

Le parvovirus B19 et l'hématopoïèse

Le parvovirus B19 est un virus à ADN simple brin positif ou négatif qui, *in vivo* et *in vitro*, est infectieux et cytolytique pour les érythroblastes et leurs précurseurs. L'infection par cet agent, de malades souffrant d'hémolyse chronique est à l'origine de grandes crises d'érythroblastopénie avec anémie importante. De sévères atteintes fœtales ont aussi été observées chez des femmes enceintes infectées. La maladie est, normalement, spontanément résolutive en une quinzaine de jours mais peut entraîner, chez des sujets immunodéprimés, une érythroblastopénie chronique, parfois associée à une atteinte des autres lignées des cellules sanguines.

Frédéric Morinet
Gil Tchernia

Le parvovirus B19 a été découvert simultanément en France et en Angleterre en 1975 [1, 2]. On a pu ensuite lui attribuer, en 1981 puis en 1983, la responsabilité de deux affections connues respectivement depuis 1948 et 1905 : l'une hématologique, l'érythroblastopénie aiguë, observée au cours des hémolyses chroniques ; l'autre dermatologique, l'exanthème infectieux ou 5^e maladie, bien connue des pédiatres. Depuis, l'implication possible de ce virus en pathologie hématologique, mais aussi obstétricale, rhumatologique et cardiologique ne cesse de croître. Son importance est probablement encore sous-estimée. Nous nous limiterons aux manifestations hématologiques avec une description du virus et des méthodologies diagnostiques.

Érythroblastopénie transitoire et hémolyse constitutionnelle

Chez les sujets atteints d'hyperhémolyse par anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine ou de la membrane du globule rouge, on a décrit — dès

1948 — des épisodes transitoires d'accentuation brutale de l'anémie qui cesse alors d'être régénérative. Ces épisodes qui concernent surtout des enfants surviennent par petites épidémies, dans les pays où l'incidence des hémoglobinopathies est importante, ou simultanément chez les membres d'une fratrie. Au taux très bas de réticulocytes correspond une moelle dont la richesse normale contraste avec l'absence ou la rareté des érythroblastes. Ceux-ci sont de grande taille et très immatures. La répétition des myélogrammes montrerait le retour en quelques jours d'une érythropoïèse vigoureuse et équilibrée qui permet la restauration d'un taux élevé de réticulocytes. Les récidives sont exceptionnelles. Le mécanisme de la majoration de l'anémie est simple : chez des sujets dont les globules rouges pathologiques ont une durée de vie anormalement brève, existe en permanence une érythropoïèse médullaire accrue qui tente de compenser les pertes. Une érythroblastopénie transitoire rompt l'équilibre : la production, soudain, cesse de contrebalancer la destruction.

En 1975, lors de la recherche de l'antigène HBs chez les donneurs de sang (*Public Health Laboratory Service,*

ADRESSES

F. Morinet : maître de conférence des universités. Laboratoire de bactériologie-virologie, hôpital Saint-Louis, 2, place Docteur-Alfred-Fournier, 75010 Paris, France.

G. Tchernia : professeur, praticien hospitalier. Laboratoire d'hématologie, hôpital Bicêtre, 78, rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.

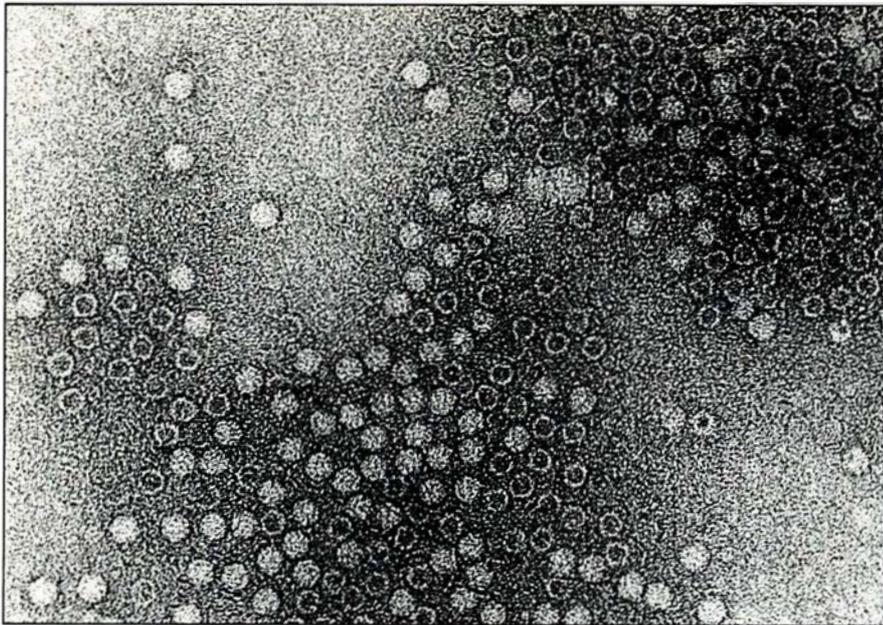


Figure 1. **Agrégats de particules virales B 19 dans un sérum humain.** Immuno-microscopie électronique ($\times 200\ 000$). (Cliché Dr Ferchal, service de bactériologie-virologie, hôpital Saint-Louis.)

Londres), des résultats discordants sont observés pour 9 sérums. Les résultats positifs obtenus par électro-immunodiffusion, qui fait appel à l'emploi d'anticorps polyclonaux, ne sont pas confirmés par radio-immunologie, technique qui utilise des anticorps monoclonaux. L'examen de ces 9 sérums par immunomicroscopie électronique met en évidence des agrégats de particules rondes, non enveloppées, de diamètre 20 nm (figure 1), dont la morphologie évoque un parvovirus. La constante de sédimentation de la particule est de 110 S, sa densité de 1,39 à 1,45 g/cm³. Ce virus fut appelé successivement SPLV (*serum parvovirus-like virus*), HPV (*human parvovirus*) puis B 19, initiales identifiant la poche de sang où il fut trouvé pour la première fois. Précisons d'emblée qu'il ne présente aucune parenté antigénique avec des *parvovirus like* isolés dans les selles lors d'épisodes de gastro-entérite ni avec un parvovirus mis en évidence à une seule occasion dans le liquide synovial de sujets présentant une polyarthrite rhumatoïde.

Ce n'est qu'en 1981 que le parvovirus B 19 est, pour la première fois, mis en accusation par Pattison [3],

qui lui attribue la responsabilité d'épisodes d'érythroblastopénie chez six jeunes drépanocytaires dont trois appartiennent à la même fratrie. On retrouve en effet des particules virales évoquant le parvovirus dans le sérum de deux des sujets au moment de l'accentuation de l'anémie et, chez tous ces malades, l'anticorps spécifique du virus. Quelques mois plus tard, Serjeant envoie à Pattison les sérums de 28 enfants jamaïcains drépanocytaires âgés de moins de 8 ans, prélevés à l'occasion d'une accentuation de leur anémie, contemporaine d'une réticulocytopénie : chez 24 des 28, on aura la preuve d'une primo-infestation par le parvovirus [4]. Dans les années suivantes, la primo-infestation par le parvovirus B 19 va apparaître comme le facteur responsable de la plupart des érythroblastopénies transitoires observées au cours des hémolyses chroniques constitutionnelles, quelle qu'en soit la nature. L'anémie hémolytique chronique n'est pas la seule cible du parvovirus B 19. Toute anémie peut être aggravée par l'érythroblastopénie, qu'il s'agisse des anémies hémolytiques auto-immunes, de l'anémie par carence martiale ou des anémies

hémorragiques. La primo-infestation virale, en dehors de l'érythroblastopénie, est discrète ou inapparente [5]. On retrouve parfois la notion de fièvre, d'asthénie, de courbatures. En revanche, mégalérythème et arthralgies ne surviennent que plusieurs jours après l'érythroblastopénie. La question suivante fut de savoir si le parvovirus B 19 avait une action sur l'hématopoïèse des sujets normaux. En 1985, Anderson [6] inocule par voie nasale des particules de parvovirus B 19 à des volontaires sains dépourvus d'anticorps spécifiques et observe une réponse typique de primo-infection virale : une virémie survient 8 jours après l'infestation et précède l'apparition d'IgM puis d'IgG anti-B 19. Les signes systémiques évoluent en deux vagues comportant, au moment de la virémie et de l'apparition des IgM, des courbatures, une sensation de malaise, une fébricule et, 17-18 jours après l'inoculation, chez certains, des rashes cutanés et des douleurs articulaires. Ces dernières manifestations, contemporaines de l'apparition des IgG, seraient liées aux complexes immuns. Enfin, les signes hématologiques concernent surtout la lignée érythroblastique, mais aussi les autres lignées : une réticulocytopénie persiste du 8^e-10^e jusqu'au 17^e jour et on observe une diminution significative mais discrète des polynucléaires, des lymphocytes et des plaquettes (figure 2, p. 129).

Hématopoïèse in vitro et parvovirus B 19

Après cette expérimentation humaine, d'ailleurs discutable, le parvovirus B19 va être étudié dans les laboratoires de culture de cellules hématopoïétiques.

Le sérum des malades atteints d'hémolyse chronique, recueilli au début d'une érythroblastopénie aiguë liée au parvovirus B 19, diminue, le rendement des cultures de progéniteurs érythroblastiques [7] (figure 3, p. 129). L'inhibition est spécifique de la lignée érythroblastique et ne concerne ni les colonies granulomonocytaires, ni les colonies « mixtes » issues de progéniteurs plus précoces. Les colonies érythroblastiques issues de progéniteurs matures

(CFU-E) sont plus sensibles à l'inhibition que les colonies issues de progéniteurs plus immatures (BFU-E) : le pouvoir inhibiteur s'exerçant sur les cellules dépendantes de l'érythropoïétine augmente avec les doses d'érythropoïétine jusqu'au plateau de

stimulation optimale (figure 4, p. 130) et n'est pas influencé par les autres facteurs de croissance hématopoïétique [8]. Il ne dépend pas des cellules accessoires médullaires, non hématopoïétiques, introduites dans le système de culture en même temps

que les progéniteurs : on peut en effet reproduire l'inhibition sur une population érythroblastique pure obtenue par repiquage précoce des cellules issues *in vitro* des BFU-E. Cette inhibition, ne dépend pas des immunoglobulines mais d'une action virale directe et se traduit par un effet cytopathique visible en 24-48 heures en microscopie électronique : les érythroblastes contiennent des particules virales et sont altérés, comme le prouve la présence de vacuoles cytoplasmiques, d'anomalies mitochondriales et nucléaires [9]. Le sérum de convalescent est protecteur : il permet de réduire ou d'annuler l'effet cytopathique et l'inhibition de la culture *in vitro* des progéniteurs érythroïdes. La spécifi-

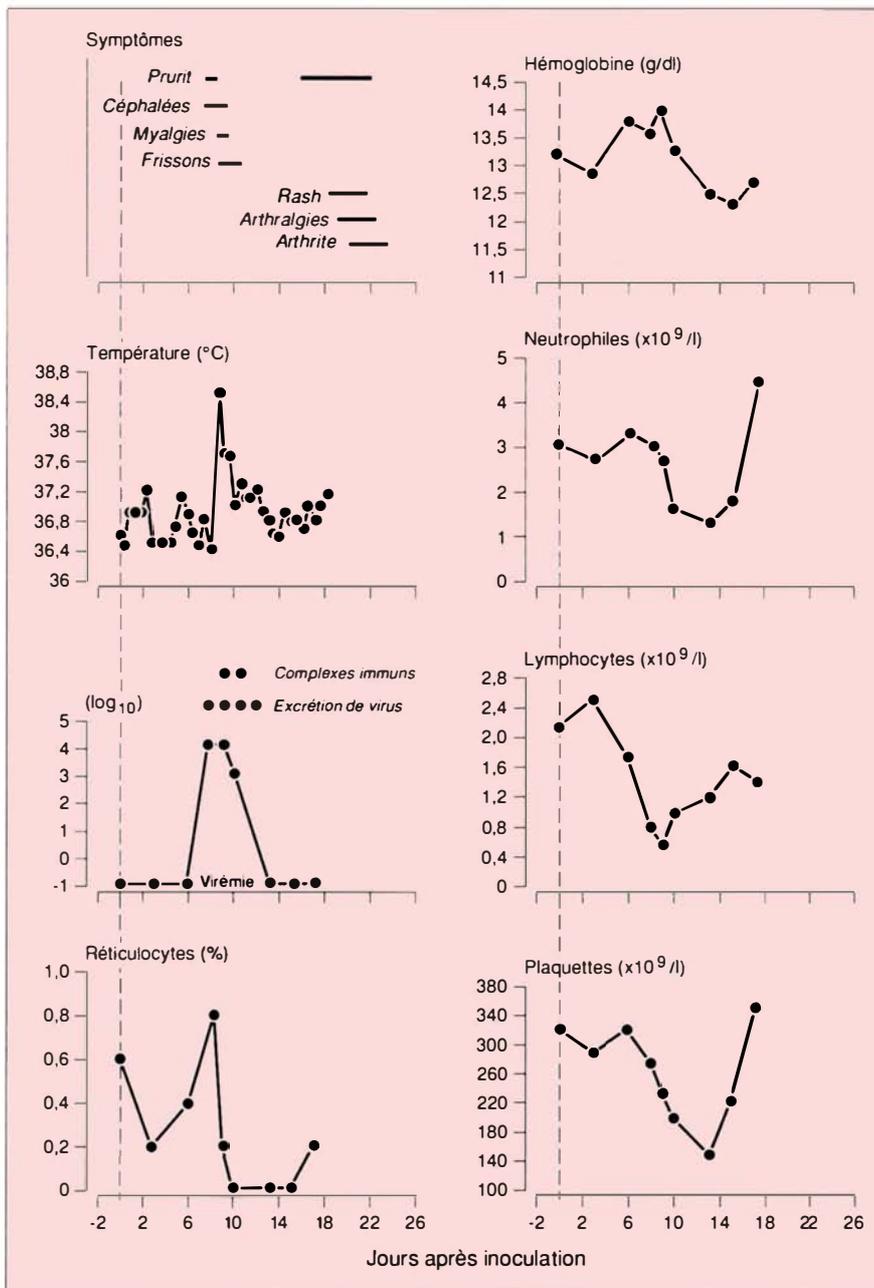


Figure 2. **Évolution chez l'homme des principaux signes cliniques, de la virémie et du taux des principales cellules sanguines après infestation expérimentale par le parvovirus B 19.** (D'après Anderson et al. [7].)

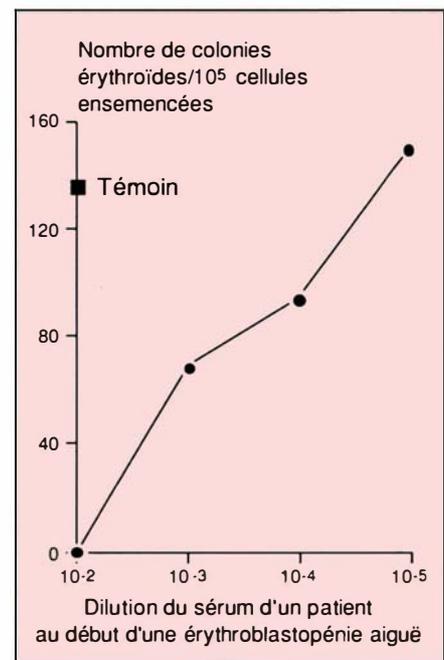


Figure 3. **Inhibition par le sérum d'un sujet infecté du rendement d'une culture *in vitro* d'érythroblastes.** Inhibition du rendement (exprimé en nombre de colonies pour 10⁵ cellules ensemencées) d'une culture de progéniteurs érythroblastiques matures (CFU-E) issus d'une moelle de sujet normal, préalablement incubée avec des dilutions croissantes de sérum d'un sujet atteint de sphérocytose héréditaire et prélevé lors d'une érythroblastopénie aiguë. Dans l'expérience témoin (■) les cultures sont faites avec une dilution (10⁻²) de sérum du sujet normal. (D'après Mortimer et al. [7].)

RÉFÉRENCES

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975 ; 1 : 72-3.
2. Couroucé AM, Ferchal F, Morinet F, *et al.* Parvovirus (SPLV) et antigène Aurillac. Étude de 18 observations. *Rev Franc Transf Immuno-Hematol* 1984 ; 27 : 5-19.
3. Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, *et al.* Parvovirus infection and hypoplastic crisis in sickle cell anaemia. *Lancet* 1981 ; 1 : 664-5.
4. Serjeant GR, Topley JM, Mason K, *et al.* Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* 1981 ; 2 : 595-7.
5. Blacklock HA, Mortimer PP. Aplastic crisis and other effects of the human parvovirus infection. *Clin Haematol* 1984 ; 13 : 679-91.
6. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, *et al.* Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 1985 ; 152 : 257-65.
7. Mortimer PP, Humphries RK, Moore JG, Purcell RH, Young NS. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation *in vitro*. *Nature* 1983 ; 302 : 426-9.
8. Takahashi T, Ozawa K, Takahashi K, Asano S, Takaku F. Susceptibility of human erythropoietic cells to B 19 parvovirus *in vitro* increases with differentiation. *Blood* 1990 ; 75 : 603-10.
9. Young N, Harrison M, Moore J, Mortimer P, Humphries RK. Direct demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected *in vitro*. *J Clin Invest* 1984 ; 74 : 2024-32.
10. Astell CR, Blundell MC. Sequence of the right hand terminal palindrome of the human parvovirus B 19 genome has the potential to form a « stem plus arms » structure. *Nucleic Acids Res* 1989 ; 17 : 5857.
11. Berns KI, Hauswirth WW. Adeno associated virus DNA structure and replication. In : Berns KI, ed. *The Parvoviruses*. New York-London : Plenum Press, 1984 : 16-20.
12. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Replication of the B 19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* 1986 ; 233 : 883-6.

cité très particulière du virus pour les érythroblastes et leurs progéniteurs va fournir un moyen de culture mais poser des problèmes techniques difficiles : le virus se développe dans les cultures d'érythroblastes, mais diminue leur rendement de 50 à 90 %. Par ailleurs, les tentatives de culture sur des lignées érythroblastiques dérivées de leucémie humaine ont pour le moment échoué.

Les résultats des cultures de progéniteurs érythroblastiques obtenus à

partir des populations cellulaires médullaires ou sanguines prélevées chez des patients infectés ont donné des résultats beaucoup plus hétérogènes qui varient considérablement avec le moment des prélèvements par rapport à celui de l'infestation. Le taux de clonage peut être normal, abaissé ou supérieur à la normale. Ces faits traduisent probablement différents états correspondant à la succession des réponses de l'organisme : réponse immune à l'agression virale,

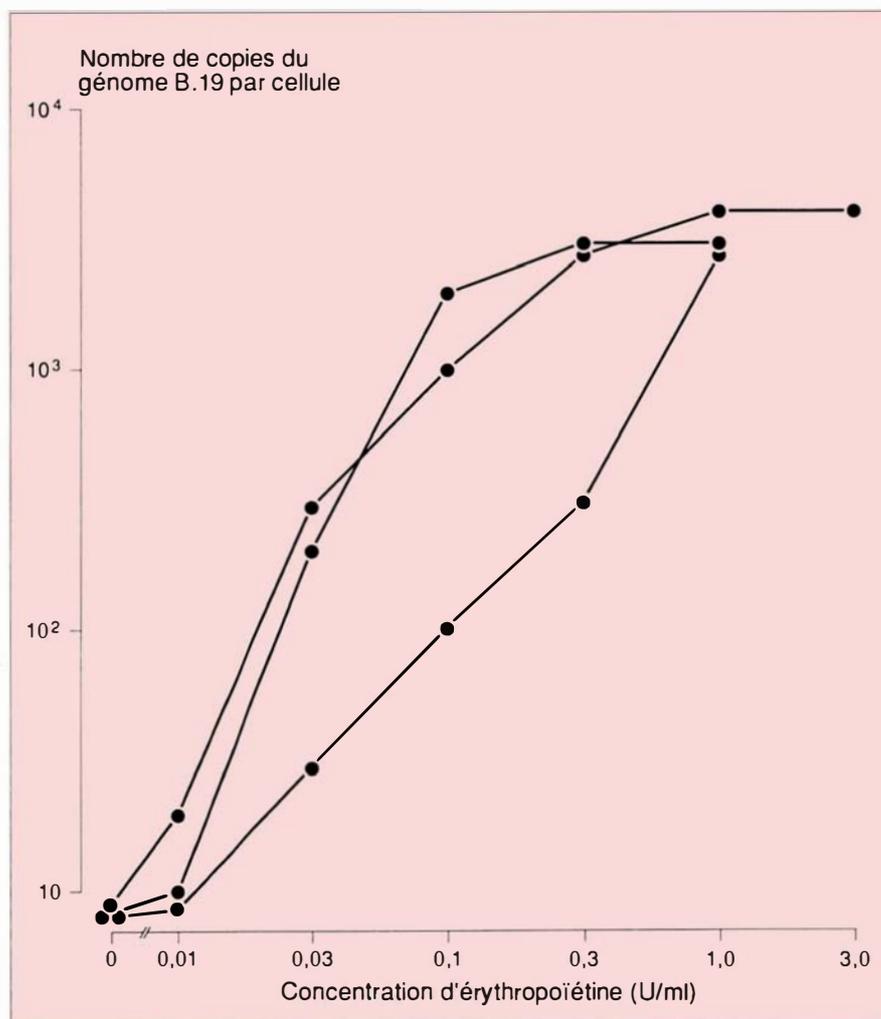


Figure 4. **Propagation in vitro du parvovirus B 19.** La propagation in vitro du parvovirus B 19 est dépendante des concentrations d'érythropoïétine : des cellules médullaires normales, préalablement incubées avec du sérum de sujets virémiques, sont cultivées en présence de concentrations variables d'érythropoïétine recombinante. Après cinq jours de culture, on mesure le nombre de copies du génome viral par cellule (Expériences réalisées avec le sérum de trois malades différents.) (D'après Takahashi et al. [8].)

réponse à l'anémie et à l'atteinte des progéniteurs. Enfin, il faut noter que si l'on ne retrouve pas d'ADN viral dans les colonies granulomonocytaires *in vitro*, on peut le retrouver dans les granulocytes matures circulants ou médullaires.

Le génome viral et sa réplication

Chaque particule infectieuse de B 19 contient une copie d'ADN simple brin linéaire de 5,4 kb de long, de polarité positive ou négative. Lorsqu'on extrait l'ADN des particules virales, les brins de polarité complémentaire se réassocient et l'on observe, après migration en gel d'agarose, une bande ayant la mobilité d'une molécule d'ADN double brin de 5,4 kpb.

Comme les autres parvovirus, le génome du B19 a des extrémités 3' et 5' qui s'autohybrident sur elles-mêmes en raison de l'existence de séquences complémentaires riches en GC. La séquence d'environ 230 nucléotides de l'extrémité 5' du génome viral, récemment établie, peut adopter une conformation cru-

ciforme (figure 5) [10]. Les sites agissant en *cis* sur le déclenchement de la réplication de l'ADN sont situés au niveau des palindromes. Les extrémités identiques et inversées du B 19 le rapproche des parvovirus défectueux (AAV = *adeno associated virus*) [11], mais la réplication se fait sans l'aide de virus auxiliaires, ce qui l'assimile aux parvovirus autonomes des animaux.

Le schéma proposé de la réplication virale est emprunté à celui des AAV (figure 6, p. 133).

A partir de cultures d'érythroblastes infectés par le virus B 19, l'hybridation avec une sonde spécifique de l'ADN viral montre que la concentration en particules virales est 10 fois plus importante dans les cellules que dans le surnageant, qui est cependant infectant pour des cellules érythroblastiques fraîches, 20 fois plus importante dans le noyau que dans le cytoplasme et 100 fois plus importante dans une population enrichie en érythroblastes que dans la population médullaire native. On retrouve environ 5 000 copies du génome viral par érythroblaste infecté [12].

La variabilité des sites de coupure

pour les enzymes de restriction sur différentes souches de B 19 isolées à des périodes et en des lieux différents a été étudiée : cinq groupes génotypiques peuvent être distingués, mais aucune corrélation n'a pu être faite entre un profil de restriction donné et une symptomatologie clinique [13].

A stringence modérée, il n'a pas été observé d'hybridation croisée entre le génome du parvovirus B 19 et ceux d'autres parvovirus autonomes ou défectueux.

A partir de cellules infectées, il est possible de visualiser la réplication virale par hybridation moléculaire. Deux types de population d'ADN peuvent être coupés par l'enzyme de restriction Bam H1 : des génomes viraux complémentaires réassociés et des formes répliquatives double brin (figure 7, p. 134) [14].

Protéines non structurales

La majeure partie (90 %) du brin de polarité positive est codante et possède des régions ouvertes de lecture dans les trois phases (figure 8, p. 135), ce qui est également le cas des autres parvovirus.

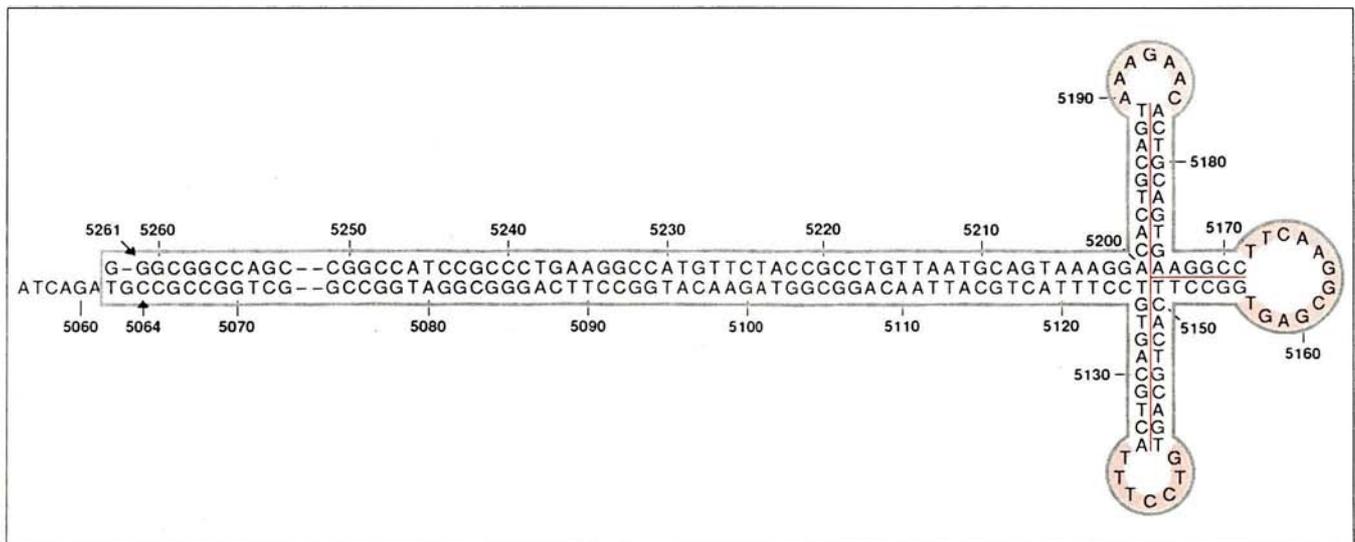


Figure 5. Configuration et séquence de l'extrémité droite du génome B 19. Un palindrome est formé du nucléotide 5064 au nucléotide 5261. A l'intérieur de ce palindrome, les 65 premiers nucléotides s'apparient parfaitement aux bases 5201-5261. Entre les nucléotides 5125 et 5200, 3 palindromes mineurs existent, nucléotides 5125-5151, nucléotides 5151-5174 et nucléotides 5174-5200. Trois boucles sur le brin sont créées à chaque point de rotation : TTTCTG (7 bases), TGAGCG GAACTT (12 bases), CAAGAAA (7 bases). (D'après Astell et al. [10].)

RÉFÉRENCES

13. Morinet F, Tratschin JD, Perol Y, Siegl G. Comparison of 17 isolates of the human parvovirus B 19 by restriction enzyme analysis. *Arch Virol* 1986 ; 90 : 165-72.
14. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Productive infection by B 19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells *in vitro*. *Blood* 1987 ; 70 : 384-91.
15. Rommelaere J. Action anticancéreuse des parvovirus. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 534-43.
16. Ozawa K, Ayub J, Yu-Shu H, Kurtzman G, Shimada T, Young N. Novel transcription map for the B 19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol* 1987 ; 61 : 2395-406.
17. Kajigaya S, Shimada T, Fujita S, Young NS. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B 19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7601-5.
18. Morinet F, d'Auriol L, Tratschin JD, Galibert F. Expression of the human parvovirus B 19 protein fused to protein A in *Escherichia coli* : recognition by IgM and IgG antibodies in human sera. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3091-7.
19. Cohen BJ, Mortimer PP, Pereira SS. Diagnostic assays with monoclonal antibodies for the human serum parvovirus-like virus (SPLV). *J Hyg (Lond)* 1983 ; 91 : 113-30.
20. Clewley JP. Detection of human parvovirus using a molecularly cloned probe. *J Med Virol* 1985 ; 15 : 173-81.
21. Kurtzman G, Ozawa K, Cohen B, Hanson G, Oseas R, Young NS. Chronic bone marrow failure due to persistent B 19 parvovirus infection. *N Engl J Med* 1987 ; 317 : 287-94.
22. Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, Jenkins DW, Nienhuis AW, Young NS. Pure red-cell aplasia of 10 years duration due to persistent parvovirus B 19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med* 1989 ; 321 : 519-23.

La région qui s'étend du nucléotide 427 au nucléotide 2449 code pour un transcrit de 2,31 kb qui permet la synthèse d'une protéine régulatrice de 671 acides aminés, de charge globale négative (figure 8 p. 135, transcrit b, protéine NS1). Cette protéine semble transactiver le promoteur riche en GC qui contrôle la synthèse de son propre ARN messager et est situé à 6 unités de carte génomique (ADN B 19 = 100 unités = 5 400 b ; 1 unité de carte génomique = 54 b). La portion centrale des protéines non structurales est hautement conservée au sein de la famille des *Parvoviridae*. Par exemple, entre les protéines non structurales du virus minute de la souris et le virus B 19, l'homologie est de 51 %, pour atteindre, sur de courtes portions, 90 % avec celle de l'AAV type 2, soit 11 sur 12 acides aminés identiques. Des signaux per-

mettant le transport nucléaire de la protéine non structurale (NS1) sont retrouvés (lys-lys-pro-arg), soulignant le rôle potentiel de cette protéine pour la réplication virale. Une région de 135 acides aminés de la protéine NS1 du parvovirus B 19, présente des homologies avec l'antigène T des polyomavirus et la protéine E 1 du papillomavirus. Ces deux dernières protéines présentent quatre régions d'homologie (A, B, C, D) dans leur moitié C-terminale. La région B a une activité ATPase, la région C un site d'attachement aux nucléotides. C'est au niveau des domaines B et C que se situent les homologies avec la protéine NS1 du B 19. L'antigène T des polyomavirus joue un rôle dans la réplication et, comme la protéine NS1 du parvovirus B 19, a une localisation nucléaire. En revanche, celle-ci, contrairement aux protéines non struc-

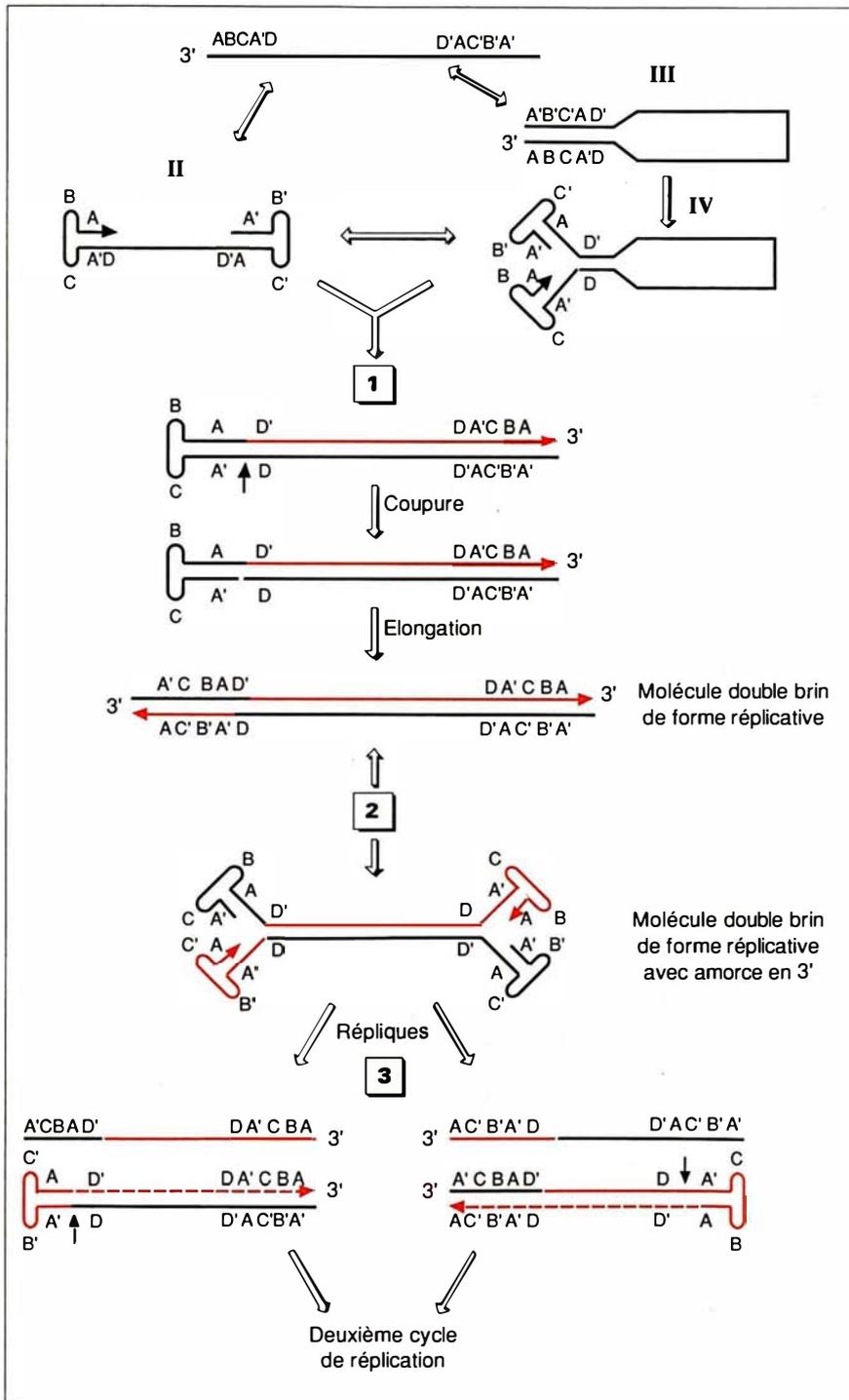
Figure 6. Schéma de la réplication virale. La première étape (1) est la formation d'une matrice susceptible de servir également d'amorce. Les extrémités 3' et 5' par leur palindromes terminaux s'autohybrident spontanément. Les configurations théoriques obtenues pourraient être de type II, III, ou IV. La configuration IV semble devoir être retenue sur la base de plusieurs arguments. (1) La structure de ses extrémités est identique à celle observée avec les formes répliquatives double brin, ce qui permettrait un seul type d'interaction ADN-protéine à l'origine de réplication. (2) Cette configuration IV a été visualisée en microscopie électronique. (3) La stabilité de la configuration IV est favorisée par l'interaction des ponts hydrogènes entre les régions D et D'. (4) Enfin, même si, sur un plan cinétique, chaque palindrome terminal s'autohybride rapidement, donnant naissance à une configuration de type II, celle-ci évoluerait vers la configuration IV par l'intermédiaire des régions D et D' (en l'absence d'interaction ADN-protéine). La deuxième étape (2) est la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par autoamorçage grâce à l'extrémité 3' autohybridée, élongation, déroulement et recopiage de l'extrémité 5'. L'élaboration complète d'un nouveau brin nécessite ensuite une coupure sur le brin parental (l'enzyme reste non identifiée) en regard de l'extrémité 3' OH et une élongation. L'extrémité 3' du brin parental devient l'extrémité 5' du brin complémentaire. On obtient la forme répliquative double brin. L'étape suivante (3) est la synthèse de néo-brins. L'événement initial de cette étape est, de nouveau, la formation d'amorce. Elle est rendue difficile par les liaisons hydrogènes existant entre les extrémités des brins complémentaires. Il est possible qu'une protéine liant l'ADN abaisse la température de fusion du double brin aux extrémités et permettent à ces extrémités de s'autohybrider. Ces événements aboutissent à la configuration de type IV qui a des propriétés de matrice-amorce. L'élongation à partir de chacune des extrémités 3' provoque le déplacement d'un néo-brin complet. Après un premier cycle de réplication, l'extrémité 3' parentale (ABCA') est remplacée par une séquence complémentaire inversée (AC'B'A'), alors que l'extrémité 5' reste identique. A la fin d'un deuxième cycle de réplication, l'extrémité 3' redevient identique à la séquence originale (ABCA') et il en est de même pour le brin complémentaire. Les extrémités 3' sont successivement : ABCA', puis AC'B'A' et de nouveau ABCA'. En revanche, les extrémités 5' de tous les brins complémentaires néoformés deviennent A'CBA'. Le démarrage de la synthèse d'ADN se fait à partir des extrémités 3' des brins de polarité positive ou négative. Chaque brin est donc infectant. Les brins monocaténaires, néosynthétisés sont empaquetés dans des capsides préformées. (D'après Berns et al. [11].)

turales des autres parvovirus, ne semble pas phosphorylée. Par ailleurs, les parvovirus ne transforment pas les cellules. Le rôle oncosuppresseur de certains parvovirus animaux suggère que l'étude de la réponse immunitaire vis-à-vis de cette protéine de régulation, non structurale, du parvovirus B 19 pourrait être intéressante chez les malades atteints de leucémie ou de cancer [15].

Protéines structurales et réponse humorale

L'expression, en système procaryote, d'un fragment (du nucléotide 2897 au nucléotide 3749) de la région droite du génome suggère l'existence de deux protéines de capsid. Après immunoprécipitation d'extraits de cellules de moelle infectées *in vitro* par le parvovirus B 19, des protéines de 58 kDa et de 83 kDa, représentant respectivement 96 et 4 % des protéines de capsid, sont identifiées. Ces protéines VP 1 (VP = *viral protein*) de 83 kDa et VP 2 de 58 kDa sont détectées par immuno-empreintes dans le noyau, le cytoplasme et les surnageants des cellules infectées. Les protéines VP 1 et VP 2 sont codées, dans la première phase de lecture, du nucléotide 2441 au nucléotide 4786. Leurs transcrits sont synthétisés grâce au promoteur situé à 6 unités de carte génomique et ont une longueur de 3,15 kb et de 3,03 kb, pour la VP 1, de 2,29 kb à 2,18 kb pour la VP 2. Les codons ATG sont situés respectivement au nucléotide 2444 pour la VP 1 et 3125 pour la VP 2 (figure 8, p. 135) [16].

La courbe hydropathique de la protéine VP 1 montre que régions hydrophiles et hydrophobes alternent en quantités égales. Cela est contraire à ce qui est observé avec la majorité des parvovirus, où la région spécifique de VP 1 est essentiellement hydrophile, avec de nombreux résidus basiques dont le rôle est de stabiliser l'ADN au sein de la particule virale. Comme pour la protéine non structurale, des homologies de séquence protéique de l'ordre de 30 % se retrouvent avec les protéines de capsides des parvovirus autonomes (virus minute de la souris) et défectueux (AAV2). La structure antigénique du parvovirus B 19 reste



pour le moment mal connue. Ce virus n'agglutine les globules rouges d'aucune espèce animale permettant de définir un sérotype au sein de la famille des *Parvoviridae*. Plusieurs équipes, utilisant des anticorps monoclonaux élaborés contre des isolats de B 19 d'années successives, mentionnent l'existence de réactivités variées de ces anticorps vis-à-vis des différentes souches de B 19. La possibilité de glissements antigéniques entre différents isolats de B 19 et donc d'interactions virus/cellules variables n'est donc pas impossible.

In vivo, le parvovirus B 19 induit la formation d'anticorps neutralisants dont la recherche prend toute son importance eu égard à la courte durée de la virémie ; cette recherche se fait par test d'immunocapture radio-immunologique ou immunoenzymatique. La source en antigène viral est limitée par l'absence de réplication du parvovirus en culture cellulaire, à l'exception des cultures d'érythroblastes de moelle ou de foie fœtal. Cela a conduit à faire exprimer la région droite codant pour les protéines de capsid en système d'expression procaryote [17] et eucaryote [18]. L'antigène produit *in vitro* permet la recherche des immunoglobulines sériques de classe IgM et IgG. Les IgM B 19 apparaissent 15 jours environ après une primo-infection et peuvent persister 6 mois. Les IgG B 19, apparues vers le 18^e jour persistent *a priori* toute la vie (figure 9, p. 136) [19]. Par technique d'immunoempreinte, il est possible de préciser cette réponse immunitaire.

Les IgM semblent dirigées contre les deux protéines de capsid VP 2 et VP 1, les IgG d'abord contre la VP 2 puis beaucoup plus tard contre la VP 1. L'utilisation de protéines produites *in vitro* portant des épitopes propres à la VP 1 permettra de confirmer ces données encore préliminaires.

Parvovirus B 19 et immunodépression

Chez des sujets immunodéprimés, le parvovirus B 19 peut avoir une expression hématologique particulière par sa chronicité et par la possibilité d'atteinte des lignées non érythroïdes.

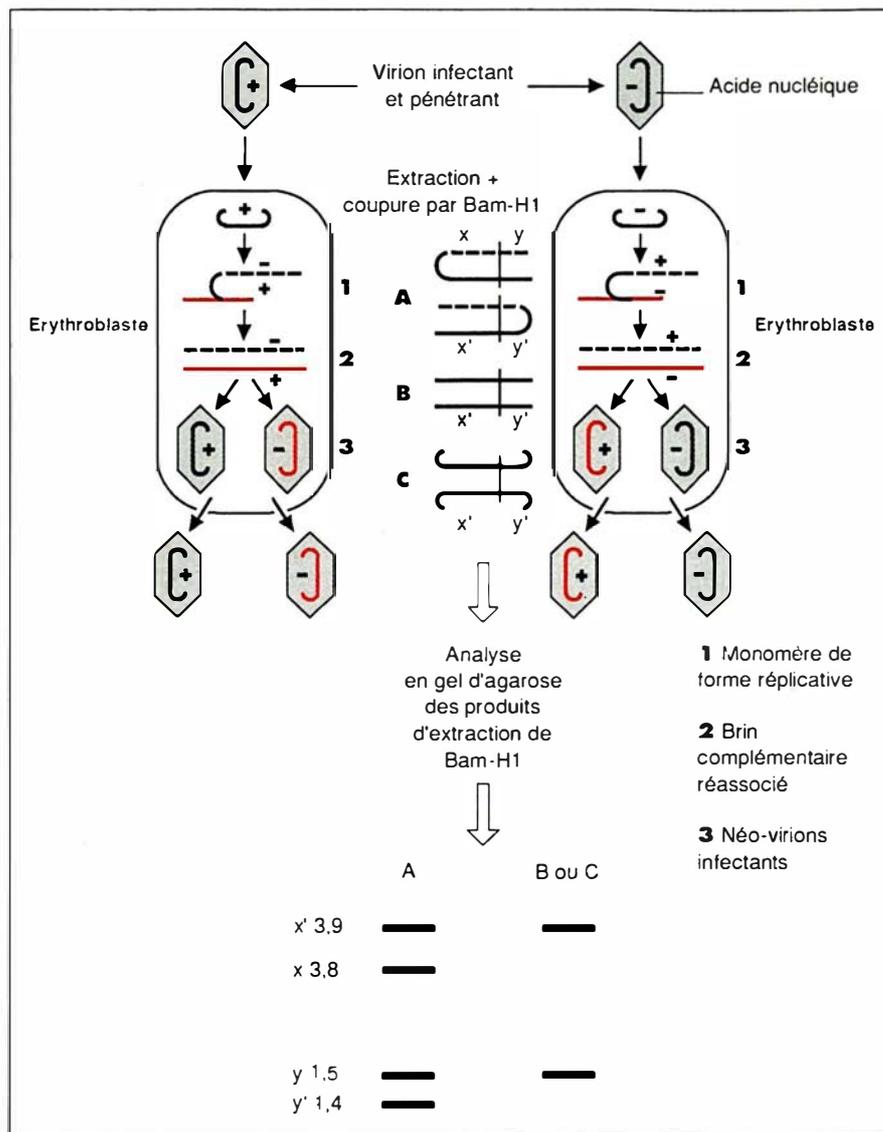


Figure 7. **Analyse en gel d'agarose des produits de la réplication virale.** Lorsque les doubles brins élaborés à partir d'un brin positif ou négatif sont coupés par Bam H1, deux populations de doublets équimolaires sont observées : l'une faite de deux bandes de 3,9 et 3,8 kbp et l'autre de deux bandes de 1,4 et 1,5 kbp. Pour chaque doublet, la bande la plus légère témoigne de l'existence de liaisons covalentes entre la matrice et le produit, et donc d'une amorce contenue dans l'extrémité 3' de la matrice. Lorsque les génomes viraux complémentaires réassociés sont coupés par l'enzyme de restriction Bam H1, deux bandes sont visibles à 3,9 et 1,5 kbp. Lorsqu'on détecte une virémie à parvovirus B 19 dans le plasma ou le sérum par Dot/blot, la confirmation par Southern blot ne montre, après coupure par Bam H1, que les produits à 3,9 et 1,5 kbp [14].

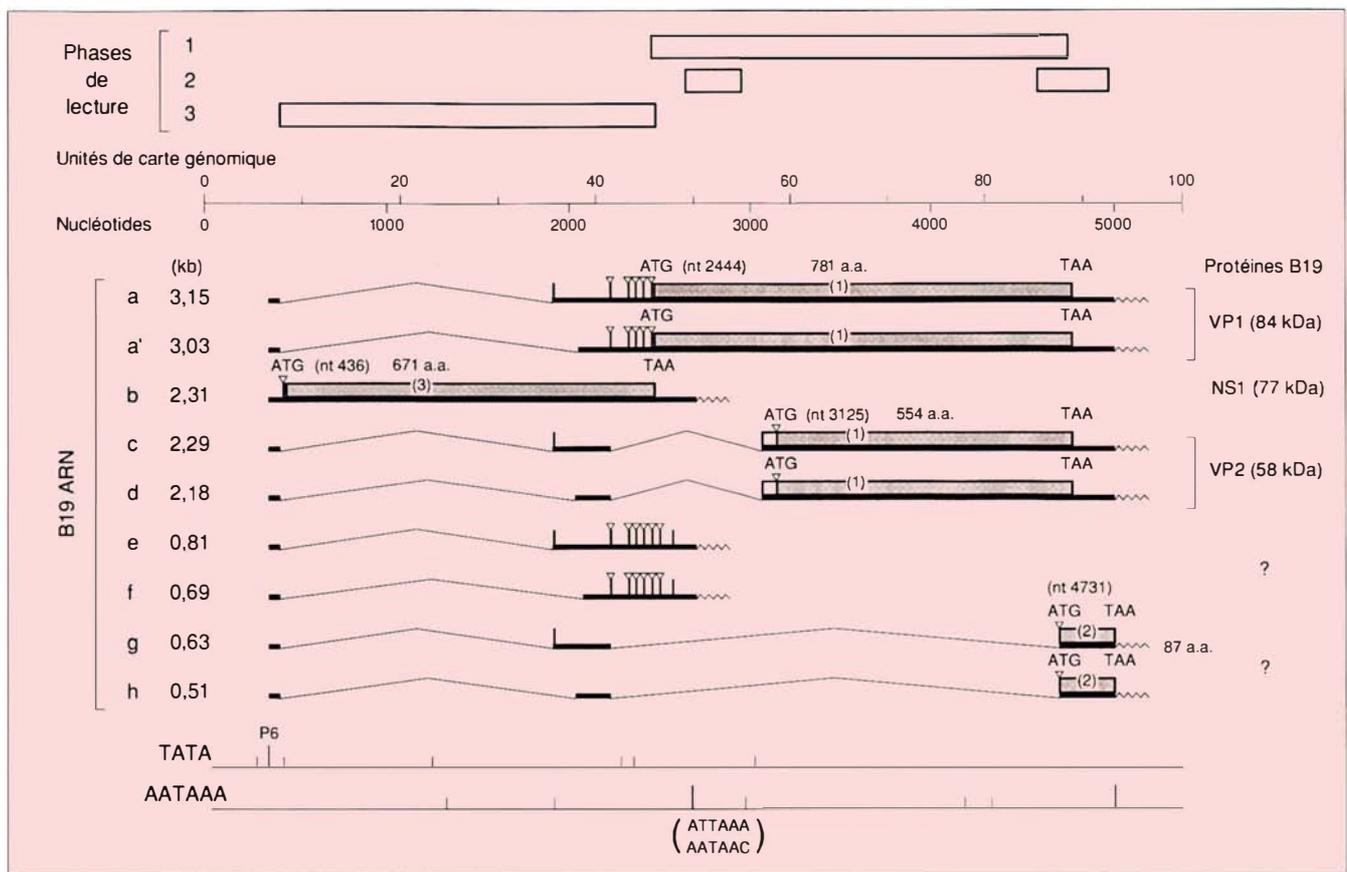


Figure 8. **Carte de transcription du parvovirus B 19.** Les neuf transcrits sont indiqués de haut en bas selon une longueur décroissante. Ils peuvent se répartir en quatre groupes : (1) un trio d'ADN, épissé ou non, dans la moitié gauche du génome viral (b, c, f) ; (2) deux ARN épissés couvrant la moitié droite et comportant un large intron à gauche (a, a') ; (3) deux ARN épissés comportant un intron gauche et droit (c, d) ; (4) deux ARN épissés ayant un intron gauche et droit très grand (g, h). Les transcrits e, f, g, h n'ont pas de fonction connue. Le promoteur fonctionnel P6, les signaux de polyadénylation (AATAAA) et les séquences TATA sont représentés par les traits verticaux. Les phases de lecture sont indiquées dans les boîtes représentant les régions codantes pour les protéines. (D'après K. Ozawa et al. [16].)

L'érythroblastopénie peut contraindre à des transfusions régulières pendant des mois ou des années après la primo-infection. Une neutropénie ou une thrombopénie dont la pathogénie n'est pas claire s'y associe inconstamment, parfois seulement pendant les premières semaines. La responsabilité du virus est prouvée par l'existence d'une virémie persistante et la présence de formes répliquatives d'ADN viral dans certaines cellules médullaires [20]. On a trouvé jusqu'à 100 000 copies de génome par cellule infectée. Dans tous les cas, la synthèse des immunoglobulines spécifiques est anormale, traduisant un défaut de l'immunité humo-

rale. Celle des IgM est inhabituellement prolongée, parfois avec des disparitions ou des diminutions intermittentes. Celle des IgG est faible ou absente. Il peut s'agir d'un déficit immunitaire congénital ou acquis : l'immunodépression congénitale peut être sévère comme dans le premier cas rapporté, où le patient est atteint d'une maladie de Nezelof (déficit combiné sévère de l'immunité cellulaire et humorale). Avant sa rencontre avec le parvovirus B 19, ce malade avait déjà souffert d'autres infections graves et répétées [21]. Au contraire les deux patients rapportés par Kurtzman [22] n'expriment qu'une anomalie de réponse au par-

vovirus B 19 : il s'agit de deux frères chez qui survient simultanément, à l'âge de 14 et 16 ans, sans antécédent d'infection, une érythroblastopénie chronique nécessitant des transfusions régulières. La splénectomie est inefficace. L'aîné meurt d'hémorragie transfusionnelle, 8 ans plus tard. Chez le cadet, 10 ans après le début des troubles, existent une virémie à parvovirus B 19 persistante, des taux bas d'IgG et élevés d'IgM anti-B 19. Il existe des anomalies dissociées de l'immunité humorale et cellulaire. L'hybridation *in situ* permet de trouver de l'ADN viral dans les rates des deux frères. L'injection régulière de préparation d'immuno-

RÉFÉRENCES

23. Van Horn K, Mortimer PP, Young N, Hanson GR. Human parvovirus-associated red cell aplasia in the absence of underlying hemolytic anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1986 ; 8 : 235-9.
24. Kurtzman G, Cohen B, Meyers P, Amunullah A, Young NS. Persistent B 19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1988 ; 2 : 1159-62.
25. Coulombel L, Morinet F, Miélot F, Tchernia G. Parvovirus infection, leukaemia and immunodeficiency. *Lancet* 1989 ; 1 : 101-2.
26. Weiland HT, Salimans MMM, Fibbe WE, Kluin PM. Prolonged parvovirus B 19 infection with severe anaemia in a bone marrow transplant recipient. *Br J Haematol* 1989 ; 71 : 300.
27. Kurtzman GJ, Cohen BJ, Field AM, Oseas R, Blaese RM, Young NS. Immune response to B 19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest* 1989 ; 84 : 1114-23.
28. Anand A, Gray ES, Brown T, Clewley JP, Cohen BJ. Human parvovirus infection in pregnancy and *hydrops fetalis*. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 183-6.
29. Porter HJ, Khong TY, Evans MF, Chan VTW, Fleming KA. Parvovirus as a cause of *hydrops fetalis* : detection by *in situ* DNA hybridization. *J Clin Pathol* 1988 ; 41 : 381-3.
30. Soothill P. Intrauterine blood transfusion for non immune hydrops fetalis due to parvovirus B 19 infection. *Lancet* 1990 ; 336 : 121-2.
31. Belloy M, Morinet F, Blondin G, Couroucé AM, Pérol Y, Vilmer E. Erythroid hypoplasia due to chronic infection with parvovirus B 19. *N Engl J Med* 1990 ; 322 : 633-4.
32. Lefrère JJ, Couroucé AM, Kaplan C. Parvovirus and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1989 ; 1 : 279.

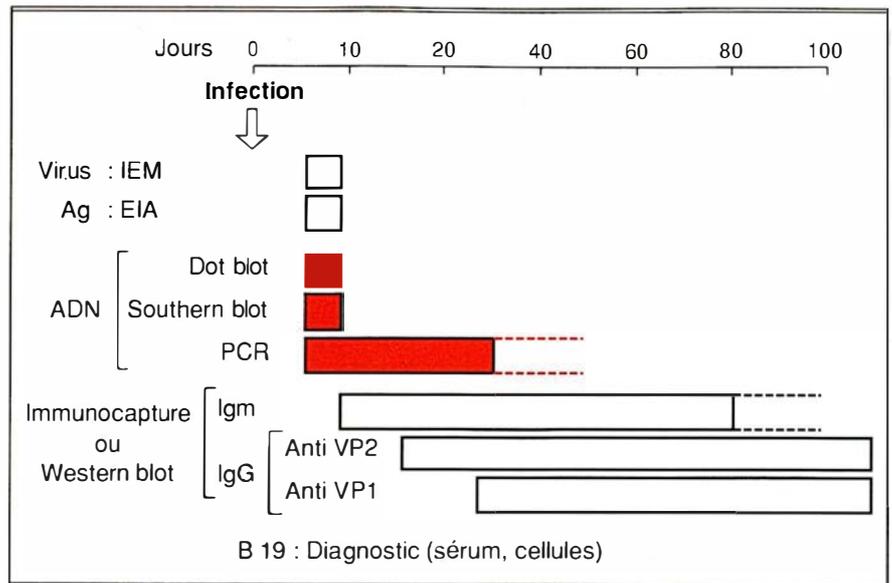


Figure 9. **Schéma des méthodologies diagnostiques d'une primo-infestation par le parvovirus B 19.** Le virus ne peut être mis en évidence que pendant très peu de temps, quelques jours après la primo-infestation, soit par visualisation des particules virales par microscopie électronique, soit par détection de ses constituants antigéniques [19], soit par détection de l'ADN viral [20] par Dot/blot ou Southern blot avant ou après amplification génique. Les anticorps IgM et IgG apparaissent plus tardivement. IEM = immunomicroscopie électronique ; EIA = enzyme immunoassay ; Dot blot = hybridation moléculaire sur tache.

globulines G intraveineuses (IgG IV) contenant des anticorps anti-B 19 va entraîner chez le survivant la disparition de la virémie et le retour d'une érythropoïèse autonome. L'immunodépression acquise peut être liée au virus HIV ou à une chimiothérapie au long cours. On a insisté ces dernières années sur la possible apparition au cours de traitements de leucémies (particulièrement chez les enfants traités pour leucémie aiguë lymphoblastique), d'érythroblastopénie prolongée ou même d'hypoplasie médullaire liée au parvovirus B 19. Ce diagnostic doit être évoqué chaque fois qu'une chimiothérapie au long cours entraîne une aplasie de durée ou d'intensité inhabituelle. L'effet des IgG IV n'est pas constant. Cette complication est grave car elle peut rendre malaisée la poursuite du traitement. Chez certains patients, il pourrait s'agir de primo-infestation, chez d'autres de réinfestation d'origine transfusionnelle [23-26]. On discute des responsabilités respectives d'une synthèse insuf-

fisante d'anticorps antiparvovirus et de la synthèse d'anticorps de qualité insuffisante pour reconnaître les épitopes neutralisants des protéines de la capsid virale [27].

B 19 et anasarque fœto-placentaire

Une primo-infestation maternelle pendant la grossesse peut, mais non obligatoirement, entraîner une anémie fœtale profonde [28, 29] responsable d'anasarque fœto-placentaire et de mort fœtale. Dans la plupart des cas publiés, le diagnostic d'anasarque est confirmé par l'échographie et un prélèvement fœtal *in utero* montre une anémie très profonde qui, dans un cas, a pu être corrigée par une transfusion *in utero* permettant la survie du fœtus et la naissance d'un enfant non anémique [30]. On ne retrouve pas de cause immunologique à l'anasarque et la responsabilité du virus est établie par la notion, chez la mère, d'une virémie ou d'IgM, et par la découverte d'ADN viral dans les tis-

sus fœtaux. Selon le stade de l'infestation fœtale il existe un nombre réduit d'érythroblastes circulants ou une intense réaction érythroblastique, qui ne devient probablement possible que lorsque les IgG maternelles ont été synthétisées et ont passé la barrière placentaire. On en rapprochera un cas récent d'érythroblastopénie chronique rapporté chez un nourrisson [31].

Parvovirus B 19 et manifestations auto-immunes en hématologie

A côté de ses effets délétères à l'encontre des progéniteurs ou des cellules immatures médullaires, le parvovirus B 19 pourrait être impliqué dans la genèse de manifestations hématologiques auto-immunes : hémolyse, thrombopénie [32] voire neutropénie. Les observations rapportées sont encore peu nombreuses.

Ainsi le parvovirus B 19 qui, au moment de sa découverte, ne paraissait pas être responsable d'une maladie précise est devenu, en hématologie, le modèle de l'infestation préférentielle d'une lignée de cellules médullaires par un virus. Ses manifestations plus graves et plus prolongées chez les immunodéprimés sont un sujet passionnant pour l'étude de l'immunité antivirale.

Dans l'avenir, on peut espérer qu'un vaccin permettra la prévention systématique de l'érythroblastopénie aiguë chez les sujets atteints d'hémolyse chronique constitutionnelle. Un tel vaccin pourrait également être proposé aux 20 à 30 % de femmes séro-négatives pour le parvovirus B 19 si elles envisagent une grossesse. Son utilisation chez les sujets immunodéprimés sera plus difficile. Vraisemblablement une immunisation passive, plus adaptée que les immuno-globulines polyvalentes, devra lui être associée : la production par génie génétique de protéines de capside permettrait de produire, chez des sujets volontaires, des gamma-globulines hyperimmunes spécifiques. Par ailleurs, le tropisme médullaire du parvovirus B 19 pose le problème de son utilisation éventuelle comme vecteur de thérapie génique ■

m/s n° 2, vol. 7, février 91

Summary

B 19 parvovirus and human hematoipoiesis

B 19 parvovirus was discovered in 1975 in blood donor sera. *In vitro* B 19 is cytolytic for BFU-E and CFU-E derived erythroblastic cells. Such a lineage restricted tropism explains the occurrence *in vivo* of acute anemia related to the disruption of compensation by increased erythropoiesis in patients with chronic hemolytic disorders. Severe anemia can also be observed in fetuses whose mother has first been affected during pregnancy. In immuno-compromised patients, anemia may be chronic with recurrent B 19 viremia. Viral lytic cycle in erythroid cells begins to be carefully depicted by molecular techniques. Hybridization technology has allowed to observe that abortive viral cycle may be detected in non-erythroid cells. These data will help to better understand episodes of leucopenia and/or thrombocytopenia which can be associated with long lasting erythroblastopenia in immuno-compromised hosts. Humoral response appears to play a major role in protecting patients and therefore vaccination would be of a great help in selected population at risk for B 19 parvovirus severe hematological complications.

Note ajoutée aux épreuves

Certains tableaux cliniques de maladie de Lyme, en l'absence de marqueur sérologique de *Borellia burgdorferi*, seraient en fait dus au parvovirus B 19, comme l'indique une lettre récente au *New England Journal of Medicine* [Mayo DR, Vance DW. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 419].

TIRÉS A PART

F. Morinet.