Important les anticorps atteignent leur maximum d’efficacité en condition physiologique. Il faut penser à les établir avant de les utiliser.

C’est grâce aux propriétés particulières des anticorps que l’immunomarquage a pu émerger :

* Spécifiques. Ils reconnaissent une séquence particulière.
* Capable de reconnaitre une très grande diversité de molécules. Le nombre de combinaison différentes de la zone de reconnaissance pouvant être générée est de plusieurs milliards.

Certains anticorps ont été rendu « visibles » par l’ajout d’une enzyme :

* Fluorescente.
* Transforme un substrat en composé coloré (généralement avec une péroxydase).

NB : ces deux propriétés ne dépendent pas de la liaison de l’anticorps avec son antigène. Cela explique l’importance des étapes de lavage.

La saturation peut être réalisée notamment avec un milieu riche en molécules différentes comme du sérum ou du lait. Éviter le bruit de fond.

Contrôle :

* Négatif vérifier que seul l’anticorps primaire est spécifique. Tous sauf C1.
* Positif vérifier que C1 reconnait l’antigène d’intérêt (test sur un milieu dont la composition est connue).

### Les types de lots d’anticorps

Deux types de lots d’anticorps sont utilisés :

* Monoclonaux. Les anticorps sont issus d’une seule cellule souche de lymphocytes.
* Polyclonaux. Plusieurs anticorps qui ciblent le même antigène. Ils ont notamment des épitopes différents càd qu’ils reconnaissent des sites différents sur l’antigène.

Rmq : Les polyclonaux peuvent permettre d’amplifier le signal.

La production des anticorps se fait par des cellules transformées en cellules « immortelles ».

### Principe de l’utilisation des anticorps secondaires

On a généralement recours à l’utilisation de deux anticorps :

1. Un anticorps primaire qui cible l’antigène d’intérêt.
2. Un anticorps secondaire ou révélateur qui cible la région constante de l’anticorps primaire et il possède une partie fluorescence ou le groupement capable d’hydrolyser le substrat en substance coloré.

Cette technique présente l’avantage d’amplifier le signal.

Elle est également moins chère.

## Elisa, la méthode immuno-enzymatique

Il existe deux méthodes ELISA :

* ELISA détecter la présence d’un anticorps.
* ELISA sandwich détecter la présence d’un antigène.

L’ELISA sandwich procède en deux étapes :

1. Fixation des anticorps spécifiques.
2. L’ajout de l’antigène.
3. Révélation par l’ajout d’un anticorps révélateur.

Les anticorps sont purifiés par chromatographie grâce à l’affinité antigène anticorps.

## Immunomarquage sur coupe histologique (tissu)

Plusieurs problèmes apparaissent lors de l’immunomarquage. Il faut :

* Traverser la membrane cellulaire traversée.
* La fixation de l’anticorps peut être empêcher par le fixation du tissu.

Les étapes sont :

1. Démasquage :

* Dénaturation par pH et température. (y un baille cheloud avec le formol. Ce dernier étant lié de façon covalente).
* Lavage avec un sérum de l’animal qui possède de nombreuses molécules servant à saturer les anticorps.

1. Blocage ou inhibition. Les péroxydases endogènes sont altérées avec de l’eau oxygénée (H2O2). Rmq : l’eau oxygénée est le substrat de cette enzyme. À trop forte concentration, l’enzyme est détruite par une sur oxydation de son cofacteur (hème avec un Fe2+).
2. Immunomarquage.
3. Une fois le marquage appliqué, on réalise une contre coloration càd le marquage de zones non étudiées pour accentuer le contraste et faciliter la lecture.

Révélation des anticrops par alkaline phosphatase.