

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire cellulaire/ Immunologie approfondie

Essai de purification des immunoglobulines G.

Présenté par :

HISSEIN Issaka Nourdja
CUBAHIRO Arnaud

Membres de jury :

Présidente :	Mme BENDJEDOU Dalila	(Prof.)	Université de Guelma.
Examinatrice :	Mme KAIDI Souad	(M.A)	Université de Guelma.
Encadreur :	Mr HEMICI Ahmed	(M.A.A)	Université de Guelma.

Juin 2013.

Résumé :

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines ayant la fonction d'anticorps. Ces immunoglobulines ont été induites en grande quantité par inoculation d'une dose d'adjuvant complet de Freund (100 µl) sur des lapins, et puis ont subi une purification partielle par passage d'un pool de sérum immun (5 ml; 4,5 mg/ml) à travers une colonne de gel Sephadex G-100 (1,1 X 60 cm). Les échantillons élués ont été reconstitués en un pool pour être ensuite analysés afin d'en déterminer le taux en IgG. Le résultat obtenu par le dosage de ces dernières a permis de conclure que les lapins ont réagi positivement à l'immunisation par cet adjuvant. Ceci est un bon argument de la faisabilité et la reproductibilité de la chromatographie comme une technique de séparation et de purification des immunoglobulines.

Mots clés : Lapins, immunisation, IgG, chromatographie, purification.

Abstract:

Immunoglobulines are glycoproteins having antibody function. These immunoglobulines are induced by administering a proportion of CFA (100 µl) on rabbits, and then underwent a partial purification by an immune serum crossing (5 ml; 4,5 mg/ml) through Sephadex G-100 freezing column (1,1 X 60 cm). Separated samples have been reconstituted in a group to be analyzed in order to determinate the IgG rate. The result obtained by immunoglobulines dosage made it possible to conclude that rabbits reacted positively to the immunization at this additive. This is a good argument of feasibility and reproductibility of chromatography like a mean of immunoglobulines separation and purification.

Keys words: Rabbits, immunization, IgG, chromatography, purification

ملخص:

الغلوبولينات المناعية ما هي إلا بروتينات سكرية تلعب دور الأجسام المضادة. لقد تم إنتاج هذه الأجسام بدرجة كافية بعد أن تم حقن الأرانب بجرعة من الممنوع AFC (100 مل), ثم تم تنقيتها جزئياً بتمريرها وفصلها في عمود يحتوي علي هلامة من نوع sephadex G-100 ذو أبعاد (1,1×60 سم). بعد شطف العينات تم إعادة تشكيل خليط منها لأجل تحليلها وتحديد نسبة الغلوبولينات المناعية من نوع IgG التي تحتويها. بعد تحليل هذه الأجسام المناعية توصلنا إلي نتائج أكدت لنا أهمية استعمال طريقة الكروماتوغرافيا كوسيلة لفصل وتنقية الغلوبولينات المناعية.

كلمات مفتاحية: تنقية، الأرانب، تحصين، الكروماتوغرافيا، الغلوبولين المناعي G.

Remerciements

Nous tenons à remercier DIEU LE TOUT PUISSANT de nous avoir accordé la santé, le courage ainsi que la volonté d'entamer et de terminer notre projet de fin d'étude.

Nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury, Mme BENDJEDOU D. et Mme KAIDI S. d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre travail.

Nous remercions profondément notre encadreur Mr HEMICI Ahmed, pour son excellent encadrement, sa vision objective sans précédent sur tous les aspects concourants à la bonne réalisation de notre mémoire.

Nous remercions également tous les professeurs qui ont contribué à notre formation, sans leur savoir et leur compétence, nous ne serions pas à ce niveau, ainsi que tout le personnel des laboratoires de biologie moléculaire et cellulaire à l'université de Guelma pour les moyens offerts.

Nous tenons à remercier également :

Dr S. KACI Née TIARTI (Laboratoire d'analyse d'Annaba).

Dr Tabet ABDELHAK (Laboratoire d'analyse médicale Guelma)

Dr BROUK HACENE (Laboratoire d'analyse médicale Guelma)

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ici l'expression de nos sentiments de reconnaissance et de respect.

HISSEIN ISSAKA Nourdja.

CUBAHIRO Arnaud.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de celle qui me sera toujours et que j'aurai aimé qu'elle soit là ce jour,... ma très bien aimée regrettée mère.

A celui qui m'encourage tout le temps et qui me redonne de l'espoir, mon très cher père.

A mon frère bien aimé KUBWIMANA Joseph Camille pour sa persévérance, son courage et sa détermination.

A mes sœurs adorées NGENDANIMANA Leslie Micheline, Gladys Muriella et Gretta pour leur amour et confiance.

A ma belle-mère qui a su m'encourager et me redonner confiance.

A mon beau-frère BIZIMANA René pour ses encouragements, soutien moral et conseils.

A la famille NYAKUBUSA Germain pour leur amour, leurs conseils et leur soutien, que le Tout Puissant vous bénisse.

A la famille NTABAKUNZI Moïse pour leur encouragement et leur patience, que le Tout Puissant vous bénisse.

A la famille NIZIGIYIMANA Salvatore pour leur amour leur encouragement et contribution, que le Tout Puissant vous bénisse.

A mes cousins : Francine, Patrick, Richard, Vincent, Polycarpe, Ladislas, Bernard, Stany, Victor.

A toute la communauté Burundaise Est-algérienne et spécialement à Alida, Axel, Delphin Juste, Denis, Ferdinand et Fierté.

A tous mes amis d'ici ou d'ailleurs pour leur attention et surtout leurs encouragements.

Je ne saurais terminer sans pour autant vivement remercier mon binôme HISSEIN ISSAKA Nourdja pour tout le soutien qu'il a eu à m'apporter.

CUBAHIRO Arnaud

Dédicace



*Au nom d'Allah le tout miséricordieux le très miséricordieux
Je dédie ce mémoire a mon unique le tout puissant ALLAH,
qui ma donné le pouvoir, la santé et le bon chemin pour
terminer ce travail, et je dédie aussi :*

- + A ma chère mère FATIME ADOUM*
- + A mon cher père ISSAKA NOURDJA*
- + A mon cher oncle ALIO ADOUM*
- + A mes chers(es) frères et sœurs*
- + A mes cousins et cousines, oncles et tantes, mes amis(es)*
- + A toutes les familles ISSAKA Nourdja et
ADOUM Abdoulaye.*
- + La communauté Tchadienne*
- + Mes enseignants(es)*
- + Et sans oublier mon binôme CUBAHIRO Arnaud*

*Et a la mémoire de mes parents qui sont disparus très tôt à
mon absence. Qu'ALLAH le tout puissant accorde leurs saintes
miséricordes.*

HISSEIN ISSAKA NOURDJA



BOK OYE

Remerciement**Dédicace****Liste des figures****Liste des tableaux****Liste d'abréviations****Introduction générale** 1**PARTIE THEORIQUE****CHAPITRE I : LES IMMUNOSGLOBULINES**

1-Définition	3
2-Classification	3
2-1- Les immunoglobuline G	3
2-2- Les immunoglobuline A	4
2-3- Les immunoglobuline M	4
2-4- Les immunoglobuline D	5
2-5- Les immunoglobuline E	5
3- Structure de l'immunoglobuline	5
3-1- Structure des chaines légères	6
3-2- Structure des chaines lourdes	7
4- Propriétés de l'immunoglobuline G	7
4-1- Propriétés physico-chimiques	7
4-2- Propriétés biologiques	10
5- Hétérogénéité de l'immunoglobuline G	11
5-1- Hétérogénéité isotypique	11
5-2- Hétérogénéité allotypie	12
5-3- Hétérogénéité idiotypie	13
6- Synthèses des immunoglobulines	14
6-1- Structures et recombinaison des immunoglobulines G	14



Sommaire

-----	2013
6-2- Maturation et sélection des lymphocytes B	14
6-3- migration des lymphocytes Ben périphérique	15
6-4- Activation et différenciation de lymphocyte Ben plasmocyte	15
6-5- Maturation a la réponse humorale en anticorps	15
7- Rôles des anticorps	16
7-1- Liaison à l'antigène	17
7-2-Activation du complément	18
7-3-Activation des cellules immunocompétentes	20

CHAPITRE II : IMMUNISATION ET PRODUCTION D'ANTICORPS

1- Définition et généralités	22
2-Types d'immunités	22
2-1- Immunité naturelle	22
2-2- Immunité acquise	22
2-2-1- Immunité acquise active	23
2-2-2- Immunité passive	23
3-Immunisation des animaux	23
3-1- Choix de l'animal	23
3-2- Choix de l'adjuvant	24
3-3- Vaccination	24
3-3-1-Vaccin (conventionnels)	25
3-3-2- Vaccins récents	25
3-4-Choix de la dose et critère d'immunisation	27
3-4-1- Le xénogénie	27
3-4-2- La dose	27
3-4-3- La voie d'administration	27
3-4-4- Le facteur du temps	29
3-4-5- L'association antigénique	30



Sommaire

	-----2013
4-Production d'immunsérums	30
4-1- Production d'anticorps polyclonaux	30
4-2- Production d'anticorps monoclonaux	31
4-2-1- Définition	31
4-2-2- Etapes des productions des anticorps monoclonaux	31
4-2-3- Domaines d'application des anticorps monoclonaux	33

CHAPITRE III : SEPARATION ET PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES

1- Méthodes de séparation non spécifiques	36
1-1- Précipitation	36
1-1-1- Précipitations par des sels	36
1-1-2- Précipitations par des alcools	38
1-2- La chromatographie	38
1-2-1- Chromatographie d'exclusion-diffusion ou gel filtration	40
1-2-2- Chromatographie d'échange ionique	45
2- METHODES DE SEPARATION SPECIFIQUES	47
2-1- Chromatographie d'affinité	47
2-1-1- Principe	47
2-1-2- Méthodologie	48
2-1-3- Applications	59
2-2- Ring test ou test de l'anneau	52
2-2-1- Principe	52
2-2-2- Application	53
2-3- Immuno néphélémétrie ou turbidimétrie	53
2-3-1- Définition	53
2-3-2- Principe	54
2-4- Immunodiffusion simple ou test d'Ouchterlony	55
2.4.1. Principe	55



Sommaire

-----	2013
2-4-2-Technique	55
2-4-3- Application	55
2-5- Immunodiffusion radiale ou technique de Mancini	56
2-5-1 Principe	56
2-5-2- Application	56
2-6- Immunoélectrophorèse simple ou technique de Graber	57
2-6-1 Principe	57
2-6-2- Technique	57
2-6-3- Application	58

CHAPITRE IV : PARTIE PRATIQUE

Matériels et méthodes	59
1-Matériels	59
1-1-Matériels expérimentaux	59
1-2-Matériels biologiques	59
2-Animaux et alimentation	59
2-1- Animaux	59
2-2- Condition d'élevage	60
2-3- Prélèvement de sang.....	60
2-4- Induction de la réponse immunitaire	60
3- Dosage des protéines par la méthode de Biuret	62
3-1- Principe	62
3-2- Mode de Préparation de la solution de Biuret	62
3-3- Etablissement de la Courbe d'étalonnage	63
3-4- Dosage des protéines	64
4- Ring test ou test de l'anneau	64
4-1- Principe	64
4-2- Procédure	64



Sommaire

-----2013

5- Précipitation au Sulfate d'ammonium	64
6- Chromatographie d'exclusion sur gel G100	65
6-1- Principe	65
6-2- Procédure	66
6-2-1- Préparation du gel.....	66
6-2-2- Remplissage de la colonne chromatographique	66
6-2-3- Technique	67
7- Dosage d'immunoglobuline par la technique de néphélométrie	68
7-1- Principe	68
7-2- Protocole	68
Résultats et discussions	69
1- Résultats du Dosage des protéines	69
2- Résultats dosage des protéines par Ring test	70
3- Résultats de précipitation des sérums au sulfate d'ammonium	71
4- Résultats de la chromatographie d'exclusion	72
5- Résultats du dosage des immunoglobulines G	74
Conclusion	76
Références bibliographiques	77
Annexes	
Résumé	



N°	Figure	Page
1	Les cinq classes des immunoglobulines	6
2	Structure de l'immunoglobuline G	8
3	Types de variabilité au niveau des immunoglobulines	12
4	Réarrangement des synthèses des immunoglobulines	16
5	Synthèse des immunoglobulines	17
6	Maturation de la réponse humorale en anticorps	18
7	Activation du complément	20
8	Mécanismes de l'activation des cellules immunocompétentes	21
9	Production d'anticorps monoclonaux	33
10	Séparation d'une protéine d'intérêt par précipitation au sulfate d'ammonium	37
11	La chromatographie de filtration moléculaire ou d'exclusion-diffusion	40
12	Appareillage d'une chromatographie liquide	42
13	courbe d'étalonnage de la chromatographie d'exclusion	44
14	Echangeur cationique faible et fort	46
15	Echangeur anionique faible et fort	46
16	Principe de la chromatographie d'affinité par des microbilles	51
17	Etapas de la chromatographie d'affinité	52
18	Test d'anneau	53
19	Principe de la néphélométrie	54
20	détermination et interprétation des réactions d'identité entre deux antigènes par immunodiffusion simple	56
21	Séparation du sérum humain par immunoelectrophorèse et recherche d'anomalies au niveau des immunoglobulines sériques	58
22	Profil d'absorbance à 285 nm des différentes fractions de protéine séparées par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G-100.	73
23	Résultats de la courbe de dosage d'immunoglobuline G	75

N°	Tableau	Page
1	Quantité de solution pour réaliser la courbe d'étalonnage	63
2	Résultats des DO issues du dosage colorimétrique des dilutions du BSA par la méthode de Biuret	70
3	dosage de l'échantillon brut par le bleu de Biuret	70
4	valeurs des DO à 285 nm des différentes fractions collectées	72
5	Résultats de dosage d'immunoglobuline G	74



Liste d'abréviations

-2013

% : Pourcentage

µl : microlitre

AA : acide aminé

Ac : anticorps

ACF : adjuvant complet de Freund

AcM : anticorps monoclonal

AcP : anticorps polyclonal

ADCC : cytotoxicité dépendante de l'anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BCR: B cells receiver

BSA: Bovine Serum Albumine

c.à.d. : c'est-à-dire

CD: Cluster de différenciation

CDR : Complementary determining region

CFA : Complet Freund Adjuvent

CM : Carboxy-méthyle

cm :Centimètre

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

DEAE : Diéthyl-amino-éthyl

DO : Densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

ELISA : Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay





Liste d'abréviations

-----2013

ex. : Xemple

Fab :Ffragment antigen binding

Fc : Fragment cristallisable

FcR: Fragment cristallisable Receiver

Fig. : FIgure

FR : Facteur rhumatoïde

g : Gramme

H : Heavy

HAT : Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine

HGPRT : Hypoxanthine-Guanine-phosphoribosyl transférase

HLA : Histicompatibilité Leucocyt A

I : Iode

ID : Intradermique

Ig : I mmunoglobuline

IM : Intramusculaire

IP : Intrapéritonéale

IV : Intraveineuse

KDa : Kilo dalton

L : Light

l : Litre

LB :Llymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

Mg : Magnésium

mg : Milligramme

ml : Millilitre

MM : Masse moléculaire



Liste d'abréviations

-----2013

mmol: Millimoles

PBS : Phosphate buffer saline

PEG : Polyéthylèneglycol

pH : Potentiel d'hydrogène

PM : Poids moléculaire

QAE : Quaternaire amino-éthyl- cellulose

RSV : Virus respiratoire syncitial

S : Svedberg

SI : Système immunitaire

SP : Sulfopropyle

Th : T-helper

UV : Ultraviolet

Ve : Volume d'élution

VH : Hypervariable

Vo : Volume mort



Chapitre I



LES IMMUNOSGLOBULINES



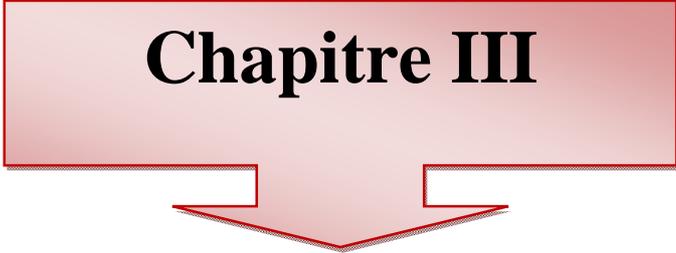
Chapitre II



IMMUNISATION ET PRODUCTION D'ANTICORPS



Chapitre III



SEPARATION ET PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES



Chapitre IV



**MATERIELS ET
METHODES**

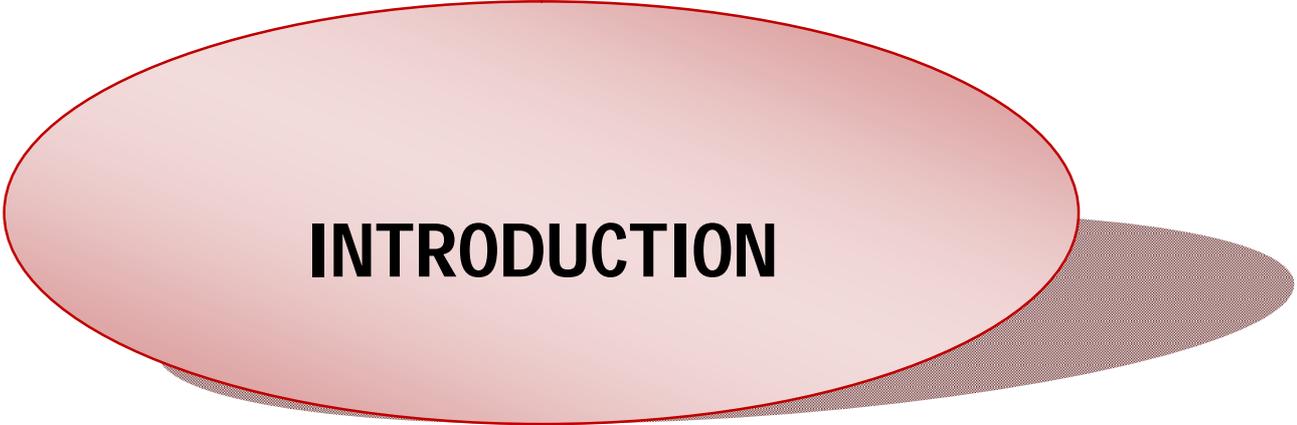


Chapitre IV



RESULTATS ET DISCUSSIONS





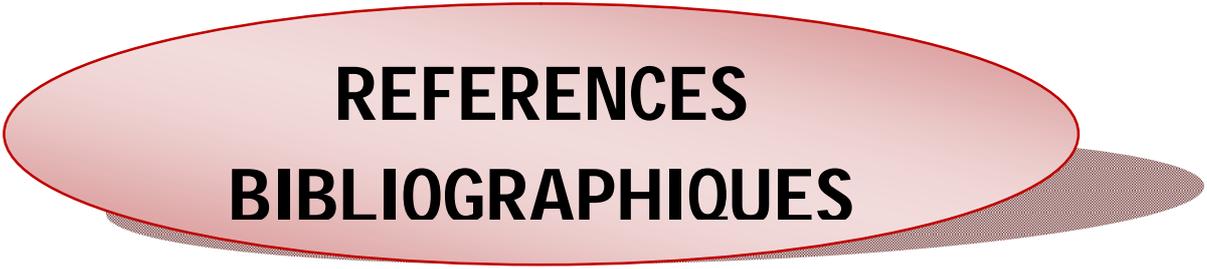
INTRODUCTION

A red oval with a gradient fill and a dark red border, casting a shadow to the right. The word "ANNEXES" is centered inside the oval in a bold, black, sans-serif font.

ANNEXES



CONCLUSION



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Introduction

-----2013

La fonction du système immunitaire est d'assurer la défense de l'organisme contre toute substance pathogène. Il possède, pour cela, une capacité d'apprentissage permettant la tolérance des antigènes du soi et l'élimination des antigènes du non soi. Le système immunitaire agit par l'intermédiaire de deux principaux mécanismes qui sont l'immunité naturelle (innée) et l'immunité acquise

Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large nombre d'immunogènes, et la réponse humorale varie, dans ce cas, en fonction de la nature de la substance immunogène.

Les anticorps jouent un rôle important dans la protection du système immunitaire en détectant, neutralisant et en éliminant les agents pathogènes et ces derniers se caractérisent par une liaison spécifique à l'antigène qui en induit la production (*CHAPEL H., 2005*).

Actuellement, on admet que des anticorps peuvent être induits contre une gamme illimitée de molécules, y compris des composés chimiques de tailles très réduites. Cela démontre que le répertoire des anticorps possibles chez un individu est pratiquement illimité et que l'organisme de l'être vivant est capable de créer un répertoire ouvert d'anticorps, de structures diverses. Il est aussi admis que l'utilité potentielle des anticorps pour la détection et le dosage d'à peu près toutes les substances dans un mélange de molécules est rendue possible par l'introduction de méthodes d'analyses immunologiques appropriées.

La purification et la caractérisation de l'antigène s'avèrent nécessaire dans le but de l'étude des molécules biologiques et les anticorps n'en font pas exception. La première étape dans la caractérisation d'une molécule est son isolement à l'état pur. En plus, en fonction de l'usage prévu, on emploie des préparations plus ou moins purifiées des anticorps. Donc, la connaissance de la destinée finale de l'anticorps est importante avant sa purification pour pouvoir mettre en place les techniques adéquates.

Vu l'impact des immunoglobulines aussi bien sur le plan économique que sur le plan médical puisqu'elles entrent en jeu d'une part dans les différents diagnostics immunologiques, et d'autre part comme traitement, nous avons jugé utile de faire la synthèse des travaux de recherche entrepris dans ce domaine pour approfondir nos connaissances





Introduction

-----2013
théoriques et d'essayer de mettre en pratique quelques-uns des techniques d'analyse ou de dosage immunologique.

Ce mémoire est divisé en deux parties. La première partie est une synthèse bibliographique qui commence par le chapitre d'immunisation, le deuxième chapitre parle des immunoglobulines et particulièrement des immunoglobulines G. Le troisième chapitre décrit les méthodes de séparation et de purification des immunoglobulines G. La deuxième partie qui consiste en une contribution pratique à l'isolement et à la purification des IgG de l'immun sérum du lapin, est faite en deux chapitres, le premier retrace les méthodes et matériels employés pour la réalisation de ce travail. Le deuxième fusionne tous les résultats de notre étude ainsi que leur interprétation et discussion.

Définition :

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines jouant le rôle d'anticorps, elles sont produites par les lymphocytes B et les plasmocytes qui se distribuent dans le plasma, les liquides extravasculaires et les sécrétions (*MALE D. et al., 2006 -2007*) (1).

Un anticorps est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries et les virus. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B, et reconnaissent des antigènes de manière spécifique. Les anticorps constituent l'immunoglobuline principale du sang, aussi on utilise parfois le terme immunoglobuline à la place du mot anticorps (2).

2. Classification des immunoglobulines :

Il existe cinq classes d'immunoglobulines et chacune est déterminée selon le type de la chaîne lourde qui la constitue. Cette différenciation s'appelle isotypie. Les différentes chaînes lourdes sont les IgG (chaîne lourde γ), les IgM (chaîne lourde μ), les IgA (chaîne lourde α), les IgD (chaîne lourde δ) et les IgE (chaîne lourde ϵ). Ces cinq chaînes lourdes se différencient par leur séquence en acides aminés, leur poids moléculaire (PM), hétérogénéité à l'intérieur de chaque classe, leur charge, le contenu en hydrate de carbone (*ESPINOSA E. et al., 2006*).

2.1. Les immunoglobulines G :

Les immunoglobulines de la classe IgG possèdent un poids moléculaire de 150 KDa et sont retrouvées dans les espaces vasculaire et extravasculaire ainsi que dans les sécrétions. L'IgG est l'immunoglobuline la plus abondante dans le sang voir annexe (**Tableau A**), elle fournit la majorité de l'immunité aux agents infectieux transmis par voie sanguine. Elle est la seule classe d'anticorps qui traverse le placenta pour fournir l'immunité humorale au fœtus et donc au bébé à sa naissance. L'IgG possède deux chaînes lourdes (chaîne de type γ) avec deux chaînes légères (κ et λ). De plus, il existe quatre sous-classes d'IgG (désignées par IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4) qui possèdent des séquences chaînes lourdes et des activités fonctionnelles légèrement différentes (*BENZAIR A., 2009*); (3).

2.2. Les immunoglobulines A :

L'immunoglobuline A (IgA) possède un PM de 170 KDa et est présente dans le sérum en quatre chaînes polypeptidiques (Deux chaînes lourdes et deux chaînes légères). Elle est principalement présente dans les sécrétions externes telles que le colostrum, le lait et la salive où elle existe en dimère de 420 KDa (**Fig. 1**). Outre les chaînes légères (λ et κ) et la chaîne lourde (α), qui la distingue de l'IgG ou des autres classes d'anticorps, l'IgA sécrétoire contient également deux autres chaînes polypeptidiques (pièce sécrétoire) et la chaîne J qui est une chaîne de liaison. La pièce sécrétoire appartient à la molécule qui contribue au transport transépithélial de l'IgA exocrine et la stabilise contre une dégradation protéolytique. Les deux unités à quatre chaînes composant l'IgA sécrétoire sont retenues ensemble par la chaîne J à travers des ponts disulfures. La majorité des IgA est synthétisée localement par les plasmocytes dans les glandes mammaires et salivaires, et le long des tractus gastro-intestinal, respiratoire et génito-urinaire. Elle est ensuite transportée par les cellules épithéliales à la lumière. Cet anticorps constitue la première ligne de défense contre l'agression microbienne sur les surfaces muqueuses (*BENZAIR A., 2009*) ; (3).

2.3. Les immunoglobulines M :

L'immunoglobuline M (IgM) est le premier anticorps produit par les cellules B et exprimé sur leur surface. Elle agit en récepteur d'antigène pour ces cellules; elle est ainsi présente en molécule soluble dans le sang. Cette molécule est exprimée sur la surface de la cellule B en unité à quatre chaînes (deux chaînes lourdes μ et deux chaînes légères). Dans le sang, l'IgM est composée de cinq unités à quatre chaînes retenues entre elles par des ponts disulfures à l'extrémité C-terminale des chaînes μ (**Fig. 1**). La chaîne J également associée à l'IgM dans le sang, initie la polymérisation de ses sous-unités au moment où elle est sécrétée par les plasmocytes. En raison de sa taille (900 KDa), l'IgM est trouvée principalement dans l'espace intravasculaire. Comme l'IgM est le premier anticorps produit dans une réponse immunitaire, son efficacité à se combiner avec un antigène est d'une importance particulière jusqu'à ce que des quantités suffisantes de l'anticorps IgG soient synthétisées. Malgré que les anticorps IgM aient habituellement des sites de liaison de faible affinité pour un antigène, ils possèdent 10 sites de liaison par molécule qui peuvent être synergiques les uns aux autres sur la même molécule lorsque celle-ci se lie à un microbe. L'intensité globale de la liaison d'une molécule d'IgM (avidité) à un microbe pratiquement élevée, ce qui permet aux anticorps de supprimer le microbe (*LYDYARD P.M., et al., 2002*); (*BENZAIR A., 2009*); (4).

2.4. Les immunoglobulines D :

L'immunoglobuline D (IgD) est présente en petites quantités dans le sang (0,3 mg/ml dans le sérum adulte). Sa principale fonction est celle d'un récepteur d'antigène sur les lymphocytes B (**Fig.1**). Les cellules B, qui sont spécifiques pour le même antigène, peuvent donc exprimer l'IgM et l'IgD. Lorsque l'IgM et l'IgD, exprimées sur la cellule, interagissent avec un antigène pour lequel elles sont spécifiques, l'antigène est internalisé, traité et présenté aux cellules T-helper. Celles-ci activent les cellules B à proliférer et à se différencier en plasmocytes, initiant ainsi une réponse immunitaire humorale (*BENZAIR A., 2009*); (3).

2.5. Les immunoglobulines E :

L'immunoglobuline E (IgE) est présente dans le sérum à des niveaux très faibles (nanogrammes par millilitre), mais joue un rôle important en augmentant l'inflammation aiguë, dans la protection contre l'infection par les vers, et dans les réactions allergiques. L'allergie médiée par l'anticorps est principalement associée à l'IgE. Après la stimulation du développement des plasmocytes produisant l'IgE par un antigène, l'IgE produit se lie aux récepteurs sur les mastocytes spécifiques pour la région Fc. Lorsqu'un antigène est réintroduit chez un individu qui possède déjà des mastocytes activés il se lie au mastocyte qui va libérer les agents pharmacologiques actifs (histamines). Les anticorps IgE sont donc des composants importants pour les syndromes d'hypersensibilité immédiate tels que le rhume des foins et l'asthme (*CHAPEL H., et al ,2004*); (3) ; (5); (6).

3. Structure de l'immunoglobuline G :

Les IgG sont les Immunoglobulines majoritaires du sérum. Ce sont les plus petites et les plus simples avec un PM de 150 KDa, un coefficient de sédimentation de 6,6 S et une mobilité électrophorétique de type gamma (7).

Les IgG sont constituées par quatre chaînes polypeptidiques groupées en deux paires de taille inégale : deux chaînes lourdes H (H pour heavy) et deux chaînes légères L (L pour light). Les chaînes H sont unies entre elles par des ponts disulfures (S-S) ou ponts interchaînes, et les chaînes H aux chaînes L également par des ponts disulfures. Il existe également des ponts disulfures intrachaines de nombre variables, assurant la stabilité d'IgG au sein d'une structure en Y (**Fig. 2**) (*PARHAM P., 2003*); (8).

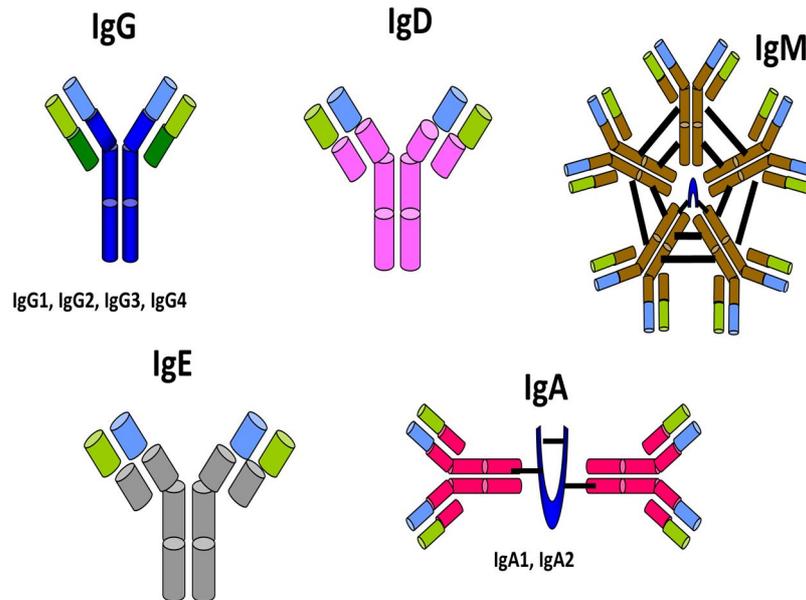


Figure 1: Les cinq classes d'immunoglobulines (1).

3.1. Structure des chaînes légères (chaîne L) :

Elle correspond à la séquence des acides aminés : 214 AA constituent les chaînes L κ ou L λ , avec un poids moléculaire de 25 KDa; elles se divisent en 2 parties approximativement égales :

- Le segment V, correspond à l'extrémité amino-terminale. Sa structure primaire est très variable, d'une chaîne L à une autre, même chez un même individu. A l'intérieur même de ce segment variable, on peut définir des zones hypervariables ou "complementary determining régions" (5% de la partie V) formant des boucles et des zones assez bien conservées constituant l'armature, (charpente, ou framework) du segment V. Il existe 3 CDR constituées par 5 à 10 AA. Ces CDR correspondent aux zones de contact entre la partie V et l'Ag correspondant. Une 4^{ème} zone hypervariable accessoire de contact avec l'Ag (HV₄) est située au niveau de FR3 et se présente comme une boucle b en épingle à cheveux. La boucle CD3 est la plus importante pour la formation des points de liaison avec l'Ag car elle est toujours concernée dans les contacts avec l'Ag et présente le plus de variabilité (9); (10). Les régions FR sont au nombre de 4 et permettent de classer les chaînes L des différents anticorps en sous-groupes de variabilité, en fonction des homologies de leurs séquences.



Le segment C (constant), correspondant à la moitié carboxy-terminale (-COOH) présentant une grande constance de structure d'une chaîne L à une autre d'un même type (κ ou λ). Cependant, il existe 6 isotypes différents pour λ et en plus quelques variations selon les individus qui correspondent à l'allotypie des chaînes légères **(10)**.

3.2. Structure primaire des chaînes lourdes (chaînes H) :

Les chaînes lourdes comprennent 440 à 446 AA selon la sous-classe et sont faites de deux fragments :

- Un segment constant (CH), C-terminal, de constitution constante d'une IgG à une autre IgG. Il représente les 3/4 de la chaîne lourde. Cette portion constante porte les structures responsables des propriétés effectrices des IgG et les déterminants isotypiques et allotypiques.
- Le segment variable (VH) correspond à l'extrémité N-terminale des chaînes lourdes. Il représente 1/4 de la chaîne lourde et participe avec son homologue $V\kappa$ ou $V\lambda$ de la chaîne L à la constitution du site Ac de l'Ig qui reconnaît l'Ag. Il existe comme pour les chaînes L, trois CDR et quatre FR pour VH. Leurs propriétés sont analogues à celles des chaînes L. Les FR permettent de définir des sous-groupes de variabilité (*ESPINOSA E. et al ,2006*) ; **(11)**.

4. Propriétés des immunoglobulines G :

La structure des Immunoglobulines a été découverte entre 1959 et 1962. Cette découverte rapporta un prix Nobel à Porter et à Eldman. Porter a essayé de cliver, par l'utilisation d'enzymes protéolytiques, la molécule d'IgG pour en déterminer les différentes fonctions. Eldman, lui, a pu réaliser un déroulage de l'IgG **(8)**.

4.1. Propriétés physico-chimiques :

Les IgG sont les glycoprotéines (approximativement 150 KDa) composées de deux chaînes lourdes (2 x 50 KDa) et de deux chaînes légères (2x 25 KDa) liées ensemble par des ponts disulfures interchaînes (entre les AA 15 et 17). Il y a deux types de chaînes légères, qui sont désigné sous le nom de lambda (λ) et de kappa (κ). Les régions amino-terminales des chaînes lourdes et légères montrent la composition en acides aminés fortement variable (VH et VL respectivement).

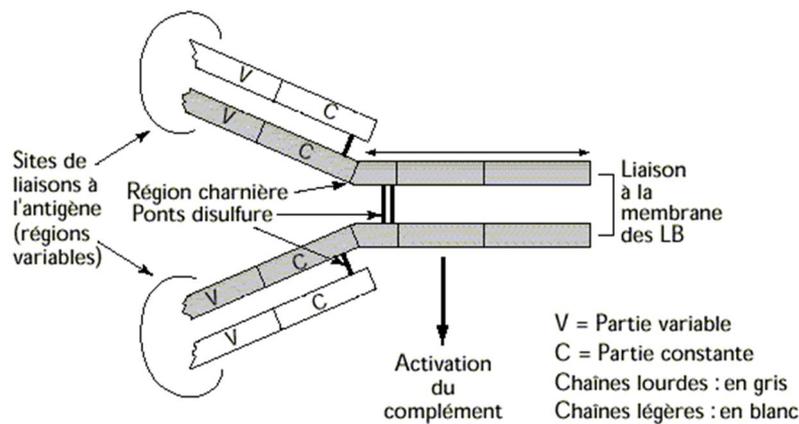


Figure 2 : Structure de l'immunoglobuline G (11); (2).

Cette région variable est impliquée dans la liaison à l'antigène contrairement à la région variable, les domaines constants des chaînes légères et lourdes (CL et CH). Les régions constantes sont impliquées dans la liaison du complément, le passage placentaire, et se lie à la membrane de cellules. Les différences dans la composition en acides aminés des chaînes lourdes et le rapport des chaînes légères λ et κ sont caractéristiques des différentes sous-classes d'IgG. Tandis que la séquence primaire en acides aminés des régions constantes des chaînes lourdes de sous-classe d'IgG est supérieure à 95% que les régions homologues, des différences structurales principales sont trouvées dans la région charnière en termes de nombre de résidus et de liaisons disulfures interchaînes (17).

La région charnière est le dispositif structural le plus divers des IgG. Elle lie les deux fragments Fab à la partie Fc de la molécule d'IgG et fournit la flexibilité à la molécule d'IgG. En outre, elle forme une structure de liaison entre les deux chaînes lourdes. La flexibilité de la région charnière est importante pour l'interaction du fragment Fab avec les différents épitopes et le fragment Fc pour s'adapter aux différentes conformations. Les liaisons disulfures dans la région centrale charnière sont importantes pour l'enchaînement covalent des chaînes lourdes.

Le point d'attachement de chaîne légère à la chaîne lourde diffère également parmi les sous-classes. Des chaînes légères d'IgG₁ se relient près du milieu de la chaîne lourde, alors que ceux d'IgG₂, IgG₃ et IgG₄ se relient à un quart de l'extrémité amino-terminale de la chaîne lourde. Les liaisons disulfures intrachaines entre les chaînes lourdes et légères transforment des parties de la molécule en régions globulaires compactes appelées les domaines. Ces domaines participent aux fonctions biologiques de l'immunoglobuline. Des



déterminantes antigéniques sont généralement trouvés sur le fragment Fc des IgG1 et des IgG2, dans région charnière d'IgG3 les fragments Fc et de Fd des IgG4 (17).

La papaïne, en présence de la cystéine, digère l'IgG en deux fragments de Fab et un fragment de Fc, et des produits de dégradation. La pepsine digère les IgG en $F(ab')_2$ et Fc' ou des chaînes de Fc_2 ou des petites polypeptides sans activité d'anticorps (17).

Porter traita une molécule d'immunoglobuline, homogène, de taille 7S et de masse moléculaire 188 KDa, par protéolyse enzymatique en utilisant la papaïne. Les produits de digestion furent ensuite analysés par chromatographie échangeuses d'anions. Trois fragments furent séparés : FI, FII et FIII. Les fragments FI et FII, de même masse moléculaire (50 KDa) se lient à l'antigène (spécifique de l'Ig de départ) et furent désigner par le symbole Fab. Le fragment FIII, de masse moléculaire égale à 80 KDa, ne se lie pas à l'antigène, mais se fixe au complément ; c'est un fragment qui possède la propriété d'être cristallisable au froid, d'où la désignation par le symbole Fc (NATHALIE M. *et al.*, 2009); (9).

Bien avant les travaux de Porter, il était admis déjà que l'immunoglobuline était une molécule divalente d'une part, c'est-à-dire possédant deux sites de liaison pour l'antigène et qu'elle fixait le complément, d'autre part. La protéolyse à la pepsine par contre fournit un fragment essentiel de taille 5S (F 5S) et plusieurs autres petits fragments ou oligopeptides. L'étude du F5S a montré que ce dernier conservait la propriété de se lier à l'antigène, tout comme la molécule d'Ig de laquelle il découlait. Dans certaines conditions réactionnelles, l'action de la pepsine sur le F 5S peut fournir un fragment F'_c de masse moléculaire égale à 20 KDa. Le F'_c correspond à un dimère de la partie C-terminale de la moitié du Fc (9).

Les travaux d'Eldman démontrèrent l'importance des liaisons disulfures dans la structure de l'Immunoglobuline et du rôle non moins important des liaisons covalentes qui relie les sous-unités de l'Ig entre elles. Il provoqua la réduction des liaisons disulfures (S-S). A la fin il obtint deux polypeptides nécessitant un agent alkylant pour la dissociation des liaisons non covalentes entre les sous-unités de l'immunoglobuline. Les deux chaînes polypeptidiques caractérisaient l'existence de deux composants essentiels dans la molécule d'immunoglobuline :

- L'un des deux composants présentait une masse moléculaire de 25 KDa, il fut nommé chaîne légère ou L (de Light chain)
- L'autre, de masse 50 KDa fut appelé chaîne lourde ou H (de Heavy Chain).

La combinaison de tous ces résultats conduit à déduire que chaque molécule d'Ig est composée de quatre chaînes : deux chaînes légères de type L et deux chaînes lourdes de types H de telle sorte que l'Ig présente une formule de la forme L_2H_2 . La chaîne H présente les deux tiers de la masse totale de l'Ig et la chaîne légère L le tiers restant (9).

Lorsque le F5S est traité par un agent réducteur doux des liaisons disulfures, il donnait deux fragments de même taille, chacun pouvait s'attacher à l'antigène. Ces résultats confrontés avec ceux obtenus par Porter, montrent que le F 5S obtenu par action de la pepsine, était constitué des deux fragments FI et FII, formés après l'action de la papaïne, mais liés par des liaisons disulfures. Cependant, la somme des masses (FI+FII) des fragments de Porter était inférieure à la masse de F 5S. En effet, le F 5S correspond aux deux fragments de FI et FII et à une partie des chaînes lourdes H contenant des liaisons disulfures inter-H ; c'est pourquoi le F 5S est désigné par $(Fab')_2$. Il faut rappeler que le fragment polypeptidique contenant la fonction Fab de H est symbolisé par Fd. (BENZAIR A., 2009); (9).

4.2. Propriétés biologiques :

Les propriétés biologiques des sous-classes des IgG peuvent être classées par catégorie en tant que réactions spécifiques du fragment Fab avec de l'antigène (fonction primaire) et les fonctions effectrices (fonction secondaire). Ces réactions se produisent en raison des liaisons d'antigène et sont médiées par l'interaction des régions constantes de la chaîne lourde, particulièrement le fragment Fc. Les principales fonctions biologiques secondaires des quatre sous-classes humaines d'IgG sont récapitulées dans le **Tableau A** (voir annexe) (17).

L'immunoglobuline G a deux types de fonctions très spécialisées. Une partie se combine avec l'antigène : c'est la partie située sur le fragment Fab et l'autre partie possède les autres propriétés : le fragment Fc. En ce qui concerne la combinaison avec l'antigène, elle est spécifique et se situe à l'extrémité du fragment Fab. Intervention des acides aminés N-terminale des chaînes lourdes et légères. Si on sépare les chaînes H et les chaînes L, les chaînes L n'ont plus aucune activité alors que les chaînes H gardent leur activité mais plus réduite. Si on refait les ponts disulfures de la molécule, l'activité réapparaît (12).

Le fragment Fc se comporte comme un antigène car il possède le site de fixation du complément. C'est la fraction C1q du complément qui permet la fixation de l'anticorps de l'immunoglobuline G. On a pu localiser ce site de fixation au niveau de la zone flexible donc



pas loin des sucres. Ce mode de fixation se retrouve sur les IgG₁, IgG₂, IgG₃ mais jamais sur IgG₄. La fixation du complément ne se fait que l'immunoglobuline est liée à un antigène. Ce qui signifie que la fixation de l'antigène au niveau des fragments Fab modifie la structure spatiale de l'Ig et que cette modification découvre le site de fixation du complément.

Autre activité du fragment Fc est le site de passage transplacentaire. Les structures placentaires de certaines espèces laissent passer certaines immunoglobulines par un mécanisme de transport actif. Dans d'autres espèces, les immunoglobulines sont transmises par le colostrum. Chez l'humain, seules les IgG peuvent traverser le placenta et les IgG₂ ne passent jamais. Autre activité physiologique du fragment Fc est le site de fixation sur les tissus (les cellules), les immunoglobulines G₂ ne peuvent pas se fixer sur les cellules. Ce phénomène est à la base des réactions allergiques (*NATHALIE M. et al., 2009*); (9).

5. Hétérogénéité des immunoglobulines G (Fig. 3) :

Il existe trois niveaux d'hétérogénéité des immunoglobulines correspondant à des motifs antigéniques différents portés par les molécules d'Immunoglobulines :

- L'isotypie
- L'allotypie
- L'idiotypie.

5.1. Hétérogénéité isotypique :

L'isotypie est traduite par un marqueur antigénique d'espèce s'exprimant sur la région constante de la chaîne H ou L. elle est retrouvée identique chez tous les individus d'une même espèce. De ce fait, l'isotypie n'exprime pas de variation génétique individuelle identifiable. Elle ne peut donc servir de marqueur à l'établissement du polymorphisme génétique, mais néanmoins, elle reste un paramètre important dans l'étude de la phylogénie (*PARHAM P., 2003*); (9).

Chez l'homme et la souris, les spécificités isotypiques des Immunoglobulines définissent :

- **Pour les chaînes lourdes :** Cinq classes et plusieurs sous classes. Il s'agit des classes définies par un marqueur antigénique porté par la chaîne polypeptidique lourde dans sa région constante. Les cinq classes sont : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE ce qui correspond respectivement aux chaînes lourdes : γ , μ , α , δ , ϵ (**BENZAIR A., 2009**).

A l'intérieur de certaines classes, on peut identifier des sous-classes. Chez l'homme, on peut identifier quatre sous-classes à l'intérieur de la classe IgG : IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄. Pour la classe des IgA, il y a deux sous-classes : IgA₁ et IgA₂. Les IgM comprennent deux sous classes : IgM₁ et IgM₂. Quant aux classes IgD et IgE les sous-classes ne sont pas précisées. La répartition des IgG en pourcentage des sous-classes est IgG₁ (70%), IgG₂ (16%), IgG₃ (10%) et IgG₄ (4%) (**9**), (**11**).

- **Pour les chaînes légères :** Deux isotypes que l'on désigne sous le symbole κ et par λ caractérisant les chaînes légères. Les deux chaînes ont une structure primaire distincte et ne présentent pas de réaction croisée. Les immunoglobulines de classe M et A peuvent se présenter en molécules polymériques, sous forme pentamérique (μ_2L_2)₅ et dimérique (α_2L_2)₂ (**BENZAIR A., 2009**), (**11**).

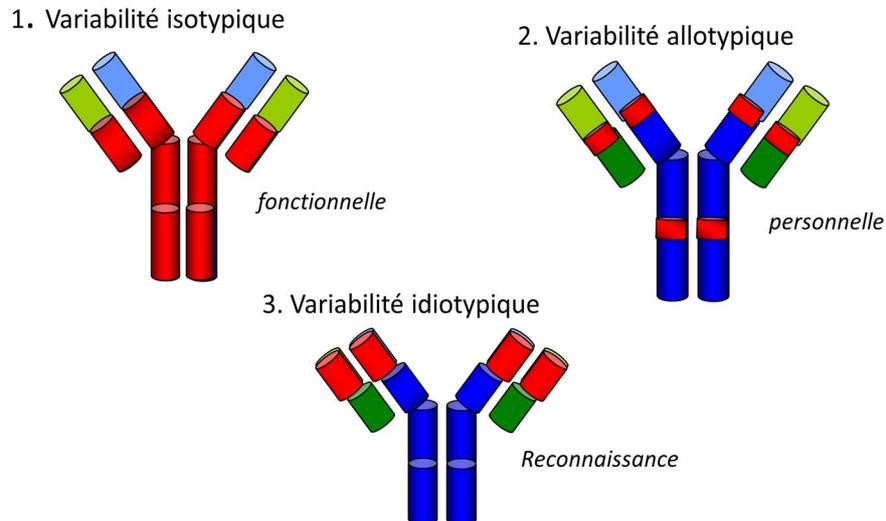


Figure 3 : Types de variabilité au niveau des immunoglobulines (**1**); (**9**).

5.2. Hétérogénéité allotypique :

Antigéniquement, l'espèce animale est définie par l'isotypie. Cependant, à l'intérieur de l'espèce un groupe d'individus est caractérisé par un ou plusieurs marqueurs antigéniques



qui lui sont propres. Les mêmes marqueurs ne sont pas retrouvés au sein d'un autre groupe de la même espèce. Ces marqueurs définissent des différences entre les individus d'une même espèce, ils représentent l'allotypie. Ces marqueurs sont exprimés sur les parties constantes des chaînes d'immunoglobulines (*PARHAM P., 2003*) ;(*BENZAIR A., 2009*).

L'allotypie est rattachée à l'existence d'allèles multiples dont la transmission obéit aux lois de la génétique mendélienne.

L'allotypie est donc intéressante pour l'étude du polymorphisme humain puisqu'elle se comporte comme un système génétique indépendant. Elle contribue à la connaissance de plusieurs systèmes biologiques, notamment le système immunitaire (*BENZAIR A., 2009*).

5.3. Hétérogénéité idiotypique :

Les déterminants idiotypiques ou idiotopes sont des éléments de structure, situés à la surface d'une molécule d'antigène et dont chaque déterminant antigénique est capable de se combiner avec une seule molécule d'anticorps (*PARHAM P., 2003*).

Un idiotype est une espèce moléculaire caractérisée par sa spécificité anticorps idiotypique. Chaque spécificité idiotypique est particulière aux anticorps contre un antigène donné. Contrairement aux spécificités allotypiques, les spécificités idiotypiques ne s'observent donc pas sur les immunoglobulines du sérum du même individu, prélevé avant sont immunisation. Le motif idiotypique est localisé sur les structures portées par les parties variables des anticorps. L'idiotypie différencie la région variable d'une population d'anticorps se liant à un motif antigénique d'une autre population d'anticorps se combinant à un autre déterminant antigénique. Selon la théorie de la sélection clonale, l'idiotypie peut être complice comme étant l'empreinte laissée par un clone cellulaire sur l'anticorps qui l'a fabriqué (*BENZAIR A., 2009*) ; (*PARHAM P., 2003*).

En résumé l'immunisation d'un animal avec un antigène induit une réponse polyclonale. De cette réponse résultera la production d'anticorps qui se lie, tous, à l'immunogène mais qui ne présente tous une région variable identique manifestant ainsi des idiotypes distincts. Certains idiotypes sont l'expression d'un grand nombre de clone et seront majoritaire dans le sérum polyclonal, d'autres au contraire ne seront l'expression que d'une minorité clonale (*PARHAM P., 2003*).

Les déterminant idiotypiques semblent jouer un rôle fondamental dans l'immuno-régulation. Aujourd'hui il est possible d'induire une production d'immunoglobuline anti-idiotype capable de provoqué un changement du profil idiotypique lors d'une réponse immunitaire (*PARHAM P., 2003*).

6. Synthèse des immunoglobulines :

L'extrême diversité des immunoglobulines s'explique par un jeu de combinaison survenant à divers niveaux pour leur synthèse.

6.1. Structure et recombinaison des gènes des immunoglobulines (Fig. 4):

L'ADN codant des immunoglobulines est présent dans trois groupes de gènes non liés :

- Un groupe code pour les chaînes $L\lambda$;
- Groupe code pour les chaînes $L\kappa$;
- Groupe code pour les chaînes H.

Notons que chaque groupe de gène de la chaîne L possède plusieurs copies différentes du segment de gène V et plusieurs autre du segment J ; caractérisés comme suit :

- Le groupe de la chaîne κ : un seul segment codant existe dans la région constante des chaînes κ , le groupe λ ; quatre segments de gènes codants existent pour la région C.
- Le groupe de gènes de la chaîne H possède plusieurs copies différentes de segments de gènes V, D et J pour les régions variables, et un seul segment de gène pour chacune des régions constantes pour les différentes classes et sous-classes. (*LYDYARD P.M., et al., 2002*).

6.2. Maturation et sélection des lymphocytes B :

La maturation des lymphocytes B se déroule dans la moelle osseuse, procédant par les étapes suivantes :



a) **Le réarrangement de la chaîne lourde** : se réalise par la combinaison du segment D avec le segment J ; une fois la jonction DJ est réalisée, une jonction s'effectue avec un segment V. Ce réarrangement doit subir « un contrôle de qualité » ou fonctionnalité pour passer à l'étape suivante (*PONVERT C. et al., 1991*); (18).

b) **Le réarrangement de la chaîne légère** : une fois la cellule pro-B possède un gène de chaîne lourde fonctionnel ; le réarrangement de la chaîne légère commence ; débutant sur le locus κ puis si besoin sur le locus λ par la recombinaison des segments des gènes V et J.

c) Un dernier contrôle est réalisé sur les deux chaînes fonctionnelles obtenues (L et H) afin de déterminer la spécificité de l'anticorps exprimé sur la surface de la cellule (18).

6.3. Migration des lymphocytes B en périphérie :

Le lymphocyte B mature qui exprime à sa surface des immunoglobulines membranaires (IgM et IgD) de même spécificité antigénique, quitte la moelle osseuse pour être exporté en périphérie via la circulation sanguine, la lymphe « lymphocytes B naïf ». Ce dernier est amené aux organes lymphoïdes secondaires, en particulier la rate et les ganglions lymphatiques (*ABUL K, et al 2009*) ; (13); (18).

6.4. Activation et différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (Fig. 5) :

En périphérie, les lymphocytes B (LB) matures attendent leur antigène (Ag) dont la rencontre LB-Ag déclenche un signal d'activation;

Les LB activés subissent le phénomène de la commutation de classe qui permet l'expression d'isotypes autre que l'IgM et IgD et qui aura lieu à la suite d'une coopération cellulaire entre LB et lymphocytes T CD4 auxiliaires, cette collaboration T-B résulte d'une reconnaissance du CD40 du LB et du CD40 L du lymphocyte T en présence d'interleukines et grâce à l'action d'une cytidine déaminase.

La différenciation conduit à des plasmocytes sécrétant des IgG, IgA, IgE, et à des lymphocytes B mémoires (13); (18).

6.5. Maturation de la réponse immunitaire humorale en anticorps (Fig. 7) :

A la suite d'une stimulation antigénique, l'organisme fabrique des anticorps spécifiques de l'antigène. Ces anticorps apparaissent progressivement dans le sérum où ils sont décelables huit jours après le premier contact.

Ceci est une réponse immune primaire ou réponse de primo-immunisation caractérisée par l'apparition des IgM en premier lieu, puis des IgG après 3 ou 4 jours plus tard. Un deuxième contact avec le même antigène et grâce à la présence des cellules mémoires, permet de déclencher une réponse immune secondaire caractérisé par :

- Une ascension beaucoup plus rapide du taux d'anticorps ;
- Un taux maximum d'anticorps plus élevé que lors de la réponse primaire ;
- Une affinité plus grande ;
- Une production d'anticorps essentiellement de type IgG (13) ;(18)

7. Rôles des anticorps :

Au cours de la réponse immunitaire, les Acs ont trois fonctions principales : Se lier à l'antigène, activer le système du complément; et recruter des cellules immunocompétentes.

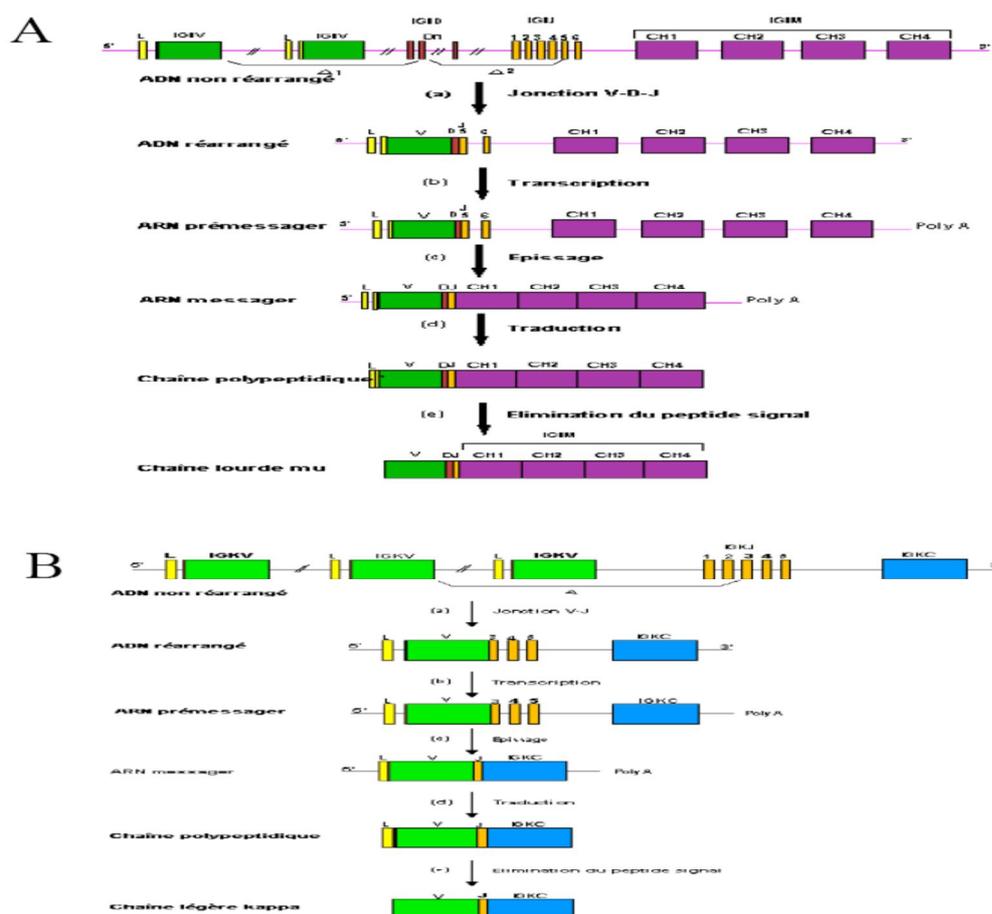


Figure 4 : Réarrangement des synthèses des immunoglobulines(13)

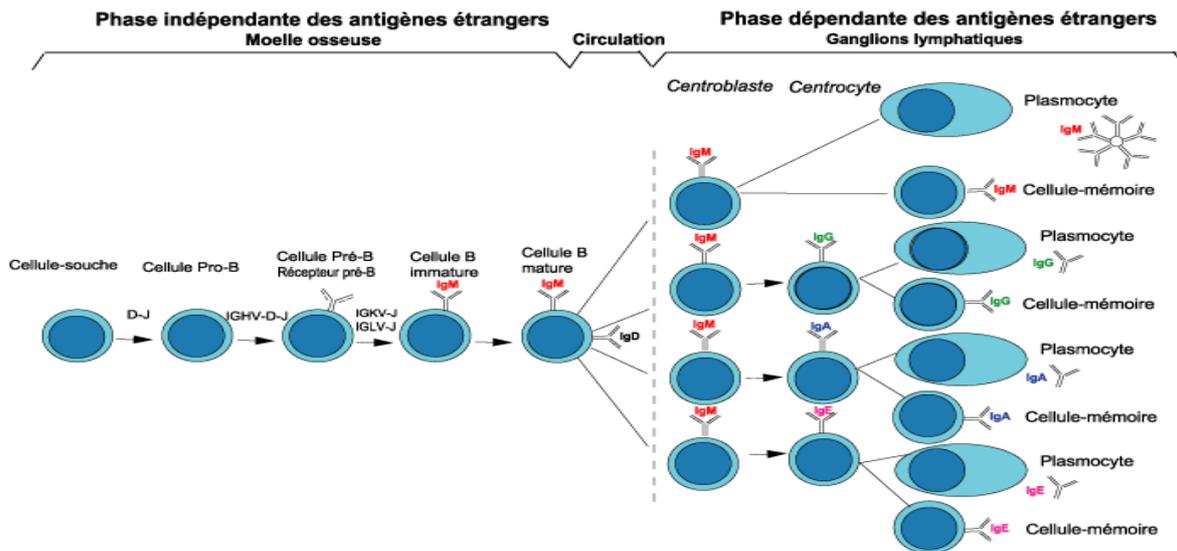


Figure 5: Synthèse des immunoglobulines (15).

7.1. Liaison à l'antigène :

Les anticorps ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines extrêmement variables aux extrémités des anticorps. La reconnaissance entre antigène et anticorps est par exemple mise à profit dans la lutte contre les toxines bactériennes. Ces toxines agissent en se fixant sur des récepteurs présents à la surface des cellules de l'organisme, ce qui provoque des dérèglements importants de l'activité cellulaire. En se fixant sur ces toxines, les anticorps antitoxines les neutralisent et préviennent les liaisons avec les récepteurs cellulaires (*PARHAM P., 2003*); (1).

De la même manière, de nombreux virus et bactéries n'exercent leur pathogénicité qu'après fixation aux cellules de l'organisme. Les bactéries utilisent des adhésines qui sont des molécules d'adhésion aux membranes cellulaires et les virus possèdent des protéines de fixation sur leur enveloppe externe. Les anticorps anti-adhésines et antiprotéines de la capsid virale bloquent l'action de ces agents pathogènes en se liant sur les molécules de fixation (*JANEWAY C.A.et al., 2003*); (10).

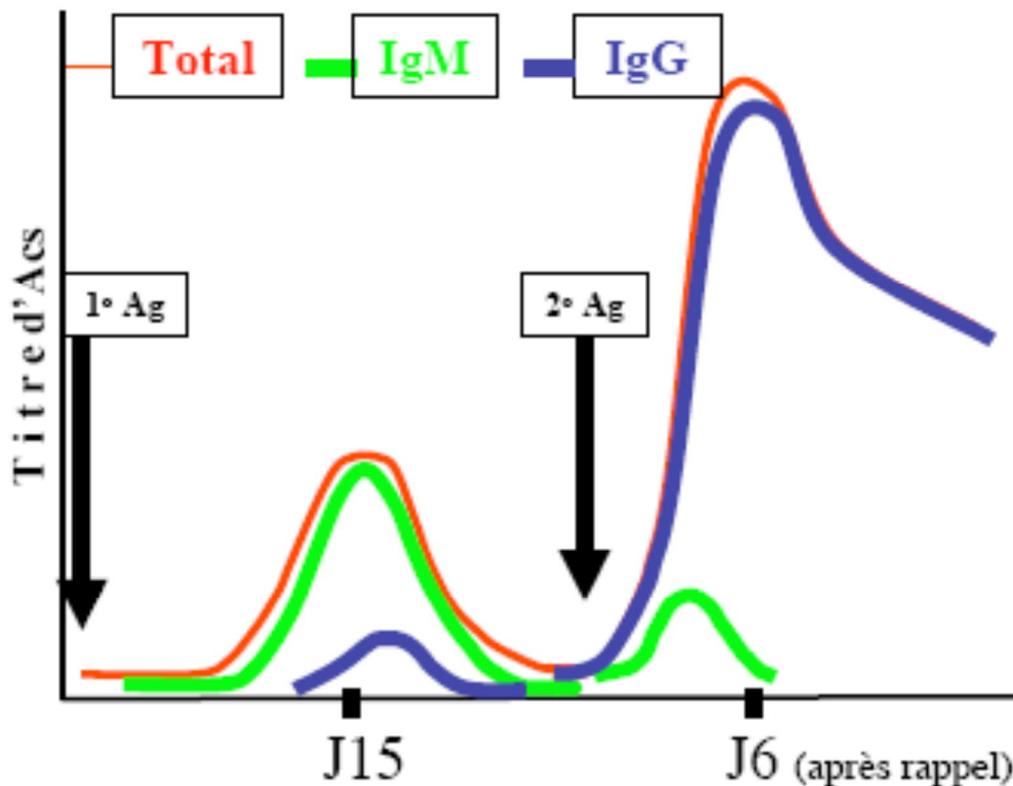


Figure 6: Maturation de la réponse immunitaire humorale en anticorps (1).

7.2. Activation du complément (Fig. 7) :

La capacité de l'anticorps à se protéger contre l'infection est dans plusieurs cas largement augmentée par le système du complément ou dépend de lui. Lorsqu'un anticorps de classe IgM s'attache à un antigène, la voie classique du complément est activée et conduit à une lyse médiée par le complément du microbe (ou autre cellule) sur lequel est localisée l'antigène. En outre, l'activation du complément peut également conduire à l'attraction des cellules immunitaires (chimiotactisme), et à l'opsonisation et la phagocytose de la cellule sur laquelle le complément sera activé (*JANEWAY C.A. et al., 2003*) ; (14).

La voie classique de la cytotoxicité médiée par le complément commence avec l'attachement de l'anticorps (IgG ou IgM) aux antigènes sur la surface de la cellule cible. Cette voie peut également être activée par un complexe Ag-Ac, et bien sûr ce complexe ne doit pas être lysé.



La formation d'un site sur lequel le premier composant du complément (C1) peut se lier nécessite une liaison unique de l'IgM, ou deux liaisons d'IgG très proche l'une de l'autre. Le composant C1q du complexe C1 (C1q, C1r, C1s) se lie ensuite aux régions Fc des anticorps liés à la cellule. Cela conduit à l'activation de C1 qui catalyse le clivage de C4 et C2, dont les pièces (C4b et C2b) se lient à la surface de la cellule et forment une nouvelle enzyme liée à la cellule, la C3 convertase (C4b+C2b). La C3 convertase clive ensuite en C3a et C3b. C3b se lie à la surface de la cellule, et forme un complexe C4b, 2b, 3b qui régule ensuite la réaction et la liaison des composants suivant du complément C5, C6, C7, C8 et C9 à la surface de la cellule (*LYDYARD P.M., et al., 2002*).

La séquence d'activation des composants C5 à C9 (le complexe d'attaque membranaire) est la même que celle de la voie alterne, et conduit à une atteinte structurelle et fonctionnelle de la membrane comme conséquence de la formation des pores créés par l'insertion des complexes C9 dans la membrane (*LYDYARD P.M. et al. 2002*).

La voie alterne est activée directement au contact avec certaines surfaces et en l'absence d'Ac comme les surfaces bactériennes ou les cellules infectées par des virus, des levures ou parasites (*JANEWAY C.A. et al ; 2003*); (*GOROCHOV G. et al, 2000*); (6).

La voie alterne utilise la C3b, le facteur B. en présence de Mg^{2+} , C3b et B forment un complexe de C3bBb, l'enzyme D clive le facteur B au sein de ce complexe (C3bBb) en Ba soluble et Bb ce qui conduit à la formation de la C3 convertase de la voie alterne : C3bBb qui aura pour rôle de cliver C3 formant de nouvelles molécules de C3B capables à leur tour de former, après réaction avec B et D, de nouvelles convertases alternes jusqu'à obtenir (C3b)_nBb (l'équivalent de C5) convertase. C5 convertase va activer C6-C9 comme dans la voie classique (*PARHAM P., 2003*) ; (*JANEWAY C.A. et al., 2003*).

La voie classique possède les mêmes activités que la voie alterne, y compris : (a) induction par C3a et C5a de la dégranulation des mastocytes et la libération des médiateurs ; (b) stimulation par C3a et C5a de la contraction du muscle lisse et une perméabilité vasculaire augmentée ; (c) migration guidée (chimiotactisme) des neutrophiles par C5a ; (d) augmentation de la phagocytose, opsonisation par C3b (*LYDYARD P.M. et al., 2002*).

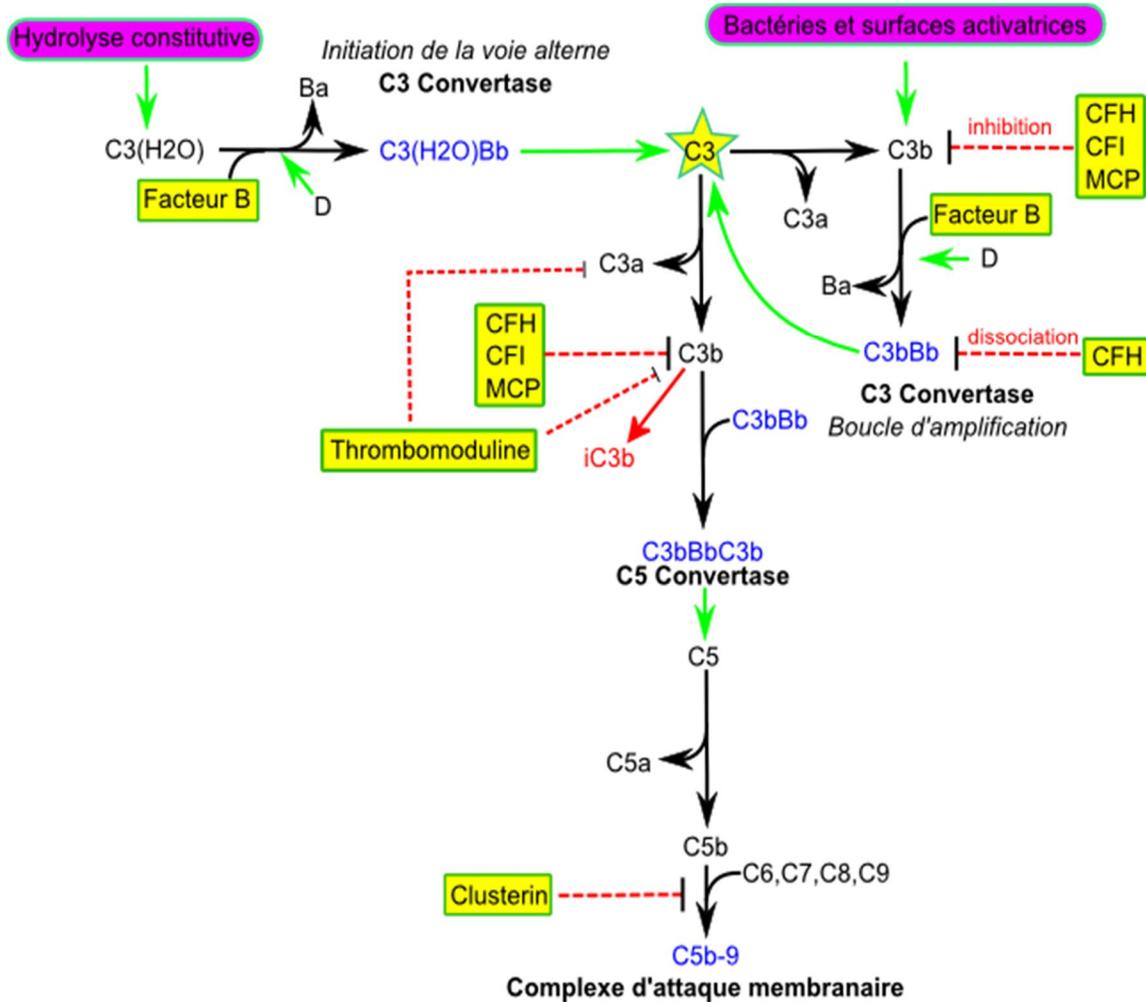


Figure 7 : activation du complément (14).

7.3. Activation des cellules immunocompétentes (Fig. 8) :

Plusieurs cellules effectrices possèdent des récepteurs pour la région Fc des anticorps. Les phagocytes (polynucléaires, macrophages et éosinophiles) utilisent leurs récepteurs Fc (FcR) pour l'IgG (FcγR) ou l'IgA (FcαR) pour activer la phagocytose des microbes opsonisés par les anticorps. Ces FcR peuvent méditer la suppression des cellules à travers la cytotoxicité dépendante d'anticorps. Les polynucléaires, les monocytes, les macrophages, les éosinophiles et les cellules NK peuvent tuer directement les cellules cibles enveloppées par l'anticorps. Cela signifie que dans la cytotoxicité dépendante d'anticorps, la lyse de la cellule cible ne requiert pas l'internalisation (malgré qu'elle puisse survenir) et se fait par la libération des molécules toxiques (ex : TNFα) à la surface de la cible (16).

L'activation de la phagocytose peut également être médiée par les récepteurs phagocytaires pour le composant du complément C3b, généré par l'activation médiée par l'anticorps de la séquence du complément (voie classique) ou activation par certains microbes de la voie alterne du complément. Les mastocytes et les basophiles possèdent des FcR pour l'IgE (FcR), qui se lie aux antigènes ou à la réponse inflammatoire aiguë. L'hyperstimulation des mastocytes ou des basophiles par ce mécanisme conduit à une pathologie (*LYDYARD P.M. et al., 2002*) (1).

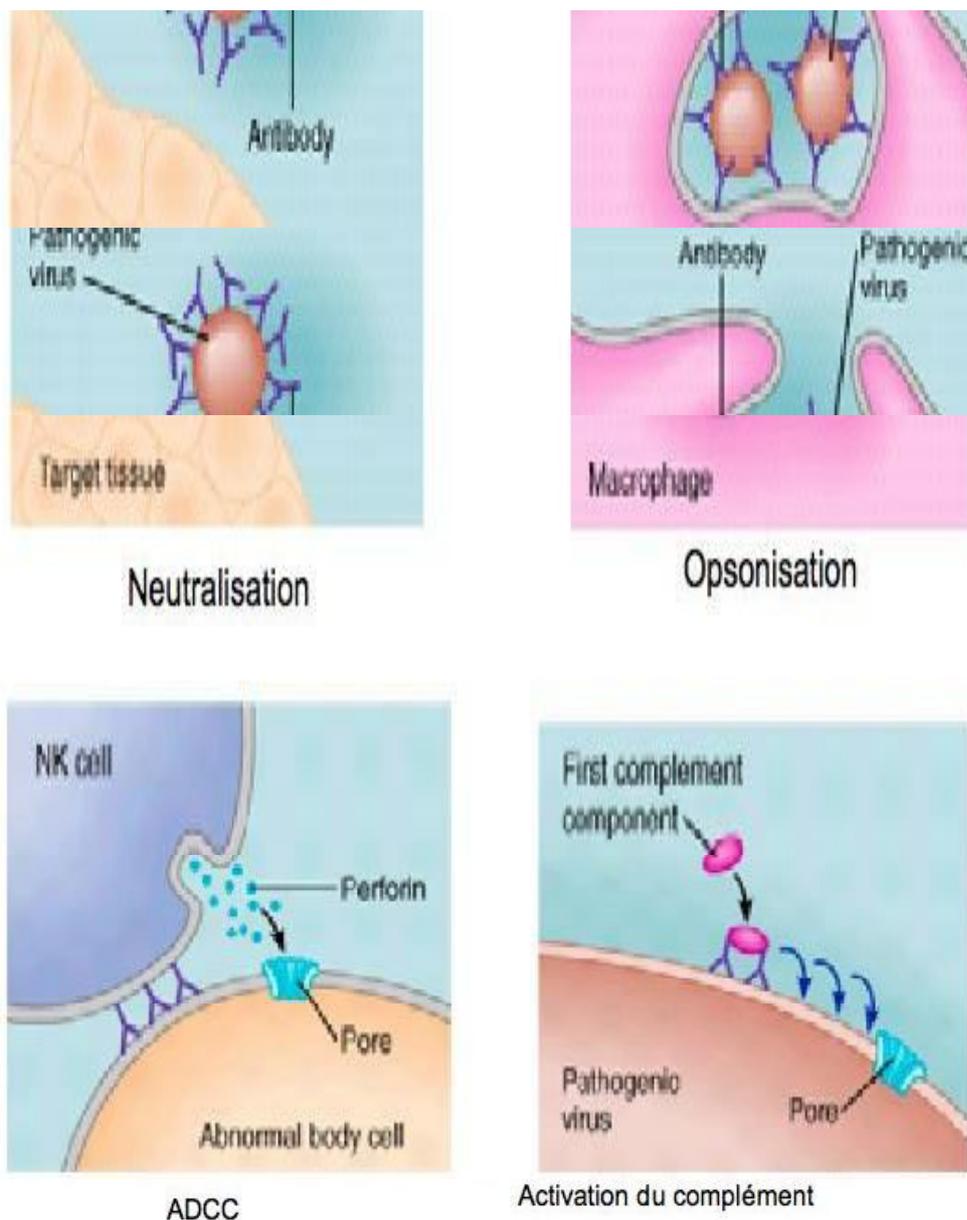


Figure 8 : Mécanismes de l'activation des cellules immunocompétentes (1).

Tableau A: propriétés des Igs humaines (*LYDYARD P.M. et al. 2002*) ; [13], [14].

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Localisation	Sang	Muqueuse Sécrétions	Lym. B Sang	Basophiles Mastocytes	Lym. B
Sous-classes	IgG1 à IgG4	IgA1 et IgA2	1	1	1
PM (Kda)	150	170 – 420	900	180	190
PM de la chaîne H (Kda)	50 – 55	62	65	70	75
Nombre de sous unités	1	1 ou 2	5	1	1
% sucres	3	8	12	13	12
% total des Igs	75	15 à 20	10	< 1	< 0.01
Sérum adulte normal (mg/ml)	8-16	1,4 - 4	0,4 – 2	0,03	Rien
Demi-vie en jour	23	6	5	3	< 3
Capacité de fixation du complément	+	-	+++	-	-
Hypersensibilité anaphylactique	-	-	-	-	++++
Transport du placenta au fœtus	+	-	-	-	-
Rôles	Neutralisation des toxines, bactéries et virus	Agglutination, neutralisation des bactéries, virus	Agglutination, voie classique du complément	Allergie, neutralisation de parasites	Activation du Lym. B

Tableau B: Gels couramment utilisés en chromatographie d'exclusion moléculaire et leurs domaines de fractionnement (*MAROUF, 2001-2002*).

Gel (nom commercial)	Domaine de fractionnement (MM)
Dextrans :	
Sephadex G -10	> 700
Sephadex G -15	> 1500
Sephadex G -25	1000-5000
Sephadex G -50	1500-30000
Sephadex G -75	3000-70000
Sephadex G -100	4000-150000
Sephadex G -200	5000-800000
Polyacrylamide :	
Biogel P-2	100-1800
Biogel P-10	1500-20000
Biogel P-100	5000-100000
Biogel P-150	15000-150000
Biogel P-300	60000-400000
Agarose :	
Sepharose CL-6B	$10^4-4.10^6$
Sepharose CL-4B	$6.10^4-2.10^7$
Sepharose CL-2B	$7.10^4-4.10^7$
Biogel A-0,5M	$10^4-5.10^5$
Biogel A-5M	$10^4-5.10^6$
Biogel A-50M	$10^5-5.10^7$

❖ **Préparation du tampon de PBS :**

Pour une colonne de gel 60 cm, il faut après 6 g de Sephadex. Cette quantité est mise à gonfler dans du tampon de PBS, pH= 7.2, à raison de 1 g de gel par 10 ml de tampon.

Avant la préparation du gel, on commence par la préparation du tampon de PBS à pH égale 7,2. Pour cette préparation, nous avons besoin des éléments suivant:

- NaCl.....7,90 g
- Na₂HPO₄.....1,20 g
- KCl.....0,2 g
- KH₂PO₄.....0,2 g
- N₃Na.....0,1 g

On dissout tous ces éléments dans un bécher contenant 800 ml d'eau distillée, ensuite on complète ce volume avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre 1000 ml. Après cela on ajuste le pH à 7,2 avec un pH-mètre et la solution peut être conservée à +4 °C.

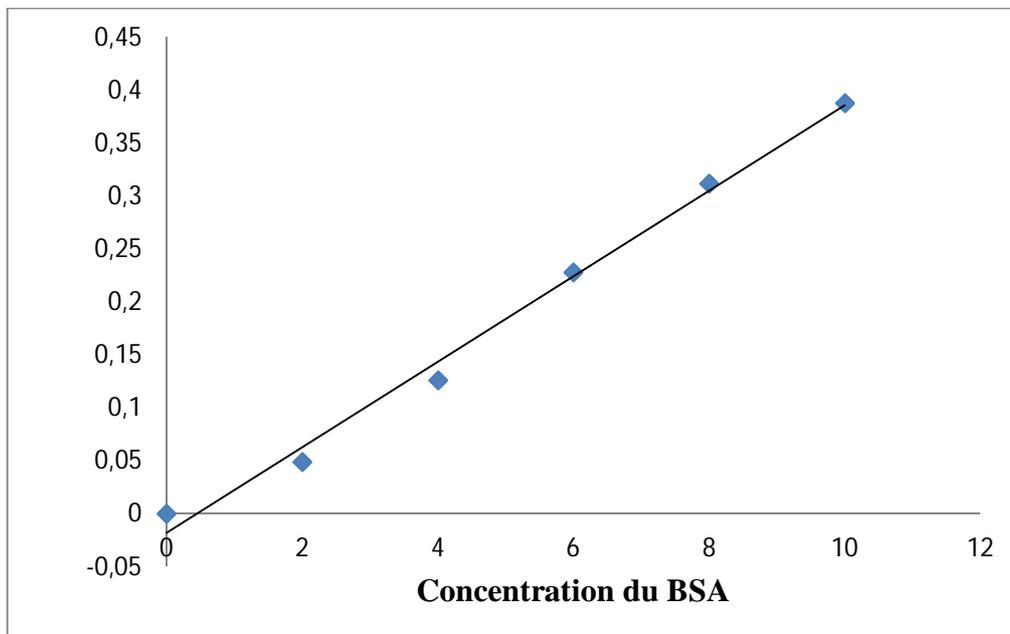


Figure 24: Courbe d'étalonnage obtenue par le dosage du BSA par le bleu de Biuret.

❖ **Solutions utilisées pour le dosage des protéines:**

- Eau distillée;
- Solution physiologique (NaCl 9 ‰);
- Solution mère d'une protéine étalon de BSA, à la concentration de 10 mg /ml.
- Solution de Biuret (voir composition dans l'annexe) :
 - 0,75 mole/l de NaOH.
 - 0,02 mole/l de Tartrate de sodium- potassium
 - 0,06 mol/l d'Iodure de potassium KI
 - 0,06 mole/l de Sulfate de cuivre $\text{Cu}(\text{SO}_3)_2$.

Tableau C : Correspondance entre le sulfate d'ammonium et le pourcentage de la Solution (*SINE J.P., 2003*).

Tableau de saturation du sulfate d'ammonium à 0°C

(à partir de solide)

Concentration initiale (% saturation at 0°C)	Concentration finale (% saturation at 0°C)																	
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
	Grammes de sulfate d'ammonium à ajouter par 100 mL																	
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7	
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1	
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	63.6	
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0	
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5	
25		0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9	
30			0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5	
35				0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9	
40					0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4	
45						0	2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8	
50							0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3	
55								0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20.0	23.8	27.7	31.7	
60									0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3	
65										0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7	
70											0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2	
75												0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6	
80													0	3.3	6.8	10.4	14.1	
85														0	3.4	6.9	10.6	
90															0	3.4	7.1	
95																0	3.5	
100																	0	

Adapté de Dawson et al. (1986)



1. Définitions

L'immunisation est définie comme le processus par lequel un être humain est protégé contre les maladies causées par les microorganismes communément appelés pathogènes. Elle se fait soit par injection d'antigènes (immunisation active), soit par injection de sérum contenant des anticorps spécifiques (immunisation passive) **(19)**.

L'immunité est la capacité que possède un organisme de se défendre, en particulier quand il subit une agression par un agent infectieux **(20)**.

Un antigène est une substance capable, lorsqu'elle est introduite dans un organisme, de provoquer une réponse du système immunitaire. Cette réponse immunitaire peut s'exprimer par la production d'anticorps spécifiques, par la production de cellules spécifiques ou par l'absence de réponse immunitaire (tolérance). Dans les maladies infectieuses, l'antigène peut être un agent infectieux complet, une des parties ou un de ses produits **(PARHAM P., 2003)**.

2. Types d'immunités

Il existe deux types d'immunité : l'immunité naturelle et l'immunité acquise **(21), (22)**.

2.1. L'immunité naturelle

L'immunité naturelle est innée et réunit un ensemble de mécanismes biochimiques et physico-chimiques empêchant la pénétration ou la prolifération d'agents infectieux dans l'organisme. C'est l'immunité d'espèce ou de race **(22)**.

2.2. L'immunité acquise

L'immunité acquise correspond à la production ou à la transmission d'un état de résistance à un antigène par l'action directe d'anticorps ou de cellules spécifiques à cet antigène. Il existe deux méthodes d'assurer l'immunité : l'immunisation active ou passive. Celles-ci peuvent être acquises naturellement ou induites artificiellement. L'immunité active s'acquiert par l'exposition à un stimulus immunogène, c.à.d. capable d'induire une réponse immunitaire. L'immunisation active la plus efficace est celle qui suit une infection naturelle, clinique ou latente. Dans de nombreuses maladies, elle assure une protection pour toute la vie **(CHAPEL H. et al., 2004); (22)**.



2.2.1. Immunité acquise active

L'immunité acquise active est l'immunité obtenue après l'administration d'un vaccin contenant des produits microbiens avec ou sans adjuvants afin d'obtenir une protection immunologique long terme contre les microbes (*CHAPEL H. et al., 2004*) ; (23).

2.2.2. L'immunité acquise passive

L'immunisation passive est l'administration d'anticorps préformés par la voie intraveineuse ou intramusculaire; elle est employée pour apporter une protection rapide dans certaines infections telles que la diphtérie ou le tétanos ou après exposition accidentelle à certaines pathogènes tels que l'hépatite B. Elle est généralement employée pour fournir une protection chez les individus dont l'immunité est compromise (26), (27).

3. Immunisation des animaux

3.1. Choix de l'animal

Le choix de l'espèce et de la souche animale doit être effectué avec soin. Le chercheur doit tenir compte des facteurs suivants: la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum ; la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; la facilité et le coût de l'entretien de l'animal et l'utilisation prévue des anticorps par exemple dans un ELISA, l'anticorps qui se lie à l'antigène doit souvent provenir d'une espèce différente de celle ayant produit l'anticorps secondaire employé à l'étape suivante du test (24), (29), (30).

Dans tous les cas, il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et en bonne santé. Généralement, les jeunes animaux adultes sont de meilleurs producteurs d'anticorps polyclonaux (AcP) que les animaux plus âgés parce que la fonction immunitaire atteint son apogée à la puberté et diminue lentement par la suite. De plus, les femelles présentent certains avantages sur les mâles puisqu'elles ont souvent une réponse immunitaire plus marquée. Elles sont généralement plus dociles et faciles à manipuler et il est plus aisé de les loger par deux ou en groupe (28), (25), (30).



3.2. Choix de l'adjuvant

Les vaccins tués, spécialement ceux constitués de petites molécules ne sont pas des antigènes puissants, mais peuvent être rendus puissants en les injectant mélangés à d'autres substances telles que l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium, le phosphate de calcium, l'albumine d'œuf, l'alun, les émulsions d'huile minérale, les complexes polynucléotidiques, la vitamine C, les lipopolysaccharides bactériens (LPS) de *E. coli*, de *Bordetella pertussis*. Ces substances sont appelés adjuvants (**BENZAIR A., 2009**).

L'adjuvant est donc une substance qui fait agir de façon non spécifique pour augmenter la réponse immune envers un antigène spécifique. Si un antigène est injecté en association avec un adjuvant, son immunogénicité s'accroît (**LYDYARD P.M. et al., 2002**).

L'adjuvant le plus employé est celui de Freund. Il existe deux formes de cet adjuvant : l'adjuvant incomplet et l'adjuvant complet. Le premier est constitué d'un mélange d'huile minérale, d'un agent émulsifiant et d'une solution d'antigène en milieu aqueux. Le second, l'adjuvant de Freund complet (CFA), est constitué du premier auquel sont ajoutées des mycobactéries tuées (*Mycobacterium tuberculosis* et/ou *Mycobacterium butyricum*) (**BENZAIR A., 2009**).

Les propriétés des adjuvants doivent inclure : la capacité à permettre la libération lente des antigènes afin de prolonger le temps d'exposition de l'antigène avec le système immunitaire ; préserver l'intégrité de l'antigène ; cibler les CPA ; stimuler les lymphocytes cytotoxiques ; produire des réponses immunitaires sélectives. Les adjuvants sont actuellement produits et testés pour déterminer comment générer sélectivement les réponses Th1 et Th2 (**LYDYARD P.M. et al., 2002**).

3.3. Vaccination

Lors de la production d'anticorps, on tire parti de la réaction naturelle de défense du corps contre les molécules étrangères immunogènes de taille suffisante: les organismes étrangers ayant pénétré dans le corps, les toxines voire les cellules mortes du corps lui-même, sont neutralisés et/ou éliminés lors d'une interaction complexe et contrôlée entre cellules et médiateurs. Les étapes essentielles de cette interaction sont le transport de l'antigène, via la lymphe ou le sang, du lieu de pénétration aux cellules de défenses spécifiques, situées dans les ganglions lymphatiques et la rate, la présentation de l'antigène par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T auxiliaires et, enfin, l'activation des cellules de défense



spécifiques à l'antigène et leur transformation en plasmocytes produisant les anticorps (réponse humorale) et/ou en cellules T cytotoxiques (réponse à médiation cellulaire) et en cellules B à mémoire dans la rate et les ganglions lymphatiques (28) , (25).

Un nouveau contact avec le même antigène provoquera une réponse plus rapide et plus forte. Ne survivant que quelques jours, voire quelques semaines, les plasmocytes doivent être remplacés continuellement par réactivation des cellules douées de mémoire (28).

Les vaccins sont fabriqués soit à partir des virus entiers ou de leurs composants (vaccin viraux), soit à partir des bactéries entières, de leurs toxines secrétées ou de leurs polysaccharides (vaccins bactériens). Les différents types des vaccins sont :

3.3.1. Vaccin conventionnels.

a) anatoxines: si la réponse immunitaire cible certains produits du pathogène, tels que les toxines de *Corynebacterium diphthéria* ou de *Clostridium tetani*, on se sert de la partie de la toxine responsable de l'immunité neutralisante pour produire le vaccin (32).

b) les fractions antigéniques contiennent des composants purifiées du pathogène, en général des parties de son enveloppe (ESPINOSA E. et al., 2006).

c) les vaccins tués (atténués) représentent des bactéries tuées et sont efficaces pour immuniser contre les pathogènes extracellulaires. Ils induisent une réponse humorale satisfaisante, par exemple contre le choléra. La protection humorale est de durée limitée, nécessitant des rappels répétés (ESPINOSA E. et al., 2006) ; (31).

d) les vaccins vivants présentent un risque très élevé d'effets secondaires et d'infections par le pathogène. Néanmoins, leur efficacité vaccinale est supérieure, surtout quand l'induction d'une réponse cellulaire est nécessaire. Le BCG est un exemple typique (32).

3.3.2 Vaccins récents

Certains pathogènes disposent de nombreuses stratégies pour échapper à la défense immunitaire de l'hôte, ce qui a rendu le développement des vaccins efficaces jusqu'à présent impossible. Les infections mycobactériennes (tuberculoses, lèpre) et les maladies parasitaires (paludisme, leishmaniose) en sont des exemples. On recherche donc actuellement de nouvelles approches afin de faire fructifier les techniques de génie génétique et de développer des vaccins plus performants et plus sûrs (AMBROISE M., 1995); (32).



a) peptides synthétiques : un peptide correspond au seul épitope actif d'un antigène protecteur. D'autres parties d'une protéine avec des effets potentiels défavorables (suppression de la réponse, effets toxiques, réaction croisée avec les protéines de l'hôte) sont donc absentes. L'efficacité des peptides qui induisent principalement une réponse humorale varie fortement en fonction également du typage HLA. Par conséquent, leur protection est limitée à une partie de la population (*ESPINOSA E. et al., 2006*).

b) protéines recombinantes: les protéines recombinantes peuvent être produites en grande quantité. A la différence des vaccins conventionnels, ces protéines sont dépourvues des composantes du pathogène représentant un risque d'effets secondaires. De plus, de tels vaccins peuvent être fabriqués même si le pathogène ne peut pas ou très difficilement être propagé in vitro. La production dépend d'un système d'expression approprié (par exemple *E. coli*) et de la disponibilité d'un protocole de purification du vaccin (*ESPINOSA E. et al., 2006*).

c) souches de vaccination recombinantes: lorsqu'une protéine recombinante seule est incapable d'induire une réponse immunitaire (surtout des cellules T), le correspondant peut être cloné dans un organisme porteur approprié (par exemple le virus de la vaccine ou le BCG). L'immunité conjointe contre les antigènes du porteur et de la protéine recombinante peut alors induire une immunité protectrice (*ESPINOSA E. et al., 2006*) ; (33).

d) Mutant par délétion: la délétion des gènes, ayant un rôle essentiel dans la virulence ou la survie du pathogène dans l'hôte, permet de rendre le pathogène incapable d'induire une maladie. La période de survie du pathogène dans l'hôte doit néanmoins être suffisante pour induire une réponse immunitaire efficace (*GOROCHOV G. et al., 2000*); (34).

e) les ADN purifiés: les ADN utilisés comme vaccin correspondent à un gène codant un antigène du pathogène. Après son intégration dans le génome de l'hôte, l'ADN vaccinal est transcrit et l'antigène codé (s'il est précédé par un peptide signal) est synthétisé, exporté, et peut induire une réponse B. Une partie de l'antigène produit est dégradée au sein de la cellule et présentée aux cellules T par les molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire. Dans le modèle animal, l'utilisation d'ADN purifié comme vaccin a produit des résultats prometteurs. Néanmoins, plusieurs possibilités d'une transformation de l'ADN en une forme virulente, la persistance de l'ADN et sa possible implication sont des questions fondamentales (35).



3.4. Choix de la dose et des critères de l'immunisation

Le caractère fondamental de l'antigène correspond à la capacité de ce dernier de provoquer chez l'animal une défense immunitaire avec induction d'une synthèse d'immunoglobulines spécifiques. Ce processus chez l'animal dépend de plusieurs facteurs notamment (*BENZAIR A., 2009*).

3.4.1. La xénogénie

Une substance est dite xénogène ou hétérologue lorsqu'elle est issue d'un organisme étranger, d'espèce éloignée. Un antigène n'est immunogène que lorsqu'il est reconnu comme étant étranger par l'animal chez qui il est introduit. C'est là une condition essentielle de l'immunogénicité. L'animal ne peut s'immuniser contre ses propres constituants. Il est capable de distinguer les substances du « soi » et du « non soi ». Néanmoins, dans certaines pathologies, si la capacité d'identification est dérégulée, cela aboutit à l'auto-immunité (*BENZAIR A., 2009*).

3.4.2. La dose

L'induction de la réponse immunitaire chez l'animal n'est pas effective que si la quantité d'antigène introduite dans l'organisme est suffisante. Si la quantité d'antigène injectée est trop importante ou trop faible, il s'établit chez l'animal un état de tolérance où il n'y a pas de réponse immunitaire. L'animal est alors dans un état réfractaire à une immunisation ultérieure réalisé même avec des doses normalement immunologiques. Par ailleurs, une substance est immunogénique lorsque sa masse moléculaire est supérieure à 10 KDa ; lorsque la substance est de masse moléculaire inférieure à 10 KDa, elle ne peut induire une réponse immunitaire que si elle est couplée à une molécule porteuse ; elle joue le rôle alors d'haptène (*BENZAIR A., 2009*), (36).

3.4.3. La voie d'administration

La voie d'injection dépend de trois facteurs : le volume à administrer à l'animal, les tampons ou les autres substances injectés avec l'immunogène et la rapidité avec laquelle l'immunogène doit être libéré dans les vaisseaux lymphatiques ou dans la circulation(36).



Les différentes sortes d'injection sont :

a) Injections sous-cutanées (SC) : Très souvent, les injections sous cutanées sont faites pour immuniser des animaux de laboratoire, en particulier les lapins. On peut injecter par cette voie des antigènes particuliers et/ou mélangés à des adjuvants. Les solutions injectées sont rapidement drainées par le système lymphatique local et se concentrent dans les ganglions lymphatiques les plus proches. De grands volumes de solution contenant de l'adjuvant de Freund ne doivent pas être injectés dans un seul site, car ils pourraient produire des granulomes graves (*GOROCHOV G. et al., 2000*) ; (36).

b) Injection intramusculaire(IM) : L'injection intramusculaire permet une libération lente de l'antigène. L'inoculum est déposé directement dans le tissu musculaire et l'antigène n'est reconnu par le système immunitaire que lorsqu'il est drainé dans les espaces interstitiels avoisinants. L'inoculum est ensuite drainé vers les ganglions lymphatiques satellites. Les injections intramusculaires sont difficiles chez les petits rongeurs. La voie intramusculaire permet d'injecter des adjuvants ou des antigènes particuliers (37).

c) Injections intradermiques (ID) : Les injections intradermiques sont souvent utilisées pour immuniser des gros animaux. Comme les injections intramusculaires, elles permettent une libération très lente de l'immunogène. L'inoculum, injecté entre les couches de la peau, diffuse lentement dans l'organisme. La voie intradermique permet d'injecter des inoculums particuliers ou contenant des adjuvants. On ne peut injecter que de petits volumes par cette voie ; l'antigène doit donc impérativement être concentré (*ED H. et al., 1991*).

d) Injections intraveineuses (IV) : Pour la plupart des animaux de laboratoire, la voie intraveineuse est pratique pour les injections secondaires et les rappels. Elle est rarement employée pour l'injection primaire. L'antigène, délivré directement dans la circulation sanguine, est rapidement capté par le système réticulo-endothélial, essentiellement dans le foie, les poumons et la rate. Tout produit toxique, comme les endotoxines bactériennes par exemple, est particulièrement dangereux par voie intraveineuse (38).

e) Injections intrapéritonéales (IP) : L'injection directe dans la cavité péritonéale est très simple et particulièrement utile chez les petits rongeurs. Les antigènes injectés dans le péritoine sont drainés dans les lymphatiques thoraciques puis dans la veine cave. Les antigènes particuliers ou les antigènes en adjuvants peuvent être administrés par cette voie en toute sécurité. Des injections intrapéritonéales répétées en ACF induisent des granulomes et



des adhérences fibreuses dans la cavité péritonéales qui peuvent aboutir à une rupture de la rate rendant difficile la production d'hybridomes. Elles peuvent aussi provoquer des ascites, voire des plasmocytomes chez certains animaux. La production d'ascite peut être extrêmement utile pour obtenir de grandes quantités d'anticorps polyclonaux chez la souris. Elle peut être augmentée en injectant au moment adéquat des cellules de plasmocytomes (39).

f) Injection dans les organes lymphoïdes : L'injection directe dans un organe lymphoïde présente des avantages théoriques évidents : la dose totale de l'immunogène est concentrée dans une région spécialisée dans la réponse immunitaire. Le problème majeur de cette voie d'injection est la difficulté de l'injection, nécessitant souvent une intervention chirurgicale (*ED H. et al., 1991*).

g) Injection dans les ganglions poplités de lapin : La patte arrière d'un lapin ou d'un autre rongeur présente certains avantages pour l'injection d'un immunogène. Les injections faites dans la partie postérieure du pied sont drainées dans les ganglions poplités de la face postérieure du genou ou dans les ganglions poplités de la face postérieure du genou ou dans les ganglions inguinaux. Les injections sont faites avec un adjuvant synthétique ou en PBS (*AMBROISE M., 1995*) ; (*ED H. et al., 1991*).

h) Injection dans les coussinets plantaires chez le lapin ou les rongeurs : Les injections dans les coussinets plantaires sont utilisées dans certains pays, mais bannies dans d'autres, car considérées comme trop traumatiques. Sauf indication très particulière, il est préférable de choisir d'autres voies. Les injections ne doivent jamais être réalisées dans les parties du coussinet plantaire qui supportent le plus de poids. De même, les injections de rappel dans le coussinet plantaire ne doivent jamais contenir d'ACF. Toujours anesthésier avant d'injecter dans les coussinets plantaires (*ED H. et al., 1991*).

3.4.4. Le facteur temps

Le temps et l'intervalle séparant les injections jouent un rôle important dans l'induction et l'expression de la mémoire immunitaire. En général, la réponse augmente quantitativement avec le nombre des injections : la concentration immunoglobulinique est plus importante chez l'animal après une seconde injection d'un même antigène qu'après une unique injection. C'est la raison pour laquelle il y a nécessité d'effectuer des rappels d'injections pour obtenir, lors d'une vaccination, une immunisation efficace contre un antigène donné (*BENZAIR A., 2009*).



3.4.5. L'association antigénique

Le résultat d'une immunisation à l'égard d'un antigène, défini en association avec un second antigène, peut aussi varier suivant la forme de cette association. Si les deux antigènes sont injectés simultanément, on peut assister à une augmentation de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'un ou des deux antigènes (réaction synergique). Par contre, si les deux antigènes pénètrent dans l'organisme séparément dans le temps (trois à six jours d'intervalle), on peut observer une diminution, sinon une disparition de la réponse immunitaire vis-à-vis du deuxième antigène injecté. Toutefois, si un antigène est injecté en association avec un adjuvant, son immunogénicité s'accroît (*BENZAIR A., 2009*) ; (40).

4. Production d'immunsérum

4.1. Production d'anticorps polyclonaux

Un immunsérum renferme des anticorps polyclonaux qui comporte des IgG de classes et de sous-classes différentes, plusieurs allotypes de chaînes lourdes et légères kappa, des chaînes légères kappa et lambda, différents paratopes liant les différents épitopes de la molécule d'antigène, des affinités différentes (*AMBROISE M., 1995*).

Le but de l'immunisation est l'obtention d'un immunsérum riche en anticorps spécifiques de l'antigène et de forte affinité. Les propriétés d'un immunsérum sont de plus variables dans le temps et se modifient avec la répétition des injections. La production d'anticorps spécifiques est la conséquence d'évènements complexes faisant intervenir de nombreux facteurs parmi lesquels :

- L'espèce animale, la lignée au sein d'une espèce,
- La nature et la dose de l'antigène, son poids moléculaire.
- Le protocole d'immunisation (23), (41).



4.2. Production d'anticorps monoclonaux :

4.2.1. Définition

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps qui ont une seule spécificité choisie et qui sont habituellement sécrétés de façon continue par des hybridomes rendus «immortels». L'hybridome est un hybride artificiel construit à partir d'une cellule lymphoïde productrice d'anticorps et d'une cellule myéломateuses (immortelle). La technique des hybridomes mise au point par Köhler et Milstein en 1975 est un outil de production de grandes quantités d'anticorps hautement spécifiques qui a eu des répercussions considérables sur les méthodes de diagnostic et de thérapie ainsi que sur l'ensemble de la recherche biomédicale. Ainsi, les antisérums monoclonaux sont caractérisés par :

- ❖ Une seule classe, voire une seule sous-classe d'immunoglobuline
- ❖ Un seul isotype de chaîne légère, soit kappa, soit lambda
- ❖ Un seul allotype de chaîne lourde et de chaîne légère, s'il existe un polymorphisme allénique.
- ❖ Une spécificité anticorps unique, se liant à un seul épitope
- ❖ D'affinité unique (*GAVRILOVIC M, 1996*) ; (23), (41).

4.2.2. Étapes de la production des anticorps monoclonaux (fig. 9)

La production des AcM passe par l'immunisation (in vivo) de cellules lymphoïdes sécrétant des anticorps, puis la sélection (in vitro) d'un hybridome producteur d'anticorps et en fin, par la multiplication de clones de l'hybridome (soit in vitro, soit in vivo).

a) La première étape se fait généralement à l'aide d'un ou de plusieurs rats ou souris (âgées de 6 à 8 semaines). L'antigène est généralement, mais pas toujours, injecté à l'animal conjointement avec un adjuvant dont la fonction est d'accroître la réponse immunitaire. En général, le délai minimal entre les doses de rappel d'immunogène doit être de 7 à 10 jours sauf dans le cas d'un protocole d'immunisation rapide sans adjuvant (**42**).

b) On doit effectuer les saignées d'essai 3 jours après le dernier rappel pour vérifier qu'il y a une réponse appropriée contre l'antigène et qu'il y a production des anticorps spécifiques. La plupart des tests immunologiques servant à déterminer s'il y a production des anticorps désirés nécessitent moins de 10µl de sérum murin. Après avoir confirmé l'existence de la réponse



recherchée, on doit administrer un autre rappel à la souris, puis l'euthanasier 3 jours plus tard et prélever sa rate; on isole alors les cellules lymphoïdes de cet organe et, dans certains cas, des ganglions lymphatiques (*GAVRILOVIC M, 1996*) ; (*ROIT I. et al., 2001*) ; (23).

c) Par l'ajout de polyéthylène glycol qui favorise la fusion des membranes, on fait fusionner les cellules lymphoïdes avec des cellules myélomateuses parentales cultivées in vitro. Seule une petite partie des cellules se fusionnent avec succès. Une autre méthode appelée électrofusion permet grâce à l'action physique d'un courant électrique de haute intensité pendant une période très courte de fusionner les cellules (*VOET D. et al., 2005*); (42).

d) Le mélange formé par les 2 types de cellules non fusionnées et les nouvelles cellules hybrides est placé sur un milieu de culture sélectif contenant du HAT, un mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine. L'aminoptérine contenue dans le HAT est une toxine puissante qui bloque l'une des voies métaboliques. La cellule peut contourner ce blocage si elle est en présence des métabolites intermédiaires que sont l'hypoxanthine et la thymidine. Les cellules de la rate croissent sur le HAT parce qu'elles peuvent utiliser cette voie métabolique de rechange, mais les cellules myélomateuses ont une déficience HGPRT⁻ qui les en empêche et elles finissent donc par mourir. Les cellules de la rate meurent naturellement au bout d'1 à 2 semaines de culture, mais les cellules fusionnées survivent parce qu'elles ont acquis à la fois l'immortalité des cellules myélomateuses et la voie métabolique de rechange des cellules de la rate. Certaines cellules fusionnées héritent également de la capacité de production d'anticorps des cellules de la rate (23).

e) Par des procédures de dosage immunologique, on trie les hybridomes qui sécrètent l'anticorps recherché. Si le résultat est positif, on clone les cultures en étalant les cellules pour en placer une seule dans chaque cupule. On obtient ainsi un clone issu d'une même cellule d'origine immortelle et productrice d'anticorps (*ROIT I. et al., 2002*) ; (41).

f) Les hybridomes ainsi sélectionnés sont souvent clonés 2 ou 3 fois in vitro pour assurer la production de cultures d'hybridomes véritablement monoclonaux dont les anticorps ont une spécificité unique (*KARP G., mars 2010*) ;(41).

g) On peut multiplier les hybridomes ainsi clonés soit en continuant de les cultiver in vitro, soit in vivo. Il est possible de produire des AcM par injection d'hybridomes dans la cavité abdominale de plusieurs espèces de rongeurs. La multiplication subséquente des hybridomes dans le liquide ascitique permet de produire facilement des AcM de façon économique. Une

autre méthode possible de production d'AcM, qui n'est cependant pas employée régulièrement, est l'extraction d'anticorps recombinants à partir du lait d'animaux génétiquement modifiés. En effet, l'expression des AcM semble être beaucoup plus importante dans le lait des souris et des chèvres transgéniques que dans les systèmes de culture cellulaire. Les méthodes les plus récentes de production d'AcM, par exemple les techniques d'expression des phages et l'expression sous forme de protéines recombinantes, ne nécessitent pas l'utilisation d'animaux (*JANEWAY C.A. et al., 2003*); (23), (41).

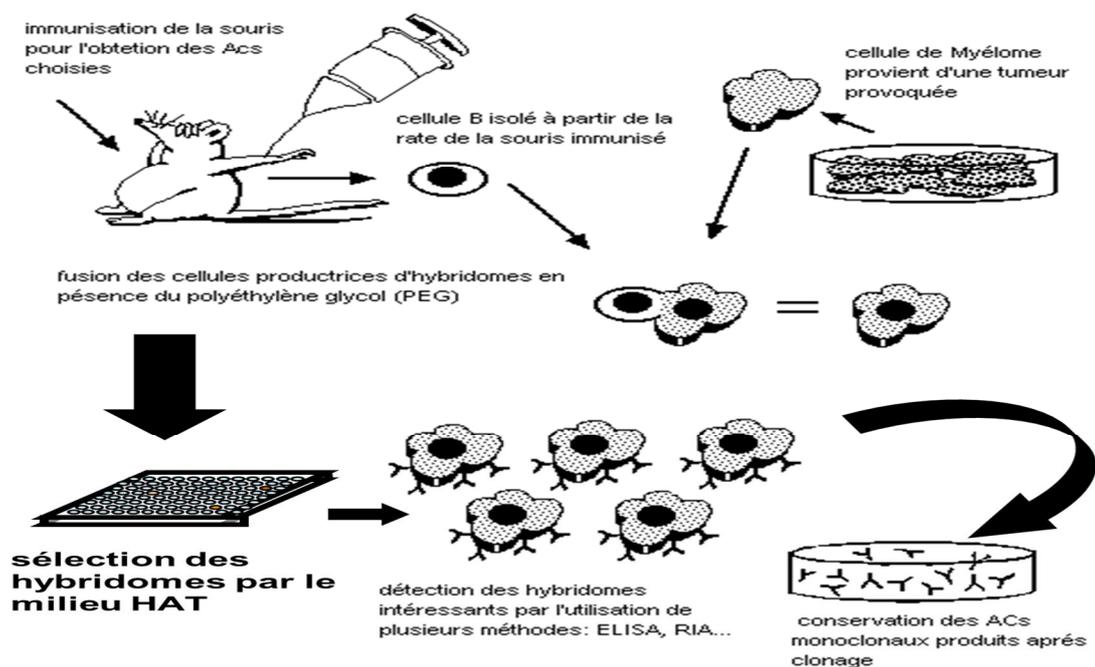


Figure 9 : production d'anticorps monoclonaux (43).

4.2.3. Domaine d'applications des anticorps monoclonaux :

Le premier avantage des anticorps monoclonaux est de permettre une thérapie ciblée car ils sont très spécifiques des agents pathogènes qu'ils visent et engendrent une activation du système immunitaire via des processus de recrutement du complément notamment. Leurs mécanismes d'action sont en outre bien connus. Ensuite, ils ont une faible toxicité par rapport à des chimiothérapies non-spécifiques, en oncologie par exemple et entraînent moins d'effets secondaires (*PARHAM P., 2003*).



Par rapport aux thérapies classiques, leur efficacité peut être supérieure avec l'observation d'une durée de vie augmentée et d'une meilleure qualité de vie dans de nombreuses pathologies cancéreuses, par exemple (*ROIT I. et al., 2001*) ; (41).

D'autre part, face à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et à l'émergence de nouveaux virus et microorganismes, ils représentent une option intéressante. Ils sont, parfois mêmes, la seule alternative en l'absence de thérapies contre certaines infections virales, comme le Virus Respiratoire Syncytial (RSV). En outre, aucune stratégie vaccinale n'est parfois envisageable. Cela concerne l'anthrax par exemple (43).

Et puis, les sujets fragiles comme les prématurés ou les personnes âgées risquent de développer de graves infections. Au début de leur utilisation, la composante animale des anticorps monoclonaux créait d'importants effets secondaires comme des réactions allergiques. Il a même été relevé des complications infectieuses mais celles-ci n'ont pas été démontrées dans le cas d'anticorps anti-infectieux (*PARHAM P., 2003*).

D'autre part, on peut souligner que leur pénétration tissulaire est limitée alors que l'atteinte de la matrice extracellulaire est nécessaire pour cibler les cellules d'intérêt. Et puis, leurs modes d'action variés ont pour conséquence de limiter leur action de base car la liaison à l'antigène n'est pas la seule interaction réalisée par un anticorps monoclonal. Il est noté que, contrairement à d'autres traitements, l'utilisation des anticorps monoclonaux est limitée aux seules pathologies dont les causes précises ont été identifiées car la moindre variation antigénique entraîne une impossibilité de ciblage du pathogène. Enfin, concernant l'aspect économique, on sait que leurs prix de vente, en lien avec les coûts de production, sont élevés par rapport aux médicaments antimicrobiens (*JANEWAY C.A. et al., 2003*).

Ainsi, les anticorps monoclonaux sont en compétition avec les vaccins, les petites molécules antivirales et les antibiotiques que ce soit en termes techniques ou économiques. Ils ont cependant une place réelle dans le traitement des maladies infectieuses car leur intérêt est indéniable (*PARHAM P., 2003*).

- Fondamentales : La production d'anticorps monoclonaux a permis des études fines de structure d'Ig pures. Définir l'aspect d'une fonction, déterminer une carte épitopique, ou encore de rechercher des épitopes non déterminés sur une protéine.



- Diagnostiques : en tant que sondes moléculaires : identification (type cellulaire, pathogènes, molécules), analyses quantitatives (ELISA), localisation (tissus) aussi bien dans le domaine humain que vétérinaire (*JANEWAY C.A. et al., 2003*).

- Agro-alimentaires : recherche d'éléments néfastes pour la santé dans le domaine alimentaire ou encore l'intervention dans la sélection de semences dans le domaine agricole.

- Thérapeutiques en tant que vecteur spécifique de toxines ou de drogue anticancéreuses, dans la prévention de rejet de greffe, traitement des maladies auto-immunes.

Autre Ac monoclonal humanisé utilisé en clinique : Omalizumab (xolair®) qui est une IgG₁ dirigée contre l'IgE humaine, utilisée dans le traitement de l'allergie (prévient l'interaction des IgE avec les récepteurs FcεR1).

- Dans le cas d'anticorps chimère, les régions constantes des chaînes lourdes et légères des Ig murines sont remplacées par des régions constantes humaines.

- Dans le cas d'anticorps humanisés, les régions hypervariables d'une Ig humaines sont remplacées par celles d'origine murine (*ROIT I. et al., 2002*); (*ROIT I. et al., 2001 (41)*).



1. METHODES DE SEPARATION NON SPECIFIQUES :

1.1. Précipitation :

Les molécules biologiques et notamment les protéines globulaires peuvent être précipitées en occasionnant une perturbation du milieu qui les contient, par une modification du pH, de la force ionique et de la température. Les propriétés du milieu sont aussi modifiées par addition de certains sels très solubles ou de solutions organiques miscibles (*SINE J.P., 2003*).

1.1.1. Précipitations par des sels :

a) Principe :

La précipitation des protéines par adjonction des sels, encore appelée précipitation par « salting-out » ou relargage, est la méthode de fractionnement protéique la plus largement utilisée.

Le principe de la précipitation est lié à la compétition qui peut apparaître pour les molécules d'eau entre les ions du sel et les molécules des protéines afin d'assurer leur solvatation. A des concentrations de sel suffisamment élevées, il se produit une modification au niveau de la couche d'hydratation des protéines due à l'exclusion des molécules d'eau par les ions du sel, ce qui favorise les interactions protéine-protéine et permettra la formation du précipité (*SINE J.P., 2003*).

b) Applications :

Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le sel le plus communément préconisé pour la précipitation des protéines, en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines.

Actuellement, cette procédure inclut NaCl, KCl, CaCl_2 , Na_2SO_4 , MgSO_4 . Les solutions saturées de NaCl de force ionique plus faible que celle du sulfate d'ammonium sont limitées en application. Néanmoins, certaines protéines fibreuses, solubles en milieu faiblement acide, peuvent être fractionnées avec NaCl ou KCl (fibrinogène, kératine, myosine, tropomyosine et collagène). Certains sels en solution concentrée comme le phosphate de potassium présente une densité et une viscosité très élevées qui rendent très difficile la décantation des parties solubles sous forme de précipité (*SINE J.P., 2003*).

Les domaines d'application de la précipitation par le sulfate d'ammonium sont diversifiés :

- **Purification d'une protéine d'intérêt :**

Les zones de précipitation ne sont pas les mêmes pour toutes les protéines qui se trouvent en mélange (**Fig. 10**). Par exemple, il est possible de précipiter et d'éliminer par centrifugation les protéines indésirables à 40% de saturation de sulfate d'ammonium. Puis, la protéine à purifier, restée dans la solution surnageant, sera précipitée à son tour en augmentant la concentration en sel.

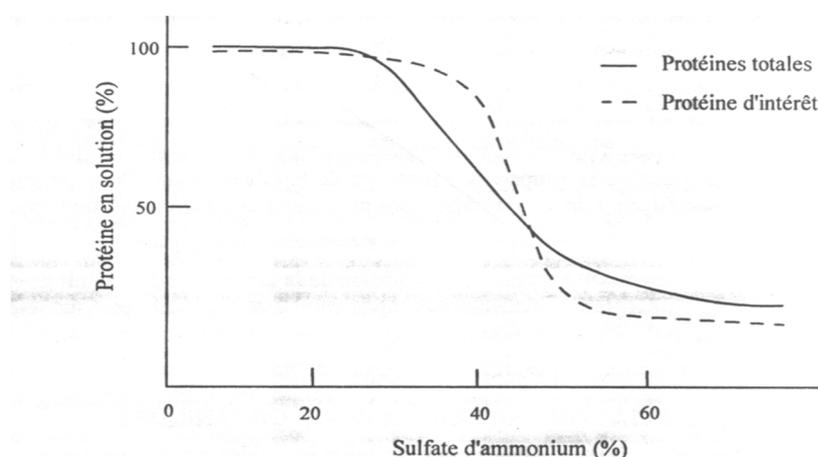


Figure 10 : Séparation d'une protéine d'intérêt par précipitation au sulfate d'ammonium (*KAMOUN P., 1977*).

- **Fractionnement d'un mélange de molécules :**

La méthode de fractionnement différentiel des protéines, appelée encore précipitation fractionnée, consiste à effectuer des précipitations successives par augmentation de la concentration en sel afin de localiser la fraction contenant la protéine d'intérêt parmi d'autres protéines. C'est le cas des enzymes contenues dans le broyat musculaire du lapin, qui peuvent être séparées après plusieurs phases de précipitations à des concentrations croissantes en sulfate d'ammonium. Par ailleurs, ce procédé est presque toujours utilisé pour la précipitation des anticorps de lapin en utilisant une solution saturée de sulfate d'ammonium. La concentration à laquelle les anticorps précipitent varie légèrement d'une espèce à une autre. La plupart des anticorps de lapin précipitent dans une solution saturée à 40 %, tandis que les anticorps de souris nécessitent une solution saturées à 45-50 %. Comme la plupart des



constituants du sérum ne précipitent pas à ces concentrations, on utilise généralement une solution saturée à 50 %, sans tenir compte de l'origine des Acs (*ED H. et al., 1991*).

Un des inconvénients de cette technique est que les anticorps précipités ne sont pas purs. Ils sont contaminés par des protéines piégées dans le précipitât. De ce fait, l'utilisation de la technique de précipitation au sulfate d'ammonium doit être combinée à d'autres méthodes de purification (*ED H. et al., 1991*).

- **Concentration d'échantillons :**

La précipitation au sulfate d'ammonium est également utilisée en phase analytique, dans un but de concentration, après des étapes de chromatographies échangeuses d'ions ou de filtration sur gel. Cependant, la concentration en protéines devra être supérieure à 1 mg/ml. Si la concentration est inférieure à cette valeur, une étape de concentration par ultrafiltration devra précéder le salting out. Dans la plupart des cas, le précipité sera récupéré par centrifugation (10000 g) pendant 10 min. Le culot devra être dissout dans un volume de tampon équivalent à au moins deux fois le volume de précipité (*SINE J.P., 2003*).

1.1.2. Précipitations par des alcools :

A température basse (0°C), un mélange de protéines ou d'anticorps solubles peut être fractionné par addition progressive d'un volume de solvant organique neutre (Ex. : éthanol, méthanol, acide acétique, acétone, phénol, etc.). Un solvant organique ajouté à une solution protéique aqueuse, entraîne une diminution du constant diélectrique du milieu aqueux. Ainsi les molécules d'eau formant une structure ordonnée le long des régions apolaires à la surface des protéines sont déplacées et remplacées par les molécules du solvant organique. Ce déplacement s'accompagne d'une diminution de la solubilité des zones polaires des protéines, ce qui induit des nouvelles interactions électrostatiques et formation d'un réseau ou agrégat protéique (*SINE J.P., 2003*).

1.2. La chromatographie:

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes de séparation, de fractionnement et de purification des différents constituants d'un mélange organique. Elles s'appliquent à la



Chapitre III : Les techniques de purification et séparation des Igs

-----2013

plupart des composés organiques et des macromolécules (protéines, polysaccharides, hormones, anticorps, enzymes, etc.).

La première chromatographie a été réalisée par le botaniste Mikhaïl TSWEET en 1906 sur des pigments végétaux colorés. Son nom dérive de *chrôma*, couleur et *graphein*, écrire = enregistrement graphique des couleurs (**BENZAIR A., 2009**) ; (44).

La séparation des substances biologiques met en jeu plusieurs techniques chromatographiques basées sur diverses propriétés physico- chimiques des molécules à séparer. Ces propriétés sont :

- La tendance de la molécule à se dissoudre dans un liquide (solubilité du soluté à séparer).
- La tendance de la molécule à se lier à un support solide (adsorption de la molécule à séparer).
- La tendance de la molécule de passer de l'état liquide à l'état gazeux (volatilité de la molécule à séparer).
- La capacité de la molécule à reconnaître une autre molécule ou un composé différent (reconnaissance biologique ou affinité biologique que possèdent certaines molécules entre elles, ex. : Enzyme-Substrat; Antigène-Anticorps; Hormone-Récepteur, etc.).

Il existe deux types de chromatographies:

-Chromatographie en phase gazeuse : Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue la chromatographie gaz-solide et la chromatographie gaz-liquide.

-Chromatographie en phase liquide : Dans ce type de chromatographie, la phase mobile est un liquide, alors que la phase stationnaire est variée. Selon les cas, on distingue :

- **La Chromatographie d'exclusion-diffusion**: Elle est connue sous plusieurs appellations: Filtration moléculaire, Gel filtration, Tamis moléculaire, Perméation de gel. La phase stationnaire est dans ce cas un solide (un gel poreux).
- **La chromatographie échangeuse d'ions**: La phase stationnaire est constituée par une résine poreuse, chargée positivement ou négativement.

- **La chromatographie d'affinité** : La phase stationnaire est un support sur lequel on fixe un ligand présentant une bioaffinité pour la substance à analyser.
- **La chromatographie de partage**: Appelée aussi chromatographie liquide-liquide, puisque la phase stationnaire se présente sous forme d'un liquide fixé sur un support.
- **La chromatographie d'adsorption**: C'est une chromatographie dont la phase stationnaire est un solide adsorbant (45) ; (46).

1.2.1. Chromatographie d'exclusion-diffusion ou gel filtration

a) Principe :

Cette technique est la plus ancienne des méthodes chromatographiques. Son principe repose sur la séparation des molécules selon leur taille et leur forme. Les molécules dont la taille est supérieure à celle des plus gros pores du gel, c'est à dire supérieure à la limite d'exclusion du gel ne peuvent y pénétrer, migrent dans la phase aqueuse qui entoure les grains du gel et quittent les premières le lit du gel (la matrice) placé préalablement dans une colonne à chromatographie. Par contre, les molécules plus petites pénètrent dans le gel et leur migration est ainsi retardée (Fig. 11). (MAROUF A., 2001-2002).

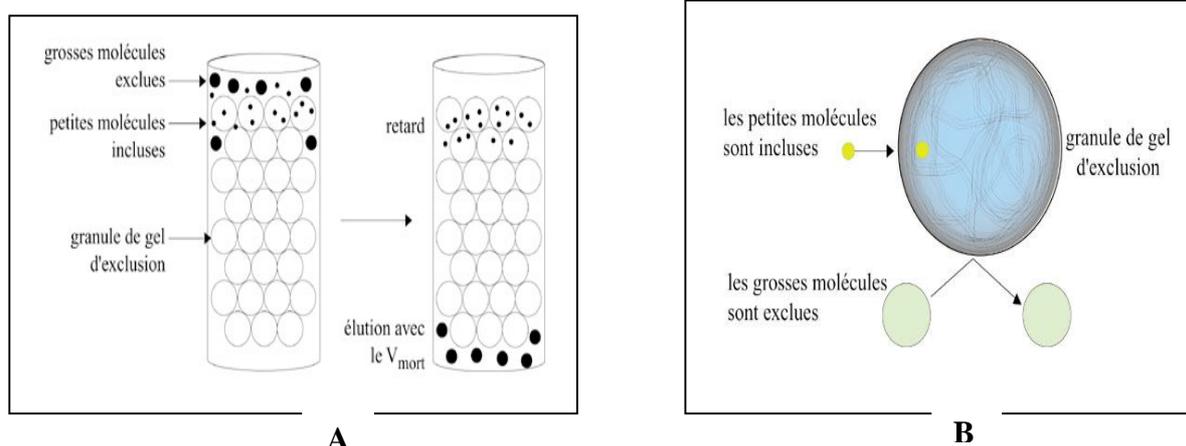


Figure 11: La chromatographie de filtration moléculaire ou d'exclusion diffusion (MAROUF A., 2001-2002).

A : Principe de la technique.

B : Représentation d'un gel d'exclusion.



b) Appareillage :

L'exploitation d'une manière fiable et rentable de cette technique implique l'emploi de plusieurs appareils et dispositifs en série (Chaîne de chromatographie) La chaîne comporte plusieurs outils (**Fig. 12**):

- ✓ **Colonne de verre** : contient la phase stationnaire (gel poreux : ex. Sephadex), à l'extrémité de laquelle on a introduit un disque poreux pour bloquer la phase solide en laissant passer seulement la phase mobile. La colonne est munie également à son extrémité inférieure d'un tube capillaire qui sert à relier la colonne à la pompe. La colonne doit être rigoureusement verticale. Sa hauteur dépend du but recherché : courte pour dessalage, longue (01 mètre ou plus) pour les séparations fines.
- ✓ **Pompe péristaltique** : c'est un appareil qui remplace l'opérateur pour l'aspiration des liquides et leur répartition dans les tubes. Elle est formée d'un ensemble de cylindres de métal ou de plastique dur, parallèles: cet ensemble tourne à une vitesse constante. Chacun des cylindres, en appuyant successivement sur un tuyau calibré, provoque l'écoulement d'un fluide à l'intérieur de ce tuyau. Le débit d'écoulement est conditionné par la vitesse de rotation de la pompe et le diamètre du tuyau.
- ✓ **Détecteur (spectrophotomètre à UV)** : est réglé à une longueur d'onde donnée (à 254 nm s'il s'agit des protéines) pour une certaine sensibilité capable de détecter des molécules séparées (protéines par ex.) à cette longueur d'onde.
- ✓ **Cellule photoélectrique du spectrophotomètre** : est reliée à un enregistreur qui traduit les variations de densité optique du flux liquidien en une courbe. Le passage d'un échantillon (protéine par ex.) provoque la réaction colorée qui se traduit à l'enregistreur par un pic dont la hauteur est proportionnelle à la densité optique DO. Quand aucun échantillon n'est aspiré, c à d qu'il ne passe dans la cuve du spectrophotomètre que le tampon (l'équivalent d'un blanc de réactif), on obtient sur l'enregistreur une ligne droite. Cette droite est dite « ligne de base ».
- ✓ **Le distributeur ou collecteur de fractions (échantillons)** : est automatique et peut collecter des volumes égaux d'échantillon dans des tubes (**45**), (**46**).

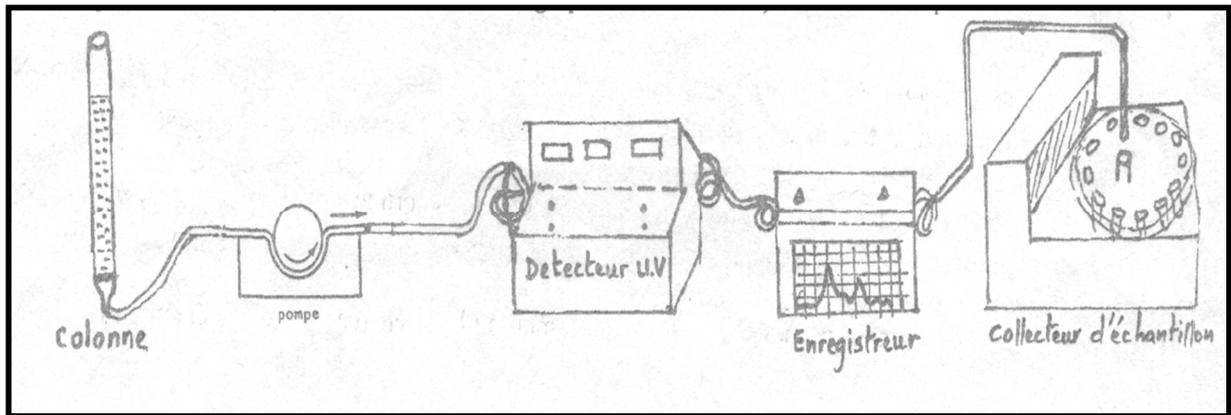


Figure 12 : Appareillage d'une chromatographie liquide (47).

c) Technique

La réalisation pratique de la filtration moléculaire des échantillons repose sur les étapes suivantes:

- L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne cylindrique contenant une matrice solide perméable comme la cellulose immergée dans un solvant ou le gel de Sephadex (le plus utilisé). Le type de gel est choisi en fonction du domaine de fractionnement dans lequel se trouvent les molécules à séparer.

Les billes de "*Sephadex*" sont constituées d'un dérivé du dextrane : ce sont des chaînes de glucose liées par des liaisons osidiques (α 1- 4 et α 1-6). A la base de cette réticulation on a pu établir plusieurs types de Sephadex voir annexe (**Tableau B**).

- Une grande quantité de solvant (un tampon généralement) est alors pompée et percolera lentement à travers la colonne. Les billes poreuses du gel ont des trous d'un diamètre bien déterminé, ne laissant passer que les petites molécules tandis que les grosses molécules transitent entre les billes.
- Le solvant entraîne avec lui les divers composants de l'échantillon vers le bas de la colonne. Les molécules à séparer se déplacent à des vitesses différentes et seront donc récupérées à des temps différents dans des tubes à essais; Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc éluées les premières au niveau du volume mort V_0 . Les petites et moyennes molécules sont éluées plus



tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. C'est pourquoi, il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse molaire (*MAROUF A., 2001-2002*).

d) Domaines d'application :

La filtration sur gel est couramment utilisée en Biochimie, dans deux types d'application : les séparations de groupe pour obtenir une séparation grossière, et le fractionnement moléculaire pour une séparation fine:

♣ Séparation de molécules de P.M. différents :

La séparation de groupe consiste à séparer les petites molécules des grosses molécules : les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et sont éluées les premières au niveau du volume mort V_m ou V_o . Les moyennes et petites molécules sont éluées plus tardivement car incluses dans les mailles du gel, leur migration est freinée.

Dans le fractionnement, on sépare un mélange complexe de protéines ou plusieurs fractions de poids moléculaires différents. Le principal usage de ce type de procédure est la détermination des masses moléculaires des protéines, ce qui est une application analytique. On peut aussi se servir du fractionnement moléculaire pour purifier une protéine donnée, ce qui est donc une application « préparative » (*MAROUF A., 2001-2002*).

♣ Dessalage (élimination des sels) :

On peut facilement séparer les macromolécules d'une solution contenant des molécules de petits poids moléculaires comme les sels (d'où le terme Dessalage), les sucres, les acides aminés, etc.).

Le procédé est simple : il suffit de prendre un gel ayant une limite d'exclusion très basse (ex. : Sephadex G10, G25) qui permettra seulement la pénétration des petites molécules mais pas les macromolécules (protéines, par ex.). Certaines résines synthétiques offrent des meilleures conditions pour les procédés de dessalage (débit rapide, limite de résolution très basse et qualité de résolution grossière). Une simple filtration permet donc de recueillir rapidement le volume mort contenant les protéines débarrassées des sels et de toute autre petite molécule qui y était fixée. On se sert donc de cette technique pour éliminer les

contaminations (sels, détergents, groupements chargés, etc.) Cette approche peut remplacer avantageusement la dialyse, elle est beaucoup plus rapide mais nécessite un peu plus de manipulation et de suivi constant. Du côté industriel, on peut par exemple produire du lait sans lactose, pour des personnes intolérantes à ce produit, en suivant ce même principe. Dans ce cas, les colonnes utilisées sont de grandes tailles (de taille industrielle) (MAROUF A., 2001-2002).

♣ Détermination des poids moléculaires :

La filtration moléculaire est abondamment utilisée en biochimie pour déterminer les poids moléculaires des protéines. Elle a remplacé avec succès la centrifugation analytique dans ce genre d'application. Cela nécessite seulement l'emploi d'une colonne de gel de haute qualité (qualité fine ou superfine) et très soigneusement calibrée.

Pour calibrer une colonne, il suffit de chromatographier des protéines dont les masses moléculaires sont connues (Protéines standards ou étalons). On note le volume d'élution de chaque étalon (V_e) en fonction du Log de son poids moléculaire (**Log PM**), et ce pour dresser une courbe d'étalonnage (**Fig. 13**). Une fois calibrée, la colonne peut être employée pour déterminer le PM d'un ou plusieurs inconnus en reportant tout simplement, sur la courbe, le volume d'élution de l'inconnu qui, par extrapolation, permet de calculer son poids moléculaire (MAROUF A., 2001-2002) ; (49).

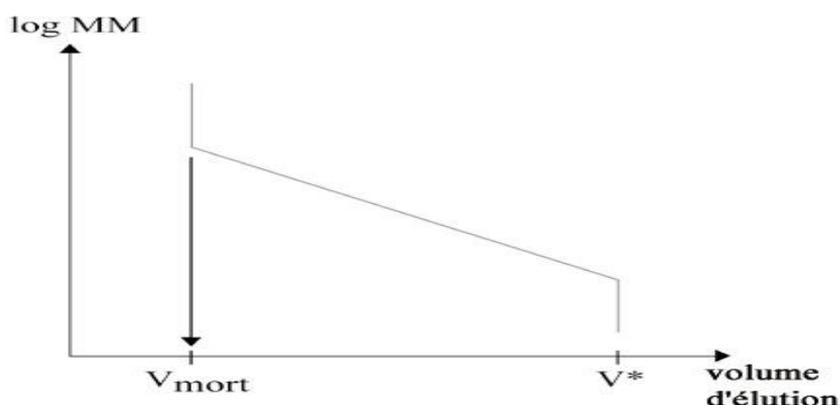


Figure 13: Courbe d'étalonnage (MAROUF A., 2001-2002).

♣ Purification des protéines :

Cette technique peut servir comme une étape de purification d'une protéine. Pour ce faire, il faut utiliser une résine de qualité supérieure qui permettra une résolution maximale. Les filtrations sur gels sont souvent la dernière étape dans un protocole de purification des protéines



car, pour être justement efficaces, elles nécessitent une préparation relativement pure, ayant un petit volume (*KAMOUN P., 1977*), (50).

1.2.2. Chromatographie d'échange ionique

a) Principe :

Cette technique est basée sur la propriété que possèdent certains groupements à la surface d'une molécule (acides aminés, protéines, acides nucléiques, anticorps, etc.), d'échanger réversiblement des charges négatives ou positives avec d'autres groupements de charges opposées, fixés au préalable sur une phase stationnaire (un support de gel) appelée échangeur d'ions dont la neutralité électrique est assurée par des ions de charges différentes (contre ions). Lorsqu'un mélange de molécules parcourt le support chargé, tous les composants ayant une charge nette opposée à celle de l'échangeur sont retenus électrostatiquement par échange avec les contre-ions préfixés, alors que ceux dont la charge est identique ou sans charge passent à travers le gel sans être retenus (*KAMOUN P., 1977*) ; (46).

b) Les échangeurs ioniques :

Les premiers supports ioniques appliqués à la séparation des protéines ont été introduit en 1956 Par PETERSON et SORBEH. Il s'agit de deux types de gels, les plus couramment utilisés dans la pratique: échangeurs cationiques ou anioniques (48).

- *Echangeurs cationiques :*

Ils possèdent une charge négative (-) et peuvent donc fixer des composés chargés + (des cations) apportés par la phase mobile. Ces supports peuvent être équilibrés ou stabilisés par un cation mobile (un contre ion), par exemple: Na^+ ou K^+ . On dit alors que l'échangeur est en cycle sodium ou potassium.

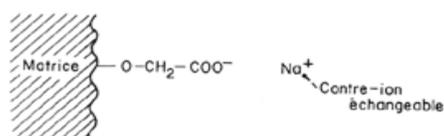
Le CM- Cellulose est un exemple de résine cationique, contenant des groupements acides faibles ($-\text{COO}^-$), le Sulfopropyle qui contient des groupements sulfoniques ($-\text{SO}_3^-$) est par contre une résine cationique forte et toujours fortement ionisée quel que soit le pH du milieu (**fig. 14**) (46).

- **Echangeurs anioniques :**

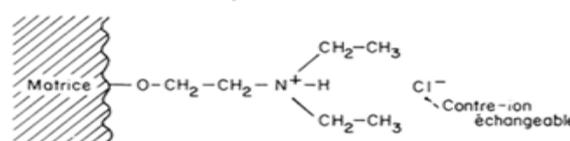
C'est une matrice ou un gel Chargé positivement (+), capable d'échanger des anions ou contre ions (Y^-) avec un groupement (-) porté par la molécule à purifier. Un échangeur anionique contient l'un des groupements positifs : NH_3^+ , NH^+ , N^+ . Il peut par exemple échanger son anion (Cl^-) avec l'ion Acétate (CH_3COO^-).

Les résines cationiques faibles contiennent des groupements basiques faiblement chargés (Amines), exemple : DEAE- cellulose (Diethyl amine éthyl- cellulose), alors que les résines cationiques fortes sont des bases fortes, trop chargées, exemple le QAE- cellulose (quaternaire amino éthyl- cellulose) (**fig. 15**) (47) ; (50).

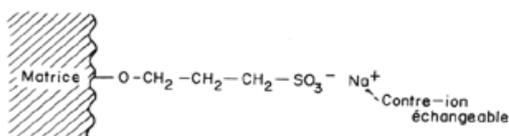
- le CM-polyoside (carboxyméthyle) : échangeur cationique faible :



- le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle), échangeur anionique faible :



- le SP-polyoside (sulfopropyle) : échangeur cationique fort :



- le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle), échangeur anionique fort :

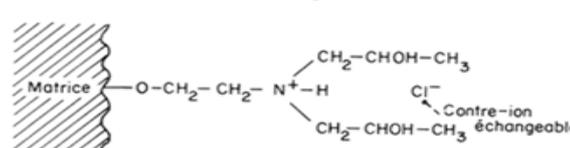


Figure 14: Echangeurs cationiques faible et fort (46) ; (47).

Figure 15 : Echangeurs anioniques fort et faible (46) ; (47).

c) Méthodologie :

Une séparation chromatographique par échange d'ions s'effectue généralement en trois étapes successives:

- **Equilibrage du gel :**

Elle consiste à assurer la neutralité ou la stabilité des groupements chargés, portés par le gel. Cela peut se faire directement après le remplissage de la colonne, par addition d'ions de charges opposées, appelées contre-ions (49).



▪ *Echange ionique et fixation :*

- L'échantillon est déposé à la surface d'un gel cationique dans un solvant aqueux dont le pH et la force ionique vont permettre la fixation de certaines de ses molécules sur les sites ionisés de la phase stationnaire; la fixation est favorisée par échange des contre-ions (X^+ , par ex. Na^+) contre les cations de l'échantillon.
- L'étape de fixation peut être suivie et contrôlée au niveau de l'enregistreur :
- Si toutes les protéines de charge (+) sont fixées, la ligne de base du tracé reste à l'origine. Si, on obtient un pic, cela signifie que les protéines n'ont pas été fixées (46).

▪ **Élution.**

L'éluant est une solution aqueuse qui contient des ions échangeables avec les solutés fixés sur l'échangeur. L'élution consiste à déplacer les protéines de leur sites de fixation en modifiant certaines caractéristiques de la phase mobile; la force ionique et/ou le pH.

On peut éluer, par exemple, différentes protéines fortement fixées par augmentation progressive de la force ionique (la densité de charge) de la phase mobile (l'éluant) en utilisant un gradient de concentration d'un sel ne modifiant pas le pH du milieu (ex. NaCl) (49).

2. METHODES DE SEPARATION SPECIFIQUES :

2.1. Chromatographie d'affinité :

2.1.1. Principe :

La séparation repose ici sur l'interaction spécifique entre une molécule à séparer (ex. un anticorps) et son effecteur spécifique (son antigène spécifique). Ce dernier appelé ligand, est fixé sous une forme accessible, à la surface de la matrice (un gel insoluble).

A partir d'un mélange de substances contenant l'anticorps recherché, le ligand ne retient que celle-ci, tandis que toutes les autres substances n'interagissant pas, migrent sans obstacle avec le solvant. On élue ensuite de la colonne, l'anticorps à l'état pur en changeant les conditions de l'élution pour dissocier le complexe (Ac-Ag) (48).

Trois types d'affinités sont utilisés :

- Affinité enzyme-substrat
- Affinité ligand-récepteur
- Affinité antigène-anticorps.

2.1.2. Méthodologie :

Une chromatographie d'affinité comporte généralement trois étapes (**Fig. 16**)

- Couplage du ligand sur la résine.
- Adsorption de la molécule d'intérêt et élimination des molécules contaminatrices.
- Désorption des molécules recherchées.

a) Couplage du ligand :

Il faut coupler le ligand sur une résine à chromatographie qui en tant que telle, n'a pas d'affinité pour la molécule d'intérêt. Ce couplage doit se faire sans dénaturer le ligand afin que ce dernier conserve son affinité pour la substance qu'on veut séparer. Il existe plusieurs gels de résines préparés d'avance sur lequel on peut coupler le ligand choisi.

Les gels possèdent en général un groupement chimique facilement activable, fixé au bout d'un bras écarteur.

Diverses résines existent sur le marché avec leurs groupements activables : Bromure de cyanogène CNBr ou P-Nitrophényle pour coupler un ligand avec une amine, Hydrazine pour un ligand ayant une fonction aldéhyde, un Thiol pour un ligand avec thiol (**51**).

Le couplage consiste donc à :

- 1- « Activer » le gel pour qu'il puisse former un lien covalent avec le ligand.
- 2- Mettre en présence la résine avec le ligand.
- 3- Déclencher la réaction de formation des liens covalents avec le ligand et la résine par des conditions physico-chimiques appropriées.
- 4- Eliminer les réactifs résiduels.



b) Adsorption :

L'adsorption se fait évidemment dans des conditions physico-chimiques bien déterminées (pH, force ionique, etc.) où l'équilibre de la réaction tend fortement vers le maintien de l'interaction ligand-molécule d'intérêt; toutes les molécules sans affinité pour le ligand ne se lieront évidemment pas et élueront rapidement. On lave ensuite la colonne avec le solvant d'adsorption pour éliminer toute molécule contaminante résiduelle.

c) Désorption :

La désorption est faite en exposant la résine contenant le complexe ligand-molécule d'intérêt à des conditions qui déstabilisent l'interaction. Cela peut être fait en changeant les conditions physico-chimiques initiales pour affaiblir l'interaction. On utilise le plus souvent un mélange de désorption contenant un produit chimique plus ou moins structurellement analogue au ligand et si possible, ayant encore plus d'affinité pour la molécule d'intérêt. On peut aussi utiliser des détergents doux qui vont briser certaines interactions protéines-protéines.

2.1.3. Applications :

a) Isolement des protéines :

La chromatographie d'affinité est couramment utilisée pour isoler des protéines. De nombreux types des molécules peuvent être utilisés comme ligand; les anticorps sont des ligands très efficaces pour isoler les antigènes spécifiques ; un glucide peut être un bon ligand pour une lectine .inversement, une lectine servira de ligand pour une glycoprotéine **(48)**

La protéine A, une protéine bactérienne ayant une grande affinité pour le fragment constant des anticorps. Il est alors systématiquement utilisé pour purifier un mélange d'anticorps polyclonaux. L'immunodiacetate, capable de complexer les métaux, peut servir à adsorber les métalloprotéines. De façon générale, on peut multiplier à l'infini les possibilités d'interactions spécifiques.



b) Isolement des anticorps :

Pratiquement, il existe différentes techniques permettant le couplage de l'antigène (l'effecteur) de façon covalente sur le support activé, grâce à l'utilisation d'agents de pontage, comme le bromure de cyanogène, la glutaraldéhyde, etc. Les effecteurs pouvant fixer des Immunoglobulines sont par ailleurs nombreux. On distingue :

La protéine A : composant majeur de la paroi du *Staphylococcus aureus*, fixe fortement certains catégories d'Ig G par la partie Fc.

La protéine G : extraite de *Staphylococcus Sp*, elle fixe des sous classes d'Ig G avec une affinité supérieure que celle due à la protéine A.

Les microbilles : Variables par leur taille et leur nature (par ex : agarose, polystyrène, chlorure de polyvinyle, silice, latex, Nylon). Ces microbilles servent de support inerte, insoluble à la surface duquel on fixe des antigènes qui sont capables de lier des anticorps spécifiques, alors que les immunoglobulines non spécifiques et les autres protéines sont éliminées (**Fig. 16**) (*JANEWAY C.A. et al., 2003*).

c) Isolement des acides nucléiques

Plusieurs méthodes d'affinité ont été mises au point la purification des acides nucléique. Ainsi, les ARNm polyadénylés peuvent facilement êtres isolés par chromatographie sur des résines d'oligo desoxythymidine - cellulose ou poly uridine - Sepharose. En effet, à faible force ionique, la courte séquence de poly adénines au bout 3' des ARNm peut se lier par simple complémentarité de base à des séquences d'oligo desoxythymidine ou de poly-uridine. On peut ensuite résorber à haute force ionique.

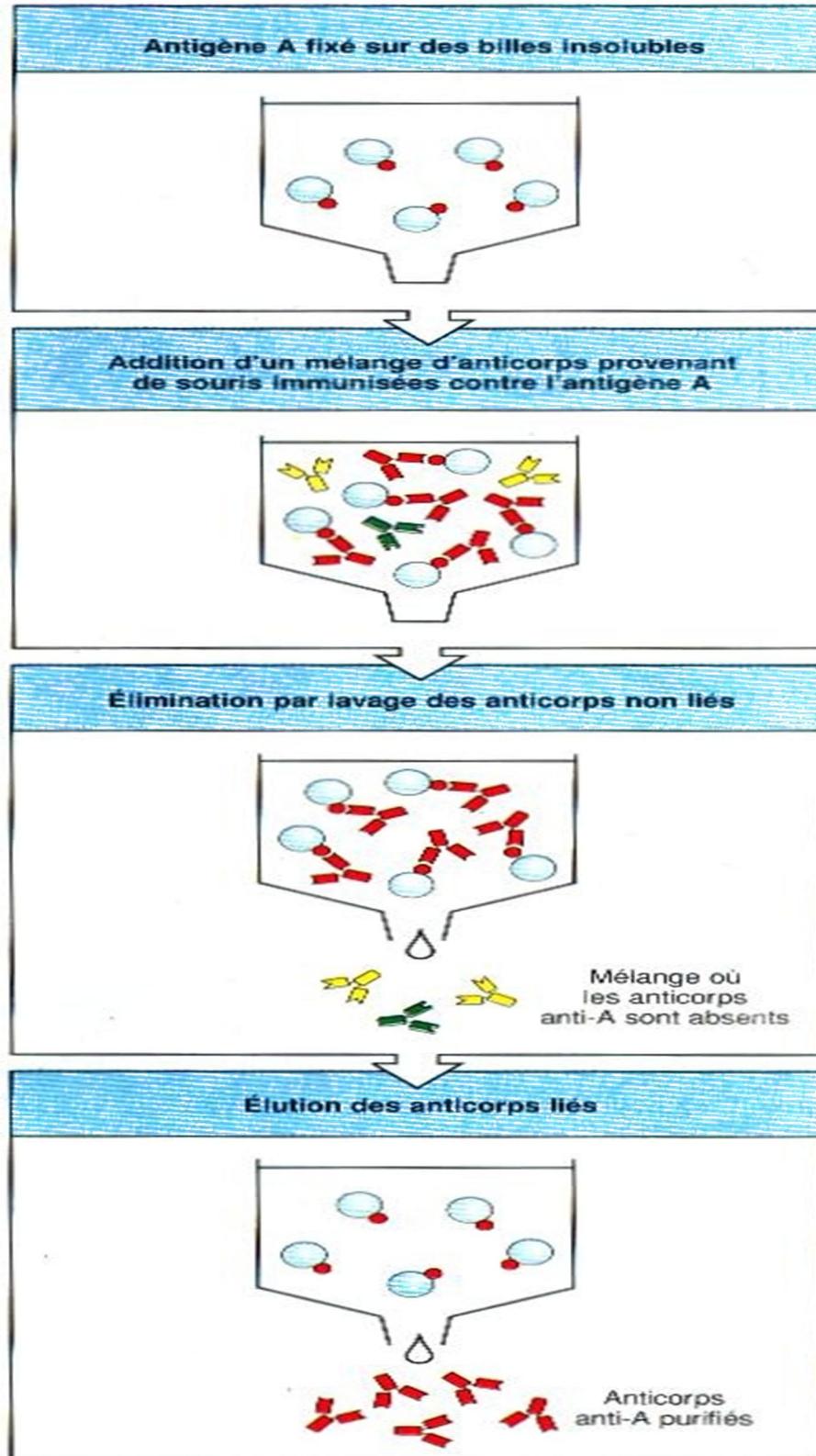


Figure 16: Principe de la chromatographie d'affinité par des microbilles (JANEWAY C.A. et al., 2003)

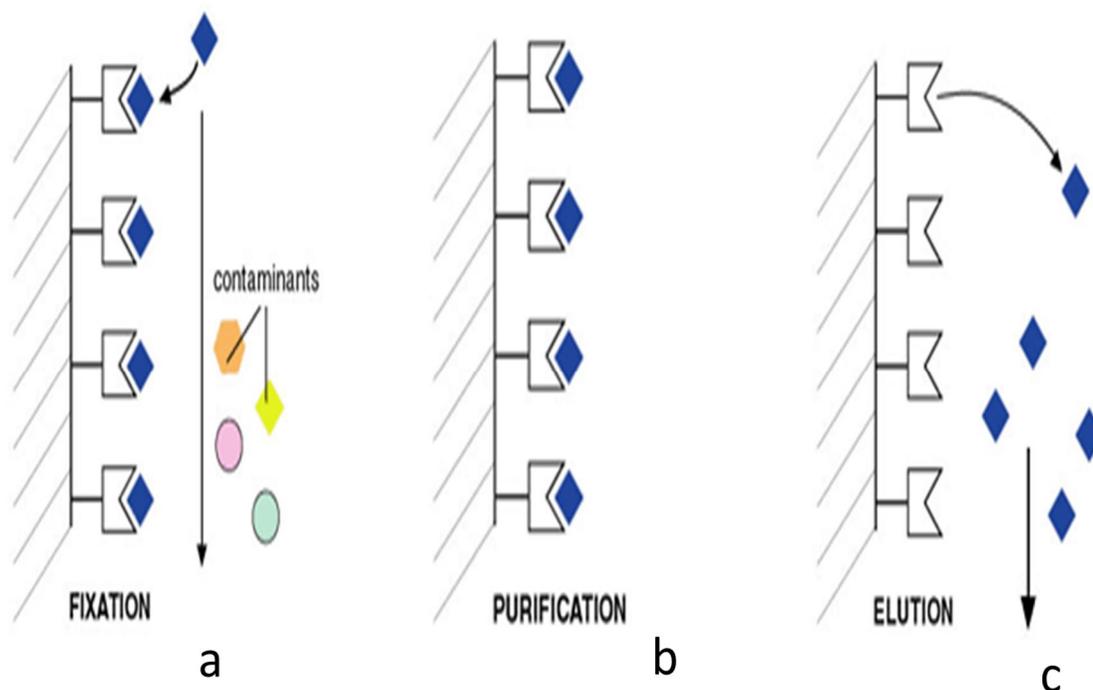


Figure 17: Etapes de la chromatographie d'affinité (46) ; (51).

2.2. Ring test ou test de l'anneau:

2.2.1. Principe :

Le test consiste à mettre en présence dans un tube capillaire 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 (**Fig. 18**) (VAUBOURDOLLE M., 2007).

L'existence d'une précipitation optimale (état d'équivalence) peut être expliquée par l'augmentation du nombre de sites anticorps occupés par l'antigène. Une fois la saturation obtenue, l'addition supplémentaire d'antigènes entraîne la dissociation du réseau (phénomène de zone).

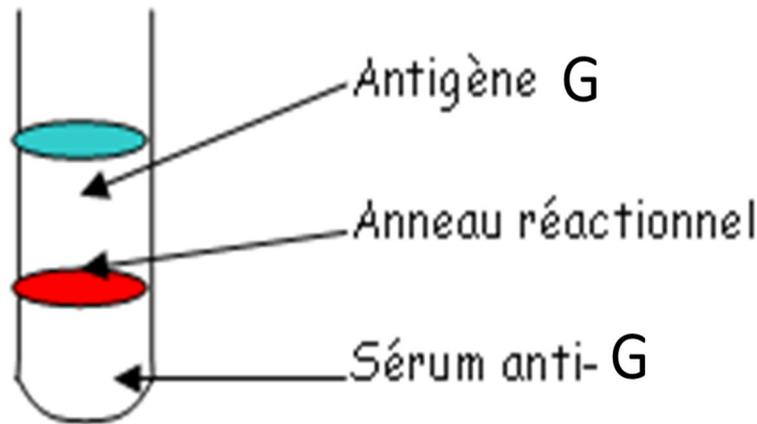


Figure 18 : Test de l'anneau (VAUBOURDOLLE M., 2007).

2.2.2. Application :

Ce test simple et rapide peut être utilisé pour plusieurs applications :

- L'étude de la spécificité de l'anticorps vis-à-vis d'un antigène donné;
- Détection et suivi de la production d'anticorps spécifiques par l'organisme soumis à l'injection d'un antigène (animal hyperimmunisé);
- Réalisation d'un titrage grossier des anticorps en utilisant des solutions d'antigènes de concentrations différentes.

2.3. Immuno néphélométrie ou turbidimétrie :

2.3.1. Définition :

La néphélométrie (du terme grec nephelos = nuage) est une technique quantitative, spécifique et rapide qui est généralement utilisée pour mesurer les concentrations de protéines sériques par immuno- précipitation. Elle sert à détecter facilement la formation de complexes immuns insolubles dans un milieu aqueux car ceux-ci provoquent une augmentation de la turbidité du milieu réactionnel que l'on peut mesurer par un appareil automate produisant des rayons laser (AMBROISE M., 1995); (5).

La néphélométrie a remplacé la méthode de Heidelberger et Kendall (technique ancienne, très lente et moins reproductible) qui consistait à apprécier la quantité de précipité formé par un simple dosage chimique du taux d'azote contenu dans les protéines (5).

2.3.2. Principe :

- Le sérum dilué est mis en présence d'un anti sérum spécifique dans des proportions variables pour avoir, au moins, dans quelques tubes les conditions de formation du réseau et une précipitation.
- Après incubation dans des conditions humides pendant plusieurs heures, il se forme le complexe antigène-anticorps qui précipite sous forme de fines particules permettant une analyse néphélométrique. (**Fig. 19**)
- Un rayon laser traverse le tube contenant d'éventuelles particules du précipité.
- Le rayon diffracté par les particules est mesuré à la sortie à l'aide d'un photomultiplicateur (appareil qui mesure la diffraction).
- L'angle de déviation est proportionnel à la concentration de la molécule à doser (Plus il y a de précipité Ac-Ag, plus il y aura de signal sur le photomultiplicateur). Toutefois, si l'angle d'entrée = angle de sortie, cela veut dire que la concentration est alors nulle (**22**).

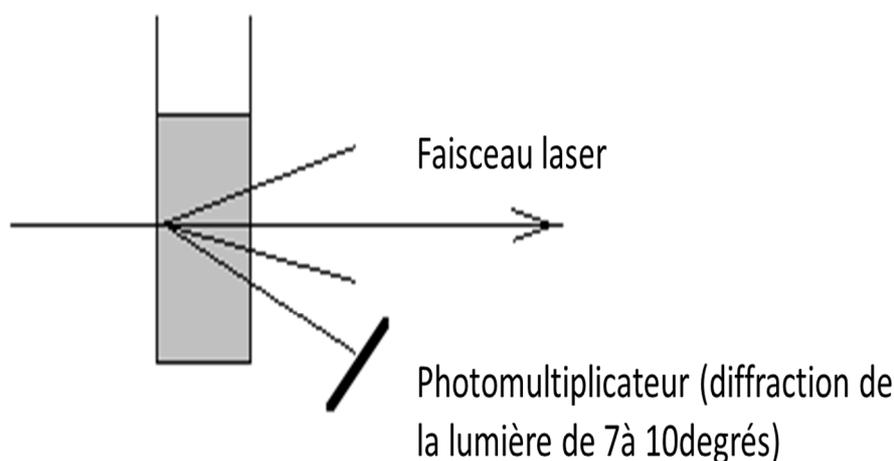


Figure 19: Principe de la néphélométrie (*AMBROISE M., 1995*).



2.4. Immunodiffusion simple ou test d'Ouchterlony :

2.4.1. Principe :

La technique repose sur l'utilisation d'un gel vierge, coulé sur un support solide où anticorps et antigènes déposés en deux points distants peuvent diffuser lentement dans le gel formant un gradient de concentration.

La précipitation a lieu au niveau du front de diffusion à l'endroit où les concentrations en Ag et Ac correspondent à la zone d'équivalence.

2.4.2. Technique :

Sur la couche mince du gel l'agarose, on creuse deux puits à l'emporte-pièce : dans l'un des puits est placé un anticorps et dans l'autre un antigène. La configuration la plus courante est celle où un puits central contenant le sérum est entouré de 6 à 8 puits périphériques dans lesquels sont déposés les antigènes ou vice versa.

Après le dépôt, on laisse diffuser les échantillons dans une enceinte humide, à 25 °C. Quand la réaction est terminée (24 à 48 heures), on peut laver le gel dans du sérum physiologique pour éliminer les autres protéines non spécifiques.

On colore le précipité par un réactif (soit le bleu de Coomassie, soit l'Amidon Schwartz, soit le vert de lissamine), et ce pour révéler les arcs de précipitation qui se forment entre le puits central et les puits périphériques.

2.4.3. Application :

Cette technique a l'avantage de permettre l'identification des différentes fractions d'antigènes par un anticorps poly spécifique. Ça sert aussi à comparer le comportement de plusieurs immuns sérums vis-à-vis d'un Ag et inversement. C'est ainsi qu'ont pu être définies entre deux antigènes ou plus des réactions d'identité, d'identité partielle, et de non identité (Fig. 20).

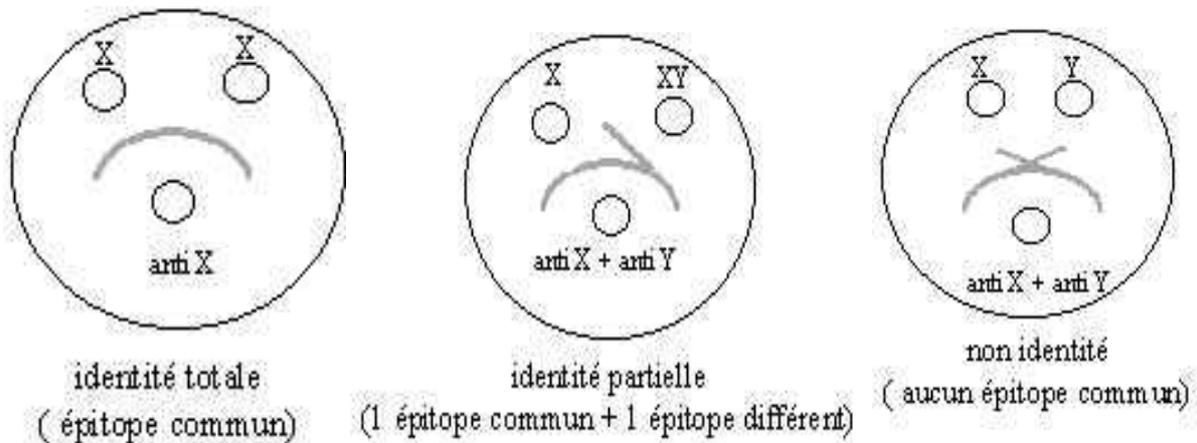


Figure 20: Détermination et interprétation des réactions d'identité entre deux antigènes par immunodiffusion simple (5).

2.5. Immunodiffusion radiale ou technique de Mancini :

2.5.1. Principe :

La technique est basée sur l'aptitude des Ags à diffuser sur un gel d'agarose imprégné d'un immun sérum à dilution convenable; une concentration constante d'anticorps est donc assurée en chaque point du gel. Un volume d'échantillon (quelques μl d'antigènes) est introduit dans le puits creusé au préalable dans le gel. Autour du lieu de dépôt, il y a apparition de disque de précipitation, dont la surface (diamètre carré) est directement proportionnelle à la concentration en antigènes (18).

2.5.2. Application :

Cette méthode peut être appliquée au dosage quantitatif des immunoglobulines dans le sérum.

L'établissement d'une courbe étalon à partir de solutions contenant des concentrations connues et croissantes d'antigènes permet de préciser la concentration d'une solution inconnue du même antigène par la simple mesure du diamètre du cercle de précipitation (52).

2.6. Immunoélectrophorèse simple ou technique de Graber :

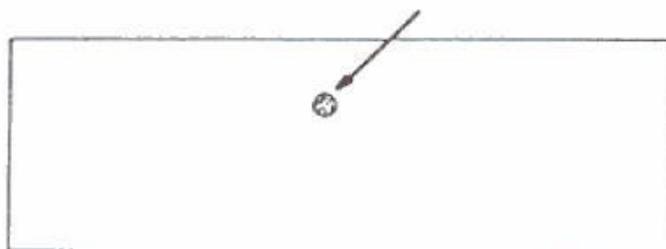
2.6.1. Principe :

Développée il y'a plus de 50 ans par Grabar et Williams en 1953, cette méthode quantitative met en jeu une séparation des protéines par électrophorèse dans un gel d'agarose suivie d'une double diffusion contre des anticorps spécifiques selon une direction perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique. Chaque zone d'équivalence correspond à un précipité (Ag-Ac) qui se traduit par un arc de précipitation.

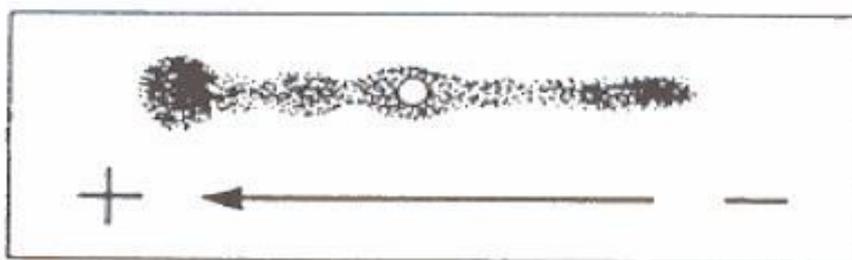
2.6.2. Technique :

Les étapes de réalisation de la technique sont les suivantes :

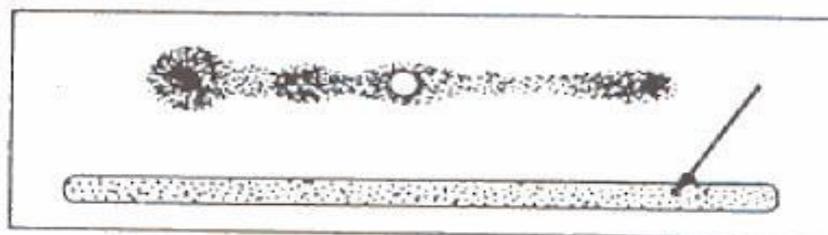
- Une lame de microscope recouverte d'agarose et percée d'un puits, dans lequel on introduit le sérum (l'anticorps) ou l'antigène à analyser ;



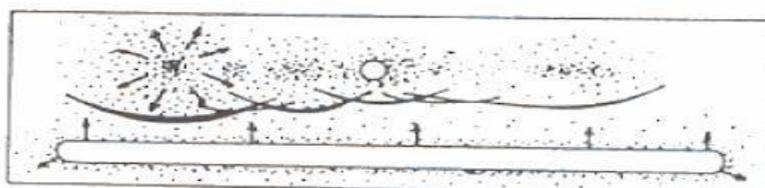
- On sépare les protéines selon leur charge grâce à un courant électrique.



- On découpe ensuite une gouttière au milieu de la lame, dans laquelle on verse de l'antisérum polyclonal ou l'antisérum humain reconnaissant pratiquement toutes les protéines du sérum humain.



- Après diffusion des antigènes et des anticorps, on obtient différents arcs de précipitation qui peuvent être colorés et comparés (*SINE J.P., 2003*).



2.6.3. Application :

L'immunoélectrophorèse est très appliquée dans la séparation des protéines du sérum humain contre l'antisérum spécifique: plus de 30 molécules antigéniques différentes dans le sérum humain ont été mises en évidence par cette technique en utilisant, comme anticorps, un sérum animal antisérum humain. Cette technique est également très utilisée pour dépister et identifier les anomalies des immunoglobulines sériques par comparaison au sérum normal (**Fig. 21**) (*SINE J.P., 2003*) ; (52).

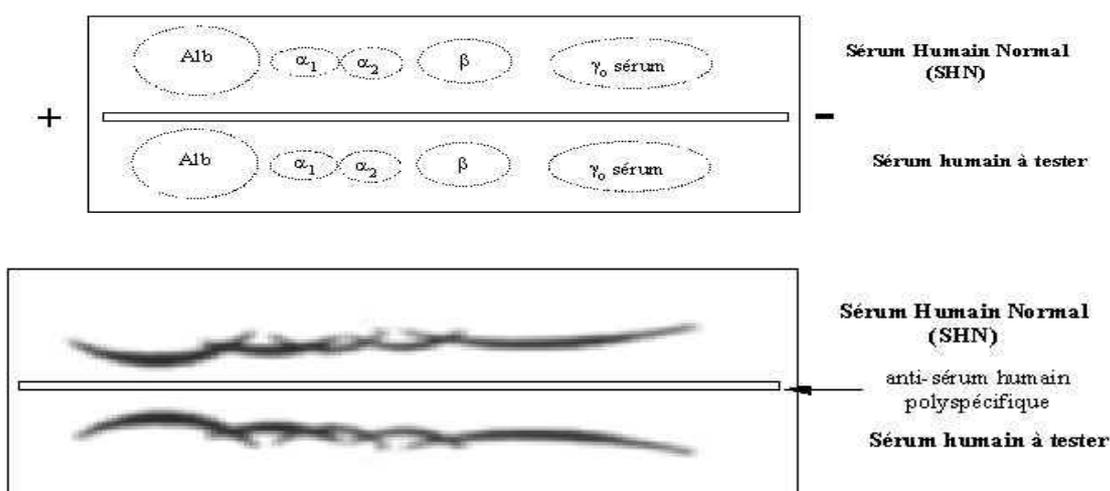


Figure 21: Séparation du sérum humain par immunoélectrophorèse et recherche

d'anomalies au niveau des immunoglobulines sériques (*SINE J.P., 2003*).

1. Matériels :

1.1. Petits matériels :

- Béchers ; - Burette (1 X 60 cm) ; - Coton ; - Micropipettes ; -Pipettes pasteurs ; - Embouts ; - Etiquettes ; - Flacons; -Erlenmeyer; - Mortier ; - Pilon ; - Plateau ; -Papier aluminium ; - Tubes à essai ; - Seringues jetables ; – Spatule ; - Tubes Eppendorfs ; - Tube à hémolyse citratés ; – Portoir ; - Tubes à hémolyse secs.

1.2. Equipements :

- Balance de paillasse ; - Balance de précision ; -Barreau magnétique ; -centrifugeuse ; - Agitateur magnétique et barreaux; -Spectrophotomètre UV ; -Spectrophotomètre visible ; - Autoclave ; - pH mètre ; - Néphélomètre ;- Automate : Turbidimètre.

1.3. Réactifs et solutions :

-Eau distillée ; -Alcool éthylique ; -Bovine sérum albumine (BSA) ; - Solution de Biuret ; - Eau physiologique 9‰ ;- Tampon phosphate buffer saline (PBS) ; -xylène ; - Gel de Sephadex G-100 en poudre - Adjuvant complet de Freund (ACF) ; - Sérums ; -Anti- IgG

1.4. Matériels biologiques :

-Lapins

2. Animaux et alimentation :

2.1. Animaux :

Les expériences sont réalisées sur deux lapins de sexe mâle, vivant ensemble dans une cage. Le premiers lapin est âgé de 9 mois, le second est âgé de 5 mois. Leurs poids sont 2,2 kg et 1,6 kg respectivement.



2.2. Condition d'élevage (photo 1) :

Les animaux sont hébergés dans la salle de l'animalerie, au niveau du département de biologie à l'université 08 Mai 1945 de Guelma, dans une cage en acier, de forme parallélépipédique. Avant leur installation, une prise de poids a été effectuée sur les deux lapins. Dans cette salle, les animaux y trouvent une bonne aération ainsi qu'une bonne température et une humidité convenable mais ces derniers paramètres ne sont pas contrôlés. Les animaux sont nourris principalement aux feuilles de laitue et de choux mais aussi de miettes de pains, et ont accès direct à l'eau.

2.3. Prélèvement de sang (photo 2) :

Les prélèvements de sang se sont effectués au niveau des oreilles par ponction intraveineuse à l'aide d'une aiguille, une semaine après que les lapins se soient installés et adaptés avec le milieu. Ces prélèvements sont recueillis dans des tubes citratés pour éviter leur coagulation et sont ensuite centrifugés à la vitesse de 3500 tours/minute, pendant 15 minutes, pour récupérer le sérum qui est immédiatement conservé à -16 °C pour utilisation ultérieure.

Le premier prélèvement qui concerne le sérum négatif, s'est fait avant l'immunisation, les autres prélèvements destinés à la pratique se sont faits huit jours après l'immunisation. Deux prises de sang au moins ont été régulièrement pratiquées chaque semaine sur les lapins, pendant plus de 25 jours.

2.4. Induction de la réponse immunitaire (photo 3):

Après avoir récolté le sérum négatif, nous avons passé à la première induction. Cette induction de la réponse immunitaire a été réalisée par inoculation dans le corps de l'animal d'une dose connue d'un immunogène fort : l'Adjuvant Complet de Freund. Elle a pour but d'amplifier la réponse immunitaire, donc une production importante des immunoglobulines. Le titre d'anticorps tend à augmenter normalement pendant au moins les trois semaines post-induction.

L'induction de la réponse immunitaire est faite après rasage des lapins sur la partie dorsale, à deux endroits distincts en utilisant une lame de rasoir et de l'alcool éthylique pour stériliser les endroits rasés et empêcher les infections. L'injection se fait par voie sous-cutanée, en petites doses réparties sur plusieurs sites, à raison de 25 μ l adjuvant/kg. Ainsi, le petit lapin qui pèse 1,6 kg reçoit environ 40 μ l d'adjuvant, alors que le grand lapin qui pèse 2,2 kg reçoit 55 μ l d'adjuvant.

Afin de prévoir toute réaction anaphylactique ou d'éventuelles infections cutanées, un suivi de l'état sanitaire des animaux pendant quelques jours est strictement exigé. Après une semaine de l'induction, on a commencé à récolter le sérum sur les deux lapins, et ce pendant trois semaines successives pour but de suivre l'évolution de la réponse immunitaire vis-à-vis de l'adjuvant inoculé.



Photo 1 : Lapins dans la cage.



Photo 2: Prélèvement du sang.



Photo 3: Immunisation d'un lapin.



3. Dosage des protéines :

Le dosage des protéines totales des sérums récoltés avant et après l'immunisation des animaux a été effectué selon la méthode de Biuret. C'est une méthode quantitative, basée sur le développement d'une réaction colorée (méthode colorimétrique). Bien qu'elle soit peu sensible, elle est relativement rapide et sa principale qualité est d'avoir une absorption égale pour toutes les protéines (*SINE, 2003*).

3.1. Principe :

Son principe repose sur le développement d'une réaction colorée capable d'absorber les spectres visibles, à une longueur d'onde $\lambda = 540$ nm. Dans cette réaction, les ions cuivriques (provenant du sulfate de cuivre, composant important de la solution de Biuret donnant une couleur bleu vif au milieu), forment avec les liaisons peptidiques présentes au niveau des protéines à doser un complexe de coloration bleu-violacée, et ce en milieu alcalin (présence de NaOH dans la solution de Biuret). Le nombre de liaisons peptidiques dans le complexe formé, et par conséquent la concentration en protéines détermine l'intensité de cette coloration. Cette intensité est mesurable en termes de densités optiques D.O. par le spectrophotomètre.

3.2. Mode de Préparation de la solution de Biuret :

- On a préparé chaque solution à part comme suivant:
 - ✓ Une solution de NaOH, soit (15 g dans 100 ml de H₂O distillée).
 - ✓ Une solution de CuSO₄, soit (0,75g dans 100 ml de H₂O distillée).
 - ✓ Une solution de Tartrate de Na et K, soit (3 g dans 100 ml de H₂O distillée).
 - ✓ Une solution de KI, soit (0,5 g dans 100 ml de H₂O distillée).

- Dans un bécher de 500 ml, on met d'abord la solution de NaOH, puis après agitation douce, on ajoute en 2^{ème} ordre la solution de CuSO₄. Puis, les solutions de Tartrate et de KI sont rajoutées successivement, tout en agitant après chaque étape.

- On complète avec de l'eau distillée jusqu'à 500 ml, et la solution est conservée loin de la lumière, à +4 °C.

3.3. Etablissement de la Courbe d'étalonnage :

A partir d'une solution mère de protéine étalon BSA utilisée à une concentration de 10 g/l, soit 10 mg/ml, on a réalisé une gamme de dilutions croissantes dans 05 tubes à essais contenant 2 à 10 mg de protéines BSA. Après avoir bien mélangé les tubes par le vortex, on les a incubés pendant 20 minutes à l'obscurité jusqu'au développement de la coloration.

La réalisation des dosages est effectuée selon le tableau ci-dessous, et la lecture de l'absorbance (les densités optiques DO) s'est faite à l'aide d'un spectrophotomètre visible, à une longueur d'onde de 540 nm en utilisant des cuvettes jetables.

Les résultats des D.O des différentes dilutions de BSA sont regroupés sous forme de tableau (**Tableau 2**). La représentation de la courbe d'étalonnage $DO = F(C)$ correspondant aux différentes lectures densitométriques, se trouve dans l'annexe (**Fig. 23**).

Tableau 1 : Quantité des solutions pour réaliser la courbe d'étalonnage

tubes	Blanc	T1	T2	T3	T4	T5
solutions						
Etalon BSA à 10 mg/ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Volume prélevé en ml						
Eau physiologique (NaCl 9‰)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Solution de Biuret						
Volume en ml	4	4	4	4	4	4
Quantité de protéines BSA/tube						
Concentration en mg/ml	0	2	4	6	8	10

3.4. Dosage des protéines :

Après avoir décongelé les échantillons que nous avons récoltés tout au long des trois semaines suivant l'immunisation, on a procédé à la dilution de tous les sérums à doser jusqu'à $1/10^{\text{ème}}$ puisqu'ils se sont avérés trop concentrés dans leur état brut.

Ensuite, dans un tube à essai, on y introduit 1 ml de l'échantillon dilué, auquel on ajoute 4 ml de la solution de Biuret. Les dosages des échantillons sont effectués en double essai comme décrit précédemment pour les protéines étalons.

4. Ring test ou test de l'anneau : (Photo 4)

4.1. Principe :

Ce test est basé sur la confrontation de deux solutions : l'adjuvant complet de Freund comme antigène et le sérum contenant éventuellement des anticorps spécifiques.

Après incubation de ce mélange dans des tubes capillaires (pipettes pasteurs), à l'obscurité pendant 48 heures, on observe si les concentrations respectives en anticorps et en antigènes sont judicieusement choisies pour se trouver dans la zone d'équivalence, la formation d'un anneau de précipitation blanchâtre à l'interface entre les deux solutions.

4.2. Procédure :

Dans le fond d'une pipette de pasteur disposée verticalement, on dépose 200 μ l d'immunsérum de lapin. A ce volume, on ajoute par-dessus 200 μ l d'ACF en laissant couler le liquide lentement le long de la paroi de façon à éviter de mélanger les solutions, ce qui permet d'avoir enfin deux phases hétérogènes non miscibles. Cette manipulation est réalisée de façon à tester les pools de sérums prélevés sur les trois semaines (**photo 2**).

5. Précipitation au Sulfate d'ammonium

Un mélange de plusieurs sérums récoltés durant les deux dernières semaines post immunisation (environ 30 ml) est soumis à une précipitation par addition de quantités croissantes de sulfate d'ammonium à l'état cristallisé. L'ajout du sel se fait par fractions sous agitation continue, dans un milieu froid (0°C) (**photo 5**). La quantité de sulfate

PARTIE PRATIQUE : Matériels et méthodes

-----2013

d'ammonium nécessaire pour précipiter la totalité des immunoglobulines est de 22,9 g pour 100 ml sérum, ce qui correspond à un taux de saturation de 40% annexe (**Tableau C**). Donc, pour 30 ml de sérum, nous avons utilisé 6g de sulfate d'ammonium.

Le mélange obtenu par précipitation est laissé décanter à 4°C pendant une heure pour permettre une parfaite précipitation des molécules et formation du culot. Ce dernier est récupéré par centrifugation pendant 30 minutes. Les substances précipitées sont ensuite resolubilisées avec du tampon PBS, puis dessalé pendant une nuit par une dialyse contre de l'eau distillée (**photo 6**). Le produit final constitue l'échantillon à chromatographier dans l'étape suivante.

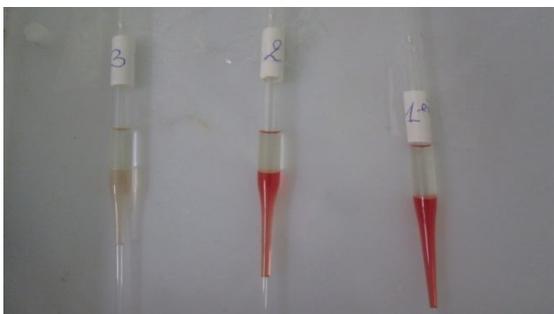


Photo 4 : Réalisation du ring test (début)
dans le sérum



Photo 5: Ajout du sulfate d'ammonium

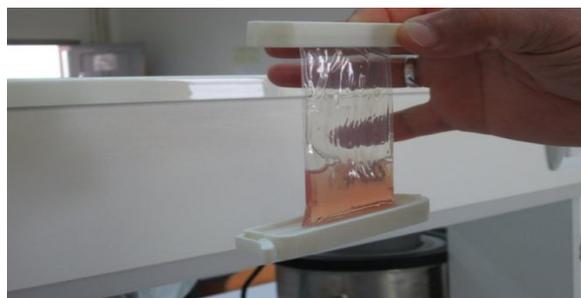


Photo 6 : Echantillon après dialyse dans le Boudin

6. Chromatographie sur gel Sephadex G-100 :

6.1. Principe:

La séparation par gel filtration met en jeu deux phases : une phase mobile (liquide) traverse une phase stationnaire (solide). Il s'ensuit une migration différentielle où les



divers composants initialement présents dans la phase mobile sont sélectivement séparés d'après leur taille et sont élués dans l'ordre des masses moléculaire décroissantes (*KAMOUN, 1977*).

Les grosses molécules ne pénètrent pas dans le gel et sont éluées très rapidement de la colonne chromatographique avec le volume mort, les plus petites molécules sont éluées tardivement puisqu'elles pénètrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement.

6.2. Procédure :

6.2.1. Préparation du gel :

Environ 6g de sephadex G-100 fournis sous-forme d'une poudre sèche, sont mis à gonfler dans un volume de tampon de PBS, Ph7 ,2 (voir composition chimique l'annexe) équivaut à15fois le poids du gel, soit approximativement 100ml de tapon. Le gel est ensuite placé dans l'autoclave bouillant à 90°C-100°C, pendant 5heures, pour dégazer parfaitement la solution. On élimine, par aspiration, les particules qui peuvent apparaître sur la surface. Le gel est enfin conservé a + 4 °C jusqu'à utilisation.

6.2.2. Remplissage de la colonne (Photos 7 et 8) :

Une burette de diamètre 1.1 cm a été utilisée comme colonne de filtration. A l'extrémité de celle-ci, on a introduit du coton en verre pour bloquer la phase solide, puis on l'a remplie soigneusement avec du gel Sephadex jusqu'à une hauteur de 55 cm.

La colonne remplie de gel a été équilibré par passage de volumes importants de tampon pendant plusieurs heures. Cette manipulation est nécessaire pour stabiliser et laver le gel en utilisant un débit d'écoulement constant de 15 ml/h.



Photo 7: Remplissage de la colonne.



Photo 8: Dépôt de l'échantillon.

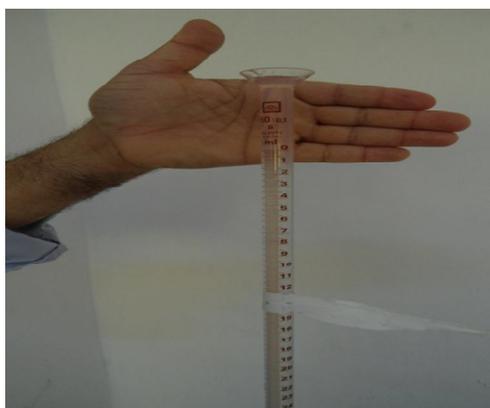


Photo 9: Diffusion et séparation de l'échantillon.

6.2.3. Technique:

Un pool reconstitué après précipitation au sulfate d'ammonium, d'un volume de 5 ml (environ 4,5 mg/ml) est passé à travers la colonne de Sephadex G- 100 (**Photo 9**). L'éluion des protéines séparées est réalisée à l'aide de 120 ml de tampon PBS, pH 7.2 et des fractions de 2,5 ml//tube sont recueillies.

La concentration des protéines éluées est suivie par lecture des DO au spectrophotomètre UV, à 254 nm. Les mesures d'absorbances sont effectuées par rapport à un blanc (tampon seul), et les valeurs obtenues nous ont permis de tracer la courbe de la densité optique (DO) en fonction du volume d'éluion (V_e) en ml (**Tableau 4**). Ensuite, des pools ont été effectués à partir des différents pics du chromatogramme. De chaque pool, on a aliquoté 3 ml d'échantillon dans un tube eppendorfs pour d'autres applications.

7. Dosage par immunoturbidimétrie (photo 10) :**7.1. Principe :**

L'échantillon contenant l'antigène (IgG) est mis en contact avec un excès d'anticorps spécifique (anti-IgG). Le mélange formé est déposé dans une cuve d'analyse à travers laquelle un faisceau lumineux traverse le complexe immunitaire soluble : une partie de la lumière incidente est absorbée, l'autre diffuse pour être transformée en lecture densitométrique.

Lors de la détermination du point final, l'accroissement de l'absorption dans une période donnée correspond à la concentration des immunoglobulines G.

7.2. Protocole :

La manipulation consiste à mettre en présence de l'échantillon contenant les IgG à doser (sérum du lapin) deux réactifs R1 et R2 de composition différente : le premier est composé de : tampon TRIS : 20 mmol, pH 8, NaCl : 200 mmol/l ; polyéthylène glycol (PEG) : 3,6% ; conservateur et stabilisateurs et le deuxième se compose d'anticorps anti-IgG, tampon TRIS : 20 mmol/l ; pH 8, NaCl : 15 mmol/l et de conservateur. L'addition du PEG est recommandée puisqu'il permet d'atteindre rapidement le point final, et augmenter la sensibilité de la réaction Ac-Ag en diminuant le risque d'obtention de résultats faussement négatifs pour les échantillons présentant un excès d'antigènes. Les anticorps anti-IgG réagissent avec les IgG de l'échantillon en formant un complexe en réseau (IgG-anti-IgG). La concentration de ce complexe, et par conséquent celle des IgG qui y sont présentes, est proportionnelle à la quantité du signal lumineux capté et transformé en lecture par l'appareil.



Photo 10 : Automate : Turbidimètre.

1. Résultats du dosage des protéines (Tableau 2) :

Les résultats suivants sont des résultats obtenus après dosages des protéines par la méthode de Biuret. Après le calibrage de l'appareil par les protéines BSA, les résultats des échantillons montrent une croissante augmentation de production de protéines dans les sérums animaux.

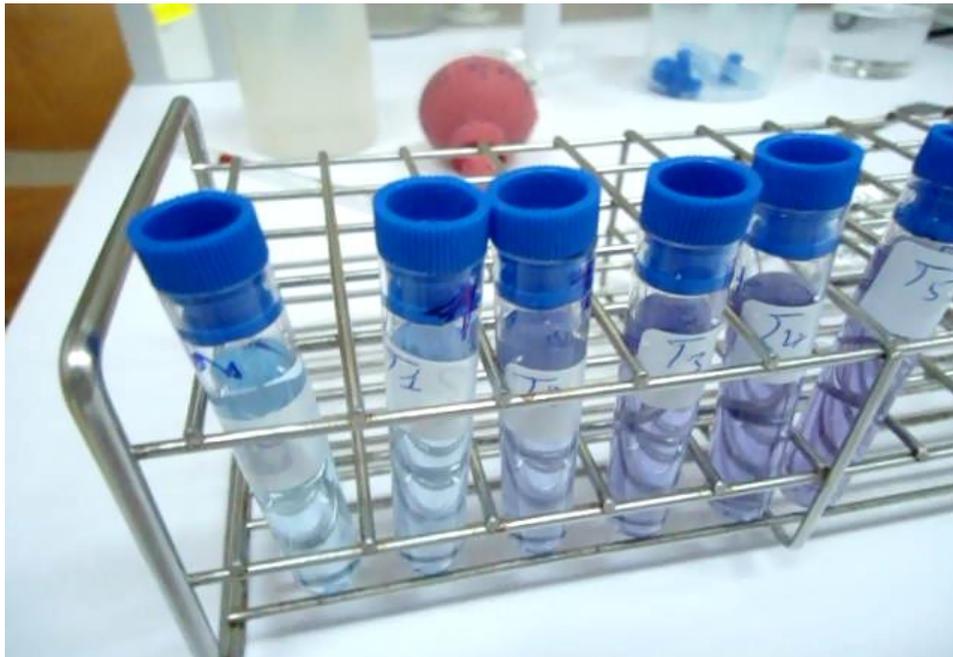


Photo 11: du dosage colorimétrique des dilutions du BSA.

Les résultats du dosage du BSA par la méthode de Biuret montrent une nette augmentation de la densité optique au fur et à mesure que la concentration du BSA augmente (**Tableau 2**). Il en est de même pour les protéines sériques récoltées tout au long de l'expérimentation. Lorsqu'on immunise un animal, ce dernier répond à l'immunisation en produisant des anticorps spécifique contre l'antigène inoculé. Cette production d'anticorps se manifeste par un taux élevé de protéines, ce qui a augmenté la densité optique (**Tableau 3**).



PARTIE PRATIQUE : Résultats et discussions

-----2013

Tableau 2: Résultats des DO issues du dosage colorimétrique des dilutions du BSA par la méthode de Biuret.

	Blanc	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
Etalon BSA à 10mg/ml volume prélevé en (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau physiologique (NaCl 9%) volume en (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	00
Solution de Biuret volume en (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de protéine BSA/tube concentration en mg/ml	0	2	4	6	8	10
Lecture de la D.O. à 540 nm	00	0,049	0,126	0,228	0,312	0,388

Tableau 3: dosage de l'échantillon brut par le bleu de Biuret.

Sérum	1 ^{ère} semaine post-immunisation	2 ^{ème} semaine post-immunisation	3 ^{ème} semaine post-immunisation
Solutions			
Echantillon en ml	1	1	1
Solution de Biuret	4	4	4
Lecture de D.O. à 540 nm	0,208	0,231	0,245
Concentration de l'échantillon en mg/ml	5,65	6,225	6,575

2. Résultats du dosage des protéines par le "ring test" (test d'anneau) :

Sur la **photo 12**, après la réaction du sérum avec l'ACF, on peut voir clairement la formation d'anneaux, de couleur blanchâtre. La formation de ces anneaux dans la zone d'équivalence, prouve que l'animal a réagi parfaitement à l'immunisation.

Le ring test est en fait une technique qualitative qui ne permet pas de déterminer la quantité de protéine produites mais se fier seulement à montrer la présence d'une substance induite par l'immunogène. Cela a permis de concrétiser la notion de réaction spécifique

antigène-anticorps par rapport puisqu'il a eu formation d'anneaux dans ces dernières réactions, de complexe immun et de zone d'équivalence à l'endroit où s'est formé le complexe immun ou les anneaux. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres recherches (*MICHEL, 2007*).

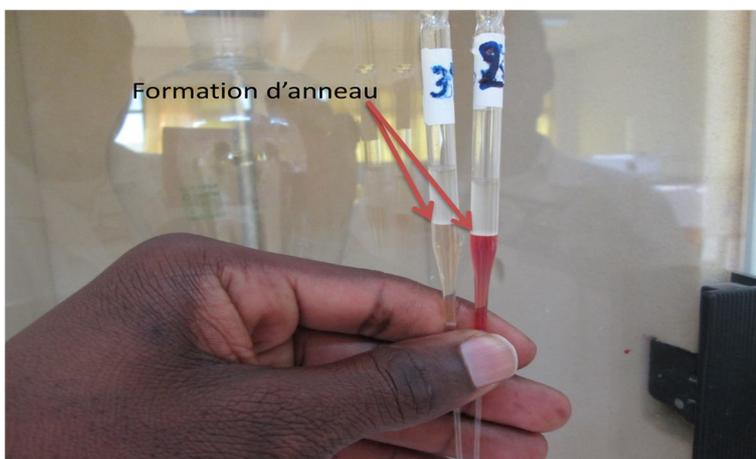


Photo 12: formation d'anneau.

3. Résultats de la précipitation au sulfate d'ammonium :

En présence de 35-40 % de sulfate d'ammonium, les protéines (immunoglobulines) précipitent. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres recherches (*JEJIOZEM G.C.H. 2007*) ; (*GARAUD J.C. et ROUSSEL G., 2011*) ; (*DESCACHT. N, et al 2010*).



Photo 13 : Mélange laiteux du sérum.
avec le sulfate d'ammonium.

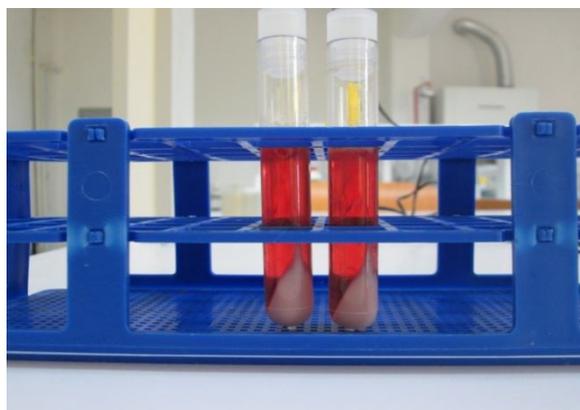


Photo 14: Précipité des immunoglobulines.
après centrifugation.

4. Résultats de la chromatographie d'exclusion -diffusion

Les résultats représentés dans le (Tableau 4) découlent de l'absorbance des échantillons élués après chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G-100.

Tableau 4 : valeurs des DO à 285 nm des différentes fractions collectées.

Tubes	D.O.	Tubes	D.O.
1	0,012	17	0,036
2	0,011	18	0,043
3	0,014	19	0,070
4	0,456	20	0,084
5	0,560	21	0,212
6	0,298	22	0,292
7	0,280	23	0,253
8	0,300	24	0,251
9	0,368	25	0,128
10	0,251	26	0,129
11	0,215	27	0,103
12	0,077	28	0,064
13	0,027	29	0,021
14	0,017	30	0,004
15	0,011	31	0,002
16	0,006	32	0,001

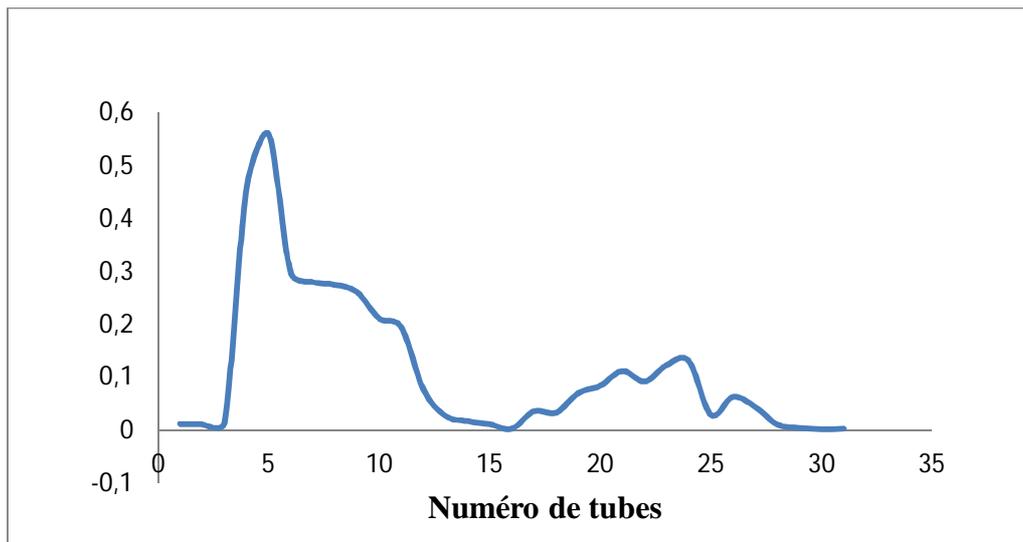


Figure 22 : Profil d'absorbance à 285 nm des différentes fractions protéiques du sérum séparées par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G-100.

Ce chromatogramme montre que le mélange protéique a été fractionné majoritairement en 4 pics distincts. La première partie de la courbe montre nettement un pic assez développée par comparaison aux autres pics élus par la suite. Ce grand pic, qui correspond à la fraction protéique majeure, est situé entre les tubes 4 et 16 qui apparaissent juste après le volume mort. Les trois autres fractions protéiques sont obtenues dans les volumes situés entre 40 et 80 ml. Elles sont représentées par des pics ayant des profils presque identiques, indiquant une résolution ou séparation presque identique.

Ces résultats permettent de conclure que ce mélange est hétérogène, constitué par la diversité de protéines n'ayant pas sûrement la même taille, et ne possédant pas un même comportement physico-chimique. La première partie du chromatogramme (1^{er} pic) est représentée par les immunoglobulines dont la masse moléculaire est environ 150 Kda et la seconde partie (les autres pics) par l'albumine (65 Kda) et les globulines (α - et β -globulines).

La chromatographie d'exclusion bien qu'elle soit une technique de base qui se révèle utile dans la séparation des mélanges biologiques, elle ne peut en aucun cas aboutir à un taux de purification assez satisfaisant, sauf si elle est combinée et/ou complétée par d'autres techniques de purification comme la chromatographie d'affinité, l'électrophorèse ou la chromatographie d'échange ionique. En effet, cette dernière est couramment utilisée comme technique analytique complémentaire dans le but d'augmenter le taux de pureté des différentes macromolécules séparées (les immunoglobulines y compris) après d'autres étapes préparatoires. Comme les immunoglobulines sont les composants du sérum les plus chargées,

par rapport aux autres protéines qui y sont présentes (les albumines notamment), l'échange ionique pourrait évidemment suivre l'étape de gel filtration pour améliorer l'aspect analytique des immunoglobulines G et augmenter leur degré de pureté.

5. Résultats du dosage des immunoglobulines G :

Les résultats suivants (**Tableau 5**) sont obtenus après dosage des immunoglobulines G par la méthode de la turbidimétrie.

Tableau 5 : Résultats du dosage d'immunoglobuline G.

Echantillons	Echant. négatif	Echant. 1 ^{ère} semaine	Echant. 2 ^{ème} semaine	Echant. 3 ^{ème} semaine	Echant. 4 ^{ème} semaine	Echant. après dialyse	Echant. après chromatographie
Résultats (mg/ml)	2,76	3,26	3,78	4,29	4,23	4,44	2,67

A partir de ces résultats, nous constatons une nette augmentation de la concentration des IgG au fur et à mesure que les jours passent (**Fig. 23**). En partant donc de la plus faible concentration obtenue pour le sérum négatif, avec une concentration minimale (2,76 mg/ml), on a passé, dans trois semaines après l'immunisation, à la valeur maximale, soit une concentration de 4,29 mg/ml. Cette augmentation de concentration signifie qu'il y'a eu une conséquente augmentation des IgG du lapin, ce qui veut dire qu'il s'est produit une induction positive de la réponse immunitaire par l'animal, qui s'est traduite par la production d'anticorps spécifiques vis-à-vis de l'immunogène utilisé (ACF). Après la 3^{ème} semaine post immunisation, dès la 4^{ème} semaine, on a remarqué une stabilité de la concentration des immunoglobulines (un plateau de pics), ce qui correspond normalement à la phase optimale de la réponse immunitaire. Par ailleurs, Il est évident de constater après dialyse, une légère augmentation de la concentration puisque normalement les protéines se concentrent par perte de certaines molécules de petite taille qui vont diffuser à travers la membrane de dialyse, semi-perméable en amenant avec elles une quantité d'eau. Néanmoins, on a pu observer une diminution assez importante de la concentration des immunoglobulines G qui ne peut être



PARTIE PRATIQUE : Résultats et discussions

2013

interprétée que par une éventuelle perte ou adsorption des protéines par la phase stationnaire (le gel) lors de la chromatographie, sans oublier en fait que les protéines éluées dans la colonne ont subi une forte dilution par le solvant (le tampon d'éluion).

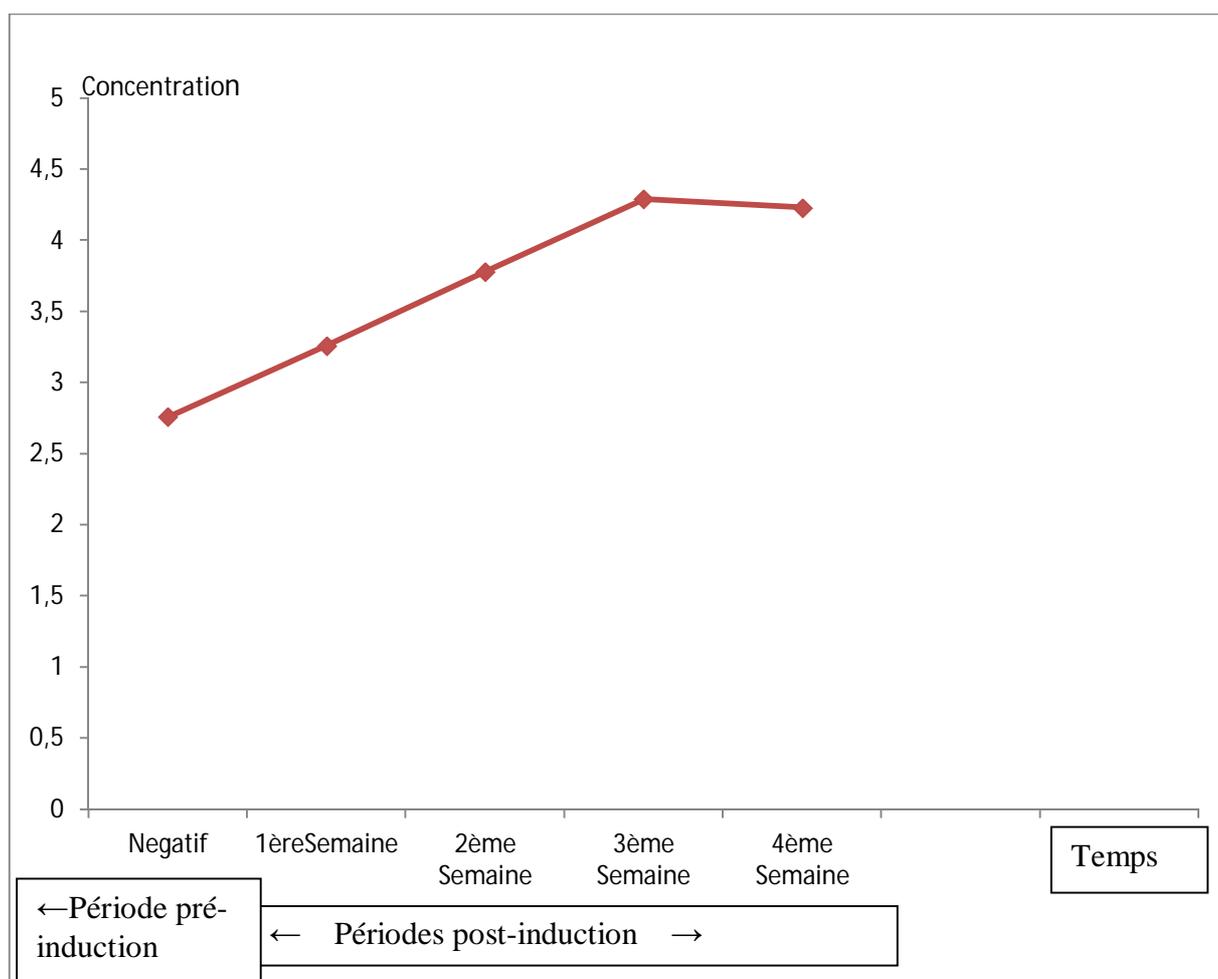


Figure 23 : Résultats de la courbe de dosage d'immunoglobuline G.



Les immunoglobulines, en tant que biomolécules actives et spécifiques, constituent un groupe hétérogène de macromolécules qui se différencient par leur poids moléculaire et leur activité biologique, capables de reconnaître des déterminants antigéniques diversifiés avec des affinités distinctes.

L'importance des immunoglobulines dans plusieurs domaines de recherche et d'investigation (immunobiologie, immunogénétique, médecine, etc.) a conduit plusieurs chercheurs à encourager toute initiative devant aider à l'obtention et à la préparation des immunoglobulines polyclonales et monoclonales.

Leur emploi en pratique a engendré un énorme bouleversement dans le potentiel diagnostique et thérapeutique, et a permis d'avoir de considérables progrès dans le domaine de la recherche fondamentale.

Notre travail s'est porté sur deux approches : en premier lieu la production et quantification des anticorps et en second lieu la purification des immunoglobulines.

L'approche de production des anticorps nous a permis de constater comment le système immunitaire réagit face à une attaque que ce soit bactérienne, virale ou autre et ainsi mettre en évidence la réponse produite durant un moment face à un antigène connu.

L'approche purification des immunoglobulines nous a permis de mettre en évidence plusieurs techniques biochimiques qui s'avèrent nécessaires pour l'isolement et le traitement analytique des différentes biomolécules, en particulier les protéines globulaires telles que les immunoglobulines.

Les résultats obtenus laissent voir une augmentation des protéines sériques tout au long de l'expérience, en même temps une confirmation de la réaction du système immunitaire contre l'adjuvant complet de Freund. Il serait difficile de dire si les immunoglobulines G obtenues sont pures ou non par manque d'analyses approfondies.

Cette étude mérite d'être poursuivie et complétée par d'autres techniques plus rentables et spécifiques en l'occurrence la chromatographie d'échange ionique et la chromatographie d'affinité. Cette dernière s'avère, d'après les données de la littérature, plus productive puisqu'elle permet le plus souvent de purifier les immunoglobulines à homogénéité, en se basant sur une réaction spécifique antigène-anticorps.



♠ DOCUMENTATIONS

- ❖ **ABUL K. Abbas et ANDREW H. Lichtman** : Les bases d'immunologie fondamentale et clinique, paris 3^{ème} édition ;(2009) ,273p.
- ❖ **AMBROISE Martin** : introduction au laboratoire de biochimie médicale ; édition Ellipses ; rue bargue 75015. Paris (1995) ; 239p.
- ❖ **BENZAIR Abdou-bacir** : immunologie : les connaissances de base,3^{ème} édition o.p.u, (2009) ;p244.
- ❖ **CHAPEL Helen, MANSEL Haenel, SIRAJ Misbah et NEIL Snowden**: Immunologie Clinique, de Boeck, 4^{ème} édition. Masson; Paris : Juillet 2004 Paris, bibliothèque royale Albert ; Bruxelles ; 2004/0074/16S, (2004) ,345p.
- ❖ **DESCACHT Nick, GRAEVE Kurt, VINCKE Cécile, RAES Geert, DE BAETSELIER Patrick et MUYDERMANS Serge**, A novel promiscuous class of comelids single-domain antibody contributes to the antigen binding repertory. The journal of immunology,(2010); pages 5696-5704.
- ❖ **ED Harlow et LANE David** : Anticorps un manuel de laboratoire, édition Pradel, (1991) ,726p .
- ❖ **ESPINOSA Eric et PASCAL Chilet** : immunologie ; ellipses ; paris 32 rue bargue 75740, (2006) ,432p.
- ❖ **GARAUD Jean-Claude et ROUSSEL Guy**, immuno-histologie en microscopie photonique et électronique, édition IAC. ODT : pages 189-191
- ❖ **GAVRILOVIC Michel, MAGINOT Marie-Josèphe, Jean WALLACH** : Manipulation d'analyse biochimique, nouvelle édition Doin, (1996), 503p.
- ❖ **GERALD Karp** : Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments ; 3^e édition, de Boeck, mars (2010), 819p.
- ❖ **GOROCHOV Guy et PAPO Thomas**: Immunologie; collection diriger par olivier bletry ; paris, (2000) ,479p.
- ❖ **JANEWAY Charles Alderson et TRAVERS Paul** ; Immunologie ,1^{ère} édition française, 2^{ème} édition américaine, Deboek, (2003) ,792p.
- ❖ **JANEWAY Charles Alderson, TRAVERS Paul, WALPORT et Shlomchik** : Immunobiologie ; 2^{ème} édition Française, 5^{ème} édition américaine, de Boeck, Paris, Bruxelles, (2003) ,782p.



Références bibliographiques

-----2013

- ❖ **JEJIOZEM Géraud Chancelin Hellow**, utilisation des produits biologique d'origine équine en thérapeutique humaine : thèse de doctorat en science et médecine vétérinaire. Université de Dakar Sénégal, 2007
- ❖ **KAMOUN Pierre** : Appareils et méthodes en biochimie, 2^{ème} édition, édition Flammarion médecine sciences, paris ;(1977); 236p.
- ❖ **KARP Gerald** : Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments ; 3^e édition, de Boeck, mars (2010), 819p.
- ❖ **LYDYARD Peter M., WHELAN Alexis et FANFER. Michael W.** : l'essentiel en immunologie, édition Berti, (2002) ,484p.
- ❖ **MALE David, JONATHAN B, DAVID Brott, IVAN R** : Immunologie; 7^{ème} édition ; Elsevier ; rue Camille-Desmoulins, (2006 -2007) ,624p.
- ❖ **MAROUF Abderrazak** : analyse instrumentale à l'usage des biologistes ,2^{ème}Edition, édition DAR ELGHARB ; (2001- 2002) ; 280 p.
- ❖ **NATHALIE Marie et KALOPP Sarda MCV-PH** : laboratoire d'immunologie centre de biologie Lyon sud, (octobre 2009) ,120p.
- ❖ **PARHAM Peter**: le système immunitaire, édition de Boeck, paris et Bruxelles, p 406 (2003).
- ❖ **PONVERT Claude, PAUPE Jean et CRISCELLI Claude** : Immunologie fondamentale et Immunopathologie, 2^{ème} édition ; édition ellipses; (1991) ,377p.
- ❖ **ROITT Ivan Maurice et DELVES Peter J** : Essentiel immunology ; édition tenth ; (2001), 473p
- ❖ **ROITT IVAN ; BROSTOFF Jonathan et MALE David** : Immunologie 3^{ème} édition ; de Boeck, (2002) ,496p.
- ❖ **SINE Jean-Pierre** : Biochimie-biologie, séparation et analyse des biomolécules ; édition Ellipses ; paris cedex15 ;(2003), 248p.
- ❖ **VAUBOURDOLLE Michel**: Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques collection le moniteur, Tome 1, 3^e édition, (2007), 1048 p.
- ❖ **VOET Donald et VOET G. Judith.** : Biochimie dynamique, 2^{ème} édition, de Boeck, (2005), 1579p.



♣ RECHERCHES ELECTRONIQUES :

[1] : Synthèse et structures des immunoglobulines

<http://www.chupsr/polys/immun/anticorps1/syntheseetstructuredesimmunoglobulines.pdf>

(consulté le 27/ 02 /2013)

[2] : Immunoglobuline <http://fr.wikipedia.org/wiki/> consulté le 28/02/2013)

[3] : Les immunoglobulines : structure et fonction

<http://www.chufes.ma/amirf/cours/biologie/38.pdf> (consulté le 27/ 02 /2013)

[4] Protéines plasmatiques

<http://www.lbmroa.com/Divers/proteineplasmatique2006-2007.pdf>(consulté le 07/ 03 /2013)

[5] : Immunoglobuline E

http://fr.wikipedia.org/wiki/Immunoglobuline_E(consulté le 17/ 04 /2013)

[6] : Structure d'un anticorps

http://www.pasteur.mg /2004/PDF/presentations/said-salim_s3.pdf(consulté le 18/ 02 /2013)

[7] : [http://www.ured-do.com/immunologie parasitaire partie iv PDF](http://www.ured-do.com/immunologie_parasitaire_partie_iv_PDF) consulté le 01/03/2013)

[8] : propriété des immunoglobulines

<https://www.google.com/#hl=fr&scie=+immunoglobulines&gsl=ser> (consulté le 25 2 2013)

[9] : Généralité sur les immunoglobulines et leur fonction

<http://allergo.lyon.fr/2009-2010/07-ImmunoglobulinesM12009.pdf> (consulté le 27/ 02 /2013)

[10] : Cours de techniques immunologiques

<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/immuno/lepoly/chap.ii/texte2.html> (consulté le 25/02 /2013)

[11] : Les chaines, variables, légère, anticorps

http://e-sante.futura-sciences.com/_forum/regions-chaine-legere.html

[12] : http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_FR/DifferenciationB/

(consulté le 25/02 /2013)

[13] : Immunologie : immunoglobulines structure et fonction

www.microbiologybook.org/french-immuns/chap4htm (consulté le 28/02/2013)

[14] : Structures primaire d'immunoglobuline

<http://www.rad.univ-anpers.fr/jaspard/page ?cours/7restructionfoncture/3structure/1structure primaire quat/6-pont de sulfure htm> (consulte le 27/02/2013)

[15] : <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorial/IGandBcells/FR/Genetique/fig5.png>

(consulté le 25/02/2013)

[16] : Activation des cellules immunocompétentes

http://lsialab.com/userfiles/htmleditor/file/news/News_IgG4_fr.pdf (consulté le 27/ 02 /2013)



Références bibliographiques

-----2013

[17]: **The human igg subclasses, revised and edited by Chandra Mohan, ph. d; asthma and allergy center Johns Hopkins University School of medicine Baltimore, md21224**

<http://wolfson.huji/purification/pdf/calbiochemHumanIgGSubcla.pdf>(consulté le 7/ 02 /2013)

[18]: **Les techniques en immunologie**

<http://www.fmp-usmba.ac.ma/umvf/UMVFMiroir/campus-numeriques/campus-immunologie/www.assim.refer.org/techniq.pdf>(consulté le 11/03/2013)

[19]: **The science of immunization questions and answers november2012**

<http://www.yumpu.com/docu/4428584/as-immunisation-final-hr-v3> (consulté le 06/03/2013)

[20] : **principes généraux d'immunologie et d'immunisation**

<http://publications.msss.gouv./acrobat/f/documentation/piq/chap1.pdf>(consulté 04/0 3/2013)

[21] : **Anticorps polyclonaux** <http://fr.wikipedia.org /anticorps poly> (consulté le 28/02/2013)

[22] : **Cour immunisation : principes de base en immunologie**

<http://www.boucher.cc/etudiants/files/cours%20immunisation.pdf>(consulté le 05/03/2013)

[23] : **Boumendjel-Messarah Amel. Cours de techniques immunologiques : chapitre i - les immunoglobulines** laboratoire de recherche en biochimie et microbiologie appliquées. Unité d'immunologie. Département de biochimie. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba (Algérie). www.djamic.net/immuno/chapitre%202.htm(consulté le 11/01/2013)

[24] : **La vaccination : quels sont les différents types de vaccins: anticorps, infections,**

<http://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/vaccination-depistage/vaccination/quels-sont-differents-types-vaccins>(consulté le 28/02/2013)

[25] : **Espace étudiant cours de virologie générale : les vaccins antiviraux**

<http://www.microbe-edu.org/etudiant/vaccin-antiviro.html>(consulté le 30/02/2013)

[26] : www.phal-aspl.gc.ca/publicat/cig-gci/p05-01.fra.php(consulté le 25/02/2013)

[27] : www.infectiologie.com/biotchlerncent.pharma.c/3180-3immunisation-active-et-passive (consulté le 18/02/2013)

[28] : **Infections communes chez l'enfant, François Boucher, md mai 2009**

<http://www.boucher.cc/etudiants/files/immunisation.pdf>(consulté le 05/03/2013)

[29] : <http://www.cons-dev.org/elearning/ethic/ea6.html> (consulté le 07/03/2013)

[30] : **Première partie : les techniques des productions des anticorps ; production des anticorps**www.uvt.rnu.tn/cours/libres/abreges-illustres.../partie1.pdf (consulté le 09/03/2013)

[31] : **Vaccination** <http://fr.wikipedia.org/wiki/vaccination> (consulté le 28/02/2013)

[32] : **Les vaccins sous unité**

http://biosol.esitpa.org/liens/vaccins_2004/lesvaccinssous_unite.htm (consulté le 15/02/2013)



[33] : Les vaccins vivants recombinants

<http://biosol.esitpa.org/liens/vaccin2004/lesvaccinsrecombinant.htm> (consulté le 15/02/2013)

[34] : www.e-sante.futurescience.com/vaccin.genetique.htm(consulté le 12/02/2013)

[35] : www.principale.training.com/pdf/frgiving%20injections.pdf(consulté le 23/02/2013)

[36] : L'injection sous-cutanée : S/C

www.soins-infirmiers.com/injection_sous_cutanee.php(consulté le 23/02/2013)

[37] : L'injection intramusculaire : IM

www.soins-infirmiers.com/injection_intramusculaire.php(consulté le 9/02/2013)

[38] : www.unige.ch/medecine/enseignement/fr/inj_im_iv.pdf (consulté le 12/02/2013)

[39] : Les différents types des injections

www.infirmier.com/pdf/cours-en/injection-parenterale.pdf.france(consulté le 17/02/2013)

[40] : www.isggb.rnu.tn/imgcommon/Go-thème3.pdf(consulté le 6/03/2013)

[41] : [www.orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/1/4mistretta.prodAc\(5\).pdf](http://www.orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/1/4mistretta.prodAc(5).pdf)(consulté le 28/02/2013)

[42] : Thèse alexandrenne Coralie universite paris xi faculte de médecine paris sud. Ecole doctorale « innovation thérapeutique : du fondamentale » pole immunologie : apports de l'immunisation génique a l'obtention d'anticorps

http://tel.archivesouvertes.fr/docs/00/35/10/80/PDF/These_Alexandrenne_Coralie_2007_CE_A-iBiTec-S.pdf.pdf (consulté le 11/03/2013)

[43] : La chromatographie

<https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:3dhjwulohej:laroche.lycee.free.fr/barrandon/spadgeesih6mx8fqwcgsqoymg3s3fla7ggqftnsfggqhulbarwpdf> (consulté le 16/03/2013)

[44] : Chromatographie

<http://www.ac-nancy-metfr/enseign/chim/chromato01/chromato.pdf>(consulté le 11/03/2013)

[45] : Méthodes chromatographiques

http://www.physagreg.fr/Cours2nd/Chimie/Theme1/Cours/Chimie-Chapitre3-fiche_chromatographie.pdf (Consulté le 18/04/2013)

[46] : Classification des méthodes chromatographiques for chromato-liquide-2007_files

<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/phy/chimccm/ccmcaadr.htm>. (Consulté le 1/04/2013)

[47] : Chromatographie liquide

<http://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/hplc/docum/chapitre4.pdf>(Consulté le 11/03/2013)

[48] : Résine à échange ionique

http://www.carloerbareagenti.com/repr/catchem100_13_resine_fr.pdf(consulté le 8/04/2013)

[49] la chromatographie en phase liquide (CPL)

<http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/chromato2/chromato2.pdf>(Consulté le 25/03/2013)



Références bibliographiques

-----2013

[50] : la chromatographie et électrophorèse

[51] : Séparation par électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose des protéines du sérum de lapin immunise ou non : <http://pauline.boulongne.pagesperso-orange.fr/ex-ts/electro-serum-lapin.pdf> (consulté le 29/03/2013)