11

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Robert Alain, Laurent Berthiaume et Michel Trudel

Le microscope électronique, par son pouvoir de résolution très élevé, est un instrument de choix pour visualiser les détails de structure les plus fins au sujet des virus, atteignant pratiquement leur niveau moléculaire. Cette qualité de résolution est possible grâce à des techniques de coloration indirectes telles que l'imprégnation négative avec des sels de métaux lourds et l'ombrage au platine à haute résolution. La technique de Kleinschmidt qui permettent de visualiser les acides nucléiques est d'ailleurs une application de l'ombrage à haute résolution. Les techniques d'enrobage et de coupes ultra-fines offrent des avantages complémentaires de l'imprégnation négative, tout en présentant une perte au niveau du pouvoir de résolution due à l'épaisseur des coupes et à la difficulté d'une coloration fine des structures. Les techniques d'imprégnation négative permettent de voir les structures virales dans leur intégrité, favorisant une interprétation en trois dimensions des images.

La microscopie électronique a joué un rôle majeur dans le développement de la virologie. La coloration négative, en particulier, a permis la visualisation rapide des particules virales et de leurs sous-unités, formant la base de la classification virale moderne. Combinée à l'utilisation de sérums anti-viraux ou d'anticorps monoclonaux, ces techniques ont permis l'identification de virus apparentés.

1. PRÉPARATION ET FIXATION DU SPÉCIMEN

Parmi les fixateurs utilisés pour la microscopie photonique, seuls un nombre restreint s'emploie en microscopie électronique à cause de la grande résolution demandée. Les mêmes principes de base de fixation et de préservation s'appliquent autant à la microscopie photonique qu'électronique.

Le choix du fixateur est déterminé par:

- la nature du matériel à préserver
- la dimension du spécimen
- l'effet du fixateur sur la substance ou la structure à étudier (i.e. acides nucléiques, graisses, hydrates de carbone, protéines, membranes, etc.)

Une double fixation est préférable à la fixation simple puisque les structures cel-

lulaires ne sont pas toutes préservées par les mêmes solutions.

1.1. SUSPENSIONS CELLULAIRES ET CULTURES DE TISSUS

Pour la fixation des cellules en feuillet, le milieu est remplacé par le fixateur, puis les cellules, après grattage avec un policeman, sont centrifugées à basse vitesse pour former un culot rigide. En ce qui concerne les cellules en suspension sont d'abord centrifugées et, après élimination du surnageant, recouvertes par le fixateur.

La vitesse de centrifugation requise pour former un culot dépend de la nature du spécimen. Pour les cellules, une centrifugation à 1000 x *g* pendant 10 min est satisfaisante. Si le volume est limité, il est possible d'utiliser la micro-centrifugation (Eppendorf ou même Airfuge de Beckman).

Pour les suspensions ne formant pas de culots solides, il suffit de resuspendre les cellules dans une solution d'agar.

Il faut éviter de briser les culots ainsi formés tout le long de la procédure de déshydratation, sauf s'ils sont trop gros. Lors de l'enrobage, les culots sont coupés en petits cubes d'environ 1 mm^3.

1.2. TISSUS HUMAINS OU ANIMAUX

Après un prélèvement de tissus, ceux-ci doivent être fixés très rapidement pour éviter le processus d'autolyse. Il est important de choisir le fixateur adéquat. Les fixateurs aldéhydiques sont les fixateurs de choix. Dès le début, il est préférable de couper le tissu en petits cubes de 1 mm^3 afin d'obtenir une fixation uniforme.

1.3. FIXATION

Les solutions de fixation sont préparées dans des solutions tamponnées dont voici les principales:

Tampon cacodylate

Cacodylate de sodium 0.1 M
pH 7.2

Tampon collidine

2,4,6 triméthylpyridine.....2.67 mL

HCl 1N.....30 mL

H_2O.....à 100 mL

Tampon phosphate (formule pour culture de tissus)

NaCl.....8.0 g

KCl.....0.2 g

$Na_2HPO_4.2H_2O$.....1.15 g

$CaCl_2$.....0.1 g

$MgCl_2.6H_2O$.....0.1 g

H_2O.....à 1000 mL

Stériliser par filtration sur une membrane de 0.22 µm.

1.3.1. Tétroxide d'osmium (OsO_4)

Ce fixateur est très toxique. Il peut fixer l'épithélium de la cornée. Il doit être utilisé sous une hotte ventilée.

L'OsO4 permet de fixer et de colorer les composants lipidiques. Dans nos laboratoires, nous diluons l'OsO4 dans du tampon collidine à pH 7.4 contenant 5% de saccharose.

1.3.2. Permanganate de potassium

Il s'agit d'une solution de rechange à l'OsO_4, car ce fixateur est insoluble dans les huiles et les gras. Il est un agent oxydant puissant et il doit être utilisé avec soin. Il préserve bien certaines membranes cellulaires et la matrice cellulaire apparaît finement granulaire; cependant les particules cytoplasmiques ayant un contenu élevé en ARN et les myofilaments du muscle strié sont mal conservés. De plus, la fixation des chromosomes n'est pas satisfaisante.

1.3.3. Fixateurs aldéhydiques

Les aldéhydes ne colorent pas les tissus durant la fixation, et certains (l'acroléine et la formaldéhyde) pénètrent les tissus assez rapidement pour fixer de gros spécimens. Certains composants de tissus fixés avec un aldéhyde, par exemple les membranes, sont extraits durant la déshydratation et, habituellement, une fixation aldéhydique primaire est suivie par un traitement au OsO_4, bien que l'acroléine et le glutaraldéhyde donnent une excellente préservation des structures fines lorsqu'elles sont employés seuls.

Les meilleurs systèmes tampons pour les aldéhydes sont les tampons phosphate ou cacodylate. Après la fixation, les spécimens sont conservés dans une solution tampon à 4°C pendant plusieurs mois, sans altération des structures fines.

Le **glutaraldéhyde** est le fixateur de choix pour la microscopie électronique. Il donne une meilleure préservation générale des structures fines et occasionne peu de destruction de l'activité enzymatique (Kay 1965).

Nous utilisons le glutaraldéhyde à une concentration finale de 2.5% dans du tampon cacodylate de pH 6.8 à 7.6. Il est important de vérifier le pH de la solution stock de glutaraldéhyde à 50%. Si son pH est inférieur à 3.5, la qualité de fixation peut être pauvre, à cause d'impuretés ou d'une oxydation. La solution stock peut être purifiée en ajoutant une petite quantité de carbonate de barium. Le précipité ainsi formé est enlevé par centrifugation.

Les spécimens sont fixés, selon leurs grosseurs, de 15 min à 4 h à 4°C avec le fixateur glutaraldéhyde tamponné. Pour les études de structures fines, il est préférable d'utiliser de petits blocs d'environ 1 mm^3 et de les fixer durant 1 à 2 h.

Pour une post-fixation adéquate dans le tétroxide d'osmium, il est essentiel de laver les spécimens dans une solution tampon. Il suffit de faire 3 lavages à intervalles de 15-30 min dans le tampon approprié et d'y laisser les échantillons au moins une nuit avant la fixation secondaire au OsO_4. Il est préférable d'ajouter du saccharose à la solution de lavage afin de maintenir la même osmolalité que le fixateur.

1.4. DÉSHYDRATATION

Le principe de la déshydratation consiste à enlever l'eau du spécimen pour la remplacer par de l'éthanol ou de l'acétone qui, à son tour, sera remplacé par le milieu d'enrobage.

La déshydratation doit être la plus courte possible afin de réduire le rétrécissement et l'extraction des composants tissulaires au minimum. Il suffit d'effectuer plusieurs bains dans la solution déshydratante en débutant par une faible concentration (25%) et en augmentant progressivement jusqu'à l'obtention d'une solution à 100% par des changements à 15-30 min d'intervalle. Il semble que les tissus rétrécissent moins dans l'acétone que dans l'alcool. On utilise l'acétone avec les résines de

polyester (Vestopal) et l'éthanol avec les résines d'époxy (Epon). Avec le SPURR, on peut utiliser l'un ou l'autre.

2. MILIEUX D'ENROBAGE

Les propriétés d'un milieu d'enrobage idéal sont:

- le milieu, avant le durcissement, doit être complètement soluble dans l'éthanol ou l'acétone
- il doit avoir une faible viscosité afin de bien pénétrer le tissu
- il doit durcir uniformément sans rétrécissement ou expansion, de sorte qu'il n'y ait pas de rupture dans le spécimen
- il doit résister au bombardement électronique du microscope.

Aucun milieu d'enrobage ne possède toutes ces qualités.

2.1. ENROBAGE

2.1.1. Résines d'époxy

Avantages
- stable au bombardement électronique
- peu de rétrécissement
- durcissement uniforme

Désavantages
- très visqueux
- compatibilité limitée avec l'éthanol

Araldite
- soluble dans l'éthanol et l'acétone
- peut causer des allergies

Epon
- basse viscosité
- pénétration facile dans le spécimen
- cause parfois du rétrécissement
- parfois difficile à couper

Maraglas
- facile à couper
- résine claire à basse viscosité
- réagit bien avec l'acétone, l'oxyde de propylène , mais pas avec l'éthanol

SPURR
- peu visqueux
- pénétration très rapide dans le spécimen
- soluble dans l'éthanol ou l'acétone
- toxique

2.1.2. Vestopal W

Avantages
- similaires aux résines d'époxy
- durcit uniformément
- aucun dommage dû à la polymérisation
- stable au bombardement électronique
- dure mais se coupe bien

Désavantages
- insoluble dans l'éthanol
- soluble dans l'acétone
- très visqueux
- doit être mélangé à un initiateur, le peroxyde de benzoyl et à un activateur, le naphténate de cobalt pour la polymérisation.

2.1.3. Milieux d'enrobage solubles dans l'eau

Dans certains milieux, miscibles avec l'eau, l'utilisation d'éthanol ou d'acétone pour la déshydratation n'est pas nécessaire, ce qui permet de mieux préserver les structures. La polymérisation peut être achevée au four ou par irradiation aux ultra-violets.

- Gélatine
- Glycol méthacrylate (GMA)
- Aquon (dérivé de l'Epon 812)
- Durcupan (dérivé d'une résine d'époxy miscible avec l'eau)
- Epon 812
- Lowicryl (dérivé acrylique)

2.1.4. Méthacrylates

Avantages
- facile à manipuler
- sans couleur
- basse viscosité
- soluble dans l'éthanol
- forme un bloc dur et transparent

Désavantages
- polymérisation inégale
- instable au bombardement électronique

2.2. EXEMPLE D'ENROBAGE: LE VESTOPAL W

1er jour:

1. Fixer le matériel frais au glutaraldéhyde 2.5% dans du tampon cacodylate ou phosphate (pH 7.2–7.4) refroidi pour un temps variant de 15 min (monocouche cellulaire) à 2 h (petits cubes de tissu).

2. Laver 3 fois avec le tampon cacodylate ou phosphate contenant 3% de saccharose en évitant de briser le culot.

3. Conserver les échantillons dans le tampon de lavage à 4°C, jusqu'à plusieurs mois.

2e jour:

4. Fixer une seconde fois avec du tétroxide d'osmium (1.3% OsO_4 dans du tampon collidine ou phosphate (pH 7.4) contenant 5% de saccharose) pendant 1 à 2 h.

5. Déshydrater le matériel fixé par passages successifs (15-30 min chacun) dans des bains de 25, 50, 75 et 95% d'acétone, puis dans de l'eau distillée et finalement faire deux immersions successives dans l'acétone à 100% pendant 30 min chacune.

6. Immerger le matériel déshydraté dans un mélange contenant 1 partie de résine Vestopal et 1 partie d'acétone.

3e jour:

7. Immerger le matériel pendant 2 h dans deux bains contenant un mélange de Vestopal pur catalysé (Vestopal avec 1% de perbenzoate tertiaire de butyle et 1% de naphténol de cobalt).

8. Couper les échantillons en petits morceaux et les placer au fond d'une capsule BEEM™ et les recouvrir avec le mélange de Vestopal.

9. Effectuer la polymérisation en plaçant les capsules à 60°C pour 40 h.

10. Démouler les échantillons en coupant la capsule.

3. COUPES ULTRA-MINCES

3.1. CRYOTOMIE

Les blocs de spécimens dans les capsules BEEM™ sont d'abord démoulés et la partie contenant le matériel est taillée de façon à former une pyramide. Cette taille primaire peut être faite à la main avec une lame de rasoir ou à l'aide d'un pyramitome.

Les coupes ultra-minces sont ensuite réalisées à l'aide d'un ultramicrotome. L'ultramicrotome effectue des coupes en

faisant passer de façon répétitive le spécimen sur un fin couteau de verre ou de diamant. La vitesse l'avance détermine l'épaisseur de la coupe. Nous ne discuterons pas ici des modèles de microtome, mais nous examinerons certains problèmes. Les principales causes de coupes imparfaites sont les suivantes:

Aucune coupe
- mécanisme d'avance à la fin de sa course
- changement de température ou courant d'air
- manque d'eau dans le puits et empilement sur la lame du couteau

Coupes d'épaisseur variable
- lame du couteau émoussée
- angle de dégagement du couteau négatif
- bloc trop mou (changement de position du bout)
- défaut du microtome

Épaisseur variable et/ou rides sur les coupes
- bloc trop dur
- face du bloc trop grande
- couteau émoussé
- angle de dégagement trop grand
- vitesse de coupe trop élevée

Coupes avec courtes rides
- imperfection du couteau

Lignes parallèles dans le sens de la coupe
- marques dues à un couteau abîmé

Rubans pas droits, ou pas de ruban
- côtés du bloc non parallèles l'un à l'autre
- trop d'eau ou une partie du couteau est sec
- compression des coupes sur une partie de couteau émoussé

Coupes attirées par le bloc et couteau mouillé
- trop de liquide dans le puits
- bloc trop mou
- angle de dégagement trop faible.

3.2. COLORATION DES COUPES

Afin d'augmenter le contraste des composants cellulaires sur les coupes, les spécimens sont colorés à certaines étapes du processus d'enrobage. Une grande partie de la coloration se fait lors de la fixation à l'OsO_4. Un bain à l'acétate d'uranyle peut aussi être rajouté avant les étapes de déshydratation. Mais de façon routinière, la coloration est effectuée directement sur les coupes minces.

Il existe trois principaux colorants: l'acétate d'uranyle, l'hydroxyde de plomb et le citrate de plomb. Les meilleurs résultats sont obtenus en combinant l'acétate d'uranyle avec un colorant au plomb.

3.2.1. Citrate de plomb

Ce contrastant agit principalement sur les ribosomes, les lipides et l'appareil de Golgi (Eastman Kodak Cie 1978). Le citrate de plomb est préparé à partir d'un mélange de nitrate de plomb et de citrate de sodium. Le pH final doit être de 12. Cette solution doit être filtrée avant usage. Le temps de coloration pour le Vestopal est d'environ 5 min. Cette coloration ayant tendance à former des cristaux de plomb, il est important de bien laver la grille d'abord au NaOH 1N, puis à l'eau distillée par la suite.

4. IMPRÉGNATION NÉGATIVE

L'imprégnation négative consiste à mettre un spécimen biologique en présence d'une solution aqueuse d'un sel de métal

lourd. Les ions métalliques, avec leur charge positive, viennent former des liens ioniques avec les charges négatives des macromolécules (protéines, glycoprotéines, acides nucléiques) constituant le spécimen. À cause de leur densité électronique élevée, les ions métalliques empêchent le passage des électrons. Par les électrons traversent facilement les structures du spécimen biologique, de densité électronique beaucoup plus faible, en lui donnant par contraste une image négative sur l'écran. Lorsque le virus a conservé son intégrité structurale, le métal lourd s'adsorbe à sa surface extérieure. Par contre, si le virus est le moindrement endommagé, la solution métallique s'infiltre à l'intérieur et révèle sa structure interne (Figure 1).

Différents métaux lourds donnent de bons résultats. Cependant, on a davantage recours à la technique une solution aqueuse d'acide phosphotungstique (PTA) à 2 ou 3%, dont on ajuste le pH entre 6.0 et 7.4 avec de l'hydroxyde de sodium ou de potassium. Comme autres sels de métaux lourds, mentionnons l'acétate d'uranyle et le silicotungstate de sodium ou de potassium.

4.1. PRÉPARATION DIRECTE SUR GRILLE

Cette technique peut s'appliquer à toute suspension virale aqueuse suffisamment concentrée (plus de 10^7 particules/ mL) et ne contenant pas des concentrations excessives de macromolécules ou de sels minéraux. En effet, ces substances interfèrent avec la qualité de l'observation et l'on doit utiliser une technique qui permet de diminuer leurs effets négatifs. Cette technique consiste à imprégner la structure virale de phosphotungstate, lequel fait ressortir celle-ci en clair sur fond noir lors de l'observation au microscope électronique.

1. Tenir une grille de cuivre, recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone, et coincée au moyen d'une fine pince d'horloger (pince Dumont #3 ou 4). Un anneau de caoutchouc peut servir à tenir la pince fermée.

2. Déposersur la surface de la grille une goutte de suspension virale au moyen d'une pipette Pasteur ou d'une micropipette.

3. Attendre de 30 à 60 sec, puis assécher la grille au moyen d'un papier buvard.

4. Ajouter une goutte de PTA et laisser imprégner environ 30 sec.

5. Enlever l'excès de liquide sur la grille au moyen d'un morceau de papier buvard en effleurant le bord de la grille.

6. Bien assécher la grille au moyen d'un autre morceau de papier buvard que l'on fait glisser entre les deux tiges de la pince en direction de la grille.

7. Déposer la grille dans un Petri avec un papier filtre au fond, ou dans une boîte porte-grilles appropriée.

8. Procéder à l'examen de la grille au microscope électronique.

Il est également possible de poser le matériel biologique sur la grille par attouchement d'une goutte déposée sur un papier de Parafilm avec la grille. Le liquide adhère automatiquement à la surface de la grille en quantité suffisante.

4.2. CONGÉLATION-DÉCONGÉLATION

Cette technique permet d'obtenir une suspension virale adéquate à partir d'une culture de cellules infectées avec un virus. Les cycles de gel et de dégel font éclater les cellules à cause des cristaux de glace qui se forment et libèrent les particules virales dans la suspension aqueuse.

1. Recueillir les cellules d'un flacon de culture cellulaire (25 cm^2) par grattage avec un policeman de caoutchouc.

2. Centrifuger les cellules à basse vitesse (400 x *g pendant* 10 min, ou 15000 rpm, pendant 30 sec, dans une centrifugeuse Eppendorf).

3. Enlever le surnageant.

4. Soumettre le culot cellulaire à trois cycles de gel-dégel, au moyen de neige carbonique, d'azote liquide ou encore en le plçant dans un congélateur à basse température.

5. Resuspendre les cellules brisées dans un volume minimum d'eau distillée (couleur légèrement opalescente).

6. Procéder à l'imprégnation négative au PTA comme décrit précédemment à la section 4.1.

Les débris cellulaires n'interfèrent habituellement pas avec l'observation ou l'identification des particules virales lorsque la suspension est diluée adéquatement. Le matériel biologique sur la grille est sufisamment dispersé pour permettre une distinction entre les particules virales et toute autre structure.

4.3. OSMOLYSE

Cette technique permet également d'obtenir une suspension virale adéquate à partir d'une culture de cellules infectées avec un virus. La suspension de cellules dans un milieu hypotonique, tel que l'eau distillée, produit un choc osmotique qui les fait éclater et libère les particules virales dans la phase liquide.

1. Recueillir les cellules d'un flacon de culture cellulaire (25 cm^2) par grattage avec un policeman de caoutchouc.

2. Centrifuger les cellules à basse vitesse (400 *g* 10 min, ou 15000 rpm, pendant 30 sec, dans une centrifugeuse Eppendorf).

3. Enlever complètement le surnageant. **Il est important de bien laisser égoutter le tube de centrifugation en le mettant à l'envers sur un papier buvard.**

4. Déposer dans le tube une goutte d'eau distillée (environ 25 µL) et agiter légèrement pour remettre les cellules en suspension.

5. Laisser reposer quelques secondes.

6. Procéder à l'imprégnation négative au PTA comme décrit précédemment.

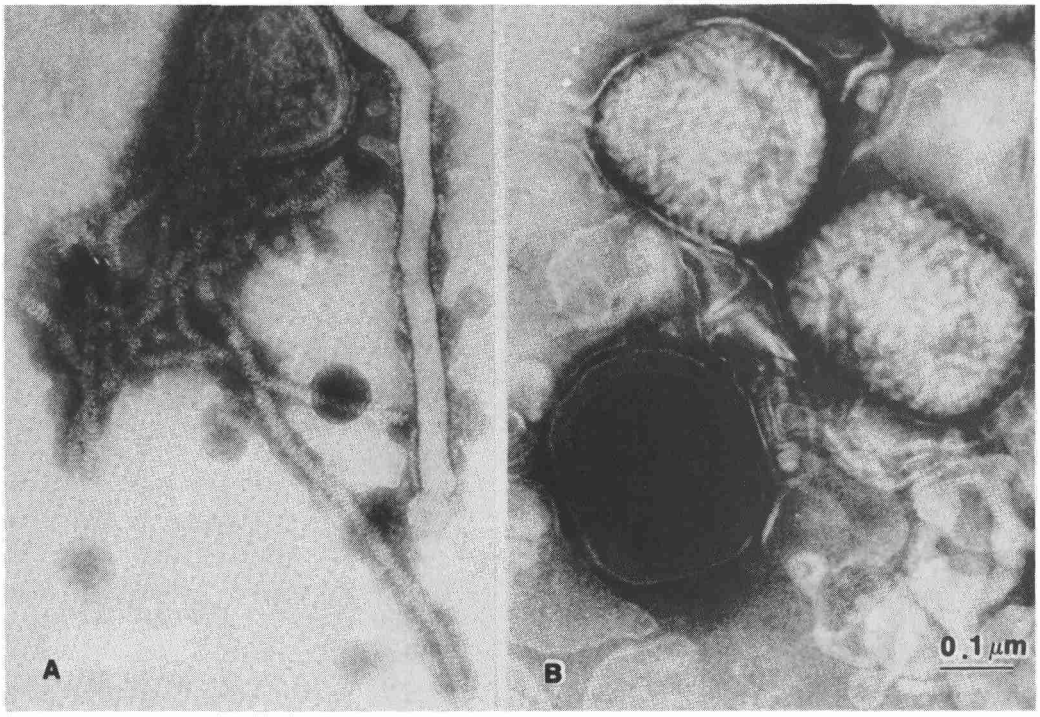


Figure 1

Particules virales observées en microscopie électronique après imprégnation négative à l'acide phosphotungstique 3%. Virion et nucléocapsides du virus parainfluenza (A) et virions du poxvirus (B).

4.4. CONCENTRATION SUR GÉLOSE

Cette technique permet de concentrer le virus directement sur la grille à partir d'une suspension virale contenant peu de virus, tout en minimisant le bruit de fond causé par les sels minéraux. Elle est particulièrement utile lorsqu'on ne dispose que de surnageants de cultures cellulaires ou de liquides biologiques contenant peu de virus, tels que le liquide céphalo-rachidien et l'urine.

1. Faire une solution d'agar noble 1% et la répartir dans les puits à fond rond d'un plateau de microtitrage en chlorure de polyvinyle flexible, (environ 250 µL/puits), et laisser le gel se former. Les plateaux préparés peuvent être conservés à 4°C un certain temps, si on les recouvre d'un plastique adhésif.

2. Déposer un aliquot de la suspension virale (50 à 100 µL) dans un puit avec gélose.

3. Déposer une grille à la surface du liquide, avec la membrane de Formvar tournée vers le bas.

4. Laisser le liquide diffuser complètement dans la gélose (environ 15 à 30 min), puis retirer la grille.

5. Procéder à l'imprégnation négative au PTA tel que décrit précédemment.

On peut également déposer la grille à la surface de la gélose, au fond de la phase liquide, avec la membrane de Formvar tournée vers le haut, le temps de la diffusion (Anderson et Doane 1972).

4.5. VIRUS PURIFIÉ

Cette technique permet d'effectuer un étalement adéquat, ainsi qu'une coloration uniforme lorsque la préparation virale est purifiée. Le phosphotungstate, lorsqu'utilisé seul, adhère difficilement à la grille de formvar en raison d'une certaine hydrophobicité. La présence de macromolécules avec des groupements polaires est nécessaire pour permettre un meilleur étalement de l'agent contrastant. Alors que les préparations virales grossières (spécimens biologiques et préparations cellulaires) contiennent suffisamment de protéines pour permettre au PTA d'adhérer à la grille, le virus purifié est normalement exempt de celles-ci et donne des colorations de piètre qualité.

On peut compenser en ajoutant à la suspension virale ou au PTA une concentration adéquate de substances polaires. Il est également possible de rendre les grilles hydrophiles en les chargeant positivement, c'est-à-dire en soumettant ces dernières, fraîchement recouvertes de carbone, à un rayonnement par haut voltage ("glow discharge") sous un vide partiel en présence d'air ou de vapeurs d'amylamine (Dubochet *et al.* 1971).

La surface du film support (membranes de formvar et de carbone) peut être aussi modifiée par l'addition d'un composé peptidique à la suspension virale, rendant ainsi la grille plus hydrophile. Il est connu que les suspensions virales contenant des protéines font de très belles grilles. On peut utiliser l'albumine sérique bovine (0.005% à 0.05%) ou la bacitracine (50 µg/mL) (Hayat 1986).

Il est aussi possible de centrifuger le matériel peu adhérant directement sur la grille, soit dans un tube Eppendorf dans le cas d'un échantillon légèrement concentré, soit dans un microtube de centrifugeuse Airfuge (voir section 4.6). Après centrifugation, les grilles contenant le matériel viral sont lavées par passage sur gouttes d'eau distillée, pour les débarrasser des sels minéraux ou des sucres et colorées négativement selon la procédure normale.

4.6. MICRO-ULTRA-CENTRIFUGATION

L'ultracentrifugation directe de particules virales sur des grilles échantillons a déjà été rapportée par Gelderblom *et al.* (1978) et Hammond *et al.* (1981), utilisant la micro-ultracentrifugeuse à air de Beckman (Airfuge) et le rotor spécial EM–90 (Miller 1981) développé pour compter le nombre de particules en microscopie électronique. Cette centrifugeuse utilise aussi des mini-rotors à angle fixe (18° et 30°) dont les tubes ont une capacité respective de 180 et 240 µL. Ces mini-rotors ont un facteur d'efficacité K = 12 et 19 à vitesse maximale (30 psi: 95 000 rpm). Avec de tels facteurs d'efficacité, la plupart des virus sont déposés sur la grille en moins de 5 min. La société fabrique aussi un rotor en vrac de 7 mL en plus du rotor pour microscopie électronique (EM–90).

La préparation rapide d'échantillons viraux pour la microscopie électronique est basée sur l'utilisation des rotors à angle fixe, leur facilité de manipulation et la distortion minimum des grilles. Selon notre expérience le rotor EM–90 est plus difficile à manipuler et en plusieurs occasions l'échantillon s'est infiltré entre le joint des parties internes du rotor durant la centrifugation.

Méthode

1. Déposer des aliquots de 50 à 100 µL d'échantillon viral dans des tubes de proprionate de cellulose de 240 µL (rotor A–100, 30° Beckman).

2. Avec une paire de pince fine, insérer une grille de microscopie électronique au fond de la suspension dans le microtube.

3. Centrifuger durant 5 min à 20 psi (120 000 x *g*).

N.B.: les tubes doivent être balancés dans le rotor.

4. Enlever le surnageant à l'aide d'une micropipette.

5. Récupérer la grille échantillon avec une paire de pince.

6. Laver la grille par trois passages successifs sur des gouttes d'eau distillée.

7. Assécher complètement à l'aide d'un papier buvard.

8. Colorer au PTA 3%, pH 6, et sécher à l'aide d'un papier buvard.

La technique de micro-ultracentrifugation directe des échantillons viraux peut être utilisée aussi bien pour les études ultrastructurales des virus ou de leurs sous-unités (Alain *et al.* 1987) que pour le diagnostique (Yin-Murphy *et al.* 1985, Hammond *et al.* 1981).

La distribution des particules sur la grille, après micro-ultracentrifugation, montre une concentration légèrement plus élevée au centre de la grille. D'autre part, pour éviter que beaucoup de débris cellulaires masquent les particules virales, nous suggérons une préclarification des échantillons par centrifugation à 15 000 rpm durant 5 min dans une centrifugeuse Eppendorf.

Nous recommandons tout particulièrement cette technique pour la préparation de fractions virales provenant de gradients de densité, des surnageants de cultures virales ou tout autre échantillon clinique contenant peu de matériel viral. La technique est rapide et simple. Elle permet d'accroître la sensibilité et d'obtenir, entre autre, un matériel de gradient propre, sans perte importante de particules virales, avec un excellent contraste.

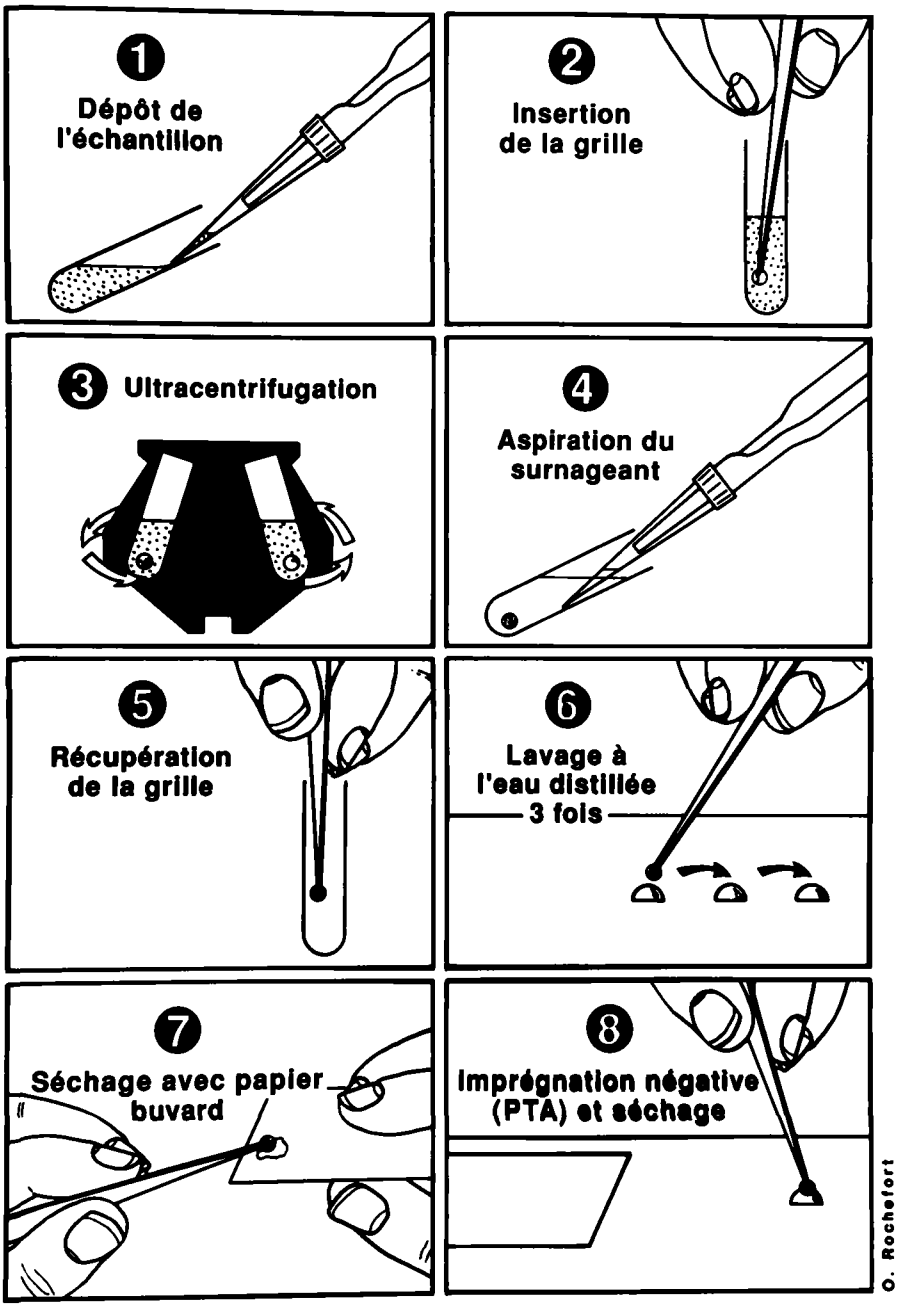


Figure 2

Préparation d'échantillons pour la microscopie électronique par micro-ultracentrifugation (AIRFUGE)

5. RÉFÉRENCES

–, *Eastman Products for Electron Microscopy*. 1978. Eastman Kodak Company, Rochester, NY, 9 pages.

Alain, R., Nadon, F., Séguin, C., Payment, P. et Trudel, M. 1987. Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. J. Virol. Meths 16: 209-216

Anderson, N. et Doane, F.W. 1972. Microscopic detection of adventitious viruses in cell cultures. Can. J. Microbiol. 18: 299-304.

Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger.M. et Kellenberg, E. 1971. A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. J. Ultrastruct. Res. 35: 147.

Gelderblom, H., Reupke, H et Warring, R. 1978. Uber den einzatz der Airfuge in der elektronen-mikroskopichen virus diagnostik. GIT Fachz. Lab. 22: 17-19.

Hammond, G.W., Hazelton, P.R., Chuang, I. et Klisko, B. 1981. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. J. Clin. Microbiol. 14: 210-221.

Hayat, M.A. 1986. *Basic Technics for Transmission Electron Microscopy*. Academic Press Inc., Orlando, Floride, USA., 411 pages.

Kay, H.D. 1965. *Techniques for Electron Microscopy*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 60 pages

Miller, M.F.. *Use of the Airfuge EM-90 electron microscopy rotor in viral research*. Bulletin technique Beckman DS-558.

Yin-Murphy, Rahim, N.A., Phoon, M.C., Baharuddin-Ishak, I. et Howe, J. 1985. Early and rapid diagnosis of acute haemorragic conjunctivis with tear specimens. Bull. WHO 63: 705-709

12

SÉROLOGIE

Pierre Payment et Michel Trudel

1. MATÉRIEL POUR LES MICROTECHNIQUES

1.1. PLATEAUX

Les plateaux (aussi appelés microcabarets) utilisés en sérologie ont 96 cupules faites d'un plastique flexible ou rigide et réparties en huit rangées de 12 cupules. Chaque cupule peut contenir jusqu'à 200 µL de liquide. Les cupules peuvent avoir un fond rond ou conique. Les microcabarets avec cupules à fond rond sont préférés par certains pour les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination. Des plateaux semblables sont utilisés en culture de cellules, mais ils ont alors un fond plat et sont stériles.

1.2. PIPETTES CALIBRÉES

La distribution de petits volumes de solution peut être faite avec des micropipettes à volumes fixes ou variables (Oxford, Pipetman, etc.) ou avec des micropipettes à réservoir de 25 ou 50 µL. Ces dernières sont en polypropylène, contiennent environ 6 mL de liquide, et peuvent distribuer des gouttes de 25 ou 50 µL. Elles sont munies d'une poire en caoutchouc pour la succion et la distribution du liquide. Pour distribuer précisément leur contenu, elles doivent être maintenues en position verticale lors de la répartition du liquide. Les micropipettes à volumes variables ou fixes sont équipées d'embouts qui doivent être en polypropylène s'ils doivent être stérilisés. On pourra aussi les acheter pré-stérilisés.

Il existe aussi sur le marché des micropipettes à canaux multiples (8 ou 12) qui sont très utiles pour effectuer des dilutions sériées ou encore pour distribuer des volumes répétitifs de solutions.

1.3. MICRODILUTEURS

Grâce aux fenêtres que possèdent leur leur partie inférieure, ces diluteurs en acier inoxydable au titane peuvent retenir un volume calibré de liquide et le transférer. Ils sont disponibles pour des volumes de 25 et 50 µL.

1.4. VÉRIFICATION DES MICROPIPETTES

Afin de vérifier si les fourchettes à dilution ou les micropipettes sont exactes, les fabricants fournissent des buvards de 67 cercles (25 µL) ou 40 cercles (50 µL). En déposant une goutte au centre du cercle

approprié, ou en touchant le centre du cercle avec la fourchettte, on détermine la précision du volume distribué: la zone mouillée ne doit ni dépasser ni incomplètement remplir le cercle. Un autre moyen consiste à utiliser une balance de précision (±0.001 g) et à peser le volume d'eau distribué.

1.5. SUPPORTS À PLATEAUX

Ces supports en aluminiun sont utilisés dans plusieurs centrifugeuses dont le modèle IEC PR–2. Le modèle courant supporte un seul plateau alors que d'autres en supportent jusqu'à cinq. Ces supports sont utilisés pour sédimenter les globules rouges ou les échantillons sur des cellules pour favoriser l'infection.

2. INHIBITION DE L'HÉMADSORPTION

Cette méthode est utilisée pour déterminer le titre en anticorps d'un sérum dirigé contre un virus hémadsorbant. La présence d'anticorps inhibera l'hémadsorption due au virus et permettra d'en évaluer le titre.

1. Chauffer les sérums à 56°C pendant 30 min.

2. Diluer ceux-ci par deux dans un milieu de maintien (MEM-Earle, 2% SFV) dans un plateau pour microculture.

3. Mélanger avec un volume égal de virus hémadsorbant (50 µL de sérum et 50 µL de virus à 100 doses hémadsorbantes, DH_{50}).

4. Incuber 1 h à 37°C (1 h à 25°C ou 16–18 h à 4°C si le virus est très labile).

5. Ajouter les cellules (100 000/mL) dans 50 µL de milieu de maintien.

6. Incuber à 37°C.

Prévoir les témoins suivants:
- virus: 50 µL de milieu et 50 µL de virus à 100 DH_{50}
- sérums: positifs et négatifs dilués de la même façon que les sérums inconnus et incubés avec 100 DH_{50}

7. Lire les résultats après 3 jours. Le titre est exprimé par la dernière dilution provoquant une inhibition de l'hémadsorption (voir Chapitre 3 pour les détails de cette méthode).

3. HÉMAGGLUTINATION

3.1. PRÉPARATION D'ANTIGÈNES HÉMAGGLUTINANTS

Les antigènes hémagglutinants ont trois origines possibles: liquides d'oeufs embryonnés, cerveaux de souriceaux ou cultures cellulaires.

3.1.2. Liquides d'oeufs embryonnés

Les virus respiratoires et les orthomyxovirus en général se développent bien dans l'oeuf embryonné et les liquides vitellin, amniotique ou allantoïde. Tous ces liquides peuvent être utilisés directement comme antigène hémagglutinant. On préférera le liquide allantoïde, plus facile à obtenir en grande quantité (voir la section se rapportant à l'inoculation intra-allantoïdienne). Aucune préparation spéciale n'est requise et l'antigène est utilisé directement ou après une inactivation au formol.

3.1.3. Cerveaux de souriceaux

Cette préparation est surtout utilisée pour les togavirus.

1. Inoculer par voie intracérébrale des souriceaux (1 à 4 jours) suisse.
2. À l'apparition des symtômes spécifiques, tuer les animaux par exsanguination (l'éther et le chloroforme inactiveraient les togavirus).
3. Prélever les cerveaux aseptiquement.
4. Ajouter suffisamment de saccharose à 8.5% (p/v) pour préparer une suspension à 20% (p/v).
5. Homogénéiser dans un appareil électrique (Virtis, Waring Blender ou autre) puis passer au travers d'une aiguille no 18.
6. Mélanger vigoureusement dans 20 volumes d'acétone froid.
7. Décanter l'acétone, ajouter 20 volumes d'acétone froid et mélanger vigoureusement.
8. Laisser 60 min à 4°C.
9. Décanter le surnageant et sécher le sédiment sous vide (1 h).
10. Réhydrater avec de la saline (deux fois le volume des cerveaux).
11. Centrifuger pendant 30 min à 10 000 x *g*.
12. Le surnageant constitue l'antigène.

3.1.4. Cultures cellulaires

Il est possible d'utiliser des cultures cellulaires pour les virus qui produisent une hémagglutinine et un effet cytopathique. On utilisera alors des cellules reconnues comme étant sensibles au virus que l'on traitera par l'une des méthodes suivantes.

3.1.4.1. Congélation - décongélation

1. Infecter la culture cellulaire avec le virus (prévoir une culture semblable non infectée comme témoin).
2. Lorsque l'effet cytopathique a atteint l'ensemble de la culture, récolter séparément les cellules et le surnageant (garder ce dernier).
3. Suspendre les cellules dans 1/10 du volume de milieu de culture.
4. Congeler et décongeler trois fois (–20°C et 37°C).
5. Centrifuger pendant 10 min à 2000 x *g* (4°C).
6. Utiliser le surnageant comme antigène.

3.1.4.2. Concentration des surnageants

Pour une préparation virale ayant un titre hémagglutinant non satisfaisant, les surnageants de cultures infectées peuvent parfois être concentrés. Nous mentionnerons deux méthodes:

3.1.4.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

1. Ajouter au surnageant de culture, un volume égal de sulfate d'ammonium saturé: ajouter lentement en agitant sans cesse.
2. Laisser 1 h à 4°C.
3. Centrifuger à 2 000 x *g* pendant 20 min.
4. Rejeter le surnageant.

5. Resuspendre le culot dans du PBS à pH 7.4 (1/50 à 1/100 du volume original).

6. Précipiter une seconde fois en amenant à 30% de saturation et resuspendre dans 1/50 ou 1/100 du volume original.

7. Dialyser pendant une nuit à 4°C contre plusieurs litres de PBS.

8. Conserver à –70°C.

3.1.4.2.2. Précipitation au polyéthylène glycol (PEG–6000)

1. Ajouter au surnageant de culture du NaCl cristallisé jusqu'à l'obtention d'une solution à 0.5 M NaCl (29 g /L).

2. Ajouter du PEG-6000 jusqu'à une concentration finale de 7.5% (une solution mère à 50% de PEG est généralement utilisée).

3. Laisser 24 h à 4°C.

4. Centrifuger à 2000 x *g*, pendant 20 min.

5. Resuspendre dans du PBS.

6. Dialyser contre du PBS.

7. Conserver à –70°C.

3.2. TRAITEMENTS POUR DÉMASQUER LES HÉMAGGLUTININES

3.2.1. Extraction alcaline

1. Gratter les cellules de la paroi du flacon pour les suspendre dans le surnageant de culture.

2. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* et à 4°C.

3. Resuspendre les cellules dans 1/20 du volume original de tampon glycine à 1 M pH 10.

4. Agiter 2 h à 25°C.

5. Centrifuger 15 min à 1500 x *g* et à 4°C.

6. Recueillir le surnageant.

7. Reprendre cette extraction trois fois.

8. Titrer chacun des extraits séparément.

9. Conserver à 70°C.

3.2.2. Traitement au Tween 80-Éther

1. Ajouter 0.1 volume de Tween 80 à 1.85%.

2. Agiter 5 min à 4°C.

3. Ajouter 0.5 volume d'éther.

4. Agiter 15 min à 4°C.

5. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* à 4°C.

6. Recueillir la phase aqueuse (phase inférieure).

7. Eliminer l'éther résiduel par barbottage d'air ou d'azote.

8. Conserver à –70°C.

Cette technique peut s'appliquer aux surnageants ou aux cellules suspendues dans du PBS.

3.3. TITRAGE DES HÉMAGGLUTININES

Cette technique a été décrite au Chapitre 3. Nous rapellerons seulement la définition de l'unité hémagglutinante: une unité hémagglutinine est contenue

dans la dernière dilution de l'antigène hémagglutinant complètement les globules rouges dans les conditions optimales.

4. INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Lorsque l'hémagglutinine réagit avec des anticorps spécifiques, elle perd son pouvoir hémagglutinant. Cette réaction est utilisée pour déceler les anticorps spécifiques à certains virus ou encore pour confirmer l'identité d'un virus. Malheusement, les sérums contiennent souvent des substances pouvant agglutiner non spécifiquement les hématies. Ils contiennent aussi des inhibiteurs non spécifiques. Ces deux substances interférantes doivent être éliminées.

4.1. TRAITEMENT DES SÉRUMS

4.1.1. Kaolin acide

Préparation de la suspension de kaolin

1. Placer 25 g de kaolin lavé à l'acide (disponible commercialement) dans 90 mL de PBS.
2. Ajuster à pH 7.2.
3. Laisser déposer 24 h.
4. Retirer le surnageant.
5. Compléter à 100 mL avec du PBS.
6. Ajuster à pH 7.2 avec du NaOH 1N.

Traitement

1. Diluer le sérum 1:5 dans du PBS (0.1 mL-0.4 mL).
2. Ajouter un volume égal de la suspension de kaolin et agiter.
3. Incuber 20 min à 4°C (agiter 2 ou 3 fois).
4. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* à 4°C.
5. Recueillir le surnageant qui correspond à une dilution 1/10 du sérum.

4.1.2. Héparine-chlorure de manganèse

1. Diluer le sérum avec un volume égal (0.1 mL + 0.1 mL) du tampon approprié (DGV, PBS ou autre: voir Chapitre 3, section 4).
2. Ajouter 0.1 mL d'une solution d'héparine (5000 unités/mL) et de $MnCl_2$ 1 M.
3. Mélanger doucement.
4. Incuber 15 min à 4°C.
5. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* à 4°C.
6. Recueillir le surnageant qui correspond à une dilution 1:3 du sérum.

4.1.3. Trypsine

1. Ajouter 0.1 mL d'une solution de trypsine (8 mL/mL en tampon phosphate 0.1 M pH 8.2 fraîchement préparée) à 0.2 mL du sérum.
2. Incuber 30 min à 56°C.
3. Utiliser tel quel pour la réaction.

4.1.4. RDE (Receptor Destroying Enzyme)

1. À 0.1 mL de sérum, ajouter 0.4 mL d'une solution de RDE contenant 100 unités/mL.
2. Incuber une nuit à 37°C.
3. Ajouter 0.3 mL de citrate de sodium à 2.5%.

4. Incuber 30 min à 56°C.

5. Ajouter 0.2 mL de PBS (dilution 1/10 du sérum).

4.1.5. Acétone

Cette technique est surtout appliquée à la détection des anticorps contre les togavirus.

1. Mélanger 0.2 mL de sérum à 1.8 mL de saline (0.15 M NaCl).

2. Ajouter 24 mL d'acétone à 4°C.

3. Mélanger doucement puis centrifuger 5 min à 2000 x *g* à 4°C.

4. Rejeter le surnageant.

5. Ajouter 25 mL d'acétone à 4°C et mélanger rigoureusement pour resuspendre le culot.

6. Centrifuger 5 min à 1000 x *g* à 4°C.

7. Rejeter le surnageant.

8. Assécher le culot sous vide.

9. Dissoudre le culot sec dans 2 mL de saline-boratée. Laisser la préparation à 4°C toute la nuit, ce qui facilite la dissolution. La dilution finale du sérum est de 1/10.

4.1.6. Adsorption des agglutinines non spécifiques

1. Préparer une suspension d'hématies à 50%. Choisir, de préférence, le même type d'hématies que celui utilisé pour la réaction d'hémagglutination (voir Chapitre 3).

2. Si le sérum n'a pas été traité pour enlever les inhibiteurs non spécifiques, on doit le diluer 1:2 ou plus.

3. S'il a été traité au kaolin, au RDE ou à l'acétone, mélanger 0.1 mL d'hématies à 50% à 1 mL de sérum dilué. S'il a été traité à la trypsine ou à l'héparine-chlorure de manganèse, mélanger 0.1 mL d'hématies à 50% à 0.3 mL de sérum dilué.

4. Incuber 18 h à 4°C (sauf après un traitement au RDE où une adsorption d'1 h à 4°C est suffisante).

5. Si l'incubation n'a duré qu'une heure, centrifuger 10 min à 1500 x *g*.

6. Utiliser le surnageant.

4.2. LA RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Diluer chaque sérum et ajouter une quantité connue d'antigène viral hémagglutinant. Laisser le mélange en contact pour que la réaction antigène-anticorps prenne place. Ajouter des hématies hémagglutinables par l'antigène viral et laisser en contact à la température et au temps prédéterminés pour obtenir l'hémagglutination. La présence d'anticorps spécifiques sera détectée par l'absence d'hémagglutination. Le titre de ces anticorps est l'équivalent de la dernière dilution inhibant l'hémagglutination.

1. Traiter les sérums pour éliminer les inhibiteurs et les agglutinines non spécifiques.

2. Diluer 25 µL de sérum dans 25 µL du tampon approprié, à l'aide de fourchettes à dilution de 25 µL.

3. Ajouter 25 µL d'antigène à 4 unités HA (UHA)/25 µL. Agiter doucement.

4. Incuber 60 min à 4°C.

5. Ajouter 25 µL d'une suspension d'hématies. Agiter doucement.

6. Incuber 60 min à la température optimale d'hémagglutination.

7. Dans certains cas, par exemple lorsque la réaction est réalisée à 4°C, il est préférable de laisser reposer 15-30 min à la température du laboratoire avant de lire les résultats.

8. Prévoir les témoins suivants:

- *Titrage à rebours*: Antigène non dilué, 1/2, 1/4, 1/8 dans le tampon.

- *Sérums*: Afin de s'assurer de la qualité de l'épreuve, on doit inclure à chaque essai, des sérums négatifs et positifs de titre connu. Ces sérums sont traités de la même façon que les sérums à éprouver. Pour tous les sérums, on doit aussi prévoir des contrôles excluant l'antigène afin de s'assurer de l'efficacité des traitements pour éliminer les inhibiteurs et les agglutinines non spécifiques. La dernière rangée de cupules est réservée à cette fin: elle recevra 25 µL de sérum à sa dilution la plus faible, 25 µL du tampon, après incubation, et 25 µL de globules rouges.

- *Globules rouges*: Prévoir quatre cupules qui ne contiendront que du tampon (50 µL) et des hématies (25 µL).

Avant de commencer l'interprétation des résultats, il est important de vérifier tous les témoins:

- l'antigène ne doit pas titrer moins de 2 ou plus de 8 UHA.

- les sérums ne doivent montrer aucune réaction avec les hématies et les sérums témoins ne doivent pas donner plus d'une dilution de différence avec leur titre indiqué.

- les hématies ne doivent pas montrer d'agglutination non spécifique.

Si tous les témoins sont normaux, lire les résultats: toutes les cupules où il n'y a pas d'agglutination sont considérées comme positives. Le titre du sérum est l'équivalent de la plus haute dilution qui inhibe complètement l'agglutination.

4.3. APPLICATIONS DE LA RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Les pages qui suivent traitent de l'application de l'IH à plusieurs virus hémagglutinants. La technique utilisée pour le virus de la rubéole est présentée en détail pour en faciliter la compréhension. Dans le cas des autres virus, seuls les détails jugés pertinents sont indiqués.

4.3.1. Virus de la rubéole

Traitement des sérums

1. Mélanger 0.1 mL de sérum à 0.1 mL de DGV.

2. Ajouter 0.1 mL de la solution d'héparine-chlorure de manganèse (c'est-à-dire des volumes égaux d'héparine à 5000 unités/mL et de chlorure et manganèse 1M). Mélanger doucement.

3. Ajouter 0.1 mL d'hématies de coq à 50% dans du tampon DGV. Mélanger doucement.

4. Incuber 18 h à 4°C ou incuber 1 h à 4°C puis centrifuger à 1000 x *g* pendant 15 min.

5. Recueillir le surnageant qui équivaut à une dilution 1/4 du sérum.

Hémagglutniation (HA)
(titrage de l'antigène)

1. Reconstituer l'antigène lyophilisé selon les indications du fournisseur.

2. Laisser l'antigène 15 min à 4°C.

3. Diluer 1/4 (0.1 mL d'antigène-0.3 mL de DGV).

4. Préparer des dilutions par deux (1/4 à 1/2048) dans 25 µL de DGV. Prévoir trois rangées par antigène.

5. Ajouter 25 µL de DGV à toutes les cupules.

6. À toutes les cupules, ajouter 25 µL d'une suspension à 0.25% de globules rouges de poussin de 1-2 jours dans du DGV (lavés trois fois dans du DGV par centrifugation). Agiter doucement.

7. Incuber 1 h à 4°C.

8. Incuber 25 min à la température de la pièce, lire les résultats.

Le titre hémagglutinant de l'antigène rubéole est la dilution la plus élevée provoquant une agglutination complète. Le titre de chacune des trois rangées ne doit pas différer de plus d'une dilution. Si les trois titres sont trop différents, il faut reprendre le titrage. Si deux titres sont similaires, ceux-ci sont considérés comme bons.

L'évaluation du nombre d'unités hémagglutinantes (UHA) se fait de la façon suivante: si le titre de l'antigène est de 1/64, une dilution 1/16 de cet antigène contient 4 UHA; il faut donc diluer 0.1 mL d'antigène reconstitué dans 1.5 mL de DGV.

Inhibition de l'hémagglutination (IH)

1. Diluer les sérums de 1/4 à 1/512 dans 25 µL de DGV avec des fourchettes de 25 µL.

2. Ajouter 25 µL de l'antigène prédilué à 4 UHA dans du DGV. Agiter doucement.

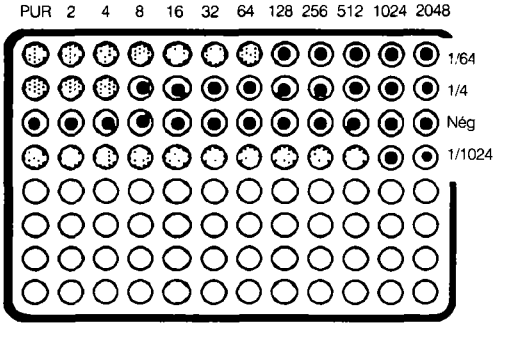
3. Incuber 1 h à 4°C.

4. Ajouter 25 µL de la suspension à 0.25% d'hématies de poussin de 1 jour. Agiter doucement.

5. Incuber 1 h. à 4°C.

6. Incuber 15 min à la température de la pièce.

7. Lire les résultats.



Interprétation

Dès le début de l'éruption cutanée (7 à 10 jours après l'infection), les anticorps IH commencent à être décelables. Le niveau le plus élevé sera atteint 5 à 6 semaines après l'infection et les anticorps persisteront. Si l'on soupçonne une rubéole, on prélèvera un premier sérum dès le contact, puis un deuxième 2 à 3 semaines plus tard. Lorsque deux sérums sont prélevés à 14 jours d'intervalle et que le

titre IH des anticorps est identique, nous procédons à la fixation du complément (FC). Cette activité anticorps apparaît plus tardivement que la précédente. Une augmentation significative du titre FC (c'est-à-dire de quatre fois) signifie une infection récente.

- Pour déterminer si une personne est protégée contre la rubéole, le tittre sérique des anticorps inhibant l'hémagglutination (IH) doit être égal ou supérieur à 1/16.

- Lorsque le titre d'un sérum est négatif ou inférieur à 1/16, il est recommandé de procéder à la vaccination. Toute personne qui reçoit le vaccin devrait fournir un second sérum prélevé 40 jours plus tard afin de vérifier l'immunité induite. Un sérum prélevé trop tôt risque de ne pas accuser d'anticorps spécifiques; le vaccin induit les anticorps plus tardivement que l'infection naturelle.

- La période d'incubation de la maladie étant de 7 à 10 jours avant l'apparition des symptômes cliniques, il est essentiel d'indiquer la date du contact et celle du prélèvement sanguin. Si des symptômes cliniques se manifestent, il est important de préciser la date du début de la maladie.

- Lorsqu'il s'agit d'un cas de contact et que le titre IH du sérum est négatif, il faut procéder à un deuxième prélèvement sanguin à 14 jours d'intervalle. Une augmentation significative du titre IH, c'est-à-dire de quatre fois, signifie une infection récente.

- Si le titre du sérum est positif, ceci indique l'état immunitaire du patient au moment du prélèvement sanguin. Dans le but de déterminer, sur un seul sérum, s'il s'agit d'une immunité acquise récemment ou de longue date, nous procédons à l'isolement des immunoglobulines M (IgM) et à la détermination d'une activité anticorps IH associée aux IgM, un signe d'une infection récente, datant de 30 à 60 jours avant le prélèvement sanguin.

4.3.2. Autres virus

Virus des oreillons

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.
- Traiter au kaolin.
- Traiter avec des hématies de coq à 50% dans du DGV.

Hémagglutination

- Hématies de poussin à 0.5% dans du DGV.
- Tampon DGV (0.025 mL).
- 60 min à 20°C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans le DGV à partir de 1/20 (à la suite du traitement au kaolin et aux hématies).
- Hématies de poussin à 0.5%.
- Antigène à 4 UHA/25 µL.
- 60 min à 20°C.

Virus de la rougeole

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.

- Absorber avec des hématies de singe cercopithèque à 50% (dans PBS ou DGV).

Hémagglutination

- Hématies de singe cercopithèque à 0.5% (lavées trois fois à l'Alsever, resuspendues dans du PBS ou du DGV).
- Tampon PBS pH 7.4 ou DGV pH 7.2.
- 60 min à 20°C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués avec du tampon PBS ou DGV à partir de 1/2.
- Antigène à 4 UHA/25 µL dans du DGV ou du PBS.
- 60 min à 25°C.
- Hématies de singe cercopithèque à 0.5% dans du PBS ou du DGV.

Réovirus

Traitements des sérums

- Inactiver à 56°C pendant 30 min.
- Traiter au kaolin.
- Absorber sur hématies bovines pour le type 3, ou humaines type "O" pour les types 1 et 2.

Hémagglutination

- Hématies bovines à 0.5% dans du PBS (type 3), ou humaines type "O" à 0.5% dans du PBS (type 1 et 2).
- Tampon PBS.
- 60 min (4, 20 ou 37°C).

Inhibition de l'hémagglutination

- Diluer les sérums dans du PBS à partir de 1/20.
- Antigène à 4 UHA dans du PBS.
- Hématies humaines 0.5% ou bovines 0.5% dans du PBS.
- 60 min (4, 20 ou 37°C).

Adénovirus

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.
- Traiter au kaolin.
- Absorber sur hématies de rat ou de singe (selon le groupe hémagglutinant).

Hémagglutination

- Hématies de rat ou de singe à 0.4% dans du PBS.
- Tampon PBS.
- 60 min à 20°C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans du PBS à partir de 1/20.
- Antigène à 4 UHA/25 µL.
- 60 min à 20°C.
- Hématies de rat ou de singe à 0.4% dans du PBS.

Entérovirus

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.

- Traiter au kaolin.
- Absorber sur hématies humaines type "O".

Hémagglutination

- Hématies humaines type "O" à 0.4% dans du PBS.
- Tampon PBS.
- 60 min à 4 ou 37°C selon le cas.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans du PBS à partir de 1/20.
- Antigène à 4 UHA/25 µL.
- 60 min à 20°C.
- Hématies humaines type "O" à 0.4%.

Togavirus

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.
- Traiter au kaolin ou à l'acétone.
- Adsorber sur hématies de poulet.

Hémagglutination

- Hématies de poussin à 0.4% dans de la saline phosphatée, ajustée au pH optimal pour le virus étudié.
- Tampon: saline phosphatée à pH optimal.
- 60 min à 20 ou 37 °C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans la saline phosphatée avec albumine.
- Antigènes dilués dans la saline phosphatée à pH optimal.
- Incuber 24 h à 20°C.
- Hématies de poussin 0.4% dans la saline phosphatée à pH optimal.
- 60 min à 20 ou 37°C.

5. SÉRONEUTRALISATION

5.1. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE D'UNE INFECTION

L'épreuve de neutralisation a pour but de déterminer la quantité d'anticorps dans un sérum ou encore d'identifier un virus. Dans les deux cas, la première étape consiste à incuber ensemble sérum et virus afin de permettre l'inactivation (neutralisation du pouvoir infectieux) du virus par les anticorps spécifiques. Ce mélange, en volume égal, de dilutions sériques et d'une quantité prédéterminée de virus est généralement incubé 30–60 min à 20–37°C. Si le virus est particulièrement labile (sensible à la chaleur, à la lumière, au pH, etc.) cette réaction se fera à 4°C. Après l'incubation, le mélange est ensemencé sur cultures cellulaires sensibles au virus ou encore inoculé à des souriceaux. Après quelques jours, la neutralisation du virus sera évaluée par l'absence de signes cliniques chez le souriceau ou encore l'absence d'effet cytopathique en cultures cellulaires. La comparaison avec les témoins appropriés facilite cette évaluation.

Pour fins de diagnostic sérologique d'une infection récente, on doit avoir une paire de sérums (précoce et tardif) qui seront éprouvés simultanément. L'épreuve de neutralisation sera réalisée en deux étapes:

- un dépistage préliminaire contre plusieurs antigènes avec le sérum tardif
- une confirmation en éprouvant les paires de sérums dont le sérum tardif était positif contre les antigènes trouvés positifs

À titre d'exemple et d'illustration de la technique, nous utiliserons la recherche d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus coxsackie.

5.1.1. Épreuve de sélection

1. Diluer stérilement les sérums tardifs à 1/8 dans du milieu de maintien (MEM-Earle 2% SFV).

2. **Déposer 25 µL de cette dilution dans les cupules A à G des rangées 1 à 4.** Répéter avec un second sérum dans les rangées 5 à 8 et un troisième sérum dans les rangées 9 à 12.

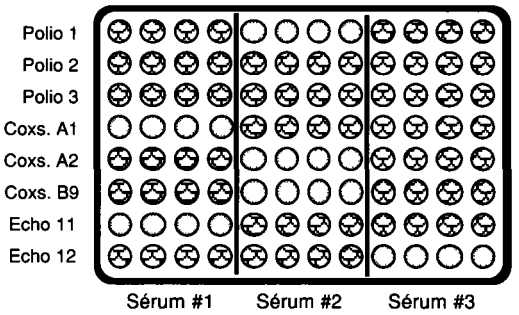
3. Répartir les différents virus à 100 $DICT_{50}$/25 µL à raison de 25 µL/cupule (prévoir sur un autre plateau le titrage de ces virus pour s'assurer d'avoir bien utilisé 100 doses). Ajouter 25 µL de milieu de maintien à la rangée H (témoins sérums).

4. Incuber 60 min à la température de la pièce.

5. Ajouter 100 µL d'une suspension cellulaire sensible aux virus étudiés. Cette suspension sera généralement préparée à 100 000 à 300 000 cellules/ mL.

6. Incuber à 37°C pendant 8 jours.

7. Examiner les cultures après 3, 6 et 8 jours et noter les cultures protégées. Les sérums protégeant deux cupules ou plus d'un virus donné sont positifs.



Épreuve de sélection

5.1.2. Épreuve de neutralisation

1. Sélectionner les sérums et les virus qui se sont révélés positifs au dépistage. Diluer les sérums 1/8 dans du milieu de maintien.

2. À l'aide d'une fourchette à dilution de 25 µL, diluer le sérum, de 1/8 à 1/512. Prévoir quatre cupules par dilution et placer 25 µL du sérum 1/8 dans la rangée 8.

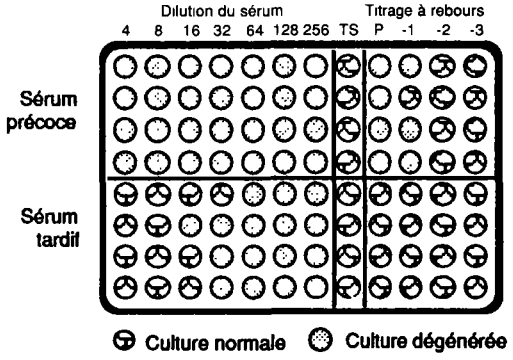
3. À toutes les cupules ayant reçu du sérum (sauf la rangée 8), ajouter 25 µL de virus (100 $DICT_{50}$). À la rangée 8, ajouter 25 µL de milieu de maintien. Ensemencer dans quatre cupules les dilutions 1:10, 1:100, 1:1000 du virus à 100 doses (cupules 9 à 12).

4. Agiter légèrement le plateau, puis incuber 1 h à la température de la pièce.

5. À toutes les cupules, ajouter 100 µL d'une suspension cellulaire appropriée ajustée à 100 000 à 300 000 cellules/mL dans du milieu de maintien.

6. Incuber à 37°C pendant 8 jours. Examiner et lire les résultats après 3, 6 et 8 jours (noter le nombre de cupules dans lesquelles l'effet cytopathique ne se manifeste pas).

7. Evaluer les cultures témoins et le titre du virus qui doit se situer entre 30 et 300 $DICT_{50}$ pour être valide (voir les tables à la fin du Chapitre 3 pour l'évaluation de la $DICT_{50}$ en fonction du nombre de cupules dégénérées ou protégées).



Épreuve de neutralisation

Déterminer le titre des anticorps neutralisants (dose neutralisante 50% ou DN 50%) en appliquant la formule de Kärber. Le titre est exprimé par la dernière dilution du sérum qui neutralise 50% de l'effet cytopathique viral.

La formule de Kärber s'applique directement.

$$DN_{50} = -\Delta - \delta\,(S - 0.5)$$

Δ : dernière dilution protégeant 100% des cultures

δ : écart entre les dilutions en $\log_{10}$ (i.e. $\log_{10} 2 = 0.3$; $\log_{10} 5 = 0.7$)

S : somme des cultures protégées à partir de Δ, chaque cupule ayant une valeur fractionnaire de l'unité

Exemple:	1/16	= 4	=	1.00
	1/32	= 3	=	0.75
	1/64	= 3	=	0.75
	1/128	= 1	=	0.25
		TOTAL		2.75

Donc $-4 - 1\,(2.75 - 0.5) = -6.25$

6.25 en $\log_2 = 80$

pour un titre neutralisant du sérum de 1/80.

6. SÉPARATION DES IMMUNOGLOBULINES EN GRADIENT DE DENSITÉ DE SACCHAROSE

Solutions

Tampon NPE (NaCl-phosphate-EDTA).

NaCl (0.14 M) ..... 8.00 g/L

Na_2HPO_4 (0.008 M) ..... 1.15 g/L

KH_2PO_4 (0.0015 M) ..... 0.20 g/L

EDTA (0.001 M) ..... 0.29 g/L

NaOH 1.0 N ..... ajuster à pH 7.2.

Saccharose (66% p/p)

Saccharose .....1710 g

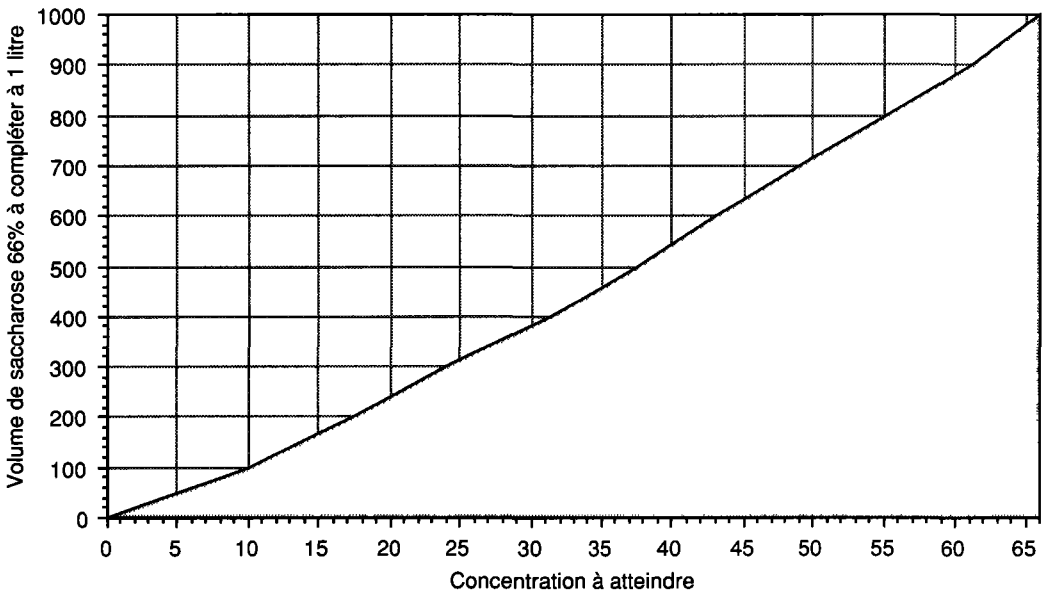
Tampon NPE .....990 mL

Cette solution se conserve à 20°C et peut être stérilisée par filtration sur membrane 0.22 µm ou en l'autoclavant pendant 15 min.

Les autres concentrations de saccharose sont préparées par dilution de cette solution mère dans le tampon NPE en utilisant le nomogramme présenté plus loin.

6.1. FORMATION MANUELLE DE GRADIENTS

1. Dans un tube en nitrate de cellulose de 6 mL (rotor SW-50.1 de Beckman) (2" x 0.5"), déposer délicatement et successivement 0.8 mL des solutions suivantes de saccharose: 38, 32, 24, 18 et 12%.
2. Laisser 5 h à 20°C ou une nuit à 4°C. La diffusion transformera le gradient discontinu en un gradient linéaire.
3. Placer 0.5 mL du sérum à séparer sur le gradient (ce sérum aura préalablement été traité aux hématies pour le débarrasser des agglutinines hétérophiles).
4. Centrifuger 16 h à 4°C à 35 000 rpm (rotor SW-50.1).
5. Recueillir des fractions de 10 gouttes en perçant le tube par le fond.
6. Mesurer au réfractomètre à 20°C la concentration en saccharose de chacune des fractions.
7. Mesurer l'activité inhibant l'hémagglutination ou toute autre activité sur chacune des fractions.



6.2. FORMATION AUTOMATIQUE DE GRADIENTS

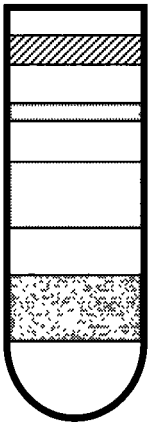
Il existe sur le marché plusieurs appareils permettant de former automatiquement des gradients linéaires. Chacun de ces appareils ayant des particularités propres, nous vous conseillons de consulter les instructions de chaque compagnie.

6.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les principales protéines sériques ont les masses moléculaire et les coefficients de sédimentation (S_{20}) suivants:

Protéine	Masse moléculaire	Coefficient de sédimentation
Albumine	69 000 kD	4.6
IgG	160 000 kD	6.6 à 7.2
IgA	160 000 kD	7 à 15
Fibrinogène	341 000 kD	7.6
IgM	960 000 kD	19, 30-150

Il est donc possible de séparer ces molécules dans un gradient de densité approprié. Après une ultracentrifugation de 16 h à 35 000 rpm, nous obtenons la séparation suivante:



Bande	Saccharose	Couleur
1	15%	Blanche opaque
2	18%	Jaune
3	20%	Jaune-brun
4	30%	Brun

Bande 1: lipoprotéines et inhibiteurs non spécifiques

Bande 2: albumine, immunoglobulines de faible masse moléculaire et IgG

Bande 3: IgG, IgA et fibrinogène

Bande 4: IgM et alpha-2 macroglobulines

Nous pouvons donc affirmer qu'à plus de 30% de saccharose, nous trouvons des IgM et qu'entre 20 et 30%, nous retrouvons des IgG.

Dans le cas d'une primoinfection récente, ce sont les IgM qui agissent comme anticorps sériques protecteurs car elles sont produites plus rapidement. Elles sont donc d'excellents indicateurs d'une infection récente sur un seul sérum.

7. RÉFÉRENCE

Lennette, E.H. et Schmidt, N.J. 1979. *Diagnostic procedures for viral and rickettsial and chlamydial infections*. American Public Health Association, Washington, DC.

13

IMMUNOFLUORESCENCE

Jacqueline Lecomte

1. INTRODUCTION

Les réactions antigène-anticorps, peuvent être visualisées ou quantifiées par une variété de méthodes et de marqueurs. Les marqueurs les plus utilisés sont les fluorochromes, les enzymes, les molécules denses aux électrons (ferritine et or colloïdal), les marqueurs radioactifs et, plus récemment, les marqueurs bioluminescents et chimioluminescents. Dans ce chapitre, nous allons décrire les méthodes couramment utilisées pour les marquages aux fluorochromes.

Les antigènes viraux, bactériens ou cellulaires peuvent être visualisés au niveau de la cellule à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes. Les techniques d'utilisation d'anticorps conjugués ont de nombreuses applications tant au niveau de la recherche que du diagnostic et seront décrites dans ce chapitre.

Les sérums utilisés pour l'immunofluorescence ne devraient pas être hémolysés, car une inactivation des immunoglobulines pourraient être occasionnée par une activité enzymatique d'un sérum hémolysé. La contamination bactérienne ou fongique devrait aussi être aussi évitée.

Pour la méthode de fluorescence directe, les anticorps doivent être spécifiques pour l'antigène étudié. Ces anticorps s'obtiennent par la purification des immunoglobulines, soit IgG ou IgM, à partir d'un antisérum animal. Les immunoglobulines purifiées sont généralement conjuguées avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou l'isothiocyanate de rhodamine (TRITC), les deux fluorochromes les plus utilisés. On obtient une coloration brillante vert pomme avec le FITC et rouge avec le TRITC. Les techniques de conjugaisons sont très bien décrites par Weir (1973).

Pour la méthode indirecte, les anticorps utilisés sont des anticorps dirigés contre les immunoglobulines d'une espèce animale ou contre des immunoglobulines humaines. Ces anticorps peuvent être spécifiques contre la chaîne lourde ou légère, contre le fragment Fc ou le fragment Fab. Ils sont conjugués au FITC ou au TRICT et peuvent être obtenus commercialement.

Il existe deux types de réactions: directe et indirecte. Pour la méthode directe, c'est un anticorps spécifique à un antigène donné qui est marqué à l'aide d'un fluorochrome. Cet antigène peut être un frottis de tissus infectés, une coupe de tissus ou un feuillet cellulaire infecté.

Dans la méthode indirecte, l'anticorps (provenant de l'espèce animale A) non conjugué se fixe sur l'antigène spécifique. Le complexe antigène–anticorps ainsi formé est détecté à l'aide d'un second anticorps (espèce animale B) conjugué cette fois à un fluorochrome et spécifique aux immunoglobulines de l'espèce animale A. Ainsi, pour démontrer la présence d'une infection à herpèsvirus, il faudra d'abord faire réagir un antisérum préparé chez une première espèce animale, par exemple chez le lapin. Le complexe virus-anticorps sera détecté à l'aide d'anti-immunoglobulines de lapin préparées chez une autre espèce animale et conjuguées à un fluorochrome. La méthode indirecte peut-être utilisée, non seulement pour la détection ou la visualisation d'un antigène, mais aussi pour la quantification d'un antisérum.

Avantages

Méthode directe

- rapide
- simple
- non spécificité faible
- requiert peu de témoins

Méthode indirecte

- plus sensible
- requiert un seul conjugué
- détection d'antigène ou d'anticorps

Désavantages

Méthode directe

- moins sensible
- antisérum de haute qualité requis
- non spécificité plus importante
- conjugué spécifique requis pour chaque antigène
- non quantitative

Méthode indirecte

- plus de témoins.
- moins rapide.

2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Les antigènes viraux peuvent être décelés à partir de sections de tissus, biopsies, de feuillets cellulaires infectés ou à partir de frottis obtenus d'écouvillons rhinopharyngiens, rectaux, etc.

2.1. PRÉPARATION ET INFECTION DE CELLULES POUR VIRUS À CROISSANCE RAPIDE

Des feuillets cellulaires peuvent être infectés avec un isolat clinique pour des fins de diagnostic ou avec un virus spécifique pour des fins de recherche. Pour un virus à croissance rapide, c'est-à-dire pouvant exprimer un début d'effet cytopathique en 24 h, les cellules sensibles à un virus peuvent être infectées directement sur des lames de microscope recouvertes d'une couche mince de "Teflon", laquelle est séparée en 8, 12, 16, ou 32 puits. Ces lames sont disponibles commercialement chez Flow Laboratories Inc. ou chez Cel-Line Associates, Inc. (Newfield, N.J.). Ces lames sont résistantes à l'acétone, hydrophobes et autoclavables.

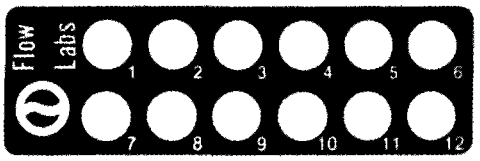


Figure 1

Lames à puits multiples pour immunofluorescence sur cellules.

Méthode

1. Diluer des cellules sensibles au virus étudié à raison de 500 000 cellules/mL de milieu de croissance contenant 25 mM de tampon HEPES (hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid).

2. Déposer sur chacun des puits 25 µL de cellules (puits de 8 mm) ou 20 µL (puits de 6 mm).

N.B. Les lames doivent être stériles.

3. Infecter les cellules avec le virus étudié à la dilution pouvant infecter 70% à 80% des cellules en 24 h.

4. Incuber 24 h à 37°C dans une étuve à CO_2 humidifiée. Afin d'éviter l'assèchement des puits, déposer les lames dans une boite de Petri stérile.

2.2. PRÉPARATION ET INFECTION DE CELLULES POUR UN VIRUS À CROISSANCE LENTE

Pour un virus à croissance lente alors que l'effet cytopathique se développe en plus de 24 h, plusieurs approches peuvent être utilisées: soit une infection réalisée *in situ*, dans des tubes de Leighton ou sur des lames Lab-Tek (Miles Laboratories), soit une infection réalisée sur un feuillet cellulaire pré-formé en flacon de 25 cm^2. Dans ce dernier cas, lorsque l'effet cytopathique commence à se manifester, il faut récupérer les cellules infectées par trypsination ou par grattage des cellules avec un policeman en caoutchouc. On procède par la suite comme ci-haut, sauf que l'incubation se poursuivra pendant trois heures seulement, soit un temps suffisant pour l'adhérence des cellules.

2.3. PRÉPARATION DE TISSUS

La détection d'antigènes viraux dans les tissus d'animaux infectés ou dans les biopsies requiert généralement la préparation de coupes histologiques. Les techniques les plus couramment utilisées sont la préparation de coupes minces par cryotomie ou à la suite d'un enrobage à la paraffine. Il y a parfois dénaturation de l'antigène par cette dernière méthode.

2.3.1. Cryotomie

1. Prélever le ou les organes et couper des morceaux de 5 mm^3.

2. Placer ceux-ci dans de l'azote liquide, ou si non disponible, congeler à –70°C ou plonger dans un bain de glace sèche et de méthanol. Les tissus congelés peuvent être gardés à –70°C jusqu'à leur utilisation ultérieure. Les tissus conservés à –20°C peuvent perdre rapidement leur antigénicité.

3. Faire des coupes de 4–6 µm à l'aide d'un microtome dans un cryostat.

4. Déposer les coupes sur des lames de microscope et laisser sécher à l'air ambiant pendant 10–30 min ou par ventilation à l'aide d'un séchoir à cheveux.

Ces lames peuvent être gardées à –70°C dans un contenant hermétique auquel on aura ajouté un agent séchant tel le gel de silice.

2.3.2. Enrobage à la paraffine

1. Couper le tissu en morceaux de moins de 5 mm^3.

2. Placer dans une solution d'éthanol 95% à 4°C pendant 16-24 h.

3. Placer dans une solution d'éthanol 100% à 4°C (trois périodes de 2 h avec agitation).

4. Placer dans trois bains de xylène de 2 h chacun à 4°C.

5. Placer le dernier bain de xylène contenant le tissu à la température de la pièce.

   Si l'enrobage à la paraffine ne suit pas immédiatement, il est possible de conserver le tissu dans le xylène à 4°C pendant 1–2 jours.

6. Enrober à la paraffine à 56°C par passage dans quatre bains successifs d'une heure chacun.

7. Placer les blocs à la température de la pièce puis à 4°C dès la solidification. Ces blocs se conservent plusieurs semaines.

8. Faire des coupes de 1 à 5 µm.

9. Déparaffiner par deux bains de xylène à 4°C de 30 sec chacun.

10. Rincer trois fois à l'éthanol 95% à 4°C.

11. Laver trois fois 1 min au PBS à 4°C.

12. Effectuer la réaction d'immunofluorescence ou conserver à –70°C.

2.4. FIXATION DES CELLULES OU TISSUS

À la suite de l'adhérence des cellules ou tissus, les cellules ou substrats antigéniques sont fixés à l'acétone froid pendant 10 à 60 min. L'acétone froid est généralement le meilleur fixatif et le plus couramment utilisé. La fixation peut aussi se réaliser avec du paraformaldéhyde. Une solution de 4% de paraformaldéhyde sera préparée avec 0.1 M de sodium de phosphate à 60°C, pH 7.2 et les cellules ou tissus seront fixés pendant 5 min à la température de la pièce.

3. MÉTHODE

3.1. IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE

Cette méthode est très appropriée pour détecter les antigènes viraux dans les tissus ou les cellules infectées. Cette méthode est rapide mais nécessite un anticorps spécifique conjugué.

1. Appliquer l'anticorps spécifique conjugué pendant 30 min.

2. Laver au moins trois fois dans du PBS avec agitation pendant 15 min.

3. Monter sous lamelle avec de la glycérine:PBS (1:9).

Les témoins

- Les cellules ou tissus infectés en réaction avec un anticorps conjugué de même espèce animale mais non dirigé contre l'antigène à l'étude.

- Les cellules ou tissus de même origine et non infectés en réaction avec l'anticorps conjugué spécifique.

3.2. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Cette méthode est aussi appropriée pour la détection d'un antigène viral et elle est plus sensible que la méthode directe. De

plus, elle permet de titrer un antisérum. Le conjugué sera généralement utilisé à la dernière dilution donnant une fluorescence facilement repérable lorsque mis en réaction avec un antisérum dilué à 1/4 tout en donnant une fluorescence non spécifique négligeable.

1. Faire réagir l'antisérum pendant 30 min.

2. Laver au PBS au moins trois fois pendant 15 min.

3. Révéler la réaction avec un conjugué anti-immunoglobuline préalablement titré pendant 30 min.

4. Laver au PBS.

5. Monter.

Les témoins:

- Les cellules ou les tissus infectés en réaction avec un sérum de même espèce animal que l'antisérum à l'étude mais ne contenant pas d'anticorps spécifiques.

- Les cellules ou les tissus de même origine, mais non infectés en réaction avec l'antisérum à l'étude et le conjugué.

3.3. ÉLIMINATION DE LA FLUORESCENCE NON SPÉCIFIQUE

La fluorescence non spécifique peut être considérablement réduite en utilisant du bleu d'Evans comme contre- colorant. La solution est préparée à 0.003% dans de l'eau distillée et filtrée. Cette solution est appliquée sur les cellules ou tissus fixés pendant 15–30 min juste avant le montage au glycérol tamponné. La fluorescence non spécifique peut aussi être diminuée en utilisant des antisérums centrifugés et dilués dans 1% d'albumine bovine ou de l'ovalbumine. Ces derniers ne pourraient pas être utilisés pour le titrage d'un antisérum bovin ou aviaire respectivement. Il est aussi possible d'obtenir commercialement des conjugués pré-adsorbés ou préparés à partir d'anticorps monoclonaux de haute spécificité.

4. MICROSCOPIE

L'observation se fait à l'aide d'un microscope équipé d'une lampe à vapeur de mercure. Cette lampe émet des rayons de différentes longueurs d'ondes. Chaque fluorochrome ayant une longueur d'onde particulière d'excitation et d'émission, il est possible de sélectionner ces longueurs d'ondes à l'aide de filtres.

Le FITC est excité par le bleu à 490 nm et émet une lumière verte à 520 nm. Le TRITC est excité par le vert à 540 nm et émet une lumière rouge à 625 nm. Outre le choix de la source de lumière appropriée, celui de la combinaison des filtres est très important. La clarté et le contraste de l'image fluorescente dépendent de la largeur de la bande passante d'une combinaison de filtres. Si la transmission est à bande large, l'image fluorescente sera plus claire mais moins contrastante et moins spécifique. Si la transmission est par bande étroite, l'image fluorescente sera légèrement plus foncée, mais par contre, plus contrastante et plus spécifique. Pour s'assurer d'une combinaison de filtres appropriée, on consulte généralement le distributeur.

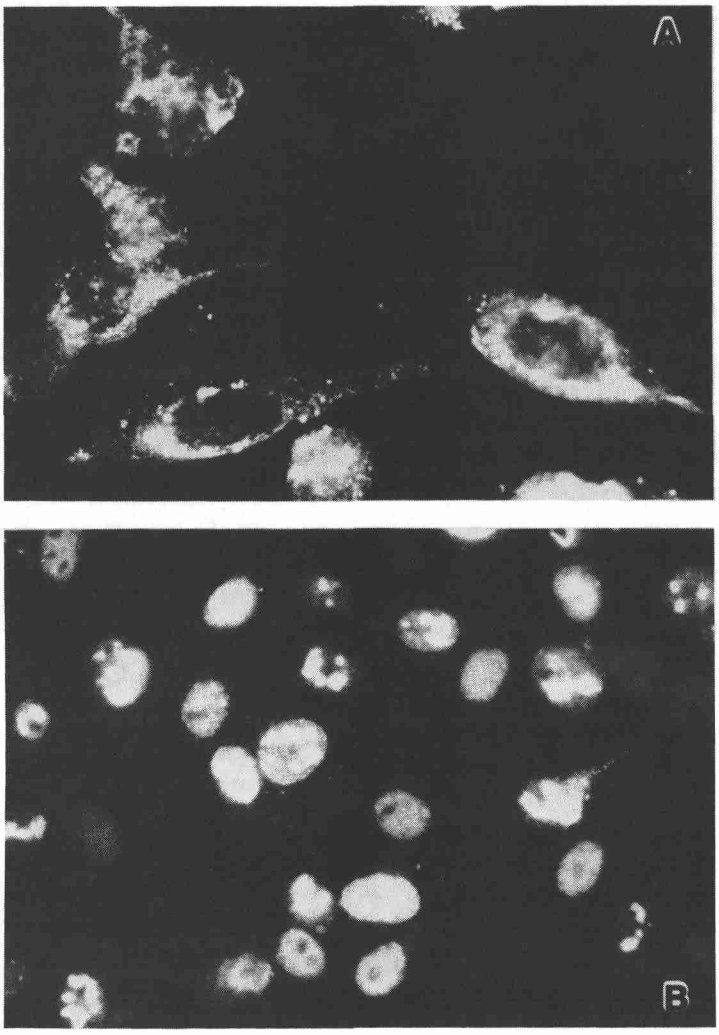


Figure 2

Méthode d'immunofluorescence indirecte

Cellules Vero infectées par le virus herpès type 1 ou 2 pendant 18 h et mises en réaction avec un anticorps monoclonal murin spécifique au type 1 ou 2. Les anticorps fixés ont été détectés avec des IgG de chèvre anti-IgG de souris conjuguées à la fluorescéine. Une fluorescence cytoplasmique forte est observée avec les anticorps dirigés contre le type 1 (figure 2a) alors que les anticorps dirigés contre le type 2 détectent un antigène nucléaire (figure 2b).

5. RÉFÉRENCES

Hijmans. M et Schaeffer, M.. 1975. *Fifth International Conference on Immunofluorescence and related techniques*. Annals of the New York Academy of Sciences 254: 1-420.

Kurstak, E. et Kurstak, C. 1974. Application of the immunoperoxidase technique in virology and cancer virology. dans *Viral immunodiagnostic*. E.Kurstak et R.Morrisset. (Édit.) Academic Press, New York, pages 1-34.

14

IMMUNOPEROXYDASE

Serge Belloncik

Les techniques immunochimiques et immunoenzymatiques sont couramment utilisées à des fins de diagnostic et de recherche. Elles permettent de localiser des antigènes de nature et d'origine variées, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques et d'un marqueur lié à ces derniers. De plus, ces techniques permettent de dépister la présence d'anticorps spécifiques dans un sérum donné.

Le principe de base de toutes ces techniques est le même. Il s'agit de coupler l'anticorps à un marqueur qui est visualisé en microscopie photonique et/ou électronique. Il s'agit alors d'immunofluorescence, d'immunoferritine ou d'immunoperoxydase, selon que le marqueur est l'isothiocyanate de fluorescéine, la ferritine ou la peroxydase. Dans le cas de l'immunoperoxydase, l'anticorps est couplé d'une façon covalente à la peroxydase. La révélation de l'activité enzymatique de cette dernière par la 3–3' diamino-benzidine (DAB) en présence de peroxyde d'hydrogène se traduit par un précipité brun observable en microscopie photonique ou dense aux électrons après traitement au tétroxyde d'osmium. Ce précipité localise la peroxydase sur l'anticorps et par conséquent l'antigène spécifique. La technique d'immunoperoxydase a été utilisée couramment depuis plus de vingt ans (Nakane et Pierce 1966, Wicker et Avrameas 1966), notamment en virologie (Kurstak 1971, Kurstak *et al.* 1974 et 1977, Tijssen 1985).

Tout comme l'immunofluorescence, les techniques directe et indirecte peuvent être pratiquées. Cependant deux autres techniques utilisant des complexes solubles peroxydase-antiperoxydase (PAP) (Sternberger *et al.* 1970) ou des complexes avidine-biotine (Hsu *et al.* 1981a, 1981b) peuvent contribuer à améliorer le rendement de la technique en terme de sensibilité et de spécificité.

Avantages de l'immunoperoxydase par rapport à l'immunofluorescence

- sensibilité et spécificité de la technique accrues considérablement
- application en microscopie photonique et électronique: la peroxydase, dont la masse moléculaire est inférieure à celle de la ferritine, ou d'autres enzymes telle que la phosphatase alcaline, permettent de localiser plus aisément les antigènes intracytoplasmiques

- ne nécessite pas d'appareillage sophistiqué
- la coloration peut être permanente
- la conjugaison des anticorps à l'enzyme est stable

Désavantages de l'immunoperoxydase par rapport à l'immunofluorescence

- addition d'une étape supplémentaire de révélation enzymatique
- utilisation de produits pouvant être cancérigènes (DAB)
- préparation du conjugué plus compliquée que l'immunofluorescence
- coût plus élevé

Les techniques de production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux ainsi que la conjugaison des anticorps à l'enzyme peroxydase peuvent contribuer largement à une meilleure spécificité et sensibilité de l'immunoperoxydase. Ces techniques ne seront pas traitées dans ce chapitre. Elles sont décrites en détail dans l'ouvrage de Tijssen (1985).

1. APPLICATION À LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

1.1. FIXATION

Plusieurs procédés de fixation peuvent être utilisés et doivent être adaptés à l'antigène recherché ou aux cellules. Le but étant de détecter un antigène dans une cellule, il est impérieux de choisir un fixateur qui préserve les structures cellulaires et l'antigénicité ainsi que de traiter les cellules par un agent perméabilisant si nécessaire. Par exemple, dans le cas d'un antigène liposoluble, il faut éviter d'utiliser des solvants de lipides. Nous donnons ci-après la technique standard de fixation qui devra être adaptée et modifiée selon les besoins de chaque expérimentation. Le lecteur pourra avoir plus de détails en se référant à d'autres ouvrages de référence.

1.1.1 Frottis et feuillet cellulaires

Les cellules sont fixées pendant 15 min au méthanol 100%, à l'acétone 100% ou à un mélange acétone:méthanol (1:1) (4°C ou à –20°C), puis lavées avec de la saline. Dans certains cas, on obtient de meilleurs résultats avec le paraformaldéhyde pendant 1 h à 4°C.

Préparation de la solution de paraformaldéhyde

1. Dissoudre 10 g de paraformaldéhyde dans 50 mL d'eau distillée à 60°C sous agitation constante.
2. Ajouter 2–6 gouttes de NaOH 100 mM pour éclaircir la solution et compléter à 500 µL par addition de phosphate de sodium 110 mM pH 5.5 et 1 g de NaCl.

1.1.2. Cultures de cellules en cabarets

Le milieu de culture est rejeté et les cellules traitées tel que décrit précédemment en ayant soin de les recouvrir complètement avec le fixateur et les solutions utilisées lors de la réaction.

1.1.3 Coupes de tissus

Dans le cas de pièces d'organes, les coupes de tissus enrobés dans la paraffine ou effectuées à congélation sont fixées sur lame selon les techniques conventionnelles d'histologie.

1.2. IMMUNOPEROXYDASE DIRECTE

Cette technique permet de retracer dans une cellule un antigène donné dont le laboratoire possède l'antisérum correspondant. Elle n'est pas applicable à la recherche d'un anticorps dans un sérum. Cette technique requiert la purification et le couplage au laboratoire des immunoglobulines à la peroxydase de Raifort.

1. Traiter les cellules avec une solution de H_2O_2 0.3% pendant 30 min, pour éliminer la peroxydase endogène, si elle est présente.

2. Recouvrir les cellules ou tissus de la suspension d'immunoglobulines marquées purifiées (20–100 mg/mL) à la dilution optimale prédéterminée pendant 2 h à 37°C en chambre humide.

3. Laver avec le tampon phosphate 3 fois 5 min.

4. Recouvrir les cellules avec la solution de révélation. Le temps de révélation varie de 5 à 20 min. La vitesse de la révélation peut être contrôlée au microscope photonique.

Solution de DAB

3-3'-diamino-benzidine tetrahydrochlorure.....50 mg

Tampon Tris-HCl pH 7.6
50 mM .....100 mL

Filtrer sur papier Whatman avant utilisation et ajouter 0.01% de H_2O_2.

NOTE: Le DAB est une substance potentiellement cancérigène. Manipuler avec des gants et un masque chirurgical.

5. Lorsque la réaction est jugée optimale (maximum de précipité, minimum de coloration de fond), les lames sont lavées pendant 5 min avec du tampon Tris–HCl. Une courte coloration de fond avec un quelconque colorant est optionnelle. Les opérations subséquentes reliées au montage des lames se font suivant les techniques classiques d'histologie.

1.3. IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTE

Cette technique comparée à la précédente, est plus longue d'exécution. Cependant, elle a l'avantage de permettre l'utilisation d'un seul type d'immunoglobuline conjuguée à la peroxydase (achetée généralement dans le commerce) pour un grand nombre d'antigènes divers, à condition que les différents anticorps spécifiques aux antigènes soient de la même espèce animale. De plus, les anticorps non marqués n'ont pas besoin d'être purifiés.

1. Fixer telle que décrit précédemment (voir section 1.1).

2. Recouvrir les cellules avec des anticorps spécifiques mais non marqués (1–25 mg/mL) pendant 2 h à 37°C en chambre humide.

3. Effectuer les lavages.

4. Recouvrir les cellules avec un antisérum anti-IgG marqué à la peroxydase pendant 2 h à 37°C en chambre humide.

5. Laver, révéler de l'activité enzymatique et monter, tels que décrits précédemment (Figure 1).

2. PEROXYDASE ANTI-PEROXYDASE (PAP)

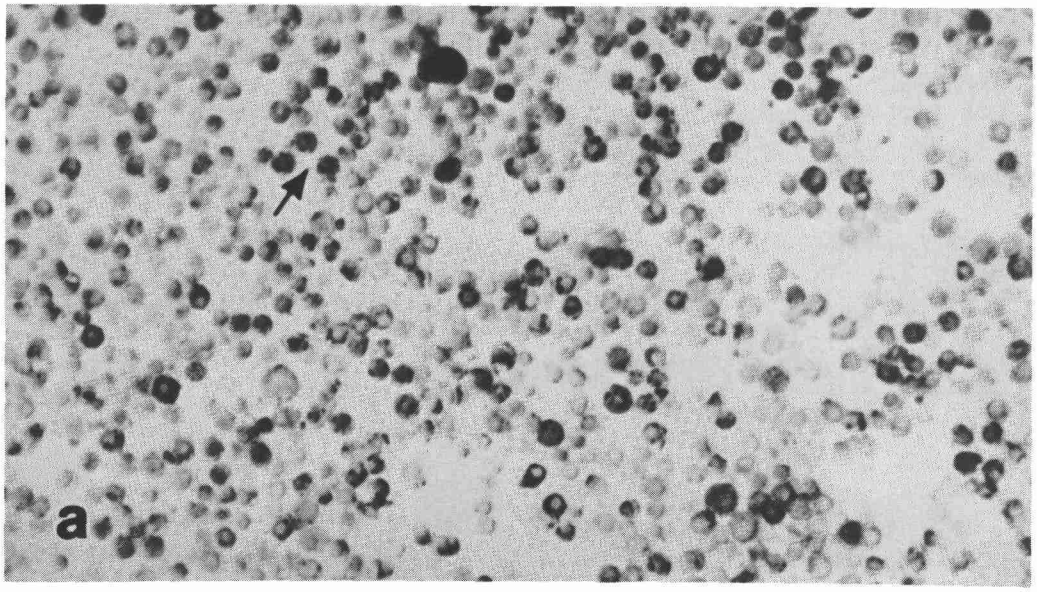
Dans ce cas, la peroxydase n'est pas couplée chimiquement à l'anticorps: il s'agit plutôt d'une association à l'anticorps par une union du type complexe antigène-anticorps soluble. Cette technique est plus sensible que les deux précédentes. Le complexe PAP peut être acheté dans le commerce ou préparé au laboratoire (Tijssen 1985).

1. Fixer tel que décrit précédemment.
2. Recouvrir les cellules avec l'anticorps (dilution 1/100 à 1/1000 dans le tampon isotonique) pendant 1 h à la température de la pièce.
3. Effectuer les lavages.
4. Recouvrir avec l'anti-IgG à une dilution optimale prédéterminée, pendant 1 h à la température de la pièce.
5. Effectuer les lavages.
6. Recouvrir les cellules avec la solution appropriée (anti-IgG utilisé à l'étape 4) de PAP (40 µg/mL) (dilution faite dans du tampon contenant 1% de sérum normal) pendant 1 h à la température de la pièce.
7. Laver, révéler de l'activité enzymatique et monter, tels que décrits précédemment.

3. COMPLEXE AVIDINE-BIOTINE (ABC)

L'avidine est une glycoprotéine ayant une très grande affinité pour la biotine. Elle possède quatre sites d'attachement pour la biotine et peut être conjuguée à des enzymes dont la peroxydase. Cette nouvelle technique d'immunoperoxydase (Hsu *et al.* 1981a, b) a recourt à un premier anticorps, puis à un deuxième biotynilé, et finalement à la réaction avec un complexe avidine-peroxydase biotinilé. Cette technique s'est révélée plus sensible que les autres et elle réduit la coloration de fond. Des trousses commerciales (ABC Kit Vecta Stain® Vector Laboratories) sont disponibles dans le commerce pour ce type de détection.

1. Fixer les cellules.
2. Recouvrir pendant 20 min avec du sérum normal de la même espèce animale que le deuxième anticorps.
3. Éponger l'excès de sérum.
4. Recouvrir avec l'anticorps spécifique dilué, pendant 1 h à la température de la pièce en chambre humide.
5. Laver 10 min dans le tampon.
6. Recouvrir avec le complexe anti–IgG biotinilé dilué (selon les recommendations du fabricant) pendant 1 h à la température de la pièce en chambre humide.
7. Effectuer les lavages.
8. Recouvrir pendant 1 h avec le complexe avidine-biotine (8 µg/mL d'avidine, 2 µg/mL de biotine-peroxydase).
9. Laver, révéler de l'activité enzymatique et monter, tels que décrits précédemment.



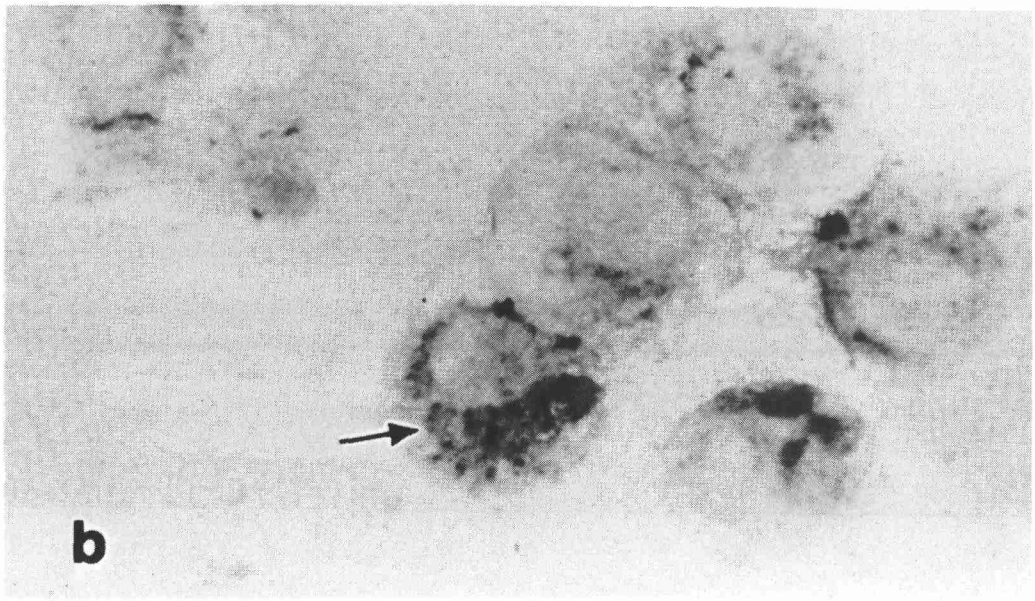


Figure 1

Détection d'antigènes viraux dans une culture cellulaire par l'immunoperoxydase indirecte

Les cellules dont le cytoplasme est de teinte sombre (flèche) sont des cellules infectées par le virus de la polyédrose cytoplasmique depuis 18 h (Reoviridae) (grossissement: a- 150X; b- 1000X).

4. RÉFÉRENCES

Kurstak, E. 1971. The immunoperoxidase technique: localization of viral antigens in cells. Methods in virology 5: 4233-444.

Kurstak, E. et Kurstak, C. 1974. Application of the immunoperoxidase technique in virology and cancer virology. dans *Viral immunodiagnostic* E. Kurstak et R. Morrisset (Édit.). Academic Press, New York, pages 3-30.

Kurstak, E., Tijssen, P. et Kurstak, C. 1977. Immunoperoxidase technique in diagnostic virology and research: principles and applications. Dans *Comparative diagnosis of viral disease. Human and related virus part B.* E. Kurstak and C. Kurstak (Édit.) Academic Press, New York. pages 403-448.

Nakane, P.K. et Pierce, G.B. 1966. Enzyme-labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem Cytochem. 14: 929-935.

Stenberger, L.A., Hardy, P.H. Jr, Cuarlis, J.J. and Meyer, H.G. 1970. The unlabelled antibody enzyme method of immunocytochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody coupled horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase and its use in identification of spirochetes. J. Histochem Cytochem. 18: 315.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay. Dans *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Volume 15, 548 pages.

Wicker, R. and Avrameas, S. 1969. Localization of virus antigens by enzyme-labelled antibodies. J. Gen. Virol. 4: 465-471.

15

ELISA

Pierre J. Talbot

1. INTRODUCTION

Les interactions spécifiques entre antigènes et anticorps constituent un pilier de l'immunovirologie moderne. Une variété de techniques ont été développées pour observer et mesurer ces interactions. Les techniques les plus sensibles font appel à la détection de l'interaction spécifique antigène-anticorps à l'aide d'indicateurs quantifiables. Ainsi, le radioimmunodosage a fait son apparition au cours des années 50. Le test fait appel au marquage radioactif de réactifs se liant spécifiquement aux complexes antigènes-anticorps. Ce type de test est encore utilisé aujourd'hui, cependant sa popularité tend à diminuer à cause des dangers de la radiation, de la demi-vie assez courte des isotopes utilisés et de la nécessité d'avoir accès à des compteurs de radioactivité. En 1971, deux groupes de chercheurs (Engvall et Perlmann 1971, Van Weemen et Schuurs 1971) eurent l'idée de remplacer l'isotope radioactif par un enzyme. Cette technique permet l'utilisation de substrats chromogènes et une visualisation de la présence de complexes antigènes-anticorps par l'apparition de produits colorés pouvant être quantifiés au spectrophotomètre. La technique fut nommée ELISA pour "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay" (Engvall et Perlmann 1971), ou EIA pour "Enzyme Immuno Assay" (Van Weemen et Schuurs 1971).

Le test ELISA tel qu'utilisé lors de son introduction faisait appel à une phase solide composée de cellulose. Plus récemment, l'utilisation du test ELISA, à la fois en recherche et en clinique, connaît un essor important grâce aux microcabarets comportant 96 puits dans un format standard de 12 x 8 puits, et à l'utilisation des lecteurs de densité optique à faisceaux verticaux qui permettent de lire en quelques secondes l'absorbance des 96 puits.

Le lecteur désireux de se familiariser avec tous les aspects théoriques et pratiques des tests immunoenzymatiques devrait consulter l'ouvrage de Tijssen (1985). Le but du présent chapitre est essentiellement de décrire la méthodologie la plus couramment utilisée par les virologistes. Il s'agit du test ELISA non-compétitif en phase solide pour la détection des anticorps ou des antigènes. Un test ELISA

compétitif est décrit dans le chapitre suivant.

2. MESURE DES ANTICORPS

2.1. PRÉPARATION DES ANTIGÈNES VIRAUX

L'antigène viral peut consister en un virus purifié (voir chapitre sur la purification de virus par ultracentrifugation). Toutefois, un tel antigène peut être relativement onéreux et/ou difficile à produire: de plus, il peut arriver que les protéines cellulaires sont copurifiées avec le virus. Une telle possibilité doit donc être contrôlée en utilisant un antigène témoin dans le test ELISA. Le choix du témoin approprié pour permettre l'élimination des réactions faussement positives lors de la détection des anticorps devient alors un problème épineux. En effet, l'utilisation de cellules non infectées pour la "purification" de l'antigène témoin n'est souvent pas appropriée, les contaminants cellulaires retrouvés dans la préparation d'antigène viral, soi-disant purifiée, sont souvent adsorbés sur les virions et ne se retrouvent donc pas à la même position dans un gradient utilisant seulement du matériel provenant de cellules non infectées. Dans ce cas, le témoin le plus approprié demeure un virus non apparenté antigéniquement, mais produit sur les mêmes cellules. Il est donc beaucoup plus pratique d'utiliser comme antigène viral une préparation obtenue à partir d'un lysat de cellules infectées, ce qui permet alors l'utilisation de l'antigène témoin idéal: un lysat de cellules non infectées. Le protocole décrit ici utilise des feuillets cellulaires, mais on peut se servir de cellules en suspension.

Méthode

1. Infecter les cellules avec le virus.
2. Lorsque la présence d'antigènes viraux est maximale (titre infectieux, effet cytopathique, détection immunologique, etc.), laver les cellules deux fois et les suspendre à l'aide d'un policeman dans du tampon PBS pH 7.4 (1-3 mL par flacon de 150 cm^2). Il est possible, à ce stade, de les garder congelées à –20°C.
3. Briser les cellules par cinq cycles de congélation-décongélation (glace sèche, éthanol ou congélateur –70°C/ bain-marie ou étuve 37°C).
4. Traiter le lysat cellulaire aux ultrasons sur glace (deux fois 1 min) en laissant reposer 1 min entre les deux traitements.
5. Éliminer les débris par une centrifugation à 1000 x *g* pendant 10 min et conserver le surnageant.
6. Centrifuger ce surnageant à 100 000 x *g* pendant 60 min pour sédimenter les virus.
7. Suspendre le culot dans un petit volume de PBS pH 7.4 (0.3–0.4 mL par flacon de 150 cm^2).
8. Reprendre le traitement aux ultrasons comme à l'étape 4.
9. Répartir en petits volumes et conserver à –20 ou –70°C. Un entreposage temporaire à 4°C est possible si l'on ajoute un agent bactéricide (merthiolate de sodium 1 mM).

2.2. MÉTHODE INDIRECTE

Certains auteurs ont utilisé le tampon carbonate-bicarbonate pH 9.6 ou encore un tampon glycine pour favoriser l'adsorption de l'antigène. Dans plusieurs cas le PBS est adéquat et même préférable, mais il est toujours important d'évaluer

quelques solutions tampons pour déterminer laquelle est la plus appropriée.

Le type de cabarets utilisés peut aussi influencer fortement l'adsorption de l'antigène à la phase solide. Certains fabricants proposent des plateaux dont le plastique a été traité pour favoriser cette adsorption. On peut utiliser le polystyrène et le polymère de vinyle, mais il faudra expérimenter davantage pour trouver le substrat optimal.

1. Bien mélanger la préparation d'antigène et incuber si possible dans un bain à ultrasons pendant 1 min.

2. Diluer dans du tampon PBS. La concentration d'antigène à utiliser a été préalablement déterminée à l'aide d'un sérum positif de référence. On se sert de la quantité minimale d'antigène permettant l'obtention d'une réaction spécifique maximale. Une fois la dilution d'antigène effectuée, une incubation de 1 min dans un bain à ultrasons est souhaitable mais non essentielle.

3. Ajouter de la préparation d'antigène dilué à raison de 100 µL par puits.

4. Incuber une nuit à 25°C ou au moins 2 h à 37°C.

5. Vidanger la solution d'antigène par inversion des microcabarets et ajouter 150 µL par puits d'une solution de blocage des sites de réactions non spécifiques (PBS pH 7.4 avec 10% sérum de fœtus de veau et 0.2% de Tween 20). Le Tween 20 peut être remplacé par 0.5% de Nonidet P–40 ou 0.1% de désoxycholate de sodium. Incuber pendant 60 min à 25°C.

6. Vidanger la solution de blocage et placer 100 µL par puits de dilutions par 2 ou 5 d'antisérum (effectuées directement dans le microcabaret, à l'aide d'une pipette à 8 ou 12 canaux). Incuber pendant 90 à 120 min à 25°C.

7. Vidanger les puits et laver trois fois avec du tampon de lavage (PBS pH 7.4 avec 0.05–0.1% de Tween–20). On peut utiliser un appareil automatique ou semi-automatique, mais on peut effectuer des lavages manuels lorsqu'un petit nombre d'échantillons sont testés.

8. Ajouter 100 µL par puits d'une solution préalablement préparée dans du tampon de blocage d'antisérum conjugué à la peroxydase de raifort (dilution 1:500 à 1:2000 ou déterminée par l'expérimentation) et spécifique pour le type d'immunoglobuline utilisé comme premier anticorps. Dans certains cas la protéine A conjuguée à la peroxydase peut remplacer l'antisérum conjugué. Incuber pendant 90 à 120 min à 25°C.

9. Bien laver les plateaux puis ajouter 100 µL par puits d'une solution fraîche de substrat et incuber 30 min à 25°C dans l'obscurité.

Tampon citrate pH 5.0

Acide citrique anhydre
0.05 M ..... 10 g

Phosphate de sodium
dibasique anhydre 0.1 M ..... 14 g

Dissoudre dans 900 mL d'eau distillée.

Ajuster à pH 5 et compléter à 1 L.

Solution de substrat

Tampon citrate pH 5.0 ..... 20 mL

Ortho-phénylènediamine
(OPD) ..... 8 mg

Peroxyde d'hydrogène 30% ..... 6.6 µL

10. Pour arrêter la réaction, ajouter 100 µL par puits de HCl 1 N. Lire l'absorbance à 492 nm au spectrophotomètre ou avec un lecteur de plateaux (Titertek Multiskan ou l'équivalent) ou encore faire une lecture visuelle en comparant les résultats aux contrôles.

2.3. MÉTHODE INDIRECTE EN SANDWICH

Dans les cas où l'antigène viral s'adsorbe mal au plastique ou est moins bien reconnu par les anticorps après adsorption, il y a lieu d'ajouter une étape supplémentaire au test décrit ci-haut. Il s'agit d'adsorber préalablement au plastique un antisérum spécifique à l'antigène viral (en général une nuit à 25°C). La dilution optimale d'antisérum doit alors être déterminée préalablement par un test en échiquier dans lequel les dilutions d'antisérum et d'antigène sont variées simultanément sur le même microcabaret (e.g. 8 dilutions d'antisérum et 12 dilutions d'antigène). L'antigène est alors détecté par un second antisérum spécifique de référence. Cette modification du test ELISA peut aussi être utilisée pour quantifier la présence d'antigènes viraux dans un échantillon.

2.4. EXPRESSION DES TITRES ELISA

La concentration d'antigène est déterminée par comparaison avec une courbe standard établie avec différentes concentrations d'un antigène de référence. Par contre, l'expression du titre en anticorps spécifiques donne lieu à plus d'ambiguïtés.

L'antisérum à tester est dilué en série tel que décrit précédemment et le titre est généralement établi comme étant la dilution maximale à laquelle la réaction enzymatique peut encore être détectée. Ce titre peut être établi visuellement d'une manière semi-quantitative. Toutefois, la lecture de l'absorbance permet une détermination plus quantitative. Pour ce faire, un antisérum négatif est inclus dans le test et dilué en série avant la réaction avec l'antigène viral. L'absorbance (bruit de fond) ainsi obtenue permet d'obtenir une absorbance moyenne à laquelle deux écart-types sont ajoutés pour obtenir l'absorbance limite au-dessus de laquelle les réactions sont considérées comme spécifiques. Le titre est alors exprimé comme étant la dilution d'antisérum où la courbe de liaison de l'anticorps à l'antigène entrecoupe cette absorbance limite. La transformation des dilutions sous une forme logarithmique facilite l'estimation précise du titre. Il faut toutefois comprendre que ce titre ne tient aucunement compte de l'affinité des anticorps mesurés, la pente de la courbe de liaison étant en général directement proportionnelle à cette affinité (Peterfy *et al.* 1983).

Il est à noter qu'il est aussi possible de ne tester qu'une seule dilution d'antisérum si l'on cherche uniquement à déterminer la positivité, comme par exemple pour le criblage des anticorps monoclonaux. En général, un échantillon est considéré positif si l'absorbance observée après réaction avec l'antigène viral est plus de deux fois supérieure à celle observée après réaction avec l'antigène contrôle.

3. RÉFÉRENCES

Engvall, E. et Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immuchem. 8: 871-874.

Péterfy, F., Kuusela, P. et Mäkela, O. 1983. Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies. J. Immunol. 130: 1809-1813.

Talbot, P.J., Salmi, A.A., Knobler, R.L. et Buchmeier, M.J. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. Virology 132: 250-260.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay. Dans *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Volume 15, 548 pages.