

50376
1995
3

gen 20103638

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour obtenir le titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Spécialité : BIOLOGIE MOLECULAIRE

par

Christine DEFER

Sujet :

**BIOLOGIE MOLECULAIRE ET VIRUS TRANSMISSIBLES
PAR LES PRODUITS SANGUINS : ETUDE DU VHC,
DE L'HTLV ET DU PARVOVIRUS B19**

SOUTENUE LE : 10 janvier 1995

Devant le Jury composé de :

Professeur André VERBERT
Docteur Anne-Marie COUROUCE
Professeur Francis BARIN
Professeur Frédéric MORINET
Docteur Jean-Jacques HUART
Docteur Michèle MANIEZ

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé sous la responsabilité de Madame le Docteur Michèle Maniez-Montreuil, dans le Laboratoire d'Immunologie des Maladies Virales (Secteur Biologie Moléculaire des Virus) du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille, dirigé par Monsieur le Docteur Jean-Jacques Huart.

Je tiens à remercier :

Madame le Docteur Michèle MANIEZ pour m'avoir encouragée et conseillée dans la conduite de ce travail. Son expérience, ses critiques et suggestions m'ont toujours été très précieuses. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié. J'espère que cette thèse est à la mesure de la confiance qu'elle m'a accordée.

Monsieur le Professeur André VERBERT pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.

Madame le Docteur Anne-Marie COUROUCE et Monsieur le Professeur Francis BARIN pour l'honneur qu'il me font en acceptant de juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur Frédéric MORINET d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Monsieur le Docteur Jean-Jacques HUART pour avoir permis la réalisation de cette thèse. Qu'il trouve ici l'assurance de mon profond respect et l'expression de toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée.

Madame le Docteur Marie-Véronique DUPRESSOIR pour ses précieux conseils, nos échanges fructueux et son soutien constant.

Madame Frédérique DESCAMPS pour m'avoir enseigné les rudiments de la PCR.

Mesdemoiselles Isabelle LEPOT et Catherine DEMEULNAERE pour leur travail efficace et leur bonne humeur permanente car cette thèse est aussi un travail d'équipe. Je leur exprime ma reconnaissance et mon amitié.

Tous les collègues des laboratoires d'Immunologie des Maladies Virales et d'Ingénierie Moléculaire pour leur participation professionnelle et amicale.

Madame Isabelle COVIN pour la frappe des tableaux et son aide efficace.

Madame le Docteur Armelle PARQUET, chef du laboratoire Hémostase Analyses, pour m'avoir permis d'étudier certains de ses patients et pour sa précieuse collaboration.

Le personnel du laboratoire Hémostase Analyses pour la collecte des prélèvements, et plus particulièrement Colette GRAVEZ pour sa disponibilité.

Monsieur Olivier SPRIET, chef du service Informatique, et Mademoiselle Nathalie DORDAIN qui a fait preuve d'une extraordinaire efficacité pour la mise en page et la réalisation des figures de ce manuscrit.

Messieurs Jean-Pierre RIAU et Fabrice GAUDFRIN, du service Imprimerie, pour la reproduction de cette thèse.

Monsieur Sigismond LECSZINSKI pour la réalisation des photographies.

Toute ma famille pour son soutien et sa compréhension.

SUMMARY

RESUME

INTRODUCTION

	Pages
<u>VIRUS DE L'HEPATITE C</u>	
<u>I HISTORIQUE</u>	12
I-1 L'hépatite non-A, non-B à transmission parentérale	12
I-2 Virus des hépatites et transfusion sanguine.....	13
I-2-1 Le marqueur direct Ag Hbs.....	13
I-2-2 Les marqueurs indirects	13
<u>II LE VIRUS DE L'HEPATITE C</u>	15
II-1 Découverte du virus grâce à la biologie moléculaire.....	15
II-2 Le VHC : un virus apparenté à la famille des Flaviviridae.....	16
II-3 Structure et organisation génomique	17
II-3-1 La région 5' non codante (5'NC).....	18
II-3-2 Les protéines structurales.....	19
II-3-3 Les protéines non structurales.....	19
II-3-4 La région 3' non codante (3'NC).....	20
II-4 Variabilité génomique du VHC	20
II-4-1 Distribution des génotypes.....	24
II-4-2 Apport du génotypage	24
II-4-3 Techniques de génotypage du VHC	25
<u>III TESTS SEROLOGIQUES</u>	27
III-1 Les tests de dépistage	28
III-1-1 Le test Ortho HCV 1.0 ELISA	28
III-1-2 Le test Ortho HCV 2.0 ELISA	28
III-1-3 Le test actuel Ortho HCV 3.0 ELISA.....	29
III-2 Le test de validation « Recombinant Immunoblot Assay » (RIBA).....	29
III-2-1 Le RIBA-1	29
III-2-2 Le RIBA-2	30
III-3-2 Le test actuel RIBA-3	30
<u>IV EPIDEMIOLOGIE</u>	33
IV-1 Transfusion sanguine et VHC	34
IV-2 Hémophilie et VHC	35
<u>V ASPECTS CLINIQUES</u>	36
V-1 Hépatite aigüe	36

V-2 Hépatite chronique.....	38
<u>VI TRAITEMENT</u>	39
VI-1 Interferon alpha	39
VI-2 Autres traitements.....	39
VI-3 Indications de la PCR au cours du traitement	40
<u>VIRUS HTLV</u>	
<u>I HISTORIQUE</u>	44
<u>II CLASSIFICATION DES RETROVIRUS</u>	45
II-1 Les spumavirus	45
II-2 Les lentivirus.....	46
II-3 Les oncovirus	46
<u>III LES VIRUS HTLV</u>	46
III-1 Morphologie	46
III-2 Génome viral	47
III-3 Expression des gènes viraux.....	48
III-3-1 Gag.....	48
III-3-2 Pol.....	48
III-3-3 Env.....	48
III-3-4 Le gène pX.....	50
<u>IV DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE</u>	50
IV-1 Trousses de dépistage.....	50
IV-2 Trousses de confirmation et de différenciation	51
IV-2-1 Tests de confirmation de première génération	51
IV-2-2 Tests actuels	52
IV-2-3 Modification des critères de positivité du western-blot par le Groupe Rétrovirus de la S.F.T.S.	53
<u>V EPIDEMIOLOGIE</u>	54
V-1 HTLV-I.....	54
V-1-1 Dans le monde	54
V-1-2 En France	54
V-2 HTLV-II.....	54
V-3 Transmission.....	55
V-3-1 Transfusion sanguine et HTLV	55
V-3-2 Toxicomanie et HTLV.....	55
V-3-3 Transmission sexuelle et HTLV	55
V-3-4 Transmission mère-enfant et HTLV	56

<u>VI PATHOLOGIES ASSOCIEES</u>	56
VI-1 Leucémie T de l'adulte	56
VI-2 Paraparésie spastique tropicale/Myélopathie chronique associée au virus HTLV-I	57

PARVOVIRUS B19

<u>I HISTORIQUE</u>	58
----------------------------------	----

<u>II PARVOVIRUS B19</u>	58
---------------------------------------	----

II-1 Classification.....	58
--------------------------	----

II-2 Morphologie.....	58
-----------------------	----

II-3 Génome viral.....	58
------------------------	----

II-4 Protéines virales	59
------------------------------	----

II-4-1 Protéines non structurales : les protéines NS1 et NS2.....	60
---	----

II-4-2 Protéines structurales : les protéines VP1, VP2 et VP3.....	60
--	----

II-5 cycle de réplication	60
---------------------------------	----

<u>III DIAGNOSTIC</u>	61
------------------------------------	----

III-1 Détection directe du parvovirus B19	61
---	----

III-1-1 Virus	61
---------------------	----

III-1-2 Protéines	62
-------------------------	----

III-1-3 ADN.....	62
------------------	----

III-1-4 Culture	62
-----------------------	----

III-2 Diagnostic d'une infection à parvovirus B19	62
---	----

<u>IV CLINIQUE</u>	63
---------------------------------	----

IV-1 Erythème infectieux (EI) et Parvovirus B19	63
---	----

IV-2 Aplasie médullaire et Parvovirus B19.....	63
--	----

IV-3 Infection foetale et Parvovirus B19	64
--	----

IV-4 Arthropathies et Parvovirus B19	65
--	----

<u>V EPIDEMIOLOGIE</u>	65
-------------------------------------	----

POLYMERASE CHAIN REACTION

<u>I GENERALITES</u>	67
-----------------------------------	----

<u>II PRINCIPE DE LA TECHNIQUE</u>	67
---	----

<u>III APPLICATIONS DE LA PCR</u>	69
--	----

III-1 RT-PCR	69
--------------------	----

III-2 Nested-PCR	70
------------------------	----

III-3 PCR quantitative.....	71
-----------------------------	----

III-4 PCR asymétrique	71
III-5 Modification de l'ADN par l'intermédiaire des amorces	72
<u>IV ANALYSE DU PRODUIT AMPLIFIÉ</u>	73
<u>V PRECAUTIONS DANS L'UTILISATION DE LA PCR</u>	74
<u>BUT DU TRAVAIL</u>	75
 <u>MATERIEL ET METHODES</u>	
<u>PCR</u>	77
<u>I CONDITIONS STANDARD D'AMPLIFICATION</u>	77
<u>II ANALYSE DES PRODUITS AMPLIFIES</u>	78
II-1 Electrophorèse	78
II-2 Southern-blot	78
II-3 Hybridation avec une sonde radioisotopique	79
II-3-1 Marquage de la sonde	79
II-3-2 Préhybridation et hybridation	79
II-3-3 Lavages	80
II-3-4 Autoradiographie	80
<u>III VALIDATION DE LA TECHNIQUE PCR DU LABORATOIRE</u>	80
III-1 Validation pour un rétrovirus : le VIH	80
III-2 Validation pour le VHC	81
<u>VHC</u>	82
<u>I TECHNIQUE PCR DU LABORATOIRE</u>	82
I-1 Extraction de l'ARN	82
I-2 Choix des amorces	83
I-3 Synthèse de l'ADN complémentaire	83
I-4 Nested-PCR	83
<u>II TECHNIQUE AMPLICOR VHC</u>	84
<u>III GENOTYPAGE</u>	86
III-1 La trousse INNO-LiPA VHC	86
III-2 Combinaison des trousse Amplicor VHC et INNO-LiPA VHC	87
<u>IV POPULATIONS ETUDIEES</u>	88
IV-1 Donneurs de sang	88

IV-2 Hémophiles.....	91
IV-2-1 Prélèvement sanguin.....	91
IV-2-2 Virémie VHC chez les hémophiles	91
IV-2-3 Hémophiles traités à l'interféron.....	92
<u>HTLV</u>	94
<u>I SELECTION DES DONNS DE SANG</u>	94
<u>II EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN</u>	97
<u>III AMPLIFICATION</u>	97
III-1 Simple PCR	99
III-2 Nested-PCR	99
III-3 Conditions opératoires.....	99
<u>PARVOVIRUS</u>	100
<u>I DERIVES SANGUINS STABLES</u>	100
I-1 Fabrication.....	100
I-1-1 Fractionnement de Cohn	100
I-1-2 Facteurs anti-hémophiliques	100
I-2 Lots étudiés	100
<u>II PLASMA PASTEURISE</u>	101
<u>III TECHNIQUE D'AMPLIFICATION</u>	102
III-1 Extraction de l'ADN	102
III-2 Amplification.....	103
<u>RESULTATS</u>	
<u>VHC</u>	104
<u>I DONNS DE SANG</u>	104
I-1 PCR	104
I-1-1 Dons positifs en RIBA 3.0	104
I-1-2 Dons indéterminés et négatifs en RIBA 3.0	106
I-2 Génotypage.....	106
<u>II HEMOPHILES</u>	108
II-1 Virémie VHC chez les hémophiles.....	108
II-2 Hémophiles traités à l'interféron	109
II-2-1 Génotypage	109

II-2 Hémophiles traités à l'interféron	109
II-2-1 Génotypage	109
II-2-2 Suivi du traitement.....	111
II-2-3 Quantification génomique du VHC	119
II-2-4 Suivi du RIBA 3.0.....	120
<u>HTLV</u>	123
<u>I ECHANTILLONS POSITIFS EN WB</u>	123
<u>II ECHANTILLONS INDETERMINEES EN WB</u>	125
<u>PARVOVIRUS B19</u>	129
<u>I PRODUITS SANGUINS</u>	129
<u>II PLASMA PASTEURISE</u>	129
<u>DISCUSSION</u>	135
<u>CONCLUSION</u>	143
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	145
<u>ANNEXES</u>	160

SUMMARY

Polymerase chain reaction is a nucleic acids amplification assay that helps to the knowledge of serological and confirmation tests limits. Thirty seven donors blood samples for which it wasn't possible to conclude for the presence or absence of anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies because they gave a non evolutionary pattern qualified as "indeterminate" with confirmation assay (RIBA) were studied by PCR : all amplifications were negative which means that, in this study, it was false reactivities or serological aftereffects. Moreover, PCR is the only assay allowing the estimation of HCV viremia in an anti-HCV positive individual. Among 72 blood donors presenting a positive viremia, 26 (36.1 %) and 19 (26.4 %) are infected with genotypes 1b and 1a, respectively. Ten samples from hemophiliacs treated with interfereon (IFN) were tested by Amplicor HCV Monitor which is a quantitative PCR assay. Results show that the highest viremias are the most resistant to the treatment. Generally, they are associated to genotype 1b. In our study, the genotype 3a (4 hemophiliacs) shows the best response to interferon treatment.

PCR can also help to the positivity criteria validation (rgp21+p19+p24) of the anti-human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) antibodies confirmation assay (WB). The 12 anti-HTLV positive samples studied were PCR positive, 11 were classified as HTLV-I and 1 was HTLV-II. Among the 174 indeterminate samples (1 or 2 reactivity(ies) on these 3 proteins), 3 showing the pattern rgp21+p19 were PCR positive. So, rgp21 associated to p19 or p24 requires a PCR confirmation. But, the other indetermined patterns categories which show no evolution, correspond to false reactivities and do not required a PCR assay.

PCR is a very sensitive assay that can detect a viremical plasma in a plasma pool prepared for fractionnation. In a retrospective study of 181 batches of plasma derivatives, the parvovirus B19 DNA amplification has revealed that 8/58 batches of factor VIII and 1/5 batch of factor IX were positive. But, the 23 batches of fibrinogen and the 95 batches of albumin tested were all negative. Furthermore, among 111 batches of pasteurized plasma, 1 parvovirus B19 DNA positive batch has been identified.

RESUME

La polymerase chain reaction (PCR), qui consiste en l'amplification d'acides nucléiques, contribue à la connaissance des limites des trousse sérologiques de dépistage et de confirmation utilisées en transfusion sanguine. L'étude de 37 prélèvements de donneurs de sang (DDS) pour lesquels il n'a pas été possible de conclure quant à la présence ou non d'anticorps anti-virus de l'hépatite C (VHC) car ceux-ci donnaient un profil dit "indéterminé", non évolutif, en technique de confirmation (RIBA), révèle qu'il s'agissait, pour cette étude, de fausses réactivités ou d'une séquelle sérologique car toutes les amplifications sont négatives. En outre, la PCR est la seule technique permettant d'apprécier la virémie VHC chez un sujet anticorps anti-VHC positif. Parmi 72 DDS présentant une virémie positive, 26 (36.1 %) et 19 (26,4 %) sont infectés par les génotypes 1b et 1a, respectivement. La trousse Amplicor VHC Monitor a permis de réaliser une PCR quantitative chez 10 hémophiles sous traitement à l'interféron (IFN). Les résultats indiquent que les virémies les plus élevées sont les plus réfractaires au traitement. Elles sont généralement associées au génotype 1b. Les 4 hémophiles infectés par le génotype 3a présentent, dans cette étude, la meilleure réponse au traitement IFN.

La PCR a aidé également à la validation des critères de positivité (rgp21+p19+p24) de la technique de confirmation (WB) des anticorps dirigés contre le virus associé à la leucémie/lymphome malin des cellules T matures (HTLV). Les 12 dons anti-HTLV positif testés sont positifs en PCR et ont été différenciés en 11 HTLV-I et 1 HTLV-II. Parmi 174 échantillons "indéterminés" (1 ou 2 réactivité(s) sur ces 3 protéines), 3 présentant le profil rgp21 + p19 sont positifs en PCR. La rgp21 associée à la p19 ou p24 requiert donc une confirmation en PCR. Par contre, les autres catégories de profils indéterminés non évolutifs correspondent à de fausses réactions et ne justifient pas une étude par PCR.

La PCR est très sensible et peut mettre en évidence un plasma virémique dans un mélange de plasma destiné au fractionnement. Dans une étude rétrospective de 181 lots de dérivés stables, la recherche de l'ADN de parvovirus B19 a révélé que 8/58 lots de facteur VIII et 1/5 lot de facteur IX étaient positifs. Par contre, les 23 lots de fibrinogène et les 95 lots d'albumine testés sont tous négatifs. Par ailleurs, parmi 111 lots de plasma pasteurisé, 1 lot positif en ADN-parvovirus B19 a été identifié.

INTRODUCTION

VIRUS DE L'HEPATITE C

I HISTORIQUE

Les hépatites sont connues depuis très longtemps, mais l'implication d'un agent viral n'a pu être démontrée que dans les années 40 par McCallum (Mc Callum, 1944) puis confirmée dans les années 60 par Krugman (Krugman, 1967) grâce à des études de transmission chez l'homme. Deux virus possédant des propriétés physicochimiques différentes avec 2 modes de transmission différents ont ainsi été mis en évidence. Plus tard, ces virus se sont avérés être le virus de l'hépatite A (VHA), transmis par la voie foecale-orale, et le virus de l'hépatite B (VHB), transmis par la voie parentérale. Par ailleurs, en 1963, Blumberg a découvert l'antigène Australia, un antigène de surface du VHB (Blumberg, 1967).

Le VHB est le **premier virus humain responsable d'hépatites** dont les protéines et le génome ont pu être caractérisés et identifiés, ce qui a permis le développement de tests sérologiques sensibles et spécifiques. Dès l'utilisation des tests de dépistage du VHB, puis du VHA, il est apparu qu'il existait au moins un autre agent responsable d'hépatites dites "hépatites non-A, non-B".

I-1 L'hépatite non-A, non-B à transmission parentérale

Le dépistage sérologique systématique du virus de l'hépatite B chez les donneurs de sang a fait apparaître qu'il existait un autre agent responsable d'hépatites transfusionnelles (Feinstone, 1985). Un diagnostic d'exclusion de toutes les causes connues d'hépatites était alors effectué. Pendant plus de 10 ans, en dépit d'intensives recherches, les méthodes de culture conventionnelles n'ont pas permis l'isolement du virus. Il n'a pas non plus été possible de visualiser l'agent responsable en microscopie électronique ou de trouver des anticorps ou antigènes qui auraient permis la mise au point de tests de diagnostic. Toutefois, des études de transmission au chimpanzé après filtration de plasma et des expériences d'inactivation par le chloroforme laissaient

supposer qu'il s'agissait d'un virus à ARN, enveloppé, de petite taille (Bradley, 1985; He, 1987; Feinstone, 1983), qui fut appelé virus de l'hépatite non-A, non-B.

I-2 Virus des hépatites et transfusion sanguine

Les hépatites post-transfusionnelles ont toujours représenté le risque le plus important de contamination virale après transfusion sanguine. Dans les années 60, le taux de transmission des hépatites excédait 30 %. En 1990, il était de 1 %. Ces progrès considérables furent les conséquences du dépistage du marqueur direct antigène HBs et des mesures prises, en 1988, en faveur du dépistage obligatoire de marqueurs indirects : le dosage des transaminases et la recherche des anticorps dirigés contre le core du VHB (anti-HBc). Ceci a eu pour effet de limiter la transmission du virus non-A, non-B, en attendant qu'un test permettant la détection des anticorps dirigés contre ce virus appelé, depuis 1989, virus de l'hépatite C (VHC) soit disponible.

I-2-1 Le marqueur direct Ag HBs

Le dépistage systématique de l'antigène HBs chez les donneurs de sang a permis de démontrer que le VHB était responsable de 20 à 25 % des hépatites transfusionnelles (Gocke, 1970; Okochi, 1970). Ces données ont ensuite été confirmées par Holland en 1973 (Holland, 1973).

L'amélioration de la sensibilité des tests sérologiques a permis de dépister quasiment toutes les hépatites dues au virus B. Toutefois, en cas de taux faible d'antigène HBs, l'anti-HBc semble être un marqueur d'une infection à VHB plus approprié (Hoofnagle, 1974).

I-2-2 Les marqueurs indirects

Dans les années 80, de nombreuses études ont estimé à 4 à 8 % la fréquence des hépatites transfusionnelles non dues au VHB. La difficulté à développer un test spécifique de l'hépatite non-A, non-B est frustrante au vu des efforts déployés et des nombreux essais réalisés chez le chimpanzé (Alter, 1978; Hollinger, 1978). Les raisons

en sont, d'une part, la nature même du virus, d'autre part, la réponse immunitaire que celui-ci provoque. En effet, des études de transmission chez le chimpanzé ont mis en évidence un titre d'infectivité plus faible pour le virus non-A, non-B par rapport au titre mesuré pour le VHB (Feinstone, 1981). Par ailleurs, des études cliniques ont montré que 50 % des patients développaient une hépatite chronique, la persistance de l'infection pouvant refléter une trop faible réponse anticorps (Alter, 1989).

Pour pallier l'absence de test anti-VHC, la recherche de marqueurs indirects, argumentée par plusieurs études, a alors été envisagée.

Le dosage des transaminases

Deux études d'Aach et Alter en 1981 ont démontré qu'un taux élevé d'alanine aminotransférase (ALAT) ou transaminase pouvait être corrélé au développement d'une hépatite (Aach, 1981; Alter, 1981). Leurs conclusions étaient que l'exclusion des donneurs présentant des taux élevés d'ALAT permettrait de prévenir environ 30 % des hépatites non-A, non-B et que la perte au niveau de la population des donneurs ne serait que de 1,5 à 3 %.

Les anticorps anti-HBc

Au moins trois études ont permis d'établir une relation entre la présence d'anticorps anti-core du VHB (anti-HBc) chez un donneur et la transmission d'une hépatite non-A, non-B chez le receveur. En 1984, Stevens a montré que des receveurs ayant reçu une poche anti-HBc positif ont un risque estimé à 19 % de développer une hépatite non-A, non-B contre 7 % pour des receveurs ayant reçu une poche anti-HBc négatif (Stevens, 1984). Koziol a, pour sa part, estimé le risque à 11,9 % (anti-HBc positif) contre 4,2 % (anti-HBc négatif) (Koziol, 1986). Enfin, Sugg a souligné l'apport du test anti-HBc chez une population déjà testée pour les ALAT puisqu'il a calculé un risque d'hépatite non-A, non-B cinq fois plus grand pour un receveur de sang anti-HBc positif (Sugg, 1988).

Dès la mise au point du test anti-VHC, il a été possible de confirmer l'apport des marqueurs indirects dans la diminution des hépatites non-A, non-B. En 1992, Nelson a étudié la séroconversion VHC chez 1000 patients transfusés avant l'utilisation des tests anti-HBc et ALAT et 1000 patients transfusés testés pour ces 2 marqueurs (Nelson, 1992). Dans ce second groupe, il a constaté une diminution de 60% du taux de séroconversion HCV. Par ailleurs, une étude du National Institute of Health a montré que 43% des donneurs positifs en anticorps anti-VHC présentaient un marqueur indirect. Au Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (CRTS), la présence d'anticorps anti-VHC est associée à la présence d'anti-HBc seul dans 11,4 % des cas, d'un taux d'ALAT supérieur à N seul dans 30 % des cas ou des deux marqueurs dans 14 % des cas.

II LE VIRUS DE L'HEPATITE C

II-1 Découverte du virus grâce à la biologie moléculaire

L'identification de l'agent responsable des hépatites non-A, non-B fut longue et difficile en raison de la faible infectivité du virus et de la faible réponse immunitaire de l'hôte rendant difficilement applicable les techniques virologiques conventionnelles. Une autre approche a été utilisée : la biologie moléculaire, qui s'est avérée la voie du succès. Le virus VHC fut le premier virus caractérisé grâce à des techniques moléculaires avant d'avoir été visualisé en microscopie électronique ou isolé en culture.

C'est finalement le clonage du génome viral par Choo au sein du laboratoire Chiron (Emeryville, CA, USA) qui a permis d'obtenir, d'une part, un antigène à partir duquel les premiers tests de diagnostic ont pu être développés et, d'autre part, de nombreux antigènes, des sondes d'acides nucléiques et des relations phylogénétiques à partir de la séquence des acides nucléiques viraux (Choo, 1989; Houghton, 1991).

Le chimpanzé fut utilisé comme modèle expérimental car il représentait la seule possibilité d'amplifier la production virale. Un chimpanzé infecté chroniquement par

un concentré en facteur VIII a fourni une grande quantité de plasma présentant un titre infectieux inhabituellement élevé de 10^6 CID50/ml. Les unités de plasmaphérèse ont été récoltées au moment de l'élévation des ALAT, mélangées, puis, ces litres de plasma ont été centrifugés afin de concentrer le virus. Les acides ribonucléiques (ARN) totaux ont été extraits à partir du culot obtenu puis rétrotranscrits en acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) grâce à l'action d'une transcriptase inverse. L'ADNc a été cloné dans un vecteur d'expression : le lambda gt11 puis exprimé chez *Escherichia Coli* (E coli). Plus d'un million de colonies ont été étudiées. Les clones produits ont été lysés, puis les protéines synthétisées ont été transférées sur papier filtre. Celui-ci a ensuite été mis en contact avec les anticorps présents dans les sérums d'un patient infecté chroniquement. Un seul clone positif ayant exprimé un peptide immunogénétique spécifique de la région NS4 du virus fut obtenu et appelé 5-1-1. Il fut utilisé comme sonde pour identifier un clone plus grand appelé C100-3 codant pour un cadre de lecture simple ou "open reading frame" (ORF). Le clone C100-3 fut ensuite fusionné avec le gène de la super oxyde dismutase (SOD) qui facilite l'expression de protéines étrangères chez la levure.

En sélectionnant des clones dont les séquences se chevauchaient, le génome du VHC fut entièrement séquencé en quelques mois (Houghton, 1989). L'antigène C100-3 fut alors utilisé pour tapisser des microplaques; ce fut la première technique ELISA permettant la détection des anticorps anti-C100-3 chez les porteurs du VHC (Kuo, 1989).

II-2 Le VHC : un virus apparenté à la famille des Flaviviridae

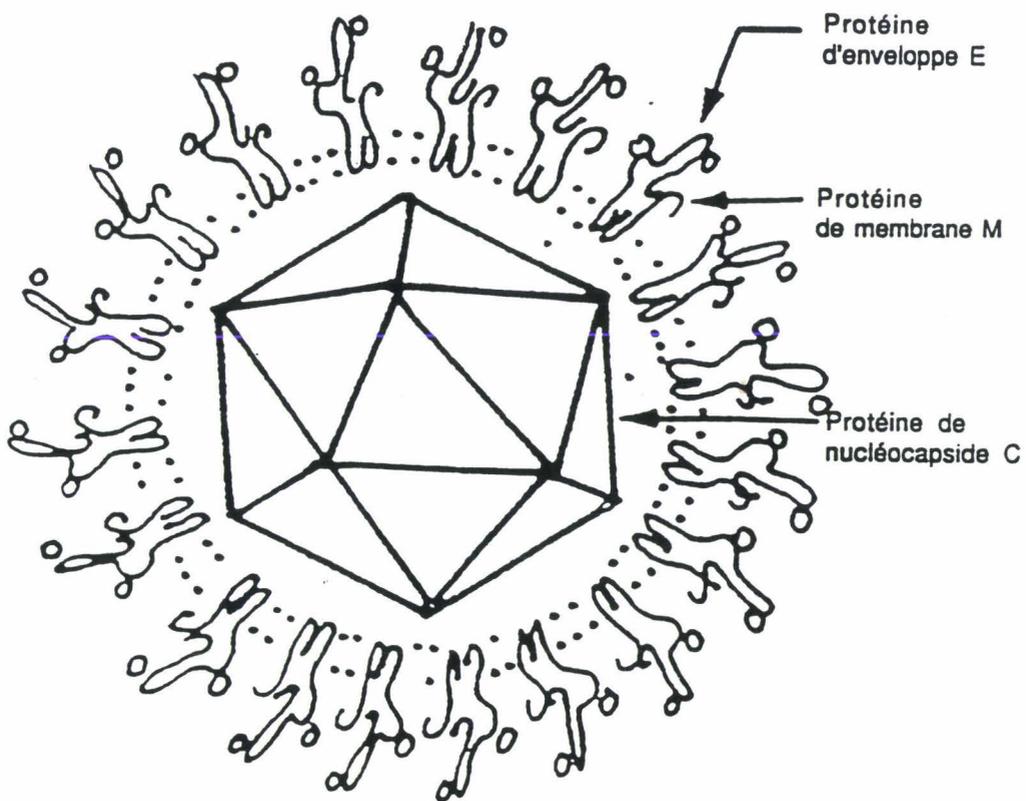
L'analyse comparative de la séquence génomique virale révèle que le virus n'est apparenté à aucun agent connu. Cependant, il présente des homologies génétiques et structurales avec des virus de la famille des Flaviviridae qui inclut notamment le virus de la dengue et le virus de la fièvre jaune.

Le génome du VHC a une organisation similaire à celle des pestivirus et dans une moindre mesure à celle des flavivirus (Miller et Purcell, 1990).

II-3 Structure et organisation génomique du VHC

Le VHC est un virus enveloppé de 30 à 80 nm de diamètre (Figure 1). Sa nucléocapside contient un ARN simple brin de polarité positive (Choo, 1991).

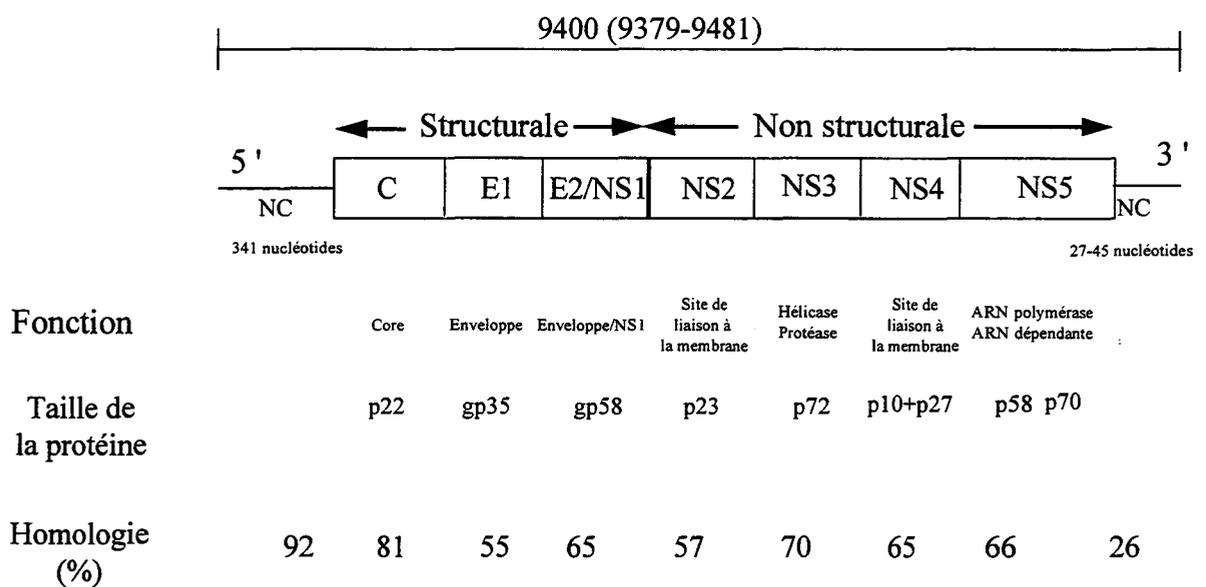
Figure 1 : Organisation du VHC



Son génome présente un grand cadre de lecture ouvert de 9030 à 9099 nucléotides transcrit en un large polypeptide d'environ 3010 à 3033 acides aminés (aa) et 2 régions non codantes d'environ 341 et 50 nucléotides aux extrémités 5' et 3', respectivement (Figure 2) (Okamoto, 1991; Choo, 1991). Cette protéine virale est clivée pour produire les protéines du VHC. Les gènes codant pour les régions structurales se situent dans la

région terminale, en 5' du cadre de lecture ouvert, tandis que les protéines virales non structurales se situent dans la région terminale en 3' (Figure 2) (Houghton, 1991). Certaines régions sont plus conservées que d'autres, comme le montre la figure 2.

Figure 2 : Structure génomique du VHC, fonctions et homologues des régions structurales et non structurales



II-3-1 La région 5' non codante (5'NC)

Cette région a une longueur de 341 bases. Elle contient plusieurs petits cadres de lectures ouverts potentiels et joue probablement un rôle important dans la réplication (Han, 1991). Il est difficile de déterminer la structure exacte de cette partie du génome à cause de ses structures secondaires complexes. La séquence est hautement conservée entre tous les isolats analysés : l'homologie est de 98 à 99 % pour un même type ou groupe de virus et de 92 à 98 % entre les différents groupes (Matsumuura, 1993). Cette région est donc idéale pour l'amplification de l'ARN du VHC.

II-3-2 Les protéines structurales

Les protéines structurales sont la p22 (core : "c"), la gp35 (enveloppe : E1) et la gp58 (enveloppe : E2/NS1) (Figure 2). Ces protéines ont été identifiées par des translations *in vitro* de l'ARN transcrit à partir d'un clone du VHC (Hijikata, 1991a).

La p22 est une protéine basique non glycosylée de 191 aa, d'environ 22 kilodaltons (kDa). Elle pourrait se lier à l'ARN viral pour former une nucléocapside dans un virion. Du fait de la présence d'un domaine extrêmement hydrophobe à son extrémité C terminale, la p22 synthétisée dans les cellules animales est fortement associée à la membrane cellulaire et est difficile à solubiliser et à purifier.

La gp35 est une glycoprotéine d'environ 35 kDa codant pour la région E1 du génome. Cette région est équivalente à la région E des pestivirus. Le site de clivage entre E1 et E2/NS1 se situe entre les acides aminés 383 et 384 (Hijikata, 1991a). Cette protéine est synthétisée au cours de l'infection VHC car des anticorps anti-gp35 ont été mis en évidence chez différents patients infectés (Kohara, 1992), ainsi que chez 10 % des donneurs de sang asymptomatiques anti-C100 positive. Ce faible taux pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la séquence nucléotidique dans la région E1 entre les différentes souches virales (Weiner, 1990).

La gp58 (région E2/NS1) de masse moléculaire 68-72 kDa est la seconde glycoprotéine d'enveloppe et correspond à la glycoprotéine E1 des flavivirus. Dans cette région, la séquence nucléotidique est extrêmement variable entre les différents isolats viraux (Hijikata, 1991b).

II-3-3-Les protéines non structurales

Il s'agit des régions NS2, NS3, NS4 et NS5 (Figure 2).

L'organisation des protéines non structurales est très proche de celle des flavivirus et des pestivirus. De petites séquences d'aa sont même conservées pour les protéase, hélicase et réplicase (Choo, 1991).

La région NS2 code pour une protéine hydrophobe p23 qui pourrait être un site de liaison à la membrane.

La région NS3 semble avoir 2 domaines fonctionnels distincts : une protéase du côté N-terminal et une hélicase du côté C-terminal. La protéase interviendrait dans la fabrication des protéines structurales au niveau des 3 jonctions E2-NS1/NS2, NS3/NS4 et NS4/NS5 (Choo, 1991). Quant à l'hélicase, il s'agit d'une protéine essentielle dans la réplication de l'ARN viral, capable de dérouler l'ARN.

La région NS4 code pour une protéine hydrophobe qui pourrait être un site de liaison à la membrane.

A l'extrémité 3' terminale du cadre de lecture ouvert se trouve la région NS5 qui code pour une ARN polymérase-ARN dépendante.

II-3-4 La région 3' non codante (3'NC)

Cette partie du génome contient une région non transcrite de 27 à 45 nucléotides. Elle se termine par une queue homopolymère de 10 à 100 résidus d'uracile selon les différents isolats. La séquence nucléotidique diffère fortement entre les différents groupes : seulement 26 à 40 % de la séquence sont conservés. Enfin, la région 3'NC peut jouer un rôle important dans la réplication du VHC puisqu'elle est un site d'entrée de l'ARN polymérase pour copier le brin mineur de l'ARN (Matsumura, 1993).

II-4 Variabilité génomique du VHC

L'existence de différents types de VHC avait été suggérée par l'absence d'anticorps anti-C100-3 chez certains patients, en technique RIBA de première génération (voir Chapitre III-2-1). Les trousse RIBA de seconde puis de troisième génération présentent une combinaison d'antigènes recombinants et de peptides issus des régions les plus conservées (C, NS3 et NS4 pour le RIBA 2.0 et C, NS3, NS4 et NS5 pour le RIBA 3.0) (voir Chapitres III-2-2 et III-2-3) et permettent la détection de tous les génotypes recensés à ce jour (Takada, 1992; Okamoto, 1992a; Simmonds, 1993).

Comme pour d'autres virus à ARN, il existe une hétérogénéité du génome du VHC. Le taux de mutation de ces virus est 10^3 fois plus élevé que celui des virus à ADN. Ces substitutions de bases au hasard résultent des erreurs d'incorporation de la réplicase ou

ARN polymérase-ARN dépendante et de l'absence de mécanisme de réparation qui pourraient agir durant la réplication de l'ARN. Par conséquent, chez un individu infecté, le génome du VHC ne présente pas d'homogénéité d'espèce mais il s'agit d'un ensemble de génomes différant très faiblement, d'où la notion de "quasi-espèces". Cette capacité de variation d'incorporation permet au VHC d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

Okamoto a mis en évidence les mutations des régions E1 et E2 au cours d'une évolution vers une hépatite chronique. Le taux de mutation estimé pour la région E2 est de $2,7 \cdot 10^3$ substitutions de bases par site, par an, tandis que ces taux sont de 0 et $0,41 \cdot 10^3$ substitutions de bases par site, par an pour les régions 5'NC et NS4, respectivement (Okamoto, 1992b).

Le processus de sélection d'hôte et l'adaptation du génome à une mutation rapide a favorisé l'évolution de nombreux génotypes distincts du VHC, fonction du degré d'homologie des nucléotides et des acides aminés (Chan, 1992). Les séquences des régions NS5 de tous les isolats recensés dans le monde ont été analysées. A ce jour, 76 isolats différents du VHC ont été répertoriés. A partir de cette analyse, six types distincts ont été identifiés et ont permis d'établir un arbre phylogénétique (Figure 3) (Simmonds, 1993).

Cette grande hétérogénéité de séquences est à l'origine d'une confusion entre les différentes nomenclatures proposées par les différentes équipes ayant identifié des génotypes du VHC. Une harmonisation s'est avérée nécessaire et un système de classification commun a été établi et accepté par de nombreuses équipes (Tableau I) (Simmonds, 1994). Six types ou groupes majeurs ont été décrits. Les homologies de séquences entre les différents membres des différents groupes varient de 55 à 72 % (moyenne 64,5 %). Chaque type peut contenir un ou plusieurs sous-types dont les homologies varient de 75 à 86 % (moyenne 80 %). Enfin, les isolats appartenant à un même sous-type présentent des homologies de séquences de plus de 88 %.

Figure 3 : Arbre phylogénétique constitué par les 76 isolats du VHC répertoriés (d'après Simmonds). Mise en évidence de 6 types majeurs.

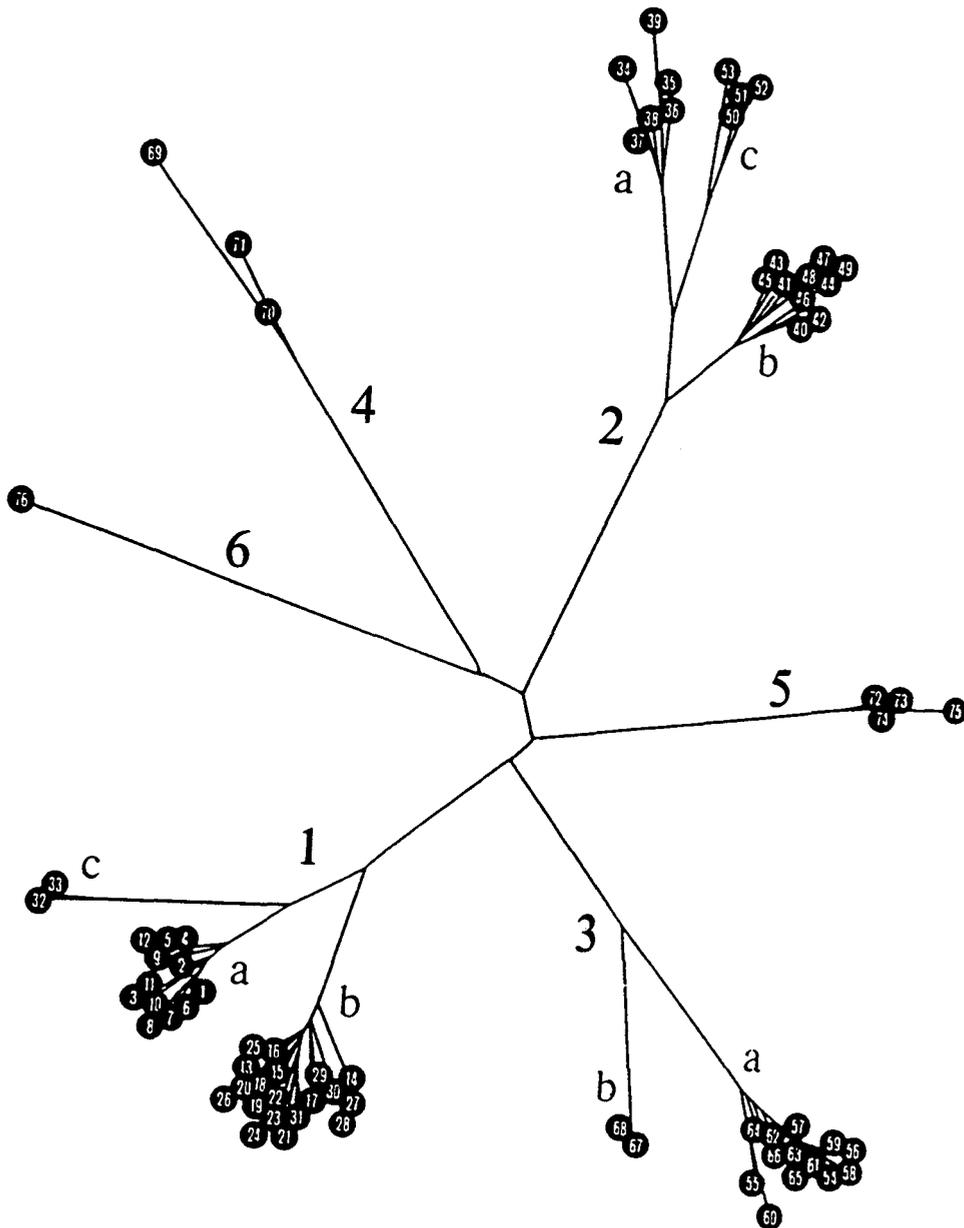


Tableau I: Classifications des virus VHC

Classification retenue	Okamoto	Mori	Cha Urdea	Nakao Enomoto	Bukh	Chan Simmonds	Prototype
1a	I		G I	K-Pt		1a	HCV-1, HCV-H, HC-J1
1b	II	II	G II	K-1		1b	HCV-J, HCV-BK, HCV-T, HCV-JK1, HC-J4
2a	III	III	G III	K-2a		2a	HC-J6
2b	IV	IV	G III	K-2b		2b	HC-J8
2c			G III		2c		S83, CA26
3a		V	G IV	K-3		3	E-b1, Ta, BR36, BR33, HD10
3b		VI	G IV	K-3			HCV-Tr, Tb
4a					4c	4	GB116, GB358, GB215, Z6,Z7,EG29
4b					4b		GB549, Z1
4c					4a		GB809, Z4
4d							GB438
4e					4d		GB724
4					5a		DK13
5a			G V		6a		SA3, SA4, SA1, SA7, SA11, PC, BTCL3
6a							HK1, HK2, HK3, HK4

II-4-1 Distribution des génotypes

Les types 1, 2 et 3 ont été trouvés dans presque tous les pays : en Europe (Mc Omish, 1994), en Amérique du Nord (Bukh, 1993; Lee, 1992), en Amérique du Sud et Asie Orientale (Mori, 1992; Okamoto, 1993). Le type 4 se trouve principalement en Afrique (Xu, 1994), au Moyen-Orient et dans un pourcentage moindre en Europe (Simmonds, 1993b, Simmonds, 1993c). Le type 5, d'abord isolé en Afrique du Sud, a été trouvé également en Europe et en Afrique Centrale (Bukh, 1993; Cha, 1992). Le type 6 n'a été trouvé que dans des échantillons provenant de Hong-Kong (Bukh, 1993; Cha, 1992; McOmish, 1994).

En France, les génotypes 1a et 1b prédominent (Kremsdorf, 1991), ils correspondent aux génotypes F1 et F2 décrits par Li (Li, 1991), avec une prévalence de 45 et 55 % respectivement.

II-4-2 Apport du génotypage

L'hypothèse est que les interactions virus-hôte pourraient varier en fonction du génotype du VHC et seraient à l'origine de différences importantes sur le plan de la pathologie et de la progression de la maladie. Des études préliminaires révéleraient une relation possible entre la sévérité de l'hépatite et le type du VHC infectant (McOmish, 1993a; Pozzatto, 1991).

D'autre part, l'efficacité du traitement à l'interféron (IFN) pourrait également dépendre du génotype.

Corrélation entre le génotype et la sévérité de la maladie

Deux études ont mis en évidence une plus forte prévalence de cirrhoses et de carcinome hépatocellulaire (CHC) chez les patients infectés par le génotype 1b (Pozzatto, 1992; Takada, 1993). En France, des résultats similaires ont été obtenus par Bréchet. Trois groupes de patients atteints d'hépatite chronique, de cirrhose ou d'un carcinome hépatocellulaire ont été génotypés. Les résultats montrent une plus forte prévalence des génotypes 1b chez les patients présentant une cirrhose (avec ou sans

CHC) par rapport au groupe des patients atteints d'hépatite chronique (80 contre 50 %) (Bréchet, 1994). Dans une étude de Trépo, 23 % des patients infectés par le génotype F1 (1a) contre 59 % des patients infectés par le génotype F2 (1b) ont développé une cirrhose (Trépo, 1994a).

Corrélation entre le génotype et la réponse à l'interféron

Les patients infectés par le virus C de génotype 1b présenteraient une faible réponse au traitement interféron. Par contre, le génotype 2a serait associé à une bonne réponse au traitement (Chemello, 1994; Yoshioka, 1992; Brouwer, 1993). Trépo a observé que parmi des patients traités, il y a plus de répondeurs (13/13) dans le groupe infecté par F1 (1a) que dans le groupe infecté par F2 (1b) (37%) (Trépo, 1994a).

Ces observations préliminaires sont extrêmement importantes car elles pourraient aboutir à une adaptation des protocoles thérapeutiques en fonction des génotypes du VHC.

La réponse au traitement IFN de patients infectés par des génotypes de VHC moins représentés (génotypes 2 à 6) est également en cours d'étude.

Dans une étude récente, la quantification de la charge virale par PCR a montré que la sévérité de la maladie et la réponse à l'interféron étaient surtout liées à la quantité d'ARN du VHC : celle-ci est beaucoup plus importante pour le génotype 1b (II) (pathologie plus sévère et moins bonne réponse à l'interféron), alors que la virémie est plus faible pour les génotypes 2a (III) (meilleure réponse au traitement interféron) et 2b (IV) (Yamada, 1994).

II-4-3 Techniques de génotypage du VHC

Trois techniques, basées sur l'amplification génique ou "polymerase chain reaction" (PCR) (voir Chapitre Polymerase Chain Reaction) sont essentiellement utilisées : l'analyse du polymorphisme de restriction (RFLP) (Nakao, 1991), la technique d'amplification génique ou polymerase chain reaction (PCR) spécifique de type

(Okamoto, 1992a; Okamoto, 1993; Kurosaki, 1993) et l'hybridation inverse (Stuyver, 1993).

Analyse du polymorphisme de restriction

La technique du RFLP a été établie pour la région NS5 et la région 5'NC.

Dans la région NS5, un fragment PCR de 401 paires de bases (pb) est obtenu après amplification avec un couple d'amorces commun aux 6 génotypes. Les enzymes de restriction utilisées AluI, Sau96I et AccII permettent de distinguer les génotypes 1 (a et b) et 2 (a et b) (Nakao, 1991). L'analyse RFLP a pu être étendue aux génotypes 3 à 6 dans la région 5'NC en utilisant les enzymes Sau3a, HaeIII, Rsa I, SmaI and HinfI (Simmonds, 1993a; Nakao, 1991; Dusheiko, 1994). Le sous-typage des types 1 et 2 étant quasiment impossible dans la région 5'NC, il est souvent nécessaire d'effectuer une double analyse des sites de restriction pour discriminer les types.

La PCR spécifique de type

Kurosaki a élaboré cette méthode pour la région NS5. Une première amplification permet d'obtenir un fragment de 401 pb qui est ensuite soumis à une "nested-PCR". Cette seconde amplification est réalisée avec l'ensemble des couples d'amorces spécifiques de types, internes au fragment de 401 pb. Les produits amplifiés sont analysés par électrophorèse en gel; le sous-type est déterminé en fonction de la taille du fragment obtenu observée par rapport à un témoin de masse moléculaire (Kurosaki, 1993). Cette méthode permet d'identifier les sous-types 1a, 1b, 2a et 2b. Okamoto a élaboré une méthode basée sur le même principe mais dans la région du core (Okamoto, 1992a). Un fragment de 276 pb est d'abord amplifié; puis une seconde amplification est effectuée en utilisant un mélange d'amorces spécifiques de sous-types.

L'un des inconvénients de cette méthode est que le pourcentage de coinfections observé est plus important (parfois plus de 20 %). Par ailleurs, il a été montré que le

génomotypage était plus fiable quand chaque sous-type est amplifié séparément (Kobayashi, 1993).

L'hybridation inverse

Cette méthode mise au point par Stuyver est commercialisée sous l'appellation de "Line Probe Assay" (LiPA) par la firme Innogenetics (Gent, Belgium) (Stuyver, 1993). L'INNO-LiPA est une technique d'hybridation inverse basée sur les différences hautement conservées de la région 5'NC. Il permet de typer et de sous-typer les virus VHC les plus communs (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4 et 5). L'amplification génique est réalisée avec un couple d'amorces commun. Puis les produits obtenus sont hybridés avec des sondes, immobilisées sur des bandelettes de nitrocellulose, spécifiques de chaque génotype. Le principal défaut de cette méthode est qu'elle ne permet pas aisément de mettre en évidence les coinfections.

La concordance entre les différentes techniques est en cours d'étude. Toutefois, il semblerait qu'elle soit de 70 % entre les techniques de PCR spécifique de type d'Okamoto et du LiPA (Thelu, 1994).

III TESTS SEROLOGIQUES

Le VHC circule dans le sérum à une concentration de 10^2 à 5.10^7 particules par millilitre (mL) (Ulrich, 1990; Simmonds, 1990) mais il a toujours été impossible de détecter les antigènes viraux par des méthodes conventionnelles. Par conséquent, la mise au point d'une technique permettant le dépistage des anticorps anti-VHC était devenue primordiale. Cette recherche aboutit enfin en 1989 après plus de 10 ans d'insuccès. Dès la mise sur le marché des tests de première génération, le dépistage systématique des dons de sang pour l'anticorps anti-VHC a été instauré (en France, le 1er mars 1990). Depuis, les tests ont évolué, leurs sensibilité et spécificité se sont accrues et actuellement, les laboratoires utilisent les tests de 3^{ème} génération. Les études présentées dans cet ouvrage font référence uniquement aux réactifs

commercialisés par la firme Ortho Diagnostics System : seules ses trousse de dépistage et de validation seront présentées dans ce chapitre.

III-1 Les tests de dépistage

III-1-1 Le test Ortho HCV 1.0 ELISA

La société Chiron a développé un test immunoenzymatique (ELISA) commercialisé par Ortho Diagnostic Systems. Les microplaques étaient recouvertes de l'antigène C100-3, un polypeptide de fusion de 363 aa correspondant à une partie de la région NS4.

Ce test manquait de sensibilité car les anticorps anti-C100-3 n'étaient pas présents chez tous les patients, que l'infection soit récente ou ancienne (Van der Poel, 1991). Il était positif pour 70 à 80 % des patients ayant développé une hépatite non-A, non-B chronique, post-transfusionnelle (Miyamura, 1990; Esteban, 1990). De plus, les anticorps n'étaient pas détectés quand l'infection était à un stade précoce, la fenêtre de séronégativité étant de 10 à 15 semaines. Ce test manquait également de spécificité et engendrait un grand nombre de fausses réactions, notamment dans la population des donneurs de sang, population à faible prévalence (Van der Poel, 1990; Mc Farlane, 1990).

III-1-2 Le test Ortho HCV 2.0 ELISA

La trousse ELISA-VHC de 2ème génération comprend les protéines C200 et C22-3. La C22-3 représente la majeure partie de la protéine de nucléocapside de 22 kDa. Les anticorps anti-C22-3 apparaissent généralement plus précocément que ceux dirigés contre la C100-3. Ils ont été détectés dans des dons de sang impliqués dans la transmission du VHC et dans le sérum de patients présentant une hépatite non-A, non-B, alors qu'auparavant ces sérums étaient anti-C100-3 négative (Chiba, 1991). La protéine C200 correspond à un large fragment cloné comprenant les régions C33-c et C100-3.

III-1-3 Le test actuel Ortho HCV 3.0 ELISA

Le test présente en plus des protéines C200 et C22-3, une protéine recombinante correspondant à la région non structurale NS5.

Vrieling a comparé les trousse ELISA Ortho 2.0 et 3.0 sur 530 sérums de donneurs de sang réactifs avec différentes trousse ELISA, tous testés en PCR (Vrieling, 1994). Les 83 échantillons positifs en PCR le sont également avec les 2 trousse, ce qui indique que Ortho 3.0 est au moins aussi sensible que Ortho 2.0. Parmi les 447 échantillons négatifs en PCR, 251, en Ortho 2.0 et 165, en Ortho 3.0 sont positifs. La trousse Ortho 3.0 est donc significativement plus spécifique puisqu'il a été possible de négativer 12% des échantillons positifs en ELISA de deuxième génération.

III-2 Le test de validation "Recombinant Immunoblot Assay" (RIBA)

III-2-1 Le RIBA-1

Un test immunoenzymatique sur bandelette appelé RIBA fut développé par la société Chiron et commercialisé par Ortho Diagnostics System, pour permettre de distinguer les réactions positives des réactions non spécifiques en ELISA 1.0. La première version disponible présentait, immobilisés sur des bandelettes en nitrocellulose, l'antigène 5-1-1 produit chez *E. coli*, l'antigène C100-3 produit chez la levure (Figure 4), une bande SOD et 2 témoins d'immunoglobulines G (IgG) humaines permettant la semi-quantification de la réaction (1 témoin positif faible et 1 témoin positif fort).

Un échantillon était considéré positif s'il réagissait avec les 2 bandes spécifiques du VHC avec une intensité au moins égale au contrôle IgG positif faible et si la bande SOD était négative. Ayant été élaboré avec les mêmes antigènes que ceux utilisés pour le test ELISA VHC 1.0, il ne s'agit pas d'un réel test de confirmation car il ne permet pas de confirmer la spécificité des anticorps mis en évidence, pourtant, moins de la moitié des résultats positifs en test ELISA 1.0 était validée en RIBA-1. Un résultat

positif en RIBA étant souvent corrélé à un ratio élevé en ELISA et à des ALAT augmentées, ce test a été très utile pour discriminer vraie et fausse réaction positive.

L'interprétation de la réaction et les critères de positivité des 3 générations de RIBA sont détaillées dans le tableau II.

III-2-2 Le RIBA-2

Le RIBA-2 a été autorisé en juin 1992. En plus des antigènes 5-1-1 et C100-3, les nouveaux antigènes inclus sont les protéines C22-3 (nucléocapside), produite dans la levure et C33c (région non structurale NS3), produite chez E coli (Figure 4). Son principe demeure identique (Tableau II).

L'addition de la C22-3 et de la C33c a permis l'identification d'un grand nombre d'hépatites C chroniques ou aiguës (Van der Poel, 1991). Le nombre d'individus dépistés est 10 à 30 % supérieur en RIBA-2 par rapport au test RIBA-1.

III-2-3 Le test actuel RIBA-3

Cinq tests de validation sont actuellement disponibles mais le RIBA 3.0 reste la trousse de validation de référence. Les différences par rapport au RIBA 2.0 sont :

- le remplacement des protéines recombinantes 5-1-1 et C100-3 par un mélange de 2 peptides synthétiques 5-1-1 et C100 (région NS4);
- une protéine recombinante modifiée C33c, produite par E coli, est ajoutée à la protéine initiale C33c;
- la protéine recombinante C22-3 est remplacée par un peptide synthétique C22 présentant 4 épitopes;
- une protéine NS5, produite par la levure, a été ajoutée (Figure 4).

L'interprétation et les critères de positivité du test sont présentés dans le tableau II.

Ces modifications améliorent la spécificité du test et permettent la résolution du statut sérologique de donneurs de sang et de malades présentant un profil indéterminé. Dans l'étude de Zaaijer, le RIBA 3.0 a permis de résoudre le statut sérologique de 81/122

(66%) échantillons indéterminés en RIBA 2.0 (Zaaijer, 1994). Lelie a estimé la sensibilité et la réactivité non spécifique du RIBA 3.0 par rapport au RIBA 2.0 dans une population de patients et de donneurs de sang (Lelie, 1994). Le nombre de RIBA 3.0 indéterminés a fortement diminué parmi les échantillons ARN-VHC positif (6,7 % en RIBA-2 contre 0.7 % en RIBA-3). La sensibilité du RIBA 3.0 est proche de 100 %. La fréquence des résultats indéterminés parmi les donneurs ARN-VHC négatif est significativement plus faible en RIBA 3.0 par rapport au RIBA 2.0 (86/214; 40 % contre 730/2114; 60 %). La diminution des réactivités non spécifiques peut être attribuée au remplacement des antigènes recombinants C22 et C100 par des peptides synthétiques.

Figure 4 : Les 3 générations du RIBA Ortho : Origine des antigènes

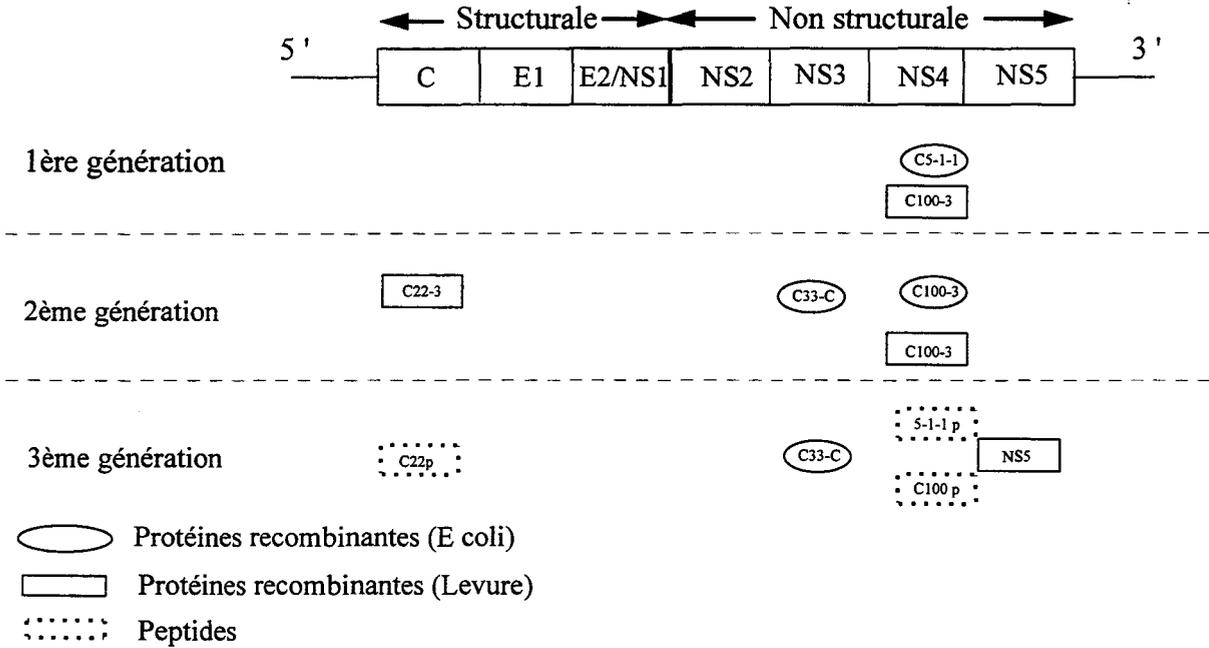
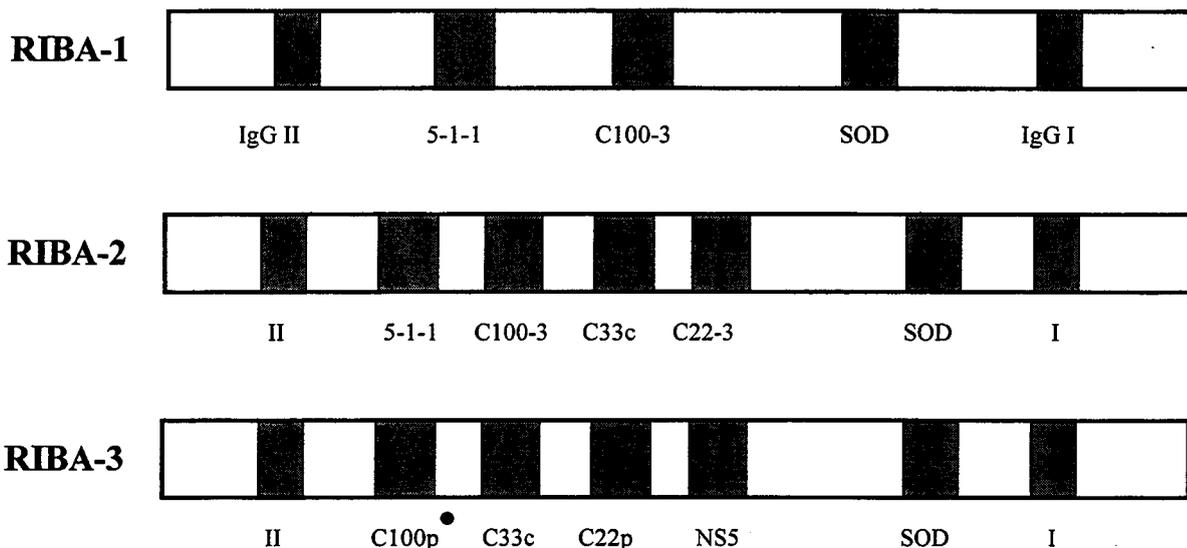


Tableau II : Interprétation des résultats du RIBA Ortho



• Peptide

Lecture de l'intensité de la réaction sur chaque bande

Cotation

Aucune bande visible	-
Bande visible d'intensité inférieure au contrôle IgGI	+/-
Bande visible d'intensité égale au contrôle IgGI	1+
Bande visible d'intensité supérieure au contrôle IgGI mais inférieure au contrôle IgG II	2+
Bande visible d'intensité égale au contrôle IgGII	3+
Bande visible d'intensité supérieure au contrôle IgGII	4+

Lecture des bandes

Interprétation

Aucune bande avec une intensité supérieure ou égale à 1+ *	Négatif
Au moins 2 bandes avec une intensité supérieure ou égale à 1+	Positif
Une seule bande avec une intensité supérieure ou égale à 1+ **	Indéterminé

* Si seule la bande SOD est positive, l'échantillon est considéré comme négatif.

** Si la bande SOD présente une réactivité supérieure ou égale à 1+ en présence d'une ou plusieurs bandes, l'échantillon est considéré comme indéterminé.

Dans l'étude de séroconversions, Van der Poel souligne que les ELISA et RIBA de 3ème génération sont plus sensibles en permettant une détection plus précoce des anticorps au cours de séroconversions VHC chez des receveurs de sang (Van der Poel, 1994).

Le nombre des résultats indéterminés en RIBA-3 a fortement diminué, néanmoins, il en reste un nombre conséquent dans la population des donneurs de sang. Ces résultats indéterminés sont majoritairement dûs à de fausses réactions, plus rarement, il peut s'agir de séroconversions. Dans la population des malades, la proportion de PCR positives parmi les sujets ayant un RIBA indéterminé peut atteindre 58 % (Lamoril, 1994). Mais généralement, ces patients présentent une déficience du système immunitaire (co-infection avec le VIH) ou une hypogammaglobulinémie.

Le statut sérologique de patients ou donneurs de sang présentant un profil indéterminé en RIBA 3.0 peut être résolu par la recherche de l'ARN du VHC par PCR.

IV EPIDEMIOLOGIE

La transmission du VHC est essentiellement une transmission parentérale, et la majorité des individus infectés par le VHC sont des drogués par voie intraveineuse ou des receveurs de produits sanguins (Esteban, 1989). La transmission transfusionnelle a été considérablement réduite depuis 1990, date du démarrage du dépistage, alors que la contamination chez les drogués par voie intra-veineuse reste importante.

Parmi les groupes à risque, la séoprévalence des anticorps anti-VHC est de 50 à 75 % chez les drogués par voie intraveineuse (Esteban, 1991; van der Poel, 1991) et de 5 à 59 % chez les patients hémodialysés (Knudsen, 1993; Huang, 1993).

La transmission non parentérale existe mais est très faible : la contamination sexuelle est de l'ordre de 2 % (Esteban, 1991; Brettler, 1992) et la transmission verticale mère-enfant survient essentiellement chez les enfants nés de mère VIH positives (la virémie VHC de la mère étant probablement plus importante) (Novati, 1992; Thaler, 1991; Ohto, 1994; Wejstal, 1992).

IV-1 Transfusion sanguine et VHC

Prévalence chez les donneurs de sang

La prévalence des anticorps anti-VHC chez les donneurs de sang s'échelonne entre 0,04 % et 1,4 %.

Il est possible de distinguer 3 zones géographiques :

- une zone de basse prévalence (< 0,5 %) : Europe du Nord, Canada , USA, Australie;
- une zone de prévalence intermédiaire : France, Allemagne;
- une zone de prévalence élevée (> 1 %) : Europe du Sud et de l'Est, Japon, Taiwan.

Prévalence chez les donneurs de sang du C.R.T.S. de Lille

Le dépistage des anticorps anti-VHC chez les donneurs de sang a démarré le 1^{er} mars 1990 en France.

Tableau III : Prévalence des anticorps anti-VHC chez les donneurs de sang du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille.

Année	Nombre de dons	Nombre de dons anti-VHC positif	Prévalence (%)
1990 (1 ^{er} mars)	177 749	510	0.29
1991	181 798	590	0.32
1992	173 856	66	0.04
1993	162 959	56	0.03

En 1990 et 1991, le dépistage était effectué avec les tests de 1^{ère} génération (moins bonne spécificité et sensibilité) et le test de validation RIBA 1.0 n'a été disponible qu'à partir de mars 1991. En 1992, avec les tests de 2^{ème} génération et en 1993 avec les tests de 3^{ème} génération, la spécificité s'est considérablement améliorée et les

donneurs positifs en anticorps anti-VHC ont été contre indiqués, en conséquence, les donneurs dépistés, en 1992 et 1993, sont principalement des nouveaux donneurs.

Hépatites post-transfusionnelles

Depuis mars 1990, l'éviction des donneurs de sang porteurs d'anticorps anti-VHC a fait considérablement chuter l'incidence des hépatites non-A, non-B post-transfusionnelles. Par ailleurs, il peut subsister un risque dû à la fenêtre sérologique. Dans ce cas, le marqueur ALAT permet une sécurité supplémentaire.

IV-2 Hémophilie et VHC

Avant-propos : Il existe 2 types d'hémophilie, A et B. Dans l'hémophilie A, la plus courante, l'hémorragie est provoquée par une déficience en facteur VIII dans le sang; alors que dans l'hémophilie B, le facteur IX est déficient. La sévérité de l'hémophilie est corrélée au taux de facteur VIII ou IX circulant. Les patients atteints d'une forme sévère de la maladie souffrent d'hémorragies spontanées et répétées dans les muscles et les articulations qui, si elles ne sont pas traitées, conduisent rapidement à la paralysie. Les hémorragies situées au cerveau peuvent même entraîner la mort.

A la fin des années 60, l'utilisation de concentrés de facteurs de coagulation a révolutionné le traitement de l'hémophilie et a permis aux malades de mener une vie quasiment normale. Ces produits sont fabriqués à grande échelle à partir de pools de plasma de milliers de donneurs. Dans les années 70, de nombreuses études ont montré que 50 à 90 % des hémophiles multitransfusés avaient un taux d'ALAT perturbé (Mannuci, 1975; Levine, 1977).

La séroprévalence des anticorps anti-C100 déterminée avec les tests de première génération a été sous-estimée puisqu'elle varie de 53 à 89 % en fonction des études. Avec les tests de seconde génération, Kudésia a dépisté 38 % d'hémophiles positifs en anti-VHC, dépistés négatifs avec les tests de première génération (Kudésia, 1992). Les études actuelles indiquent que 60 à 100 % des hémophiles perfusés avant l'application de méthodes d'inactivation virale aux produits fabriqués à partir de mélanges de

plasmas sont anticorps anti-VHC positif (Laurian, 1992). Par contre, l'étude de Pistello souligne que le traitement actuel des plasmas (chauffage ou traitement solvant/détergent effectué en France depuis 1987) prévient efficacement la transmission du VHC chez les patients hémophiles (Pistello, 1991).

V ASPECTS CLINIQUES

Le virus de l'hépatite C provoque des hépatites aiguës, rarement fulminantes, résolutes. Mais il peut également induire des hépatites chroniques (symptomatiques et asymptomatiques), des cirrhoses et des carcinomes hépatocellulaires (CHC).

V-1 Hépatite aiguë

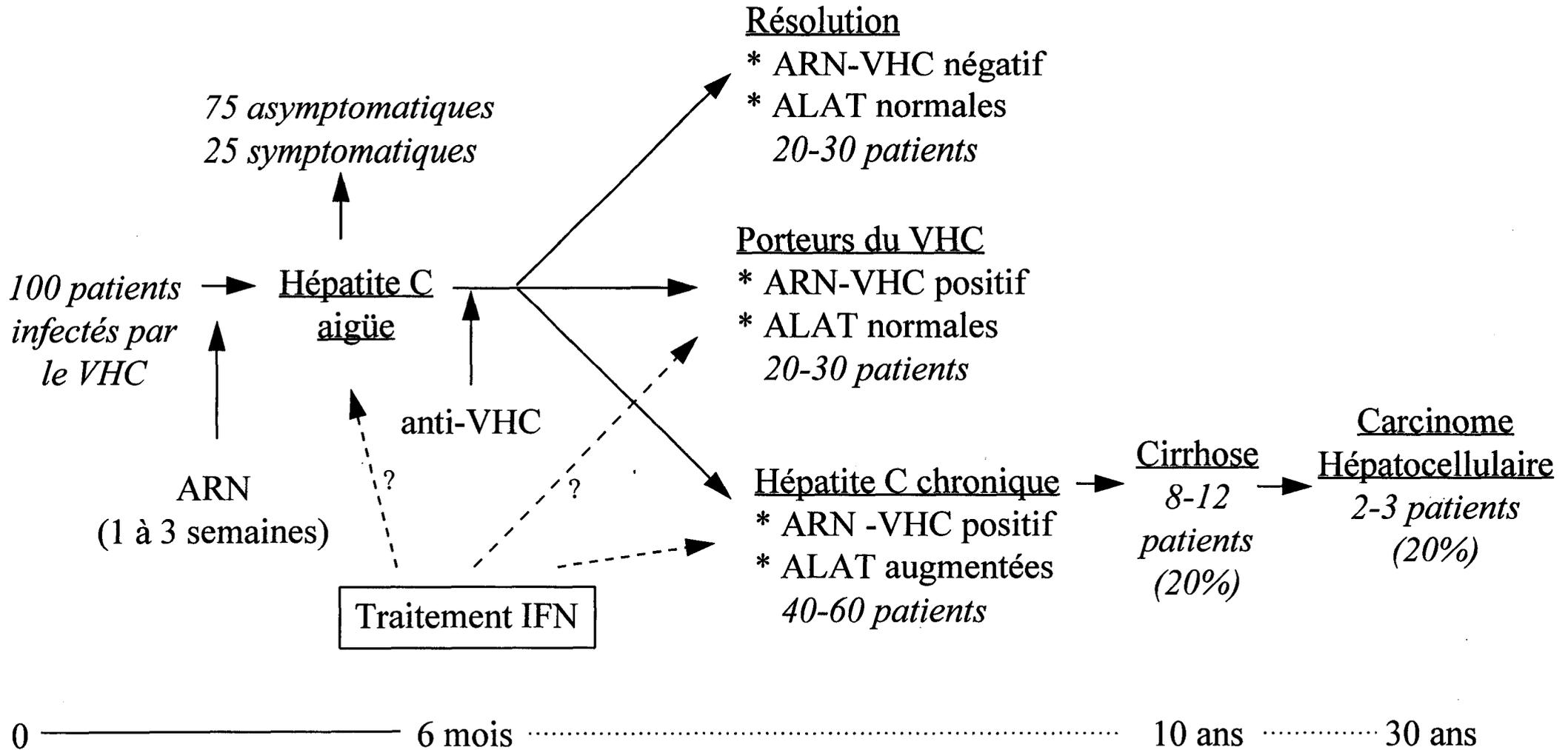
L'infection aiguë peut être sévère ou asymptomatique. La période d'incubation moyenne du VHC est de 6 à 12 semaines. Cependant, si l'inoculum est important, comme dans le cas de perfusion d'un facteur de coagulation contaminé, cette période est réduite à 4 semaines voire moins (Lim, 1991).

Dans 25 % des cas, les malades ont un ictère et/ou présentent d'autres signes cliniques tels que anorexie, asthénie, amaigrissement, fièvre. Au cours de la phase précoce de l'infection, les ALAT peuvent fluctuer et parfois même redevenir normales ce qui rend parfois difficile l'appréciation d'une vraie convalescence. La hauteur du pic des ALAT n'est jamais aussi importante pour le VHC que pour le VHA ou le VHB puisqu'elle dépasse rarement 300 unités/mL

L'évolution de ces hépatites est la suivante (Figure 5) : 6 mois après la contamination, 60 % des malades ont toujours un taux élevé d'ALAT (généralement, plus de 2 fois la normale), alors que 40 % sont guéris et ont des transaminases normales. Trois ans plus tard, 80 % des malades présentant une hypertransaminasémie ont développé une hépatite chronique. En résumé, sur 100 patients atteints par une hépatite aiguë, 40 à 60 développent une hépatite chronique (Figure 5).

Avec les tests de seconde génération, la détection de la séroconversion survient 7 à 8 semaines, en moyenne, après la contamination. Généralement, les anticorps anti-C22-3

Figure 5 : HEPATITE C : HISTOIRE NATURELLE, MARQUEURS ET TRAITEMENT



et anti C33c apparaissent au moment du pic des ALAT, une à deux semaines avant les anticorps anti-C100.

L'ARN du VHC peut être détecté 1 à 3 semaines après la contamination. Il est présent moins de 4 mois dans le cas d'une hépatite aigüe résolutive mais peut persister plusieurs décennies si l'hépatite évolue vers la chronicité (Farci, 1991).

V-2 Hépatite chronique

La chronicité se caractérise par une hypertransaminasémie supérieure à 2 fois la normale et par des signes histologiques d'hépatite chronique (Lee, 1991). Une cirrhose d'évolution très lente (3 à 10 ans) peut survenir chez 20 % des malades (Realdi, 1982). Cependant, il existe des facteurs aggravants, la progression peut être beaucoup plus rapide si le sujet est âgé au moment de l'infection, si sa consommation d'alcool est importante ou s'il y a co-infection avec le VIH ou le VHB. Chez 20 % des malades, la cirrhose évoluera vers un carcinome hépatocellulaire (CHC) sur une durée de 10 ans (Figure 5).

L'évolution inverse peut également être observée. Certaines hépatites chroniques peuvent guérir; ceci se traduit par une diminution en titre, voire une disparition, des anticorps anti-VHC. Un faible pourcentage de patients, 5 à 10 %, semble même complètement éradiquer l'ARN du VHC (Tanaka, 1991).

Il est difficile de prévoir l'évolution de l'hépatite C chez un patient à un temps donné. Des épisodes de nécroses hépatiques peuvent progresser à vitesse variable vers la cirrhose et inversement, la lésion peut être réversible et l'hépatite devenir inactive. La cirrhose peut également se développer chez un patient ayant initialement présenté une histologie bénigne, voire asymptomatique; le mécanisme de cette transition est inconnu (Schmilovitz-Weiss, 1993).

VI TRAITEMENT

VI-1 Interféron-alpha

L'interféron-alpha (IFN) est le seul traitement efficace reconnu de l'hépatite C. Cependant, la réponse au traitement n'est effective que chez 50 % des patients et se caractérise par une normalisation des ALAT et/ou de l'histologie du foie. Plus de la moitié des répondeurs feront une rechute après l'arrêt du traitement. A long terme, les transaminases sont stabilisées chez 10 à 25 % des patients, seulement (Hoofnagle, 1993; Varagona, 1992).

Le protocole généralement recommandé est l'injection 3 fois par semaine de 3.10^6 U pendant 6 mois.

L'IFN étant coûteux, le traitement est plus particulièrement indiqué pour les patients atteints d'une hépatite virale chronique avec un taux d'ALAT initial élevé et une biopsie du foie révélatrice d'une hépatite chronique active, sans lésion cirrhotique. En effet, les patients qui ne répondent pas au traitement semblent être déjà à un stade avancé de la maladie ou ont déjà développé une cirrhose (Marcellin, 1991). Si une baisse du taux d'ALAT ne s'est pas produit au début du traitement, la thérapie est inefficace et peut être stoppée. S'il s'agit d'une réponse partielle, la dose d'IFN peut être augmentée à 5.10^6 U et le traitement prolongé. Cependant, les effets de l'IFN sont nombreux et dose-limitants; c'est pourquoi, plus généralement, des patients recevant 3.10^6 U d'IFN verront leur dose diminuée à cause de la fatigue, de l'anxiété, d'une dépression, d'une leucopénie, de maux de têtes ou de nausées.

VI-2 Autres traitements

L'IFN est le traitement le plus efficace de l'hépatite C chronique, mais le taux de réponse est décevant, il est coûteux, difficile à administrer et mal toléré. Afin d'augmenter le taux de réponse, l'efficacité d'autres agents antiviraux, tels que la ribavirine (Di Biscéglie, 1991) et l'acyclovir (Pappas, 1985) ou d'immunomodulateurs tels que la prednisolone est étudiée.

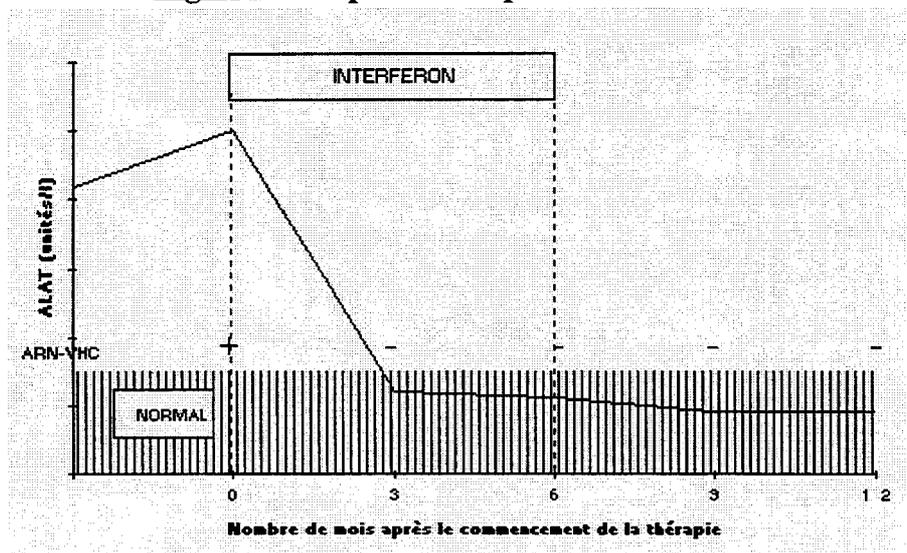
VI-3 Indications de la PCR au cours du traitement

Généralement, le taux de transaminases et la présence d'ARN-VHC sont corrélés.

Les patients peuvent être classés en 3 groupes en fonction de leur réponse au traitement IFN.

-Le premier groupe comprend 50 % des patients qui répondent au traitement IFN. Après 4 à 8 semaines de traitement, l'ARN du VHC devient indétectable par PCR. Pour environ 25 % des patients, le traitement aura un effet bénéfique à long terme (Figure 6). Le taux d'ALAT diminue dès le premier mois de traitement et se normalise après 2 ou 3 mois. Généralement, le taux d'ALAT est corrélé à la virémie puisque la diminution s'accompagne d'une disparition de l'ARN du VHC : la PCR se négative. A l'arrêt de la thérapie, les ALAT restent à un taux normal et l'ARN du VHC indétectable. Les rechutes tardives sont rares.

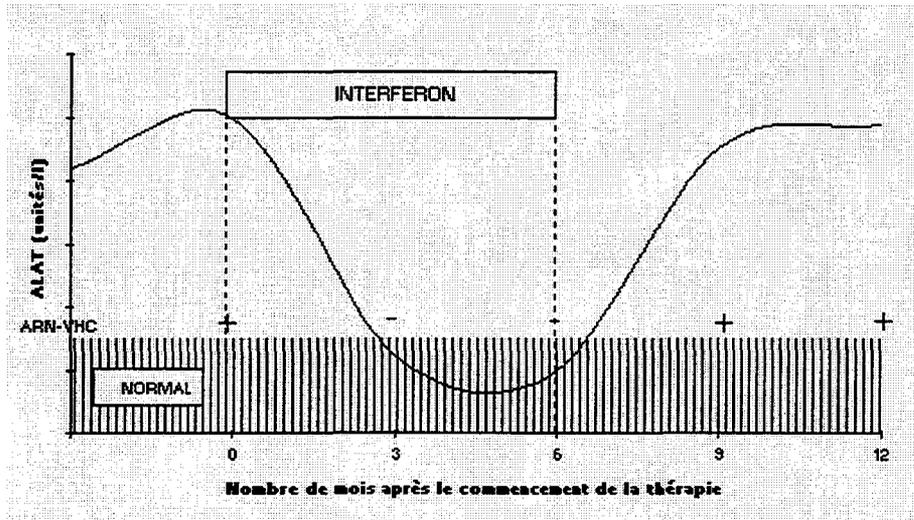
Figure 6 : Réponse complète au traitement IFN



Les 25 autres pour-cent répondent de la même manière au traitement mais rechutent très rapidement dès son arrêt (Figure 7). Cette rechute se caractérise par une réapparition de l'ARN du VHC et une nouvelle élévation des ALAT. Un nouveau traitement avec une dose plus forte peut être envisagé, si l'IFN est bien toléré (Hagiwara, 1992; Chayama, 1991).

Figure 7 : Réponse complète mais transitoire au traitement IFN

Rechute dès l'arrêt de la thérapie



-Un second groupe de 25 % des patients répond partiellement ou transitoirement au traitement. Pour certains, la PCR se négative momentanément, les ALAT diminuent mais ne sont jamais normales (Figure 8). Pour les autres, la PCR se négative, les ALAT deviennent normales; mais très rapidement, elles augmentent et l'ARN du VHC est à nouveau détectable malgré la poursuite du traitement (Figure 9). L'augmentation de la dose d'IFN peut être bénéfique, malheureusement certains patients ne supportent pas les effets secondaires.

Figure 8 : Réponse partielle au traitement IFN

Les taux d'ALAT diminuent mais ne sont jamais normaux

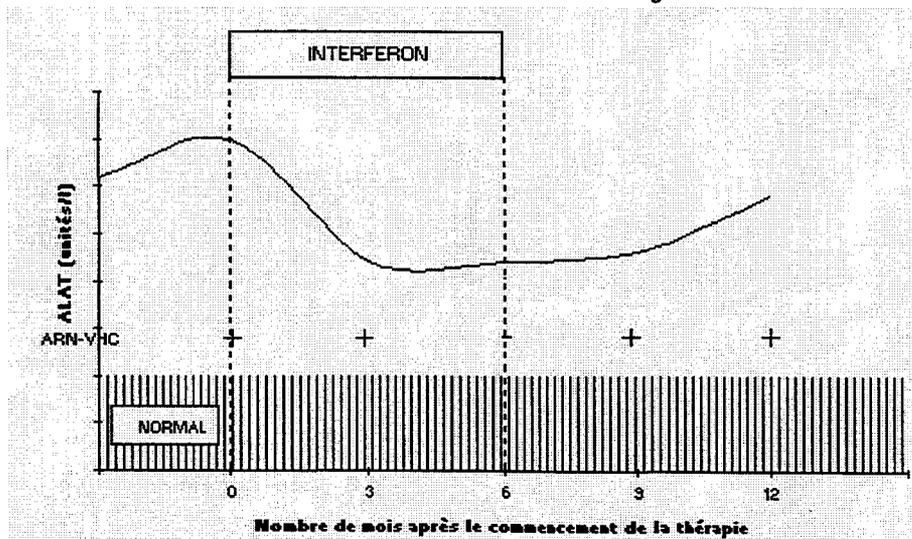
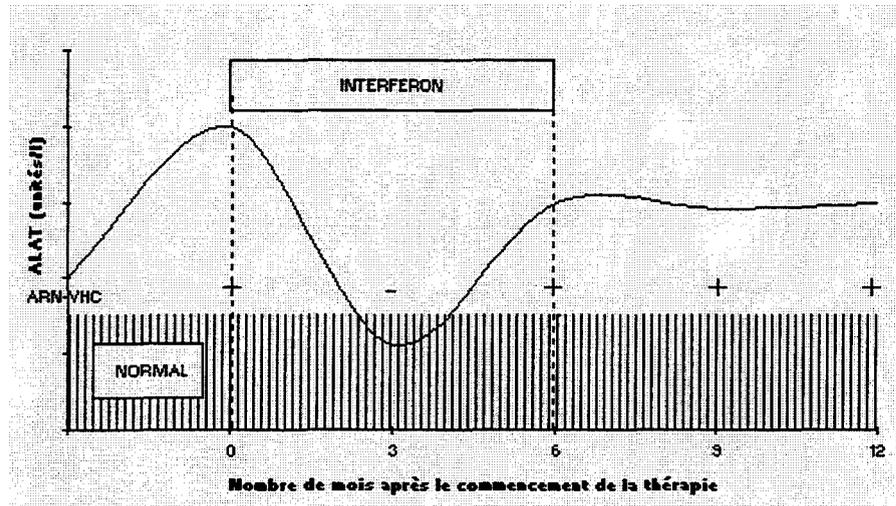
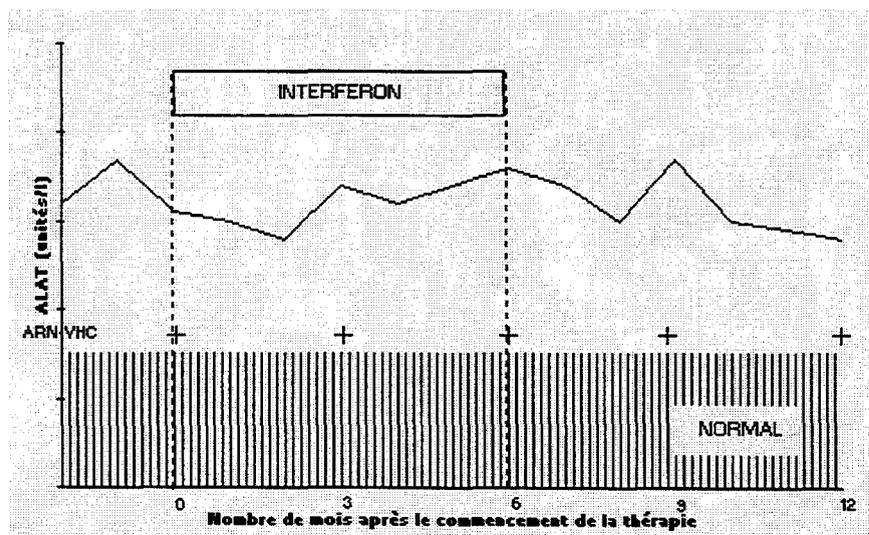


Figure 9 : Réponse complète mais transitoire au traitement IFN
Rechute malgré la poursuite du traitement



-Le troisième groupe de 25 % des patients ne répond pas au traitement IFN (Figure 10). Les ALAT restent élevées et l'ARN du VHC est détectable tout au long du traitement. Les raisons de cette résistance sont inconnues. L'arrêt du traitement peut être envisagé.

Figure 10 : Pas de réponse au traitement IFN



Il est possible de suivre plus précisément l'évolution de l'ARN du VHC au cours du traitement en effectuant une PCR quantitative (voir Chapitre Polymerase chain reaction). L'étude de Brillanti montre une bonne corrélation entre la réponse clinique et la disparition de l'ARN du VHC (Brillanti, 1991).

VIRUS HTLV

I HISTORIQUE

Les premiers virus associés à des leucémies et des cancers animaux, découverts au début du siècle, se sont révélés, soixante ans plus tard, être des rétrovirus. En 1908, deux chercheurs danois, Ellerman et Bang avaient montré que des cancers du sang (leucémies) du poulet pouvaient être induits par des agents de type viral, et, en 1911, Peyton Rous avait établi la responsabilité d'un virus dans le développement du sarcome de poulet. Ce n'est cependant qu'au début des années 70 que les chercheurs commencèrent véritablement à s'intéresser aux rétrovirus grâce à la biologie moléculaire, alors débutante, qui permit d'élucider leur mode de répllication. Temin et Mizutani, d'une part, et Baltimore, d'autre part, démontrèrent l'existence dans les particules virales de la transcriptase inverse ou rétrotranscriptase (RT), renversant le dogme, jusque-là sacré, de la transformation à sens unique de l'ADN vers l'ARN (Temin, 1970; Baltimore, 1970). La RT permet, en effet, la transformation de l'ARN rétroviral en un ADN proviral susceptible de s'intégrer dans le génome d'une cellule hôte.

En 1976, Morgan découvrit une substance produite par les lymphocytes-T activés : le facteur de croissance des lymphocytes-T appelé interleukine 2 (IL2) qui, en 1978, permit à Poiesz, dans le laboratoire de Gallo, de mettre en culture les lymphocytes-T d'un malade souffrant d'une forme cutanée de lymphome (syndrome de Sezary) (Morgan, 1976; Poiesz 1980). En 1980, à partir des lignées cellulaires en culture permanente, il isola un nouveau virus qui fut appelé "human T-cell leukemia/lymphoma virus" de type I (HTLV-I) (Poiesz 1980). Il fut rapidement établi que ce nouveau virus était aussi responsable d'une leucémie particulière, qui, à l'époque, semblait limitée au sud du Japon. Cette leucémie désignée sous le terme de "adult T-cell leukemia" ou ATL avait été décrite en 1977 par Takatsuki (Takatsuki

1977). Par ailleurs, Myoshi et Hinuma isolèrent en 1981, un rétrovirus à partir de cellules d'ATL en culture qui se révéla être identique au virus HTLV-I (Miyoshi, 1980; Hinuma, 1981).

En 1978, une lignée cellulaire T fut établie à partir des cellules de rate d'un homme souffrant d'une forme rare de leucémie dite à tricholeucocytes, à cause de l'aspect chevelu de la surface des cellules tumorales. En 1982, à partir de ces cellules fut isolé le virus HTLV-II par Kalyanamaran (Kalyanamaran, 1982a).

Après la description du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), un troisième rétrovirus humain appelé à l'origine lymphadenopathy-associated virus (LAV) (Barré-Sinoussi, 1983) ou HTLV-III (Gallo, 1983) fut identifié. Ce virus est maintenant nommé VIH (virus de l'immunodéficience humaine).

II CLASSIFICATION DES RETROVIRUS

La classification des rétrovirus est basée sur leur implication en pathologie, leur morphologie, leur antigénicité, la structure du génome et la présence de certains gènes.

Dans la famille des rétrovirus, 3 sous-familles se distinguent :

- les spumavirus
- les lentivirus
- les oncovirus

II-1 Les spumavirus

Les spumavirus produisent des infections chroniques chez de nombreuses espèces mais ne semblent pas provoquer de signes cliniques. Ils montrent peu de spécificité de tissus ou d'espèces et se répliquent sur des cultures fibroblastiques ou épithéliales de différents mammifères. A ce jour, aucune pathologie particulière ne leur est associée.

II-2 Les lentivirus

Ces rétrovirus sont associés à des maladies longues. Ceux qui ont un rôle pathogène existent chez les animaux domestiqués : mouton, chèvre, cheval, chat, bovin. Ce groupe est rapidement devenu important car les lentivirus humains sont les VIH-1 et -2 responsables du SIDA.

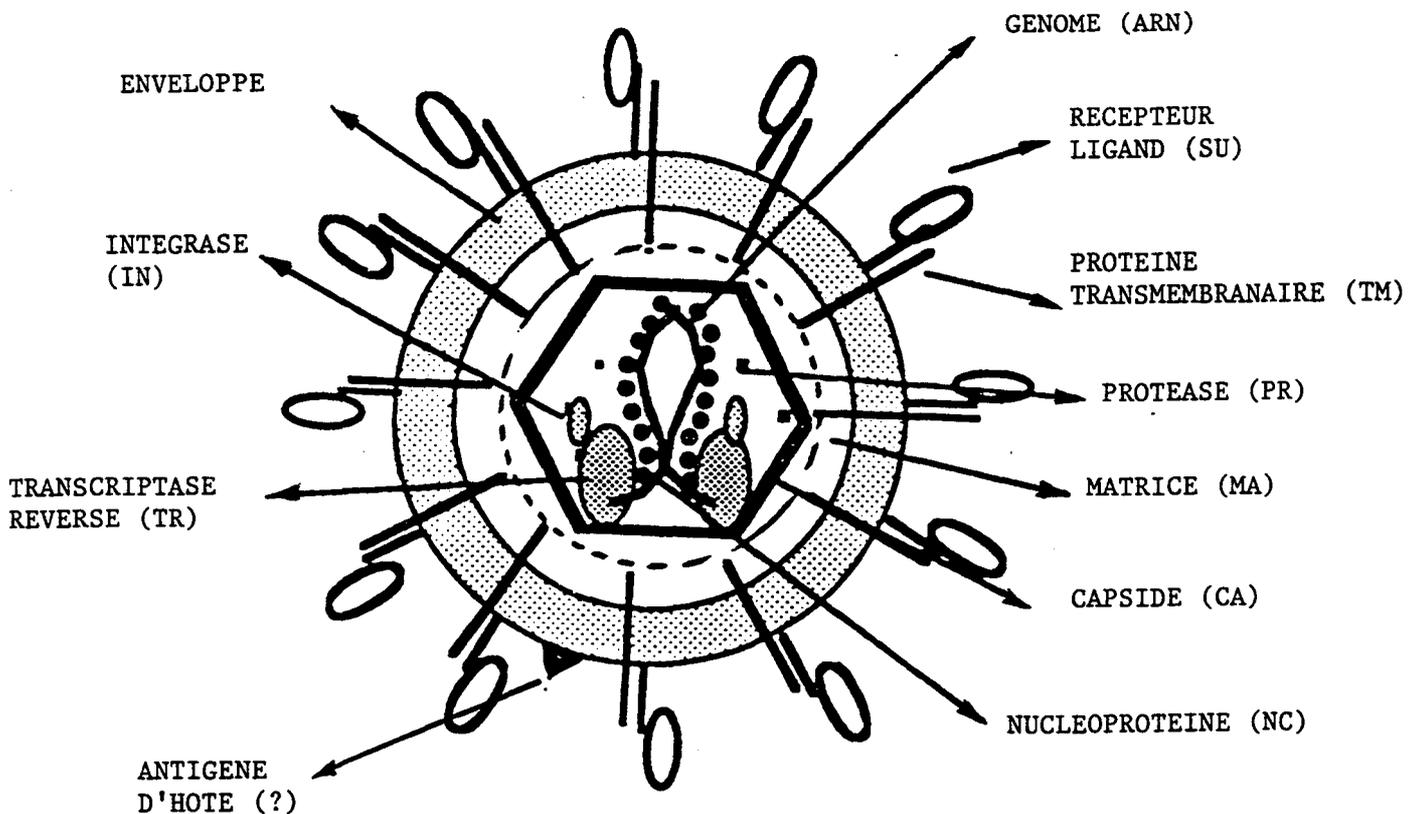
II-3 Les oncovirus

Les oncovirus induisent toute une variété de cancers chez l'animal. Ils représentent un modèle expérimental de choix pour étudier au niveau moléculaire les mécanismes qui peuvent amener une cellule à se transformer et à échapper au contrôle de l'organisme. Les oncovirus les mieux connus ont pour hôte le poulet, la souris, le chat, le singe et l'homme. Chez ce dernier, il s'agit des virus HTLV-I et HTLV-II.

III LES VIRUS HTLV

III-1 Morphologie

Le virus HTLV est une particule sphérique de 80 à 100 nm de diamètre entourée d'un fragment de membrane cytoplasmique emprunté à la cellule lors de son extrusion par bourgeonnement. Cette enveloppe est parsemée de spicules qui sont des glycoprotéines dont la séquence protéique est codée par le virus lui-même. Le "core" ou nucléocapside, un icosaèdre formé à partir des protéines gag codées par le virus, renferme un dimère d'ARN (Figure 11). A chaque molécule d'ARN est appariée une molécule d'ARN de transfert (ARNt) qui servira d'amorce à la réplication par la RT.

Figure 11 : Organisation du virus HTLV

III-2 Génome viral

Chaque molécule d'ARN a une longueur de 9000 bases environ. Les provirus HTLV-I (9035 bases) et HTLV-II (8952 bases) ont été entièrement séquencés en 1983 par Seiki et en 1984 par Shimotohno, respectivement (Seiki, 1983; Shimotohno, 1985). L'homologie de séquence entre les 2 virus est de 65 % environ.

Lors de la réplication, la RT rétrotranscrit l'ARN en ADN double brin, lequel est intégré sous forme de provirus dans le génome de la cellule hôte. Ce provirus est alors considéré par la cellule comme faisant partie de son génome au même titre qu'un gène cellulaire normal (Figure12).

III-3 Expression des gènes viraux

Les 3 gènes principaux gag, pol et env se retrouvent chez tous les rétrovirus, alors que le gène pX se retrouve exclusivement chez les virus HTLV (Figure 13).

III-3-1 Gag

Le gène gag code pour les 3 protéines internes du virus de masse moléculaire 19.000 (p19), 24.000 (p24), 15.000 (p15) (Robert-Guroff, 1981; Kalyanamaran, 1982a; Kalyanamaran, 1982b), un produit intermédiaire (p28) et un précurseur (p53). La protéine majeure du core est la p24, la p19 est la protéine gag aminoterminal et la p15, située à l'extrémité C terminale du gène gag, est une protéine de liaison avec l'acide nucléique.

III-3-2 Pol

Le gène pol code pour la rétrotranscriptase, la RNase H et l'intégrase. Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse et l'intégration du provirus dans la cellule hôte.

III-3-3 Env

Le gène env code pour les 2 glycoprotéines de l'enveloppe virale de masse moléculaire 46.000 (gp46) et 21.000 (gp21), et pour le précurseur gp62/68. La gp21 est transmembranaire et par analogie avec le VIH peut être impliquée dans la fusion avec la cellule. La gp46 est la protéine majeure d'enveloppe (Kalyanamaran, 1984).

Figure 12 : Structure de l'ARN et de l'ADN proviral au cours du cycle de réplication du virus HTLV

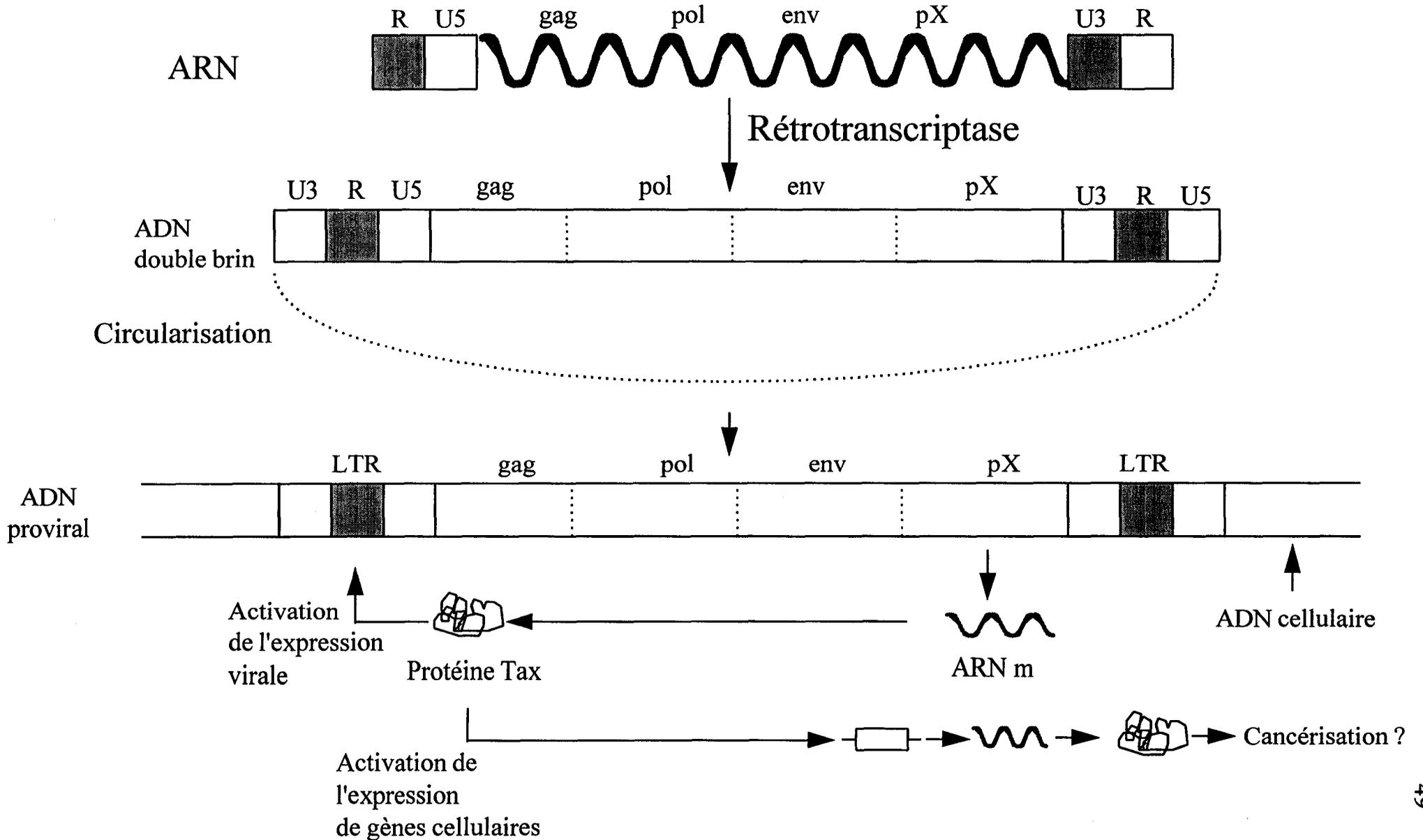
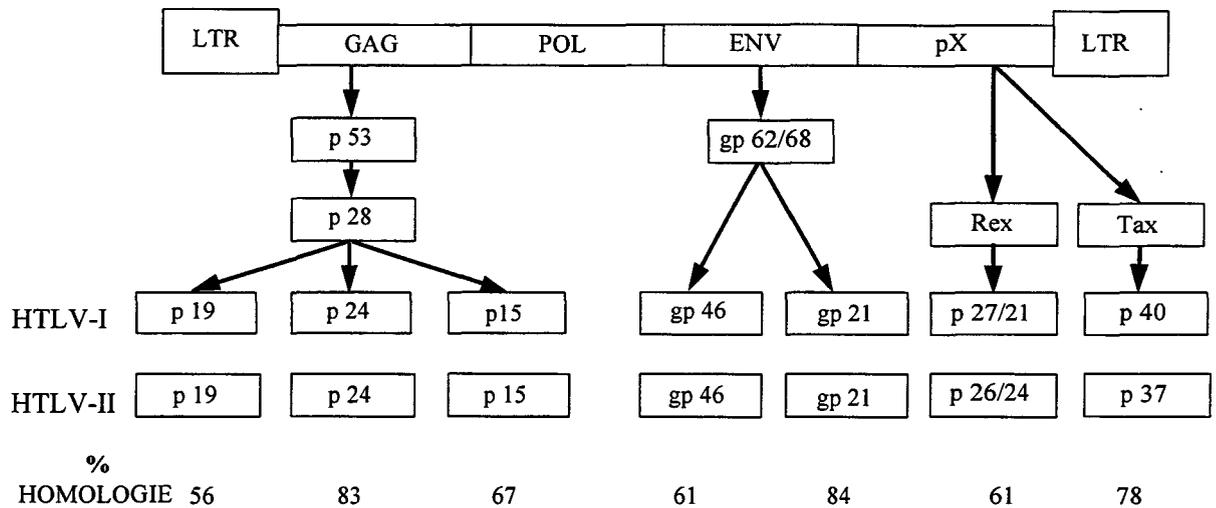


Figure 13 : Structure des virus HTLV-I et HTLV-II
Principales protéines et homologie



III-3-4 Le gène pX

Le gène pX est propre aux virus HTLV. L'analyse de la séquence nucléotidique a montré que cette région contient 2 cadres de lecture ouverts qui produisent 2 protéines de trans-régulation nommées tax et rex. Tax est une protéine non structurale de masse moléculaire 40.000 (HTLV-I) ou 37.000 (HTLV-II). Elle est un trans-activateur des gènes viraux et cellulaires et agit sur le « long terminal repeat » (LTR) pour réguler la transcription de l'ARN viral. Enfin, elle est capable de trans-activer les gènes cellulaires de l'IL2 et de son récepteur induisant éventuellement la transformation des lymphocytes et leur prolifération monoclonale lente (en 20 à 30 ans). La protéine rex agit au niveau post-transcriptionnel et est impliquée dans le transport de l'ARN messenger (ARNm) dans le cytoplasme pour la production des protéines virales structurales.

IV DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

IV-1 Trousses de dépistage

Le dépistage des anticorps anti-HTLV sur les dons de sang est obligatoire en France Continentale depuis le 15 juillet 1991. A cette époque, 3 tests ELISA utilisant comme

antigène le lysat de toutes les protéines du virus HTLV-I étaient disponibles : Abbott, North Chicago, Illinois, USA; Organon-Teknika, Durham, North Carolina, USA; Cambridge Biotech distribué en France par Ortho-Diagnostics System, Roissy. L'homologie entre les 2 virus HTLV-I et HTLV-II étant de 65 %, ces trousse détectent les anticorps dirigés contre les 2 sérotypes.

Les échantillons positifs répétables en ELISA (0,24 % en France Continentale, communication JM Lemaire, non publiée) sont confirmés en western-blot (WB).

IV-2 Trousses de confirmation et de différenciation

IV-2-1 Tests de confirmation de première génération

Avant 1987, 2 trousse western-blot (WB) étaient disponibles : Biotech (Du Pont puis Ortho-Diagnostics System) et un réactif utilisé en recherche mis au point par les laboratoires Abbott. Toutes deux étaient fabriquées à partir de lysats du virus HTLV-I purifiés. Ces tests manquaient de sensibilité et il était nécessaire de recourir à la technique de radio-immunoprécipitation (RIPA) ou à la PCR.

Aucun des 2 tests de première génération ne permettait la différenciation entre les virus HTLV-I et HTLV-II. En cas de positivité, il était nécessaire de réaliser une PCR, qui seule permettait de discriminer les 2 virus.

Critères de positivité

En 1987, ces critères étaient définis par la firme Biotech. Un sérum était considéré positif s'il présentait les 2 anticorps anti-gag : p19 et p24.

En 1988, le "Center of Disease Control" (CDC) établit de nouveaux critères : anti-env (gp62/68 ou gp46) + anti-gag (p24) (CDC, 1988).

En 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) proposait anti-env (gp62/68 ou gp46) + anti-gag (p19 ou p24) (WHO, 1990).

IV-2-2 Les tests actuels

En 1991, 2 nouvelles trousse WB ont été commercialisées et utilisées pour la confirmation des échantillons réactifs en ELISA dès le démarrage du dépistage des anticorps anti-HTLV chez les donneurs de sang. Il s'agit du HTLV-blot 2.2 de Diagnostic Biotechnology (DBL) distribué en France par Bioptim et du HTLV-I/II western-blot de Biotech/Ortho. Les bandelettes ont été enrichies en protéines d'enveloppe produites par recombinaison génétique. La p21env_r (rgp21) est une protéine transmembranaire présentant des épitopes communs aux 2 virus HTLV-I et HTLV-II. La trousse DBL présente, en plus, une seconde protéine spécifique du virus HTLV-I : la rgp46-I ou MTA-1. Depuis 1993, une nouvelle version de cette trousse (HTLV-blot 2.3) contenant en plus de la rgp46-I et de la rgp21, une troisième protéine recombinante spécifique du virus HTLV-II : la rgp46-II (K55) est disponible.

Critères de positivité

Les critères de positivité proposés par les 2 firmes sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Critères de positivité des western-blot DBL et Biotech.

	Anti HTLV-I/II positif	Anti HTLV-I positif	Anti HTLV-II positif
DBL/Bioptim	gag (p19 ou p24) + env (gp46 ou rgp21)	gag (p19 ou p24) + env (gp46 ou rgp46-I) + env (rgp21)	gag (p24) + env (rgp46-II) + env (rgp21)
Biotech/Ortho	gag (p24) + env (gp46 ou rgp21)	gag (p19>p24) + env (gp46 ou rgp21)	gag (p24<p19 ou p19 absent) + env (rgp21)

IV-2-3 Modification des critères de positivité du western-blot par le Groupe Rétrovirus de la S.F.T.S.

Les protéines recombinantes intégrées dans les tests de confirmation de seconde génération ont été un apport important pour améliorer la spécificité et la sensibilité du WB :

-Avec la trousse DBL, les rgp46-I et -II permettent de différencier les virus HTLV-I et HTLV-II.

-La rgp21 a permis d'augmenter la sensibilité dans la détection des anticorps dirigés contre les protéines d'enveloppe (Manns, 1991; Lal, 1992). Les résultats obtenus par Couroucé le confirment : tous les échantillons anti-HTLV positif ont réagi avec la rgp21 alors que 54 % d'entre eux sont négatifs pour la gp46 native (Couroucé, 1993).

Cependant, des problèmes subsistent :

-Avec la trousse DBL, environ 4,5 % des sérums anti-HTLV-I positif ne réagissent pas avec la rgp46-I (Couroucé, 1993) et 1 % des sérums anti-HTLV-II positif ne réagissent pas avec la rgp46-II (Lipka, 1992).

-L'inconvénient majeur des 2 trousse sont les fausses réactivités sur la rgp21 (Manns, 1991; Couroucé, 1993; Busch, 1994). Cette fausse réactivité peut être isolée ou associée à une seconde fausse réactivité sur une protéine gag (p19 ou p24). Dans ce cas, l'échantillon est positif selon les critères des firmes. Dans l'étude de Couroucé, cela concerne 6 % des échantillons testés, alors que dans 94 % des cas confirmés positifs en immunofluorescence, le profil WB était : rgp21, p19 et p24 (Couroucé, 1993).

Afin de ne pas annoncer à tort une séropositivité anti-HTLV à un donneur de sang, le Groupe Rétrovirus (GRV) de la Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS) a proposé une modification des critères de positivité. Ces nouveaux critères sont la présence, au minimum, de 3 bandes au niveau des rgp21, p19 et p24. Tout prélèvement réagissant avec une ou deux protéines est dit "indéterminé" (Lipka, 1991).

La fréquence de ces résultats indéterminés est élevée. Coste a testé 1200 sérums positifs répétables en ELISA : 6 % ont été confirmés anti-HTLV positif, seuls 17 % étaient négatifs et 77 % présentaient un profil incomplet en WB (Coste, 1992). De plus, avec ces critères, les échantillons réactifs avec la rgp21 et une seule protéine gag nécessitent des investigations supplémentaires, surtout les échantillons HTLV-II probables qui sont maintenant classés indéterminés.

V EPIDEMIOLOGIE

V-1 HTLV-1

V-1-1 Dans le monde

Des zones de forte endémie apparaissent clairement en Amérique Centrale et en Amérique du Sud parmi les populations indiennes, en Afrique, en Mélanésie, en Asie et dans les Iles Caraïbes.

V-1-2 En France

En France Continentale, la séroprévalence dans la population générale est faible (0,039 pour mille) (Couroucé, 1993), alors que dans les territoires français des Iles Caraïbes : Martinique et Guadeloupe, elle est de 5 à 8 pour mille. En raison de cette forte prévalence, le dépistage systématique des anticorps anti-HTLV sur les dons de sang a été rendu obligatoire dans ces départements et en Guyane Française, dès janvier 1989.

V-2 HTLV-II

L'HTLV-II est endémique dans plusieurs groupes indiens d'Amérique du Nord (Panama, Floride, Nouveau Mexique) et les tribus Cayapo et Kraho du Brésil (Kaplan, 1993; Hall, 1994).

Les infections HTLV-II sont également importantes chez les drogués par voie intraveineuse. Aux Etats-Unis, différentes études signalent des taux de positivité de 0,4 à 20 % (Kaplan, 1993), et lors d'enquêtes réalisées chez les donneurs de sang, il est

apparu que les 2 types HTLV-I et HTLV-II arrivaient presque à égalité (43 % HTLV-I, 52 % HTLV-II) (Lee, 1991). En Europe, parmi les drogués, l'HTLV-II est prévalent en Italie et en Espagne (Zella, 1990; Soriano, 1990), alors qu'en France, la prévalence n'est que de 0,2 % (Coste, 1993).

V-3 Transmission

V-3-1 Transfusion Sanguine et HTLV

Seule la transfusion de produits sanguins contenant des cellules est infectante : 64 % des receveurs de sang total anti-HTLV positif sont infectés (Okochi, 1984). Toutefois, le taux de contamination diminue avec la durée de conservation du dérivé labile. Le plasma n'est pas contaminant puisque le virus n'est pas circulant. Ce mode de transmission a été considérablement réduit par le dépistage des anticorps anti-HTLV chez les donneurs de sang (depuis juin 1991 en France).

V-3-2 Toxicomanie et HTLV

La transmission des virus HTLV-I et HTLV-II chez les drogués par voie intraveineuse s'effectue probablement lors de l'échange de seringues contaminées. Toutefois, l'importance de ce mode de transmission est difficile à évaluer. L'infection par le virus HTLV-II semble être importante : une étude américaine a montré qu'un épisode de toxicomanie du partenaire sexuel est le risque majeur d'infection HTLV-II chez les femmes donneuses de sang (Biggar, 1991; Lee, 1991).

V-3-3 Transmission sexuelle et HTLV

Le taux de transmission de l'HTLV-I dans le sens homme → femme serait de 5 % par an contre 1 % dans le sens femme → homme. L'HTLV-II est également transmissible sexuellement puisque, dans l'étude de Lee, la plupart des donneuses de sang anti-HTLV-II positif ont eu un contact sexuel avec un drogué par voie intraveineuse contaminé par le virus (Lee, 1991).

V-4-4 Transmission mère-enfant et HTLV

Chez les nouveaux-nés nés de mère HTLV positive, le taux d'anticorps anti-HTLV décroît durant les 6 à 9 mois après la naissance signifiant qu'il s'agit d'anticorps maternels transmis passivement (Verdier, 1992). Toutefois, des enfants restent séropositifs, sans diminution du titre d'anticorps. L'essentiel de cette transmission mère-enfant se fait lors de l'allaitement. La dose infectante serait de 10^7 à 10^8 cellules infectées, ce qui correspond à une période de 6 mois d'allaitement à raison de 500 mL par jour. Le taux de transmission serait de 40 % en cas d'allaitement exclusif au sein (Verdier, 1992).

VI PATHOLOGIES ASSOCIEES

Les pathologies associées concernent principalement l'HTLV-I. Quant au virus HTLV-II, outre l'isolat initial (Kalyanamaran, 1984), seul un autre cas de leucémie à tricholeucocytes T a été décrit (Rosenblatt, 1986). Cependant, l'HTLV-II infectant fréquemment les toxicomanes, de nouvelles maladies pourraient apparaître (Hall, 1994).

VI-1 Leucémie T de l'adulte (Adult T-cell leukemia ou ATL)

Il s'agit d'une variété rare de prolifération des lymphocytes T CD4 décrite par Takatsuki au Japon (Takatsuki, 1977). L'ATL, dans sa forme la plus aigüe, est caractérisée par des atteintes cutanées et ganglionnaires, une hypercalcémie et la présence de cellules multilobées circulantes. L'évolution est rapide et le plus souvent fatale, la survie étant de 6 à 24 mois pour les formes les plus graves.

L'ATL se développe chez 2 à 4 % des personnes infectées par l'HTLV, la maladie débutant généralement entre 50 et 69 ans.

VI-2 Paraparésie spastique tropicale / Myélopathie chronique associée au virus HTLV-I (TSP/HAM)

Cette maladie a été décrite en 1985 en Martinique et appelée paraparésie spastique tropicale, puis l'année suivante au Japon sous le nom de myélopathie associée au virus HTLV-I (Gessain, 1985; Osame, 1986). Les TSP/HAM sont caractérisées, au plan neuropathologique, par l'apparition d'un processus inflammatoire affectant principalement la moelle épinière, dont l'intensité s'accroît au cours de l'évolution de la maladie et entraîne une paralysie progressive des membres inférieurs.

La période d'incubation est plus courte que celle de l'ATL, la maladie débute généralement entre 40 et 50 ans. La TSP/HAM se développe chez 1 % des sujets infectés par le virus HTLV-I (Kaplan, 1990) et est plus souvent associée à une contamination transfusionnelle (25 % des cas) (Osame, 1990).

PARVOVIRUS B19

I HISTORIQUE

Le premier parvovirus dont le pouvoir pathogène a été démontré chez l'homme, est le parvovirus humain sérique B19, découvert simultanément en France et en Angleterre en 1975 (Couroucé, 1984; Cossart, 1975).

Auparavant, les parvovirus étaient surtout connus en pathologie animale (entérite du chien, atteinte foetale du porc, panleucopénie du chat), et ce n'est qu'au début des années 70 qu'il a été possible de relier le parvovirus à une infection humaine. De petits virus, présents dans des extraits de selles de volontaires expérimentalement infectés, possédaient des caractères semblables à ceux des parvovirus connus chez les animaux (Paver, 1993). Par ailleurs, chez des donneurs de sang, lors d'un dépistage de l'antigène HBs, Cossart a remarqué des particules ressemblant aux parvovirus dans des sérums présentant des réactions avec des anticorps polyclonaux anti-HBs contenant aussi des anticorps anti-parvovirus. Ces réactions étaient non confirmées avec des anticorps polyclonaux anti-HBs dépourvus d'anti-parvovirus. Par ailleurs, un second prélèvement effectué chez ces sujets montrait l'apparition d'anticorps dirigés contre l'antigène mis en évidence. Ces virus d'abord appelés SPLV (serum parvovirus-like virus) ou HPV (human parvovirus) furent finalement nommés B19 car l'un des sérums étudiés était étiqueté ainsi.

II PARVOVIRUS B19

II-1 Classification

La famille des parvoviridae est divisée en 2 sous-familles, chacune d'entre elles comprenant 3 genres :

Famille : Parvoviridae

-Sous-famille : Parvovirinae

-Genre : Parvovirus

Erythrovirus

Dependovirus

-Sous-famille : Densovirinae

-Genre : Densovirus

Iteravirus

Contravirus

II-2 Morphologie

Le parvovirus est un virus non enveloppé, de petite taille (20 à 25 nm), de forme icosaédrique (formé de 32 capsomères).

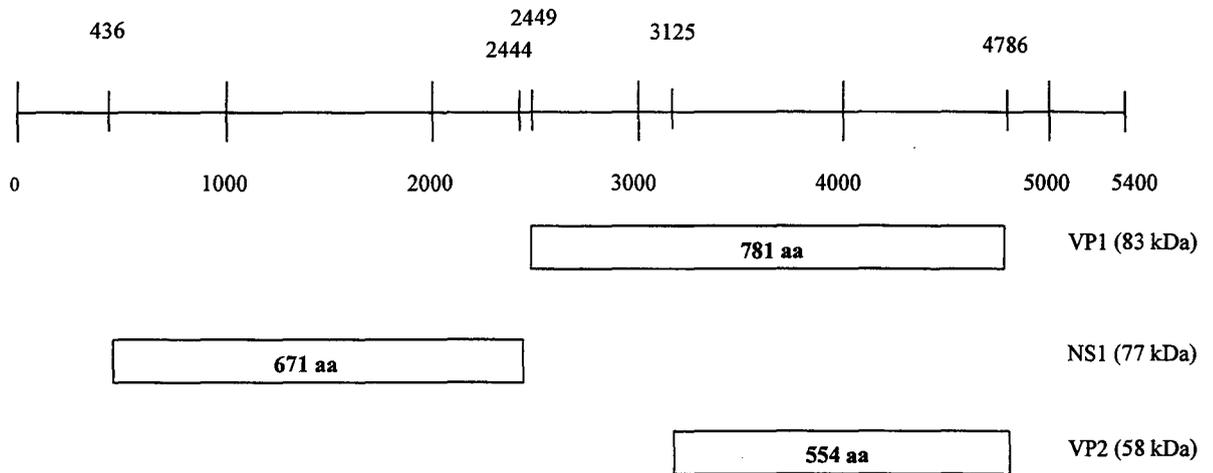
L'inactivation de ces virus dans les produits sanguins pose un problème car ils sont résistants aux solvants des lipides, aux pH compris entre 3 et 9, au chauffage 1 H à 56°C et à des fortes concentrations en sels. Par contre, ils sont sensibles à la bêta-propiolactone, la formaline, l'hydroxylamine, aux agents oxydants et partiellement aux congélations-décongélations répétées (Martin, 1993).

II-3 Génome viral

L'ADN du parvovirus est un simple brin linéaire de 5,4 kb de long, de polarité positive ou négative, entièrement séquencé par Shade en 1986 (Shade, 1986). Les extrémités 5' et 3' s'autohybrident sur elle-mêmes en raison de l'existence de séquences complémentaires riches en GC. Ces palindromes en épingle à cheveux ("hairpin") d'une longueur de 150 (5') et 280 (3') bases environ (Astell, 1989) jouent un rôle dans la réplication de l'ADN viral. Neuf ARN prennent naissance au niveau des 5 TATA box situées dans la région 5' du génome.

II-4 Protéines virales

Ces protéines sont représentées Figure 14.

Figure 14 : Protéines du parvovirus B19

II-4-1 Protéines non structurales : les protéines NS1 et NS2

La NS1 est une protéine régulatrice de 671 aa (77 kDa) qui semble transactiver le promoteur riche en GC qui contrôle la synthèse de son propre ARNm. Elle est codée par la région gauche du génome et ne semble pas être phosphorylée. Ses fonctions de coupure et d'hélicase permettraient le démarrage de la réplication (Astell, 1990). La protéine NS2 de 25 kDa n'a pas de fonction connue.

II-4-2 Protéines structurales : les protéines VP1 et VP2

Les protéines VP1 (83 kDa) et VP2 (58 kDa), codées par la région droite du génome, représentent 4 et 96 % des protéines de capside, respectivement (Morinet, 1991). Elles sont assemblées dans le cytoplasme, puis les capsides vides sont transportées vers le noyau pour y encapsider l'ADN (Martin, 1993).

II-5 Cycle de réplication

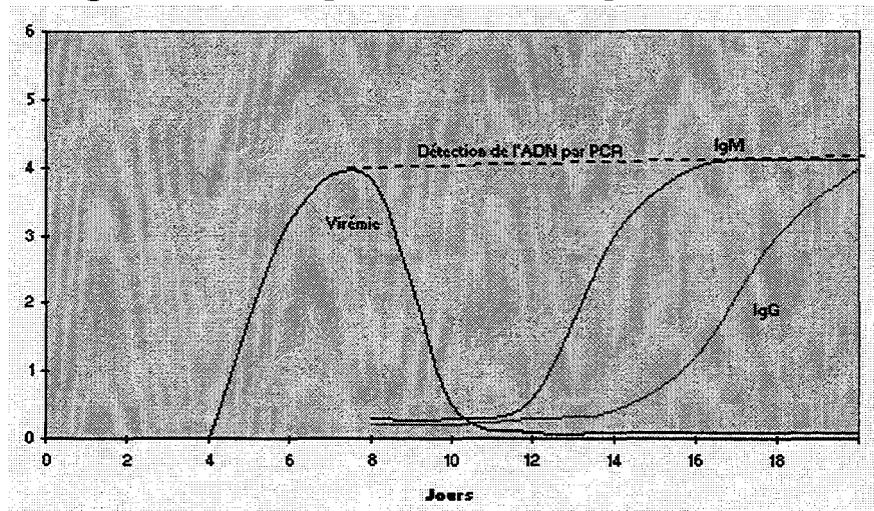
Un cycle de réplication dure 72 heures. Le parvovirus pénètre dans les cellules permissives par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. La réplication de l'ADN se

déroule dans le noyau, par contre les capsides formées par les protéines VP1 et VP2 sont assemblées dans le cytoplasme. Puis, l'encapsulation de l'ADN a lieu dans le noyau. Finalement, les particules virales sont libérées dans le cytoplasme par lyse de la cellule. L'immunomicroscopie électronique permet aisément de distinguer capsides vides et particules complètes.

III DIAGNOSTIC

Le parvovirus pénètre dans l'organisme par les voies respiratoires et est détecté 6 à 8 jours plus tard dans le sang (Figure 15). La virémie dure 2 à 6 jours. Les IgM apparaissent 12 à 14 jours après la primo-infection et peuvent persister jusqu'à 6 mois. Les IgG apparaissent vers le 16^{ème} jour et persisteront toute la vie.

Figure 15 : Cinétique de l'infection à parvovirus B19



III-1 Détection directe du parvovirus B19

III-1-1 Virus

Les particules virales peuvent être mises en évidence par la méthode d'immunomicroscopie électronique. A partir de plasma ou de sérum, un culot viral est préparé, auquel est ajouté un sérum contenant des anticorps anti-B19. Les agrégats de particules virales sont ensuite observés en microscopie électronique.

III-1-2 Protéines

Les antigènes peuvent être révélés par des méthodes immunoenzymatiques (IEA) ou radioimmunologiques (RIA).

III-1-3 ADN

L'ADN peut être mis en évidence avant l'apparition des IgM par des techniques d'hybridation moléculaire (dot-blot et Southern-blot) (Morinet, 1986). La sensibilité de ces techniques est de 10^5 particules virales/millilitre.

L'amplification génique ou PCR étant une technique très sensible, il est nécessaire d'y recourir chez les patients atteints d'infection B19 chronique. En effet, il est possible de détecter 1 à 10 fg d'ADN viral (équivalent à 10-100 génomes) (Clewley, 1989; Salimans, 1989; Frickhofen, 1991). Cette sensibilité peut encore être augmentée à 1 copie/mL en réalisant une double amplification génique ou "nested-PCR"(Carrière, 1993; Patou, 1993).

III-1-4 Culture

La culture du B19 est très délicate et n'est réalisable que sur les cellules de précurseurs érythroïdes (les plus sensibles étant les CFU-E et les BFU-E). Le virus ne se multiplie pas sur les lignées cellulaires classiques.

III-2 Diagnostic d'une infection à parvovirus B19

La virémie étant très brève, il est très difficile de l'observer. Le diagnostic est donc essentiellement sérologique et consiste en la recherche d'anticorps spécifiques de type IgM dirigés contre les protéines VP1 et VP2. Ceux-ci peuvent être détectés jusqu'à 6 mois après l'infection. Apparaissent, ensuite, les IgG dirigées contre la protéine VP1. La présence d'IgG dirigées contre les protéines VP1 et VP2 reflète une infection ancienne.

Les techniques d'ingénierie moléculaire ont permis d'obtenir des quantités importantes d'antigènes sous forme de protéines recombinantes ou de peptides correspondants aux

protéines VP1 et VP2, à partir desquels ont été développées des trousse d'immunoenzymologie spécifiques des IgG et des IgM. Ces trousse ELISA sont maintenant commercialisées et remplacent peu à peu les techniques d'immunoprécipitation, longtemps seules disponibles.

IV CLINIQUE

L'infection à parvovirus B19 est bénigne chez le malade auparavant en bonne santé, mais elle peut parfois avoir des conséquences plus graves : le parvovirus est associé à diverses manifestations cliniques telles que l'érythème infectieux, l'anémie sévère (en particulier chez les immunodéprimés), la crise d'aplasie, l'arthrite et l'anasarque foetoplacentaire.

IV-1 Erythème infectieux (EI) et Parvovirus B19

L'EI est également appelé "cinquième maladie" afin de la différencier des 4 autres exanthèmes : rougeole, scarlatine, rubéole et exanthème subit (roséole infantile). Cette maladie, survenant principalement chez l'enfant, a été attribuée au parvovirus par Anderson (Anderson, 1983). Elle est caractérisée par l'apparition sur les joues, puis sur les membres, d'une éruption rouge confluyente qui donne au visage un aspect "souffleté". Cette éruption est très sensible au soleil, au bain, à l'effort ou à tout autre facteur de stress qui intensifie la rougeur. La maladie dure 11 jours en moyenne.

Chez l'adulte, il s'agit d'une éruption maculo-papuleuse associée à une atteinte articulaire. Un syndrome pseudo-grippal initial et une asthénie sont parfois observés. La primo-infection est symptomatique dans 20 % des cas.

IV-2 Aplasie médullaire et Parvovirus B19

La crise d'aplasie ou crise érythroblastopénique est un arrêt transitoire, complet de l'érythropoïèse dans la moëlle osseuse, avec diminution importante du taux d'hémoglobine. Ces épisodes transitoires d'accentuation brutale de l'anémie surviennent surtout chez l'enfant. Chez les patients sains, l'anémie est asymptomatique et dure 10

jours environ. Parallèlement, une thrombopénie et une neutropénie peuvent être observées. Le virus a été identifié pour la première fois en 1981 par Pattison, dans le sérum de malades drépanocytaires présentant un épisode d'érythroblastopénie (Pattison, 1981). Chez les patients atteints d'hémoglobinopathies telle que la drépanocytose, l'anémie est aigüe et symptomatique car la durée de vie des globules rouges est raccourcie (Serjeant, 1981). Les recherches chez ces malades déficients sur le plan hématologique ont montré une action du virus sur les précurseurs des cellules érythropoïétiques.

L'aplasie médullaire peut être chronique en cas de réplication virale médullaire chronique au cours de certains déficits immunitaires, de leucémies aigües ou chroniques et du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La virémie est persistante et l'ADN viral est présent dans les cellules médullaires (Clewley, 1985). La synthèse d'IgM est prolongée et intermittente. Les IgG sont présentes en quantité faible, voire absentes. L'administration d'immunoglobulines contenant des anticorps spécifiques permet transitoirement une disparition de l'anémie et de la virémie.

IV-3 Infection foetale et Parvovirus B19

L'infection à parvovirus B19 est associée à des troubles variés du développement foetal (Schwartz, 1988). Les cellules cibles du virus sont les cellules de l'érythropoïèse dont le foie est l'organe principal. Le foetus présente une forte anémie qui entraîne une forte insuffisance cardiaque, une anasarque foetoplacentaire et un avortement spontané. Le risque de décès in utero en cas d'infection au cours de la grossesse varie de 2 à 26 % (Anderson, 1990; Morinet, 1992). La recherche de l'ADN viral dans le sang du cordon ou le liquide amniotique par PCR semble être la meilleure technique pour confirmer l'infection à parvovirus. Un traitement par exsanguino-transfusion peut alors être envisagé pour corriger l'anémie foetale (Schwartz, 1988). Toutefois, il s'agit d'une opération risquée, dont les chances de réussite sont faibles.

IV-4 Arthropathies et parvovirus B19

Des arthrites des doigts, poignets, genoux accompagnent 5 à 8 % des érythèmes infectieux chez l'enfant. Chez l'adulte, une polyarthrite aiguë pouvant persister plusieurs mois (White, 1988) et s'accompagnant d'une élévation transitoire du facteur rhumatoïde peut être observée chez 50 % des patients primo-infectés.

V EPIDEMIOLOGIE

La transmission du virus dans l'organisme se fait essentiellement par la voie respiratoire, mais une transmission parentérale par perfusion de facteurs de coagulation est possible. L'érythème infectieux obéit à un rythme saisonnier, les épidémies survenant en hiver et au printemps. Les victimes sont surtout les enfants, ce qui explique que 60 % des adultes soient séropositifs vis-à-vis du virus B19.

Les épidémies de crise d'aplasie coïncident fréquemment avec les épidémies d'EI.

Le parvovirus B19 peut être transmis par voie sanguine. Toutefois, le risque transfusionnel semble mineur 1/33 000 à 1/100 000 dons (Couroucé, 1984; Mc Omish, 1993b).

Chez les hémophiles, l'injection de facteur VIII et de facteur IX peut également transmettre le parvovirus car ceux-ci sont préparés à partir de pools de plasma de plus de 5000 dons. Une étude de Williams indique que 89 % d'enfants hémophiles ayant reçus des facteurs VIII non traités sont anticorps anti-B19 positifs, contre 38 % dans le groupe témoin d'enfants du même âge et 48 % des enfants traités avec des cryoprécipités (Williams, 1990). Par contre, un seul des 11 enfants ayant reçu un concentré de facteur VIII chauffé a été dépisté IgG anti-B19 positif, ce qui indique que le traitement par chauffage réduit le risque de transmission du virus. D'autres études effectuées sur des concentrés de facteurs antihémophiliques traités par solvant/détergent (SD) montrent que le B19 n'est pas éliminé et peut être transmis. Santagostino souligne que 4 patients sur 10 ont présenté des IgM anti-B19, 1 à 2 semaines après injection, alors qu'ils étaient négatifs auparavant (Santagostino, 1994).

Lefrère a testé par PCR 30 concentrés de facteurs de coagulation traités SD : six d'entre eux présentaient de l'ADN de parvovirus. Toutefois, cela ne signifie pas que tous ces produits sont infectants; dans certains cas, il pourrait s'agir de fragments d'ADN qui subsistent après le traitement (Lefrère, 1993). Une étude récente de Laurian souligne que des hémophiles ont été contaminés par des concentrés de facteur VIII quel que soit le procédé d'inactivation virale (Pasteurisation, chauffage, SD), ces procédés n'étant efficaces que sur les virus enveloppés. Parmi les hémophiles A sévères et hémophiles A modérés n'ayant reçu, depuis leur naissance, que des concentrés de facteur VIII de très haute pureté solvant/détergent (VIII THPSD), 83 et 87 % ont des anticorps anti-B19, respectivement, alors que dans le groupe témoin, 36 % des enfants avaient une sérologie positive (Laurian, 1994). Les procédés actuels d'inactivation ne sont pas totalement efficaces sur les virus non enveloppés.

POLYMERASE CHAIN REACTION

I GENERALITES

En 1985, la "polymerase chain reaction" (PCR), une méthode d'amplification en tube de fragments d'acides désoxyribonucléiques (ADN) sélectionnés, a été développée par des chercheurs de la firme Cetus (Saiki, 1985). La traduction française est "amplification en chaîne par polymerase" (ACP), mais à cette terminologie très peu usitée, est préférée le terme "PCR". Cette technique est une amplification sélective, in vitro, de courtes séquences d'ADN ou d'ARN (de 50 à plus de 2000 pb, indétectables par des techniques de biologie moléculaire classiques du fait de leur faible quantité, alors qu'en PCR, 1 à 5 microgrammes (μg) suffisent. L'amplification est efficace et permet d'obtenir 10^6 à 10^9 copies en quelques heures. Ensuite, les acides nucléiques obtenus peuvent être facilement clonés et /ou séquencés.

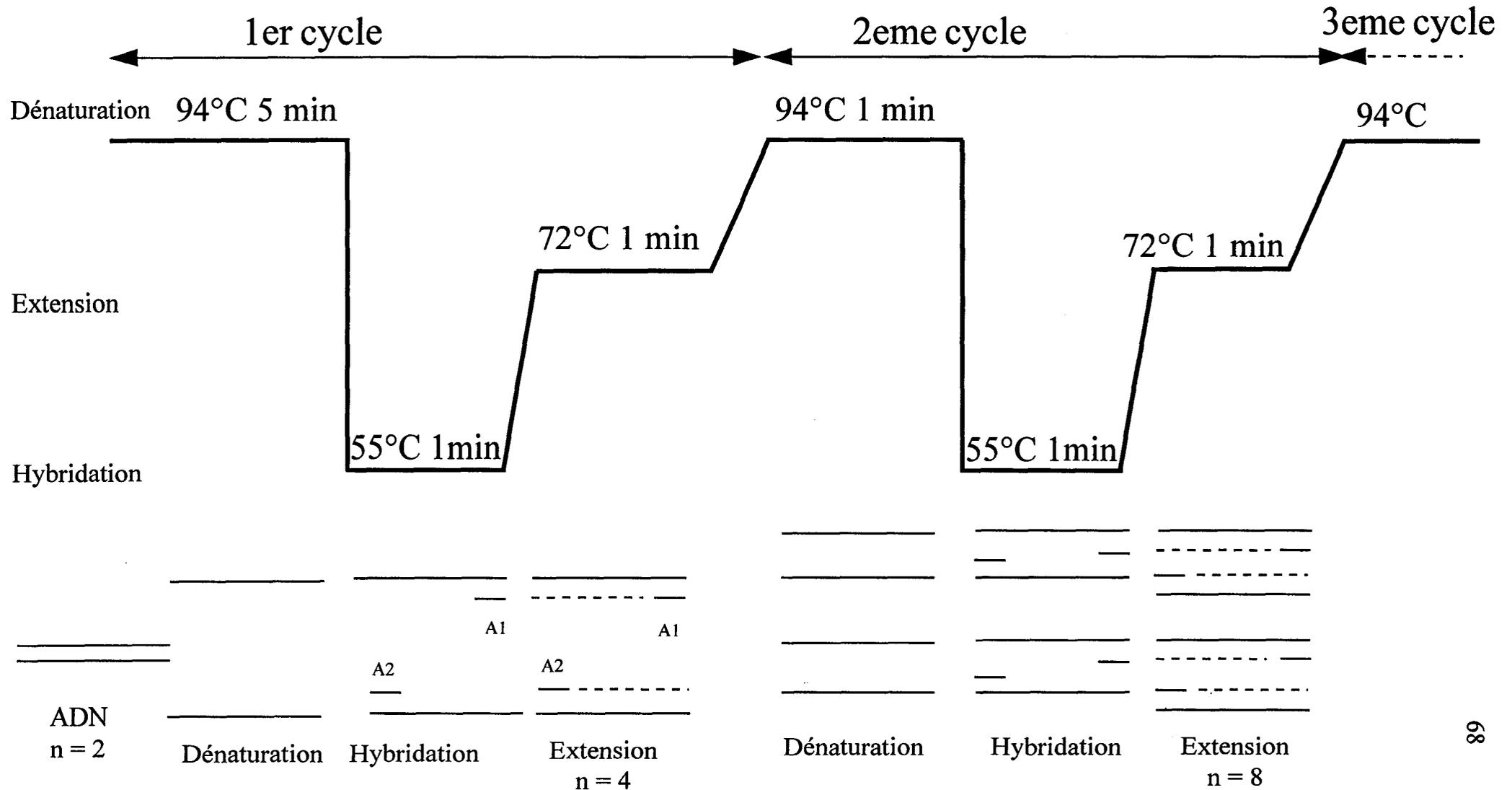
La PCR est basée sur la répétition cyclique de 3 réactions : dénaturation, hybridation et élongation, dont le seul paramètre de variation est la température d'incubation. Ces 3 réactions ont lieu dans le même tube et nécessitent l'emploi de réactifs thermostables. Un cycle a une durée de 3 à 5 minutes (min) et est répété 30 à 40 fois.

A l'origine, Saiki a utilisé comme enzyme l'ADN polymerase I de Kleenow qui est détruite lors de l'étape de dénaturation, d'où la nécessité de rajouter de l'enzyme à chaque nouveau cycle. La *Taq* polymerase est une ADN polymerase thermostable isolée à partir d'une archéobactérie appelée *Thermus aquaticus*, son utilisation a permis d'automatiser la PCR (Saiki, 1988). En 1986, le protocole établi par Mullis et Faloona permet d'effectuer 40 cycles sans rajout d'enzyme (Mullis, 1986).

II PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

-La première étape de la procédure est la dénaturation de l'ADN double brin natif par chauffage vers 94°C (Figure 16). Un des avantages de cette technique est qu'elle ne

**Figure 16 : Représentation schématique de la
polymerase chain reaction**



nécessite pas un ADN cible extrêmement pur. Celui-ci peut être mélangé à d'autres ADN ou substances. Dès 1988, une étude de Saiki a montré qu'une seule séquence cible permettait l'initiation de l'amplification, faisant de la PCR la technique la plus sensible pour détecter une séquence d'ADN spécifique (Saiki, 1988).

-La seconde étape, qui se déroule à une température réduite, est l'étape d'hybridation des amorces. Pour amplifier une séquence cible, il est nécessaire de connaître ses extrémités pour synthétiser des amorces oligonucléotidiques (20 à 25 nucléotides) qui permettront l'initiation de la réaction. Deux amorces complémentaires du brin (-) et du brin (+) sont mélangées à l'ADN, dans des conditions optimales d'hybridation, celles-ci se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives (Figure 16).

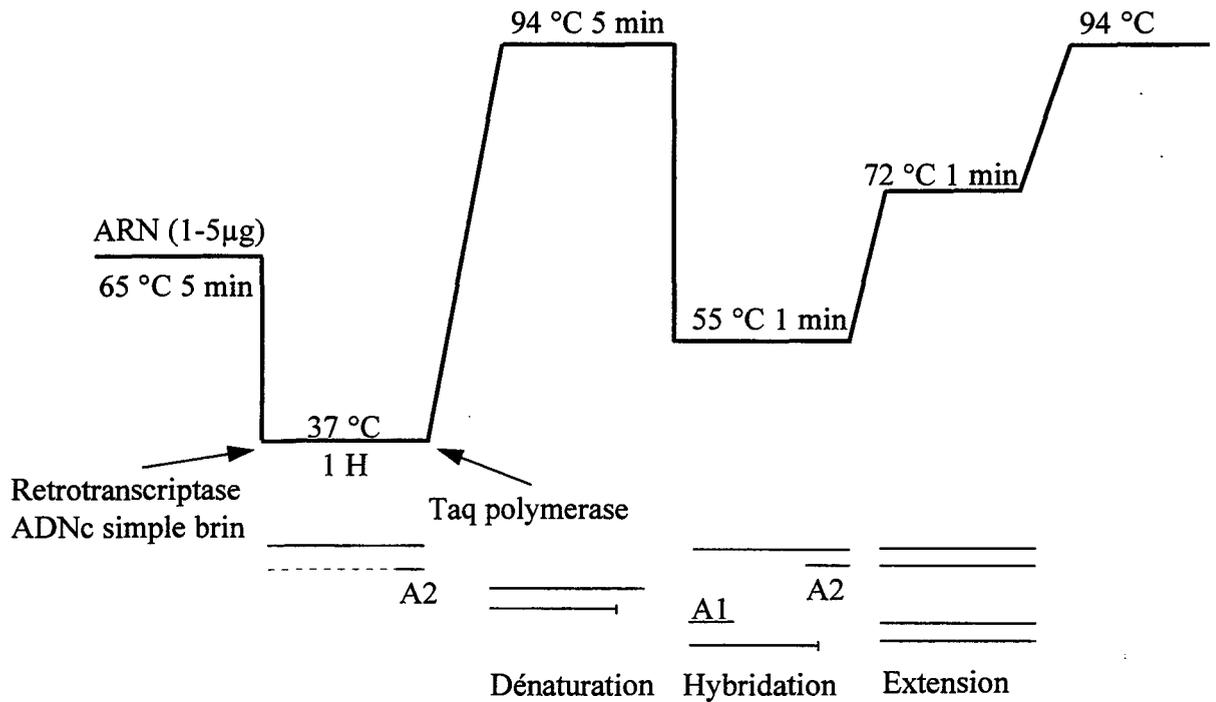
-La troisième étape est l'élongation ou extension. Le brin d'ADN complémentaire est synthétisé par la *Taq* polymérase en présence d'un mélange des 4 déoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) : adénosine, guanosine, thymidine et cytosine, la complémentarité des bases étant A-T/C-G. Il en résulte un doublement de la séquence puisque chaque brin est recopié.

L'opération est ensuite recommencée, chaque nouveau cycle produisant le doublement de la séquence comprise entre les 2 amorces. L'amplification étant exponentielle, au bout de n cycles, le nombre de fragments théoriques est de 2^n (en pratique, le rendement est de l'ordre de 70 %).

III APPLICATIONS DE LA PCR

III-1 RT-PCR

L'amplification de séquences d'ARN (ARN viral ou ARNm) est précédée d'une étape de rétrotranscription permettant la synthèse d'un ADNc simple brin, complémentaire de l'ARN original. L'amorce peut être une de celles utilisées pour la PCR. L'ADNc est ensuite soumis à une PCR (Figure 17). Une nouvelle enzyme, la rTth commercialisée par la firme Cetus, possède la double activité de rétrotranscriptase et d'ADN polymérase. Il est donc possible d'enchaîner les 2 étapes, rétrotranscription et PCR, sans interruption.

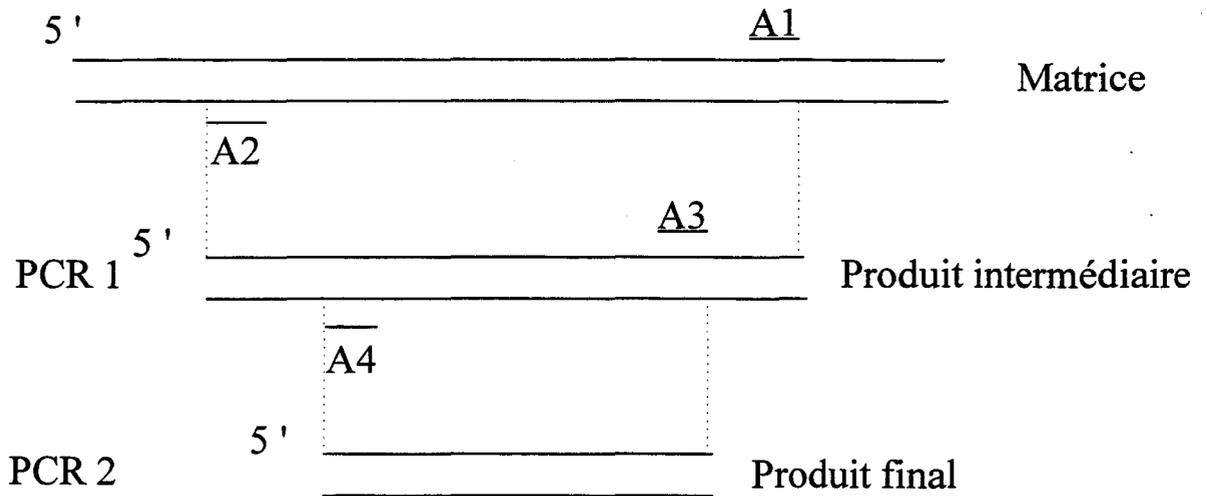
Figure 17 : PCR-ARN (RT-PCR)

III-2 "Nested-PCR"

La "nested-PCR" ou "PCR nichée" est une double amplification réalisée avec un second couple d'amorces internes par rapport au premier couple (Figure 18). Il est parfois nécessaire d'y recourir quand le niveau de virémie est très faible comme c'est le cas pour les virus HTLV et VHC.

Cette méthode est assortie d'un risque majeur de contaminations par transfert. Un système de double PCR en un tube a donc été développé.

Figure 18 : Double amplification ou PCR nichée ("nested-PCR")

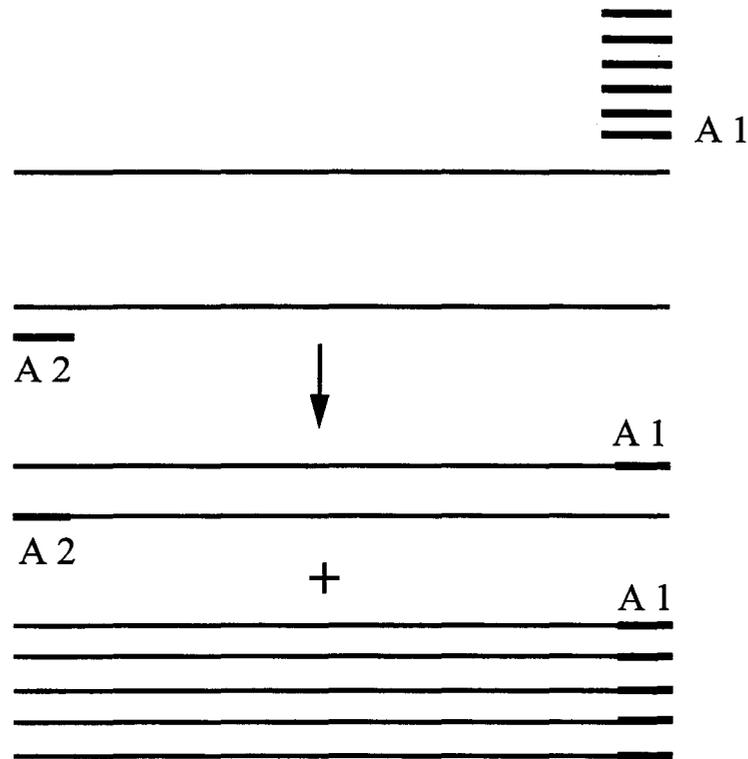


III-3 PCR quantitative

La quantité d'ADN produite peut être reliée à la quantité d'ADN ou d'ARN présente initialement. La mesure peut être faite au cours ou à la fin de l'amplification avec un standard externe ou interne. Pour cela, un étalonnage de la méthode par rapport à une référence aussi proche que possible de celle à doser, de quantité connue est nécessaire. En virologie, la PCR quantitative est appliquée dans le suivi thérapeutique de patients infectés par le VIH ou le VHC. En cancérologie, elle permet d'évaluer les risques de rechute de certaines leucémies après une chimiothérapie.

III-4 PCR asymétrique

Le produit de la PCR est double brin. Il peut également être simple brin si l'une des amorces est introduite en excès dans le milieu réactionnel (généralement 100 fois plus). Durant les premières étapes de la réaction, l'ADN double brin est synthétisé exponentiellement, quand la concentration d'une des amorces devient limitante, l'ADN simple brin s'accumule (Figure 19). Celui-ci peut ensuite être séquencé ou utilisé comme sonde.

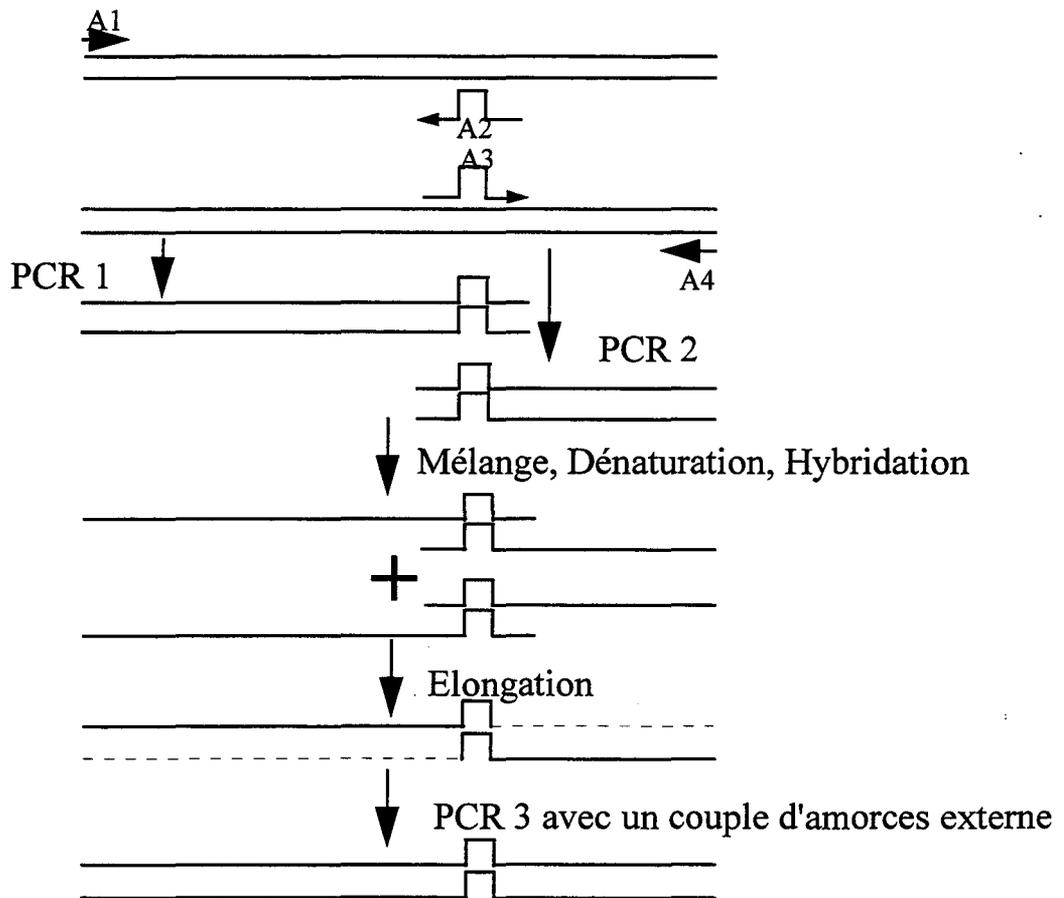
Figure 19 : PCR asymétrique

III-5 Modification de l'ADN par l'intermédiaire des amorces

La PCR ne sert pas seulement à amplifier un ADN mais elle peut également le modifier car les amorces utilisées sont intégrées dans le produit final.

-Il est possible d'introduire une mutation (insertion, délétion ou substitution de bases) à une position désirée. Dans une première étape, 2 PCR indépendantes sont effectuées, chacune contenant une amorce mutée, ces 2 amorces étant complémentaires (Figure 20). Les 2 produits d'amplification sont mélangés, dénaturés et hybridés, 2 types d'hybrides sont obtenus. Après élongation, l'ADN muté pourra être amplifié avec un couple d'amorces externe.

-Toute séquence ou molécule attachée à l'extrémité 5' de l'amorce sera également intégrée. Il peut s'agir d'une séquence d'ADN comportant un site de restriction, ce qui facilitera le clonage de l'ADN amplifié ou d'un marquage par une molécule radioactive, froide ou fluorescente, ce qui facilitera l'analyse du produit amplifié.

Figure 20 : Mutagénèse par PCR

IV ANALYSE DU PRODUIT AMPLIFIÉ

L'ADN amplifié peut être identifié par le procédé du "dot-blot" qui consiste à déposer l'échantillon sur un filtre et d'hybrider avec une sonde oligonucléotidique marquée. Par cette technique, il n'est pas possible de vérifier la longueur du segment amplifié. L'ADN peut également être soumis à une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide coloré au bromure d'éthidium. Le transfert sur filtre et l'hybridation moléculaire avec une sonde spécifique (Southern-blot) sont réalisés pour vérifier la spécificité de la réaction et augmenter la sensibilité de la détection. Plus récemment, ont été développées des techniques de révélation en microplaques basées sur le principe de l'ELISA.

V PRECAUTIONS DANS L'UTILISATION DE LA PCR

En raison de son extrême sensibilité, la PCR représente une technique de choix pour le diagnostic des infections virales puisqu'elle permet la détection de quelques génomes viraux par échantillon. Cette grande sensibilité est également l'inconvénient majeur de cette technique. En effet, il est nécessaire de prendre de grandes précautions pour éviter les résultats faussement positifs, principalement dûs à des contaminations par des produits d'amplification. L'utilisation diagnostique de la PCR requiert donc la plus grande rigueur.

-Il est nécessaire de séparer géographiquement les différentes étapes de la technique afin d'éviter les contaminations, les molécules contaminantes étant souvent des produits amplifiés lors d'une précédente PCR. Au laboratoire de biologie moléculaire des virus du C.R.T.S. de Lille, chaque étape de la PCR (extraction des acides nucléiques, préparation du mélange réactionnel, amplification et analyse des produits amplifiés) est réalisée dans pièces séparées, en surpression.

-Chaque pièce dispose de son propre matériel, conçu pour éviter les vaporisations.

-Tous les réactifs sont aliquotés.

-Des témoins négatifs et positifs, ainsi que des témoins de non contamination du mélange réactionnel sont inclus dans chaque série.

-Le port des gants est obligatoire.

-Le manipulateur peut également contaminer les PCR en cours, il est donc contraint de respecter des règles pour passer d'une pièce à l'autre (changement de gants et de blouse).

-Il est important de vérifier la technologie PCR en participant à des contrôles qualité multicentriques.

BUT DU TRAVAIL

Le but de ce travail est de présenter ce que les techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification génique, mises au point au laboratoire ou commercialisées, peuvent apporter à l'étude de virus transmissibles par les produits sanguins labiles et stables.

Dans un premier temps, nous avons mis au point, optimisé et validé la technique de PCR pour chacun des trois virus modèles choisis : le VHC, le virus HTLV et le parvovirus B19.

Nous montrerons comment la PCR peut aider à la connaissance des "limites" d'une trousse de dépistage ou de confirmation, ou à la définition de critères d'interprétation d'une réaction.

Pour l'étude du VHC, nous avons déterminé la proportion de virémies parmi des dons de sang positifs en RIBA 3.0 et nous avons étudié des prélèvements indéterminés pour conclure quant à la spécificité ou non de ces réactions indéterminées. Tous les prélèvements ARN-VHC positifs ont ensuite été génotypés afin de préciser quel(s) est (sont) le(s) génotype(s) dominant(s) dans la population des donneurs de sang du CRTS de Lille.

Pour le virus HTLV, après la définition des critères de positivité du WB par le Groupe Rétrovirus, dans la cadre d'une large étude, des prélèvements dont la sérologie est positive ou "indéterminée" ont été étudiés par PCR afin de valider ces critères et de pouvoir résoudre certaines impasses sérologiques. L'amplification génique a également été utilisée pour différencier les virus HTLV-I et HTLV-II quand la protéine spécifique de type (WB DBL) était absente.

La PCR et la sérologie peuvent également être complémentaires car elles n'apportent pas les mêmes renseignements. Dans certains cas, la recherche d'anticorps ne suffit pas, il est nécessaire de savoir si le virus réplique ou de mettre en évidence l'acide nucléique viral. Nous avons recherché l'ARN du VHC par PCR, chez des hémophiles,

en vue d'une inclusion dans un protocole de traitement par interféron. Dix d'entre eux, mis sous traitement ont été génotypés et le nombre de génomes VHC, au démarrage de la thérapie, a été évalué. Puis, nous avons suivi régulièrement l'évolution de la virémie pendant toute la durée du traitement et jusqu'à 6 mois après l'arrêt de l'interféron. Dans les cas de rechute, nous avons quantifié le nombre de génomes présents dès la réapparition de l'ARN-VHC.

Dans la chaîne du fractionnement du plasma, la PCR a été utilisée afin d'identifier les étapes permettant d'éliminer les virus non enveloppés tel le parvovirus B19. Dans ce but, nous avons donc testé, rétrospectivement, différents types de dérivés stables. Enfin, les résultats de la recherche de l'ADN du B19 par PCR, en systématique, dans des pools de plasma avant ou après pasteurisation seront présentés.

MATERIELS ET METHODES

PCR

Afin de simplifier la lecture, la préparation des solutions est détaillée en annexe 1 (p 160), le signe * y fera référence. De même, les séquences des amorces et sondes utilisées pour nos études, synthétisées dans le laboratoire avec le Gene Assembler (Pharmacia), sont répertoriées en annexe 2 (p 161-162).

I CONDITIONS STANDARD D'AMPLIFICATION

Les conditions optimisées décrites ci dessous sont appliquées aux 3 virus étudiés dans cet ouvrage (Innis, 1990).

Chaque tube PCR contient le mélange réactionnel de 100 μ L suivant :

- 50 pmol de chaque amorce
- 200 μ mol de chaque nucléotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia)
- Tampon d'amplification "GeneAmp PCR buffer" (Perkin Elmer Cetus)
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,3
 - 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂
 - 0,001 % (p/v gelatine)
- 2,5 U de *Taq polymerase* (Perkin Elmer Cetus)
- 1 μ g d'ADN (échantillon étudié ou témoin)
- qsp (quantité suffisante pour) 100 μ L avec de l'eau (H₂O) stérile

Dans chaque série, un témoin de non contamination des réactifs est préparé (mélange réactionnel sans ADN).

Pour éviter l'évaporation lors de la PCR, le mélange est recouvert d'huile de vaseline (Vasse).

Les tubes sont placés sur l'incubateur programmable (le laboratoire dispose de 2 Techne PHC3, OSI). Trente à 35 cycles d'amplification sont alors effectués.

Pour une nested-PCR, le mélange réactionnel est identique.

II ANALYSE DES PRODUITS AMPLIFIES

II-1 Electrophorèse

Un mélange de 1,6 g d'agarose (Appligène) et de 80 mL de tampon TAE* est chauffé jusqu'à dissolution complète. Juste avant le coulage du gel, du bromure d'éthidium (BET) est ajouté (le BET est un intercalant de l'ADN qui va permettre, sous lumière ultra-violette (UV), la visualisation des fragments amplifiés). Après polymérisation du gel, 20 µL de produit PCR sont déposés dans chaque puits, ainsi qu'un témoin de masse moléculaire (100 bp ladder, Pharmacia) qui va permettre l'identification de l'ADN amplifié. La migration est réalisée à 100 volts pendant 1 H. Le gel est ensuite observé aux UV. En nested-PCR, la procédure s'arrête à cette étape alors que pour une simple PCR, la spécificité est confirmée en Southern-blot par hybridation avec une sonde spécifique de la région amplifiée.

II-2 Southern-blot

Un Southern-blot est ensuite réalisé pour vérifier la spécificité du gène amplifié. Nous utilisons un protocole rapide qui nécessite l'utilisation d'une membrane de nylon activée pour fixer les acides nucléiques en présence de soude 0,4 N (Zeta-probe, Biorad). Dans ces conditions, la fixation est covalente et la membrane ne nécessite aucune post-fixation.

Le gel est plongé dans la soude (NaOH) 0,4 N pendant 10 min.

Le montage suivant est réalisé en disposant de haut en bas :

- des feuilles de papier Whatman 3 mm
- la membrane de transfert
- le gel, la face contenant l'ADN contre la membrane de transfert
- des feuilles de papier Whatman 3 mm

Le transfert dure 4 H au minimum, en présence de NaOH 0,4 N.

La membrane est séchée, puis conservée à 4°C jusqu'à son hybridation avec une sonde radioisotopique ou non.

II-3 Hybridation avec une sonde radioisotopique

Chaque sonde correspondant aux séquences amplifiées est marquée à son extrémité 5' au P³² par la polynucléotide kinase (Appligène).

II-3-1 Marquage de la sonde

-Pour marquer 100 ng de sonde, préparer le mélange :

-5 µL de Gamma³² ATP (Amersham, pb 10166, 3000Ci/mM)

-2 µL de tampon kinase 10x*

-2 µL de serum albumine bovine (BSA) à 0,5 µg/mL

-10 U de kinase

-Compléter à 20 µL avec H₂O

-Laisser incuber 20 min à 37°C

-Rajouter 10 U de kinase, puis 20 min d'incubation à 37°C

-La réaction est arrêtée par passage des 20 µL sur Quick Spin Column (G25) (Boeringher).

-L'intensité du marquage est vérifiée au scintillateur avec un filtre imprégné par 1 µL de sonde dans du picofluor.

-Pour une membrane de 14 x 11cm, 10⁷ cpm sont nécessaires.

II-3-2 Préhybridation et hybridation

La membrane est trempée dans le tampon de préhybridation pendant 3 H, à 42°C.

Tampon de préhybridation :

-3x SSC*

-5x Denhardt's*

-30 % formamide

-0,5 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

-100 µg/mL de sperme de saumon dénaturé

La sonde est ajoutée dans le même tampon pendant une nuit à 42°C.

II-3-3 Lavages

Les membranes sont lavées successivement dans 3 tampons :

-1^{er} lavage

Température :	ambiante	15min
Tampon :	3x SSC	
	0,1% SDS	

-2^{eme} lavage

Température :	50°C	15min
Tampon :	3x SSC	
	0,1% SDS	

-3^{eme} lavage

Température :	50°C	15min
Tampon :	1x SSC	
	0,1% SDS	

II-3-4 Autoradiographie

Les membranes sont autoradiographiées, 3 H à -80°C, en présence de films ultrasensibles (Hyperfilm Amersham) dans des cassettes munies d'écrans intensificateurs.

III VALIDATION DE LA TECHNIQUE PCR DU LABORATOIRE

La PCR est une technique très sensible, qui comprend de nombreuses étapes et requiert donc une très grande rigueur. Elle nécessite une phase de validation en intégrant des groupes de contrôle de qualité.

III-1 Validation pour un rétrovirus : le VIH

En 1991, notre laboratoire a contrôlé la sensibilité et la spécificité de sa technique PCR en participant à une étude multicentrique. Le virus modèle choisi était un rétrovirus, le VIH. Avec 6 autres laboratoires, nous avons testé 2 panels de 20 échantillons positifs,

négatifs ou qui présentaient une réactivité en WB (Defer, 1992). Outre la méthode de travail, nous avons remarqué que le choix des amorces était très important. Pour un couple, nous avons obtenu une concordance avec la sérologie de 100 % (40 à 100 % pour les autres laboratoires), alors que pour le second couple, elle était de 95 % (40 à 100 % pour les autres laboratoires). Dans les 2 cas, nous avons pourtant suivi la même procédure.

III-2 Validation pour le VHC

Depuis 1992, notre laboratoire fait partie du Groupe Français d'étude de la standardisation de la PCR-VHC appelé maintenant Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP). Avec 8 autres laboratoires, nous avons pu tester notre technique de PCR-VHC en étudiant 3 panels composés de positifs (hépatite chronique active) purs et en dilution, et de négatifs. Les résultats du premier panel ont montré une grande disparité entre les laboratoires (procédures et amorces différentes), confirmant la difficulté d'amplifier un virus à ARN faiblement virémique. Pour notre laboratoire, la concordance avec la sérologie était de 84 % (38 à 100 % pour les autres laboratoires). Pour les 2 panels suivants, les disparités ont été considérablement réduites en adoptant une procédure et des amorces communes. Pour notre laboratoire, la concordance avec la sérologie était de 93 et 100 % (38 à 100 % pour les autres laboratoires) (French Study Group for the Standardization of Hepatitis C virus PCR, 1994).

La PCR-VHC est en constante évolution : des réactifs simplifiant les techniques de laboratoire, ainsi que des trousse d'amplification sont maintenant disponibles. Il est donc important de participer régulièrement à des contrôles de qualité multicentriques.

VHC

I TECHNIQUE PCR DU LABORATOIRE

I-1 Extraction de l'ARN

Les techniques d'amplification de l'ARN du VHC sont en constante évolution afin d'obtenir un résultat plus rapide. C'est le cas de l'étape d'extraction qui permet de préparer un ARN de meilleure qualité, avec un meilleur rendement, dans un minimum de temps. Au début de notre étude, nous avons développé une méthode d'extraction au thiocyanate de guanidine d'après la publication de Chomczynski et Sacchi (ref). Actuellement, nous employons un réactif prêt à l'emploi basé sur le même principe : le TRIzol Reagent (Total RNA Isolation Reagent) (Gibco BRL). Les résultats obtenus avec ces deux méthodes sont identiques. Le TRIzol a l'avantage de permettre la préparation d'ARN en 1 H 30 (au lieu de 24 H avec la méthode classique). Nous ne décrivons donc que notre technique actuelle.

Technique d'extraction au TRIzol

-Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et de thiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN. A 100 µL de plasma (sérum) est ajouté 1 mL de TRIzol. Le tout est laissé 5 min à température ambiante (TA).

-200 µL de chloroforme (Prolabo) sont ajoutés, le tout est mélangé pendant 15 secondes (sec), puis laissé 2 min à TA. La séparation des phases est réalisée par centrifugation à 4°C, 12 000 x g, pendant 15 min.

-La phase aqueuse, qui représente 60 % du volume de TRIzol initial, est transférée dans un autre tube. Pour la précipitation de l'ARN, 500 µL d'isopropanol (Merck) sont ajoutés. Après 10 min à TA, les tubes sont centrifugés 10 min, 4°C, 12 000 x g.

-Le culot d'ARN est lavé avec 1 mL d'éthanol (ETOH), séché, puis resuspendu dans 50 µL d'eau stérile, traitée au DEPC (Diethyl pyrocarbonate) (anti-RNase).

-L'ARN est incubé 10 min à 60°C.

I-2 Choix des amorces

Les amorces sélectionnées appartiennent à la région 5'NC, partie la plus conservée du génome du VHC. La virémie étant faible, nous avons choisi 2 systèmes de "nested-PCR" : les amorces SF1-SR1/SF2-SR2 publiées par Novati (Novati, 1992) et les amorces 32-36/33-48 publiées par Okamoto (Okamoto, 1990).

I-3 Synthèse de l'ADN complémentaire

Cette étape est nécessaire pour amplifier le génome des virus à ARN. Pour initier la synthèse, nous avons utilisé les amorces antisens SR1 et 36.

Synthèse de l'ADNc

Pour chaque échantillon, un mélange réactionnel de 15 µL est préparé :

- 200 pmol Amorce SR1 ou 36
 - 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL)
 - 2 mM dNTP
 - 10 mM DTT
 - Tampon (Gibco BRL)
 - 50 mM Tris-HCl (pH 8,3)
 - 75 mM KCl
 - 3 mM MgCl₂
 - 20 U rRNasin (Ribonuclease Inhibitor) (Promega)
 - qsp H₂O stérile
- 5 µL d'ARN sont ajoutés, le tout est incubé 1 H à 37°C

I-4 "Nested PCR"

Un mélange réactionnel de 45 µL, contenant le couple d'amorces externe, est préparé, auquel sont ajoutés 5 µL d'ADNc. Les tubes sont disposés sur l'incubateur avec le programme suivant : dénaturation 94°C 5 min, 35 cycles (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min), 72°C 10 min.

Pour la PCR interne, un mélange réactionnel de 90 μL auquel sont ajoutés 10 μL de la première PCR. Le tout est soumis à 30 cycles d'amplification.

Les produits amplifiés sont analysés en gel d'agarose 2 %, la taille des ADN amplifiés est de 210 pb et 144 pb pour les couples SR2-SF2 et 33-48, respectivement.

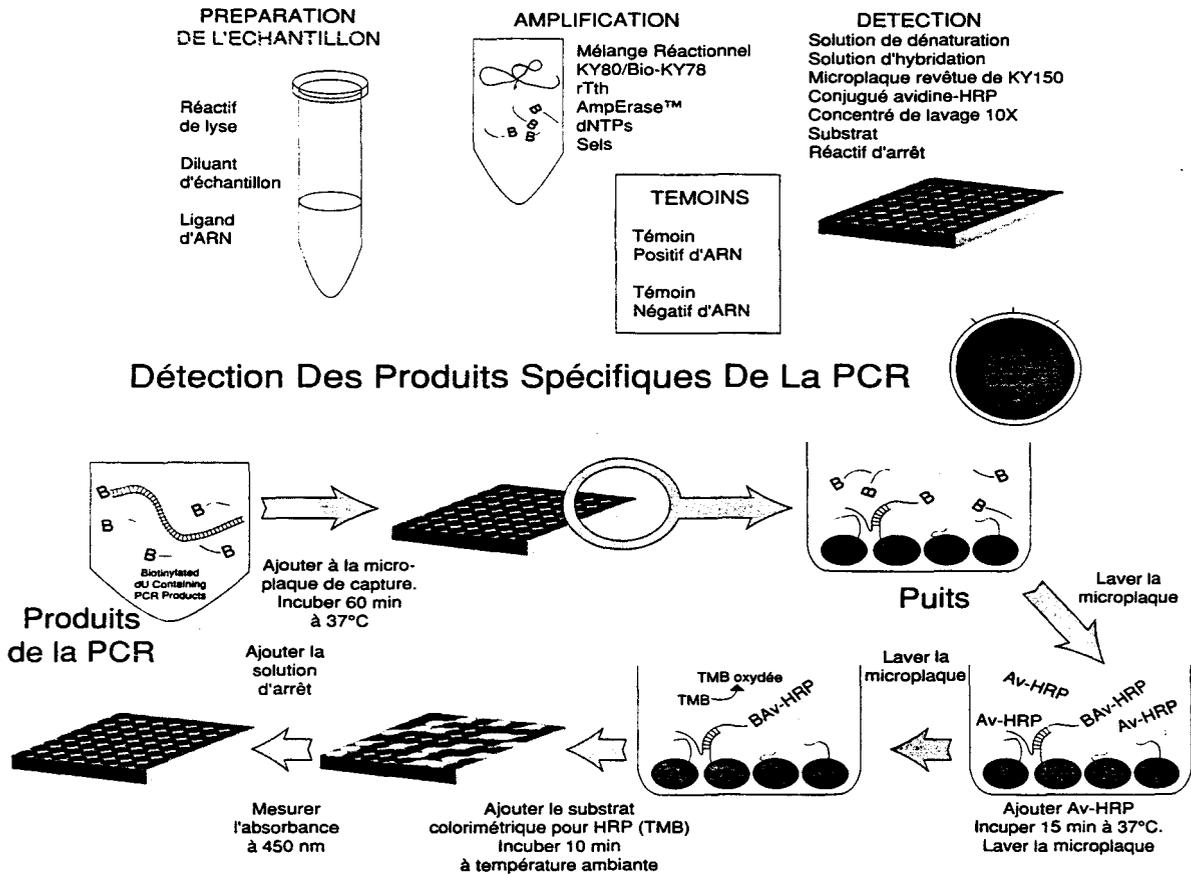
II TECHNIQUE AMPLICOR VHC

Le test Amplicor est composé de 3 trousseaux : préparation des échantillons, amplification et détection.

L'originalité de cette technique est l'utilisation de la rTth qui possède la double fonction de synthèse de l'ADNc et d'amplification. La rétrotranscription et la PCR se déroulent dans le même tube, avec le même mélange réactionnel, ce qui réduit le nombre de manipulations et donc diminue le risque de contaminations. De plus, parmi les dNTP, la déoxyuridine remplace la déoxythymidine et l'utilisation de l'Uracyl N-Glycosylase (UNG) permet de détruire les amplifiats parasites synthétisés lors des PCR précédentes, source de contamination la plus importante. La détection des produits amplifiés est réalisée en microplaques recouvertes d'une sonde spécifique. Les amorces sélectionnées appartiennent à la région 5'NC (la taille du produit amplifié est de 244 pb), l'amorce antisens est biotinylée à son extrémité 5', ce qui permet la détection en colorimétrie. En effet, après amplification, les produits obtenus sont dénaturés puis déposés dans la microplaque où ils s'hybrident avec la sonde. Après lavage, le conjugué, la peroxydase de raifort (HRP) couplée à l'avidine, est ajouté. Puis, le substrat de la HRP, le tetraméthylbenzidine (TMB), permet d'obtenir une coloration dont l'intensité sera mesurée à 450 nanomètres (nm).

Pour l'étude des donneurs de sang, nous avons appliqué strictement la procédure préconisée par Roche, dont les différentes étapes sont détaillées Figure 21.

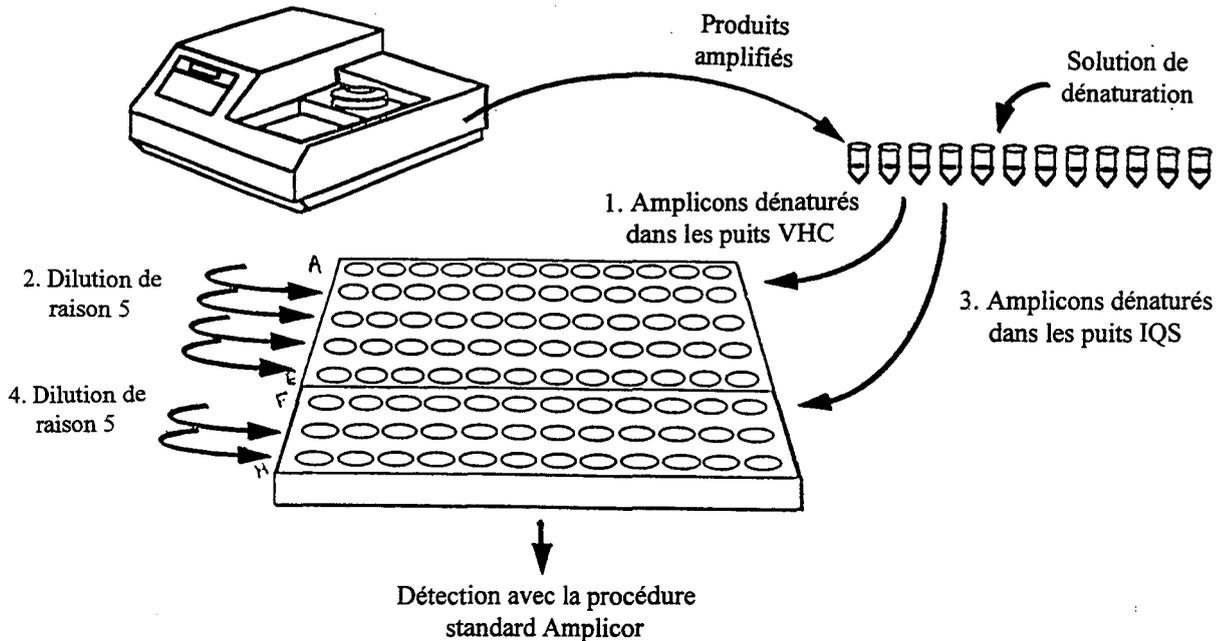
Figure 21 : La trousse Amplicor™ (Roche)



La première version de la trousse Amplicor ne permet qu'une détection qualitative de l'ARN du VHC. Très récemment, a été mis sur le marché le test Amplicor HCV Monitor qui permet une amplification quantitative basée sur le principe de la PCR compétitive. Un témoin interne de 100 copies (IQS=Internal Quantitation Standard) est mélangé à l'échantillon au moment de l'extraction. Après amplification, les produits obtenus sont dénaturés, déposés sur la microplaque et dilués de cupule en cupule. Pour chaque barrette, les 5 premières cupules sont recouvertes avec la sonde spécifique de la région du VHC amplifiée et les 3 dernières sont recouvertes de la sonde spécifique de l'IQS (Figure 22) et servent de référence pour le calcul du nombre de copies de génome du VHC présentes dans l'échantillon.

Nous avons utilisé cette trousse pour la quantification de l'ARN chez les hémophiles sous traitement interféron en appliquant le protocole du fabricant.

Figure 22 : Quantification avec la trousse Amplicor™ HCV Monitor (Roche)

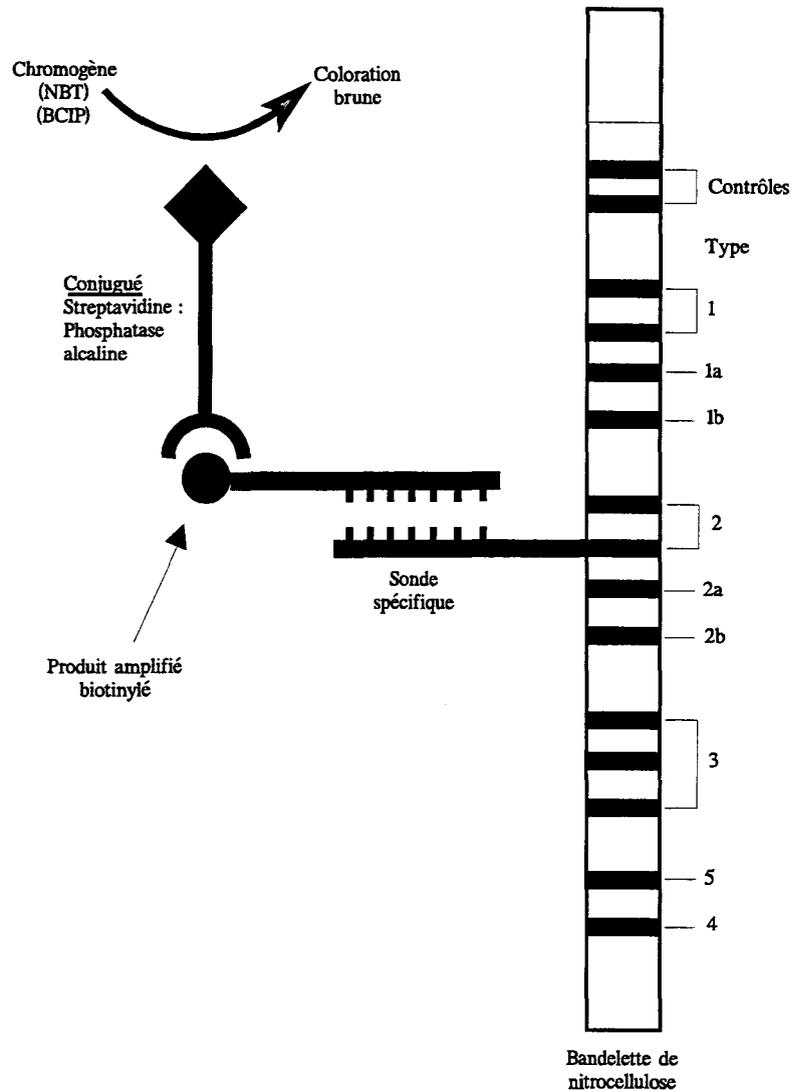


III GENOTYPAGE

III-1 La trousse INNO-LiPA VHC

Nous avons utilisé la trousse LiPA (Innogenetics) en appliquant la procédure préconisée par le fabricant (1-préparation de l'échantillon, 2-amplification en nested-PCR avec les amorces spécifiques de la région 5'NC, une des amorces du couple interne étant biotinylée). Les sondes spécifiques de chacun des génotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a et 5a, immobilisées sur une bandelette de nitrocellulose, s'hybrident avec le produit amplifié, dénaturé. Le conjugué est la streptavidine, qui forme un complexe avec la biotine fixée à la sonde, couplée à la phosphatase alcaline. L'ajout du substrat de cette dernière, le NBT/BCIP, permet le développement d'une coloration brune (Figure 23).

Figure 23 : La trousse INNO-LiPA VHC



III-2 Combinaison des trousse Amplicor VHC et INNO-LiPA VHC

Pour le génotypage des donneurs de sang, nous avons couplé les 2 techniques Amplicor VHC et INNO-LiPA VHC. En effet, dans les 2 cas, les produits amplifiés sont spécifiques de la région 5'NC et sont biotinylés par l'intermédiaire d'une amorce. Pour vérifier la compatibilité des 2 trousse, nous avons amplifié avec Amplicor, 2 échantillons de chacun des génotypes détectés avec la procédure préconisée par Innogenetics, puis nous avons déterminé le génotype avec le LiPA, aucune discordance n'a été observée. Cette combinaison, plus rapide, simplifie le génotypage.

IV POPULATIONS ETUDIEES

IV-1 Donneurs de sang

Nous avons comparé notre technique PCR-VHC à la trousse Amplicor (Roche) sur 144 poches de plasmas de donneurs de sang (85 hommes et 59 femmes), décantées et congelées à -35°C dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Cent vingt deux dons de sang positifs répétables pour les anticorps anti-VHC avec la trousse ELISA Ortho de troisième génération ont été testés avec la trousse de validation RIBA 3.0. 22 échantillons négatifs en sérologie ont également été étudiés. La figure 24 présente différents profils positifs ou indéterminés observés en RIBA 3.0.

Figure 24 : RIBA 3.0 (Ortho Diagnostics System)

RIBA 3.0 (ORTHO)



1. Témoin négatif
2. Témoin positif
3. Echantillon positif, C100+, C33c+, C22-3+, NS5 -
4. Echantillon positif C100 -, C33c+, C22-3+, NS5 +
5. Echantillon positif C100 -, C33c+, C22-3+, NS5 -
6. Echantillon indéterminé C100
7. Echantillon indéterminé C33c
8. Echantillon indéterminé C22-3
9. Echantillon indéterminé NS5

IV-1-1 Dons positifs en RIBA 3.0

Quatre vingt cinq dons positifs en RIBA 3.0 ont été testés en PCR. Les différents profils sont détaillés dans le tableau V.

Tableau V : Echantillons positifs en RIBA-3 testés en PCR

Profil RIBA 3.0	ALAT < N	ALAT ≥ N
C100-3, C33c, C22-3, NS5 n = 46	12	34
C100-3, C33c, C22-3 n = 25	14	11
C33c, C22-3, NS5 n = 5	2	3
C33c, C22-3 n = 9	8	1
Total n = 85	36	49

IV-1-2 Dons indéterminés et négatifs en RIBA 3.0

Trente sept échantillons étaient indéterminés en RIBA 3.0, sur plusieurs prélèvements (ce qui exclut la possibilité qu'il s'agisse d'une séroconversion) : 36 étaient réactifs avec un seul des antigènes et 1 présentait une réactivité avec la bande SOD et la protéine C33c. Dans le tableau VI, les échantillons ont été classés en fonction de leur profil en RIBA et en fonction du taux d'ALAT.

Tableau VI : Echantillons indéterminés ou négatifs en RIBA-3 testés en PCR.

Profil RIBA 3.0	ALAT < N	ALAT ≥ N
C100-3 (n = 2)	2	0
C33c (n = 16)	14	2
C22-3 (n = 13)	13	0
NS5 (n = 5)	4	1
C33c, SOD (n = 1)	1	0
Négatif (n = 22)	20	2

IV-2 Hémophiles

IV-2-1 Prélèvement sanguin

Le sang est prélevé sur citrate ou EDTA, centrifugé, décanté, aliquoté et congelé immédiatement à -80°C.

IV-2-2 Virémie VHC chez les hémophiles

Cent vingt sept hémophiles suivis au CRTS de Lille, présentant un profil négatif (1), indéterminé (7) ou positif (119) en RIBA 3.0, ont été étudiés avec la technique PCR du laboratoire en vue d'une inclusion dans un protocole de traitement par interféron.

Tableau VII : Hémophiles et sujets atteints d'une maladie de l'hémostase présentant un profil indéterminé ou positif en RIBA 3.0 testés en PCR

Profil RIBA 3.0	Homme		Femme	
	ALAT < N	ALAT > N	ALAT < N	ALAT > N
C100-3, C33c, C22-3, NS5	30	36	2	3
C100-3, C33c, C22-3	27	6	2	1
C33c, C22-3, NS5	2	2	0	1
C33c, C22-3	4	1	0	0
C100-3, C33c	1	0	0	0
C100-3, C22-3	1	0	0	0
C33c	1	0	1	0
C22-3	5	0	0	0
Négatif*	0	1	0	0

* : Hémophile atteint d'hypogammaglobulinémie

IV-2-3 Hémophiles traités à l'interféron

Protocole interféron

Le protocole de traitement interféron alpha-2b recombinant (Introna) proposé a pour investigateur principal le docteur Bertrand (service d'hématologie de l'hôpital Jean Minjoz, Besançon). La posologie est de 3 millions d'unités 3 fois par semaine en sous cutané, pendant un an. Les hémophiles inclus dans ce protocole, présentent une hémophilie A ou B ou une autre maladie de l'hémostase, notamment la maladie de Willebrand, et ont reçu au moins une fois des dérivés plasmatiques. Ils sont âgés entre 15 et 70 ans. Ils doivent présenter une élévation des transaminases supérieure à 1,5 N à 2 reprises à au moins 6 mois d'intervalle avant l'inclusion. Leur sérologie d'hépatite C est positive (ELISA-2 et RIBA-2). Il n'est pas réalisé de biopsie hépatique. Ont été exclus de ce protocole, les hémophiles infectés par les virus VHB ou VIH, ou atteints

d'hépatopathie chronique non virale ou d'une cirrhose décompensée. Une anémie inférieure à 10 g/L, des antécédents cardiaques sévères ou psychiatriques, une TSH anormale ou une créatinine supérieure à 150 $\mu\text{mol/L}$ étaient également d'autres critères d'exclusion. Une adaptation thérapeutique est proposée en fonction de la clinique : si les effets secondaires sont modérés, la dose est diminuée provisoirement à 1 million d'unités 3 fois / semaine, si les effets secondaires sont trop marqués, le traitement est arrêté.

Description des patients

A ce jour, 19 hémophiles ont été inclus dans le protocole de traitement à l'interféron, sous le contrôle des docteurs J.C. Paris (CHR, Lille), A. Parquet (CRTS, Lille) et J. Goudemand (CHR et CRTS, Lille). Nous ne nous intéresserons dans cet ouvrage qu'au suivi de 10 d'entre eux.

Tableau VIII : Hémophiles et sujet atteint d'une maladie de Willebrand traités à l'interféron alpha

Hémophiles	Année de naissance	Type d'hémophilie	Profil RIBA 3.0
DG	1940	A mineure	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
QA	1946	A modérée	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
PJC	1963	A majeure	C100++, C33c++++, C22-3++++, NS5+++
LB	1975	A modérée	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
BC	1975	Willebrand	C100++, C33c++++, C22-3++++, NS5-
SJ	1954	B mineure	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
HC	1950	B majeure	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
FP	1952	A mineure	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
LC	1952	B majeure	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++
PG	1964	A modérée	C100++++, C33c++++, C22-3++++, NS5++++

Tous, excepté le sujet BC, sont de sexe masculin.

Les hémophiles dont le suivi n'est pas présenté soit, ont été mis sous traitement trop récemment, soit ont interrompu très rapidement leur traitement consécutivement à un problème d'intolérance à l'interféron (accident cardiaque, perte de cheveux, douleur hémithoracique gauche).

Suivi du traitement

Les hémophiles ont été génotypés deux fois afin de détecter d'éventuelles co-infections : la première fois en appliquant le protocole complet du fabricant de la trousse INNO-LiPA et la seconde fois en couplant les 2 trousse Amplicor et LiPA. Une PCR est réalisée régulièrement pendant la durée du traitement, puis à 4 et 6 mois après arrêt de ce traitement. Nous avons quantifié la charge virale avec la trousse Amplicor HCV Monitor, juste avant la mise sous interféron, et également en cas de rechute dès la réapparition de l'ARN-VHC. Le dosage des transaminases est réalisé chaque mois.

HTLV

I SELECTION DES DONNS DE SANG

La recherche d'anticorps anti-HTLV dans les dons de sang est réalisée en technique immunoenzymatique. Les échantillons positifs répétables sont ensuite testés en WB. Pour notre étude par PCR, 186 échantillons provenant de différents Centre de Transfusion français ont été sélectionnés en fonction du profil obtenu avec les 2 trousse WB disponibles (Biotech et DBL). Selon les critères du Groupe Rétrovirus, 174 échantillons étaient "indéterminés" (seulement 1 ou 2 réactivités parmi les 3 protéines rgp21, p19 et p24). Les différentes catégories sont détaillées dans le tableau VIII.

Tableau IX : Nombre d'échantillons étudiés par PCR pour chacun des profils WB indéterminés.

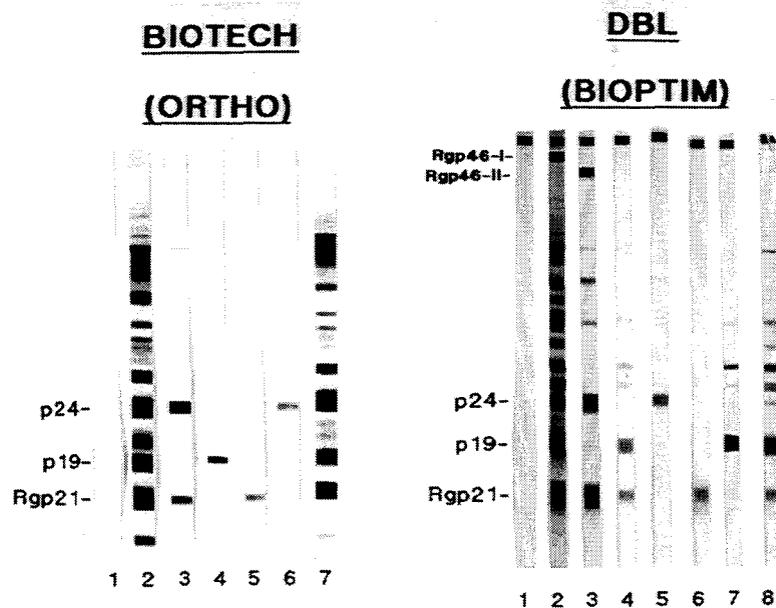
Profil WB	Nombre
p19	46
p24	49
p19+p24	27
rgp21 isolée	9
rgp21+p24	19
rgp21+p19	24

Deux échantillons de la catégorie rgp21+p19 présentaient également une réactivité au niveau de la MTA-1.

Nous avons également testé 12 échantillons confirmés positifs par les 2 WB. Avec le WB DBL, 8 ont pu être différenciés par la protéine spécifique de type (7 étaient rgp46-I positive et rgp46-II négative, et un était rgp46-II positive et rgp46-I négative) et 4 étaient rgp46-I et -II négative.

La figure 25 présente différents profils positifs ou indéterminés observés avec les 2 trousse WB (DBL et Biotech)

**Figure 25 : Les western-blots HTLV Biotech (Ortho Diagnostics system)
et Diagnostic Biotechnology (Bioptim)**



Biotech (Ortho)

1. Témoin négatif
2. Témoin positif HTLV-I
3. Témoin positif HTLV-II
4. Echantillon p19 isolée
5. Echantillon rgp21 isolée
6. Echantillon p24 isolée
7. Echantillon positif rgp21+, p19+, p24+

DBL (Bioptim)

1. Témoin négatif
2. Témoin HTLV-I
3. Témoin HTLV-II
4. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, rgp46-I/II -
5. Echantillon p24 isolée
6. Echantillon rgp21 isolée
7. Echantillon p19 isolée
8. Echantillon positif sans rgp46-I ou -II

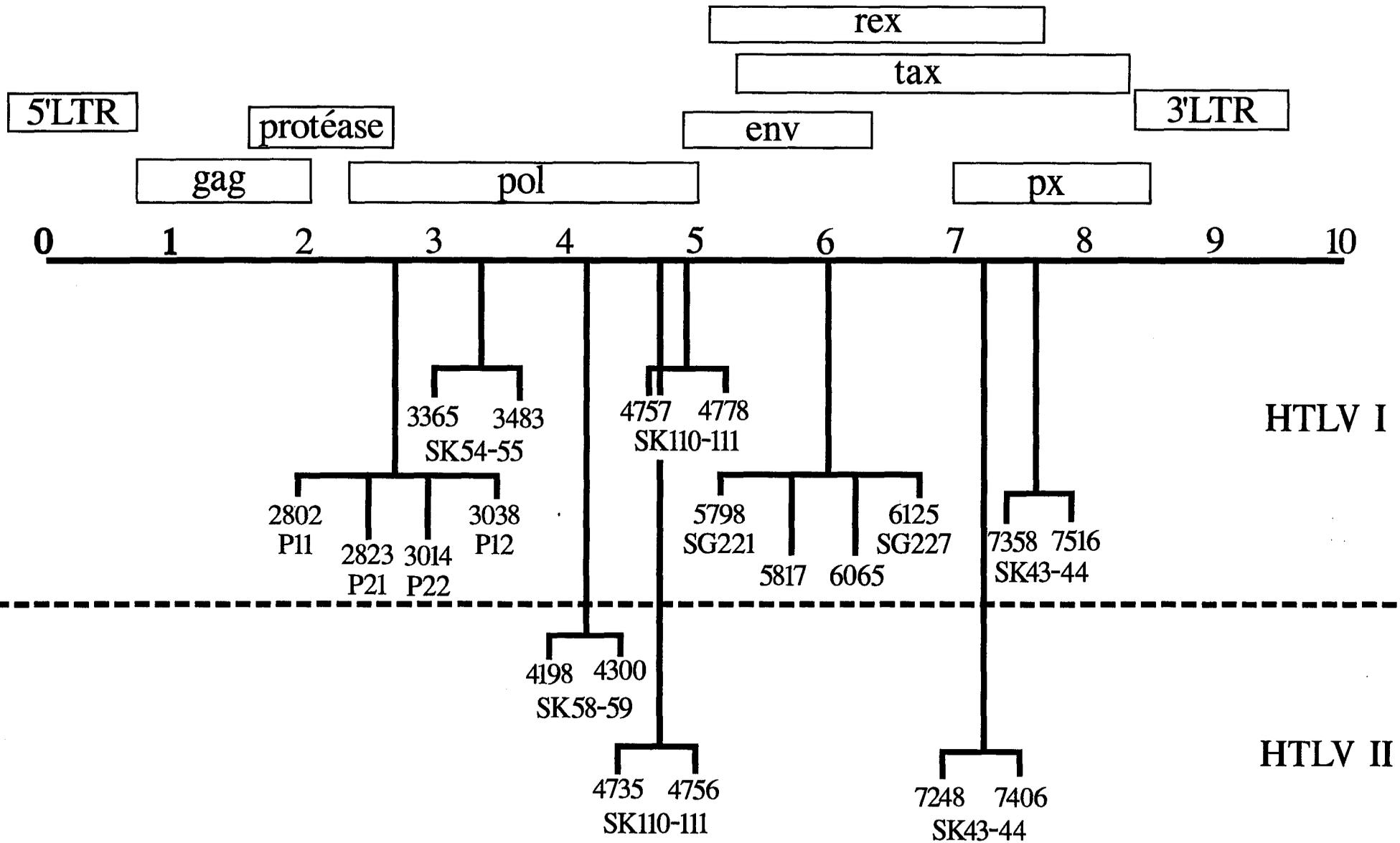
II EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN

Les ADN ont été obtenus à partir de 3 types d'échantillons : prélèvements de sang sur citrate ou éthylène diamine tétraacétate (EDTA), préparations de lymphocytes ou culots globulaires. Pour l'extraction, nous avons utilisé le "341 Nucleic Acid Purification System" commercialisé par Applied Biosystems (Roissy, France). Cet automate permet la préparation d'ADN sans manipulation préalable, ce qui permet de limiter la contamination de l'échantillon par un autre ADN. L'extraction a été effectuée à partir de 5 mL de sang ou d'un culot de lymphocytes selon le protocole préconisé par le fabricant. L'ADN est ensuite ressuspendu dans 1 mL de TE.10⁻¹*, aliquoté et conservé à -20°C.

III AMPLIFICATION

Deux systèmes d'amplification ont été appliqués : la simple PCR suivie d'une hybridation avec une sonde marquée au phosphore 32 et la nested-PCR. La position des amorces sur le génome HTLV est représentée dans la figure 26.

Figure 26 : Amorces utilisées pour la PCR-HTLV



III-1 Simple PCR

Les amorces et sondes choisies ont été publiées par Kwok (Kwok, 1988-1990). Le couple SK43-44 amplifie une région conservée du gène tax. La sonde SK45 détecte les 2 virus HTLV-I/II. Les amorces SK110-111 (sondes SK112 et SK188), SK54-55 (sonde SK56) et SK58-59 (sonde SK60) amplifient le gène pol. Les sondes SK112 et SK56, d'une part, et les sondes SK188 et SK 60, d'autre part, sont spécifiques des virus HTLV-I et HTLV-II, respectivement. Après analyse en gel d'agarose 2 %, la spécificité des produits amplifiés est vérifiée en Southern-blot.

III-2 "Nested-PCR"

Deux systèmes de nested-PCR spécifiques du virus HTLV-I ont été utilisés (Figure 26). Le premier système P11-P12/P21-P22, publié par Prayoonwiwat (Prayoonwiwat, 1991) amplifie une portion de la région pol. Le second système amplifie une portion de la région env : le couple externe est SG221-SG227 publié par Greenberg (Greenberg, 1989), le couple interne, C1-C2, a été déterminé dans notre laboratoire d'après la séquence publiée par Seiki (Seiki, 1983).

A la fin de la première PCR, le produit intermédiaire est dilué au 1/100ème, 10 µL sont ajoutés au second mélange réactionnel, puis soumis à 30 cycles de PCR.

La longueur du produit amplifié est contrôlée par coloration au BET après électrophorèse en gel d'agarose à 2 %.

III-3 Conditions opératoires

Le mélange réactionnel et les cycles d'amplification sont identiques pour la simple et la nested-PCR. Un µg d'ADN est ajouté au mélange réactionnel de 100 µL. Après l'étape de dénaturation de 5 min, les échantillons sont soumis à 30 cycles d'amplification : 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min. Une amplification préliminaire du gène HLA-DQ alpha a été effectuée afin de s'assurer que l'ADN était amplifiable (Scharf, 1988). Cinquante échantillons négatifs par les 2 trousseaux WB ont été testés avec tous les couples d'amorces afin de vérifier la spécificité de notre technique. Notre sensibilité est

inférieure à 5 copies par μg d'ADN. Des témoins positifs et négatifs ont été inclus dans chaque série, notamment l'ADN de 2 lignées C91 PL et C334 MO infectées par les virus HTLV-I et HTLV-II, respectivement (fournis par C. Desgranges, INSERM U271, Lyon).

PARVOVIRUS B19

DERIVÉS SANGUINS STABLES

I-1 Fabrication

I-1-1 Fractionnement de Cohn

Le fractionnement du plasma est effectué selon la méthode de Cohn, qui consiste en précipitations successives d'un mélange plasma-alcool en faisant varier la concentration en éthanol, la force ionique, la température, le pH et la concentration en protéines. En augmentant la concentration d'éthanol de 8 à 40 %, en abaissant la température à -3 puis à -5°C et en acidifiant le pH de 7,3 à 4,8, sont obtenus successivement les immunoglobulines et l'albumine.

I-1-2 Facteurs anti-hémophiliques

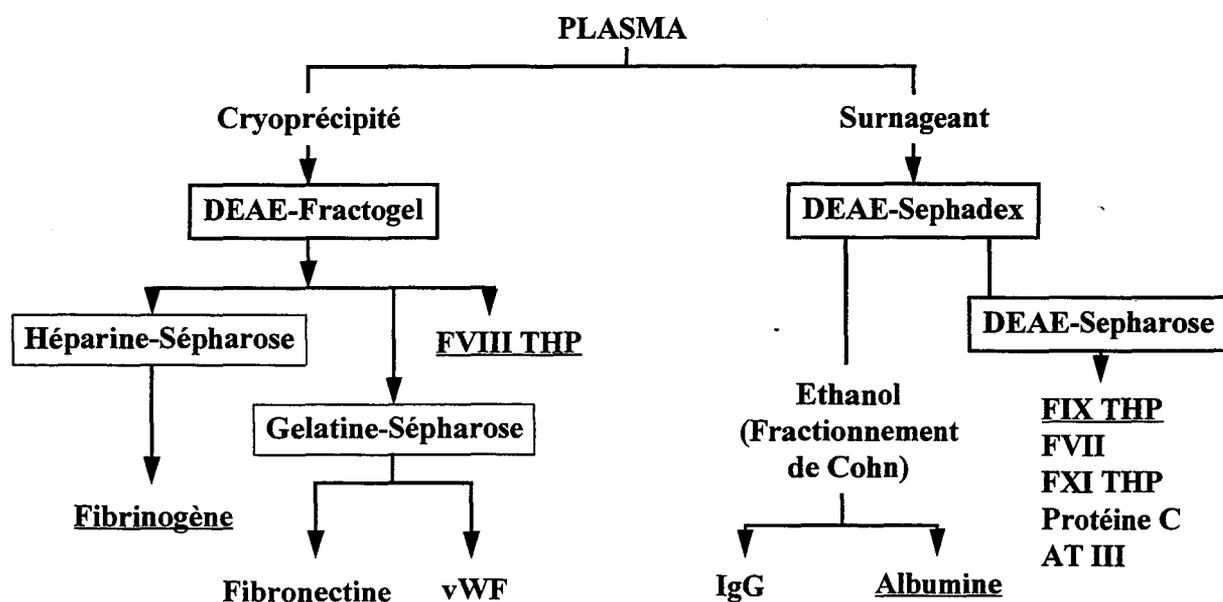
Les facteurs VIII, VIII Willebrand et IX de très haute pureté (THP) sont obtenus par des techniques de purification par chromatographie et par traitement solvant-détergent (0,3 % tri(n-butyl) phosphate (TNBP) avec 1 % tween 80 à une température de $24-30^{\circ}\text{C}$ pendant 6 H). Le traitement SD permet d'inactiver les virus à enveloppe lipidique dont font partie les virus VIH et les virus des hépatites.

I-2 Lots étudiés

Nous avons testé, rétrospectivement, 181 lots de dérivés stables, préparés à partir de pools de plasma.

Tableau X : Nombre et type de dérivés stables étudiés par PCR

Type de produit	Nombre
Albumine 4 %	46
Albumine 20 %	49
Facteur VIII (THP+Willebrand)	58
Facteur IX	5
Fibrinogène	23

Schéma de fractionnement du plasma humain au L.F.B. de Lille

II PLASMA PASTEURISE

La pasteurisation est l'un des procédés permettant l'inactivation virale, tout en respectant l'activité biologique des protéines du produit. Son spectre d'action est plus large que le traitement solvant/détergent qui ne permet pas l'inactivation des virus non enveloppés. Au CRTS de Lille a été développée la technique de pasteurisation du plasma pour assurer la plus grande sécurité virale.

La taille des lots a été limitée à 100 dons sélectionnés (environ 60 litres de plasma), chaque don subissant le dépistage de tous les marqueurs viraux obligatoires. Le plasma est décongelé à 37°C (pas de formation de cryoprécipité), des agents stabilisants sont ajoutés. Le tout est chauffé à 60°C pendant 10 H, sous agitation, dans une cuve stérile. Le plasma est refroidi, ultrafiltré, puis réparti en flacons de verre. La congélation a lieu à -50°C et le stockage à -35°C.

Nous avons testé en PCR parvovirus 55 lots avant pasteurisation et 111 lots après pasteurisation. Dès la réception de l'échantillon au laboratoire, celui-ci est aliquoté et congelé à -80°C.

III TECHNIQUE D'AMPLIFICATION

III-1 Extraction de l'ADN

Pour l'étude des plasmas pasteurisés, chaque échantillon est étudié en parallèle avec le même échantillon contaminé avec 0,5 µg d'ADN de parvovirus B19.

Technique d'extraction

Cent µL d'échantillon sont mélangés à 200 µL de tampon de lyse* et 20 µg/mL de protéinase K (Gibco-BRL). Le tout est incubé 1 H à 65°C. Les tubes sont refroidis dans la glace. Un volume de phénol/chloroforme (v/v) (Interchim/Prolabo) est ajouté. Après agitation vigoureuse, les tubes sont centrifugés 15 min à 12 000g, à +4°C. Au surnageant est ajouté un volume de chloroforme, les tubes sont à nouveau centrifugés 15 min à 12 000g, à +4°C. Le surnageant est prélevé et trois volumes d'éthanol (Carlo Erba) y sont ajoutés. Les tubes sont placés à -20°C pendant 12 H. Les ADN précipités sont sédimentés par centrifugation 45 min à 12000g à +4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70 %. L'ADN est remis en suspension dans 100 µL d'H₂O stérile, puis dosé à 260 nm.

III-2 Amplification

Chaque échantillon est amplifié par deux couples d'amorces : 376-377 (Morinet) et la sonde 378, sélectionnée dans notre laboratoire, et B19-1-B19-2 / B19-3 (Morinet). Les produits amplifiés ont une longueur de 402 et 777 pb, respectivement. Un mélange réactionnel de 100 μ L contenant 1 μ g d'ADN est préparé. Le programme d'amplification est : dénaturation 5 min, puis 35 cycles 94°C 1 min, 48°C (376-377) ou 55°C (B19-1/B19-2) 1 min, 72°C 2 min, élongation finale 72°C, 10 min.

Les produits obtenus sont analysés en gel d'agarose 2 %. La spécificité du produit amplifié est vérifiée en Southern-blot, par hybridation avec une sonde radioisotopique.

Témoins positifs

Pour l'étude des plasmas pasteurisés, a été préparé dans notre laboratoire un ADN extrait à partir d'un plasma contaminé par le liquide de lavage d'un foie foetal parvovirus B19 positif (dilution au 1/100) chauffé pendant 10 H à 60°C. Ce témoin, ainsi qu'1 μ g d'ADN B19 positif est amplifié systématiquement dans chaque série.

Pour l'étude des produits finis, un facteur VIII B19 positif est amplifié dans chaque série.

RESULTATS

VHC

LDONS DE SANG

I-1 PCR

Aucune discordance n'a été observée entre la technique de notre laboratoire et la trousse Amplicor pour les dons indéterminés, négatifs ou positifs en RIBA 3.0. Les résultats observés pour quelques échantillons négatifs ou positifs en Amplicor sont présentés Figure 27.

I-1-1 Dons positifs en RIBA 3.0

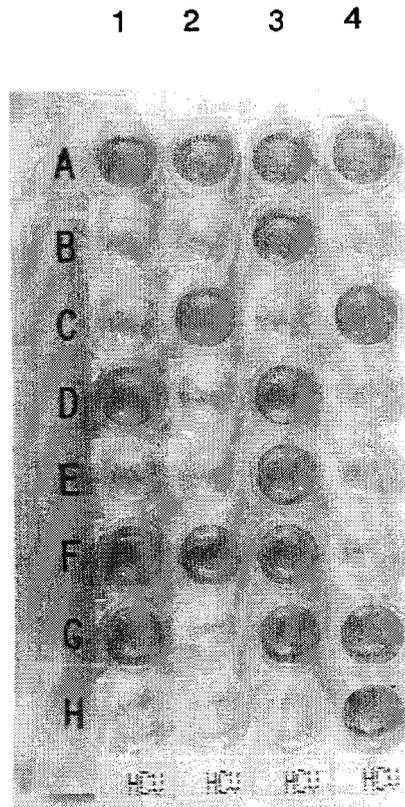
Les résultats sont présentés dans le tableau XI. Parmi les 85 plasmas positifs en RIBA 3.0, 72 sont positifs en ARN-VHC, (84,7 %). Ce pourcentage est plus important pour la catégorie A (98 %) que pour la catégorie B (76 %). Le nombre de plasmas testés pour les catégories C et D est peu représentatif, nous remarquons, cependant, que les 5 échantillons positifs sans C100 et 3/9 échantillons sans C100 ni NS5 le sont également en PCR. Concernant les ALAT, 75,5 % des dons de la catégorie A et 11/19 (58 %) de la catégorie B, positifs en PCR, ont un taux d'ALAT augmenté.

Tableau XI : Résultats de la PCR des dons positifs en RIBA 3.0

	PROFIL RIBA 3.0	PCR POSITIVE		PCR NEGATIVE	
		ALAT < N	ALAT ≥ N	ALAT < N	ALAT ≥ N
A	C100-3, C33c, C22-3, NS5 n = 46	11 24 %	34 74 %	1 2 %	0
B	C100-3, C33c, C22-3 n = 25	8 32 %	11 44 %	6 24 %	0
C	C33c, C22-3, NS5 n = 5	3	2	0	0
D	C33c, C22-3 n = 9	2	1	6	0
	TOTAL n = 85	24	48	13	0

Figure 27 : Amplicor VHC

Résultats obtenus pour quelques échantillons positifs ou négatifs



- A1-A2 : Témoins positifs
 B1-B2 : Témoins négatifs
 C1-E1-H1 : Echantillons négatifs
 D1-F1-G1 : Echantillons positifs

I-1-2 Dons indéterminés ou négatifs en RIBA 3.0

Les résultats sont présentés dans le tableau XII. Toutes les amplifications sont négatives pour les 37 dons indéterminés sur plusieurs prélèvements (profil stable en RIBA-3) et les 22 dons négatifs en sérologie.

Tableau XII : Résultats de la PCR des dons indéterminés ou négatifs en RIBA 3.0

PROFIL RIBA 3.0	PCR NEGATIVE - Technique laboratoire + Amplicor-VHC	
	ALAT < N	ALAT ≥ N
C100-3 n = 2	2	0
C33c n = 16	14	2
C22-3 n = 13	13	0
NS5 n = 5	4	1
C33c, SOD n = 1	1	0
NEGATIF n = 22	20	2

I-2 Génotypage

Les 72 dons positifs en ARN-VHC ont été génotypés avec la trousse INNO-LiPA VHC après amplification avec la trousse Amplicor. Les résultats, présentés dans le tableau XIII, font apparaître que les génotypes les plus représentés sont le 1b puis le 1a, les autres génotypes trouvés étant les 2a, 3a, 4a. Aucun donneur, dans cette étude, n'a été retrouvé infecté par les génotypes 2b, 3b ou 5a.

Tableau XIII : Génotypage des donneurs de sang

GENOTYPE	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	5a
NOMBRE n = 72	19	26	7	0	12	0	8	0
%	26,4	36,1	9,7	0	16,7	0	11,1	0

La répartition des génotypes en fonction du profil en RIBA 3.0 est détaillée dans le tableau XIV. Dans les catégories A et B, tous les génotypes sont représentés. 33/45 (73 %) échantillons de la catégorie A et 12/19 (63 %) de la catégorie B sont du génotype 1 (a ou b), par contre, pour les profils sans C100 (catégorie C et D), aucun échantillon n'est du génotype 1a ou 1b.

Tableau XIV : Répartition des génotypes en fonction du profil en RIBA 3.0

	PROFIL RIBA 3.0	GENOTYPES				
		1a	1b	2a	3a	4a
A	C100-3, C33c, C22-3, NS5 n = 45	16	17	2	5	5
B	C100-3, C33c, C22-3 n = 19	3	9	1	4	2
C	C33c, C22-3, NS5 n = 5			2	2	1
D	C33c, C22-3 n = 3			2	1	

II HEMOPHILES

II-1 Virémie VHC chez les hémophiles

Parmi les 119 échantillons positifs en RIBA 3.0, 95 sont positifs en PCR (78,9 %). Tous les hémophiles présentant un RIBA indéterminé sont négatifs et l'hémophile négatif en sérologie, atteint d'hypogammaglobulinémie est positif en PCR (Tableau XV).

Concernant les taux d'ALAT, 63 % (39/62) des hémophiles virémiques de la catégorie profil RIBA complet et 25 % (7/28) de la catégorie RIBA sans NS5 ont un taux d'ALAT augmenté.

Tableau XV : Résultats de la PCR des hémophiles et sujets atteints d'une maladie de l'hémostase présentant un profil positif ou indéterminé en RIBA 3.0

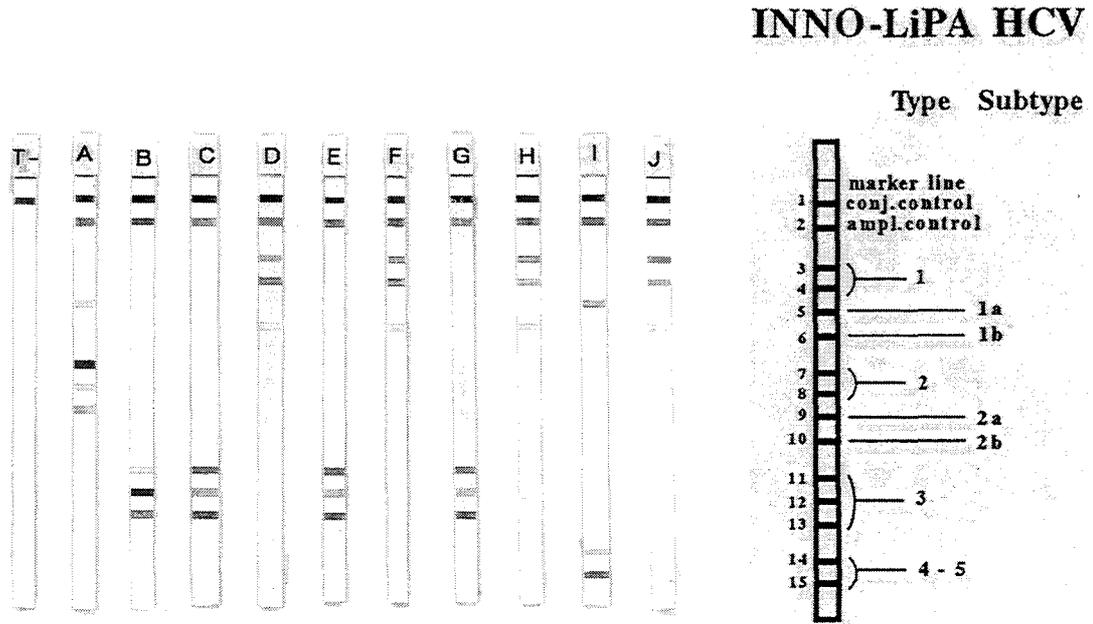
PROFIL RIBA 3.0	PCR POSITIVE		PCR NEGATIVE	
	ALAT < N	ALAT ≥ N	ALAT < N	ALAT ≥ N
C100-3, C33c, C22-3, NS5 n = 71	23 32 %	39 55 %	9 13 %	0
C100-3, C33c, C22-3 n = 36	21 58,5 %	7 19,5 %	8 22 %	0
C33c, C22-3, NS5 n = 5	2	2	0	1
C33c, C22-3 n = 5	0	1	4	0
C100-3, C33c n = 1	0	0	1	0
C100-3, C22-3 n = 1	0	0	1	0
C33c n = 2	0	0	2	0
C22-3 n = 5	0	0	5	0
NEGATIF* n = 1	0	1	0	0

* Hémophile atteint d'hypogammaglobulinémie.

II-2 Hémophiles traités à l'interféron

II-2-1 Génotypage

Le génotypage réalisé 2 fois (protocole LiPA+protocole Amplicor-LiPA) pour chaque patient n'a fait apparaître aucune discordance. La répartition chez les dix hémophiles sous traitement est : génotype 1b, 4 cas; génotype 2a, 1 cas; génotype 3a, 4 cas; génotype 4, 1 cas (Figure 28).

Figure 28 : Génotypage des hémophiles traités à l'IFN

T-. Témoin négatif

A. Hémophile DG : Génotype 2a

B Hémophile QA : Génotype 3a

C. Hémophile PJC : Génotype 3a

D. Hémophile LB : Génotype 1b

E. Hémophile BC : Génotype 3a

F. Hémophile SJ : Génotype 1b

G. Hémophile HC : Génotype 3a

H. Hémophile FP : Génotype 1b

I. Hémophile LC : Génotype 4

J. Hémophile PG : Génotype 1b

II-2-2 Suivi du traitement

Pour chaque hémophile, les résultats du suivi des transaminases et de l'ARN du VHC, le génotype et la quantification sont présentés Figures 29 à 38.

Figure 29 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile LB

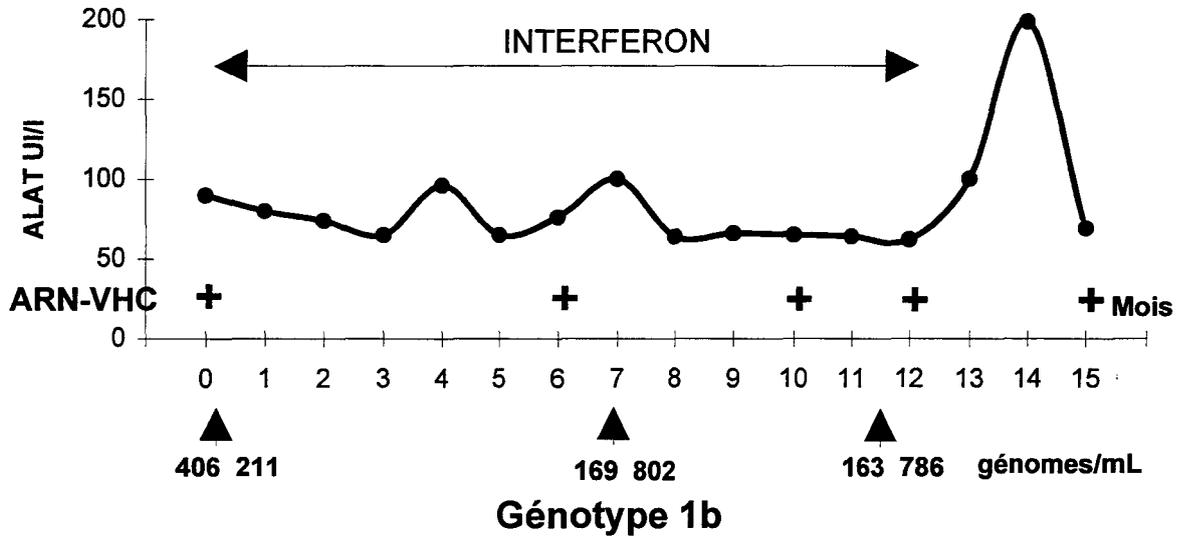


Figure 30 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile FP

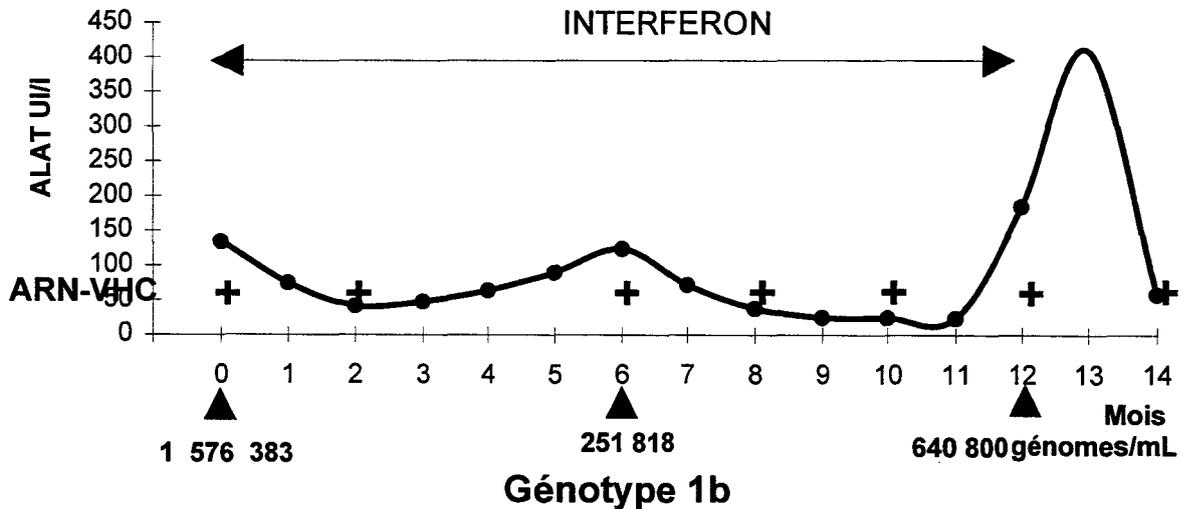


Figure 31 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile PG

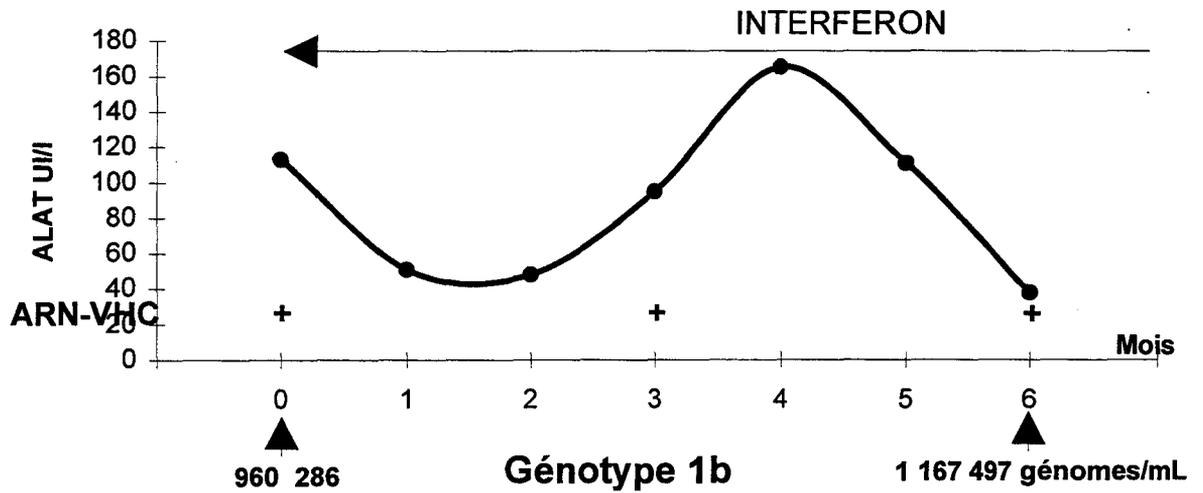


Figure 32 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile SJ

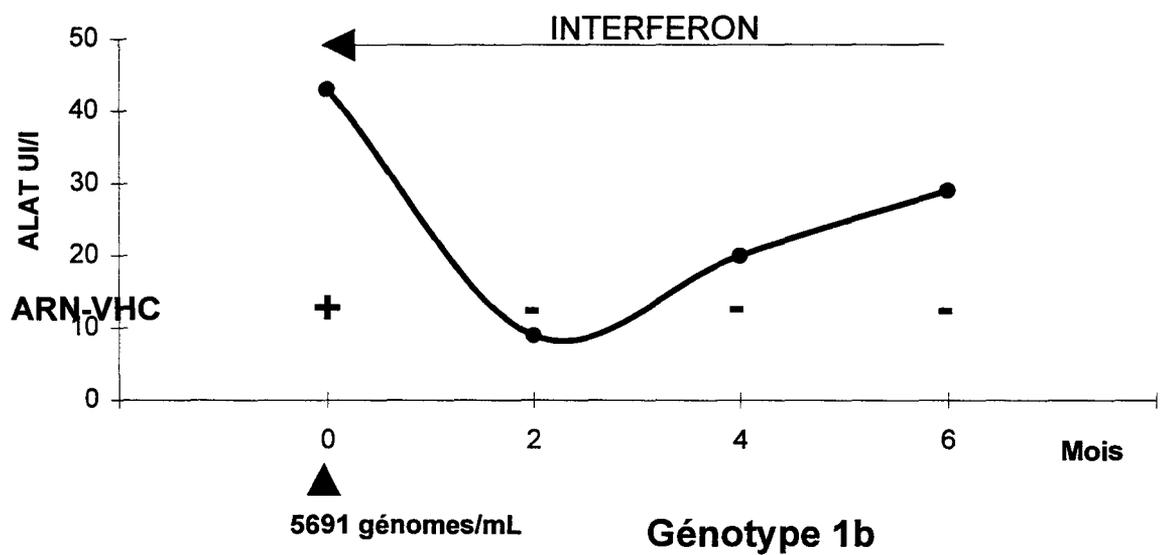


Figure 33 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile DG

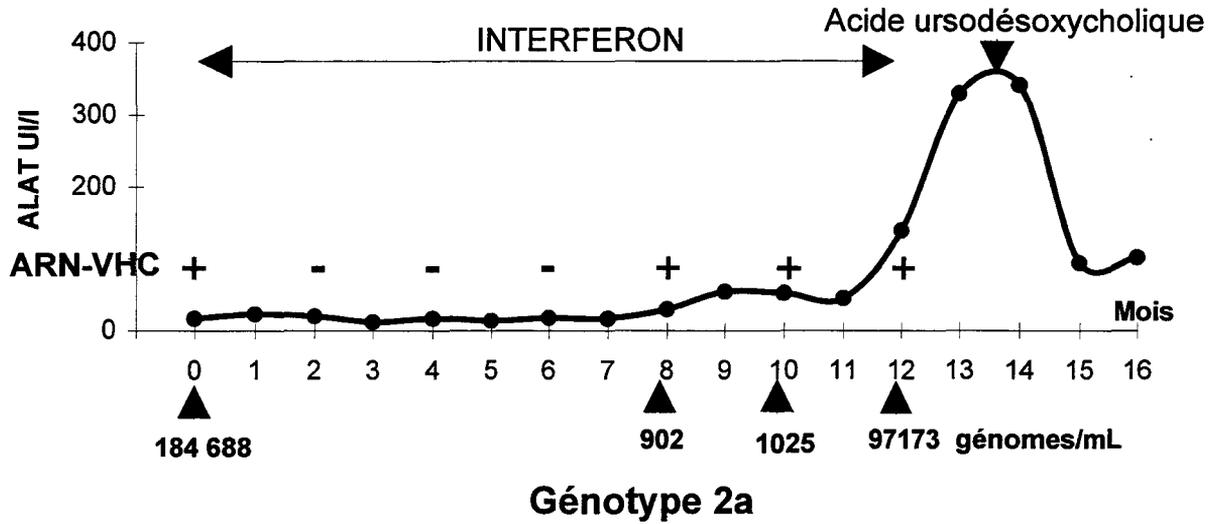


Figure 34 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile PJC

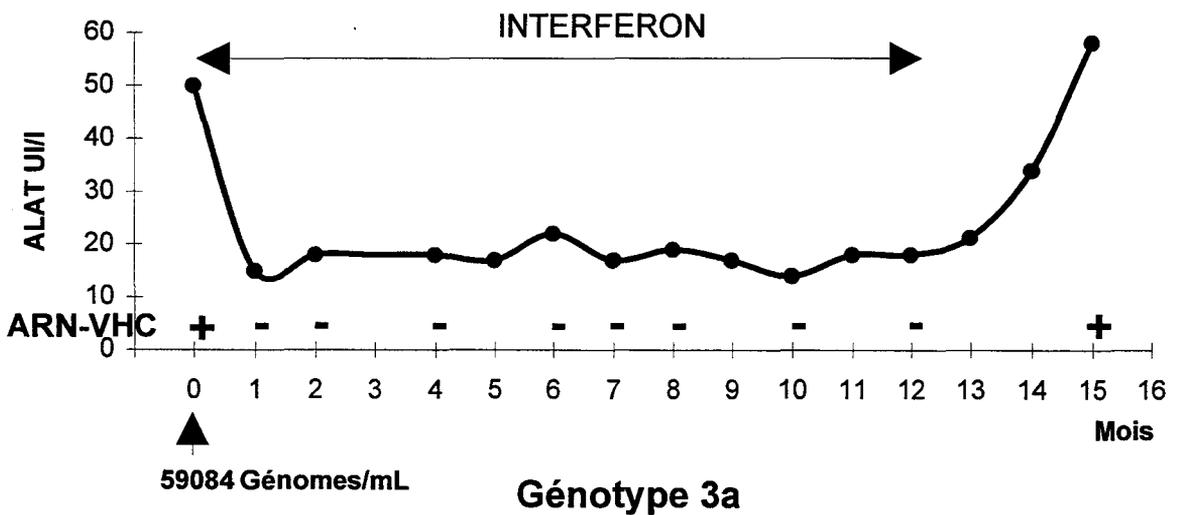


Figure 35 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile BC

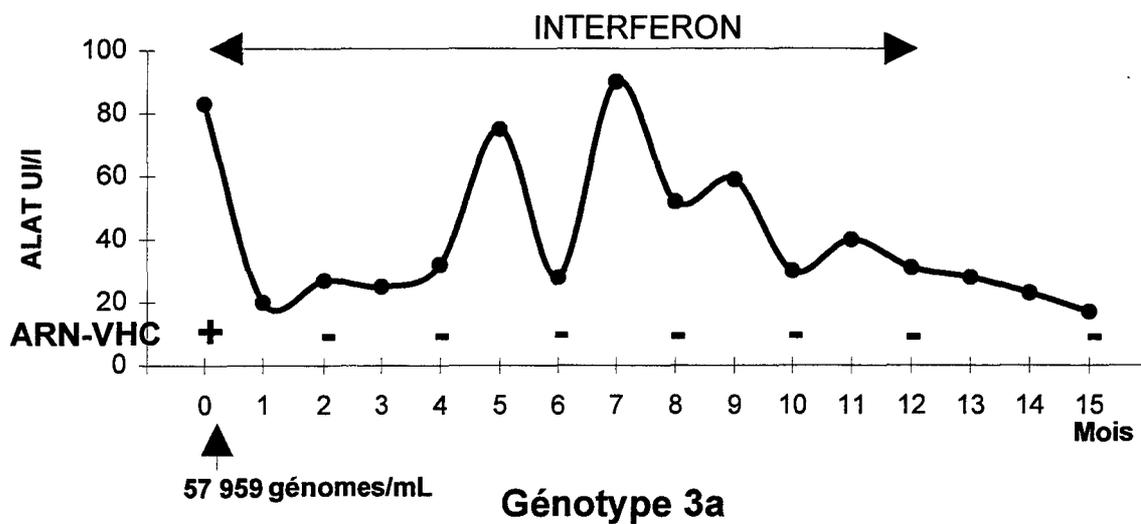


Figure 36 : Taux d'ALAT, génotype, résultat de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile QA

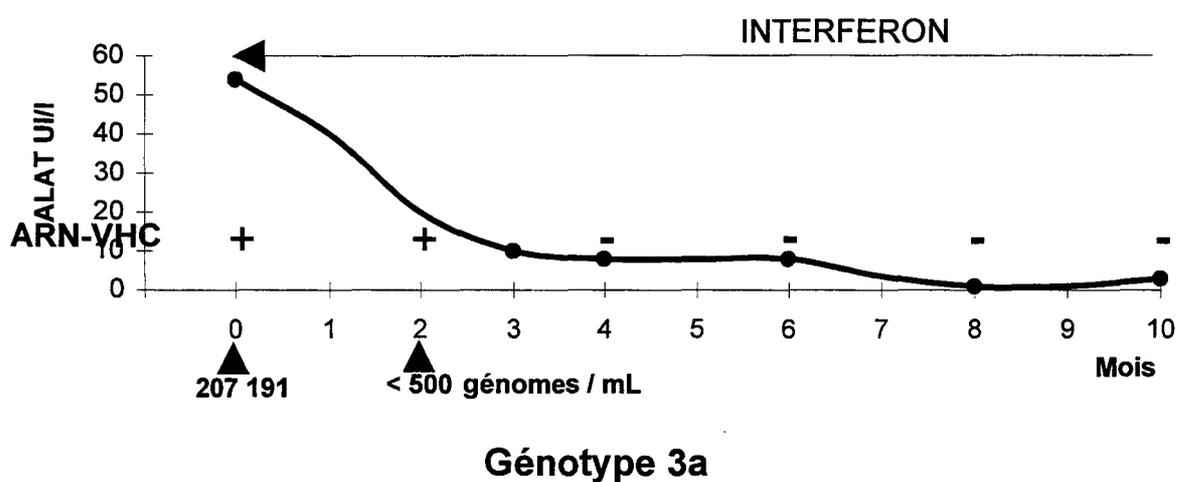


Figure 37 : Taux d'ALAT, génotype, résultats de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile HC

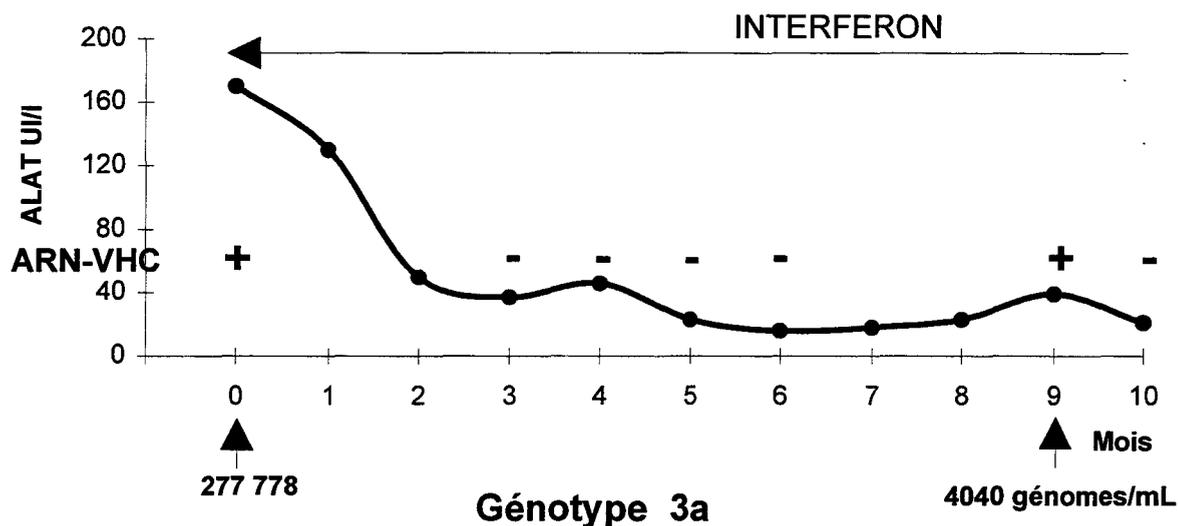
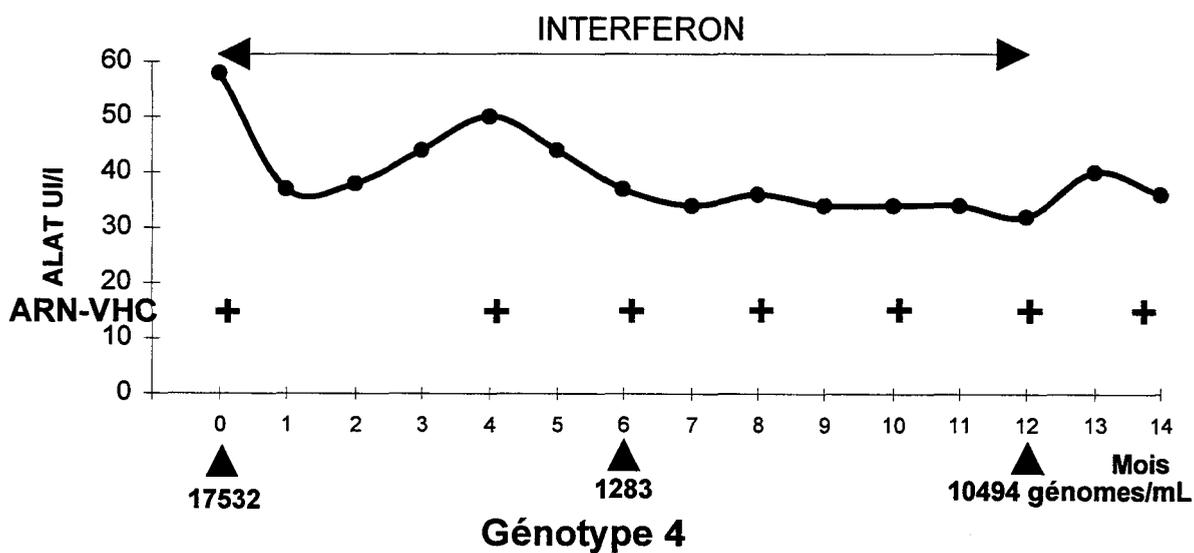
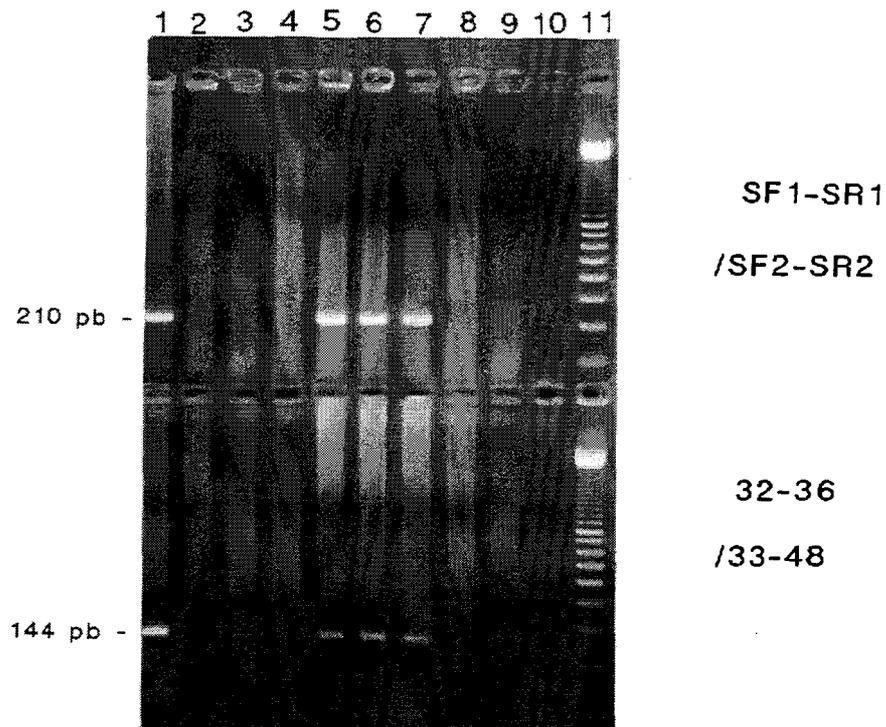


Figure 38 : Taux d'ALAT, génotype, résultat de l'ARN-VHC, nombre de génomes de l'hémophile LC



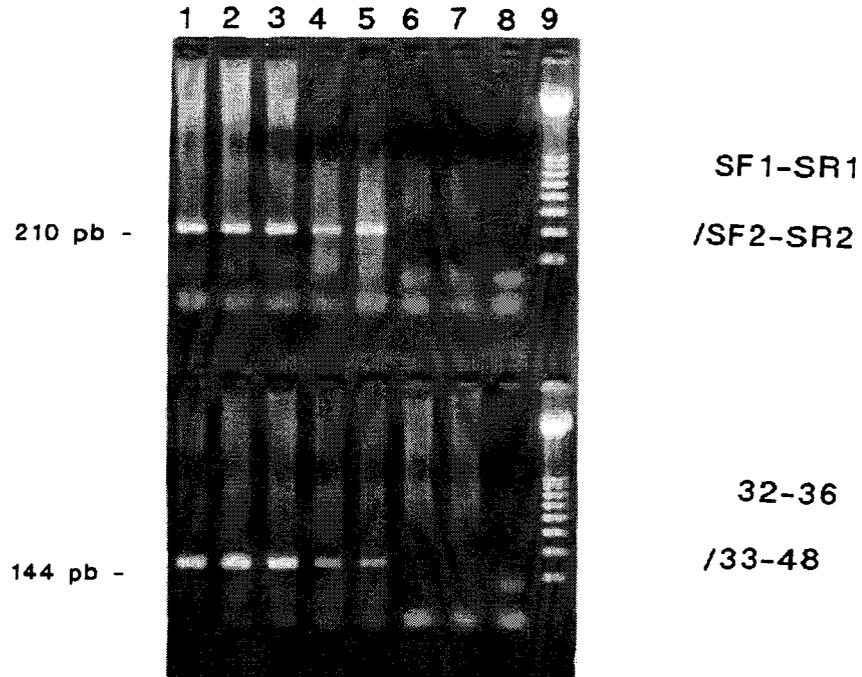
Trois des 4 hémophiles infectés par le génotype 1b (Figures 29-31), ainsi que l'hémophile LC infecté par le génotype 4 (Figure 38) n'ont pas répondu au traitement interféron, alors que les 5 patients infectés par les génotypes 2a (hémophile DG) (Figure 33) et 3a (Figure 34-37), et l'hémophile SJ (génotype 1b) (Figure 32) ont répondu. Les hémophiles DG (Figure 33), PJC (Figure 34) et HC (Figure 37) ont présenté une réponse complète mais transitoire. Leurs taux d'ALAT se sont normalisés et l'ARN-VHC s'est négativé mais celui-ci a de nouveau été détectable avant ou au moment de la ré-augmentation du taux d'ALAT. L'hémophile PJC a rechuté après l'arrêt de l'IFN au mois 15 (M15) alors que les hémophiles DG et HC ont rechuté au cours de la prise d'interféron à M8 et M10, respectivement. Les figures 39 et 40 illustrent 2 types de suivi du traitement en PCR : suivi de l'hémophile DG, réponse puis rechute et suivi de l'hémophile FP, pas de réponse au traitement IFN.

**Figure 39 : Suivi de l'ARN-VHC de l'hémophile DG
par PCR, en gel d'agarose
(Réponse à l'IFN, puis rechute)**



1. M0 : ARN-VHC positif
2. M2 : ARN-VHC négatif → Réponse à l'IFN
3. M4 : ARN-VHC négatif
4. M6 : ARN-VHC négatif
5. M8 : ARN-VHC positif → Rechute
6. M10 : ARN-VHC positif
7. M12 : ARN-VHC positif
8. Témoin mélange réactionnel ADNc
9. Témoin mélange réactionnel PCR1
10. Témoin mélange réactionnel PCR2
11. Poids moléculaire 100 pb

**Figure 40 : Suivi de l'ARN-VHC de l'hémophile FP
par PCR, en gel d'agarose
(Pas de réponse à l'IFN)**



1. M0 : ARN-VHC positif
2. M4 : ARN-VHC positif
3. M8 : ARN-VHC positif
4. M10 : ARN-VHC positif
5. M14 : ARN-VHC positif
6. Témoin mélange réactionnel ADNc
7. Témoin mélange réactionnel PCR1
8. Témoin réactionnel PCR2
9. Poids moléculaire 100 pb

II-2-3 Quantification génomique du VHC

Les hémophiles infectés par le génotype 1b ont un nombre de génomes plus important que ceux infectés par les autres génotypes (2a, 3a ou 4), à l'exception de l'hémophile SJ (5 691 génomes/mL) qui est le seul contaminé par ce génotype ayant répondu au traitement (Tableau XVI).

Le seul hémophile infecté par le génotype 4 suivi ne répond pas au traitement IFN alors que la charge virale est relativement faible.

Tableau XVI : Génotype, réponse, nombre de génomes à M0 des hémophiles sous traitement interféron.

Hémophile	Génotype	Réponse à l'IFN	Génomes/mL à M0
LB	1b	Non	406 211
FP	1b	Non	1 576 383
PG	1b	Non	960 286
SJ	1b	Oui	5 691
DG	2a	Oui	184 688
PJC	3a	Oui	59 084
BC	3a	Oui	57 959
QA	3a	Oui	207 191
HC	3a	Oui	277 778
LC	4	Non	17 532

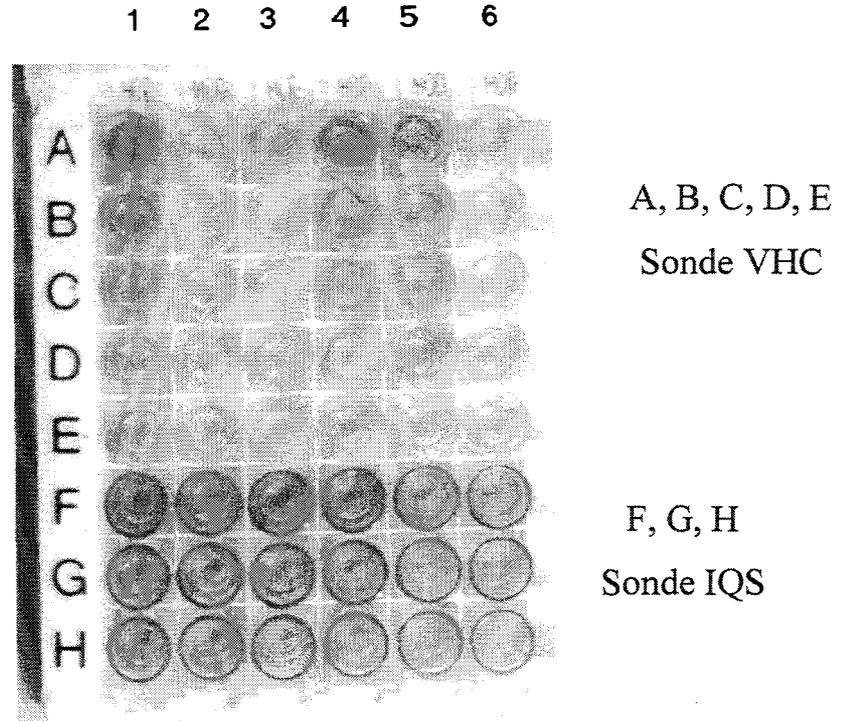
Les figures 41 et 42 illustrent les résultats de la détermination du nombre de génomes avec la trousse Amplicor VHC Monitor. La figure 41 illustre la quantification génomique du VHC des hémophiles DG, au démarrage du traitement et dès la réapparition de l'ARN du VHC à M8, et QA, disparition de l'ARN-VHC à M2. La figure 42 illustre 2 exemples de persistance du virus malgré l'IFN : le suivi du nombre de génomes de l'hémophile FP permet, toutefois,

d'observer une diminution transitoire de la virémie au cours du traitement, et le suivi de l'hémophile LC montre que l'IFN ne permet pas l'éradication du virus malgré une faible virémie à M0.

II-2-4 Suivi du RIBA 3.0

Le suivi du RIBA n'a montré aucune diminution du taux d'un des anticorps dirigés contre les quatre antigènes. A ce jour, tous les hémophiles sous traitement ont exactement le même profil en RIBA-3 qu'à M0. Une étude complémentaire de sérums en dilution visant à apprécier une éventuelle décroissance du taux des anticorps chez les sujets devenus PCR négative est en cours.

Figure 41 : Amplicor VHC Monitor :
Suivi quantitatif de la virémie des hémophiles DG et QA



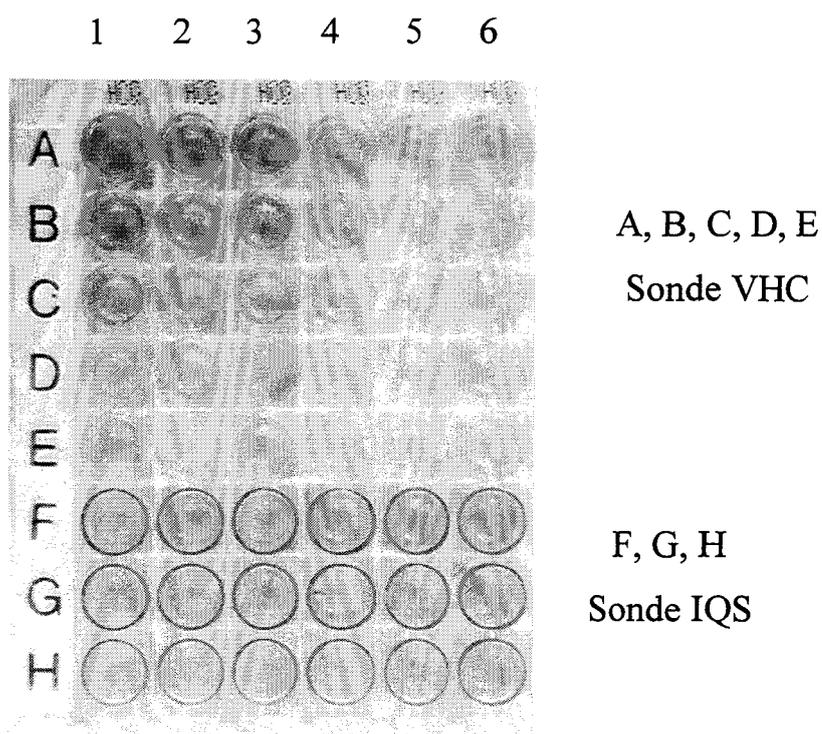
Hémophile DG

1. M0	:	184 688	génomés/mL
2. M8	:	902	
3. M10	:	1025	
4. M12	:	97 173	

Hémophile QA

5. M0	:	207 191	
6. M3	:	<500	

Figure 42 : Amplicor VHC Monitor
Suivi quantitatif de la virémie des hémophiles FP et LC



Hémophile FP

1. M0	:	1 576 383	génomés/mL
2. M6	:	251 818	
3. M12	:	640 800	

Hémophile LC

4. M0	:	17 532
5. M6	:	1283
6. M12	:	10 494

HTLV

LECHANTILLONS POSITIFS EN WB

Les 12 échantillons anti-HTLV positifs testés sont positifs en PCR (Tableau XVII).

Tableau XVII : Résultats de la PCR des échantillons positifs en western-blot HTLV

Nombre d'échantillons	Profil en western-blot					Nombre de PCR positives	Conclusion
	rgp21	p19	p24	rgp46-I	rgp46-II		
7	+	+	+	+	-	7	HTLV-I
4	+	+	+	-	-	4	HTLV-I
1	+	+	+	-	+	1	HTLV-II

Les résultats obtenus pour les différents couples d'amorces sont détaillés dans le tableau XVIII.

Parmi les 7 échantillons positifs ayant réagi avec la rgp46-I du western-blot DBL, 6 sont HTLV-I positif avec tous les couples d'amorces spécifiques du virus HTLV-I et 1 est positif avec un seul couple en simple PCR, SK54-55/SK56 et les 2 couples en nested-PCR. Un échantillon ayant réagi avec la rgp46-II est positif avec les couples et sondes spécifiques du virus HTLV-II. Quatre échantillons étaient HTLV positif selon les critères du Groupe Rétrovirus, mais n'étaient pas différenciés avec la trousse DBL (pas de réactivité avec les protéines rgp46-I et rgp46-II). En PCR, ils sont tous différenciés en HTLV-I : 3 avec tous les couples spécifiques de l'HTLV-I et un avec tous excepté le couple SK54-55/SK56.

Tableau XVIII : Résultats obtenus avec les différents couples d'amorces pour les échantillons positifs en western-blot

Paires d'amorces	SK43-SK44	SK110-SK111		SK54-SK55	SK58-SK59	P11-P12 /P21-P22	SG221-SG227 /C1-C2
Région	tax	pol		pol	pol	pol	env
Sonde	SK45	SK112	SK188	SK56	SK60		
Type de virus	HTLV-I/II	HTLV-I	HTLV-II	HTLV-I	HTLV-II	HTLV-I	HTLV-I
9 HTLV-I	+	+	-	+	-	+	+
1 HTLV-I	-	-	-	+	-	+	+
1 HTLV-I	+	+	-	-	-	+	+
1 HTLV-II	+	-	+	-	+	-	-

II ECHANTILLONS INDETERMINES EN WB

Parmi les 174 échantillons indéterminés en WB, 171 sont négatifs en PCR (Tableau XIX). Les 3 échantillons trouvés positifs appartiennent à la catégorie rgp21+p19, deux d'entre eux présentent une réactivité avec la bande rgp46-I du WB DBL. En PCR, deux sont positifs avec les deux systèmes de nested-PCR uniquement (Figures 43, 44 et 45) et le troisième est positif avec toutes les amorces spécifiques de l'HTLV-I, excepté le couple SK43-44/SK45. Les figures 44 et 45 illustrent les résultats obtenus en amplification avec les couples SK110-111, SK54-55 et SK43-44 pour quelques échantillons indéterminés ou positifs en WB.

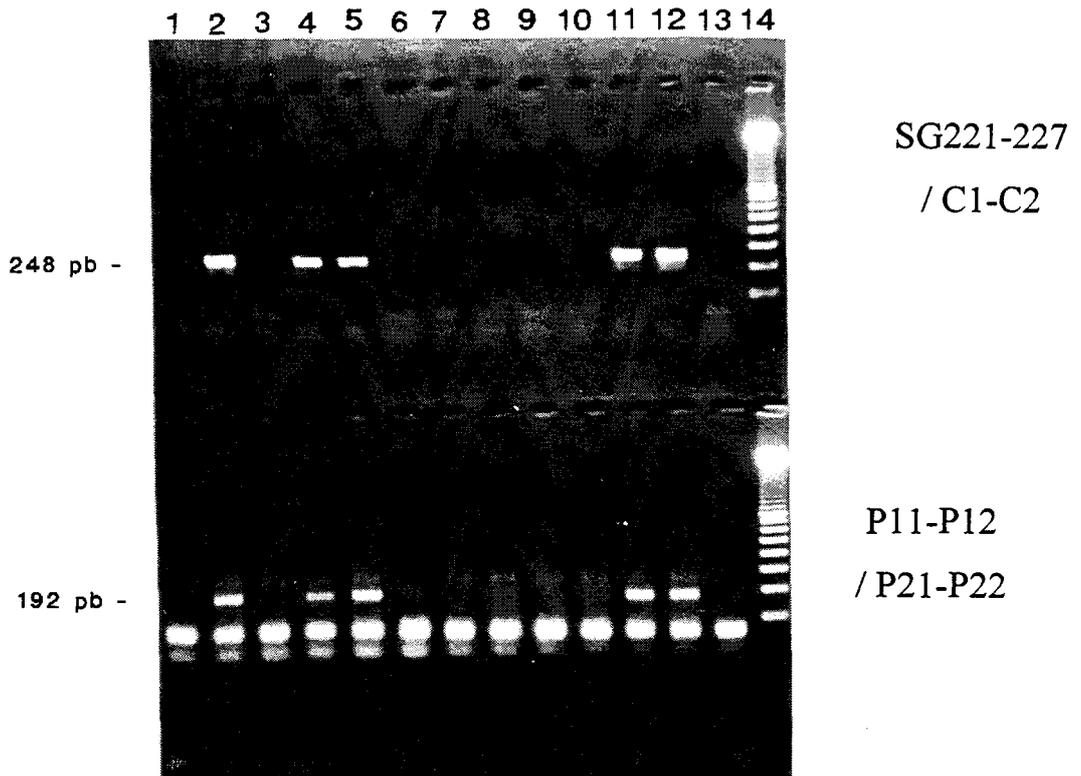
Tableau XIX : Résultats de la PCR des échantillons indéterminés en western-blot

Nombre d'échantillons	Profil du western-blot					Résultats de la PCR	
	rgp21	p19	p24	rgp46-I	rgp46-II	+	-
9	+	-	-	-	NT*	0	9
22	+	+	-	-	NT	1	21
2	+	+	-	+	-	2	0
19	+	-	+	-	-	0	19
27	-	+	+	-	NT	0	27
46	-	+	-	-	NT	0	46
49	-	-	+	-	NT	0	49
Total 174						3	171

*NT : Non testé

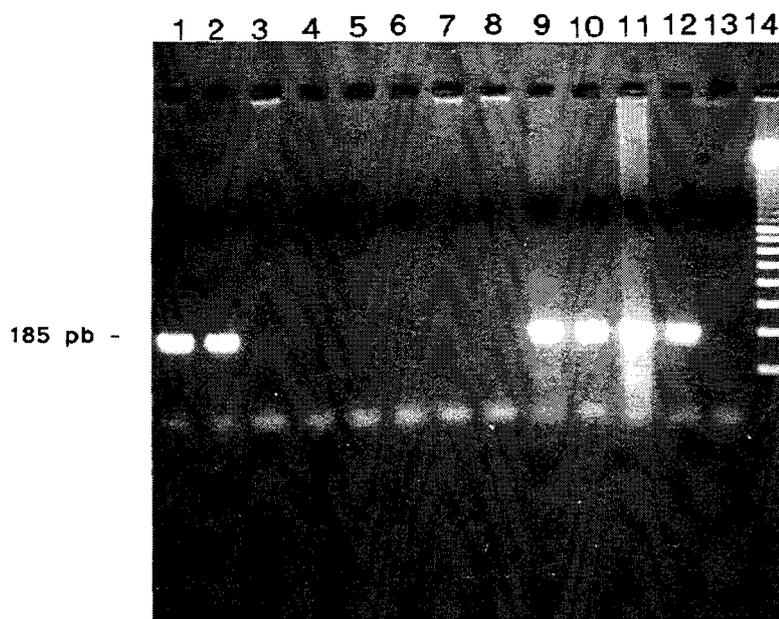
Figure 43 : Couples SG221-227 / C1-C2 (HTLV-I) et P11-P12 / P21-P22 (HTLV-I)

Résultats obtenus pour quelques échantillons en gel d'agarose.



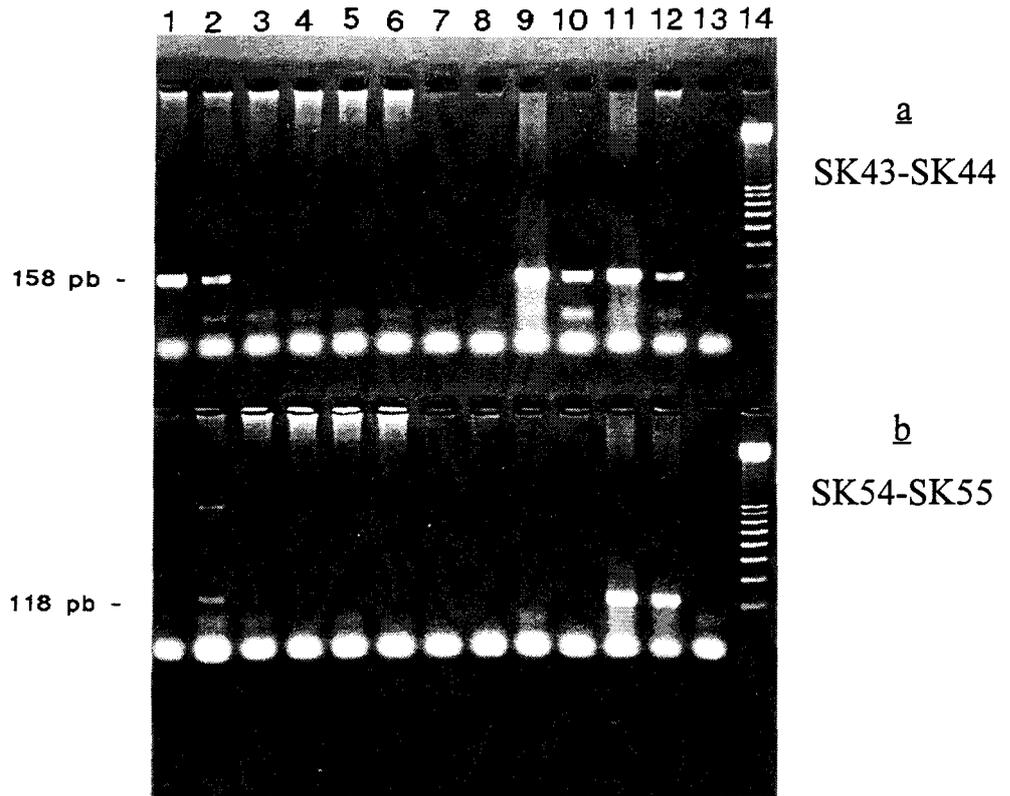
1. Echantillon WB HTLV-II positif, PCR négative
2. Echantillon WB HTLV-I positif, PCR positive
3. Echantillon rgp21 isolée, PCR négative
4. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, MTA-1, PCR positive
5. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, rgp46-I/II-, PCR positive
- 6., 7., 8. Témoins WB négatif, PCR négative
9. Témoin culture HTLV-II, PCR négative
10. Témoin HTLV-II, PCR négative
11. Témoin culture HTLV-I, PCR positive
12. Témoin HTLV-I, PCR positive
13. Témoin mélange réactionnel
14. Poids moléculaire 100 pb

Figure 44 : Couples SK110-SK111 (HTLV-I +HTLV-II)
Résultats obtenus pour quelques échantillons en gel d'agarose



1. Echantillon WB HTLV-II positif, PCR positive
2. Echantillon WB HTLV-I positif, PCR positive
3. Echantillon rgp21 isolée, PCR négative
4. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, MTA-1, PCR négative
5. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, rgp46-I/II-, PCR négative
- 6., 7., 8. Témoins WB négatif, PCR négative
9. Témoin culture HTLV-II, PCR positive
10. Témoin HTLV-II, PCR positive
11. Témoin culture HTLV-I, PCR positive
12. Témoin HTLV-I, PCR positive
13. Témoin mélange réactionnel
14. Poids moléculaire 100 pb

Figure 45 : Couples SK43-SK44 (HTLV-I / -II) et SK54-SK55 (HTLV-I)
Résultats obtenus pour quelques échantillons en gel d'agarose



1. Echantillon WB HTLV-II positif, a : PCR positive, b : PCR négative
2. Echantillon WB HTLV-I positif, PCR positive (a+b)
3. Echantillon rgp21 isolée, PCR négative (a+b)
4. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, MTA-1, PCR négative (a+b)
5. Echantillon rgp21+, p19+, p24-, rgp46-I/II-, PCR négative (a+b)
- 6., 7., 8. Témoins WB négatif, PCR négative (a+b)
9. Témoin culture HTLV-II, a : PCR positive, b : PCR négative
10. Témoin HTLV-II, a : PCR positive, b : PCR négative
11. Témoin culture HTLV-I, PCR positive (a+b)
12. Témoin HTLV-I, PCR positive (a+b)
13. Témoin mélange réactionnel
14. Poids moléculaire 100 pb

Parvovirus B19

I PRODUITS SANGUINS

Parmi les 181 lots étudiés, seuls 9 lots contenaient de l'ADN du parvovirus B19, amplifié par les couples 376-377/378 et B19-1-2/B19-3 : 8 lots de facteur VIII et 1 lot de facteur IX. Les résultats sont détaillés dans le tableau XX.

Tableau XX : Résultats de l'amplification de l'ADN du parvovirus B19 dans les produits sanguins.

Type de produit	PCR +	PCR -
Albumine 4 %	0	46
Albumine 20 %	0	49
Facteur VIII	8	50
Facteur IX	1	4
Fibrinogène	0	23
Total 181	9	172

II PLASMA PASTEURISE

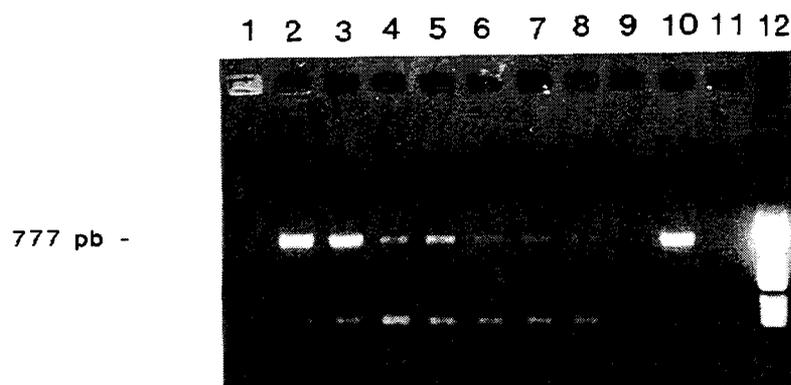
La figure 46 illustre les résultats obtenus avec des dilutions du témoin plasma contaminé par du virus B19, chauffé pendant 10H à 60°C, pour le couple B19-1-2 (en gel d'agarose et en autoradiographie).

Parmi les 111 lots de plasma pasteurisé testés en PCR, un seul contenait de l'ADN de parvovirus amplifié avec les 2 couples. Le lot non pasteurisé correspondant est également le seul lot trouvé positif parmi les 55 testés. Le contrôle de la positivité a été réalisé directement sur l'un des flacons de 100 mL stocké à -35°C. Les figures 47 et 48 illustrent les résultats obtenus avec les 2 couples d'amorces sur quelques lots de plasma pasteurisé; parmi ceux-ci,

se trouvent le lot ADN-B19 positif. Le contrôle de la positivité a été réalisé directement sur un flacon de 100 mL de plasma pasteurisé, stocké à -35°C (Figure 49).

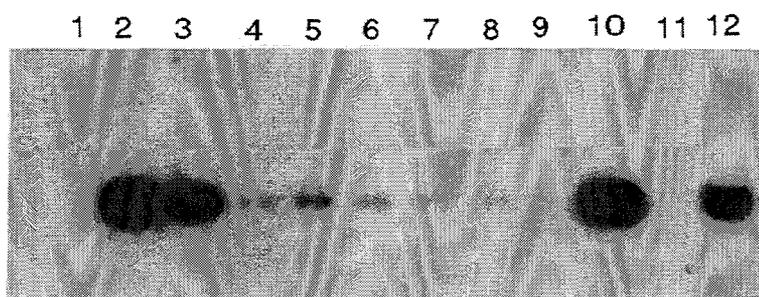
**Figure 46 : Témoin plasma pasteurisé positif (dilution au 1/100^e)
Couple B19-1, B19-2**

Gel d'agarose



Autoradiographie

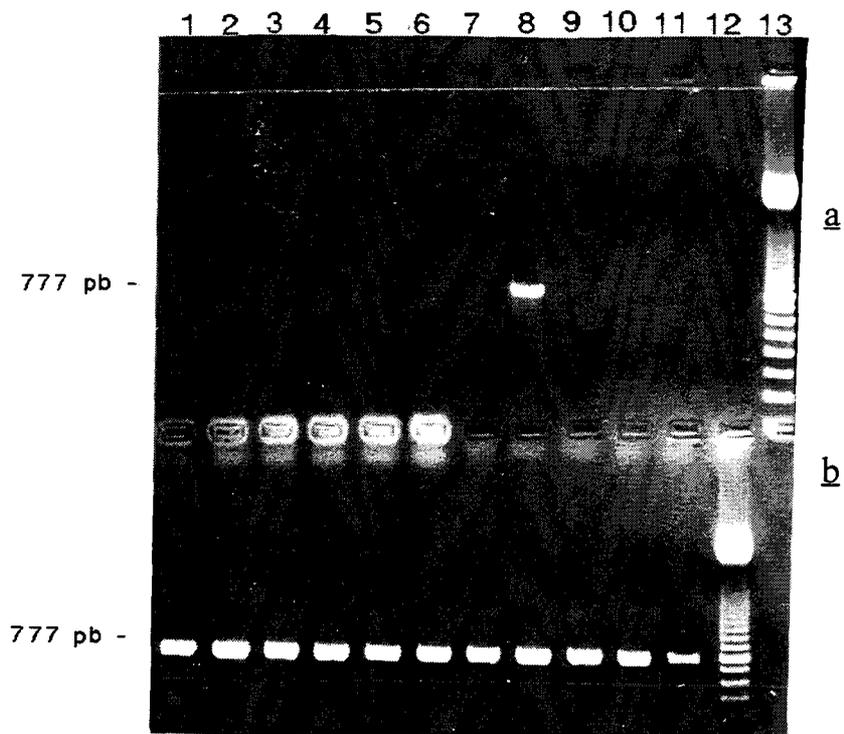
Sonde B19-3



1. Témoin négatif
2. Dilution finale au 1/1000
- 3.....1/10 000
- 4.....1/50 000
- 5.....1/100 000
- 6.....1/500 000
- 7.....1/1 000 000
- 8.....1/1 500 000
- 9.....1/2 000 000
10. Témoin positif
11. Témoin mélange réactionnel
12. Poids moléculaire pBR 322

Figure 47 : Plasma pasteurisé
Couple d'amorces B19-1/B19-2

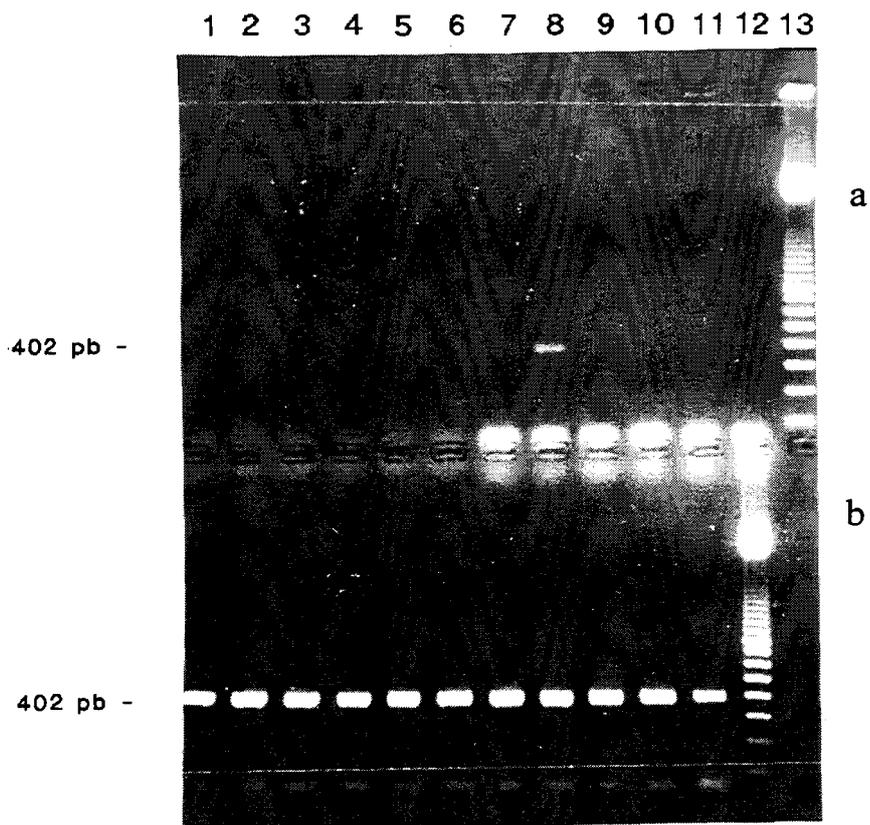
(Gel d'agarose)



- a** : 1 à 10 : Tous les lots sont négatifs, sauf lot n° 8
 11. Témoin négatif
 12. Témoin mélange réactionnel
- b** : 1 à 10 : Mêmes lots contaminés par de l'ADN de B19
 11. Témoin plasma pasteurisé positif
 13a et 12b : Poids moléculaire 100 pb

Figure 48 : Plasma pasteurisé
Couple d'amorces 376-377

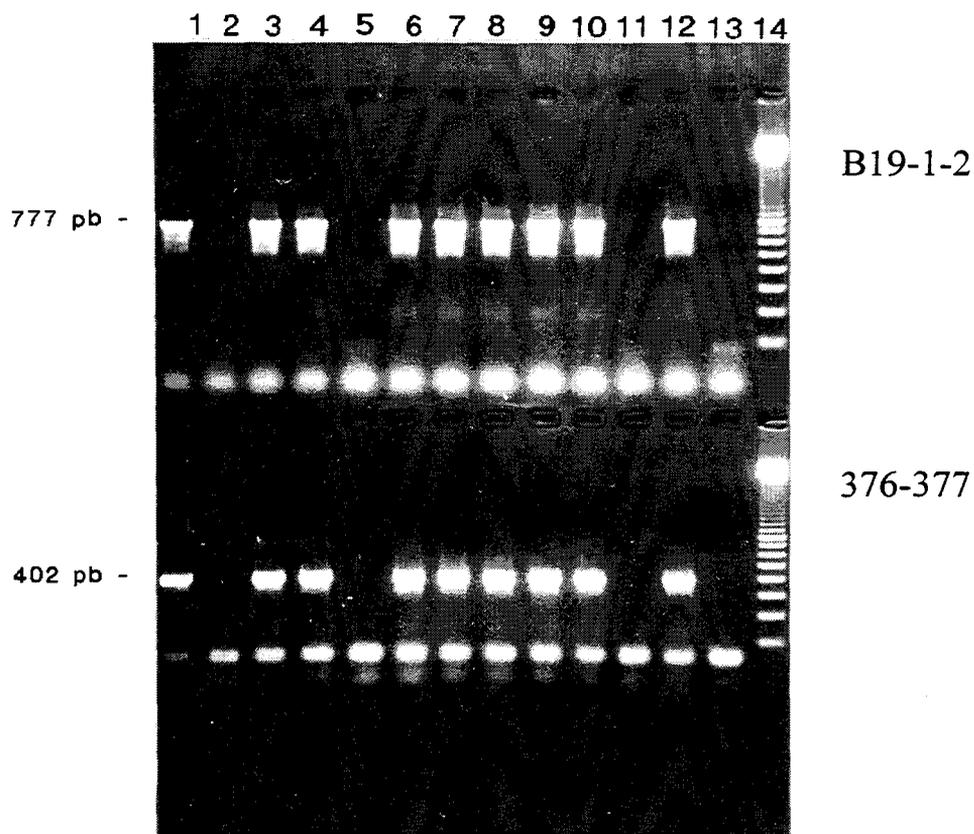
(Gel d'agarose)



- a** : 1 à 10 : Tous les lots sont négatifs, sauf lot n° 8
 11. Témoin négatif
 12. Témoin mélange réactionnel
- b** : 1 à 10 : Mêmes lots contaminés par de l'ADN de B19
 11. Témoin plasma pasteurisé positif
 13a et 12b : Poids moléculaire 100 pb

**Figure 49 : Contrôle du lot de plasma pasteurisé positif
en ADN parvovirus B19**

(Gel d'agarose)



- | | | |
|--------|---|--|
| 1 | : | Contrôle lot plasma pasteurisé positif (flacon 100 ml) |
| 2 | : | Lot négatif |
| 3 | : | Lot positif avant pasteurisation |
| 4 | : | Lot positif après pasteurisation |
| 5 | : | Lot négatif |
| 6 à 10 | : | Lots 1 à 5 contaminés par de l' ADN B19 |
| 11 | : | Témoin négatif |
| 12 | : | Témoin positif |
| 13 | : | Témoin mélange réactinnel |
| 14 | : | Poids moléculaire 100 pb |

DISCUSSION

Les résultats de la PCR ne sont exploitables que si des règles strictes sont observées au cours des manipulations afin d'obtenir les meilleures spécificité et reproductibilité. Les amorces sont choisies dans les régions les plus conservées du génome viral pour éviter les résultats faussement négatifs. Ceux-ci peuvent également être limités par l'utilisation de plusieurs paires d'amorces appartenant à la même région ou à des régions différentes. Certes, la procédure s'en trouve alourdie mais cette démarche apporte une sécurité supplémentaire. Nous avons également introduit des témoins négatifs à chaque étape de nos protocoles pour garantir la spécificité de nos résultats.

La recherche en PCR, d'ARN-VHC, dans des dons de sang présentant une sérologie négative, indéterminée ou positive en anticorps anti-VHC permet d'apprécier, si la PCR est positive, la sensibilité et la spécificité du RIBA 3.0. Par ailleurs, il était intéressant de comparer les résultats obtenus chez les donneurs de sang (DDS) avec ceux obtenus dans un groupe à très forte prévalence tel que les hémophiles.

Les 22 dons négatifs en sérologie le sont également en PCR, ce résultat confirme la bonne spécificité de notre PCR, ce qui est capital pour l'étude de RIBA indéterminés.

Parmi les 85 plasmas positifs en RIBA-3, 72 avaient un ARN-VHC détectable, soit 84,7 %. Les 13 PCR négatives ne signifient pas, pour autant, qu'il s'agit de réactions faussement positives en RIBA-3, il peut s'agir d'une séquelle sérologique ou d'une phase non répliquative (la virémie VHC est intermittente). Les résultats obtenus chez les hémophiles sont sensiblement identiques : le nombre de virémies positives est un peu plus faible pour les profils RIBA complets (catégorie A) (87 % contre 98 % chez les DDS). En absence de NS5 (catégorie B), les résultats sont identiques chez les DDS et les hémophiles (80,5 %). Dans nos 2 études, la proportion de PCR positives est directement corrélée au nombre de bandes observées en RIBA. En effet, chez les DDS, un seul prélèvement (2 %) est négatif dans la catégorie A alors qu'il y en a 24 % dans la catégorie B. Chez les hémophiles, la différence est toutefois moins nette (13 % et 22 % de PCR négatives pour les catégories A et B, respectivement).

Chez les DDS présentant un RIBA complet, la positivité de la PCR est assez bien corrélée au taux d'ALAT, 75,5 % (34/45) des PCR positives sont associées à un taux d'ALAT augmenté. Par contre, seuls 58 % (11/19) des échantillons de la catégorie B, positifs en PCR étaient associés à un taux d'ALAT élevé. Cette observation est encore plus évidente chez les hémophiles puisque 63 % des échantillons de la catégorie A et seulement 25 % (7/28) des échantillons de la catégorie B sont associés à un taux d'ALAT augmenté. Il est à noter qu'aussi bien dans la population des DDS que dans celle des hémophiles anti-VHC positifs, les taux d'ALAT sont presque toujours normaux quand la PCR est négative.

L'absence de NS5 pourrait refléter une virémie plus faible et/ou des périodes d'absence de réplication du virus plus longues, ou éventuellement une mauvaise qualité de l'antigène correspondant. Ces donneurs ne semblent pas contaminés par un génotype particulier. Comme l'indique le tableau XII, la proportion de chacun des génotypes trouvés est sensiblement identique pour les catégories A et B (73 % de la catégorie A contre 63 % de la catégorie B ont le génotype 1 (a ou b)).

Par ailleurs, la présence ou l'absence de protéine C100-3 n'est pas du tout corrélée à la virémie. En effet, dans la catégorie C (C33c, C22-3, NS5), 5/5 (étude DDS) et 4/5 (étude Hémophiles) échantillons sont positifs en PCR. Toutefois, il est nécessaire d'étudier un nombre de prélèvements plus important afin de confirmer cette observation, qui peut laisser penser que cette protéine, telle qu'elle est, a peu d'intérêt pour le diagnostic. Par contre, dans l'étude de génotypage, l'absence de réactivité sur la C100-3 éliminerait la possibilité d'une infection par le génotype 1 (a ou b), puisqu'aucun des donneurs de la catégorie C n'est infecté par ce génotype. Il est possible d'expliquer ce résultat par le fait que la C100-3 utilisée dans le RIBA est synthétisée à partir d'un virus du génotype 1. Une étude de Van Doorn confirme qu'il n'existe pas de corrélation entre le génotype et la réponse anti-VHC, bien que les génotypes 2, 3 et 4 montrent une faible réactivité pour les épitopes anti-NS4 (Van Doorn, 1994).

Il est plus difficile d'interpréter les profils RIBA ne présentant que 2 réactivités. Le profil C33c, C22-3 est parfois corrélé à une PCR positive (3/9 échantillons dans l'étude DDS et 1/5 dans l'étude hémophile). Ce profil nécessite donc une analyse en PCR pour discriminer entre vraie, fausse réaction et séquelle sérologique. Mais, si la PCR est négative, il est nécessaire de réaliser une nouvelle recherche de l'ARN-VHC sur un prélèvement ultérieur avant de conclure à une absence de virémie, celle-ci pouvant être transitoire.

Les 2 profils C100-3+C33c et C100-3+C22-3 semblent très rares (2 cas chez les hémophiles) et sont probablement 2 fausses réactions associées ou une séquelle sérologique.

En RIBA-3, le remplacement des protéines recombinantes par des peptides a réduit considérablement les réactions indéterminées mais la spécificité du RIBA doit encore être améliorée : il demeure 40 % environ de dons indéterminés (Lelie 1994). Dans notre étude, il s'agit très probablement de réactions non spécifiques ou de séquelles sérologiques car tous les dons que nous avons étudiés sont négatifs en PCR. D'ailleurs, ces profils n'évoluent pas. Cependant, un profil RIBA indéterminé peut correspondre à une séroconversion, dans ce cas, un prélèvement ultérieur permettra de suivre l'évolution de ce profil, ou à une hépatite C chronique; dans ce cas, seul le recours à la PCR permet de confirmer celle-ci (Lamoril, 1994; Reid, 1994).

Le génotypage des 72 donneurs positifs en PCR confirme les études françaises publiées (Li, 1991; Bréchet, 1994) : les génotypes 1b et 1a sont prépondérants en France. Le génotypage semble peu utile pour la sécurité transfusionnelle, par contre, il peut être informatif dans les enquêtes transfusionnelles : les souches virales d'un donneur et d'un receveur peuvent être comparées.

Chez les DDS, les résultats obtenus avec la trousse Amplicor VHC sont identiques à ceux obtenus avec notre technique. Toutefois, notre expérience au laboratoire montre que, chez des patients, des discordances Amplicor+, PCR-Labo - ou Amplicor -, PCR-Labo+ ont été observées. Généralement, il s'agit de patients en cours de traitement à l'interféron (IFN).

Dans le suivi du traitement par l'IFN de 10 hémophiles, le génotypage réalisé 2 fois par 2 techniques différentes n'a pas mis en évidence de co-infection. Le principal inconvénient de la trousse LiPA étant, précisément, la difficulté à détecter les co-infections, d'autres techniques (RFLP et amorces spécifiques de type) sont peut-être plus adaptées au génotypage de population à haute probabilité de co-infection.

Notre étude confirme que la détermination du génotype peut être un facteur prédictif de la réussite du traitement IFN. Notre travail, même s'il n'est qu'en cours, a montré qu'il était très difficile de traiter les hémophiles infectés par le génotype 1b. Mais le génotype est-il le seul en cause ? Nos résultats indiquent comme ceux de Yamada que la virémie est un facteur très important (Yamada, 1994). En effet, 3/4 hémophiles infectés par le génotype 1b, présentant les nombres de copies virales les plus élevés n'ont pas répondu au traitement IFN, leurs taux d'ALAT ne semblent pas se normaliser durant la prise de l'IFN. Cependant, 2 parmi les 3 ont présenté une augmentation brutale du taux d'ALAT dès l'arrêt de la prise d'IFN. Tout au long du traitement, l'IFN aurait donc permis une stabilisation du taux d'ALAT. Le 4^{ème} hémophile infecté par le génotype 1b a une virémie très faible (5691 copies). A 6 mois de traitement, l'ARN-VHC est toujours négatif et le taux d'ALAT s'est normalisé.

Il est difficile de corréler le génotype à la réponse IFN pour les génotypes 2a (hémophile DG) et 4 (hémophile LC), un seul sujet ayant été étudié pour chaque génotype. Toutefois, l'hémophile DG, qui présente une virémie relativement faible (184 688 génomes/mL) a parfaitement répondu à l'IFN (ARN-VHC négatif et normalisation du taux d'ALAT), mais nous avons observé une réapparition de l'ARN-VHC à M8, non accompagnée d'une augmentation du taux d'ALAT. Dans ce cas, l'IFN a également permis une stabilisation. La littérature montre que les meilleurs répondeurs sont généralement les génotypes 2a (Yoshioka, 1992; Brouwer, 1993; Chemello, 1994), nous n'apportons aucun élément permettant de confirmer cette hypothèse. Chez l'hémophile LC, le suivi observé est typique d'une absence de réponse au traitement IFN (ARN-VHC +, taux d'ALAT élevé tout au long de l'étude), pourtant, le nombre de copies est l'un des plus faibles (17 532). Une diminution de la virémie a

toutefois été remarquée, mais il est impossible de dire si elle est naturelle ou si elle est le fait du traitement IFN. Il est impossible d'établir une corrélation entre le génotype 4 et la réponse au traitement, il serait nécessaire d'étudier le suivi d'autres patients contaminés par ce génotype.

Les 4 hémophiles infectés par le génotype 3a semblent répondre le mieux au traitement. Dès le 2^{ème} mois, l'ARN-VHC est négatif et les taux d'ALAT se sont normalisés.

La durée de la prise d'IFN pendant 1 an, au lieu de 6 mois généralement, pourrait être un facteur important dans la réussite du traitement. Le cas de l'hémophile HC (génotype 3a) montre que même si le traitement semble avoir réussi au bout de 6 mois, il peut subsister une virémie très faible, non amplifiable (ARN-VHC négatif jusqu'à M6, positif à M9, puis à nouveau négatif à M10). Un traitement plus long de 12 mois pourrait permettre l'éradication totale du virus et augmenter le taux de réussite.

Les résultats obtenus avec la trousse Amplicor VHC Monitor indiquent que la quantification d'un virus à ARN devient possible, mais il est nécessaire d'étudier la reproductibilité, de comparer les résultats sur des sérums et des plasmas et de démontrer la fiabilité des résultats sur des prélèvements congelés depuis longtemps. Le meilleur suivi de quantification que nous ayons présenté est celui de l'hémophile DG, chez lequel nous avons pu observer la réapparition de l'ARN-VHC (rechute à M8). Dans le futur, la quantification associée au génotypage deviendra un facteur prédictif de la réussite du traitement. Une étude de Trépo indique que la réponse sera meilleure si, d'une part le taux d'ARN-VHC est faible et si, d'autre part, il n'y a pas de cirrhose (Trépo, 1994b).

Notre étude ne permet pas de confirmer la plus forte prévalence de cirrhoses et de CHC chez les patients infectés par le génotype 1b (Pozzatto, 1991; Takada, 1993). Il est probable que des études de quantification indiqueront que ces maladies sont également associées aux virémies les plus importantes.

Un autre facteur d'échec pourrait être le délai important entre l'infection et la mise en oeuvre du traitement, dans la mesure où ces patients ont été contaminés avant 1985.

L'apport de la PCR a été très utile pour résoudre les problèmes posés par le manque de spécificité et sensibilité, selon les critères imposés, des WB HTLV. Tous les profils positifs en WB ont été confirmés en PCR. Si un donneur présente une réactivité sur les 3 protéines rgp21, p19 et p24, il doit être considéré infecté par le virus HTLV. Toutefois, la possibilité de l'association de 3 fausses réactions de faible intensité ne peut être écartée. Dans ce cas, une confirmation par PCR est justifiée, surtout si la protéine spécifique de type du WB DBL est absente.

Il a été montré que, parmi les dons réactifs répétables en dépistage, environ 77 % présentent un profil indéterminé en WB. Dans 80 % des cas, il s'agit d'une réactivité sur les protéines internes (p19 et/ou p24). En général, ces profils n'évoluent pas dans le temps et ne correspondent pas à une séroconversion. Notre étude le confirme : en l'absence d'une réactivité sur la rgp21, aucune séropositivité n'a été observée, la PCR étant négative pour les 122 échantillons ayant réagi avec la (les) p19 et/ou p24 seule(s). Ceci confirme l'importante contribution de la rgp21 à l'amélioration de la sensibilité du WB (Lillehoj, 1990). Cette importance est également soulignée par Manns : dans l'étude de profils de séroconversion, la rgp21 apparaît en même temps que la p19 et la p24 et peut parfois être la seule protéine détectée (Manns, 1993).

Cependant, comme Manns et Kaplan, nous montrons que les fausses réactivités sur la rgp21 existent (49 cas dans notre étude) (Manns, 1991; Kaplan, 1993). Ces réactivités sont, soit isolées (9 cas), soit associées à une protéine interne. Aucune réactivité sur les protéines rgp46-I et -II n'a été observée pour ces échantillons indéterminés qui sont négatifs en PCR. L'absence de rgp46-I et -II du WB DBL peut donc orienter vers une séronégativité. A l'opposé, la présence de la rgp46-I peut aider à confirmer une infection HTLV quand les 3 protéines rgp21, p19 et p24 ne sont pas simultanément réactives. En effet, 2 échantillons indéterminés trouvés positifs en PCR présentaient le profil rgp21+, p19+, p24- et une réactivité sur la rgp 46-I. Le troisième échantillon indéterminé, positif en PCR présentait le profil rgp21+, p19+, p24 -, rgp46-I -. L'interrogatoire de la donneuse et le dépistage réalisé sur le sérum de son mari ont révélé que celui-ci était contaminé par le virus HTLV et présentait un profil complet en

WB. Cette information a été très importante pour améliorer la sensibilité de notre technique PCR-HTLV puisqu'elle a révélé que la simple PCR suivie d'un Southern-blot n'était pas assez sensible pour détecter les infections les plus faibles. Nous avons dû recourir à 2 systèmes de "nested-PCR" pour parvenir à amplifier l'ADN de 2 échantillons, le nombre de copies présentes se situant probablement entre 1 à 5 puisque la sensibilité de notre simple PCR était d'environ 5 copies. Tous les échantillons testés jusqu'alors ont été retestés avec les 2 nested-PCR, aucune nouvelle positivité n'a été trouvée. En raison de cette extrême sensibilité, les précautions les plus strictes sont requises pour le manipulateur et les réactifs utilisés. Par ailleurs, tous les échantillons testés en PCR ont été étudiés en parallèle en RIPA au CRTS de Montpellier dans le laboratoire du docteur JM Lemaire. Tous nos résultats sont concordants, à l'exception de ces 2 échantillons positifs uniquement en nested-PCR qui sont négatifs en RIPA, confirmant ainsi que les réponses les plus faibles en anticorps équivalent à un nombre de copies virales très faible et sont les plus difficiles à amplifier en PCR.

La nouvelle version du WB DBL incorporant la rgp21 et les protéines spécifiques des virus HTLV-I (rgp46-I) et HTLV-II (rgp46-II) permet de différencier les sérotypes I et II (Roberts, 1993). Cependant, les fausses négativités sur la rgp46-I existent : 4 cas dans notre étude. De tels échantillons nécessitent la réalisation d'une PCR afin de discriminer entre les 2 types de virus HTLV.

Avec les troupes WB actuelles, la PCR reste utile seulement pour les échantillons présentant le profil en WB, rgp21 associée à la p19 et/ou la p24 et sans réactivité sur les protéines de type du WB DBL : si une réactivité sur l'une des protéines internes est absente, il faut infirmer ou confirmer l'infection par le virus, et si les 3 réactivités sont présentes, il faut déterminer le type du virus. L'étude de Couroucé avait déjà montré que dans 94 % des échantillons positifs les 3 protéines rgp21, p19 et p24 étaient présentes. Notre étude confirme que les critères de positivité proposés par le Groupe Rétrovirus concilient sensibilité et spécificité et sont suffisamment sûrs pour éviter qu'une séropositivité soit annoncée à tort à un donneur.

La grande sensibilité de la PCR permet la mise en évidence de séquences du parvovirus B19 dans des pools de plasma ou des produits issus de ces pools, tels que les facteurs de coagulation. Dans l'étude rétrospective de produits stables, 8 lots de facteur VIII et 1 lot de facteur IX contenaient de l'ADN-parvovirus B19. Un résultat positif ne signifie pas que le virus est infectieux. L'ADN peut être libre et/ou abimé et ne plus être infectieux. Toutefois, de nombreuses études ont montré que le pourcentage d'individus présentant des anticorps anti-B19 était toujours plus important dans le groupe ayant reçu des facteurs de coagulation par rapport au groupe témoin (Bartoloméi Corsi, 1988; Santagostino, 1994; Laurian, 1994). Le fractionnement de Cohn qui est employé pour la fabrication de l'albumine élimine le parvovirus B19 puisque tous les lots étudiés sont négatifs. Le parvovirus B19, virus non enveloppé, thermostable, peu sensible aux procédés actuels d'inactivation virale est un modèle intéressant pour la mise au point et la validation de nouveaux procédés d'élimination virale.

CONCLUSION

Les tests de dépistage et de confirmation ont permis la recherche en systématique de marqueurs viraux et ont contribué à la prévention d'infections virales post-transfusionnelles.

La PCR peut être utilisée pour étudier les dons pour lesquels le dépistage sérologique n'a pas permis de conclure quant à la présence ou non d'un virus (RIBA-3 ou WB-HTLV indéterminés). Elle permet d'apprécier les limites des tests sérologiques et, dans certains cas, de connaître la fréquence des réactions faussement négatives ou positives. Elle contribue, aussi, à l'amélioration des connaissances dans le domaine de la sécurité transfusionnelle. Pour le VHC, notre étude confirme que les RIBA 3.0 indéterminés correspondent à des réactions non spécifiques ou des séquelles sérologiques et que la probabilité d'une séroconversion est très faible. Pour le virus HTLV, les critères de positivité du WB (rgp21+p19+p24) concilient sensibilité et spécificité. Le recours à la PCR n'est justifié que pour les profils rgp21 et (p19 ou p24) ou pour discriminer entre les virus HTLV-I et HTLV-II quand la protéine spécifique de type est absente. Les profils p19 et/ou p24 correspondent à de fausses réactions et ne nécessitent pas de confirmation par PCR

L'utilisation de la PCR en routine demeure difficile en raison de la lourdeur de la procédure. Par contre, l'amplification génique peut être associée aux tests sérologiques qui n'informent que sur le statut anticorps du donneur ou du patient et ne permettent pas toujours de différencier infection passée résolutive et infection en cours.

La PCR est la technique la plus adaptée pour apprécier l'efficacité d'un traitement antiviral en permettant de suivre, par exemple, la disparition de la virémie du VHC. Le génotype 1b est le sous-type prépondérant en France. La quantification de la virémie et la détermination du génotype peuvent être des facteurs prédictifs de la réussite du traitement IFN. En fait, ces 2 informations sont corrélées puisque les virémies les plus importantes sont associées au génotype 1b (moins bons répondeurs) et les virémies les plus faibles sont associées au génotype 3a (bons répondeurs). La détermination du

nombre de copies virales avant l'inclusion dans un protocole de traitement IFN permettra l'adaptation de la thérapie.

La recherche de l'ADN de parvovirus B19 confirme qu'il est possible d'utiliser ce virus connu pour sa résistance aux techniques de stérilisation classiques, pour suivre son élimination physique au cours d'un procédé de préparation d'un dérivé sanguin.

Les techniques d'amplification génique sont en pleine évolution, des trousse de biologie moléculaire basées sur le principe de la PCR apparaissent sur le marché, elles représentent un premier pas vers l'automatisation de la technique. Il est nécessaire de connaître ou d'améliorer leurs sensibilité, spécificité et reproductibilité. Si les améliorations apportées sont satisfaisantes, il conviendra, alors, de réfléchir à l'intérêt de rechercher le génome viral, en complément des tests sérologiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) **Aach** RD, Szmuness E, Mosley JW, et al.. Serum albumine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients. *New Engl J Med* **1981**, 304 : 989-994.
- 2) **Alter** HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible antigen in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1978**, i : 459-463.
- 3) **Alter** HJ, Purcell RH, Holland PV, Alling DW, Koziol DE. The relationship of donor transaminase (ALT) to recipient hepatitis : impact on blood transfusion services. *JAMA* **1981**, 304 : 989-994.
- 4) **Alter** HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New Engl J Med* **1989**, 321 : 1494-1500.
- 5) **Anderson** MJ, Jones MJ, Fisher-Hoch SP, et al. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* **1983**, 1 : 1378.
- 6) **Anderson** LJ. Human parvoviruses. *J Infect Dis* **1990**, 161 : 603-608.
- 7) **Astell** CR, Blundell MC. Sequence of the right hand terminal palindrome of the human parvovirus B19 genome has the potential to form a "stem plus arms" structure. *Nuc Ac Res* **1989**, 17 : 5857.
- 8) **Astell** C. Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication. In : Tijssen P Ed. Boca Raton, FL, CRC Press Inc. *Handbook of parvovirus* **1990**, vol I : 59-79.
- 9) **Baltimore** D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **1970**, 226 : 1209-1211.
- 10) **Barré-Sinoussi** F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at-risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220 : 868-871.
- 11) **Bartolomei Corsi** O, Azzi A, Morfini M, Fanci R, Rossi Ferrini P; Human parvovirus infection in haemophiliacs first infused with treated clotting factor concentrates. *J Med Virol* **1988**, 25 : 165-170.
- 12) **Biggar** RJ, Buskell-Bales Z, Yakshe PN, Caussy D, Gridley G, Seeff L. Antibody to human retroviruses among drug users in three East Coast American cities 1972-1976. *J Infec Dis* **1991**, 163 : 57-63.
- 13) **Blumberg** BS, Gerstley BSJ, Hungerford DA London WT, Sutnick AJ. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Inter Med* **1967**, 66 : 924-931.

- 14) **Bradley DW**, McCaustland, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees : physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small enveloped virus. *Gastroenterology* **1985**, *88* : 773-779.
- 15) **Bréchet C**. Hepatitis C virus genetic variability : clinical implications. In *Hepatitis C virus : New diagnostic tools*. John Libbey Eurotext Eds, Paris **1994** : 1-15.
- 16) **Brettler DB**, Mannucci PM, Gringeri, et al. The low risk of hepatitis C virus transmission among sexual partners of hepatitis C-infected haemophilic males : an international, multicenter study. *Blood* **1992**, *80* : 540-543.
- 17) **Brillanti S**, Garson JA, Take BW, et al. Effect of alpha-interferon therapy on hepatitis C viraemia in community-acquired chronic non-A, non-B hepatitis : a quantitative polymerase chain reaction study. *J Med Virol* **1991**, *34* : 136-141.
- 18) **Brouwer J**, Nevens F, Kleter G, et al. Which hepatitis C patient will benefit from interferon ? Multivariate analysis of 350 patients treated in a Benelux multicentre study. *J Hepatol* **1993**, *18* : suppl 1 : S10.
- 19) **Bukh J**, Purcell RH, Miller RH. At least 12 genotypes of hepatitis C predicted by sequence analysis of hepatitis C viruses of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1993**, *90* : 8234-8238.
- 20) **Busch MP**, Laycock M, Kleinman SH. Accuracy of supplementary serologic testing for human T-lymphotropic virus types I and II in US blood donors. *Blood* **1994**, *83* : 1143-1148.
- 21) **Carriere C**, Boulanger P, Delsert C. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus using the polymerase chain reaction with nested primers. *J Virol Methods* **1993**, *44* : 221-234.
- 22) **Center of Disease Control**. Licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type 1. *MMWR* **736**, **1988**.
- 23) **Cha TA**, Beal E, Irvine B, et al . At least five related but distinct hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**, *89* : 7144-7148.
- 24) **Chan SW**, McOmish F, Holmes EC, et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variant. *J Gen Virol* **1992**, *73* : 1131-1141.
- 25) **Chayama K**, Saitoh S, Arase Y, et al. Effect of interferon administration serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **1991**, *13* : 1040-1043.
- 26) **Chemello L**, Alberti A, Kenneth R, Simmonds P. Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *New Engl J Med* **1994**, *330* : 143.

- 27) **Chiba J**, Ohba H, Matsuura Y, et al. Serodiagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection with an HCV core protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88* : 4641-4645.
- 28) **Choo QL**, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, *244* : 359-362.
- 29) **Choo QL**, Richaman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88* : 2451-2455.
- 30) **Clewley JP**. Detection of human parvovirus using a molecularly cloned probe. *J Med Virol* **1985**, *15* : 173-181.
- 31) **Clewley JP**. Polymerase chain reaction of parvovirus B19 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **1989**, *27* : 2647-2651.
- 32) **Cossart YE**, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* **1975**, *1* : 72-73.
- 33) **Coste J**, Lemaire JM, Voisin S. Les trousse de confirmation et de différenciation. Symposium HTLV, Montpellier, 26-27 mars **1992** : 94-99.
- 34) **Coste J**, Lemaire JM, Courouce AM, The Retrovirus Study group of the French Society of Blood Transfusion, Carnavaggio M. Human T-lymphotropic virus (HTLV) types I and II : seroprevalence among intravenous drug users in Continental France. *AIDS* **1993**, *7* : 440-441.
- 35) **Couroucé AM**, Ferchal F, Morinet F, et al. Parvovirus (SPLV) et antigène Aurillac. Etude de 18 observations. *Rev Franc Transf Immuno Hematol* **1984**, *27* : 5-19.
- 36) **Couroucé AM**, Pillonel J, Lemaire JM, Maniez M, Brunel JB. Seroepidemiology of HTLV-I/II in universal screening of blood donations in France. *Aids* **1993**, *7* : 841-847.
- 37) **Defer C**, Agut H, Garbarg-Chenon A, et al. Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA. *AIDS* **1992**, *6* : 559-663.
- 38) **Di Bisceglie AM**, Shindo M, Fong TL, et al. A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* **1992**, *16* : 649-654.
- 39) **Dusheiko G**, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus : an investidation of type specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* **1994**, *19* : 13-18.
- 40) **Enomoto N**, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, *170* : 1021-1025.
- 41) **Esteban J**, Esteban R, Viladomia Z, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk group in Spain. *Lancet* **1989**, *2* : 1004-1006.

- 42) **Esteban** JI, Gonzales A, Hernandez JM, et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *New Engl J Med* **1990**, 323 : 1107-1112.
- 43) **Esteban** JI, Lopez-Talavera JC, Genesca J, et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Inter Med* **1991**, 115 : 443-449.
- 44) **Farci** P, Alter JH, Wong D, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *New Engl J Med* **1991**, 325 : 98-104.
- 45) **Feinstone** SM, Alter HJ, Dienes HP, et al. Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. *J Inf Dis* **1981**, 144 : 588-598.
- 46) **Feinstone** SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infection and Immunity* **1983**, 41 : 816-821.
- 47) **Feinstone** SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis A or B. *New Engl J Med* **1985**, 292 : 767-770.
- 48) **French Study Group for the Standardization of Hepatitis C virus PCR**. Improvement of hepatitis C virus RNA polymerase chain reaction through a multicentre quality control study. *J Virol Methods* **1994**, 49 : 79-88.
- 49) **Frickhofen** N, Young NS. A rapid method of sample preparation for detection of DNA viruses in human serum by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **1991**, 35 : 65-72.
- 50) **Gallo** RC, Sarin PS, Gelmann EP, et al. Isolation of a human T-cell leukemia-lymphoma virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220 : 865-868.
- 51) **Gessain** A, Barin F, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **1985**, ii : 4407-410.
- 52) **Gocke** DJ, Greenberg HB, Harvey NB. Correlation of Australia antigen with post-transfusion hepatitis. *JAMA* **1970**, 212 : 877-879.
- 53) **Greenberg** SJ, Ehrlich GD, Abbott MA, et al. Detection of sequences homologous to human retroviral DNA in multiple sclerosis by gene amplification. *Proc Nat Acad Sci USA* **1989**, 86 : 2878-2882.
- 54) **Hagiwara** H, Hayashi N, Mita E, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Hepatotlogy* **1992**, 115 : 37-41.
- 55) **Hall** WW, Kabo T, Ijichi S, Takahashi H, Zhu SW. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type II : emergence of an important newly recognized pathogen. *Seminars in Virology* **1994**, 5 : 165-178.

- 56) **Han JH**, Shyamula V, Richman KH, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA : identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88* : 1711-1715.
- 57) **He LF**, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determination of the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Inf Dis* **1987**, *155* : 636-640.
- 58) **Hijikata M**, Kato N, Ootsutama M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Comm* **1991a**, *175* : 220-228.
- 59) **Hijikata M**, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative non structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1991a**, *88* : 5547-5551.
- 60) **Hinuma Y**, Nagata K, Hanooka M, et al. Adult T-cell leukemia : antigen in a ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* **1981**, *78* : 6476-6480.
- 61) **Holland PV**, Alter HJ, Purcell RH, Walsh JJ, Morrow AG, Schmidt PJ. The infectivity of blood containing the Australia antigen. In : Prier JE, Friedman H (Edts). *Australia antigen*. University Press, Baltimore **1973** : 191-203.
- 62) **Hollinger FB**, Gitrick GL, Aach RD, et al. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees : a projet of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* **1978** : 60-68.
- 63) **Hoofnagle JH**, Gerety RJ, Ni L. Antibody to hepatitis B core antigen : a sensitive indicator of hepatitis B virus replication. *New Engl J Med* **1974**, *290* : 1136-1340.
- 64) **Hoofnagle JH**, Di Bisceglie AM, Shndo M. Antiviral therapy of hepatitis C - Present and future. *J Hepatol* **1993**, *17* : S130.
- 65) **Houghton M**, Choo QL, Kuo G, et al. European patent application 88 **1989**, 310, 922 : 5. Publication 318.216.
- 66) **Houghton M**, Weiner A, Han J, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses. implications for the diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* **1991**, *14* : 381-388.
- 67) **Huang CS**, Ho MS, Yang CS, Lee CL, Tan CA. Hepatitis C markers in Hemodialysis patients. *J Clin. Microbiol.* **1993**, *31* : 1764-1769.
- 68) **Innis MA**, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In *PCR protocols : a guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ White TJ Eds, Academic Press **1990**, 337-347.

- 69) **Kalyanamaran VS**, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **1982a**, 218 : 571-573.
- 70) **Kalyanamaran VS**, Sarngadharan MG, Nakao Y, et al. Natural antibodies to the structural protein (p24) of human T-cell leukemia (lymphoma) retrovirus found in the sera of leukemic patients in Japan. *Proc Natl Acad Sci USA* **1982b**, 79 : 1653-1657.
- 71) **Kalyanamaran VS**, Jarvis-Morar M, Sarngadharan MG, Gallo RC. Immunological characterization of the low molecular weight gag gene proteins p19 and p15 of HTLV and demonstration of human natural antibodies to them. *Virology* **1984**, 132 : 61-70.
- 72) **Kaplan JE**, Khabbaz RF. The epidemiology of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *Rev Med Virol* **1993**, 3 : 137-148.
- 73) **Knudsen F**, Wantzin P, Rasmussen K, et al. Hepatitis C in dialysis patients : Relationship to blood transfusions, dialysis and liver disease. *Kidney Int* **1993**, 43 : 1353-1356.
- 74) **Kobayashi Y**, Watanabe S, Konishi M, et al. Quantitation and typing of serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-beta. *Hepatology* **1993**, 18 : 1093-1102.
- 75) **Kohara M**, Tsukiyama-Kohara K, Maki N, et al. Expression and characterization of glycoprotein gp35 of hepatitis C virus using recombinant vaccinia virus. *J Gen Virol* **1992**, 73 : 2313-2318.
- 76) **Koziol DE**, Holland PV, Alling DW, et al. Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in blood. *Annals Int Med* **1986**, 184 : 488-495.
- 77) **Kremsdorf D**, Porchon C, Kim JP, Reyes GR, Brechot C. Partial nucleotide sequence analysis of a french hepatitis C virus : implications for HCV genetic variability in the E2/NS1 protein. *J Gen Virol* **1991**, 72 : 2557-2561.
- 78) **Krugman S**, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical epidemiological types of infection. *JAMA* **1967**, 200 : 365-373.
- 79) **Kudesia G**, Chapman S, Makris M, Preston FE. Need for second-generation anti-HCV testing in haemophilia. *Lancet* **1992**, 339 : 362-364.
- 80) **Kuo G**, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **1989**, 244 : 362-364.
- 81) **Kurosaki M**, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology* **1993**, 18 : 1319-1325.

- 82) **Kwok S**, Kellogg D, Ehrlich G, et al. Characterization of a sequence of Human T-cell leukemia virus type I from a patient with chronic progressive myelopathy. *J Inf Dis* **1988**, 158 : 1193-1197.
- 83) **Kwok S**, Lipka JJ, McKinney N, et al. Low incidence of HTLV infections in random blood donors with indeterminate western-blot patterns. *Transfusion* **1990**, 30 : 491-494.
- 84) **Lal RB**, Brodine S, Kazure J, Katongs EM, Yamagihara R, Roberts C. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and II infections. *J Clin Microbiol* **1992**, 30 : 296-299.
- 85) **Lamoril J**, Lunel F, Laurent-Puyg P, et al. Indeterminate third-generation immunoblot assay in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **1994**, 21 : 133-136.
- 86) **Laurian Y**, Blan A, Delaney SR, Allain JP. All exposed hemophiliacs have markers of HCV. *Vox Sang* **1992**, 62 : 55-56.
- 87) **Laurian Y**, Parquet A, Dussaix E, Chalvon A, d'Oiron R, Tchernia G. Facteur VIII et contamination par le parvovirus B19. Premier Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Angers, 8-10 juin **1994**, O-9-7 : 131.
- 88) **Lee HH**, Swanson P, Rosenblatt JD, et al. *Lancet* **1991** : 337, 1435-1439.
- 89) **Lee SD**, Hwang SJ, Lu RH, Lai KH, Tsai YT. Antibodies to hepatitis C virus in prospectively follow-up patients with posttransfusion hepatitis. *J Inf Dis* **1991**, 163 : 1354-1357.
- 90) **Lee CH**, Cheng C, Wang J, Lumeng L. Identification of hepatitis C viruses with a non-conserved sequence of the 5' untranslated region. *J Clin Microbiol* **1992** : 1602-1604.
- 91) **Lefrere JJ**, Mariotti M, Thauvin M. B19 parvovirus in solvent/detergent-treated anti-haemophilia concentrates. *Lancet* **1994**, 343 : 211-212.
- 92) **Lelie N**, Cuypers T, Zaaijer H, Reesink. Replacement of RIBA-2 by RIBA-3 improves confirmation of HCV-infection. XXIIIrd Congress of the International Society of Blood Transfusion, Amsterdam, July 4-8, **1994**. Abstract 0030.
- 93) **Levine PH**, McVerry BA, Attock B, Dormandy KM. Health of the intensively treated hemophiliac with special reference to abnormal liver chemistries and splenomegaly. *Blood* **1977**, 50 : 1-9.
- 94) **Li JS**, Tong SP, Vivitsky L, Lepot D, Trepo C. Two french genotypes of hepatitis C virus : homology of the predominant genotype with the prototype american strain. *Gene* **1991**, 105 : 165-172.

- 95) **Lillehoj** EP, Alexander SS, Dubrule C et al. Development and evaluation of human T-cell leukemia virus type I serologic confirmatory assay incorporating a recombinant envelope polypeptide. *J Clin Microbiol* **1990**, 2653-2658.
- 96) **Lim** SG, Lee CA, Charman H, Tilsed G, Griffiths PD, Kernoff PBA. Hepatitis C antibody assay in a long term study of haemophiliacs. *Br J Haematol* **1991**, 78 : 398-402.
- 97) **Lipka** JJ, Young KKY, Kwok SY, Reyes GR, Sninsky JJ, Fong SKH. Significance of human T-lymphotropic virus type I indeterminate serological findings among healthy individuals. *Vox Sang* **1991**, 61 : 171-176.
- 98) **Lipka** JJ, Miyoshi I, Hadlock KG. Segregation of human T-cell lymphotropic virus types I and II infections by antibody reactivity to unique viral epitopes. *J Infec Dis* **1992**, 165 : 268-272.
- 99) **Mac Callum** FO, Bauer DJ. Homologous serum jaundice transmission experiments with human volunteers. *Lancet* **1944**, 1 : 622-627.
- 100) **Manns** A, Murphy EL, Wilks R, et al. Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. *Blood* **1991**, 77 : 869-905.
- 101) **Mannuci** PM, Capitanio A, Del Ninno E, Colombo M, Pareti F, Ruggeri ZM. Asymptomatic liver disease in haemophiliacs. *J Clin Pathol* **1975**, 28 : 620-624.
- 102) **Marcellin** P, Boyer N, Giostra E, et al. Recombinant human alpha-interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis : a multicenter randomized controlled trial from France. *Hepatology* **1991**, 13 : 393-397.
- 103) **Martin** P, Denis F. Diagnostic virologique des infections à parvovirus B19. *L'Eurobiologiste* **1993**, 206 : 251-264.
- 104) **Matsuura** Y, Miyamura T. The molecular biology of hepatitis C virus. *Seminars in Virology* **1993**, 4 : 297-304.
- 105) **Mc Farlane** IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergoni D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis : pathogenic factors or false positive results ? *Lancet* **1990**, 335 : 754-757.
- 106) **Mc Omish** F, Chan SW, Dow BC, et al. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors : Investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* **1993a**, 33 : 7-13.
- 107) **Mc Omish** F, Yap PL, Jordan A, Hart H, Cohen BJ, Simmonds P. Detection of parvovirus B19 in donated blood : a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **1993b**, 31 : 323-328.

- 108) **McOmish** F, Yap PL, Daw BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors : an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* **1994**, 32 : 884-892.
- 109) **Miller** RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, 87 : 2057-2061.
- 110) **Miyamura** T, Saito I, Katayama T, et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA : application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, 87 : 983-987.
- 111) **Miyuchi** I, Kubonishi I, Somida M, et al. A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann* **1980**, 71 : 155-156.
- 112) **Morgan** DA, Ruscetti FW, Gallo RC. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **1976**, 193 : 1007-1008.
- 113) **Mori** S, Kato N, Yagyu A, et al. A new type of hepatitis c virus in patients in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 183 : 334-342.
- 114) **Morinet** F, Tratschin JD, Perol Y, Sieg G. Comparison of 17 isolates of the human parvovirus B19 by restriction enzyme analysis. *Arch Virol* **1986**, 90 : 165-172.
- 115) **Morinet** F, Tchernia G. Le parvovirus B19 et l'hématopoïèse. *Médecine/Sciences* **1991**, 7 : 127-137.
- 116) **Morinet** F. Infection virale à parvovirus B19. *Path Biol* **1992**, 40 : 621-622.
- 117) **Mullis** KB, Falloona FB, Scharf S, Saiki RK, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **1986**, 51 : 263-273.
- 118) **Nakao** T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C genomes by restriction length polymorphism. *J Gen Virol* **1991**, 72 : 2105-2112.
- 119) **Nelson** KE, Donahue JC, Munoz A, et al. The risk of transmission of hepatitis C virus (HCV) and effectiveness of donor screening. 5th National Forum on AIDS, hepatitis and other blood-borne diseases, Atlanta **1992**, GA. p70.
- 120) **Novati** R, Thiers V, d'Arminio A, et al. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested-polymerase chain reaction. *J Inf Dis* **1992**, 165 : 595-596.
- 121) **Ohto** H, Souzuke T, Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *New Engl J Med* **1994**, 330 : 744-750.

- 122) **Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al.** Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'noncoding region. *Jpn Exp Med* **1990**, 60 : 215-222.
- 123) **Okamoto H, Okada S, Sugiyama, et al.** The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* **1991**, 60 : 167-177.
- 124) **Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, et al.** Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type specific primers : application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* **1992b**, 73 : 673-679.
- 125) **Okamoto H, Kojima M, Okada SI, et al.** Genetic drift of hepatitis C during an 8.2 year infection in a chimpanzee : variability and stability. *Virology* **1992a**, 190 : 894-899.
- 126) **Okamoto H, Tokita H, Sakamoto M, et al.** Characterization of the genomic sequence of type V (or 3a) hepatitis C virus isolates and PCR primers for specific detection. *J Gen Virol* **1993**, 74 : 2385-2390.
- 127) **Okochi KS, Murakami S, Ninomuya K, et al.** Australia antigen, transfusion and hepatitis. *Vox Sang* **1970**, 18 : 289-300.
- 128) **Okochi K, Sato H, Hinuma Y.** A retrospective study on transmission on adult T-cell leukemia virus by blood transfusion : seroconversion in recipients. *Vox Sang* **1984**, 46 : 245-253.
- 129) **Osame M, Usuku K, Izumo S et al :** HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1986**, i : 1031-1032.
- 130) **Osame M, Janssen R, Kubota H, et al.** Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan : association with blood transfusion. *Ann Neurol* **1990**, 28 : 50-56.
- 131) **Pappas SC, Hoofnagle JH, Young N, Straus SE, Jones EA.** Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis in acyclovir; a pilot trial. *J Med Virol* **1985**, 15 : 1-9.
- 132) **Patou G, Pillay D, Mynt S, Pattison J.** Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. *J Clin Microbiol* **1993**, 31 : 540-546.
- 133) **Pattison JR, Jones SE, Hodgson, et al.** Parvovirus infection and hypoplastic crisis in sickle cell anaemia. *Lancet* **1981**, 1 : 664-665.
- 134) **Paver WK, Carl EO, Ashley CR, Clarke SKR.** A small virus in human faeces. *Lancet* **1973**, 1, 7697 : 237-239.
- 135) **Pistello M, Ceccherini-Nelli L, Cecconi N, Bendinelli M, Panicucci.** Hepatitis C virus prevalence in Italian haemophiliacs injected with virus-inactivated concentrates : five year follow-up and correlation with antibodies to other viruses. *J Med Virol* **1991**, 33 : 43-46.

- 136) **Poiesz BJ**, Ruscetti FW, Gardan AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**, 77 : 7415-7419.
- 137) **Pozzatto G**, Moretti M, Franzin F, et al. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* **1991**, 338 : 509.
- 138) **Pozzatto G**, Moretti M, Franzin F, et al. The presence of "Japanese type" of NS4 region is associated to more severe liver disease. *J Hepatol* **1992**, 16 : S3.
- 139) **Prayoonwiwat N**, Pease LR, Rodriguez M. Human T-cell lymphotropic virus type I sequences detected by nested polymerase chain reaction are not associated with multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* **1991**, 66 : 665-680.
- 140) **Realdi G**, Alberti A, Rugge M, et al. Long term follow-up of acute and chronic non-A, non-B transfusion hepatitis. Evidence of progression to liver cirrhosis. *Gut* **1982**, 23 : 270-275.
- 141) **Reid JD**; Detection of HCV-RNA in the blood donor population of Yorkshire. *Br J Biomed Sci* **1994**, 51 : 215-220.
- 142) **Robert-Guroff M**, Ruscetti FW, Posner LE, Poiesz BJ, Gallo RC. Detection of the human T-cell lymphoma virus p19 in cells of some patients with cutaneous T-cell lymphoma and leukemia using a monoclonal antibody. *J Exp Med* **1981**, 154 : 1957-1964.
- 143) **Roberts BD**, Fong SKH, Lipka JJ et al. Evaluation of an immunoblot assay for serological confirmation and differentiation of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *J Clin Microbiol* **1993**, 31 : 260-264.
- 144) **Rosenblatt JD**, Golde DW, Wachsman W, et al. A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy cell leukemia. *N Engl J Med* **1986**, 315 : 372-377.
- 145) **Saiki RK**, Scharf S, Falloona R, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **1985**, 230 : 1350-1354.
- 146) **Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**, 239 : 487-491.
- 147) **Salimans MMM**, Holsappel S, van de Rijke FM, Jiwa NM, Raap AK, Weiland HT. Rapid detection of human parvovirus B19 DNA by dot-hybridization assay for detection of human parvovirus B19 DNA in human sera. *J Clin Microbiol* **1989**, 29 : 2047-2050.
- 148) **Santagostino E**, Mannucci E, Gringeri A, Azzi A, Morfini M. Eliminating parvovirus B19 from blood products. *Lancet* **1994**, 343 : 798.

- 149) **Scharf** SJ, Long CM, Erlich HA. Sequence analysis of the HLA-DQ and HLA-DR loci from three pemphigus vulgaris patients. *Hum Immunol* **1988**, 239 : 487-491.
- 150) **Schmilowitz-Weiss** H, Levy M, Thompson N, Dusheiko G : Viral markers in the treatment of hepatitis B and C. *Gut* **1993** : S26-S35.
- 151) **Schwartz** TF, Roggendorf M, Hottenträger, et al. Human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Lancet* **1988**, ii : 566-567.
- 152) **Seiki** M, Hattori S, Hirayama Y Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus : complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **1983**, 80 : 3618-3622.
- 153) **Serjeant** GR, Mason K, Topley JM, et al. Outbreak of aplastic crisis in sickle cell anemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* **1981**, ii : 595-598.
- 154) **Shade** RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol* **1986**, 58 : 921-936.
- 155) **Shimotohno** K, Takahashi Y, Shimizu N, et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II : an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **1985**, 82 : 3101-3105.
- 156) **Simmonds** P, Zhang LQ, Watson HG, et al. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs and drug users. *Lancet* **1990**, 336 : 1469-1472.
- 157) **Simmonds** P, McOmish F, Yap PL, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus : identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* **1993a**, 74 : 661-668.
- 158) **Simmonds** P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a serie of subtypes by phylogenetic tree analysis. *J Gen Virol* **1993b**, 74 : 2391-2399.
- 159) **Simmonds** P, Holmes EC Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* **1993c**, 74 : 2391-2399.
- 160) **Simmonds** P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* **1994**, 19 : 1321-1324.
- 161) **Soriano** V, Tor J, Monzon M, Gruas JM, Clotet B, Ribas-Mundo M. HTLV-II in Spain. *Lancet* **1990**, 336 : 627-627.

- 162) **Stevens CE**, Aach Rd, Hollinger FB, et al. Hepatitis B virus antibody in blood donors and the occurrence of non-A, non-B hepatitis in transfusion recipients : an analysis of the transfusion transmitted viruses study. *Annals Int Med* **1984**, 104 : 488-495.
- 163) **Stuyver L**, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* **1993**, 74 : 1093-1102.
- 164) **Sugg U**, Schenzle D, Hess G. Antibodies to hepatitis B core in blood donors screened for alanine aminotransferase level and hepatitis non-A, non-B in recipients. *Transfusion* **1988**, 28 : 386-388.
- 165) **Takada N** Takase S, Takada A, Date T. HCV genotypes in different countries. *Lancet* **1992**, 339 : 808.
- 166) **Takada N**, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* **1993**, 17 : 277-283.
- 167) **Takatsuki K**, Uchiyama T, Sagawa K, Yodoi J. Adult T-cell leukemia in Japan. In : *Topics in Hematology*. Seno S, Takaku F, Irino S Eds. Excerpta Medica, Amsterdam **1977**, 73-77.
- 168) **Tanaka E**, Kiyosawa K, Sodeyama, et al. Significance of antibody to hepatitis C virus in Japanese patients with viral hepatitis : relationship between anti-HCV antibody and the prognosis of non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *J Med Virol* **1991**, 33 : 117-122.
- 169) **Temin HM**, Mizutani M. RNA-directed DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **1970**, 226 : 1211-1213.
- 170) **Thaler MM**, Park CK, Landers DV, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* **1991**, 338 : 17-18.
- 171) **Thelu MA**, Boulet V, Cohard M, Seigneurin JM, Zarski JP. Viremia, a more interesting factor than HCV genotype in chronic hepatitis C for predictive response to alpha-interferon therapy. In *Hepatitis C virus : new diagnostic tools*. John Libbey Eurotext Eds, Paris **1994**, 103-106.
- 172) **Trepo C**, Alonso JS, Li JS, Qu D, Laurent F, Vitvitski L. Limites du diagnostic immunosérologique et moléculaire de l'hépatite C. *Nucl. Med. Biol.* **1994a**, 21 : 419-431.
- 173) **Trepo C**, Haber Setzer F, Bailly F, Berby F, Ricahrd L, Berthillon P, Vivitski L. Interferon therapy for hepatitis C. *Antiviral research* **1994b**, 24 : 155-163.
- 174) **Ulrich PP**, Romeo JM, Lane PK, Kelly I, Daniel LJ, Vyas GN. Detection, semiquantitation and genetic variation in hepatitis virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase. *J Clin Invest* **1990**, 86 : 1609-1614.

- 175) **Van der Poel CL**, Reesink HW, Lelie PN, et al. Anti-HCV and transaminase testing of blood donors. *Lancet* **1990**, 336 : 187-188.
- 176) **Van der Poel CL**, Cuypers H, Reesink H, et al. Risk factors in hepatitis C virus-infected blood donors. *Transfusion* **1991**, 31 : 777-779.
- 177) **Van der Poel CL**, Cuypers H, Reesink HW et al. : Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* **1991**, 337 : 317-319.
- 178) **Van der Poel CL**, Reesink HW, Mauser-Bunschoten EP, et al. Prevalence of anti-HCV antibodies confirmed by recombinant immunoblot in different population subsets in The Netherlands. *Vox Sang* **1991**, 61 : 30-36.
- 179) **Van der Poel CL**, Vrieling H, et al. Detection of anti-HCV seroconversion with 3rd generation assays. XXIIIrd Congress of the International Society of Blood Transfusion, Amsterdam, July 4-8, **1994**. Abstract 0476.
- 180) **Van Doorn LJ**, Kleter B, Stuyver L et al. Analysis of hepatitis C virus genotypes by a line probe assay and correlation with antibody profiles. *J Hepatol* **1994**, 21 : 122-129.
- 181) **Varagona G**, Brown D, Kibbler H, et al. Response, relapse and re-treatment rates viraemia in chronic hepatitis C treated with alpha-2b-interferon. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1991**, 4 : 710-714.
- 182) **Verdier M**. Transmission mère-enfant du virus HTLV-I. Modèles animaux de transmission verticale. Symposium HTLV, Montpellier, 26-27 mars **1992** : 143-150.
- 183) **Vrieling H**, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer H, Lelie PN, Cuypers HTM. Evaluation of three anti-HCV ELISAs : Ortho 2.0, Ortho 2.5 et Ortho 3.0. XXIIIrd Congress of the International Society of Blood transfusion, Amsterdam, July 4-8, **1994**. Abstract 0467.
- 184) **Weiner AJ**, Brauer MJ, Rosenblatt J, et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **1990**, 180 : 848-848.
- 185) **Wejstal R**, Widell A, Mansson AS, Hermodsson S, Norkrans G. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Ann Inter Med* **1992**, 117 : 887.
- 186) **White DG**, Mortimer PP, Blake DR, Woolf AD, Cohen BJ, Bacon PA. Human parvovirus arthropathy. *Lancet* **1985**, i : 419-421.
- 187) **Williams MD**, Cohen BJ, Beddall AC, Pain KJ, Mortimer PP, Hill FGH. Transmission of human parvovirus B19 by coagulation factor concentrates. *Vox Sang* **1990**, 58 : 177-181.
- 188) **World Health Organization**. Proposed WHO criteria for interpreting results from western-blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epidemiol Rec* **1990**, 65 : 281-288.

- 189) **Xu LZ**, Larzul D, Delaporte E, Brechot C, Kremsdorf D. Hepatitis C virus genotype 4 is highly prevalent in central Africa (Gabon). *J Gen Virol* **1994**, 75 : 2393-2398.
- 190) **Yamada M**, Kakumu K, Yoshioka K, et al. Hepatitis C virus genotypes are not responsible for development of serious liver disease. *Digest Dis and Sci* **1994**, 39 : 234-239.
- 191) **Yoshioka K**, Kakumu S, Wakita T, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy : relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **1992**, 16 : 293-299.
- 192) **Zaaijer HL**, Hendrik TM, Cuypers HTM, et al. New immunoblot resolves indeterminate results for antibody to hepatitis C virus. *Transfusion* **1994**, 34 : 184.
- 193) **Zella D**, Mori L, Sala M, et al. HTLV-II infection in Italian drug abusers. *Lancet* **1990**, 336 : 575-576.

ANNEXES

ANNEXE 1

Tampon TAE 50x (pour 100 mL)

-TRIS (Bioprobe)	:	24,2 g
-EDTA (Bioprobe)	:	1,85 g
-Acide acétique (Merck)	:	5,7 mL
-QSP (Quantité Suffisante Pour) 100 mL		

Aliquoter, autoclaver

Tampon Kinase 10x pour T4 Appligène

-TRIS-HCl 1M pH 7,6	:	5 mL
-DTT 1M	:	0,5 mL
-MgCl ₂ 1M	:	1 mL
-H ₂ O	:	3,5 mL

Aliquoter et congeler à -20°C

Tampon SSC 20x

-NaCl 3 M	:	175,3 g/L
-Citrate 0,3 M	:	88,2 g/L

Ajuster pH avec HCl, autoclaver.

Denhardt 50x

-Ficoll (Sigma) 5 g	
-BSA 5 g	
-Polyvinylpyrrolidone (Sigma) 5 g	
-QSP 500 mL	

Filtrer, Aliquoter.

Tampon TE 10-1

-TRIS, pH 8; 1 M	:	10 mL
-EDTA 0,5M	:	2 mL
-H ₂ O	:	QSP 1000 mL

Aliquoter, autoclaver

Tampon de lyse

-TRIS-HCl, pH 8	:	10 mM
-NaCl	:	0,4 M
-EDTA	:	2 mM
-Triton	:	0,5 %

ANNEXE 2

VHC

1) Couple externe SF1-SR1, couple interne SF2-SR2 (Région 5'NC)

	Nom	Séquence (5'-3')	Position
Sens	SF1	GCC ATG GCG TTA GTA TGA G	(-259/-240)
Antisens	SR1	TGC ACG GTC TAC GAG ACC TC	(-20/-2)
Sens	SF2	GTG CAG CCT CCA GGA CCC CC	(-235/-215)
Antisens	SR2	GGG CAC TCG CAA GCA CCC	(-45/-25)

2) Couple externe 32-36, couple interne 33-48 (Région 5'NC)

Sens	32	CTG.TGA.GGA ACT ACT GTC TT	(-298,-279)
Antisens	36	AAC ACT ACT CGG CTA GCA GT	(-97, -78)
Sens	33	TTC CAG GCA GAA AGC GTC AG	(-279, -261)
Antisens	48	GTT GAT CCA AGA AAG GAC CC	(-155,-136)

HTLV

1) SK43-SK44 / SK45 (Région tax - HTLV-I / HTLV-II)

Sens	SK43	CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT	7358-7377 (I) 7248-7267 (II)
Antisens	SK44	GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG	7496-7516 (I) 7386-7406 (II)
Sonde	SK45	ACG CCC TACT GGC CAC CTG TCC AGA GCA TCA GCT CAC CTG	7447-7468

2) SK110-111 / SK112 (HTLV-I) ou SK188 (HTLV-II) (Région pol)

Sens	SK110	CCC TAC AAT CCC ACC AGC TCA G	4757-4778 (I) 4735-4756 (II)
Antisens	SK111	GTGGTGGATTTGCCATCGGGTTTT	4919-4942 (I) 4897-4920 (II)
Sonde	SK112	GTA CTT TAC TGA CAA ACC CGA CCT AC	4825-4850 (I)
Sonde	SK188	TCA TGA ACC CCA GTG GTA A	4880-4898 (II)

3) SK54-SK55 / SK56 (Région pol - HTLV-I)

Sens	SK54	CTT CAC AGT CTC TAC TGT GC	3365-3384
Antisens	SK55	CGG CAG TTC TGT GAC AGG G	3465-3483
Sonde	SK56	CCG CAG CTG CAC TAA TGA TTG AAC TTG AGA AGG AT	3426-3460

4) SK58-SK59 / SK60 (Région pol - HTLV-II)

Sens	SK58	ATC TAC CTC CAC CAT GTC CG	4198-4217
Antisens	SK59	TCA GGG GAA CAA GGG GAG CT	4281-4300
Sonde	SK60	TAA GGG AGT CTG TGT ATT CAT TGA AGG TGG AAA TTG GGT C	4237-4276

5) Couple externe P11-P12, couple externe P21-P22 (Région pol - HTLV-I)

Sens	P11	CCC GGG CCC CCT GAC TTG TC	2802-2821
Antisens	P12	CTG CAG GAT ATG GGC CAG CT	3019-3038
Sens	P21	AGG ATC CCA ACC ACA CTA GCC CAC	2823-2846
Antisens	P22	TTG GAT CCG GGT GGG ACT ATT TTT	2991-3014

6) Couple externe SG221-SG227, couple interne C1-C2 (Région env - HTLV-I)

Sens	SG221	CTC GAG CCC TCT ATA CCA TG	5799-5815
Antisens	SG227	GGA TCC TAG GGT GGG AAC AG	6106-6125
Sens	C1	TTGTCCAGTTAACCTACAA	5817-5836
Antisens	C2	GCA GGA TGA GGG AGT TAT GA	6046-6065

HLA-DQ Alpha

Sens	GH26	GTG CTG CAG GTG TAA ACT TGT ACC AG
Antisens	GH27	CAC GGA TCC GGT AGC AGC GGT AGA GTT G

PARVOVIRUS

1) 376-377 / 378 (Région VP2)

Sens	376	GTG CTT ACC TGT CTG GAT TGC	2408-2428
Antisens	377	GCT AAC TTG CCC AGG CTT GT	2790-2809
Sonde	378	AGG TTA CTG GAA CAG ACT TAG AGC TTA TTC AAA TA	2529-2563

2) B19-1; B19-2 / B19-3 (Région VP2)

Sens	B19-1	TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC	3131-3151
Antisens	B19-2	CTA AGC GGG ATC CGT ATA AG	3889-3908
Sonde	B19-3	GCT TTA AAT TTA TTT TTT TCA	3404-3424

ANNEXE 3

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ORALES

Publications

Defer C, Belin MT, Caillet-Boudin ML, Boulanger P. Human adenovirus-host cell interactions : comparative study with members of subgroups B and C. **J Virol** 1990, **64** : 3661-3673.

Defer C, Agut H, Garbarg-Chenon A, et al. Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA. **AIDS** 1992, **6** : 659-663.

Defer C, Maniez-Montreuil M. PCR VIH-1 in situ : une autre méthode de quantification de la charge virale? **Transcriptase** 1992, **10** : 10-11.

Lamoril J, Lunel F, Laurent-Puyg P, **Defer C**, et al. Indeterminate third-generation immunoblot assay in hepatitis C virus infection. **J Hepatol** 1994, **21** : 133-136.

Defer C and the French Study Group for the Standardization of Hepatitis C virus PCR. Improvement of hepatitis C virus RNA polymerase chain reaction through a multicentre quality control study. **J Virol Methods** 1994, **49** : 79-88.

Defer C, Coste J, Descamps F et al. Contribution of polymerase chain reaction and the radioimmunoprecipitation assay in the confirmation of HTLV infection in french blood donors. **Transfusion**, soumis pour publication.

Communications orales

Defer C, Lepot I, Maniez M. Etude de l'infection VHC par PCR et répartition des génotypes chez les donneurs de sang. Ier Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Angers, 8-10 juin 1994. Abstract 9-3 : 127.

Defer C, Couroucé AM, Descamps F, Maniez M, Lemaire JM. PCR analysis of HTLV-infection in French blood donors. XXIIIrd Congress of the International Society of Blood Transfusion, Amsterdam, 2-8 july 1994. Abstract 92 : 17.

Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA

Christine Defer, Henri Agut*, Antoine Garbarg-Chenon†, Maurice Moncany‡, Frederic Morinet§, Dominique Vignon††, Martine Mariotti‡‡ and Jean-Jacques Lefrère‡‡

Objective: Seven French laboratories tested the specificity and sensitivity of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of HIV-1 DNA.

Methods: Following its own PCR protocols, each laboratory independently tested blind two panels of 20 coded peripheral blood mononuclear cell samples collected from HIV-1-seropositive individuals and from HIV-1-seronegative individuals at high or low risk of HIV infection. For the first panel, laboratories were free to select type and number of primers; for the second, all were required to use the two primer pairs Pol 3/4 and MMy 9/10' (Nef 1).

Results: False-positive and false-negative results were observed in all laboratories (concordance with serology ranged from 40 to 100%). In addition, the number of positive PCR results did not differ significantly between high- and low-risk seronegatives. The use of crude cell lysates in DNA preparation produced the same PCR results as phenol-extracted DNA. Discrepancies between laboratories indicated that factors other than primer pairs contributed strongly to laboratory variability.

Conclusions: Our results emphasize the importance of both positive and negative controls in PCR and demonstrate the value of multicentre PCR quality control.

AIDS 1992, 6:659-663

Keywords: Polymerase chain reaction, HIV-1 DNA.

Introduction

Polymerase chain reaction (PCR) is a highly sensitive technique for demonstrating specific DNA fragments [1], and has been used successfully to detect HIV-1 DNA [2]. However, because of its high sensitivity, PCR can generate false-positive results, usually due to laboratory contamination [3]. Technical problems in PCR procedure can also generate false-negative results. Strict guidelines on sample preparation, PCR conditions and evidence of amplified products are therefore required, and PCR procedures should generally be standardized among laboratories.

Seven French laboratories, with extensive experience in PCR detection of HIV DNA, initiated a quality-con-

trol study to assess the specificity and sensitivity of their PCR procedure. The aim was to determine optimal PCR conditions for the detection of HIV DNA with maximum diagnostic proficiency.

Subjects and methods

Subjects

The laboratories used two different peripheral blood mononuclear cell (PBMC) panels (designated panel 1 and panel 2), each consisting of 20 samples obtained from the following four groups of individuals.

From the Centre Régional de Transfusion Sanguine, Lille, *Hôpital Pitié Salpêtrière, †Hôpital Trousseau, ‡Institut Pasteur, §Hôpital Saint-Louis, Paris, the ††Centre de Transfusion Sanguine, Hôpital Foch, Suresnes and ‡‡Institut National de Transfusion Sanguine, Paris, France.

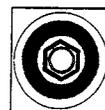
Requests for reprints to: Christine Defer, Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 21 rue Camille Guérin, BP 2018, 59012 Lille Cedex, France.

Date of receipt: 21 November 1991; revised: 13 April 1992; accepted: 21 April 1992.



ELSEVIER

Journal of Virological Methods 49 (1994) 79-88

Journal of
Virological
Methods

Improvement of hepatitis C virus RNA polymerase chain reaction through a multicentre quality control study

French Study Group for the Standardization of Hepatitis C virus PCR

Laboratoire de Virologie Transfusionnelle, Institut National de Transfusion Sanguine, Paris (Françoise Bouchardeau, Anne-Marie Couroucé); Centre Régional de Transfusion Sanguine, Lille (Christine Defer, Michèle Maniez); Laboratoire de Virologie, Service des Maladies du Foie et de l'Appareil Digestif, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre (Elisabeth Dussaix, Pierre Laurent-Puig); Laboratoire d'immunologie, Hôpital St-Antoine (Jean-Claude Homberg); Hôpital Louis-Mourier, Colombes (Jérôme Lamoril, Jean-Charles Deybach, Marie-France Fruchard); Institut National de Transfusion Sanguine, Hôpital St-Antoine, Paris (Jean-Jacques Lefrère, Martine Mariotti, Micheline Thauvin, Frank Demange); Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise (Patricia Lewin); Centre de Transfusion, Hôpital St-Louis, Paris (Pascale Loiseau, Arnaud Drouin, Nadine Ravera, Marc Benbunan); Service de Bactériologie-virologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris (Françoise Lunel, Lionel Frangeul); Unité d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, Clichy (Patrick Marcellin, Michèle Martinot-Peignoux); Laboratoire de Bactério-virologie, Hôpital Henri-Mondor, Créteil (Jean-Michel Pawlotsky); Hôpital St Antoine, Unité d'Hépatologie, Paris (Lawrence Serfaty, Raoul Poupon); Centre de Transfusion, Hôpital Foch, Suresnes (Dominique Vignon); Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Grenoble (Jean-Pierre Zarski, Annette Ounanian).*

Accepted 7 February 1994

Abstract

Nine French laboratories, using the polymerase chain reaction (PCR) for detection of hepatitis C virus (HCV) RNA, initiated a quality control study to assess and to improve the specificity and sensitivity of their procedures. The study was carried out in three rounds, based on coded panels consisting of anti-HCV positive and anti-HCV negative samples. For the first panel, each laboratory followed its own protocol: 100% sensitivity was observed in two laboratories, 100% specificity in seven. For the second panel, all laboratories were required to use both their own procedure and a consensus procedure established from those laboratories which provided the best results on the first panel. With their own procedure, 100% sensitivity was observed in five laboratories and 100% specificity in all. With the common procedure, 100% sensitivity was observed in all but one, and 100% specificity in all. The third panel included three positive samples with four successive dilutions. For two samples, 8/8 laboratories had positive signals until the 1/100 dilution and discrepant results beyond this dilution; for the

*Corresponding author at: Institut National de Transfusion Sanguine, Hôpital Saint-Antoine, 53, boulevard Diderot, 75012 Paris, France. Fax: (33) 45 12 75 03.