

Mise au point d'anticorps

LEICA BOND

Lab Meeting: 06/02/2023

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 Addressin) : 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. Weinstein](#)¹ 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: [32415259](#)

→ marqueur associé au
TLS

Tertiary lymphoid structures in cancer – considerations for patient prognosis

[Luis Munoz-Erazo](#),¹ [Janet L. Rhodes](#),¹ [Valentine C. Marion](#),² and [Roslyn A. Kemp](#)^{✉1}

Étapes de la validation d'un panel d'IHC

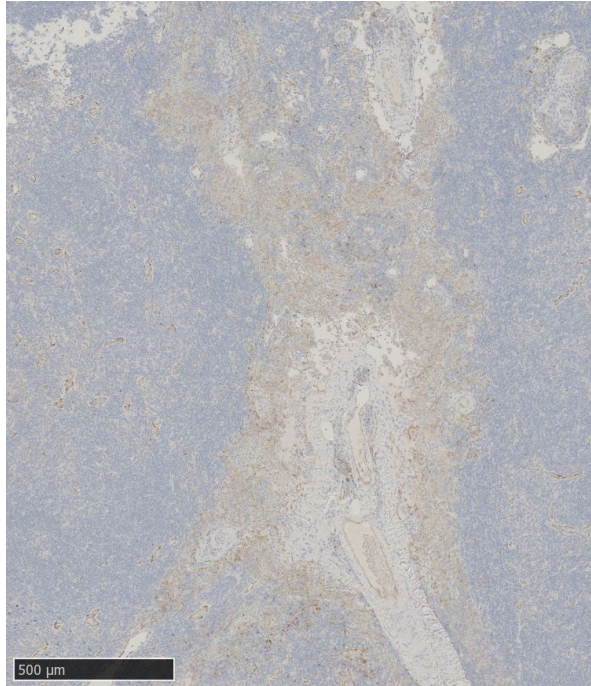
1. Validation manuelle des anticorps en chromogénique
2. Test de position des anticorps en chromogénique au LEICA BOND
3. Validation des anticorps en fluorescence au LEICA BOND (système TSA/OPAL)
4. Ordre du panel et choix des OPAL pour chaque anticorps → Test sur le LEICA BOND

Étapes de la validation d'un panel d'IHC

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

Validation manuelle des anticorps - CD31

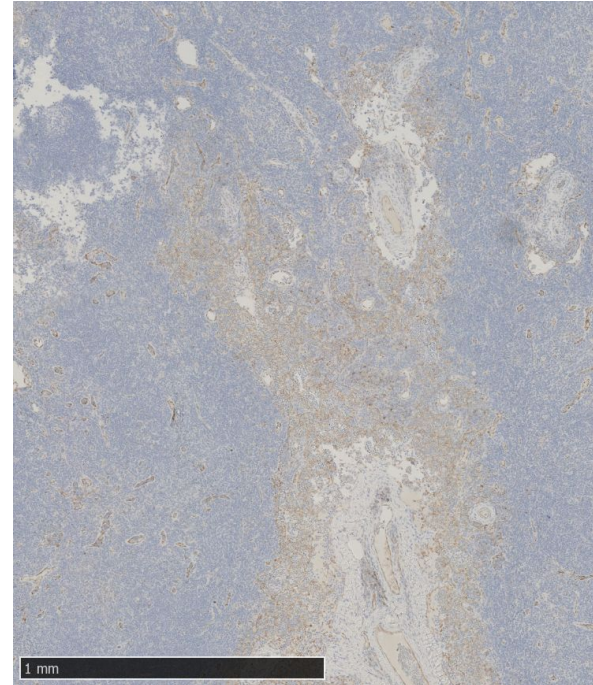
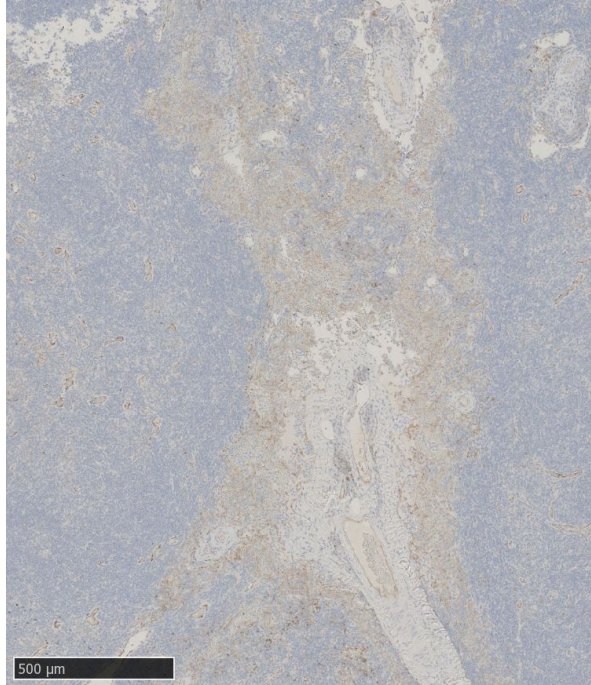
marquage assez faible, passage de la concentration du 1/500 au 1/200



ganglion

Validation manuelle des anticorps - CD31

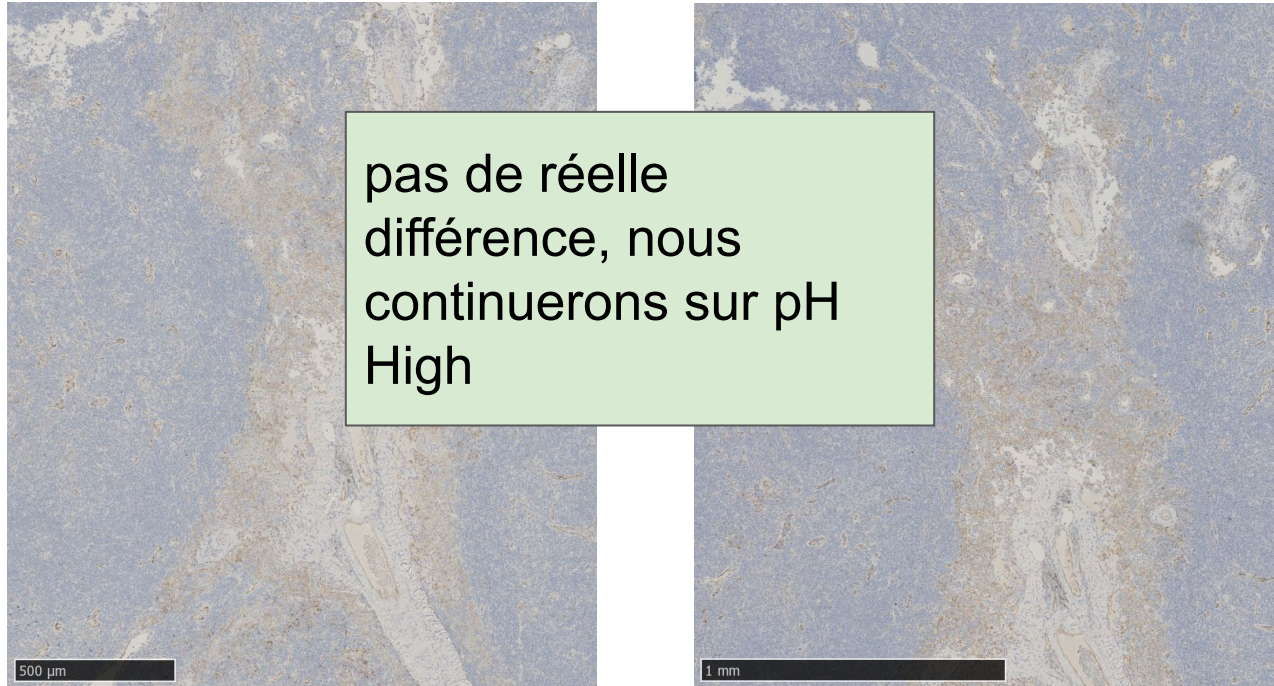
pH Low vs pH High



ganglion

Validation manuelle des anticorps - CD31

pH Low vs pH High



ganglion

Étapes de la validation d'un panel d'IHC

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

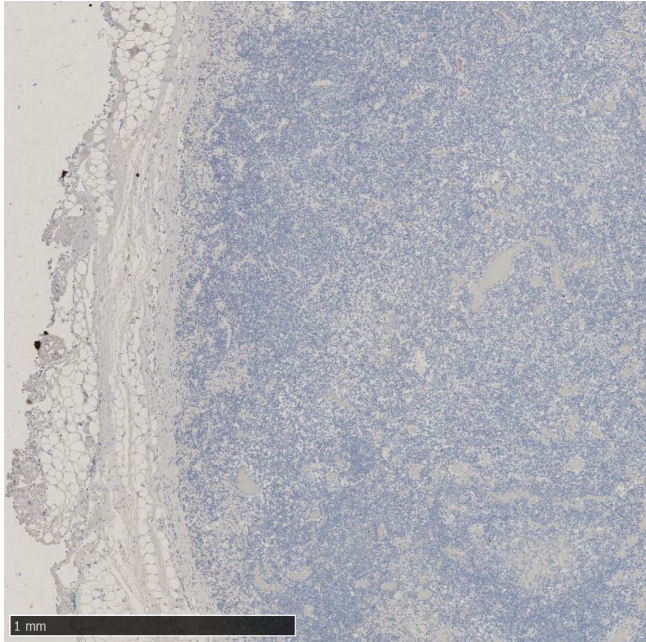
Test de position - CD31

		Rack 1		Rack 2		Rack 3
1AR						
2AR		CD31				
3AR						
4AR				CD31		
5AR						
6AR						CD31

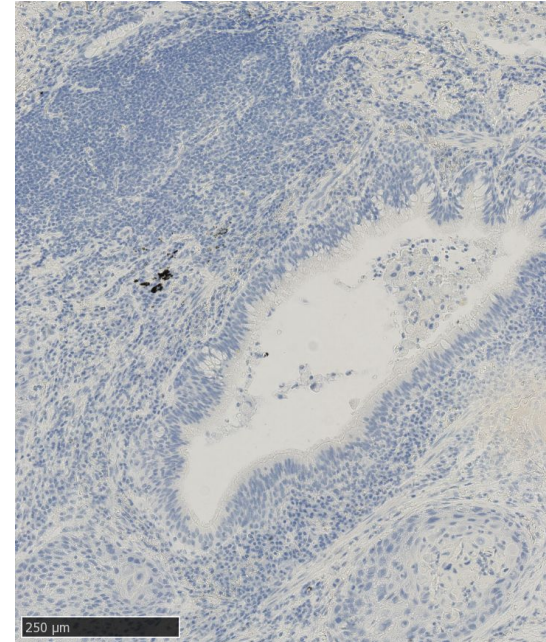
Test de position - CD31

dilué au 1/200

2AR - ganglion



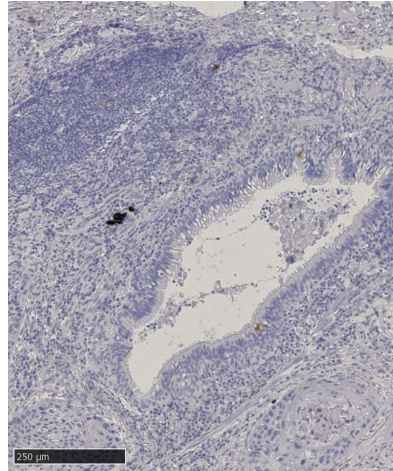
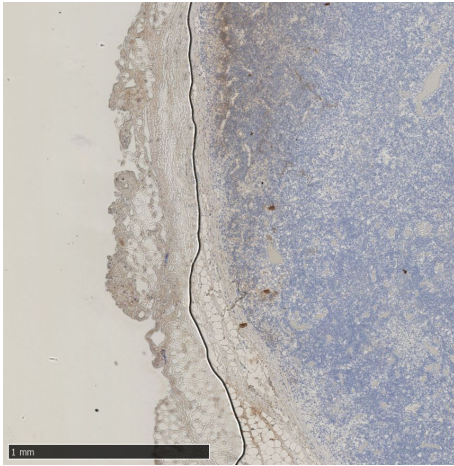
2AR - poumon



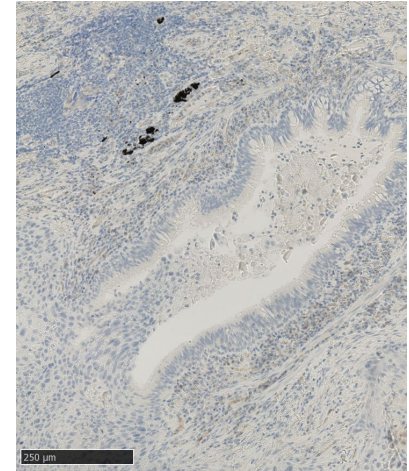
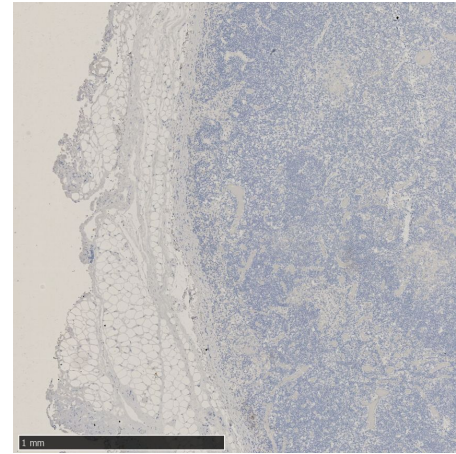
Test de position - CD31

dilué au 1/200

4AR - ganglion & poumon



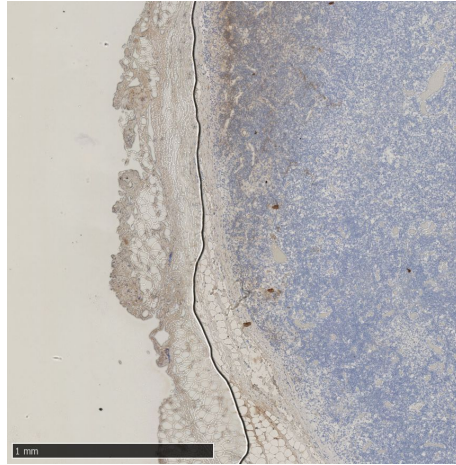
6AR - ganglion & poumon



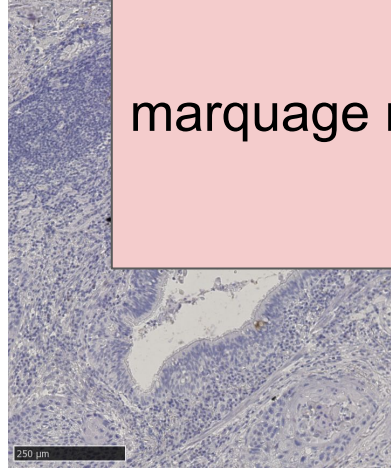
Test de position - CD31

dilué au 1/200

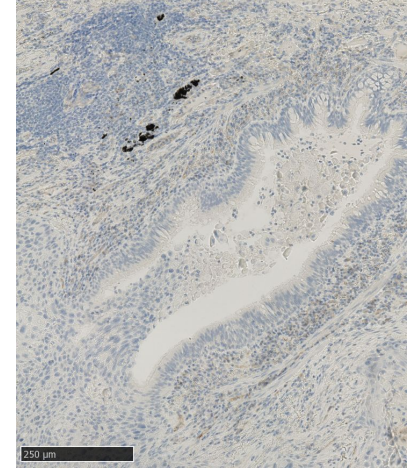
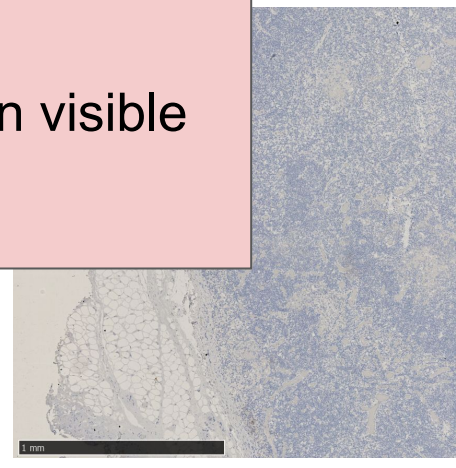
4AR - ganglion & poumon



6AR - ganglion & poumon



marquage non visible



Test chauffe - CD31

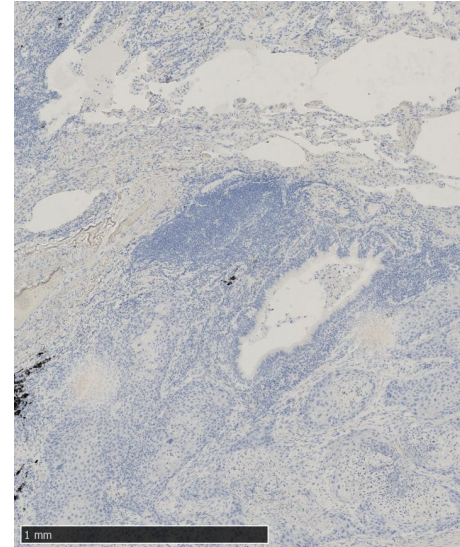
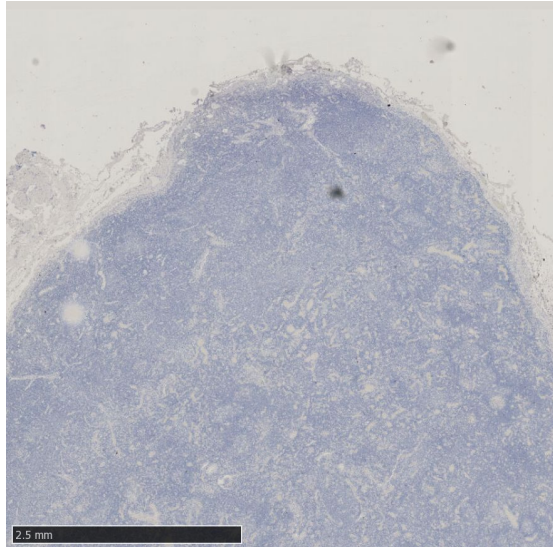
dilué au 1/**100**

Incubation des anticorps primaire à 37°C à 30min vs 60min

Test chauffe - CD31

dilué au 1/100

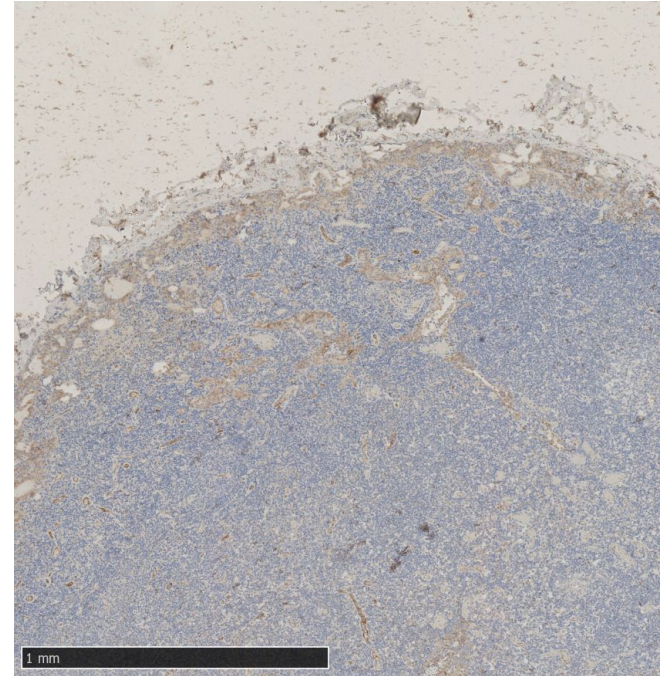
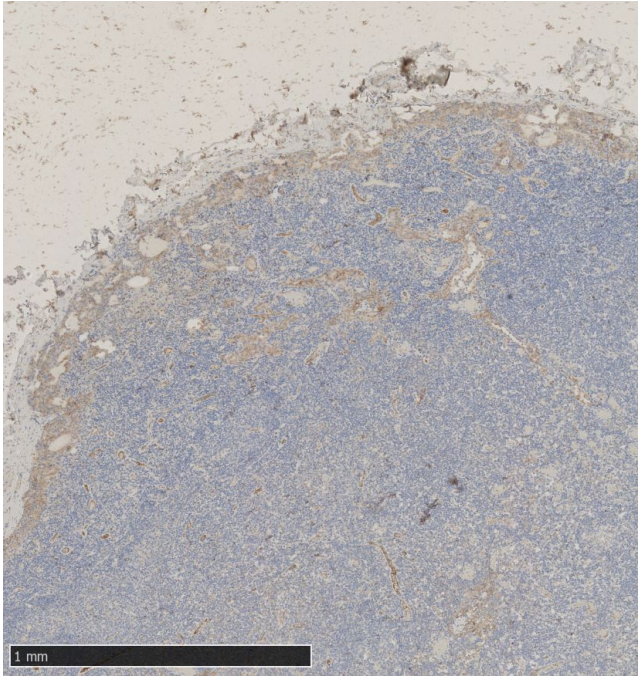
Incubation des anticorps primaire à 37°C à 30min vs 60min
isotype ganglion & poumon à 30 min



Test chauffe - CD31

dilué au 1/100

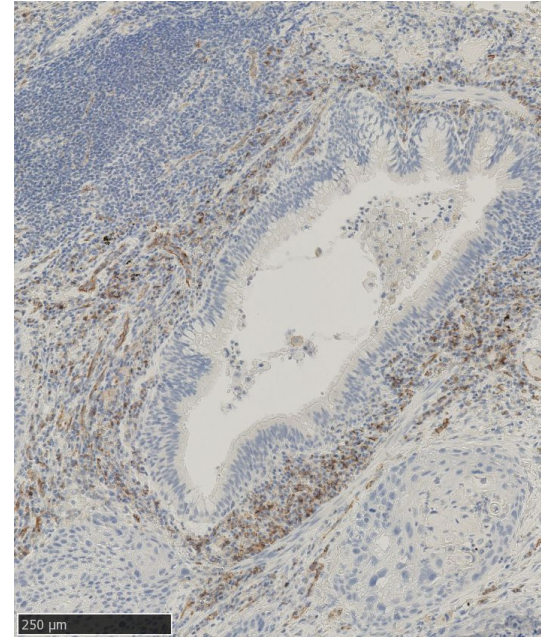
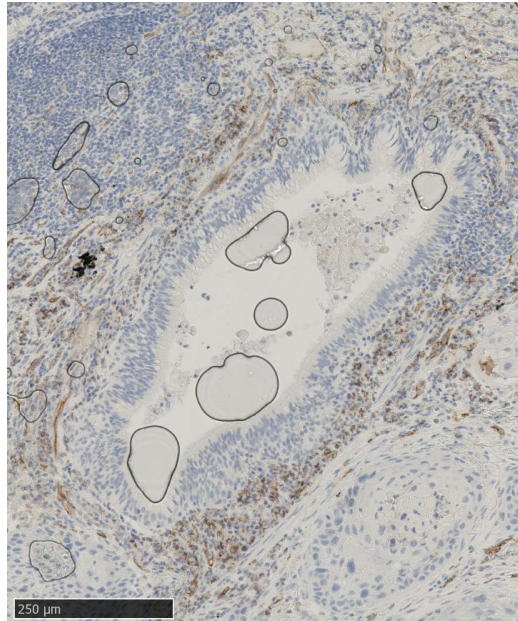
Incubation des anticorps primaire à 37°C à 30min vs 60min
(ganglion) 30 min vs 60 min



Test chauffe - CD31

dilué au 1/100

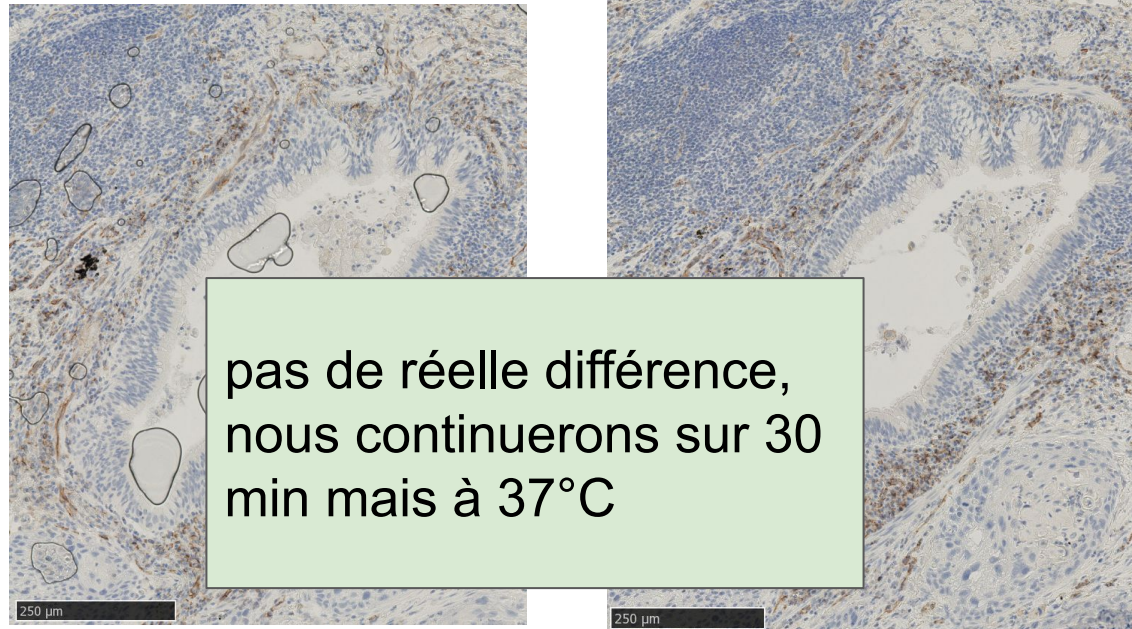
Incubation des anticorps primaire à 37°C à 30min vs 60min
(poumon) 30 min vs 60 min



Test chauffe - CD31

dilué au 1/100

Incubation des anticorps primaire à 37°C à 30min vs 60min
(poumon) 30 min vs 60 min



Nouveau test de position - CD31 (lames non scannées)

2AR - problème technique (lames essuyés du côté tissu)

4AR et 6AR - signal trop faible

Nouveau test de position - CD31 (lames non scannées)

2AR - problème technique (lames essuyés du côté tissu)

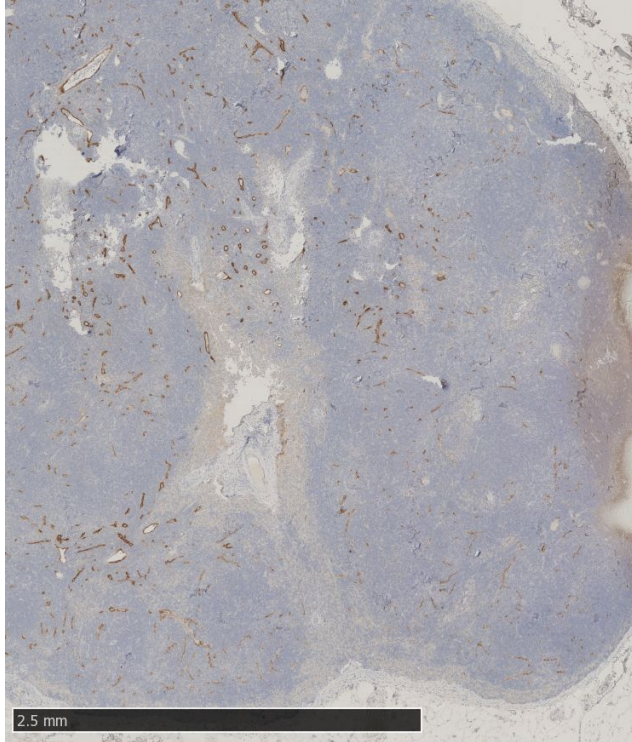
4AR et 6AR - signal trop faible

1AR						
2AR		CD31				
3AR						
4AR				CD31		
5AR						
6AR						CD31

Étapes de la validation d'un panel d'IHC

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

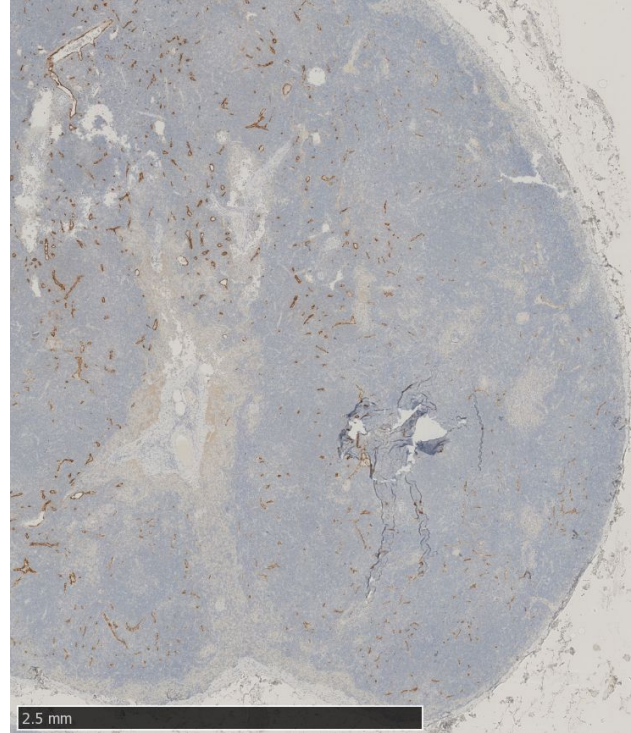
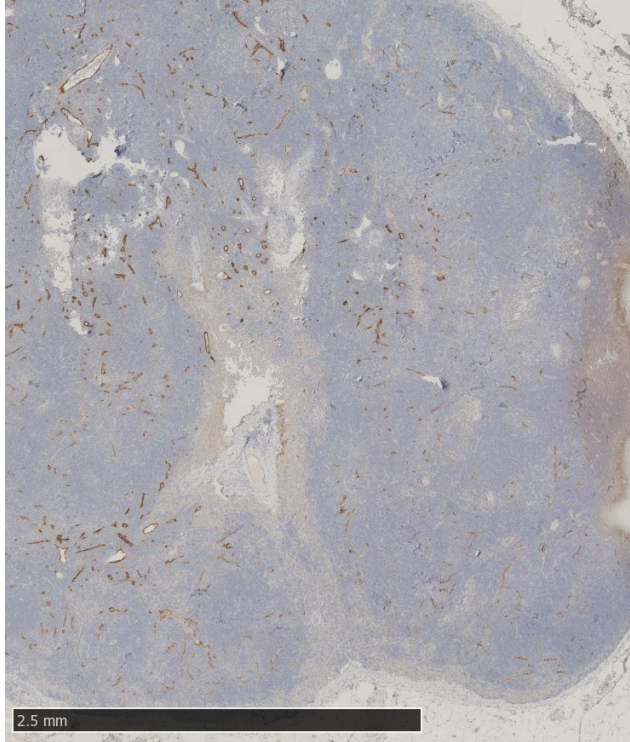
Validation manuelle des anticorps - PNAd



ganglion

Validation manuelle des anticorps - PNAd

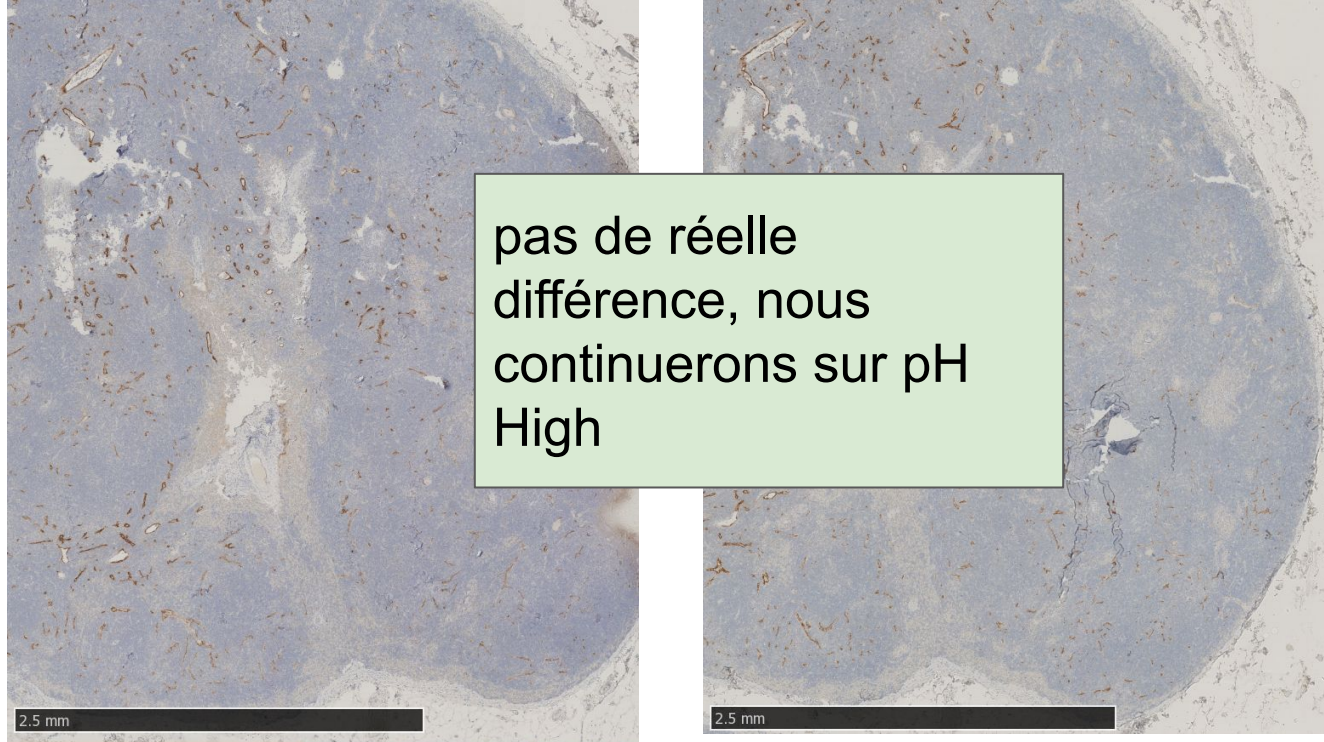
pH High vs Low



ganglion

Validation manuelle des anticorps - PNAd

pH High vs Low



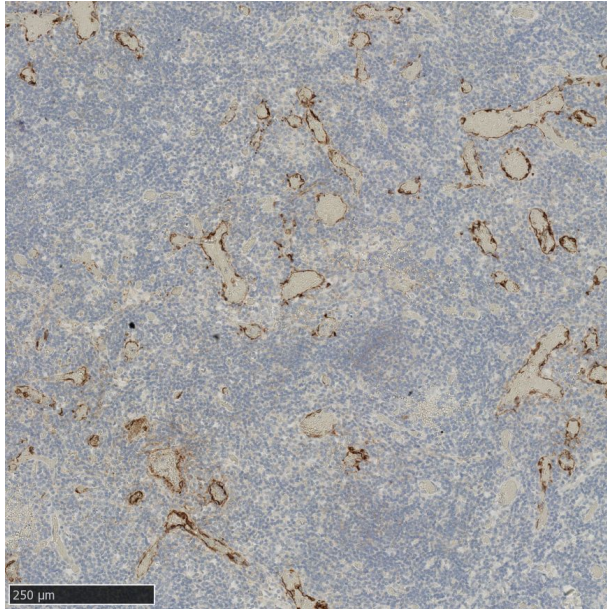
ganglion

Test de position - PNAd

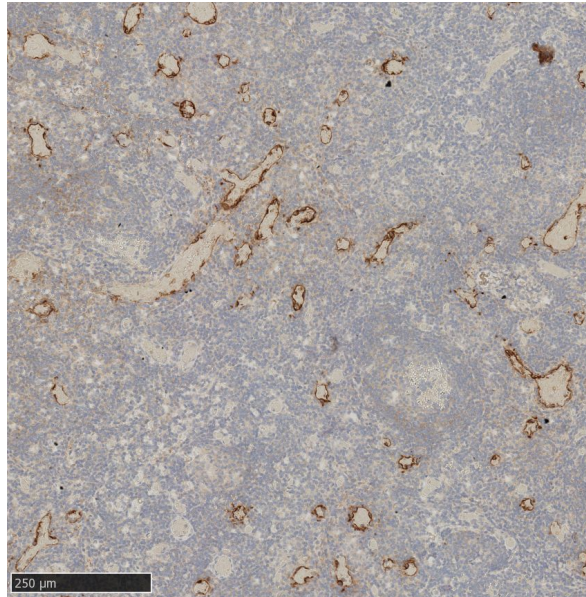
		Rack 1		Rack 2		Rack 3
1AR						
2AR		PNAd				
3AR						
4AR				PNAd		
5AR						
6AR						PNAd

Test de position - PNAd

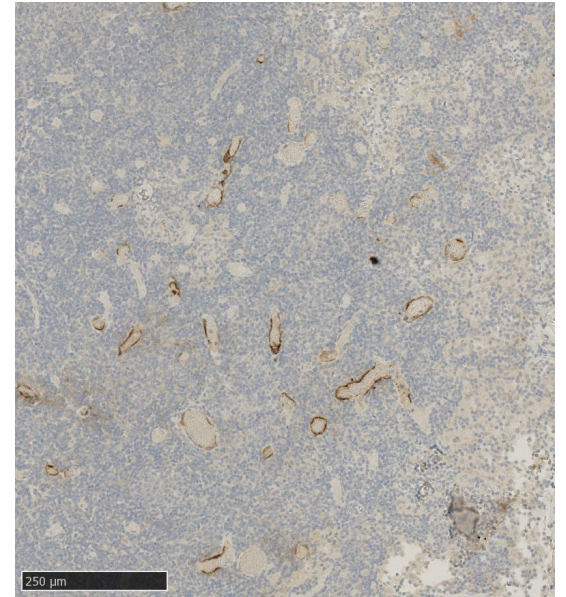
2AR - ganglion



4AR - ganglion

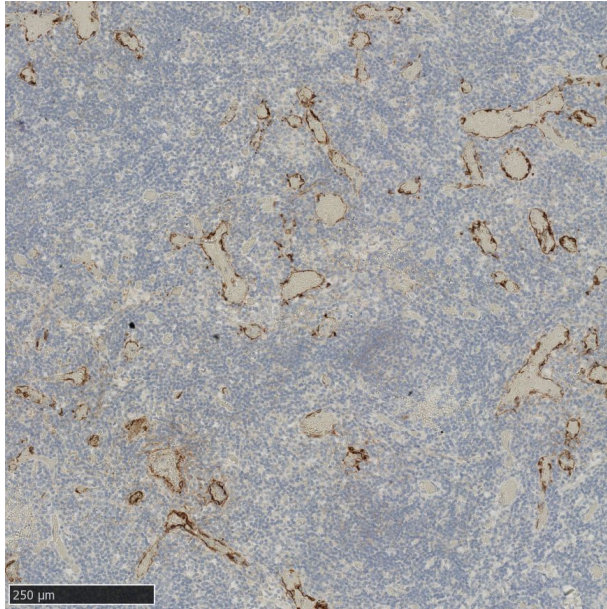


6AR - ganglion

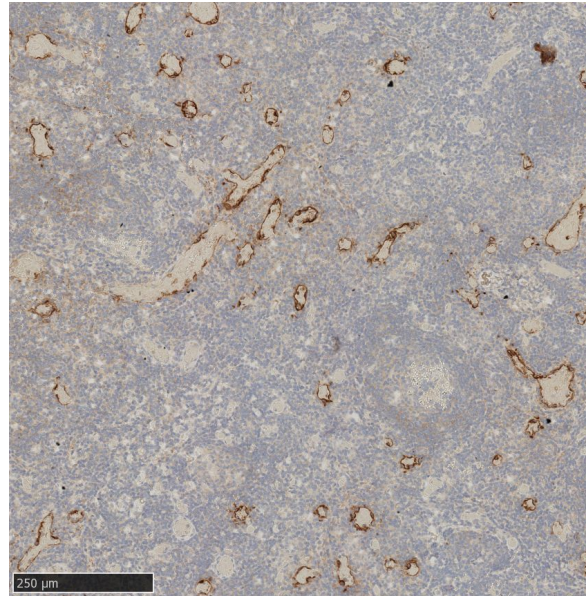


Test de position - PNAd

2AR - ganglion



4AR - ganglion



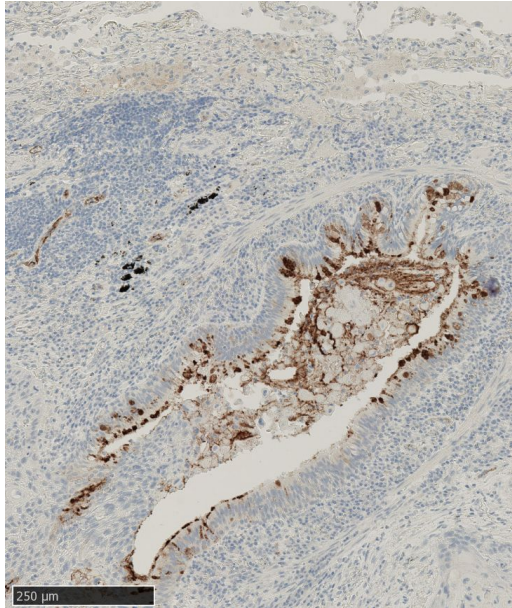
6AR - ganglion



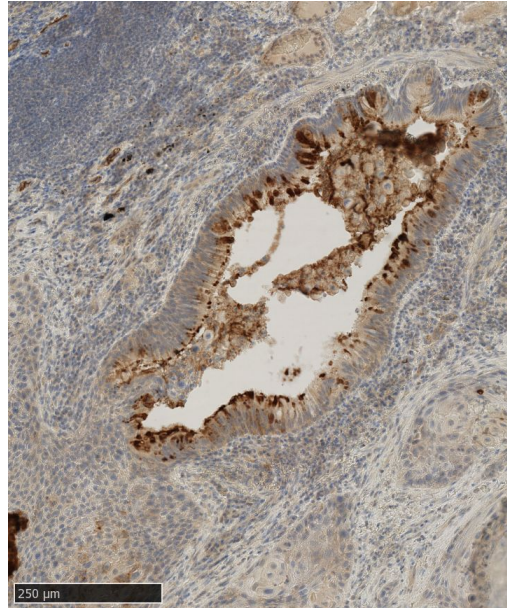
2AR et 4AR,
marquage visible

Test de position - PNAd

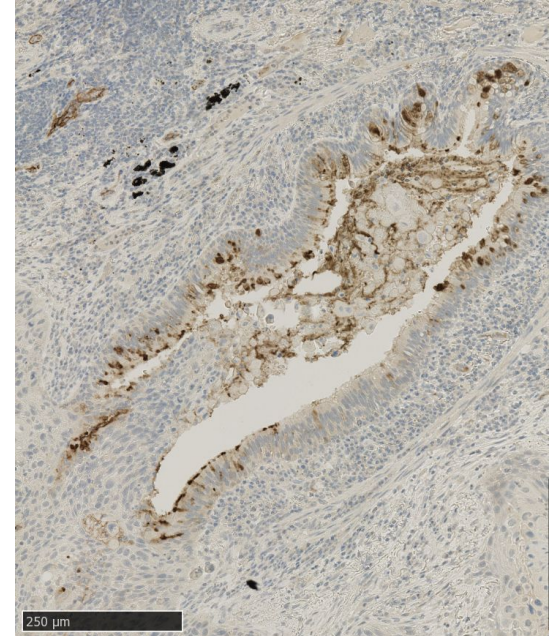
2AR - poumon



4AR - poumon

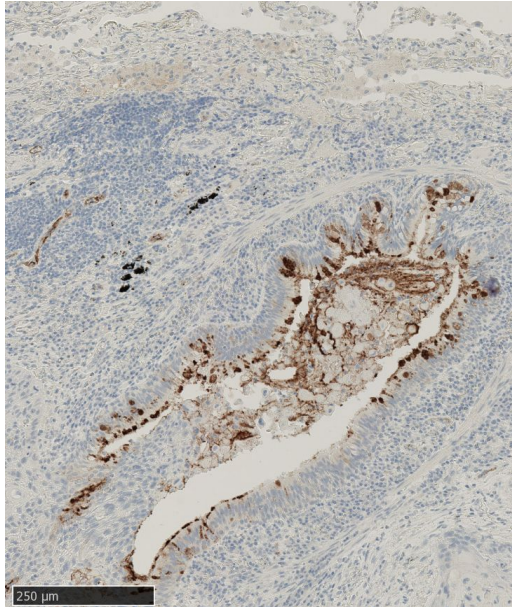


6AR - poumon

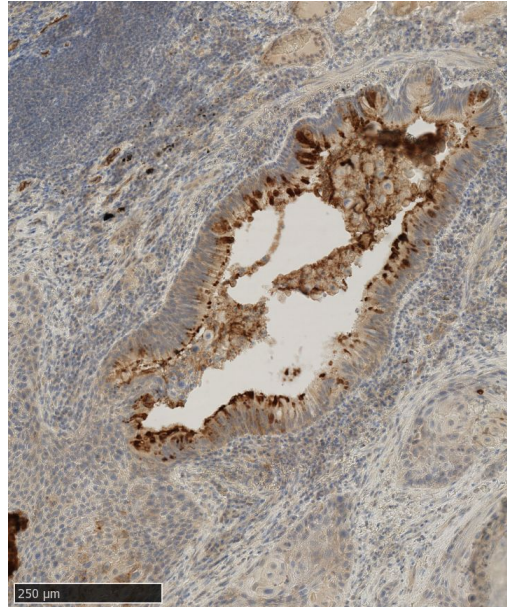


Test de position - PNAd

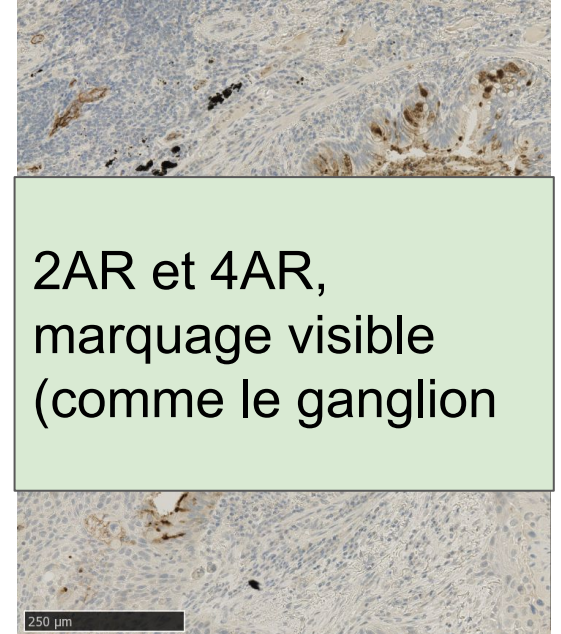
2AR - poumon



4AR - poumon



6AR - poumon



2AR et 4AR,
marquage visible
(comme le ganglion)

Test de position - PNAd

1AR						
2AR		PNAd				
3AR						
4AR				PNAd		
5AR						
6AR						PNAd

Étapes de la validation d'un panel d'IHC

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

Étapes de la validation d'un panel d'IHC

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**

Merci d'avoir écouté

