

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION EN BIOLOGIE

DIAGNOSTIC DES ORTHOPOXVIRUS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Danièle SPEHNER, Robert DRILLIEN

INSERM - E 0345, EFS-Alsace, Strasbourg Collaborations

Daniel Hanau

Daniel Garin, CRSSA, Grenoble

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

DIAGNOSTIC DES ORTHOPOXVIRUS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Distinction variole/varicelle (1940)

Stades précoces de la maladie

Distinction orthopox (compox) / parapox (ORF)

Différents stades de la maladie

L'exanthème débute à la face puis s'étend au tronc et aux membres inférieurs

Les éruptions prennent la forme de :

- macules (1er jour)
- papules (2ème jour)
- vésicules (3ème jour)
- pustules (5ème jour)
- Croutes (8ème jour, tombent 20-30ème jour)

ME (1938)

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

DIAGNOSTIC DES ORTHOPOXVIRUS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

ECHANTILLON BIOLOGIQUE

Prélèvement

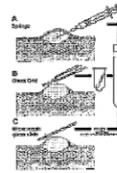
Traitement

Observation

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

LE PRELEVEMENT

En aucun cas congeler l'échantillon !
Conservation à +4°C



Inactivation
- aldehyde
- ...

CONTRASTE :
- ME
- histologie

Hazleton P. and Gelderblom H. Emerging infectious diseases, vol.9n°3, Mars 2003

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

AMPLIFICATION DU PRELEVEMENT

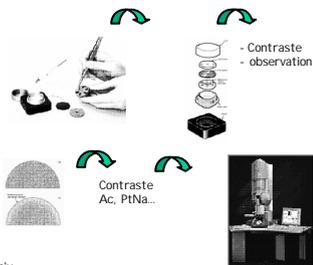
PLUSIEURS METHODES

1. Glow discharge : hydrophile

2. L'ultracentrifugation sur grille (airfuge)

3. La concentration à la surface

4. Préadsorption avec Ac de son choix



- Alain et al., J. Virol Methods, 16 (1987) 209-216
 - Johnson R. and Gregory D., J. Microsc. 171, août 1993, 125-136
- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

TRAITEMENT

Les principaux problèmes rencontrés avec le matériel biologique :
- forte contenance en eau
- son faible contraste.

Les étapes pour pouvoir visualiser un tissu sous le microscope électronique :
- la fixation, la déshydratation, l'énrobage dans une résine et la coupe.
- l'énrobage dans de la glace amorphe et la cryo coupe

- Mais : les petites particules tels que les virus peuvent être observés directement

LA PLUS RAPIDE : la coloration négative

ETUDES PLUS APPROFONDIES :
- stade hydraté congelé
- immunomarquages
- inclusion en résine

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

LA COLORATION NEGATIVE

SEL DE METAL LOURD : AcUr, PtNa, Molybdate d'ammonium.

Grille formvar-Ca
+ 5µl suspension

NEGATIVE STAINING MA Hayat and Sara Miller, McGrawHill Publishing Company

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

LA COLORATION NEGATIVE

Virus de la variole aviaire

ORF

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

OBSERVATION D'UN ECHANTILLON EN BIOLOGIE

- préservation de la structure
- immobilisation des ions et macromolécules
- préservation de l'antigénicité

TECHNIQUES CRYO

- augmentation de la stabilité du matériel biologique à basse température pendant la déshydratation
- perte réduite de structure moléculaire
- Observation directe des virus dans un stade hydraté congelé

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

STADE HYDRATE CONGELE

Virus de la vaccine MVA

CRYO

ORF

CRYO

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

CRYO COLORATION NEGATIVE

Virus de la vaccine MVA

CRYO

ORF

CRYO

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

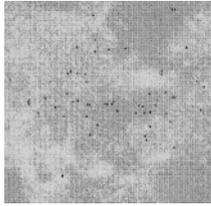
FIXATEUR CHIMIQUE

CRYO-COUPES : thawed cryo sections, technique dite de Tokuyasu

... ICC

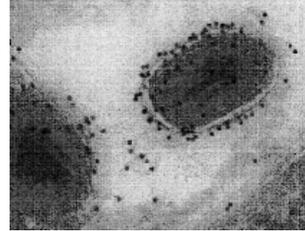
- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

Cryo-coupes (Tokuyasu)
MVA-24 / Brk21

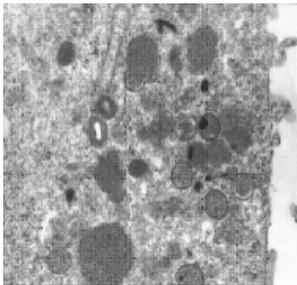


ICC : aBSR + PAG5nm
- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

Cryo-coupes (Tokuyasu)
MVA-24 / Brk21



ICC : aBSR + PAG5nm
- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004



- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004

CONCLUSIONS

DIAGNOSTIC RAPIDE : COLORATION NEGATIVE
Immunomarquages
Oui

ETUDE PLUS APPROFONDIE : CRYO COLORATION NEGATIVE Non
STADE HYDRATE CONGELE Non
CRYO COUPES TECHNIQUE DE TOKUYASU Oui
INCLUSION EN RESINE (cycle viral) Oui/Non

Merci...

- Journées Nationales d'Infectiologie -
Strasbourg, 10-11 juin 2004