

VIROLOGIE

UNIVERSITE DE COCODY



UFR Sciences Pharmaceutiques

VIROLOGIE VIROLOGIE

PR. LOUKOU Guillaume
Dr OUASSA Timoté

Dr KOUAME Désiré CONCEPT

COURS DE VIROLOGIE

A/ - DEFINITION STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES VIRUS (14 Pages)

I/ - EVOLUTION DU CONCEPT DE VIRUS

- Protistes supérieurs: Eucaryotes - P. inférieurs: Procaryote - Connaissance des maladies virales

II/ - CARACTERE DE DEFINITION DES VIRUS

III/ - ANATOMIE GENERALE DES PARTICULES VIRALES

IV/ - TECHNIQUES D'ETUDE DES VIRUS

- 1/ - Technique d'ombrage: coloration négative de Brenner et Horne
2/ - Technique de diffraction des rayons X
3/ - Autres techniques : ultracentrifugation, électrophorèse, techniques biologiques et immunologiques

V/ - STRUCTURE DES VIRIONS

- 1/ - Les Acides nucléiques viraux (ADN et ARN)
2/ - Les Capsides des virus à symétrie cubique, hélicoïdale et mixte
3/ - Les Enveloppes

VI/ - CLASSIFICATION DES VIRUS

B/ - LES METHODES D'ETUDE DES VIRUS (26 Pages)

I/ - METHODES PHYSICOCHIMIQUES :

- 1/ - Etudes structurales : taille, morphologie, composition 2/ - Diagnostic rapide

II/ - METHODES BIOLOGIQUES :

II. A/ - Isolement viral:

- 1/ - Animal de laboratoire 2/ - Oeuf embryonné de poules
3/ - Cultures cellulaires: cellules 1^{ères}, diploïdes et, hétéroplloïdes 4/ - Conditions de culture

II. B/ - Identification :

- 1/ - Méthodes approchées : a/ Animal de laboratoire b/ Oeuf embryonné
c/ Culture cellulaire: * E.C.P.* Modif membrane * Interf. virale
2/ - Méthodes spécifiques d'identification : Ag. Viraux - Antigénicité
3/ - Titrage

C/ - MULTIPLICATION DES VIRUS (10 Pages)

I/ - METHODES D'ETUDE (4)

II/ - LES PRINCIPALES ETAPES (5)

- A/ - Adsorption, Pénétration et Décapsidation^o
B/ - Phase d'éclipse : 1/ - Caractères des virus à ADN (+++) 2/ - Caractères des virus à ARN
C/ - Assemblage des constituants et Maturation D/ - Formation d'enveloppe E/ - Libération

III/ - MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES

- 1/ - Infection lytique avec les phages virulents : a/ - M. des phages à ARN b/ - Phages à ADN
2/ - Infection non lytique ou lysogémisation

D/ - INFECTION VIRALE : DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT

D. I / - INFECTION VIRALE

I/ - ENTREE DU VIRION DANS L'ORGANISME

II/ - DIFFUSION DE L'INFECTION

- 1/ - Diffusion localisée: Incubation courte 1-3 Jours.
2/ - Diffusion par voie sanguine: I. longue 10-14 J (5 étapes.) 3/ - Infections inapparentes
4/ - Infections latentes et récurrentes 5/ - Inf. à évolution lente 6/ Inf. transformantes

III/ - LES DEFENCES DE L'ORGANISME (4)

D.II / - DIAGNOSTIC

D.III / - TRAITEMENT

DEFINITION STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES VIRUS

I/ - EVOLUTION DU CONCEPT DE VIRUS

Dans le monde vivant il y a trois (3) règnes: le règne animal, le végétal et, celui des protistes.

- **HAECHEL** en **1866** définit les « **protistes** » cômme étant des êtres unicellulaires ou pluricellulaires qui ne forment pas de tissus différenciés.

- **CHATTON** en **1937** sépare les protistes en deux grands groupes : les protistes supérieurs appelés « **eucaryotes** » ou cellules à noyau et, les protistes inférieurs appelés « **procaryotes** ».

- **Les Protistes supérieurs ou Eucaryotes** : ce sont les «*champignons, les protozoaires et les algues sauf les algues bleues*». Ils sont caractérisés par un vrai noyau entouré d'une membrane périnucleaire, dotés de chromosomes dont la division se fait par «mitose».

Le cytoplasme est entouré d'une membrane cytoplasmique à double feuillet et, doté de tous les organites: ribosomes, mitochondries, reticulum endoplasmique, ARN soluble, liposome ...

- **Les Protistes inférieurs ou Procaryotes** sont : «*les schizomycètes ou bactéries, les algues bleues ou cyanophycées*». Le matériel génétique constitué par un ADN monocaténaire qui remplace le noyau. Il n'y a pas de membrane nucléaire ni, de mitochondrie.

La division se fait par «scissiparité». La paroi est constituée de peptidoglycane

- **Les « Virus »** sont donc définis comme une entité à part, l'on dit qu'un virus est un virus. Ce sont des fluides vénéreux constitués d'acide nucléique associé à des protéines qui donnent une nucléocapside nue ou enveloppée.

- CONNAISSANCES SUR LES MALADIES VIRALES

- 2500 ans avant Jésus - Christ: description de la variole en Chine

- 2000 ans avant Jésus - Christ : description de l'encéphalite par les Japonais

- **1796** : **JENNES** développe la vaccination antivariolique.

- **1881**: **PASTEUR** réalise des travaux sur la rage avec la mise au point d'un vaccin

- **1892** : **IWASNOSKI** travaille sur le virus de la mosaïque du tabac

Ces maladies sont dues à des «**agents ultrafiltrables**» qui traversent les filtres réputés pour arrêter les bactéries. Ce sont donc des agents de taille inférieure aux bactéries et, non observables au microscope photonique ordinaire d'où l'appellation «d'inframicrobes», d'ultravirus, d'antigènes invisibles, transmissibles, filtrables.

- **1915**: **TWORT** décrit des virus qui infectent les bactéries appelés « **bactériophages** »

- **1934**: Découverte du microscope électronique avec de meilleures connaissances de la structure virale

- **1936**: Etablissement de la «nature chimique» des virus au niveau de l'ADN

- **1953**: Définition du virus.

De nos jours les virus sont connus pour être à l'origine de plusieurs affections allant, des affections bénignes telles le «rhume», aux plus graves comme la «poliomyélite». D'autres sont issues des états particuliers, telle la grossesse avec la «rubéole» qui induit des malformations. Certaines sont douées d'une action transformante comme les cancers et, les affections immunologiques issues des «rétrovirus».

II/ - CARACTERES DE DEFINITION DES VIRUS : (André LWOFF / 1953)

Jusqu'en 1953, l'on avait une absence de critères nets pour définir les virus, c'est André LWOFF qui en s'inspirant des travaux sur les bactériophages va définir un certain nombre de critères.

Les Virus sont des entités dont le génome est un acide nucléique (ARN ou ADN) qui se reproduisent à l'intérieur de cellules vivantes et, qui utilisent les machineries de synthèse de ces cellules pour en faire la synthèse des virions qui contiennent le génome viral et les transfèrent à d'autres cellules.

Les critères de définition de **LWOFF** et, énoncés par **LURIA** en 1967 sont :

1/ - Un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et, qui constitue le génome viral

2/ - La reproduction se fait par la «réplication du génome» et, diffère de la scissiparité

3/ - Le virus manifeste un «parasitisme intracellulaire absolu». Les virus sont des parasites obligatoires des cellules car, dépourvus de métabolisme propre. Ils ne possèdent ni noyau, ni de cytoplasme donc aucune source d'énergie, ni d'enzymes métaboliques.

Ils ne peuvent se multiplier qu'au sein d'une cellule vivante dont ils détournent à leur profit, les mécanismes de synthèse protéique: système ribosomial, ARN de transfert ...

Les virus n'ayant pas de métabolismes propres, ils sont donc «insensibles aux antibiotiques».

4/ - Ils possèdent une «structure particulière» bien définie constituée par: un acide nucléique protégé par un microcoque protéique appelé: «**capside**». L'arrangement de l'acide nucléique et, de la capsidite fournit la «**nucléocapside**» qui définit la symétrie du virus. On va donc parler de virus à : symétrie cubique: poliomyélite, à symétrie hélicoïdale: grippe; et à symétrie binaire,mixte : phage

III/ - ANATOMIE GENERALE DES PARTICULES VIRALES (Cf : Schéma)

La forme extracellulaire et infectieuse du virus est le «**virion**», qui transporte le génome de cellule à cellule. Il est représenté par les acides nucléiques étroitement inclus dans des protéines appelées «**capside**» et dont l'arrangement spatial donne une symétrie cubique, hélicoïdale ou mixte.

L'ensemble: acide nucléique - capsidite constitue une «**nucleocapside**» nue ou enveloppée par un «peplos».

IV/ - TECHNIQUES D'ETUDE DES VIRUS

Après les travaux de Pasteur (rage), d'Iwasnosky (mosaïque du tabac) et de Twort; la recherche sur la structure des virus a stagné en fin de 19^{ème} siècle. L'on avait la seule utilisation de l'ultrafiltration ou la diffraction aux rayons «X». L'apport du microscope électronique fut alors déterminant avec, le développement de la technique de coloration de Brenner et Horne

1/ - Technique d'ombrage : Coloration négative de **Brenner et Horne** (1959)

C'est une coloration par le phosphotungstate de Na. Elle consiste à imprégner les virus d'une substance opaque aux électrons qui se dépose entre les motifs structuraux du virus. Elle a permis de déterminer la **taille des virus**: variant entre **10 à 350 nm** pour le plus gros et, une meilleure connaissance de la morphologie caractéristique des virus dans les préparations purifiées ou les produits pathologiques.

2/ - Technique de diffraction des rayons « X » :

Elle est utilisée pour les préparations de virus purifiés et, permet d'étudier le mode d'arrangement de la symétrie

3/ - Autres techniques :

- Ultracentrifugation
- Electrophorèse
- Techniques biochimiques: *CCM, *HPLC, *CPG, * utilisation d'enzymes de restriction
- Techniques de biologie moléculaire (PCR) pour l'étude des constituants internes
- Techniques immunologiques: deux réactifs * **1 Ag** : virus à étudier * **1 Ac** dans un sérum spécifique.

Elles mettent en jeu un antigène (virus à étudier) et en face, un anticorps obtenu chez les animaux en réaction d'innoculation de l'antigène viral.

V/ - STRUCTURE DES VIRIONS (3 Parties)

1/ - LES ACIDES NUCLEIQUES VIRAUX :

Ils renferment l'information génétique, l'on détermine par des méthodes d'étude leur nature: ADN ou ARN, leur poids moléculaire (PM), leur nature en monocaténaire ou en double chaîne, la taille, le rapport Guanine Cytosine (GC en %), leur séquence en base et, leur configuration.

a/ - Génome à ADN

- L'ADN est bicaténaire, doté de deux brins disposés souvent en double hélice (Watson et Crick)
- Chaque brin est composé d'une chaîne de « nucléotide » constituée: d'une base, un sucre (Désoxyribose) et, d'une molécule d'acide phosphorique. Ces molécules d'acides phosphoriques relient les nucléotides entre eux, par des liaisons di-esters

- Les Bases sont quatre : * 2 Puriques (*Adénine et Guanine*) * 2 Pyrimidiques. (*Thymine et Cytosine*)

Les deux brins de molécules d'ADN s'assemblent par appariement de bases **A =T** et **G =C**

- Le Poids Moléculaire (PM) varie entre **1,5 - 160 10 6** daltons. Le Phage X 174 a un petit génome de 4 à 5 gènes. Les *Poxvirus* (variole) sont dotés de 240 gènes codant, pour environ 30 polypeptides

L'ADN se présente le plus souvent sous forme «linéaire». Ex : *Herpèsvirus (Varicelle, Zona)*, *Adenovirus*, *Poxvirus*. Mais d'autres peuvent être s/f «circulaire». Ex : Hépatite B, *Papovirus*, *Oncarnavirus*. La circularisation de l'ADN va favoriser son insertion dans le génome de la cellule hôte d'où, la transformation en cellule maligne. Les virus de ce type sont dits «oncogènes», c'est à dire qu'ils induisent les tumeurs.

b/ - Génome à ARN

Il s'agit généralement d'ARN monocaténaire. Il existe des ARN viraux bicaténaires Ex : *Reovirus e,t Rotavirus*. Ils sont là en double hélice. L'Uracyle remplace l'Adénine. Il y a des virus à ARN dont le génome est plurisegmenté, avec extraction * PM = 1,5 à 15 10 6 daltons Ex : *Myxovirus, Reovirus, Rota et, Rétrovirus*. La Plurisegmentation favorise les recombinaisons génétiques.

Selon la classification de **Baltimore** on distingue les génomes ARN (+) et ARN (-) :

* **Ex ARN (+)** : *Poliovirus*, directement infectieux se comportant comme des ARN messagers, qui se disposent au niveau du ribosome en vue de la biosynthèse de protéines.

* **ARN (-)** qui ne se comportent pas comme des ARN messagers, ils doivent subir une phase de transcription sous l'influence de la «*transcriptase*» pour donner l'ARN messager.

Les génomes à ARN peuvent être linéaires ou, circulaires.

2./ - LES CAPSIDES VIRALES

La «**capside**» est une structure polymérisée formée d'un petit nombre de structures protéiques répétées un grand nombre de fois. Ce sont les «**capsomères**», ils sont maintenus entre eux, par des liaisons non covalentes et qui constituent, des unités morphologiques visibles au microscope électronique.

Elle protège l'acide nucléique contre les nucléases et, la recouvre entièrement. Les molécules polypeptidiques sont arrangées selon une symétrie cubique: icosaédrique ou, hélicoïdale.

Certains «phages T» ont une symétrie mixte ou binaire: tête cubique et, queue hélicoïdale

a/ - Virus à symétrie cubique (Icosaédrique)

Les Capsides ont la forme d'un «**icosaèdre**»: polyèdre régulier inscrit dans une sphère L'Icosaèdre possède «20 faces» égales qui sont des triangles équilatéraux unis par «30 arêtes» et «12 sommets». Il y a une symétrie dite **5 x 3 x 2** c'est à dire : * 10 axes de symétrie 3 passant par le centre de 2 faces opposées. * 6 axes de symétrie 5 passant par les sommets et 15 axes de symétrie 2 passant par le milieu des arêtes. En théorie chaque face triangle peut être divisée en triangles équilatéraux.

VIROLOGIE

La capsid est composée d'un grand nombre de capsomères, chacun étant constitué d'un ou plusieurs chaînes polypeptidiques avec leur arrangement spatial révélé par la diffraction aux rayons «X». Ces molécules constituent des unités chimiques: unités de structure qui s'arrangent en pentamères (5 sous unités) ou en hexamère (6 sous unités) et forment des capsomères.

Ils portent le nom de «**penton**» et «**hexon**» qui sont creusés d'un canal axial cylindrique. Au sommet se dispose les capsomères de type penton, au niveau des faces et arêtes les hexons.

Dans un «**icosaèdre**» il y a toujours 12 pentamères: capsomères des sommets des triangles
Le nombre de capsomère est donné par la formule de HORNE et WILDY: $N = 10 T + 2$

«**T**» correspond au nombre de triangulation spécifique d'une famille donné par Ex :

* *Poliovirus* T= 3 → $10(3) + 2 = 32$ capsomères * *Rotavirus* T = 9 → N = 92

* *Herpesvirus* T = 16 → N = 162 * *Adenovirus* T = 25 → N = 252.

b/ - Virus à symétrie hélicoïdale

Chez certains virus à ARN, les capsomères sont attachés autour de l'acide nucléique en spirale aérée. La capsid épouse la forme hélicoïdale de l'acide nucléique et sa longueur.

Dans le *virus de la mosaïque du tabac*: la nucléocapsid est **rigide**, c'est le 1^{er} virus isolé et décomposé: il est doté de 2000 sous-unités protéiques toutes identiques. Le génome est un ARN et, les sous unités protéiques s'empilent en spirale autour de l'ARN. Chacune des sous-unités porte une encoche sur la face supérieure et inférieure où va se loger le génome

Dans les virus animaux: la nucléocapsid est **flexible**, elle est soit **enroulée** sur elle-même
Ex: V. de la grippe *Myxovirus influenza* et, de la rage *Rhabdovirus*, soit en **pelotonnée**: V. de la rougeole. Les éléments de taille, diamètre, longueur de l'hélice, nucléocapsid sont les critères de classification.

c/ - Virus à symétrie mixte ou binaire

On note que certains « **bactériophages** » (Ex: **T 4** de *E. coli*) ont une structure mixte. Ils associent une **tête** de «symétrie cubique» renfermant le génome à ADN pelotonné bicaténaire et, une **queue** de «symétrie hélicoïdale». Ils sont terminés par une «plaque basale» de section hexagonale ayant une extrémité de crochets qui vont permettre la fixation du virus sur paroi bactérienne. Il y a ensuite une contraction du manchon et, le tube pénètre dans le cytoplasme de la bactérie où l'ADN va être injecté.

Cf: Schéma virus à symétrie hélicoïdale * VMT * V *Myxovirus influenza*

Cf: Schéma virus à symétrie binaire * *Bactériophage T4*

3/ - LES ENVELOPPES VIRALES : PEPLoS

Certains virus sont entourés d'une enveloppe ou «**peplos**» formée d'unités de structures morphologiques: les peplomères. Les enveloppes sont complexes, dotées d'une protéine de membrane interne sous jacente à une couche externe complexe de nature glucido-lipidoprotéique.

Elles sont dégradées par les solvants des graisses (lipides): ether, sels biliaries: elles sont donc «fragiles» et, ne peuvent pas être isolés des selles ou fèces. Ex: *Virus de la grippe*, *Herpesvirus*. Ils sont différents des virus non enveloppés comme les *Poliovirus* non fragiles et donc éliminés par les selles

Ces enveloppes sont issues de la membrane perinucleaire, réticulaire, cytoplasmique selon le lieu de multiplication: le noyau pour les virus à ADN et, le cytoplasme pour les virus à ARN.

Elles vont subir des modifications et certaines portent des «**spicules**» dotées d'un rôle important dans l'immunité. Ex : le virus de la grippe a des spicules d'hémagglutinine: protéine d'information virale codée par le génome ou, des spicules de neuraminidase.

VIROLOGIE

- Les *Poxvirus* : virus de la variole sont à structure complexe de grande taille 350 nm, la nucléocapside hélicoïdale est incluse dans un «core» en forme de lentille ou de diabololo qui est entouré d'amas protéique formant des corps latéraux. L'ensemble est entouré d'une double membrane (Cf : Schéma de *Poxvirus*)

- Certains virus du règne végétal sont dotés d'acides nucléiques nus, sans capsid de protection: ce sont les «**viroïdes**»

- Chez l'homme ou les animaux: les agents du KURU, maladie de Creutzfeld-Jacob, tremblote du mouton ou l'ESV chez vache folle ont une structure mal connue ce sont des **virus lents**

VI - CLASSIFICATION DES VIRUS : André LWOFF, HORNE et TOURNIER (1962)

C'est en 1962 qu'une classification générale des virus sera établie sur des bases rationnelles: **Classification LHT**: Lwoff, Horne et Tournier qui choisissent un certain nombre de critères physicochimiques pouvant servir de critères de différenciation, ils vont en choisir un petit nombre:

- la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN)
- le type de symétrie de la nucléocapside
- la présence ou non d'une enveloppe
- le nombre de capsomères chez les virus à symétrie cubique ou, le diamètre de la nucléocapside chez les virus à symétrie hélicoïdale.

Avec le développement des méthodes d'étude, de nouveaux critères ont été ajoutés

- le nombre de brins de l'acide nucléique
- la division éventuelle en fragment
- la masse moléculaire totale ...

Depuis 1966 et mieux 1974, le Comité International de Taxonomie Virale: «**ICTV**» reconnaît une trentaine (**30**) de familles virales dont vingtquatre (24) qui affectent les végétaux.

* La famille est caractérisée par le suffixe «**viridae**»

* La sous famille est caractérisée par le suffixe «**virinae**»

* Le Genre est caractérisé par le suffixe «**virus**»

A/ - VIRUS A ADN :

1/ - Symétrie cubique:

* **Virus nu:** *Adenovirus / Papovavirus* * **Virus enveloppé:** *Herpesvirus./ Iridovirus*

2/ - Symétrie hélicoïdale

3/ - Symétrie complexe: * **Virus enveloppé :** *Poxvirus*

B/ - VIRUS A ARN :

1/ - Symétrie cubique:

* **Virus nu:** *Picornavirus (Poliovirus) / Reovirus*

* **V. enveloppé:** *Togavirus* (Fièvre jaune)

2/ - Symétrie hélicoïdale :

* **Virus enveloppé :** *Orthomyxovirus / Rhabdovirus*

3/ - Symétrie complexe :

* **Virus enveloppé :** *Retroviridae*

CLASSIFICATION DES VIRUS :
CAS DE QUELQUES VIRUS RENCONTRES EN PATHOLOGIE HUMAINE

Acide Nucléique	Symétrie de la Nucléocapside	Présence d'une Enveloppe	FAMILLE	GENRE	ESPECE
ADN	Hélicoïdale	Oui	Poxviridae	Orthopoxvirus	V. de la variole V. de la vaccine
		Non	Phage		
ADN	Cubique	Oui	Herpesviridae	Herpesvirus (162 Capsomères: 150 hexons / 12 pentons)	Herpes Simplex HSV Varicelle Zona VZV Cytomégalovirus CMV Epstein Barr EBV
ADN	Cubique	Non	Papavoriridae Adenoviridae	Papillomavirus Adenovirus	V. des Papillomatoses
		Oui	Hepadnaviridae		
ARN	Hélicoïdale	Oui	Orthomyxo - viridae	Infuenzavirus	V de la grippe A,B,C
		Oui	Paramyxo - viridae	Paramyxovirus Pneumovirus Morbillivirus	Virus Ourlien V. Respi. Syncytial V. Morbilleux
		Oui Non	Rabdoviridae Phage	Lyssavirus	V. Rabique
ARN	Cubique	Non	Picornaviridae	Enterovirus	Poliovirus Coxsackievirus Enterovirus V. Hépatite A / VHA
ARN	Cubique	Oui	Togaviridae	Flavivirus Alphavirus Rubivirus	V. Amarile V de la Dengue V. Rubéolique
		Oui	Retroviridae	Lentivirus	VIH

** ADK 10/04 ADK / 10 / 01 **

LES METHODES D'ETUDE DES VIRUS

INTRODUCTION

I/ - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

A/ - ETUDES STRUCTURALES

- 1/ - Etudes pour la détermination de la taille des Virus
- 2/ - Etudes pour la détermination morphologique
- 3/ - Etudes pour la détermination de la composition

B/ - DIAGNOSTIC RAPIDE

II/ - METHODES BIOLOGIQUES

A/ - L'ISOLEMENT VIRAL

- 1/ - L'animal de laboratoire
 - 2/ - L'œuf embryonné de poules (**Good Pasture 1935**)
 - 3/ - Les cultures cellulaires (**Enders 1949**)
- a/ - Cellules primaires ou de 1^{ère} explantation b/ - Cellules diploïdes
c/ - Cellules de lignée continue ou hétéroplôïdes
4/ - Les conditions de culture

B/ - L'IDENTIFICATION VIRALE

1/ - LES METHODES APPROCHEES

- a/ - L'animal de laboratoire
 - b/ - L'œuf embryonné de poules
 - c/ - Les cultures cellulaires
- * Effet cytopathique (E.C.P.): Ex : *Poliovirus* / *Herpesvirus* / *Paramyxovirus* / *Adenovirus*.
* Modification de membrane : * Hémadsorption * Hémagglutination * Interférence virale

2/ - LES METHODES SPECIFIQUES D'IDENTIFICATION VIRALE

- a/ - Rappel sur la structure des virus
- b/ - Antigènes viraux - Antigenicité: Ag. capsidiques * Ag. solubles * Ag membranaires

C/ - TITRAGE DES VIRUS

- Les principales méthodes spécifiques : résumé

Les réactions immunologiques vont mettre en jeu l'antigène **Ag** = Virus à identifier et l'anticorps **Ac** = Immunosérum spécifique obtenu ap d'animaux inoculés par le Virus. Les sérums de référence viennent d'animaux immunisés

1/ - Réaction de Neutralisation de l'ECP : Effet CytoPathologique. **Ex PolioVirus, EnteroVirus**

Les Ac spécifiques vont se fixer de manière sélective sur les Ag présents à la périphérie des virus, les masquent et empêchent le virion de pénétrer dans la cellule sensible

2/ - Réactions de fixation du complément : « **RfC** » : ce sont des réactions d'hémolyse

Ag = Virus inconnu + Ac dirigé contre le virus + Complément (Formation d'un complexe Ag-Ac → Lyse des cell) + Système hémolytique : Globules rouges de Mouton + Anti-GR Mouton

3/ - Réaction d'inhibition de l'hémagglutination 4/ - Réaction d'inhibition de l'hémadsorption

5/ - Réaction d'Immunofluorescence *« IFD »/*« IFI » AG -Ac + Flurochrome → couleur donnée

Ex: Isothiocyanate de Fluorescéine (FITC) → Verte / Rhodopsine → Rouge

6/ - Réaction ImmunoEnzymatique : ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Même principe que IFI mais, la substance révélatrice est une enzyme. La révélation se fait par l'addition d'un substrat qui pourra fournir un leucodérivé coloré

7/ - Autres Réactions : * Immunodiffusion * Electrosynerase * RadioImmunoAssay (RIA)

LES METHODES D'ETUDE DES VIRUS

- INTRODUCTION

Le but de ces méthodes est l'étude structurale, la biologie et le diagnostic des affections occasionnées par les virus.

- **PASTEUR** en **1884** réalise des travaux sur le virus de la rage, qui permettent l'obtention d'un vaccin à partir d'inoculation d'animaux.

- **IVANOSWSKY** en **1892** puis, **LOEFFLER** et **FROSCHE** en **1898** et **PASTEUR** démontrent l'ultrafiltrabilité des virus, c'est le cas du virus de la rage, la mosaïque du tabac, la fièvre aphteuse.

- **GOOD PASTURE** en **1935** réalise des travaux sur l'oeuf embryonné de poule comme support.

- **ENDERS** et **Coll.** en **1949** font un grand bond avec le développement de la culture cellulaire. C'est une propagation de cellules vivantes «in vitro»: un véritable tournant de la vaccinologie.

- **LWOFF** en **1953** permet la définition des virus, par des critères de classification notamment le fait qu'ils manifestent un parasitisme intracellulaire, qu'ils sont sans métabolisme propre ...

- **BRENNER** et **HORNE** en **1959** développent la «technique de coloration négative» pour l'observation des virus au microscope électronique.

- **LWOFF, HORNE** et **TOURNIER (LHT)** en **1962** permettent la classification des virus selon des critères physiologiques, chimiques bien définis.

I/ - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

A/ - METHODES UTILISEES POUR LES ETUDES STRUCTURALES

1/ - Etudes pour la détermination de la taille des virus :

- Ultrafiltration - Ultracentrifugation - Technique de diffraction aux rayons «X»
- Microscopie électronique qui établit la taille des virus comprise entre **15 - 350 nm** (*Poxvirus*)
- Technique de coloration négative de Breiner et Horne en 1959

2/ - Etudes pour la détermination de la morphologie:

- Microscopie électronique - Diffraction aux rayons « X »

3/ - Etudes pour la détermination de la composition chimique: protéines, acides nucléiques...

- Technique de chromatographie sur couche mince (CCM) - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- HPLC - Electrophorèse en gel (séparation des protéines) - Enzyme de restriction (acides nucléiques)

B/ - DIAGNOSTIC RAPIDE

- Microscopie électronique: diagnostic différentiel de variole, la vaccine et la varicelle : *Herpesvirus*
- Identification des roues utilisée pour le diagnostic des gastroentérites infantiles à *Rotavirus*
- Diagnostic rapide des *Adénovirus* dans les affections respiratoires par «**IME**» : Immuno-Microscopie Electronique. Le principe est basé sur la mise au point d'une préparation virale (**Ag**) et d'un immun serum (**Ac**) dirigé contre le virus, qui va induire la formation d'amas de virus facilement observable au microscope électronique.

II/ - METHODES BIOLOGIQUES

A/ - L'ISOLEMENT VIRAL

Le virus n'a pas de métabolisme propre, c'est un «parasite obligatoire» d'où la nécessité d'un système cellulaire vivant pour réaliser son isolement.

1/ - L'animal de laboratoire

- * Le «**singe**» pour les *Poliovirus* * Le «**furet**» pour le virus de la grippe
- * **Pasteur** travaille sur le «**cerveau de lapin**» pour atténuer le virus de la rage
- * L'on a les «**sourisseaus** » nouveaux - nés pour les *Arbovirus*. Le «**hamster** » pour les *Adenovirus*

2/ - L'oeuf embryonné de poules (GOOD PASTURE en 1935)

Ce sont des oeufs de 10 à 11 jours, l'inoculation est réalisée soit par la paroi chorioalantoïdienne soit, par le sac vitelin ou l'amnios. On utilise des «œufs de poules *Leghorn*» obèses qui pondent des œufs blancs de coques plus fines et, dotées d'un avantage: le «mirage»
Comme principe: l'on éclaire l'œuf latéralement avec la lumière et, l'on peut voir l'intérieur de l'œuf

3/ - Les cultures cellulaires

Elles sont réalisées par **ENDERS** en **1949**, ce qui a permis la mise au point des vaccins.

a/ - Les cellules primaires ou de primoculture issues de la digestion enzymatique de tissus animaux. Une multiplication à l'étuve fournit par repiquage limité : un tapis continu.

Exemples : * Cellules de rein de singe * Cellules embryonnaires

b/ - Les cellules diploïdes: elles sont issues de plusieurs repiquages possibles allant à cinquante (50)

Ex : * Cellules de WI 38 * Cellules MARC 5

c/ - Les cellules de lignée continue ou hétéroplœides : à caryotype anormal avec une absence de phénomène d'inhibition de contact. Elles sont issues des cultures d'épithélium humain

Ex : * Cellules Hela: issues du carcinome du col de l'utérus ou, d'origine animale (Ex : Vero, MA-104)

4/ - Les conditions de culture

Un certain nombre de conditions sont nécessaires pour le développement des cellules «in-vitro»: milieux spéciaux de culture, récipients, température d'incubation ...

- **Les milieux de culture:** milieux tamponnés pour éviter les grandes variations de pH, ils sont dotés d'éléments essentiels (vitamines, sels minéraux, sucre et sérum de veau), d'antifongiques, d'antibiotiques ... La stérilisation se fait par «filtration».

- **Les récipients :** sont en verre neutre non toxique ou, en plastique spécialement traité.

Les cultures sont réalisées dans des tubes ou boîtes à base plate. L'on travaille en atmosphère rigoureusement stérile sous des hottes à flux laminaire et, les salles sont dotées de lampes à ultra-violet (UV) germicides.

L'incubation se fait à «**37°C**» avec un démarrage en atmosphère de 5 à 10 % de CO₂

B/ - L'IDENTIFICATION VIRALE

1/ - LES METHODES APPROCHEES

Ce sont des modifications morphologiques ou physiologiques observées sur l'animal, l'œuf ou, la culture cellulaire.

a/ - L'animal de laboratoire : inoculé avec un virus donné, on peut observer soit, la mort de l'animal soit, une paralysie du train postérieur de l'animal.

b/ - L'œuf embryonné de poule :

- Dans le cas des *Poxvirus*, on observe des modifications caractéristiques sur la membrane chorioallantoïdienne par des pustules blanches. Dans le cas du virus de la grippe, l'on note la présence de l'antigène (Ag) par «l'hémagglutinine» au niveau du liquide amniotique.

c/ - Les cultures cellulaires (C.C.) : caractérisées avec plusieurs effets et phénomènes

c.1./- Effet cytopathologique «ECP» : modification morphologique avec dégénérescence des cellules

* **Exemple 1 : *Enterovirus, Poliovirus*** (virus à ARN nu)

- **Etat frais**: destruction du tapis cellulaire, avec à la place des cellules réfringentes, des restes de conjonctive

- **Après coloration à hématine éosine**: multiplication dans la cellule entraînant une grosse inclusion cytoplasmique eosinophile, qui repousse le noyau contre la membrane cytoplasmique.

C'est un caractère essentiel car les *Poliovirus* sont à ARN, se repliquant dans le cytoplasme bourré.

* **Exemple 2 : *Adenovirus*** (virus à ADN nu)

- **Etat frais**: aspect en «gruyère» ou de dentelle, les cellules sont détachées du support

- **Après coloration à l'éosine**, l'on observe une inclusion nucléaire: le nucléole qui est respecté, l'ensemble donne alors un aspect de «fleur de marguerite».

* **Exemple 3 : *Herpesvirus*** (virus à ADN enveloppé)

- **Etat frais**: aspect en «grappe herpétique» ou lacher de ballon; cellules arrondies et ballonisées

- **Après coloration**: le noyau et la chromatine sont marginés avec, une inclusion nucléaire rouge.

* **Exemple 4 : *Paramyxovirus, Rétrovirus*** (virus à ARN enveloppé)

- **Etat frais**: fusion des cytoplasmes cellulaires, l'on a de grandes cellules polynucléaires: «syncytium»

- **Après coloration**: l'on a le cytoplasme doté de 10 à 50 noyaux avec, une inclusion eosinophile

c.2./- Phénomènes de modification de membrane : HémodSORption et HéMAGglutination

- **Le phénomène d'hémodSORption**: c'est un phénomène précoce produit au bout de quelques heures quand, un virus synthétisant les glycoprotéines d'information virale est encore en position intracellulaire. Ces glycoprotéines sont issues des hémagglutinines et, synthétisées à la surface des cellules infectées. Quand on additionne des globules rouges à la surface des cellules infectées, ces globules sont adorbés sous forme de «rosette» par l'intermédiaire des hémagglutinines virales : on parle alors «d'hémodSORption».

- **Le phénomène d'héMAGglutination**: il s'observe avec les virus dotés d'une hémagglutinine au niveau des glycoprotéines de surface: virus de la grippe, rubéole. Il se produit avec le virus extracellulaire. C'est un phénomène moins rapide que l'hémodSORption. Quand on met le virus extracellulaire avec les globules rouges, l'on a la formation un réseau entre les hématies et les virus qui possèdent une hémagglutinine. La «réaction est positive» quand, au fond du tube ou de la cupule, il existe un «virus hémagglutinisant». Elle est «négative» quand l'on a plutôt un «bouton d'hématies».

c.3./ - Phénomène d'interférence virale: il est fréquent chez le virus de la rubéole

Lorsqu'il infecte une cellule, il n'y a pas d'effet cytopathique produit. Pour mettre en évidence la présence du virus, l'on surinfecte les cellules avec un autre virus cytopathogène (EX : *Echovirus 11*)

Si le virus de la rubéole est présent dans la cellule, l'on n'observe pas d'effet cytopathologique. Dans le cas contraire, avec *Echovirus 11*: Enterovirus de même type que les Poliovirus; l'on a un ECP. L'absence d'ECP lorsque la cellule est déjà infectée par un 1^{er} virus, est due à la synthèse d'une substance antivirale «l'interferon» qui empêche la surinfection par *Echovirus 11*

2/ - LES METHODES SPECIFIQUES D'IDENTIFICATION VIRALE

Elles vont permettre la recherche de l'identité d'un virus inconnu, ce sont des méthodes appliquées à la recherche et au dosage des anticorps (Ac) présents dans le sang du patient, elles sont liées aux «réactions immunologiques» mettant en jeu: un antigène (Ag) et un anticorps (Ac) issu du sérum du patient ou, d'un immunosérum spécifique.

**** MECANISME DE BASE DE LA REACTION IMMUNOLOGIQUE**

Les macrophages captent l'Ag. et induisent une communication avec les lymphocytes T (LT) d'où, leur stimulation et l'induction de la communication avec les lymphocytes B (LB) qui se différencient pour donner les «plasmocytes»: cellules spécialisées pour la synthèse d'Ac. spécifiques de l'Ag. ayant pénétré l'organisme et gardé en mémoire.

L'accrochage «Ac-Ag» constitue la réaction immunologique primaire.

a/ - RAPPEL : structure des virus (Cf Schéma)

Selon **Lwoff**, le virus possède une structure particulière bien définie constituée par un acide nucléique, une coque protéique : protéine du core et, pour certains une enveloppe.

On peut noter: les protéines de la capsidie, les glycoprotéines de membrane ...

b/ - ANTIGENES VIRAUX: *Ag capsidiques * Ag d'enveloppe * Ag membranaires

1/- Antigènes capsidiques:

Ce sont les protéines constitutives de la capsidie et, les protéines internes associées au génome Ex : *Myxovirus influenzae*: virus de la grippe, on observe des nucléoprotéines, des polymérase ou protéines internes associées à la capsidie. La nucléoprotéine et les protéines de membranes constituent les «antigènes (Ag) internes» qui sont peu immunogènes.

Les anticorps (Ac) dirigés contre les antigènes internes ne sont pas neutralisants, sans signification protectrice. Ils fixent le complément ou, réagissent en immunodiffusion simple ou double, ce sont des «anticorps (Ac) de diagnostic» utilisés pour caractériser le virus.

2/- Antigènes d'enveloppes:

Ils sont plus complexes, les fractions glucidiques et lipidiques sont associées à des motifs protéiques. Ils n'existent que dans les virus enveloppés.

Ce sont les antigènes (Ag) de l'hôte spécifique du substrat cellulaire où le virus s'est multiplié, ils élaborent des anticorps (Ac) neutralisants qui fixent le complément. En plus de ces antigènes (Ag.) constitutifs il faut ajouter deux autres élaborés par la cellule infectée et dont la synthèse est dirigée par le genome viral: les antigènes (Ag) solubles et membranaires. Ils sont dits solubles car ce sont des protéines synthétisées mais non intégrés aux virions fils et qui vont subsister dans la cellule et passer dans le milieu extérieur après la lyse cellulaire.

3/ - Antigènes membranaires :

Ils confèrent à la cellule un comportement différent de la cellule normale, ils caractérisent les phénomènes d'hémasorption et d'hémagglutination

* **Hémagglutinine (HA)**: très immunogène, provoque élaboration d'Ac. inhibant l'hémagglutination Et, neutralise le pouvoir infectieux du virus, ce sont des anticorps. à signification protectrice

* **Neuraminidase (NA)**: non immunogène, elle fournit des anticorps (Ac.) non neutralisants mais qui ont la propriété de diminuer la taille et nombre de plages formés par les virus en culture cellulaire.

Tous les Ag. vont synthétiser des anticorps (Ac.) par le système immunocompétent, mais l'on a la possibilité de synthèse après une infection expérimentale chez un animal ou par vaccination.

PS / - Les acides nucléiques ne sont pas antigéniques

c/ - **TITRAGE DES VIRUS :** * Méthode de plages et, méthode de Reed et Muench

Pour identifier le virus isolé et pour doser les «Ac.» dans le sang du malade, on a besoin de connaître le «titre du virus». Et selon le virus, le titrage sera effectué soit sur un animal de laboratoire, soit sur un oeuf embryonné ou sur une culture cellulaire.

1/ - Méthode de Plages

- Dans un 1^{er} temps on réalise des dilutions en série dans des tubes à hémolyse stériles, on ajoute 1,8 ml de milieu dans chaque tube et, 0,2 ml de suspension virale. On réalise à partir de la 1^{ère} dilution au 1/10 ; des dilutions logarithmiques en passant 0,2 ml de tube en tube

- On dispose de boîte de Petri ou flacon de culture cellulaire doté d'un tapis de cellules confluentes (plus le virus est concentré, plus la nappe sera détruite)

On rejette le milieu et on inocule ces cellules avec 1 ml de chaque dilution.

- On laisse en contact 1 heure à 37°C puis on rejette la suspension virale et on coule sur chacune des boîtes un milieu doté de gélose et du rouge neutre (colorant vital non toxique)

- Après emballage avec du papier aluminium, on laisse incuber à 37°C pendant 4 jours, quand les cellules sont vivantes elles sont colorées en rose.

Interprétation :

* à la dilution 10⁻⁷ la nappe cellulaire est intacte, il n'y a plus de particules virales.

* à la dilution 10⁻¹, toutes les cellules sont lysées et la surface de la culture est incolore, ensuite on voit apparaître de 10⁻² → 10⁻⁵ des cellules vivantes et colorées. En présence des plages de lyse, les cellules sont mortes donc il y a eu multiplication virale, on considère qu'à 10⁻⁶, il ne reste que 3 particules virales. Un virus va donc donner une plage de lyse à 10⁻⁶.

Le Titre sera «T» : Nombre de plage X Inverse de dilution → 3 X 1/10⁻⁶ UFP

2/ - Méthode de Reed et Muench

Elle va exprimer le titre en Dose Infectieuse Cytopathique (DICT) 50% sur le nombre de jours L'effet cytopathique et les autres méthodes approchées d'identification virale ont donné une orientation vers un groupe de virus donné Ex : Les *Enterovirus* et les *Poliovirus* ont leur ECP constitués par des cellules réfringentes, les nappes sont détruites avec des restes de conjonctives L'on va par la suite identifier les virus par des méthodes immunologiques, il suffira de rechercher parmi une gamme de sérums connus: le serum qui neutralise le pouvoir infectieux du virus, c'est le sérum de référence qui provient d'animaux immunisés. L'on a plusieurs types de réactions Ag-Ac

3/ - LES METHODES IMMUNOLOGIQUES D'IDENTIFICATION VIRALE

Les réactions immunologiques vont mettre en jeu l'antigène (Ag) qui est le virus à identifier et l'anticorps (Ac) ou, l'immuno-sérum spécifique obtenu à partir d'animaux inoculés par le virus. Les sérums de référence sont issus d'animaux immunisés

1/ - Réaction de Neutralisation de l'ECP: (Effet CytoPathologique).Ex Poliovirus, Enterovirus

Les anticorps (Ac) spécifiques se fixent de manière sélective sur les antigènes (Ag) présents à la périphérie des virus (capside ou enveloppe), ils masquent la surface et empêchent le virion de pénétrer dans la cellule sensible.

Exemple d'application: la recherche et l'identification d'un virus inconnu chez un patient.
Cas des virus de la poliomyélite: *Poliovirus I, II et III*, pour typer le virus

a/ - On met en présence la suspension virale titrée dotée d'un virus inconnu de type Enterovirus et les immuns sérums AntiPoliovirus soit associés, soit monovalents dans des tubes à hémolyse avec 0,2 ml des immuns sérums de référence qui apporteront sous 20 ml, 20 doses neutralisantes. Pour les réactions d'identification du virus, pour les réactions de sérologie virale, on utilise des suspensions virales dotées de 100 unités formant plages UFP, le titre étant de 10^6 . Pour avoir une solution titrant 100 UFP, il faut diluer au $10^{-4} = 1/10.000$. On utilise un serum. AntiPoliovirus trivalent dirigé contre les 3 types, un serum AntiPolio type I, type II et un type III

b/ - Contact pendant 1 h à 37°C et, chaque mélange inoculé à des tubes de culture cellulaire.

c/ - Après incubation à 37°C pendant 3 à 4 jours, on recherche la production d'ECP

- Interprétation :

- * Dans le 1^{er} tube, il n'y a pas de lésion, pas d'ECP : c'est le témoin cellule
- * Dans le Témoin virus, il y a destruction totale des cellules, soit donc des ECP importants
- * Dans le 1^{er} Tube avec serum AP trivalent, s'il s'agit d'un poliovirus, l'on a neutralisation des ECP = 0
- * Dans le 2^{ème} tube avec serum AP type I, s'il ya neutralisation de l'ECP : c'est un virus polio de type I et dans ce cas, les 2 autres tubes sont dotés d'un ECP important avec un tapis cellulaire détruit

2/ - Réaction de fixation du complément «RfC» : ce sont des réactions d'hémolyse

Le complément est une protéine thermolabile détruite à 36°C, présente dans le sang des animaux et indispensable dans certains processus de défense de l'organisme lié à la lyse des organismes étrangers

- **Principe:** Les Ag des hématies, bactérie ou virus se fixe à l'Ac (Ig) grâce au complément

- **Application:** Identifier un virus inconnu en présence d'un immunosérum connu et titré

Ag = virus inconnu + Ac dirigé contre le virus + Complément (formation complexe Ag-Ac qui induit la lyse des cellules) + Système hémolytique : Globules rouges de mouton + Ac. Anti-GR de mouton.

- Interprétation :

* Si le virus correspond au sérum utilisé, l'on a la formation d'un complexe virus (Ag)-Ac qui fixe obligatoirement le complément du cobaille = Réaction positive: absence d'hémolyse.

* Si le virus ne correspond pas au sérum utilisé, l'on n'a pas de formation de complexe Ag-Ac et le complément est libre, suite à l'addition d'un système hémolytique (GR-AcAGR), s'il y a une hémolyse: la réaction est dite négative (R -)

3/ - Réaction d'Inhibition de l'hémagglutination : très utilisée dans les identifications

- **Principe :** Certains virus possèdent des hémagglutinines sur la capsidie (*Adenovirus*) ou sur l'enveloppe (*Myxovirus*) plus rarement, elles sont solubles (*Poxvirus*.) Ce caractère leur confère la propriété de se fixer sur les récepteurs particuliers situés à la périphérie des globules rouges (GR)

Chaque virion peut s'unir à plusieurs globules rouges (GR) à la fois, s'il est assez abondant il se produit une «agglutination» des GR entre elles par l'intermédiaire de ces virus, réaction appréciable à l'œil nu. En effet dans un tube à fond rond, les GR normales sédimentent en formant un disque à contour régulier ou bouton d'hématies en une heure. Au contraire, les hématies agglutinées s'empilent dans le fond sous forme d'un dépôt à bord déchiqueté et crémelé

* Si dans un 1^{er} temps on met en contact le virus hemagglutinisant et un sérum spécifique, les sites Ag du virus responsable de sa fixation sur les hématies se recouvrent d'Ac qui les masquent.

* Si dans un second temps au bout d'une ½ heure, on ajoute des GR aucune hémagglutination ne se produit et les hématies libres sédimentent en disque régulier. On dit que les Ac ont inhibés l'hémagglutination, la réaction est positive. Elle est très utilisée pour l'identification de virus.

PS : En bactériologie dans une réaction d'agglutination, les agglutinines sont des Ac., en virologie c'est un Ag. et, les Ac. correspondants qui sont les Ac. inhibiteurs de l'hémagglutination.

4/ - Réaction d'inhibition de l'hémadsorption : pour l'identification des *Myxovirus*

- **Principe**: diffère peu de la réaction d'hémagglutination, mais ici l'Ag. au lieu d'être constitué de virus en suspension dans un milieu liquide, il est constitué par les membranes de cellules infectées. Dans une telle culture cellulaire les virus se libèrent des cellules par bourgeonnement et avant leur détachement, la membrane sous jacente aux virus possèdent les sites antigeniques propres à fixer les globules rouges (GR). L'inhibition a lieu quand on introduit avant les GR, des Ac. qui en se fixant sur les sites membranaires vont les masquer et empêcher la fixation des GR.

- **Application** : essentiellement pour l'identification des *Myxovirus*.

5/ - Réaction d'Immunofluorescence : pour les infections virales, bactériennes et parasitaires.

Cette réaction est d'usage très large, exécutée selon le principe général de la méthode directe ou indirecte. Seul l'Ag. est différemment constitué de cellules infectées dans lesquelles on cherche à révéler les Ag. viraux à l'aide d'Ac. spécifiques. L'observation à l'aide d'un microscope à fluorescence.

* IFD (direct) et * IFI (indirect): Ag-Ac + fluochrome qui va fournir une couleur donnée

Ex: FITC =Isothiocyanate de Fluorescéine donne une couleur verte; la Rhodopsine une couleur rouge.

6/ - Réactions ImmunoEnzymatiques : ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Le principe est le même que l'IFI mais, la substance révélatrice est une enzyme.

La révélation se fait par l'addition d'un substrat qui pourra fournir un leucodérivé coloré.

L'Ac. au lieu d'être conjugué à un fluorochrome, est lié à une enzyme Ex: la Phosphatase alcaline, la Peroxydase. L'addition d'un substrat (Ex : PNPP=Phospho- nitrophenyl phosphate ou le tétraméthyl benzyline) va permettre l'apparition d'un leucodérivé coloré observable à l'œil nu et, dont la densité optique (DO) pourra être déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'on a la technique ELISA par compétition : méthode simple économique et très sensible

7/ - RadioImmunoLogie : RadioImmunoAssay (RIA)

Principe identique que la méthode ELISA, elle est très sensible mais, le marquage des conjugués se fait à l'aide d'éléments radioactifs dangereux à manipuler, avec des appareils de lecture coûteux

8/ - Autres réactions : * Immunodiffusion * Electrosynerase

*** ADK 10/04 * ADK 10 et 03/03 * ADK 04/09/02 ***
 ** ADK 10/93 ** ** ADK 08/94 ADK 06/95 ADK 02/97 **

LA MULTIPLICATION DES VIRUS

LOWFF en 1953 définit le virus comme un parasite obligatoire, c'est à dire que la cellule hôte permet la réplication du matériel génétique viral et la synthèse des différents constituants.

A / - METHODES D'ETUDE (4)

Le virus introduit dans la culture cellulaire disparaît pendant plusieurs heures: c'est la phase d'Eclipse, puis il apparaît des **virions**. L'étude de cette phase est réalisée au microscope électronique, par des méthodes biochimiques (électrophorèse, chromatographie, ultracentrifugation ...) et, par des méthodes immunologiques

B / - LES PRINCIPALES ETAPES (5)

- **Virus à ADN** : *Poxivirus, Herpesvirus* - **Virus à ARN** : *Poliovirus, V. Grippal, Retrovirus*

I/ - ADSORPTION – PENETRATION – DECAPSIDATION

1/ - Adsorption ou fixation :

Elle est liée à la fixation du virus sur la membrane cytoplasmique avec la présence de récepteurs spécifiques sur les membranes cellulaires. C'est le cas des *Poliovirus* avec leurs récepteurs lipoprotéiques chez les singes; le virus *de la grippe* fixé sur les bronches respiratoires supérieures.

2/ - Pénétration : Elle est marquée par deux mécanismes en général par «phagocytose ou viropexie» et, pour des virus enveloppés par «fusion de l'enveloppe virale et des membranes»

3/ - Décapsidation : une fois le virus dans la cellule, la multiplication se fait dans le cytoplasme avec production d'enzymes cellulaires qui vont dégrader les protéines de l'enveloppe. L'acide nucléique est ainsi libéré dans le cytoplasme selon le virus: cet acide va soit rester, dans le cytoplasme cas des virus à ARN soit, migrer vers le noyau cas des virus à ADN

II/ - PHASE D'ECLIPSE Les cellules virales disparaissent et la durée variable selon les virus et sa complexité. La phase se termine lorsque l'on peut à nouveau mettre en évidence des particules virales. Dans la cellule, l'acide nucléique va se répliquer et servir de source d'informations pour la synthèse de protéines notamment les «enzymes de réplication» pour la synthèse de protéines de structure (protéines de capsid, d'enveloppe) sources d'information pour la synthèse de protéines non structurales qui vont inhiber la synthèse cellulaire.

1/ - Caractères des virus à ADN (+++) : **Poxivirus * Herpesvirus*

- Les trois premières phases: adsorption, pénétration, décapsidation sont identiques.

L'acide nucléique: ADN qui est libéré dans le cytoplasme ou le noyau va être transcrit en «ARN messagers précoces» par l'ARN polymérase de la cellule ou la «*Transcriptase*» : c'est la transcription précoce.

- Ces ARN messagers passent sur les ribosomes de la cellule où, ils sont traduits en protéines dites «protéines précoces»: c'est la «**traduction**». Il y a d'abord la synthèse d'enzymes nécessaires à la production d'ADN, au métabolisme viral: *Thymidine Kinase, ADN Polymerase, DNase*. D'autres protéines sont de structure chez les *Poxivirus, Adenovirus et Herpesvirus*. L'on a enfin des protéines inhibitrices de synthèse cellulaire.

- Lorsque les polymerases sont synthétisées, l'ADN viral peut se répliquer, une «**réplication semiconservatrice**» selon Watson et Crick

- A partir des nouvelles molécules d'ADN formées. Il existe une seconde «**transcription**» à partir «d'ARN messagers tardifs» qui, sur les ribosomes vont synthétiser les «protéines tardives» pour les structures et l'assemblage.

a/ - Cas des Poxvirus : Virus à ADN à multiplication dans le cytoplasme

Ils comportent une enveloppe interne où se trouve un acide nucléique: ADN associé à la «*transcriptase virale*». Il existe une «*transcription*» et une formation de messagers à l'intérieur du virus; ces messagers vont quitter le virus pour se rendre dans le cytoplasme de la cellule puis, les ribosomes. Et vont subir la «*traduction*» : la synthèse de protéines, les «*décapsidases*» qui vont détruire l'enveloppe et la capsule pour libérer l'acide nucléique.

b/ - Cas des Herpesvirus : Virus à ADN à multiplication dans le noyau de la cellule.

Lors de la libération de l'ADN dans le cytoplasme à l'issue de la première phase, il migre dans le noyau de la cellule où il va se répliquer. Toutes les synthèses de protéines sont faites dans le cytoplasme avec les ribosomes mais à la fin, ces protéines retournent dans le noyau et l'assemblage de la capsid se fait dans le noyau. C'est comme avec les *Adenovirus et Papavovirus*.

2/ - Caractères des virus à ARN

a/ - Exemple 1 : Poliovirus (Picornavirus) à multiplication dans le cytoplasme cellulaire

L'ARN viral sert d'ARN messenger car, il n'existe pas de «*transcriptase*» associé aux ribosomes de la cellule, il est traduit à ce niveau et permet la synthèse d'un grand polypeptide qui se clive en six «6» avec : deux enzymes de réplication et, quatre protéines de capsid.

Les enzymes de réplication se placent au niveau de l'extrémité «3'» de la chaîne de polarité négative (-) et, permettent à un très grand nombre de chaîne complémentaire à polarité positive (+) de s'incorporer aux nouveaux virions.

b/ - Exemple 2 : Virus grippal (Mixovirus) Virus enveloppé doté d'une «*transcriptase*» qui va permettre les transcriptions de l'ARN en ARN messagers

c/ - Exemple 3 : Leucovirus et, Retrovirus.

Il existe un phénomène particulier: la «*transcriptase reverse*» qui va transformer ARN viral en ADN, d'où la formation d'un hybride RNA-DNA comme l'existence d'une copie de la chaîne DNA. La formation d'un DNA bicaténaire va constituer l'information virale soit en produisant de nouveaux virions soit, en s'intégrant au génome de la cellule. L'on assiste à une réinfection cellulaire chronique ou, à la transformation de cellules saines en cellules malignes.

III/ - ASSEMBLAGE DES CONSTITUANTS ET MATURATION

A partir de protéines synthétisées, l'on assiste à un autoassemblage de ces protéines. Pour la formation de la capsid, cas des *Poliovirus* l'on a d'abord le «*facteur procapsid*» constitué de protéines (**VP0, VP3 et, VP1**). Le génome ARN va pénétrer dans la procapsid et donner un «*provirion*». A ce stade, l'on a le clivage du **VP0** en **VP2 et VP4** puis, un «*virion complet*». Lors de la multiplication virale, il y a très peu de virions complets produits

IV/ - FORMATION DE L'ENVELOPPE

L'enveloppe est un constituant cellulaire et, un constituant d'organismes viraux.

- Chez les virus de la grippe: *Myxovirus*; l'ARN est enveloppé. Les nucléocapsides vont s'aligner sur la membrane de la cellule infectée: membrane ayant subi des modifications au cours de la multiplication virale avec une accumulation de protéine membranaire ou «*Pr-M*».

Souvent les hémagglutinines et neuraminidases vont donner des «*Peplomères*» d'infection virale. Il y aura des bourgeonnements et une libération d'un nouveau virion chez les *Myxovirus*.

- Chez l'*Herpesvirus*, virus à ADN: la multiplication se fait dans le noyau et, son enveloppe est prise sur la membrane nucléaire

V/ - LIBERATION

La libération est réalisée par «*bourgeonnement*» chez les *Myxovirus et Paramyxovirus*, chez les *Poliovirus*, elle se fait par «*lyse*» de la cellule infectée.

Certains virus restent longtemps intracellulaires, au laboratoire l'on peut réaliser l'éclatement des cellules par «*congelation – décongelation*» et également, par les ultrasons.

C/ - MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES

Les bactériophages sont décrits en 1917, ils présentent les mêmes caractères que les virus. La structure fut déterminée après examen en microscopie électronique notamment les phages **T 2** et **T 4** d'*Escherichia coli*. Les bactériophages sont des virus infectants de manière particulière les bactéries. Chaque particule ou «virion» contient trois (3) parties:

- La « **tête** » de 25 à 100 µm de diamètre, elle est icosaédrique, cylindrique enfermant une gaine contractile, gaine basale avec des crochets et des filaments synthétisent une enzyme.

- Une « **enveloppe** » protéique dotée d'un filament d'acide nucléique, une petite queue creuse de diamètre plus fin et de longueur véritable entourée d'une couche de protéine contractile.

- Une « **plaque terminale** » entourée de fibre nodale libérée, au moment de la fixation du phage sur la bactérie sensible. L'extrémité caudale sécrète une enzyme ou «endolysine» qui entraîne la destruction de la paroi bactérienne constituée de mucopeptide.

Après la pénétration de l'acide nucléique du phage dans le cytoplasme bactérien; il existe des degrés de virulence différents: * des «phages virulents» qui entraînent une infection lytique et, * des «phages tempérés» qui induisent le processus de lysogenisation: infection chronique des cellules sans les détruire

1/ - Infection lytique avec les phages virulents

Les phages virulents T2 et T4 Coliphage de *E. coli*, ils détruisent rapidement la structure du chromosome de la bactérie, un mélange à une culture jeune de bactérie sensible entraîne un cycle lytique complet et, la formation de plusieurs centaines de particules nouvelles de phage. C'est un cycle productif avec la lyse de toutes les bactéries infectées.

*** Méthodes d'étude in-vitro**

- En milieu liquide : l'on a une lyse bactériophagique qui induit un éclaircissement complet du milieu. L'appréciation est directe dans le visible ou en continu par un biophotomètre enregistreur

- En milieu solide : l'on ensemence sur une gélose nutritive dans une boîte de Pétri une suspension de bactéries sensibles 10⁸ bact/ml et, une centaine de bactériophages, l'on incube à 37°C pendant 24 h et l'on obtient une culture en nappe avec des trous : plages ou taches vierges

a/ - Multiplication des phages à ARN : constitué de capsid à symétrie cubique sans queue

- **Absorption et Pénétration** : à la surface des bactéries, il existe des flagelles ou pili sexuels où s'adsorbent les bactériophages à RNA et qui entraînent la pénétration dans la cellule bactérienne

- **Eclipse** : Réplication de RNA, action comme un RNA messenger qui synthétise deux (2) protéines constitutives et une enzyme « replicase ». La réplication est identique à celle de Poliovirus, sans transcription - Assemblage et Libération : réalisée après la lyse cellulaire

b/ - Multiplication des phages à ADN

- **Adsorption** : Fixation par les crochets à la plaque basale sur récepteur spécifique de la paroi bact.

- **Pénétration** : produite par la queue du phage de lysosyme qui attaque la paroi bactérienne.

Le manchon se retracte, le tube interne pénètre dans le cytoplasme et y injecte l'ADN. La capsid reste à l'extérieur. La multiplication est très rapide, avec la transcription de l'ADN en ARN messenger puis, la synthèse de différentes protéines dont les protéines de synthèse.

- **Assemblage** : tous les mécanismes sont utilisés pour la reconstitution du bactériophage, la synthèse de lysosymes va entraîner l'écartement de la paroi et la libération du bactériophage.

2/ - Infection non lytique ou Lysogenisation

C'est un phénomène des bactériophages tempérés qui sont insuffisamment actifs pour induire la lyse immédiate; les bactéries infectées survivent mais, transformées en « *bactéries lysogènes*», cas des phages **P1 P2** *E. coli* et *Listeria*, **P 22** *Salmonella* et, **P 12** *Lambda E. coli*.

Après l'ingestion du DNA du phage dans la membrane du cytoplasme bactérien, il s'intègre au chromosome bactérien. Le bactériophage est constitué du prophage et de la bactérie. Cela induit les bactéries lysogènes transmettent héréditairement au cours des générations successives.

INFECTION VIRALE : DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT

A/ - INFECTION VIRALE

Les infections virales peuvent se manifester de façon aiguë, chronique mais aussi pas du tout

A. I/ - ENTREE DU VIRION DANS L'ORGANISME

Il faut obligatoirement que le virus traverse la barrière cutanéo-muqueuse pour pénétrer dans l'organisme ceci, en cas de traumatismes divers, piqure, morsure...

- **La peau et les conjonctives** : cas des virus de la rage, *Poxvirus*, *Herpesvirus*, *Adenovirus*.
- **Les muqueuses** : * rhino-pharyngée (*grippe*, *rougeole*) * gastro-intestinale. *Enterovirus*
- * génitale : certains virus sont transmis par voie sexuelle : *Hépatite B et C*, *HIV*, *Herpesvirus*
- **La voie transplacentaire** : *V. rubéole*, *rétrovirus(HIV)* et certains *Herpesvirus*

A. II/ - DIFFUSION DE L'INFECTION

Elle peut rester localisée, elle peut se faire par voie sanguine (virémie) ou par voie lymphatique.

1/ - Diffusion localisée: Incubation courte de **1-3** jours (affections respiratoires et gastro-intestinale)

La multiplication virale et l'atteinte cellulaire sont localisées au niveau de la porte d'entrée, infection par « diffusion » exemples : rhume (*Rhinovirus*), grippe (*Myxovirus*).

Le développement viral peut se faire dans les cellules des voies respiratoires, l'on a aussi les gastro-entérites dues aux *Rotavirus*, *Enterovirus* et *Calcivirus* regroupés sous le nom de « SRV »

2/ - Infection généralisée : Diffusion par voie sanguine: Incubation longue **10-14** jours

Le cheminement du virus de la porte d'entrée à la cellule cible se fait en plusieurs étapes (5)

- **1^{ère} multiplication** à la porte d'entrée pour la majorité des infections, elle est « respiratoire »
- **2^{ème} étape** : déversement dans le sang (1^{ère} virémie), les vaisseaux lymphatiques, la rate...
- **3^{ème} étape** : rate et système réticuloendothélial; 2^{ème} multiplication avec beaucoup de virions
- **4^{ème} étape** : les virions repassent dans sang (2^{ème} virémie), puis gagnent les cellules cibles
- **5^{ème} étape** : multiplication dans les organes cellulaires avec, lésions caractéristiques de la maladie
 - a - **Oeil** : manifestations des *Herpesvirus* qui induisent Varicelle, Zona, CMV, *Adenovirus*, Rubeole
 - b - **Lignées sanguines** : V. E. Barr, *Rétrovirus (VIH)*; HTLV = Human T Lymphocyte V.
 - c - **Peau** : *Herpesvirus (VZV)*, *Poxvirus*, Rougeole, Rubéole, *Coxsachievirus* et *Echovirus (Enterovirus)*.
 - d - **Foie** : Hépatites A,B,C ;V. EB, CMV, *Herpesvirus*, Fièvre jaune, Fièvre hémorragique Ebola
 - e - **Embryon** : *Herpesvirus*, CMV, HTLV, Rubéole
 - f - **Vessie** : *Adenovirus* type 11 → Cystite
 - g - **SNC** : HSV (Encéphalites), CMV, Rage, *Arbovirus*, Oreillon, Rougeole, Maladie de C. Jacob
 - h - **Parotides** : Oreillon
 - i - **Organes génitaux** : HSV, Papillomavirus
 - j - **Voies respiratoires**: *Adenovirus*, *Rhinovirus*, Grippe, Rougeole, V. Respi. Syncytial (VRS)
 - k - **Tube digestif** : *Rotavirus*, *Adenovirus*, Agent Norwalk

PS : Certaines encéphalites à HSV se font soit par voie sanguine soit, par voie nerveuse au cours de certaines infections généralisées chez la femme enceinte lors de la 2^{ème} virémie, il peut avoir passage du virus de la mère au fœtus par la voie transplacentaire Ex : *Virus Rubéole*, CMV

3/ - **Les Infestions inapparentes**

Il n'y a aucun signe clinique observé alors que le virus s'est multiplié, elles sont très fréquentes et, de grande importance en épidémiologie : sources de dissémination importantes et, **responsable de l'immunité** de plusieurs personnes. L'état d'immunitaire acquis de trois « 3 » façons :

- « naturellement par une 1^{ère} infection », pouvant être typique, brusque ou inapparente.
- « artificiellement par seroprévention », par apport d'anticorps (Ac.) artificiellement préparé et qui induit une immunité sérologique immédiate dont la durée est inférieure à 15 jours
- « artificiellement par la vaccination »

** Les vaccins vivants induisent une immunité plus solide et plus durable que les vaccins inactivés.

4/ - Les Infections latentes et récurrentes (Virus Herpétiques : HSV)

Elles sont dues à un virus qui donne d'abord une infection aiguë qui va guérir mais, suivie d'une infection latente avec ou sans expressions cliniques récidivantes. Ce sont les virus *Herpétiques* : (HSV), *Cytomégalovirus* (CMV), virus de *Varicelle et Zona* (VZV), virus *Epstein Barr* (VEB)

Ex 1 : pour VZV, Il faut avoir eu la varicelle pendant son enfance pour faire un zona à l'âge adulte

Les virus après une primo-infection varicelleuse restent latents dans les ganglions rachidiens

Ex 2 : pour HSV, la primo-infection herpétique chez l'enfant de 6 -18 mois passe souvent inaperçue ou avec des signes : gingivostomatite, angine et l'altération de l'état général puis, tout rentre dans l'ordre mais le virus persiste dans ganglions et donne une lésion vésiculeuse : « recurrence herpétique ».

5/ - Les Infections à évolution lente (Ex : P.E.S.S.) : maladie touchant le système nerveux (SN), la période d'incubation est très longue, après plusieurs mois jusqu'à plusieurs années.

Ex 1 : La ParaEncephalite Subaiguë Scerosante « **PESS** » touche les adultes ; les jeunes sont infectés plusieurs années avant par le virus responsable de la rougeole. On trouve en effet chez ces sujets, des taux d'anticorps (Ac) élevés contre ce virus.

Ex 2 : Pour la *maladie de Creutzfeld J.*, elle est due à un «viroïde à ARN » à faible poids moléculaire sans capsid. Ses particules sont dangereuses car résistent à de nombreux traitements stérilisants

6/ - Les Infections transformantes :

Elles sont dues à des « virus dits oncogènes »; chez l'homme on connaît les *Papovavirus* qui donnent des tumeurs bénignes; les *Poxvirus* du genre *Molluscum contagiosum* qui donnent des néo-formations cutanées bénignes. L'on met aussi en cause les *HSV* de type 2 dans le cancer du col utérin

A. III/ - LES DEFENCES DE L'ORGANISME

1/ - La Porte d'entrée : 1^{ère} lignée de défense, elles vont empêcher la pénétration ou la fixation des virus. Ce sont la peau, les muqueuses (défences naturelles), leurs sécrétions, le mouvement des cils, les sels biliaires ... Lorsque la peau est saine, aucune pénétration de virus n'est possible. Le mucus empêche la fixation des virus aidé, par le mouvement des cils vibratils, les sels biliaires à leur niveau détruisent l'enveloppe des virus.

2/ - Les Macrophages : 2^{ème} lignée, ils jouent un rôle essentiel, existent dans la rate et le foie sous forme fixes ou libres au niveau péritonéal . Ils vont détruire les virus en respectant les déterminants antigéniques qu'ils présentent aux lymphocytes en déclenchant la réponse immunitaire.

3/ - L'Immunité antivirale : Ce sont des réponses à médiation humorale et cellulaire

La coopération entre différentes cellules : les LT régulatrices LT4 vont déclencher la réponse immunitaire par coopération, elle induit la production de LT cytotoxiques : cellules tueuses, elles vont également solliciter par des lymphokines la production des LB filles, qui vont produire des plasmocytes qui sont à l'origine d'immunoglobulines (Ig) spécifiques

4/ - Les autres facteurs : (Interféron et Fièvre : moyens de défense)

Les Interférons sont des protéines cellulaires induites par l'infection et, qui inhibent la multiplication des virus par des mécanismes complexes. La place des moyens de défense naturelle fût essentielle après les expériences de Fonconnier et Gresser.

B/ - LE DIAGNOSTIC

- **Objectifs** : réaliser le diagnostic différentiel avec les maladies bactériennes et éviter les antibiotiques.
- * Intérêt épidémiologique: prise des mesures d'hygiène préventive et sanitaire (Campagne de vaccinations)
- * Intérêt thérapeutique : même si elle est peu satisfaisante, la chimiothérapie antivirale est présente

B. I/ - CHOIX DES ECHANTILLONS

Il est important de savoir où retrouver un virus en fonction de la symptomatologie: pathologie suspectée

- Au cours des diarrhées : prélèvement des selles
- Affections neurologiques : LCR, gorge, selles et sang
- Eruptions vésiculeuses : liquide de vésicule
- Affections respiratoires : sécrétions rhinopharyngées, bronchiques ou le liquide pleural ...
- Affections néonatales (rubéole) : urine, fragment de tissus et de selles, gorge ...
- Hépatites : selles, urines, sang
- Affections oculaires : prélèvement des sécrétions conjonctivales

B. II/ - TRANSPORT: Il doit être toujours accompagné d'une fiche de renseignements obligatoire. Les précautions à prendre : emballage double standardisé, utilisation de milieu de transport

B.III/ - METHODES DE DIAGNOSTIC

1/ - Methodes directes

a/ - Methodes physicochimiques : Examens directs en ME ou, en Immuno ME, Electrophorèse

b/ - Methodes biologiques directes :

- **Méthodes approchées** : Inoculation à des animaux, oeufs embryonnés, cultures cellulaires, méthodes immunologiques. En routine, on utilise des cultures cellulaires avec un certain nombre de lignées cellulaires de manière à pouvoir augmenter les charges suite aux multiplications des virus
Ex : cellules de rein de singe, cellules Marc 5, cellules de lignée continue Hela ou cellule Hep 2

- **Méthodes spécifiques** : Plusieurs « réactions immunologiques » d'identification des virus
* de fixation du complément, d'inhibition de l'hémagglutination, de l'hémadsorption, ELISA, RIA

2/ - Methodes biologiques indirectes : (Cf : Methodes d'étude des virus)

Elles sont liées à la sérologie virale, l'Ig. M est le signe d'infection récente par RFC si sérum tardif

a- Les systèmes de dilution utilisés varient en fonction des nécessités techniques d'où la diversité des échelles, un même serum pouvant avoir un titre de :

* 32 : fixation du complément * 160 IHA * 128 pour la neutralisation * 2048 en immunofluorescence

b- Pour différentes raisons, le diagnostic peut se faire sur un seul serum et, en fonction de l'évolution de la maladie: Serum précoce ou S. tardif, dans l'un on recherche les **IgM** = signe de l'infection récente dans l'autre, on utilise la notion de titre significatif (Ex Réaction de fixation cplmt > 64 = inf. récente)

c- En Sérologie du **nouveau né** de moins de 6 semaines, l'on retient qu'un taux élevé d'Ac ne signifie pas une infection car, il peut s'agir Ig.G maternelle transmise par le placenta. Pour s'assurer d'une infection, il faut mettre en évidence et doser les **IgM** qui ne traversent pas la barrière placentaire

d- La sérologie chez les patients souffrants de maladies du système immunitaire est toujours difficile à interpréter donc, il faut beaucoup de prudence dans ces cas.

C/ - LE TRAITEMENT

C. I/ - TRAITEMENT PREVENTIF

1/- Historique : Le traitement préventif peut être passif par l'apport d'immunoglobulines (Ig.), c'est la séroprévention qui est éphémère ou, active par la vaccination d'où la production de plusieurs vaccins viraux d'intérêt médical avec divers exemples : variole (Jenner 1796), rage (Pasteur 1885) Poliomyélite (Salk/Lepine 1955) .

Avec le développement des cultures cellulaires in-vitro l'on a pu avoir les vaccins de la rougeole (J.F Enders 1958),de la rubéole (1966), de l'hépatite B (81), de la fièvre jaune (IP Dakar/Rockefeller issu de 240 passages sur les cerveaux de souris) mais pour le SIDA quand ? la question reste posée

2/- Obtention des vaccins :

Vaccins vivants ou tués; Vaccins atténués ou V. atténués par passage successif sur des plaques

Souche Virus	Cellules de Passage	Souche Vaccin
- Rougeole Edmonston A	Rein de singe 24 Amios 28 / Œuf embryonné 6-12	Edmonston B
Edmonston B	Fibroblaste poulet 66-85	Schwarz
- Rubéole	Rein singe 77 / R. lapin 51	HPV 77 / Cendehill
- Fièvre jaune	Cerveau de souris 240	IP Dakar 17 D

NB : Par Génie génétique : Production de molécules par les levures avec un coût plus faible

II/- TRAITEMENT CURATIF

Jusqu'en 1957 la vaccination était la seule méthode de traitement des affections virales, puis utilisation de « l'interferon » à partir de 1957, et en 1959 des produits antiviraux ont été essayés, Ex : 5 IododesoxyUridine = *Idoviran** actif sur HSV in-vitro mais toxique in-vivo. Ensuite plusieurs progressions ont permis de bloquer la multiplication des virus mal connue et, l'évolution de la thérapie par une meilleure connaissance des différentes étapes du phénomène de multiplication ainsi que des substances qui vont agir sur ces étapes : adsoption ou fixation, décapsidation, transcription, replication, traduction et synthèse, assemblage et maturation, enfin libération.

- Les Différentes substances antivirales

a/ - Produits agissants sur l'adsorption : * Cyclosporine * *Peptides T* (action sur CD4)

* Molécule CD4 soluble * Ac. neutralisants : serum VIH+ * Substances polyanioniques = Dextran

b/ - Action sur la pénétration et la décapsidation:*Amantadine *Rimantadine *Arildone

- Amines tricycliques actives sur le virus grippal : Amantadine=*Mantadin** Rimantadine = *Rofual**

- Arildone : active sur les virus à ARN et, à ADN

c/ - Agissant sur la réplication : - Analogues des Nucléosides (= leurre des enzymes virales)

Les acides nucléiques sont constitués d'un certain nombre de bases, les « analogues » utilisés en thérapeutique se comportent comme des « leurres pour les enzymes virales » : *transcriptase reverse, ARN et ADN polymérasés*, ils agissent par inhibition du fonctionnement de ces enzymes sans affecter les enzymes cellulaires. Ils sont incorporés dans le génome en formation et induisent la formation d'un génome anormal ou un arrêt de la formation de ce génome. Les plus importants en thérapeutique concernent les virus : HSV et VIH+

Un Nucléoside est une Base Purique ou Pyrimidique et un Pentose (Ribose ou désoxyribose)

Les chaînes d'ARN ou ADN sont constituées d'un alignement de quatre nucléotides différents :

- **ADN**: * Adenosine = **A** * Thymidine = **T** * Guanosine = **G** * Cytidine = **C**

- **ARN**: * A, * Uridine = **U**, * G, * C Il y a un appariement des bases : **A=T** , **G =C** et **A= U**

1/ - Les Drogues AntiHerpetiques

→ **Drogues de 1^{ère} génération:** Analogue de Thymidine et Adenosine

- Analogues de la Thymidine : * IdoxUridine = *Iduviran* dont le spectre s'étend à ADN

*TriFluoroThymidine TFT, Trifluridine = *Viroph* : 10 fois plus active s'étend aux Herpesvirus

- Analogues de l'Adenosine : * Vidarabine = *Ara A*, 1^{er} Antiviral utilisé par voie générale active sur l'ADN Polymérase virale très sensible, incorporé dans la chaîne d'ADN en fragment et lui confère des propriétés mutagènes et tératogènes. Active sur les formes graves HSV et VZV

→ **Drogues de 2^{ème} génération :** Analogue de Guanosine et Thymidine

- AcycloGuanosine* = *Zovirax* elle subit une 1^{ère} phosphorylation et deux autres, surtout active sur les cellules infectées, puissant inhibiteur de l'ADN Polymérase. La forme injectable est la plus active. Action sur les virus T kinases + (HSV1 et 2, VZV), et inactif sur les T kinase - (CMV)

- Analogue de Thymidine : *BromoVinylDesoxyUridine = *BVDU* actif sur HSV1 ! et VZV

→ **Drogues de 3^{ème} génération :**

- Dérivé de l'*Ara A* : *Cyclaridine*, plus soluble, active sur virus résistants TK-, ADN Poly-

- Dérivé de l'AcycloGuanosine: DihydropropoxyméthylG. = DHPG = *Gargiclovir* à l'origine de la formation d'un dérivé triphosphorylé doté d'une grande affinité pour l'ADN Polymérase Actif sur les HSV, VSV, CMV++. utilisé pour les affections à CMV, et les sujets immunodéprimés ...

2/ - AntiRétroviraux : Substances agissantes contre les infections respiratoires

→ **Inhibiteurs de la Transcriptase Reverse**

1/- Zidovudine = *Retrovir* 2/ -Didanosine = *Videx* 3/ - Lamuvidine = *Epivir* 4/ - Stavudine = *Zérit*

5/- Abacavir = *Ziagen* 6/ - Nevirapine = *Viramune* 7/ - Zalcitabine = *Hvid*

* **Associations :** Zidovudine + Lamuridine → *Combivir** = Synergie qui prévient problèmes de résistance Ces produits peuvent être utilisés en monothérapie, di ou trithérapie avec des Protéases

→ **Inhibiteurs des Protéases :** utilisés contre HIV en trithérapie

- Invinavir = *Crixivan* - Ritonavir = *Norvir* - Nefinavir = *Viracept* - Saquinavir = *Invirase*

→ **Analogues de Pyrophosphates:** Ac. PosphonoAcétique = PAA Ac P. Formique = PFA **

Activité contre la T. reverse du VIH, actifs sur HSV, VZV, CMV mais s'accumule dans les os

→ **Drogues bloquants les ARN Viraux** - Thiophenylcarbazonne = *Marboran*: bloque la traduction d'ARNm tardifs, activité sur les Poxvirus: Variole, efficace sur les complications de la vaccination Antivariolique mais ce produit n'est plus fabriqué depuis l'erradiation

→ **Les OligoNucléotides "Antisens":** Inhibiteurs compétitifs des Transcription et Traduction du HIV

3/ - Produits agissants sur la phase de maturation : Interferons (IFN):

Glycoprotéines synthétisées par les cellules des vertébrés qui stimulent la réponse immunitaire.

Il existe trois classes : - IFN Alpha issu des leucocytes - IFN Bêta issu des fibroblates humains

Ces deux IFN sont produits par les lymphoblastes - IFN Gamma issu du génie génétique.

Ils sont utilisés dans les traitements des infections respiratoires, varicelle, zona, l'hépatite B

Leur activité est directe par l'IFN lui - même ou par l'intermédiaire des cellules Natural Killer NK

- LA RESISTANCE AUX ANTIVIRAUX ET CONCLUSION

Les mécanismes sont dus à des « mutations » sur le gène de la Polymérisation virale et de la Thymidine kinase, l'utilisation d'association de substances synergiques ou antagonistes constituent un moyen de lutte. Le diagnostic des infections virales est de plus en plus pertinent ceci, dû à l'existence d'un arsenal thérapeutique antiviral virostatique performant, les virucides toxiques sont à usage externe

*** ADK 10/04

*** ADK 26/10/03

06 et 16 /03/03 27/ 02/03

*** ADK /10/01 ***

INFECTION VIRALE : DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT

A/ - INFECTION VIRALE

I/ - ENTREE DU VIRION DANS L'ORGANISME

Le Virus doit traverser avant tout la barrière cutanomuqueuse : cas traumatismes, morsures : V. Rage
Ensuite les muqueuses: rhino-pharyngée, gastro-intestinales, génitales et la voie transplacentaire

II/ - DIFFUSION DE L'INFECTION

1/ - Diffusion localisée : incubation courte de 1-3 J. Ex : rhume, grippe, gastro-entérites

2/ - Diffusion par voie sanguine: incubation longue 10-14 J (5 étapes)

Cheminement du virus de la porte d'entrée à cellules cibles en plusieurs étapes

- **Parotides** : V. Oreillons - **SNC** : Herpes (Encéphalites), Rage, Mal C. Jacob - **Embryon** : Rubéole

- **Lignées sanguines** : Rétrov VIH - **Peau** : Herpes (Varicelle, Zona), Rougeole - **Foie** : Hépatites / Fièvre jaune

- **Voies respiratoires** : Rhinovirus, Grippe. - **Tube Digestif** : Rotavirus - **Organes génitaux** : Herpès

3/ - Les Infestions inapparentes 4/ - Les Infections latentes et récurrentes (HSV)

5/ - Les Infections à évolution lente (Ex : P.E.S.S.)

6/ - Les Infections transformantes * HSV type 2 → Cancer du col utérin Inf. ← V. Oncogènes:

III/ - LES DEFENCES DE L'ORGANISME

1/ - **Porte d'entrée** : 1^{ère} ligne : vont empêcher pénétration ou fixation des virus
(peau, sécrétions muqueuses, mouvements des cils, sels biliaires)

2/ - **Macrophages** : 2^{ème} ligne, jouent un rôle essentiel, détruisent les virus

3/ - **Immunité antivirale** : Réponse à médiation humorale et cellulaire 4/ - **Autres facteurs** : INF, fièvre

B/ - LE DIAGNOSTIC

- **Objectifs** : réaliser le diagnostic différentiel avec maladies bactériennes et éviter antibiothérapie

* Intérêt épidémiologique et thérapeutique : (mesures d'hygiène, sanitaires : vaccinations).

1/ - **Le Choix des échantillons** 2/ - **Transport** 3/ - **Méthodes** : (Physicochim, Biolo directes et indirectes)

C/ - LE TRAITEMENT

- **Traitement préventif** Passif / Ig., ou Actif par la vaccination → ++ Vaccins viraux

* Variole (Jenner 1796) * Rage (Pasteur 1885) * Polio (Salk/Lepine 1955) * Rougeole

* Rubéole * Oreillons * Fièvre J. (IP Dakar/ Rockefeller ← 240 pas / cerveau Souris)

- **Traitement curatif** blocage de la multiplication par des substances actives sur les étapes :

Ex 5 IododesoxyUridine (Idoviran*) actif sur HSV in vitro mais, toxique in vivo . °

- **Substances Antivirales** 1/ - Action sur l'adsorption ° : * Oligopeptides * Peptides T (actif sur CD4)

2/ - Action sur la pénétration et la décapsulation : * Amantadine * Rimantadine * Aridone

3/ - Action sur la réplication : * Analogues des Nucléosides (= leurre des enzymes virales)

I/ - LES DROGUES ANTIHERPETIQUES

- 1^{ère} Génération : * IdioXUridine (Iduviran*) * TriFluoroThymidine TFT * Vidaratine

- 2^{ème} Génération ° : * AcycloGuanosine (Zovirax*) * BromoVinylDesoxyUréidine (BVDU)

- 3^{ème} Génération : * D' de la Vidarabine * D' Guanosine (DHPG = Gancyclovir *)

II/ - SUBSTANCES AGISSANTES CONTRE INFECTIONS RESPIRATOIRES

- **La Ribavirine**: Virazole* = Ana. Guanosine empêche fixation ARN messagers viraux sur les ribosomes. Ils inhibent les Polymerases virales : Transcriptase Reverse du HIV

- **Autres produits actifs sur VIH / Inhibition de la Transcriptase Reverse**

1 / - Abacavir Ziagen* 2/ - Didanasine Videx* 3/ - Lamuvidine Epivir* 4/ - Stavudine Zérit*

Associations : Zidovudine + Lamuridine → Combivir* = Synergie qui prévient les problèmes de résistance

- **Les Inhibiteurs des Protéases** : contre HIV en trithérapie

* Indinavir (Crixivan *) * Ritnavir (Norvir*) * Saquinavir

- **Analogues de Pyrophosphates** : Ac. PosphonoAcétiques (PAA) * Ac P. Formique (PFA)

- La Thiosemicarbazone (Marboran*) : bloque la traduction des ARNm tardifs : utilisé dans la Variole

- **Les OligoNucléotides "Antisens"** : → Inhibition compétitive dans la transcription et traduction V. (HIV)

- **LES INTERFERONS**: Glycoprotéines qui stimulent réponse immunitaire. (3 classes)

IFN Alpha, IFN Bêta ← Lymphocytes / IFN Gamma ← Génie génétiq. Ttt Inf Respi, Varicelle, Zona, Hépatite B

COURS DE VIROLOGIE
Pr LOUKOU

I/ - DEFINITION STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES VIRUS

I/ - EVOLUTION DU CONCEPT DE VIRUS

- Protistes supérieurs: Eucaryotes - Protistes inférieurs : Procaryote
- Connaissance des maladies virales

II/ - CARACTERE DE DEFINITION DES VIRUS

III/ - ANATOMIE GENERALE DES PARTICULES VIRALES

IV/ - TECHNIQUES D'ETUDE DES VIRUS

- 1/ - Technique d'ombrage : Coloration négative de Brenner et Horne
- 2/ - Technique de diffraction des rayons X
- 3/ - Autres techniques :

* Ultracentrifugation * Electrophorèse * Techniques Biologiques * Techniques Immunologiques

V/ - STRUCTURE DES VIRIONS (3 Parties)

- 1/ - Les Acides Nucléiques Viraux :

a/ - Génome à ADN b/ - Génome à ARN

- 2./ - Les Capsides Virales

a/ - Virus à symétrie Cubique b/ - V. à symétrie Hélicoïdale c/ - V. à symétrie Mixte

- 3/ - Les Enveloppes Virales ou PEPLoS

VI/ - CLASSIFICATION DES VIRUS

II/ - LES METHODES D'ETUDE DES VIRUS

III/ - MULTIPLICATION DES VIRUS

IV/- INFECTION VIRALE :DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT

ADK : 10/03 /010/ 03 06/09/01

I/ - DEFINITION STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES VIRUS

I/ - EVOLUTION DU CONCEPT DE VIRUS

- Protistes supérieurs: Eucaryotes - Procaryotes - Connaissance des maladies virales

II/ - CARACTERE DE DEFINITION DES VIRUS

III/ - ANATOMIE GENERALE DES PARTICULES VIRALES

IV/ - TECHNIQUES D'ETUDE DES VIRUS

1/ - Technique d'ombrage : Coloration négative de Brenner et Horne

2/ - Technique de diffraction des rayons X

3/ - Autres techniques :

* Ultracentrifugation * Electrophorèse * Techniques Biologiques * Techniques Immunologiques

V/ - STRUCTURE DES VIRIONS (3 Parties)

1/ - Les Acides Nucléiques Viraux : a/ - Génome à ADN b/ - Génome à ARN

2./ - Les Capsides virales : Virus à symétrie cubique, hélicoïdale et mixte

3/ - Les Enveloppes virales ou Peplos

VI/ - CLASSIFICATION DES VIRUS

II/ - LES METHODES D'ETUDE DES VIRUS

INTRODUCTION

I/ - METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

A/ - ETUDES STRUCTURALES

1/ - Etudes pour la détermination de la taille des virus 2/ - Etudes pour la détermination morphologique

3/ - Etudes pour la détermination de la composition

B/ - DIAGNOSTIC RAPIDE

II/ - METHODES BIOLOGIQUES

A/ - L'ISOLEMENT VIRAL

1/ - L'animal de laboratoire 2/ - L'œuf embryonné de poules (Good Pasture 1935)

3/ - Les cultures cellulaires (Enders 1949)

a/ Cellules primaires b/ Cellules diploïdes c/ Cellules de lignée continue ou hétéroploïdes

4/ - Les conditions de cultures

B/ - L'IDENTIFICATION VIRALE

1/ - LES METHODES APPROCHEES

a/ - L'animal de laboratoire b/ - L'œuf embryonné de poules

c/ - Les cultures cellulaires

* Effet Cytopathique (E.C.P.) * Modification de membrane : * Hémodorsorption / * Hémagglutination

* Interférence virale

2/ - LES METHODES SPECIFIQUES D'IDENTIFICATION VIRALE

a/ - Rappel structure virus b/ - Antigènes viraux: Ag capsidique. * Ag solubles * Ag membranaires

C/ - TITRAGE DES VIRUS

III/ - LA MULTIPLICATION DES VIRUS

LOWFF en 1953 Virus = parasite obligatoire, c'est à dire que la cellule permet la réplication du matériel génétique viral et la synthèse des différents constituants

I/ - METHODES D'ETUDE (4)

Le virus introduit dans la culture cellulaire disparaît pendant plusieurs heures : la phase d'éclipse puis, il est appelé Virion. L'étude de cette phase d'éclipse est réalisé au microscope électronique, par des méthodes biochimiques (electrophorèse, chromatographie, ultracentrifugation ...)

II/ - LES PRINCIPALES ETAPES (5)

A/ - ADSORPTION – PENETRATION – DECAPSIDATION

B/ - PHASE D'ECLIPSE

1/ - Caractères des virus à ADN (+++) 2/ - Caractères des virus à ARN

C/ - ASSEMBLAGE DES CONSTITUANTS ET MATURATION

D/ - FORMATION DE L'ENVELOPPE

E/ - LIBERATION

III/ - MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES

1/ - Infection lytique avec les Phages virulents

a/ - Multiplication des Phages à ARN b/ - Multiplication des Phages à ADN

2/ - Infection non lytique ou lysogémisation

IV/ - INFECTION VIRALE : DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT

A/ - INFECTION VIRALE

I/ - ENTREE DU VIRION DANS L'ORGANISME

II/ - DIFFUSION DE L'INFECTION

1/ - Diffusion localisée: Incubation courte de 1-3 jours.

2/ - Diffusion par voie sanguine : Incubation longue 10-14 jours (5 étapes)

3/ - Les infections inapparentes 4/ - Les infections latentes et récurrentes (Virus Herpétiques)

5/ - Les infections à évolution latente (Ex : P.E.S.S.) 6/ - Les infections transformantes

III/ - LES DEFENCES DE L'ORGANISME

1/ - La Porte d'entrée 2/ - Les Macrophages

3/ - L'Immunité antivirale 4/ - Les autres facteurs : l'interféron / la fièvre

IV/ - DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT