

Cour 4 :

Techniques immunologiques et moléculaires d'identification des virus

1/Diagnostic indirecte :

Il repose sur la détection des anticorps. Voici quelques tests de diagnostic indirect.

A/ Les tests d'agglutination :

Ces tests se basent sur le principe de liaison Antigène/Anticorps.

Pour cela, nous utilisons des particules microscopiques (latex, gélatine) recouvertes d'un antigène viral et ses épitopes, qui seront mélangées à une dilution de sérum.

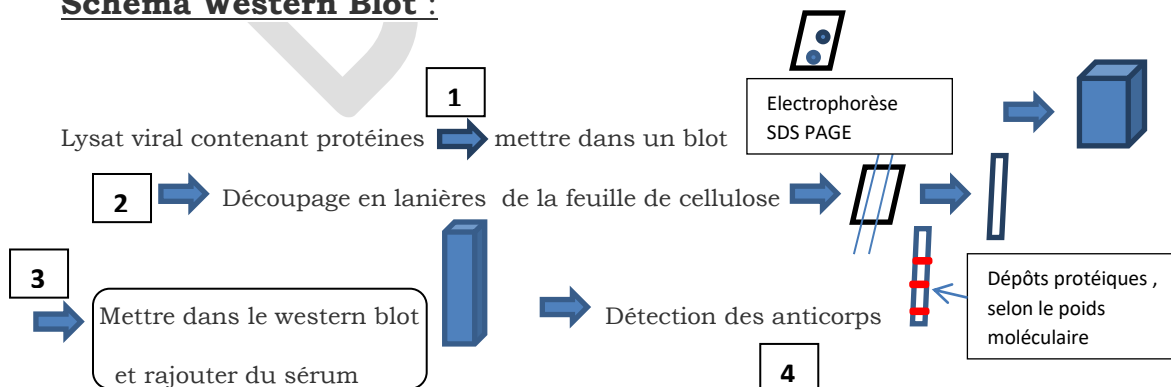
Les anticorps sont capables de lier aux épitopes et établiront donc des ponts entre les particules qui seront visibles comme une agglutination.

Un problème pouvant survenir avec ce genre de test est l'effet « prozone » : lorsqu'il y a une très grande quantité d'anticorps, il y a déséquilibre entre la quantité d'anticorps et d'antigènes et la réaction ne se produit pas.

Pour ce genre de tests, l'exemple le plus utilisé est le test **ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**.

B/ Le test Western Blot (WB):

Schéma Western Blot :



Dans le test WB, les protéines d'un **lysate viral** sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), ensuite transférées (« blotting ») vers une feuille de nitrocellulose ou de nylon.

Cette feuille, découpée en lanières, et permettra de tester les sérums pour rechercher les anticorps des différentes protéines avec une technique dont le principe ressemble à celle de l'ELISA décrit plus haut.

La réaction apparaît comme une bande de dépôt à l'endroit où se trouve la protéine concernée.

2/ Diagnostic directe :

A/ Microscope électronique :

Le microscope électronique est un outil qui permet de visualiser des objets extrêmement petits. Pour cette raison, il a été utilisé abondamment pour caractériser et identifier les virus. La technique permet d'identifier le virus sur base de sa structure et de sa taille. Son principal avantage est la rapidité de réalisation.

B/ Culture cellulaire :

Elles reposent sur le fait qu'un virus mis en contact avec une cellule en culture peut s'y multiplier.

Il faut donc disposer des cellules en culture puis rajouter des virus qui vont se multiplier sur ces cellules.

Les cellules en culture sont observées au microscope. Elles vont former un tapis cellulaire homogène. Après inoculation de ces cellules en culture, on cherche à détecter un **effet cytopathogène** (ECP) caractérisé par l'ensemble des altérations cytologiques observées lors de la réplication virale.

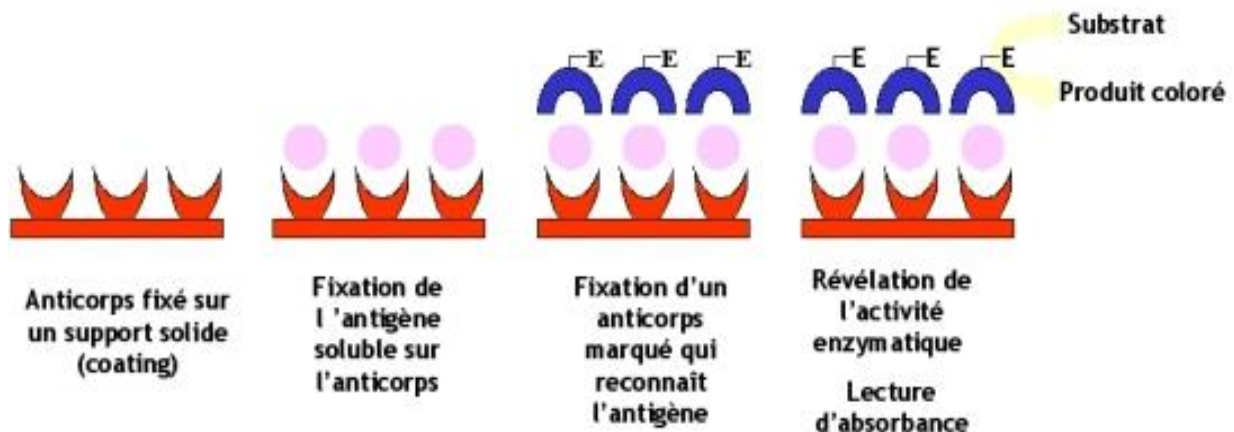
L'ECP s'observe à l'état frais au microscope, à faible grossissement.

C/ Détection d'antigènes viraux :

Au cours des infections virales, certaines protéines virales sont libérées dans le sang, ce sont les «antigènes solubles». Ils sont présents dans le sang.

Pour détecter ces antigènes, on utilise une application de l'ELISA. Dans cette application : un anticorps antiviral est fixé sur un support solide (voir schéma). Le principe général du test ELISA reste le même.

NB : Il existe de nombreux tests automatisés ou des tests unitaires utilisant cette application d'ELISA.



Principe de l'ELISA pour rechercher des antigènes.

D/ Détection d'acides nucléiques :

Il est possible de détecter l'ADN ou l'ARN viral par hybridation. Le principe de base de cette technique est tout simplement celui de la complémentarité des doubles brins.

Si on soumet les acides nucléiques à une température élevée (94°C), les brins se dissocient. Lors du refroidissement, On rajoute des sondes complémentaires, les sondes s'apparenteront alors au brin cible. Ces sondes sont généralement marquées à l'aide de marqueurs radioactifs, facilement identifiable.

Pour cette technique, Lorsqu'il s'agit de détection de l'ARN, on va parler de « **Northern blot** », et lorsqu'il s'agit de détection d'ADN, c'est le « **Southern blot** ».

Cette technique est de moins en moins utilisée, et depuis une vingtaine d'années, Elle a été remplacée par de nouvelles techniques.

Ainsi, elle a été remplacée par la « **PCR** » : réaction de polymérisation en chaîne « **Polymerase Chain Reaction** ». Cette méthode permet **de cibler des fragments d'ADN précis** et de les détecter. Elle se fait à l'aide d'amorces spécifiques et d'un appareil appelé : **Thermocycleur**.

Pour résumer les méthodes d'identification des virus:

Méthodes de Diagnostic	Exemples de virus à détecter
Diagnostic « indirect »	
• Recherche Anticorps	Presque tous les virus
Diagnostic « direct »	
• Détection d'antigènes.	Rotavirus, Adenovirus,
• Microscopie.	Grippe.
• Culture cellulaire	Enterovirus
• Détection d'Acides nucléiques viraux (PCR).	Tous les virus