

Autres méthodes d'authentification basées sur l'analyse des protéines : les méthodes immunochimiques

Les méthodes immunochimiques sont basées sur une réaction entre un **antigène*** et un (ou plusieurs) **anticorps*** qui permet de reconnaître spécifiquement une molécule recherchée. Ces techniques sont nombreuses, les deux principales méthodes utilisées en authentification d'espèces halieutiques sont décrites: une méthode qualitative (l'immunodiffusion) et une méthode quantitative (le test ELISA).

L'immunodiffusion

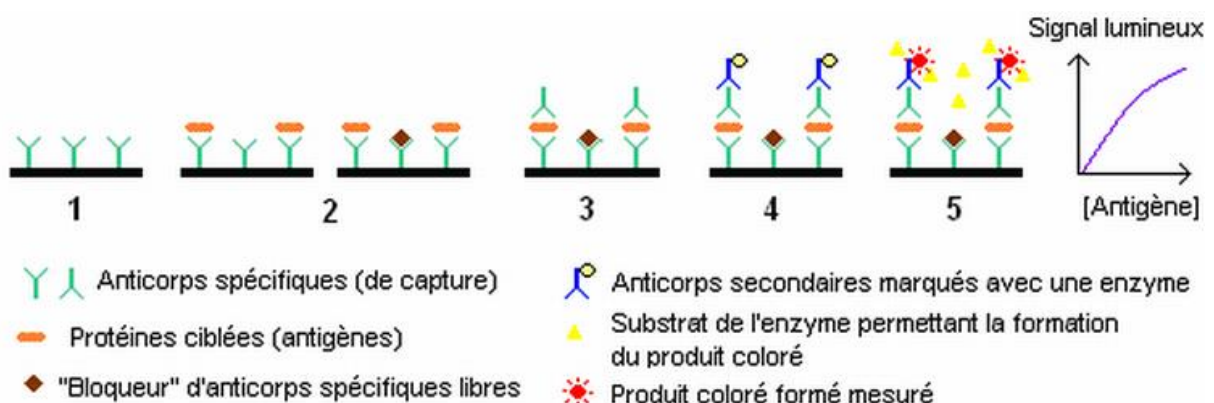
Cette technique consiste à **diffuser des anticorps*** spécifiques sur une **gélose** disposant de puits dans lesquels les protéines à tester ont été déposées (jouant le rôle d'**antigène***). Si les anticorps rencontrent la protéine qui leur est spécifique, ils vont former un complexe qui va précipiter. Le **résultat** peut ainsi être **observé directement**.

Le test ELISA

Le **test ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permet non seulement de savoir si la protéine recherchée est présente mais aussi en quelle quantité. Technique en double sandwich :

- 1 ⇒ Des **anticorps*** spécifiques (de capture), capables de lier spécifiquement l'**antigène*** ciblé (protéine), sont fixés à une micro-plaque.
- 2 ⇒ La solution à tester est déposée dans les puits de la microplaque et si la protéine recherchée (**antigène***) est présente, elle se lie spécifiquement à l'anticorps.
La plaque est ensuite « passivée » avec un « bloqueur » pour éviter que les anticorps non liés aux protéines recherchées ne se fixent « par erreur » aux anticorps secondaires, et n'interfèrent dans les étapes suivantes.
- 3 ⇒ Les **anticorps*** spécifiques sont de nouveau ajoutés, afin de « prendre en sandwich » la protéine ciblée.
- 4 ⇒ Des **anticorps*** secondaires marqués (avec un **fluorochrome*** ou une **enzyme*** permettant la formation d'un produit coloré) se lient sur les **anticorps*** spécifiques fixés à la protéine recherchée.
L'**anticorps*** secondaire est un anti-anticorps de synthèse (anti-**immunoglobuline*** - anti IgG) non spécifique de l'**antigène*** à doser, à reconnaissance large, qui se fixe sur tous les **anticorps*** animaux. Il est plus facilement disponible et beaucoup moins coûteux que les **anticorps*** spécifiques, c'est pourquoi il est utilisé pour le marquage.
- 5 ⇒ Révélation : le substrat de l'**enzyme*** est ajouté, le produit coloré est formé (ou le signal fluorescent est émis). La réaction peut être quantifiée par colorimétrie (ou spectrophotométrie) à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'**antigène*** (le nombre de molécules d'**anticorps*** secondaires fixées dépend du nombre de molécules d'**antigènes*** immobilisées par l'**anticorps*** spécifique).

Entre chaque étape, plusieurs lavages avec un tampon sont nécessaires.



Ces méthodes sont très spécifiques mais il est parfois difficile de produire ou de se procurer l'anticorps recherché. Elles sont assez peu développées pour l'identification d'espèces halieutiques étant donné la diversité des espèces.

Bibliographie

Masseyeff R. (1997). Chap. 8 : Méthodes immunochimiques. *In* : Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Edited by P. Kamoun. Flammarion Médecine-Sciences : 231-284.

Reid L.M., O'Donnell C.P., Downey G. (2006). Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends in Food Science & Technology* **17** (7) : 344-353.

Skarpeid H.J. *et al.* (1999). Fish, shellfish and fish eggs. *In* : Food authenticity – Issues and methodologies. F.A.I.M. Concerted Action n° AIR3-CT94-2452. Eurofins scientific Ed, ISBN n° 2-9512051-0-4. p.105-117.

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/immu6el1.htm>