

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE DJILLALI LIABES SIDI BEL-ABBES

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

POLYCOPIÉ EN IMMUNOCHIMIE ALIMENTAIRE

DR. AMIRA GHISLAINE DRA



Polycopié destiné aux étudiants en Biologie et en Sciences alimentaires, plus particulièrement aux étudiants, de Licence « Alimentation, Nutrition et Pathologies » et de Master « Biochimie de la Nutrition ».

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2018/2019

Avant-Propos

Ce travail composé de trois chapitres est destiné aux étudiants en Biologie et en Sciences Alimentaires, plus particulièrement aux étudiants, de Licence « Alimentation, Nutrition et Pathologies » et de Master « Biochimie de la Nutrition ».

Il a pour objectif de rendre accessible les principes de l'immunochimie, dont les méthodes tendent à se développer de plus en plus dans le secteur agroalimentaire. Du fait de leurs principales caractéristiques (spécificité, faible seuil de détection, rapidité), ainsi que leur performance par rapport aux méthodes traditionnelles (chromatographie, électrophorèse...) ou récentes (RMN, PCR).

Les différents chapitres traitent des bases de l'immunochimie en tant que science ainsi que des différentes techniques appliquées dans différents domaines notamment l'agro-alimentaire.

Les notions de base (terminologie, structures des anticorps, caractéristiques de la réaction anticorps-antigène ainsi que la nature de leur liaison) sont présentées dans le premier chapitre.

Les deux chapitres suivants, sont consacrés aux principes des techniques immunochimiques, dans lesquels, ces méthodes sont divisées en deux types, avec immunoréactifs marqués et non marqués.

Afin de renforcer l'aspect pédagogique et didactique de ce document, un effort particulier a été consenti sur la sélection des informations les plus pertinentes. Le tout présenté dans un style facile et abordable pour les étudiants et enrichi de nombreuses illustrations détaillant les différents mécanismes et principes de chaque méthode.

Table des matières

Avant-propos.....	i
I.1. Généralités :	v
I.1.1. Définition.....	1
I.1.2. Domaine d'application.....	1
I.1.3. Propriétés des méthodes immunochimiques	2
I.2. Notions de base	2
I.2.1. Antigène :	2
I.2.2. Epitope ou déterminant antigénique :	2
I.2.3. Haptène :	2
I.2.4. Structure des anticorps :.....	3
I.2.5. Paratope :	4
I.2.6. Anticorps polyclonaux :	4
I.2.7. Anticorps monoclonaux :	6
I.3. Aspect théorique de la réaction antigène – anticorps	7
I.3.1. Caractéristiques de la liaison antigène – anticorps	7
I.3.2. Nature des liaisons- faible énergie.....	7
I.3.2.1. Forces de van der Waals :	7
I.3.2.2. Forces électrostatiques = liaisons ioniques :.....	8
I.3.2.3. Liaison hydrogène :.....	8
I.3.2.4. Liaisons hydrophobes :.....	8
I.3.3. Affinité et avidité.....	8
I.3.3.1. Affinité (ou affinité intrinsèque) :.....	8
I.3.3.2. Avidité (ou affinité fonctionnelle) :	8
I.3.4. Spécificité :.....	9
I.3.5. Réaction croisée :.....	9
II.1. Réactions de précipitation en milieu liquide	10
II.1.1. Méthodes de l'anneau (ring test)	10
II.1.2. La « primofloculation » (Ramon).....	10
II.1.3. Méthode de d'HEIDELBERGER KENDALL	11
II.1.4. Méthodes de quantification	12
II.1.4.1. La turbidimétrie / néphélométrie :	12

II.2. Réactions de précipitation en milieu gélifié	13
II.2.1. Immunodiffusion simple en gel : technique d'Oudin	13
II.2.2. Immunodiffusion double ou réaction d'Ouchterlony	14
II.2.3. Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)	15
II.2.4. Immunoélectrophorèse : Electrophorèse et Immunodiffusion	16
II.2.4.1. Immunoélectrophorèse en flammèches ou monodimensionnelle (méthode de Laurell)	16
II.2.4.2. Immunoélectrophorèse croisée (Bidimensionnelle)	17
II.3. Les réactions d'agglutination.....	18
II.3.1. Application des méthodes d'agglutinations dans la détermination du groupe sanguin (Système ABO).....	19
II.3.2. Test de fixation du complément	19
II.4. Immuno-chromatographie d'affinité.....	21
III.1. Systèmes de test avec des immunoréactifs marqués.....	22
III.1.1. Technique IFA (immunofluorescence assay)	22
III.1.1.1. Définition	22
III.1.1.2. Principe	22
III.1.2. Technique RIA (RadioImmuno Assay)	23
III.1.2.1. Définition	23
III.1.2.2. Marquage	23
III.1.2.3. Principe	23
III.1.3. Techniques immunoenzymatiques	24
III.1.3.1. Technique ELISA	24
III.1.3.2. Technique ELISPOT (Dosage en phase hétérogène)	31
III.1.3.3. Immunohistochimie	31
III.1.4. Test de Western blot (immunotransfert) : Électrophorèse de protéines sur gel.....	32

Liste des Figures

Figure 1: Structure d'un anticorps.....	3
Figure 2: Structure des différentes immunoglobulines	3
Figure 3: Types de fragments issus par clivage par la papaïne et la pepsine	4
Figure 4: Sérum polyclonal renfermant un mélange d'anticorps spécifiques	5
Figure 5: Production des anticorps monoclonaux.....	6
Figure 6: Réaction antigène-anticorps	7
Figure 7: Spécificité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène	9
Figure 8: Réaction croisée	9
Figure 9: Test de l'anneau	10
Figure 10: Test de l'anneau (complément de figure)	10
Figure 11: Technique de « primofloculation » (Ramon).....	11
Figure 12: Courbe de précipitation quantitative antigène-anticorps	12
Figure 13: turbidimétrie / néphélométrie.....	12
Figure 14: Technique d'Oudin	14
Figure 15: Technique d'Ouchterlony.....	14
Figure 16: Technique de Mancini	15
Figure 17: Immunoélectrophorèse	16
Figure 18: Immunoélectrophorèse Monodimensionnelle.....	17
Figure 19: Immunoélectrophorèse croisée (Bidimensionnelle).....	17
Figure 20: Hémagglutinations	18
Figure 21: Méthode de fixation du complément.....	20
Figure 22 : Technique de chromatographie d'affinité	21
Figure 23 : Immunofluorescence directe et indirecte.....	23
Figure 24 : Dosage de la mélatonine par la technique RIA.....	24
Figure 25: Méthode EMIT.....	27
Figure 26: Variantes de la technique EMIT	28
Figure 28: Méthode ELISPOT.....	31
Figure 29: Technique immunohistochimique	32
Figure 30 : Technique du Western-blot.....	33

Liste des Tableaux

Tableau 1: Système ABO	19
Tableau 2: Les réactions enzymatiques.....	25
Tableau 3: Différentes phases du dosage immunoenzymatique.....	26
Tableau 4: Modes réactionnels du dosage immunoenzymatique	26

I.1. Généralités :

L'immunochimie est une sous discipline de la chimie qui étudie les constituants et les réactions chimiques du système immunitaire. De nombreuses méthodes ont été développées et améliorées en immunochimie et sont maintenant utilisées dans d'autres disciplines comme la virologie ou la biologie moléculaire.

Svante Arrhenius fut l'un des pionniers de la discipline et il publia *Immunochemistry* en 1907 pour décrire l'utilisation des méthodes de chimie physique pour l'étude des toxines et des antitoxines.

Les méthodes immunochimiques tendent à se développer de plus en plus dans le secteur agroalimentaire. Du fait de leurs principales caractéristiques (spécificité, faible seuil de détection, rapidité), elles apparaissent aussi performantes, sinon plus, que les méthodes traditionnelles (chromatographie, électrophorèse...) ou récentes (RMN, PCR). Ces méthodes présentent trois applications importantes : d'une part, elles sont utilisées pour le contrôle de l'hygiène, à la fois pour la détection des flores contaminantes et pour celle des flores pathogènes.

D'autre part, elles permettent le contrôle de la qualité des produits alimentaires. En effet, elles sont utilisées pour analyser la composition de ces produits, détecter les fraudes (additions de protéines de lait ou de soja dans de la viande...), détecter la présence de substances toxiques (fongicides) et d'allergènes... Enfin, elles permettent de contrôler l'effet des traitements agroalimentaires appliqués aux aliments sur la qualité de ceux-ci. Ces méthodes doivent cependant souvent être associées à d'autres techniques : microbiologiques ou physicochimiques.

I.1.1. Définition

Les méthodes d'immunochimie sont des réactions utilisées afin de permettre la détection et la quantification de molécules en très faible quantité appelées analytes. La détection se fait en général dans les milieux biologiques. Ces méthodes sont basées sur la spécificité de la réaction antigène---anticorps (Ag-Ac).

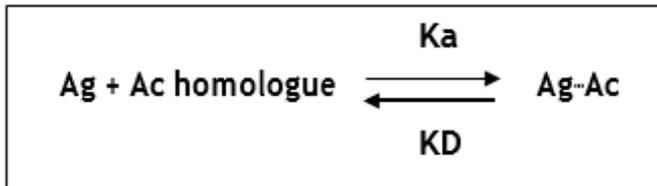
I.1.2. Domaine d'application

En plus du secteur alimentaire, le domaine d'application de l'immunochimie est vaste :

- Diagnostic de **maladies infectieuses** (détecter des bactéries, des virus, des champignons, des parasites) Il se fait de 2 manières :
 - ✚ par diagnostic indirect (recherche des Ac spécifiques générés dans le sérum)
 - ✚ par diagnostic direct (recherche directement l'agent infectieux dans les liquides biologiques ou dans des biopsies c'est à dire sur un tissu)

NOTIONS DE BASE EN IMMUNOCHIMIE

- Diagnostic de **pathologies touchant le système immunitaire** : déficit immunitaire, maladies auto-immunes (ex : polyarthrite rhumatoïde), pathologies qui créent une hypersensibilité (allergies)...
- **Dosage quantitatif de biomolécules** : dosage d'hormones, de médicaments, de vitamines, de protéines pathologiques déclenchées dans des processus inflammatoires



Ka : constante d'association

KD : constante de dissociation

I.1.3. Propriétés des méthodes immunochimiques

Dans l'analyse, les méthodes d'immunochimie se distinguent en général par les propriétés suivantes :

- ✚ Sensibilité élevée (jusqu'au pico gramme par litre)
- ✚ Simplicité de préparation des échantillons
- ✚ Faible consommation de solvant
- ✚ Débit élevé d'échantillons - automatisation possible
- ✚ Simplicité de l'évaluation
- ✚ Résultats après un délai très bref

C'est pourquoi, elles sont fréquemment utilisées comme méthodes de dépistage.

I.2. Notions de base

I.2.1. Antigène :

Toute substance naturelle ou synthétique qui est reconnue par les cellules du système immunitaire.

I.2.2. Epitope ou déterminant antigénique :

Ce sont des zones d'intérêt particulier sur une partie limitée de l'Ag qui va être reconnue par une partie de l'Ac (paratope). Il a une structure tridimensionnelle qui est complémentaire au site de liaison avec l'Ac. La plupart des Ag possèdent plusieurs épitopes, le tout sera alors responsable d'une réponse polyclonale. Les épitopes sont généralement conformationels (car structure 3D) mais il existe aussi des épitopes séquentiels (séquences successive sur la structure primaire).

I.2.3. Haptène :

Ce sont des molécules de faible poids moléculaire (<5000 Da) qui peuvent induire la synthèse d'Ac spécifiques lorsqu'ils sont couplés à une protéine porteuse (albumine, adjuvant de Freud...). Cet

NOTIONS DE BASE EN IMMUNOCHIMIE

haptène est incapable de générer lui-même une production d'Ac. Un haptène ne possède donc qu'un seul épitope.

I.2.4. Structure des anticorps :

Ils font partie de la famille des immunoglobulines. Ils sont composés de 2 chaînes légères, appelées L (« light »), et de 2 chaînes lourdes, appelées H (« heavy ») ; reliées par des ponts disulfure.

Aux extrémités, il y a des zones variables (V) qui sont les sites de fixation aux Ag, c'est à dire là où se feront les réactions. Le reste est composé de zones constantes (C).

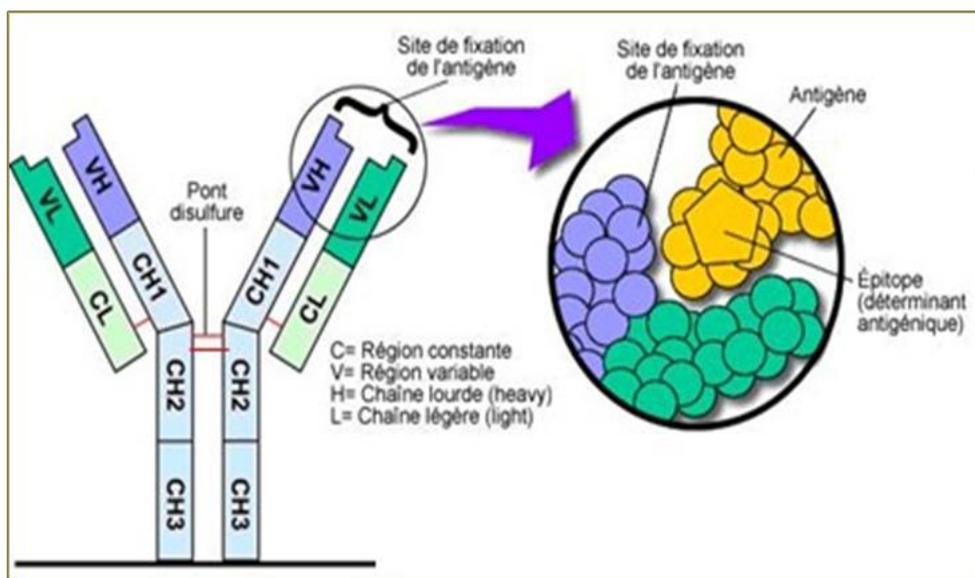


Figure 1: Structure d'un anticorps

Il existe 5 classes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgA, IgD, IgE

Celles qui intéressent le plus ce cours sont les IgG, c'est-à-dire les Ac classiques, protecteurs, retrouvés dans le sérum.

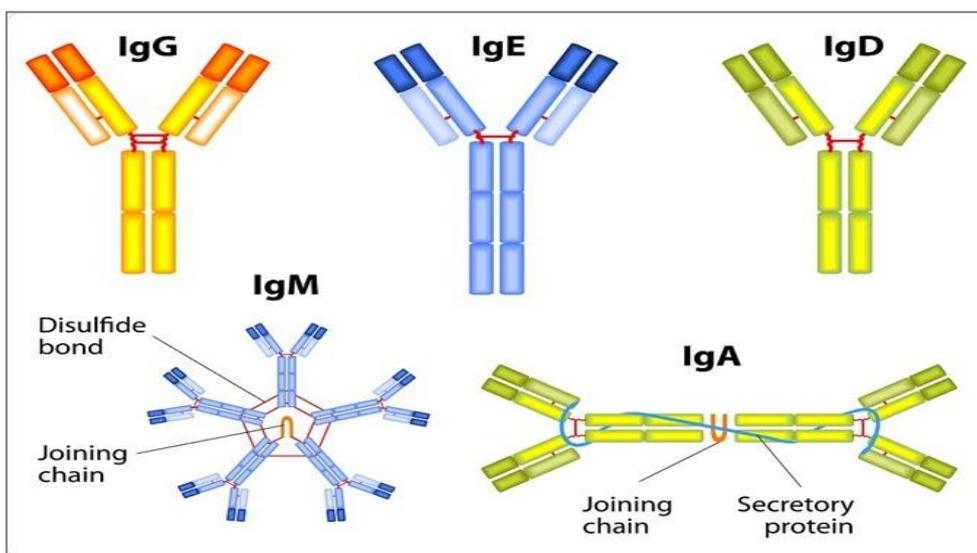


Figure 2: Structure des différentes immunoglobulines

NOTIONS DE BASE EN IMMUNOCHIMIE

I.2.5. Paratope :

C'est la partie de l'Ac qui est mise en contact avec l'épitope. Sa structure spatiale constitue une niche qui va permettre à l'Ag de venir se positionner : c'est donc le lieu de la réaction spécifique.

On n'utilise pas toujours les Ac entiers, on a parfois recours à des fragments d'Ac générés par des enzymes protéolytiques. Les fragments sont produits par des enzymes qui permettent une coupure modérée, ménagée de la molécule.

On distingue 2 types de fragments :

- Ceux obtenus par la **papaïne** : elle coupe la molécule au-dessus du pont disulfure.

On obtient 3 fragments :

- 2 fragments FAB identiques, porteurs du site de liaison pour l'Ag
- 1 fragment FC (fragment cristallisable) qui comporte les fonctions effectrices comme la fixation au complément, aux récepteurs FC
- Ceux obtenus par la **pepsine** : il y a plusieurs sites de protéolyse en dessous des ponts disulfure et l'on génère un seul fragment utile : Le fragment $F(ab')_2$. Le fragment FC est dégradé.

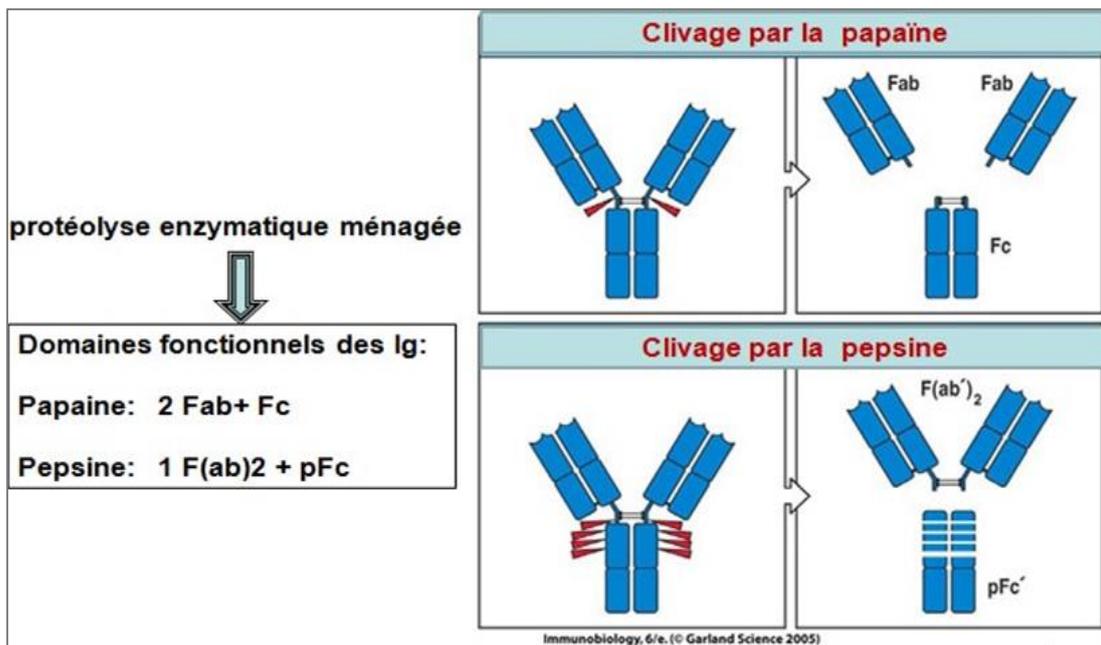


Figure 3: Types de fragments issus par clivage par la papaïne et la pepsine

I.2.6. Anticorps polyclonaux :

Ce sont des Ac constitués d'un mélange d'Ac produits par des lymphocytes B différents. Ils peuvent résulter :

- de l'injection à l'animal d'une protéine non purifiée
- ou plutôt de l'injection à l'animal d'une protéine purifiée : par exemple si un Ag possède X

NOTIONS DE BASE EN IMMUNOCHEMIE

épitopes, on va récupérer les Ac différents qui correspondent à ces X épitopes. Le sérum produit va donc reconnaître le même Ag mais avec des affinités différentes selon l'épitope qui a été impliqué.

- Les sources fréquentes d'Ac polyclonaux d'animaux immunisés sont le sang (antisérum par ex. de lapins), les œufs (fraction d'Ig du jaune d'œuf par ex. de poules) et le lait (fraction de g- globulines par ex. de vache).

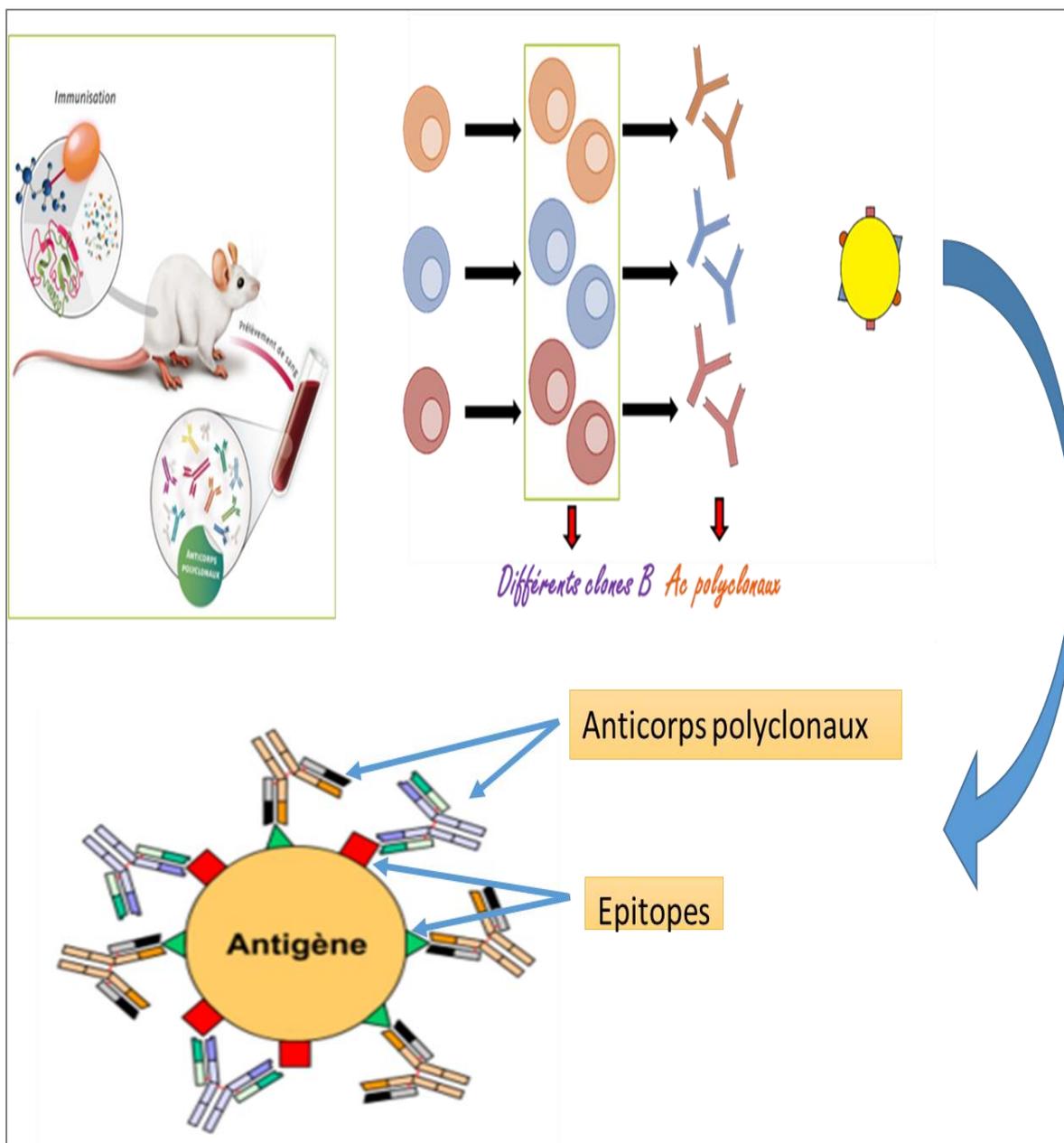


Figure 4: Sérum polyclonal renfermant un mélange d'anticorps spécifiques

NOTIONS DE BASE EN IMMUNOCHEMIE

1.2.7. Anticorps monoclonaux :

Ce sont des Ac constitués d'une population moléculaire homogène avec une monospécificité pour un épitope donné. Ils sont produits de manière beaucoup plus onéreuse par des cellules en culture. Leur lieu de synthèse spécifique est l'hybridome, qui est une cellule qui résulte de la fusion d'une cellule du myélome (prolifération illimitée) avec un lymphocyte B qui provient d'une souris immunisée vis-à-vis de la protéine pure injectée. Dans un but d'analyse, on utilise la plupart du temps des Ac polyclonaux, mais les AcM acquièrent une importance croissante pour des problèmes spécifiques (spécificité plus importante).

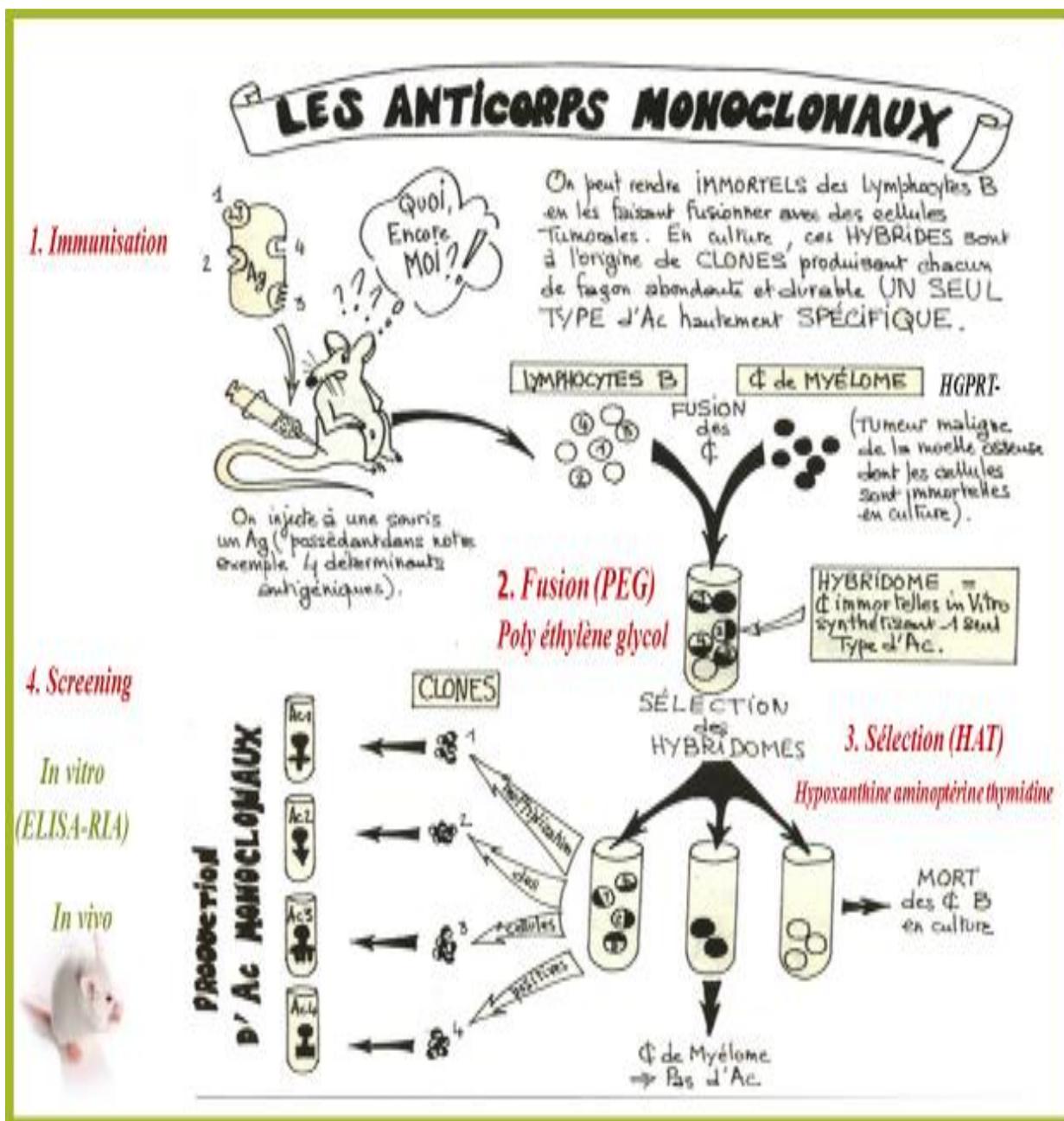


Figure 5: Production des anticorps monoclonaux

I.3. Aspect théorique de la réaction antigène – anticorps

In vitro, elle peut se produire quand on ajoute un Ac homologue à son Ag. On obtient alors le complexe Ag --- Ac qui est spécifique. Cette réaction est spécifique et réversible.

La spécificité est due à la reconnaissance stérique de l'Ag (épitope) et de l'Ac (paratope).

La réversibilité est possible car la combinaison entre ces 2 molécules se fait par des liaisons de faible énergie.

I.3.1. Caractéristiques de la liaison antigène – anticorps

Association de 2 molécules entre le paratope et l'épitope. Cette association nécessite une bonne complémentarité stérique entre les 2 sites réactifs.

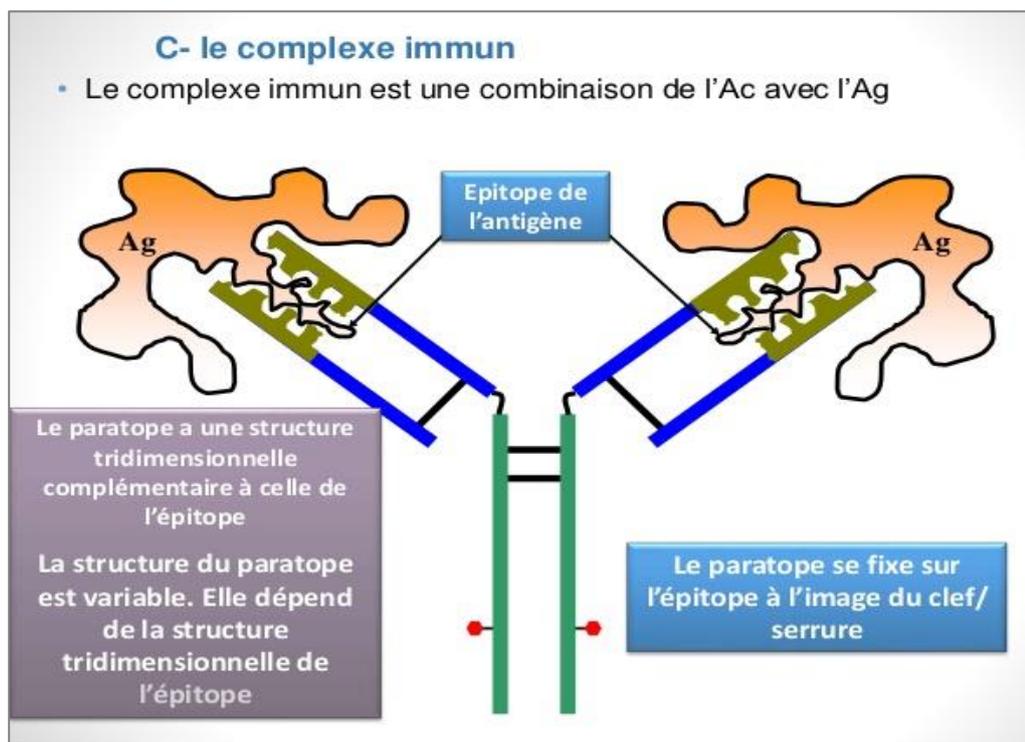


Figure 6: Réaction antigène-anticorps

C'est une réaction exothermique, spécifique et réversible.

La loi d'action de masse détermine la constante d'équilibre $K =$ affinité intrinsèque.

I.3.2. Nature des liaisons- faible énergie

- Dépendent de la complémentarité entre le paratope et l'épitope
- Non covalentes

I.3.2.1. Forces de van der Waals :

- Les plus faibles
- Dues au mouvement des électrons dans la molécule : formation de dipôles SS

NOTIONS DE BASE EN IMMUNOCHIMIE

I.3.2.2. Forces électrostatiques = liaisons ioniques :

- Entre 2 groupements ioniques
- 2 à 5 kcal/mol

I.3.2.3. Liaison hydrogène :

- Entre atomes électropositifs et électronégatifs
- Faibles

I.3.2.4. Liaisons hydrophobes :

- Entre groupements polaires ou hydrophobes
- Faibles
- Il y a donc des forces d'attraction et de répulsion entre le paratope et l'épitope.

L'énergie de liaison est élevée entre le paratope et l'épitope car toutes ces liaisons sont de faible énergie mais sont très nombreuses.

- Quand on mesure l'affinité d'un anticorps pour son antigène, on mesure la somme des forces attractives et répulsives.

I.3.3. Affinité et avidité

En biochimie, l'avidité est l'intensité de l'ensemble des forces des interactions non covalentes entre une macromolécule biologique et un ligand qui se fixe sur plusieurs sites à sa surface. Elle se distingue ainsi de l'affinité qui est la force d'une seule interaction non covalente.

I.3.3.1. Affinité (ou affinité intrinsèque) :

Correspond à la force des interactions entre un paratope et un épitope. Sa mesure nécessite l'utilisation d'un antigène et d'un anticorps monovalent.

Les anticorps produits par une réponse mémoire possèdent une plus haute affinité que ceux produits en réponse primitive.

En général, l'affinité des AcP pour leurs Ag reste constante dans des plages de *pH* comprises entre 4 et 9 et une plage de concentration de sel de $c(\text{NaCl}) = 0-1 \text{ mol/l}$. A l'inverse, les AcM peuvent réagir de manière très sensible aux modifications du milieu, car ils se lient souvent seulement à un seul épitope. Une modification du *pH* de 7,0 à 8,0 ou une modification du nombre de mol/l, de 100 à 200 mmol/l, peut déjà annuler la capacité de fixation.

L'affinité détermine de manière prépondérante la qualité de l'Ac pour un test d'immunochimie, car elle détermine la solidité de la liaison Ag-Ac.

I.3.3.2. Avidité (ou affinité fonctionnelle) :

Correspond à la force des interactions entre un antigène multi-déterminant et les anticorps produits à son encontre.

I.3.4. Spécificité :

C'est-à-dire, la faculté de reconnaître certaines structures de liaisons de poids moléculaire élevé et de se lier avec elles pour former un *complexe immun*, est la propriété la plus marquante des Ac. Cette propriété est utilisée dans le diagnostic clinique et dans l'analyse en vue de l'identification ou pour la détection de différents Ac et Ag.

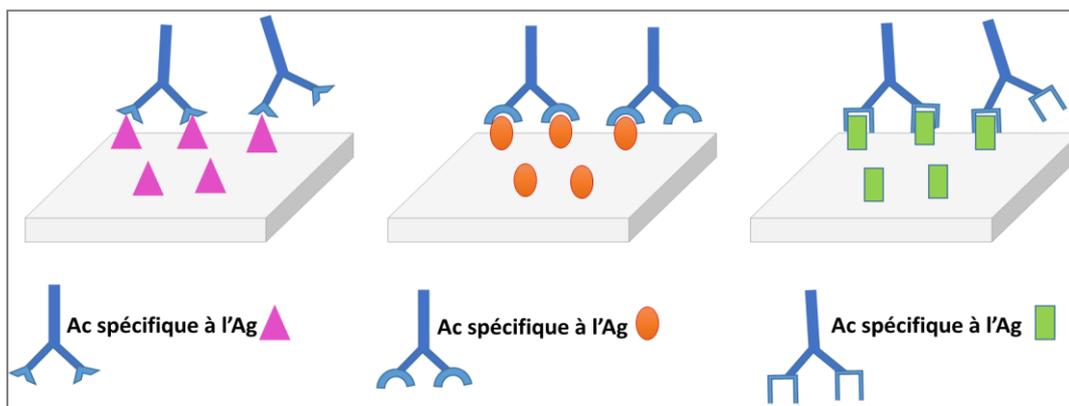


Figure 7: Spécificité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène

I.3.5. Réaction croisée :

Il s'agit d'une réaction immunologique d'un Ac avec des Ag de structures différentes. Il n'est pas nécessaire pour cela que les déterminants antigéniques soient complètement identiques, des similitudes structurelles peuvent suffire pour que les AC se lient avec eux. Les forces de liaison pour les différents Ag sont plus ou moins marquées. Si les Ag de structures différentes ont des déterminants communs, identiques, il s'agit d'une réactivité commune ; les forces de liaison ont alors la même intensité.

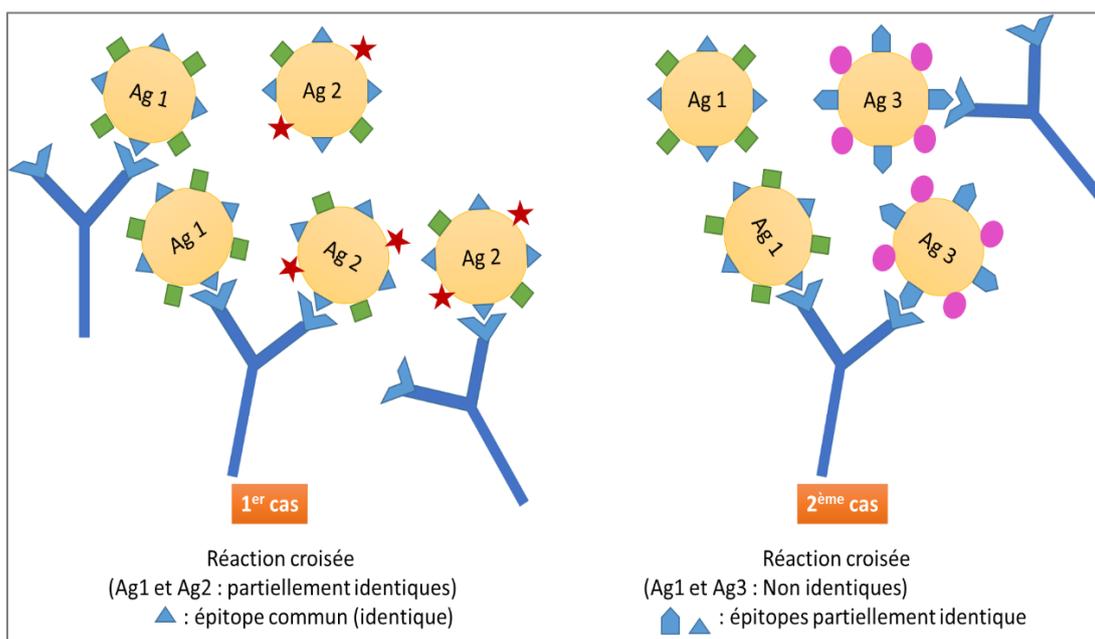


Figure 8: Réaction croisée

II.1. Réactions de précipitation en milieu liquide

II.1.1. Méthodes de l'anneau (ring test)

Le test consiste à mettre en présence dans un étroit tube vertical un sérum contenant les anticorps recherchés et l'antigène correspondant sans les mélanger de façon à laisser s'opérer la diffusion des molécules dissoutes entre les deux solutions. Si les concentrations respectives en anticorps et en antigènes sont judicieusement choisies pour se trouver dans la zone d'équivalence, on observe la formation d'un anneau de précipitation blanchâtre à l'interface entre les deux solutions qui traduit la formation de complexes immuns.

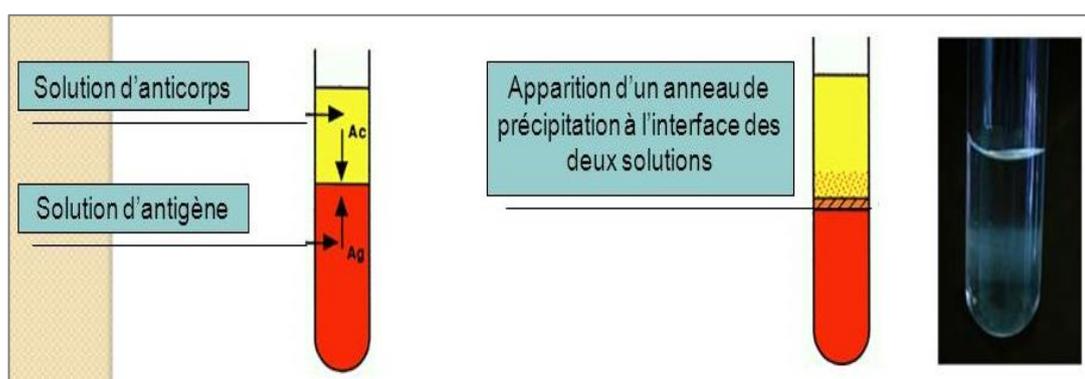


Figure 9: Test de l'anneau

Les phénomènes de la technique de l'anneau sont mieux illustrés sur la figure suivante :

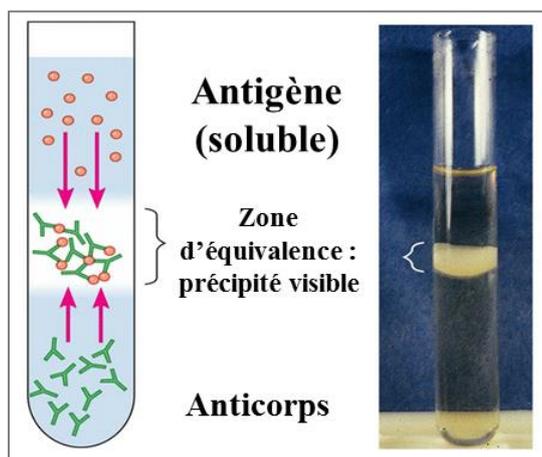


Figure 10: Test de l'anneau (complément de figure)

II.1.2. La « primofloculation » (Ramon)

Cette méthode, utilisée en particulier pour les titrages d'antitoxines (sérum anti-tétanique, anti-diphtérique, anti-venimeux), consiste à mettre en présence, dans des tubes différents, une quantité fixe d'Ag et des dilutions progressives de la solution d'anticorps. On observe des

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

variations de la quantité de précipité et de la rapidité d'apparition de la précipitation.

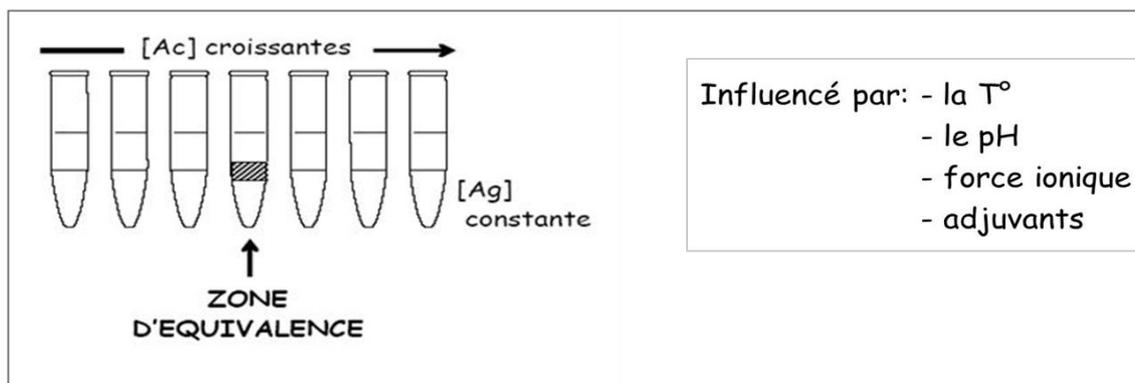


Figure 11: Technique de « primofloculation » (Ramon)

II.1.3. Méthode de d'HEIDELBERGER KENDALL

Elle est basée sur le même principe que la méthode de Ramon, mais se réalise avec des dilutions progressives de l'Ag en présence d'une quantité constante d'anticorps.

Une courbe de précipitation quantitative antigène-anticorps est tracée suivant la méthode expérimentale qui consiste à mélanger dans une série de tubes sous un faible volume (< 2 ml) une quantité fixe d'immunsérum ou de solution d'anticorps et des quantités croissantes d'antigène homologue en solution.

Des précipités (complexes Ag-Ac insolubles) se forment, dont l'importance augmente de tube en tube jusqu'à passer par un maximum dans les tubes centraux pour diminuer ensuite progressivement. On quantifie le précipité et on le reporte sur une courbe. On obtient une courbe en cloche dont on distingue 3 zones :

- Une **zone d'excès d'Ac** : première partie de la courbe (quantité faible d'Ag) avec peu de précipité.
- Une **zone d'équivalence** : partie médiane de la courbe (quantité moyenne d'Ag) avec une quantité de précipité maximal.
- Une **zone d'excès d'Ag** : dernière partie de la courbe (quantité importante d'Ag) avec peu de précipité. comme illustré sur la figure suivante :

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

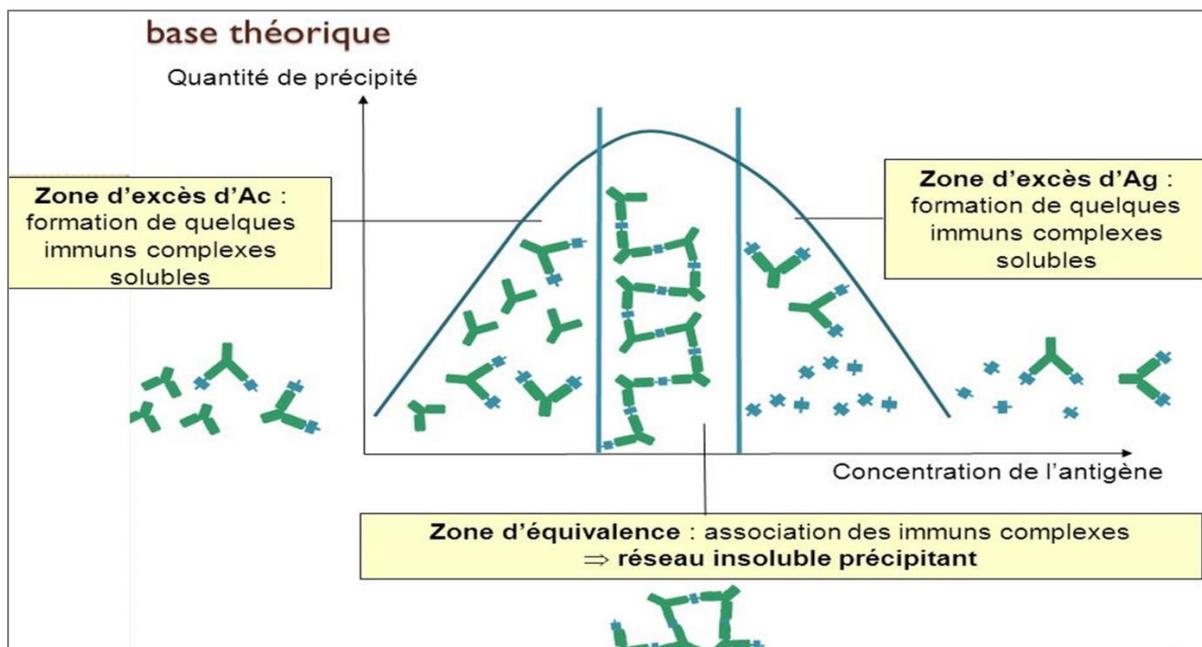


Figure 12: Courbe de précipitation quantitative antigène-anticorps

II.1.4. Méthodes de quantification

II.1.4.1. La turbidimétrie / néphélométrie :

La **quantification** est basée sur le principe selon lequel la lumière, passant par un milieu contenant des particules dispersées d'un indice différent de celui du milieu, diminue en intensité du fait d'un phénomène de dispersion.

La **turbidimétrie** mesure seulement de la lumière **transmise**, dans le même axe.

La **néphélométrie** mesure la lumière **diffusée** dans une direction donnée : on se place pour la détection à un angle de 7 à 10 degrés par rapport à la lumière diffusée.

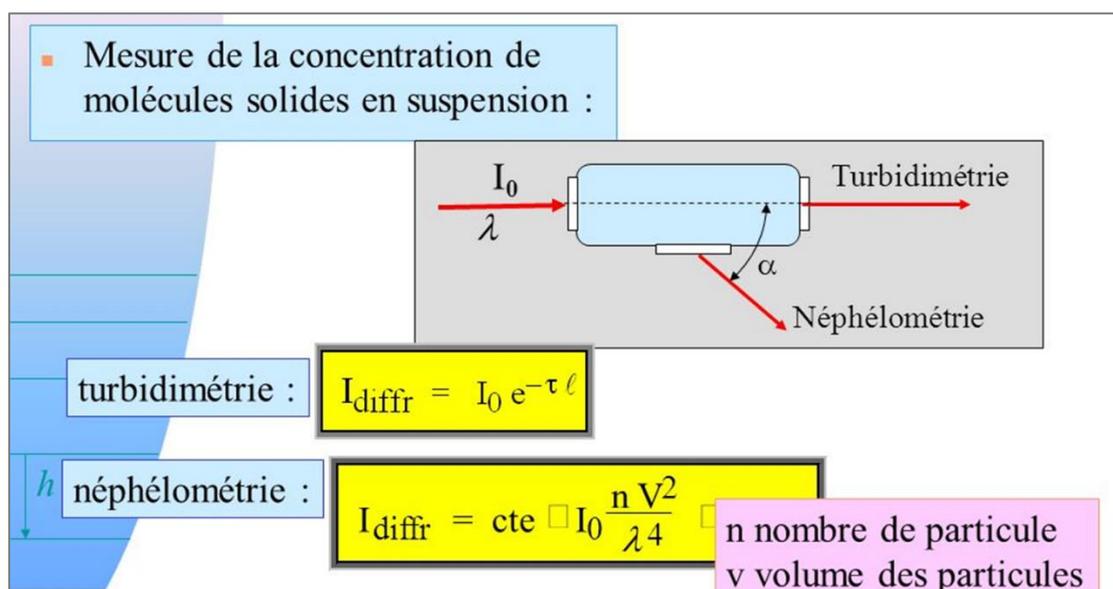


Figure 13: turbidimétrie / néphélométrie

II.2. Réactions de précipitation en milieu gélifié

L'immunodiffusion simple et double en gel consiste, par exemple, à incorporer au gel l'anticorps et à déposer l'antigène, qui va alors diffuser selon un gradient de concentration. La technique uni-dimensionnelle d'Oudin effectuée dans des tubes, la technique bidimensionnelle de Mancini ou les électroimmuno-précipitations de type Laurell repose toutes sur ce principe.

Gels d'agarose

L'agarose est une forme purifiée de l'agar, une substance extraite de certaines algues et utilisée en microbiologie. L'agarose est un polymère linéaire et non chargé où alternent des résidus de galactose et d'anhydrogalactose. La purification enlève une bonne partie des composantes ioniques de l'agar qui perturberaient la diffusion ou la migration électrophorétique en créant de l'endo-osmose. La gélification de l'agarose se fait par formation de ponts hydrogène entre les chaînes de polymères. Contrairement à l'acrylamide et au dextran, aucune réaction chimique de formation de liens covalents n'est requise. Les liens hydrogène étant déstabilisés par l'agitation thermique, la gélification se fait à température beaucoup plus basse que la dissolution de l'agarose.

Comme tous les gels, l'agarose solidifiée a une porosité correspondant à sa concentration. Entre 0.5 et 2%, elle est suffisamment grande pour que les complexes protéiques et les acides nucléiques puissent diffuser. La grande taille des mailles des gels d'agarose, comparée aux gels de dextran ou d'acrylamide, permet la diffusion des complexes Ab:Ag. À des concentrations de 1-2%, l'agarose a une consistance suffisamment rigide pour permettre une manipulation aisée. La concentration habituellement employée dans les techniques immunochimiques est de l'ordre de 1%.

Les gels d'agarose sont faciles à faire. On peut facilement dissoudre de l'agarose dans un tampon aqueux en amenant la solution à une température supérieure à 90°C. Tant que la solution reste liquide (au-dessus de 50-60°C), on peut la verser sur une plaque de verre. En se refroidissant, l'agarose se gélifie et devient solide. Une fois solidifié, on peut creuser dans le gel des puits qui pourront contenir les échantillons de protéines. Celles-ci pourront ensuite diffuser dans les mailles du gel d'agarose.

II.2.1. Immunodiffusion simple en gel : technique d'Oudin

Il s'agit en fait d'une adaptation du test de l'anneau pour un milieu gélifié. L'antisérum est incorporé à un gel au fond d'un petit tube capillaire. La solution d'antigène est ajoutée à son sommet. Au fur et à mesure que l'antigène diffuse dans le gel contenant l'anticorps, il se forme un front de précipitation pour chaque complexe antigène-anticorps, qui migre vers le fond du tube. Il est même possible de procéder à une évaluation quantitative de l'antigène en mesurant la distance

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

de migration des anneaux de précipitation et en les comparant à des expériences servant de référence réalisées avec des quantités connues d'antigène

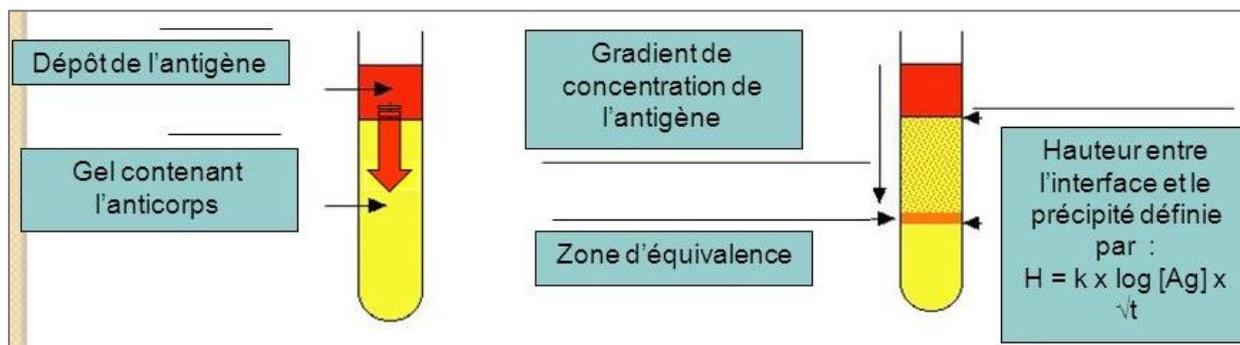


Figure 14: Technique d'Oudin

II.2.2. Immunodiffusion double ou réaction d'Ouchterlony

Les solutions d'Ag et d'Ac sont déposées dans des puits percés à distance les uns des autres dans un gel d'agarose. Les molécules diffusent dans le gel en fonction de leur taille et forment des lignes de précipitation pour chaque système d'Ag et d'Ac. Chaque ligne de précipitation correspond à la zone d'équivalence respective, c'est-à-dire à la formation d'un réseau Ag-Ac.

Cette méthode permet l'analyse d'un mélange d'Ag et l'identification de ses constituants. Lorsque deux protéines diffusent dans un gel à la rencontre des Ac, on distingue des réactions d'identité, de non-identité ou d'identité partielle.

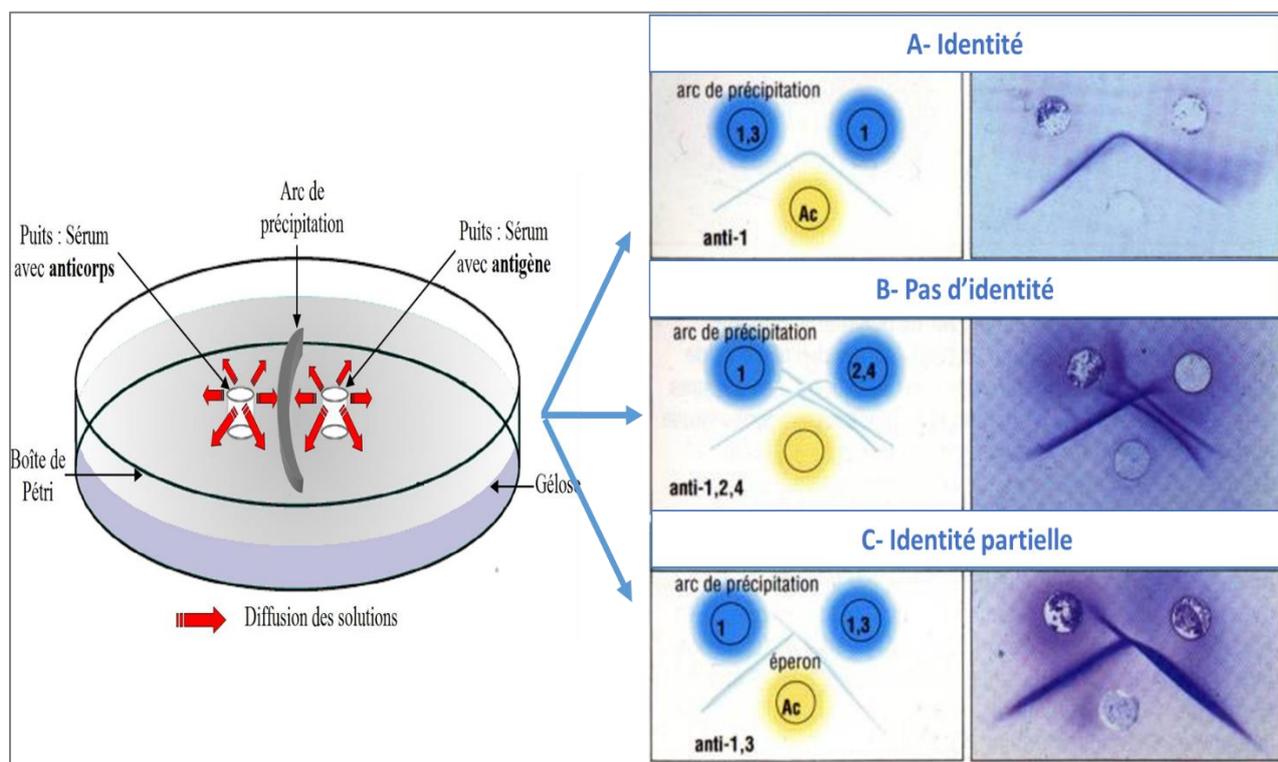


Figure 15: Technique d'Ouchterlony

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

II.2.3. Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)

Cette méthode consiste à incorporer un antisérum spécifique dans la gélose et à déposer la solution d'Ag dans des puits. L'antigène diffuse dans le gel contenant l'anticorps en un gradient de concentration décroissant. A l'équilibre il se forme un anneau de précipitation dont le carré du diamètre est proportionnel à la concentration de l'Ag. La concentration est exprimée par référence à une courbe standard avec un Ag de concentration connue.

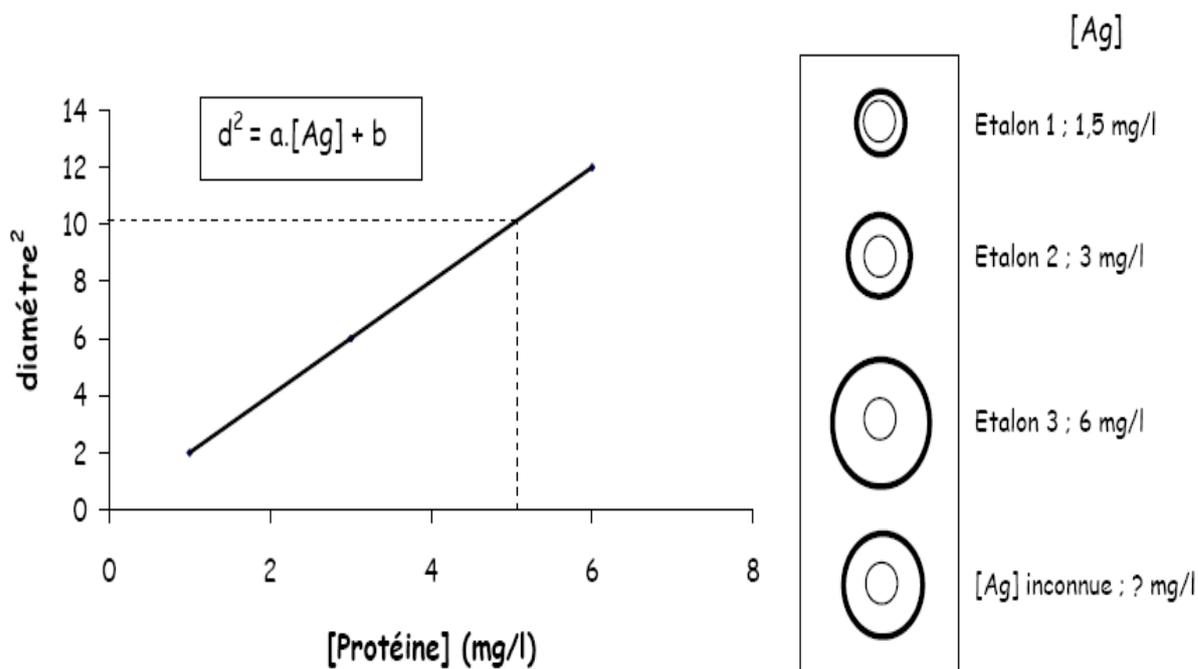
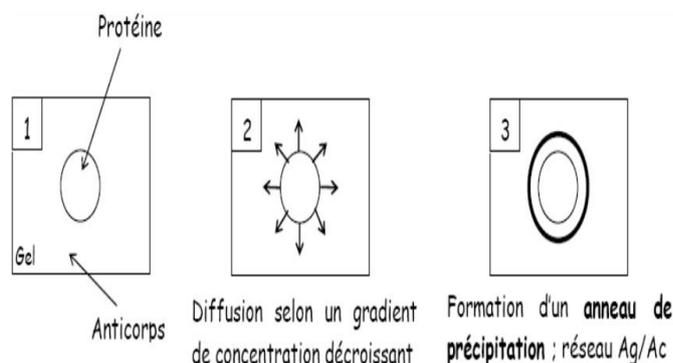
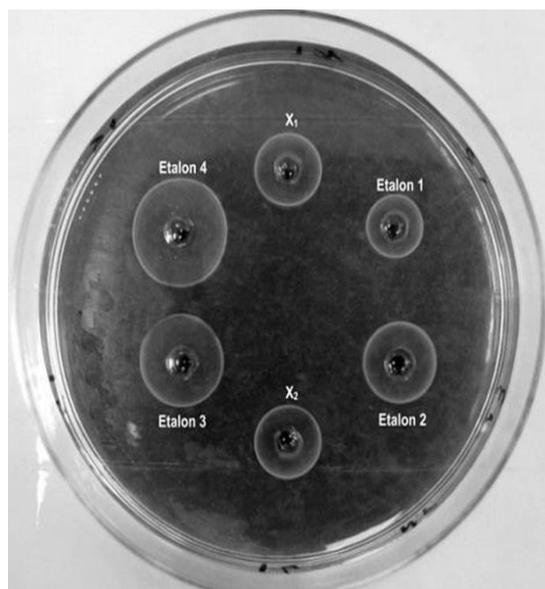


Figure 16: Technique de Mancini

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

II.2.4. Immunoélectrophorèse : Electrophorèse et Immunodiffusion

Cette méthodologie concerne les différents aspects de l'*analyse immunoélectrophorétique* (souvent désignée immunoélectrophorèse), mise au point par Grabar et Williams, et concernant actuellement de nombreuses techniques qui en dérivent.

Il s'agit d'une technique (qualitative peu sensible $>100\mu\text{g/ml}$) qui permet de séparer un mélange d'antigène très complexe (beaucoup de molécules de poids moléculaires très voisins) selon leur charge avant d'être détecté par précipitation à l'aide d'une solution d'Ac versée dans la gouttière longitudinale située entre les puits contenant les solutions d'Ag. La diffusion de l'Ac vers les fractions d'analyte entraîne la formation d'arcs de précipitation qui permettent une comparaison de deux mélanges complexes d'Ag.

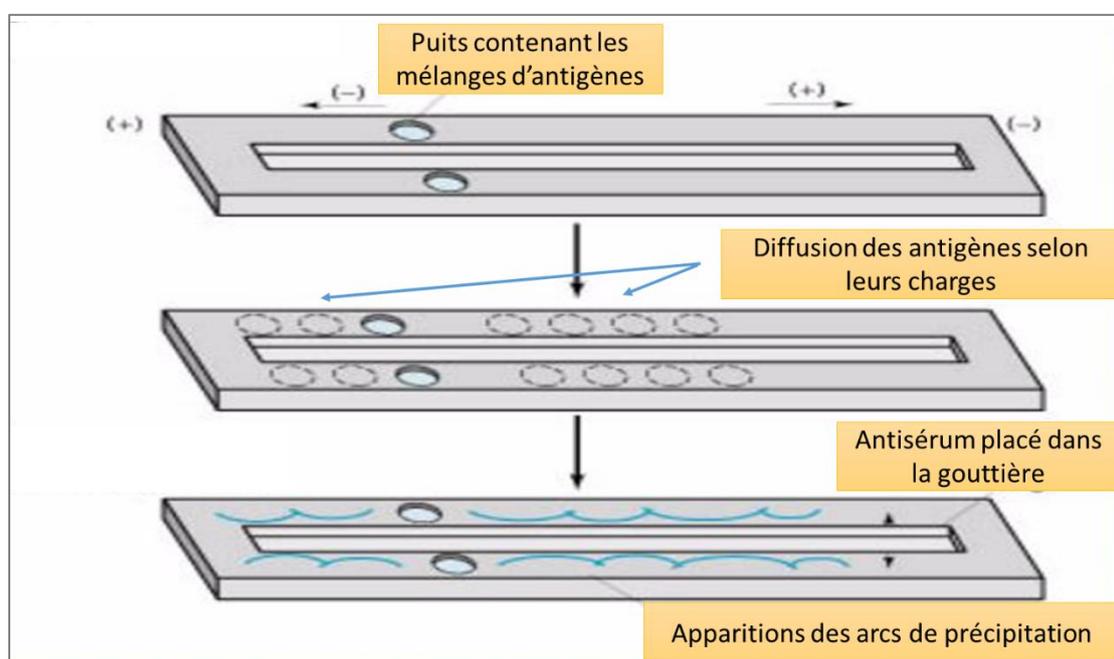


Figure 17: Immunoélectrophorèse

II.2.4.1. Immunoélectrophorèse en flammèches ou monodimensionnelle (méthode de Laurell)

Le principe de cette technique est de déposer des échantillons de protéine (étalons et dilution de protéines) dans des puits perforés à la base d'un gel d'agarose contenant l'anti corps contre une protéine.

En appliquant un champ électrique sur ce montage on force les protéines de l'échantillon à traverser le gel plein d'anticorps.

Les antigènes présents dans l'échantillon se complexeront avec les anticorps du gel et les entraineront dans leur migration.

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

L'arc de précipitation aura donc l'allure d'une flammèche (ogive ou fusée)

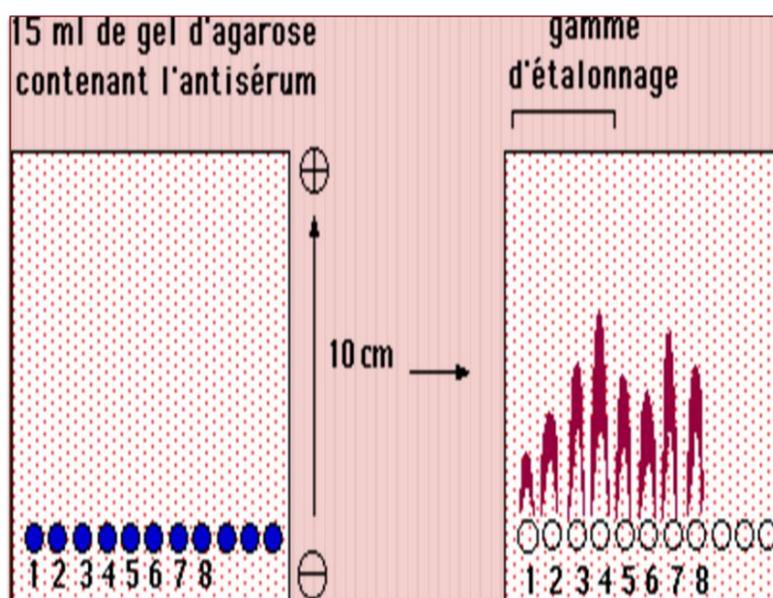


Figure 18: Immunoélectrophorèse Monodimensionnelle

II.2.4.2. Immunoélectrophorèse croisée (Bidimensionnelle)

Une autre technique est l'immunoélectrophorèse croisée (IEC), quelque fois appelée bidimensionnelle. Cette méthode est une combinaison d'IES avec la méthode de Laurell. On sépare les constituants d'un échantillon par électrophorèse simple, en première dimension, pour ensuite les faire migrer, toujours par électrophorèse, dans le gel de deuxième dimension contenant déjà des anticorps. Durant cette migration, faite à un pH où les anticorps sont électriquement neutres, se formeront des "fusées" de précipitine. Cette méthode permet d'analyser la complexité d'un antisérum.

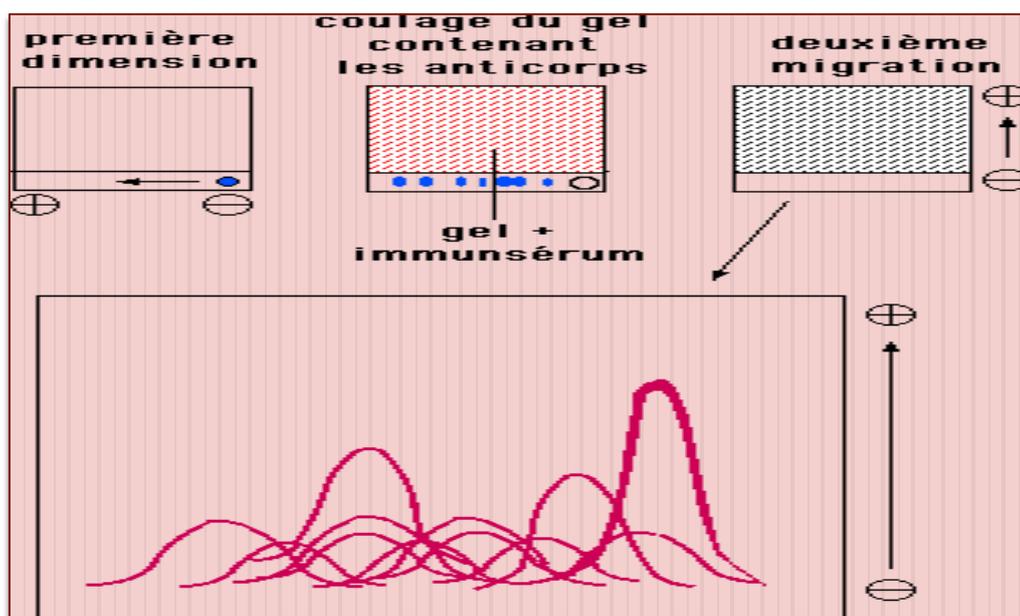


Figure 19: Immunoélectrophorèse croisée (Bidimensionnelle)

II.3. Les réactions d'agglutination

La réaction d'agglutination, dérivée de la sérotypisation des bactéries, peut être utilisée pour des Ag particuliers ainsi que les Ag solubles. Des billes de latex ou des érythrocytes de mouton sont souvent utilisés comme support insoluble pour fixer des Ag non particuliers. Si l'on ajoute alors des Ac à une suspension de particules d'Ag, il se produit des entrelacs des particules - une agglutination.

Deux types d'agglutinations sont distingués à savoir :

- *Direct*

Bien visible à l'œil nu les anticorps et les antigènes forment un amas on utilise un antigène particulier et un anticorps agglutinant.

- *Indirect*

C'est une agglutination artificielle, résultante d'une faible quantité d'anticorps et d'antigène, entre autres utilise un antigène particulière et un anticorps non agglutinant.

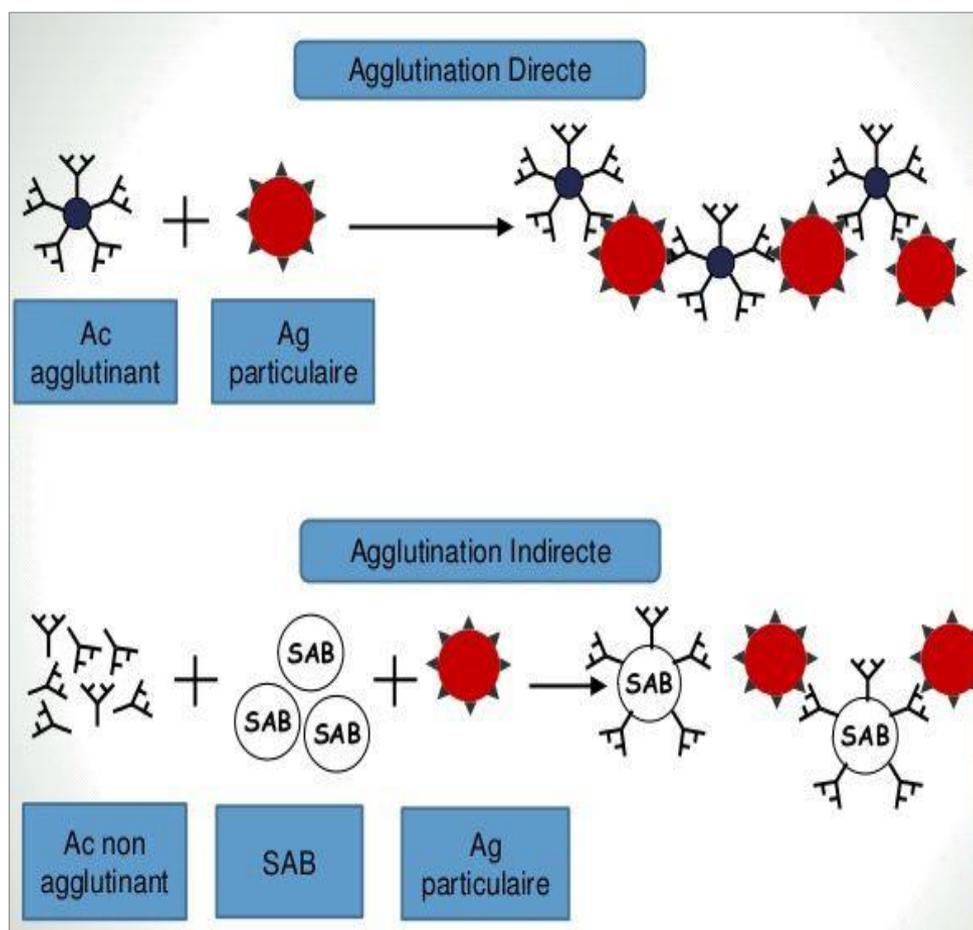


Figure 20: Hémagglutinations

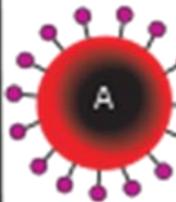
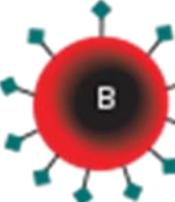
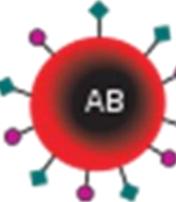
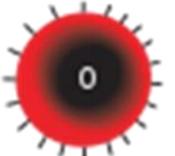
DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

II.3.1. Application des méthodes d'agglutinations dans la détermination du groupe sanguin (Système ABO)

Le système Abo est un des nombreux systèmes sanguins ; il est composé de 4 groupes différents.

Le terme Abo est une combinaison des trois lettres utilisées pour définir les trois groupes sanguins initialement décrits dans le système A, B et O; auxquels s'est ensuite ajouté le groupe AB.

Tableau 1: Système ABO

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	 Antigène A	 Antigène B	 Antigène A et B	Bas d'antigène

II.3.2. Test de fixation du complément

C'est un test immunologique médical qui peut être utilisé pour détecter la présence d'anticorps spécifiques d'un antigène dans le sérum, selon que la fixation du complément se produit ou non.

Le système du complément est un système de protéines sériques qui réagissent avec les complexes antigène-anticorps.

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES : SANS MARQUAGE

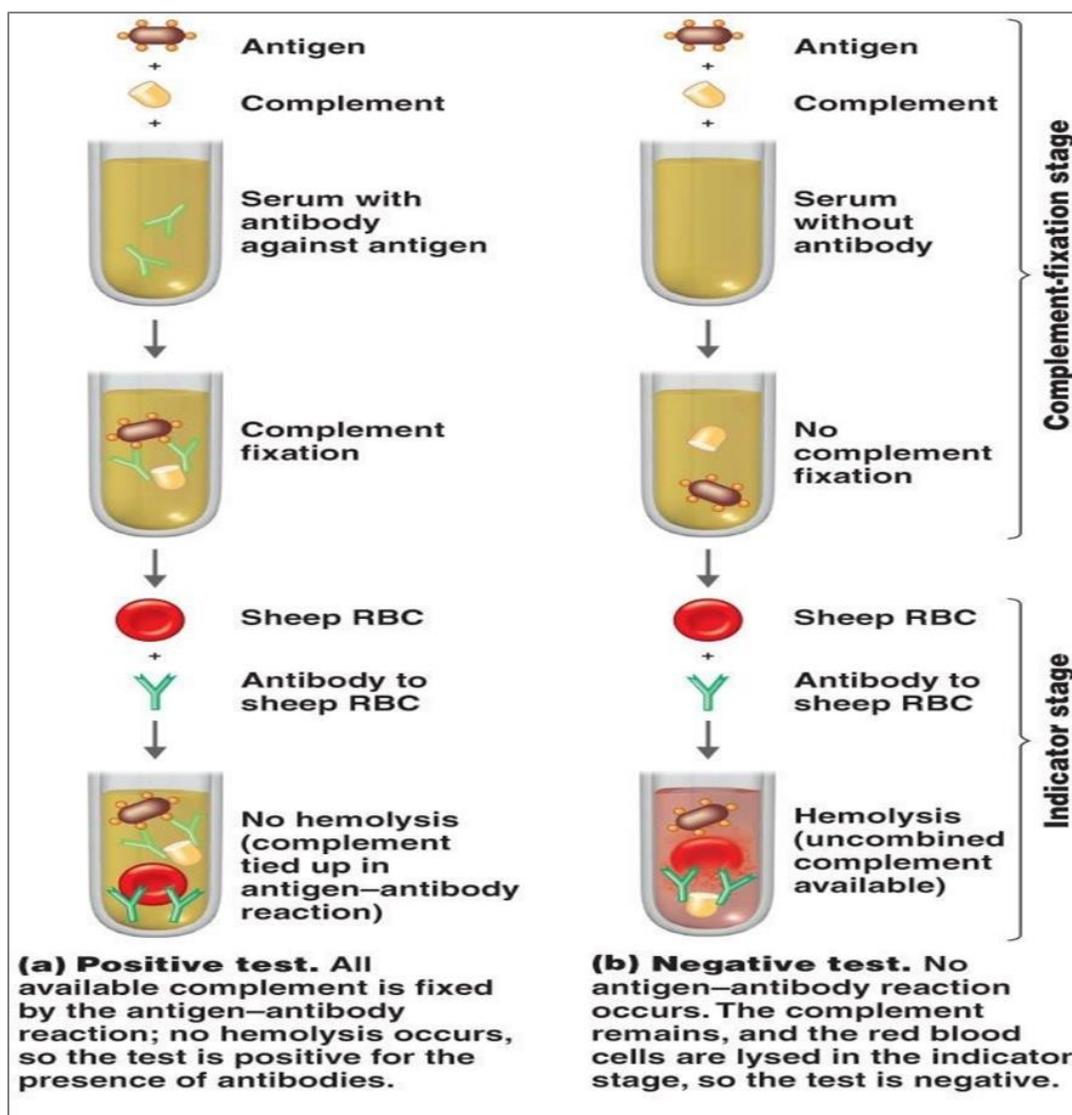


Figure 21: Méthode de fixation du complément

□ **Positif :**

Si le sérum du bovin contient des anticorps contre l'antigène d'intérêt, ils se lieront à l'antigène dans l'étape 3 pour former des complexes antigène-anticorps. Les protéines du complément réagiront avec ces complexes et seront épuisées. Ainsi, lorsque les complexes anticorps-GR sont ajoutés à l'étape 4, il n'y aura plus de complément dans le sérum et les GR resteront intacts au fond du tube.

□ **Négatif :**

Si aucun anticorps ne contre l'antigène d'intérêt n'est présent, le complément ne sera pas épuisé et il va réagir avec les complexes anticorps-GR ajoutés à l'étape 4, conduisant à la lyse des globules rouges qui vont déverser leur contenu dans la solution, donnant ainsi une solution rose.

II.4. Immuno-chromatographie d'affinité

Des ligands plus ou moins spécifiques (Ac), liés de manière covalente à une matrice solide (agarose), reconnaissent et se lient aux molécules ou aux groupes de molécules souhaités dans un mélange. Il devient ainsi possible de séparer les molécules souhaitées des substances restantes par un simple lavage. On parle d'immuno-chromatographie d'affinité. On essaie de réaliser l'éluion des analytes de telle sorte que l'immuno-adsorbant ne soit pas dénaturé de manière irréversible, mais puisse être utilisé plusieurs fois.

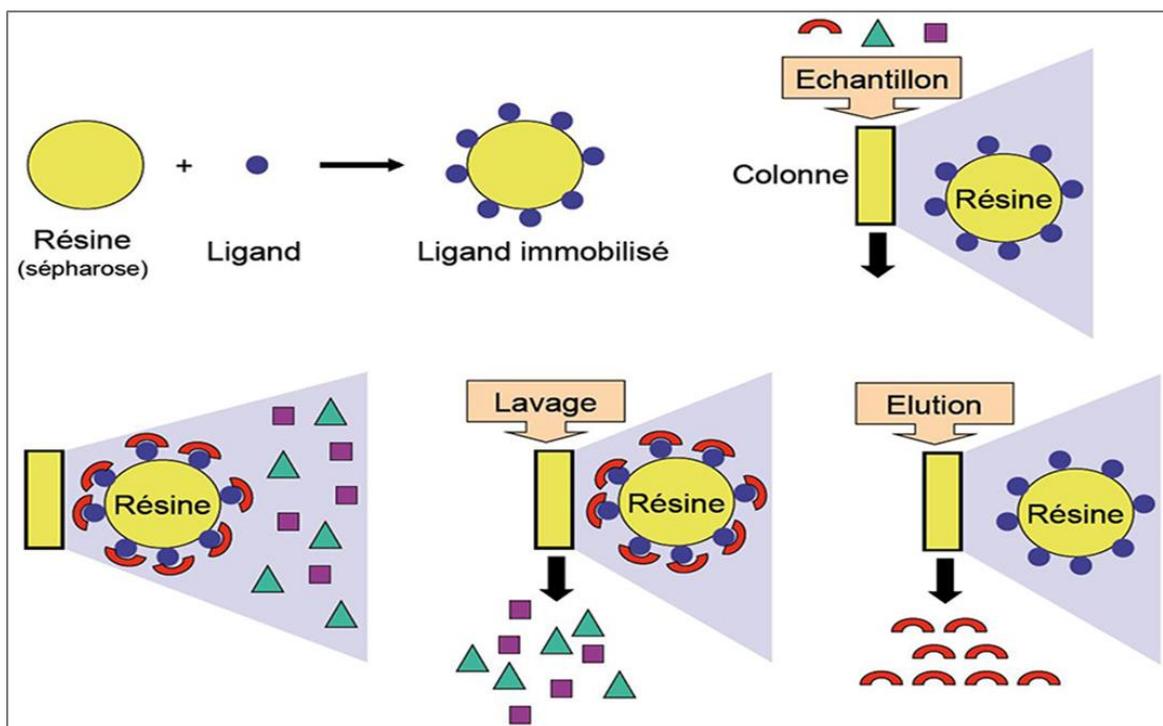


Figure 22 : Technique de chromatographie d'affinité

III.1. Systèmes de test avec des immunoréactifs marqués

Ce sont les méthodes les plus sensibles (ng/ml→pg/ml). Selon le marqueur utilisé, on peut distinguer 3 types de techniques :

1. L'immunofluorescence : l'antigène ou l'anticorps est marqué avec un fluorochrome.
2. La radio-immunologie : connue aussi sous le nom de RIA (Radio-Immuno-Assay) basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif.
3. L'immunoenzymologie : plus connue sous le nom d'E.L.I.S.A. (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Dans cette réaction, l'anticorps est marqué avec une enzyme, qui permet de transformer un substrat incolore en produit coloré.

L'analyse par test immunologique s'appuie sur la détection quantitative de complexes immuns marqués.

III.1.1. Technique IFA (immunofluorescence assay)

III.1.1.1. Définition

L'immunofluorescence, très rarement appelée méthode de Coons, est une technique de laboratoire qui permet de repérer la présence de diverses substances grâce à des anticorps, rendus fluorescents, qui vont se fixer dessus. Cette méthode est utilisée pour rechercher des bactéries ou des anticorps dans des prélèvements biologiques.

III.1.1.2. Principe

Une des technique de détection les plus performantes pour détecter la présence d'un anticorps fixé sur un antigène tissulaire ou cellulaire est l'immunofluorescence. Dans cette technique, un colorant fluorescent (l'isothiocyanate de fluorescéine ou la phycoérythrine) est fixé de façon covalente à l'anticorps spécifique et permet la détection directe de l'antigène à analyser. On peut en outre utiliser des Ac anti-Ig fluorescents pour détecter des anticorps fixés sur l'antigène tissulaire on parle alors dans ce cas d'immunofluorescence indirecte. La lecture des coupes tissulaires ou des cellules ainsi marquées est réalisée à l'aide d'un microscope UV à fluorescence.

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

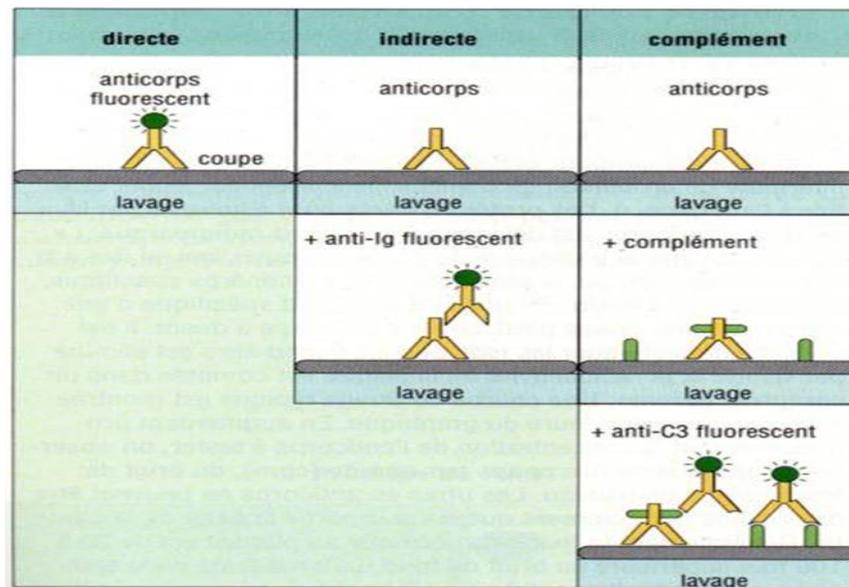


Figure 23 : Immunofluorescence directe et indirecte

III.1.2. Technique RIA (RadioImmuno Assay)

III.1.2.1. Définition

La technique radio immunologique ou RIA (Radio Immuno Assay) est une technique de laboratoire utilisant des composés radioactifs (iode, tritium,...) conjugués à des antigènes pour doser des antigènes du même type contenant dans un produit gras à un anticorps spécifique, ou inversement. En effet, le complexe Ac-Ag est détecté grâce à la désintégration des atomes radioactifs (iode 125 à titre d'exemple).

III.1.2.2. Marquage

In vivo

Par adjonction de précurseurs contenant des isotopes radioactifs (acides aminés, sucres, bases, etc...) à des cultures cellulaires ou bactériennes.

In vitro

Par remplacement d'un des atomes "naturels" de la molécule par un isotope RA* tel que le tritium ou le phosphore 32.

III.1.2.3. Principe

L'antigène spécifique des anticorps que l'on veut détecter est préalablement marqué à l'iode 125. La préparation contenant l'anticorps est alors incubée avec l'antigène marqué. Les complexes Ag/Ac qui se forment en phase liquide sont alors précipités avec une solution de chlorure d'ammonium ou de polyéthylène glycol. Le culot de précipitation est ensuite lavé avec une solution saline et la présence de l'anticorps à doser est déterminée en mesurant la radioactivité

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

présente dans le précipité et en la comparant avec une gamme étalon réalisée soit avec un sérum titré soit avec une préparation purifiée d'anticorps de concentration connue. Cette technique bien que relativement coûteuse et délicate car utilisant des produits radioactifs, présente l'avantage d'une grande sensibilité.

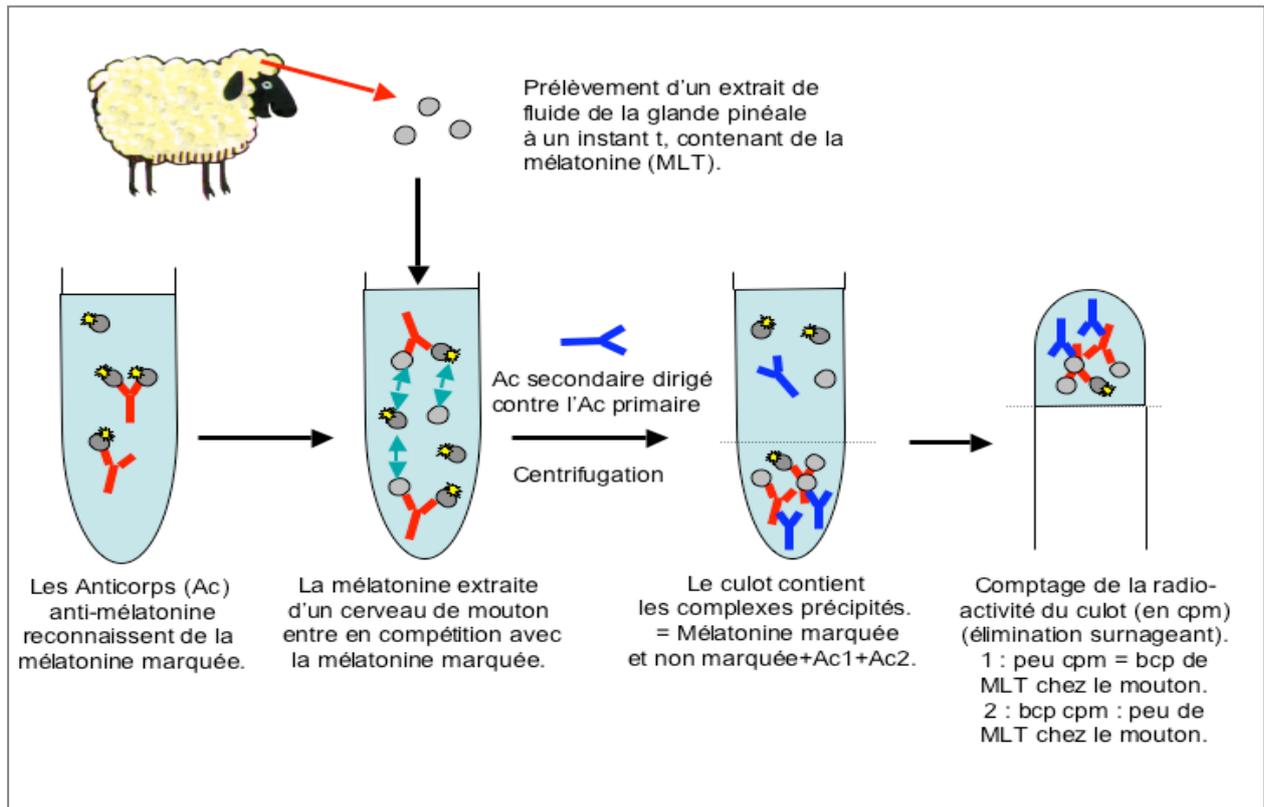


Figure 24 : Dosage de la mélatonine par la technique RIA

III.1.3. Techniques immunoenzymatiques

III.1.3.1. Technique ELISA

III.1.3.1.1. Définition

La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par 2 scientifiques suédois, Peter Perlmann et Eva Engvall à l'Université de Stockholm en 1971. La méthode immuno-enzymatique **ELISA** (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ».

La technique ELISA, plus simple et moins coûteuse a presque totalement remplacé le RIA. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

III.1.3.1.2. Principe

La révélation du test n'utilise pas, comme dans le RIA de radioéléments mais est liée au clivage par une enzyme, préalablement fixée à l'anticorps ou à l'antigène, d'un substrat incolore en un produit coloré. Cette technique est basée sur deux types de procédés :

Un procédé dans lequel une phase solide est nécessaire pour immobiliser l'antigène ou l'anticorps associé à l'enzyme et ainsi permettre l'évaluation de l'activité enzymatique du complexe antigène-anticorps-enzyme, ce sont les dosages en phase hétérogène et un procédé dans lequel aucune séparation n'est nécessaire car le dosage du complexe antigène-anticorps-enzyme s'effectue directement dans le mélange réactionnel, son activité étant modifiée selon l'étendue de la réaction antigène-anticorps : ce sont les dosages en phase homogène.

III.1.3.1.3. Enzymes utilisées

Les enzymes utilisées pour préparer les conjugués doivent être faciles à obtenir et purifier, stables, et mettre en jeu une réaction produisant un composé coloré (cas le plus fréquent) (Tableau 2).

L'enzyme (marqueur) est couplée à l'antigène (ou haptène) ou à l'anticorps. Ce couplage doit préserver le site actif de l'enzyme et le site de liaison Ag ou Ac.

Tableau 2: Les réactions enzymatiques

Enzymes	Substrats	Produits
Phosphatase alcaline	PNPP (4-nitrophényl-phosphate) incolore.	PNP (4-nitrophénol) (jaune) à 405nm.
Peroxydase	H ₂ O ₂ +ODP (orthophénylène diamine) H ₂ O ₂ +luminol.	Produit coloré (orange) Produit luminescent.
β-galactosidase	ONPG (2-nitrophényl β-galactoside).	ONP (2-nitrophénol) (jaune) à 405nm.
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	Glucose 6-phosphate +NAD ⁺ ou NADP ⁺	NADH ou NADPH à 340nm.

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

III.1.3.1.4. Variantes du dosage immunoenzymatique

Les tests immunologiques sont souvent classés selon les critères suivants :

Tableau 3: Différentes phases du dosage immunoenzymatique

Déroulement du test	
Dosage immunoenzymatique homogène	Les réactions immunologiques d'un Ag avec un Ac modifient aussi immédiatement l'activité enzymatique couplée au système. Comme il n'est pas nécessaire de séparer les complexes immuns formés, ces types de dosage immunoenzymatique peuvent être effectués dans une phase homogène.
Dosage immunoenzymatique hétérogène	Avant de pouvoir déterminer l'activité enzymatique, il faut tout d'abord séparer l'Ag libre marqué avec un enzyme ou l'Ac libre marqué avec un enzyme, du complexe Ag-Ac-enzyme. On lie l'Ag ou l'Ac à une phase solide pour pouvoir effectuer simplement cette séparation. C'est cette variante de dosage immunoenzymatique qui est le plus souvent utilisée pour l'examen des denrées alimentaires.

Tableau 4: Modes réactionnels du dosage immunoenzymatique

Concentration d'Ac	
Dosage immunoenzymatique compétitif	L'Ag marqué avec un enzyme rentre en concurrence avec l'analyte pour le nombre limité de sites de liaison de l'Ac.
Dosage immunoenzymatique non compétitif	L'Ag peut réagir par un excédent d'Ac.
Origine du signal de mesure	
Dosage immunoenzymatique direct	On détermine directement la quantité de complexes ayant un Ag marqué avec un enzyme.
Dosage immunoenzymatique indirect	On détermine indirectement la quantité de complexes analyte-Ac par la quantité d'Ac secondaires marqués avec un enzyme, qui marquent l'Ac primaire du complexe immun.

DOSAGE IMMUNOCHEMIQUE : AVEC MARQUAGE

III.1.3.1.5. Méthode en phase homogène

A) EMIT (Enzyme multiplied immunoassay)

Il n'y a pas de séparation entre Ag et Ac. La fixation de l'enzyme sur son ligand va modifier son activité en l'activant ou en l'inhibant.

Dans cet exemple : Lorsque l'enzyme est liée à l'Ag, elle est inactive.

Il s'agit d'une méthode par compétition : on ajoute la molécule à doser.

On va alors déplacer les molécules qui portent l'enzyme. A chaque fois qu'elles seront libres, ces molécules seront activées. Il n'y a pas besoin de séparer Ag et Ac, il suffit de rajouter dans le milieu réactionnel un substrat spécifique de l'enzyme. Le produit de la réaction est mesuré par spectrophotométrie (mesure de l'absorbance).

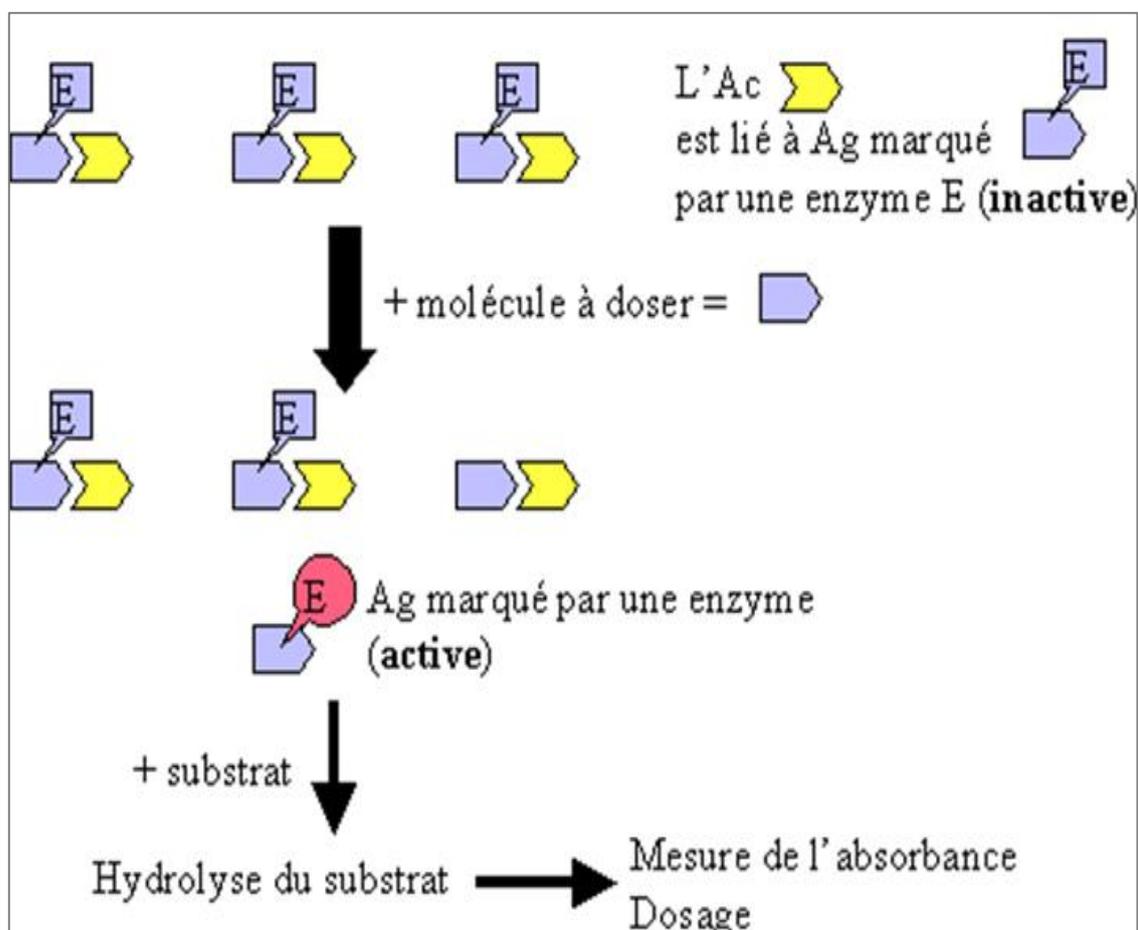


Figure 25: Méthode EMIT

On distingue trois variantes de la technique EMIT, où, dans ces méthodes (toutes trois servent à doser des antigènes), il n'y a pas de phase de lavage. Dans les deux premiers cas, le signal augmente avec [Ag], dans le troisième il diminue lorsque [Ag] croît.

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

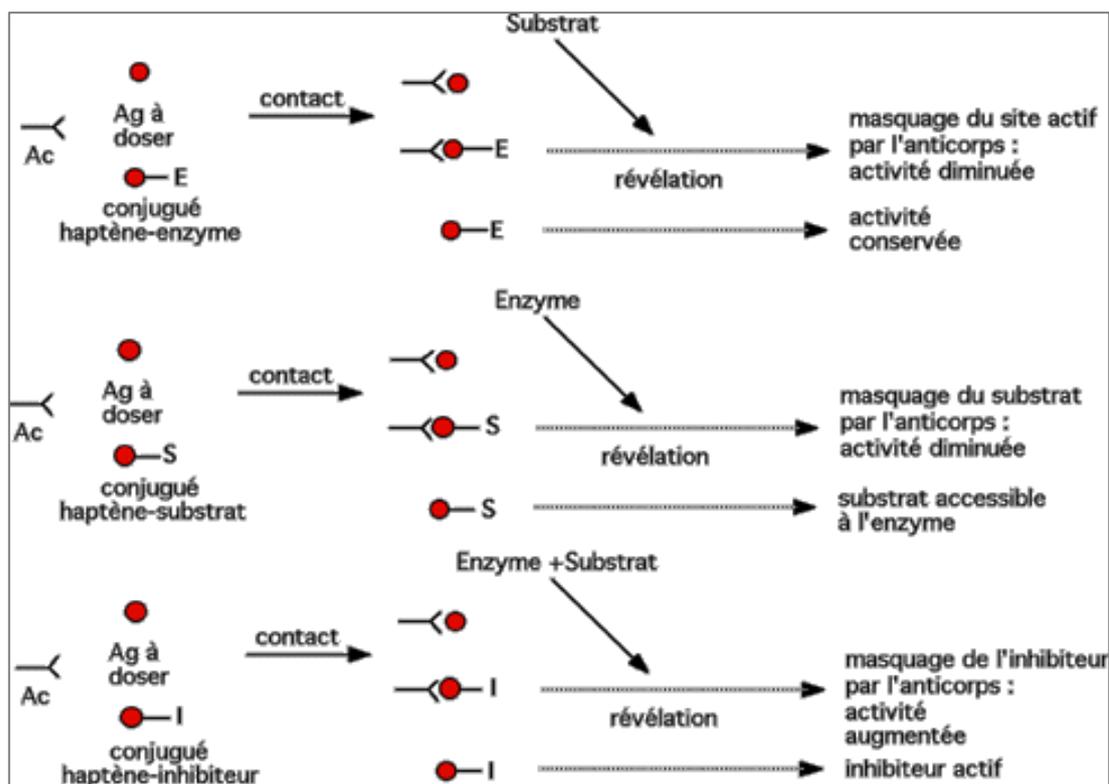


Figure 26: Variantes de la technique EMIT

L'antigène à doser entre en compétition avec l'haptène marqué pour la fixation sur l'anticorps. Deux cas possibles :

- masquage du site actif de l'enzyme lors de la fixation de l'anticorps : activité diminuée. A augmente avec [Ag].

- restauration de l'activité qui avait été diminuée par la conjugaison : activité augmentée. A diminue avec [Ag].

N.B. Il existe de nombreuses variantes avec un conjugué haptène-substrat ou haptène-inhibiteur...

III.1.3.1.6. Méthodes en phase hétérogène

Pour détecter la présence dans un sérum d'un anticorps spécifique, l'antigène spécifique de l'anticorps à doser est déposé dans un puits à fond plat en plastique. L'antigène est dilué dans un tampon bicarbonate à pH 9,6 ce qui favorise les interactions électrostatiques entre l'antigène et le plastique de la plaque et permet la fixation stable de l'antigène au fond du puits. Des dilutions limites du sérum contenant l'anticorps à doser sont alors déposées dans les puits. Après un temps de contact suffisant, les puits sont lavés avec une solution saline de sorte que seuls les anticorps spécifiques restent fixés sur l'antigène et donc au plastique. on révèle la présence de l'anticorps fixé au fond de la plaque en déposant ensuite dans le puit un anticorps anti-Immunoglobuline marquée avec une enzyme qui peut être la phosphatase alcaline ou la peroxydase. Après lavage, il

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

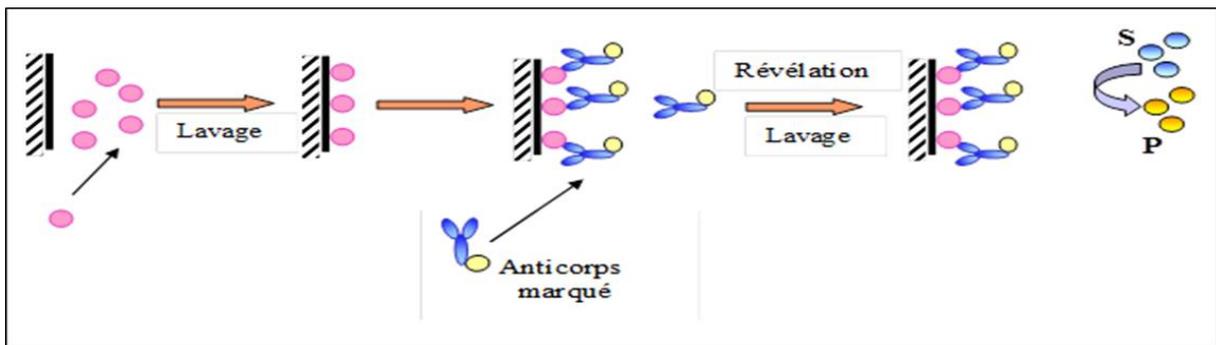
ne reste plus qu'à révéler la présence des anticorps spécifiques en ajoutant le substrat de l'enzyme ayant servi à marquer les anticorps anti-Immunoglobuline et à lire la réaction colorée.

A) Avec excès de réactif en Immunoenzymométrie (sans compétition)

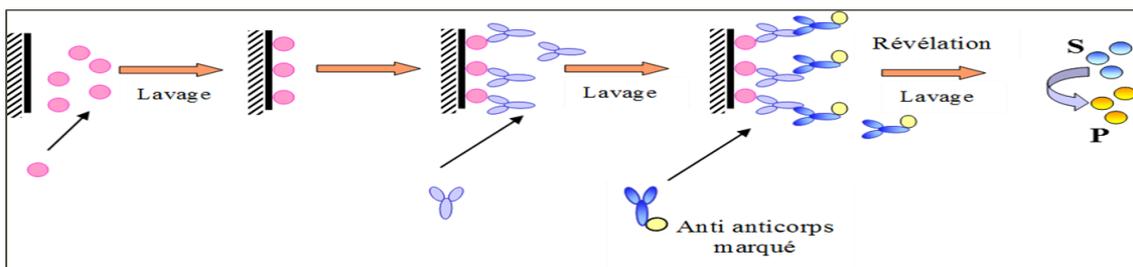
Ces techniques nécessitent toute une étape de séparation. Elles sont donc réalisées en phase hétérogène constituée par une phase solide, formée le plus souvent par différents polymères plastiques (paroi du tube, plaque de microtitration, billes magnétiques...), sur laquelle est fixé l'anticorps ou l'antigène.

La fixation, généralement passive, peut être faite par simple adsorption ou par différents types de liaisons plus spécifiques. Elle peut être active et se fait, alors, soit par liaison covalente, soit par l'intermédiaire d'une autre molécule (biotine, protéine A). Ce dernier mode de fixation est celui qui modifie, le moins, les propriétés des anticorps et il a été utilisé en particulier avec des monoclonaux.

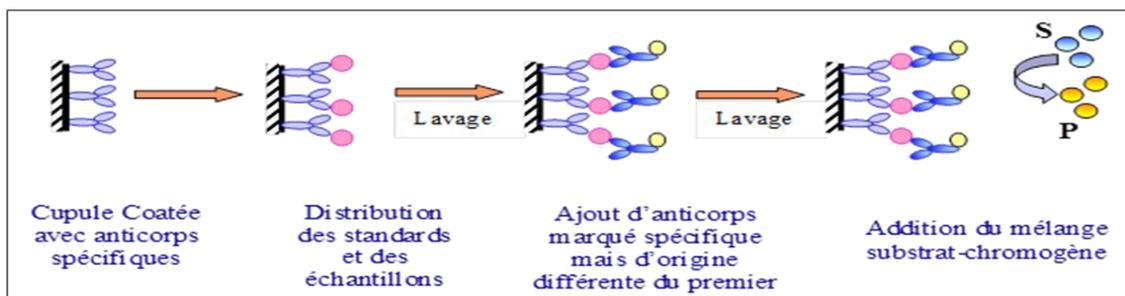
a. Dosage d'un antigène par méthode simple (Elisa directe)



b. Dosage indirecte d'un antigène (ELISA indirecte)

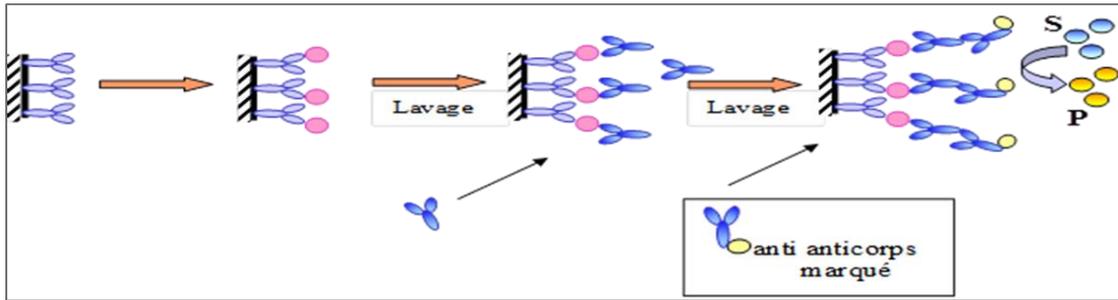


c. Sandwich direct



DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

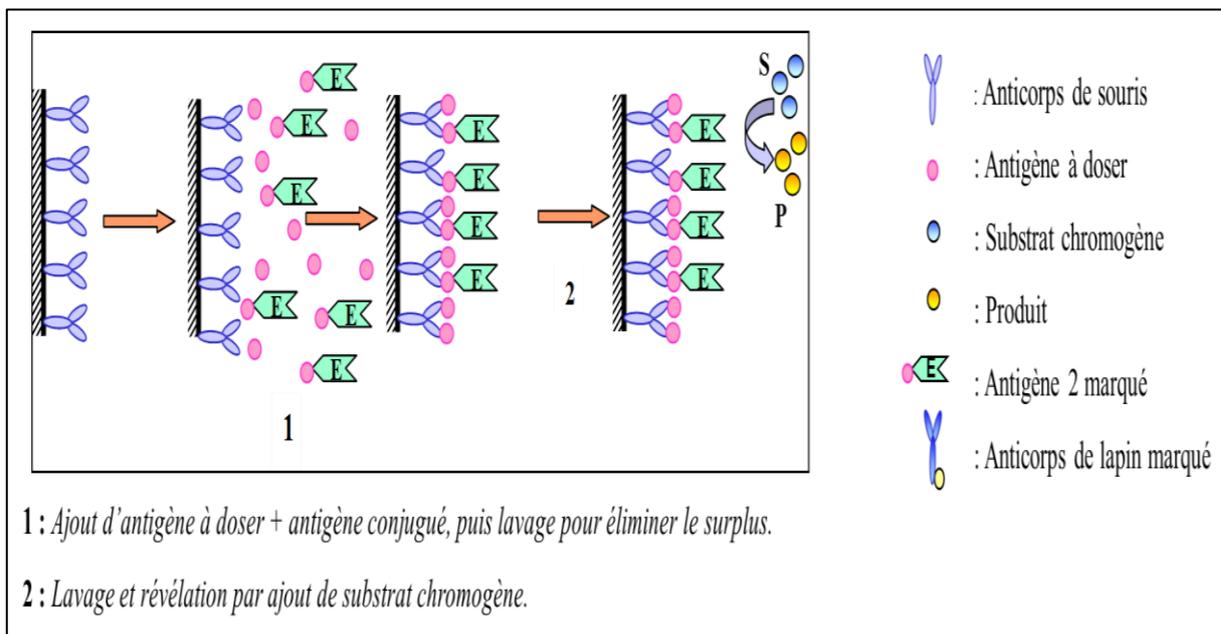
d. Sandwich indirect



B) Avec réactif limitant (avec compétition)

Ce sont les techniques ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). La phase hétérogène est constituée par une phase solide (paroi du tube, de la microplaque, billes magnétiques...) sur laquelle est fixé l'anticorps ou l'antigène (ou haptène). La fixation peut être faite par simple adsorption (sur le plastique) ou par différents types de liaisons plus spécifiques. Ces méthodes nécessitent une étape de lavage pour éliminer l'excès de marqueur qui ne se serait pas fixé.

Dosage d'un antigène (ELISA compétitive)



L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps ; la totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction liée qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser. On peut procéder en phase liquide homogène ou en phase solide hétérogène ; dans ce dernier cas, la séparation des fractions libre et liée est facilitée. Cette méthode s'applique à tous les antigènes quelle que soit leur taille, y compris les haptènes.

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

III.1.3.2. Technique ELISPOT (Dosage en phase hétérogène)

Capturer des molécules sécrétées par des cellules (généralement des cytokines), sur un support solide sensibilisé qui permet la culture des cellules. Il s'agit d'une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont fixés des Ac. Cela permet la réalisation in situ d'une culture de cellules.

Il faut attendre un certain temps (24h) pour que les cellules viennent sécréter les cytokines. On effectue ensuite un lavage pour éliminer les cellules.

Si les cytokines sont spécifiques des Ac, elles se fixent.

La révélation se fait par un Ac secondaire couplé à un système qui permet la précipitation avec apparition alors des **spots de précipitation**.

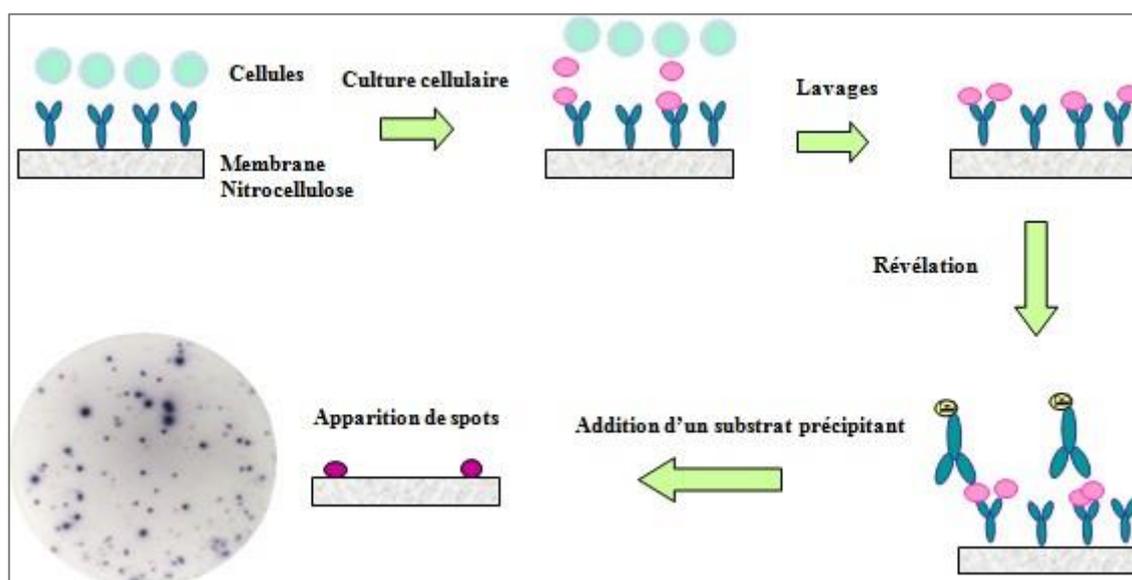


Figure 27: Méthode ELISPOT

Cette méthode est beaucoup utilisée dans les pathologies auto-immunes, dans le développement de vaccins, et dans les maladies infectieuses.

III.1.3.3. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode alternative à l'immunofluorescence pour détecter la présence d'un antigène sur une coupe de tissu. Dans ce cas, l'anticorps de révélation n'est pas couplé à un fluorochrome mais à une enzyme qui convertit un substrat incolore en un produit coloré insoluble qui se dépose au niveau de l'anticorps. Le résultat peut être observé directement en microscopie optique.

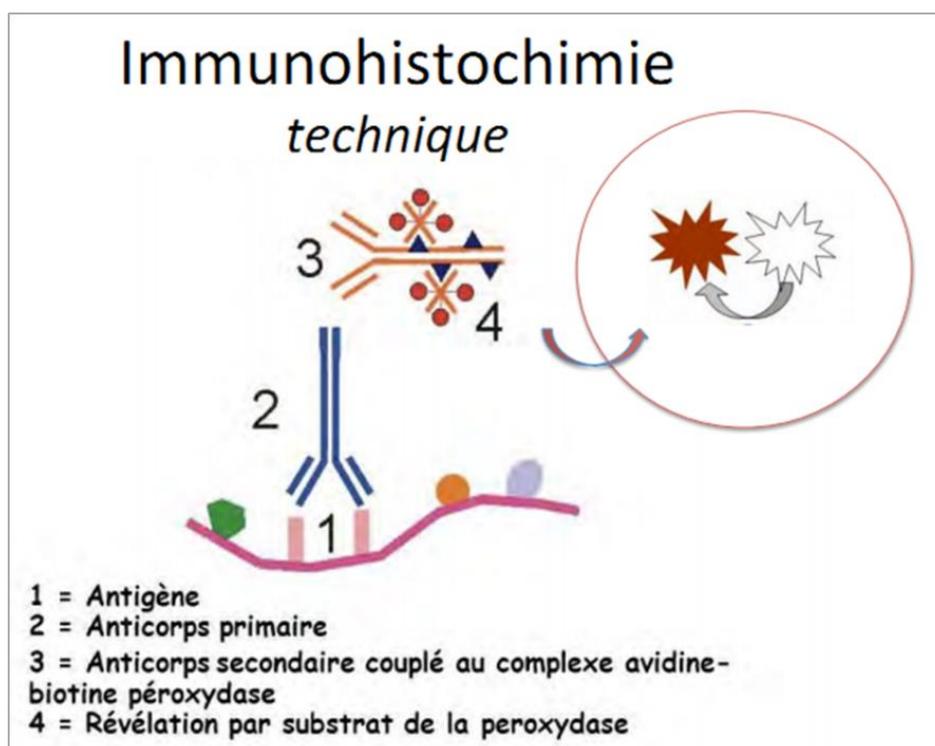


Figure 28: Technique immunohistochimique

III.1.4. Test de Western blot (immunotransfert) : Électrophorèse de protéines sur gel

Le **Western Blot** (aussi appelé immunotransfert) est une technique employée pour analyser des protéines individuelles dans un mélange protéique (par ex., un lysat de cellules). Dans le cadre du Western blot (immunotransfert), le mélange protéique est soumis à une électrophorèse sur gel dans une matrice porteuse (SDS-PAGE, PAGE native, focalisation isoélectrique, électrophorèse sur gel bidimensionnelle, etc.) afin de trier les protéines par **taille**, **charge**, ou toute autre différence au sein des bandes individuelles de protéines. Les bandes de protéines séparées sont ensuite transférées vers une membrane porteuse (par ex., nitrocellulose, nylon ou PVDF). Ce procédé porte le nom de **transfert**. Les protéines adhèrent à la membrane de la même manière qu'elles ont été séparées en raison des interactions entre les charges. Les protéines de cet immunotransfert peuvent ensuite être utilisées pour être liées à l'anticorps en vue de la détermination.

On utilise des anticorps pour détecter des protéines cibles sur le Western blot (immunotransfert). Les anticorps sont conjugués à des marqueurs **fluorescents** ou **radioactifs** ou encore à des **enzymes** pour provoquer une réaction suite à l'ajout d'un réactif, entraînant une coloration ou une émission de lumière qui favorise la détection (directe ou indirect).

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE : AVEC MARQUAGE

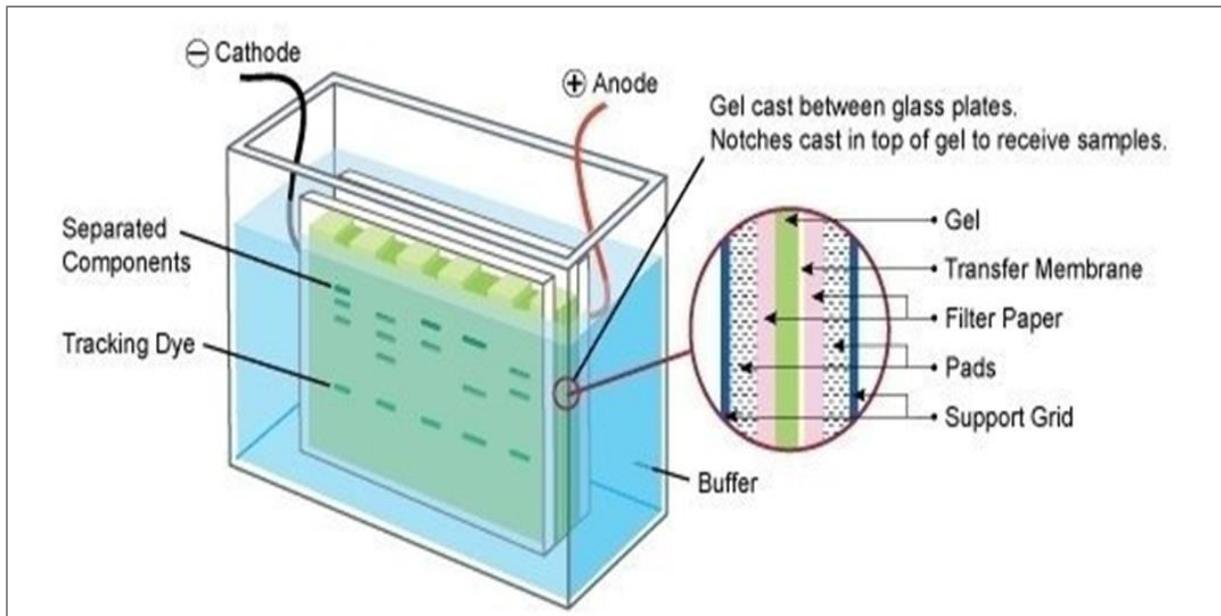


Figure 29 : Technique du Western-blot

Le terme Western blotting s'appuie sur un jeu de mots. Le transfert de Southern, qui est une méthode de détection de séquences ADN spécifiques, tire son nom de Ed Southern, qui a été le premier à décrire cette procédure. Le Western blot (immunotransfert), de même que le transfert de Northern (pour la détection d'ARN), joue sur la signification de ce nom.

Bibliographie

- ♣ **Boyer R.F.**, 1993. Modern experimental biochemistry, Addison-Wesley Publishing Company, Reading (USA), P: 136-7.
- ♣ **C.Y.Boquien**. 1993. L'apport de l'immunochimie en agroalimentaire. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. Volume 8, Issue 2, pp : 81-88.
- ♣ **Fisher, J., Arnold, J.R.P.**, 2001. L'essentiel en Chimie pour Biologistes. Berti Editions, Paris. P : 38
- ♣ **Franz –Xavier R., Robert P., Eduard K.**, 2002. Guide pratique de toxicologie. Munich, P 310.
- ♣ **Gaston-Louis D.** 1972. Eléments d'immunologie médicale. Paris, P 121.
- ♣ **Gauthier Didier.**, 2007. Introduction aux techniques utilisées en biochimie : Immunodiffusion et immunoélectrophorèse. **[En ligne]** Adresse URL : http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/iddies.html. Consulté le 29.05.2019.
- ♣ **Kamoun P.**, 1997. Appareils et méthodes en biochimie, 3e édition Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, p. 233-6.
- ♣ **Lafont.** Méthodes physique de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. 2005. **[En ligne]** Adresse URL : www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html. Consulté le 27/04/2019
- ♣ **Marie Wislez**, 2016. IHC, FISH, CISH, NGS dans les CBNPC : quelles évolutions dans l'ère des biomarqueurs. Service de Pneumologie et de Réanimation GRC « Theranoscan » UPMC, Paris VI Hôpital Tenon Paris. **[En ligne]** Adresse URL : <http://splf.fr/wp-content/uploads/2016/09/ihc-fish-cish-ngswislez.pdf>. Consulté le 13.06.2019.
- ♣ **Paraf A., et Peltre G.** Immuno-analyses pour l'agriculture et l'alimentation. Techniques et pratiques, INRA, 2^{ème} édition, 1992 : pp 58-61
- ♣ **Revillard Jean-Pierre.**, 2001. Immunologie, 4ème Édition - Deboeck Université - 4 ème édition, P : 33, 457- 482.
- ♣ **Ricoux R., Chazaud B., Tresca J.P., et Pontet M.**, 2000. Quality control of coated antibodies: new, rapid determination of binding affinity. Clin. Chem. Lab. Med, **38** (3), pp : 239-243.

- ♣ **Weil B.** Méthodes en immunologie. Laboratoire d'immunologie. Faculté de médecine Cochin-Port-Royal. Paris, France. **[En ligne]** Adresse URL : http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours-Immuno/chapitre-24.htm. Consulté le 06.02.2019