

## Chapitre II- Méthodes d'étude de la cellule

Les cellules sont de très petite taille et d'organisation très complexe. Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule :

- \* les techniques morphologiques.
- \* les techniques chimiques et biochimiques.
- \* les techniques physiologiques.

Ces techniques sont toutes basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques.

### 1.LA MICROSCOPIE

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le microscope (photonique ou électronique) permet d'observer sur une coupe très fine les détails infiniment petits d'un objet (animal, plante).

Le principe est dans tous les cas le même : **une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation**. Cette onde est captée par **un objectif** qui la concentre et passe par **un oculaire** qui crée **une image observable**. Cette image est soit observée **à l'œil nu, soit photographiée**, soit enregistrée par **caméra CCD** et stockée sur ordinateur pour retraitement.

**1.2. Les types de microscope** la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée :

- le microscope optique, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des photons.

le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet.

### A : LA MICROSCOPIE OPTIQUE OU PHOTONIQUE

\*Le microscope optique est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions et de séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain.

\*Tous les microscopes sont caractérisés par leur **pouvoir séparateur** (pouvoir de résolution c'est à dire la distance limite appréciable entre 2 points et aussi limite de résolution). Un microscope photonique à transmission distingue des objets tout au plus distant de 0,2 µm.

**Le grossissement** d'un objet est le produit du grossissement de l'objectif par celui de l'oculaire.

•On parle de grandissement pour un objectif et de grossissement pour un oculaire et de grossissement final d'un microscope (grandissement objectif x grossissement oculaire).

\*Il existe divers types de microscopes photoniques :

- les uns permettent **l'observation directe de structures** dont les dimensions sont de l'ordre de  $0,2 \mu\text{m}$  ce sont les **microscopes par transmission**.
- les autres microscopes donnent des **informations indirectes** sur l'ultrastructure des cellules = **microscope à lumière polarisée, microscope à fond noir et microscope à contraste de phase**.
- le microscope confocal à balayage.

### Microscopes par transmission

Le microscope le plus courant utilise la lumière visible qui est transmise directement sur la préparation biologique. Ces microscopes sont équipés de système de lentilles qui condensent la lumière sur la préparation à observer. **Les échantillons biologiques observés sont traversés par la lumière.**

### Le microscope à contraste de phase

Ce type de microscope est largement utilisé pour l'observation de **cellules vivantes non fixées**. Son principe repose sur **l'amplification des contrastes naturels** en mettant à profit les différences **d'indices de réfraction entre les organites** ; qu'il transforme en différences d'intensités de lumières qui sont alors visibles à l'œil.

### Le microscope à fond noir

Il permet de révéler certains détails lors de l'observation des **cellules vivantes**, en augmentant les **contrastés** naturels. Dans ce type de microscope, la source de lumière est **oblique** par rapport à la préparation cellulaire. Un condenseur spécial éclaire la préparation sous une incidence rasante, seul les **rayons réfléchis** sont captés par l'objectif : le fond du champ d'observation est noir, et le moindre objet apparaît brillamment éclairé.

### Le microscope à lumière polarisée

Il permet de détecter des **structures biréfringentes** qui ont une organisation moléculaire particulière, telles que les microtubules et les chloroplastes et parois des cellules végétales.

On place entre **deux filtres croisés** un **objet actif** sur la lumière polarisée, tel qu'une substance organique possédant un carbone asymétrique ou un arrangement moléculaire ordonné le plan de polarisation est dévié et l'extinction est levée, la lumière issue de l'objet traverse le second filtre. Il faudra opérer une rotation du second filtre pour obtenir à nouveau l'extinction.

### **Le microscope à rayons UV (= à fluorescence)**

Ce microscope est semblable au microscope photonique ordinaire, sauf qu'il est muni d'une source de **rayon UV** (lampe à UV) et d'un **système de filtre qui permet de choisir la longueur d'onde des UV** appropriés pour chaque substance. Il est le plus souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à **un fluochrome** ; à titre d'exemple, on peut aussi détecter la présence d'insuline dans une cellule avec anticorps Anti-insuline marqué par fluorescence.

est généralement utilisé pour les échantillons non colorés. L'image obtenue a un fond (l'arrière-plan de l'observation) sombre, presque noir

## **B. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**

La **résolution** d'un microscope électronique peut atteindre **2 angströms**. Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf qu'au lieu des photons ce microscope fonctionne avec **des électrons** le faisceau est produit et accéléré par un canon à électrons (cathode et anode percée). Les lentilles de verre sont remplacées par des **bobines électromagnétiques** ("lentilles" électromagnétiques) seules capables de focaliser les électrons, et de créer des images. Avec ces microscopes on ne peut examiner que des **cellules tuées**, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques Å. On aura donc accès à l'ultra structure des organites.

### **Types de microscopes électroniques**

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

la microscopie à transmission

la microscopie à balayage

### **Microscope électronique à transmission :**

En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée.

**Microscope électronique à balayage (scanning) :**

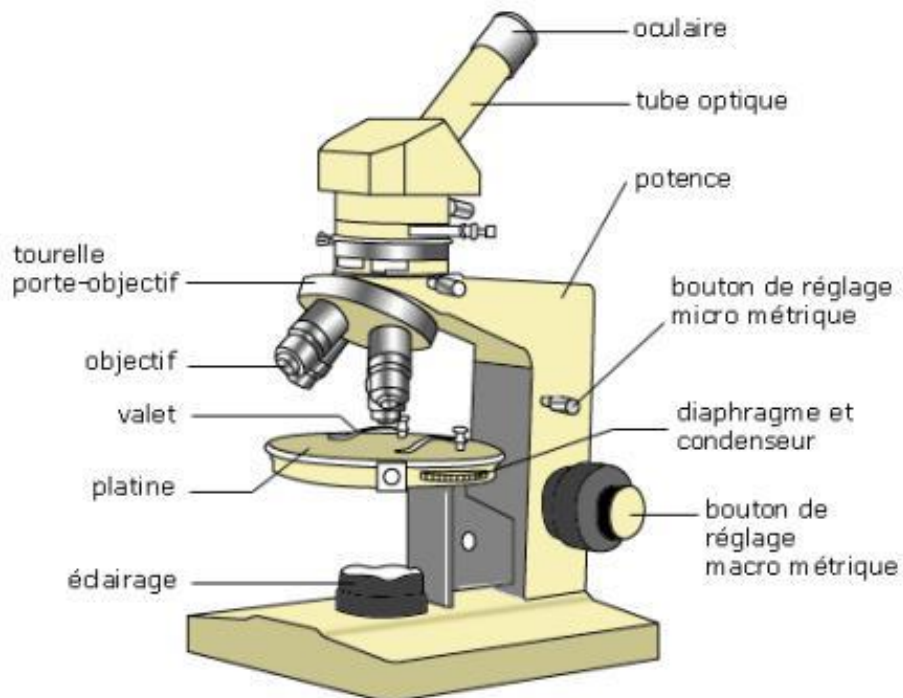
Bien que de résolution plus faible que la précédente, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en pseudo 3D. Le flux d'électrons **balaye la surface de l'objet au préalable recouvert d'une couche métallique**. Ce sont **les électrons secondaires**, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour **fournir une image**. Cet appareil a un pouvoir séparateur est plus faible que celui du microscope à transmission.

**Tableau 1** : Les différents types des microscopes optiques

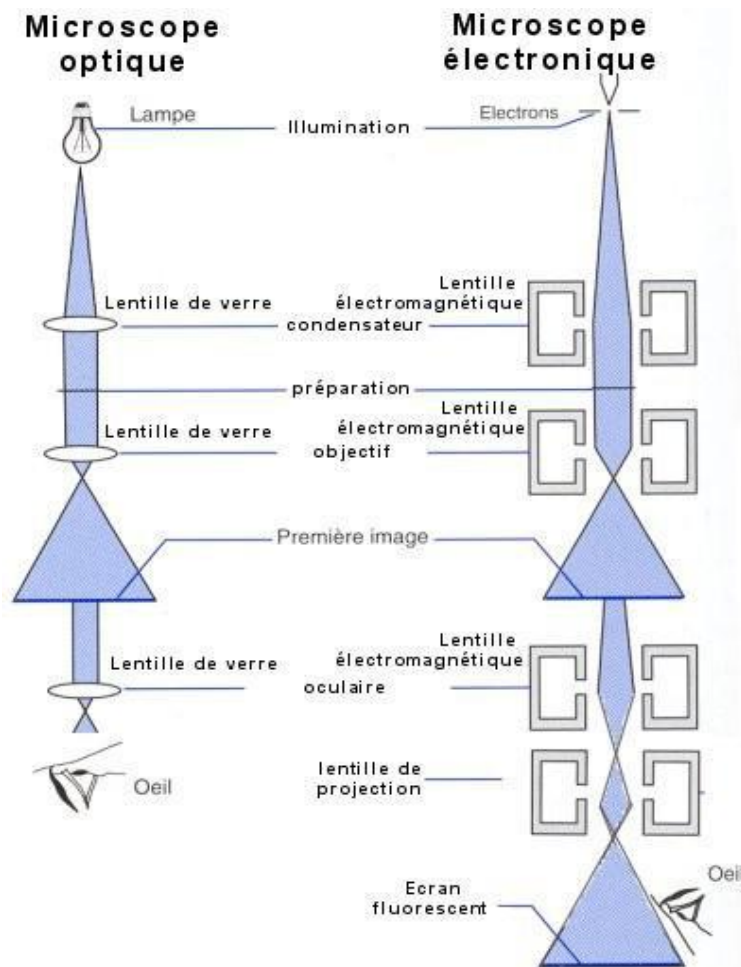
Les types	Utilisés pour :
Optique à fond clair	L'observation des structures cellulaires internes après coloration
Optique à fond noir	L'observation d'échantillons non colorés et des cellules vivantes et en déplacement
Optique à fluorescence	Le marquage fluorescent de structure et de composés macromoléculaires.
Optique à contraste de phase	La mise en évidence des différences d'indices de réfraction et de contraste
Optique inversé	L'observation de cellules en culture.

**Tableau 2** : les principales différences entre MO et ME

	MO	ME
Source d'énergie	Lampe électrique	Filament de tungstène porté à incandescence
Rayonnement	photons	Electrons libres accélérés dans le vide pour traverser ensuite l'échantillon
Système optique	Lentille de verre	Lentille électrique Lentille magnétique
Pouvoir de résolution= pouvoir séparateur	0.2 $\mu\text{m}$	0.2nm (2Å)
Epaisseur de l'échantillon	2 à 10 $\mu\text{m}$	300-800Å
Grossissement	40 à 2000	500.000(MET)



**Figure 1** : Schéma d'un microscope optique monoculaire



**Figure 2:** Principe de fonctionnement du microscope optique et électronique à transmission

## 2. Les conditions d'observation aux microscopes

### a) Examen des échantillons en microscopie optique

#### \*Examen de cellules vivantes :

Il faut utiliser des techniques qui augmentent les contrastes sans toxicité pour la cellule.

**Les méthodes chimiques, les colorants vitaux :** La quasi totalité des colorants sont très toxiques pour les cellules, quelques rares colorants n'ont pas cet inconvénient. On peut citer :

\***Le Vert Janus B** spécifique des mitochondries

\***Le bleu de Trypan**, qui ne peut pénétrer dans des cellules vivantes, mais qui colore les cellules mortes (test d'exclusion du bleu trypan) : il est très utilisé pour évaluer la vitalité des cellules.

**Les méthodes physiques, le microscope à contraste de phase : ce microscope augmente le contraste des objets. C'est le seul moyen d'observer les mouvements cellulaires et de les filmer.**

### \*Examen des cellules mortes:

a) **Prélevement** : On distingue quatre catégories majeures de prélevement :

- \* Les frottis : grattage (du col de l'utérus...).
- \* Les biopsies : fragments de tissu ou d'organe.
- \* Les organes en intégralité
- \* Les liquides d'épanchement divers (pleural, ascitique, péricardique, etc.).

**Il existe également des techniques de prélevement plus sophistiquées : par excision, ponction ou microdissection.**

b) **Fixation** : C'est l'action de tuer les cellules. On peut fixer à l'aide de procédés chimiques : Alcool, formol, acide acétique, etc....ou bien par des procédés physiques, comme la congélation brusque (meilleur fixateur).

c) **Déshydratation** :

l'étape consiste à retirer l'eau de l'échantillon pour la remplacer par un solvant compatible avec le milieu utilisé pour l'inclusion (étape d). à fin de ne pas créer un choc osmotique très important qui détruirait les cellules.

Pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des alcools de degrés croissants, 70°, 80°, 90°, 100°, pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations et l'eau va sortir par osmose. On procède donc à une double substitution.

\*On remplace l'eau par de l'alcool (Déshydratation)

\*On remplace l'alcool par le toluène (Substitution)



d) **Inclusion** :

La coupe ne peut être pratiquée que dans une substance assez **dure** ; c'est pourquoi on **imprègne** les tissus d'une substance d'**enrobage**, en général la **paraffine**. On plonge le tissu déshydraté dans un solvant organique le xylène, puis dans la paraffine maintenue liquide à l'ébullition entre 50 et 60 °C. On refroidit alors et on obtient un bloc de paraffine durcie contenant le tissu à examiner.

e) **Coupe (microtomisation)** :

Le bloc de paraffine est découpé en tranches minces à l'aide des **microtomes** qui sont des appareils permettant de débiter les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns. Les forces de frictions entre couteau et bloc chauffent la paraffine et la mettent en surfusion, ce qui permet de coller les coupes les unes à la suite de l'autre : ruban de coupes sériées. On les recueille

sur des lames de verre (porte objets) autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.

**f) Réhydratation :**

Les coupes collées sur lame de verre sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique et ramenées à l'eau par des bains d'alcools de concentrations croissantes.

**g) Coloration :**

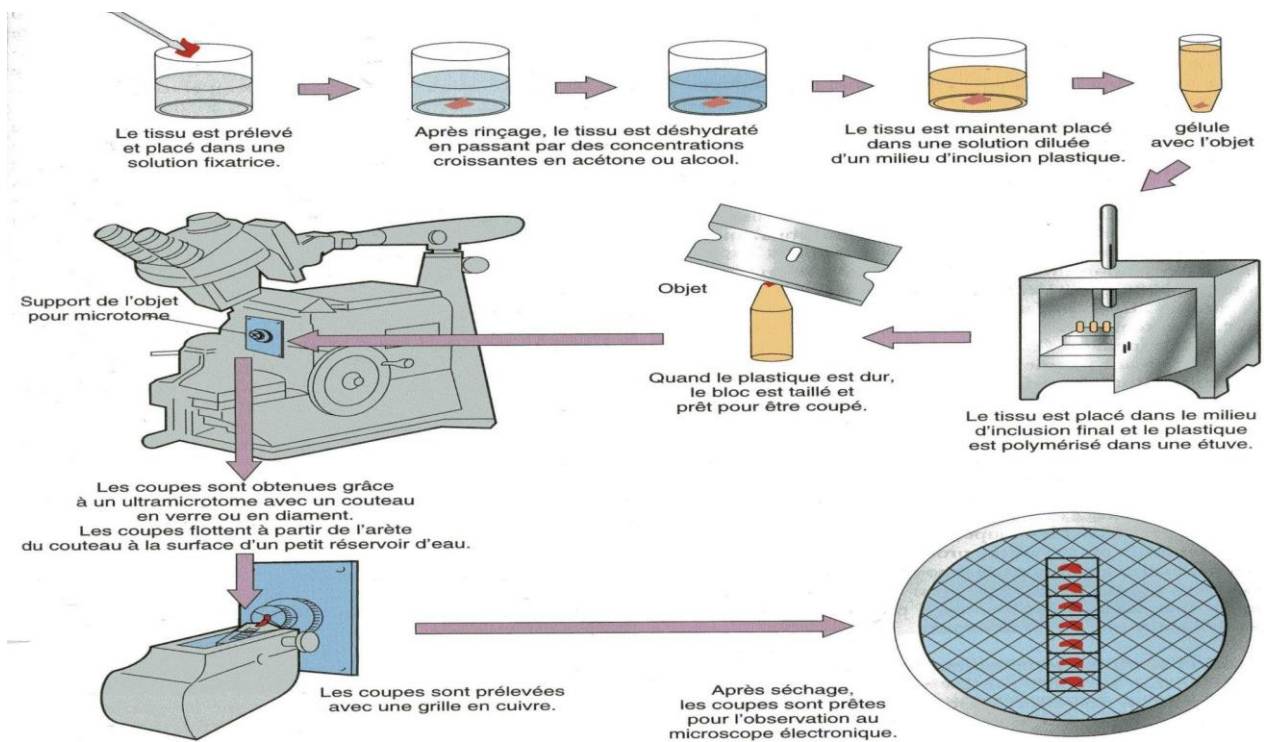
Cette lame de verre est alors plongée dans un colorant. On dispose nombreux colorants naturels, qui se fixent sur telle ou telle structure de la cellule, les colorants plus courants sont :

\*L'hématoxyline, qui colore les noyaux cellulaires en bleu violacé

\*L'éosine, qui colore les cytoplasmes en rose

\*Les bleus (Bleu de méthylène, de toluidine) sont également employés en routine.

- Les **colorants métrachromatiques** qui changent de couleur suivant la nature des structures colorées. On donnera comme exemple le **May-Grunwald-Giemsa (MGG)**, qui correspond à l'association d'éosine et de bleu de méthylène, permettant la coloration des frottis sanguins.
- Les **colorants histochimiques** comme l'**acide périodique de Schiff** qui colore les polysaccharides et le noir soudan qui colore les lipides.
- La **méthode histo-enzymatique** qui permet la formation d'un produit coloré par action d'une enzyme sur son substrat incolore.



**B) Examen des échantillons en microscopie électronique**



La séquence de manipulation est analogue à celle qui a été exposée pour la microscopie optique.

**a) Fixation** : encore plus exigeante (les artefacts sont plus visibles), elle est réalisée avec des fixateurs spéciaux, comme : le tétraoxyde d'osmium  $\text{OsO}_4$  et le glutaraldehyde  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ . Ce sont les deux principaux fixateurs chimiques utilisés en microscopie électronique.

**b) Déshydratation** : elle suit le même principe qu'en microscopie optique; mais elle est délicate car les tissus doivent être conservés jusqu'au niveau moléculaire.

**c) Inclusion** : elle se fait dans un milieu très dur, dans des matières plastiques telle que la résine. Une fois refroidi, durci par polymérisation, on obtient un échantillon solide.

**d) Coupe** : effectuée sur un ultramicrotome, elle fournit des tranches encore plus minces, de 50 nm.

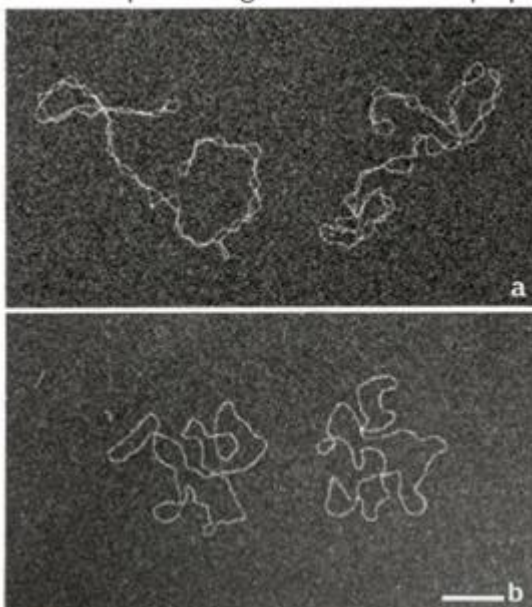
**e) Coloration** : c'est plutôt une imprégnation (il n'y a que le noir et le blanc en microscopie électronique) par des sels de métaux lourds, comme les sels de plomb ou d'uranyle, qui augmente le contraste des structures cellulaires.

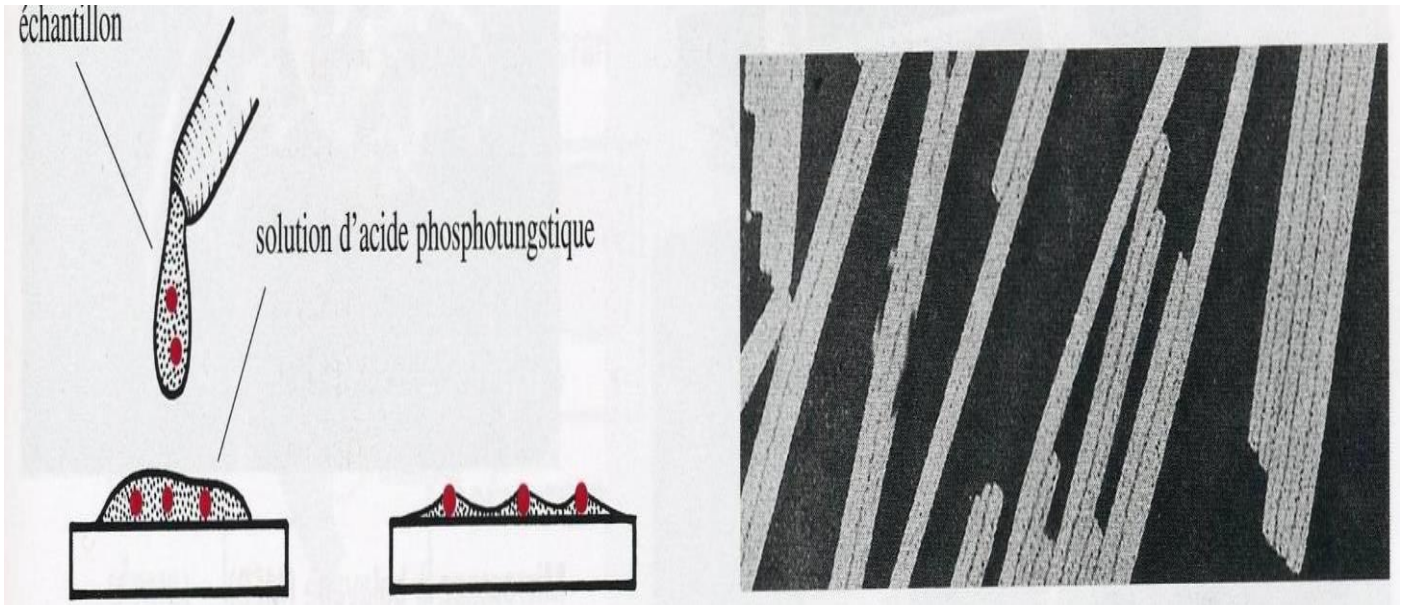
### Technique de coloration

#### A) La coloration négative

La technique dite de coloration négative consiste à monter l'échantillon à observer dans un liquide dense aux électrons, comme une solution d'acide phosphotungstique. Ainsi, les petits éléments à observer (comme par exemple les virus) ressortent dans un fond noir.

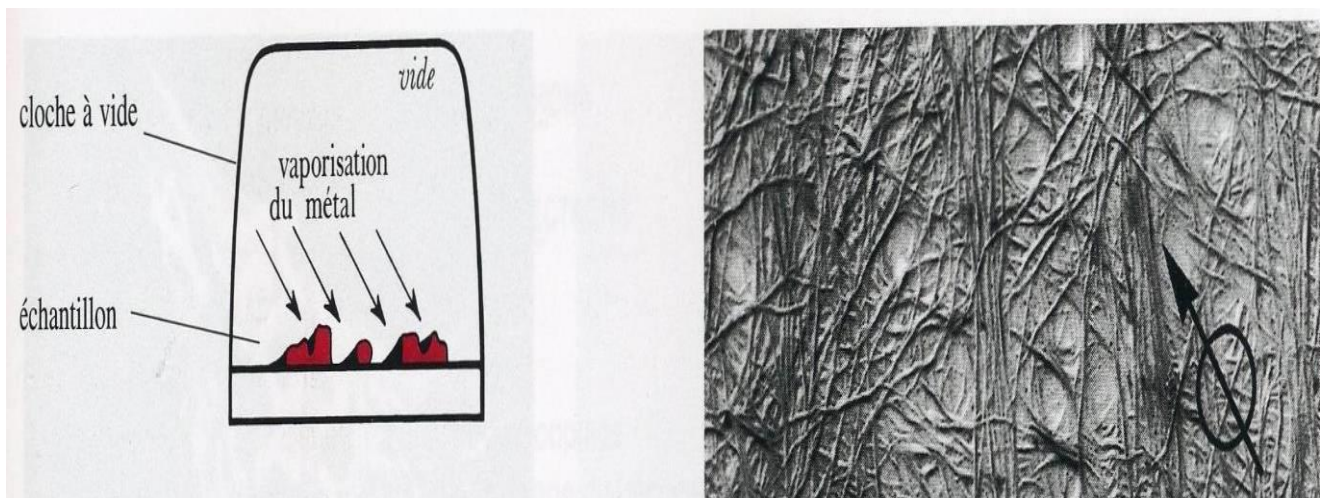
A gauche sont observées deux molécules d'ADN bactérien, condensée (a) ou relâchée (b). ces molécules apparaissent plus claires que le fond sombre grâce à la coloration négative.





### **B) L'ombrage**

Cette technique consiste en une **vaporisation d'atomes métallique** sur l'échantillon à observer. Cette projection se fait avec un certain angle et sous vide, ce qui conduit à une accumulation localisée de métal sur les pentes de l'échantillon qui crée un effet **d'ombre** lors de l'examen en microscope électronique à transmission. On obtient alors une sensation **de reliefs**, comme s'il s'agissait d'un microscope électronique à balayage.



### La cryofracture et le cryodécapage et technique de réplique

La cryofracture permet de fracturer les membranes cellulaires pour en observer la structure et la composition. Le principe consiste à figer les structures cellulaires en les congelant très rapidement grâce à l'azote liquide. Ensuite, l'échantillon est fracturé (et non coupé) à l'aide d'un couteau qui va casser l'échantillon dans les zones de plus faible résistance, généralement entre les deux feuilletts membranaires.

Cette technique de séparation permet d'accéder aux surfaces et aux feuilletts des membranes. Pour qu'elles soient facilement observables, il faut réaliser un cryodécapage. Le cryodécapage consiste à sublimer une fine couche de glace à la surface de l'échantillon pour augmenter les reliefs de la structure (comme des protéines membranaires). On réalise ensuite un ombrage métallique, puis on recouvre l'échantillon de carbone pour en obtenir une réplique. Cette réplique est alors observée au MET (la sensation de reliefs est là encore due à l'ombrage métallique réalisé)

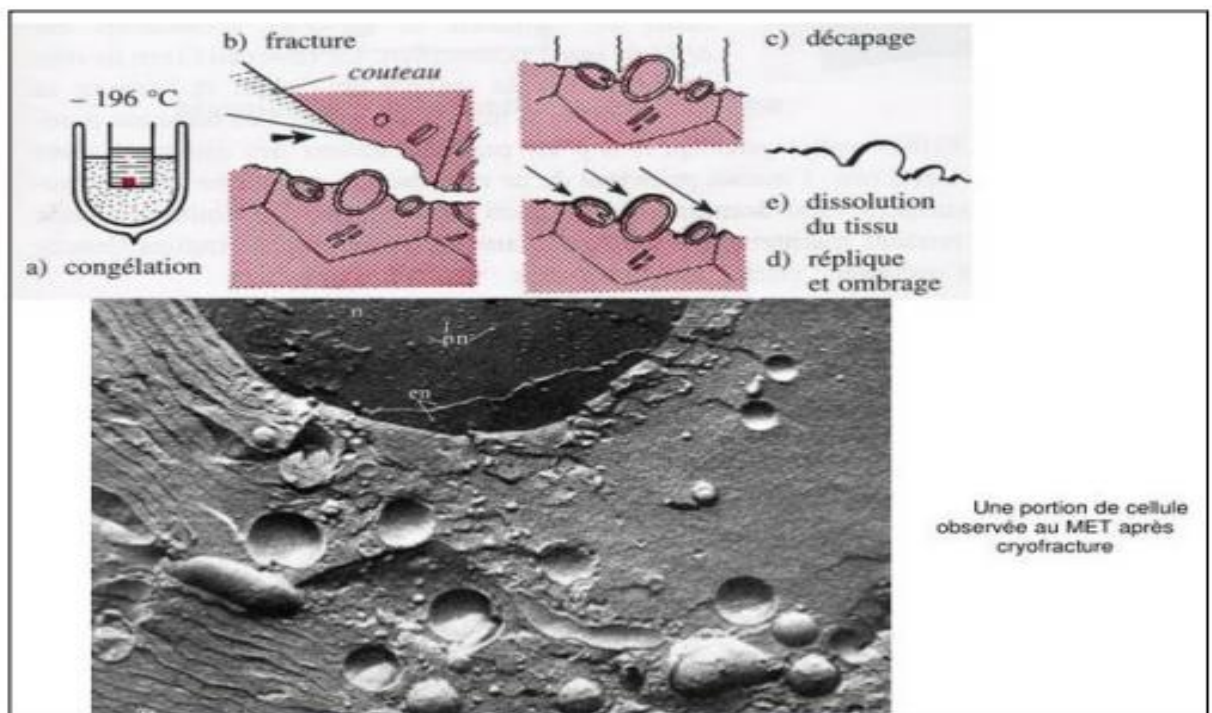


Fig: technique de cryo-fracture et cryo-décapage et ombrage métallique 03

## II. METHODES D'ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CELLULES

Ces méthodes permettent de connaître la nature mais aussi la localisation des constituants biochimiques de la cellule.

Selon les recherches envisagées, les matériels cellulaires sont différents :

- **Les Cellules entières ou coupes de cellules**
- **Broyats cellulaires = homogénats cellulaires**

Pour obtenir un broyat cellulaire = homogénat cellulaire on peut partir, soit d'une suspension de cellules, soit de fragments de tissu. Différentes techniques sont utilisables, Elles peuvent d'ailleurs se combiner pour une meilleure efficacité :

### 1. Mortier + abrasif :

Cette méthode s'adresse à des fragments de tissus. Les morceaux de tissu sont très souvent congelés immédiatement par immersion dans de l'azote liquide ( $-196\text{ °C}$ ) ou de la carboglace ( $\text{CO}_2$  liquide,  $-80\text{ °C}$ )

afin de les durcir. L'abrasif utilisé est souvent le sable de Fontainebleau de granulométrie régulière et très fine.

## 2. **Mixeur :**

ex : le disperseur ultra-Turrax. C'est un appareil muni de pales en rotation.

## 3. **Le Potter-Elvehjem :**

Le piston tourne à 1000 ou 2000 tours/min et en même temps que le piston tourne, on fait aller et venir le tube verticalement. Les cellules qui passent entre le piston et la paroi du tube sont alors soumises à des forces de cisaillement qui amènent leur éclatement.

## 4. **Le choc osmotique :**

On place les cellules dans un **milieu hypotonique**. Le milieu intracellulaire étant plus concentré qu'à l'extérieur, l'eau entre de façon massive à l'intérieur des cellules sous l'effet de l'osmose. Le volume cellulaire augmentant, la membrane plasmique n'y résiste pas et la cellule éclate.

Lorsque les cellules sont délimitées par une paroi, celle-ci peut protéger les cellules de la lyse car la présence de la paroi (contre laquelle vient se plaquer la mb plasmique) crée une force de turgescence qui s'oppose à l'entrée de l'eau par osmose.

Pour neutraliser l'intervention de la paroi, on la digère au préalable en plaçant les cellules dans une solution isotonique tamponnée contenant des enzymes capables d'hydrolyser les constituants pariétaux :

ex : cellulases et pectinases pour les cellules végétales :

ex : lysozyme pour les cellules bactériennes ;

ex : chitinase pour levures et moisissures.

## 5. **Vibrateur ultrasonique :**

Cet appareil émet des ultrasons dont on peut régler la fréquence et l'intensité en fonction du matériel cellulaire étudié. La membrane plasmique se rompt sous l'effet des vibrations engendrées par la propagation des ondes.

Comme pour le choc osmotique, des cellules débarrassées de leur paroi seront fragilisées et donc plus facilement lysées avec ce type de technique.

Conditions de manipulation :

- On met l'échantillon biologique dans une **solution tamponnée et isotonique** ou légèrement hypertonique (sauf pour la technique du choc osmotique). De façon à ne pas altérer les structures cellulaires.

- On travaille entre **0-4 °C**, afin d'empêcher tout fonctionnement enzymatique.

## • **Fractions cellulaires**

Si l'on veut connaître la composition biochimique des organites cellulaires, il faut les isoler les uns des autres. La purification d'organite passe par l'obtention de fractions cellulaires. On parle de techniques de fractionnement cellulaire = isolement d'organites cellulaires. Le fractionnement cellulaire est réalisé à partir d'un homogénat cellulaire.

### **1. La centrifugation**

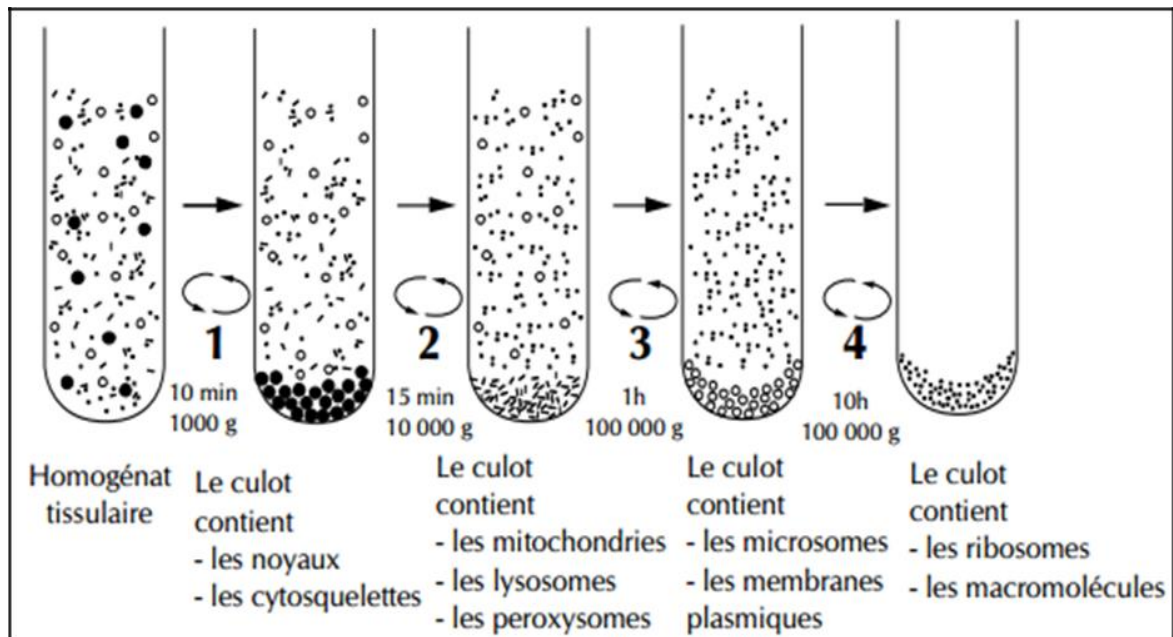
La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

**2. L'ultracentrifugation** utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

Il existe deux principaux types :

#### **2.1. L'ultracentrifugation différentielle**

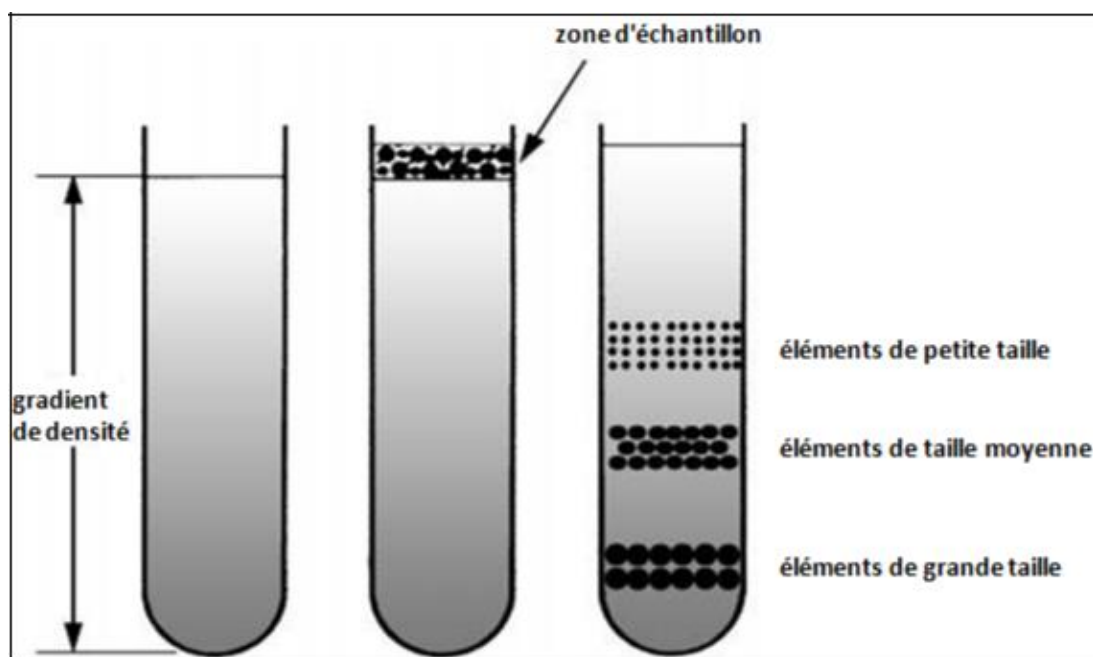
On l'appelle ultracentrifugation différentielle car basée sur la différence de vitesse de sédimentation des organites, elle-même reposant sur différence de densité des organites ; et ultra pour désigner les faibles différences (comme pour ultrastructure) et utilisation d'accéléérations importantes.



**Figure :** Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation différentielle

### 2.2. L'ultracentrifugation en gradient de densité

Cette technique permet de séparer en une seule fois des organites qui ont des vitesses de sédimentation très voisines (très faibles différences de densité). On travaille dans un milieu présentant un gradient de densité d'où le nom donné à la technique.



**Figure2:** Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur gradient de densité

## II. Les méthodes histochimiques

**1.1 Les techniques histochimiques:** Les techniques histochimiques sont basées sur des réactions biochimiques qui permettent de mettre en évidence in situ (= dans les tissus), différents constituants (lipides, glucides, protéines, acides nucléiques, métaux, etc.). Donc l'histochimiste cherche à localiser une substance donnée dans une structure histologique.

### II.1 Mise en évidence des glucides

✓ L'acide périodique (IO<sub>4</sub>H) est un oxydant qui coupe les liaisons 1-2 glycol, amino alcool des glucides et des glycoprotéines et forme des poly-aldéhydes. Ces aldéhydes sont ensuite combinés avec le réactif de Schiff (fuchsine acide) qui donne une couleur rose pourpre avec les structures contenant les aldéhydes.

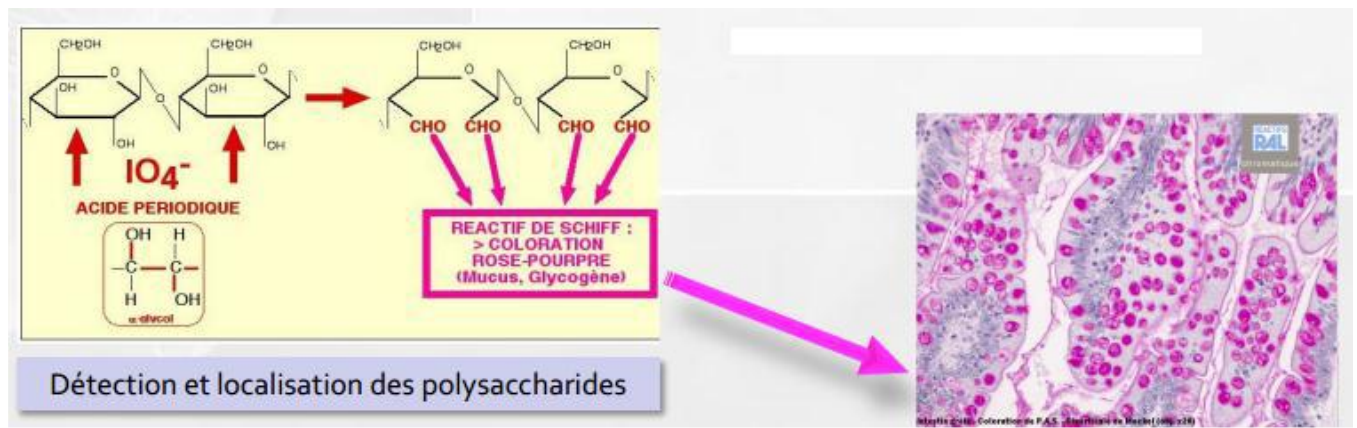


Figure . Réaction de localisation des polysaccharides

### II.2. Localisation d'acides nucléiques : test de Brachet

• Cette technique est employée pour localiser les acides nucléiques dans la cellule. Elle est toujours réalisée à partir de coupes. Ce test combine :

Une méthode de coloration au mélange (vert de méthyle + rouge pyronine) :

- Vert de méthyle ----> ADN vert
- Rouge pyronine ----> ARN rouge

• L'emploi d'enzymes d'hydrolyse de façon spécifique soit l'ADN soit l'ARN, cas de DNase et RNase est nécessaire.

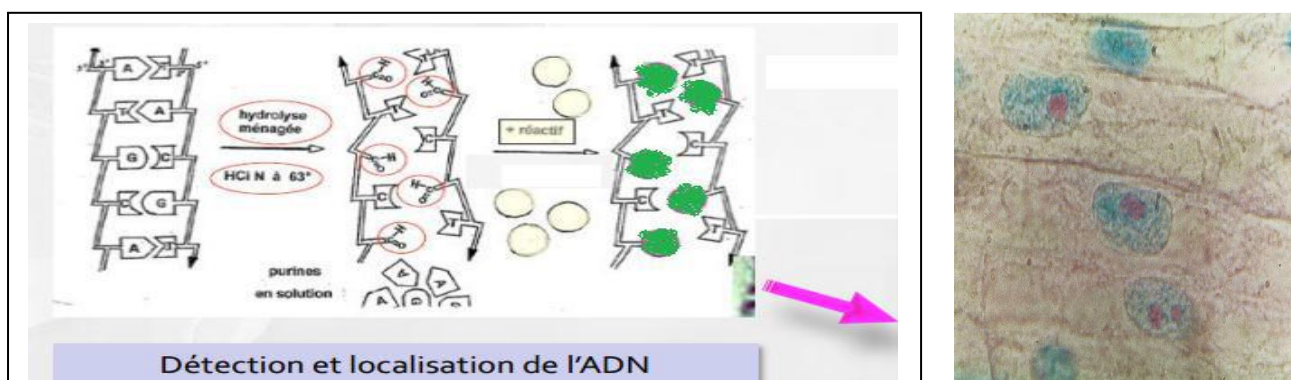


Figure . Réaction de localisation de l'ADN.

### II.3. Mise en évidence des lipides

✓ **L'huile rouge ou Oil Red:** Se fait sur les coupes à congélation et montage aqueux. Elle est surtout demandée pour les pathologies de la glande parathyroïde renfermant des acini et des vacuoles graisseuses.

### II.4. Mise en évidence des micro-organismes

**Gram:** Très utilisé en bactériologie médicale; elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer par leur aptitude à fixer le **violet de gentiane Gram+** ou la **fuchsine Gram-**.

### II.5. Cas des fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'absorber une longueur d'onde bien précise et d'émettre en retour une lumière d'une longueur d'onde plus importante. Ces composés sont au cœur de l'utilisation du microscope optique à fluorescence. Il ne s'agit pas de colorant, ils peuvent reconnaître spécifiquement certains composés : c'est le cas du DAPI qui est un fluorochrome s'intercalant dans la molécule d'ADN et qui, excité sous UV, émet une lumière bleue. Ces fluorochromes sont surtout utilisés avec des anticorps pour détecter spécifiquement une molécule bien précise.

## III. Techniques immunologiques (technique de localisation d'antigènes Ag)

**1. Méthodes de précipitation:** Le phénomène de précipitation se produit lorsque l'on met en contact un antigène soluble avec l'anticorps correspondant. Cette réaction se fait soit en milieu liquide soit en milieu gélifié. Le temps de réaction varie de moins d'une heure à plusieurs jours. La lecture peut se faire, soit à l'œil nu, soit avec des appareils tels que le néphélomètre ou le turbidimètre.

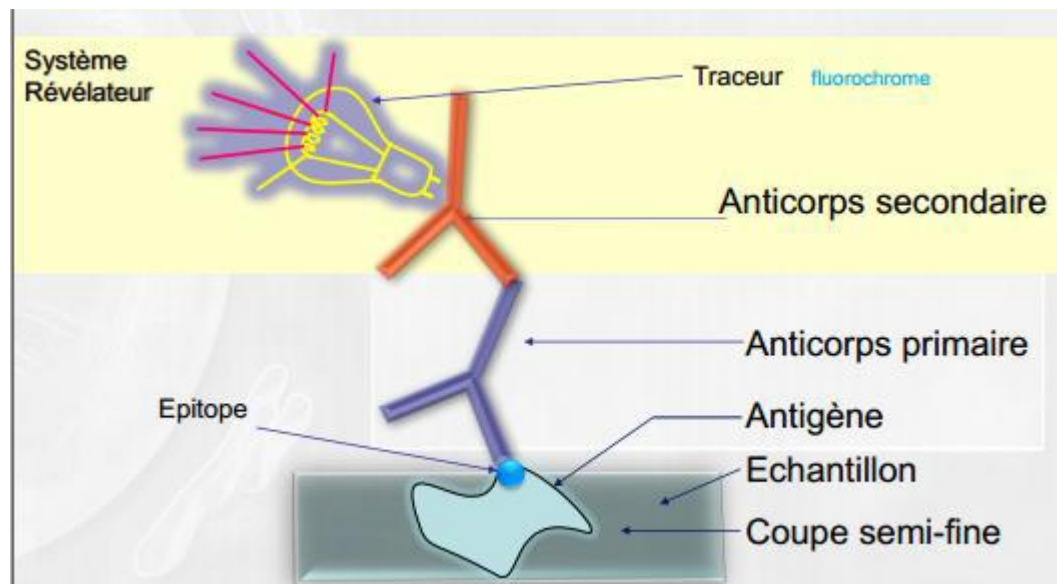
**2. Méthodes d'agglutination:** L'agglutination se produit lorsque l'on met en présence un antigène particulaire (bactéries, globules rouges...) avec l'anticorps correspondant. Cette réaction est rapide (quelques minutes) et visible à l'œil nu.

**3. Méthodes utilisant un marqueur:** Ce sont les méthodes les plus sensibles (ng/mL et pg/mL). Selon le marqueur utilisé on peut distinguer 3 types de technique:

**3.1 L'immunofluorescence (l'antigène ou l'anticorps est marqué avec un fluorochrome):** Le temps de réalisation d'une technique d'immunofluorescence est de moins de 2 heures. La lecture nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence ou d'un cytomètre en flux.

**3.2 L'immunoenzymologie (d'ELISA 'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay'):** Dans cette réaction, l'antigène ou l'anticorps est marqué avec une enzyme, qui permet de transformer un substrat incolore en produit coloré. Le temps de réalisation varie de moins d'une heure à plusieurs heures. La lecture est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre.

**3.3 La radioimmunologie:** Connue aussi sous le nom de RIA (Radio-Immuno-Assay) basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif.



**Figure.** Technique de localisation d'antigènes Ag

## VI. Techniques enzymologiques

L'histoenzymologie est une spécialisation de l'histologie et notamment de l'histochimie. Elle a pour objet de détecter indirectement les activités spécifiques de certaines enzymes par les méthodes qui requièrent des colorants histologiques et des substrats spécifiques.

### 1 La technique ELISA:

**2.1.1 Principe:** La technique ELISA (**Enzyme Linked Immunosorbent Assay**) est une technique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixé à l'anticorps.

#### Le test ELISA indirect

La première étape appelée "**coating**" de l'antigène: Elle consiste à incuber dans des puits, la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché. La fixation de l'antigène sur le fond des puits se fait électro-statiquement. Les plaques sont incubées à 4 °C pendant une nuit. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les antigènes en excès avec du tampon de lavage.

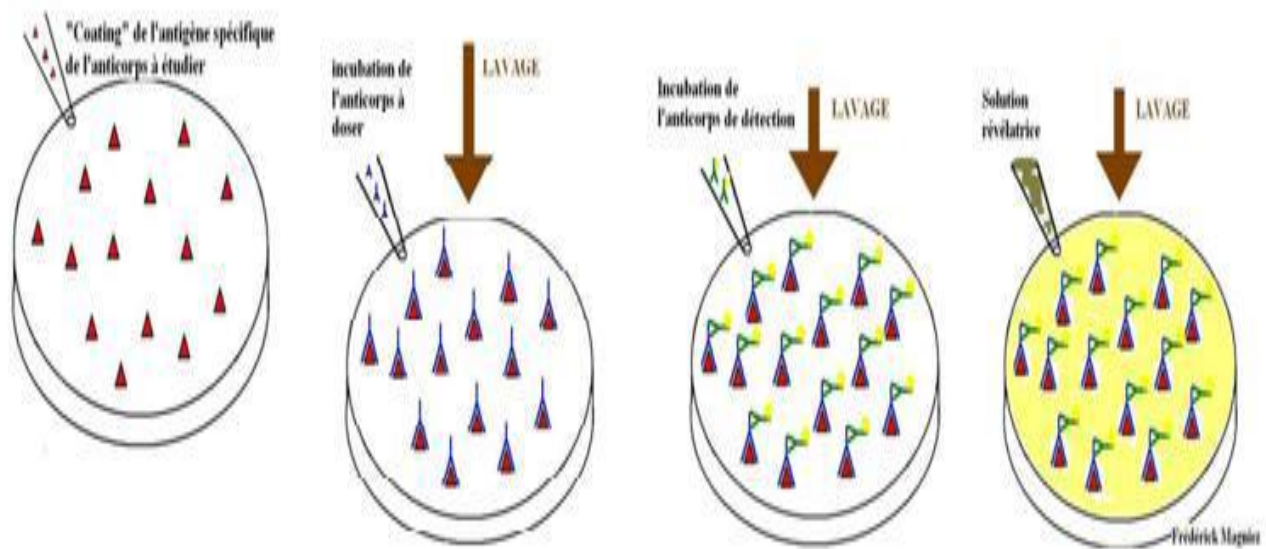
La deuxième étape consiste à **fixer l'anticorps à doser**: On incube à 37 °C dans les puits, la solution d'anticorps à doser pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps à doser en excès avec du tampon de lavage.

La troisième étape consiste à **fixer l'anticorps de détection**: On incube à 37 °C dans les puits, la solution d'anticorps de détection pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès avec du tampon de lavage. Notons que les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.

La quatrième étape consiste à **révéler les anticorps fixés**: On incube à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme. L'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché.

Exemple d'application: Identification dans le sérum du patient, les anticorps anti-protéines de l'enveloppe et du corps du virus de l'immunodéficience humaine (**Fig**).





**Figure : La méthode ELISA indirecte**

### **La DAS ELISA direct ou *Double Antibody Sandwich ELISA direct***

L'utilisation de la DAS ELISA nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène.

- La première étape consiste à fixer sur le support, **l'anticorps de capture**. On incube la solution à 37 °C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4 °C puis lavage.
- Lors de la deuxième étape, on dépose **l'échantillon possédant l'antigène** à identifier qu'on laisse incuber à 37 °C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4 °C puis lavage.
- Dans une troisième étape, on fixe **l'anticorps de détection** marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché. Pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble à 37 °C pendant 2 heures.
- La dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.