

VALIDATION D'ANTICORPS RECOMBINANTS EN HISTOLOGIE : UNE ALTERNATIVE ÉTHIQUE SANS COMPROMIS SUR LA QUALITÉ SCIENTIFIQUE

DEMY Doris Lou ^{1,2*}, PIROT Nelly ^{3,4*}, BROYON Morgane ^{3,4}, LE BERT Marc ^{1,5},
GOMEZ Susana ^{1,2}, LEGRAND Véronique ^{1,2}, DORSCHNER Stéphane ^{1,6},
SOTIROPOULOS Athanassia ^{1,2,7#}, BENCSIK Anna ^{8#}

¹ GIS FC3R, École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

² Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France

³ IRCM, Univ. Montpellier, ICM, INSERM, Montpellier, France

⁴ BCM, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

⁵ CNRS, UMR7355, Orléans - France

⁶ CEA, France

⁷ U1016, Institut Cochin, Paris - France

⁸ Université Lyon 1, Anses Laboratoire de Lyon, Lyon, France

* co-premiers auteurs

co-derniers auteurs

Auteurs correspondants : doris-lou.demy@fc3r.com ; nelly.pirot@inserm.fr

OPEN ACCESS 

Received: December 3, 2025

Revised: May 13, 2026

Accepted: May 19, 2026

Published: June, 2026

 CC BY-NC 4.0

© Association Française d'Histotechnologie 2026

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non-commercial purposes, provided the original work is properly cited and the authors are credited.

doi.org/10.25830/afh.rfh.2026.38.1.91

VALIDATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES IN HISTOLOGY: AN ETHICAL ALTERNATIVE WITHOUT COMPROMISING SCIENTIFIC QUALITY

ABSTRACT

The use of animal-derived antibodies remains widespread in research – including in histotechnology – despite well-documented ethical concerns (e.g., the use of large numbers of animals, painful procedures) and limitations in scientific robustness (such as batch to batch variability and lack of reproducibility). In contrast, recombinant antibodies, produced *in vitro* from defined sequences, provide more reliable, ethically sound, and ultimately, more cost-effective alternatives. Consequently, since 2020, both European (EURL ECVAM, the European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) and French (CNREEA, the National Committee for Ethical Reflection on Animal Experimentation) committees have advocated a transition towards the use of these recombinant antibodies whenever feasible.

The French Centre for the 3Rs (FC3R) seeks to promote and implement the 3Rs principle (Replacement, Reduction, Refinement of animal testing) in France by fostering responsible and innovative research, education and transparent communication. To support researchers in the transition from using animal-derived antibodies to *in vitro*- produced 'recombinant' alternatives, the FC3R has launched, in collaboration with the French Association of Histotechnology (AFH), a study involving a network of French histology platforms.

The first phase of this study was conducted in partnership with the AFH and involved the development and dissemination of a survey targeting French histology platforms. The aim was to identify the antibodies most commonly used, as well as the conditions under which they are employed. A total of twelve platforms responded, reporting 36 antibodies considered 'to be replaced'. Among these, 61% were polyclonal and 25% monoclonal, some of which are produced using ascites fluid, a severe procedure associated with significant animal suffering. Interestingly, five of the antibodies identified were already recombinant, highlighting the need for improved transparency in the communication and labeling of recombinant antibodies, including by suppliers.

Since late 2024, a pilot study has been underway at sites selected from the survey with the aim of comparing the performance of usual polyclonal and monoclonal antibodies to that of their recombinant counterparts. Funded by the FC3R, this initiative covers both the procurement of recombinant antibodies and the technical services provided by the participating platforms. The preliminary results are highly encouraging: effective recombinant alternatives have been successfully identified for the detection of CD3, CD31, GFAP, GFP, CHGA, Occludin, KRT14 and Ki67. In this article, comparative analyses of anti-GFP antibodies from Abcam and CST are presented as a case study to illustrate both the methodology and the outcomes. The complete set of results will be widely disseminated, particularly via the FC3R website and the AFH network, in order to raise awareness within the scientific community and to support the transition toward more robust and ethically responsible practices.

KEY WORDS

Antibodies, Histology, Immunostaining, *In vitro* production, Recombinant, Replace Reproducibility, 3Rs.

RÉSUMÉ

L'utilisation d'anticorps produits chez des animaux reste très courante en recherche - notamment en histotechnologie - en dépit d'enjeux éthiques majeurs (grand nombre d'animaux, procédures potentiellement douloureuses) et des limites scientifiques bien documentées (comme par exemple la variabilité entre lots, le manque de reproductibilité). Des alternatives recombinantes, produites *in vitro* à partir de séquences connues, offrent pourtant aujourd'hui des solutions plus fiables, plus éthiques, et à terme, plus économiques. C'est pourquoi des comités européen (EURL ECVAM laboratoire de référence européen pour les alternatives aux tests animaux) et français (CNREEA, comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale) préconisent, depuis 2020, la transition vers ces anticorps recombinants chaque fois que cela est possible.

Dans ce contexte, le Centre Français pour les 3R (FC3R) a pour mission de promouvoir la mise en œuvre du principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner l'expérimentation animale) en soutenant une recherche responsable et innovante, l'éducation et une communication transparente. Afin d'accompagner les acteurs de la recherche dans une transition visant à remplacer l'utilisation d'anticorps d'origine animale par des anticorps recombinants produits *in vitro*, le FC3R a engagé une étude en collaboration avec l'Association Française d'Histotechnologie (AFH) mobilisant des plateformes d'histologie françaises.

La première phase de ce travail, conduite en partenariat avec l'AFH, a consisté à élaborer et diffuser un questionnaire à destination des plateformes d'histologie françaises, afin d'identifier les anticorps les plus couramment utilisés ainsi que leurs conditions d'utilisation. Douze plateformes ont répondu à cette enquête, listant 36 anticorps « à remplacer ». Parmi eux, 61 % étaient polyclonaux, particulièrement problématiques en termes de reproductibilité et d'impact éthique, et 25 % monoclonaux, certains produits par liquide d'ascite, une méthode reconnue comme sévère pour les animaux. De manière notable, 5 anticorps listés étaient déjà recombinants, révélant un manque de visibilité de cette qualité et soulignant la nécessité d'une meilleure transparence dans la communication et l'étiquetage des anticorps recombinants, y compris par les fournisseurs.

Depuis fin 2024, une étude pilote est menée au sein de plateformes issues de l'enquête afin de comparer les performances des anticorps usuels polyclonaux et monoclonaux avec leurs équivalents recombinants. Financée par le FC3R, elle couvre l'acquisition des anticorps recombinants ainsi que les prestations techniques des plateformes. Les premiers résultats sont très encourageants : des alternatives recombinantes efficaces ont été identifiées pour la détection de CD3, CD31, GFAP, GFP, CHGA, Occludine, KRT14 et Ki67. Dans le présent article à travers l'exemple d'études comparatives des anticorps Abcam et CST anti-GFP, nous illustrons la démarche et les résultats. L'ensemble des résultats sera largement diffusé, notamment sur le site web du FC3R et le réseau de l'AFH, afin de sensibiliser la communauté et d'accompagner la transition vers des pratiques plus robustes et plus responsables sur le plan éthique.

KEY WORDS

Anticorps, Histologie, Immunomarquages, Production *in vitro*, Recombinant, Remplacer, Reproductibilité, 3R.

INTRODUCTION

Les anticorps constituent des outils essentiels en recherche biomédicale, en diagnostic et en thérapeutique. L'histologie, pilier de la recherche biomédicale et du diagnostic, repose fortement sur leur utilisation pour visualiser des protéines et autres molécules au sein des cellules et des tissus, permettant ainsi de mettre en évidence des structures spécifiques. En Europe, le marché des anticorps de recherche représente un secteur en forte expansion, avec plus de 8,6 millions d'anticorps disponibles commercialement et près de 400 fournisseurs (<https://www.citeab.com/market-data/antibodies-market-reports>, consulté le 16 avril 2026).

Ces réactifs constituent des outils incontournables dans de nombreux domaines scientifiques et biomédicaux, et leur demande ne cesse de croître. Historiquement, la production des anticorps repose majoritairement sur l'immunisation animale, conduisant à la génération d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux [1]. Les anticorps polyclonaux sont obtenus par immunisation d'animaux (souris, lapins, chèvres, etc.), suivie de la collecte de sérum contenant un mélange d'immunoglobulines dirigées contre différents épitopes d'un antigène donné. À l'inverse, les anticorps monoclonaux sont traditionnellement produits via la technologie des hybridomes - décrite par Georges J. F. Köhler et César Milstein lors de la découverte fondatrice ayant conduit au prix Nobel de physiologie ou médecine de 1984 - reposant sur la fusion de lymphocytes B producteurs d'anticorps et de cellules myélomateuses immortalisées.

Malgré l'existence d'alternatives technologiques, la majorité des anticorps utilisés en recherche demeure encore aujourd'hui produite par immunisation d'animaux de différentes espèces [2], un processus qui conduit au sacrifice estimé d'environ 1 million d'animaux par an dans l'Union européenne [3]. Ce chiffre issu des recommandations de l'EURL ECVAM (laboratoire de référence européen pour les alternatives aux tests animaux), s'inscrit dans un contexte de procédures reconnues comme potentiellement douloureuses et sources de souffrance animale.

Bien que les espèces principalement concernées - souris, rats, lapins et animaux de grande taille - ainsi que le rôle prépondérant des anticorps polyclonaux soient clairement identifiés dans la littérature, aucune donnée statistique publique ne permet à ce jour d'établir une répartition quantitative précise par espèce ou par type d'anticorps. En effet, les statistiques de l'Union européenne (Directive 2010/63) regroupent les animaux par finalité (recherche, production, enseignement), sans distinguer spécifiquement la

production d'anticorps par espèce, les anticorps polyclonaux et monoclonaux sont comptabilisés conjointement dans la catégorie « production biologique ». À cela s'ajoute le caractère confidentiel des données industrielles.

Cependant l'usage des espèces animales dans la production d'anticorps est bien identifié. Les souris sont principalement utilisées pour la génération d'hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux, les rats pour des anticorps monoclonaux et polyclonaux, les lapins - majoritaires en recherche - pour des anticorps polyclonaux, les chèvres, moutons, ânes et chevaux pour des productions de grands volumes d'anticorps polyclonaux ; plus récemment les lamas et alpagas sont de plus en plus employés pour la génération d'anticorps à domaine unique de type VHH (*nanobodies*) [4, 3].

Souvent sous-estimé, le coût éthique massif de la production d'anticorps d'origine animale existe bel et bien et est plutôt bien documenté [5]. La souffrance associée à ces procédures est souvent invisibilisée alors même que la production d'anticorps polyclonaux repose sur des protocoles invasifs impliquant des injections répétées d'antigènes associés à des adjuvants inflammatoires. Ces pratiques provoquent des effets indésirables tels que douleur, abcès, ulcérations, perte de poids et altérations comportementales [6] observés systématiquement chez toutes les espèces concernées, bien que leur expression varie selon les modèles animaux (lagomorphes, caprins et ovins,...). À ces effets s'ajoutent des prélèvements sanguins répétés constituant des contraintes supplémentaires et cumulatives sur le bien-être animal. Malgré les mesures de raffinement existantes, ces atteintes au bien-être animal demeurent intrinsèques à la méthode et persistent tant que des alternatives non animales ne sont pas adoptées [3].

Au-delà des enjeux éthiques, ce mode de production repose sur des réponses immunitaires animales intrinsèquement variables conduisant à la génération d'anticorps polyclonaux hétérogènes, dont la spécificité, l'affinité et la composition clonale varient d'un lot à l'autre. Chaque lot correspondant à une réponse immunitaire unique, les performances analytiques ne peuvent être strictement reproduites dans le temps. De nombreuses analyses indépendantes ont montré qu'une proportion très importante d'anticorps de recherche commercialisés ne reconnaît pas correctement leur cible ou présente des liaisons hors cible significatives, certaines études estimant que jusqu'à 50 % des anticorps testés sont non spécifiques ou inadaptés à l'application revendiquée [7-10].

Cette faible fiabilité des anticorps polyclonaux, combinée à l'absence fréquente de données de caractérisation robustes et à la variabilité inter-lots, affecte directement la qualité de la recherche en compromettant l'obtention de résultats robustes et reproductibles. Les conséquences pour les laboratoires

et les plateformes d'analyses sont multiples : perte de temps, augmentation des coûts expérimentaux, mobilisation inutile de ressources, fragilisation des conclusions scientifiques et impact potentiel sur des domaines critiques pour la santé publique, tels que le diagnostic et les stratégies thérapeutiques [11].

Face aux limites des anticorps polyclonaux, les dernières décennies ont vu émerger des approches fondées sur des anticorps définis (pour revue voir [12]). Les anticorps monoclonaux issus de la technologie des hybridomes ont constitué historiquement une première réponse majeure à ces enjeux, en permettant l'obtention d'anticorps dirigés contre un épitope unique. Comparativement aux polyclonaux, ces anticorps monoclonaux offrent une meilleure spécificité analytique et une reproductibilité accrue, contribuant ainsi de manière décisive à l'amélioration de la qualité de nombreux travaux de recherche biomédicale [5].

Toutefois, malgré ces avantages, les anticorps monoclonaux produits par hybridomes présentent eux aussi des limites : instabilité génétique des lignées, dérives fonctionnelles au cours du temps, variations entre lots (bien que ces problématiques soient en principe atténuées par le développement de procédures de stabilisation des lignées et de contrôles qualité rigoureux lors des productions, en particulier au sein des entreprises ayant une certification qualité), coexistence possible de plusieurs chaînes fonctionnelles remettant en cause la mono-spécificité supposée de ces anticorps et dépendance persistante à l'immunisation animale. En effet, comme pour les polyclonaux, la production initiale d'hybridomes repose sur l'immunisation animale, celle-ci n'intervenant toutefois qu'au début du processus, ce qui constitue l'un des principaux avantages de cette technologie. Ces éléments soulèvent des enjeux à la fois éthiques et de standardisation biologique [12, 5].

Les anticorps recombinants à séquence définie, produits par des plateformes *in vitro* (*phage display*, *yeast display* ou expression recombinante), permettent de lever la majorité de ces verrous. Leur identité moléculaire est entièrement caractérisée, leur production est indépendante de l'animal et leur reproductibilité intrinsèque, puisque, comme pour les hybridomes monoclonaux, la même séquence peut être exprimée à l'identique indéfiniment.

Ainsi les avancées technologiques actuelles offrent des solutions permettant simultanément d'améliorer la fiabilité, la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité de la recherche, tout en réduisant, voire éliminant le recours à l'animal en cohérence avec les principes des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), formalisés dès 1959 par William Russell et Rex Burch dans le chapitre 4 de leur ouvrage intitulé « *The Principles of Humane Experimental Technique* » (en français, « Les principes des techniques expérimentales humaines ») [13].

L'approche recombinante consiste au i) **remplacement** de l'utilisation d'animaux pour la production d'anticorps, ii) à la **réduction** du nombre d'animaux nécessaires et iii) au **raffinement** des pratiques expérimentales en limitant les procédures invasives. Les avantages et les limites de ces méthodes de production d'anticorps sont synthétisés dans le **Tableau I**.

TYPE D'ANTICORPS	MÉTHODE DE PRODUCTION	AVANTAGES	LIMITES	IMPACT 3R
Polyclonaux	Immunisation animale + Collecte de sérum	Sensibilité élevée Reconnaissance multi-épitopes	Variabilité inter-lots Faible reproductibilité	Impact négatif (nombre important d'animaux + souffrance animale)
Monoclonaux (hybridomes)	Fusion lymphocytes B / myélome	Spécificité élevée Production continue	Dérive cellulaire Parfois production <i>in vivo</i> (ascite)	Impact modéré à sévère (ascites)
Recombinants	Séquençage + Expression <i>in vitro</i> (cellules, <i>phage display</i>)	Reproductibilité Traçabilité Ingénierie facile	Coût initial (<i>nanobody</i>) Adoption limitée	Impact positif (remplacement complet possible)

Tableau I : Synthèse des avantages et limites des méthodologies de production des anticorps et de leur impact vis à vis des 3R.

Pourtant, bien que le remplacement des anticorps d'origine animale par des anticorps recombinants soit possible depuis plus de vingt ans, cette technologie peine encore à s'imposer durablement dans les laboratoires de recherche comme dans ceux des plateformes d'histotechnologie.

Dans le cadre réglementaire de l'Union européenne, l'application de la Directive 2010/63/EU implique que les États membres ne devraient plus autoriser le développement et la production d'anticorps par immunisation animale en l'absence d'une justification scientifique solide et dûment étayée. Or, l'existence, la disponibilité commerciale et la robustesse désormais bien établie des anticorps recombinants fragilisent fortement les différents arguments historiquement avancés en faveur du maintien des anticorps d'origine animale [9]. En cohérence avec ce constat, l'EURL ECVAM recommande depuis 2020 l'abandon du recours aux animaux pour le développement et la production d'anticorps destinés à la recherche, au diagnostic ainsi qu'aux applications réglementaires et thérapeutiques, au profit de méthodes de production alternatives *in vitro* [3]. Cette orientation a été déclinée au niveau national avec la publication, fin 2022, d'une recommandation du Comité national de réflexion éthique sur l'expérimentation animale (CNREEA), adaptée au contexte de la recherche française.

Privilégier les anticorps recombinants lorsque cela est possible, constitue ainsi une démarche responsable, reposant sur l'utilisation d'outils fiables et robustes, tout en contribuant concrètement à la réduction du recours aux animaux élevés à des fins de production de réactifs pour la recherche. Une adoption plus généralisée des anticorps recombinants en recherche s'inscrirait pleinement dans le cadre du principe des 3R et serait une alternative solide aux anticorps d'origine animale pour de nombreuses applications, comme les tests d'immunohistochimie (IHC).

À cet égard, le Centre Français pour les 3R (FC3R) qui a pour mission de promouvoir et d'accompagner la mise en œuvre du principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner l'expérimentation animale) en France, notamment par la valorisation d'une recherche innovante, l'éducation et une communication transparente, a contacté l'Association Française d'Histotechnologie (AFH) en 2024, pour un projet d'implémentation visant à comparer les performances des anticorps usuels polyclonaux et monoclonaux avec leurs équivalents recombinants.

Réalisé en trois étapes avec les plateformes d'histologie françaises membres de l'AFH, il s'appuie sur 1), une enquête nationale, recensant les anticorps les plus usuellement mis en œuvre ainsi que leurs conditions d'utilisation, 2), une étude-pilote de comparaison avec des homologues recombinants et 3), une phase de dissémination des résultats obtenus. Dans le présent article, nous présentons les principes de la démarche mise en œuvre, les modalités de l'enquête nationale conduite, ainsi que les anticorps identifiés, lesquels ont été classés en fonction de leur impact scientifique et de leur pertinence au regard des principes des 3R. Cette étude se focalise sur l'une des cibles ainsi identifiées, la GFP (*Green Fluorescent Protein*), une protéine fluorescente rapportrice dérivée de la méduse *Aequorea victoria* et largement utilisée dans de nombreux modèles expérimentaux, par exemple chez les souris transgéniques. Le gène rapporteur *gfp* permet notamment de suivre des lignées cellulaires ou, lorsqu'il est fusionné à un gène d'intérêt, d'analyser l'expression de ce dernier au sein des cellules et des tissus. La cross-réactivité des anticorps dirigés contre la GFP avec la protéine YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), protéine produite à partir d'un mutant du gène codant la *gfp*, a également été examinée [14]. À travers l'exemple d'études comparatives menées sur des anticorps anti-GFP commercialisés par les fournisseurs Abcam et Cell Signaling Technology (CST), nous illustrons concrètement l'approche méthodologique adoptée ainsi que les résultats obtenus.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Stratégie

L'objectif de cette étude est de faciliter et d'accélérer l'adoption des anticorps recombinants (Ac recomb.) en France, en démontrant scientifiquement leur fiabilité en tant qu'alternatives aux anticorps d'origine animale. Dans cette perspective, le FC3R a financé une étude visant 1) à fournir des anticorps recombinants, 2) à assurer leur caractérisation analytique et 3) à diffuser les résultats auprès des utilisateurs. L'enjeu est double : produire des données robustes pour attester de la validité scientifique des anticorps recombinants et favoriser leur adoption à grande échelle au sein de la communauté scientifique.

Dans ce contexte, le Centre Français des 3R (FC3R) a mené avec le soutien de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH), une enquête nationale auprès des plateformes françaises d'histologie, membres de l'AFH, afin d'identifier les anticorps polyclonaux considérés comme prioritaires à remplacer. Le choix de solliciter les plateformes plutôt que les équipes de recherche reposait sur plusieurs arguments :

- **Volume et impact** : les plateformes traitent un nombre élevé d'échantillons, ce qui leur confère un fort levier d'action et maximise l'impact potentiel en matière de réduction de l'utilisation d'animaux.
- **Nature des cibles** : elles recourent majoritairement à des anticorps dits de « routine », correspondant à des cibles pour lesquelles des anticorps recombinants sont plus susceptibles d'exister, d'être disponibles dans le commerce et parfois même partiellement caractérisés.
- **Dimension économique** : au regard des volumes d'anticorps utilisés, les plateformes sont davantage sensibles aux gains économiques potentiels associés à l'emploi d'anticorps recombinants que les équipes de recherche individuelles.
- **Expertise et ressources** : elles bénéficient d'un haut niveau de compétences scientifiques et techniques, de protocoles validés et souvent automatisés, de banques de tissus, d'équipements performants et rigoureusement entretenus, ainsi que des systèmes de gestion des données.
- **Rayonnement et effet réseau** : les plateformes regroupent un large éventail d'utilisateurs issus de domaines variés, ce qui favorise la diffusion, l'appropriation et l'adoption des anticorps validés au sein de la communauté scientifique.

Enquête nationale

Une enquête nationale a été menée auprès des plateformes françaises d'histotechnologie membres de l'AFH, afin d'identifier les anticorps prioritaires à remplacer. L'enquête, élaborée sous LimeSurvey avec l'aide des membres du bureau de l'AFH, comportait 60 questions, qui couvraient différents domaines : caractéristiques des plateformes, critères de sélection des anticorps (fournisseur, prix, clonalité...), anticorps « à remplacer » (jusqu'à 5 par plateforme), matériel biologique concerné (tissu/organe/lignée cellulaire, espèce, mode de fixation, de conservation etc.), protocoles expérimentaux, équipements utilisés, ressources biologiques disponibles.

L'enquête a été ouverte du 15 février au 1^{er} avril 2024 et diffusée *via* les comptes de réseaux sociaux et la newsletter du FC3R, ainsi que la liste de diffusion de l'AFH. Au total, 52 questionnaires ont été commencés et 12 réponses complètes ont été enregistrées.

Sélection des cibles prioritaires

Les cibles et leurs anticorps identifiés ont été classés selon leur impact scientifique et leur pertinence au regard des principes des 3R. Une attention particulière a été portée aux anticorps polyclonaux et aux anticorps monoclonaux produits par ascite (à remplacer en priorité), ainsi qu'aux cibles partagées entre plusieurs plateformes.

Sélection des plateformes

L'identification des anticorps « prioritaires » a permis d'établir une présélection parmi les plateformes répondantes, c'est-à-dire celles utilisant en routine les anticorps retenus. Lorsque plusieurs plateformes s'étaient portées candidates pour caractériser un même anticorps, la priorité a été donnée à celles ayant proposé plusieurs anticorps à tester. D'autres critères de sélection ont également été pris en compte : estimation des coûts (devis), disponibilité pour réaliser les marquages selon le calendrier établi par le FC3R, présence en interne des contrôles et échantillons de tissus nécessaires, et absence de nécessité de sacrifier de nouveaux animaux.

Sélection des anticorps recombinants

Les alternatives recombinantes ont été identifiées via les bases de données spécialisées (CiteAb et Recombinant Antibodies & Mimetics Database) et sélectionnées selon la validation de ces anticorps pour différentes applications (IF, IHC, P-IHC, etc.), espèces et isotypes de la fraction cristallisable (Fc) proposées, gamme de prix... Pour garantir une diversité d'origine des produits, la sélection a intégré à la fois des groupes industriels majeurs et des start-ups européennes. Cinq fournisseurs ont émergé, dont quatre ont été retenus: Abcam, ABCD Antibodies, Absolute Antibody et CST/Ozyme. En effet ces derniers ont accepté de collaborer avec des réductions de prix ou une fourniture gratuite des anticorps.

Pour chaque cible, les plateformes ont reçu la liste des alternatives recombinantes issues de ces fournisseurs et ont choisi *in fine* 3 à 4 anticorps par cible, en veillant à répartir équitablement leur sélection entre les différents fournisseurs.

Montage et conduite des projets

Les projets ont été coordonnés entre le FC3R et les plateformes partenaires, incluant la sélection des anticorps à tester, la définition des stratégies de validation (comparaison, modèles Knock Out), la planification expérimentale, la gestion des ressources.

Anticorps

Les anticorps recombinants anti-GFP testés et présentés dans cette étude sont indiqués dans le **Tableau II** ci-dessous. Deux anticorps recombinants fournis par le fournisseur ABCD Antibodies ont également été testés (cf. site du FC3R <https://www.fc3r.com/anticorps/>).

RÉFÉRENCE	CLONE	FOURNISSEUR	ESPÈCE HÔTE	CONCENTRATION STOCK
ab183734	EPR14104	Abcam	Lapin	138 µg/mL
2956	D5.1	CST	Lapin	7 µg/mL
A11122	Polyclonal	Invitrogen	Lapin	2000 µg/mL

Tableau II : Liste des Ac recombinants (clone, fournisseur, espèce hôte, concentration stock) utilisés dans les tests comparatifs illustrés dans cet article.

Tissus

L'ensemble des échantillons étudiés correspond à des tissus murins fixés et inclus en paraffine, déjà traités et issus de la « blocothèque » du Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM). Les blocs ont été sélectionnés de façon à inclure des échantillons correspondant à des conditions de contrôle positif et de contrôle négatif. Des souris exprimant le rapporteur mTomato-mGFP (Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP) Luo) ou YFP (Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos) sous le contrôle du promoteur Rosa26 ont été croisées avec des animaux exprimant la recombinaise Cre, inductible par le tamoxifène, et fusionnée au récepteur nucléaire ER sous le contrôle du promoteur du locus Rosa26 (Gt(ROSA)26Sortm2(cre/ERT2)Brn). L'expression de la GFP ou de la YFP a été induite par l'application topique de tamoxifène (Sigma, T5648) sur la peau du dos (cinq fois 2 mg pour les animaux transgéniques GFP et une fois 400 µg pour les animaux transgéniques YFP). Des souris dépourvues de l'allèle Rosa26-CreER mais ayant reçu une application de tamoxifène ont été utilisées comme témoins négatifs. Des prélèvements de peau et de foie de ces souris ont été réalisés 6 jours après la première application de tamoxifène, puis fixés pendant 24 h dans du formol tamponné neutre à 10 %, avant d'être rincés trois fois dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Les échantillons ont été déshydratés à l'aide d'un automate d'imprégnation en paraffine (ASP300S, Leica) par des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes : éthanol à 70 % (4 h, puis 30 min), éthanol à 95 % (15 min, puis 30 min) et éthanol à 100 % (45 min, 1 h, puis 1 h 30 min). La déshydratation a été suivie d'une clarification au xylène par des bains successifs (45 min, puis 1 h à deux reprises), puis d'une imprégnation de paraffine à l'aide de bains successifs de paraffine liquide à 58 °C (45 min, puis 1 h et 1 h 30 min). Les échantillons ont ensuite été inclus en bloc dans de la paraffine liquide à l'aide d'une station d'inclusion en paraffine (Arcadia, Leica), puis refroidis jusqu'à solidification. Ces blocs de tissus inclus en paraffine ont été utilisés pour préparer des coupes histologiques de 3 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome (HM355S, MM France), montées sur des lames TOMO (Roche), puis séchées à 37 °C pendant une nuit.

Immunomarquages et acquisition d'images

Les mises au point des marquages immunohistochimiques dirigés contre la GFP ou l'YFP ont été réalisées sur un automate d'immunomarquage Ventana Discovery Ultra® (Roche Diagnostics), conformément aux recommandations du fournisseur et en utilisant les kits associés. La stratégie de mise au point retenue est celle classiquement décrite dans la littérature [15].

Dans un premier temps, 2 conditions de démasquages ont été testées pour pouvoir effectuer une comparaison efficace : démasquage à la chaleur en tampon Tris-EDTA pH 8 durant 24 min à 95 °C (Tampon CC1, Ventana, 05424569001) et tampon citrate pH 6 pendant 24 min à 91 °C (Tampon CC2, Ventana, 05424542001). Pour les premiers tests, les anticorps primaires ont été dilués au 1/100 dans un tampon Standard (ST) (Agilent, S0809) et incubés durant 60 min à 37 °C. Tous les anticorps primaires ont été révélés avec une solution prête à l'emploi d'anticorps secondaire anti-Immuglobuline de lapin (OmniMap Rabbit, Ventana, 05266548001). Le substrat, le DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Ventana, 05266645001) a été déposé durant 8 min. La contre-coloration des noyaux a été ensuite effectuée en incubant 8 min les lames avec de l'hématoxyline II (Ventana, 05277965001) suivie d'une incubation pendant 4 min avec une solution de « *Bluing reagent* » (Ventana, 05266769001). Selon les résultats obtenus, le signal a été optimisé pour chaque anticorps selon deux méthodes : une amplification du signal (augmentation de la concentration de l'Ac primaire jusqu'à 30 µg/mL, remplacement du diluant d'Ac par du diluant "*low background*" S3022 d'Agilent, remplacement du kit d'amplification par le kit HQ (Ventana, DISCOVERY Anti-Rabbit HQ # 07017812001, DISCOVERY Anti-HQ # 07017936001)) ou une réduction du signal/bruit de fond (gamme de dilution du primaire, remplacement du diluant d'Ac par du diluant "*low background*" ou diminution du temps d'incubation de l'Ac primaire).

Les lames ont été déshydratées à l'aide d'un Autostainer XL (Leica), puis montées sous lamelles avec le milieu de montage Pertex à l'aide d'un appareil de montage de lames CTM6 (MM France). Les lames immunomarquées ont été numérisées à l'aide d'un scanner MIDI2 (3DHitech) et les images ont été visualisées à l'aide du logiciel Slideviewer.

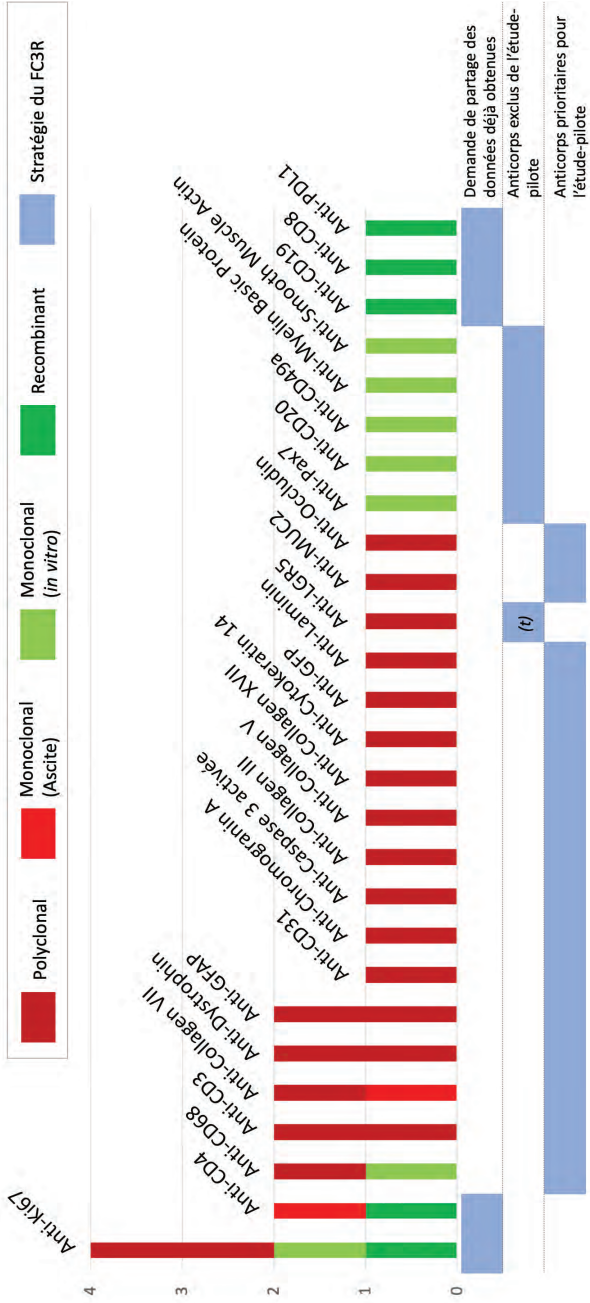


Figure 1 : Synthèse des résultats de l'enquête nationale auprès des plateformes françaises d'histologie en matière d'Ac candidats au remplacement par des Ac recombinants. Les anticorps déclarés comme « à remplacer » (n = 36) sont présentés sous forme d'histogramme et regroupés par cible (n = 27, axe des abscisses). Chaque anticorps (axe des ordonnées) est représenté en fonction de sa clonalité. En bleu, sont indiquées les stratégies initiales du FC3R pour chaque cible. La cible marquée (t) a été exclue de l'étude pilote pour des raisons techniques.

RÉSULTATS

Résultats de l'enquête

Douze plateformes nationales d'histotechnologie ont répondu à l'enquête, pour un total de 36 anticorps « à remplacer » dirigés contre 27 protéines cibles. Le FC3R a procédé à l'analyse des différentes réponses, pour interclasser les anticorps « à remplacer » par ordre de priorité en termes de reproductibilité et d'impact 3R (**Figure 1**).

Cinq anticorps dirigés contre cinq cibles distinctes se sont révélés être déjà recombinants. Les déposants ont été contactés pour partager et publier les résultats disponibles (**Figure 1**, histogramme **vert foncé**). Neuf anticorps, ciblant neuf protéines différentes, ont été identifiés comme des monoclonaux. Les fournisseurs ont été sollicités afin de préciser leurs modalités de production (*in vitro* ou *via* des animaux (ascites)) : un anticorps n'était plus commercialisé, six étaient produits *in vitro* (**Figure 1**, histogramme **vert clair**), deux par ascite (**Figure 1**, histogramme **rouge vif**).

Vingt-deux anticorps, ciblant 18 protéines distinctes, sont des polyclonaux et soulèvent donc à ce titre des enjeux à la fois éthiques (principe des 3R) et scientifiques (variabilité, non-spécificité, et manque de reproductibilité) (**Figure 1**, histogramme **rouge foncé**). Les anticorps polyclonaux ainsi que les monoclonaux produits par ascite et déclarés comme « à remplacer » par plusieurs plateformes ont été définis comme prioritaires. Les autres anticorps ont été, sont ou seront intégrés à l'étude, en fonction des disponibilités des plateformes, de l'existence d'alternatives recombinantes et des contraintes budgétaires du FC3R. La caractérisation d'alternatives recombinantes pour les anticorps prioritaires a débuté en septembre 2024 et se poursuivra jusqu'à fin 2026.

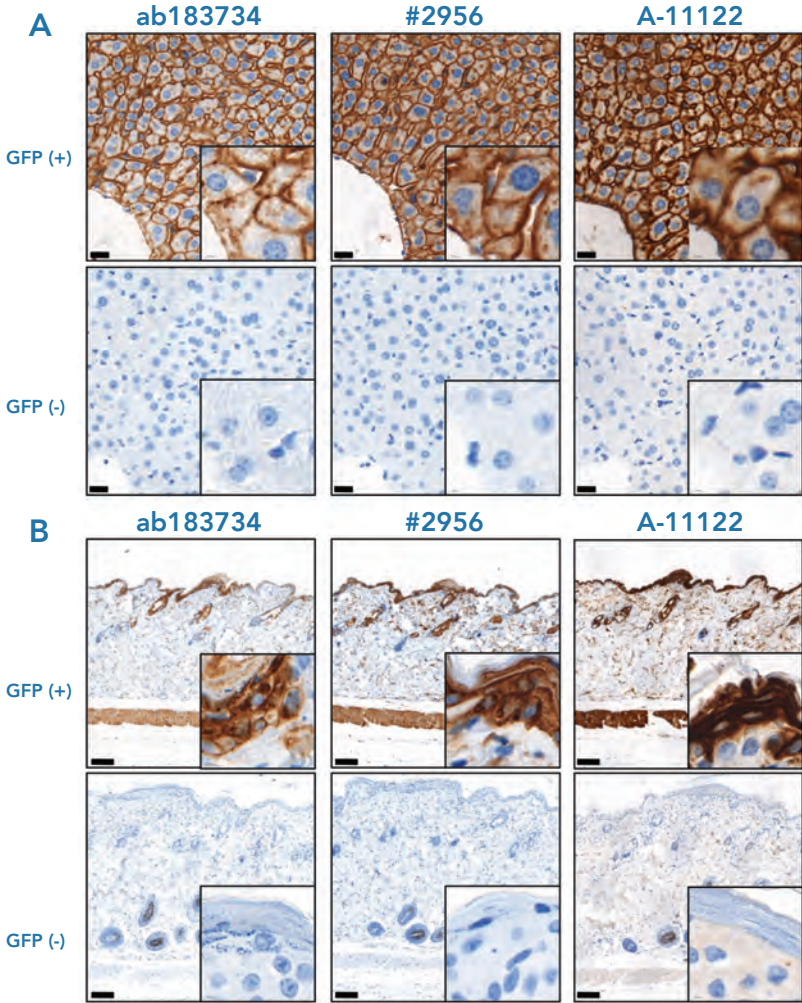


Figure 2 : Comparaison des marquages immunohistochimiques obtenus entre les anticorps recombinants et l'anticorps polyclonal de référence sur les tissus exprimant ou non la GFP. Illustration des marquages obtenus avec les anticorps recombinants ab183734 et #2956 et l'anticorps polyclonal A-11122 sur du foie (A) et de la peau (B) de souris GFP (+) et GFP (-), photos prises à l'objectif x40 (barre d'échelle de 20 µm) et x10 (barre d'échelle de 100 µm) et encadrés à l'objectif x244. Les encadrés représentent, à plus fort grossissement, le marquage des hépatocytes situés près de la veine centro-lobulaire dans le foie et les kératinocytes de l'épiderme de la peau. Les marquages présentés sont obtenus avec des concentrations jugées optimales pour chaque anticorps primaire à savoir 16 µg/mL pour l'anticorps polyclonal A-11122 et respectivement 0,069 µg/mL et 0,035 µg/mL pour les anticorps recombinants ab183734 et #2956.

Évaluation d'anticorps recombinants ciblant la GFP

L'enquête a mis en évidence, pour l'une des plateformes participantes, la nécessité de remplacer un anticorps polyclonal utilisé pour la détection de la protéine fluorescente GFP, largement utilisée comme rapporteur pour déterminer l'expression de gènes et la localisation de protéines. Pour cela, deux anticorps recombinants anti-GFP - ab183734 (Abcam) et #2956 (CST) - ont été testés sur des tissus (peau et foie) de souris transgéniques exprimant ou non la GFP. La spécificité ainsi que l'intensité des marquages obtenus ont été comparées avec celles de l'anticorps polyclonal de référence A-11122 (Invitrogen) (**Figure 2A**).

Comme illustré par la **Figure 2A**, le marquage membranaire des hépatocytes obtenu avec les anticorps ab183734 et #2956 est équivalent à celui obtenu avec l'anticorps polyclonal tant en termes d'intensité de signal que de spécificité. Dans l'épiderme, les marquages obtenus sont également équivalents à celui de l'anticorps de référence même si on note un signal quelque peu plus faible mais avec un très bon rapport signal sur bruit (**Figure 2B**). Quel que soit l'anticorps, on note une absence de marquage sur les tissus témoins négatifs n'exprimant pas la GFP.

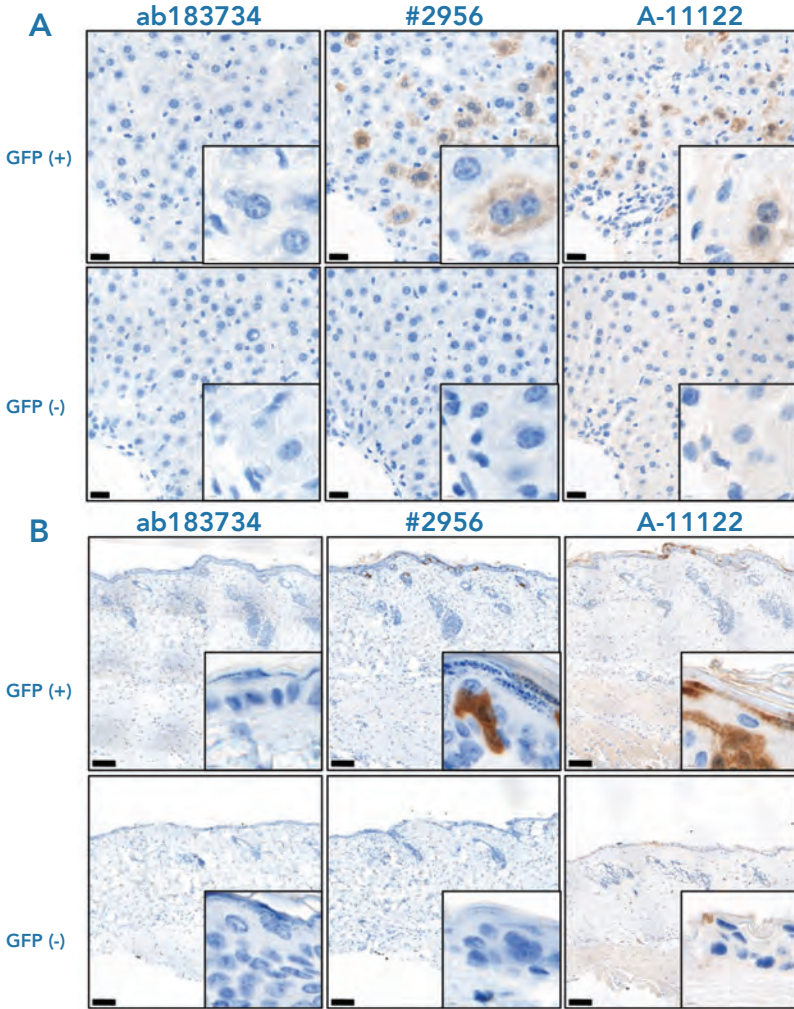


Figure 3: Comparaison des marquages immunohistochimiques obtenus entre les anticorps recombinants et l'anticorps polyclonal de référence sur les tissus exprimant ou non la YFP. Illustration des marquages obtenus avec les anticorps recombinants ab183734 et #2956 et l'anticorps polyclonal A-11122 sur du foie (A) et de la peau (B) de souris YFP (+) et YFP (-), photos prises respectivement à l'objectif x40 (barre d'échelle de 20 μ m) et x10 (barre d'échelle de 100 μ m) et encadrés à l'objectif x244. Les encadrés représentent le marquage des hépatocytes situés près de la veine centro-lobulaire dans le foie et les kératinocytes de l'épiderme à plus fort grossissement. Les marquages présentés sont obtenus avec des concentrations jugées optimales pour chaque anticorps primaire à savoir 16 μ g/mL pour l'anticorps polyclonal A-11122 et respectivement 0,069 μ g/mL et 0,035 μ g/mL pour les anticorps recombinants ab183734 et #2956.

Évaluation d'anticorps recombinants ciblant la YFP

Compte tenu de la possibilité de réactivité croisée entre les anticorps dirigés contre la GFP et la protéine YFP, la cross-réactivité des anticorps anti-GFP avec la protéine YFP a également été étudiée (**Figure 3**). Pour cela, les deux anticorps recombinants ont été testés sur des tissus (peau et foie) de souris transgéniques exprimant ou non la YFP. La spécificité ainsi que l'intensité des marquages obtenus ont été comparées avec celles de l'anticorps polyclonal de référence A-11122.

Comme illustré par la **Figure 3A**, des deux anticorps recombinants, seul l'anticorps #2956 de CST reconnaît la protéine YFP selon un profil similaire à celui obtenu avec l'anticorps polyclonal. Le marquage cytoplasmique des hépatocytes obtenu avec cet anticorps est, à dilution 457 fois plus importante, d'intensité légèrement supérieure à celui obtenu avec l'anticorps polyclonal A-11122. Dans l'épiderme, les marquages obtenus sont identiques entre l'anticorps recombinant #2956 et l'anticorps de référence (**Figure 3B**). Quel que soit l'anticorps, on note une absence de marquage sur les tissus témoins négatifs n'exprimant pas la YFP.

Conditions optimales d'IHC validées pour les anticorps anti-GFP et YFP

Le **Tableau III** synthétise les conditions optimales d'IHC pour les anticorps recombinants testés sur l'automate Ventana Discovery Ultra® de Roche Diagnostics. La référence ab183734 a également été testée sur le Bond RX et des résultats équivalents ont été obtenus avec les kits du fournisseur Leica et un démasquage en tampon pH 9 de Leica (résultats non illustrés).

RÉFÉRENCE	DÉMASQUAGE	ANTICORPS PRIMAIRE	SYSTÈME D'AMPLIFICATION
ab183734	CC1 (pH 8) – 24 min 95 °C	0,069 µg/mL, diluant ST - 60 min 37 °C	Kit OmniMap Lapin HRP
#2956	CC1 (pH 8) – 24 min 95 °C	0,035 µg/mL, diluant ST - 60 min 37 °C	Kit OmniMap Lapin HRP
A11122	Protéase 1 – 4 min 37 °C	16 µg/mL, diluant LB - 60 min 37 °C	Kit Anti-Lapin HQ et Anti-HQ HRP

Tableau III : Protocoles d'immunomarquages validés pour les anticorps recombinants et polyclonaux anti-GFP sur l'Automate Ventana Discovery Ultra® de Roche Diagnostics.

Le tableau ci-dessus montre que les concentrations optimales de travail sont respectivement 232 et 457 fois plus faibles pour les anticorps recombinants ab183734 et #2956 que pour l'anticorps de référence polyclonal A11122. On note par ailleurs que ce dernier nécessite en plus une amplification renforcée de son signal à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un haptène et d'un anticorps tertiaire dirigé contre cet haptène.

Synthèse des résultats préliminaires de l'étude

Comme illustré dans la présente étude pour la cible GFP, plusieurs autres anticorps recombinants ont été évalués par trois plateformes d'histologie françaises en vue de remplacer des anticorps polyclonaux dirigés contre diverses protéines d'intérêts. Le **Tableau IV** présente, pour chacune de ces trois plateformes (APEX, RHEM et atelier interne INRAE St Gilles), les cibles étudiées, les anticorps recombinants testés, les anticorps polyclonaux de référence utilisés pour comparaison, ainsi que les tissus et espèces analysés et les résultats obtenus (**Tableau IV**).

Cible	Anticorps polyclonal de référence	Anticorps testés	Organes et espèces testées	Anticorps validés avec des propriétés d'immunomarquage identiques ou supérieures à l'anticorps polyclonal de référence
Plateforme APEX				
CD3 (cluster de différenciation 3)	A0452 (Dako)	ab16669 (Abcam)	Rate de souris, rat, macaque	ab16669 et #85061 sur les tissus issus des 3 espèces testées.
		#85061 (CST)		
		YTH 12.5 (Absolute Antibody)		
		ABCD_AD036 (ABCD Antibodies)		
GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	Z0334 (Dako)	ab278054 (Abcam)	Cerveau de souris, rat, macaque	ab278054, ABCD_AK148 et #80788 sur les tissus issus des 3 espèces testées.
		ABCD_AK148 (ABCD Antibodies)		
		#80788 (CST)		
Plateforme RHEM				
CD31 (cluster de différenciation 31)	ab28364 (Abcam)	ab182981 (abcam)	Poumons, rate et foie de souris et rat Foie et côlon humains	ab182981 et ab281583 sur les tissus issus des 3 espèces testées. JC70 sur tissus humains uniquement mais avec un rapport signal sur bruit faible.
		ab281583 (Abcam)		
		JC70 (Absolute Antibody)		
		ABCD_AD217 (ABCD Antibodies)		
Ki67	M3064 (AMSBIO)	ab279653 (Abcam)	Intestin et rate de souris Lignée cellulaire humaine exprimant ou non la protéine Ki67	ab279653, ab281583 at MA5-1450 sur tissu de souris et humains. ab281583 donne le meilleur rapport signal sur bruit.
		ab281583 (Abcam)		
		MA5-14520 (Invitrogen)		
Atelier d'histologie interne de l'INRAE de St Gilles				
CHGA (Chromogranin A)	ab45179 (Abcam)	ab283265 (Abcam)	Tissus de porc, souris et rat	ab283265 sur tissus issus des 3 espèces.
		#36468 (CST)		
KRT14 (Kératine 14)	sc-17104 (Santa Cruz)	#49565 (Cell Signaling Tech.)	Cellules et sur tissus de vache, chèvre et truie	ab119695 sur tissu et culture cellulaire 2D de vache ainsi que chez la truie.
		ab119695 (Abcam)		
		2GA (Absolute Antibody)		
		ABCD_AD217 (ABCD Antibodies)		
Occludine	33-1500 (Invitrogen)	ab216327 (Abcam)	Cellules et sur tissus de souris, porc et vache	ab216327 sur tissus de porc mais les résultats sont mitigés chez la vache.
		1-3 (Absolute Antibody)		
		37-5 (Absolute Antibody)		
		#91131 (CST)		

Tableau IV : Synthèse des validations en IHC des anticorps recombinants testés en fonction de 7 cibles identifiées dans l'enquête et obtenus par les trois plateformes françaises participant à cette étude. La dernière colonne de droite liste les Ac recombinants validés et permet ainsi d'estimer le taux global de validation des anticorps recombinants. L'ensemble des résultats obtenus pour ces différentes cibles est consultable sur le site du FC3R (<https://www.fc3r.com/anticorps/>).

Comme indiqué dans le **Tableau IV**, incluant les résultats obtenus pour la cible GFP, 26 anticorps recombinants ont été évalués contre 8 cibles distinctes : CD3, CD31, CHGA, GFP, GFAP, Ki67, KRT14 et Occludine. Parmi eux, 17 ont été validés par les plateformes partenaires pour une utilisation dans leurs conditions expérimentales spécifiques (protocole, espèces, tissus, réactifs, équipements, etc.).

DISCUSSION

Cette étude, visant à démontrer la pertinence des anticorps recombinants comme alternatives des anticorps polyclonaux pour les marquages immunohistochimiques sur tissus, a bénéficié de la contribution de 12 plateformes d'histologie françaises, dont 4 ont été impliquées dans la phase expérimentale. Parmi celles-ci, les résultats de 3 sont en partie présentés dans ce travail. Deux plateformes (APEX et RHEM) ont conduit leurs développements sur automate, tandis que la 3^e, (INRAE St Gilles) a réalisé les essais en manuel. Le taux global de validation des anticorps recombinants s'élève à 65,3 %. Ce qui signifie un taux seulement de 34,7 % de non reconnaissance de la cible testée. Ce pourcentage est inférieur au 50 % rapporté dans la littérature concernant les anticorps produits chez l'animal qui se révèlent non spécifiques ou inadaptés à l'application revendiquée [7-10]. Cette performance peut s'expliquer par une sélection rigoureuse des anticorps, privilégiant ceux validés pour des applications sur coupes tissulaires (immunofluorescence (IF), IHC, P-IHC). Ce taux de réussite apparaît nettement plus élevé dans des conditions dites "standards", lorsque l'espèce cible correspond aux spécifications du fournisseur (82 % soit 14/17). En comparaison, des essais exploratoires réalisés "à l'aveugle" sur des espèces non documentées telles que vache, porc et chèvre (non couvertes par la fiche technique) indiquent un taux de seulement 40 % (4/10). En moyenne, « 3,25 » anticorps recombinants ont été évalués par cible, ce qui a permis d'identifier au moins une alternative fonctionnelle pour chacune d'elles, correspondant à un taux de succès de 100 % à l'échelle des cibles étudiées.

Nous montrons dans cette étude que les anticorps recombinants anti-GFP ab183734 et #2956 constituent une alternative plus sensible pour la détection de l'expression de la GFP en IHC. Des intensités de marquage équivalentes, voire supérieures à celles obtenues avec l'anticorps de référence, sont observées avec des concentrations d'anticorps considérablement plus faibles (un facteur de 232 et 457 pour ab183734 et #2956, respectivement). Nos résultats sont cohérents avec d'autres études qui montrent également, dans des conditions applicatives proches, une meilleure performance et une reproductibilité accrue des anticorps recombinants par rapport aux anticorps usuels non recombinants [16].

Cette observation peut s'expliquer par l'aptitude des Ac recombinants à maximiser la probabilité de détection de leur cible par rapport aux Ac polyclonaux. Dans le cas des *nanobodies*, cela peut également s'expliquer par leur capacité accrue de pénétration tissulaire du fait de leur petite taille. Cependant, à séquence identique, un anticorps recombinant ne présente pas intrinsèquement de performances supérieures à celles d'un anticorps monoclonal d'origine animale.

L'anticorps # 2956 présente par ailleurs, une propriété intéressante à relever de réactivité croisée avec la protéine YFP. Il serait pertinent d'évaluer également la capacité de ces anticorps à reconnaître la protéine, mCitrine, une variante génétiquement modifiée dérivée de la YFP [17]. Par ailleurs, ces deux anticorps recombinants anti-GFP présentent l'avantage de fonctionner avec un démasquage des épitopes par la chaleur (HIER) contrairement à l'anticorps polyclonal de référence qui nécessite un démasquage enzymatique. Le démasquage thermique est généralement privilégié en IHC multiplexée en raison de sa meilleure reproductibilité et de sa capacité à préserver l'intégrité tissulaire, tandis que les méthodes protéolytiques peuvent induire une variabilité accrue et altérer les tissus [18]. Ainsi, ces deux Ac recombinants offrent un atout supplémentaire pour leur intégration dans des protocoles de marquage IHC multiplexé, qu'ils soient séquentiels ou non, ou encore en imagerie de masse (par exemple, avec la technologie Hyperion).

Comme pour les anticorps anti-GFP, la majorité des autres Ac recombinants validés, cités dans cette étude, a systématiquement présenté des performances d'immunomarquage satisfaisantes, voire supérieures à celles des anticorps de référence se traduisant notamment par un signal plus intense, un bruit de fond réduit et une utilisation possible à des dilutions plus élevées ou concentrations plus faibles. Toutefois, l'affirmation selon laquelle les anticorps recombinants présentent des performances d'immunomarquage systématiquement supérieures ou équivalentes, doit être quelque peu nuancée. En effet, les anticorps polyclonaux de référence utilisés dans cette étude correspondent le plus souvent à des réactifs historiquement adoptés par les plateformes, sans garantie qu'ils représentent les solutions les plus performantes actuellement disponibles pour les cibles considérées. Les performances en termes de reproductibilité (entre expériences, entre lots, entre opérateurs ou entre laboratoires), la compatibilité avec les tissus cryoconservés, ainsi que la sensibilité des anticorps (c'est-à-dire leur capacité à détecter des antigènes faiblement exprimés) n'ont pas été évaluées dans cette étude. Leur exploration constituerait néanmoins une perspective pertinente pour approfondir la caractérisation de ces anticorps en immunohistochimie.

La possibilité d'utiliser certains anticorps recombinants à des dilutions plus élevées représente un avantage économique notable pour les plateformes. Le coût par lame peut ainsi être considérablement réduit, jusqu'à un facteur de 22 dans certains cas, comme illustré pour l'anticorps recombinant anti-GFP ab183734 (0,20 € contre 4.45 € pour l'anticorps de référence). Compte tenu des volumes importants d'anticorps consommés en routine sur les plateformes d'histologie, le recours aux anticorps recombinants peut s'avérer particulièrement avantageux sur le plan économique. D'autant plus que souvent pour les anticorps polyclonaux, la variabilité inter-lots liées à des facteurs biologiques (animal, durée d'immunisation, réponse immunitaire) impose des ajustements réguliers de dilution afin de maintenir un marquage reproductible. À l'inverse, la meilleure standardisation des anticorps recombinants limite ces ajustements. En réduisant le nombre d'expériences nécessaires pour obtenir des résultats reproductibles, leur utilisation contribue indirectement à diminuer le recours aux animaux.

Au-delà des aspects scientifiques et opérationnels, l'adoption des anticorps recombinants s'inscrit pleinement dans le respect des exigences éthiques et réglementaires actuelles, notamment à travers les principes des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Les Ac recombinants apparaissent offrir une réponse cohérente aux exigences éthiques et réglementaires contemporaines visant à minimiser la souffrance animale tout en améliorant la qualité des données scientifiques. En se substituant aux anticorps polyclonaux d'origine animale, leur utilisation participe directement au Remplacement des méthodes reposant sur l'immunisation animale. Par ailleurs, leur forte reproductibilité et leur standardisation limitent les besoins de réajustement expérimental, contribuant ainsi à la Réduction du nombre d'expériences nécessaires et, indirectement, du recours aux animaux. Enfin, l'amélioration de la robustesse et de la qualité des marquages s'inscrit dans une logique de Raffinement, en optimisant les protocoles expérimentaux et la fiabilité des données obtenues.

Cette étude démontre d'ores et déjà, à travers huit cibles, la fiabilité des anticorps recombinants comme alternatives aux anticorps d'origine animale en IHC. La démarche engagée et les résultats obtenus ont été valorisés au travers de plusieurs actions de diffusion, incluant des webinaires (FC3R, INRAE), et des congrès (J3R, AFH). Des ressources dédiées, en français et en anglais, leur sont également dédiées sur le site web du FC3R (<http://www.fc3r.com/>). D'autres actions de valorisation sont en cours telles que des campagnes de communication sur les réseaux sociaux, la rédaction d'articles scientifiques (*Short Notes ou Antibody Reports*), ainsi que l'intégration des données dans les bases de données spécialisées et chez les fournisseurs.

Par exemple, une *Short Note*, consacrée à la caractérisation des anticorps anti-KRT14, met en évidence la qualité des marquages obtenus avec ces anticorps recombinants sur des tissus d'espèces moins couramment étudiées telles que des animaux de ferme [19]. Enfin, de nouvelles caractérisations (CD68, CD4, Dystrophine, Laminine, MUC2, Collagène VII, etc....) viendront compléter ces travaux et renforcer l'évidence que les anticorps recombinants constituent une alternative à la fois scientifiquement robuste et éthiquement responsable.

Une perspective pertinente à ces travaux de transition vers des pratiques plus robustes et plus responsables sur le plan éthique, serait d'étendre cette démarche aux anticorps secondaires, pour lesquels des alternatives recombinantes sont désormais disponibles (anti-mouse ou anti-rabbit recombinants, Ac secondaires basés sur *nanobodies* pour immunofluorescence). Notamment des alternatives recombinantes aux anticorps secondaires sous forme de *nanobodies* anti-IgG, ont récemment été développées et validées pour diverses applications, dont l'immunofluorescence et l'imagerie à haute résolution [20-22]. Bien que leur offre reste à ce jour plus limitée et souvent plus coûteuse que celle des anticorps habituels, leur développement rapide laisse entrevoir un potentiel important d'adoption dans les années à venir.

CONCLUSION

Ainsi, l'intégration progressive des anticorps recombinants ne constitue pas seulement une évolution technologique, mais bien un changement de paradigme, conciliant excellence scientifique, reproductibilité des résultats et engagement concret en faveur du bien-être animal. Elle met également en lumière le rôle central des praticiens de l'histologie, dont l'expertise technique, la capacité à optimiser les protocoles et l'exigence de qualité sont essentielles pour exploiter pleinement ces innovations, garantir la fiabilité des données produites et ouvrir la voie à leur adoption par d'autres utilisateurs d'anticorps dans des domaines variés.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le GIS FC3R. Le FC3R remercie les membres du bureau de l'AFH pour leur accompagnement et leurs conseils précieux ainsi que les fournisseurs collaborateurs pour leurs gestes commerciaux et leur soutien. Nous remercions particulièrement les plateformes APEX, l'atelier d'histologie de l'INRAE de St Gilles, le RHEM pour leurs expertises en histologie et leur investissement. Le RHEM bénéficie du soutien de REACT-EU (Recovery Assistance for Cohesion and the Territories of Europe), de l'IBiSA, de la Ligue contre le cancer, de la région Occitanie / Pyrénées-Méditerranée, de l'université de Montpellier et du GIS FC3R, dont les fonds sont gérés par l'Inserm.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BURNS R. Immunisation strategies for antibody production. *Methods Mol Biol*, 2009,**508** 27-35.
- [2] LEENAARS M. & HENDRIKSEN C.F. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar j*, 2005,**46** (3): 269-279.
- [3] VIEGAS BARROSO J.F., HALDER M.E. & WHELAN M. EURL ECVAM recommendation on non-animal-derived antibodies. Publications Office of the European Union, 2020.
<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC120199>
- [4] THOMPSON M.K., *et al.* Optimizing selection of large animals for antibody production by screening immune response to standard vaccines. *J Immunol Methods*, 2016,**430** 56-60.
- [5] GRAY A., *et al.* Animal-free alternatives and the antibody iceberg. *Nature Biotechnology*, 2020,**38** (11): 1234-1239. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0687-9>
- [6] LEENAARS P.P.A.M., *et al.* Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. *Laboratory Animals*, 1998,**32** (4): 387-406.
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367798780599884>
- [7] BAKER M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*, 2015,**521** (7552): 274-276. <https://doi.org/10.1038/521274a>
- [8] BERGLUND L., *et al.* A Genecentric Human Protein Atlas for Expression Profiles Based on Antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008,**7** (10): 2019-2027.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535947620312834>

- [9] BRADBURY A. & PLÜCKTHUN A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature*, 2015,**518** (7537): 27-29. <https://doi.org/10.1038/518027a>
- [10] WELLER M.G. Quality Issues of Research Antibodies. *Anal Chem Insights*, 2016,**11** 21-27.
- [11] BIDDLE M., et al. Improving the integrity and reproducibility of research that uses antibodies: a technical, data sharing, behavioral and policy challenge. *mAbs*, 2024,**16** (1): 2323706. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2323706>
- [12] DANGER Y. Revue des méthodes actuelles d'obtention des anticorps monoclonaux pour un usage diagnostique. *Revue française d'histotechnologie*, 2025,**37** (1): 171-187. <https://www.afhisto.fr/revue/2025-8>
- [13] RUSSELL W.M.S. & BURCH R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia*, 1960,1.
- [14] REMINGTON S.J., et al. zFP538, a Yellow-Fluorescent Protein from *Zoanthus*, Contains a Novel Three-Ring Chromophore. *Biochemistry*, 2005,**44** (1): 202-212. <https://doi.org/10.1021/bi048383r>
- [15] MANSOURI H., et al. Les bonnes pratiques, outils et astuces pour la mise au point d'anticorps en immunohistochimie (synthèse table ronde, congrès AFH, Saint-Malo 2024). *Revue française d'histotechnologie*, 2025,**37** (1): 189-203. <https://www.afhisto.fr/revue/2025-9>
- [16] AYOUBI R., et al. Scaling of an antibody validation procedure enables quantification of antibody performance in major research applications. *Elife*, 2023,**12**.
- [17] GRIESBECK O., et al. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: MECHANISM AND APPLICATIONS*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001,**276** (31): 29188-29194. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820803858>
- [18] PARRA E.R., et al. Procedural Requirements and Recommendations for Multiplex Immunofluorescence Tyramide Signal Amplification Assays to Support Translational Oncology Studies. *Cancers (Basel)*, 2020,**12** (2): 255; <https://doi.org/10.3390/cancers12020255>
- [19] WIART-LETORT S. & FINOT L. Two recombinant antibodies recognize (cyto)keratin 14 by immunofluorescence in farm animals (cow, goat and swine) Deux anticorps recombinants reconnaissent la (cyto)kératine 14 par immunofluorescence chez les animaux d'élevage (vaches, chèvres et porcs). 2025: n.p. <https://hal.science/hal-05285752>

[20] PLEINER T., BATES M. & GÖRLICH D. A toolbox of anti-mouse and anti-rabbit IgG secondary nanobodies. *Journal of Cell Biology*, 2017,**217** (3): 1143-1154. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709115>

[21] SHENG W., *et al.* Development of SNAP-Tag Based Nanobodies as Secondary Antibody Mimics for Indirect Immunofluorescence Assays. *Cells*, 2025,**14** (10): 691. <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/10/691>

[22] SOGRATE-IDRISSI S., *et al.* Circumvention of common labelling artefacts using secondary nanobodies. *Nanoscale*, 2020,**12** (18): 10226-10239. <http://dx.doi.org/10.1039/D0NR00227E>

RESSOURCES INTERNET – SITE WEB

AFH : <https://www.afhisto.fr/>

Avis sur l'utilisation d'anticorps d'origine animale ou non-animale : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2022-11/avis-sur-l-utilisation-d-anticorps-d-origine-animale-ou-non-animale-valid-le-7-novembre-2022--25402.pdf>

CNREEA: <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2022-11/avis-sur-l-utilisation-d-anticorps-d-origine-animale-ou-non-animale-valid-le-7-novembre-2022--25402.pdf>

CiteAb : <https://www.citeab.com/>

Directive 2010/63/EU :

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>

EURL ECVAM : https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam/eurl-ecvam-faqs/frequently-asked-questions-eurl-ecvam-recommendation-non-animal-derived-antibodies_en

FC3R : <http://www.fc3r.com/>

Pages « Anticorps » du site FC3R : <https://www.fc3r.com/anticorps/>

Plateforme APEX : <https://anatomie-pathologique-sante-animale.hub.inrae.fr/>

Plateforme Atelier Histo de l'Inrae de St Gilles : <https://pegase.rennes.hub.inrae.fr/recherche/ateliers-de-laboratoire/atelier-histologie2>

Plateforme RHEM : <https://www.rhem.cnrs.fr/>

Recombinant Antibodies & Mimetics Database :

<https://antibodies.humanspecificresearch.org/>