

# Diagnostic Virologique

Plan (en gras dans le plan les incontournables)

## I. Diagnostic indirect

## II. Diagnostic direct

### a. Les prélèvements

### b. Les antigènes viraux

### c. Détection des génomes viraux

Principe de la PCR

PCR en temps réel

RT PCR

Charge virale

Hybridation moléculaire (**hybridation in situ**, **génotypage**, ADN branché)

### d. Culture des virus

### e. Détection des virus par microscopie électronique

## III. Titrage des virus

### a. Titrage par dénombrement

### b. Titrage quantique

Une grande partie des infections virales sont diagnostiquées grâce aux symptômes observés chez le patient. On parle de **diagnostic clinique** (basé sur le tableau clinique). On l'utilise souvent parce que la maladie régressera d'elle-même et/ou qu'on n'a pas de traitement antiviral à proposer. Mais dans certaines situations, on a besoin d'identifier précisément le virus responsable ou la réponse immunitaire spécifique, notamment pour mettre en place un traitement et juger de son efficacité, ou pour faire des études épidémiologiques. C'est ce qu'on appelle le **diagnostic virologique**. Il peut se diviser en deux groupes de techniques : le diagnostic direct et le diagnostic indirect.

Le **diagnostic direct** consiste à mettre en évidence le virus lui-même, soit en isolant des particules virales, soit en ciblant les composés du virus, ses protéines ou son génome. On pouvait aussi « identifier » les particules virales par microscopie électronique (mais ce n'est plus le cas en routine).

Le **diagnostic indirect** ou sérologique consiste en la recherche des anticorps spécifiques d'un virus. Il peut être réalisé par différentes techniques comme l'ELISA ou le Western Blot.

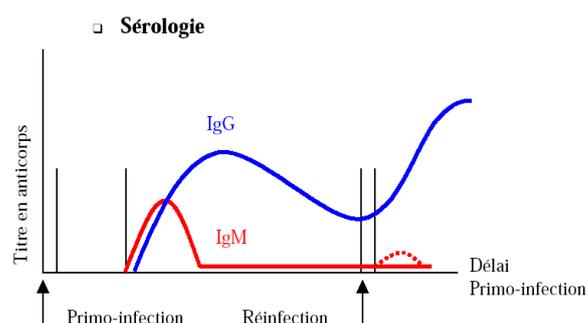
En fonction des raisons pour lesquels on fera un diagnostic on utilisera une technique différente (voir ED2).

## I. Diagnostic indirect

Le **diagnostic indirect** permet de rechercher les anticorps spécifiques d'un virus donné : il s'agit de tests sérologiques pour déterminer si un sujet est séropositif. Le prélèvement utilisé est le sang.

On parle de séroconversion lorsqu'un patient est séronégatif lors d'un premier prélèvement et se révèle séropositif lors d'un second prélèvement.

On met en évidence des immunoglobulines, des IgG et des IgM. Les IgG sont plus longues à apparaître mais

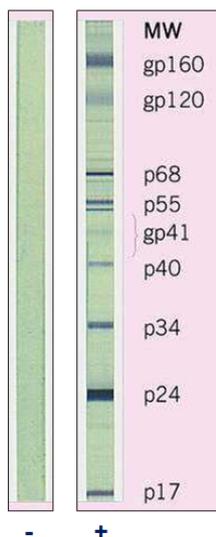
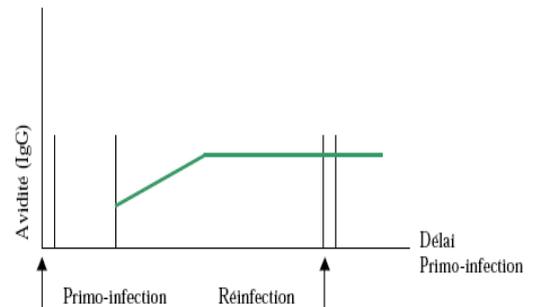


persistent pendant l'ensemble de la vie d'un être humain (voir Figure). Les IgM apparaissent plus rapidement mais sont transitoires.

Dans le cas de virus responsables d'infections latentes comme les Herpesvirus, les IgM peuvent être présents non seulement au cours des primo-infections (Primo-infection = Envahissement, pour la première fois, de l'organisme par un agent infectieux), mais également au cours des réactivations (processus de bascule d'un état latent à une multiplication active d'un virus – voir cours 3). Or les pathologies sont souvent plus graves au cours des primo-infections que des réactivations car l'organisme ne possède pas encore d'anticorps spécifiques. Il sera donc important de différencier primo-infection et réactivation grâce au diagnostic.

On peut alors utiliser l'**avidité des IgG** :

Au début, lorsque les IgG apparaissent, leur avidité envers l'antigène est plus faible. Cette avidité s'accrue avec le temps. On sait donc qu'une avidité faible est synonyme d'une infection récente (voir Figure à droite).



Pour mettre en évidence **des anticorps**, on peut utiliser une technique ELISA mais aussi un Western Blot (voir Figure à gauche). La technique du western blot consiste à faire migrer des protéines virales sur un support inerte en fonction de leur poids moléculaire. Ces protéines virales n'ont pas été obtenues chez le patient mais en laboratoire. Il faut ensuite mettre ces bandelettes en présence du prélèvement du patient pour que ses anticorps se fixent aux antigènes viraux. Il s'agit donc d'une technique sérologique. La photo représente un WB pour le VIH-1 et on peut détecter des anticorps dirigés contre les différentes protéines du VIH-1. La bandelette de gauche est négative celle de droite est positive car on voit plus de trois bandes différentes.

Le western blot, bien que permettant la séparation de protéines en fonction de leur poids moléculaire, permet ici de détecter des anticorps spécifiques chez un patient. C'est une technique indirecte.

## II. Diagnostic direct

### a. Les prélèvements

Différents types de prélèvements peuvent être utilisés. On peut utiliser le sang (la virémie signifie la présence de virus dans le sang), les selles, les sécrétions nasales (aspiration nasopharyngée, écouvillonnage nasal), les urines, les prélèvements cutanés (vésicules, ulcérations), les prélèvements génitaux, les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), le liquide céphalo-rachidien (LCR) et la salive. Les virus sont fragiles, ils sont présents dans les cellules infectées, qui elles-mêmes survivent dans des conditions particulières. Un bon prélèvement devra donc être riche en cellules infectées. Le prélèvement doit être bien fait (quantité suffisante, bonnes conditions de transport, transfert rapide vers le laboratoire),

Le choix du site de prélèvement doit être fait selon les signes cliniques, selon les virus recherchés et en fonction de la physiopathologie de l'infection virale.

A partir de ce prélèvement, on peut faire différents tests pour identifier le virus ou la réponse immunitaire spécifique de ce virus.

### **b. Identification des antigènes viraux**

On peut mettre en évidence les protéines virales, ou antigènes viraux. Nous avons à notre disposition des anticorps spécifiques d'un grand nombre d'antigènes viraux détectables par des techniques d'immunofluorescence ou par des procédés immunoenzymatiques. Des tests de détection rapide (TDR) reposent aussi sur la mise en évidence de protéines virales grâce à des anticorps spécifiques.

Les antigènes viraux sont détectés rapidement et directement grâce à ces anticorps spécifiques. La technique est applicable aux virus non cultivables, en recherchant les antigènes viraux directement dans un prélèvement qui contient des cellules infectées.

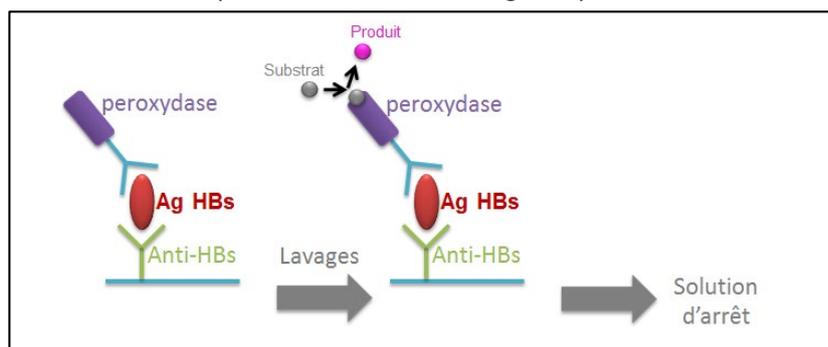
Voici quelques exemples.

### **ELISA**

On peut mettre en évidence les antigènes viraux grâce à des techniques ELISA en utilisant des anticorps spécifiques fixés sur une plaque

(par exemple pour mettre en évidence l'Ag HBs du virus de l'Hépatite B ou la protéine p24 du VIH-1).

#### *Principe de la détection de l'Ag HBs par ELISA*



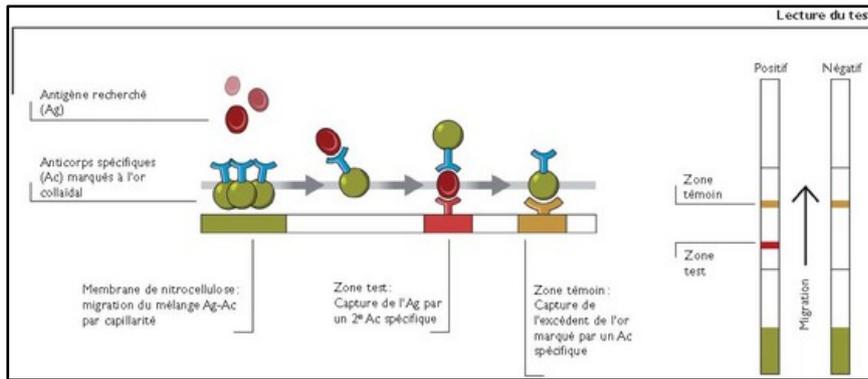
On peut détecter HSV-1 et HSV-2 par des techniques d'immunofluorescence, qui permettent même de les discriminer malgré leurs homologies. On peut aussi mettre en évidence le cytomégalovirus humain dans le sang.

### **Tests de diagnostic rapide**

Ce sont des tests qui détectent des antigènes viraux grâce à des anticorps spécifiques. Ils sont spécifiques d'un virus précis et en général adaptés à un seul type de prélèvement. On va trouver les techniques d'immunochromatographie sur membrane ou bandelette et les techniques d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques. C'est la technique utilisée pour les tests antigéniques contre le SARS-CoV2.

### **Immuno-chromatographie**

Le prélèvement, préalablement mis en contact avec un tampon d'extraction/migration, est déposé à l'une des extrémités d'une membrane. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec des anticorps spécifiques qui sont marqués avec une bille de couleur ou de l'or colloïdal. Le tampon va entraîner la migration sur la membrane par capillarité du complexe antigène/anticorps ainsi formé qui sera stoppée par des anticorps fixés à un certain niveau de la membrane. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée. Un contrôle interne permet de valider le test.



Ces techniques permettent par exemple de détecter les rotavirus, les norovirus et les adénovirus dans les selles dans le cas d'une gastro-entérite aiguë. On peut également rechercher le virus de la grippe ou le virus respiratoire syncytial dans le nasopharynx (écouvillonnage nasopharyngé). C'est la technique utilisée pour rechercher le SARS-CoV-2 à partir d'un écouvillonnage nasopharyngé.

### c. Détection des génomes viraux.

On pourra détecter les génomes viraux soit après **amplification génique**, soit par une technique d'**hybridation** (et dans ce cas le signal qu'on va amplifier). La principale technique d'amplification de l'ADN est la PCR, mais il en existe de nombreuses variantes. Il existe aussi des techniques d'amplification de l'ARN (NASBA et TMA). Elles sont peu utilisées maintenant (du coup elles ne seront pas détaillées ici mais sachez qu'elles existent).

#### 1) Principe de la PCR (normalement c'est un rappel)

La PCR (*polymerase chain reaction*) est une réaction de polymérisation en chaîne. C'est une technique d'amplification génique qui permet de synthétiser de l'ADN en grande quantité grâce à une enzyme majeure : la Taq polymérase, qui est une ADN polymérase thermophile efficace à 72°.

On utilise un thermocycleur : c'est un appareil permettant d'effectuer des changements de température, dont dépend le bon déroulement des étapes de PCR.

Le support de la PCR est une matrice d'ADN double brin (db), et deux amorces simple brin (sb).

-Etape 1 : Dénaturation

On cherche à obtenir de l'ADN sb à partir de la matrice db. On augmente pour cela la température (95°C), ce qui dénature la matrice et permet d'obtenir deux brins séparés.

-Etape 2 : Hybridation

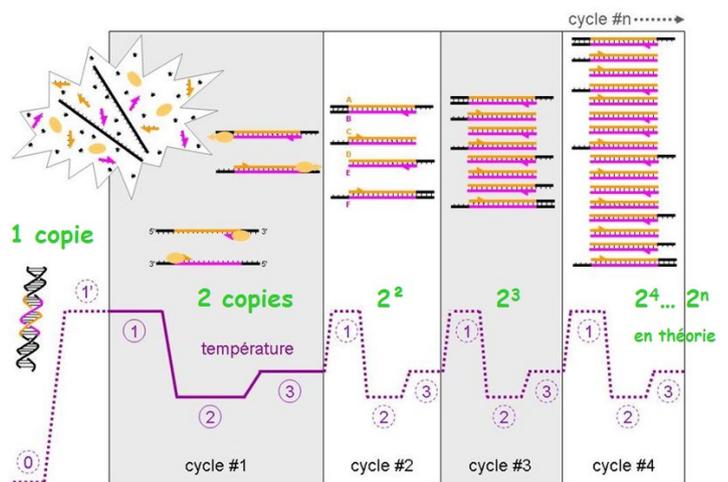
On abaisse la température (55°). Les amorces sb, complémentaires des l'extrémité des deux brins de la matrice, s'y fixent alors.

## Principe de la PCR (polymerase chain reaction)

-Etape 3 : Elongation

On élève de nouveau la température à 72°, température de fonctionnement optimal de la Taq polymérase qui synthétise les deux brins d'ADN complémentaires des 2 matrices sb.

Ce cycle est répété un nombre « n » de fois, et on obtient en théorie  $2^n$  brins d'ADN. Une telle quantité de matériel génétique est plus facilement détectable et exploitable.



## 2) PCR en temps réel

C'est la technique la plus utilisée dans le domaine de la virologie. Le principe est identique à celui de la PCR classique mais permet en plus de révéler la quantité d'ADN synthétisée au cours de l'amplification. A cette fin, il est nécessaire qu'un signal proportionnel à la quantité produite soit émis au fur et à mesure, qu'un outil puisse mesurer ce signal, et que des outils informatiques puissent l'analyser.

### Chimies de fluorescence

Deux techniques sont utilisées pour détecter le signal au fur et à mesure :

- Utilisation d'agents liant l'ADN db = agents intercalants, le plus utilisé étant le SYBR green. La sensibilité est très augmentée avec cette technique car elle ne s'hybride qu'aux produits de PCR (car le SYBR green se lie à l'ADN double brin uniquement).

- Utilisation de sondes nucléotidiques spécifiques complémentaires qui se lient aux séquences nucléotidiques du virus et qui émettent de la fluorescence grâce à la présence de fluorochromes fixés sur la séquence nucléotidique. Cette fluorescence suit le principe de FRET qui permet de transmettre de l'énergie entre deux fluorophores proches l'un de l'autre. Plusieurs méthodes en découlent :

- L'hydrolyse de sonde, avec la sonde Taqman
- Hybridation de deux sondes,
- Molecular beacons*, balises moléculaires

L'avantage des sondes par rapport au SYBR green c'est que la spécificité et la sensibilité sont augmentées.

## 3) RT-PCR

C'est la technique utilisée pour mettre en évidence le génome des virus à ARN. Le principe est identique à celui de la PCR en temps réel mais il y aura une étape avant la PCR qui utilise la RT (reverse transcriptase ou transcriptase inverse). On utilise cette enzyme pour transformer l'ARN du virus en ADNc car seul l'ADN peut être amplifié par PCR. C'est notamment la technique utilisée pour diagnostiquer le SARS-CoV-2 au laboratoire, mais elle est utilisée pour tous les virus à ARN (grippe, rougeole, VIH, VHC...).

#### 4) Charge virale

Les techniques vues précédemment permettent de quantifier les acides nucléiques viraux, et donc les virus eux-mêmes et donc de déterminer ce qu'on appelle la **charge virale**. La charge virale correspond à la quantité de virus présent dans le sang (on peut également déterminer la charge virale dans le LCR ou le liquide amniotique par exemple, mais on parle du sang par défaut).

La détermination de la charge virale permet de suivre avec précision le développement d'une infection, notamment chez les personnes greffées sensibles à certaines infections virales. Par exemple, la charge virale est actuellement souvent utilisée comme outil de suivi dans les infections par le virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), de l'immunodéficience acquise (VIH) ou le cytomégalovirus.

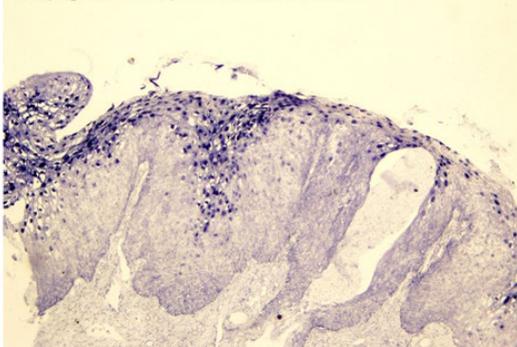
Si une charge virale est détectée chez un patient, on conclut non pas forcément que le sujet est malade (symptomatique), mais que le virus est en train de se multiplier dans l'organisme (dans le contexte de patients greffés et immunodéprimés). On peut alors mettre en place un traitement qu'on qualifie d'anticipé (*preemptive treatment* en anglais). L'étude de la charge virale dans l'organisme du sujet traité permet aussi de vérifier l'efficacité du traitement, l'objectif étant de parvenir à une charge virale indétectable (on ne dit pas nulle parce que ces techniques ont un certain seuil de sensibilité).

#### 1) Hybridations moléculaires

Passons maintenant aux techniques d'hybridation moléculaire où l'on n'amplifie pas l'acide nucléique mais le signal de détection. L'**Hybridation *in situ*** permet d'étudier la distribution histologique du génome viral (dans quels tissus) et cytologique (dans quels types cellulaires), grâce à des sondes oligonucléotidiques spécifiques du génome viral et marquées.

Cette technique est largement utilisée dans le suivi des cancers viro-induits, notamment induit par les papillomavirus ou le virus Epstein-Barr.

Papillomavirus HPV16 responsable de cancer du col de l'utérus  
Marquage dans le noyau des cellules infectées



Ici une photo montrant une biopsie du col de l'utérus, où le papillomavirus HPV16 est mis en évidence dans le noyau des cellules infectées (en bleu/violet).

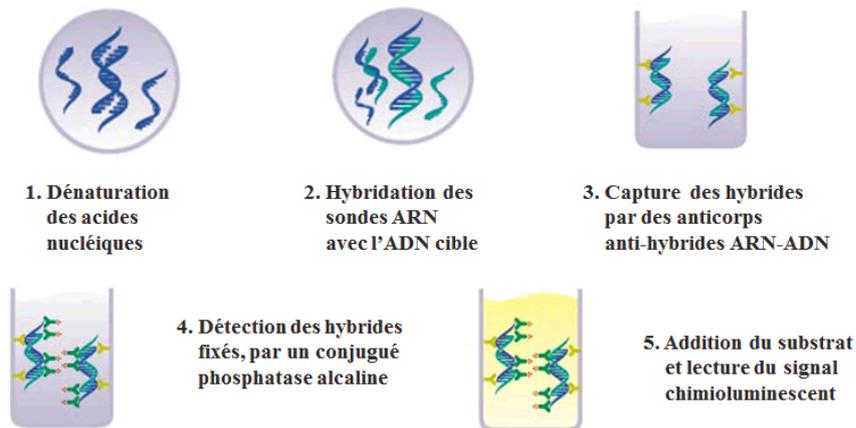
**Hybridation en phase liquide** (Digene HPV test). On utilise ce test diagnostique également pour la détection des papillomavirus (HPV), mais il ne permet pas d'identifier précisément le génotype du virus. On utilise une sonde détectant 13 HR-HPV (HR pour haut risque oncogène) et 5 LR-HPV (LR pour *low risk*).

On dénature le génome à ADN des papillomavirus puis on le met en présence de sondes d'ARN complémentaires au génome des HPV. Elles s'y hybrident.

Ces hybrides (et eux seuls) ADN/ARN sont captés par des anticorps anti-hybrides ADN/ARN fixés dans un « puits » qui les retient, les acides nucléiques non hybridés ne sont pas capturés.

Ces hybrides fixés sont détectés par un autre anticorps conjugué à la phosphatase alcaline (enzyme) à laquelle on additionne un substrat qui réalise une réaction colorimétrique avec l'enzyme. Un signal chimioluminescent détectable est produit.

Cette méthode est utilisée pour la détection des papillomavirus à haut risque oncogène.



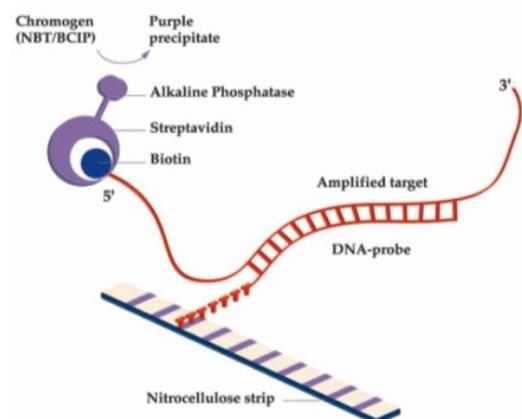
### Génotypage des papillomavirus

Les papillomavirus n'étant pas tous oncogènes, il est intéressant de déterminer à quel génotype ils appartiennent. Il existe des techniques de génotypage basées sur l'hybridation inverse. LiPA (pour *Line Probe Assay*) est une technique qui utilise des sondes spécifiques de chaque génotype que l'on fixe sur un support inerte (membrane de nitrocellulose).

Précédemment, on effectue une PCR de l'ADN à génotyper avec fixation, sur chaque extrémité 5' des produits, d'une protéine appelée biotine.

Les produits de PCR sont mis en contact avec la membrane de nitrocellulose (après dénaturation, car il faut de l'ADN sb). Il y aura hybridation de la sonde et du produit de PCR en fonction du génotype.

L'ADN sb biotinylé réagit avec de la streptavidine conjuguée à une phosphatase alcaline. L'ajout d'un substrat chromogène entraîne la coloration d'une bande à un endroit où s'est fixé le produit de PCR. Ces profils sont interprétables et permettent d'identifier le génotype.



*Pour ceux qui veulent en savoir plus*

### Technique de l'ADN branché

Pour la technique de l'ADN branché, on dispose de plusieurs sondes complémentaires de différentes régions du génome à détecter. La diversité des virus détectables étant grande, les techniques doivent être robustes de sorte à ne pas passer à côté d'un virus variant.

Ces sondes spécifiques s'hybrident avec l'ARN (dans le cas du VIH) cible. Ces sondes sont elles-mêmes accrochées à des sondes de capture, elles-mêmes fixées sur le fond de micro-plaques. L'ARN est donc fixé au fond de la plaque, il est nécessaire de le détecter.

D'autres sondes se fixent sur le génome, étant elles-mêmes fixées à un système pré-amplificateur sur lequel viennent s'accrocher d'autres sondes. C'est par ce système qu'est obtenue l'amplification du signal.

Ses applications sont courantes et permettent la détection de virus très variables génétiquement (VIH, HCV, HBV...).

Le signal luminescent est proportionnel au nombre de molécules d'acide nucléique viral adsorbées. L'utilisation simultanée de nombreuses sondes ramifiées, complémentaires de différentes régions du

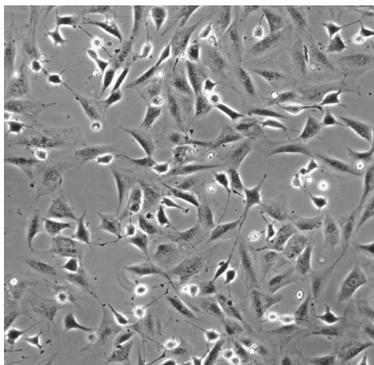
génomique virale cible, permet la détection de virus génétiquement très variables (HIV, HCV). Le grand nombre de molécules lumineuses en jeu permet une diminution du seuil de détection, sans risque de contamination (il n'y a pas d'amplification de l'acide nucléique, contrairement à une PCR).

#### d. Culture des virus

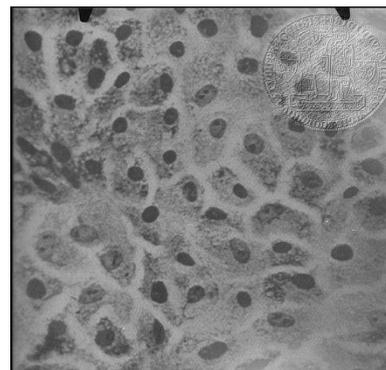
L'isolement des virus par culture est un autre diagnostic direct. Les virus sont des parasites obligatoires de la cellule et ne peuvent pas donc pas être cultivés dans un simple milieu de culture comme les bactéries. On infecte donc des cellules cultivées en laboratoire avec un prélèvement de patient pour isoler les virus, c'est-à-dire pour les multiplier. L'isolement des virus a **longtemps constitué la technique de référence dans le diagnostic virologique** mais ce n'est souvent **plus le cas aujourd'hui** avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire comme la PCR.

On va déposer un prélèvement provenant d'un malade (et contenant potentiellement un virus) sur un tapis cellulaire (des cellules confluentes cultivées sur du plastique constituent un tapis cellulaire) et on va regarder si le virus produit un effet cytopathique. Cela correspond à des modifications de la cellule que l'on peut observer au microscope optique. On a aussi utilisé ce qu'on appelle l'hémadsorption, qui consiste à mettre des hématies en contact avec les cellules infectées et on observe dans certains cas, le fait que les globules rouges se fixent aux cellules infectées.

Ceci permet de s'affranchir du fait que les virus sont trop petits pour être visualisés directement au microscope.



Fibroblastes



Cellules épithéliales

Voici deux photos de cellules qui présentent des formes très différentes. Des fibroblastes qui ont une forme allongée et un cytoplasme de grande taille. Les cellules épithéliales sont plus petites et forment des tapis confluents.

La difficulté majeure rencontrée lors de la culture de virus est le choix du type cellulaire le plus approprié au virus recherché. En effet, il n'existe pas de lignée cellulaire universelle dans laquelle tout virus peut être détectable. On a besoin ainsi de cultiver plusieurs types cellulaires au laboratoire.

Comme on ne peut pas visualiser directement un virus, même au microscope optique, on va observer les effets que celui-ci cause à la cellule, des dommages (effets cytopathiques), des inclusions dans le cytoplasme ou le noyau ou encore des modifications de propriétés de sa surface (hémadsorption). Aujourd'hui, on va essentiellement utiliser des anticorps spécifiques des protéines virales pour reconnaître les cellules infectées.

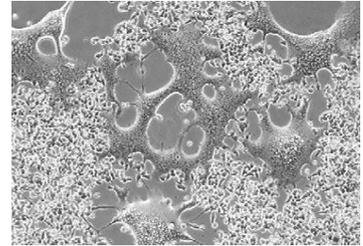
## Effet cytopathique

L'un des moyens d'observer la présence de virus après mise en culture est de prêter attention aux effets cytopathiques : ce sont les dommages causés à la cellule hôte par le virus (tous les virus ne sont pas cytopathogènes).

On retrouve deux types majeurs d'effets cytopathiques.

- Modification de l'architecture de la cellule :

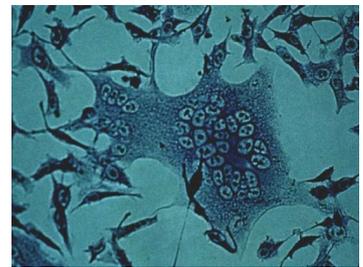
Les cellules peuvent s'agrandir, grossir, devenir réfringentes. A terme, ces cellules se décollent de leur support et meurent. Leur membrane va se rompre et on observe alors une lyse cellulaire.



- Modification de la morphologie de la cellule :

Ce type de modification aboutit à la formation d'un syncytium. Ce terme désigne une « cellule géante » contenant plusieurs noyaux, formée par la fusion membranaire de plusieurs cellules.

(pour info un syncytium au singulier, des syncytia au pluriel)



## e. Détection des virus par Microscopie électronique

*Pour ceux qui veulent en savoir plus.*

L'intérêt de la microscopie électronique est surtout pour la recherche et **n'est plus pour le diagnostic** maintenant. La microscopie électronique permet l'étude morphologique des virus et également d'étudier les virus à l'intérieur des cellules. Le grossissement est de 100 000 à 150 000. Pour avoir un pouvoir de résolution élevée (1nm) il faut une longueur d'onde très courte. Les électrons peuvent se comporter comme une longueur d'onde très courte. Il faudra faire le vide absolu à l'intérieur du microscope pour permettre une propagation linéaire des électrons.

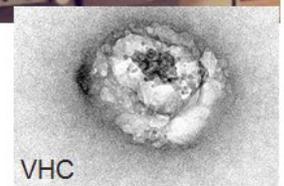
Comme les électrons ont un faible pouvoir de pénétration (< 0,2m), ils traversent ou non l'échantillon en fonction de l'épaisseur et de la nature des atomes. Si l'épaisseur est importante ils seront absorbés et déviés. Si elle est faible, le faisceau d'électron traversera l'échantillon et imprimera l'écran.

Plus les atomes sont lourds, plus les électrons sont déviés.

Mais la matière vivante est composée en majorité d'atomes de faible PM (C,O,N,H), ce qui entraîne un faible contraste des images.

Pour augmenter les contrastes, on utilise des méthodes de « coloration par des métaux lourds ».

En diagnostic, il faut des concentrations virales supérieures à 100000 particules virales par ml pour voir les virus. Cela est le cas dans les selles au cours des gastro-entérites virales.



### III. Titrage des virus

*Il ne s'agit pas à proprement parler d'une technique de diagnostic.*

*C'est pour ceux qui veulent en savoir plus.*

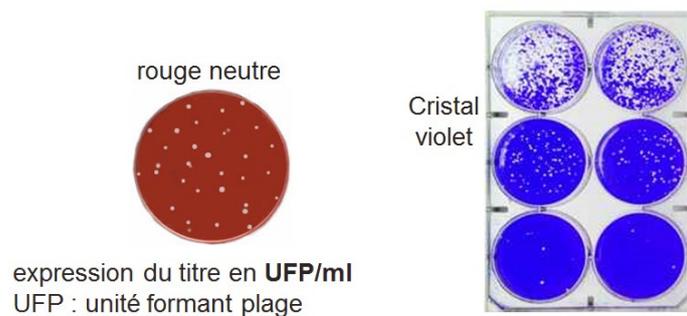
L'objectif du titrage est de pouvoir dénombrer les virus, mais leur petite taille ne permet pas de le faire directement. On va donc faire une appréciation quantitative fondée sur l'action des virus sur un système sensible vivant. Ce dernier doit être vivant (puisque les virus sont des parasites obligatoires), cela peut donc être un animal, un œuf embryonné (un œuf de poule fécondé dans lequel l'embryon du poussin a commencé à se former - très utilisé en virologie, dans l'industrie des vaccins). Ces techniques ne servent qu'à dénombrer les particules virulentes c'est-à-dire les particules infectieuses. Un titrage n'est possible que si le virus cause un effet cytopathique.

Comment cette technique fonctionne-t-elle ?

On va mettre en contact des dilutions de notre échantillon avec des lots homogènes du système sensible. Il y a 2 types de titrages : un par dénombrement (on va compter les lésions) et l'autre est un titrage quantique où des méthodes statistiques vont être utilisées pour calculer le titre.

#### a. titrage par dénombrement

Le **titrage par dénombrement** : consiste à compter le nombre de lésions sur le système sensible. Ce titrage se fait essentiellement sur culture cellulaire (on observe des plages de lyse), mais aussi sur des œufs et on observe par exemple des vésicules à la surface des membranes de l'œuf. A chaque fois que l'on verra une lésion on compte une unité virulente, sous-entendu un virus. Sur une culture cellulaire on met en évidence des plages de lyse (des trous dans le tapis confluent des cellules), c'est la méthode des plages mise au point par DULBECCO.



En quoi consiste la méthode des plages mise au point par DULBECCO ?

On va partir d'un tapis cellulaire confluent (on cultive les cellules sur une petite surface plastique ( un puit) et les cellules en se multipliant vont se toucher et former un tapis). On infecte ces cellules avec la suspension virale que l'on veut titrer. On va le faire à plusieurs dilutions dans plusieurs puits. Cela fait, on va recouvrir les cellules par un milieu gélifié nutritif et on va attendre quelques heures/jours. Il se formera des plages de lyse (des trous dans le tapis cellulaire) qui seront visibles à l'œil nu. Pour plus facilement les visualiser, on va colorer les cellules restantes avec du rouge neutre ou du cristal violet.

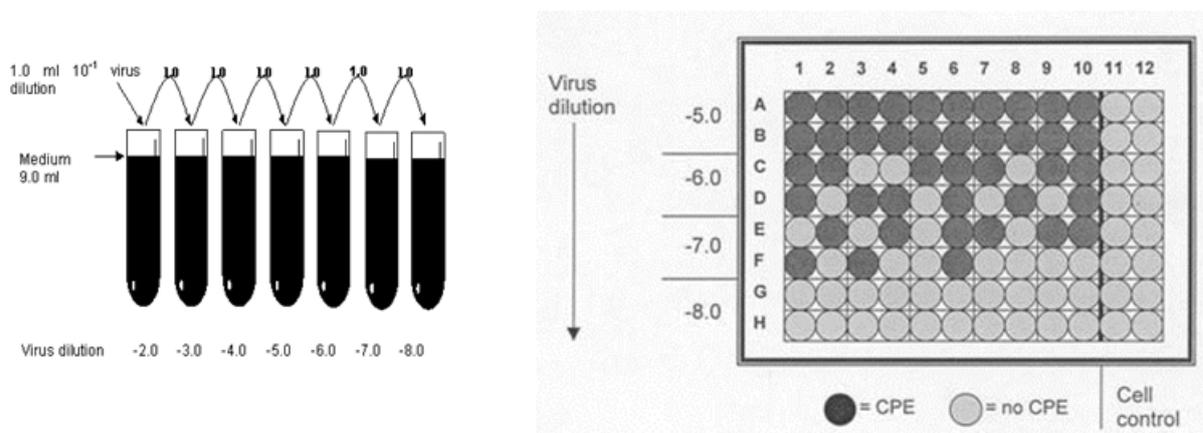
Comment ça marche ? En temps normal, le virus rentre dans la cellule, puis se multiplie à l'intérieur, et finit par en sortir pour se retrouver dans le surnageant. Le virus se déplace ensuite au gré des mouvements du surnageant pour aller infecter des cellules plus ou moins proches de la cellule de départ, donc le tapis cellulaire va être globalement endommagé. Cependant, si la culture de cellules est recouverte d'un milieu gélosé, le virus va être « coincé » à l'intérieur de ce milieu à la sortie de la cellule, cela implique que seuls les virus sortant à proximité d'une cellule vont pouvoir l'infecter. La première

cellule infectée va être détruite puis celle juste à côté va l'être également, et ainsi de suite...Si on attend suffisamment longtemps, il apparaît des plages de lyse (points blancs sur l'image de la diapo) visibles à l'œil nu (on utilise quand même une loupe pour compter). Le comptage des plages de lyse sera fait après coloration de toutes les cellules avec du rouge neutre ou du cristal violet. On considère que là où il y a une plage de lyse il y avait au départ dans la suspension un virus. Cependant on ne peut pas définir le nombre de virus par ml d'échantillon, on utilise la terminologie UFP (pour : Unité Formant Plage, PFU en anglais pour « *Plaque Forming Unit* ») par ml. On choisit une dilution qui permet de compter les plages facilement (ni trop ni trop peu).

### b. Titrage quantique

La seconde méthode de titrage c'est le titrage quantique. C'est une méthode du « tout ou rien » : soit on voit un effet sur le système utilisé, soit on en voit pas. Pour des cellules, on observe des effets cytopathiques, mais si on travaille sur l'animal on détermine s'il est vivant ou mort, et c'est la même chose pour l'œuf embryonné (embryon vivant ou mort). Cela va permettre de calculer la Dose Infectante 50%, autrement dit la dose qui provoque un effet toxique sur 50% des tapis cellulaires ou qui tue 50% des animaux.

Le titrage se fait généralement sur des plaques de 96 puits, puisque c'est une technique statistique il faut une grande répétition des mêmes conditions. On va donc faire différentes dilutions de suspensions virales qui vont être réparties dans les puits. Après l'incubation, on attend de voir s'il y a apparition d'un effet cytopathique ou pas. Par cette technique et à l'aide des tables statistiques on établit le calcul du titre.



L'illustration montre des dilutions de 10 en 10 des suspensions de virus. On peut voir des dilutions -5,-6,-7,-8 répétées chacune d'elle 20 fois ; le puits est noir quand il y a un effet cytopathique (CPE), et blanc quand il n'y en a pas (no CPE). On va ensuite se placer sur une ligne de dilution où il y a à la fois des puits avec des effets cytopathiques et des puits où il n'y en a pas, pour les comptabiliser et donc connaître le titre. Le titre s'exprime ici en DIC50 (dose infectieuse culture cellulaire 50%), c'est la dilution de suspension virale qui donne 50 % de réponses positives en culture de cellules.

Cette technique est reproductible et très facile à mettre en œuvre, ce qui est un avantage par rapport au titrage par dénombrement. Le titrage quantique est cependant moins précis.