7

Hépatite C : outils diagnostiques et stratégie de dépistage

La mise en évidence d'une infection par le VHC est souvent effectuée chez des sujets ne présentant aucun symptôme d'atteinte hépatique. Ceci implique que l'utilisation des tests disponibles, sérologiques ou basés sur la caractérisation du matériel nucléique, doit se faire en éliminant au maximum le risque de faux négatifs quand la recherche a pour but d'éviter tout risque de diffusion du virus et celui de faux positifs quand il s'agit de poser un diagnostic.

Diagnostic sérologique

Les tests sérologiques permettant la mise en évidence d'anticorps anti-VHC totaux se classent en tests de dépistage et tests de validation. De plus, des tests permettant la détection d'IgM anti-VHC ont été récemment développés.

Tests de dépistage

Les tests les plus couramment utilisés en première ligne sont de type immunoenzymatiques (Elisa) sur microplaques ou sur billes de polystyrène. Les antigènes viraux utilisés sont des protéines virales recombinantes ou des peptides synthétiques qui diffèrent, suivant les tests, par leur longueur, leur structure et la localisation des régions du génome viral qui les codent. La plupart des tests utilisent des antigènes viraux permettant la détection d'anticorps dirigés contre des épitopes structuraux (antigènes de capside) et des épitopes non structuraux (codés par les régions NS3, NS4 et NS5).

La sensibilité et la spécificité des tests Elisa sont difficiles à évaluer en l'absence de test de référence, qu'il s'agisse d'un test sérologique, qui utiliserait des protéines virales naturelles ou natives, ou de la recherche d'ARN viral par amplification génomique (*polymerase chain reaction* ou PCR). En effet, certains malades peuvent avoir une détection d'ARN viral positive par PCR, en l'absence d'anticorps décelables. Ceci est surtout observé chez les sujets immunodéprimés ou hémodialysés (Bukh et coll., 1993 ; Chan et coll., 1993 ; Bryan et coll., 1993 ; Ragni et coll., 1993) ou, de façon transitoire, à la phase

aiguë de l'infection, avant la séroconversion (Puoti et coll., 1992 ; Peters et coll., 1994). A l'inverse, certains malades peuvent avoir des anticorps sériques en l'absence d'ARN viral détectable, soit parce qu'ils ont guéri d'une infection aiguë et gardent des anticorps résiduels, soit parce que le niveau de la réplication virale est inférieur au seuil de détection de la PCR (Shieh et coll., 1991). Dans ce dernier cas, la recherche d'ARN viral est le plus souvent positive dans le foie.

Les différents tests disponibles en France ont récemment subi une évaluation comparative. Les résultats ont été interprétés en fonction des caractéristiques cliniques et de la présence dans le sérum de l'ARN du VHC recherché par PCR. Les tests évalués ont une sensibilité comprise entre 94 % et 99 %. Certains tests détectent mieux les anticorps dirigés contre les antigènes codés par la région NS3, tandis que d'autres sont plus sensibles pour la détection des anticorps anti-capside. Ces différences de sensibilité pourraient être à l'origine du retard de certains tests dans la mise en évidence d'une séroconversion VHC ou d'une moindre sensibilité chez des malades immunodéprimés. La spécificité des tests Elisa paraît satisfaisante. Néanmoins, des réactions faussement positives peuvent être observées. Elles ont été surtout rapportées avec les tests de première génération (Mc Farlane et coll., 1990 ; Wong et coll., 1990) et semblent plus rares avec les tests actuels. Les faux-positifs pourraient être observés principalement en cas d'hypergammaglobulinémie, de maladie dysimmunitaire, d'infection liée à un autre virus, ou lorsque les tests ont été faits sur des sérums chauffés ou décongelés et recongelés plusieurs fois.

Tests de validation

Le manque de spécificité des tests de première génération a été à l'origine du développement de tests dits de « validation ». Ces tests, aujourd'hui de deuxième ou de troisième génération, sont fondés sur une technique d'immunoblotting (le RIBA pour *Recombinant Immunoblot Assay* en est un exemple), permettant la détection semi-quantitative des anticorps (Pawlotsky et coll., 1996a). Les antigènes utilisés sont des proteines recombinantes ou des peptides synthétiques. Ils associent des antigènes structuraux (antigènes de capside et, parfois, d'enveloppe) et non structuraux (NS3, NS4, NS5), ainsi que des contrôles de spécificité et de sensibilité.

Les tests de validation permettent de détecter la présence de plusieurs anticorps spécifiques du VHC. Dans certains cas, un seul anticorps est détecté. Le test est alors considéré comme « indéterminé ». En fait, la signification d'un test indéterminé varie selon qu'il est obtenu chez un donneur de sang testé systématiquement ou dans le cadre du diagnostic d'une infection à VHC dans un laboratoire de virologie. Vingt à 40 % des donneurs de sang ayant un test Elisa positif ont un test de validation de deuxième génération indéterminé. Dans ce cas, la recherche d'ARN viral par PCR est positive dans 2 à 14 % des cas (Lunel et coll., 1993 ; Martinot-Peignoux et coll., 1993). Le test de deuxième génération indéterminé correspond, le plus souvent, à un faux

positif. Les tests de troisième génération, plus sensibles et plus spécifiques, ont permis de résoudre la majorité de ces cas en résultats positifs ou négatifs (Garcia-Samaniego et coll., 1993). Un test de troisième génération ayant un résultat indéterminé peut cependant être observé chez un donneur de sang : il correspond le plus souvent à un faux positif. Ceci concerne en particulier les tests RIBA de troisième génération caractérisés par la présence isolée d'anticorps anti-NS5, qui sont fréquents chez les donneurs de sang (40 % des tests RIBA de troisième génération indéterminés) et ne sont jamais associés à une détection d'ARN viral positive (Pawlotsky et coll., 1995a).

Dans le cadre du diagnostic d'une infection à VHC dans un laboratoire de virologie, les résultats indéterminés des tests de deuxième génération sont moins fréquents, de l'ordre de 15 %. Ils sont souvent trouvés chez des sujets immunodéprimés et sont souvent associés à une réplication virale détectée par PCR (50 à 85 % des cas) (Lunel et coll., 1993 ; Martinot-Peignoux et coll., 1993 ; Pawlotsky et coll., 1994a ; Buffet et coll., 1994). Les tests de troisième génération ont, là encore, permis de résoudre la majorité des problèmes diagnostiques en résultats positifs ou négatifs. Cependant, des tests de validation de troisième génération indéterminés peuvent toujours être observés, même s'ils sont moins fréquents (10 % des sérums positifs en Elisa de troisième génération) (Lamoril et coll., 1994 ; Pawlotsky et coll., 1996b). Environ la moitié de ces sérums sont positifs pour la recherche d'ARN viral par PCR. Le principal facteur responsable de l'existence de ces tests indéterminés est l'immunosuppression, qu'elle soit liée à une infection associée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou induite par la thérapeutique (Lamoril et coll., 1994 ; Pawlotsky et coll., 1996b). Le génotype du VHC ne semble, en revanche, jouer aucun rôle (Pawlotsky et coll., 1996b). L'observation de profils indéterminés chez certains malades non immunodéprimés et infectés par un VHC de génotype courant reste cependant inexpliquée.

Recherche d'IgM anti-VHC

Un test permettant la détection d'anticorps sériques anti-capside du VHC de type IgM a été récemment développé (HCV IgM EIA, Abbott Diagnostics). La sensibilité de ce test n'est pas connue avec précision. Sa spécificité semble satisfaisante. En particulier, la présence de facteur rhumatoïde, fréquente au cours des hépatites chroniques C, n'entraine pas de faux-positifs de ce test (Pawlotsky et coll., 1995b). L'intérêt de la détection de ces anticorps pour le diagnostic d'hépatite aiguë C semble limité, puisque leur présence est inconstante au cours des infections aiguës et fréquente (de l'ordre de 50 % pour les IgM anti-capside) au cours des hépatites chroniques. La présence d'IgM anti-capside du VHC pourrait être liée au génotype viral et pourrait être associée à l'absence de réponse soutenue à long terme après traitement par l'interféron alpha. L'intérêt pratique de la recherche d'IgM anti-capside du VHC reste cependant mal défini (Pawlotsky et coll., 1996a).

Limites des tests sérologiques

Les tests sérologiques actuels jouent un rôle primordial dans le dépistage et le diagnostic des infections par le VHC, mais ils ont un certain nombre de limites :

- Ils n'ont pas de signification en matière de réplication virale et témoignent simplement d'un contact du sujet avec le VHC ;
- La séroconversion est souvent tardive au cours de l'hépatite aiguë C, de telle sorte que l'infection aiguë par le VHC risque d'être méconnue ;
- Il existe des hépatites chroniques C séronégatives, exceptionnelles chez les sujets immunocompétents, mais relativement fréquentes chez les sujets immunodéprimés et les hémodialysés ;
- En présence de plusieurs étiologies possibles d'une maladie aiguë ou chronique du foie, le test sérologique ne permet pas d'établir le rôle du VHC dans l'hépatopathie ;
- Certains profils sérologiques sont difficiles à interpréter, en particulier quand deux tests de dépistage sont discordants ou quand un test de validation est indéterminé.

Ces limites rendent indispensable l'utilisation de tests virologiques « directs » reflétant la réplication du VHC dans l'organisme. Au cours des infections par le VHC, les antigènes viraux sont présents en quantités très faibles dans les fluides et les tissus et ne peuvent être détectés par les méthodes usuelles. Les seuls tests directs disponibles à ce jour sont donc les tests moléculaires, fondés sur la recherche de l'ARN du VHC.

Diagnostic moléculaire

Le niveau de réplication du VHC est faible. La virémie est en moyenne de 10^5 génomes/ml, alors qu'elle est en moyenne de 10^7 à 10^8 génomes/ml au cours des infections par le VHB. Dans ces conditions, la détection de l'ARN du VHC dans le sérum ou les tissus a, jusqu'à présent, essentiellement reposé sur la technique d'amplification génique par PCR. Des techniques alternatives ont été proposées récemment.

Détection de l'ARN viral

La PCR permet de fabriquer, au cours d'une réaction cyclique et grâce à l'utilisation d'enzymes thermostables, des copies de l'ARN viral qui sont des ADN double-brins. Ces ADN double-brins synthétisés en quantité très importante deviennent alors facilement détectables par les techniques usuelles (Saiki et coll., 1985). Depuis peu il est aussi possible d'obtenir et de détecter des copies de l'ARN viral simple brin, enfin les techniques les plus récentes qui sont encore en cours de mise au point utilisent la méthode des ADN branchés sur l'ARN viral permettant de le visualiser par chimioluminescence et de le quantifier.

La PCR de l'ARN du VHC a longtemps utilisé des protocoles différents mis au point dans chaque laboratoire (Weiner et coll., 1990 ; Garson et coll., 1990), mais les contrôles de qualité ont montré des différences notables de sensibilité, de spécificité et de reproductibilité (Zaaijer et coll., 1993 ; French Study Group, 1994). La PCR de l'ARN du VHC standardisée (Amplicor® HCV, Roche Diagnostic Systems) permet de pallier ces inconvénients et est aujourd'hui largement utilisée en routine (Young et coll., 1993 ; Wolfe et coll., 1994 ; Nolte et coll., 1995). Ce test utilise une enzyme thermostable unique, la rTth DNA polymerase, et inclut une procédure de prévention des contaminations permettant de diminuer le risque de faux-positifs.

L'avantage principal de la PCR est sa grande sensibilité. La PCR peut cependant être à l'origine de résultats faussement positifs ou négatifs. Les résultats faussement positifs sont liés à des contaminations. Le *carry-over* est la contamination des échantillons, en cours de traitement, par des produits amplifiés au cours des séries précédentes. L'utilisation de systèmes de prévention permet de réduire ce risque dans une proportion importante. Elle ne dispense le laboratoire du respect indispensable des « règles de bonne conduite » (Kwok et Higuchi, 1989). Des contaminations croisées au moment de la préparation des échantillons ou au moment de l'hybridation sur microplaque des produits amplifiés peuvent également être à l'origine de faux positifs de la PCR.

Le risque de résultats faussement négatifs est souvent sous-estimé. La PCR, bien que très sensible, a un seuil, variable selon la technique utilisée, au dessous duquel une faible réplication ne pourra être détectée. De plus, la PCR peut souffrir d'un manque de reproductibilité pour les virémies faibles. Enfin, des « inhibiteurs » des enzymes de la réaction peuvent être présents dans les échantillons testés. Une dilution des échantillons permet parfois de supprimer l'action de ces inhibiteurs. Dans tous les cas, la réalisation de deux PCR indépendantes pour chaque échantillon testé et l'inclusion dans chaque série d'un nombre suffisant de témoins est indispensable pour limiter ces risques. L'incorporation de « standards internes », acides nucléiques synthétiques amplifiés parallèlement à l'acide nucléique viral, est également souhaitable pour identifier la présence d'inhibiteurs de la réaction.

Certaines techniques de PCR sont utilisées en recherche et permettent la détection spécifique des brins négatifs de l'ARN du VHC, qui sont les intermédiaires de la réplication virale dans les cellules infectées. Leur détection dans un tissu est donc la preuve indirecte que le virus se réplique dans ce tissu (Fong et coll., 1991 ; Paterlini et coll., 1993 ; Shindo et coll., 1992 ; Takehara et coll., 1992). L'interprétation des résultats est cependant délicate.

La détection de l'ARN du VHC peut également être réalisée dans le foie et les cellules mononucléées du sang (Paterlini et coll., 1993 ; Gerber et coll., 1992 ; Müller et coll., 1993 ; Zignego et coll., 1992). Les cellules mononucléées pourraient jouer un rôle de « réservoir » du VHC dans certaines circonstances pathologiques.

Quantification de l'ARN viral

La quantification de l'ARN du VHC, c'est-à-dire la mesure de la concentration en génomes viraux dans un fluide ou dans un tissu, est censée refléter le niveau de la réplication virale dans l'organisme ou dans l'organe étudié. En fait, tous les génomes détectés ne correspondent pas à des particules virales infectieuses : la quantification de l'ARN du VHC surestime probablement l'importance de la production de virions infectieux. Elle permet cependant une appréciation indirecte de l'importance de la réplication virale qui trouve surtout son intérêt si elle est répétée au cours du temps.

Plusieurs techniques ont été développées dans les laboratoires de recherche. Elles étaient essentiellement fondées sur une amplification par PCR du génome viral et utilisaient soit des dilutions sériées, soit une amplification compétitive avec des « standards internes ». Ces techniques ont été à l'origine de publications contradictoires qui ont mis en lumière la nécessité d'une standardisation.

Les industriels ont récemment proposé des méthodes standardisées de quantification de l'ARN du VHC. La technique la plus largement évaluée à ce jour est la technique des ADN branchés (Quantiplex® HCV RNA 1.0, Chiron Diagnostics). La quantité d'ARN viral présente dans un prélèvement est calculée en comparant le résultat obtenu à une courbe standard établie pour chaque technique, à partir de génomes viraux synthétiques présents en quantité connue. Le report sur la courbe de la luminescence observée pour un prélèvement donné permet de déduire la charge virale correspondante, opération réalisée par un logiciel spécifique (Kolberg et coll., 1994). Cette méthode a fait la preuve d'une très grande reproductibilité. Récemment, il est apparu que la technique pouvait sous-estimer la charge virale dans les prélèvements contenant des virus de génotype 2 ou 3 (Simmonds, 1995). La nouvelle génération du test (Quantiplex® HCV RNA 2.0) ne présente plus cet inconvénient.

Des techniques de quantification standardisée de l'ARN du VHC fondées sur l'amplification de l'ARN viral en compétition avec un standard interne (acide nucléique présent en quantité connue) sont en cours d'évaluation. Une technique de PCR quantitative standardisée a été récemment développée (Amplicor HCV Monitor®, Roche Diagnostic Systems). L'ARN viral présent dans le prélèvement et le standard interne sont amplifiés dans le même tube par une PCR utilisant des amorces qui leur sont communes. Le produit d'amplification est ensuite dilué plusieurs fois et les dilutions sont hybridées en microplaques avec des sondes spécifiques de l'ARN viral ou du standard. La mesure des densités optiques permet, grâce à un logiciel spécifique, le calcul du nombre de copies d'ARN viral présentes dans le prélèvement. Les résultats des premières évaluations montrent une sensibilité satisfaisante, bien que légèrement inférieure à celle de la PCR non quantitative, et

une bonne reproductibilité. Une technique NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*) HCV® quantitative (Organon Teknika) est également en cours de développement (Sillekens et coll., 1994).

Le problème principal posé par ces techniques est l'absence d'étalon standard universel. Chaque technique utilise ses propres standards et les résultats obtenus ne peuvent pas être comparés entre eux. Une standardisation internationale parait souhaitable.

Détermination du génotype viral

Des travaux récents suggèrent que le génotype du VHC pourrait être dépendant du mode de transmission de l'infection (Pawlotsky et coll., 1995c ; Silini et coll., 1995 ; Nousbaum et coll., 1995 ; Pol et coll., 1995). Dans les pays développés d'Europe de l'Ouest, le sous-type 1b, majoritaire, semble associé à la transmission transfusionnelle et aux hépatites C de cause inconnue, alors que les toxicomanes intra-veineux sont principalement infectés par les sous-types 3a et 1a (Pawlotsky et coll., 1995c ; Silini et coll., 1995 ; Nousbaum et coll., 1995 ; Pol et coll., 1995). Le génotype viral semble également influencer la pathogénicité de la maladie. Il est bien établi que le génotype influence, comme la charge virale et le degré d'hétérogénéité de la population virale, la réponse au traitement par l'interféron alpha. Il reste cependant discuté si le génotype influence réellement la sévérité de la maladie hépatique. Le génotype 1 est fortement prévelent chez des sujets avec cirrhose et HCC ; des études prospectives (Bruno et coll., 1997) et rétrospectives (Silini et coll., 1996) suggèrent même l'implication du type 1 dans la survenue des HCC. Il faut cependant tenir compte des biais épidémiologiques majeurs tels que l'âge, l'ancienneté de la maladie, et l'existence de facteur de risque associé comme une intoxication alcoolique chronique. De plus, la réponse anticorps pourrait varier en fonction du génotype (Mc Omish et coll., 1993 ; Pawlotsky et coll., 1995d). Il est bien établi, aujourd'hui, que les malades infectés par un virus de type 1 répondent significativement moins bien à l'interféron alpha que les malades infectés par un autre type (Nousbaum et coll., 1995 ; Martinot-Peignoux et coll., 1995 ; Pawlotsky et coll., 1996c). Cependant, des facteurs confondants tels que l'âge des malades et l'ancienneté de la maladie doivent être pris en compte et l'existence de réelles différences entre les sous-types 1a et 1b reste discutée (Pawlotsky et coll., 1996d). La détermination du génotype du VHC repose sur des techniques moléculaires, directes (génotypage) et sérologiques, indirectes (sérotypage).

Les techniques de génotypage sont fondées sur une amplification initiale par PCR de l'ARN viral. Les méthodes de PCR différentielle consistent en une amplification réalisée dans la région du génome codant pour la capside virale à l'aide de plusieurs couples d'amorces, spécifiques des principaux types et sous-types viraux (Okamoto et coll., 1992). Ces méthodes sont contraignantes car elles obligent à réaliser une réaction par génotype étudié et pour

chaque sérum testé. Elles ont, en outre, tendance à surestimer les infections mixtes, du fait d'amplifications non spécifiques relativement fréquentes (Giannini et coll., 1995).

D'autre méthodes ont été développées, fondées sur l'étude du polymorphisme de restriction des fragments amplifiés par PCR. Le principe est la réalisation d'une amplification par PCR d'une région du génome viral avec des amorces universelles, c'est-à-dire non spécifiques de génotype. Les produits amplifiés sont alors digérés par plusieurs enzymes de restriction et le polymorphisme de restriction obtenu, caractéristique des différents génotypes, est analysé après migration des produits d'amplification en électrophorèse (Davidson et coll., 1995).

Le troisième type de méthode de génotypage associe deux étapes successives : une amplification par PCR de l'ARN viral avec des amorces universelles dans une région d'intérêt et l'hybridation des produits amplifiés à des sondes oligonucléotidiques spécifiques des différents types et sous-types (Qu et coll., 1994 ; Stuyver et coll., 1993). Les seules méthodes de génotypage standardisées et commercialisées appartiennent à cette catégorie. La technique aujourd'hui la plus utilisée est l'Inno-LiPA HCV (Innogenetics). Après amplification par PCR de la région 5' non codante du génome viral à l'aide d'amorces universelles, l'hybridation se fait sur des bandelettes de nitrocellulose sur lesquelles ont été déposées en bandes parallèles les sondes spécifiques des différents types et sous-types. L'hybridation est ensuite révélée par une méthode colorimétrique enzymatique. La sensibilité et la spécificité de cette technique ont été récemment améliorées. D'autres techniques standardisées fondées sur le même principe sont également en cours de développement, comme Amplicis HCV (Cis-Bio) ou Gen.Eti.K DEIA (Sorin Biomedica).

Les techniques de sérotypage sont fondées sur la détection, par une technique immuno-enzymatique d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques des différents génotypes (Simmonds et coll., 1993 ; Bhattacherjee et coll., 1995). Deux tests (HCV Serotyping Assay, Murex Diagnostics, et RIBA HCV Serotyping Assay, Chiron Diagnostics) sont en cours d'évaluation. Les premiers résultats suggèrent une bonne spécificité de ces tests par rapport au génotypage, mais un manque relatif de sensibilité (5 à 25 % des sérums ne sont pas typables selon les techniques) (Dixit et coll., 1995 ; Martinot et coll., 1995 ; Pawlotsky et coll., 1995e). Des réactivités croisées entre génotypes peuvent être observées (Martinot et coll., 1995 ; Pawlotsky et coll., 1995e). En outre, la possibilité d'identifier certains sous-types du VHC est impossible en sérotypage pour l'instant. Cependant, en raison de leur facilité d'emploi et leur coût inférieur à celui des techniques de biologie moléculaire, il est probable que ces tests seront largement utilisés pour l'analyse des génotypes majoritaires en France : 1, 2 et 3.

Utilisation des tests dans le diagnostic

La loi française fait obligation de réaliser deux tests différents pour le diagnostic sérologique des infections par le VHC. Aucune précision n'est donnée quant aux deux tests devant être réalisés : il peut aussi bien s'agir de deux tests Elisa que d'un test Elisa suivi d'un test de validation. Cependant, compte tenu de la spécificité et de la sensiblité des tests Elisa de 3ème génération, il semble que la pratique d'un seul test soit suffisant pour dépister une infection par le VHC. Pour confirmer le diagnostic d'hépatite, un test de contrôle sur un deuxième échantillon sanguin devrait toutefois être envisagé. L'obligation légale d'effectuer deux tests différents pour le diagnostic de l'hépatite C peut être justifiée par les différences de sensibilité constatées suivant les sujets en fonction de la spécificité des anticorps détectés par chaque test (Lunel et coll., 1995). En effet, tous les individus ne répondant pas de façon identique à un même stimulus antigénique, leur sérum contient des anticorps différant tant par leur spécificité que par leur niveau.

Le problème des sujets ayant des anticorps anti-VHC détectés dans le sérum et une activité des aminotransférases normale est complexe. Dans ce cas, l'ARN du VHC est détecté par PCR dans 25 à 100 % des cas, selon les études. Ces divergences peuvent s'expliquer par les différences de sensibilité des techniques de détection de l'ARN viral et par la définition de la normalité de l'activité des aminotransférases. L'hépatite chronique liée au VHC étant caractérisée par des fluctuations de l'activité des aminotransférases (Dienstag, 1983), certains sujets peuvent avoir des épisodes successifs d'élévation et de normalisation de celles-ci : chez ces malades, l'ARN du VHC est le plus souvent présent et l'histologie hépatique montre des lésions d'hépatite chronique active. Au contraire, certains sujets ont une activité sérique des aminotransférases normale de façon répétée pendant plusieurs mois ou plusieurs années : dans cette population, l'ARN du VHC est détecté dans 25 à 30 % des cas. Si une biopsie hépatique est faite chez les sujets ayant une virémie détectable, l'examen histologique met en évidence des lésions d'hépatite chronique active, de degré d'agressivité faible, chez la majorité d'entre eux (Serfaty et coll., 1996).

En cas de piqûre accidentelle d'un membre du personnel de santé avec un objet souillé par le sang d'un malade porteur du VHC, la recherche d'ARN viral, habituellement positive dès la première semaine en cas de transmission de l'infection, permet de documenter celle-ci. En cas de positivité de la PCR, un traitement destiné à éviter le passage à la chronicité peut être discuté. Au cours des hépatites chroniques, la recherche d'ARN viral à visée diagnostique est d'indication rare chez les sujets immunocompétents. Chez les immunodéprimés ou hémodialysés, les sérologies sont souvent faussement négatives ou indéterminées. La recherche d'ARN viral permet alors le diagnostic d'infection par le VHC.

Le risque de transmission du VHC d'une mère infectée à son enfant est très faible, de l'ordre de 3 %, lorsque la mère n'est pas co-infectée par le VIH (Cilla et coll., 1992 ; Lam et coll., 1993 ; Wejstal et coll., 1990 ; Ohto et coll., 1994). En cas de co-infection par le VIH, le risque de transmission est de l'ordre de 20 % (Lam et coll., 1993 ; Giovannini et coll., 1990 ; Novati et coll., 1992 ; Thaler et coll., 1991). L'enfant est toujours porteur à la naissance des anticorps anti-VHC maternels transmis de façon passive. Ces anticorps disparaissent progressivement en quelques mois si l'enfant n'est pas infecté, mais peuvent cependant persister jusqu'à un an (Roudot-Thoraval et coll., 1993). La détection répétée de l'ARN viral chez l'enfant est très en faveur d'une transmission de l'infection.

Utilisation des tests dans le suivi des patients

Les figures 7.1 et 7.2 résument les propositions d'utilisation des méthodes diagnostiques dans le suivi des patients ayant une sérologie C positive ou douteuse.

Hépatite aiguë

L'infection aiguë par le VHC se traduit souvent par une simple élévation de l'activité sérique des aminotransférases, en l'absence d'autre cause d'hépatite aiguë. L'apparition des anticorps anti-VHC (séroconversion) est souvent retardée par rapport à l'épisode aigu. L'augmentation de sensibilité des tests de troisième génération a permis de raccourcir le délai de détection des anticorps. Avec ces tests, le délai moyen de séroconversion après la première élévation de l'activité sérique des aminotransférases chez un malade non immunodéprimé est de 4 à 5 semaines (Prince et coll., 1993 ; Aach et coll., 1991). Les premiers anticorps détectés sont habituellement ceux dirigés contre la région NS3 ou contre l'antigène de capside du virus, mais des différences existent entre les tests (Thiers et coll., 1993). Chez un malade immunodéprimé, l'apparition des anticorps est souvent retardée et les tests peuvent être indéterminés ou négatifs. Dans les cas d'hépatite aiguë séronégative (avant la séroconversion ou chez un malade immunodéprimé) ainsi qu'avant la survenue de l'hépatite après une possible contamination par le VHC, seule la recherche d'ARN viral dans le sérum par PCR permet le diagnostic (Lunel et coll., 1991 ; Lazizi et coll., 1992 ; Lau et coll., 1993 ; Lok et coll., 1993 ; Poterucha et coll., 1992 ; Puoti et coll., 1992). L'ARN viral est détectable quelques jours après la contamination, toujours avant la fin de la première semaine. Cette détection précède donc l'hépatite aiguë qui survient le plus souvent après une incubation de 4 à 12 semaines (Dienstag, 1983). L'ARN du VHC reste détectable pendant l'épisode aigu et ne disparait du sérum qu'en cas de guérison, au bout de quelques semaines (Puoti et coll., 1992). Des études basées sur la recherche d'ARN viral au cours d'hépatites

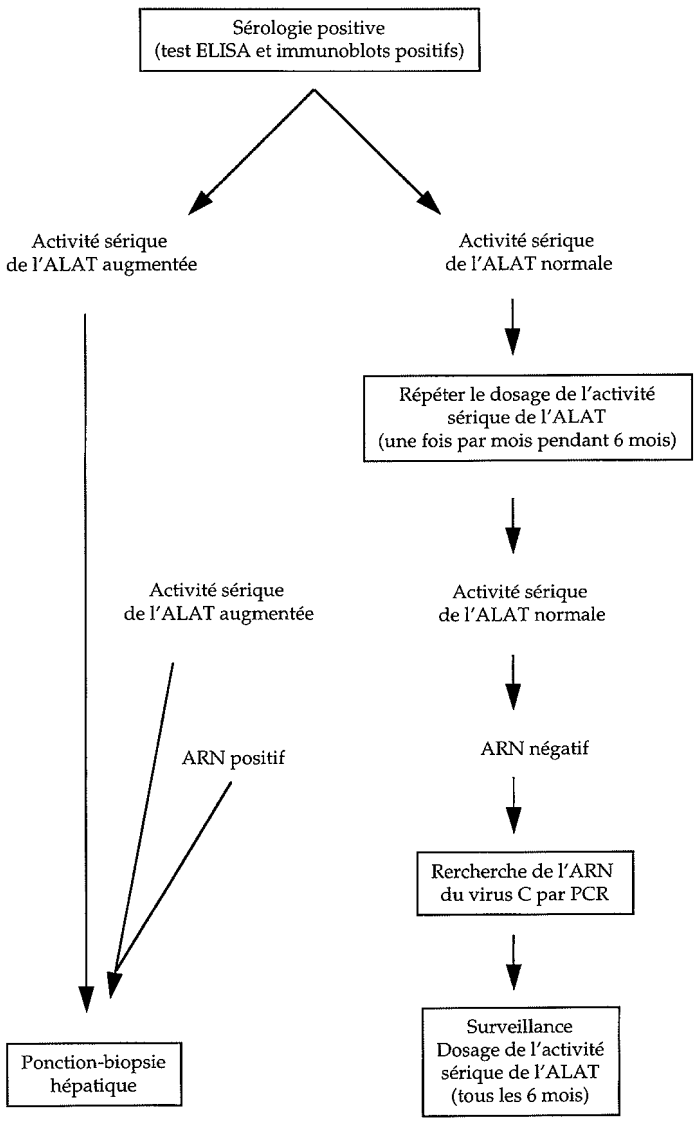

Figure 7.1 : Proposition d'arbre décisionnel devant une sérologie C positive (d'après Pawlotsky et coll., 1996a). ALAT : alanine aminotransférase ; VHC : virus de l'hépatite C ; PCR : *polymerase chain reaction.*

fulminantes non-A, non-B ont montré que le VHC était rarement en cause dans les hépatites fulminantes (Farci et coll., 1994). En revanche, la survenue d'une hépatite fulminante chez un malade ayant une co-infection B-C semble plus fréquente (Féray et coll., 1993).

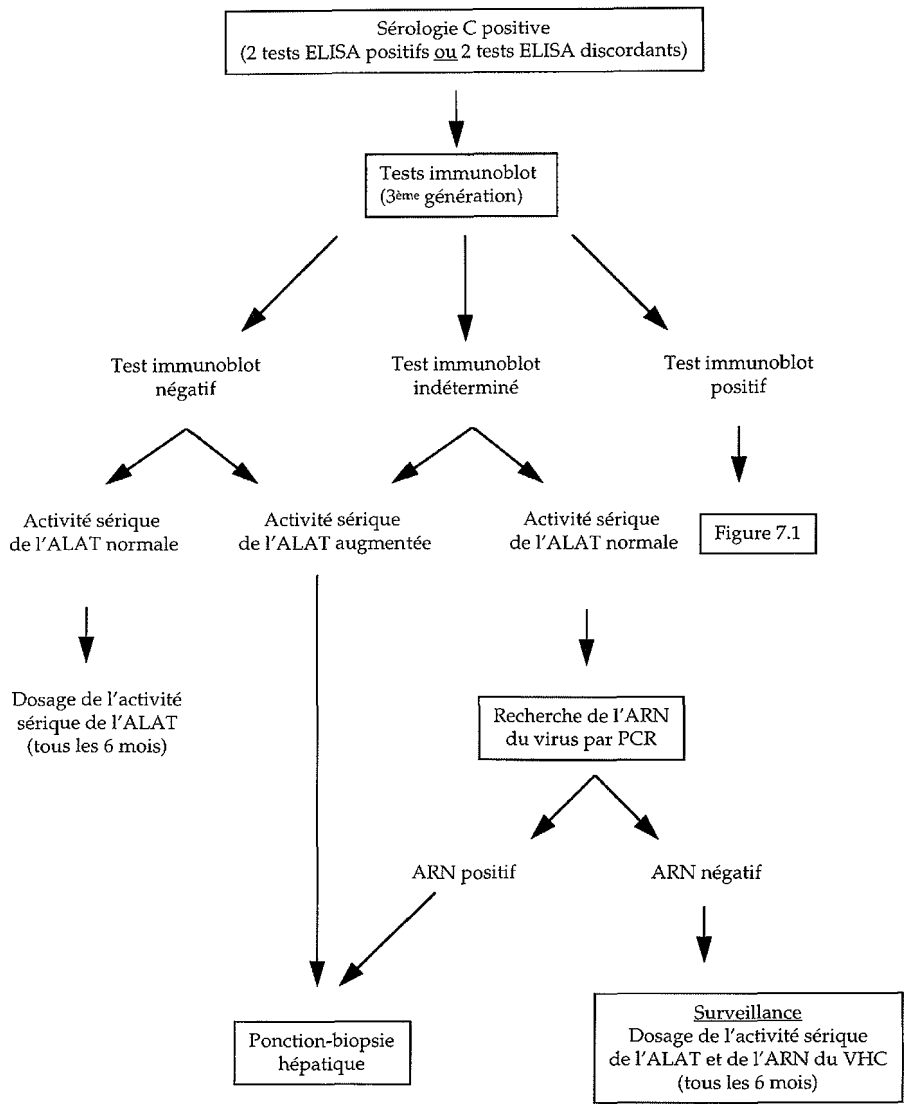

Figure 7.2 : Proposition d'arbre décisionnel devant une sérologie C douteuse (d'après Pawlotsky et coll., 1996a). ALAT : alanine aminotransférase ; VHC : virus de l'hépatite C ; PCR : *polymerase chain reaction.*

En cas de guérison spontanée d'une hépatite aiguë C, l'activité sérique des aminotransférases se normalise progressivement et la recherche d'ARN viral dans le sérum devient négative en quelques jours à quelques semaines. En revanche, les tests sérologiques se modifient peu au cours du temps. Une disparition lente des anticorps dirigés contre la région NS4 (anti-c100) a pu

être observée mais les anticorps dirigés contre la capside (anti-c22) et la région NS3 (anti-c33c) persistent plusieurs années après la guérison (Giuberti et coll., 1994 ; Barrera et coll., 1995).

Hépatite chronique

Chez les malades ayant développé une infection chronique, les anticorps anti-VHC sont détectables par les tests Elisa dans la quasi totalité des cas en l'absence d'immunosuppression (Alter et coll., 1989 ; Esteban et coll., 1990 ; Van der Poel et coll., 1989). Les tests de validation confirment habituellement le diagnostic. Cependant, des discordances sont parfois observées entre deux tests de dépistage, ou bien le test de validation peut être indéterminé en l'absence d'immunosuppression associée. Dans ces cas, la mise en évidence de l'ARN viral par PCR est utile pour confirmer le diagnostic d'infection par le VHC.

Chez les malades immunodéprimés et chez les hémodialysés, la sérologie est souvent négative ou indéterminée. La réactivité sérologique peut même fluctuer parallèlement au niveau d'immunité du malade. On constate alors des « séroconversions » et des « séroréversions ». Chez les malades non immunodéprimés, en revanche, l'hépatite chronique séro-négative est exceptionnelle. Dans tous ces cas, la recherche d'ARN viral par PCR est habituellement positive.

Une virémie C est détectable chez 90 à 95 % des sujets ayant des anticorps sériques anti-VHC lorsque l'activité sérique des aminotransférases est élevée et que l'examen histologique du foie met en évidence une hépatite chronique (Farci et coll., 1991 ; Gunji et coll., 1992). La recherche d'ARN viral dans le sérum est donc inutile pour le diagnostic d'infection chronique par le VHC. En cas de recherche d'ARN viral négative, il peut s'agir d'une virémie faible, inférieure au seuil de détection de la technique, ou fluctuante. La réplication virale persiste chez les malades infectés par le VHC et ayant une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire.

L'existence de porteurs asymptomatiques du VHC, chez qui une réplication virale peut être mise en évidence mais qui n'ont aucun signe de maladie liée au VHC, est discutée. Des cas de malades ayant un examen histologique du foie normal malgré la détection persistante d'une virémie C ont été rapportés. Dans d'autres études, au contraire, la présence d'ARN du VHC était toujours associée à des lésions d'hépatite chronique (Alberti et coll., 1992 ; Brillantini et coll., 1993).

La détection de l'ARN du VHC par PCR a permis de démontrer l'association d'un certain nombre d'anomalies extra-hépatiques à l'infection par le VHC et, pour certaines d'entre elles, un lien de causalité a été clairement établi. Les anomalies extra-hépatiques associées au VHC peuvent être classées en 5 catégories (Pawlotsky et coll., 1996a) :

- Les anomalies liées à la formation de complexes immuns (cryoglobulinémies mixtes autrefois considérées comme essentielles, glomérulonéphrites membrano-prolifératives (Johnson et Mc Farlane, 1993) et peut-être certains cas de périartérite noueuse ;
- Des auto-anticorps sériques variés (anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti microsomes de foie et de rein (LKM1), anti-cytosol...) ;
- Le lichen plan ;
- Des lésions des glandes salivaires pouvant ressembler à celles du syndrome de Gougerot-Sjögren ;
- La porphyrie cutanée tardive dans sa forme sporadique.

La négativité de la recherche d'ARN viral a contribué à éliminer le rôle du VHC dans un certain nombre de maladies dont la cause n'est toujours pas identifiée. En effet, la recherche d'ARN du VHC dans le sérum et dans le foie de malades ayant une hépatite fulminante non-A, non-B était négative dans la majorité des cas. Au cours des aplasies médullaires survenant après une hépatite non-A, non-B, la combinaison d'études sérologiques et de la recherche d'ARN viral par PCR a permis d'éliminer le rôle du VHC dans la majorité des cas (Hibbs et coll., 1992 ; Pol et coll., 1990). Ces observations, ainsi que celles d'hépatites post-transfusionnelles liées ni au VHB, ni au VHC (Koretz et coll., 1993 ; Thiers et coll., 1993 ; Romeo et coll., 1995), font discuter l'existence de virus « non-A, non-B, non-C, non-E ». Le rôle des agents viraux « flavi-like » GBV-B et GBV-C ou virus de l'hépatite G (VHG) récemment identifiés devra être évalué (Simons et coll., 1995 ; Kim et coll., 1995). La technique actuelle pour le diagnostic des infections à VHG est la détection de l'ARN viral par RT-PCR. Toutefois, aucun test n'est encore disponible commercialement, et il s'agira de réactifs coûteux, difficiles à diffuser largement. Sachant qu'il existe au moins 5 sous-types de VHG, des recherches sont en cours sur la mise au point de tests sérologiques, fondés sur l'utilisation de protéines recombinantes ou de peptides de synthèse. A ce jour, les résultats sont contradictoires et de fiabilité discutable. L'approche la plus prometteuse utilise la protéine d'enveloppe E2 et la détection d'anticorps anti-E2 devrait permettre d'identifier les individus préalablement exposés au VHG. Une étude récente (Tacke et coll., 1997) montre que la réponse anticorps anti-E2 est associée à une perte de virémie détectable, et pourrait donc être utilisée comme marqueur de guérison de l'infection par le VHG.

La présence d'anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM1 ou anti-LC1 dans le sérum de malades ayant une hépatite chronique active peut faire discuter le diagnostic d'hépatite auto-immune. Ces anticorps sont fréquemment observés au cours des hépatites chroniques C et la détection d'ARN du VHC permet d'orienter la décision thérapeutique. En effet, le traitement des hépatites auto-immunes repose sur l'utilisation des corticoïdes alors que la prescription d'interféron alpha peut être à l'origine d'une aggravation de l'atteinte hépatique chez ces malades.

Patients traités

Chez les malades ayant une hépatite chronique C traités par l'interféron-α, le profil des anticorps se modifie rarement au cours du traitement et après celui-ci. Par contre, après 6 mois de traitement, une normalisation de l'activité sérique des aminotransférases est obtenue dans environ 50 % des cas (Pawlotsky et coll., 1994c), même si plus de la moitié de ces répondeurs initiaux rechutent après l'arrêt du traitement. On estime ainsi qu'au plus 20 % des malades traités ont une normalisation durable de l'activité sérique des aminotransférases, qui est habituellement associée à une amélioration histologique significative (Douglas et coll., 1993 ; Marcellin et coll., 1992 ; Saracco et coll., 1993 ; Boyer et coll., 1995).

L'effet du traitement peut être évalué à deux niveaux : son effet sur la maladie hépatique, évalué par la comparaison des biopsies hépatiques pré- et post-traitement, et son effet sur l'infection elle-même, c'est-à-dire sur la réplication virale. La recherche d'ARN viral avant traitement est donc utile car elle servira de référence pour l'étude de l'effet du traitement sur la réplication (Michieletto et coll., 1993). Il n'existe pas de consensus sur l'utilisation de la recherche de l'ARN du VHC pour évaluer la réponse au traitement par l'interféron α. Certaines propositions peuvent cependant être faites. Chez les malades « non répondeurs » (absence de normalisation de l'activité sérique des aminotransférases), la recherche d'ARN viral est inutile. Dans un pourcentage, qui reste discuté, de malades qui ont une normalisation durable des aminotransférases, on observe une disparition de l'ARN viral du sérum qui reste indétectable à distance du traitement. Ces sujets sont considérés comme des répondeurs virologiques à long terme. Une éradication « complète » du VHC (recherche d'ARN viral négative dans le sérum, le foie et les cellules mononucléées du sang) a été rapportée chez certains malades (Romeo et coll., 1994). La réponse virologique à long terme est aujourd'hui le critère principal d'évaluation de l'efficacité des protocoles thérapeutiques au cours des hépatites chroniques C. A l'arrêt du traitement, la persistance d'une virémie détectable malgré la normalisation de l'activité des aminotransférases rend hautement probable la survenue rapide d'une rechute (Chayama et coll., 1991). Certains sujets gardent une réplication virale détectable malgré une normalisation prolongée de l'activité des aminotransférases (Boyer et coll., 1995). Leur devenir à long terme n'est pas connu. En cas de rechute (réascension des aminotransférases), la recherche d'ARN viral est inutile. Si la recherche d'ARN est négative, elle permet de confirmer que le malade a une réponse virologique et, si elle est toujours négative 6 mois après l'arrêt en l'absence de rechute biochimique, que la réponse virologique est soutenue. Chez les répondeurs à long terme, la recherche de l'ARN viral sérique tous les 6 mois ou tous les ans peut être proposée afin de confirmer la persistance de la réponse virologique. La négativation de la détection de l'ARN du VHC après 3 mois

de traitement pourrait prédire la réponse à long terme et conduire, en cas de non-négativation, à interrompre le traitement plus précocement (Pol et coll., 1994).

La quantification de l'ARN du VHC a peu d'intérêt pour l'évaluation de l'efficacité du traitement sur la réplication virale, qui nécessite l'utilisation des techniques les plus sensibles disponibles. C'est la recherche non quantitative de l'ARN viral par PCR qui remplit cette condition. La détermination systématique de la charge virale avant traitement n'a donc aucune indication en routine, car cette information n'entraîne aucune conséquence pratique. Cependant, de nombreuses études s'attachent à définir les schémas thérapeutiques qui, pour une charge virale initiale donnée, permettront d'obtenir le meilleur taux de réponse. Au cours des traitements anti-viraux, la réponse soutenue à l'interféron est significativement associée à une faible charge virale avant traitement (Nousbaum et coll., 1995 ; Martinot-Peignoux et coll., 1995 ; Pawlotsky et coll., 1996c). Les études les plus récentes ont suggéré que, chez les malades recevant 3 millions d'unités d'interféron α trois fois par semaine pendant 6 mois, seuls ceux ayant une charge virale, évaluée par la technique des ADN branchés, inférieure à 5 méga-équivalents génomes/ml étaient susceptibles d'avoir une réponse virologique soutenue (Martinot-Peignoux et coll., 1995 ; Pawlotsky et coll., 1996c).

La meilleure indication de la quantification de l'ARN du VHC est le suivi des malades recevant une greffe du foie pour cirrhose virale C. La survenue d'anomalies du bilan hépatique après la transplantation, en l'absence de complication chirurgicale ou de rejet, associée à la constatation d'un pic de virémie par rapport aux valeurs basales post-greffe permet de rapporter les anomalies à la réinfection du greffon par le VHC (Duvoux et coll., 1995). La quantification de la virémie, régulièrement au cours du suivi et en cas d'anomalies du bilan hépatique, est donc un examen diagnostique utile dans cette circonstance.

Les techniques de détermination du génotype, largement utilisées en recherche, n'ont, pour l'instant, pas d'indication en dehors de protocoles thérapeutiques. Il a en effet été montré que les malades infectés par un virus de type 1 répondent significativement moins bien à l'interféron alpha que les malades infectés par un virus d'autre type. Là encore, de nombreuses études en cours évaluent les schémas thérapeutiques permettant de donner à chaque malade, en fonction de son génotype viral, le plus de chances de répondre au traitement.

Stratégie de dépistage

L'hypothèse d'un dépistage universel ne paraît ni adaptée, ni coût-efficace, car la prévalence de l'infection par le VHC est insuffisante. En France, dans la population générale, la prévalence des marqueurs sériques d'infection par le

VHC est de l'ordre de 1 %. Il y aurait ainsi environ 550 000 porteurs chroniques du VHC, dont seulement 10 % auraient été diagnostiqués. Les études épidémiologiques ont montré que parmi les personnes dépistées anti-VHC positives lors d'un examen systématique, moins de 25 % étaient déjà informées ou soupçonnaient être porteuses du virus. De surcroît, 80 % des sujets dépistés de façon systématique étaient virémiques, répliquaient le virus et présentaient donc un risque évolutif. Il existe par conséquent en France au moins 500 000 personnes qui doivent être dépistées. Compte tenu de la démographie médicale, chaque médecin doit dépister 5 à 10 nouveaux cas pour espérer réussir le dépistage de toutes les personnes infectées. Les modalités méthodologiques pratiques les plus adaptées pour réussir le dépistage grâce aux généralistes sont en cours d'études. Un projet d'évaluation devrait être mis en place avec le concours de la CNAM dans plusieurs villes, dont Lyon. Il conviendrait de comparer par exemple un dépistage ciblé par les généralistes en fonction de leur perception du risque chez leurs patients et une approche alternative visant à une sensibilisation du patient par affiche dans la salle d'attente et des autoquestionnaires permettant au malade de s'identifier lui-même comme potentiellement à risque. Parallèlement, l'intérêt d'un dépistage semi-systématique en deux temps avec premièrement la prescription des transaminases et secondairement, seulement en cas de positivité, la recherche des anticorps anti-VHC, doit également être évalué. Cette pratique semble exposer à de très nombreux faux positifs, surtout quand l'on s'adresse à des populations plus exposées, et devra être évaluée de façon très approfondie.

Les dépistages ciblés sont les plus pertinents et performants. Environ 30 % des sujets contaminés par le VHC l'ont été à la suite d'une transfusion sanguine, avant l'instauration du dépistage systématique en 1990. Le dépistage ciblé des populations de transfusés devrait permettre de détecter une grande partie des patients infectés auxquels un traitement pourrait être proposé. Des études effectuées dans des cohortes de sujets transfusés ont montré que le rendement de dépistage variait de 3 à 10 %. La population des donneurs de sang est aujourd'hui sélectionnée sur l'absence de facteur de risque d'infection et la négativité des tests sérologiques viraux. La sensibilité des tests Elisa de troisième génération utilisés depuis 1993 permet un dépistage efficace des sujets ayant été infectés par le VHC, et c'est ainsi que le risque de transmission du VHC par les produits sanguins a pu être considérablement réduit. Ce risque, de l'ordre de 6 % en cas de transfusion sanguine au milieu des années 1980, est aujourd'hui très inférieur à 0,5 % (Japanese Red Cross et coll., 1991 ; Donahue et coll., 1992). En France, le risque résiduel de transmission transfusionnelle du VHC s'élève à 1/200 000 dons.

La population des toxicomanes intraveineux constitue un autre tiers des sujets contaminés par le VHC. Elle présente un risque particulièrement élevé puisque près de 70 % des toxicomanes intraveineux seraient infectés par le VHC. Un dépistage régulier de l'infection par le VHC, comme par le VIH, est donc préconisé pour assurer un suivi auprès de cette population qui s'expose

continuellement au facteur de risque de contamination. Par contre, chez les anciens toxicomanes intraveineux, la stratégie de dépistage est similaire à celle proposée pour les sujets ayant été transfusés avant 1991.

Les personnels de santé représentent également une population à risque d'acquisition et de transmission du VHC. Les catégories les plus exposées doivent être définies (chirurgiens, personnels en contact avec les patients hémodialysés...).

La population carcérale est également une population sur laquelle des efforts de prévention de la dissémination du VHC doivent être effectués.

En population générale, l'intérêt du dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C réside à deux niveaux : il s'agit d'une part de repérer le plus tôt possible les patients qui nécessitent une prise en charge thérapeutique destinée à limiter les complications d'hépatite chronique, et d'autre part de lutter contre l'extension de la contamination par le VHC. Compte tenu de l'absence de signes cliniques témoignant de l'infection dans une majorité des cas, une circulaire ministérielle du 9 mai 1995 recommande de proposer, comme aux transfusés, un dépistage gratuit des anticorps anti-VHC à tous les sujets ayant subi des actes médicaux invasifs (anesthésie générale, biopsie, endoscopie...), en particulier avant la reconnaissance du risque de transmission nosocomiale du VHC et l'instauration des règles strictes de désinfection. En effet, 30 % des infections par le VHC sont dues à une cause inconnue, mais pourraient être d'origine nosocomiale dans la majeure partie des cas. Les individus vivant au contact de patients infectés, les femmes enceintes présentant un facteur de risque ou les personnes entrant dans un protocole de fécondation in vitro sont également concernés par ce dépistage. Enfin, l'infection par le VHC doit être recherchée chez les sujets présentant une élévation des transaminases, un atteinte inexpliquée de l'état général ou une asthénie persistante.

Bibliographie

Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE et coll. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *N Engl J Med* 1991, **325 :** 1325-1329

Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P et coll. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet* 1992, **340 :** 697-698

Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL et coll. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989, **321 :** 1494-1500

Barrera JM, Bruguera M, Ercilla G, Gil C, Celis R, Gil MP et coll. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995, **21 :** 639-644

Bhattacherjee V, Prescott LE, Pike I, Rodgers B, Bell H, El-Zayadi AR et coll. Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J Gen Virol* 1995, **76 :** 1737-1748

Boyer N, Marcellin P, Duchatelle V, Martinot M, Kilani A, Pouteau M et coll. Sustained response after alpha interferon therapy in patients with chronic hepatitis C (abstract). *Hepatology* 1995, **22 :** 291A

Bresters D, Zaaijer HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN et coll. Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion* 1993, **33 :** 634-638

Brillantini S, Foli M, Gaiani S, Masci C, Miglioli M, Barbara L. Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *Lancet* 1993, **341 :** 464-465

Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F et coll. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis : a prospective study. *Hepatology* 1997, **25** : 754-758

Bryan JP, Sjogren MH, Malone JL, Mc Arthy P, Kao TC, Wagner K et coll. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C in human immunodeficiency virus type 1-infected US Navy personnel. *J Infect Dis* 1993, **167** : 715-719

Buffet C, Charnaux N, Laurent-Puig P, Chopineau S, Quichon JP, Briantais MJ et coll. Enhanced detection of antibodies to hepatitis C virus by use of a third-generation recombinant immunoblot assay. *J Med Virol* 1994, **43 :** 259-261

Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH et coll. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients : failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis* 1993, **168 :** 1343-1348

Chan TM, Lok ASF, Cheng IKP, Chan RT. A prospective study of hepatitis C virus infection among renal transplant recipients. *Gastroenterology* 1993, **104 :** 862-868

Chayama K, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Matsumoto T, Sakai Y et coll. Effect of interferon administration on serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1991, **13 :** 1040-1043

Cilla G, Perez-Trallero E, Iturriza M, Carcedo A, Echeverria J. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Pediatr Infect Dis* 1992, **11 :** 417

Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EAC et coll. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995, **76 :** 1197-1204

Dienstag J. Non-A, non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology* 1983, **85 :** 439-462

Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M, Di Nello R et coll. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus : strong correlation with standard genotyping methodologies. *J Clin Microbiol* 1995, **33** : 2978-2983

Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Yawn DH, Mc Allister HA et coll. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992, **327** : 369-373

Douglas DD, Rakela J, Hsiang JL, Hollinger FB, Taswell HF, Czaja AJ et coll. Randomized controlled trial of recombinant alpha-2a interferon for chronic hepatitis C. Comparison of alanine aminotransferase normalization versus loss of HCV RNA and anti-HCV IgM. *Dig Dis Sci* 1993, **38** : 601-607

Duvoux C, Pawlotsky JM, Cherqui D, Tran Van Nhieu J, Métreau JM, Fagniez PL et coll. Serial quantitative determination of hepatitis C virus RNA levels after liver transplantation. A useful test for diagnosis of hepatitis C virus reinfection. *Transplantation* 1995, **60** : 457-461

Esteban JI, Gonzalez A, Hernandez JM, Viladomiu L, Sanchez C, Lopez-Talavera JC et coll. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990, **323** : 1107-1112

Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B et coll. A long term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991, **325** : 98-104

Farci P, Munoz S, Alter H, Shimoda A, Govindarajan S, Chung L et coll. Hepatitis C virus (HCV)-associated fulminant hepatitis and its transmission to a chimpanzee (abstract). *Hepatology* 1994, **20** : 265A

Féray C, Gigou M, Samuel D, Bernuau J, Reynes M, Bismuth H et coll. Hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in serum and liver of patients with fulminant hepatitis. *Gastroenterology* 1993, **104** : 549-555

Follett EAC, Dow BC, Mc Omish F, Yap PL, Hugues W et coll. HCV confirmatory testing of blood donors. *Lancet* 1991, **338** : 1024

Fong TL, Shindo M, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* 1991, **88** : 1058-1060

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

Garcia-Samaniego J, Enriquez A, Soriano V, Gutierrez M, Baquero M, Munoz F. Third-generation recombinant immunoblot assay to confirm hepatitis C virus-indeterminate serological samples. *Vox Sang* 1993, **64** : 191-192

Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A et coll. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by « nested » polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990, **335** : 1419-1422

Gerber MA, Shieh YSC, Shim KS, Thung SN, Demetris AJ, Schwartz M et coll. Detection of replicative hepatitis C virus sequences in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1992, **141** : 1271-1277

Giannini C, Thiers V, Nousbaum JB, Stuyver L et coll. Comparative analysis of two assays for genotyping hepatitis C virus based on genotype-specific primers or probes. *J Hepatol* 1995, **23** : 246-253

Giovannini M, Tagger A, Ribero ML, Zuccotti G, Pogliani L, Grossi A et coll. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus and HIV infections : a possible interaction. *Lancet* 1990, 335 : 1166

Giuberti T, Marin MG, Ferrari C, Marchelli S, Schianchi C, Degli Antoni AM et coll. Hepatitis C virus viremia following clinical resolution of acute hepatitis C. *J Hepatol* 1994, **20 :** 666-671

Gunji T, Kato N, Mori S, Ootsuyama Y, Hijikata M, Imawari M et coll. Correlation between the serum level of hepatitis C virus RNA and disease activities in acute and chronic hepatitis C. *Int J Cancer* 1992, **52** : 726-730

Hibbs J, Frickhofen D, Rosenfeld S, Feinstone F, Kojima S, Bacigalupo A et coll. Aplastic anemia and viral hepatitis : non-A, non-B, non-C. *Hepatology* 1992, **17** : 340-342

Japanese Red Cross non-A, non-B Hepatitis Research Group. Effect of screening for hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody on incidence of post-transfusion hepatitis. *Lancet* 1991, **338 :** 1040-1041

Johnson PJ, Mc Farlane IG. Meeting report : International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993, **18** : 998-1005

Kievits T, Van Gemen B, Van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H et coll. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods* 1991, **35 :** 273-286

Kim JP, Linnen J, Wages J, Shih J, Nakatsuji Y, Fry K et coll. Identification of a new hepatitis virus (HGV) and its implication in post-transfusion hepatitis (abstract). *Hepatology* 1995, **22** : 218A

Kolberg J, Sanchez-Pescador R, Detmer J, Collins M, Sheridan P, Neuwald P et coll. Branched DNA (bDNA) quantitation of hepatitis C viral RNA in patient sera. *In* : Hepatitis C virus : new diagnostic tools. Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP) Eds. Paris : John Libbey Eurotext, 1994, 57-69

Koretz RL, Brezina M, Polito AJ, Quan S, Wilber J, Di Nello R et coll. Non-A, non-B postransfusion hepatitis : comparing C and non-C hepatitis. *Hepatology* 1993, **17 :** 361-365

Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989, **339** : 237-238

Lacour JP, Bodokh I, Castanet J, Bekri S, Ortonne JP. Porphyria cutanea tarda and antibodies to hepatitis C virus. *Br J Dermatol* 1993, **128** : 121-123

Lam JPH, Mc Omish F, Burns SM, Yap PL, Mok JYQ, Simmonds P. Infrequent vertical transmission of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1993, **167** : 572-576

Lamoril J, Lunel F, Laurent-Puig P, Defer C, Loiseau P, Lefrère JJ et coll. Indeterminate third-generation recombinant immunoblot assay in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1994, **21** : 133-134

Lau JYN, Davis GL, Kniffen J, Qian KP, Urdea M, Chan CS et coll. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993, **341** : 1501-1504

Lazizi Y, Elfassi E, Pillot J. Detection of hepatitis C sequences in sera with controversial serology by nested polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992, **30** : 931-934

Lok ASF, Chien D, Choo QL, Chan TM, Chiu KW, Cheng IKP et coll. Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens : comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology* 1993, **18** : 497-502

Lunel F, Cadranel JF, Moussalli J, Perrin M, Ghoussoub JJ, Desruenne M et coll. Delayed anti-HCV antibody seroconversion in 41 heart transplanted patients with non-A, non-B post-transfusion hepatitis (abstract). *J Hepatol* 1991, **13** : S47

Lunel F, Perrin M, Frangeul L, Aumont P, Opolon P, Huraux JM. Sensitivity of third generation Ortho HCV ELISA and RIBA in 143 patients with indeterminate second generation RIBA. *In* : Ortho Diagnostic Systems and Chiron Corporation Eds. Tokyo : *Proceedings of the fourth International Symposium on HCV*, 1993, 72

Lunel F, Perrin M, Frangeul L, Cadranel JF, Huraux JM. Utilité de deux tests de dépistage des anticorps anti-HCV dans le diagnostic des séroconversions chez les patients à risque. *Recueil des résumés du 4ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie*. Tours : Société Française de Microbiologie 1995, JE88

Marcellin P, Boyer N, Martinot-Peignoux M, Areias J, Giostra E, Degott C et coll. Long-term histologic changes and detection of serum HCV-RNA by polymerase chain reaction (PCR) in patients with chronic hepatitis C having responded to recombinant alpha-interferon (abstract). *Hepatology* 1992, **16** : 65A

Martinot M, Marcellin P, Pellet C, Le Breton V, Darthuy F, Rémiré J et coll. Serological assay to determine HCV genotype : comparison with PCR-based HCV genotyping (abstract). *Hepatology* 1995, **22** : 358A

Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Branger M, Gabriel F, Elias A, Larzul D et coll. HCV infection assessed with third-generation anti-HCV testing and

polymerase chain reaction. *In* : Ortho Diagnostic Systems and Chiron Corporation Eds. Tokyo : *Proceedings of the fourth International Symposium on HCV*, 1993, 70

Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M et coll. Pretreatment serum HCV RNA levels and HCV genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995, **22 :** 1050-1056

Mc Farlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis : pathogenic factor or false-positive result ? *Lancet* 1990, **335 :** 754-757

Mc Hutchison JG, Kuo G, Houghton M, Choo QL, Redeker AG. Hepatitis C virus antibodies in acute icteric and chronic non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterology* 1991, **101 :** 1117-1119

Mc Omish F, Chan SW, Dow BC, Gillon J, Frame WD, Crawford FJ et coll. 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* 1993, **33 :** 7-13

Michieletto L, Pipan C, Bibiani S, Tempesta D, Botta GA, D'Aquino M. Value of HCV RNA as a predictive long-term response tool in patients with chronic hepatitis treated with interferon (abstract). *Proceedings of the 1993 International Symposium on Viral hepatitis and Liver Disease* (the 8th Triennial Congress). Tokyo : 1993, 246

Müller HM, Pfaff E, Goeser T, Kallinowski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* 1993, **74 :** 669-976

Nolte FS, Thurmond C, Fried MW. Preclinical evaluation of Amplicor hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1995, **33 :** 1775-1778

Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Bréchot C et coll. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995, **122 :** 161-168

Novati R, Thiers V, D'Arminio Monforte A, Maisonneuve P, Principi N, Conti M et coll. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1992, **165 :** 720-723

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C et coll. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N Engl J Med* 1994, **330 :** 744-750

Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y et coll. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers : application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992, **73** : 673-679

Paterlini P, Driss F, Pisi E, Franco D, Berthelot P, Bréchot C. Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HBsAg negative patients : a study of a low endemic area. *Hepatology* 1993, **17** : 20-29

Pawlotsky JM, Fleury A, Choukroun V, Deforges L, Roudot-Thoraval F, Aumont P et coll. Significance of highly positive c22-3 « indeterminate » second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay (RIBA) and resolution by third generation HCV RIBA. *J Clin Microbiol* 1994a, **32 :** 1357-1359

Pawlotsky JM, Ben Yahia M, André C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F et coll. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis : a prospective case-control study. *Hepatology* 1994b, **19 :** 841-848

Pawlotsky JM, Marcellin P, Trépo C, Dhumeaux D. Traitement des hépatites virales C. *Gastroenterol Clin Biol* 1994c, **18 :** 362-373

Pawlotsky JM, Maisonneuve P, Duval J, Dhumeaux D, Noel L. Significance of NS5 « indeterminate » third-generation anti-hepatitis C virus serologic assays. *Transfusion* 1995a, **35** : 453-454

Pawlotsky JM, Rémiré J, Darthuy F, Intrator L, Udin L, Dhumeaux D et coll. Is the detection of anti-hepatitis C virus core IgM influenced by the presence of serum rheumatoid factor ? *J Med Virol* 1995b, **45 :** 68-70

Pawlotsky JM, Darthuy F, Rémiré J, Pellet C, Udin L, Stuyver L et coll. Significance of anti-hepatitis C virus core IgM antibodies in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1995c, **47 :** 285-291

Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J et coll. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995d, **171** : 1607-1610

Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Aumont P, Darthuy F, Rémiré J et coll. Influence of hepatitis C virus (HCV) genotypes on HCV recombinant immunoblot assay patterns. *J Clin Microbiol* 1995e, **33 :** 1357-1359

Pawlotsky JM, Dussaix E, Simmonds P, Prescott L, Pellet C, Laurent-Puig P et coll. Hepatitis C virus (HCV) genotype determination : genotyping versus serotyping (abstract). *Hepatology* 1995f, **22** : 358A

Pawlotsky JM, Lunel F, Zarski JP, Laurent-Puig P, Bréchot C. Diagnostic biologique des infections par le virus de l'hépatite C. Place des tests sérologiques et moléculaires. *Gastroentérol Clin Biol* 1996a, **20** : 146-161

Pawlotsky JM, Bastie A, Pellet C, Rémiré J, Darthuy F, Wolfe L et coll. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay (RIBA). *J Clin Microbiol* 1996b, **34** : 80-83

Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Darthuy F, Rémiré J, Métreau JM et coll. Factors affecting treatment responses to interferon-alpha in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1996c, **174** : 1-7

Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pellet C, Duval J, Dhumeaux D. Are hepatitis C virus genotypes 1a and 1b so different ? *Hepatology* 1996d, **23** : 1289-1291

Peters T, Mohr L, Scheiffele F, Schlayer HJ, Preisler S, Berthold H et coll. Antibodies and viremia in acute post-transfusion hepatitis C : a prospective study. *J Med Virol* 1994, **42 :** 420-427

Pol S, Driss F, Devergie A, Bréchot C, Berthelot P, Gluckman E. Is hepatitis C virus involved in hepatitis-associated aplastic anemia. *Ann Intern Med* 1990, **113 :** 435-437

Pol S, Jaffredo F, Nalpas B, Sayada C, Berthelot P, Bréchot C. Predictive value of HCV viremia after 3 months in the monitoring of antiviral treatments (abstract). *Hepatology* 1994, **20 :** 159A

Pol S, Thiers V, Nousbaum JB, Legendre C, Berthelot P, Kreis H, Bréchot C. The changing relative prevalence of hepatitis C virus genotypes : evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. *Gastroenterol* 1995, **108** : 581-583

Poterucha J, Rakela J, Lumeng L, Lee C, Taswell H, Weisner R. Diagnosis of chronic hepatitis C after liver transplantation by the detection of viral sequences with polymerase chain reaction. *Hepatology* 1992, **15 :** 42-45

Prince AM, Brotman B, Inchauspé G, Pascual D, Nasoff M, Hosein B et coll. Patterns and prevalence of hepatitis C virus infection in posttransfusion non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis* 1993, **167 :** 1296-1299

Puoti M, Zonaro A, Ravaggi A, Marin MG, Castelnuovo F, Cariani E. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992, **16 :** 877-881

Qu D, Hantz O, Gouy M, Vitvitski L, Li JS, Berby F et coll. Heterogeneity of hepatitis C virus genotypes in France. *J Gen Virol* 1994, **75 :** 1063-1070

Ragni MV, Ndimbie OK, Rice EO, Bontempo FA, Nedjar S. The presence of hepatitis C virus (HCV) antibody in human immunodeficiency virus-positive hemophilic men undergoing HCV « seroreversion ». *Blood* 1993, **82 :** 1010-1015

Romeo R, Pol S, Berthelot P, Bréchot C. Eradication of hepatitis C virus RNA after alpha-interferon therapy. *Ann Intern Med* 1994, **121 :** 276-277

Romeo R, Pol S, Demeret C, Thiers V, Kremsdorf D, Cuillerier E et coll. Evidence of non-A, non-B, non-C infection in chronic hepatitis by polymerase chain reaction testing for hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1995, **22 :** 125-129

Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Thiers V, Deforges L, Girollet PP, Guillot F et coll. Lack of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-seronegative women : a prospective study with hepatitis C virus RNA testing. *Hepatology* 1993, **17 :** 772-777

Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et coll. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 1985, **230 :** 1350-1354

Saracco G, Rosina F, Abate ML, Chiandussi L, Gallo V, Cerutti E et coll. Long term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with different doses of interferon alpha-2b. *Hepatology* 1993, **18 :** 1300-1305

Serfaty L, Chazouillères O, Pawlotsky JM, Andréani T, Pellet C, Poupon R. Interferon alpha therapy in patients with chronic hepatitis C and persistently normal aminotransferase activity. *Gastroenterology* 1996, **110** : 291-295

Shieh YSC, Shim KS, Lampertico P, Balart LA, Jeffers LJ, Thung SN et coll. Detection of hepatitis C virus sequences in liver tissue by the polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1991, **65 :** 408-411

Shindo M, Di Bisceglie AM, Biswas R, Mihalik K, Feinstone SM. Hepatitis C replication during acute infection in the chimpanzee. *J Infect Dis* 1992, **166** : 424-427

Silini E, Bono F, Cividini A, Cerino A, Maccabruni A, Tinelli C et coll. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995, **22** : 691-695

Silini E, Borrelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME, Brambilla S, Bono F et coll. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis : a case-control study. *Gastroenterol* 1996, **111** : 199-205

Sillekens P, Kok W, Van Gemen B, Lens P, Huisman H, Cuypers T et coll. Specific detection of HCV RNA using NASBA as a diagnostic tool. *In* : Hepatitis C virus : new diagnostic tools. Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), ed. Paris : *John Libbey Eurotext*, 1994, 71-82

Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, Mc Omish F, Dow BC et coll. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS4 region of hepatitis C virus (HCV) : use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol* 1993, **31 :** 1493-1503

Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995, **21 :** 570-583

Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG et coll. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Med* 1995, **1 :** 564-569

Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H et coll. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993, **74 :** 1093-1102

Tacke M, Kiyosawa K, Stark K, Schluter V et coll. Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 1997, **349** : 318-320

Takehara T, Hayashi NR, Mita E, Hagiwara H, Ueda K, Katayama K et coll. Detection of the minus strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction : implications for hepatitis C virus replication in infected tissue. *Hepatology* 1992, **15 :** 387-390

Thaler MM, Park CK, Landers DV, Wara DW, Houghton M, Veereman-Wauters G et coll. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1991, **338 :** 17-18

Thiers V, Lunel-Fabiani F, Valla D, Azar N, Fretz C, Frangeul L et coll. Post-transfusional anti-HCV negative non-A, non-B hepatitis (II) : serological and polymerase chain reaction analysis for hepatitis C and hepatitis B viruses. *J Hepatol* 1993, **18 :** 34-39

Van der Poel CL, Reesink HW, Lelie PN, Leentvaar-Kuypers A, Choo QL, Kuo G et coll. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. *Lancet* 1989, **2 :** 297-298

Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee C et coll. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990, **335 :** 1-3

Wejstal R, Hermodsson S, Iwarson S, Norkrans G. Mother to infant transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1990, **30 :** 178-180

Wolfe L, Tamatsukuri S, Sayada C, Ryff JC. Detection of HCV RNA in serum using a single-tube, single-enzyme PCR in combination with a colorimetric microwell assay. *In* : Hepatitis C virus : new diagnostic tools. Groupe Français d'Etudes Moléculaires des Hépatites (GEMHEP), ed. Paris : John Libbey Eurotext, 1994, 83-94

Wong DC, Diwan AR, Rosen L, Gerin JL, Johnson RG, Polito A et coll. Non-specificity of anti-HCV test for seroepidemiological analysis. *Lancet* 1990, **336 :** 750-751

Young KKY, Resnick RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993, **31 :** 882-886

Yuki N, Hayashi N, Hagiwara H, Takehara T, Oshita M et coll. Serodiagnosis of chronic hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *J Hepatol* 1993, **17** : 170-174

Zaaijer HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993, **341 :** 722-724

Zignego A, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzeti M, Foschi M et coll. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992, **15 :** 382-386