gold particles and membrane antigenic sites were measured under labeling by the simple standard and the CARD-amplified protocols. Detection of a mitochondrial membrane-associated protein with the tyramide-IgG protocol has demonstrated that the amplified signal was still quite close to the membrane and that the resolution obtained with the tyramide-IgG probe, compared to the simple protein A-gold technique, remained very good.

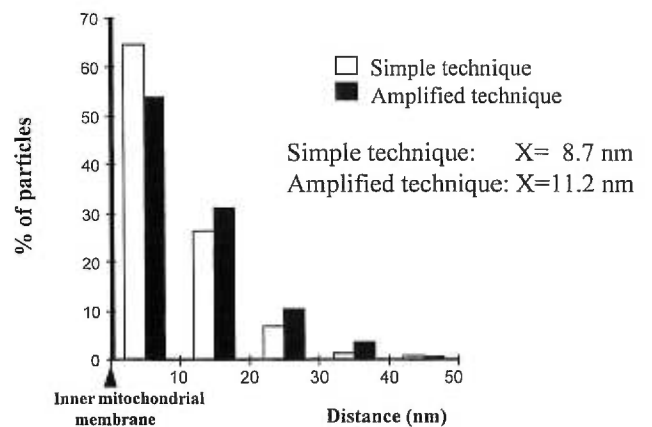


Figure 4 The evaluation of the resolution was assessed by measuring the distance between the gold particles and the closest membrane. Two labeling techniques were compared: the simple protein A-gold technique and the amplified tyramide-IgG technique. In general, the distance between the gold particles and the inner mitochondrial membrane appears slightly larger for the amplified technique.

The introduction of the gold marker by construction of various new tyramide conjugates and modification of the CARD technique have enabled us to take advantage of the properties of both protocols: the amplification of the signal on the one hand, useful for low labeling, and the resolution and possibilities of quantitation due to the particulate marker on the other hand. The end results have proved that this combination led to significant improvements in immunogold techniques.

Acknowledgments

Supported by grants from the Medical Research Council of Canada.

We thank Patricia Mayer from NEN Life Science Products (Boston, MA) for donating the Renaissance TSA indirect kit. We also thank Johanne Chaîney for secretarial assistance in the preparation of the manuscript and Jean Léveillé for the photographic work.

Literature Cited

- Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40:1457-1463
- Baschong W, Lucocq JM, Roth J (1985) "Thiocyanate gold": small (2-3 nm) colloidal gold for affinity cytochemical labeling in electron microscopy. *Histochemistry* 83:409-411
- Bendayan M (1984) Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications and limitations. *J Electron Microscop Tech* 1:243-270
- Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-163
- Bendayan M, Duhr MA (1986) Modification of the protein A-gold immunocytochemical technique for the enhancement of its efficiency. *J Histochem Cytochem* 34:569-575
- Bendayan M, Shore GC (1982) Immunocytochemical localization of mitochondrial proteins in the rat hepatocyte. *J Histochem Cytochem* 30:139-147
- Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE (1994) cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem* 42:1635-1642
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125:279-285
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1991) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* 137:103-112
- Hainfeld JF (1987) A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy. *Science* 263:450-453
- Hainfeld JF (1988) Gold cluster-labeled antibodies. *Nature* 333:281-282
- Hainfeld JF, Furuya FR (1992) A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J Histochem Cytochem* 40:177-184
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory
- Hopman AHN, Ramaekers FCS, Speel EJM (1998) Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem* 46:771-777
- Humbel BM, de Jong MDM, Müller WH, Verkleij AJ (1998) Pre-embedding immunolabeling for electron microscopy: an evaluation of permeabilization methods and markers. *Microsc Res Tech* 42:43-58
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A
- Kellenberger E, Carlemalm E, Villiger W, Roth J, Garavito M (1980) Low denaturation embedding for electron microscopy of thin section. Waldkraiburg, Chemische Werke Lowi GmbH, 1-59
- Kerstens HMJ, Poddighe PJ, Hanselaar AGJM (1995) A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* 43:347-352
- Mayer G, Bendayan M (1997) Biotinyl-tyramide: a novel approach for electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 45:1449-1454
- McLean IW, Nakane PK (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 22:1077-1083
- Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC (1995) ImmunoMax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab Invest* 73:149-156
- Plenat F, Picard E, Antunes L, Vignaud JM, Marie B, Chalabreysse P, Muhale F (1997) L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. *Ann Pathol* 17:17-23
- Raap AK, van de Corput MPC, Vervenne RAW, van Gijlswijk RPM, Tanke HJ, Wiegant J (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet* 4:529-534
- Roth J, Bendayan M, Carlemalm E, Villiger W, Garavito M (1981) The enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J Histochem Cytochem* 29:663-671
- Sano T, Hikino T, Niwa Y, Kashiwabara K, Oyama T, Fukuda T, Nakajima T (1998) In situ hybridization with biotinylated tyramide amplification: detection of human papillomavirus DNA in cervical neoplastic lesions. *Mod Pathol* 11:19-23
- Schöfer C, Weipoltshammer K, Almeder M, Wachtler F (1997) Signal amplification at the ultrastructural level using biotinylated tyramides and immunogold detection. *Histochem Cell Biol* 108:313-319
- Shindler KS, Roth KA (1996) Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J Histochem Cytochem* 44:1331-1335
- Slot JW, Geuze HJ (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 38:87-93
- Stirling JW, Graff PS (1995) Antigen unmasking for immunoelectron microscopy: labeling is improved by treating with sodium ethoxide or sodium metaperiodate, then heating on retrieval medium. *J Histochem Cytochem* 43:115-123
- van Gijlswijk RPM, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ (1996) Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J Histochem Cytochem* 44:389-392
- van Gijlswijk RPM, Zijlmans HJMAA, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45:375-382
- Wilson DF, Jiang DJ, Pierce AM, Wiebkin OW (1996) Antigen retrieval for electron microscopy using a microwave technique for epithelial and basal lamina antigens. *Appl Immunohistochem* 4:66-71
- Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R (1997) Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-nanogold, and silver acetate autoradiography. *Am J Pathol* 150:1553-1561

Introduction of a Novel HRP-Substrate-Nanogold Probe for Signal Amplification in
Immunocytochemistry

Gaétan Mayer, James F. Hainfeld^{§†}, Moïse Bendayan^{*}

^{*}Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec,
Canada, ^{§†}Department of Biology, Brook Haven National Lab., Upton, NY, [†]Nanoprobes
Inc., Stony Brook, NY.

Correspondence to Dr. M. Bendayan

Dept. of Pathology and Cell Biology

Université de Montréal

C.P. 6128 Succ. Centre Ville

Montreal, Quebec H3C 3J7

Canada.

Tel. 514-343-6289

Fax. 514-343-2459

E-mail moise.bendayan@umontreal.ca

Summary

Amplification of immunological signals with the catalyzed reporter deposition (CARD) allows improved detection of scarce tissue antigens in light and electron microscopy. The technique takes advantage of the oxidation ability of the horseradish peroxidase (HRP), in the presence of hydrogen peroxide, to yield the accumulation of one of its specific reporter-tagged substrates. This immunocytochemical approach continues to be improved by the introduction of new reporter molecules tagged to tyramine or to other HRP-substrates. In this study we introduced a novel HRP-substrate tagged to Nanogold particles. The amplification protocol is based on the application of a specific primary antibody, a biotinylated secondary antibody, streptavidin-HRP and an HRP-substrate coupled to Nanogold followed by silver intensification. In addition to amplify immunological signals of high resolution, the direct accumulation of Nanogold particles at target sites by enzymatic activity of HRP improves the efficiency of the technique as compared to other amplification protocols. Moreover, this approach combines the CARD amplification potentials to the ultrasmall gold probe and the silver intensification method. Immunolabelings obtained by light and electron microscopy, as well as immunodot assay using this new amplification strategy, appear to be highly sensitive, specific and of enhanced intensity.

Key words: CARD, Nanogold, immunocytochemistry, immunodot assay, silver enhancement

Introduction

The catalyzed reporter deposition approach (CARD) is now widely used in cell biology for membrane immunoassays, western blotting, in situ hybridization and immunocytochemistry (Bobrow et al.1989; Adams 1992; Wigle et al. 1993; Kerstens et al. 1995; Mayer and Bendayan 1997,1999; Schöfer et al. 1997; Humbel et al. 1998). A majority of studies has reported greater sensitivity with reduced background and enhancement of antigen detection between 8 and 10,000 fold depending on the level of resolution and the protocol used (Bobrow et al. 1991; Adams 1992; Merz et al.1995; Hunyady et al. 1996; Werner et al. 1996; Erber et al. 1997). The procedure is based on the action of the immunologically introduced HRP to catalyze the deposition of substrate-reporter molecules by a short half-life free radicals mechanism (Bobrow et al. 1989). This amplification procedure was recently adapted to electron microscopy to reveal intracellular antigens with high resolution by modifying the original protocol. New reporter molecules coupled to tyramine were introduced and allowed the sensitive detection of antigenic sites with the particulated colloidal gold marker (Mayer and Bendayan 1999).

To expand the possibilities of this approach we have now developed a novel probe, the HRP-substrate-Nanogold, which takes advantage of the small 1.4 nm Nanogold particles and of the silver enhancement protocol. Both the Nanogold and the silver enhancement contribute to higher labeling intensities. Small gold particles such as those of 1 to 5-nm colloidal gold and Nanogold are known to give higher labeling densities (Lackie et al. 1985; Ghitescu and Bendayan 1990; Dulhunty et al.

1993; Hainfeld and Furuya 1992) partly because of reduced steric hindrance and the overall ratio between immunoglobulin molecules and gold particles. Besides its small size, the Nanogold offers additional advantages such as its stable covalent link to proteins and its neutral isoelectric point that prevents interactions with negatively charged molecules on tissue sections. The silver intensification protocol also provides several advantages by improving levels of detection limit (Holgate et al. 1983) and generating high contrast, non-diffusible, permanent black stainings (Holgate et al. 1983; Taatjes et al. 1987). Hacker et al. (1997) and Zehbe et al. (1997) have already experienced the combination of the CARD technique with the streptavidin-Nanogold and the silver autometallography in in situ hybridization (ISH) experiments. They reported single-gene-copy sensitivity in detecting viral DNA and very high sensitivity for RNA ISH. They also suggested that CARD-Nanogold could have the potential to replace in situ polymerase chain reaction in many applications.

In this study, we used three different immunolabeling approaches, in light and electron microscopy, for the assessment of the amplification obtained with a novel HRP-substrate-Nanogold probe. The simple indirect streptavidin-Nanogold protocol was compared to the biotinyl-LC-LC-tyramide/streptavidin-Nanogold and to the HRP-substrate-Nanogold. The results obtained with the later approach appear superior in allowing the immunolocalization of low amounts antigen-antibody complexes. Moreover, the CARD-Nanogold amplification system was assessed on membrane immunoassay and proven to be quite sensitive.

Materials and Methods

Preparation of a novel HRP-substrate-Nanogold

A new HRP-substrate consisting of ligands other than tyramine was covalently coupled to a 1.4 nm Nanogold-type gold cluster according to previously described techniques (Hainfeld 1987). The reagent product was purified by size exclusion chromatography using an Amicon GH-25 matrix in aqueous buffer. The Nanogold peak was collected and rotary evaporated to dryness and resuspended in 20 % methanol. This prototype reagent was generated and provided by Nanoprobes (Stony Brook, NY).

Immunocytochemistry

For light microscopy immunocytochemistry, fragments of normal rat pancreas were fixed in Bouin's fixative and embedded in paraffin according to standard techniques. Five micron thick sections were mounted on glass slides, deparaffinized and rehydrated through decreasing concentrations of ethanol. After washing in 0.01 mol/l phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS), the sections were incubated with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in PBS for 10 min. to quench endogenous peroxidase activity. The sections were then briefly washed in PBS and incubated with the specific guinea pig anti-porcine insulin antibody (ICN, Costa Mesa, CA) diluted 1:200 or 1:10,000 in PBS for 2 h at room temperature. The tissues were washed twice

0.01M

for 5 min. in PBS and once for 5 min. in 0.15 mol/l NaCl, 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich Canada; Oakville, Ontario, Canada), 0.1 mol/l Tris-HCl buffer pH 7.5 (Tris-Tween buffer) before incubation in Tris-1% bovine serum albumin solution for 30 min. Then, the biotinylated goat anti-guinea-pig IgG antibody (GAG-B; Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA) diluted 1:500 in Tris pH 7.5 containing 0.5% bovine serum albumin (Tris-BSA) was applied to the sections for 1 h at room temperature. Following three washes of 5 min. each in Tris-Tween buffer, the tissue sections intended for the indirect simple labeling protocol were incubated with streptavidin-Nanogold (Nanoprobes) diluted 1:500 in Tris buffer for 30 min. The sections intended for the amplification protocol were incubated with streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP; NEN Life Science; Boston, MA) diluted 1:500 in Tris-BSA for 30 min., washed in Tris-Tween buffer for 15 min. and incubated with the HRP-substrate-Nanogold complex diluted 1:50 in 0.05 mol/l Tris-HCl pH 7.5 containing 0.03% H₂O₂ for 10 min. The sections processed for simple and amplified protocols were then washed for 15 min. in Tris-Tween buffer and rinsed several times in ultrapure water. Enhancement of the Nanogold was performed by incubating the slides in the LI Silver enhancement solution (Nanoprobes) for about 20 to 30 min. For each of the protocols, the gold-silver development was allowed to proceed until reaching an optimal signal; maximum specific reaction with low levels of background. Sections were then thoroughly rinsed with water for 5 min., mounted in PBS-50% glycerol without counterstaining and observed under a Leitz Orthoplan microscope (Leica Microsystems; Montreal, Quebec, Canada).

For the electron microscopy immunocytochemical study, small fragments of normal

rat pancreas were fixed by immersion with 0.1 mol/l phosphate buffered 1% glutaraldehyde for 2 h at room temperature, washed in the same buffer, dehydrated in methanol and embedded in Unicryl at -25C as described previously (Bendayan 1995). Thin sections were cut, mounted on Parlodion-carbon-coated nickel grids, incubated for 30 min. on a drop of 1% ovalbumin in PBS and transferred to a drop of the rabbit anti-human amylase antibody (Sigma-Aldrich) diluted 1:10 or 1:200 in PBS or the guinea-pig anti-insulin antibody diluted 1:200 or 1:10,000 for 2 h at room temperature or overnight at 4C. The grids were rinsed for 15 min with PBS and placed on a drop of the 1% ovalbumin solution for 15 min. The sections to be processed for simple indirect labeling were incubated with the Nanogold conjugated goat anti-rabbit IgG or with the Nanogold conjugated goat anti-guinea-pig IgG (Nanoprobes) diluted 1:100 in PBS for 30 min. at room temperature. The sections to be processed for the CARD amplification protocol were incubated with the biotinylated goat anti-rabbit IgG (GAR-B; Sigma-Aldrich) diluted 1:100 in PBS or with the biotinylated anti-guinea pig IgG antibody diluted 1:500 in PBS for 1 h, washed in the same buffer, incubated with streptavidin-HRP 1:500 for 30 min, washed twice in PBS and once in Tris and incubated with the HRP-substrate-Nanogold complex diluted 1:25 in 0.05 mol/l Tris-HCl pH 7.5 containing 0.03% H₂O₂ for 10 min. Following these incubations, the tissue sections were washed with PBS for the simple protocol and with Tris buffer for the amplified protocol. The grids were then thoroughly washed with ultrapure water, silver enhanced in the HQ Silver solution (Nanoprobes) for 4 min., washed again with water, air dried, and stained with uranyl acetate. Grids were examined with a 410 SL Philips electron microscope.

The biotinyl-long chain-long chain-tyramide (biotinyl-LC-LC-tyramide) protocol was also tested for its amplification property. For a fair comparison, streptavidin-Nanogold and silver enhancement were used as the detection step for the deposited biotin molecules. For the tyramide amplification protocol in electron microscopy we followed the previously described technique (Mayer and Bendayan, 1999). Briefly, the grids were incubated on drops of 2% BSA in PBS, transferred onto drops of the anti-amylase (1:200 in PBS) for overnight at 4C, washed, and incubated on a drop of GAR-B (1:100 in PBS) for 60 min. The sections were then washed, transferred to the BSA solution, incubated on a drop of streptavidin-HRP (1:500 in PBS) for 30 min., washed again and incubated with the biotinyl-LC-LC-tyramide probe diluted 1:50 in PBS containing 0.03% H₂O₂ for 10 min. After several washes, the accumulated biotin molecules were detected by a 30 min. incubation with the streptavidin-Nanogold (1:500 in PBS). The grids were then silver enhanced with the HQ Silver solution for 4 min., stained with uranyl acetate and examined in the electron microscope.

The specificity of the immunolabelings was assessed by several control experiments, including antigen adsorption, omission of the primary or secondary antibody, omission of the streptavidin-HRP reagent, or omission of the HRP-substrate-Nanogold.

Immunodot assay

Normal rabbit IgGs were obtained from Jackson ImmunoResearch (Bio/Can, Mississauga, Ontario, Canada) and serial dilutions in PBS were made from a starting concentration of 10 µg/ml down to 0.001 µg/ml. One microliter of each solution was spotted on a strip of nitrocellulose membrane (0.45µm) (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) and allowed to dry for 30 min. The membrane was then blocked with 5% BSA in PBS containing 0.05% Tween (PBST) for 60 min., incubated with the biotinylated anti-rabbit IgG diluted 1:500 with 1% BSA in PBST for 2 h at RT, and washed 15 min. with PBST buffer. The strip was incubated with streptavidin-HRP (1:500 in PBST containing 1% BSA) for 30 min. at RT, washed in PBST buffer for 15 min., rinsed in Tris and amplified using the HRP-substrate-Nanogold complex diluted 1:200 in 0.05 mol/l Tris-HCl pH 7.5 containing 0.03% H₂O₂ for 10 min. at RT. After washing with Tris-Tween buffer and deionized water, the nitrocellulose membrane was treated with the LI Silver enhancement solution for 30 min., washed in water and air dried. For control, the same protocol was followed with one exception corresponding to the omission of the incubation with the HRP-substrate-Nanogold.

Results

In our comparative study of the CARD-Nanogold amplification system by light and electron microscopy, we first applied the simple protocol making use of the Nanogold coupled to a species specific secondary antibody. Amylase antigenic sites in pancreatic acinar cells were revealed. In electron microscopy, this simple indirect labeling technique along with a rather diluted primary antibody, followed by silver enhancement, resulted in a particulate black signal over the different cellular compartments involved in protein secretion. Using the anti-amylase antibody diluted 1:200, a specific labeling, but of low intensity, was present over the rough endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, the condensing vacuoles, and the secretory granules (Figure 1A). For the amplification protocols, keeping with the same antibody dilution, the biotinyl-long chain-long chain-tyramide probe combined to the streptavidin-Nanogold reagent and silver enhancement led to higher intensities of labeling over structures containing amylase. However, some background staining was obtained over nuclei and mitochondria (not shown). To improve the results, a novel signal amplification protocol was developed using a new probe, the HRP-substrate-Nanogold. This HRP-substrate-Nanogold protocol consists in the direct and specific deposition of Nanogold upon its reaction with peroxidase. Immunolocalization of amylase in the acinar cells using this novel approach led to significant increases of the signal when compared to that obtained with the simple approach. Electron dense particulate deposits in high number were present over cellular compartments containing amylase (Figure 1B). This labeling was associated

to low background stainings over nuclei and mitochondria. Moreover, application of this protocol with a more concentrated primary antibody led to very high labeling intensities detectable at low magnification and allowing a general overview of the labeled tissue (Figure 1C). Indeed, in spite of no counterstaining, the silver intensified reaction product permitted the clear outlining of the labeled structures. The dark labeling present over the RER, the cisterna of the Golgi apparatus, the condensing vacuoles and the secretory granules made possible such high definition of amylase secreting cells and organelles at low magnification (Figure 1C). In addition, nuclei and mitochondria showed very little labeling demonstrating the overall high specificity of the reaction.

By light microscopy, immunodetection of insulin antigenic sites in rat pancreatic islet cells revealed a strong positive signal, when the primary antibody was used at 1:200 dilution, with both the simple (streptavidin-Nanogold) and the amplified (HRP-substrate-Nanogold) immunolabeling techniques (Figure 2A and 2C). The staining appeared as a black precipitate localized over the major part of the islets of Langerhans, contrasting with the surrounding acinar cells devoid of labeling. Differences between the simple and the amplified techniques were more apparent when the primary antibody against insulin was used at much higher dilutions. The use of the anti-insulin antibody at 1:10,000 dilution, in combination with the simple indirect labeling technique (streptavidin-Nanogold) and silver enhancement, resulted in an absence of staining over the pancreatic islets (Figure 2B). In contrast, the same highly diluted antibody in combination with the HRP-substrate-Nanogold was able to generate a positive specific result. A black staining was recorded over the insulin

secreting cells of the pancreatic islets with no background over the exocrine parenchyma (Figure 2D). Furthermore, the same protocol at the electron microscope level supported those results (Figure 3A and 3B). Indeed, with the primary antibody diluted at 1:200, a very intense labeling, revealed by the silver enhanced gold particulate marker, was obtained over the dense core of the insulin secretory granules with almost no diffusion of the reaction product into the halo of the granules (Figure 3A). Moreover, a similar positive labeling was also obtained with the anti-insulin diluted 1:10,000 (Figure 3B).

The specificity of the labelings obtained with both the simple and the amplified techniques, in light and electron microscopy, was confirmed by the control experiments. The addition of the corresponding antigens to the antibodies or the omission of the primary antibody abolished the labelings. Other control experiments such as omission of the biotinylated secondary antibodies or omission of the streptavidin-HRP reagent also led to absence of labeling (Figure 4A). However, protocols in which the HRP-substrate-nanogold reagent was omitted but otherwise completed with the streptavidin-HRP step and the silver intensification procedure gave a positive signal of low intensity (Figure 4B).

Determination of the sensitivity of the CARD-Nanogold amplification method was evaluated by an immunodot assay with known concentrations of protein. Silver deposits which revealed the proteins bound on the nitrocellulose membrane were still detectable at protein concentrations of 0.005 and 0.001 $\mu\text{g/ml}$. Since only one microliter of these dilutions was spotted on the membrane, the positive reactions

show that an amount of protein between 5 and 1 pg can be detected with this amplification technique (Figure 5). However, as with the control experiment involving omission of the HRP-substrate-Nanogold reagent in immunoelectron microscopy (Figure 4B), the silver intensification procedure was able to reveal the HRP molecules on immunodots (not shown). Nevertheless, the sensitivity of the reaction was much lower than with the amplification procedure.

Discussion

Back in the early 1990's the CARD technique was essentially based on the deposition of reporter molecules such as biotin and FITC through the reaction of HRP on its substrate tyramide. It has since been extended to various other reporter molecules (Plenat et al. 1997; van Gijlswijk et al. 1997; Hopman et al. 1998; Mayer and Bendayan 1999). Tyramine is a phenolic compound bearing a free hydroxyl group that reacts with HRP and a free amino group that can act as a linking end with reporter molecules. The reaction proceeds through intermediate free radicals. In presence of hydrogen peroxide, HRP catalyzes the oxidation of the phenol moiety of the tyramide that forms a highly reactive radical. The reporter tagged activated tyramine binds rapidly and covalently to electron-rich amino acids of proteins in the immediate vicinity of the immobilized HRP (Gross and Sizer 1959; Bobrow et al. 1992). This system was first applied by electron microscopy where application to post-embedding immunocytochemistry led to the deposition of a dense filamentous reaction product over specific labeled structures (Mayer and Bendayan 1997). Subsequent improvements of the technique yield amplified labelings revealed by colloidal gold particles (Mayer and Bendayan 1999). Up to now no other hydrogen-donating substrates of HRP were used with the CARD approach. As a matter of fact the technique can also be applied with other enzyme/substrate systems to enhance immunological signals. Bobrow et al. (1989,1992) reported successful amplifications with other enzymatic systems such as the β -galactosidase/biotinyl-coumarin-galactose. Catalytic deposition of the novel HRP-substrate used in the present study

presumably follows the same free radical mechanism as tyramide. Moreover it has been coupled to Nanogold particles, easily visualized after silver enhancement, which eliminates additional detection steps and provides the technique with several advantages.

The present work demonstrates that the CARD-Nanogold system can be employed successfully as a highly sensitive, high resolution immunoenzymatic technique for light and electron microscopy. The approach requires five successive incubation steps with: 1) the specific primary antibody; 2) the corresponding biotinylated secondary antibody; 3) the streptavidin-HRP; 4) the HRP-substrate-Nanogold complex; and finally 5) the silver enhancement. The results obtained with the amplification protocol, at the electron microscope level, uphold the fact that accumulation of labeled substrate allows for a single antigen-antibody complex to be revealed by multiple reporter molecules (Bobrow 1989). The anti-amylase antibody was used at a dilution of 1:200 with both the simple and the amplified protocols. At this dilution, the antibody can only bind to a definite amount of antigen molecules, according to its binding affinity. When compared to the simple labeling protocol, the CARD-Nanogold amplification system yields much higher labeling intensities, demonstrating greater efficiency in the detection for an equal number of antigen-antibody complexes. By light microscopy, this increase in detection efficiency was reflected by shorter silver enhancement times providing signals as intense or even of higher intensities than those obtained with the simple approach. The enhanced staining intensity and the reduced time in silver development is most likely due to an increase in the number of Nanogold particles that facilitates conglomeration of silver

deposits and therefore enhances staining by light microscopy (Lackie et al. 1985).

On the other hand, we have also demonstrated an increase in the detection limit of antigens with the use of the HRP-substrate-Nanogold probe. For this purpose, a highly diluted antibody against insulin was used to simulate conditions in which antigen-antibody complexes are present in very low amounts. Indeed, the incubation of pancreatic tissue with the anti-insulin antibody diluted 1:10,000 combined with the simple indirect protocol resulted in an absence of signal. In contrast, the amplification protocol yield specific positive stainings by light as well as electron microscopy making possible the detection of the signal generated by only few antigen-antibody complexes.

The amplification capabilities of the CARD approach combined to the small Nanogold probe, the silver enhancement and a rather concentrated antibody (anti-amylase 1:10; Figure 1C) yield a very strong labeling over the pancreatic cells. Owing to this very intense signal, labeled cellular compartments were able to be detected at low magnification in electron microscopy without any counterstaining. This protocol, used with moderately concentrated antibodies could be very useful for the screening of immunostained tissue sections or even for labeled subcellular structures. Observations were further facilitated by the very low background found over nuclei and mitochondria. In what concerns the specificity of the results, this was confirmed by the control experiments. However, staining of low intensity was observed with the control protocol involving the omission of the HRP-substrate-Nanogold either by immunoelectron microscopy or by immunodot. One explanation for this low signal, which indeed appeared specific, could be the silver intensification

of the hemic iron atom present in the peroxidase molecule. In this case the metallic atoms may have been transformed into iron sulphides or selenides since, with only few exceptions, endogenous or exogenous metals in tissues must be present under these forms to be able to react with the silver developer (Danscher 1981; 1982; 1983). An alternative would be the direct silver amplification of the streptavidin-HRP, without transformation, due to a favorable chemical or spatial condition of the iron in complex molecules. Either ways, staining under this control condition was only observed upon incubation with streptavidin-HRP and the low signal seemed to be specifically located at target antigenic sites. Moreover, addition of an unrelated Nanogold compound did not modify nor increase the staining. As for immunoelectron microscopy, in immunodot the sensitivity of this labeling was found to be much lower than with the complete amplification protocol.

Sensitivity of the CARD-Nanogold amplification method was assessed with an immunodot assay with known concentrations of protein. Serial dilutions of normal rabbit IgG spotted on membrane down to 1 pg of proteins were revealed. This result demonstrates a detection limit comparable to ELISAs, enhanced luminol luminescence and to the one cycle amplification with biotiny-tyramide and the two cycle amplification with fluorescein-tyramide visualized with the streptavidin-HRP-DAB system used by Bobrow et al. (1991). Furthermore, our amplification method displays several advantages over other detection systems: the elimination of the carcinogenic DAB reagent, the rapid one step silver intensification after deposition of Nanogold, the application to electron microscopy and the detection by particulate

markers offering good ultrastructural resolution.

The major drawback of the CARD-Nanogold technique relates to the silver enhancement step in its use by transmission electron microscopy. The homogenous 1.4-nm gold particles are difficult to visualize as such and silver intensification is essential to increase their size. However, the silver enhancement process leads to an heterogeneity in the size of gold-silver particles which hampers quantification of immunolabeling. The disparity in particle size may arise from the local gold label density that affects the percentage of enlarged particles and the final particle size. Also, large particles might result from fusion of small ones making quantification of immunolabeling density problematic and leading to underestimations (Stierhof et al. 1991; Takizawa and Robinson 1994; Humbel et al. 1995; Robinson et al. 1998). Therefore comparison between different amplification protocols becomes difficult and a silver enhancement technique that could yield more uniform enhanced particles is still needed for reliable quantitative evaluation and multiple labeling experiments.

The new HRP-substrate-Nanogold probe, used as an amplification/detection step in our CARD protocol, leads to high sensitivity immunolabelings. Moreover it pushed back the detection limit afforded by the simple indirect Nanogold protocol. The combination of three amplification methods, i.e. the CARD protocol, the use of the small Nanogold probe and the silver intensification technique, has provided improved, very sensitive and intense immunolabelings both by light and electron microscopy.

Aknowlegments

Reasearch supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the U.S. National Institutes of Health.

We thank Dr. Frederic R. Furuya of Nanoprobes for his implication in the preparation of the HRP-substrate-nanogold.

We also thank Mr. Jean Léveillé for photographic work.

G.M. is recipient of a studentship award from the Medical Research Council of Canada.

Litterature cited

- Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40:1457-1463
- Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-163
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125:279-285
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1991) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* 137:103-112
- Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J (1992) The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods* 150:145-149
- Danscher G (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71:1-16
- Danscher G (1982) Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry* 76:281-293
- Danscher G (1983) A silver method for counterstaining plastic embeded tissue. *Stain Technology* 58:365-372

- Dulhunty AF, Junankar PA, Stanhope C (1993) Immunogold labeling of calcium ATPase in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle: use of 1-nm, 5-nm, and 10-nm gold. *J Histochem Cytochem* 41:1459-1466
- Erber WN, Willis JI, Hoffman GJ (1997) An enhanced immunocytochemical method for staining bone marrow trephine sections. *J Clin Pathol* 50:389-393
- Ghitescu L, Bendayan M (1990) Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 38:1523-1530
- Gross AJ, Sizer IW (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem* 234:1611-1614
- Hacker GW, Hauser-Kronberger C, Zehbe I, Su H, Schiechl A, Dietze O, Tubbs R (1997) In situ localization of DNA and RNA sequences: super-sensitive in situ hybridization using streptavidin-Nanogold-silver staining: minireview, protocols and possible applications. *Cell Vision* 4:54-65
- Hainfeld JF (1987) A small gold-conjugate antibody label: improved resolution for electron microscopy. *Science* 263:450-453
- Hainfeld JF, Furuya FR (1992) A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J Histochem Cytochem* 40:177-184
- Holgate CS, Jackson P, Cowen PN, Bird CC (1983) Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem* 31:938-944

- Hopman AHN, Ramaekers FCS, Speel EJM (1998) Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem* 46:771-777
- Humbel BM, Sibon OCM, Stierhof YD, Schwarz H (1995) Ultra-small gold particles and silver enhancement as a detection system in immunolabeling and in situ hybridization experiments. *J Histochem Cytochem* 43:735-737
- Humbel BM, de Jong MDM, Müller WH, Verkleij AJ (1998) Pre-embedding immunolabeling for electron microscopy: An evaluation of permeabilization methods and markers. *Microsc Res Tech* 42:43-58
- Hunyady B, Krempels K, Harta G, Mezey E (1996) Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* 44:1353-1362
- Kerstens HMJ, Poddighe PJ, Hanselaar AGJM (1995) A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* 43:347-352
- Lackie PM, Hennessy RJ, Hacker GW, Polak JM (1985) Investigation of immunogold-silver staining by electron microscopy. *Histochemistry* 83:545-550
- Mayer G, Bendayan M (1997) Biotinyl-tyramide: A novel approach for electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 45:1449-1454
- Mayer G, Bendayan M (1999) Immunogold signal amplification: application of the CARD approach to electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 47:421-430

- Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC (1995) ImmunoMax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab Invest* 73:149-156
- Plenat F, Picard E, Antunes L, Vignaud JM, Marie B, Chalabreysse P, Muhale F (1997) L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. *Ann Pathol* 17:17-23
- Robinson JM, Takizawa T, Vandré DD, Burry RW (1998) Ultrasmall immunogold particles: important probes for immunocytochemistry. *Microsc Res Tech* 42:13-23
- Schöfer C, Weipoltshammer K, Almeder M, Wachtler F (1997) Signal amplification at the ultrastructural level using biotinylated tyramides and immunogold detection. *Histochem Cell Biol* 108:313-319
- Stierhof YD, Humbel BM, Schwarz H (1991) Suitability of different silver enhancement methods applied to 1 nm colloidal gold particles: an immunoelectron microscopic study. *J Electron Microscop Tech* 17:336-343
- Taatjes DJ, Schaub U, Roth J (1987) Light microscopical detection of antigens and lectin binding sites with gold labeled reagents on semithin Lowicryl K4M sections: usefulness of the photochemical silver reaction for signal amplification. *Histochem J* 19:235-245
- Takizawa T, Robinson JM (1994) Use of 1.4-nm immunogold particles for immunocytochemistry on ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* 42:1615-1623

- van Gijlswijk RPM, Zijlmans HJMAA, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 45:375-382
- Werner M, von Wasielewski R, Komminoth P (1996) Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* 105:253-260
- Wigle DA, Radakovic NN, Venance SL, Pang SC (1993) Enhanced chemiluminescence with catalyzed reporter deposition for increasing the sensitivity of Western blotting. *Biotechniques* 14:562-563
- Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R (1997) Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold, and silver acetate autometallography. *Am J Pathol* 150:1553-1561

Legend to figures

Figure 1 Localization of amylase in rat pancreatic acinar cells by electron microscopy.

(A) Simple indirect labeling technique: anti-amylase (1:200), anti-rabbit-IgG-Nanogold followed by silver enhancement.

(B) HRP-substrate-Nanogold amplification protocol: anti-amylase (1:200), biotinylated anti-rabbit IgG, streptavidin-HRP, HRP-substrate-Nanogold followed by silver enhancement.

(C) HRP-substrate-Nanogold amplification protocol combined with the anti-amylase antibody diluted 1:10. No counterstaining with uranyl acetate.

In all cases, the particulate black signal is present over the rough endoplasmic reticulum (RER), the Golgi apparatus (G), the condensing vacuoles (V) and the zymogen granules (ZG). Mitochondria (M) and nuclei (N) are almost devoid of labeling. Compared to the simple protocol (A) the amplified one (B) yield much higher intensities of labeling. Low magnification micrograph (C) of three amylase containing cells (separated by dotted lines) demonstrates very high labeling intensities over the cellular structures. With such intense signal, the different cellular compartments containing amylase are easily recognized at low magnification even without counterstaining.

Bars = 0.5 μ m.

Figure 2 Localization of insulin on serial sections of rat pancreatic tissue at the

light microscope level.

(A) Simple indirect labeling technique using the anti-insulin (1:200), Nanogold conjugated anti-guinea pig IgG followed by the silver intensification. A strong positive black labeling is present over the islet of Langerhans (I).

(B) Same simple indirect labeling protocol using the anti-insulin (1:10,000). Absence of staining over the islet.

(C) Amplification protocol using the anti-insulin (1:200), the biotinylated anti-guinea pig IgG, streptavidin-HRP and HRP-substrate-Nanogold followed by silver enhancement. This generates an intense staining over the pancreatic islet.

(D) Same amplification protocol used with highly diluted anti-insulin 1:10,000 also reveals a positive specific staining of the islet cells, demonstrating an increase in the detection limit of the antigen-antibody complexes.

Bars = 10 μm .

Figure 3 Localization of insulin in rat pancreatic B-cell at the electron microscope level.

(A) The anti-insulin antibody (1:200) combined with the HRP-substrate-Nanogold amplification approach resulted in very intense labeling over the insulin-containing secretory granules.

(B) Similar labeling of the granules was obtained with the antibody diluted 1:10,000 combined to the HRP-substrate-Nanogold.

Bars = 0.25 μm .

Figure 4 Control experiments.

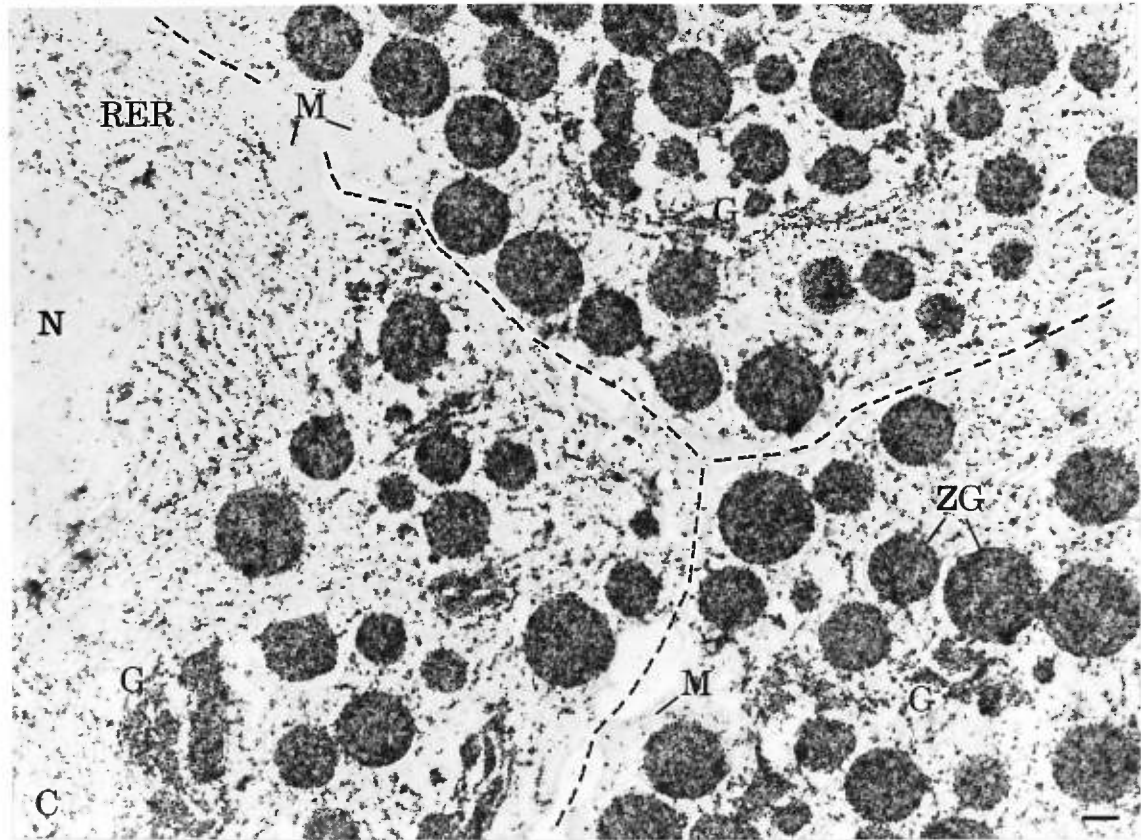
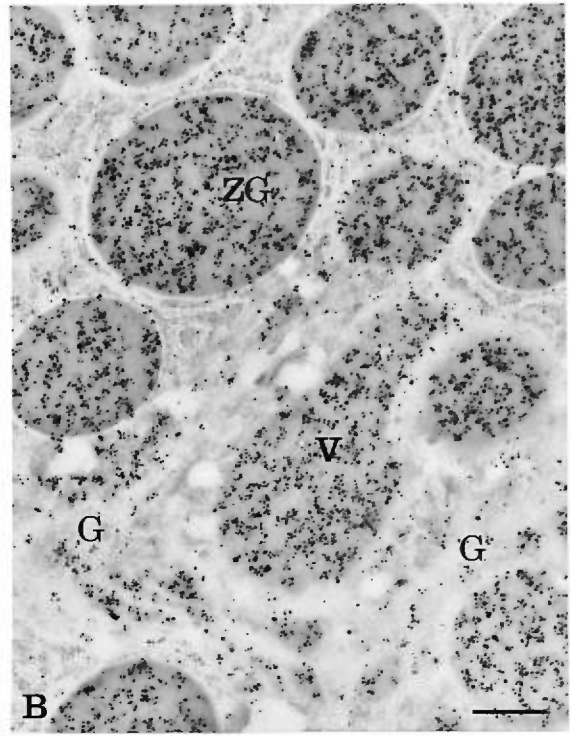
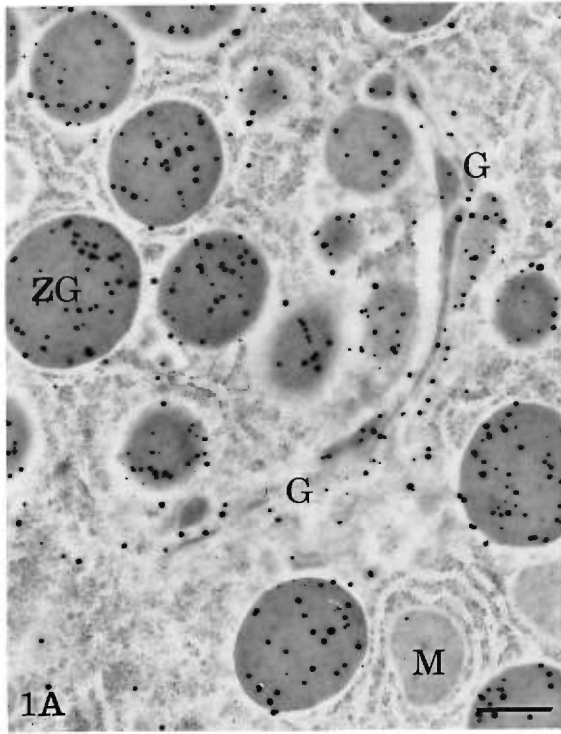
(A) Omission of the streptavidin-HRP. The section of pancreas was incubated with anti-amylase 1:200, biotinylated anti-rabbit IgG, HRP-substrate-Nanogold followed by silver enhancement. Almost no labeling was found over the rough endoplasmic reticulum (RER), the Golgi apparatus (G) and the zymogen granules (ZG). Mitochondria (M) and nuclei were also devoid of labeling.

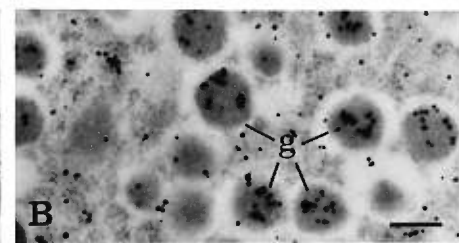
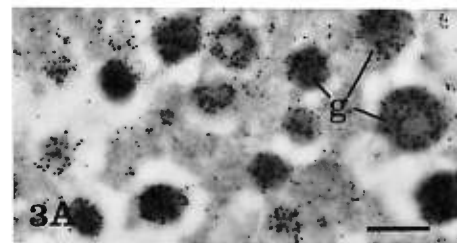
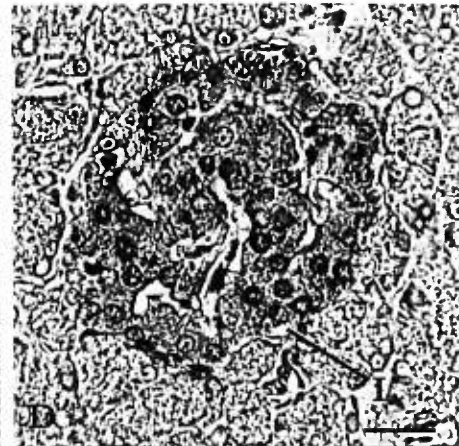
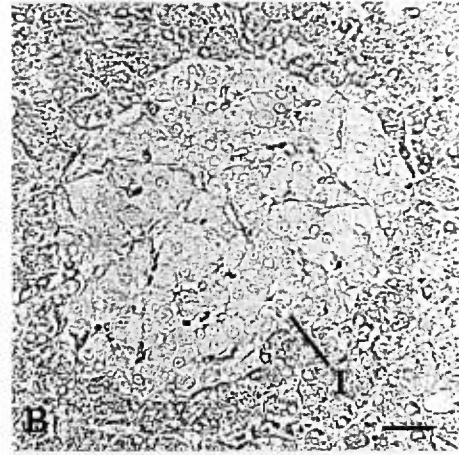
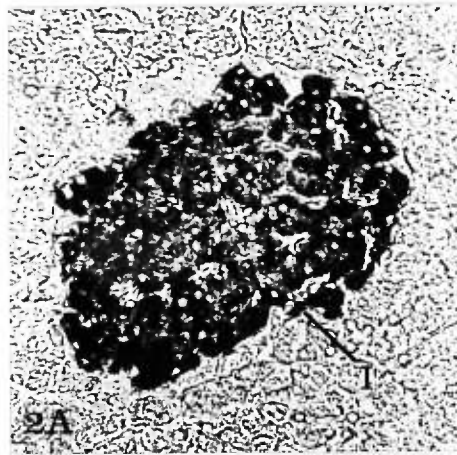
(B) Omission of the HRP-substrate-Nanogold. Incubation with anti-amylase (1:200), biotinylated rabbit anti-IgG, streptavidin-HRP followed by silver enhancement resulted in a labeling of very low intensity over specific structures such as the Golgi apparatus (G) and the zymogen granules (ZG).

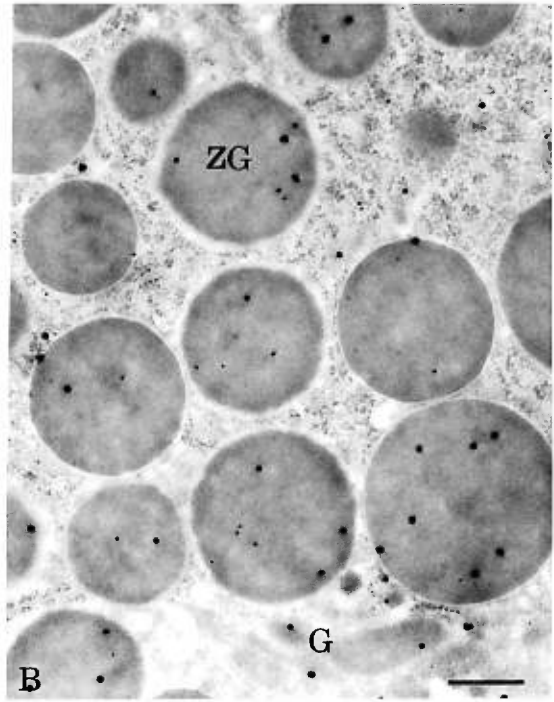
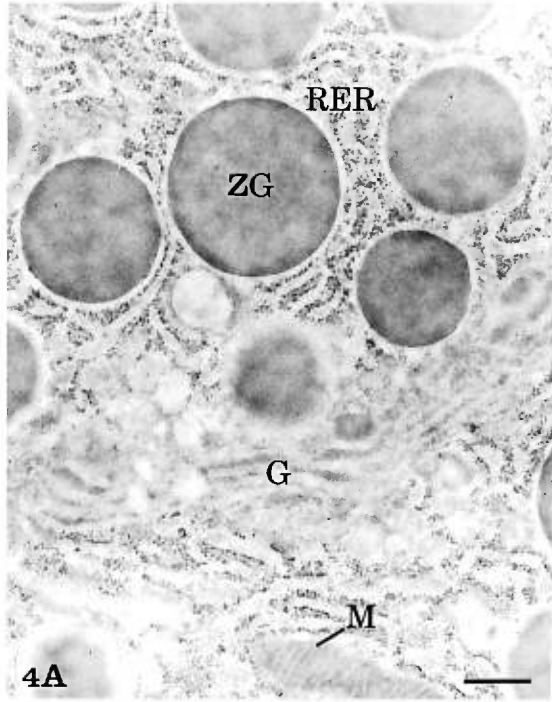
Bars = 0.5 μm

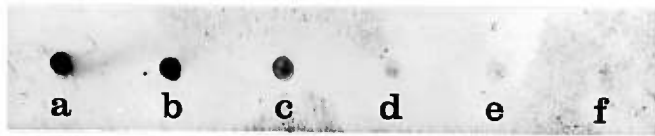
Figure 5 Immunodot assay.

One μl of serial dilutions of rabbit IgGs starting at 10 $\mu\text{g/ml}$ (10 ng of proteins) was spotted on nitrocellulose membrane. The HRP-substrate-Nanogold amplification protocol generated a positive signal down to the lowest concentration of IgGs applied to the nitrocellulose strip (0.001 $\mu\text{g/ml}$ or 1 pg of proteins). a: 10 $\mu\text{g/ml}$; b: 1 $\mu\text{g/ml}$; c: 0.1 $\mu\text{g/ml}$; d: 0.01 $\mu\text{g/ml}$; e: 0.005 $\mu\text{g/ml}$; f: 0.001 $\mu\text{g/ml}$.









3. DISCUSSION

En cytochimie ultrastructurale, les deux méthodes les plus utilisées pour la détection d'antigènes tissulaires sont les techniques immunoenzymatiques et les techniques d'immunocytochimie à l'or colloïdal. Les méthodes enzymatiques offrent une bonne sensibilité mais donnent une faible résolution due aux larges précipités et à la diffusion qui peuvent cacher la structure du site antigénique. Les méthodes d'immuno-or colloïdal offrent, elles aussi, une bonne sensibilité de détection. Mais en plus, les sondes d'or colloïdal permettent la localisation des antigènes avec une très haute résolution, l'évaluation précise de la distribution du marquage ainsi que la quantification des résultats. À cause de ces propriétés cette dernière approche est devenue la méthode la plus utilisée en morphologie moléculaire.

Les progrès très rapides de la biologie moléculaire et cellulaire et la découverte incessante de nouvelles protéines accentuent les besoins de recourir à des techniques immunocytochimiques ultrasensibles afin de détecter des quantités infimes d'antigène.

Au début des années 1990, une nouvelle approche a été développée pour amplifier les réactions immuno-chimiques. C'est la technique d'amplification CARD basée sur la capacité de l'HRP à catalyser la condensation oxydative de composés phénoliques couplés à des indicateurs par un mécanisme radicalaire. La très courte

demi-vie des intermédiaires tyramides activés cause leur attachement covalent aux acides aminés aromatiques riches en électron (tyrosines, tryptophanes phénylalanines) des protéines entourant immédiatement l'HRP. Ceci entraîne donc la déposition d'un grand nombre d'indicateurs aux sites de la réaction enzymatique et mène à une bonne résolution. La méthode a été utilisée dès le début pour augmenter la sensibilité des dosages immunoenzymatiques et des Western blots (Bobrow et coll., 1989,1991). Elle a ensuite été appliquée en cytochimie par microscopie optique conventionnelle, incluant l'immunofluorescence et l'hybridation *in situ* (Adams, 1992; Berghorn et coll., 1994; de Haas et coll., 1996; van Gijlswijk et coll., 1996,1997; Macechko et coll., 1997; Zehbe et coll., 1997; Sano et coll., 1998).

Au cours de cette étude nous avons appliqué en premier lieu la méthode de biotinylation-tyramide, développée par Bobrow, pour la localisation ultrastructurale, en post-enrobage, d'antigènes en microscopie électronique (Mayer et Bendayan, 1997). Nous avons ensuite modifié ce système d'amplification pour l'associer à l'or colloïdal (Mayer et Bendayan, 1999). Pour augmenter les performances de la technique CARD combinée à l'immuno-or nous avons ensuite développé de nouvelles sondes. Les nouveaux complexes indicateur-substrat de l'HRP, biotinylation-LC-LC-tyramide, tyramide-IgG, tyramide-albumine-or et substrat-Nanogold ont été construits et introduits dans les protocoles de marquages d'immuno-or pour associer les avantages de l'approche CARD à ceux du marqueur à l'or colloïdal ou à ceux des marqueurs d'or ultrapetits (Mayer et Bendayan, 1999; Mayer et Coll., en préparation).

La technique indirecte *labeled avidin-biotin* (LAB) a été appliquée à tous les protocoles que nous avons employés pour élaborer les techniques d'amplification. Les différences entre les protocoles résident dans l'étape d'amplification enzymatique proprement dite. Nous avons employé les systèmes: HRP/biotinyl-tyramide avec ou sans détection subséquente à la streptavidine-or, HRP/biotinyl-LC-LC-tyramide et streptavidine-or, HRP/tyramide-albumine-or, HRP/tyramide-IgG détecté par la protéine A-or et HRP/substrat de l'HRP-Nanogold amplifié à l'argent.

3.1 PROTOCOLE DE BIOTINYL-TYRAMIDE

Lors de nos premiers essais d'amplification du marquage nous avons utilisé la technique indirecte LAB suivie par l'amplification des signaux générés par le système HRP/biotinyl-tyramide. La procédure fait appel à la streptavidine-HRP, liée aux complexes anticorps secondaires biotinylés-anticorps primaires-antigènes, pour catalyser la déposition de biotinyl-tyramide (Figure 10). L'application d'anticorps primaires spécifiques combinés à la technique CARD a été effectuée sur des coupes minces de tissus préparés pour la microscopie électronique. Ce protocole a mené à la déposition spécifique d'un matériel filamenteux dense sur les structures connues pour contenir les différents antigènes. Le marquage s'est avéré être d'assez forte intensité en plus de générer une bonne résolution parce que confiné aux compartiments cellulaires spécifiques. De plus, le dépôt filamenteux recouvrant les structures ne masque pas leurs propriétés morphologiques comme l'aurait probablement fait un

autre produit de réaction enzymatique.

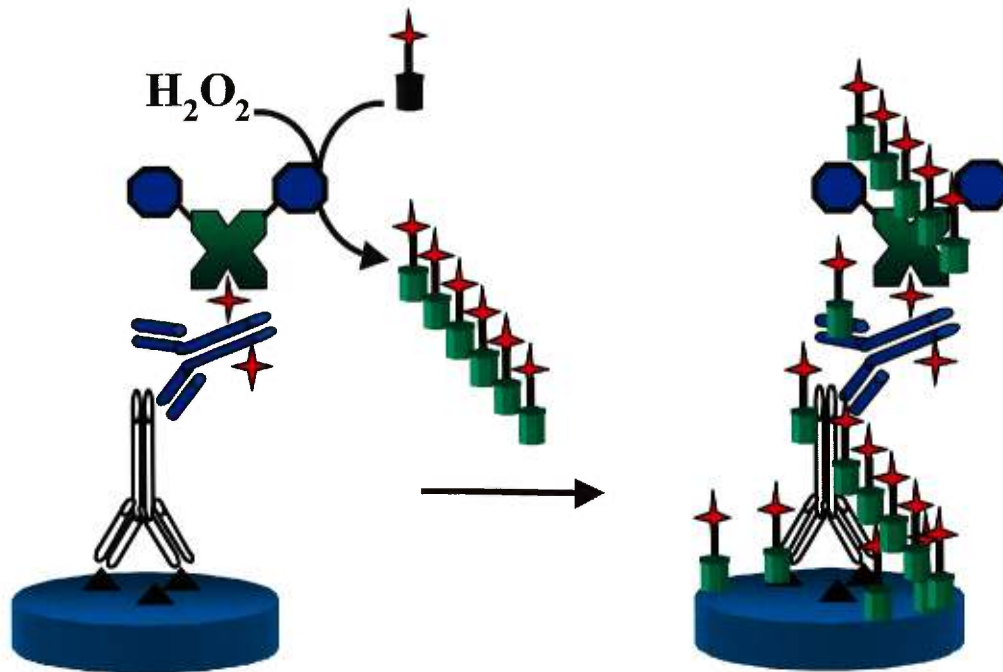


Figure 10. Principe du protocole de biotiny-tyramide sans détection subséquente avec la streptavidine-or. Lors de certaines conditions favorables, ce protocole génère un produit de réaction filamenteux dense aux sites antigéniques spécifiques.

Le type de marquage que nous avons obtenu avec la technique CARD est nouveau en microscopie électronique. La déposition de filaments denses peut être utilisée comme une technique alternative pour la détection d'un seul type d'antigène ou en combinaison avec d'autres techniques pour la détection simultanée de plusieurs antigènes différents.

L'HRP a donc catalysé la déposition de tyramide à la surface des coupes de tissus, donnant lieu à des filaments électron-denses logés aux sites spécifiques des complexes antigène-anticorps. Les réactions biochimiques prenant place lors de l'oxydation de la tyramine par l'HRP ont été étudiées *in vitro* (Gross et Sizer, 1959). Les auteurs ont rapporté la génération de pigments bruns visibles dans des tubes à essais. L'analyse de ces pigments a montré qu'ils contenaient des molécules de dityramine, d'autres dérivés plus oxydés et des polymères de tyramine (Gross et Sizer, 1959). Il reste à confirmer si ces dérivés polymériques correspondent au produit de réaction filamenteux dense que nous avons obtenu en microscopie électronique. Nous croyons que les facteurs possiblement impliqués dans la formation des filaments en immunocytochimie sont, entre autres, les procédures de fabrication de la sonde, le pH et la concentration de la tyramide lors de sa réaction avec l'HRP et le type de solution de blocage utilisé.

Lors de l'application de ce protocole avec l'ovalbumine, utilisée comme bloqueur, nous avons obtenu les filaments. Cependant, lorsque nous avons utilisé l'albumine bovine (BSA) les filaments ne se sont pas formés. Les solutions de protéines couramment utilisées pour bloquer les sites de liaison non-spécifiques lors des réactions immunochimiques (BSA, ovalbumine, caséine etc.) servent aussi de «récepteurs» pour la tyramide ou d'autres phénols activés par l'HRP. D'après les études de Bobrow et coll. (1991,1992) certaines protéines permettent une meilleure amplification que d'autres selon le type de système utilisé. Les interactions des

protéines avec les phénols activés diffèrent selon leur environnement et le type de substrat auquel les protéines sont adsorbées (ex. nitrocellulose, plaque de polystyrène) (Bobrow et coll., 1991,1992). Le type de bloqueur semble donc jouer un rôle important lors de l'amplification. Cependant, il semble aussi que les sondes de tyramine biotinylées soient plus enclines à former les filaments puisque les autres sondes couplées à l'or colloïdal ou aux IgG ont pu être utilisées avec l'ovalbumine pour générer de très bons résultats sans filaments.

La concentration de la tyramide est aussi un facteur déterminant car l'HRP catalyse plus particulièrement la dimérisation des composés phénoliques (Westerfield et Lowe, 1942; Gross et Sizer, 1959; Zaitsev et Ohkura, 1980). Il semble que la dilution des substrats phénoliques réduit la probabilité de dimérisation et de polymérisation et favorise la réaction des radicaux libres intermédiaires avec les parties riches en électrons des protéines du tissu ou de la solution de blocage utilisée (Bobrow et coll., 1992). Dans notre cas, la concentration de biotiny-tyramide que nous avons utilisée est inconnue puisque nous avons appliqué les dilutions suggérées par le fabricant commercial. Il est donc possible qu'une concentration trop élevée de tyramide ait provoqué la polymérisation qui mène aux filaments. De plus, la façon dont a été fabriquée la sonde, ainsi que sa reconstitution implique le solvant organique sulfoxyde de diméthyle (DMSO). Les interactions possibles du DMSO avec la tyramide avant ou pendant la réaction, et avec la solution de blocage sont inconnues et ne peuvent être éliminées comme facteurs de polymérisation.

3.2 PROTOCOLE DE BIOTINYL-TYRAMIDE/STREPTAVIDINE-OR

L'amplification par la tyramide, révélée par de fins filaments denses aux électrons, est intense et spécifique. Cependant, parce que c'est un produit de réaction et non un marqueur de forme régulière, il est difficile d'effectuer l'évaluation quantitative de l'intensité du marquage.

Les techniques employant les particules d'or comme marqueur sont reconnues pour leurs multiples avantages, et en particulier pour la possibilité de quantifier l'intensité des signaux immunocytochimiques. En changeant la solution de blocage et en ajoutant une étape d'incubation avec la streptavidine-or, pour détecter la biotine accumulée aux sites antigéniques, nous avons combiné les avantages d'amplification de l'approche CARD avec ceux associés à l'immuno-or (Figure 11). La localisation ultrastructurale de l'amylase dans les cellules acineuses pancréatiques et sa distribution le long de la voie de sécrétion nous ont permis d'évaluer ce nouveau protocole. L'application de cette approche a permis d'obtenir un marquage par des particules d'or colloïdal spécifique et amplifié. Nous avons, de cette façon, pu exploiter les avantages du marqueur à l'or colloïdal dans un protocole d'amplification. Toutefois, l'amplification ne s'est pas montrée aussi convaincante que nous l'avions espéré. Bien que la quantification des résultats ait démontré une intensité quatre fois plus élevée que la technique conventionnelle de protéine A-or, nous croyons que l'encombrement stérique empêche en partie la liaison entre les molécules de biotiny-

tyramide accumulées sur la coupe et la streptavidine-or. Nous avons alors essayé d'améliorer la sonde développée par Bobrow.

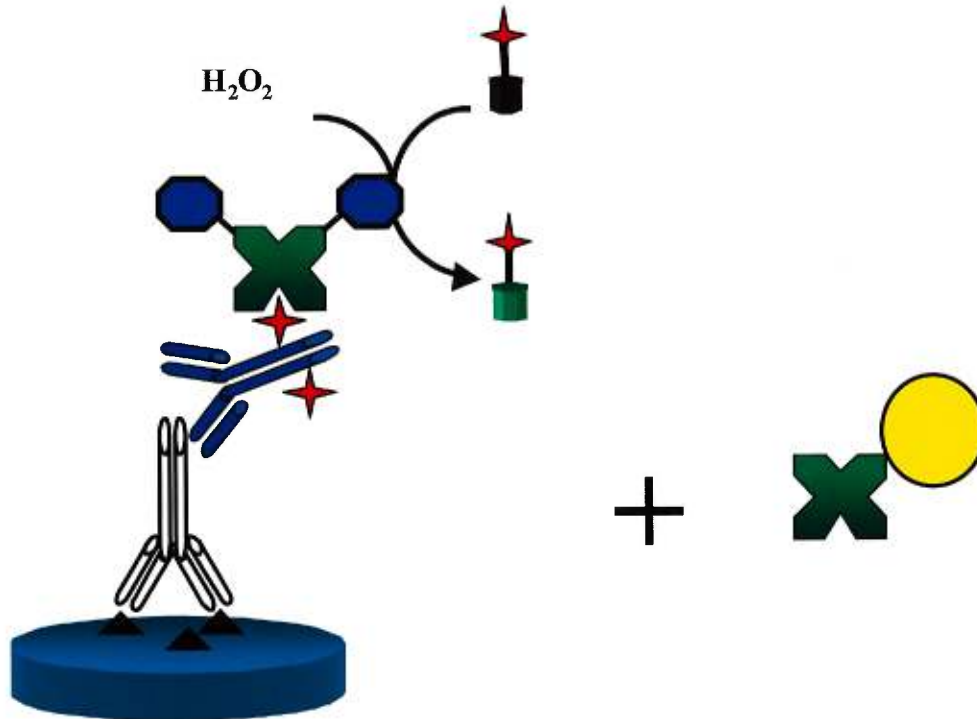


Figure 11. Schéma représentant le protocole de biotinylation/tyramide/streptavidine-or. La streptavidine-or peut s'associer à la biotine accumulée.

3.3 PROTOCOLE DE BIOTINYL-LC-LC-TYRAMIDE/STREPTAVIDINE-OR

Des travaux effectués antérieurement ont montré que le site de liaison à la biotine est situé à 9 Å sous la surface de la molécule d'avidine (Green et coll., 1971). La même étude fait état de l'augmentation de l'affinité de l'avidine pour la biotine lorsque des bras d'espacement plus long sont utilisés. Il a été postulé que l'encombrement stérique

serait réduit de cette façon.

Pour vérifier l'hypothèse de l'encombrement stérique entre la biotinylyl-tyramide et la streptavidine-or, nous avons construit une nouvelle sonde en introduisant des bras d'espacement, qui sont des chaînes hydrocarbonées d'une longueur de 30 Å, entre les molécules de tyramine et de biotine (Figure 12).

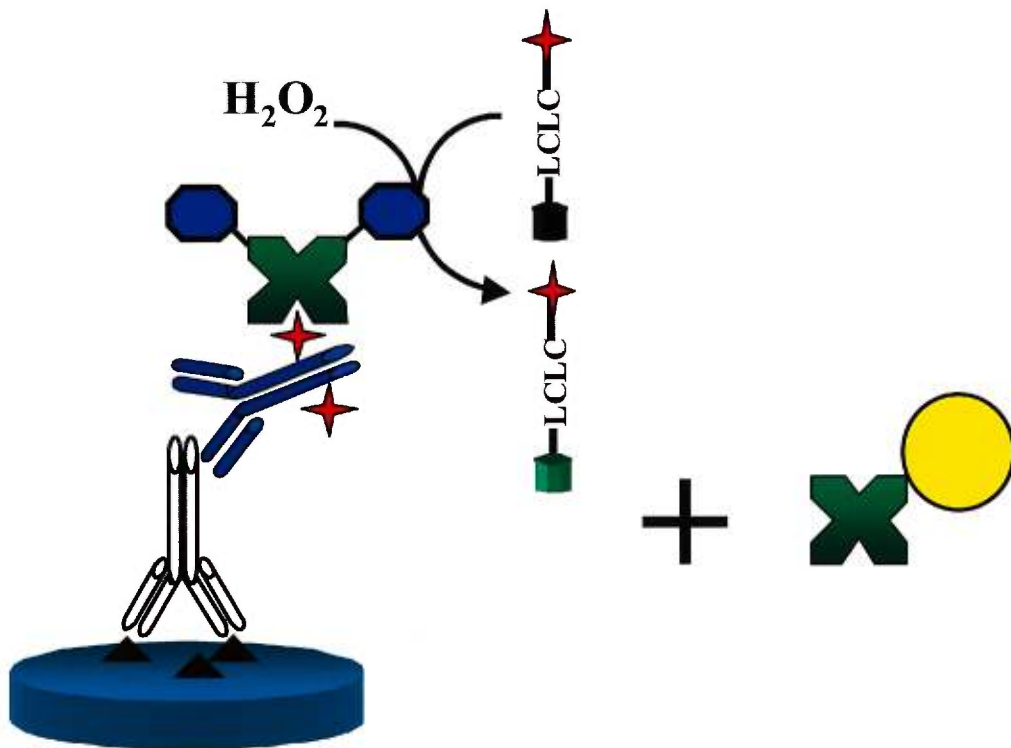


Figure 12. Protocole de biotinylyl-LC-LC-tyramide/streptavidine-or. Des bras d'espacement hydrocarbonés sont insérés entre les molécules de biotine et de tyramine pour diminuer les effets de l'encombrement stérique avec la streptavidine-or.

L'utilisation du protocole indirecte LAB suivi par la déposition catalytique de la sonde biotiny-LC-LC-tyramide et de sa détection par le complexe streptavidine-or a résulté en une densité de marquage 12 fois plus élevée que celle de la protéine A-or simple et trois fois plus élevée que celle générée par la sonde biotiny-tyramide. L'obtention d'un signal beaucoup plus intense, au niveau des structures contenant l'amylase, indique que l'incorporation de bras d'espacement entre les molécules de tyramine et de biotine a permis de surmonter les problèmes d'encombrement stérique entre les réactifs.

Cependant, les deux sondes biotinylées, biotiny-tyramide et biotiny-LC-LC-tyramide, ont donné des niveaux de marquage non-spécifique assez élevés qui sont apparus comme étant des problèmes de diffusion. En effet, le bruit de fond était plus élevé près des compartiments cellulaires contenant l'amylase et il diminuait en s'en éloignant. La diffusion de la biotiny-tyramide a déjà été rapportée par van Gijlswijk et coll. (1996). Nous avons utilisé, comme van Gijlswijk et coll. l'ont fait, le sulfate de dextran pour diminuer le bruit de fond causé par la diffusion des réactifs biotinylés. L'effet du polymère s'est avéré dépendant de la concentration. Une concentration de 20 % de dextran a complètement aboli les artefacts de diffusion et le bruit de fond, mais a aussi réduit l'amplification du signal. C'est une concentration de 10 % qui a semblé être le meilleur compromis entre le niveau d'amplification et le marquage non-spécifique. L'utilisation du dextran a provoqué une diminution de l'intensité générale du marquage mais a tout de même contribué à la génération de

résultats ayant de très bons rapports signal/bruit de fond.

3.4 PROTOCOLE DE TYRAMIDE-ALBUMINE-OR

Pour améliorer la technique, c'est-à-dire pour augmenter le niveau d'amplification, éliminer les problèmes de diffusion et réduire le bruit de fond, nous avons construit une autre sonde qui permet le dépôt catalytique d'or colloïdal. La sonde a été construite en conjuguant la tyramine à l'albumine, puis en conjuguant ce complexe tyramide-albumine à des particules d'or colloïdal.

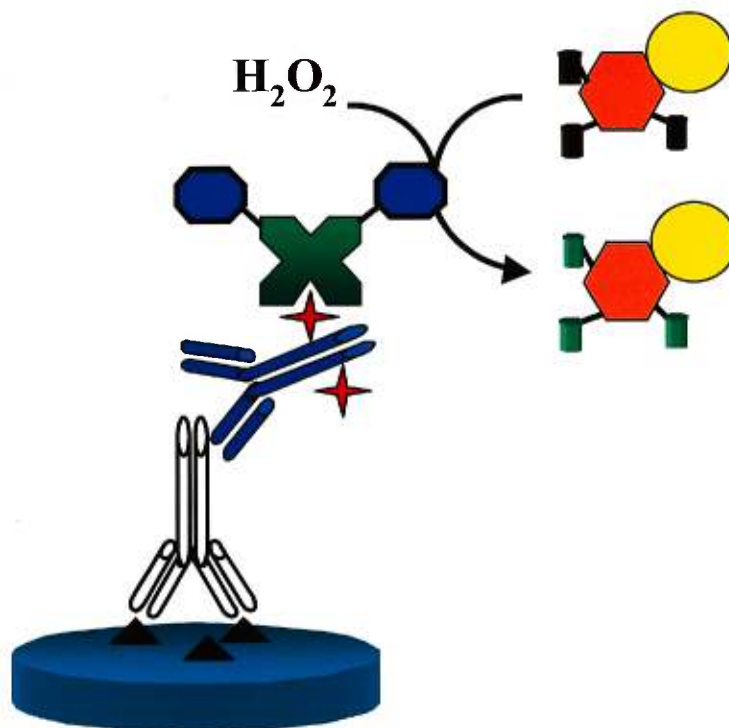


Figure 13. Diagramme représentant le protocole de tyramide-albumine-or. L'activation des molécules de tyramide permet l'accumulation des particules d'or colloïdal au site antigénique.

Étant directement couplé au substrat de l'HRP, la sonde tyramide-albumine-or permet de raccourcir le protocole d'amplification CARD. Elle est directement déposée, de façon catalytique par l'HRP, au site antigénique spécifique et ne requiert pas d'autres étapes de détection (Figure 13).

L'application de cette sonde en combinaison avec la technique CARD, pour détecter l'amylase, a généré un marquage intense sur les compartiments cellulaires contenant les complexes antigène-anticorps. La quantification des résultats a démontré que l'intensité du marquage était excellente et que l'amplification obtenue avec la tyramide-albumine-or était sept fois plus élevée qu'avec le protocole de protéine A-or non-amplifié. De plus, le bruit de fond causé par le marquage non-spécifique sur les mitochondries et sur les noyaux est demeuré faible et aucune diffusion de la sonde n'a été relevée.

3.5 PROTOCOLE DE TYRAMIDE-IgG/PROTÉINE A-OR

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'alors nous ont montré que la technique CARD était hautement flexible et adaptable à plusieurs types de complexes indicateur-substrat de l'HRP. C'est pourquoi nous avons continué à explorer de nouvelles avenues potentiellement encore plus puissantes en terme d'amplification du marquage à l'or colloïdal.

Le couplage de molécules de tyramine avec des immunoglobulines G normales nous a permis d'utiliser la protéine A-or dans le protocole d'amplification CARD (Figure 14). La tyramide-IgG, activée par l'HRP, s'accumule au site antigénique cible et il devient alors possible de procéder à la détection de la sonde avec le complexe protéine A-or. La protéine A-or réagit spécifiquement avec les fragments Fc des immunoglobulines G et permet, dans ce cas-ci, d'amplifier le marquage en se liant aux IgG déposés catalytiquement et en même temps aux complexes anticorps primaire-anticorps secondaire formés immunologiquement.

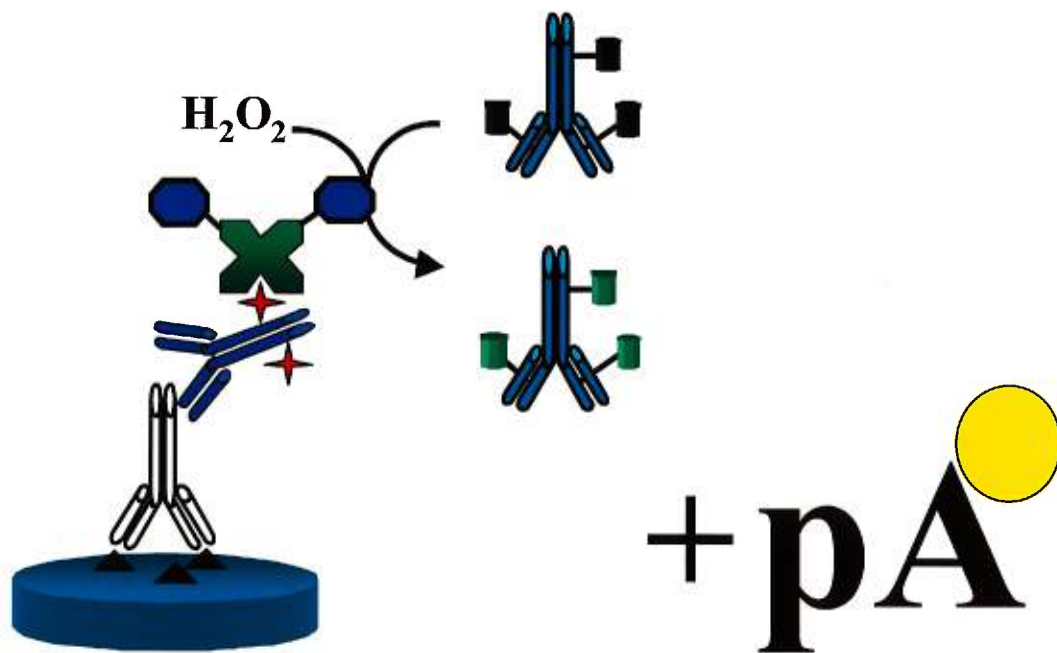


Figure 14. Schéma du protocole de tyramide-IgG/protéine A-or. L'accumulation catalytique de la sonde tyramide-IgG est révélée par le complexe protéine A-or.

Le complexe tyramide-IgG nous a permis d'enregistrer la plus haute amplification du signal immunocytochimique révélée par le marqueur à l'or colloïdal. Cette méthode a engendré un signal 13 fois plus intense que le protocole de protéine A-or simple, tout en maintenant un faible niveau de bruit de fond sur les mitochondries et les noyaux.

3.6 PROTOCOLE DE SUBSTRAT-NANOGOLD/INTENSIFICATION À L'ARGENT

Pour étendre les possibilités d'amplification en microscopie électronique, nous avons développé une sonde qui tire avantage des amas d'or ultrapetits de 1.4 nm, du dépôt catalytique permis par l'approche CARD et de l'amplification à l'argent (Figure15). Ces trois caractéristiques contribuent toutes à des marquages de plus hautes intensités. Plusieurs études ont démontré que la densité de marquage est inversement proportionnelle à la grosseur des particules d'or (Van Bergen en Henegouwen et Leunissen, 1986; Yokota, 1988; Gu et D'Andrea, 1989; Ghitescu et Bendayan, 1990). Les petites particules comme celles de 1 à 5 nm et le Nanogold de 1.4 nm donnent des densités de marquage plus élevées en partie à cause de la réduction de l'encombrement stérique et de la plus grande facilité de liaison des complexes immunoréactif-or aux antigènes (Lackie et coll., 1985; Ghitescu et Bendayan, 1990; Dulhunty et coll., 1993; Hainfeld et Furuya, 1992). Le protocole d'intensification à l'argent apporte aussi certains avantages en améliorant la limite de détection des

antigènes et en générant des colorations noires, permanentes et hautement contrastées (Holgate et coll., 1983; Taatjes et coll., 1987).

Nous avons donc utilisé un nouveau substrat phénolique de l'HRP (molécule différente de la tyramine) couplé à des particules de Nanogold pour amplifier les résultats immunocytochimiques en microscopie électronique. Nous avons comparé ce protocole de CARD-Nanogold avec les protocoles d'IgG- et de streptavidine-Nanogold simples et amplifiés.

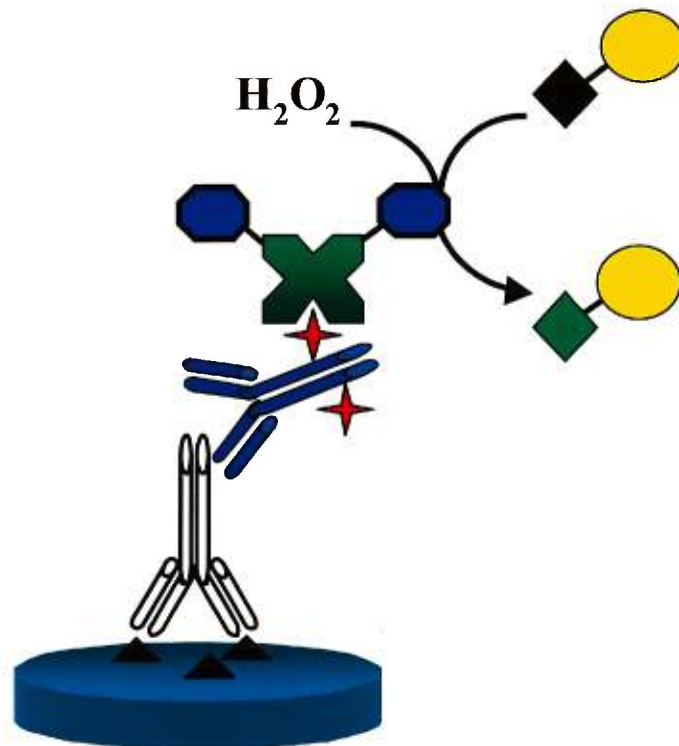


Figure 15. Diagramme représentant le système d'amplification CARD-Nanogold. La sonde substrat de l'HRP-Nanogold est directement déposée au site antigénique spécifique. Les amas d'or ultra-petits sont ensuite soumis à l'amplification à l'argent.

Le dépôt catalytique et l'amplification à l'argent du nouveau substrat-Nanogold ont mené à des marquages spécifiques qui se sont révélés être très intenses. En comparaison avec les autres protocoles évalués et pour les mêmes dilutions d'anticorps primaires, le protocole CARD-Nanogold a démontré une plus grande intensité de marquage et donc une meilleure efficacité de détection des complexes antigène-anticorps. En plus, ce protocole a permis une augmentation de la sensibilité en donnant des signaux positifs là où les protocoles simples n'ont pas réussi. Nous avons pu évaluer cette augmentation de sensibilité en diluant l'anticorps primaire jusqu'à ce que l'approche simple ne donne aucun marquage, puis en démontrant que le protocole amplifié générait encore de bons résultats à cette dilution de l'anticorps primaire.

L'étape d'amplification à l'argent et son utilisation en microscopie électronique à transmission constitue un désavantage de la technique CARD-Nanogold. Les particules d'or de 1.4 nm sont difficiles à visualiser comme tel et l'intensification à l'argent est nécessaire pour augmenter leur grosseur. Cependant, la procédure mène à des complexes d'or-argent ayant des diamètres variables et compromet la quantification de la densité du marquage. Ces différences de diamètre entre les particules peuvent provenir du fait qu'une trop grande densité de marquage en un point affecte le pourcentage de particules «élargies» et leur diamètre final. En plus, les grosses particules peuvent être le résultat de la fusion de petites particules, ce qui aurait pour conséquence de mener à des sous-estimations de la densité de marquage

(Stierhof et coll., 1991; Takizawa et Robinson, 1994; Humbel et coll., 1995; Robinson et coll., 1998).

La sensibilité de la méthode CARD-Nanogold a été évaluée par immunodot sur membrane de nitrocellulose. Il a été possible de révéler des quantités aussi petites que 1 pg de protéines. Ceci démontre que notre approche permet une limite de détection comparable aux techniques d'ELISA, de chimiluminescence et aux protocoles de un et deux cycles d'amplification avec les sondes de biotinyI-tyramide et de fluorescéine-tyramide appliquées par Bobrow et coll. (1991).

Une autre caractéristique intéressante de la méthode est que, lorsqu'elle est utilisée avec un anticorps primaire assez concentré, le marquage obtenu s'avère très intense. Cette particularité permet de détecter les compartiments cellulaires marqués à très faible grossissement en microscopie électronique sans même avoir à contraster les coupes de tissus. Ce protocole peut donc, aussi, être utilisé pour faire l'évaluation du marquage sur une grande surface de la coupe de tissu.

3.7 RÉOLUTION

La résolution d'un immunomarquage dépend de la grosseur de la sonde utilisée et du nombre d'étapes impliquées dans le protocole de marquage. La résolution de l'approche d'immuno-or obéit à la règle d'échafaudage (Kellenberger et coll.,

1986,1987). Durant le marquage et pendant que la surface de la coupe de tissu est hydratée, les différents réactifs et sondes s'empilent au niveau du site antigénique. Cependant, lorsque la coupe est séchée, l'empilement des réactifs tombe de côté dans une direction aléatoire en raison de la perte de tension de surface.

En ce qui concerne la résolution des signaux d'immuno-or amplifiés, nous avons voulu savoir si, à cause des différentes étapes du protocole, la distance entre le marqueur à l'or colloïdal et le site antigénique réel augmentait de façon significative. Le marquage d'une protéine membranaire avec les protocoles de protéine A-or simple et de tyramide-IgG/protéine A-or nous a permis de comparer et d'évaluer la résolution du protocole d'amplification. En mesurant les distances entre les particules d'or et les sites antigéniques membranaires et en établissant la distribution de ces mesures nous avons démontré que le signal amplifié maintenait toujours un bon niveau de résolution. Autant pour la technique simple qu'amplifiée, la majorité du marquage a été localisé à moins de 10 nm de la membrane. Toutefois, la distance moyenne entre les particules d'or et la membrane montre une faible perte de la résolution pour la sonde tyramide-IgG. Les résultats démontrent tout de même qu'en dépit de l'amplification, la résolution demeure excellente.

3.8 CONTRÔLES DE SPÉCIFICITÉ

La spécificité des marquages a été évaluée par plusieurs expériences contrôles. Deux

types de contrôles ont été effectués pour (a) l'évaluation de la spécificité du marquage, incluant l'utilisation d'anticorps adsorbés aux antigènes spécifiques et l'omission de l'anticorps primaire ou secondaire, et (b) l'évaluation de la spécificité de l'amplification, incluant l'omission d'un des réactifs comme le peroxyde d'hydrogène, la streptavidine-HRP ou le substrat de l'HRP conjugué.

Aucun marquage n'a été obtenu lorsque les anticorps primaires ont été omis ou adsorbés avec leur antigène correspondant, montrant bien la spécificité du signal obtenu avec les protocoles complets. De même, l'omission de l'anticorps secondaire biotinylé a provoqué la perte des signaux spécifiques à l'exception du protocole de tyramide-IgG/protéine A-or (voir plus bas).

Parmi les contrôles d'amplification, certains ont engendré une absence de marquage et d'autres un faible signal.

L'omission des sondes de tyramine biotinylées a résulté en une absence de filaments denses ou en un marquage faible résultant de la liaison normale de la streptavidine-or avec l'anticorps secondaire biotinylé.

Le protocole de tyramide-IgG utilise le complexe protéine A-or pour détecter les fragments Fc des immunoglobulines. Donc, même en absence de l'anticorps secondaire, la protéine A-or a pu reconnaître l'anticorps primaire pour donner un

signal semblable au protocole standard de protéine A-or.

Le protocole contrôle impliquant l'omission du substrat de l'HRP-Nanogold mais complété jusqu'aux étapes de streptavidine-HRP et d'amplification à l'argent a donné un marquage de faible intensité. Ce signal, localisé spécifiquement, serait possiblement causé par l'intensification à l'argent de l'atome de fer présent dans la molécule de peroxydase. Dans ce cas, les atomes métalliques pourraient avoir été transformés en sulphides ou en sélénides de fer car, à part quelques exceptions, les métaux exogènes ou endogènes dans les tissus doivent être sous ces formes pour réagir avec la solution d'argent (Danscher 1981,1982,1983). Sinon, l'amplification de l'HRP à l'argent, sans transformation, pourrait provenir d'une condition chimique ou spatiale favorable du fer à l'intérieur de la peroxydase. Dans tous les cas, le marquage obtenu lors de ces expériences contrôles n'a été observé que lorsque le protocole incluait la streptavidine-HRP, et de plus, le faible signal est apparu localisé spécifiquement aux sites antigénique cibles.

3.9 CONCLUSION

En général, les techniques immunocytochimiques sont suffisamment sensibles pour détecter la plupart des constituants biologiques d'intérêt. Cependant, pour détecter des constituants présents en faible quantité, il est souvent nécessaire de développer des procédures capables d'amplifier fortement les signaux immunologiques.

Les méthodes indirectes sont celles qui ont été les plus modifiées pour augmenter la sensibilité de l'immunocytochimie. À cause de la multiplication des épitopes disponibles pour les étapes subséquentes, elles permettent d'introduire un plus grand nombre d'enzymes ou de complexes enzymatiques qui sont utilisés pour catalyser la déposition d'un produit de réaction électron-dense ou coloré. À cause de l'arborisation des immunoréactifs, les techniques indirectes permettent aussi l'introduction d'un plus grand nombre de marqueurs fluorescents ou de particules métalliques aux sites antigéniques ciblés pour générer des signaux amplifiés. Cependant, le nombre d'étapes d'incubation, parfois élevé, peut mener à un bruit de fonds qui annule les effets de l'amplification. De plus, ces procédures sont plus longues à effectuer et demandent souvent plusieurs anticorps et réactifs différents.

Au lieu de multiplier les étapes pour produire une amplification, la technique CARD est basée sur la capacité des enzymes à catalyser la déposition covalente d'un grand nombre de molécules qui peuvent servir, directement ou indirectement, de marqueurs. Mis à part les avantages évidents d'amplification, ce système possède une très grande flexibilité. Il est possible d'incorporer, en un site antigénique, des molécules de peroxydase de plusieurs façons, les substrats de l'enzyme sont multiples et peuvent être couplés à de nombreux haptènes, protéines, fluorochromes, particules denses, etc. et les systèmes de détection de ces substrats conjugués peuvent eux même être extrêmement variés.

En immunofluorescence ou en FISH, les méthodes de *time-resolved fluorescent microscopy*, de CARD ou la combinaison des deux ont permis d'atteindre des niveaux de détection d'antigènes inégalés (Marriott et coll., 1994; Seveus et coll., 1992,1994; Raap et coll., 1995; Chao et coll., 1996; de Haas et coll., 1996; de Haas et coll., 1997; Van heusden et coll., 1997; Van Tine et coll., 1998; Speel et coll., 1999). De même, les techniques immunoenzymatiques atteignent maintenant une très haute sensibilité lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec la technique CARD (Bobrow et coll., 1991; Adams, 1992; Merz et coll., 1995; Hunyady et coll., 1996; Werner et coll., 1996; Erber et coll., 1997; King et coll., 1997).

Au niveau ultrastructurale, les techniques d'amplification combinant la haute résolution, la facilité de détection du signal ainsi que la possibilité de quantifier les résultats se font très rares. Les techniques permettant de tels marquages doivent utiliser l'or colloïdal qui, à prime abord, n'est pas compatible avec les techniques d'amplification enzymatiques. En microscopie optique et électronique, certaines applications d'hybridation *in situ* ont combiné la technique de CARD/biotinyl-tyramide avec la streptavidine-Nanogold ou avec des particules d'or colloïdal ultrapetites couplées à des anticorps anti-biotine. Utilisées en pré- ou en post-enrobage ces protocoles ont permis la localisation de séquences d'ARN et d'ADN qui sont présentes en très faibles quantités à l'intérieur des cellules (Hacker et coll., 1997; Schöfer et coll., 1997a,b; Zehbe et coll., 1997; Humbel et Coll., 1998; Punnonen et coll., 1999). Certaines de ces études ont même démontré qu'une telle combinaison

peut remplacer la réaction de polymérase en chaîne *in situ* et générer une sensibilité assez bonne pour détecter des gènes de virus à ADN présents en une seule copie par cellule (Hacker et coll., 1997; Zehbe et coll., 1997; Tbakhi et coll., 1998).

En appliquant la technique CARD en microscopie électronique, sans détection à l'or colloïdal, nous avons obtenu un marquage de haute résolution représenté par de fins filaments denses aux électrons. Ce nouveau produit de réaction représente une alternative aux techniques existantes et pourrait être utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs pour des expériences de marquages multiples. Cependant, les filaments ne sont pas de nature régulière comme les particules d'or et les évaluations quantitatives des intensités de marquage sont difficiles à effectuer.

Les sondes de tyramines biotinylées, tyramide-albumine-or et tyramide-IgG nous ont permis d'associer la capacité d'amplification de l'HRP avec les avantages de résolution et de quantification de l'or colloïdal. De plus, trois méthodes d'amplification, c'est-à-dire le protocole CARD, les amas d'atomes d'or ultrapetits (Nanogold) et l'amplification à l'argent, ont été réunies dans le protocole de CARD-Nanogold. Ces approches ont mené à des immunomarquages améliorés, très sensibles et intenses en microscopie électronique.

Les résultats que nous avons obtenus prouvent que la combinaison de l'amplification enzymatique avec les particules d'or a repoussé les limites de

post-enrobage.

La mise en pratique du protocole CARD est un pas vers l'élaboration de techniques très sensibles qui ne requiert pas trop d'étapes ni trop d'antisérums différents. Ce seront des techniques plus simples mais en même temps plus sensibles et efficaces qui provoqueront la prochaine grande évolution de l'immunocytochimie.

4. BIBLIOGRAPHIE

Adams JC (1977) Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. *Neurosciences* **2**:141-145

Adams JC (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* **40**:1457-1463

Åkerström B, Björck L (1986) A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J Biol Chem* **261**:10240-10247

Åkerström B, Brodin T, Reis K, Björck L (1985) Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* **135**:2589-2592

Aubin JE (1979) Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* **27**:36-43

Avrameas S (1969a) Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunocytochemistry* **6**:43-52

Avrameas S (1969b) Indirect immunoenzyme techniques for the intracellular detection of antigens. *Immunocytochemistry* **6**:825-831

Avrameas S, Uriel J (1966) Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C.R. Acad Sci Paris* **262**:2543-2545

Baschong W, Lucocq JM, Roth J (1985) "Thiocyanate gold": Small (2-3 nm) colloidal gold for affinity cytochemical labeling in electron microscopy. *Histochemistry* **83**:409-411

Baschong W, Wrigley NG (1990) Colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high resolution labels for immunoelectron microscopy. *J Electron Microscop Tech* **12**:313-323

Bendayan M (1980) Use of the protein A-gold technique for the morphological study of vascular permeability. *J Histochem Cytochem* **28**:1251-1254

Bendayan M (1982) Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* **30**:81-85

- Bendayan M** (1984) Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: Methods, applications and limitations. *J Electron Microsc Tech* **1**:243-270
- Bendayan M** (1987) Introduction of protein G-gold complex for high-resolution immunocytochemistry. *J Electron Microsc Tech* **6**:7-13
- Bendayan M** (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* **29**:1-163
- Bendayan M, Duhr MA** (1986) Modification of the protein A-gold immunocytochemical technique for the enhancement of its efficiency. *J Histochem Cytochem* **34**:569-575
- Bendayan M, Nanci A, Herbener GH, Gregoire S, Duhr MA** (1986) A review on the study of protein secretion applying the protein A-gold immunocytochemical approach. *Amer J Anat* **175**:379-400
- Bendayan M, Shore GC** (1982) Immunocytochemical localization of mitochondrial proteins in the rat hepatocyte. *J Histochem Cytochem* **30**:139-147
- Bendayan M, Stephens H** (1984) Double labeling cytochemistry applying the protein A-gold technique. Dans: *Immunolabeling for Electron Microscopy* (Polak JM, Varndell IM, eds.) pp. 143-154. Elsevier, Amsterdam
- Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE** (1994) cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem* **42**:1635-1642
- Bisgaard K, Lihme A, Rolsted H** (1993) Polymeric conjugates for enhanced signal generation in enzyme immunoassays. Scandinavian Society for immunology XXIVth Annual meeting. University of Aarhus, Denmark
- Björck L, Kronvall G** (1984) Purification of some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* **133**:969-974
- Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ** (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* **125**:279-285
- Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J** (1992) The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods* **150**:145-149
- Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt GJ** (1991) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* **137**:103-112

- Brandtzaeg P** (1975) Rhodamine conjugates: specific and nonspecific binding properties in immunohistochemistry. *Ann N. Y. Acad Sci* **254**:35-54
- Brown D, Roth J, Orci L** (1985) Lectin-gold cytochemistry reveals intercalated cell heterogeneity along rat kidney collecting ducts. *Am J Physiol* **248**:C348-C356
- Cattoretti G, Berti E, Schiró R, D'Amato L, Valeggio C, Rilke F** (1988) Improved avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) staining. *Histochem J* **20**:75-80
- Chao J, DeBiasio R, Zhu Z, Giuliano KA, Schmidt BF** (1996) Immunofluorescence signal amplification by the enzyme-catalyzed deposition of a fluorescent reporter substrate (CARD). *Cytometry* **23**:48-53
- Chen BX, Szabolcs MJ, Matsushima AY, Erlanger BF** (1996) A strategy for immunohistochemical signal enhancement by end-product amplification. *J Histochem Cytochem* **44**:819-824
- Childs GV, Unabia G** (1982) Application of a rapid avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique to the localization of pituitary hormones at the electron microscopic level. *J Histochem Cytochem* **30**:1320-1324
- Chilosi M, Lestani M, Pedron S** (1994) A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotech Histochem* **69**:235-239
- Clerc MF, Granato DA, Horisberger M** (1988) Labelling of colloidal gold with IgE. A quantitative study using monoclonal IgE anti-beta-lactoglobulin and evaluation of the biological activity of the gold complex with RBL-1 cells. *Histochemistry* **89**:343-349
- Coons AH** (1956) Histochemistry with labeled antibody. *Int Rev Cytol* **5**:1-23
- Coons AH, Creech HH, Jones RN** (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* **47**:200-202
- Courtoy PJ, Picton DH, Farquhar MG** (1983) Resolution and limitations of the immunoperoxidase procedure in the localization of extracellular matrix antigen. *J Histochem Cytochem* **31**:945-951
- Coventry BJ, Neoh SH, Mantzioris BX, Skinner JM, Zola H, Bradley J** (1994) A comparison of the sensitivity of immunoperoxidase staining methods with high-sensitivity fluorescence flow cytometry-antibody quantitation on the cell surface. *J Histochem Cytochem* **42**:1143-1147
- Danscher G** (1981a) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* **71**:1-16

- Danscher G** (1981b) Light and electron microscopic localization of silver in biological tissue. *Histochemistry* **71**:177-186
- Danscher G** (1981c) Localization of gold in biological tissue: A photochemical method for light and electron microscopy. *Histochemistry* **71**:81-88
- Danscher G** (1982) Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry* **76**:281-293
- Danscher G** (1983) A silver method for counterstaining plastic embedded tissue. *Stain Technology* **58**:365-372
- Danscher G, Rytter Nørgaard JO** (1983) Light microscopical visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* **31**:1394-1398
- Davidoff M, Schulze W** (1990) Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: An amplification alternative in immunocytochemical staining. *Histochemistry* **93**:531-536
- Davidoff MS, Schulze W, Holstein AF** (1991) Combination of alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP)- and avidin-biotin-alkaline phosphatase complex (ABAP)-techniques for amplification of immunocytochemical staining of human testicular tissue. *Andrologia* **23**:353-356
- de Haas RR, van Gijlswijk RPM, van der Tol EB, Zijlmans HJMAA, Bakker-Schut T, Bonnet J, Verwoerd NP, Tanke HJ** (1997) Platinum porphyrins as phosphorescent label for time-resolved microscopy. *J Histochem Cytochem* **45**:1279-1292
- de Haas RR, Verwoerd NP, van Der Corput MP, van Gijlswijk RPM, Siitari H, Tanke HJ** (1996) The use of peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide in combination with time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunocytochemistry and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* **44**:1091-1099
- De Harven E, Soligo D** (1987) Should we be counting immunogold marker particles on cell surfaces with the SEM? *J Microsc* **146**:183-189
- De Mey J** (1984) Colloidal gold as marker and tracer in light and electron microscopy. *EMSA bull.* **14**:54-66
- De Mey J** (1986) Colloidal gold probes. Dans: *Immunocytochemistry, Modern Methods and Applications* (Polak J, Van Noorden S, eds.) pp. 82-106. Wright-PSG, Bristol

- De Mey J, Moeremans M, Geuens G, Nuydens R, De Brabander M** (1981) High resolution light and electron microscopic localization of tubulin with the IGS (immuno-gold staining) method. *Cell Biol Int Rep* **5**:889-899
- Diamandis EP** (1991) Multiple labeling and time-resolvable fluorophores. *Clin Chem* **37**:1486-1491
- Diamandis EP, Christopoulos TK** (1991) The biotin-(strept)avidin system: Principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* **37**:625-636
- Doerr-Schott J** (1989) Colloidal gold for multiple staining. Dans: *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications* (Hayat MA, ed.) Vol.1, pp.145-190. Academic Press Inc., New York
- Dulhunty AF, Junankar PA, Stanhope C** (1993) Immunogold labeling of calcium ATPase in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle: use of 1-nm, 5-nm, and 10-nm gold. *J Histochem Cytochem* **41**:1459-1466
- Elias JM, Margiotta M, Gaborc D** (1989) Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. *Am J Clin Pathol* **92**:62-67
- Eliasson M, Andersson R, Olsson A, Wigzell H, Uhlén M** (1989) Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J Immunol* **142**:575-581
- Eliasson M, Olsson A, Palmcrantz E, Wiberg K, Inganäs M, Guss B, Lindberg M, Uhlén M** (1988) Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *J Biol Chem* **263**:4323-4327
- Erber WN, Willis JI, Hoffman GJ** (1997) An enhanced immunocytochemical method for staining bone marrow trephine sections. *J Clin Pathol* **50**:389-393
- Farr AG, Nakane PK** (1981) Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: A brief review. *J Immunol Meth* **47**:129-144
- Faulk WP, Taylor GM** (1971) An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **8**:1081-1083
- Forsgren A, Sjöquist J** (1966) «Protein A» from *S.Aureus*: Pseudoimmune reaction with human γ -globulins. *J Immunol* **97**:822-827
- Frens G** (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. *Nature (Lond.), Phys Sci* **241**:20-22

- Gallyas F, Görcs T, Merchenthaler I** (1982) High-grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem* **30**:183-184
- Gee B, Warhol MJ, Roth J** (1991) The use of an anti-horseradish peroxidase antibody-gold complex in the ABC technique. *J Histochem Cytochem* **39**:863-869
- Geoghegan WD** (1988) The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold. *J Histochem Cytochem* **36**:401-407
- Geoghegan WD, Ackerman GA** (1977) Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat antihuman immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: A new method, theory and application. *J Histochem Cytochem* **25**:1187-1200
- Geoghegan WD, Scillian JJ, Ackerman GA** (1978) The detection of human B-lymphocytes by both light and electron microscopy utilizing colloidal gold labeled antiimmunoglobulin. *Immunol Commun* **7**:1-12
- Ghitescu L, Bendayan M** (1990) Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *J Histochem Cytochem* **38**:1523-1530
- Ghitescu L, Galis Z, Bendayan M** (1991) Protein AG-gold complex: An alternative probe in immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **39**:1057-1065
- Giorno R** (1984) A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* **2**:161-166
- Goto S, Nagahiro S, Ushio Y, Hofer W** (1992) A simple enhancement method for the silver-gold-intensified diaminobenzidine reaction in the light microscopic immunoperoxidase technique. *J Histochem Cytochem* **40**:1423-1425
- Graham RC, Karnovsky MJ** (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* **14**:291-302
- Green MA, Sviland L, Malcolm AJ, Pearson ADJ** (1989) Improved method for immunoperoxidase detection of membrane antigens in frozen sections. *J Clin Pathol* **42**:875-880
- Green NM, Konieczny L, Toms EJ, Valentine RC** (1971) The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin. *Biochem J* **125**:781-784

- Gross AJ, Sizer IW** (1959) The oxidation of tyramine, tyrosine and related compounds by peroxidase. *J Biol Chem* **234**:1611-1614
- Grumbach IM, Veh RW** (1995) The SA/rABC technique: A new ABC procedure for detection of antigens at increased sensitivity. *J Histochem Cytochem* **43**:31-37
- Gu J, D'Andrea M** (1989) Comparison of detecting sensitivities of different sizes of gold particles with electron-microscopic immunogold staining using atrial natriuretic peptide in rat atria as a model. *Amer J Anat* **185**:264-270
- Gu J, De Mey J, Moeremans M, Polak JM** (1981) Sequential use of the PAP and immunogold staining method for the light microscopical double staining of tissue antigens. *Regulatory Peptides* **1**:365-374
- Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S** (1979) The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* **27**:1131-1139
- Gupta PK, Myers JD, Baylin SB, Mulshine JL, Cuttitta F, Gazdar AF** (1985) Improved antigen detection in ethanol-fixed cytologic specimens: A modified avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method. *Diagn cytopathol* **1**:133-136
- Hacker GW, Hauser-Kronberger C, Zehbe I, Su H, Schiechl A, Dietze O, Tubbs R** (1997) In situ localization of DNA and RNA sequences: super-sensitive in situ hybridization using streptavidin-Nanogold-silver staining: minireview, protocols and possible applications. *Cell Vision* **4**:54-65
- Hainfeld JF** (1987) A small gold-conjugated antibody label: Improved resolution for electron microscopy. *Science* **263**:450-453
- Hainfeld JF** (1988) Gold cluster-labeled antibodies. *Nature* **333**:281-282
- Hainfeld JF, Furuya FR** (1992) A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J Histochem Cytochem* **40**:177-184
- Hancock MB** (1982) A serotonin immunoreactive fiber system in the dorsal columns of the spinal cord. *Neurosci Lett* **31**:247-252
- Hanker JS, Ambrose WW, James CJ, Yates PE, Gall SA, Bossen EH, Fay JW, Laszlo J, Moore JO** (1979) Facilitated light microscopic cytochemical diagnosis of acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* **39**:1635-1639
- Hennink B, de Haas RR, Verwoerd NP, Tanke HJ** (1996) Evaluation of a time-resolved fluorescence microscope using a phosphorescent Pt-porphine model system. *Cytometry* **24**:312-320

Hinton DM, Petrali JP, Meyer HG, Sternberger LA (1973) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Molecular immunocytochemistry of antibodies on the erythrocyte surface. *J Histochem Cytochem* **21**:978-998

Hiort O, Kwan PWL, DeLellis RA (1988) Immunohistochemistry of estrogen receptor protein in paraffin sections: Effect of enzymatic pretreatment and cobalt chloride intensification. *Am J Clin Pathol* **90**:559-563

Holgate CS, Jackson P, Cowen PN, Bird CC (1983) Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem* **31**:938-944

Hopman AHN, Ramaekers FCS, Speel EJM (1998) Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD amplification. *J Histochem Cytochem* **46**:771-777

Horisberger M (1981) Colloidal gold: A cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy. *Scann Electron microsc II*: 19-31

Horisberger M (1989) Quantitative aspects of labeling colloidal gold with proteins. Dans: *Immuno-Gold Labeling in Cell Biology* (Verkleij AJ, Leunissen JLM, eds.) pp.49-60. CRC Press Inc. Boca Raton

Horisberger M, Rosset J (1977) Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **25**:295-305

Hoyland JA, Freemont AJ (1991) Investigation of a quantitative post-hybridization signal amplification system for mRNA-oligodeoxyribonucleotide in situ hybridization. *J Pathol* **164**:51-58

Hsu SM, Raine L (1981d) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **29**:1349-1353

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981a) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* **75**:734-738

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981b) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**:577-580

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981c) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* **75**:816-821

Hsu SM, Ree HJ (1980) Self-sandwich method. An improved immunoperoxidase technic for the detection of small amounts of antigens. *Am J Clin Pathol* **74**:32-40

Hsu SM, Soban E (1982) Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **30**:1079-1082

Humbel BM, de Jong MDM, Müller WH, Verkleij AJ (1998) Pre-embedding immunolabeling for electron microscopy: An evaluation of permeabilization methods and markers. *Microsc Res Tech* **42**:43-58

Humbel BM, Sibon OCM, Stierhof YD, Schwarz H (1995) Ultra-small gold particles and silver enhancement as a detection system in immunolabeling and in situ hybridization experiments. *J Histochem Cytochem* **43**:735-737

Hunyady B, Krempels K, Harta G, Mezey E (1996) Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* **44**:1353-1362

Johansson O, Backman J (1983) Enhancement of immunoperoxidase staining using osmium tetroxide. *J Neurosci Method* **7**:185-193

Jovin TM, Arndt-Jovin DJ (1989) Luminescence digital imaging microscopy. *Annu Rev Biophys Chem* **18**:217-308

Kellenberger E, Dürrenberger M, Villiger W, Carlemalm E, Wurtz M (1987) The efficiency of immunolabel on lowicryl sections compared to theoretical prediction. *J Histochem Cytochem* **35**:959-969

Kellenberger E, Hayat MA (1991) Some basic concepts for the choice of methods. Dans: *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications* (Hayat MA, ed.) Vol.3, pp.2-28. Academic Press Inc., San Diego

Kellenberger E, Villiger W, Carlemalm E (1986) The influence of surface relief of thin sections of embedded, unstained biological material on image quality. *Micron Microsc Acta* **17**:331-348

Kendall PA (1965) Labelling of thiolated antibody with mercury for electron microscopy. *Biochim Biophys Acta (Amst.)* **97**:174-176

Kerstens HMJ, Poddighe PJ, Hanselaar AGJM (1995) A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J Histochem Cytochem* **43**:347-352

Khalfan H, Abuknesha R, Rand-Weaver M, Price RG, Robinson D (1986) Aminomethyl coumarin acetic acid: A new fluorescent labelling agent for proteins. *Histochem J* **18**:497-499

King G, Payne S, Walker F, Murray GI (1997) A highly sensitive detection method for immunocytochemistry using biotinylated tyramine. *J Pathol* **183**:237-241

Kraehenbühl JP, Racine L, Griffiths GW (1980) Attempts to quantitate immunocytochemistry at the electron microscope level. *Histochem J* **12**:317-332

Krajewski S, Seitz RJ, Wechsler W (1990) Enhanced immunocytochemical staining sensitivity in formalin-fixed and paraffin-embedded material by simultaneous use of PAP and ABC. *Folia Histochemica Cytobiologica* **28**:211-218

Lackie PM (1996) Immunogold silver staining for light microscopy. *Histochemistry* **106**:9-17

Lackie PM, Hennessy RJ, Hacker GW, Polak JM (1985) Investigation of immunogold-silver staining by electron microscopy. *Histochemistry* **83**:545-550

Lansdorp PM, van der Kwast TH, de Boer M, Zeijlemaker WP (1984) Stepwise amplified immunoperoxidase (PAP) staining. I. Cellular morphology in relation to membrane markers. *J Histochem Cytochem* **32**:172-178

Larsson LI (1988) *Immunocytochemistry: Theory and practice*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.

Lascano EF, Berria MI (1988) PAP labeling enhancement by osmium tetroxide-potassium ferrocyanide treatment. *J Histochem Cytochem* **36**:697-699

Laurent G, Gourdin MF, Reyes F (1980) Immunoperoxidase detection of immunoglobulins in cells of immunoproliferative diseases: A comparison between conjugate and nonconjugate (PAP) procedures. *Am J Clin Pathol* **74**:265-274

Linsenmayer TF, Fitch JM, Schmid TM (1988) Multiple-reaction cycling: A method for enhancement of the immunochemical signal of monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* **36**:1075-1078

Liposits Z, Petersen SL, Paull WK (1991) Amplification of the in situ hybridization signal by silver postintensification: The biotin-dUTP-streptavidin-peroxydase diaminobenzidine-silver-gold detection system. *Histochemistry* **96**:339-342

Liposits Z, Sétáló G, Flerkó B (1984) Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience* **13**:513-525

Lucoq JM, Roth J (1984) Applications of immunocolloids in light microscopy. III. Demonstration of antigenic and lectin-binding sites in semithin resin sections. *J Histochem Cytochem* **32**:1075-1083

Macechko PT, Krueger L, Hirsch B, Erlandsen SL (1997) Comparison of immunologic amplification vs enzymatic deposition of fluorochrome-conjugated tyramide as detection systems for FISH. *J Histochem Cytochem* **45**:359-363

Malmgren L, Olsson Y (1977) A sensitive histochemical method for light- and electron-microscopic demonstration of horseradish peroxidase. *J Histochem Cytochem* **25**:1280-1283

Marriott G, Clegg RM, Jovin DJ, Jovin TM (1991) Time-resolved imaging microscopy: phosphorescence and delayed fluorescence imaging. *Biophys J* **61**:1374-1387

Marriott G, Heidecker M, Diamandis EP, Yan-Marriott Y (1994) Time-resolved delayed luminescence image microscopy using an europium ion chelate complex. *Biophys J* **67**:957-965

Mason TE, Phifer RF, Spicer SS, Swallow RA, Dreskin RB (1969) An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J Histochem Cytochem* **17**:563-569

Mayer G, Bendayan M (1997) Biotinyl-tyramide: A novel approach for electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **45**:1449-1454

Mayer G, Bendayan M (1999) Immunogold signal amplification: Application of the CARD approach in electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **47**:421-429

Mayer G, Hainfeld JF, Bendayan M Introduction of a novel HRP-substrate-Nanogold probe for signal amplification in immunocytochemistry. (En préparation)

McQuaid S, Allan GM (1992) Detection protocols for biotinylated probes: Optimization using multistep techniques. *J Histochem Cytochem* **40**:569-574

Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC (1995) ImmunoMax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. *Lab Invest* **73**:149-156

Milde P, Merke J, Ritz E, Haussler MR, Rauterberg EW (1989) Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: Comparison of four immunoperoxidase methods. *J Histochem Cytochem* **37**:1609-1617

Moeremans M, Daneels G, Van Dijck A, Langanger G, De Mey J (1984) Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining. *J Immunol Meth* **74**:353-360

Mokrý J (1996) Versatility of immunohistochemical reactions: A comprehensive survey of detection systems. *Acta Medica (Hradec Králove)* **39**:129-140

Moriarty GC, Moriarty CM, Sternberger LA (1973) Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase-antiperoxidase complex: A technique more sensitive than radioimmunoassay. *J Histochem Cytochem* **21**:825-833

Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS (1993) Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconj Chem* **4**:105-111

Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Waggoner AS (1989) Cyanine dye labeling reagents containing isothiocyanate groups. *Cytometry* **10**:11-19

Müller-Höcker J, Schäfer S, Sendelhofert A, Weis S (1998) The application of a biotin-anti-biotin gold technique providing a significant signal intensification in electron microscopic immunocytochemistry: A comparison with the ultrasmall immunogold silver staining procedure. *Histochem Cell Biol* **109**:119-125

Mullink H, Vos W, Jiwa M, Horstman A, van der Valk P, Walboomers JMM, Meijer CJLM (1992) Application and comparison of silver intensification methods for the diaminobenzidine and diaminobenzidine-nickel endproduct of the peroxidation reaction in immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* **40**:495-504

Nairn RC (1962) *Fluorescent protein tracing*. Livingstone Ltd., Edinburgh and London

Nairn RC (1976) *Fluorescent protein tracing*. 4th ed. Churchill-Livingstone, Edinburgh

Nakane PK (1968) Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem* **16**:557-560

Nakane PK, Pierce GB (1966) Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* **14**:929-931

Nakane PK, Pierce GB (1967) Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol* **33**:307-318

Naritoku WY, Taylor CR (1982) A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunochemical methods: An evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. *J Histochem Cytochem* **30**:253-260

Newman GR, Jasani B (1998) Silver development in microscopy and bioanalysis: A new versatile formulation for modern needs. *Histochem J* **30**:635-645

Newman GR, Jasani B, Williams ED (1983) Metal compound intensification of the electron-density of diaminobenzidine. *J Histochem Cytochem* **31**:1430-1434

Nielsen MH, Bastholm L, Chatteljee S, Koga J, Norrild B (1989) Simultaneous triple immuno-gold staining of virus and host cell antigens with monoclonal antibodies of virus and host cell antigens in ultrathin cryosections. *Histochemistry* **92**:89-93

Ordronneau P, Lindström PBM, Petrusz P (1981) Four unlabeled antibody bridge techniques: A comparison. *J Histochem Cytochem* **29**:1397-1404

Ordronneau P, Petrusz P (1980) Immunocytochemical demonstration of anterior pituitary hormones in the pars tuberalis of long-term hypophysectomized rats. *Am J Anat* **158**:491-506

Parfanovich MI, Sokolov NN, Mekler LB, Fadeyeva LL, Zhadanov VM (1965) Use of iodinated antibody for revealing viral antigens in ultrathin sections of cells. *Nature (Lond.)* **206**:784-786

Parsons JA, Erlandsen SL (1974) Ultrastructural immunocytochemical localization of prolactin in rat anterior pituitary by use of the unlabeled antibody enzyme method. *J Histochem Cytochem* **22**:340-351

Peacock CS, Thompson IW, Van Noorden S (1991) Silver enhancement of polymerised diaminobenzidine: Increased sensitivity for immunoperoxidase staining. *J Clin Pathol* **44**:756-758

Pepe FA, Finck H (1961) The use of specific antibody in electron microscopy. I. The visualization of mercury labelled antibody in the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* **11**:521-531

Petrusz P, Ordronneau P, Finley JCW (1980) Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem J* **12**:333-348

Pileri SA, Piccioli M, Ceccarelli C (1996) EnVision^{tm+}: A new powerful tool for diagnosis and research. XXI International Congress of the International Academy of pathology and 12th World Congress of Academic and Environmental Pathology. Budapest, Hungary

Plenat F, Picard E, Antunes L, Vignaud JM, Marie B, Chalabreysse P, Muhale F (1997) L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. *Ann Pathol* **17**:17-23

Pressman D, Yagi Y, Hiramoto R (1958) A comparison of fluorescein and I131 as labels for determining the «in vivo» localization of anti-tissue antibodies. *Int Arch Allergy* **12**:125-136

Punnonen EL, Fages C, Wartiovaara J, Rauvala H (1999) Ultrastructural localization of β -actin and amphotericin mRNA in cultured cells: Application of tyramide signal amplification and comparison of detection methods. *J Histochem Cytochem* **47**:99-112

Raap AK, van de Corput MPC, Vervenne RAW, van Gijlswijk RPM, Tanke HJ, Wiegant J (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Human Mol Genet* **4**:529-534

Ram JS, Nakane PK, Rawlins DG, Pierce GB (1966) Enzyme labeled antibody for ultrastructural studies. *Fed Proc* **25**:732-741

Robinson JM, Takizawa T, Vandr  DD, Burry RW (1998) Ultrasmall immunogold particles: Important probes for immunocytochemistry. *Microsc Res Tech* **42**:13-23

Rodriguez EM, Yulis R, Peruzzo B, Alvial G, Andrade R (1984) Standardization of various applications of methacrylate embedding and silver methenamine for light and electron microscopy immunocytochemistry. *Histochemistry* **81**:253-263

Romano EL, Romano M (1977) Staphylococcal protein A bound to colloidal gold: A useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochemistry* **14**:711-715

Romano EL, Stolinski C, Hughes-Jones NC (1974) An antiglobulin reagent labelled with colloidal gold for use in electron microscopy. *Immunochemistry* **11**:521-522

Roth J (1982) The preparation of protein A-gold complexes with 3 nm and 15 nm gold particles and their use in labelling multiple antigens on ultrathin sections. *Histochem J* **14**:791-801

Roth J, Bendayan M, Orci L (1978) Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J Histochem Cytochem* **26**:1074-1081

Roth J, Bendayan M, Orci L (1980) FITC-protein-A-gold complex for light and electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **28**:55-57

Roth J, Brown D, Orci L (1983) Regional distribution of N-acetyl-D-galactosamine residues in the glycocalyx of glomerular podocytes. *J Cell Biol* **96**:1189-1196

Roth J, Saremaslani P, Warhol MJ, Heitz PU (1992) Improved accuracy in diagnostic immunohistochemistry, lectin histochemistry and in situ hybridization using a gold-labeled horseradish peroxidase antibody and silver intensification. *Lab Invest* **67**:263-269

Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA (1998) The EnVision™+ system: A new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMatetm, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* **51**:506-511

Sano T, Hikino T, Niwa Y, Kashiwabara K, Oyama T, Fukuda T, Nakajima T (1998) In situ hybridization with biotinylated tyramide amplification: Detection of human papillomavirus DNA in cervical neoplastic lesions. *Mod Pathol* **11**:19-23

Savitski AP, Papovsky DB, Ponomarev GV, Berezin IV (1989) Phosphorescent immunoassay. Are metalloporphyrins alternatives to rare earth fluorescent labels. *Dokl Akad Nauk SSSR* **304**:1005-1008

Schöfer C, Weipoltshammer K, Almeder M, Wachtler F (1997a) Signal amplification at the ultrastructural level using biotinylated tyramides and immunogold detection. *Histochem Cell Biol* **108**:313-319

Schöfer C, Weipoltshammer K, Hauser-Kronberger C, Wachtler F (1997b) High resolution detection of nucleic acids at the electron microscopic level. Review of in situ hybridization technology, the use of gold, and catalyzed reporter deposition (CARD). *Cell Vision* **4**:443-454

Scopsi L, Larsson LI (1985) Increased sensitivity in immunocytochemistry: Effects of double application of antibodies and of silver intensification on immunogold and peroxidase-antiperoxidase staining techniques. *Histochemistry* **82**:321-329

Scopsi L, Larsson LI (1986) Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualizing methods employing a model system. *Histochemistry* **84**:221-230

Seveus L, Väisälä M, Hemmilä I, Kojola H, Toomans G, Soini E (1994) Use of fluorescent europium chelates as labels in microscopy allows glutaraldehyde fixation and permanent mounting and leads to reduced autofluorescence and good long-term stability. *Microsc Res Tech* **28**:149-154

Seveus L, Väisälä M, Syrjänen S, Sandberg M, Kuusisto A, Harju R, Salo J, Hemmilä I, Kojola H, Soini E (1992) Time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cytometry* **13**:329-338

Shi ZR, Itzkowitz SH, Kim YS (1988) A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem* **36**:317-322

Shin M, Izumi SI, Nakane PK (1995) Multilayer peroxidase-labeled antibody method: Comparison with labeled streptavidin-biotin method, avidin-biotin-peroxidase complex method, and peroxidase-antiperoxidase method. *J Clin Lab Anal* **9**:424-430

Shindler KS, Roth KA (1996) Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J Histochem Cytochem* **44**:1331-1335

Singer SJ (1959) Preparation of an electron dense antibody conjugate. *Nature (Lond.)* **183**:1523-1524

Slot JW, Geuze HJ (1981) Sizing of protein A-gold probes for immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **90**:533-536

Slot JW, Geuze HJ (1984) Gold markers for single and double immunolabelling of ultrathin cryosections. Dans: *Immunolabelling for Electron Microscopy* (Polak JM, Varndell IM, eds.) pp.129-142. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

Speel EJM, Hopman AHN, Komminoth P (1999) Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: Play CARD(s). *J Histochem Cytochem* **47**:281-288

Speel EJM, Schutte B, Ramaekers FCS, Hopman AHN (1992) The effect of avidin-biotin interactions in detection systems for in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* **40**:135-141

Stephens H, Bendayan M, Gisiger V (1985) Simultaneous labelling of basal laminae components and acetylcholinesterase at the neuro-muscular junction. *Histochem J* **17**:1203-1220

Sternberger LA (1979) Immunocytochemistry. 2nd Ed. Wiley and Sons, New York

Sternberger LA, Donati EJ, Cuculis JJ, Petrali JP (1965) Indirect immunouranium technique for staining of embedded antigen in electron microscopy. *Exp Mol Path* **4**:112-125

Sternberger LA, Donati EJ, Wilson CE (1963) Electron microscopic study on specific protection of isolated *Bordetella bronchiseptica* antibody during exhaustive labelling with uranium. *J Histochem Cytochem* **11**:48-58

Sternberger LA, Hardy PH jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* **18**:315-333

Sternberger LA, Sternberger NH (1986) The unlabeled antibody method: Comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *J Histochem Cytochem* **34**:599-605

Stierhof YD, Humbel BM, Schwarz H (1991) Suitability of different silver enhancement methods applied to 1 nm colloidal gold particles: An immunoelectron microscopic study. *J Electron Microscop Tech* **17**:336-343

Straus W (1982) Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH. *J Histochem Cytochem* **30**:491-493

Streit P, Reubi JC (1977) A new sensitive staining method for axonally transported horseradish peroxidase (HRP) in the pigeon visual system. *Brain Res* **126**:530-537

Swanson PE, Hagen KA, Wick MR (1987) Avidin-biotin-peroxidase-antiperoxidase (ABPAP) complex: An immunocytochemical method with enhanced sensitivity. *Am J Clin Pathol* **88**:162-176

Taatjes DJ, Schaub U, Roth J (1987) Light microscopical detection of antigens and lectin binding sites with gold labeled reagents on semithin Lowicryl K4M sections: Usefulness of the photochemical silver reaction for signal amplification. *Histochem J* **19**:235-245

Takizawa T, Robinson JM (1994) Use of 1.4-nm immunogold particles for immunocytochemistry on ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* **42**:1615-1623

Tbakhi A, Totos G, Hauser-Kronberger C, Pettay J, Baunoch D, Hacker GW, Tubbs RR (1998) Fixation conditions for DNA and RNA in situ hybridization: A reassessment of molecular morphology dogma. *Am J Pathol* **152**:35-41

Tougaard C, Tixier-Vidal A, Avrameas S (1979) Comparison between peroxidase-conjugates antigen or antibody and peroxidase-anti-peroxidase complex in a postembedding procedure. *J Histochem Cytochem* **27**:1630-1633

Tsutsumi Y, Seriwaza A, Kawai K (1995) Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathol Int* **45**:108-115

Tubbs RR, Sheibani K (1981) Chromogens for immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **29**:684

Vacca LL, Abrahams SJ, Naftchi NE (1980) A modified peroxidase-antiperoxidase procedure for improved localization of tissue antigens: Localization of substance P in rat spinal cord. *J Histochem Cytochem* **28**:297-307

Vacca LL, Rosario S, Zimmerman EA, Tomachefsky P, Ng PY, Hsu KG (1975) Application of immunoperoxidase techniques to localize horseradish peroxidase tracer in the central nervous system. *J Histochem Cytochem* **23**:208-215

Van Bergen en Henegouwen PMP, Leunissen JLM (1986) Controlled growth of colloidal gold particles and implications for labelling efficiency. *Histochemistry* **85**:81-87

Van de Plas P, Leunissen JLM (1993) Ultrasmall gold probes: Characteristics and use in immuno(cyto)chemical studies. *Methods Cell Biol* **37**:241-257

van der Loos CM, Naruko T, Becker AE (1996) The use of enhanced polymer one-step staining reagents for immunoenzyme double-labeling. *Histochem J* **28**:709-714

van Gijlswijk RPM, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ (1996) Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J Histochem Cytochem* **44**:389-392

van Gijlswijk RPM, Zijlmans HJMAA, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: Use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* **45**:375-382

Van heusden J, de Jong P, Ramaekers F, Bruwiere H, Borgers M, Smets G (1997) Fluorescein-labeled tyramide strongly enhances the detection of low bromodeoxyuridine incorporation levels. *J Histochem Cytochem* **45**:315-319

Van Oss CJ (1994) *Immunochemistry*. (Van Oss CJ, Van Regenmortel MHV, ed.) M. Dekker, New York

Van Tine BA, Knops JF, Butler A, Deloukas P, Shaw GM, King PH (1998) Localization of HuC (ELAVL3) to chromosome 19p13.2 by fluorescence in situ hybridization utilizing a novel tyramide labeling technique. *Genomics* **53**:296-299

Velez-Granell CS, Arias AE, Torres-Ruiz JA, Bendayan M (1994) Molecular chaperones in pancreatic tissue: Presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells. *J Cell Science* **107**:539-549

Verwoerd NP, Hennink EJ, Bonnet J, van der Geest CRG, Tanke HJ (1994) Use of ferro-electric liquid crystal shutters for time-resolved fluorescence microscopy. *Cytometry* **1**:113-117

Wang BL, Larsson LI (1985) Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immuno-gold staining. *Histochemistry* **83**:47-56

Werner M, von Wasielewski R, Komminoth P (1996) Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* **105**:253-260

Westerfield WW, Lowe C (1942) The oxidation of p-cresol by peroxidase. *J Biol Chem* **145**:463-470

Wilson MR, Easterbrook-Smith SB (1993) Enzyme complex amplification: A signal amplification method for use in enzyme immunoassays. *Anal Biochem* **209**:183-187

Wood GS, Warnke R (1981) Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* **29**:1196-1204

Yokota S (1988) Effect of particle size on labeling density for catalase in protein A-gold immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **36**:107-109

Zaitso K, Ohkura Y (1980) New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: Rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Analyt Biochem* **109**:109-113

Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R (1997) Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-nanogold, and silver acetate autometallography. *Am J Pathol* **150**:1553-1561

Zotikov AA, Polyakov YS (1977) The use of the phosphorescence microscope for study of the phosphorescence of various cells. *Microsc Acta* **79**:415-418

Zsigmondy R (1905) *Zur Erkenntnisse der Kolloide*. G Fischer, Jena

Zsigmondy R, Thiessen PA (1925) *Das Kolloidale Gold*. Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier:

tout particulièrement le docteur Moïse Bendayan pour m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre cette maîtrise, pour avoir su me transmettre sa passion pour la microscopie électronique et pour m'avoir permis de travailler au sein de son équipe,

le docteur Irène Londoño de l'équipe du docteur Bendayan pour tous ses conseils et son aide dans mon travail quotidien,

Diane Gingras, Michèle Doucet, Kourosch Arshi, Ariel E. Arias, Jean Léveillé, Johanne Chaîney, Michel Lauzon, Paul Luckawecki et Monique Leroux, du département de pathologie et biologie cellulaire, pour leurs expertises, leurs conseils et l'amitié qu'ils m'ont prodigué depuis plusieurs années,

le docteur Lucian D. Ghitescu, également du département de pathologie et biologie cellulaire, pour nous avoir aimablement permis d'utiliser ses réactifs chimiques,

Barbara Creary et Serge Picher pour leur gentillesse et leur intérêt,

Pierre Cossette pour sa grande amitié,

le docteur James F. Hainfeld du *Brookhaven National Laboratory* à New York pour son implication dans le projet d'amplification avec le Nanogold, pour ses conseils et sa gentillesse,

le docteur Frederic R. Furuya de la compagnie Nanoprobes à New York pour les complexes phénol-Nanogold,

le docteur Patricia Mayer de la compagnie Dupont NEN de Boston pour nous avoir fournis la biotinyl-tyramide,

le docteur Stephen W. Carmichael Président de la *Histochemical Society* pour son support et ses encouragements lors du *Fifth Joint Meeting of the Japan Society for Histochemistry and Cytochemistry and The Histochemical Society* qui s'est tenu à San Diego en 1998,

Histochemical Society pour m'avoir octroyé le prix Ralph D. Lillie de la meilleure présentation effectuée par un étudiant au congrès de la société américaine d'histochimie à San Diego,

le *Consortium for Plasma Science* pour la bourse de voyage qui m'a permis de participer au congrès de *Histochemical Society* à San Diego,

le Conseil de Recherches Médicales du Canada (CRM) pour la bourse qu'il m'a octroyée et son soutien financier,

et la Faculté des études supérieures qui m'a permis d'intégrer le programme de maîtrise en biologie cellulaire.