

2.2 Pouvons-nous compter le nombre de virus?

Aujourd'hui, nous allons voir certaines des procédures utilisées pour déterminer le nombre de virus dans un volume donné et d'établir ainsi leur concentration. C'est ce qu'on appelle « quantification ». Quantification virale est essentielle en recherche et développement, pour préparer des vaccins, ou pour connaître la quantité de virus qui nous ajoutons à la culture de tissus. Mais aussi dans le diagnostic, pour évaluer la réponse du patient au traitement antiviral.

Diverses méthodes pour quantifier les virus ont été décrites. Ils évaluent leur pouvoir infectieux, ou de leur acide nucléique ou de leurs protéines, ou ils ne même pas compter directement le nombre de particules. Dans cette vidéo, nous allons parler de certains d'entre eux.

Essai de plaque

Une des méthodes plus courantes pour quantifier les virus est l'essai de plaque, surtout avec les virus qui lisent les cellules infectées. Il se compose de contaminer les cultures de tissus disposées en puits, ou en plaques, avec des dilutions du virus problème. Une première étape consiste à enlever le milieu de culture pour faciliter un contact optimal entre les virus et les cellules. Après une courte période d'incubation, les cultures sont recouvertes de gélose semi-solide. Il s'agit d'empêcher que les virus s'est propagé librement, donc il infectera uniquement les cellules adjacentes à ces déjà infectés. Après quelques jours nous voyons le développement des zones circulaires transparentes, un signe que les virus ont lysent les cellules. Ce sont les soi-disant « plaques ». Le nombre de plaques dépend du nombre de virions dans l'inoculum, et il est supposé que chaque plaque a été formée à partir une particule virale dans l'échantillon. Ils sont comptés manuellement, habituellement avec l'œil nu. Il est plus facile de les voir après avoir retiré la gélose semi-solide et coloration des cellules, par exemple, avec le violet de gentiane. Le résultat est exprimé en unités formant des plaques, ou PFU/ml. Pour calculer cette valeur la meilleure chose est d'ajouter la suspension virale en trois exemplaires et faire la moyenne des trois valeurs. Enfin, il nous suffit de diviser cette valeur par la dilution utilisée et le volume ajouté à la plaque, comme vous pouvez le voir dans l'exemple de l'image.

Unités de mise au point

Vous vous demanderez comment faire ce test si les virus ne causent pas de lyse, ne s'est pas ? L'astuce consiste à utiliser des anticorps spécifiques contre les protéines virales, marqués avec un colorant fluorescent. Ce type de test avec des réactifs marqués nous allons voir dans la vidéo 4.2. C'est une méthode plus rapide que l'essai de plaque, étant donné que les résultats peuvent être vus entre 24 et 72 heures après l'infection. Mais c'est plus cher, car nous aurons besoin plus réactifs.

TCID50

La TCID50 quantifie la quantité de virus nécessaire pour détruire ou nuire autre type d'effet cytopathique dans 50 % des cellules ou des cultures infectées. Il est considéré comme plus précis que les méthodes précédentes parce que les concentrations qui produisent l'effet 100 % peuvent varier considérablement, et la valeur de 50 % est la plus précise. Une formule mathématique est appliquée, dont nous discuterons en vidéo 4.1, qui est utilisé pour nombreuses autres mesures, comme déterminer la dose infectante 50, etc. La valeur de TCID50 diffère de la valeur de l'essai de plaque, et statistiquement, une unité TCID50 équivaut à 0,69 PFU unités.

Essais de protéines

La concentration virale peut aussi être quantifiée en déterminant la quantité de protéines, totale et spécifique, d'un virus. Cela peut être fait par l'intermédiaire de techniques d'hémagglutination, le Western Blot, ou immuno-essais ou ELISA. Nous allons parler de la plupart de ces techniques dans d'autres vidéos.

Certains laboratoires utilisent d'autres techniques, semblable à la suivante.

Pour quantifier les virus par cytométrie en flux (dont on reparlera dans video 4.4) deux fluorochromes différents sont utilisés : l'un à l'occasion des protéines virales et un autre à l'occasion de l'acide nucléique viral. PCR quantitative, dont nous allons voir dans la vidéo 3.3, mesure de l'ARN, tous deux associés aux virions et libre. Enfin, nous pouvons également quantifier la quantité de virus avec le microscope électronique à transmission que nous avons juste vu dans la vidéo précédente.

En utilisant l'un de ces systèmes nous pouvons quantifier approximativement le nombre de virions par millilitre. Un autre concept intéressant est celui du MOI. Cela signifie la multiplicité d'infection. C'est le nombre de virions d'être ajouté par cellule au cours de l'infection. Ainsi, si l'on ajoute 1 million des virus à 1 million de cellules, le MOI est un.

Comme vous pouvez le voir, différentes stratégies peuvent être suivies pour quantifier les virus. Ici nous avons parlé de quelques-uns, mais il y a beaucoup d'autres.

Je vous remercie beaucoup pour votre attention.