

Objectifs du module

Nous disposons d'outils de laboratoire nous permettant de détecter les infections virales et leurs effets. Lorsqu'on travaille dans le secteur médical, vétérinaire ou agricole et qu'on est confronté aux infections virales, il est nécessaire d'avoir une vue générale des possibilités diagnostiques existantes. Vous trouverez ici les principes du diagnostic viral ainsi qu'un aperçu des différentes techniques utilisées.

Table des matières

1. Buts du diagnostic
2. Approche générale
3. Caractéristiques d'un test
4. Techniques diagnostiques
5. Quiz et tests
6. Bibliographie

A la fin de ce module « Généralités sur les virus », vous serez capable de

- **Expliquer** l'utilité des tests de laboratoire en virologie
- **Comprendre** les notions de qualité générale des tests (sensibilité, spécificité, etc.)
- **Situer** les différents types de tests directs et indirects en virologie
- **Comprendre** le mode de fonctionnement général des tests repris dans ce chapitre

Prérequis

Avoir parcouru et compris les parties I à III de ce cours dans leurs aspects généraux

Questions et réflexions

Un test répond à une question. Posez-vous d'abord la question

Les qualités d'un test dépendent fortement de la population testée : tenez en compte dans l'évaluation d'une technique

Les qualités d'un test vous disent s'il est adapté aux circonstances

1. Buts du diagnostic

Lorsqu'on ne sait pas ce qu'on cherche, il est difficile de trouver.

Le diagnostic établi par un laboratoire de virologie tente de répondre à un certain nombre de questions. En fonction de la question posée et en fonction du virus concerné, le laboratoire appliquera des techniques différentes.

Le diagnostic peut poursuivre les buts suivants :

Confirmer une infection aiguë

Démontrer une immunité par une infection ancienne ou une vaccination

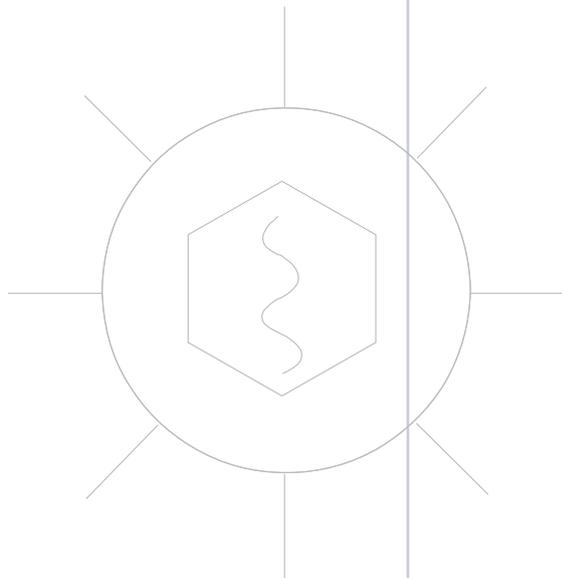
Détecter une infection persistante avec ou sans symptômes

Détecter la présence d'une exacerbation, par réactivation ou surinfection

Caractériser un virus

Suivre l'évolution d'une infection virale avec ou sans traitement

[Pour lire les exemples : <http://www.virologie-uclouvain.be>]



IV. Diagnostic viral

2. Approche générale

Deux types d'approche sont possibles. Soit la recherche directe du virus ou d'éléments de celui-ci, soit une approche indirecte recherchant les signes de la réaction de l'organisme à la présence du virus. En médecine humaine ou vétérinaire, cette dernière approche se résume la plupart du temps à la recherche d'anticorps. En phytopathologie, si ce type d'approche est moins utilisé vu l'absence de production d'anticorps par la plante, il reste possible de rechercher la présence d'inclusions cellulaires caractéristiques d'infections virales.

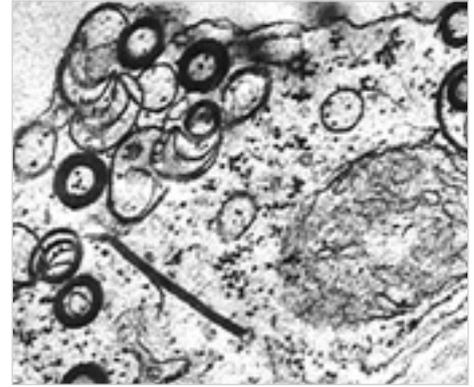
1. Approche indirecte

Chez les animaux ou l'homme, les anticorps signent un contact récent ou ancien avec un antigène donné. Les anticorps reconnaissent un antigène donné et sont donc spécifiques d'un virus donné. Cette recherche d'anticorps se fait généralement dans du **sérum**, d'où le nom de **test sérologique**. On peut détecter une **séropositivité**, ou la présence d'anticorps. On peut également déceler sur deux sérums successifs l'apparition d'anticorps ou **séroconversion**. Les anticorps sont des **immunoglobulines** groupées en différentes classes, dont les **IgG** et les **IgM**. Les IgM sont surtout présentes lors de la première réponse en phase aiguë et disparaissent en quelques mois. La présence d'IgM indique donc souvent une infection récente. Les IgG apparaissent à peu près au même moment et persisteront à vie. On observe qu'au cours de l'évolution de la réponse immunitaire, il y a maturation de ces IgG qui au début ont une faible avidité pour l'antigène, laquelle augmentera au cours des mois.

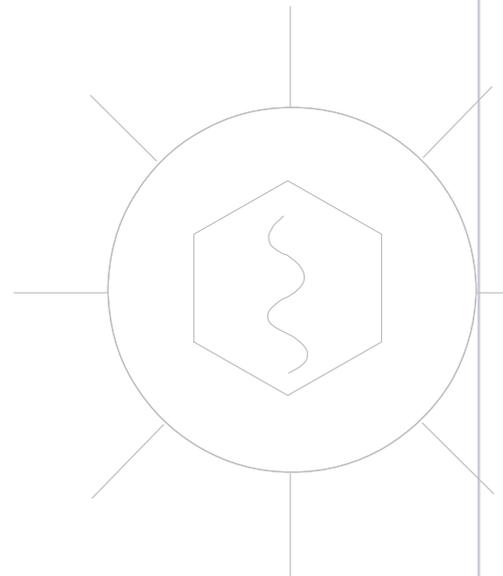
L'**avidité des IgG** est un autre marqueur permettant de dater une infection.

2. Approche directe

Il s'agit de la façon conceptuelle la plus simple. Un virus est présent et nous recherchons sa présence soit en le visualisant de façon complète par microscopie électronique, soit en le cultivant et en observant ses effets directs ou indirects sur les cellules cultivées, l'animal ou la plante inoculée. Par ailleurs, nous pouvons détecter des éléments constitutifs du virus, comme des antigènes exprimés dans les particules virales ou à la surface de cellules infectées, ou une séquence spécifique d'acide nucléique. Les techniques de détection d'acides nucléiques prennent actuellement de plus en plus d'importance, surtout depuis le développement de techniques d'amplification comme la **PCR**. Après détection du génome d'un virus on peut caractériser celui-ci par différentes techniques d'hybridation et de séquençage.



IV.2.1. Inclusions en roues à aubes provoquées par le virus de la bigarrure du poireau (microscopie électronique)



3. Caractéristiques d'un test

Lorsque nous nous posons une question en virologie, nous pouvons demander un test qui nous donnera une réponse. Comment savoir quelle confiance nous pouvons avoir dans cette réponse ? Ceci dépendra des caractéristiques du test, mais également des circonstances dans lesquelles il est demandé.

Exemple : Je soupçonne une hépatite virale chez une personne et je demande de doser dans son sang la présence de bilirubine (pigment entraînant la jaunisse). D'une part une infection par un virus de l'hépatite peut survenir sans présence de jaunisse et d'autre part il y a d'autres raisons que les hépatites virales d'avoir une jaunisse. Ce test, bien que me donnant une indication, a des limites évidentes.

1. La sensibilité clinique d'un test

C'est la capacité d'un test à détecter une infection, une maladie ou une immunité lorsque celle-ci est présente.

Exemple : Si un test a une sensibilité de 98% pour détecter l'infection par le virus du SIDA (VIH ou HIV), cela signifie que sur 100 personnes infectées je vais en détecter 98 avec mon test. De même, si la sensibilité clinique d'un test destiné à la détection du virus de la mosaïque du tabac est de 95%, cela signifie que le test est capable de mettre la présence du virus en évidence 95 fois sur 100.

2. La spécificité clinique d'un test

C'est la capacité d'un test à être réellement négatif quand une infection, une maladie ou une immunité est absente.

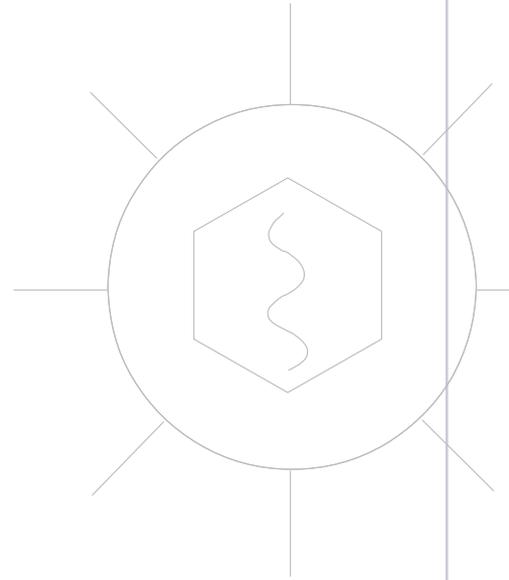
Exemple : Si en transfusion sanguine, lors du dépistage du SIDA chez des donneurs de sang on trouve 2 donneurs positifs sur 1000, parmi des donneurs parfaitement négatifs, la spécificité clinique du test est de 99,8%. Parmi les négatifs je trouve 0,2% de résultats faussement positifs.

3. La sensibilité analytique d'un test

Ceci représente la quantité minimale de matière à analyser que le test parvient à détecter.

Exemple : un test pour la détection de l'hépatite B parvient à détecter de façon reproductible au moins 10.000 virus par ml de sang. Il s'agit de la sensibilité analytique de ce test.

On décrira parfois la sensibilité analytique comme le « seuil de sensibilité ».



Exemple : test très sensible. La sensibilité clinique s'évalue sur une population ayant l'attribut recherché (maladie, infection ou immunité)

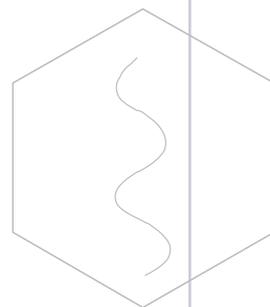
	Test +	Test -	Total
Présence de Maladie/infection/immunité	198	2	200

$$\text{Sensibilité clinique} = (198 / 198 + 2) \times 100 = 99\%$$

Exemple : test très spécifique. La spécificité clinique s'évalue sur une population n'ayant pas l'attribut recherché (maladie, infection ou immunité)

	Test +	Test -	Total
Présence de Maladie/infection/immunité	2	998	1000

$$\text{Spécificité clinique} = (998 / 998 + 2) \times 100 = 99,8\%$$



4. La spécificité analytique d'un test

La spécificité analytique d'un test indique sa capacité à ne détecter qu'un produit à analyser bien précis à l'exclusion de tout autre. Exemple : un test très spécifique ne détecte que le virus de la varicelle. Un test un peu moins spécifique détecte tous les virus de la même famille, à savoir les *Herpesviridae*.

5. La valeur prédictive positive d'un test ou la valeur prédictive d'un test positif (VPP)

La VPP indique les chances qu'un test, lorsqu'il est positif, soit réellement positif et non faussement positif. La VPP dépend des autres caractéristiques du test, particulièrement de la spécificité, mais encore beaucoup plus de la probabilité pré-test du diagnostic. Lorsqu'une maladie ou infection est rare et donc sa probabilité pré-test faible, un résultat positif sera beaucoup plus souvent faussement positif que si cette infection était fréquente dans le groupe étudié.

Exemple : Lorsqu'on teste les immunoglobulines de classe M contre la rubéole, ce test est indicatif d'une infection récente. Utilisé chez des patients présentant des symptômes il confirmera la plupart du temps le diagnostic ; utilisé comme dépistage chez des personnes n'ayant aucun symptôme, comme les femmes enceintes, les tests positifs seront généralement faussement positifs.

Exemple : valeur prédictive positive élevée si l'attribut est très fréquent (prévalence de ±16,6%) avec un test qui a une sensibilité de 99% et une spécificité de 99,8%. La VPP se calcule sur les résultats positifs.

	Attribut présent	Attribut absent	Total
Test +	198	2	200

$$VPP = (198/198 + 2) \times 100 = 99\%$$

Exemple : valeur prédictive faible si l'attribut est très rare (prévalence de ± 0,1%) avec le même test

	Attribut présent	Attribut absent	Total
Test +	99	200	299

$$VPP = (99/99+200) \times 100 = 33\%$$

6. La valeur prédictive négative d'un test ou la valeur prédictive d'un test négatif (VPN)

La VPN indique les chances qu'un test, lorsqu'il est négatif, soit réellement négatif et non faussement négatif. De même que dans le cas de la VPP, la VPN est fortement dépendante de la probabilité pré-test du diagnostic.

Exemple : En transfusion il y a un système d'auto-exclusion des donneurs, basé sur un interrogatoire écrit. Le but est de diminuer la probabilité pré-test de tomber sur une personne infectée par un virus d'hépatite ou par celui du SIDA. De cette façon on améliore la VPN des tests qui seront par après exécutés sur les dons: lorsqu'on aura un test négatif, on augmente la probabilité qu'il corresponde réellement à l'absence d'infection.

7. Définition mathématique

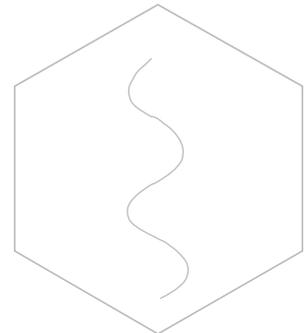
Divisons la population testée en fonction de la présence d'une maladie/infection/immunité et de la présence d'un résultat positif ou négatif de test.

► Pour accéder à l'exercice : <http://www.virologie-uclouvain.be>

Nous voyons que la sensibilité clinique s'évalue dans une population ayant l'attribut testé (maladie/infection/immunité) et que la spécificité clinique s'évalue dans une population n'ayant pas cet attribut.

Par contre la VPP et la VPN vont dépendre de la proportion de malades et de bien portants dans la population testée, puisqu'ils se calculent sur les colonnes verticales.

IV.3.1. Calcul de la sensibilité et de la spécificité des valeurs prédictives d'un test



4. Techniques diagnostiques

Les différentes approches possibles dans le diagnostic viral, directe et indirecte, seront mieux comprises par quelques exemples pratiques détaillés. Nous décrivons ici quelques techniques de détection d'anticorps, de détection et de caractérisation des virus (sous-types, résistance aux médicaments antiviraux).

1. Détection d'anticorps

Lorsqu'un animal ou un homme entre en contact avec un **antigène** étranger, il réagit par une réaction immunologique spécifique.

Cette réaction comprend deux volets : une réaction **humorale** avec la production d'**anticorps** qui reconnaissent l'antigène et une réaction cellulaire avec augmentation d'une population cellulaire cytotoxique spécifique.

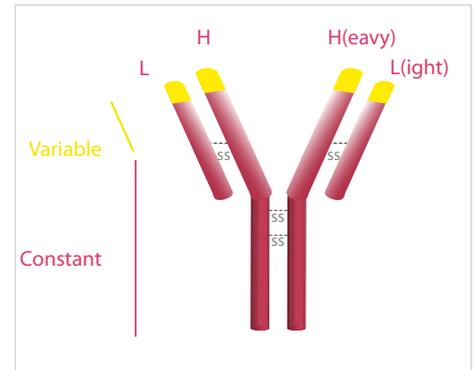
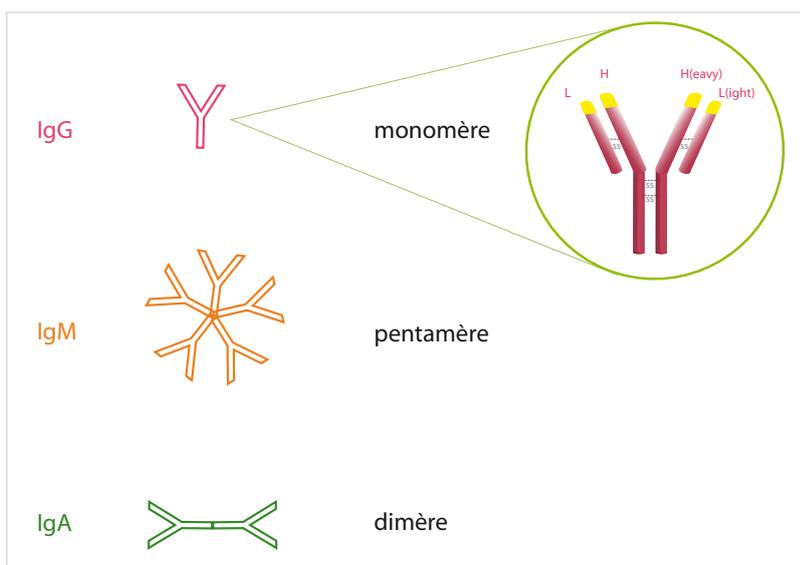
Cette réaction survient aussi lors du contact avec un virus par infection ou vaccination.

La production d'anticorps spécifiques peut être détectée avec des techniques relativement simples.

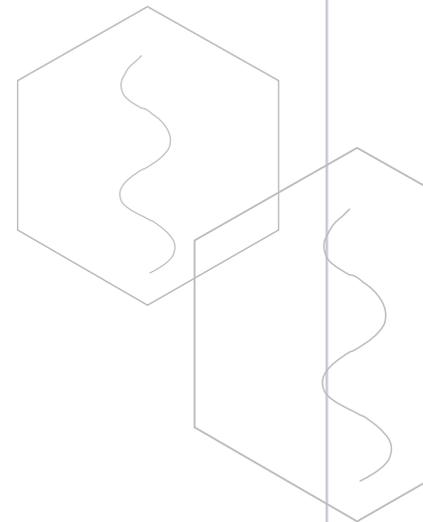
Ces tests sont effectués généralement sur du sérum d'où le nom de **tests sérologiques**.

Les anticorps sont des protéines, nommées immunoglobulines ou gamma-globulines, divisées en différentes classes : les immunoglobulines G, M, A, E.

Ce sont surtout les **IgG** (monomères) et les **IgM** (pentamères) qui seront recherchées dans le diagnostic des maladies virales.

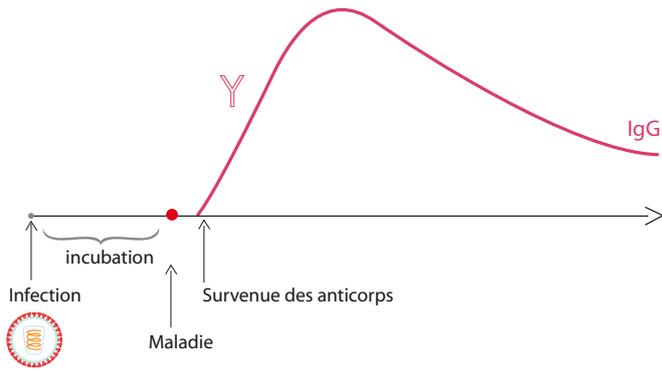


IV.4.1.1. Structure d'une molécule d'immunoglobuline

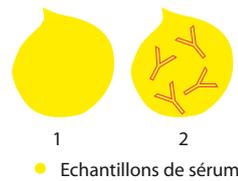
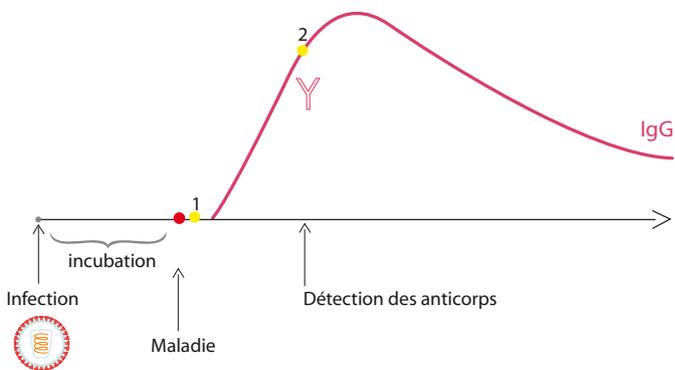


IV.4.1.2. Structure d'une molécule d'immunoglobuline

Séropositivité : Présence d'anticorps

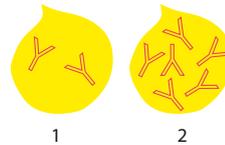
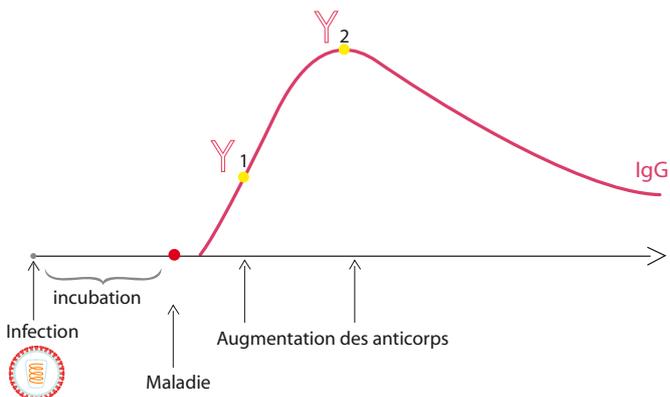


Séroconversion : apparition d'anticorps sur deux sérums successifs



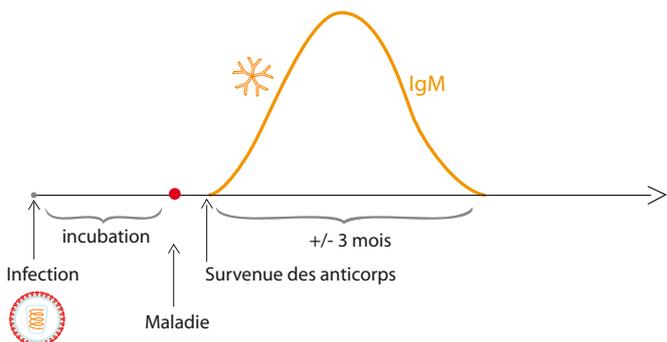
● Echantillons de sérum

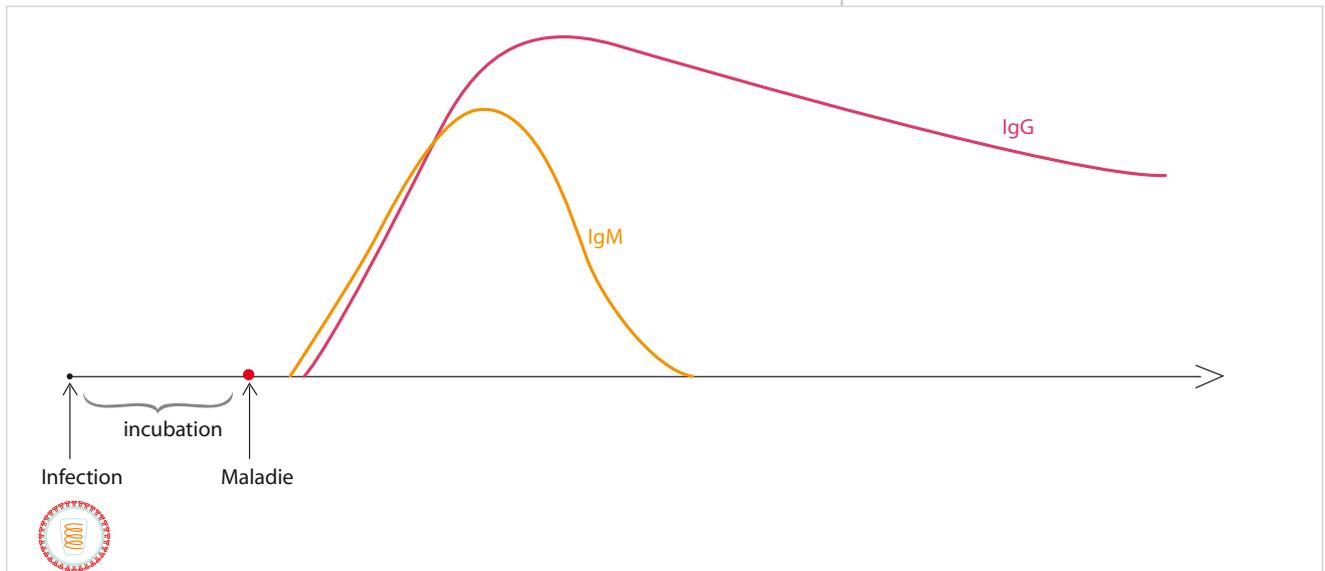
Augmentation de titre ou taux d'anticorps entre les deux sérums



● Echantillons de sérum

Recherche d'IgM





IV.4.1.3. Apparition d'anticorps après infection et leur détection

Le test sérologique détectera :

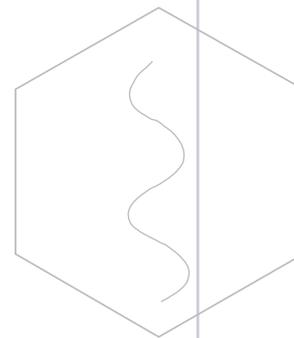
La présence d'anticorps ou séropositivité : ceci signe le contact avec le virus mais ne permet pas de dater le moment de l'infection. Pour certains virus qui persistent dans l'organisme cela indique également l'état de porteur (exemple : le virus du SIDA ou VIH/HIV)

L'apparition d'anticorps entre deux sérums successifs prélevés généralement à un intervalle de 10 à 21 jours. On parle de séroconversion. Ceci indique qu'un premier contact a eu lieu autour du moment du premier prélèvement.

Une augmentation de la concentration d'anticorps entre deux sérums. Cette concentration s'exprime en titre ou en unités test utilisé. Une augmentation indique qu'il y a eu une stimulation du système immunitaire : celle-ci peut être due à une infection récente ou à une réactivation virale symptomatique ou non.

La présence d'anticorps de la classe M (IgM), qui sont présent pendant les premiers mois après un contact.

La présence d'anticorps IgG de faible avidité. L'avidité des anticorps augmente au cours des mois succédant à une infection aiguë. Une faible avidité indique donc une infection récente.

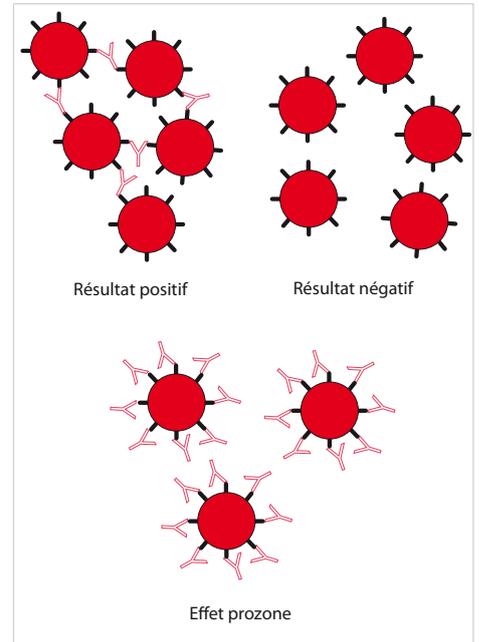


Quelques exemples de tests sérologiques

Les tests d'agglutination

Ils font appel à des particules microscopiques (latex, gélatine ou globules rouges) recouvertes d'un antigène viral avec ses épitopes, qui seront mélangées à une dilution de sérum. Les anticorps sont capables de lier deux **épitopes** et établiront donc des ponts entre les particules qui seront visibles comme une agglutination microscopique ou macroscopique.

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. Lorsque, dans ce cas, on dilue le sérum la réaction devient positive.

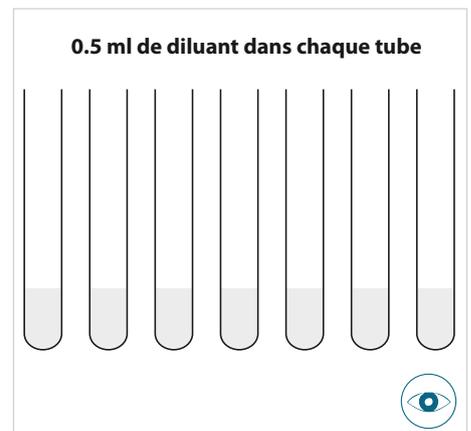


IV.4.1.4. Test d'agglutination Apparition d'anticorps après infection et leur détection

Définir le taux d'anticorps par titration

Avec le test d'agglutination le principe de la titration est aisément compris. Il s'agit d'établir une série de dilutions de sérums et d'effectuer la réaction de détection avec chaque dilution. La plus haute dilution offrant encore une réaction positive donnera le titre. Lorsqu'à une dilution de 1/32 on détecte encore les anticorps, mais plus à 1/64, on dit que le titre d'anticorps dans ce sérum est de 32.

Lorsque les particules utilisées pour le test d'agglutination sont des globules rouges (avec leurs propres protéines de surface fortement glycosylées comme antigènes), on parle d'hémagglutination. Ce test est souvent utilisé, non pas pour la détection d'anticorps, mais pour la détection de particules virales se liant aux acides sialiques (comme le virus de la grippe).



IV.4.1.5. Titration d'un sérum pour la recherche d'anticorps

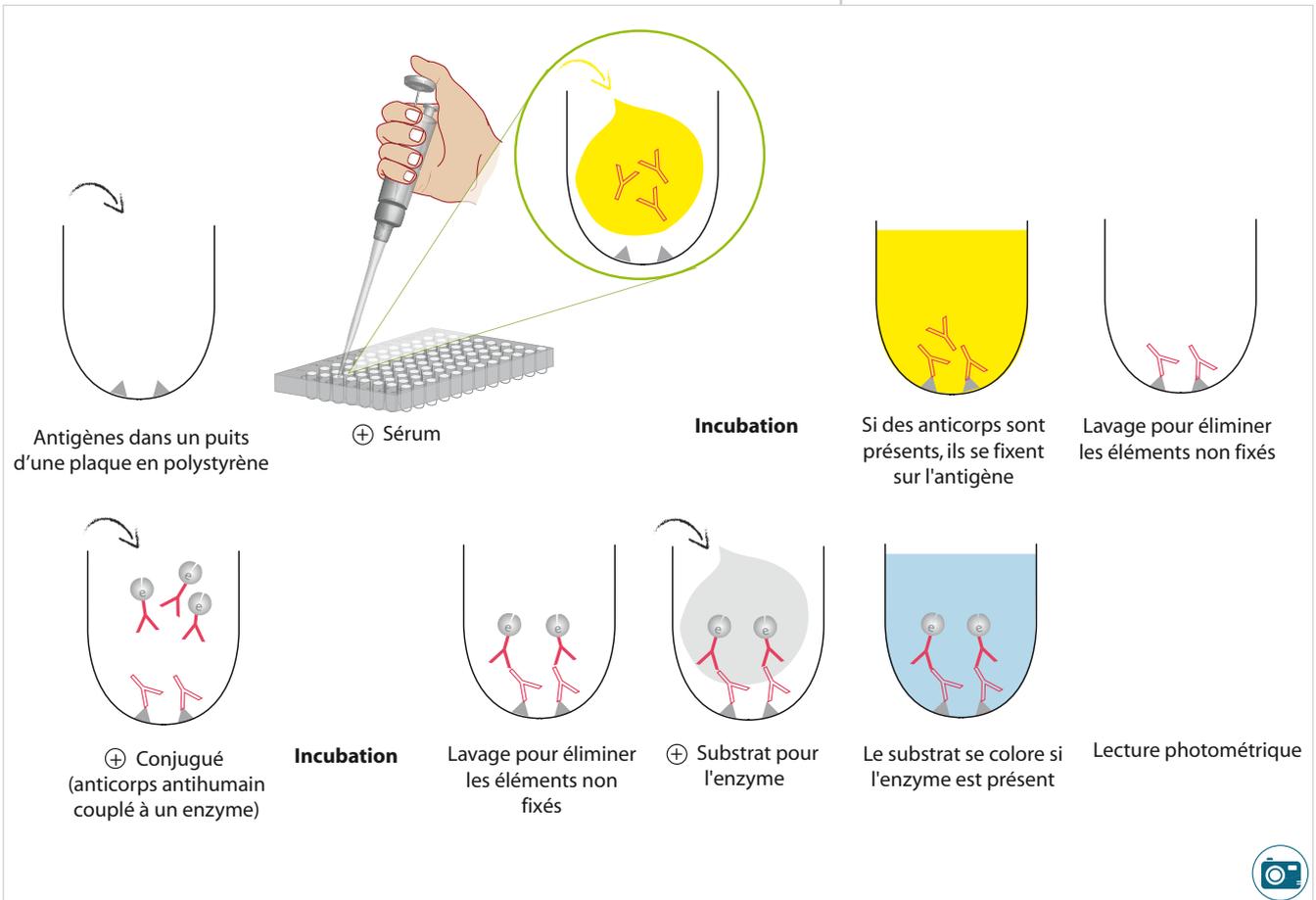
ELISA ou EIA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ou Enzyme ImmunoAssay)

Ces tests font appel à un **conjugué** couplant une enzyme à un anticorps de détection. Ces tests permettent une automatisation complète des tests et de cette façon de tester de nombreux sérums. Le principe est donné dans la figure IV.4.1.6.

L'ELISA permet aussi une évaluation du taux d'anticorps, mais au lieu de faire appel à une titration, il fait appel à une courbe standard pour comparer les valeurs obtenues. Dans ce cas le résultat sera exprimé en unités. Ces unités seront internationales (UI) si la comparaison se fait avec un standard international ou arbitraires (UA) s'il n'y a pas de standardisation.

Il existe de nombreuses variantes du test ELISA, comme les tests de capture et les tests compétitifs. Le principe peut également être modifié pour la détection d'antigènes.

Les tests sérologiques décrits dans cette section sont donc aussi utilisés pour l'identification de virus phytopathogènes à partir d'un extrait végétal. Ainsi, chaque année, des centaines de milliers d'ELISA sont réalisés pour détecter les virus potentiellement présents dans les pommes de terre destinées à la plantation, pour minimiser les risques de pertes de rendement liés à ces virus.



IV.4.1.6. Titration d'un sérum pour la recherche d'anticorps

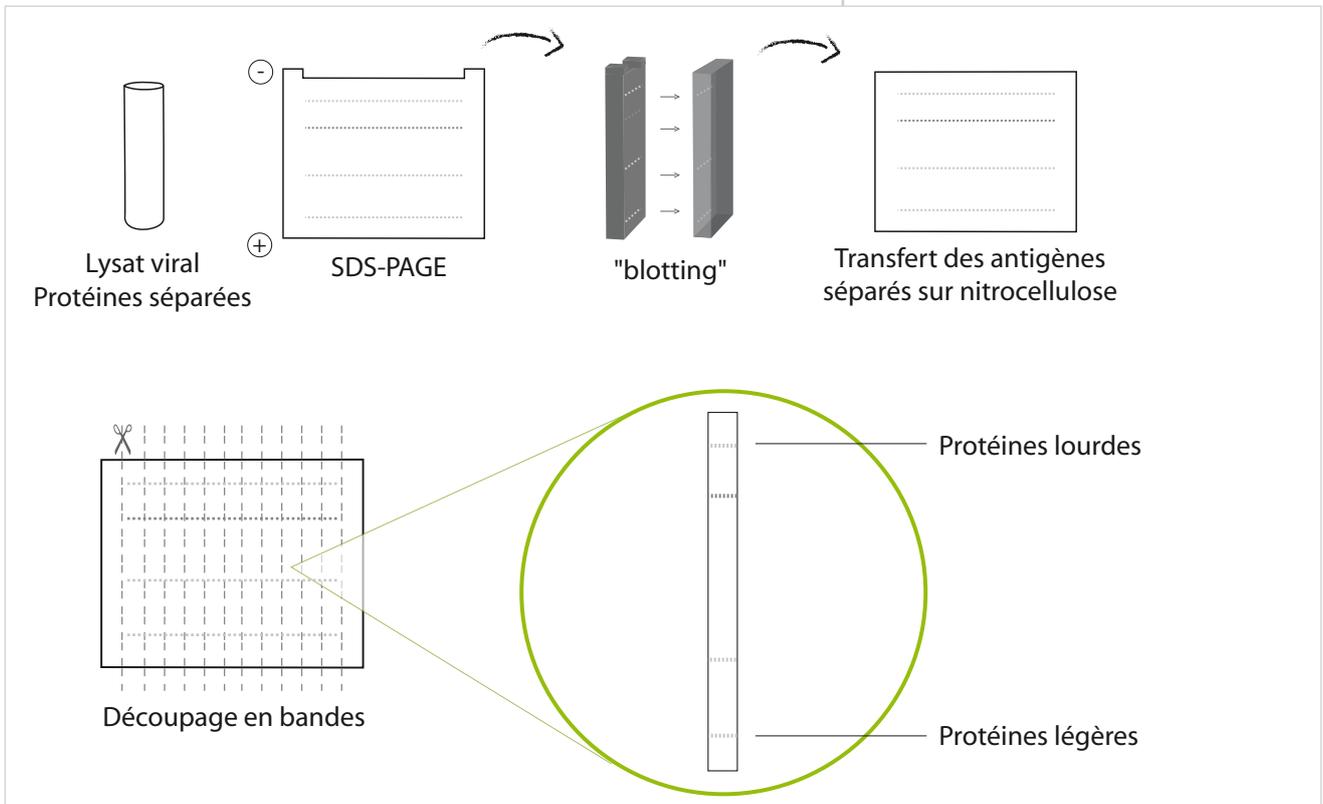
Western blot

Lorsqu'on confirme un résultat obtenu en sérologie de routine, on utilise parfois un test dit Western blot (WB), qui est une modification du principe ELISA énoncé plus haut.

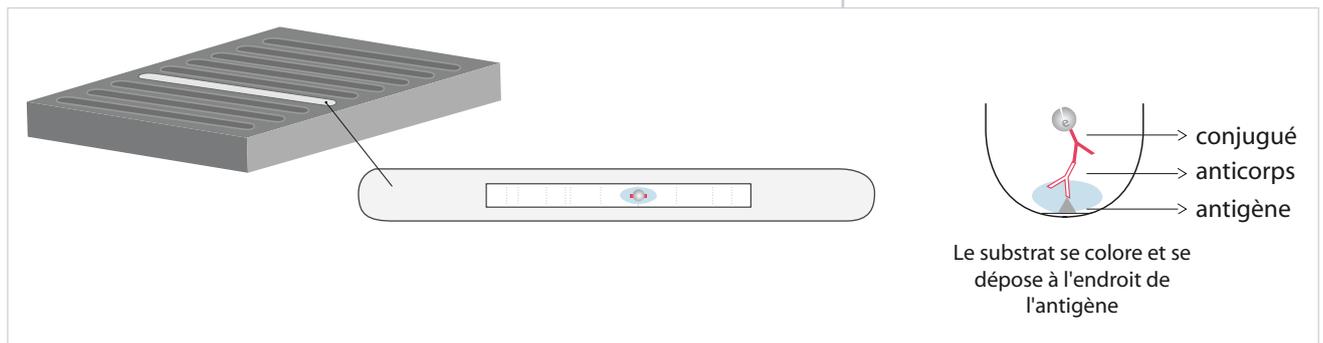
Dans le test WB, les protéines d'un **lysate viral** sont séparées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), ensuite transférées (« blotting ») vers une feuille de nitrocellulose ou de nylon.

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

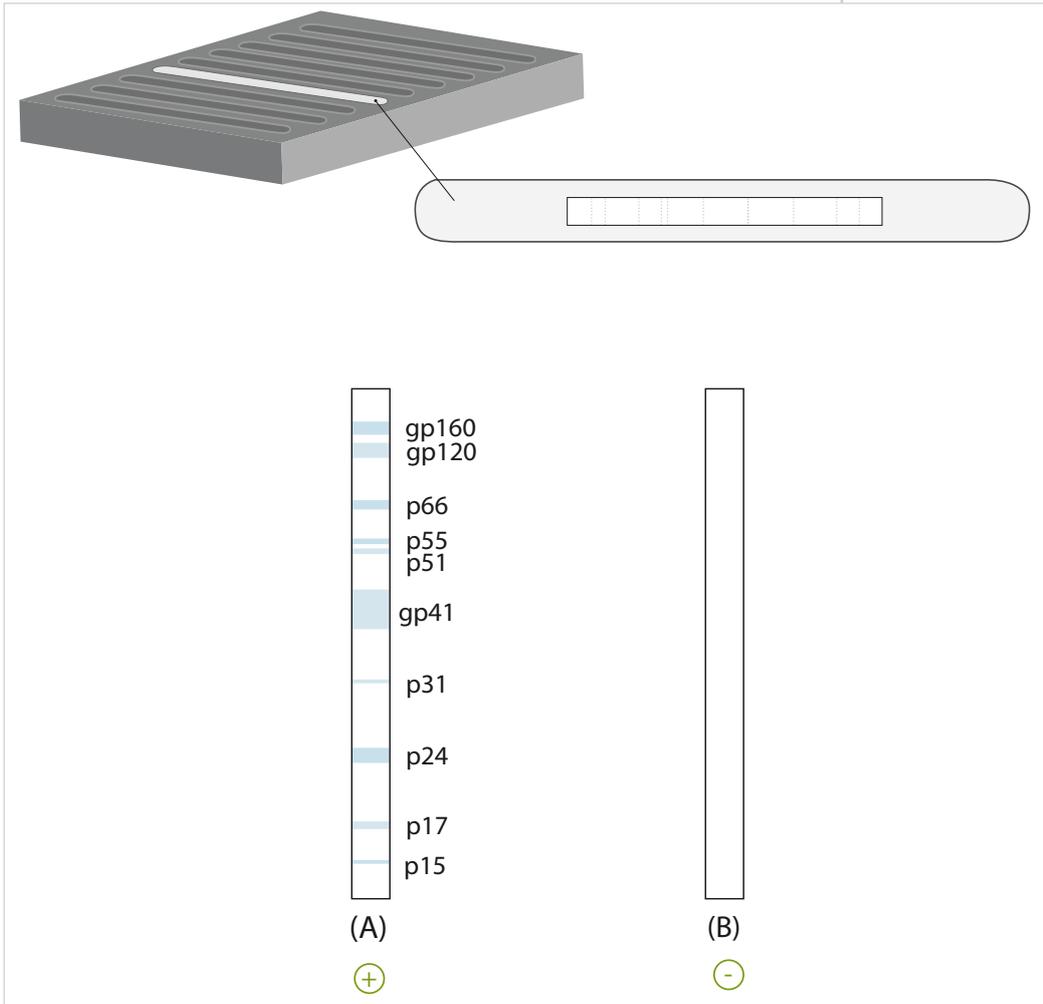
La réaction apparaît comme une bande de dépôt à l'endroit où se trouve la protéine concernée.



IV.4.1.7. Préparation des bandes de Western blot



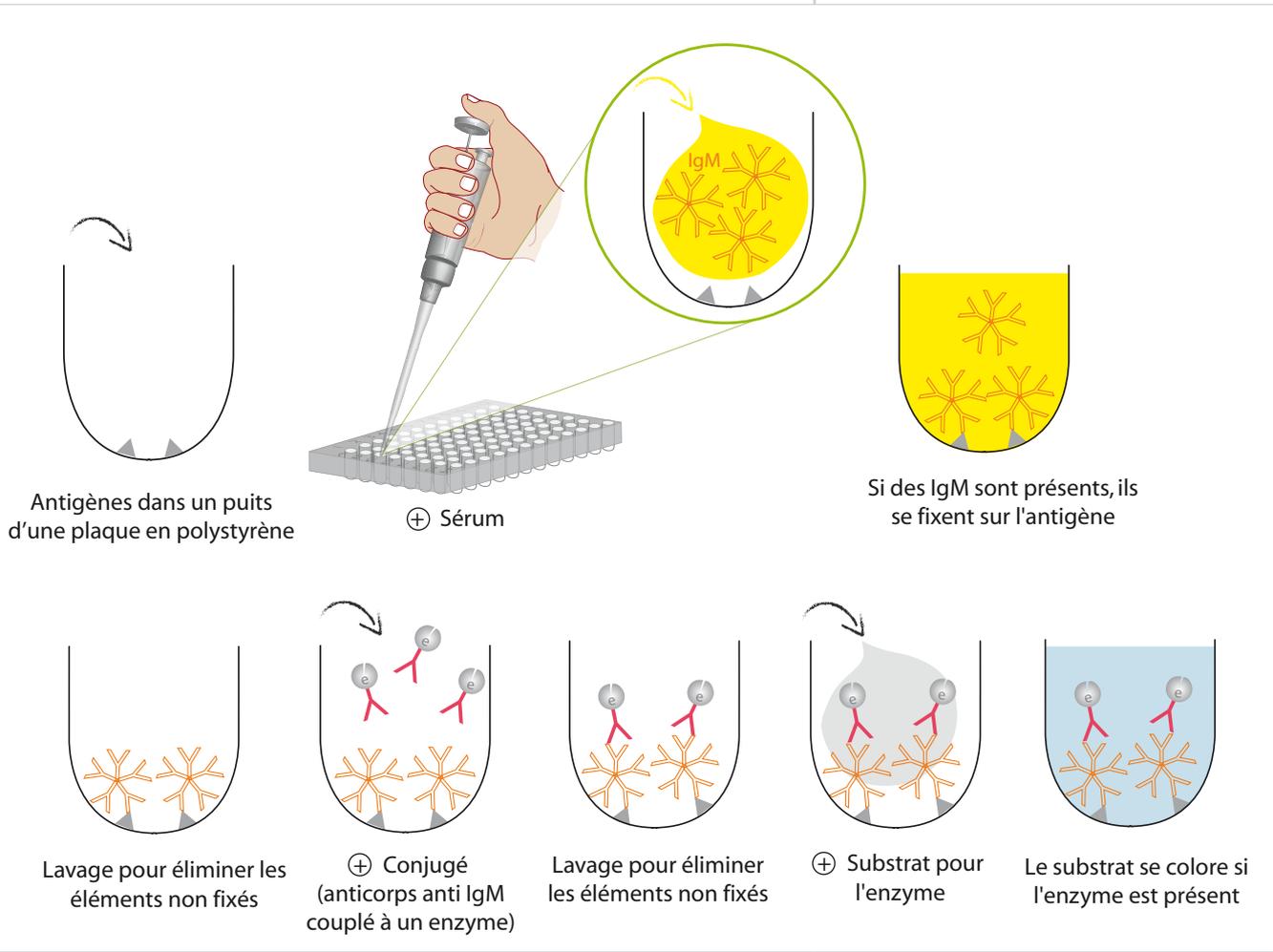
IV.4.1.8. Détection d'anticorps par Western blot



IV.4.1.9. Résultat de détection d'anticorps

Recherche des anticorps IgM

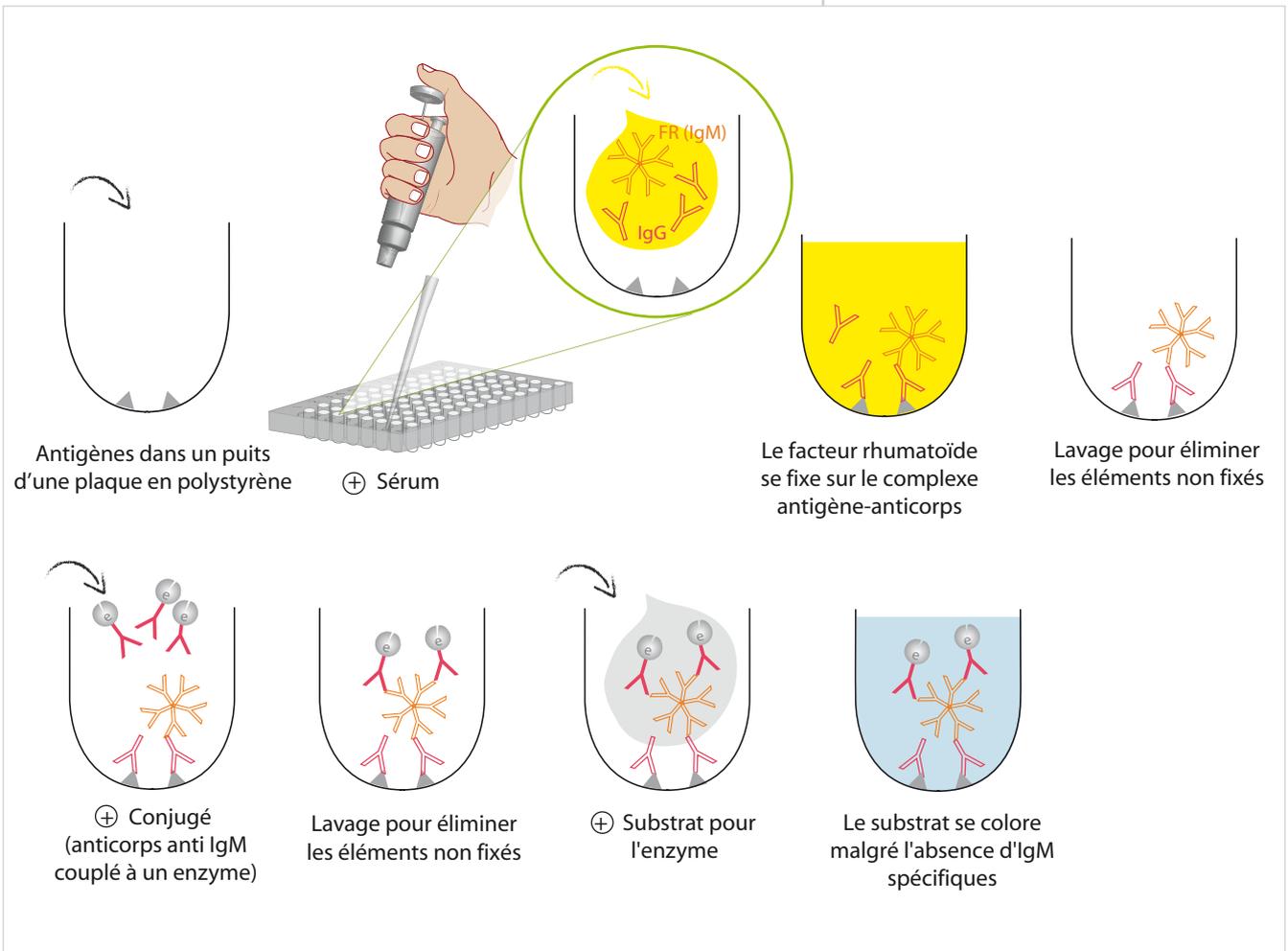
Dans les tests ELISA, le **conjugué** peut spécifiquement être dirigé contre une classe particulière d'immunoglobulines, les IgG ou les IgM. Les tests recherchant les IgM posent un certain nombre de problèmes, et de façon générale ils restent moins fiables que les tests IgG. Dans un test, suivant le format donné dans la figure IV.4.1.10 des résultats faussement négatifs ou positifs peuvent survenir. Des résultats faussement négatifs surviennent lorsqu'il y a beaucoup d'IgG accompagnant les IgM. Les IgG vont saturer les sites de réaction et ne permettront pas aux IgM de se fixer.



IV.4.1.10. Test immuno-enzymatique pour la reconnaissance des IgM

Interférence du facteur rhumatoïde (FR) dans les ELISA IgM

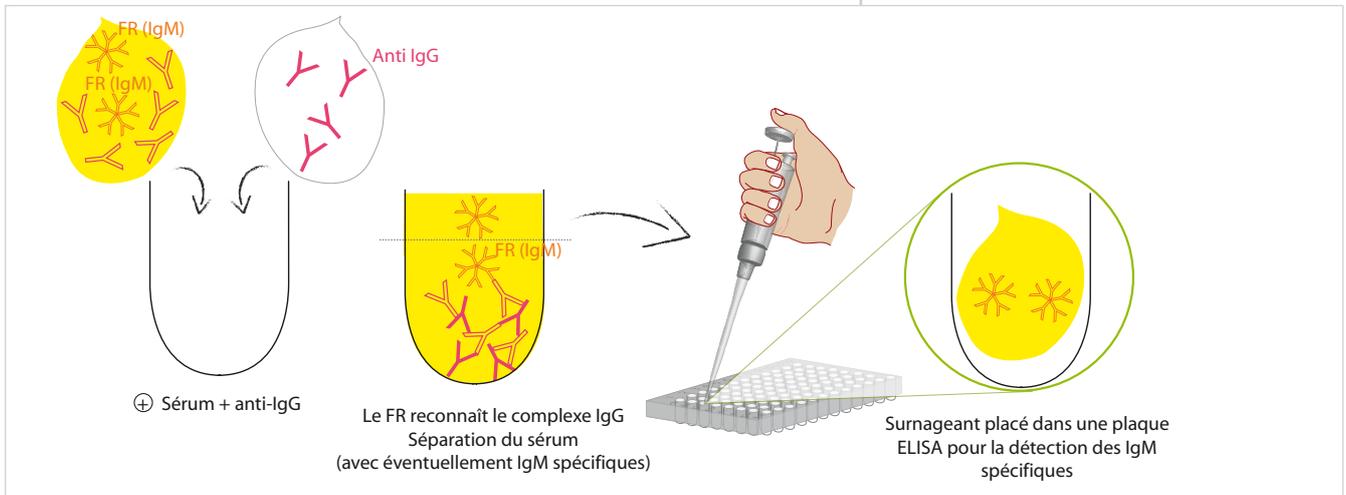
Par ailleurs, de nombreux facteurs peuvent intervenir pour créer des résultats faussement positifs. Le plus important est le **facteur rhumatoïde (FR)** : il s'agit d'IgM réagissant de façon non spécifique avec des IgG complexées ou liées à un antigène. Lorsque dans le test ELISA des IgG spécifiques se sont liées à l'antigène et que ce complexe est reconnu par le facteur rhumatoïde présent dans le sérum du patient, une réaction de reconnaissance d'IgM se fera lors de l'ajout de conjugué, donnant faussement l'impression que des IgM spécifiques sont présentes.



IV.4.1.11. Interférence du facteur rhumatoïde dans les ELISA IgM

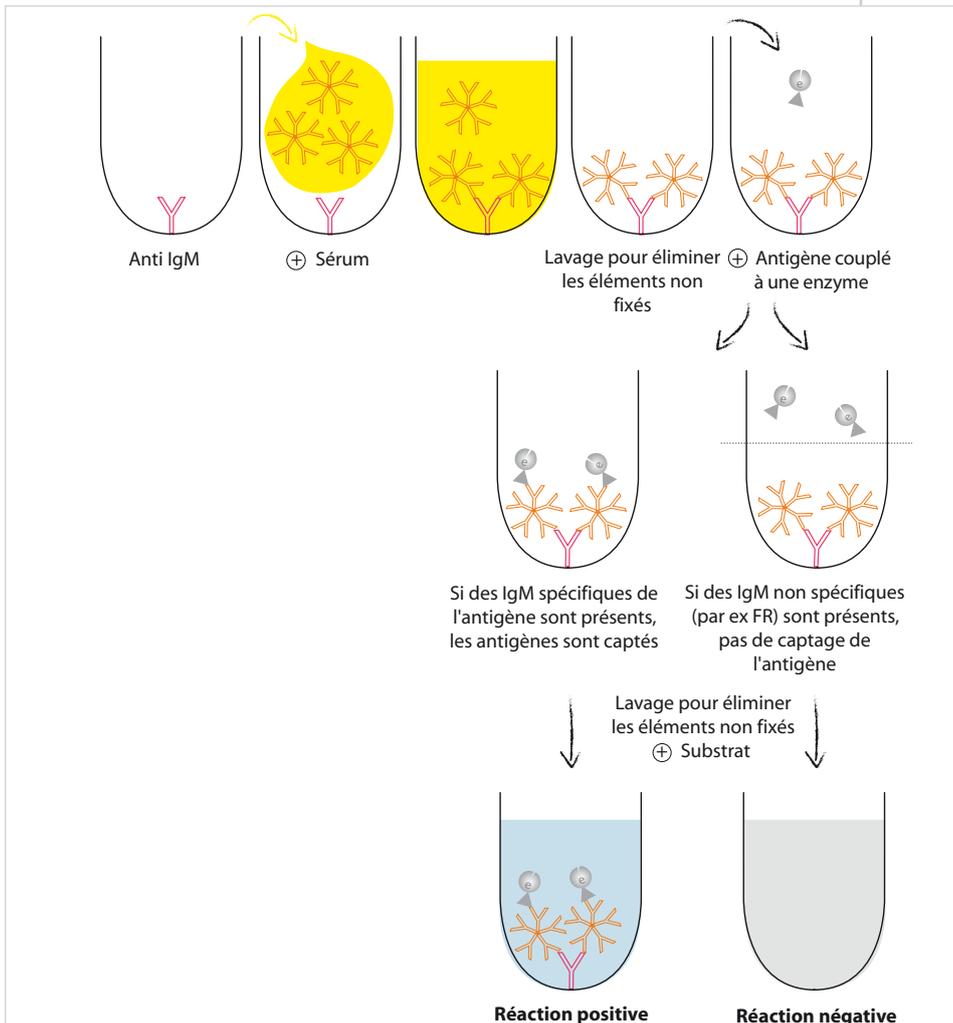
Il y a **deux** façon d'éviter l'effet du facteur rhumatoïde et en même temps d'empêcher l'effet d'une forte concentration d'IgG spécifiques :

1. Ajout d'anti-IgG : on dilue le sérum avec un diluant contenant des anticorps anti-IgG humaines. Ceci complexe les IgG (donc moins d'IgG en solution) et fixe le facteur rhumatoïde.



IV.4.1.12. Ajout d'anti-IgG

2. Test de capture : on utilise un ELISA de capture d'IgM : les IgM sont capturées par des anticorps anti-IgM fixés sur la phase solide. Ensuite on détecte les IgM avec l'antigène viral concerné conjugué à une enzyme. Seules les IgM spécifiques réagissent.



IV.4.1.13. Test de capture différenciant les IgM spécifiques et les IgM non spécifiques

4. Techniques diagnostiques

2. Recherche directe du virus

2.1. Microscopie 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. **Conçu au cours des années 1930**, notamment par Ernst Ruska qui obtiendra un prix **Nobel** pour cela en 1986, le microscope électronique à transmission « transmission electron microscope » (TEM) génère un faisceau d'électrons au départ d'une cathode soumise à un voltage très élevé. Ce faisceau d'électrons est dirigé sur un échantillon qu'il traverse pour en révéler l'image sur un écran fluorescent, une plaque photographique ou plus récemment sur une camera CCD qui peut alors révéler l'image en temps réel sur un moniteur.

D'autres microscopes comme le microscope à balayage « Scanning Electron Microscope » (SEM) ou le microscope de force atomique « Atomic Force Microscope » (AFM) permettent aussi de visualiser la structure ou des détails de particules virales.

Si elle présente un intérêt certain pour la virologie, la microscopie électronique est cependant peu utilisée en regard de l'investissement requis et de la technicité élevée qu'elle implique.

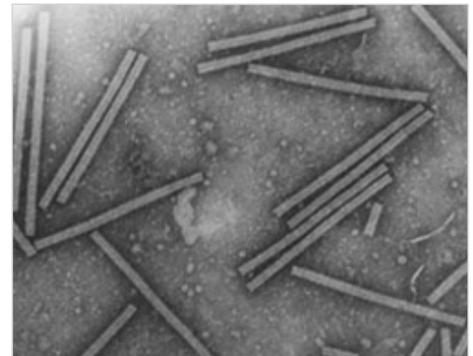
Pour la mise en évidence de virus, on travaille généralement avec des grilles de cuivre ou de zinc recouvertes d'un fin film de carbone et/ou de formvar. On dépose ensuite sur ce film une préparation virale que l'on va colorer avec des agents comme l'acétate d'uranyle ou l'acide phosphotungstique. Les virus apparaissent alors en contraste négatif comme des structures claires sur un fond foncé. On parle de coloration négative.

La technique permet d'identifier le virus sur base de sa structure et de sa taille.

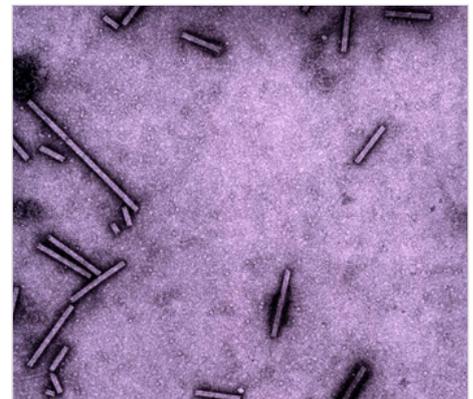
Son principal avantage est la rapidité de réalisation. On peut la combiner avantageusement avec les techniques immunologiques : on parle alors de décoration immunologique (la particule virale est entourée d'immunoglobulines qui lui donnent un aspect plus dense), d'immunosorbent electron microscopy (ISEM) lorsque l'on adsorbe les particules virales à l'aide d'immunoglobulines, un peu à la manière d'un ELISA. Dans certains cas, on a utilisé des particules métalliques sphériques pour marquer spécifiquement certaines structures virales (**immunogold-labelling**)



IV.4.2.1. Microscope électronique



IV.4.2.2. Particules virales (en microscopie électronique)

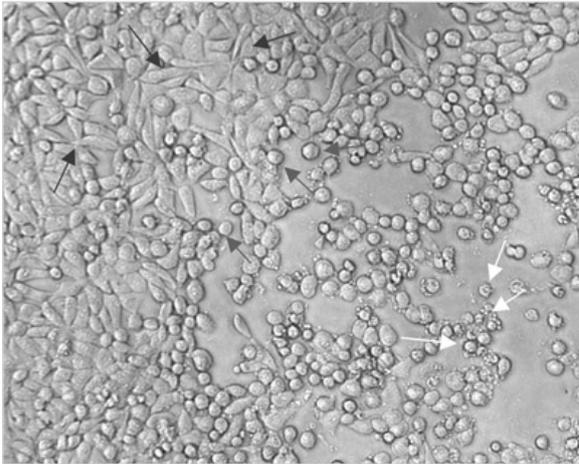


IV.4.2.3. Identification de structure virale par la technique de la décoration immunologique

2.2. Culture virale

La culture de cellules (cell culture) permet de maintenir en croissance des cellules en conditions contrôlées. Ce procédé a été largement utilisé pour l'isolement et la maintenance de souches virales. Bien que cette approche soit souvent lente et qu'elle requiert une technicité élevée, **elle a longtemps été considérée** comme le standard pour les laboratoires de diagnostic de maladies virales humaines ou animales (Leland and Ginocchio, 2007). Son principal avantage est de permettre l'isolement d'un grand nombre de virus très différents.

Le chercheur va chercher à détecter, par examen microscopique de cellules en culture, des indices d'infection virale. Le spectre des effets est assez large et requiert une expérience conséquente. On peut citer le gonflement ou le rétrécissement des cellules, les regroupements ou la formation de syncytium pour aller dans certains cas jusqu'à la destruction complète. Ces changements sont appelés **effets cytopathiques** (cytopathic effects –CPE).



Certaines détections peuvent être réalisées endéans les premières 24h comme souvent pour le HSV (uman Herpes Simplex Virus), mais d'autres demandent une période bien plus longue.

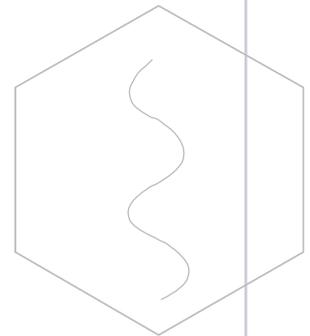
Dans certains cas, on va combiner le test à une **hémadsorption** (HAD) qui permettra l'identification spécifique de virus qui expriment des **hémagglutinines**.

Une détection directe d'antigènes viraux par fluorescence peut compléter adéquatement la technologie et raccourcir de façon importante la durée de la culture.

Les techniques de culture cellulaire ont beaucoup évolué au cours des dernières années pour offrir de nouveaux formats de culture et des alternatives intéressantes en terme de diagnostic.

D'autres techniques, comme l'inoculation d'œufs embryonnés ou encore d'animaux de laboratoire, si elles ne sont pas à proprement parler des techniques liées à la culture de cellules, permettent la mise en évidence de virus.

Côté virus de plantes, on a aussi utilisé les cultures de cellules végétales (**protoplastes**) pour la multiplication et l'étude de virus. Toutefois, la technicité élevée requise en a limité l'intérêt dans le cadre du diagnostic viral.



IV.4.2.4. Effet cytopathique

Flèches noires : cellules normales

Flèches grises : après infection, des îlots de cellules commencent à s'arrondir

Flèches blanches : les cellules se détachent et meurent

2.3. Détection directe d'antigènes

La détection directe des protéines antigéniques d'origine virale permet dans de nombreux cas de poser un diagnostic rapide. Dans certains cas, cette détection est rapide et facile, comme par exemple pour la détection du virus respiratoire syncytial (RSV) dans des sécrétions respiratoires ou la détection d'une antigénémie dans les polymorphonucléaires neutrophiles lors d'une infection par le cytomegalovirus (CMV).

Lorsque le virus n'est pas cultivable, cette approche de détection directe est souvent privilégiée. Ce sera le cas par exemple pour la détection de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (AgHBs) présent dans le sang ou encore pour les virus qui infectent les plantes.

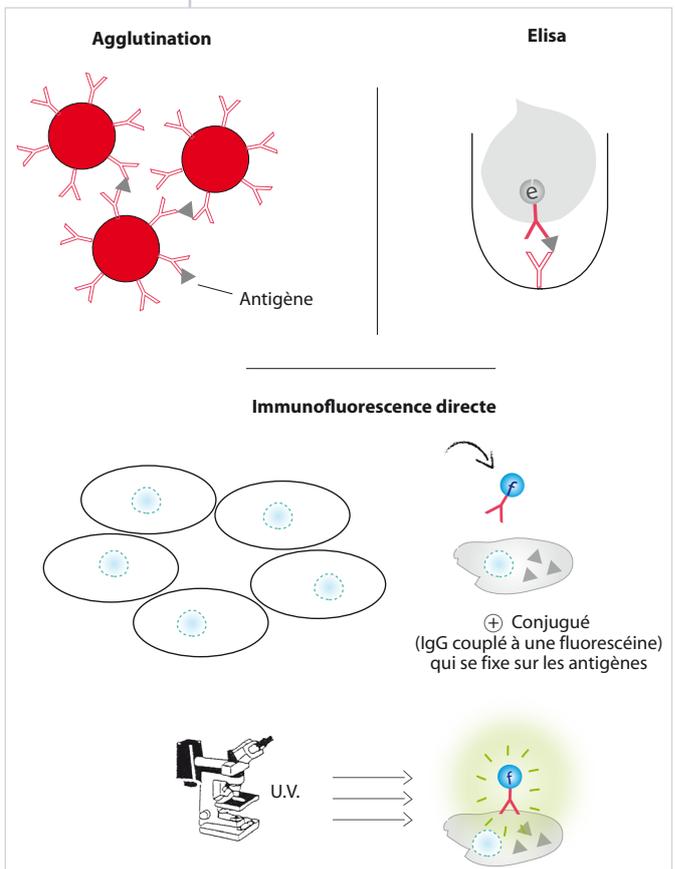
Lorsque le virus est cultivable, l'utilisation de la détection directe permet d'accélérer le diagnostic et d'obtenir une détection plus rapide.

Les techniques utilisées pour la détection directe d'antigènes sont les mêmes que celles utilisées pour la détection d'anticorps, déjà décrites. On va donc utiliser des techniques d'agglutination, de précipitation, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ou d'immunofluorescence. Dans ce dernier cas, on va utiliser des anticorps anti-antigène marqués avec une molécule fluorescente, comme l'isothiocyanate de fluorescéine. L'examen de la préparation à l'aide d'un microscope à épifluorescence, qui émet une lumière ultraviolette, permet la détection d'une coloration spécifique en surface des cellules examinées.

Il est aussi possible de détecter les protéines virales après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur une membrane de nitrocellulose : on parle alors de « Western blot » (FIGURE: Western blot BVQ protéine de capside).

Cette technique permet notamment, outre la détection de la protéine virale, que l'on peut détecter au moyen d'anticorps, de mettre en évidence son poids moléculaire. Cette technique est également utilisée pour la recherche d'anticorps contre des composantes virales.

IV.4.2.5. ELISA - Vidéo



IV.4.2.6. Détection d'antigènes

2.4. Détection d'acides nucléiques

Il est possible de détecter l'ADN ou l'ARN viral par hybridation. Le principe à la base de cette technique est tout simplement celui de la complémentarité des doubles brins ! Si l'on soumet les acides nucléiques à une température élevée (94°C), les brins se dissocient. Si lors du refroidissement, une sonde complémentaire à un des brins est présente, elle s'appariera alors au brin cible. Les sondes sont généralement marquées à l'aide de marqueurs radioactifs ou d'une molécule comme la digoxigénine, facilement identifiable. Appliquée à la détection de l'ARN, on va parler de « Northern blot », et de « Southern blot » lorsqu'il s'agit de détection d'ADN.

Cette technique est utilisée pour la détection de certains virus en anatomopathologie. Elle est de moins en moins utilisée dans le domaine du diagnostic pur, mais conserve tout son intérêt pour l'étude du fonctionnement viral au sein de la cellule.

Mais depuis une vingtaine d'années, de nouvelles techniques ont véritablement révolutionné le domaine du diagnostic.

La réaction de polymérisation en chaîne (« **polymerase chain reaction** » ou **PCR**) permet de copier une séquence nucléotidique connue un très grand nombre de fois ce qui en facilite la détection, à l'aide d'amorces spécifiques et d'un appareil appelé thermocycleur.

Cet appareil est capable de répéter rapidement une série de cycles de chauffe et de refroidissements. L'excellente connaissance des génomes viraux a facilité ce développement technologique.

Dans le cas des virus à ARN, on réalisera d'abord une transcription inverse (reverse transcription) à l'aide d'une enzyme appelée transcriptase inverse (reverse transcriptase), avant la réalisation de la PCR. On parlera alors d'une RT-PCR.

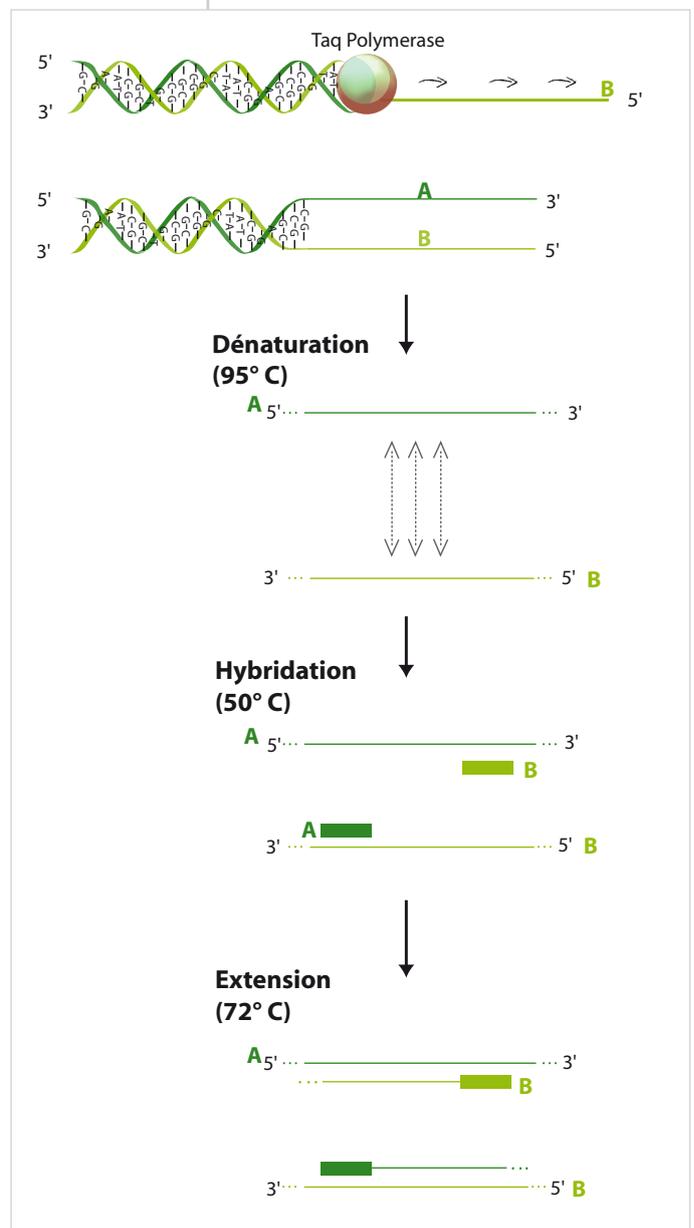
La technique est maintenant largement utilisée en virologie et déclinée en plusieurs versions, comme la PCR multiplex qui vise l'amplification de plusieurs cibles au sein de la même réaction ou encore la PCR nichée (nested PCR), qui permet d'augmenter encore la sensibilité de la réaction en réalisant une PCR suivie d'une deuxième PCR ciblant une portion interne du premier amplicon produit.

La technique PCR, si elle offre l'avantage d'une très grande sensibilité, n'en présente pas moins des défauts !

Le premier est la difficulté de quantifier l'ADN ciblé. Ce problème a été contourné avec le développement de PCR quantita-



IV.4.2.7. Thermocycleur



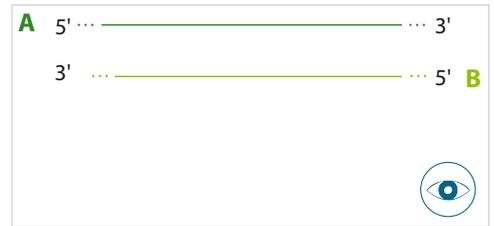
IV.4.2.8. Principe de la PCR

tives... La quantification de la fluorescence associée à une sonde Taqman® ou à un agent colorant comme le SYBR® green permet de quantifier l'ADN ciblé dans la réaction, en suivant l'élaboration des produits d'amplification au fur et à mesure de la réaction, sans devoir ouvrir le tube réactionnel : il s'agit d'une PCR quantitative en temps réel.

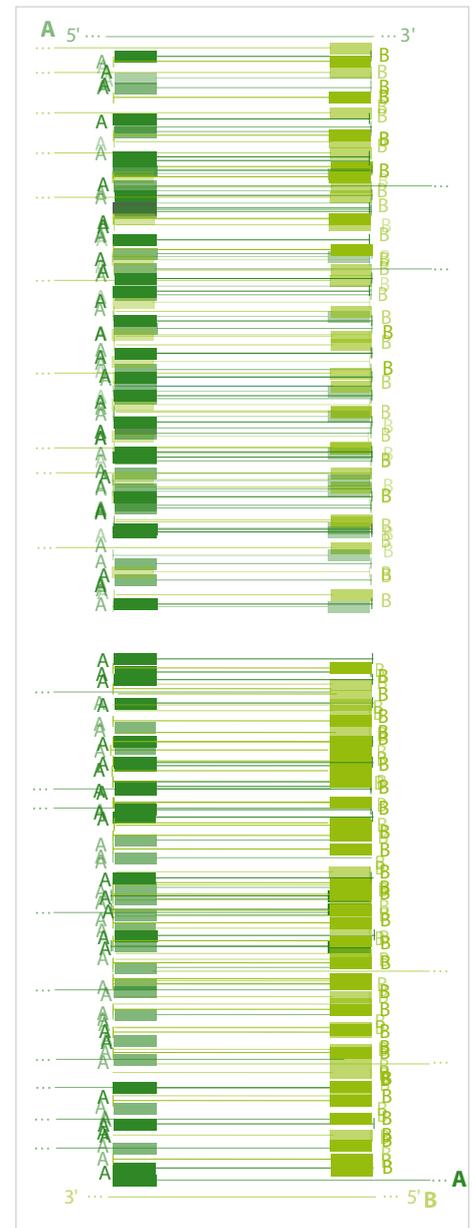
Un deuxième problème rencontré avec cette technologie est sa très grande sensibilité : une simple contamination de l'échantillon à tester peut conduire à des faux positifs. Cette limitation implique la mise en place de mesures strictes par le laboratoire de manière à limiter au maximum ces risques. Par ailleurs les produits d'amplification, fort riches en amplicons, sont une source importante de contamination, si on ne sépare pas clairement les zones de préparation des zones d'amplification dans le laboratoire. Ce risque n'existe par en cas de PCR en temps réel où le tube d'amplification reste fermé.

Troisième problème : les virus ont un génome extrêmement **variable**. Lorsque la séquence nucléotidique recherchée n'est plus exactement identique à celle ciblée par la PCR, cela peut entraîner des résultats faussement négatifs. Plusieurs solutions techniques minimisent ce problème : choix judicieux des amorces dans une zone très stable du génome, utilisation d'amorces dégénérées, c.à.d. où à une même position plusieurs nucléotides sont possibles.

La PCR et les techniques d'hybridation permettent de quantifier les acides nucléiques viraux, et donc les virus eux-mêmes ! On parle alors de **charge virale**. Elle est souvent déterminée par PCR ou RT-PCR. L'étude de la charge virale permet de suivre avec précision le développement d'une infection, de proposer des indications de traitement et d'en suivre les effets. Par exemple, la charge virale est actuellement souvent utilisée comme outil de suivi dans les infections par le virus de l'hépatite B, de l'hépatite C, de l'immunodéficience acquise (VIH ou HIV) ou le cytomégalo-virus. De la même manière, on cherche à quantifier les virus pathogènes des végétaux au sein de cultures de protoplastes, pour comprendre leur fonctionnement au sein de la cellule végétale.



IV.4.2.8. Cycles successifs



IV.4.2.9. Xième cycle

4. Techniques diagnostiques

3. Caractérisation du virus

3.1. Classification précise du virus

Lors du diagnostic d'une infection virale, on peut s'arrêter à la morphologie générale, telle qu'observée par microscopie électronique (ex. : capsidie icosaédrique sans enveloppe de 28-30 nm), à la famille virale (ex. : *Picornaviridae* ou *Herpesviridae*), à la sous-famille (ex. : α -*Herpesvirinae*) ou à l'espèce (ex. : virus de l'hépatite C).

Diverses raisons peuvent pousser à identifier le virus de façon plus précise et il existe différentes classifications pour distinguer à l'intérieur des espèces virales :

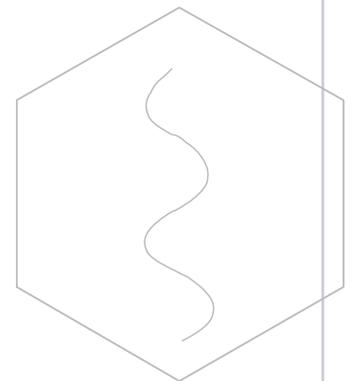
Sérotypes : ils se distinguent l'un de l'autre par leurs antigènes, qu'on peut distinguer à l'aide d'anticorps spécifiques, d'où le nom de sérotype. Ces sérotypes sont parfois regroupés dans des sérogroupe. (ex. : les entérovirus sont classiquement reconnus comme sérotypes, comme par exemple echo 30)

Génotypes : ils se distinguent l'un de l'autre par la similitude de leur séquence nucléotidique. Nous avons vu sous « **variation génétique** » que les virus se modifient continuellement. Il est ainsi possible de les séparer d'après des regroupements **phylogénétiques**. Ces génotypes peuvent avoir une importance capitale dans la pathologie (ex. : Les papillomavirus peuvent appartenir à des génotypes différents, parmi lesquels on peut distinguer des types bénins et malins. Ces derniers (surtout génotypes 16 et 18) sont associés par exemple au cancer du col de l'utérus) ou dans le traitement (ex. : les infections par les génotypes 2 et 3 du virus de l'hépatite C répondent mieux et plus rapidement au traitement que les infections par le génotype 1).

Electrophérotypes : cette distinction est typiquement utilisée pour les rotavirus. Ce sont des virus contenant un génome ARN segmenté en 11 segments. En faisant migrer l'ARN viral par électrophorèse, on obtient un patron de bandes représentant les différents segments. On observera une différence dès que le poids et la charge des segments diffèrent. Ce test fut fort utilisé jusqu'il y a quelques années pour suivre la dissémination des virus dans la population. Actuellement, on fait plus souvent appel à l'analyse phylogénétique.

Pathotypes : pour les virus des végétaux et des animaux non-humains, le spectre d'hôte, la capacité à infecter une plante particulière ou encore l'expression d'un phénotype particulier lors de l'infection sont des critères de distinction faciles et intéressants. On parle alors de pathotypes.

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des virus permet de construire des arbres dont les branches relient les séquences les plus similaires. Ces analyses permettent de retracer l'origine commune de certains virus,



ce qui est particulièrement utile quand on recherche des chaînes de transmission, par exemple à l'intérieur d'une institution de soins de santé.

3.2. Résistance aux antiviraux

L'introduction de médicaments antiviraux a entraîné l'adaptation des virus avec l'apparition de résistances aux produits antiviraux.

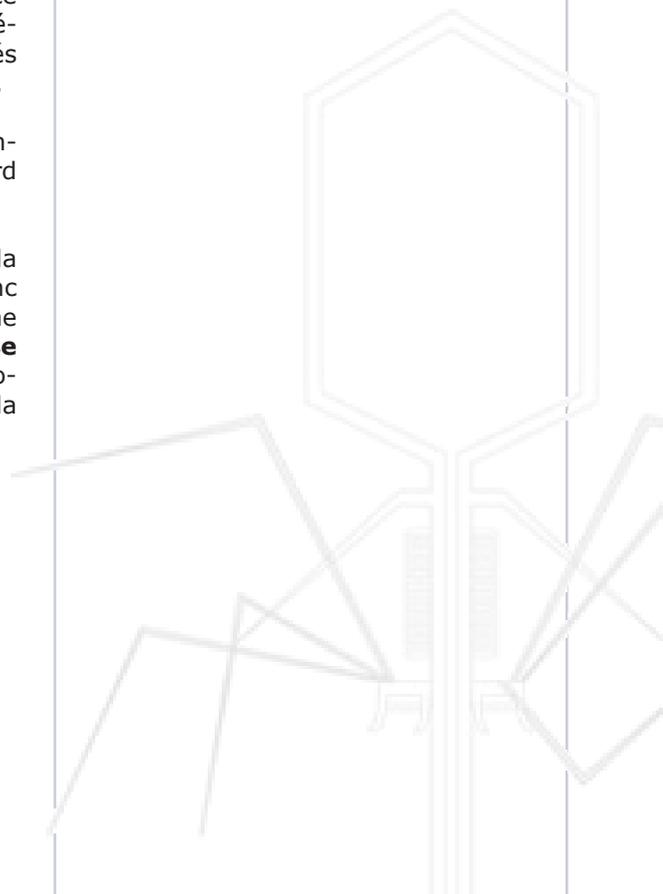
Cas particulier des virus de plantes ▶ Pour en savoir +
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Analyse phénotypique : Par cette analyse, on recherche la résistance d'un virus se répliquant **in vitro** pour un médicament donné. On peut travailler avec un virus isolé à partir du patient et qu'on a propagé en culture cellulaire. On peut aussi amplifier la région du génome viral qui code la cible du médicament (par exemple, la transcriptase inverse du virus du SIDA) et l'insérer dans un virus de référence dont on teste ensuite la sensibilité à la molécule antivirale. Les deux techniques présentent des avantages et des inconvénients, mais l'inconvénient majeur des deux est que ce sont des techniques longues et laborieuses.

Analyse génotypique : La région d'intérêt du génome viral est amplifiée et séquencée. On déduit alors, de cette séquence nucléotidique, la séquence en acides aminés de la protéine codée par cette région. Un certain nombre de mutations clés sont connues qui confèrent une résistance au virus. Souvent, les mutations sont multiples et il est nécessaire d'utiliser des algorithmes plus ou moins compliqués et régulièrement mis à jour pour interpréter ce qu'on voit.

(Quelques sites de mise à jour d'algorithmes : l'ANRS française <http://www.hivfrenchresistance.org/> ; Stanford database et Rega : <http://hivdb.stanford.edu/>)

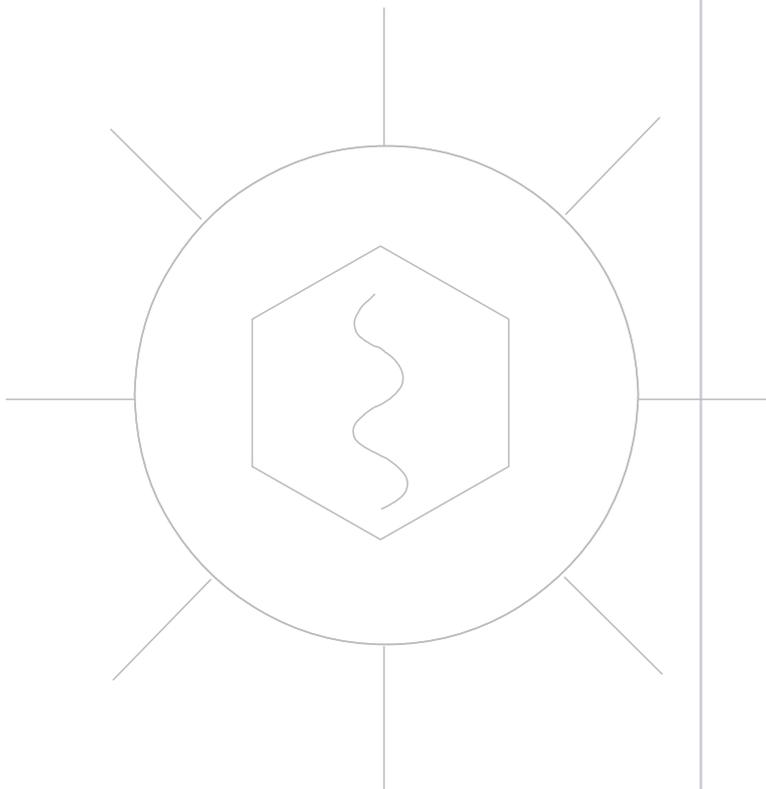
A cause de l'existence du phénomène de quasi-espèce et la possibilité d'une différence entre le virus produit (et donc détecté) et le virus latent, le génotypage a ses limites. Une précaution importante est d'**effectuer ce genre d'analyse pendant le traitement par ce médicament**. Ainsi la population virale examinée est composée de virus soumis à la pression sélective du traitement.



3.3. Charge virale

Les virus causant une **virémie** peuvent être quantifiés dans le **sérum** ou le **plasma** afin de suivre l'efficacité d'un traitement. On appelle la concentration virale, **la charge virale**. Différentes techniques ont été proposées pour quantifier le virus du SIDA, le virus de l'hépatite B et le virus de l'hépatite C. Actuellement, c'est surtout la PCR en temps réel qui est utilisée. Il existe des systèmes automatisés permettant de tester de grands nombres d'échantillons. Les résultats peuvent être exprimés en copies/ml ou en UI/ml, lorsque le dosage se fait par rapport à un standard international. Les variations de 0,3 à 0,5 log₁₀ sont généralement considérées comme significatives.

Au niveau de la plante, des techniques similaires sont utilisées pour le dosage des virus au départ de l'ARN ou de l'ADN viral, via un extrait total des acides nucléiques d'un échantillon de plante. Il est ainsi capital de connaître la charge virale pour pouvoir comparer différents génotypes de plantes quant à leur résistance à l'infection virale. D'autres techniques, comme la détection par hybridation in situ ou détection immunologique, permettent de localiser l'infection virale et de mieux connaître sa distribution.



5. Quiz et tests

Plusieurs possibilités s'offrent à vous :

- Tableau d'évaluation des connaissances
- Questions fermées et questions ouvertes à réponse brève et unique
- Jeux
- Questions ouvertes

► Pour accéder aux quiz et tests : [<http://www.virologie-uclouvain.be>]

6. Bibliographie

Références " Techniques diagnostiques "

Leland, D.S., Ginocchio, C.C., 2007. **Role of cell culture for virus detection in the age of technology.** Clinical Microbiology Reviews, 20, 1 : 49-78.

