

## 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

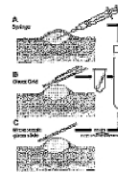
Traitement

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

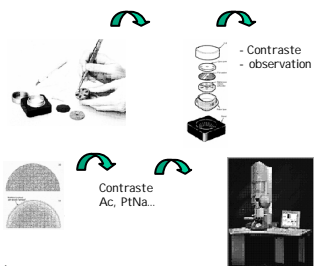
##### PLUSIEURS METHODES

1. Glow discharge : hydrophile

2. L'ultracentrifugation sur grille (airfuge)

3. La concentration à la surface

4. Préadsorption avec Ac de son choix



Contraste  
Ac, PtNa...

2. Alain et al., J. Virol Methods, 16 (1987) 209-216
  3. 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'embrochage dans une résine et la coupe.  
- l'embrochage 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

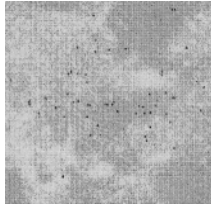
- Journées Nationales d'Infectiologie -  
Strasbourg, 10-11 juin 2004

**FIXATEUR CHIMIQUE**

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

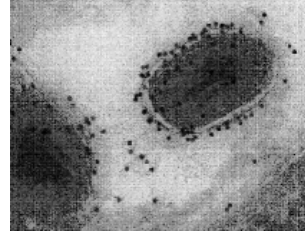
- Journées Nationales d'Infectiologie -  
Strasbourg, 10-11 juin 2004

Cryo-coupes (Tokuyasu)  
MVA-24 / Brk21

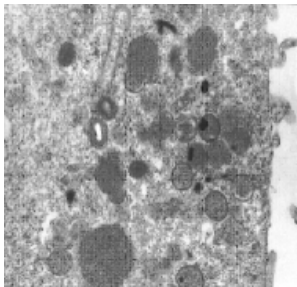


ICC : aBSR + PAG5nm  
- Journées Nationales d'Infectiologie -  
Strasbourg, 10-11 juin 2004

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