



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

Polycopié:

SÉROLOGIE

Présenté par:

Dr. MOSBAH Asma

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

TABLE DE MATIERE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION A LA SEROLOGIE	1
1. Définition.....	1
2. Buts du diagnostic	1
3. Types du diagnostic.....	1
3.1. Approche indirecte.....	2
3.2. Approche directe.....	2
4. La sensibilité clinique d'un test	2
I. TECHNIQUES SEROLOGIQUE.....	3
1. Réaction d'agglutination	3
1.1. Principe	3
1.2. Types de test d'agglutination.....	3
1.3. Avantage de la technique.....	4
1.4. Intérêt de la réaction d'agglutination	4
TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES.....	6
1. Technique d'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	6
1.1. Principe	6
1.2. Avantages de la technique	6
1.3. Test ELISA indirect.....	6
1.4. DAS-ELISA direct (Double Antibody Sandwich ELISA direct).....	7
2. Technique d'Immunoempreinte (Western Blot).....	9
2.1. Principe	9
2.2. Etapes de la technique.....	9
2.3. Anticorps et réactifs accessoires.....	10
2.4. Détection.....	11
3. Technique d'immunofluorescence.....	13
3.1. Principe d'immunofluorescence directe	13
3.2. Principe d'immunofluorescence indirecte (IFI).....	13
3.3. Réalisation de l'IFI	13

3.4. Types des fluorochromes utilisés.....	13
3.5. Facteurs influençant l'IFI	14
TECHNIQUE DE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	15
1. Principe.....	15
2. Eléments et conditions de PCR.....	15
2.1. Les amorces.....	15
2.2. Les températures	16
2.3. L'ADN matriciel	16
2.4. L'ADN polymérase.....	16
2.5. Le tampon	17
DOSAGE SÉRIQUE HPLC (LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE)	18
1. Définition de Chromatographie CLHP	18
2. Les étapes du dosage sérique par HPLC.....	18
2.1. La préparation des échantillons de plasma est comme suite;.....	19
3. Notions fondamentales.....	20
3.1. Notion du temps	20
3.2. Notion de concentration	20
3.3. Notion d'efficacité.....	21
II. SEROLOGIE VIRALE.....	22
1. Introduction.....	22
2. Prélèvements	22
3. Techniques de détection de virus et de ses constituants	23
3.1. Recherche de virus et de ses constituants.....	23
3.2. Recherche de virus par culture cellulaire.....	23
3.3. Recherche des génomes viraux.....	23
3.4. Recherche des antigènes viraux.....	24
3.5. Recherche de virus résistants	24
4. Sérologies Virale.....	25
4.1. Objectifs	25
4.2. Techniques du diagnostic.....	25
4.3. Interprétation des résultats	25
5. Conclusions.....	25
III. SEROLOGIE BACTERIENNE	26
1. Introduction	26

2. Types de Prélèvement.....	27
3. Techniques utilisées	27
4. Indications	28
4.1. Autres indications	28
5. Performances analytiques.....	28
IV. SEROLOGIE MYCOSIQUE.....	29
1. Introduction.....	29
2. Prélèvements	29
3. Diagnostic.....	30
3.1. Diagnostic direct	31
3.2. Diagnostic indirect	31
V. SEROLOGIE PARASITAIRE.....	33
A. PALAUDISME	33
1. Introduction.....	33
2. Méthodes utilisées pour le diagnostic	33
3. Antigènes dans la sérologie du paludisme.....	34
4. Anticorps dans la sérologie du paludisme.....	34
5. Indications précises de la sérologie.....	35
B. LA TOXOPLASMOSE	36
1. Introduction.....	36
2. Prescription du diagnostic sérologique de la toxoplasmose.....	36
3. Diagnostic sérologique de la toxoplasmose.....	37
4. Interprétation des résultats du diagnostic sérologique.....	37
Références.....	39

LISTE DES ABREVIATIONS

PCR : Polymerase Chain Reaction

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich ELISA

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

PBST : Phosphate Buffered Saline Tween

BSA : Bovin Serum Albumin

HRP : Horse Radish Peroxidase

DAB : DiAminoBenzidine

LBA : Lavage Broncho Alvéolaire

LCR : Liquide Cephalo Rachidien

LISTE DES FIGURES

Fig 1. Agglutination directe et indirecte.....	4
Fig 2. Différents étapes de test ELISA.....	8
Fig 3. Double Anticorps Sandwich ELISA direct.....	8
Fig 4. Etapes de western blot.....	12
Fig 5. Schéma d'IFI.....	14
Fig 6. Etapes de PCR.....	17
Fig 7. Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC.....	21
Fig 8. Schéma de la réponse humorale bactérienne.....	26

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Différents groupes sanguins.....	5
Tableau II. Différentes méthodes utilisées pour le diagnostic bactérien.....	27
Tableau III. Détermination du diagnostic d'infection et son ancienneté.....	38

INTRODUCTION A LA SEROLOGIE

1. Définition

La sérologie est une méthode biologique utilisant le sérum pour le diagnostic médical. Le sérum est un constituant du plasma sanguin. Au cours d'un examen sanguin, le biologiste analysera le sérum.

Cette technique est basée sur la recherche d'anticorps spécifiques qui traduisent l'immunisation contre un microorganisme pathogène. Il témoigne d'une réponse immunitaire humorale polyclonale. Il peut être utilisé pour diagnostiquer les maladies infectieuses, les maladies auto-immunes, déterminer les groupes sanguins, surveiller l'évolution de certaines maladies et vérifier les vaccinations. En outre, la sérologie est également un outil de dépistage, en particulier pour le SIDA ou l'hépatite, ainsi qu'un outil épidémiologique. La sérologie implique diverses techniques telles que l'immunoenzymologie, les radioimmunosages, l'immunofluorescence, etc.

2. Buts du diagnostic

Le diagnostic peut viser les objectifs suivants;

- Confirmer une infection aiguë.
- Démontrer l'immunité par une vieille infection ou une vaccination.
- Détecter une infection persistante avec ou sans symptômes.
- Détecter la présence d'exacerbation par réactivation ou surinfection.
- Caractériser un virus.
- Surveiller le cours d'une infection virale avec ou sans traitement.

3. Types du diagnostic

Deux types d'approche sont possibles; soit la recherche directe du microorganisme pathogène ou de ses composants, soit une approche indirecte qui cherche les signes de la réaction de l'organisme à la présence du microorganisme. En médecine, cette dernière approche se résume principalement dans la recherche d'anticorps.

3.1. Approche indirecte

La présence des anticorps signale un contact récent ou ancien avec un antigène donné. Ces anticorps sont donc spécifiques d'un virus donné. Cette recherche d'anticorps se fait généralement dans du sérum.

Les anticorps sont des immunoglobulines groupées en différentes classes, dont les IgG et les IgM. Les IgM sont surtout présentes lors de la première réponse en phase aiguë et disparaissent en quelques mois. La présence d'IgM indique donc souvent une infection récente.

Les IgG apparaissent à peu près au même moment et persisteront à vie. On observe qu'au cours de l'évolution de la réponse immunitaire, il y a maturation de ces IgG qui au début ont une faible avidité pour l'antigène, laquelle augmentera au cours des mois. L'avidité des IgG est un autre marqueur permettant de dater une infection.

3.2. Approche directe

Dans cette approche le virus est présent et nous recherchons sa présence soit en le visualisant de façon complète par microscopie électronique, soit en le cultivant et en observant ses effets directs ou indirects sur les cellules cultivées, l'animal ou la plante inoculée.

Par ailleurs, nous pouvons détecter des éléments constitutifs du virus, comme des antigènes exprimés dans les particules virales ou à la surface des cellules infectées, ou une séquence spécifique d'acide nucléique. Les techniques de détection d'acides nucléiques prennent actuellement de plus en plus d'importance, surtout depuis le développement des techniques d'amplification comme la PCR. Après la détection du génome d'un virus on peut caractériser celui-ci par différentes techniques d'hybridation et de séquençage.

4. La sensibilité clinique d'un test

C'est la capacité d'un test à détecter une infection, une maladie ou une immunité lorsque celle-ci est présente. Exemple : si un test a une sensibilité de 98% pour détecter l'infection par le virus du SIDA (VIH ou HIV), cela signifie que sur 100 personnes infectées on va en détecter 98 avec notre test. De même, si la sensibilité clinique d'un test destiné à la détection du virus de la mosaïque du tabac est de 95%, cela signifie que le test est capable de mettre la présence du virus en évidence 95 fois sur 100.

I. TECHNIQUES SEROLOGIQUE

1. Réaction d'agglutination

1.1. Principe

Le principe des réactions d'agglutination est de co-incuber des dilutions de sérum avec des suspensions contenant le micro-organisme. C'est un phénomène complexe au cours duquel les anticorps s'unissent aux antigènes portés par la particule formant ainsi des ponts spécifiques entre les particules et permettent leur réunion en amas. On pratique cette technique sur lame, en tube ou en microplaques.

La réaction d'agglutination permet de visualiser la fixation Ag-Ac. Si l'antigène est placé à la surface de grosses particules (bactéries ou parasite), les Ac peuvent provoquer leur agglutination. Après incubation, l'agglutination est lue à l'œil nu, on parle d'agglutination active ou passive, directe ou indirecte :

- Une réaction positive se caractérise par un voile formé au fond de la cupule ;
- Une réaction négative se caractérise par un point noir formé au fond de la cupule (sédimentation de l'antigène).

1.2. Types de test d'agglutination

1.2.1. Agglutination active directe et indirecte

C'est une agglutination résultant d'une union spécifique entre un anticorps et un antigène particulaire appartenant naturellement à la particule. Les épitopes sont possédés par les grosses particules. Les anticorps précipitant sont des anticorps primaires dans la technique directe et dans la technique indirecte il faut des anticorps secondaires anti-Ig pour former le réseau.

1.2.2. Agglutination passive directe et indirecte

C'est une agglutination réalisée entre un anticorps et un antigène normalement soluble, mais rendu particulaire par fixation sur un support. Les épitopes sont ici portés par de petites molécules greffées à la surface des grosses particules (biologiques ou inerte). Le couplage des antigènes peut être obtenu par divers procédés : traitement par le chlorure de chrome, la benzidine bisdiazotée et surtout, actuellement, le glutaraldéhyde et les carbodiimides.

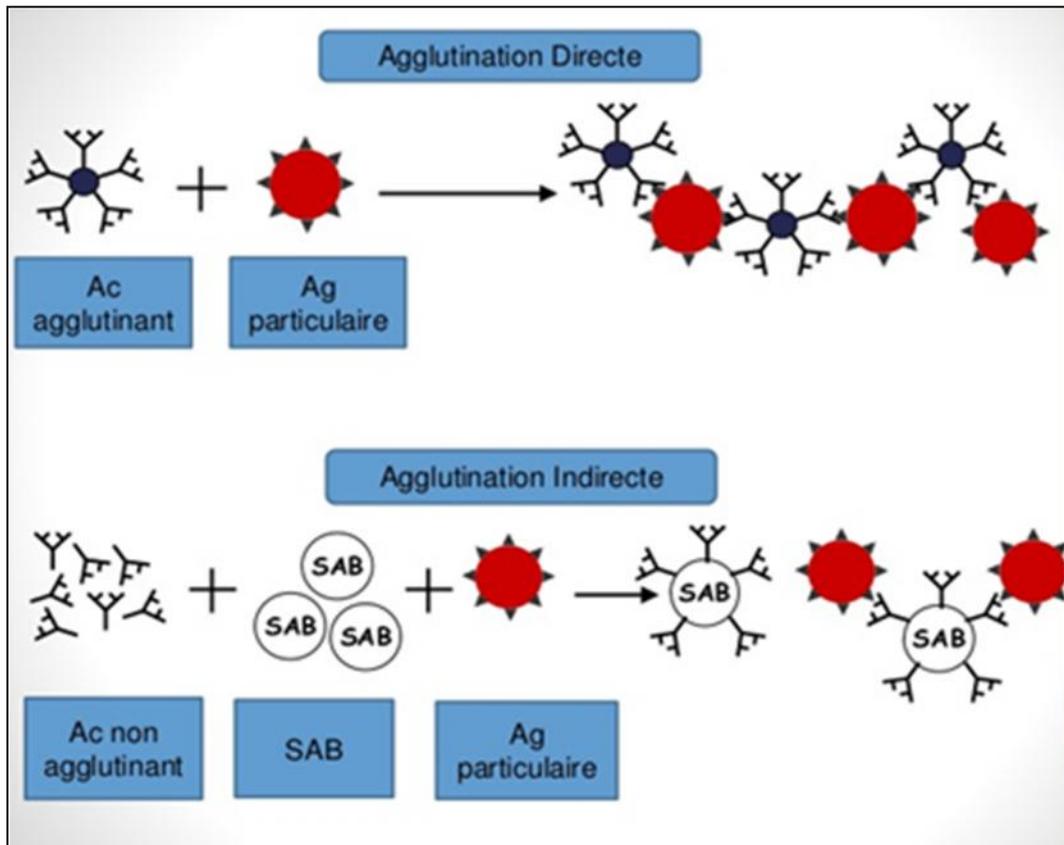


Fig 1. Agglutination directe et indirecte (Gruber et Durhs, 1896).

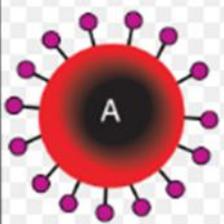
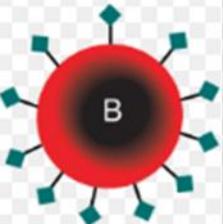
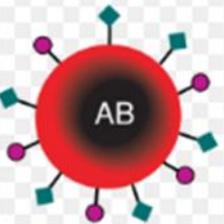
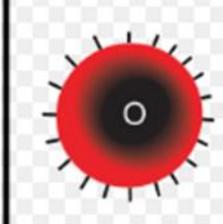
1.3. Avantage de la technique

Cette technique présente plusieurs avantages : une haute sensibilité, ainsi qu'une haute spécificité, un faible coût, et utilisable sur de nombreuses espèces, d'où un intérêt tout particulier pour l'étude épidémiologique du cycle évolutif.

1.4. Intérêt de la réaction d'agglutination

Les réactions d'agglutination sont particulièrement utilisées pour le sérodiagnostic des affections microbiennes et le typage des groupes sanguins (hémagglutination). La découverte fondamentale des quatre groupes sanguins du système ABO, revient à Landsteiner en 1900. Il conclut à l'existence de deux antigènes du groupe sanguin «A» et «B»; les hématies d'un sujet donné portent soit l'un (A), soit l'autre (B), soit les deux (AB), soit aucun (O). Ces antigènes sont des glycoprotéines constitués de chaînes hétérosaccharidiques multiples (L-fucose, N-acétylgalactosamine, D-galactose, N-acétyl glucosamine), branchées sur une sérine ou une tyrosine d'un squelette polypeptidique. Landsteiner conclut également à la présence d'alloanticorp anti-A et anti-B chez les sujets qui n'ont pas l'antigène correspondant (Figure1).

Tableau I. Différents groupes sanguins (Landsteiner, 1900)

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	 Antigène A	 Antigène B	 Antigène A et B	Pas d'antigène

2. Techniques immunoenzymatiques

2.1. Technique d'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

2.1.1. Principe

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique qui permet la détection des anticorps dans un échantillon de sérum. La réaction fait appel aux anticorps spécifiques de l'antigène (ceux recherchés) et à des anticorps couplés à une enzyme, spécifiques du complexe immun formé. La réaction enzymatique produite crée une coloration quantifiable par spectrophotométrie.

2.1.2. Avantages de la technique

Cette technique possède plusieurs avantages, parmi lesquels on trouve;

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible.
- technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé.

2.1.3. Test ELISA indirect

Ce test permet de détecter ou doser des anticorps, il se réalise en 4 étapes (Figure 2):

2.1.3.1. Coating de l'antigène

Elle consiste à incuber dans des puits, la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché. La fixation de l'antigène sur le fond des puits se fait électrostatiquement. Les plaques sont incubées à 4°C pendant une nuit. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les antigènes en excès avec du tampon de lavage. Puis on va utiliser une solution de blocage pour bloquer les sites libres sur la plaque.

2.1.3.2. Fixation de l'anticorps à doser

On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps à doser pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps à doser en excès avec du tampon de lavage.

2.1.3.3. Fixation de l'anticorps de détection

On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps de détection pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès avec du tampon de lavage. Notons que les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.

2.1.3.4. Révélation des anticorps fixés

On incube à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme. L'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché.

2.1.4. DAS-ELISA direct (Double Antibody Sandwich ELISA direct)

Dans ce type d'ELISA, l'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifiques. L'utilisation de DAS-ELISA nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène.

- La première étape consiste à fixer sur le support, l'anticorps de capture. On incube la solution à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.
- Lors de la deuxième étape, on dépose l'échantillon possédant l'antigène à identifier qu'on laisse incuber à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.
- Dans une troisième étape, on fixe l'anticorps de détection marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché. Pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble à 37°C pendant 2 heures.
- La dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

NB: la différence entre le DAS-ELISA direct et le DAS-ELISA indirect est au niveau du système biotine-streptavidine réside dans l'anticorps de détection. Pour le DAS-ELISA indirect par le système biotine-streptavidine, l'anticorps de détection porte une molécule de biotine qui interagit avec la streptavidine couplé à une enzyme (Figure 3).

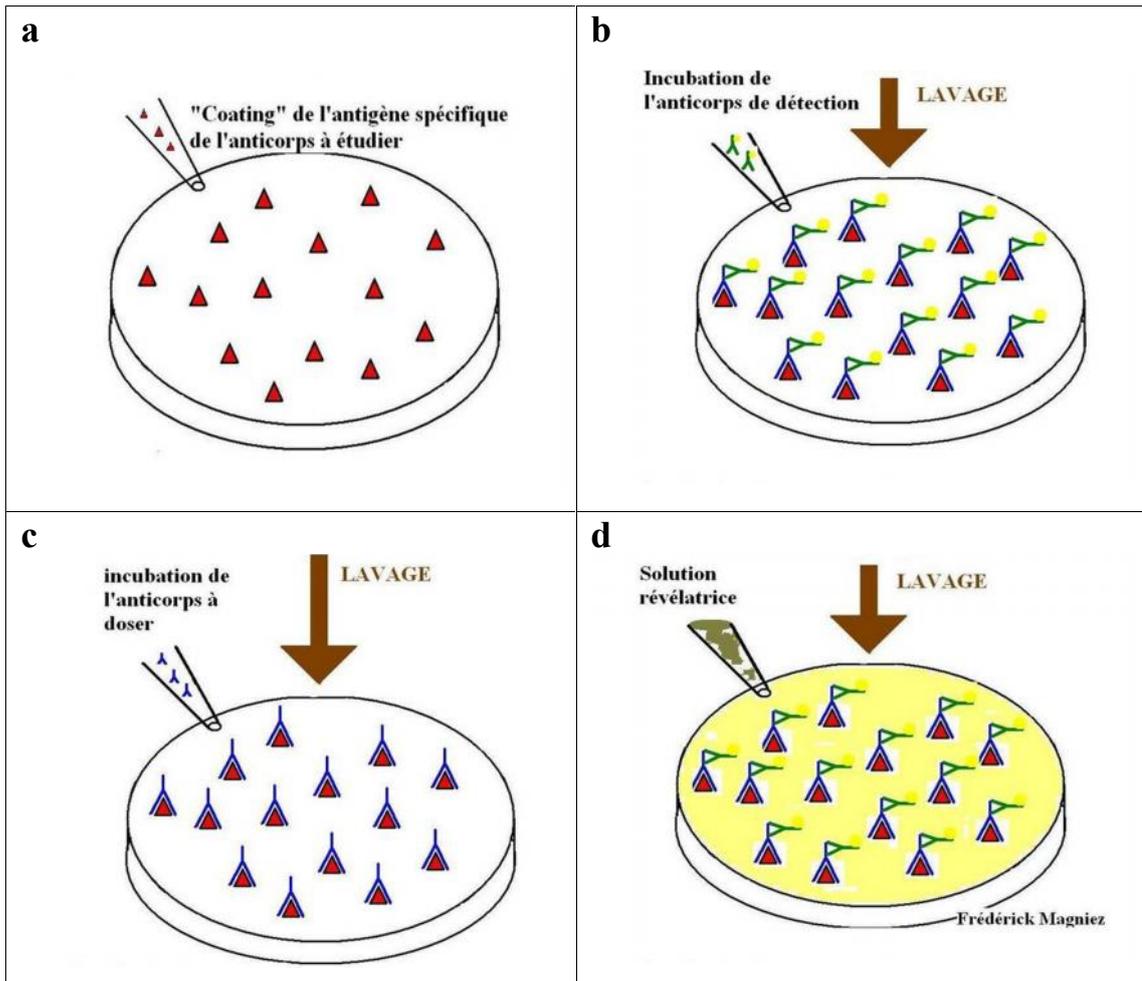


Fig 2. Différents étapes de test ELISA (Engvall et Perlman, 1971)

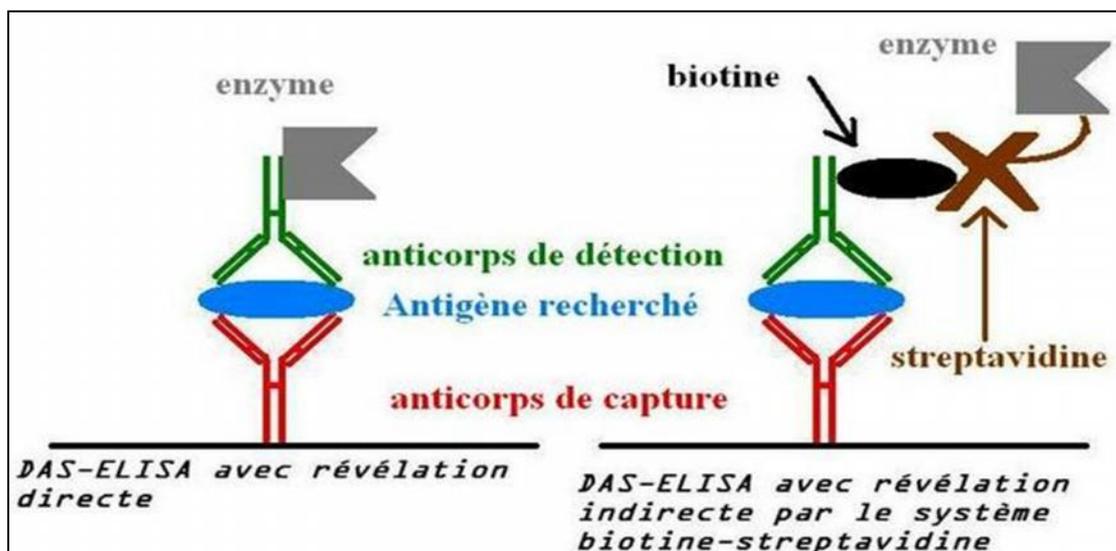


Fig 3. Double Anticorps Sandwich ELISA direct (Ling et Overby, 1972)

2.2. Technique d'Immunoempreinte (Western Blot)

2.2.1. Principe

Le Western Blot (aussi appelé immunotransfert) est une technique employée pour analyser des protéines individuelles dans un mélange protéique (par ex., un lysat de cellules). Dans le cadre du Western blot, le mélange protéique est soumis à une électrophorèse sur gel dans une matrice porteuse afin de trier les protéines par taille, charge au sein des bandes individuelles de protéines.

Les bandes de protéines séparées sont ensuite transférées vers une membrane porteuse (par ex., nitrocellulose, nylon ou PVDF). Ce procédé porte le nom de transfert. Les protéines adhèrent à la membrane de la même manière qu'elles ont été séparées en raison des interactions entre les charges. Le transfert de protéines permet de confirmer ou d'affirmer un diagnostic (Figure 4).

2.2.2. Etapes de la technique

2.2.2.1. Préparation des échantillons

La première étape de Western blot est la préparation d'échantillons. Cette préparation sert à libérer les protéines d'intérêt. L'extraction des protéines permet l'isolement de molécules actives endogènes ou protéines exprimées sans avoir besoin d'un traitement secondaire. Les étapes de cette préparation sont :

- 1- Centrifuger les cellules à faible vitesse (par exemple 5 min à 2500 x g) et récupérer le culot.
- 2- Resuspendre les cellules dans le réactif spécifique et incubé à température ambiante pendant 5 min.
- 3- Centrifuger les cellules pendant 5 min à 16000 x g à 4 ° C.
- 4- Transférer l'extrait cellulaire dans un nouveau tube et procéder à l'analyse.

2.2.2.2. SDS-PAGE

La deuxième étape du Western blot est la séparation des protéines. Les protéines sont séparées en fonction du poids moléculaire selon les étapes suivantes :

- 1- Après la préparation de l'échantillon, on est prêt à déterminer la concentration en protéines.
- 2- Une fois que la concentration en protéines est évaluée, nous sommes prêts à préparer notre échantillon pour le chargement du gel.
- 3- Pour dénaturer l'échantillon, utiliser un tampon de chargement avec le sulfate de détergents anioniques dénaturant dodécylsulfate de sodium (SDS), et faire bouillir le mélange à 95-100 ° C pendant 5 minutes.
- 4- Charger la première voie du puits avec marqueur protéique et les autres puits par les échantillons
- 5- Remplir l'appareil d'électrophorèse avec beaucoup du tampon. Pour les gels PAGE.
- 6- Une fois que les protéines sont séparées, le gel est coloré avec le bleu de Coomassie .

2.2.2.3. Protéine de transfert

Cette étape consiste à transférer les protéines dans un champ électrique à partir du gel sur une membrane, étant soit PVDF ou de nitrocellulose.

Pour le transfert humide, le gel et la membrane sont pris en sandwich entre une éponge et du papier (éponge / papier / gel / membrane / papier / éponge) et tous sont serrés ensemble. Le sandwich est immergé dans du tampon de transfert auquel un champs électrique est appliqué. Les protéines chargées négativement voyagent vers l'électrode chargée positivement.

Le gel a également besoin de s'équilibrer pendant quelques minutes dans un tampon de transfert de la glace froide. Une fois le transfert est terminé, il est nécessaire de visualiser les protéines pour assurer le transfert.

2.2.3. Anticorps et réactifs accessoires

La coloration par le bleu de Coomassie peut être utilisée pour visualiser toutes les protéines séparées par SDS-PAGE, Mais comment déterminer quelle bande correspond à la protéine d'intérêt ?

L'utilisation d'anticorps détectant la protéine d'intérêt permet de répondre à cette question en fixant uniquement la protéine d'intérêt ;

- La première étape est de bloquer la membrane. Le blocage de la membrane empêche la liaison de fond non spécifique. Soit des protéines de lait ou le BSA peuvent être utilisés comme une solution de blocage.
- Ensuite, incuber la membrane 1 heure avec la solution de blocage à température ambiante sous agitation douce. Une fois la membrane bloquée, l'étape suivante est l'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire.
- Incuber simplement votre anticorps primaire dans la solution spécifique pendant 1 heure. Laver avec du PBST.
- Finalement, incuber l'anticorps secondaire dans le tampon de blocage pendant 1 heure. Lavez la membrane à nouveau plusieurs fois avec PBST.

2.2.4. Détection

Cette étape consiste à utiliser un substrat chimio-luminescent qui réagit avec un anticorps. Les substrats chromogènes (4-chloronaphthol ou DAB) fonctionnent également avec la HRP et produisent un produit coloré qui se dépose sur la membrane à proximité de l'anticorps secondaire couplé à la HRP et produit un signal visible sur film.

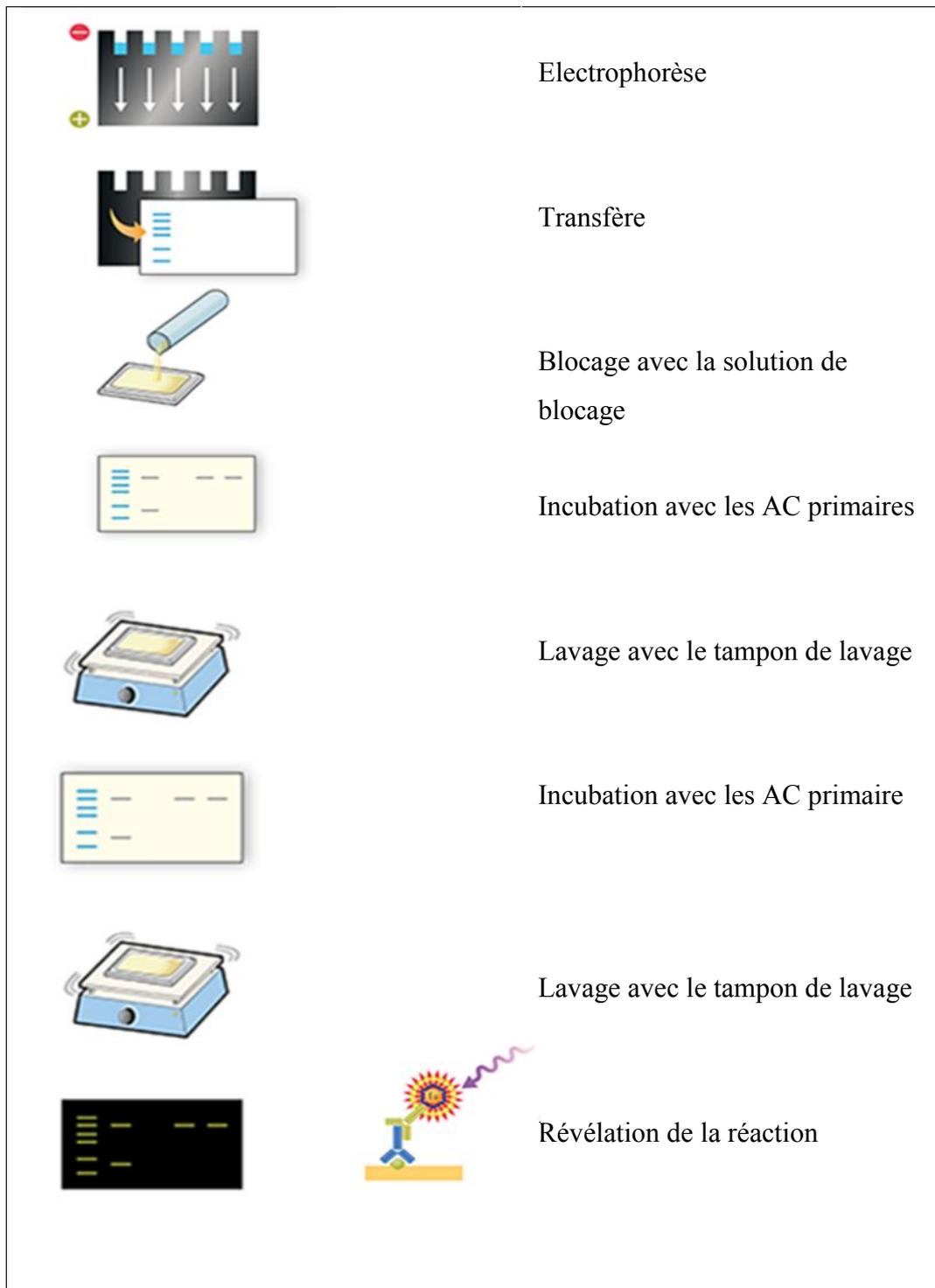


Fig 4. Etapes de western blot (Towbin et *al*, 1979)

2.3. Technique d'immunofluorescence

2.3.1. Principe d'immunofluorescence directe

L'immunofluorescence directe est une technique de marquage immunohisto-chimique, qui consiste à révéler des motifs antigéniques, présents sur une structure cellulaire ou tissulaire, par application d'anticorps (Ac) spécifiques du motif antigénique à révéler, rendu préalablement fluorescents par couplage à un fluorochrome. Les anticorps primaires, directement marqués par un fluorochrome, sont limités sur le marché et très chers. Pour pallier aux problèmes d'intensité lumineuse, l'immunofluorescence indirecte est préférée.

2.3.2. Principe d'immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI utilise les propriétés de la réaction antigène/anticorps. Un anticorps possède la propriété unique, par son paratope ou site anticorps, de se combiner spécifiquement à l'épitope ou déterminant antigénique d'un antigène, que celui-ci soit exogène ou endogène.

Dans cette technique, un anticorps primaire monoclonal se fixe sur le bioagresseur. Ensuite, un anticorps secondaire polyclonal qui possède une forte affinité pour l'anticorps primaire est ajouté. Les anticorps primaires présentent différents sites de fixation. Plusieurs anticorps secondaires peuvent donc s'y lier, ce qui augmente ainsi l'intensité lumineuse.

On mesure la fluorescence au microscope à ultraviolet, à une dilution précise. Une lame est positive si on observe une fluorescence sur tout le contour de l'échantillon (Figure 5).

2.3.3. Réalisation de l'IFI

La technique de IFI se déroule selon les étapes suivantes ;

- Dépôt du sérum du patient et incubation ;
- Lavage pour éliminer les protéines fixées faiblement de manière non spécifique ;
- Ajout des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués par le Fluorochrome puis une deuxième incubation est réalisée ;
- Lavage et lecture à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé en épi-illumination.

2.3.4. Types des fluorochromes utilisés

Les fluorochromes sont des substances qui ont pour propriétés d'émettre une fluorescence dans le visible lorsqu'ils sont excités par une lumière dans les longueurs d'ondes de l'ultra-violet. Trois sont d'utilisation courante :

- Isothiocyanate de fluorescéine (FITC),
- Phycoérythrine (PE)
- Rhodamine.

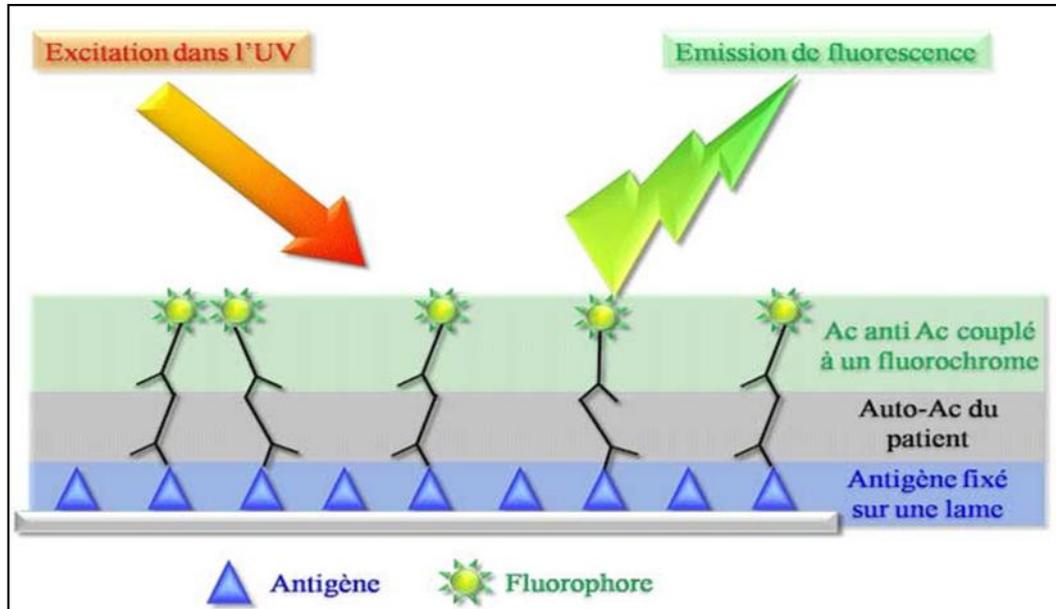


Fig 5. Schéma d'IFI (Coons et *al*, 1942)

2.3.5. Facteurs influençant l'IFI

La recherche des autoanticorps s'effectue le plus souvent en première intention par IFI. L'utilisation de différents types de substrats (coupes congelées d'organes de rat, de cobaye, de singe, ou cellules humaines en culture) permet la mise en évidence des différents autoanticorps dont on précisera le titre et l'aspect de fluorescence.

En égard à l'hétérogénéité des immunoglobulines au sein des quelles s'expriment quelques clones auto-immuns, les résultats de ces tests d'IFI ne peuvent être rendus en unités de masse. On est obligé de définir une valeur seuil au-delà de laquelle la fluorescence observée avec le sérum étudié est significativement différente de l'aspect donné par un sérum humain normal et considérée comme positive. Le titre de l'anticorps se définit comme l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive.

3. Technique de PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.1. Principe

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes (Figure 6).

- 1- Dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin : dénaturation.
- 2- Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligo-nucléotides amorces spécifiques : hybridation.
- 3- Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin : polymérisation.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

3.2. Eléments et conditions de PCR

3.2.1. Amorces

Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles vont avoir un double rôle : en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier (étape 2 du cycle) et avec leur extrémité 3' OH libre servir d'amorce pour l'ADN polymérase (étape 3 du cycle).

Les oligonucléotides amorces s'hybrident aux extrémités de la séquence qui va être amplifiée, il faut donc connaître les séquences nucléotidiques des extrémités de la région ADN amplifiée. C'est en effet au niveau de ces extrémités que les oligonucléotides amorces vont s'hybrider.

3.2.2. Températures

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :

- L'étape de dénaturation, est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.
- L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.
- L'étape de polymérisation est à environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces.

3.2.3. ADN matriciel

En théorie une copie d'ADN de la séquence recherchée est suffisante pour avoir une amplification, il faut cependant tenir compte de la probabilité de rencontre des molécules d'ADN matrice avec les amorces. Dans la pratique plusieurs copies sont nécessaires pour avoir un résultat correct. Mais attention, la mauvaise qualité et/ou une quantité trop importante d'ADN matrice peut conduire à une amplification aspécifique, voire à une inhibition enzymatique. Il est possible d'expliquer cette inhibition par la présence de contaminants provenant de l'échantillon ou des réactifs utilisés dans les protocoles d'extraction d'ADN.

3.2.4. ADN polymérase

Les premières ADN polymérases utilisées provenaient d'une bactérie thermophile (résistante à des températures très élevées), comme par exemple *Thermusaquaticus* (Taq polymérase). De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes, ce qui simplifie considérablement leur obtention, et leurs propriétés ont été largement modifiées pour les rendre plus efficaces et plus fidèles.

3.2.5. Tampon

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (Tris HCl à pH basique 8,5 à 9). Il contient des cations bivalents Mg^{2+} , cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg^{2+} et de cations monovalents (K^+ ou NH_4^+) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ADN.

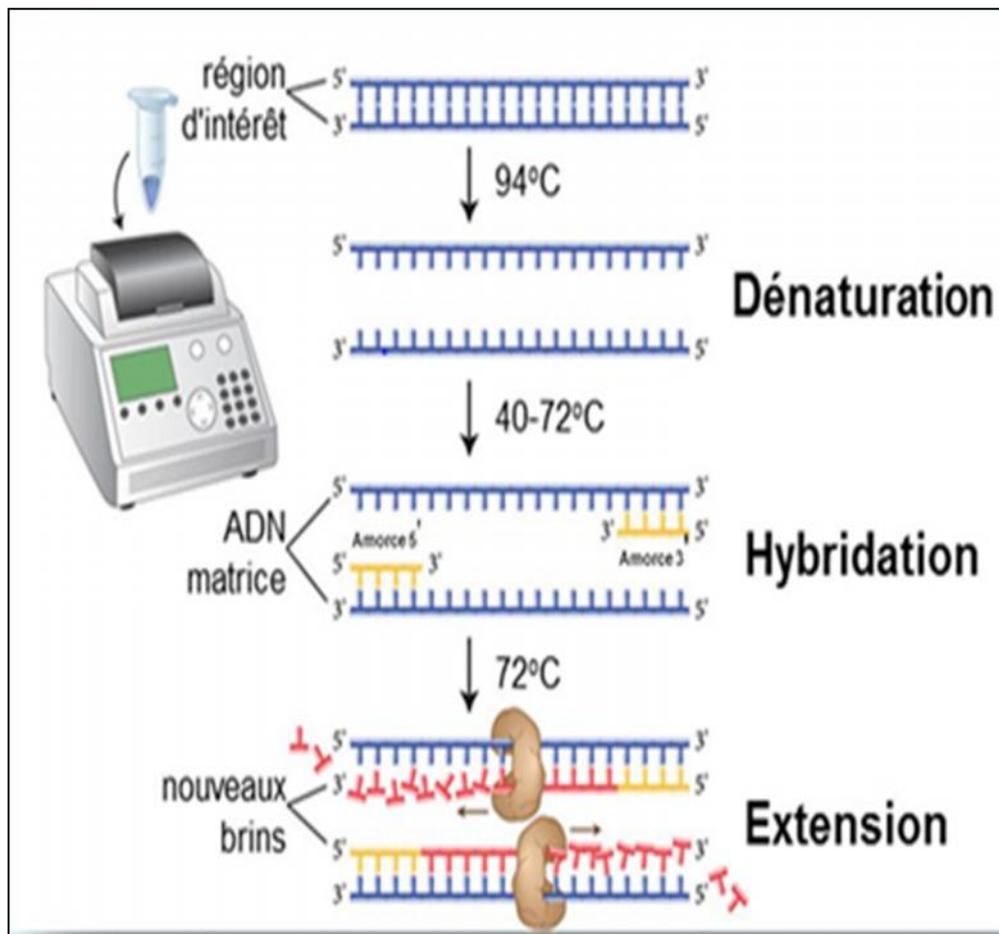


Fig 6. Etapes de PCR (Higuchi et al, 1992)

4. Dosage sérique HPLC

4.1. Définition de Chromatographie HPLC

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange dans laquelle interviennent des phénomènes d'adsorption et de partage. Le mécanisme général correspond à l'entraînement de ces constituants par une phase mobile (liquide) le long d'une phase stationnaire ou fixe (solide, gel de silice sur plaque aluminium par exemple) contenue dans une colonne. Le solvant de chromatographie de la phase mobile déposé en haut de colonne va descendre par capillarité dans la phase stationnaire entraînant avec lui les composants protéiques. Selon leur hydrophilie, pHi ou encore selon leur PM. Ils migreront plus ou moins vite dans la phase fixe.

La chromatographie liquide haute performance ou CLHP (HPLC en anglais) améliore les performances de séparation en mettant la phase mobile sous pression (plus précis, plus rapide). Le dispositif est alors modifié : le diamètre de la colonne est réduit, des pompes sont ajoutées, les phases fixes employées doivent être capables de résister à la pression (donc phase stationnaire en silice). Dans la chromatographie, ce qui entraîne les molécules est un flux liquidien, naturel ou forcé.

Le système de la chromatographie à haute performance est un dispositif composé d'une pompe à haute pression permettant l'utilisation d'un solvant (phase mobile) en mode isocratique et d'un système d'injection manuel (boucle). La colonne est apolaire couplée à un détecteur au spectrofluorimètre ou au spectrophotomètre UV.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

4.2. Les étapes du dosage sérique par HPLC

La première étape de processus analytique consiste en une préparation de l'échantillon avant l'analyse. La réalisation de cette étape dépend de deux performances :

a. Le volume de la prise du plasma traité

Dans les méthodes directes pour le dosage des vitamines plasmatiques le volume est généralement entre 20 et 100 µl.

b. Le solvant ou le mélange de solvants pour l'extraction du composant à doser

Le bon choix est basé sur les conditions suivantes :

- Doit dénaturer les protéines.
- Doit avoir une polarité convenable et une affinité pour l'analyte pour éliminer une éventuelle co-précipitation pendant la dénaturation des protéines.
- Doit être complètement miscible avec l'échantillon.
- Doit être compatible avec le système de détection et ne pas interférer avec l'analyte.

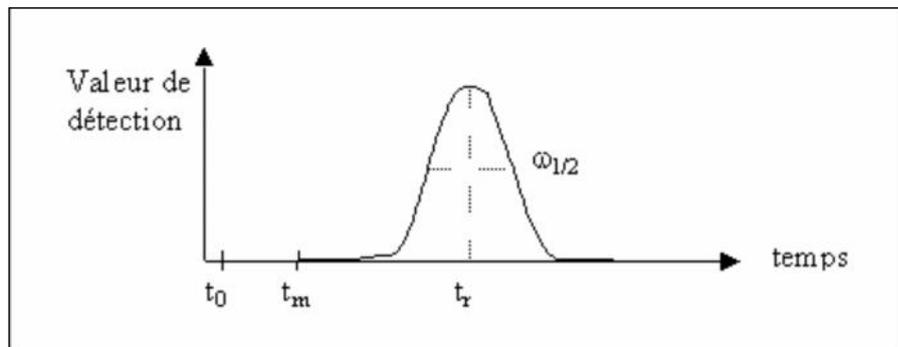
4.2.1. La préparation des échantillons de plasma est comme suite;

- Classer les échantillons de la série à analyser sur la paillasse afin de décongeler le plasma.
- Préparer et étiqueter en double les tubes Eppendorff, selon le nombre d'échantillons prévus.- Enlever de la seringue l'aiguille avec son étui.
- Transférer une faible quantité de plasma liquide dans le premier tube.
- Refaire la même opération pour l'ensemble des échantillons de la série.
- Centrifuger à 12000 rpm, pendant 1 minute pour éliminer les fibrines.
- Prélever 100 µl de plasma et transférer dans le deuxième tube placé dans un étui d'aluminium.
- Ajouter 400 µl de solvant.
- Fermer le tube et agiter violemment avec la main, dans le sens vertical
- Centrifuger à 11000 rpm pendant 4 minutes. Enlever les tubes de la centrifugeuse.
- Mettre en marche le système HPLC.
- Prélever soigneusement le surnageant (à l'aide de la seringue conçue pour l'injection), sans toucher les parois du tube ou le précipité et charger la boucle d'injection.
- Injecter les échantillons.

Les résultats vont être exprimés sous forme d'un chromatogramme, c'est le graphique d'une fonction de la concentration de l'analyte en fonction du temps d'élution (ou temps de rétention).

4.3. Notions fondamentales

4.3.1. Notion du temps



- t_0 est le temps du début de l'injection
- Le temps mort t_m est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
- Le temps de rétention t_r est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

4.3.2. Notion de concentration

• **Le coefficient de partage K** : A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Ce coefficient est fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire
- Celle entre les phases mobile et stationnaire

4.3.3. Notion d'efficacité

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- le nombre de plateaux théoriques **N_{th}**

$$N_{th} = 5,54 \left[\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right]^2$$

t_r : temps de rétention

ω_{1/2} : largeur du pic à mi-hauteur

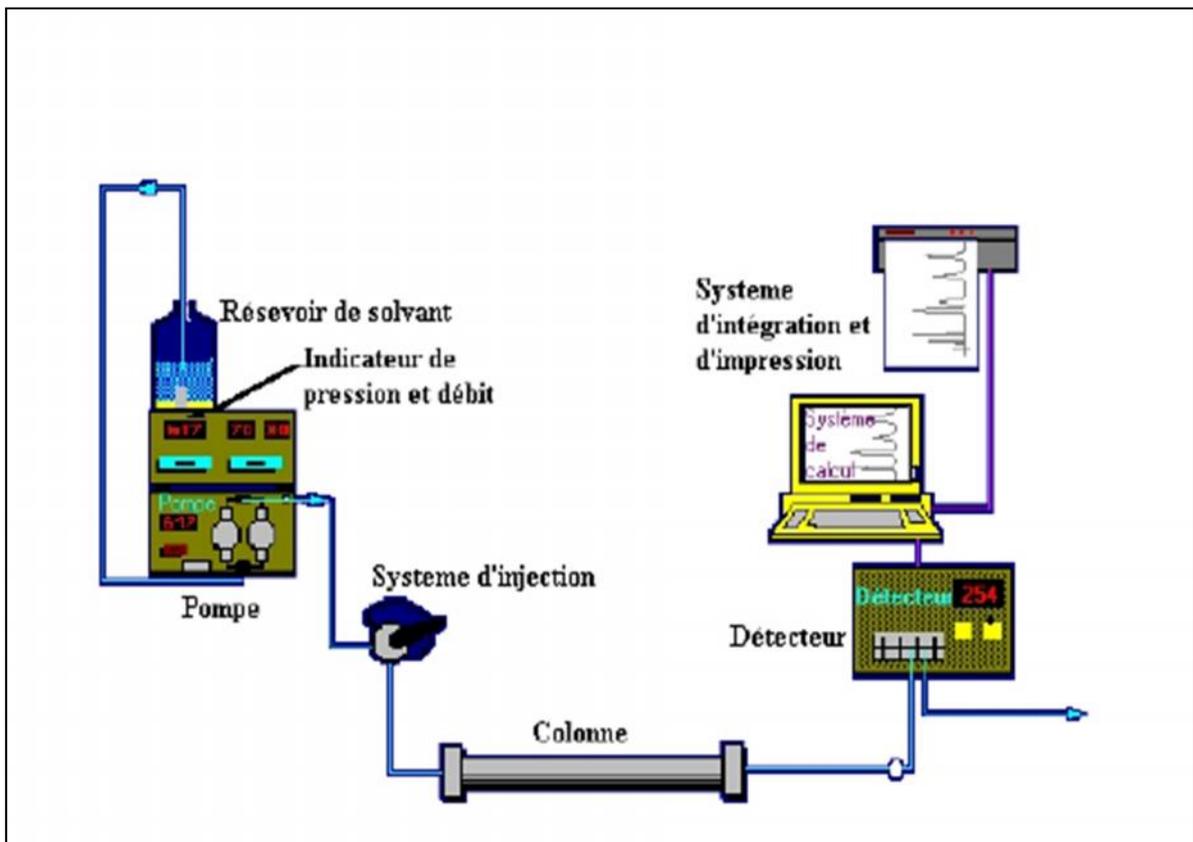


Fig 7. Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC (Snyder et Kirkland, 1979)

II. SEROLOGIE VIRALE

1. Introduction

La majorité des infections virales présentent un tableau clinique très évocateur mais dans certaines situations, le diagnostic précis d'un virus responsable de la pathologie observée est nécessaire pour ;

- Apporter la preuve de l'origine virale des signes cliniques observés et diagnostiquer le virus en cause (ex : hépatites, herpès),
- Suivre une évolution biologique de l'infection (ex : VIH, Hépatite B),
- Permettre une décision thérapeutique et juger de l'efficacité des traitements antiviraux (ex : traitement d'une infection à cytomégalovirus par ganciclovir),
- Prévenir la transmission d'infections virales à l'occasion du don de sang, d'organes et de tissus,
- Apprécier l'état immunitaire (ex : rubéole),
- Etudier les marqueurs sériques en population (ex : enquêtes de prévalence, études épidémiologiques).

Le diagnostic virologique doit se faire uniquement dans des conditions précises. Les infections virales fréquentes chez les sujets immunodéprimés nécessitent tout particulièrement des diagnostics rapides et le suivi des traitements antiviraux. Le diagnostic virologique fait appel à deux groupes de techniques réalisant :

- a- Soit la mise en évidence du virus ou de ses constituants,
- b- Soit celle de la réponse immunitaire spécifique.

2. Prélèvements

Différents types de prélèvements peuvent être utilisés pour la recherche de virus; on peut utiliser le sang (virémie), les selles, les sécrétions nasales, les urines, les prélèvements cutanés (vésicules, ulcérations), les prélèvements génitaux, les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), les liquides céphalo-rachidien (LCR).

Les virus sont fragiles, ils sont présents dans les cellules infectées qui elles-mêmes survivent dans des conditions particulières.

3. Techniques de détection de virus et de leurs constituants

3.1. Recherche de virus et de leurs constituants

Les virus ne sont pas visibles en microscopie optique. Plusieurs approches sont possibles pour montrer la présence d'un virus responsable d'une infection :

- L'identification directe des cellules infectées au sein des prélèvements des patients
- L'amplification du virus par inoculation des prélèvements aux cultures cellulaires
- L'amplification du génome virale (ex : particules virales présentes dans le plasma).

Les méthodes d'amplification sont les plus sensibles, cependant tout dépend de la charge virale du prélèvement laquelle est variable selon le moment (primo-infection) et selon l'état immunitaire du sujet (risque élevé chez les sujets immunodéprimés).

3.2. Recherche de virus par culture cellulaire

Les cultures cellulaires utilisent des lignées de cellules d'origine humaine ou animale. On citera les cellules épithélioïdes humaines en lignée continue (Hela, Hep, KB) ou les cellules fibroblastiques humaines (MRC5 : pour les CMV). Les signes de multiplication virale induisent l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) défini par un changement de l'aspect des cellules, visible en microscopie optique (accumulation des virus produits ou des antigènes dans le noyau, ou dans le cytoplasme des cellules infectées).

On peut observer des modifications de la nappe cellulaire par examen au microscope. On peut aussi colorer les cellules pour identifier les inclusions. Les techniques de culture de virus sont indispensables pour effectuer des titrages de virus et quantifier le nombre de virus infectieux. Elles restent à la base des techniques de recherche de molécules antivirales (screening d'antiviraux).

3.3. Recherche des génomes viraux

Les techniques de PCR sont les plus utilisées. Elles sont sensibles et spécifiques de chaque type de virus. Les appareils de PCR en temps réel constituent un progrès important puisqu'ils permettent des diagnostics rapides ; de plus le coût de ces techniques est peu élevé. L'application de ces techniques permet le diagnostic d'infections à Cytomégalovirus (CMV) et Epstein-Barr-Virus (EBV), adénovirus, herpès-virus.... Elles sont quantitatives et permettent de suivre l'efficacité d'un traitement antiviral.

L'exemple du VIH est intéressant car il a permis le développement de techniques différentes pour la quantification de l'ARN VIH plasmatique. Ces outils ont aussi été développés par les firmes pour les virus HCV et HBV.

3.4. Recherche des antigènes viraux

La recherche des antigènes viraux consiste à identifier l'infection virale directement au sein des cellules infectées présentes dans les prélèvements des patients. Le meilleur exemple est celui du diagnostic des infections respiratoires. A partir des prélèvements naso-pharyngés, on peut rechercher les antigènes viraux dans les cellules du nez ou de la gorge et dans les lavages broncho alvéolaire (LBA). Les virus grippaux, le virus respiratoire syncytial (VRS), les virus para-influenzae s'accumulent dans le cytoplasme des cellules infectées.

Les antigènes viraux peuvent être visualisés par technique d'immuno-fluorescence, en utilisant des anticorps spécifiques de chaque virus marqués par la fluoréscéine. On utilise des anticorps monoclonaux. Cette technique est simple et rapide (une à deux heures), elle permet de rechercher simultanément plusieurs virus sur un même prélèvement.

3.5. Recherche de virus résistants

La technique la plus utilisée est celle du séquençage des gènes cibles (ex : reverse-transcriptase, protéase du HIV). L'analyse des séquences obtenues permet d'identifier les mutations induites par la réplication virale en présence d'antiviral (concentration insuffisante, mais difficile à augmenter du fait du risque de toxicité). Chaque traitement antiviral induit des modifications conformationnelles particulières de l'enzyme et des modifications spécifiques des séquences. Ces techniques sont lourdes et chères ; elles permettent d'arrêter un traitement inefficace, d'adapter des doses et/ou de choisir un nouveau traitement.

4. Sérologies Virale

4.1. Objectifs

L'infection virale est le plus souvent suivie par une réponse immunitaire humorale traduite par la production d'anticorps spécifiques des antigènes du virus (IgG et IgM). La connaissance d'un statut sérologique présente différents intérêts ; elle permet de connaître l'état immunitaire du sujet. Un titre positif permet d'affirmer que le sujet est immunisé et a rencontré une fois le virus dans sa vie (HIV, Rubéole) ou bien qu'il est vacciné (hépatite B). Elle permet aussi de suivre l'évolution de l'infection virale (anticorps anti HBc et HBs).

4.2. Techniques du diagnostic

Différentes techniques sont utilisées : ELISA, agglutination, Western blot et immunoblot. L'ELISA est devenue la technique la plus utilisée car elle est rapide simple spécifique et adaptable sur automate. Elle permet d'utiliser différents types d'antigènes : lysats de virus, protéines virales natives, protéines de recombinaison génétique ou peptides de synthèse. Ceci permet des sérologies analytiques selon les antigènes utilisés (exemple suivi de l'infection par le virus de l'hépatite B).

4.3. Interprétation des résultats

L'interprétation des sérologies virales n'est pas toujours facile. Il faut garder à l'esprit que la réponse immune est différente d'un sujet à l'autre (ex : vaccination contre la rubéole) qu'il n'y a pas de relation directe entre le titre d'anticorps et la symptomatologie clinique. La quantification du titre d'anticorps est intéressante pour effectuer le suivi clinique en primo-infection notamment. Par contre, les sérologies virales sont peu informatives chez les sujets immuno-déprimés.

5. Conclusions

Les examens virologiques deviennent particulièrement contributifs grâce au développement de nouvelles techniques rapides sensibles et spécifiques pour la détection des virus. Elles permettent le diagnostic et le suivi thérapeutique d'infections chroniques (HIV, HBV) ou d'infections sévères chez les sujets immuno-déprimés. Il faut souligner la nécessité de contacts entre cliniciens et biologistes pour orienter le choix des examens, cibler les recherches selon chaque pathologie observée et adapter les traitements.

III. SEROLOGIE BACTERIENNE

1. Introduction

La structure antigénique bactérienne pose quelques difficultés ; en effet, la réponse immunitaire est complexe et protéiforme. Cette réponse variable dans le temps est parfois mise à profit pour déterminer la phase de croissance de la bactérie et donc le stade de la maladie (variation de la réponse en fonction des stades d'une syphilis par exemple). Cette structure antigénique est souvent proche d'une espèce à l'autre entraînant des réactions croisées et donc une baisse de spécificité. C'est une des principales différences avec les sérologies virales qui présentent beaucoup moins d'antigènes et donc une réponse immunitaire plus facilement interprétable.

La réponse humorale est toujours en décalage avec l'activité de l'agent infectieux : une séronégativité à un stade clinique précoce doit imposer un contrôle 10 à 20 jours après.

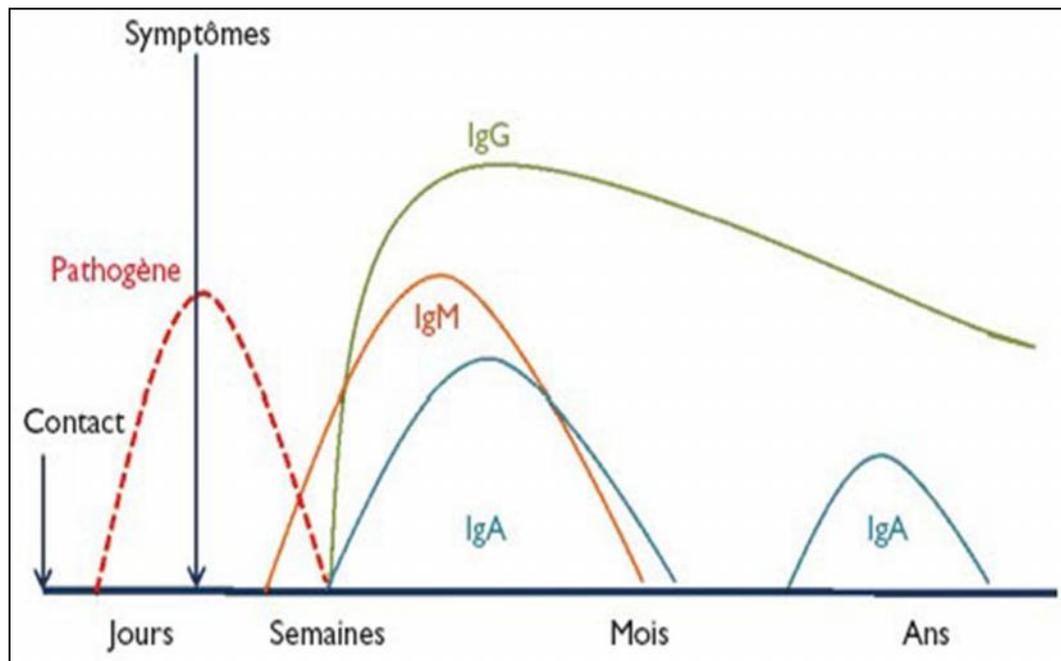


Fig 8. Schéma de la réponse humorale bactérienne

De nombreuses bactéries n'entraînent pas de réponse immunitaire humorale détectable en cas d'infection locale. Le meilleur exemple reste les chlamydiae : cette bactérie intracellulaire n'entraînera une réponse humorale que lorsque l'infection est présente depuis assez longtemps pour permettre un contact tissulaire profond. Une sérologie chlamydiae

positive indique souvent une infection ancienne (la sérologie peut demeurer négative pendant des années malgré l'infection).

2. Types de Prélèvement

La nature de prélèvement dépend de la localisation de l'infection ;

- Sang (Septicémie) = Hémoculture
- Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) en cas de méningite
- Urine = Uroculture
- Selles = Coproculture
- Prélèvements Pulmonaires : Expectorations, Aspirations Bronchiques...

3. Techniques utilisées

Le tableau suivant regroupe les différentes méthodes utilisées pour le diagnostic bactérien;

Tableau II. Différentes méthodes utilisées pour le diagnostic bactérien

	AG - Support	Révélation - Lecture	Avantages
IFI	AG purifiés ou AG de la paroi bactérienne fixés sur une lame	Fluorescence (excitation dans l'UV) lue au microscope	Technique de référence des intracellulaires
ELISA	AG fixés sur un support solide (plaque)	Immuno-enzymatique (spectro)	Automatisable, très sensible
Agglutination passive	Particules bactériennes ou bactérie entier sensibilisées par AG	Visuelle (agglutination macroscopique)	Simple et rapide
Immuno-Empreinte	Protéines de l'AG fixées sur des bandelettes de nitrocellulose	Immuno-enzymatique (+++)	Distingue plusieurs cibles antigéniques, très spécifique, automatisable

4. Indications

Il est très important, au vue des difficultés d'interprétation de certaines sérologies bactériennes, de bien connaître les indications et les limites d'interprétation de ces sérologies.

Il faudra toujours privilégier la recherche directe du germe lorsqu'elle est possible. Lorsque les bactéries sont difficilement isolables, la sérologie bactérienne est contributive.

- Bactéries présentes en trop faible quantité,
- Infection décapitée par un traitement antibiotique précoce,
- Bactéries de croissance difficile ou impossible,
- Prélèvements trop invasifs,
- Diagnostic rétrospectif d'une infection guérie.

4.1. Autres indications

Les sérologies bactériennes permettent également :

- Le diagnostic des complications immunologiques (Affections rhumatologiques ou neurologiques : Syndrome de Guillain-Barré, polynévrites...)
- Le suivi thérapeutique (par l'appréciation de l'évolution du titre en AC)
- L'appréciation de l'efficacité d'une vaccination
- L'enquête épidémiologique (par évaluation de l'état immunitaire d'une population et l'étude de la séroprévalence d'une infection donnée).

5. Performances analytiques

De nombreux paramètres vont venir impacter la performance analytique de ces sérologies. La qualité de la technique utilisée est définie par la sensibilité et la spécificité de la méthode. Ainsi, dans les cas de dépistage, nous rechercherons les méthodes les plus sensibles, alors que les tests de confirmation feront appel à des méthodes spécifiques.

Cependant, comme nous l'avons évoqué plus haut, de nombreuses réactions croisées entre espèces viennent souvent diminuer la spécificité. De plus, l'interprétation doit tenir compte de la prévalence des anticorps recherchés dans la population générale.

IV. SEROLOGIE MYCOSIQUE

1. Introduction

Le diagnostic de mycoses causées par des champignons émergents n'est pas toujours facile, car la clinique est en règle générale aspécifique. Tout micromycète (levure ou moisissure) isolé d'un produit pathologique doit être à priori considéré comme un pathogène éventuel. La notion de contaminant ou de colonisateur saprophyte ne sera retenue qu'après avoir écarté l'hypothèse d'une mycose opportuniste.

Le rôle du laboratoire dans le diagnostic d'une mycose est primordial, c'est lui seul qui peut confirmer l'origine d'une infection et, par conséquent, permettre d'instaurer un traitement adapté et efficace. Dans un premier temps, l'isolement du champignon est la première preuve de sa responsabilité dans l'infection. Ce diagnostic mycologique, direct, comporte 3 étapes importantes : le prélèvement ; l'examen direct ; la culture avec identification du champignon.

L'identification précise du genre et de l'espèce du champignon est devenue indispensable. Par ailleurs, de plus en plus des champignons saprophytes deviennent pathogènes et il importe de savoir les reconnaître. Dans un deuxième temps, le diagnostic sérologique, indirect, peut être utile pour confirmer ou remplacer un diagnostic direct négatif. Dans l'intérêt du malade, le diagnostic nécessite une étroite collaboration entre le médecin et le biologiste.

Le médecin doit fournir un minimum de renseignements cliniques et épidémiologiques afin d'orienter le biologiste dans le choix des techniques et des milieux à utiliser. De son côté, le biologiste doit signaler le plus rapidement possible au médecin les premiers éléments de diagnostic afin de pouvoir débiter un traitement le plus précocement possible.

2. Prélèvements

Le diagnostic d'une mycose émergente repose sur un prélèvement de qualité. Il doit être le plus stérile possible afin d'éviter les contaminations de l'environnement. Les modalités du prélèvement dépendent de la localisation des lésions. Les différentes origines de prélèvement peuvent être :

a- Les expectorations

L'examen de l'expectoration spontanée ou induite permet d'étudier la présence de champignon. Elles sont recueillies après rinçage de la bouche par un antiseptique pour limiter la contamination par la flore buccale.

b- Le prélèvement sous fibroscopie bronchique

Il s'agit du brossage bronchique, du lavage bronchoalvéolaire, d'aspiration bronchique et de biopsie pulmonaire. Ils donnent des résultats plus fiables et rapides sur le plan de diagnostic.

c- Le liquide céphalorachidien

C'est le prélèvement de base qui permet de mettre en évidence l'agent causal, il peut être recueilli par ponction lombaire ou sur des dérivations.

d- Les lésions des muqueuses et cutanées

Les lésions cutanées sont prélevées par grattage au niveau de la périphérie de la lésion là où le champignon est le plus abondant, le matériel est recueilli dans un récipient stérile. Les lésions des muqueuses sont prélevées avec deux écouvillons, l'un pour réaliser l'examen direct et l'autre pour la culture.

e- Les biopsies

Toutes les biopsies, ponctions et pièces opératoires doivent être séparés en 2 parties : la première partie est destinée à l'examen anatomo-pathologique est fixé dans du formol ; la deuxième partie, déposée dans un tube sec stérile ou avec un peu d'eau physiologique, est envoyée au laboratoire pour mise en culture.

f- Le sang

Il est prélevé directement sur un milieu de culture prêt à l'emploi. Il peut s'agir de milieu spécifique de champignon (système Bactec sur milieu Mycosis ou système isolateur) ou non spécifique. Pour la sérologie, le sang sera prélevé sur un tube sec sans anticoagulant.

3. Diagnostic

L'examen clinique du patient doit être mis en relation avec les analyses réalisées au laboratoire. L'identification d'un champignon repose principalement sur sa morphologie, observée directement à partir du prélèvement ou après culture sur un milieu approprié. On

peut aussi identifier les levures, grâce à leurs caractères biochimiques. Des techniques immunologiques sont également utilisées.

3.1. Diagnostic direct

L'examen direct est la première étape de diagnostic biologique en mycologie, il est indispensable, il permet d'affirmer la nature fongique d'une infection. L'examen direct est réalisé très facilement en examinant au microscope un peu du prélèvement déposé entre lame et lamelle à l'état frais ou avec une goutte de liquide de montage (bleu lactique, encre de chine), ou après apposition sur lame d'un fragment de biopsie coloré au May-Grünwald-Giemsa et au Gomori-Grocott. On peut observer les levures isolées ou avec des filaments. Des filaments de diamètre variable, cloisonnés ou non ou des éléments fongiques particuliers. Le biologiste doit communiquer immédiatement le résultat de l'examen direct au clinicien, la culture pouvant demander de 2 à 20 j.

3.2. Diagnostic indirect

Le diagnostic immunologique permet de confronter un diagnostic de mycose en l'absence d'isolement du champignon ou d'étayer le rôle pathogène d'un champignon banal isolé tel *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus*. Le diagnostic indirect repose sur;

- La rétection d'antigènes circulants ou de métabolites (cryptococcose, aspergillose, histoplasmoses) ;
- La recherche d'anticorps spécifiques (aspergillose, candidose, histoplasmoses, coccidioidomycose) par immunodiffusion (immuno-electrophorese), hemagglutination indirecte, immunofluorescence, ELISA...
- Les techniques de biologie moléculaire (PCR).

3.2.1. Détection des anticorps circulants

La recherche des anticorps se fait couramment pour certaines mycoses, telles que les aspergilloses et les candidoses. En effet dans le commerce existent de nombreux coffrets de réactifs prêt à emploi. Par contre, pour d'autres mycoses telle la scedosporiose, les antigènes doivent être préparés par le laboratoire à partir de la souche de champignon isolée chez le malade. Les techniques sont alors longues et fastidieuses et les résultats délicats à interpréter en l'absence de toute validation et standardisation. La recherche d'anticorps n'a d'intérêt que chez les sujets immunocompétents, la synthèse d'anticorps étant très faible, voire nulle chez les immunodéprimés. Les techniques immunologiques sont nombreuses :

- ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- Hémagglutination indirecte pour un dépistage
- Réactions d'immunoprécipitation pour une confirmation

3.2.2. Détection des antigènes circulants

Les antigènes solubles, circulants, présents dans les sérums sont l'objet de nombreuses recherches. Les antigènes polysaccharidiques tel le galactomannane sont les plus étudiés. Ils résistent à l'action des enzymes et la fermentation. Ils peuvent être recherchés dans le sérum, l'urine, le LCR et les biopsies d'organes.

Les réactions les plus utilisées font appel à l'agglutination de particules de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement le galactomannane. La réaction après dissociation des complexes immuns et destruction des protéines, met en contact le liquide supposé contenir l'antigène et les billes de latex seront agglutinées en quelques minutes en cas de réaction positive. Exemple Pastorex Aspergillus.

Chez les patients suspects de mycose profonde, l'isolement du champignon responsable n'est pas toujours aisé. De plus, le diagnostic mycologique, par son caractère trop souvent tardif, peut compromettre les chances de guérison qui sont d'autant plus grandes que le traitement est instauré plus précocement. En plus, la sérologie spécifique est souvent mise en défaut chez le sujet immunodéprimé.

V. SEROLOGIE PARASITAIRE

A. PALAUDISME

1. Introduction

La sérologie n'a pas de place dans le diagnostic des accès palustres aigus en raison de l'apparition tardive des anticorps (Ac) antipalustres par rapport à l'émergence des parasites dans le sang. Le diagnostic sérologique se heurte également à des difficultés d'interprétation. En effet, la présence d'Ac spécifiques peut témoigner soit d'une infection palustre évolutive soit d'un paludisme antérieur dans la mesure où les Ac peuvent persister 2 à 3 ans après l'infection.

Le diagnostic immunologique est indiqué dans certaines formes cliniques chroniques tel le paludisme viscéral évolutif et la splénomégalie palustre hyper immune au cours des quelles les Ac sont à des taux élevés alors que les recherches parasitologiques sont le plus souvent négatives.

2. Méthodes utilisées pour le diagnostic

Les tests sérologiques sont particulièrement appropriés lorsque le parasite ne peut pas être documenté par l'examen direct (à l'œil nu ou sous le microscope). Les méthodes sérologiques pour les infections parasitaires comprennent ;

- Les tests ELISA (Enzyme linkedimmunosorbentassay),
- IFA (Indirect fluorescence assay),
- Les tests Immunoblots.

La technologie ELISA offre la possibilité de tester plusieurs échantillons simultanément en raison de son format à 96 puits. L'autre avantage des tests ELISA est leur haute sensibilité, souvent au détriment de la spécificité. Ces qualités expliquent la large utilisation des tests ELISA comme outil de dépistage ou de diagnostic.

Le problème principal des tests sérologiques est la fréquence des réactions croisées, spécialement entre les différents helminthes. Les résultats positifs devraient être confirmés par un second test avec une spécificité plus élevée. Ceci peut être obtenu grâce aux tests IFA ou immunoblots qui sont plus spécifiques que les tests ELISA. Les tests IFA, en particulier, ont une haute sensibilité et spécificité. Les tests immunoblots sont des méthodes fiables avec une excellente performance ;

3. Antigènes dans la sérologie du paludisme

D'après des études par l'immunofluorescence, on sait que différents stades de développement d'une même espèce de parasite possèdent des antigènes communs, mais les études d'immunisation active indiquent qu'il doit exister des anticorps spécifiques de chaque stade. Cela laisse prévoir que les antigènes du paludisme constituent un groupe vaste et hétérogène. Certains antigènes dérivent probablement du parasite lui-même tandis que d'autres peuvent représenter des constituants altérés des cellules de l'hôte.

Les antigènes habituellement utilisés dans les tests sérologiques sont surtout des schizontes érythrocytaires, des extraits de schizontes ou des antigènes solubles obtenus à partir de sérums d'individus hautement infectés.

Pour qu'un test sérologique soit sensible et spécifique, des antigènes purifiés sont indispensables. De tels antigènes permettent de normaliser les tests ainsi que de préparer et distribuer des réactifs de référence. Malheureusement, en matière de paludisme, aucun antigène de ce type n'a été isolé. C'est pourquoi il est souvent difficile de comparer les résultats obtenus par différents laboratoires, même ces derniers semblent utiliser des méthodes identiques.

4. Anticorps dans la sérologie du paludisme

La présence de plasmodiums dans l'organisme d'un sujet est à l'origine de la synthèse d'anticorps dirigés contre les antigènes de ce parasite. Le nombre et la diversité des antigènes dans les stades de la schizogonie érythrocytaire compliquent l'interprétation de la réponse immunitaire. D'autre part, les caractéristiques mêmes de cette réponse immune limitent l'utilité pratique de la sérologie dans le domaine du diagnostic.

Les anticorps paludéens appartenant aux classes G et M, il peut être nécessaire de fractionner le sérum pour doser correctement les anticorps IgM, car les anticorps IgG semblent en gêner la détection. La séroconversion se produit 5 à 10 jours après l'apparition de la parasitémie et concerne d'emblée les IgG.

La quantité d'anticorps dosée par les méthodes sérologiques sera proportionnelle à l'intensité et à la durée de l'infection. La sérologie est plus sensible que la mise en évidence du parasite car elle est indépendante des fluctuations à court terme de la parasitémie et reste positive en cas de parasitémie subpatente.

5. Indications précises de la sérologie

a- Dans les cas de fièvre d'origine indéterminée.

Lorsque le patient a suivi une chimioprophylaxie irrégulière d'efficacité douteuse ou que le traitement curatif a été commencé sans attendre le prélèvement, la parasitémie peut être masquée. La constatation d'un titre élevé d'anticorps précisera souvent la cause de la fièvre, tandis que leur absence permettra d'exclure l'étiologie malarienne.

b- Dans les centres de transfusion sanguine des zones non endémiques.

Les donneurs de sang ayant voyagé récemment pourront être porteurs de parasites en dehors d'accès francs. Dans ce cas aussi, il s'agira d'exclure la présence d'une parasitémie asymptomatique et souvent subpatente.

c- Dans les études épidémiologiques.

Le titre moyen d'anticorps antiformes asexués sanguins dans un échantillon de population permet d'évaluer l'intensité du contact avec les parasites, qui lui-même est tributaire de la transmission locale.

B. TOXOPLASMOSE

1. Introduction

La toxoplasmose est une maladie due à une infection par un parasite *Toxoplasma gondii*. Elle peut se contracter en consommant de la viande contaminée mal cuite, des crudités mal lavées ou de l'eau souillée. Dans la majorité des cas, cette infection est bénigne, asymptomatique ou s'accompagne d'une fièvre, d'une fatigue et/ou d'une infection de type angine (syndrome mononucléosique). Des formes plus graves existent chez les patients immunodéprimés et chez la femme enceinte qui risque de contaminer son enfant par voie transplacentaire.

2. Prescription du diagnostic sérologique de la toxoplasmose

C'est donc essentiellement chez les patients immunodéprimés et chez la femme enceinte que se situe l'intérêt du diagnostic sérologique de la toxoplasmose, c'est-à-dire la recherche et le dosage des anticorps spécifiques anti-toxoplasme.

- **Chez toute femme enceinte,**

Le diagnostic sérologique est réalisé en début de grossesse afin de savoir si elle est "protégée" ou non contre la toxoplasmose. En effet, s'il existe des anticorps (concerne 70 % des femmes en âge de procréer) cela reflète une ancienne infection et donc pratiquement aucun risque de transmission au bébé. Dans le cas contraire, des mesures de précaution doivent être prises pour ne pas contracter la maladie pendant la grossesse (consommation de viande bien cuite, attention aux chats qui transmettent le parasite) et une surveillance sérologique sera effectuée tous les mois jusqu'à la fin de la grossesse. Un prélèvement de liquide amniotique peut être parfois effectué pour diagnostiquer une infection chez le fœtus.

- **Chez un sujet immunodéprimé** (patient séropositif, transplanté, sous chimiothérapie...),

Une toxoplasmose peut se manifester avec des complications graves. Une réactivation d'une ancienne toxoplasmose est également possible, d'où l'intérêt de surveiller les taux d'anticorps chez ces patients. Un diagnostic sérologique sera demandé si la personne présente des symptômes évoquant une infection oculaire ou cérébrale qui peut évoquer une infection à toxoplasme.

- **Chez un transplanté,**

Les kystes inclus dans l'organe du donneur, alors que le receveur est séronégatif pour la toxoplasmose, peuvent entraîner un rejet du greffon et une infection parasitaire classique.

3. Diagnostic sérologique de la toxoplasmose

Le diagnostic est posé grâce à la recherche d'anticorps, qui témoignent que l'organisme a été exposé à la maladie : les immunoglobulines dites "Ig M" et "Ig G".

- Les IgM permettant de dépister des infections récentes sont au maximum dans les premières semaines après l'infection et régressent rapidement, classiquement en moins de quatre semaines. Toutefois, avec les techniques d'immunocapture, les IgM persistent 6 à 12 mois, voire plus après la conversion. Les IgG atteignent leur maximum en 2 à 3 mois, restent en plateau quelques mois, puis régressent sans disparaître complètement.
- Le diagnostic de toxoplasmose aiguë repose sur l'observation de l'ascension significative du titre des IgG en 3 à 4 semaines d'intervalle, associée à la présence d'IgM. Lorsque la réponse d'IgG atteint la phase en plateau, il est impossible de dater précisément le début de l'infection par les techniques sérologiques.
- Les tests d'avidité des IgG permettent la datation des séroconversions. Une forte avidité permet l'exclusion d'une infection récente (datant de moins de quatre mois). Ces tests sont particulièrement utiles chez la femme enceinte.
- Chez l'immunodéprimé, le dosage des IgG est peu sensible pour poser le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive. Une étude récente a montré l'intérêt du dosage des IgE dans le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive. Le dosage des IgM par la méthode ELISA est aussi efficace pour différencier une toxoplasmose infection d'une toxoplasmose active chez l'immunodéprimé.

4. Interprétation des résultats du diagnostic sérologique

En fonction des résultats, on pourra déterminer le diagnostic d'infection et son ancienneté.

Tableau III. Détermination du diagnostic d'infection et son ancienneté.

IgM	IgG	Commentaires
Négative	Positive	Infection ancienne. La personne a été contaminée plus de 6 mois avant l'analyse.
Négative	Négative	Pas d'infection ou infection très récente. Le patient est séronégatif.
Positive	Négative	Infection récente. Chez le nouveau-né, cela indique une infection congénitale
Positive	Positive	Infection chronique. Réactivation d'infection. Parfois, les IgM peuvent être positifs plusieurs mois après la fin de l'infection. Cela veut dire que le malade a été contaminé moins de six mois avant l'examen (on parle de primo-infection ou infection récente).

- Pour les cas douteux, un deuxième dosage après 2 à 3 semaines permet, en fonction de l'évolution des taux, de comprendre l'évolution de l'infection.

Références

- Agut H., Boutolleau D., Burrel S. Diagnostic virologique. *EMC - Maladies infectieuses*, 2014; 11: 1-8.
- Bessières M.H., Linas M.D., Cassaing S. Intérêt et limites du diagnostic sérologique des mycoses. *Revue Française des Laboratoires*, 2004; 366: 61-67.
- Collet C., Simonney N., Honoré-Bouakline S., Wargnier A., Lagrange P.H., Hermann J.L. Tuberculose et diagnostic rapide : avancées ou échecs ?. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*, 2003; 18: 283-288.
- Coons AH., Creech HJ., Jones RN., Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol*, 1942 ; 45:159-170.
- Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971; 8: 871-874.
- Grangeot-Keros L. Intérêt et limites de la sérologie dans les infections virales. *Revue Française des Laboratoires*, 2004; 366: 45-50.
- Gruber M., Durhs HE. Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Cholera vibrio und des Typhusbacillus. *MUnch. med. Wochschr*, 1896; 43: 285-286.
- Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zbl Bakt*, 1900; 27: 357-362.
- Ling CM., Overby LR. Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmunoassay with 125 I-antibody. *J. Immunol.*, 1972; 109: 834-841.
- Roux V., Rolain J.M. Identification des bactéries par biologie moléculaire. *EMC-Maladies infectieuses*, 2014; 11: 1-11.
- Snyder LR., Kirkland JJ. *Introduction to the Modern Chromatography, 2nd ed.*, John Wiley and Sons, 1979.
- Sophie B., Jean-Philippe B., Dominique C. Diagnostic au laboratoire des mycoses profondes. *Revue Française des Laboratoires*, 2004; 359: 33-39.
- Taoudi N.D., Maslin J., Dubrous P., Garnotel E. Apports et limites des sérologies bactériennes en pathologie infectieuse. *Revue Française des Laboratoires*, 2004; 366: 37-43.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1979; 76: 4350-4354.

- **Sites internet**

- http://www.doctissimo.fr/html/sante/analyses/sa_750_smose.htm.
- http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%2024.htm.
- <http://www.djamiatic.net/immuno/chapitre%203.html>.
- <http://www.technobio.fr/article-18589062.html>.
- <http://www.anticorps-enligne.fr/resources/17/1224/test-de-western-blot-immunotransfert-electrophorese-de-proteines-sur-gel/>.
- <http://www.cours-medecine.info/>.