Mise au point d'anticorps et test panel

LEICA BOND

Lab Meeting: 13/02/2023

Rappel projet

Cohorte NSLC opéré, n > 230

distinct groups based on immune infiltrates

- group A: no/low T/B cell infiltration ("immune desert")
- group B: presence of immune infiltrates (excluded or not).
 - o group B1: immune infiltrated non organized (absence of TLS)
 - o group B2: infiltrated with organized response (presence of TLS).

Les panels

Panel 1: panCK, CD3, CD20, CD23, Ki67 et MECA-79/PNAD

Panel 2: panCK, CD31, aSMA, LYVE1 (ou D2-40), HIF-1a

Anticorps à tester

MECA-79/PNAd (Peripheral Node Adressin): marqueur des HEV (High

Endothelial Venule)

Front Immunol. 2016; 7: 301.

Published online 2016 Aug 9. doi: 10.3389/fimmu.2016.00301

PMCID: PMC4977569

PMID: 27555845

Biosynthesis and Functional Significance of Peripheral Node Addressin in Cancer-Associated TLO

Aliyah M. Weinstein¹ and Walter J. Storkus^{1,2,3,*}

- **CD31/PECAM** (Platelet Endothelial cell adhesion molecule) : marqueur des cellules endothéliales principalement

Cell Mol Immunol. 2020 Jun; 17(6): 570-575.

Published online 2020 May 15. doi: 10.1038/s41423-020-0457-0

PMCID: PMC7264315

PMID: <u>32415259</u>

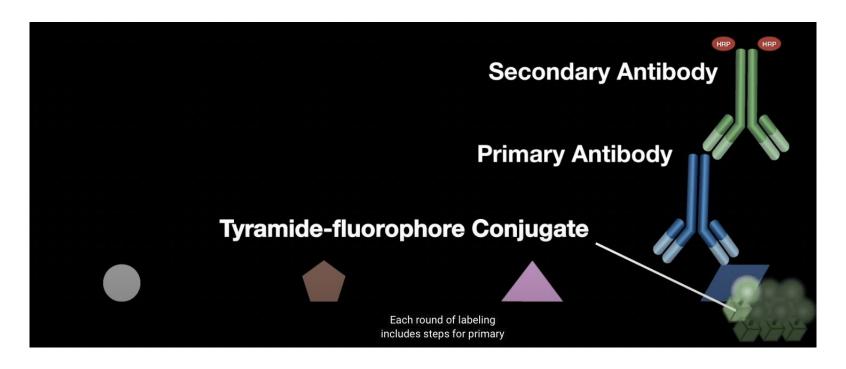
→ marqueur associé au

TLS

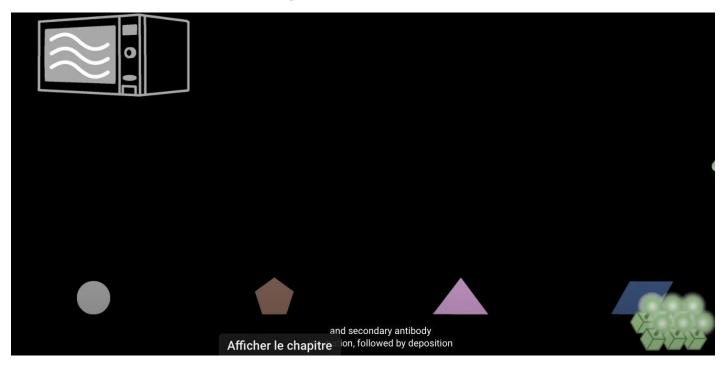
Tertiary lymphoid structures in cancer – considerations for patient prognosis

Antigène

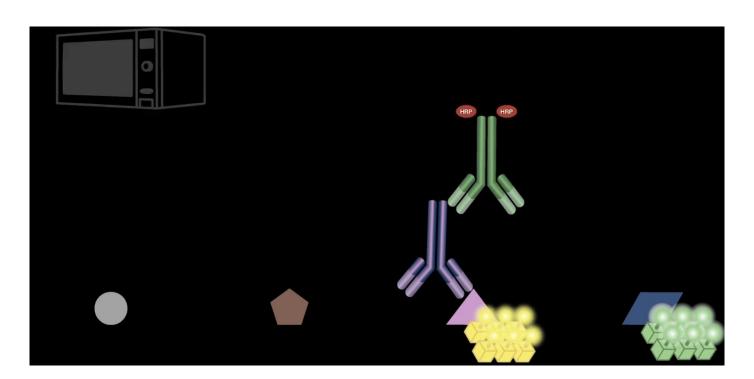
Antigène reconnu par un anticorps



Antigen Retrieval (AR) par chauffage



Ainsi de suite



- 1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique
- 2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND
- 3. Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)
- 4. Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND

- 1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique
- 2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND
- Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)
- Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND

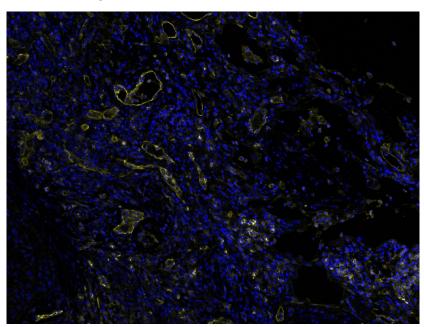
- 1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique → OK
- 2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND → Jusqu'à 2AR (Antigen Retrieval) pour CD31 et jusqu'à 4AR pour PNAd
- 3. Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)
- 4. Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND

- 1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique
- 2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND

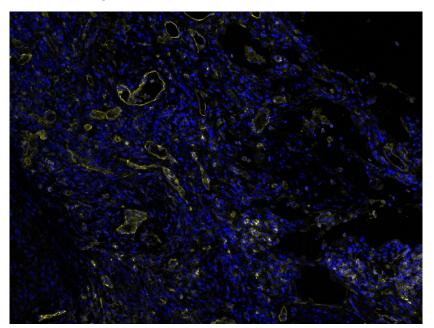
3. Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)

 Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND

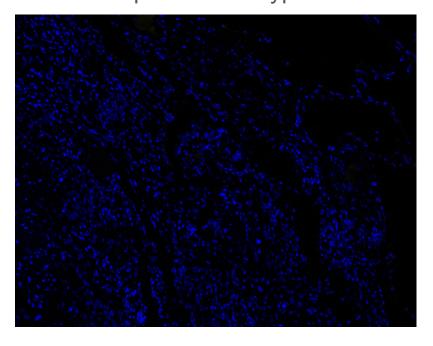
Opal 570 : CD31

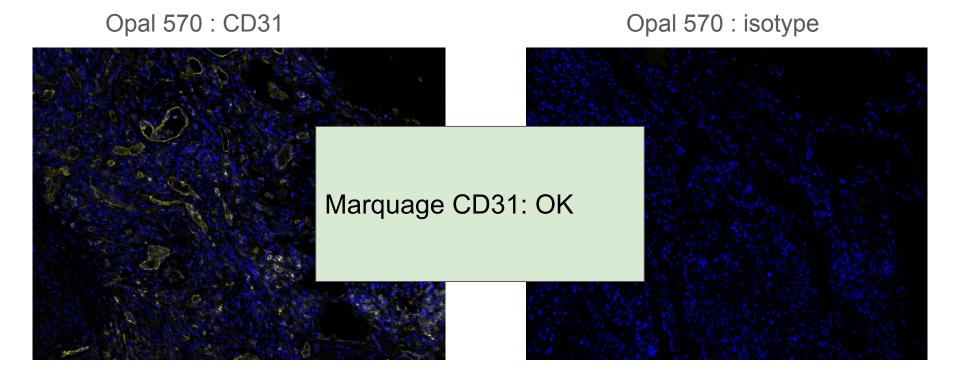


Opal 570 : CD31

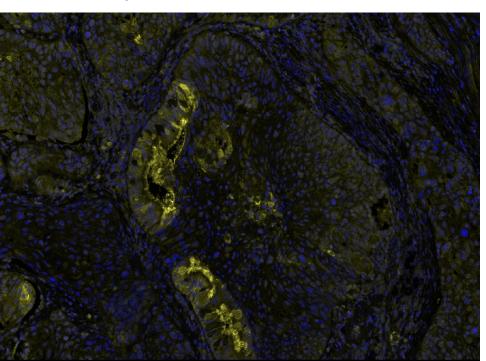


Opal 570: isotype

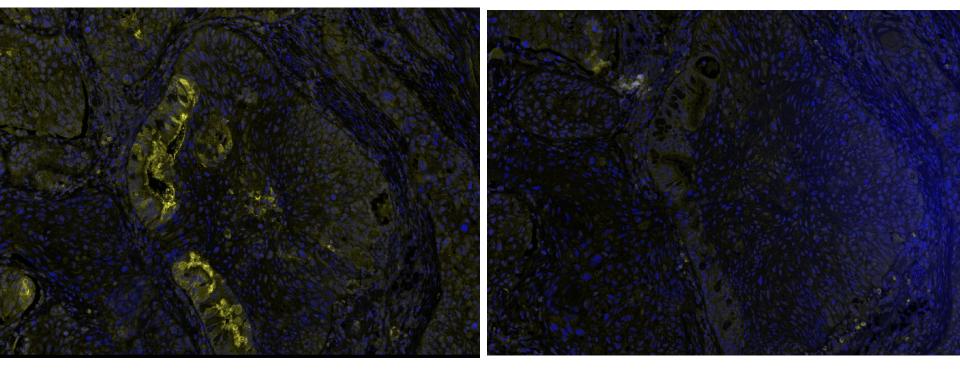




Opal 570 : PNAd

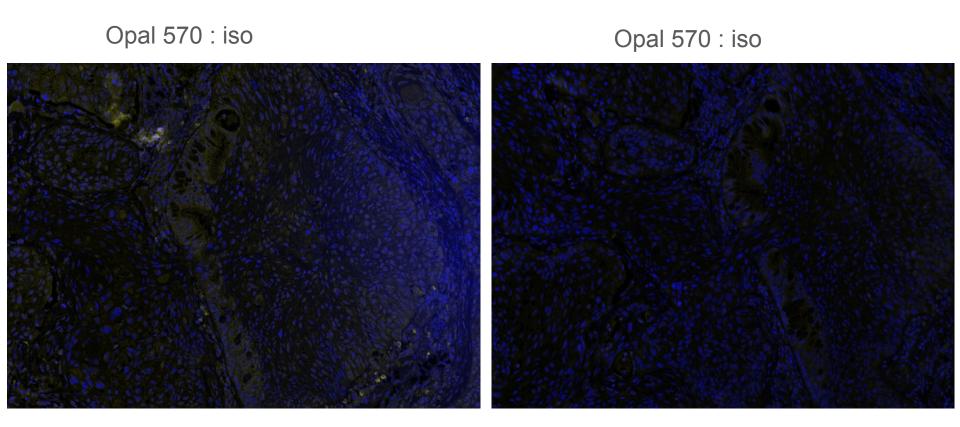


Opal 570 : PNAd Opal 570 : iso



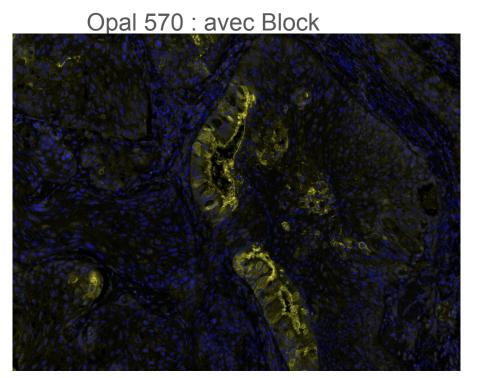
Opal 570: PNAd Opal 570 : iso Marquage PNAd: visible mais trop de bruit de fond...

Comme PNAd est rat anti-human, rajout d'une étape de Blocking

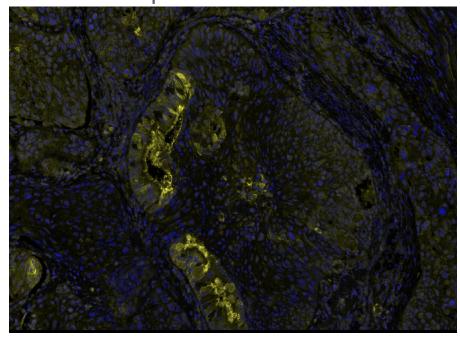


Opal 570 : iso Opal 570 : iso (avec Block)

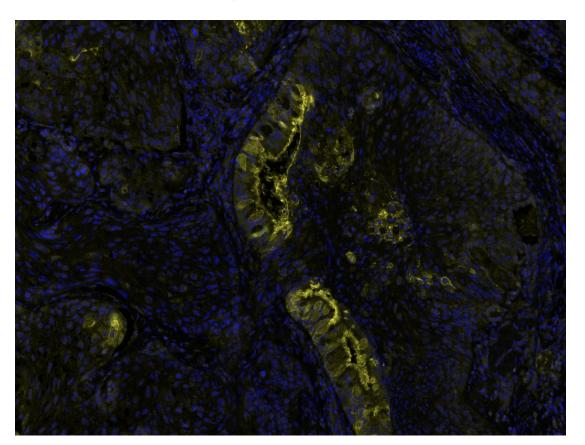




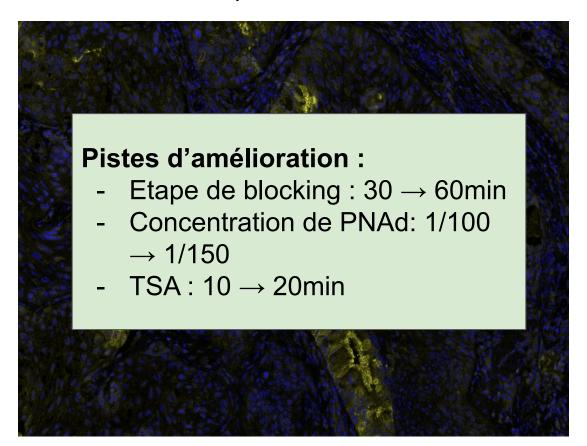
Opal 570 : sans Block



IF (ImmunoFluorescence) - PNAd Opal 570 : avec Block



Opal 570: avec Block



- 1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique
- 2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND
- Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)

4. Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND

Panel 1: panCK, CD3, CD20, CD23, Ki67 et MECA-79/PNAD

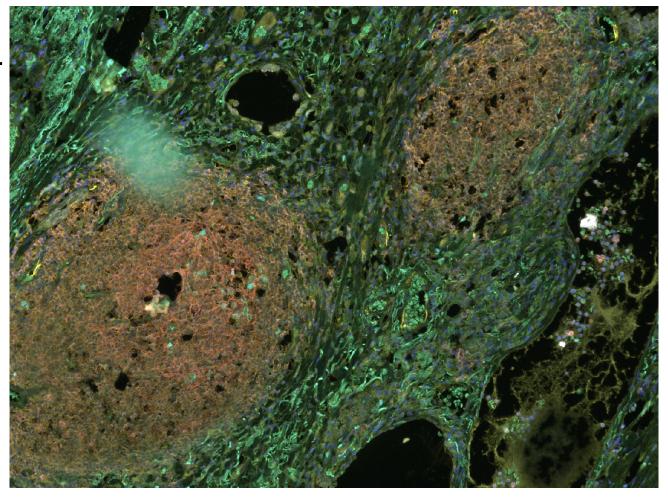
Ordre du panel

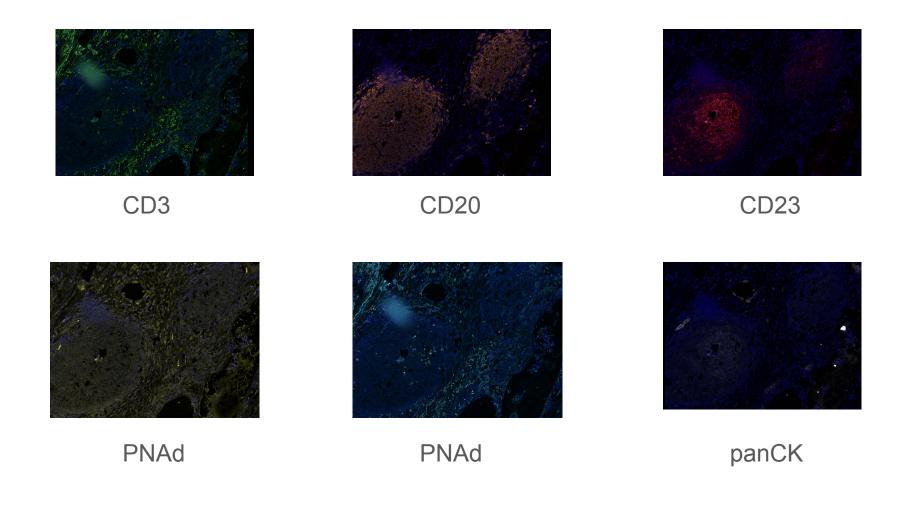
1AR	CD3						
2AR		CD20					
3AR			CD23				
4AR				PNAd			
5AR					Ki67		
6AR						panCK	
7AR							DAPI

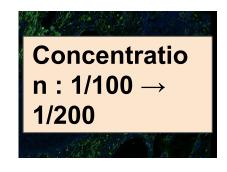
Ordre du panel et Opal/TSA associé

1AR	CD3	Opal 520					
2AR		CD20	Opal 620				
3AR			CD23	Opal 690			
4AR				PNAd	Opal 570		
5AR					Ki67	Opal 420	
6AR						panCK	Opal 780
7AR							DAPI

PANEL







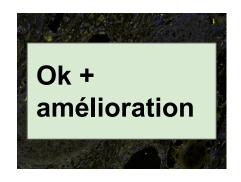
CD3



CD20



CD23



PNAd



Ki67

refaire la manip (petite quantité, erreur ?)

panCK

PANEL



- 1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique
- 2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND
- Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)
- Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND
- 5. Confirmer les résultats du multiplex sur du simplex dans les mêmes conditions

Merci d'avoir écouté

