

LA VIROLOGIE

La naissance d'une spécialité

par Monique Emmanuel Lamy (1930 - professeur émérite 1995)

et

Guy Burtonboy (1934 - professeur émérite 2000)



Au début des années 50, les analyses virologiques n'étaient pratiquement pas utilisées en clinique. Les médecins ne voyaient pas l'intérêt de demander au laboratoire d'apporter la preuve d'une affection virale. La plupart des maladies causées par les virus étaient connues depuis des siècles, leurs symptomatologies étaient bien décrites et le diagnostic clinique paraissait évident. De surcroît, il n'y avait pas d'implication thérapeutique ; le médecin ne disposait d'aucun médicament antiviral efficace. Les techniques virologiques disponibles n'étaient pratiquées que dans de très rares laboratoires de recherche. À l'époque, les questions de virologie ne passionnaient pas grand monde : en 1948, le premier colloque international consacré aux virus avait rassemblé huit chercheurs.

Cependant, la campagne de lutte contre la poliomyélite avait stimulé la recherche dans ce domaine et du point de vue scientifique, la connaissance des virus venait de

faire des progrès extraordinaires. Quand J. Enders, en 1949, a pu montrer que certains virus pouvaient se multiplier dans des cellules en culture, tout était en place pour passer aux applications médicales. C'est alors que J. Salk a utilisé la formolisation des suspensions virales pour la fabrication d'un vaccin polio tué. Ce type de vaccin sera fabriqué dans différents pays.

En 1954, dans notre université encore bilingue, le Pr P. De Somer décide d'installer un laboratoire de virologie. Il envoie Mlle M.E. Lamy, qui vient de terminer sa licence en zoologie, se familiariser avec les techniques de culture de tissus dans le laboratoire du Pr P. Lépine à l'Institut Pasteur de Paris, puis chez les Prs W. et P. Von Magnus à Copenhague.

L'année suivante, au rez-de-chaussée de l'Institut Rega, récemment achevé, un groupe de travail constitué par le Pr P. De Somer, Mlle M.E. Lamy et le Dr Abel Prinzie met au point un vaccin contre le virus de la poliomyélite. Ce vaccin, produit à Rixensart par la firme R.I.T. (aujourd'hui Glaxo Smithkline), sera utilisé en Belgique avec pour résultat la diminution rapide, puis la disparition des cas de poliomyélite dans notre pays.

Après la division de l'université, en 1968, le Pr G. Bruynoghe, chef de service de microbiologie francophone, crée une unité de virologie et en confie la responsabilité au Dr M.E. Lamy qui vient de terminer ses études de médecine. À cette époque, les analyses bactériologiques de l'hôpital Saint-Pierre sont effectuées dans le laboratoire du Pr S. Stadtsbaeder, localisé dans les bâtiments en planches construits après la guerre, appelés à bon droit les "baraques". C'est le long de ces locaux dans un corridor de 8,50 m sur 1,2 m, qu'en septembre 1964, débute la virologie à l'hôpital Saint-Pierre. Dans ce couloir étaient logés en file indienne : le bureau avec un téléphone très utilisé, et les tables de travail avec becs bunsen et microscopes. La recherche des anticorps se faisait par fixation du complément pour les virus respiratoires : influenza, parainfluenza, adénovirus, virus respiratoire syncytial (RSV) et par séroneutralisation pour les virus poliovirus I, II, III et Coxsackie B1 à B5. Les virus picorna, adéno, RSV étaient isolés à partir des produits pathologiques sur les cultures de cellules et identifiés par leurs effets cytopathogènes. Pour isoler le virus influenza, la technicienne Mlle J. Vanderhoeven inoculait des œufs embryonnés ; cela se faisait sous un drap noir pendu par des pinces et des ficelles attachées à la conduite de chauffage, les pieds sur le bord du bac de désinfectant. De nouvelles méthodes seront introduites très rapidement.

Trois ans plus tard, en 1967, le laboratoire de virologie emménage dans le pavillon préfabriqué qui avait hébergé la médecine nucléaire. Les locaux sont plus vastes et mieux agencés : deux chambres stériles, une salle pour la sérologie, un local pour la désinfection et la stérilisation, un petit secrétariat et un bureau. Le staff s'est développé : cinq laborantines et deux stagiaires, une secrétaire, une personne à la cuisine. Un fichier des malades est constitué et dès 1969, en accord avec le Pr J.J. Haxhe, débute la collaboration avec M.R. David et Mlle M.T. Leboutte du Centre de Calcul. Celle-ci aboutira à un fichier informatisé, utilisé grâce à un système de réseau Macintosh en liaison directe avec le Centre de Calcul de Louvain-la-Neuve. Le 1^{er} mars 1995, cette banque de données qui est devenue un outil indispensable pour tous les cliniciens, après transfert et fusion de ces données avec le centre informatique des cliniques Saint-Luc, servira de base à la constitution des nouveaux fichiers de virologie du 1^{er} avril 1995 à ce jour.

En 1970, un nouveau laboratoire de virologie est installé sur le site de Woluwe. Le seul bâtiment construit est l'Ecole de Santé Publique (ESP). Le rez-de-chaussée et les premiers étages étaient aménagés et occupés, les autres niveaux étaient à l'état brut. Le Dr M.E. Lamy eut le plaisir et la latitude de concevoir la répartition d'une surface de 400 m² au 6^e étage : local de sérologie, chambres stériles pour les cultures, salle des centrifugeuses, chambre froide, pièce noire pour les microscopes à immunofluorescence, cuisines pour le lavage et la stérilisation, chambre stérile pour la préparation des milieux, secrétariat et bureau. En face du bureau, une table offrira bientôt la possibilité de projeter et d'écouter des cours audiovisuels de virologie. Le corridor central s'encombrera d'année en année de freezers à -20°C et à -80°C (stocks de virus ou de sérums), récipients d'azote liquide (stocks de cellules à -180°C).

À partir de 1971, nous allons profiter du laboratoire de microscopie électronique que l'unité du Pr J.F. Heremans a installé au sous-sol de l'ESP. Au départ du Pr C. Coccito pour l'ICP, nous pourrons nous étendre dans les locaux qu'il occupait au 6^e étage de l'ESP. Nous y aménageons un laboratoire pour la recherche, et un autre pour y effectuer les « radioimmunoassay » (RIA) sur des sérums très infectieux, avec un compteur gamma et un autoclave pour la désinfection du matériel avant l'évacuation du matériel radioactif (200 tests par jour).

En 1981, au niveau -1 des cliniques Saint-Luc, un nouveau laboratoire est aménagé par le Dr M.E. Lamy pour les examens directs et les isollements de virus et de chlamydia ; 100 m² répartis en laboratoire central, bureau, chambre noire et chambres stériles. Cette antenne mise en place avec la collaboration de Mme A.M. Favart,

licenciée en sciences, va permettre l'acheminement rapide des échantillons et renforcer la collaboration avec les cliniciens.

En 1987, le laboratoire de référence SIDA déménage avec l'unité de Microbiologie ; il quitte l'École de Santé Publique pour s'installer au 5^e étage de la Tour Claude Bernard, sous la direction du Pr G. Burtonboy.

* * *

Dans ces différents locaux, le laboratoire va connaître un développement continu au fur et à mesure des progrès techniques et de la découverte de nouveaux virus. Les anciennes méthodes ont été perfectionnées ou remplacées par de nouvelles approches. De nouveaux domaines ont été abordés.

La sérologie de la rubéole va prendre une grande place. Alors que cette maladie était considérée comme une infection banale, Norman Gregg, dès 1941, avait attiré l'attention sur le fait que des cas de cataracte congénitale étaient associés à la rubéole chez la femme enceinte. En 1964, après une épidémie de rubéole aux États-Unis, on relève plus de 20 000 cas d'infection transplacentaire avec des anomalies congénitales graves : cataracte, malformations cardiaques, retard psychomoteur. À partir de 1965, en attendant le vaccin contre le virus de la rubéole, qui ne sera disponible en Belgique qu'en 1969, nous allons contrôler l'immunité des jeunes femmes : les tests d'inhibition de l'hémagglutination des globules rouges O + par un antigène de rubéole nous permettent de rechercher les anticorps contre ce virus. Plus tard, en collaboration avec le Pr M. Van Lierde, l'immunité « rubéole », basée sur le test IHA et Elisa IgG, fera l'objet d'une étude systématique chez les femmes enceintes. En l'absence d'immunité, nous recherchons à chaque consultation une infection éventuelle. Le diagnostic d'une rubéole transplacentaire s'appuyait sur les tests Elisa IgM et IgG, le diagnostic de certitude établissant que l'embryon était infecté, se basait sur la recherche d'IgM dans le sang du cordon, prélevé in utero.

Depuis l'installation du laboratoire au -1 des cliniques, au début des années 80, la recherche d'antigènes viraux spécifiques dans les cellules pathologiques est largement utilisée. Cette technique requiert des prélèvements cellulaires, frottis, urine, fraîchement prélevés et acheminés très rapidement au laboratoire ; les antigènes sont recherchés par des anticorps monoclonaux spécifiques, révélés par immunofluorescence (IF) ou immunoperoxydase (IP). Cette technique permet chez les enfants en bas âge le diagnostic rapide du virus respiratoire syncytial (RSV). Cette infection qui peut être dramatique en pédiatrie exige un diagnostic d'urgence. Les analyses sont effectuées jour et nuit, y compris le week-end.

Citons aussi la recherche de l'antigène de l'herpès génital dans les frottis de col utérin suspect, la recherche de l'antigène de l'herpès Zoster dans les frottis de

vésicules, la recherche de l'antigène CMV (cytomégalo virus) dans les cellules de l'urine ou de la salive chez les greffés, la détection de chlamydia dans les cellules urinaires.

Il y a 50 ans, les hépatites étaient un problème clinique majeur, mais aucun virus n'avait encore été identifié comme responsable de ces affections. Les découvertes dans ce domaine ont été nombreuses, spectaculaires et ont entraîné des modifications profondes dans la pratique de la médecine et de la virologie en particulier. B. Blumberg a trouvé en 1963 l'antigène Australien permettant ainsi de détecter et d'identifier le virus de l'hépatite B (HBV). C'est la première fois que la détection d'un antigène viral est utilisée pour démontrer la présence d'un virus. Le retentissement est extraordinaire. Cette approche est immédiatement appliquée dans tous les centres de prélèvement du sang et dans tous les laboratoires cliniques. L'industrie pharmaceutique va développer de nouvelles techniques et commercialiser des kits et des appareils pour le diagnostic de l'HBV. Les premiers tests d'immunodiffusion, puis de contre-électrophorèse sont rapidement abandonnés, alors que les tests RIA puis ELISA seront largement utilisés au laboratoire où ils sont réalisés par trois de nos meilleurs techniciens, Mlle M. Broes, MM. L. Croone et G. De Ridder. La pathologie à suivre est vaste : diagnostic et suivi des hépatites aiguës, qui peuvent évoluer vers la guérison avec disparition de l'antigène HBs et apparition des anticorps protecteurs, mais qui parfois se prolongent en hépatite chronique très infectieuse ou en portage asymptomatique. Une routine journalière de 150 tests détectait en RIA les porteurs de l'antigène HBs. En cas de réponse positive, les autres marqueurs étaient recherchés en RIA ; le suivi des cas positifs était effectué avant et en cours de traitement éventuel. Comme laboratoire de référence, nous avons effectué de nombreux tests pour confirmer des contrôles de malades extérieurs ou pour appuyer des études dans le domaine du diagnostic ou bien des vaccinations. Le suivi des greffés de rein, de foie, de pancréas représentait un travail très conséquent. Le sérum correspondant à tout greffon était testé avant greffe. Tout greffé était suivi avant et après greffe.

Le virus de l'hépatite A, un virus de la classe des picornaviridae comme le poliovirus, a été clairement identifié en 1973. Dès 1975 le diagnostic est introduit en clinique. Un vaccin comportant un virus inactivé est disponible depuis quelques années.

L'hépatite C fut longtemps classée comme hépatite non-A non-B. Ce n'est qu'en 1989 que Q.L. Choo et ses collaborateurs ont pu identifier par des techniques de biologie moléculaire le virus HCV et montrer qu'il s'agissait d'un virus à RNA de

la famille du virus de la fièvre jaune. Cette découverte a permis de développer des tests de diagnostic appliqués immédiatement au laboratoire. L'HCV était la cause la plus fréquente d'hépatite post-transfusionnelle après détection systématique de l'HBV. On distingue plusieurs génotypes. Mme Ch. Cornu, pharmacienne biologiste travaillant dans notre laboratoire, en collaboration avec les hépatologues, a étudié la fréquence et l'impact sur l'efficacité des traitements par l'interféron alpha.

Le virus de l'hépatite E (HEV) a été caractérisé en 1980, quand il a été possible de le distinguer de celui de l'hépatite A. Le diagnostic est désormais possible. Découvert en 1970 par un gastro-entérologue de Turin, l'agent Delta (HDV) est un virus défectif qui a besoin de l'HBV pour sa réplication ; il ne peut se développer que dans les hépatocytes déjà infectés par l'HBV. La co-infection augmente les risques d'hépatite fulminante et de gravité de l'hépatite chronique. Il est fréquent dans certains pays, en particulier l'Italie, d'où son importance pour le service des greffes de rein à Saint-Luc^{*}. Le diagnostic est basé sur le dosage des anticorps HDV et la présence d'antigène HDV dans la biopsie.

Le domaine des hépatites virales est devenu très large ; le rôle du laboratoire est non seulement de mettre en évidence ces virus, mais également de suivre les différentes infections.

La connaissance des virus de la famille de l'Herpès a également fait de grands progrès. Les « herpetoviridae » constituent une grande famille ; sur 100 types d'herpetoviridae isolés, on dénombre actuellement huit virus herpès humains qui ont pu être caractérisés : herpès simplex HSV1 (vésicules sur la peau, la cornée et encéphalites), herpès 2 (infection génitale, cocancérigène du col utérin, infection transplacentaire), herpès zoster-varicelle VZV, virus cytomégalique humain HCMV, virus Epstein Barr EBV, les herpès 6 (exanthème subit), 7 et l'herpès 8 identifié dans le sarcome de Kaposi. Le diagnostic de l'herpès simplex (HSV1) a d'abord été basé sur l'isolement du virus en culture, puis sur la recherche d'antigène dans les vésicules ; actuellement, la PCR (Polymerase Chain Reaction) permet de détecter le virus dans l'encéphalite herpétique. Un diagnostic rapide est devenu indispensable puisqu'il existe un traitement efficace.

Le diagnostic des infections par le virus cytomégalique a pris beaucoup d'importance. De 1905 à 1956, les auteurs se contentaient de décrire des inclusions nucléaires dans différents types de cellules ; le terme cytomégalie est alors utilisé. En 1950, J.P. Wyatt suggère le terme de maladie à inclusions cytomégaliennes pour

* Ce service traite un grand nombre de malades en provenance de l'Italie.

décrire une infection congénitale. En 1956, Rowe et Weller isolent le virus CMV sur cellules diploïdes humaines MRC5. L'infection foétale est un problème grave, puisqu'elle peut être cause de malformations congénitales. Depuis plus de 20 ans, le laboratoire de virologie, dont le Dr V. Gaudy, travaille en étroite collaboration avec le service d'obstétrique pour rechercher les signes de primo-infection au cours de la grossesse et pour diagnostiquer la contamination du fœtus. Nos études basées sur l'isolement du virus dans le liquide amniotique, ont montré que le risque d'infection par le CMV in utero est plus fréquent pendant la seconde période de la grossesse, mais paraît cliniquement moins grave du point de vue des malformations pour le fœtus que si l'infection a lieu en début de grossesse.

Le CMV en primo-infection ou en réactivation constitue aussi un risque majeur pour les immunodéprimés. C'est pourquoi, le suivi CMV de ces malades est fréquent et approfondi. Le statut sérologique des futurs greffés et des donneurs de greffons s'impose ; c'est un diagnostic effectué en urgence de jour et de nuit depuis plus de 15 ans. En post-greffe, le diagnostic rapide de primo-infection ou de réactivation CMV est très important dans le suivi du malade. En effet, le symptôme température associé à l'augmentation de la créatinine met en diagnostic différentiel un rejet de greffe et une infection liée au virus. Si le CMV est en cause, il faut diminuer les immunodépresseurs ; s'il y a rejet, il faut les augmenter. Ces suivis ont été effectués par le groupe de travail de virologie : Mmes A.M. Favart, M. Pirenne, M. Lebyn, M. Peers en collaboration avec les Prs G. Alexandre, J.P. Squifflet, J.B. Otte, E. Sokal et J. Lerut. Un diagnostic très rapide était indispensable et reposait sur la recherche de l'antigénémie CMV, c'est-à-dire la recherche de l'antigène pp65 dans les leucocytes du malade. Le test d'antigénémie CMV pp65 fut mis au point par le Dr B. Mulongo, après un stage aux Pays-Bas dans les laboratoires du Pr W. Van der Bij, qui avait obtenu un anticorps monoclonal permettant de mettre en évidence cet antigène. Dans ce cadre, le laboratoire a participé à plusieurs études du Pr J.P. Squifflet sur l'utilisation de certains antiviraux, dont le Vanciclovir lors des rejets chez les greffés du rein et du pancréas.

Depuis la fin des années soixante, nous nous sommes particulièrement intéressés au virus d'Epstein Barr, EBV. L'obtention de lignées continues de lymphocytes (LTLC) a été le premier service que la virologie a pu rendre aux malades greffés. La couche de globules blancs obtenue par centrifugation d'une trousse de sang fraîchement prélevé était mise en culture à long terme. Au cours des deux premières semaines, on observait l'élimination des polynucléaires et la nécrose de nombreuses cellules, puis à la troisième semaine l'apparition soudaine de lymphoblastes dont le nombre doublait tous les trois jours ; la lignée était devenue

continue. Au début des années septante, les cellules servaient, entre autres, à immuniser le cheval du Pr G. Sokal, afin d'obtenir un sérum antilymphocytaire utilisé pour prévenir le rejet des greffes rénales. Plus tard nous apprendrons que ces lignées contenaient le virus d'Epstein-Barr (EBV). En 1964, Epstein et Barr avaient mis en évidence ce nouveau virus herpès dans des cultures d'un lymphome de Burkitt. En 1968, les Prs W. et G. Henle montrent que le virus est responsable de la mononucléose infectieuse. Le Dr M.E. Lamy reçoit de leur laboratoire des lignées de cellules exprimant à des stades différents les antigènes du virus. Ce matériel sera utilisé pour doser les anticorps EBV par immunofluorescence. Pendant plus de 10 ans, nous serons les seuls en Belgique à assurer ce diagnostic. Cela nous a amenés dès 1972, à mettre au point une technique IF en microplaque permettant d'analyser des grands nombres d'échantillons. Après une primo-infection, le virus reste latent dans les lymphocytes entraînant une possibilité de réactivation, surtout en cas d'immunodépression. De plus, l'EBV est associé à différentes tumeurs, telles que le lymphome de Burkitt (BL), le cancer du nasopharynx (CNP), les lymphomes, la maladie de Hodgkin et les affections lymphoprolifératives chez les greffés immunodéprimés. Le diagnostic d'infection repose sur la quantification des différents anticorps correspondant aux différents antigènes de l'EBV. Ces tests nous ont permis d'étudier les primo-infections et les réactivations dans différentes pathologies de greffés (rein, foie, pancréas) et d'immunodéprimés. Nous avons pu notamment mettre en évidence l'impact de la primo-infection EBV dans le rejet de la greffe de foie. Au laboratoire de virologie, Mmes J. Tondreau, A. Despineux, M.P. Huon et Ch. Eysers ont réalisé de nombreuses études sur l'EBV, lesquelles n'ont pu se faire que grâce aux collaborations des cliniciens et en particulier des médecins qui s'occupent à Saint-Luc des greffes de rein, de foie, de moelle. Nous tenons à les en remercier.

Après les travaux de J. Melnick et K.O. Smith en 1962 aux États-Unis, l'examen direct des virus au microscope électronique est devenu pour les virologues l'équivalent de l'observation des bactéries au microscope ordinaire avec la coloration de Gram. La préparation et l'examen ne demande que quelques minutes. L'avantage de la méthode est que celle-ci met bien en évidence les détails de l'architecture des particules et permet ainsi de reconnaître à quelle famille virale appartiennent les virions observés. À Louvain, les premiers essais d'examen direct des virus ont été effectués dans le laboratoire du Pr Paul Maldague où travaillait le Dr G. Burtonboy. C'est là que Jean-Paul Squifflet, étudiant chercheur, examine en 1969, une préparation de sérum d'un porteur du virus de l'hépatite B et fait une photo de ce qui était alors appelé antigène Australien. Ces images avait déjà été obtenues ailleurs, mais au laboratoire de virologie de l'UCL, c'était la première fois que pouvaient être

observées des particules d'origine virale. En 1971, le Dr G. Burtonboy revient des États-Unis après plusieurs mois passés à San-Antonio dans le laboratoire de K.O. Smith, où il s'est familiarisé avec l'examen direct des particules virales. À l'ESP, il est responsable du microscope électronique que le Pr J.F. Heremans vient d'installer pour son service d'immunologie. Avec Nicole Delferrière, ils vont appliquer cette approche à l'étude et au diagnostic de nombreuses affections virales. Les premières applications de la technique se font en collaboration avec le Pr J.M. Lachapelle. Les membres de son équipe et en particulier le Dr D. Tennstedt vont réaliser avec notre laboratoire des études sur les viroses cutanées : herpès, molluscum, orf et papillomavirus. Depuis plus de 20 ans, les dermatologues de Saint-Luc font toujours appel à cette technique pour les diagnostics difficiles. En ophtalmologie, l'examen des larmes au microscope électronique par la technique de coloration négative va servir au diagnostic rapide des conjonctivites et des kératites virales. Plus tard, l'examen direct des selles sera utilisé en pédiatrie pour rechercher des virus chez les enfants diarrhéiques. En aidant ainsi au diagnostic de différentes affections, nous avons pu rassembler une iconographie exceptionnelle des différents virus dont on connaissait l'importance en pathologie.

En 1973, un jeune vétérinaire, Paul-Pierre Pastoret *, qui prépare une thèse d'agrégation sur les virus des bovidés, vient travailler au laboratoire. Il est très intéressé par les possibilités que peut offrir en médecine vétérinaire le diagnostic rapide par examen direct des sécrétions. Ce sera le point de départ d'une longue série de travaux réalisés en collaboration avec l'École de Médecine vétérinaire, qui, à cette époque, était encore installée à Cureghem. Nous participons à de nombreuses publications sur la bronchite des bovidés, la diarrhée des veaux, des porcs, des chiots, les infections des pigeons. Nous allons progressivement acquérir une compétence dans ce qui sera appelé plus tard la Virologie comparée. Par la suite, cette compétence nous sera très utile. Les entérites à rotavirus des veaux étaient bien connues des vétérinaires et nous avons eu l'occasion de nous familiariser avec ce virus quand R.F. Bishop décrivit en 1973 la présence de rotavirus dans les selles d'enfants diarrhéiques ; il apparaît alors qu'il s'agit de l'étiologie la plus fréquente des « gastro-entérites épidémiques » entre 6 mois et 2 ans. Peu après, des échantillons pour ce type de pathologie nous sont apportés par une puéricultrice de la crèche des Bourgeons sur le site de Woluwe. Elle était très inquiète ; ses petits pensionnaires se mettaient à vomir l'un après l'autre en inondant leurs langes de selles liquides ; et les médecins étaient en grève. Nous avons recherché des particules virales dans les selles par microscopie électronique, il n'y avait pas d'autres techniques à notre disposition.

* Actuellement professeur à la Faculté vétérinaire de l'université de Liège.

L'examen direct a montré une quantité impressionnante de rotavirus. La puéricultrice est partie rassurée : elle craignait la présence de colibacilles. Nous avons dû lui établir un certificat, à titre de preuve. Par la suite, des kits de détection ont été commercialisés et le diagnostic de rotavirus est devenu une routine.

Au début de l'année 1978, nous avons eu la visite d'un pathologiste de l'École vétérinaire, Freddy Coignoul. Il venait nous parler d'une nouvelle maladie du chien, une entérite contagieuse grave, et nous demander d'examiner quelques échantillons de selles pour y rechercher un virus éventuel. Quelques minutes plus tard, Nicole Delferrière examinait la première préparation et y trouvait de très petits virions, 24 nm de diamètre. Par la suite, il sera possible de montrer qu'il s'agissait de parvovirus. Les pathologistes de Cureghem vont décrire la nouvelle maladie sous le nom d' « entérite hémorragique du chien ». Assez curieusement, cette épidémie va se répandre à peu près au même moment dans tous les pays du monde. Elle aurait tué des millions de chiens. L'agent responsable est connu sous le nom de CEV, *canine enteritis virus*. Nous apprenons à cultiver ce virus. Nous mettons au point des méthodes qui nous permettent de détecter et de doser les anticorps spécifiques. En 1983, le Dr G. Burtonboy fait de ce travail le sujet de sa thèse d'agrégation « *Identification d'un nouveau parvovirus* ». Les promoteurs sont les Prs G. Bruynoghe et M.E. Lamy. Ces travaux nous amènent à rencontrer tous les spécialistes des parvovirus. À la fin des années 70 nous étions peut-être une vingtaine dans le monde. C'est ainsi que nous sommes en contact avec le groupe de Colindale qui a découvert un « parvoviruslike agent » dans un plasma humain. En 1981, ce virus appelé B19 est reconnu comme le responsable du syndrome de Gasser ; deux ans plus tard, comme l'agent causal de l'érythème infectieux, la 5^e maladie, et associé à certains cas d'hydrops fœtal. Nous recherchons le virus par microscopie électronique et par immunodiffusion. Des médecins de tout le pays nous demandent ces analyses, car nous sommes alors le seul laboratoire à les pratiquer en Belgique. Bien des années plus tard, nous utiliserons des techniques plus élaborées, PCR et IF sur des protéines recombinantes. En reprenant dans la sérothèque, minutieusement tenue par Mme Ch. Cornu, les échantillons de sérum des enfants qui avaient été suivis par le Pr Etienne Sokal, il sera alors possible de montrer que certaines hépatites fulminantes étaient liées à une infection B19.

Les premiers articles qui vont attirer l'attention sur l'existence de cas inexplicables d'immunodéficience acquise paraissent en 1981. Dans le « *Morbidity and Mortality Weekly Report* », les Centres pour le Contrôle des maladies aux États-Unis, CDC, donnent une description assez brève de cinq cas de pneumonie à *Pneumocystis*

carinii chez des jeunes gens jusque-là en bonne santé. Dans les mois qui suivent, une série de publications décrivent des cas de sarcome de Kaposi, de candidase étendue, d'ulcère herpétique chronique ou d'autres pathologies liées à un déficit acquis de la réponse immunitaire T. Ce syndrome sera appelé Syndrome d'Immuno Déficience Acquise ou SIDA. Les études épidémiologiques suggèrent une origine infectieuse. Les relevés indiquent que le nombre de cas augmente très rapidement et que la majorité des patients sont des homosexuels de sexe masculin ou des drogués intraveineux.

À Saint-Luc, le Pr Jean Sonnet soigne plusieurs malades qui présentent des tableaux cliniques similaires, ce sont des hommes et des femmes venant du Zaïre, du Rwanda ou du Burundi, ils ne sont ni homosexuels, ni drogués. Il faudra plusieurs années avant que soit reconnue l'importance de l'épidémie de SIDA en Afrique subsaharienne, mais dès le début le Pr Jean Sonnet en est convaincu. Pour chacun de ces patients, le laboratoire va recevoir des échantillons de sang, de selles, de salives, de lavages bronchiques, de liquides de vésicules, de biopsies et d'expectorations. Tout est analysé, ré-analysé, sérologie exhaustive, recherche de virus en culture et de particules virales par microscopie électronique, avec peu de résultats. En 1983, à l'Institut Pasteur de Paris, dans le laboratoire de Jean-Claude Chermann, une jeune licenciée en sciences, Françoise Barré, en cultivant les cellules d'un ganglion prélevé chez un jeune homosexuel, révèle la présence d'un nouveau rétrovirus qu'elle dénomme LAV pour « *lymphadenopathy associated virus* ». Les patients atteints de SIDA ont tous des anticorps contre ce virus. Le Dr G. Burtonboy va passer quelques jours dans le laboratoire de J-C. Chermann. Françoise Barré lui apprend à cultiver les lymphocytes T pour isoler le virus, à doser la transcriptase reverse et à mettre en évidence les anticorps. Il revient à Bruxelles avec des cellules produisant du virus LAV. Nous montrerons d'abord que les patients du Pr J. Sonnet, les SIDA africains, ont des anticorps contre le LAV. Très vite, nous pourrons ensuite isoler ce rétrovirus des lymphocytes de ces malades traités à Saint-Luc.

En 1985, l'épidémie de SIDA a pris des proportions inquiétantes. Le retentissement dans les médias est de plus en plus important. La plupart des pays vont prendre des mesures préventives spectaculaires. M. Aerts, secrétaire d'Etat à la Santé organise une conférence de presse où il annonce : « afin d'éviter la transmission du virus du SIDA par du sang contaminé, les centres de prélèvement du sang seront désormais obligés d'analyser chaque don de sang ; une trousse de sang ne pourra être utilisée que si la recherche d'anticorps HIV a donné un résultat négatif ». Il ajoute que « vu la très faible incidence de l'infection dans notre pays (estimée à l'époque à 1/100 000), il faut s'attendre à un nombre élevé de résultats faussement positifs. Pour répondre à ce problème, les banques de sang peuvent envoyer les

échantillons positifs à l'un des laboratoires de référence, qui confirmera ou non le diagnostic d'infection HIV ». M. Aerts précise que les Drs Lise Thiry, Jan Desmyter, Peter Piot et Guy Burtonboy^{*}, présents à cette réunion, sont les responsables de ces laboratoires. Le ministre n'avait sans doute pas eu le temps de demander leur avis, aucun des quatre n'était au courant, mais personne n'a protesté. C'est l'origine des laboratoires de référence SIDA. Bientôt, pour des raisons d'équilibre linguistique, philosophique et régional, il y aura en Belgique huit laboratoires de référence SIDA. Chaque nouveau responsable de la Santé publique va étendre leur mission en leur attribuant de nouvelles tâches pour en faire finalement un système unique au monde par son efficacité et sa générosité. Toute personne, qu'elle soit affiliée ou non à une mutuelle, qu'elle donne son nom ou préfère conserver l'anonymat, peut s'adresser à l'un de ces laboratoires pour confirmer un dépistage positif, suivre l'évolution d'une infection HIV, analyser la sensibilité ou la résistance d'un virus aux traitements antiviraux, avec les techniques les plus performantes, et ce, sans aucun frais, ni pour le patient, ni pour le médecin ou le laboratoire qui en a fait la demande. Le fonctionnement est assuré par un subside forfaitaire indépendant de la nomenclature INAMI. Le secret professionnel est respecté de manière stricte et si des relevés sont transmis au ministre pour permettre de suivre l'évolution de l'épidémie, ils ne comportent aucun moyen d'identifier les patients. La plupart des gens ne sont pas au courant des possibilités qui leur sont ainsi offertes, et les médias n'en parlent jamais. À peu près un tiers des séropositifs dépistés en Belgique ont été diagnostiqués ou suivis par notre laboratoire de référence.

Les progrès de la biologie moléculaire ont ouvert de nouvelles possibilités, introduit de nouveaux concepts et permis de nouvelles approches. Mme Ch. Cornu va suivre cette évolution de très près et utiliser ces nouveaux procédés au fur et à mesure de leur développement. Fin des années 70, elle fait des hybridations avec des sondes spécifiques pour détecter le HBV. Plus tard, nous utiliserons également cette approche pour l'étude des parvovirus et du virus du SIDA. Un progrès remarquable sera l'invention de la PCR. Début des années 90, Mme Ch. Cornu introduira cette nouvelle technologie au laboratoire. Elle met au point une méthode très sensible de détection du virus de l'hépatite C, qui permet de montrer la présence du virus dans le sang des sujets infectés bien avant l'apparition d'une sérologie positive. Pendant plusieurs années, la PCR sera seulement qualitative, mais en 95 apparaissent sur le marché des kits commercialisés pour la quantification des génomes HCV et HIV. Certains sont basés sur la PCR, d'autres sur l'amplification du signal. Un progrès merveilleux et des prix exorbitants.

^{*} Respectivement : ULB, KUL, Institut de Médecine tropicale d'Anvers et UCL.

Le Dr M. Heusterspreute nous apporte sa compétence et sa grande expérience dans le clonage et le séquençage des acides nucléiques. Mme Isabelle Parent fera la première séquence complète d'un rétrovirus isolé au laboratoire. Le Pr Ch. Verellen nous accueille dans le laboratoire de génétique où nous pouvons analyser des échantillons dans un appareil de séquençage automatique. Nous profiterons de son hospitalité jusqu'en 96 ; le laboratoire de référence disposera alors d'un séquenceur « ABI 370 », qui après quelques problèmes de mise en service a fonctionné pratiquement 24 heures sur 24 et sept jours sur sept.

Ces progrès techniques sont arrivés au bon moment pour permettre de suivre le traitement des infections virales, en particulier HIV et HBV.

En 1978, le premier médicament antiviral efficace et non toxique a été mis à la disposition des médecins : l'acycloguanosine inhibe de manière sélective la réplication des virus herpès 1, 2 et 3. Les résultats sont remarquables, mais comme on pouvait s'y attendre, des mutants qui résistent au traitement peuvent apparaître. Le laboratoire doit fournir un diagnostic très rapidement, et en cas d'échec thérapeutique rechercher la résistance. Ce rôle deviendra très important.

Une étude en double aveugle réalisée dès 1985 avait montré que l'azidothymidine, l'AZT, un inhibiteur de la transcriptase du HIV permettait de traiter efficacement les patients atteints de SIDA. De nombreux antiviraux actifs contre le HIV vont être développés, d'abord administrés seuls, puis en combinaison, bi-, tri- et parfois quadrithérapie. Le laboratoire suit les patients ; la diminution de la charge virale estimée par PCR quantitative permet d'évaluer l'effet du traitement. En cas d'échec thérapeutique, l'isolement et la culture du virus en présence des différents antiviraux permet de désigner le ou les médicaments efficaces. En analysant la séquence du génome viral, on peut déceler la présence de mutations de résistance. Dans notre laboratoire, Benoît Kabamba, pharmacien biologiste, est devenu un expert dans ce domaine. Il travaille en étroite collaboration avec l'équipe du Pr Bernard Vandercam. Chaque cas est discuté. Il s'agit d'un domaine très complexe que nous commençons seulement à aborder ; le laboratoire apporte une information très utile, mais qui n'est qu'un des éléments à prendre en compte. Il faut une approche multidisciplinaire.

Manipuler certains pathogènes viraux peut présenter des risques. Le personnel qui travaille dans un laboratoire de virologie doit avoir reçu une formation appropriée et respecter des règles de sécurité.

Les recommandations établies à ce sujet dans différents pays sont pratiquement identiques ; il s'agit de mesures simples qu'il faut adapter à chaque situation. Elles ont toujours été mises en œuvre au laboratoire. Ce n'était, ni un problème majeur, ni une

question à résoudre d'urgence. Cependant, dans les années 80, une directive européenne avait établi une liste des pathogènes avec leurs niveaux de risque, en précisant les mesures de précautions obligatoires pour manipuler génétiquement ces microorganismes. Document rédigé dans la crainte de manipulations génétiques « sauvages », afin de réglementer et surtout de contrôler l'utilisation des techniques de génie génétique. Sans doute un peu hâtivement, l'Institut Bruxellois pour la gestion de l'Environnement (IBGE) décide d'étendre ce règlement à tout travail sur des microorganismes, et donc à tous les laboratoires de microbiologie, en se limitant toutefois à la région de la capitale. Il a fallu modifier les locaux, installer un autoclave à double entrée, acheter de nouveaux équipements, des sacs poubelles différents, coller de nouveaux sigles et surtout remplir beaucoup de documents. Heureusement, notre dossier a été introduit dans les délais et jugé conforme. Nos laboratoires de virologie ont obtenu une autorisation d'exploitation.

Une autre décision européenne nous a ensuite occupés pendant plusieurs années ; à savoir, la norme EN 45001 adoptée en 1990. En fait, il s'agit d'une liste de mesures de bon sens pour améliorer la qualité des analyses et des résultats. Le respect de ces mesures et la compétence du laboratoire doivent être vérifiés par un audit. Le principe est séduisant ; si un laboratoire souhaite prouver que ses résultats sont fiables, il demande à une tierce partie indépendante de lui accorder un label de qualité : l'accréditation. Le Dr G. Burtonboy a suivi la formation organisée par le Ministère en février 95, et est devenu auditeur « qualité ». Cela nous a permis de bien comprendre ce qui était demandé et de mettre en place un système répondant aux critères de qualité requis. Geneviève Daix avait rédigé avec beaucoup de soin une première version de notre manuel de procédures. Nous sommes déjà bien avancés, quand un arrêté royal de 1998 précise que pour être reconnus et subsidiés les laboratoires de référence SIDA doivent être accrédités avant l'an 2000. Tout le laboratoire participe à la mise en place du système. Mme M. Ruwet finalise les documents de pré-audit, puis d'audit, et nous sommes accrédités en juin 99.

Bénédicte Brasseur devient responsable de la qualité ; elle remplit cette mission avec enthousiasme et le fait très bien, puisque fin septembre 2000 la visite de contrôle des auditeurs se termine par des félicitations. Nous sommes toujours le seul laboratoire de référence à être en possession de l'accréditation exigée.

Nous ne regrettons pas cette démarche, au contraire. La mise en place d'un « système de contrôle de la qualité » a amélioré le fonctionnement du laboratoire. Les responsabilités sont bien définies, chacun sait ce qu'il doit faire et comment, la formation des nouveaux venus est plus structurée, les machines sont mieux entretenues, les produits mieux utilisés, il y a moins d'erreurs, moins de pannes ; une économie de temps et d'argent. Le résultat le plus important est que ceux qui

travaillent au laboratoire de référence sont satisfaits et n'imaginent plus un autre fonctionnement.

En 1995, le Pr M.E. Lamy est émérite et quitte le laboratoire. Elle se retire dans sa maison de Rhode-Saint-Genèse et va se consacrer à la sculpture comme elle s'est consacrée à la virologie, avec la même énergie, le même enthousiasme.

Le Pr G. Burtonboy reprend la direction de la virologie aux cliniques Saint-Luc. Mme Ch. Cornu et le Dr Monique Bodeus assurent le fonctionnement du laboratoire à l'ESP et à l'étage -1 des cliniques. Mme Ch. Cornu s'occupe plus spécialement des hépatites. Elle poursuit ses collaborations très fructueuses avec les Prs A. Geubel et E. Sokal, tout en suivant les patients dialysés en néphrologie. Le Dr M. Bodeus s'intéresse de plus en plus aux problèmes de réactivation virale chez les greffés. Elle collabore avec les gynécologues pour l'étude des infections virales chez les femmes enceintes, travaille beaucoup avec les pédiatres et met au point une nouvelle technique permettant la détection des anticorps précoces. L'année suivante, le Pr Patrick Goubau se joint à l'équipe. Il vient de la KUL, où il était le collaborateur du Pr Jan Desmyter. Il prend la direction du laboratoire clinique.

Quelques années plus tard, accédant à des demandes réitérées, la direction des cliniques décide de remettre en état les locaux de la virologie à l'ESP. Après 30 ans de bons et loyaux services, ce n'était pas un luxe. Réparation des murs, des plafonds, mais aussi réorganisation des espaces, un nouvel autoclave, un nouveau système d'air conditionné, un nouveau revêtement de sol et une peinture fraîche. Tout est pimpant et tout le monde est satisfait.

Fin septembre 2000, le Pr Guy Burtonboy accède à l'éméritat et le Pr Patrick Goubau lui succède.

Le laboratoire est prêt à aborder le nouveau millénaire.

Les choses ont bien changé en quelques dizaines d'années. En 1964 le fonctionnement du laboratoire de virologie était assuré par le Dr M.E. Lamy et une laborantine qui faisaient une moyenne de 25 analyses par semaine ; à la fin des années 90, l'unité occupe 50 personnes et le nombre d'analyses hebdomadaire approche les 5 000. La Virologie est devenue une spécialité à part entière, même si elle n'est pas encore reconnue comme telle par l'INAMI ; elle a ses techniques bien particulières et fait appel à des concepts très différents de ceux des autres branches de la microbiologie. Il s'agit d'une discipline qui a évolué très vite et sans interruption. La connaissance des différents virus a fait des progrès extraordinaires. On comprend

de mieux en mieux les mécanismes moléculaires de la réplication virale et ses conséquences pour la cellule infectée. Ce sont les seuls agents pathogènes pour lesquels on connaît la séquence du génome, le nombre et la structure des protéines. Pour les plus petits virions, la position de chaque atome de la particule a été déterminée par diffraction aux RX. Les avancées de la recherche ont eu des répercussions rapides sur la pratique de la virologie clinique. Les découvertes de nouveaux virus ont permis de faire des progrès spectaculaires dans le diagnostic et la prévention de nombreuses affections : poliomyélite, rubéole congénitale, hydrops fœtal, hépatite fulminante des parvoviroses, complications cutanées des infections HCV, pour ne citer que quelques exemples. Les progrès techniques ont été considérables et de nouvelles méthodes ont été continuellement mises à la disposition du laboratoire. Ce qui se faisait à la main a été progressivement confié à des appareils de plus en plus sophistiqués. Des robots traitent les échantillons de sérum à la demande, détectent et mesurent les anticorps ou les antigènes de plusieurs virus différents ; les résultats peuvent être transmis par le système informatique.

Au cours de cette évolution, le travail du virologue a changé. Au début, il devait mettre au point les techniques, essayer de reproduire les méthodes décrites dans la littérature ou observées dans un autre laboratoire. Le travail avait un aspect manuel et artisanal, un côté recherche appliquée qui ne sera bientôt plus qu'un souvenir. Dans l'énorme majorité des cas, le diagnostic est désormais, basé sur l'utilisation de kits commercialisés. Celui qui fait les analyses ne possède pas toutes les informations sur les détails des techniques qu'il utilise ; les firmes gardent certains procédés secrets, la machine est souvent une sorte de boîte noire. La commercialisation des moyens de diagnostic a des implications financières, les analyses sont de plus en plus coûteuses, mais il y a d'énormes avantages. En effet, nous disposons de tests toujours plus sensibles, plus spécifiques et surtout plus reproductibles. Bien entendu, il faut les utiliser à bon escient, en connaître les indications et les limites, veiller à la qualité du matériel, des réactifs et surtout interpréter les résultats en fonction de la pathologie. Aujourd'hui, comme il y a 36 ans, l'objectif du gestionnaire d'un laboratoire de virologie est de garantir la qualité des informations qu'il fournit.

Rhode-Saint-Genèse, avril 2001

Bruxelles, avril 2001



Le Pr Simone Stadtsbaeder (1925 – émérite 1985 - † 1999) (à gauche) et le Dr Monique E. Lamy dans le laboratoire de virologie de l'hôpital St-Pierre à Leuven en 1964.



À partir de 1970, les cultures de cellules et de virus se font sur le site de Woluwe , dans des chambres stériles au 6^e étage de l'École de Santé Publique. Ci-dessus M. Luc Croonen (technicien).



Un laboratoire pour l'isolement et l'examen direct des virus est installé à l'étage -1 des cliniques Saint-Luc en 1981. Ci-dessus de gauche à droite : Mmes Martine Peers et Monique Pirene (techniciennes) avec à droite Mme Martine Ruyschaert (secrétaire).



Depuis 1991, les cultures de virus HIV sont effectuées dans un laboratoire répondant aux normes de sécurité L3 .



Une partie de l'équipe de Virologie à l'ESP en 1992. Le Pr M.E. Lamy est assise à gauche.