

VHC - MARQUEURS

Un nouveau test quantitatif pour le VHC

Michelle Martinot-Peignoux

Inserm U481, hôpital Beaujon (Clichy)

**Clinical utility
of total HCV
core antigen
quantification
: a new
indirect
marker of
HCV
replication**
Bouvier-Alias
M., Patel K.,
Dahari H.,
Beaucourt S.,
Larderie P.,
Blatt L.,
Hezode C.,
Picchio G.,
Dhumeaux D.,
Neumann
A.U.,
McHutchison
J.G.,
Pawlotsky
J.-M.
Hepatology,
2002, 36,
211-218

Limitée par son manque de sensibilité, une nouvelle technique de quantification du VHC ne peut être utilisée pour le suivi sous traitement, mais reste une option pour les dons du sang et les laboratoires ne pouvant s'appuyer sur des techniques moléculaires complexes.

Avec 150 millions de personnes infectées dans le monde, l'hépatite C est une cause importante de maladie chronique du

foie. Des études récentes ont montré que 35% à 60% des patients recevant une bithérapie interféron (IFN) ou IFN pégylé associé à la ribavirine ont une éradication virale complète dans le sérum. Ces études ont montré que certains facteurs étaient associés à une meilleure probabilité de réponse au traitement. Parmi ces facteurs figurent le jeune âge, le sexe féminin, et surtout un génotype 2 ou 3 et une faible charge virale VHC¹.

Un traitement de 24 semaines par bithérapie est suffisant pour obtenir une réponse prolongée chez les patients ayant une faible charge virale (< 800 000 unités internationales par millilitre [UI/ml]). Ce traitement doit être de 48 semaines chez les patients avec une forte charge virale (> 800 000 UI/ml) principalement lorsqu'ils sont infectés par un génotype 1 ou 4². Il a également été récemment rapporté qu'une diminution de 2 log (un facteur 100) de la charge virale à 4 semaines de traitement avait une forte valeur prédictive positive de réponse complète prolongée au traitement (> 80%; résultats personnels, congrès de l'association américaine pour l'étude du foie [AASLD] 2002).

Enfin, la conférence de consensus sur le traitement de l'hépatite C qui s'est tenue à Paris en février 2002 recommande un traitement de 24 semaines avec la bithérapie IFN pégylé + ribavirine pour les infections liées à un génotype 2 ou 3 et de 48 semaines pour les infections liées à un génotype 1 ou 4.

Cependant si, à la 12^e semaine de traitement, la charge virale n'a pas diminué de 2 log (un facteur 100), le traitement peut être arrêté en raison de la forte probabilité d'échec thérapeutique.

Ainsi, le monitoring de la charge virale pendant les premiers mois de traitement pourrait permettre d'optimiser un traitement souvent mal toléré par les patients et de surcroît très onéreux.

La mesure de la charge virale sérique est donc importante avant le début d'un traitement mais également pendant celui-ci afin de permettre un suivi optimisé des patients. Elle doit donc être spécifique, reproductible, exacte et standardisée afin de permettre la comparaison entre les essais thérapeutiques.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a établi un étalon international (UI/ml d'ARN-VHC) pour la standardisation universelle de la quantification du VHC. Cet étalon permet une meilleure comparaison des différents tests disponibles.

La mesure de la charge virale se fait de deux manières :

- Par des techniques fondées sur une amplification compétitive de l'ARN viral avec un ARN synthétique dont une quantité connue est ajoutée à l'échantillon au début de la réaction. La charge virale est calculée en fonction d'une courbe étalon établie en parallèle. Ces techniques ont une sensibilité de 600 UI/ml d'ARN-VHC avec un intervalle de quantification de faible amplitude (600 - $0,5 \times 10^6$ UI/ml d'ARN-VHC). Cela implique

une étape préalable de dilution pour un nombre important d'échantillons.

- Par la technique de l'amplification du signal, ou méthode des "ADN branchés", qui permet la détection directe sans amplification de faibles quantités d'ARN viral après hybridation sur un support solide. La sensibilité est de 615 UI/ml d'ARN-VHC avec une large amplitude de quantification (615 - $7,7 \times 10^6$ UI/ml d'ARN-VHC).

L'article de Bouvier-Alias et coll. publié dans *Hepatology* rapporte une nouvelle technique de quantification du VHC. L'originalité de cette technique est la quantification directe de l'antigène (Ag) de capsid du VHC. Le génome du virus de l'hépatite C est composé d'un génome ARN entouré d'une capsid et enveloppé. Il y a quelques années, cette technologie aurait été présentée comme une avancée majeure dans le diagnostic des hépatites chroniques C, aujourd'hui elle représente un ajout à des techniques de biologie moléculaire, pour la détection de l'ARN-VHC, plus sensibles et standardisées. Ce test comporte une étape préliminaire de dissociation des complexes antigènes-anticorps, suivie d'une incubation en microplaque dont les puits sont tapissés d'anticorps monoclonaux et, enfin, d'une mise en présence de conjugué puis de substrat. Les résultats exprimés en picogrammes/ml (pg/ml) d'antigène de la capsid du VHC, sont calculés en fonction de la dilution en série d'un standard contenant 400 pg/ml d'antigène de la capsid du VHC.

L'évaluation et le calibrage de ce test réalisés en comparant les résultats de 392 échantillons auparavant quantifiés avec la technique de l'ADN branché (Versant[®] ARN VHC 3.0 Assay (bDNA), Bayer DS)³, montrent une bonne corrélation entre les deux techniques ($r = 0,92$; $p \leq 0,0001$). De ces résultats, les auteurs extrapolent une équivalence entre pg/ml et ARN-VHC UI/ml : 1 pg d'antigène de la capsid du VHC serait équivalent à 8000 UI/ml d'ARN-VHC. Ce résultat est beaucoup plus contestable. En effet, l'équivalence entre pg/ml et UI/ml aurait dû être évaluée avec des dilutions du standard OMS directement quantifiées par le test d'antigène de la capsid du VHC.

Les résultats montrent de bonnes spécificité (99,2%) et reproductibilité (98%) bien que la reproductibilité inter-laboratoires ne soit pas évaluée.

L'étude de sensibilité et de linéarité semble plus problématique. En effet, pour cette étude, les auteurs ont utilisé un panel OMS de 50, 500, 5 000, 50 000, 200 000, 500 000 et 2 000 000 UI/ml d'ARN-VHC. Chaque dilution a été mesurée 10 fois. Seuls les échantillons calibrés à 200 000, 500 000 et 2 000 000 UI/ml

d'ARN-VHC ont été détectés de façon reproductible. L'échantillon calibré à 50 000 UI/ml d'ARN-VHC a été détecté 1 fois sur 10. Les autres dilutions n'étaient pas détectables. Ce résultat indique que la sensibilité du test se situe entre 50 000 et 200 000 UI/ml d'ARN-VHC. La conclusion des auteurs rapportant une sensibilité de 20 000 UI/ml d'ARN-VHC semble donc un peu optimiste. En ce qui concerne la linéarité, les auteurs ne précisent pas si certains échantillons ont nécessité une dilution.

Comme citée ci-dessus, la dynamique virale en début de traitement permet d'évaluer la probabilité d'une réponse à un traitement. Une étude clinique réalisée dans cette même étude confirme que le manque de sensibilité du test ne permet pas le suivi des patients même pendant les toutes premières semaines de traitement.

Au total, ce test vient en complément des tests moléculaires déjà disponibles pour la détection de l'ARN du VHC. Il peut être une option pour les laboratoires qui n'ont pas encore mis en place de techniques de biologie moléculaire, pour les tests de don du sang (lors de la phase aiguë, lorsque les anticorps ne sont pas encore présents) et pour les pays où l'utilisation de techniques moléculaires complexes n'est pas envisageable.

Il est dommage que les résultats n'aient pas été d'emblée exprimés en UI/ml d'ARN-VHC, évitant ainsi la confusion avec les tests déjà disponibles.

1 - Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M et al.

"HCV genotype and pretreatment serum HCV RNA level are the main and independent prognosis factors of sustained response to alpha interferon in chronic hepatitis C"

Hepatology, 1995, 22, 1050-5

3 - Trimoulet P, Halfon P, Pohier E et al.

"Evaluation of the VERSANTR HCV RNA 3.0 Assay for quantification of hepatitis C virus RNA in serum"

J Clin Microbiol, 2002, 40, 2031-6

2 - Poynard T, Marcellin P, Lee SS et al.

"Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirine for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus"

Lancet, 1998, 352, 1426-32