

# LES BONNES PRATIQUES, OUTILS ET ASTUCES POUR LA MISE AU POINT D'ANTICORPS EN IMMUNOHISTOCHIMIE

## (Synthèse table ronde, Congrès AFH, Saint-Malo 2024)

MANSOURI Hanane<sup>1,2</sup>, COCHIN Sandrine<sup>3</sup>, LE SAFFRE Corinne<sup>4</sup>, PIROT Nelly<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Plateforme RHEM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier), Institut de recherche en Cancérologie de Montpellier, Univ. Montpellier, ICM, INSERM, 208 rue des Apothicaires, CRLC Val d'Aurelle-Centre P.Lamarque, 34298 Montpellier, France.

<sup>2</sup> Plateforme RHEM, BioCampus Montpellier, Univ. Montpellier, CNRS, INSERM, 141 rue de la cardonille, 34298 Montpellier, France.

<sup>3</sup> Transgene, Parc D'innovation, 400 bd Gonthier d'Andernach, 67400 Illkirch Graffenstaden, France

<sup>4</sup> PH2I (Plateforme Histologie, Immunomarquage et Imagerie du tissu), Centre de recherche Paris Cardiovasculaire (PARCC), 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France.

Auteur correspondant : nelly.pirot@inserm.fr

# **BEST PRACTICES, TOOLS AND TIPS FOR SETTING-UP ANTIBODIES IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY**

**(Summary round table, AFH congress, Saint-Malo 2024)**

## **ABSTRACT**

Who hasn't tried to develop a primary antibody in immunohistochemistry without success? Who hasn't wondered whether they have the right controls and methodology to validate the specificity of an antibody in immunohistochemistry? When you consider that 50% of commercial antibodies do not recognize their targets, it is important to have the right habits.

The objective of these roundtables was to exchange information on current practices in laboratories for developing immunostaining using antibodies (Ab). The aim was to share tools and tips to guarantee specificity and quality of immunohistochemical (IHC) staining. For immunofluorescent (IF) staining, only methods for reducing autofluorescence were discussed at the end of the round table.

## **KEY WORDS**

Antibodies (Ab), Experimental validation, Immunohistochemistry, Optimization.

## RÉSUMÉ

Qui n'a pas déjà tenté de mettre au point un anticorps primaire en immunohistochimie sans succès? Qui ne s'est pas déjà demandé s'il disposait des bons contrôles et de la bonne méthodologie pour valider la spécificité d'un anticorps en immunohistochimie? Quand on sait que 50% des anticorps commerciaux ne reconnaissent pas leurs cibles, il est important d'avoir les bons réflexes.

Ces tables rondes étaient organisées dans le but d'échanger sur les pratiques courantes des laboratoires pour mettre au point des immunomarquages à l'aide d'anticorps (Ac). Il s'agissait de partager des outils et des astuces qui permettent de garantir la bonne spécificité et qualité d'un marquage immunohistochimique (IHC). Pour les marquages immunofluorescents (IF), seules les méthodes de réduction de l'auto-fluorescence ont été abordées en fin de table ronde.

## MOTS CLÉS

Anticorps (Ac), Immunohistochimie, Optimisation, Validation expérimentale.

## INTRODUCTION

L'immunohistochimie (IHC) est une technique essentielle en recherche biomédicale et en diagnostic, permettant la détection et la localisation spécifique de protéines dans les tissus. Cependant, sa mise en œuvre repose sur de nombreux paramètres techniques dont la maîtrise est cruciale pour obtenir des résultats fiables et reproductibles. Choix des anticorps (Ac), sélection des témoins appropriés, validation expérimentale des protocoles : autant d'étapes critiques qui influencent la qualité des marquages immunohistochimiques. Cet article a pour objectif d'aborder les problématiques techniques rencontrées lors de la mise au point des protocoles IHC et de fournir des solutions pratiques aux chercheurs, ingénieurs et techniciens de laboratoire. Les informations présentées ici résultent des échanges lors de deux tables rondes organisées dans le cadre du congrès AFH 2024 de Saint-Malo, réunissant des utilisateurs issus de laboratoires spécialisés dans l'IHC, réalisant leurs marquages soit manuellement, soit à l'aide d'automates. Une grande majorité (90 %) des participants travaillent sur des échantillons inclus en paraffine, avec des tissus d'origine humaine ou murine en proportions égales, et dans une moindre mesure sur des tissus provenant d'autres espèces. Au fil de cet article, le lecteur trouvera des conseils pratiques, des recommandations pour le choix des Ac et des témoins, ainsi que des références vers des ressources en ligne. Une stratégie expérimentale pour la validation des techniques d'IHC sera également proposée, permettant d'optimiser la reproductibilité et la fiabilité des marquages. En s'appuyant sur ces recommandations, les utilisateurs pourront affiner leurs protocoles et améliorer la robustesse de leurs résultats en immunohistochimie.

## MATERIELS ET MÉTHODES

Les deux sessions des tables rondes ont rassemblé un total de 80 participants, incluant des chercheurs, ingénieurs et techniciens de laboratoire, ayant partagé leurs pratiques et leurs besoins en matière de mise au point des techniques d'IHC.

Les discussions ont porté sur plusieurs thématiques essentielles, notamment les critères de sélection des anticorps et des témoins appropriés, la comparaison des techniques manuelles et automatisées, l'optimisation des protocoles pour les échantillons en paraffine ainsi que la gestion des variations inter laboratoires et la validation des résultats.

Les échanges ont été consignés et analysés afin d'identifier les difficultés les plus fréquentes rencontrées par les utilisateurs et de proposer des solutions adaptées. Les recommandations formulées dans cet article s'appuient donc directement sur les expériences et retours d'experts ayant une pratique régulière de l'IHC.

En complément, des ressources en ligne et bases de données spécialisées ont été ajoutées afin de compléter les conseils fournis et orienter les utilisateurs vers des solutions testées.

## RÉSULTATS

Les participants sont issus de laboratoires où les marquages immunohistochimiques sont réalisés soit manuellement, soit avec des automates.

Ils réalisent à part équivalente des IHC et des IF. Parmi eux, 90% travaillent sur des échantillons inclus en paraffine. Ils utilisent également à part égale des tissus d'origine humaine ou murine, à moindre part des tissus provenant d'autres espèces.

Voici un aperçu des méthodes utilisées :

Méthodes de réalisation des IHC	Manuellement	Automate d'IHC		
		Leica	Roche	Autres
Par des professionnels	50%	20%	28%	2%

### 1. Critères et méthodes de sélection d'un anticorps primaire

Une majorité de participants sélectionne ses anticorps en s'appuyant sur les références citées dans les publications scientifiques de leur domaine de recherche.

Des sites de fournisseurs, dont la qualité et la spécificité des anticorps sont bien documentées et reconnues, ont été cités comme Abcam ([www.abcam.com](http://www.abcam.com)) et Cell Signaling Technology ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)).

Les différents sites internet suivants sont également des bons outils de référencement des anticorps :

- Biocompare : [www.biocompare.com](http://www.biocompare.com)
- Atlas antibodies : [www.atlasantibodies.com](http://www.atlasantibodies.com)
- Anticorps en ligne : [www.anticorps-enligne.fr](http://www.anticorps-enligne.fr)
- CiteAb : [www.citeab.com](http://www.citeab.com)
- The Antibody Registry : [www.antibodyregistry.org](http://www.antibodyregistry.org)
- Antibodypedia : [www.antibodypedia.com](http://www.antibodypedia.com)
- Linscott's Directory : [www.linscottsdirectory.com](http://www.linscottsdirectory.com)
- Antibody resource : [www.antibodyresource.com](http://www.antibodyresource.com)
- BenchSci : [www.benchsci.com](http://www.benchsci.com) (Site payant dédié aux groupes pharmaceutiques. Avantage: donne le contact du collègue de son laboratoire qui a déjà acheté l'Ac).

Le forum de l'AFH est également un moyen de faire appel à la communauté du domaine pour obtenir de bons conseils : [afh.com/forum](http://afh.com/forum)

Pour des espèces plus exotiques, les participants font appel à leurs collègues travaillant sur des échantillons de souris ou humain ou sollicitent des fournisseurs pour obtenir des échantillons gratuits.

Les professionnels disposant d'un automate d'immunomarquage font souvent appel à des Ac commercialisés par leur fournisseur d'automate ce qui facilite les mises au point. Toutefois ces Ac sont souvent dédiés à la clinique et peu à la recherche.

Il est également recommandé de privilégier des anticorps disposant d'un identifiant appelé « Research Resource Identifiers (RRIDs) ». Ces identifiants servent à aider les chercheurs à citer des ressources clés (anticorps, organismes modèles et projets de logiciels) dans la littérature biomédicale afin d'améliorer la transparence des méthodes de recherche. Ainsi, si un Ac identique est revendu par plusieurs fournisseurs on dispose d'un identifiant unique même en cas de changement de référence. Le registre des Ac (<https://rrid.site>) est la source officielle des identifiants d'Ac qui peuvent être cités dans les publications pour marquer de manière unique les Ac utilisés. Il peut aussi être consulté pour rechercher un anticorps d'intérêt.

Ainsi, lors de la sélection d'un anticorps pour la technique IHC il est important de :

- Vérifier, via la fiche technique et/ou des publications, que l'anticorps a été validé pour des applications en IHC et/ou IF. Les résultats de western blot et les images disponibles seront également analysés. Un Ac mettant en évidence une seule bande sur le gel de migration du WB permet de s'assurer de la spécificité de l'anticorps.
- Bien choisir l'origine de l'anticorps : un Ac monoclonal sera privilégié pour la reproductibilité de lot à lot et la spécificité. Les Ac recombinants sont également de plus en plus priorisés pour des raisons éthiques (règles des 3R – Remplacer, Réduire, Raffiner).
- Vérifier la concentration de l'anticorps recommandé : sur la fiche technique, la dilution recommandée pour l'Ac est aussi un bon moyen d'évaluer sa sensibilité. Un Ac devant être faiblement dilué (< au 1/100<sup>e</sup>) est peu recommandé.

Un guide pratique complet a été élaboré par le réseau européen des anticorps (EuroMAbNet, [www.euromabnet.com](http://www.euromabnet.com)) pour trouver et valider un Ac pour la recherche, toutes applications confondues [1].

## 2. Critères de sélection du matériel biologique et méthodes de validation de la spécificité d'un Ac

Il est important de disposer de tissus témoins appropriés, positifs et négatifs, pour valider la spécificité d'un Ac. Les choix de ces tissus témoins positifs et négatifs peuvent s'appuyer sur les données issues de différentes sources :

- La fiche technique de l'Ac
- Protein atlas: [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)
- Human protein atlas : [www.humanatlas.org](http://www.humanatlas.org)
- UniProt : [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)
- Pubmed : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

Généralement, le marquage d'Ac est testé sur des témoins positifs et négatifs (cellules et/ou tissus qui expriment l'antigène cible par rapport à ceux qui en sont dépourvus). La reconnaissance de la protéine endogène peut également être obtenue en modulant l'expression de la protéine endogène, par exemple en comparant des tissus issus d'une expérience de knock-out (KO) ou de silencing ciblé de gène (siRNA, shRNA, ou technologie CRISPR/Cas9). Les multiples contrôles positifs et négatifs doivent être testés dans la même expérience et sont essentiels pour permettre la confirmation de la détection de la protéine endogène et pour montrer que l'anticorps ne se lie pas en l'absence de la protéine cible. Il est mentionné que le passage d'un protocole d'IHC validé sur culot cellulaire à des tissus nécessite parfois un réajustement du protocole.

Il est également important de vérifier que l'Ac présente le profil de marquage cellulaire ou tissulaire attendu et, idéalement, qu'il détecte la localisation subcellulaire appropriée de l'antigène. Le choix de témoins positifs présentant différents niveaux d'expression de la protéine pour l'antigène cible, par exemple une expression forte par rapport à une expression modérée/faible, peut renforcer la confiance dans la validation et la spécificité de l'Ac et aider à identifier les Ac ayant la plus grande affinité pour l'antigène cible.

**Où trouver les blocs de tissus témoins positifs quand on ne dispose pas soi-même du matériel biologique ?**

- France tissue bank (FFPE banques) : [www.francetissuebank.com](http://www.francetissuebank.com)
- Tebubio : [www.tebubio.com](http://www.tebubio.com)
- BiolVT : <https://biovt.com>
- Scientist : <https://scientist.com/human-biological-samples>  
Portail qui répertorie les stocks de plusieurs fournisseurs
- Tissuearray : <https://tissuearray.com>
- Mise en place d'une collaboration avec un Centre de Ressources Biologiques.

Il existe également des lames prétraitées pour IHC contenant des spots protéiques à des concentrations connues permettant d'évaluer l'efficacité du processus (Lames PRS, Excilone).

Comme contrôle expérimental négatif pour la réactivité non spécifique de l'Ac primaire, on peut utiliser à la place de ce dernier un contrôle apparié à l'isotype et de la même espèce hôte (appelé Ac isotypique contrôle). Cet Ac contrôle, sans réactivité dans le système expérimental, permettra de valider la technique. Certains participants utilisent les Ac isotypiques utilisés en cytométrie de flux. Il est rapporté toutefois que ces Ac isotypiques donnent souvent du bruit de fond. Celui-ci peut varier selon les isotypes (les IgG2a ou IgG2b en donnent par exemple davantage). Il est rapporté que Cell Signaling Technology propose de bons contrôles isotypiques. Les réglementations BPL appliquées à la clinique imposent de multiplier par 10 ou 100 la concentration de l'isotype pour vérifier les cross-réactivités. Parmi les participants, seul une quinzaine utilise ce type de contrôle en routine. Les autres utilisent un contrôle sans Ac primaire mais avec application du secondaire ce qui permet de valider la spécificité de la méthodologie de révélation.

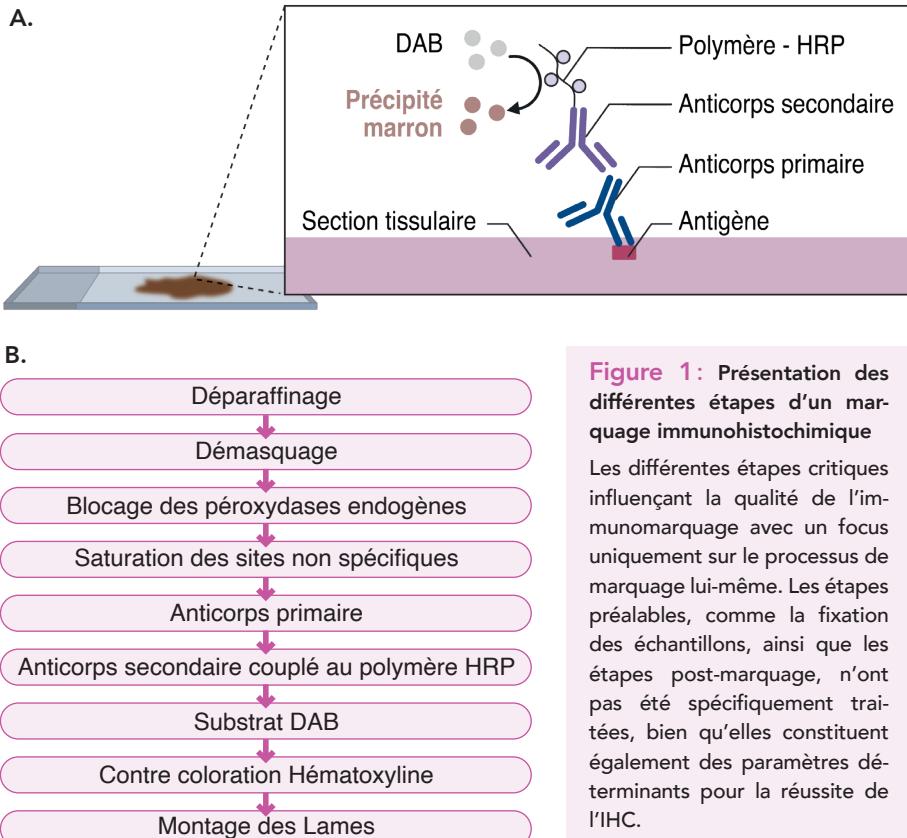
Ce choix se fait principalement parce que les personnes ont approuvé leur technique notamment celles travaillant depuis des années avec le même automate d'immunomarquage et les mêmes réactifs.

### **3. Stratégies expérimentales de mise au point de marquages IHC pour un Ac donné**

La technique de marquage d'IHC sur coupe paraffine comprend un certain nombre d'étapes (**Figure 1**). Lors des échanges, les étapes critiques influençant la qualité de l'immunomarquage ont été abordées. La **Figure 2** synthétise l'arbre de décision que suivent les participants lors de la mise au point de marquages IHC pour un Ac donné. Comme mentionné, le choix des étapes de démasquage et des solutions de blocage, ainsi que la sélection des diluants et des systèmes d'amplification sont décisifs.

#### **Étape de démasquage**

Il existe plusieurs méthodes pour démasquer les épitopes, mais la plus fréquemment utilisée en première intention est le démasquage par la chaleur, à pH 6 ou 9. Les participants réalisant les expériences manuellement utilisent majoritairement un bain-marie. Toutefois, la cocotte-minute est recommandée par certains car elle améliore cette étape du fait qu'elle a lieu sous pression. La reproductibilité des résultats est ainsi améliorée. Le four à micro-ondes est moins recommandé car la température ne reste pas stable. Il ne doit pas être trop fort pour éviter l'évaporation de la solution et l'assèchement du tissu.



**Figure 1:** Présentation des différentes étapes d'un marquage immunohistochimique

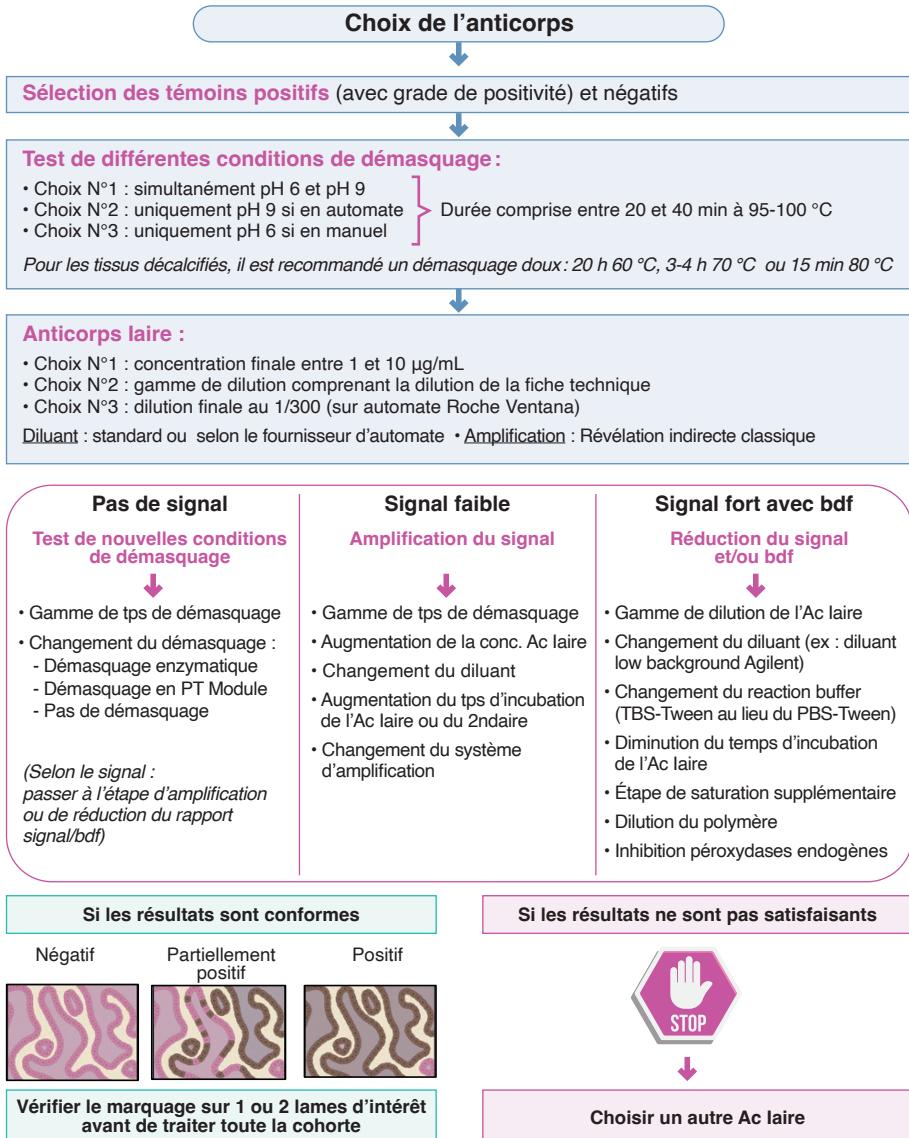
Les différentes étapes critiques influençant la qualité de l'immunomarquage avec un focus uniquement sur le processus de marquage lui-même. Les étapes préalables, comme la fixation des échantillons, ainsi que les étapes post-marquage, n'ont pas été spécifiquement traitées, bien qu'elles constituent également des paramètres déterminants pour la réussite de l'IHC.

### Étape de blocage

Les bloqueurs de protéines agissent en occupant les sites de liaison non spécifiques des tissus (adsorption des protéines) ce qui minimise la réaction non spécifique indésirable avec l'anticorps primaire d'intérêt. Les bloquants les plus couramment utilisés en technique manuelle sont la gélatine de poisson, l'albumine de sérum bovin (BSA), le sérum de cheval ou le sérum de l'espèce dans lequel est dérivé l'anticorps secondaire. Les participants utilisant des automates utilisent préférentiellement les solutions de blocage proposées par leurs fournisseurs.

### Choix du diluant d'anticorps

Les deux tampons utilisés classiquement en manuel sont le PBS (Phosphate Buffered Saline) et le TBS (Tris-HCl Buffered Saline). Au cours de cette table ronde, l'intérêt de l'un ou l'autre a été discuté. Ils sont utilisés pour maintenir le pH

**Figure 2 : Arbre décisionnel de mise au point de marquages IHC pour un Ac donné.**

L'arbre décisionnel constitue un outil clé pour guider les utilisateurs à travers les différentes étapes d'un marquage immunohistochimique. Il permet d'adopter une approche rationnelle et structurée en facilitant le choix des paramètres critiques influençant la qualité des marquages.

(entre 7,4 et 7,5) et l'osmolarité de la solution, ce qui est essentiel pour préserver la morphologie des tissus et l'intégrité des protéines. Cependant, leurs propriétés les rendent adaptées à différents scénarios dans le cadre de l'IHC.

### Composition et propriété du PBS pour l'IHC :

C'est une solution saline contenant du chlorure de sodium, du phosphate de sodium et, dans certaines formulations, du chlorure de potassium et du phosphate de potassium.

Le PBS permet de :

- préserver des cellules et des tissus : il est isotonique et non toxique, ce qui le rend idéal pour préserver la structure cellulaire et la morphologie des tissus.
- garantir la stabilité du pH : il offre une excellente stabilité du pH à 7,4, cruciale pour les réactions antigène-anticorps.

Le PBS est polyvalent car il est aussi souvent utilisé comme tampon de lavage entre les étapes de l'IHC pour éliminer l'excès d'anticorps et de réactifs sans perturber les coupes de tissus ou les anticorps liés.

### Composition et propriété du TBS pour l'IHC :

C'est une solution saline tamponnée de THAM (tris (hydroxy méthyl) amino-méthane), un tampon biologique largement utilisé contenant du chlorure de sodium.

Le TBS a l'avantage de :

- Réduire le bruit de fond, un problème courant en IHC. Ceci est particulièrement vrai pour les tissus ayant une activité peroxydase endogène élevée.
- Avoir un pouvoir tampon supérieur à celui du PBS, ce qui peut être avantageux pour maintenir un pH stable (en général 7,5) pendant des temps d'incubation plus longs ou dans des conditions de température variables.
- Être compatible avec divers systèmes de détection. Certains systèmes de détection, en particulier ceux qui utilisent la peroxydase du raifort (HRP), peuvent être plus performants avec le TBS.

### Choix entre PBS et TBS

Le choix entre le PBS et le TBS en immunomarquage se fera sur les besoins spécifiques de l'expérience :

- Caractéristiques de l'antigène : certains antigènes peuvent être mieux révélés avec un tampon qu'avec l'autre.
- Type de tissu : un tampon peut réduire plus efficacement le bruit de fond en fonction de la nature du tissu et de la présence d'enzymes endogènes.
- Type d'anticorps : le choix peut dépendre des anticorps primaires et secondaires utilisés. Certains anticorps peuvent avoir des protocoles optimisés recommandant le TBS ou le PBS.

## Diluants commerciaux

Les diluants commerciaux pour les anticorps sont souvent des solutions tamponnées :

- À base de tampon TRIS-HCl à pH neutre (7,0 - 7,6).
- Avec un détergent, du NaCl et des stabilisateurs
- Avec des agents réducteurs de bruit de fond à base de protéines telles que la BSA, des protéines sériques ou des caséines.

Les formulations des diluants d'Ac peuvent modifier de manière significative la stabilité et les propriétés de liaison des anticorps affectant à la fois la spécificité pour l'épitope et l'interaction non spécifique. Il ne faut pas négliger son impact et ne pas hésiter à changer dans le cas où l'on observe beaucoup de bruit de fond ou au contraire si le signal est trop faible.

## 4. Choix du système d'amplification

Les systèmes d'amplification majoritairement utilisés par les participants sont (liste non exhaustive) :

### En manuel :

- Gamme Vector laboratories : VECTASTAIN® ABC system ou ImmPRESS Polymer
- Gamme Biocare Medical : LLC MACH 2 ou 3 Rabbit HRP Polymer Detection
- Gamme Dako : EnVision, EnVision +/Flex
- Gamme ZyroChem

### En automate :

- Ventana : OmniMap/UltraMap multimer, HQ and NP Hapten Multimer, TSA-BF Amp kit
- Leica : Bond Refine (Power Vision) - Novolink.

Pour le choix des Ac secondaires, il est recommandé de privilégier ceux à adsorption croisée. Ce sont des Ac polyclonaux qui ont subi une étape de purification supplémentaire appelée adsorption croisée pour filtrer les membres qui se lient à des espèces d'immunoglobulines (IgG) hors cible. Par exemple, il est notamment intéressant de sélectionner un secondaire qui a été adsorbé contre l'espèce ciblée. Cela permet de limiter des réactions non spécifiques de ce dernier sur le tissu de l'espèce cible.

## Cas particulier du marquage avec un anticorps primaire de souris sur du tissu de souris

### Différentes solutions sont possibles :

- Kit Mouse on Mouse (MOM) de Vector (réf: BMK-2202) ou d'Abcam (réf: ab269452)
- Anticorps secondaire monoclonal de lapin anti-Fc souris d'Abcam (clone M204-3, rabbit anti-Mouse IgG Pan (1, 2a, 3) Fc specific). Il joue le rôle de *linker* entre le primaire et un Ac tertiaire anti-IgG de lapin, il est à diluer préférentiellement comme le primaire dans du diluant « Antibody Diluent, Background Reducing » de Dako/Agilent (réf : S3022).
- Saturation avec des fragments Fab de souris (Jackson). Les Ac à fragment Fab sont générés par digestion à la papaïne d'Ac IgG entiers afin d'éliminer l'ensemble du fragment Fc, y compris la région charnière. Ils sont utilisés pour bloquer les immunoglobulines endogènes.

Les utilisateurs des kits MOM ont rapporté un rapport qualité/prix considéré comme moyen du fait du bruit de fond souvent encore présent sur les tissus après application. Quant à l'anticorps monoclonal de lapin, celui-ci semble bien fonctionner à l'exception de tissus très riches en immunoglobulines endogènes (ex : rein de souris âgée de plus de 24 mois).

## DISCUSSION

Les résultats des deux sessions de la table ronde mettent en évidence une grande diversité des pratiques en matière de mise au point des immunomarquages, tout en révélant des habitudes communes pour optimiser et valider les protocoles. Cette diversité peut s'expliquer notamment par les différences dans les équipements (automatisation ou technique manuelle), les types d'échantillons analysés et les objectifs spécifiques de chaque laboratoire.

Tout d'abord, le choix des Ac primaires repose majoritairement sur des publications scientifiques et des bases de données spécialisées. La nécessité d'une validation rigoureuse des Ac a été soulignée, notamment via l'utilisation de témoins positifs et négatifs appropriés et l'exploitation de registres tels que The Antibody Registry ou Protein Atlas. Il a également été mentionné que l'adoption des Research Resource Identifiers (RRIDs) pourrait améliorer la traçabilité et la reproductibilité des expériences [2].

Concernant les protocoles expérimentaux, l'étape de démasquage a été identifiée comme un facteur critique influençant la qualité du marquage. Bien que plusieurs méthodes existent, la cocotte-minute a été plébiscitée pour sa capacité à offrir une meilleure reproductibilité des résultats par rapport au bain-marie ou au micro-ondes.

Par ailleurs, le choix des solutions de blocage et des diluants joue un rôle clé dans l'optimisation du signal et la réduction du bruit de fond. Le débat entre l'utilisation du PBS et du TBS a mis en évidence que ce dernier pouvait être privilégié pour des échantillons présentant une forte activité peroxydasique endogène. De même, le recours à des diluants commerciaux adaptés aux Ac utilisés est recommandé pour améliorer la qualité des marquages.

Le choix du système d'amplification a également été discuté, avec une préférence pour des méthodes adaptées aux contraintes expérimentales spécifiques. Pour les automates, les solutions propriétaires sont souvent utilisées, tandis qu'en manuel, une large gamme de kits est disponible auprès de nombreux fournisseurs.

Enfin, a été abordé dans les discussions le cas d'un marquage IHC avec un anticorps primaire de souris sur des tissus de souris. Plusieurs solutions ont été proposées pour contourner les problèmes de marquage liés à l'utilisation d'Ac de souris sur des tissus murins, comme l'utilisation de kits Mouse-on-Mouse ou d'Ac secondaires adsorbés croisés.

## CONCLUSION

Cette étude collaborative menée sous forme de table ronde a permis de dresser un état des lieux des pratiques en immunohistochimie et de recenser les difficultés rencontrées par les professionnels du domaine. Les discussions ont abouti à des recommandations basées sur les expériences des participants et des sources spécialisées, mettant en avant des stratégies développées pour optimiser la mise au point des immunomarquages [1].

L'un des principaux enseignements est l'importance d'une approche rigoureuse dans la sélection et la validation des Ac, ainsi que dans le choix des protocoles expérimentaux. L'automatisation offre des avantages en termes de reproductibilité, mais les méthodes manuelles restent largement utilisées et nécessitent des optimisations spécifiques.

Enfin, la nécessité de renforcer le partage des connaissances au sein de la communauté scientifique a été soulignée. La mise en commun des retours d'expérience, notamment via des plateformes collaboratives comme le forum de l'AFH, pourrait contribuer à améliorer la standardisation des pratiques et à faciliter la résolution des problèmes rencontrés en immunohistochimie.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier chaleureusement l'ensemble des participants aux tables rondes pour leurs échanges constructifs et leurs partages d'expériences, qui ont permis la rédaction de cet article. Nous exprimons également notre gratitude aux organisateurs du congrès de l'AFH 2024 pour avoir offert un cadre propice aux discussions.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RONCADOR G., ENGEL P., MAESTRE L., ANDERSON A., CORDELL J., CRAGG M. The European antibody network's practical guide to finding and validating suitable antibodies for research. *mAbs* 2015, **8**:1, 27-36.
2. KWON D. The antibodies don't work! The race to rid labs of molecules that ruin experiments. *Nature*. 2024, **635** (8037):26-28.