

La découverte du virus de la grippe*

P. BERCHE¹

À l'époque de la pandémie de 1889, une « chasse aux microbes » s'est engagée sous l'impulsion de Louis Pasteur et Robert Koch. On prélève les sécrétions, le sang, les urines, les tissus des patients ; on scrute au microscope de minuscules bactéries de quelques millièmes de millimètre, que l'on cultive sur des milieux nutritifs. Et l'on trouve les germes responsables des grands fléaux, le charbon, la tuberculose, la peste, le choléra, la lèpre... Bien sûr, la grippe est aussi l'objet d'intenses recherches. Pour quels résultats ? Au cours de la pandémie de grippe de 1893, l'Allemand Richard Pfeiffer (1858-1945) (Figure 1) et le Japonais Shibasaburo Kitasato (1852-1931), deux médecins travaillant à Berlin dans le laboratoire de Robert Koch, découvrent une bactérie qu'ils pensent être l'agent de la grippe. Ils réussissent à isoler un petit bacille « hémophile », croissant uniquement sur des milieux enrichis de sang. Ce bacille est retrouvé avec une grande fréquence dans les crachats des patients grippés. Ils le dénomment « bacille de l'*influenza* », aujourd'hui *Haemophilus influenzae*. Cependant, certaines observations sont en totale contradiction avec cette hypothèse, notamment le fait qu'en dehors de toute épidémie le bacille de Pfeiffer soit retrouvé dans diverses infections, otites, sinusites, méningites purulentes, et même chez des sujets sains. Cela ne colle pas.

I. - LES DOUTES LORS DE LA GRIPPE ESPAGNOLE

Le cataclysme de 1918 stimule de nouvelles recherches très actives sur l'agent responsable de la grippe espagnole pour promouvoir une vaccination efficace. De sérieux doutes apparaissent sur le rôle réel du bacille de Pfeiffer. Il devient évident qu'il faut reprendre la recherche de l'agent causal avec un regard nouveau. Des dizaines de chercheurs s'attaquent au problème, en Allemagne, en France, en Grande-Bretagne, en Italie, en Australie, au Brésil, au Japon, en Chine et aux États-Unis. Comment réduire la mortalité ? Comment traiter les patients ? Comment préparer un vaccin ? Bien sûr, il y a ce *Bacillus influenzae*, protégé par le respect dû à l'éminent découvreur Richard Pfeiffer, âgé alors de soixante ans et médecin-général de l'Armée allemande.

Les États-Unis, on s'en doute, sont à la pointe de la recherche sur la pandémie. De nombreuses études réalisées



Fig. 1 - Richard Pfeiffer (1858-1945).

au cours de l'automne 1918 confirment la présence du bacille de Pfeiffer chez un grand nombre de victimes, mais de façon très hétérogène. Ainsi, Oswald Avery, chercheur de l'Institut Rockefeller de New York, se rend en septembre 1918 au camp de Devens, où sévit une épidémie

* Cet article est inspiré du livre de P. Berche (*Faut-il avoir peur de la grippe. Histoire des pandémies*, chapitre 6, Odile Jacob, Paris, 2012), où sont cités de nombreux articles et ouvrages documentant cet article.

¹ Hôpital Necker-Enfants malades.

dévastatrice de grippe. Il est d'abord incapable de cultiver le bacille à partir des prélèvements d'autopsie. Après bien des efforts, il réussit finalement à le faire croître à partir des tissus pulmonaires provenant de 22 de 30 soldats morts. Dans de nombreux cas, il trouve le bacille en culture pure, ou parfois mélangé à des pneumocoques. Cependant, dans certains cas, il n'isole que des pneumocoques ou des staphylocoques, sans retrouver le bacille de Pfeiffer. En plus de cela, il ne retrouve pas de bactéries dans les poumons de 7 patients décédés en quelques jours. Incompréhensible. De quoi sont-ils morts ? En plus, Avery réussit à isoler le bacille de Pfeiffer chez plus de 30 % des sujets sains, montrant la fréquence du portage de ce germe dans la population. Malgré ces résultats contradictoires, il câble le 27 septembre 1918 au *surgeon general* Gorgas que la grippe du camp de Devens est bien due au bacille de Pfeiffer. Erreur. Bien d'autres chercheurs arriveront à la même conclusion, notamment William Park, Anna Williams et Milton Rosenau à New York, Preston Kyes à Chicago, et Paul Lewis à Philadelphie. Cependant, certaines équipes n'arrivent à cultiver ce bacille que dans moins de 10 % des cas, aussi bien aux États-Unis, qu'en Allemagne ou en France. On met alors en doute leur compétence ! Un autre médecin, Victor Vaughan, qui a recherché la cause de la grippe, émet de sérieux doutes en novembre 1918 : « Nous sommes forcés de conclure qu'il n'a pas été prouvé que le bacille de Pfeiffer est responsable de la maladie que nous connaissons comme la grippe ».

II. - POURQUOI PAS UN VIRUS ?

Que sait-on des virus en 1918 ? On sait que les germes de certaines maladies contagieuses peuvent échapper aux investigations les plus minutieuses. L'œil le plus exercé ne détecte rien en examinant au microscope le pus très contagieux suintant des pustules des patients varioleux, ni la lymphe des pustules de vaches atteintes de *cowpox*, ni la bave des chiens dont les morsures causent la rage. Ces agents invisibles sont incapables de croître en culture sur milieux nutritifs. Ils ont été découverts grâce à l'utilisation de filtres de kaolin, mis au point en 1884 par un collaborateur de Louis Pasteur, Charles Chamberland. En 1892, Dimitri Iwanowsky observe à Saint-Pétersbourg que l'agent de la mosaïque du tabac traverse ces filtres. C'est la découverte du premier virus. On parle alors d'agents « ultrafiltrables », invisibles au microscope optique, et dont la taille est près de 500 fois plus petite que celle des bactéries. Il faudra attendre 1939 pour pouvoir observer les premiers virus avec de puissants microscopes électroniques. À l'orée du XX^e siècle, on réussit à caractériser les premiers virus en transmettant à l'animal des filtrats de sécrétions, de tissus ou de sang d'animaux ou de patients.

Paradoxalement, ce sont des bactériologistes chevronnés, convaincus de la responsabilité du « bacille de l'*influenza* », qui vont contester le paradigme. William Park et Anna Williams, qui collaborent depuis vingt-cinq ans au *New York City Department of Public Health*, sont des experts reconnus de la sérothérapie et des vaccinations. En 1918,

malgré les difficultés techniques, ils réussissent à cultiver le bacille de Pfeiffer dans 80 % des tissus de patients morts de grippe. Persuadés du rôle de cette bactérie, ils l'injectent à des animaux de laboratoire, sans pouvoir reproduire la maladie. Ils tentent alors d'inoculer des volontaires sains en utilisant des cultures bactériennes, sans plus de succès. Malgré ces échecs, ils s'acharnent à produire un vaccin et un antisérum contre le bacille en immunisant des lapins et des chevaux. Cela les amène à faire une observation surprenante. Les antisérums obtenus sont spécifiques de chacune des souches : aucun ne peut agglutiner l'ensemble des bactéries testées. Ceci signifie que *Bacillus influenzae* est constitué d'une population de souches bactériennes très hétérogènes, une observation incompatible avec l'idée d'un agent spécifique unique causant la grippe. C'est pourquoi, au début de l'année 1919, Park et Williams changent radicalement de position, avec un remarquable courage intellectuel. Ils déclarent : « La preuve de l'existence de multiples souches semble être absolument contre l'idée que le bacille de Pfeiffer puisse être la cause de la pandémie. Il nous apparaît impossible que nous puissions manquer la souche épidémique dans de si nombreux cas, tout en obtenant certaines autres souches aussi abondamment. À l'instar des streptocoques et des pneumocoques, *Bacillus influenzae* est très probablement un contaminant secondaire très fréquent ». Un grand pas est franchi, qui fait vaciller les fausses certitudes.

Ces résultats confortent les doutes de certains scientifiques qui pensent au rôle d'un virus filtrable. À Philadelphie, Paul Lewis frôle la vérité, sans pouvoir la saisir. Cet ancien chercheur de l'Institut Rockefeller connaît bien les virus : il s'est brillamment illustré en 1909 en montrant l'origine virale de la poliomyélite antérieure aiguë et en développant un vaccin qui protège les singes contre cette maladie. En 1918, il s'attelle à la grippe et tente de transmettre la maladie à des volontaires, en filtrant sur des bougies de porcelaine les sécrétions respiratoires des patients. Échec total. De son côté, Milton Rosenau à New York conduit en novembre 1918 des expériences soigneuses sur 68 « volontaires » dans une base d'entraînement de l'*US Navy*. Des marins emprisonnés pour divers crimes ont accepté de risquer leur vie contre la liberté. On collecte les crachats et le sang de victimes vivantes, ainsi que des broyats de tissus pulmonaires de cadavres. Les échantillons sont dilués dans l'eau physiologique, centrifugés, passés au travers d'un filtre de porcelaine, et inoculés par diverses voies aux marins. Tout est essayé : injections, inhalations, instillations nasales, badigeonnages de la gorge et des conjonctives. On utilise même des doses massives. Certains marins doivent serrer la main de patients atteints de grippe ou s'exposer à des patients en train de tousser ou de parler. Aucun volontaire ne tombe malade ! Mais l'un des médecins conduisant ces expériences meurt ! Déconcertant et décourageant. Mêmes échecs sur des volontaires à San Francisco, Chicago, Philadelphie et en Allemagne... Décidément, ce n'est pas un virus !

Certes, il y a ces communications de Charles Nicolle et Charles Lebaillay, à Tunis, et du médecin militaire René

Dujarric de La Rivière, à l'Institut Pasteur de Paris, qui auraient réussi à transférer la grippe par des filtrats de sécrétions ou du sang « défibriné » inoculés par voie sous-cutanée. Pas vraiment convaincant en pleine épidémie. Ainsi, de très nombreux essais de filtration sont réalisés, avec des résultats le plus souvent négatifs ou parfois positifs mais inconstants. Ces multiples échecs sont probablement liés à l'inactivation d'un virus assez fragile lors des procédés de filtration. Toujours est-il que toutes ces observations laissent sceptiques la communauté médicale, en sorte qu'en 1919, au sortir de la pandémie, on tient toujours que le bacille Pfeiffer est la cause de la grippe.

III. - LA DÉCOUVERTE DU VIRUS DE LA GRIPPE PORCINE

C'est alors qu'un grain de sable, une observation sur le terrain, va orienter les recherches vers la bonne piste. Le 30 septembre 1918, J.S. Koen, un vétérinaire travaillant au *Federal Bureau of Animal Industry*, rapporte la survenue d'une brusque épizootie d'infections respiratoires à l'occasion d'un meeting national des éleveurs porcins. Un grand nombre de porcs sont frappés et beaucoup meurent. La maladie ressemble en tout point à la grippe humaine, notamment par son caractère très contagieux. L'épizootie s'étend aux élevages du Middle West, qui sont décimés. Les fermiers nient l'existence de cette grippe, craignant l'effet sur l'opinion publique et le contrecoup financier. Malgré leurs réticences, Koen publie ses observations dans le *Journal of Veterinary Medicine* en 1919, insistant sur la similarité entre les gripes porcine et humaine : « La similitude entre les épidémies humaines et porcines est telle qu'il est fréquemment rapporté qu'une épidémie familiale est immédiatement suivie d'une épizootie dans l'élevage et *vice versa* [...], ce qui suggère une étroite relation entre les deux maladies. » De telles coïncidences entre les épidémies, déjà observées dans le passé, sont également signalées en Europe et en Chine. Dans les années suivantes, la grippe continue à frapper les élevages de porcs du Middle West. En 1922-1923, Koen réussit à transmettre la maladie d'un porc à l'autre par le mucus respiratoire, mais, lui aussi, échoue à transmettre la maladie avec les filtrats.

C'est à cette époque, en 1923, qu'un jeune médecin, Richard Shope (1902-1966), originaire de l'Iowa (Figure 2), est engagé par Paul Lewis, pour travailler sur son nouveau sujet de recherche, la résistance innée des cobayes à la tuberculose. Il intègre la division du *Rockefeller Institute for Comparative Pathology* à Princeton, près de Philadelphie. Shope est un homme talentueux, original et attachant, à l'esprit indépendant et curieux. Lors d'un court séjour qu'il fait dans sa famille qui vit dans l'Iowa, Shope est fortuitement témoin d'une épizootie meurtrière de grippe porcine, associée à une mortalité de 4 %, un taux proche de celui de la grippe espagnole. Lui aussi est frappé par la similarité avec la grippe humaine. Quand son patron Paul Lewis meurt tragiquement de la fièvre jaune au Brésil en 1929, Shope décide de réorienter ses recherches vers la

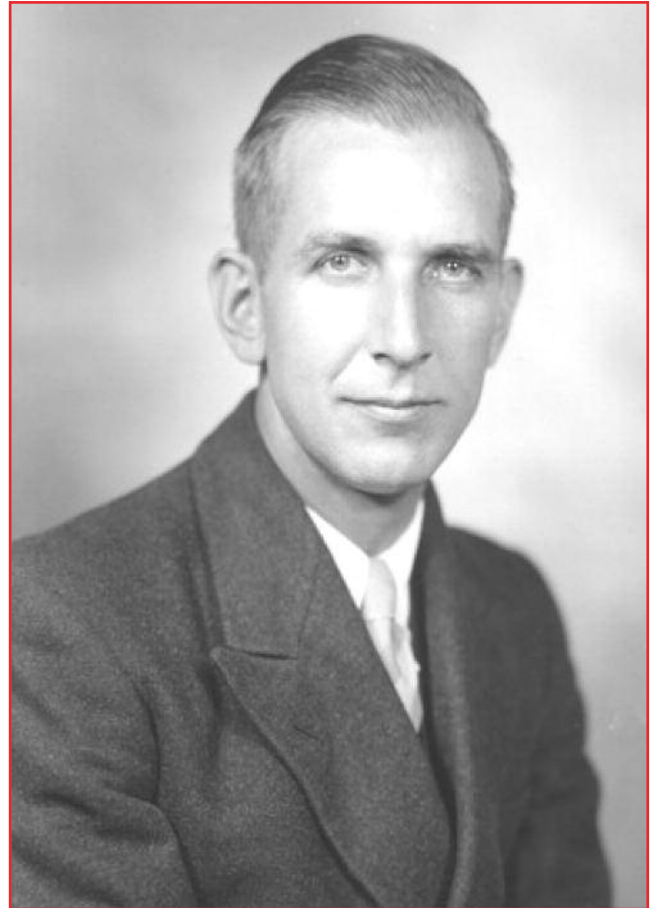


Fig. 2 - Richard Shope (1902-1966).

grippe porcine, d'autant que son travail sur la tuberculose ne donne aucun résultat. Il est alors amené à retourner dans l'Iowa pour étudier une épidémie dans des élevages de porcs. Dans une série d'expériences, il réussit à transmettre la grippe à des jeunes cochons en bonne santé, à partir de sécrétions ou d'extraits de broyats pulmonaires de cochons malades. Mieux, Shope réussit, là où Koen et beaucoup d'autres ont échoué quelques années auparavant : il inocule la grippe à des porcs après filtration des sécrétions respiratoires. À cette époque, les filtres organiques de collodion (nitrate de cellulose) commencent à remplacer les filtres de porcelaine, ce qui a probablement facilité le succès de ses tentatives. Il montre aussi que l'adjonction du *Bacillus influenzae suis*, une bactérie du porc proche de la bactérie humaine, entraîne une maladie beaucoup plus grave. Ainsi, le bacille de Pfeiffer est enfin relégué à sa vraie place, celle d'une bactérie de la flore commensale du pharynx, surinfectant les poumons fragilisés par l'infection virale. De plus, Shope établit une relation entre les gripes porcines et humaines, en montrant que les anticorps des patients survivant à la pandémie de 1918 sont capables de protéger le porc contre la grippe porcine. En 1931, il publie trois articles dans le *Journal of Experimental Medicine*, où il démontre que la grippe porcine est due à un virus.

IV. - LA DÉCOUVERTE DU VIRUS DE LA GRIPPE HUMAINE

La découverte majeure de Shope ouvre une voie royale à l'identification du virus responsable de la grippe humaine qui aura lieu paradoxalement au Royaume-Uni. En 1922, ce pays se remet péniblement de la Première Guerre mondiale et de la grippe espagnole. La principale institution de recherche du pays, le *Medical Research Council* (MRC), décide d'encourager les études sur les virus dans un nouvel institut, le *National Institute for Medical Research* (NIMR). Ce centre est installé à Hampstead, dans les faubourgs de Londres, dans un énorme bâtiment de briques au toit de cuivre vert, situé au sommet de Bittacy Hill. L'objectif de l'Institut est d'améliorer les méthodes d'études des virus. Pour cela, on recrute des jeunes médecins, mais aussi des spécialistes de microscopie et des physiciens, comme William Elford, pour mettre en œuvre et améliorer les méthodes de filtration sur membrane de collodion et d'ultracentrifugation pour purifier les virus et déterminer leur taille.

C'est à cette époque qu'un magazine de chasseurs, le journal *Field*, approche le MRC pour diligenter une étude sur la prévention de la maladie de Carré par vaccination. Cette grave infection virale, qui ressemble à la rougeole et à la grippe, touche près de 50 % des jeunes chiens et en-

traîne une forte mortalité. Cette requête s'accompagne d'un généreux soutien financier. Le travail est confié à Patrick Laidlaw, un microbiologiste très compétent, modeste, aimant soutenir et encourager les jeunes membres de son département. Du fait de la haute contagiosité de la maladie de Carré, on met en place des installations spéciales de sécurité pour les animaux. Un terrain est donc acquis à Mill Hill, pour construire une ferme, avec des bâtiments conçus pour prendre d'importantes précautions d'isolement, protégeant les animaliers et les chercheurs. Le personnel est protégé par des vêtements qui sont décontaminés avant et après le travail dans l'unité. Cette localisation est d'autant plus utile que, déjà à cette époque, les défenseurs des animaux sont violemment opposés à tout type d'expérimentation.

Une fois de plus, le hasard va servir la recherche. À l'occasion d'une épidémie de maladie de Carré survenue dans la région, des furets sauvages présentent les signes typiques de la maladie. Une observation qui s'avérera décisive par la suite. En 1926, Patrick Laidlaw et George Dunkin réussissent à transmettre le virus de la maladie de Carré à ce petit mammifère albinos. Le furet devient, dès lors, un animal très utile et très répandu pour étudier ce virus. Afin de renforcer l'équipe de Laidlaw, le MRC recrute alors Christopher Andrewes (1896-1988) (Figure 3), un jeune médecin brillant qui travaille au *St Bartholomew's Hospital*.



Fig. 3 - Christopher Andrewes (1896-1988).

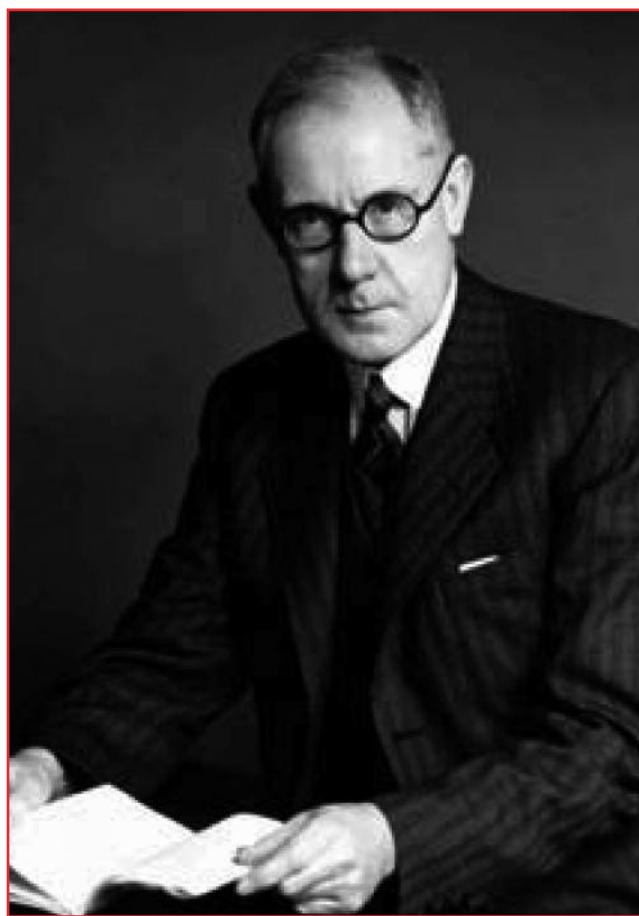


Fig. 4 - Wilson Smith (1897-1965).

Celui-ci a travaillé deux ans à l'Institut Rockefeller sur la fièvre rhumatismale, puis sur des virus oncogènes du lapin. Il commence à travailler avec Elford sur le pouvoir infectieux du virus de la maladie de Carré, en inoculant des sécrétions filtrées sur des membranes de collodion de tailles variées. À nouveau, le hasard intervient. En 1933, survient à Londres une épidémie de grippe, à un moment où l'équipe de Laidlaw et Andrewes accueille un nouveau venu, Wilson Smith (1897-1965), un jeune bactériologiste (Figure 4), soigneux, fiable, doué d'un fort sens de l'humour, mais surtout travailleur infatigable. Au tout début de l'épidémie de grippe, Smith prélève les sécrétions pharyngées de patients, incluant celles d'Andrewes et de quelques collaborateurs grippés. Il tente d'instiller les filtrats des exsudats de gorge à divers animaux de laboratoire, par différentes voies, notamment la muqueuse nasale. Échecs. Mais il réussit facilement à transmettre la grippe aux furets ! Puis les chercheurs réussissent à propager la maladie par les sécrétions filtrées de furet en furet. En définitive, ils mettent au jour un virus filtrable, transmissible en série chez le furet et induisant une immunité contre la réinfection, car les furets infectés deviennent résistants à la grippe. Smith, Laidlaw et Andrewes publient leurs résultats en 1933 : la grippe humaine est bien due à un virus, bien qu'ils n'aient pas réussi la transmission humaine. Richard Shope confirme rapidement la découverte. Il montre la capacité neutralisante des anticorps humains contre le virus porcin. En 1936, Charles Stuart-Harris, un jeune chercheur, est accidentellement exposé aux éternuements d'un furet qu'il a lui-même infecté par le virus de la grippe. Deux jours plus tard, il contracte une grippe qui le cloue au lit plusieurs jours. On isole de sa gorge le virus et des anticorps spécifiques apparaissent dans son sérum. La chaîne de transmission est bouclée et le troisième postulat de Koch, qui établit un lien de causalité, est enfin rempli, en montrant que la transmission expérimentale du virus chez l'homme reproduit la maladie. Le rôle du virus sera confirmé par son isolement lors d'épidémies. Quelques années plus tard, on observera le virus au microscope électronique (Figure 5).

La découverte du virus profite des rapides progrès dans les techniques de propagation *in vitro* des virus, avec le développement des cultures de cellules et l'utilisation des œufs embryonnés. En 1934, Macfarlane Burnet réussit à cultiver sur des œufs embryonnés de poulet le virus de la peste aviaire, dont on ignore alors la parenté avec le virus de la grippe. En 1935, Wilson Smith réussit à cultiver le virus de la grippe humaine sur embryons de poulet. Puis en 1940, Burnet l'inocule dans la cavité allantoïde de ces embryons, ce qui permet de récolter de grandes quantités de virus, ouvrant la porte à la préparation de vaccins.

Jusqu'à l'orée de la Seconde Guerre mondiale, on pense qu'il n'existe qu'un seul virus de la grippe, retrouvé chez l'homme et le porc. Cela va rapidement être remis en question par la mise au jour de nouvelles propriétés du virus. Tout d'abord en 1940, on découvre un nouveau virus différent de celui isolé en 1933. À l'occasion de petites épidémies bénignes de grippe saisonnière, frappant chez des

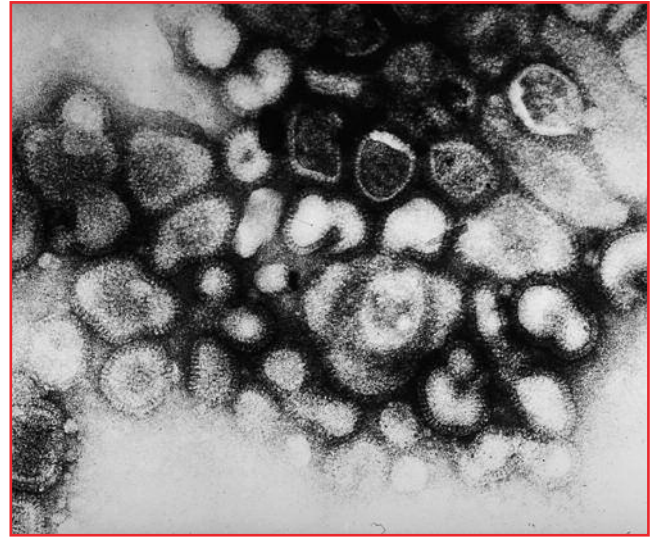


Fig. 5 - Le virus (*Myxovirus influenzae*) observé au microscope électronique.

personnes âgées dans les maisons de retraite, on remarque que les sérums des convalescents ne neutralisent pas le virus de la grippe humaine et porcine. Le virus isolé en culture sur œuf est clairement distinct du virus de la grippe. Dès lors, on parle de virus « A » pour la grippe saisonnière et de virus « B » pour ce nouveau venu. Quelques années plus tard, en 1951, on découvrira un autre virus apparenté au virus A, le virus « C » pourvoyeurs de rhinites virales. Contrairement au virus A, la virulence des virus B et C reste très stable.

V. - LA DÉCOUVERTE DE LA DIVERSITÉ DU VIRUS DE LA GRIPPE : HÉMAGGLUTININE ET NEURAMINIDASE

En 1941 à New York, George Hirst (1910-1994) (Figure 6) fait une observation fortuite très importante, qui va ouvrir la voie à la découverte de l'extrême diversité du virus. En prélevant du liquide allantoïde riche de virus sur œuf embryonné, il provoque parfois de petites hémorragies d'origine traumatique, et remarque que les globules rouges s'agglutinent en petits amas : les virus très abondants induisent l'adhésion des globules rouges les uns aux autres, ce qu'on nomme « hémagglutination ». Hirst observe aussi ce phénomène avec les globules rouges de plusieurs espèces de mammifères, y compris l'homme et le porc. Le virus porte donc une « hémagglutinine », dite « H », capable de former ces amas. On montrera par la suite qu'il s'agit d'une glycoprotéine exposée sur l'enveloppe du virus, qui s'attache à des récepteurs de sucres abondants à la surface des globules rouges. Cette hémagglutination est inhibée par les sérums de convalescents, qui bloquent l'adhésion des virus aux hématies en neutralisant l'hémagglutinine. Grâce à des collections de sérums de patients ou d'animaux ayant contracté la grippe, on peut rapidement distinguer plusieurs « hémagglutinines » : les virus sont porteurs « d'antigènes » distincts, qui permettront d'identifier différentes « souches » de virus.



Fig. 6 - George Hirst (1910-1994).



Fig. 7 - Thomas Francis (1900-1969).

À quel récepteur le virus s'attache-t-il sur des globules rouges ? En 1948, on découvre que l'hémagglutination est inhibée par addition de mucines, polymères de sucres qui sont des acides sialiques. De plus, le traitement des globules rouges par une enzyme bactérienne, une « neuraminidase » extraite de la bactérie du choléra (*Vibrio cholerae*), prévient l'hémagglutination. Les acides sialiques sont donc les récepteurs du virus sur les globules rouges. Ils tapissent abondamment l'épithélium respiratoire, expliquant le tropisme du virus pour les voies aériennes. Hirst fait une autre découverte importante. Il remarque que l'hémagglutination est un phénomène éphémère : les hématies agglutinées se désagrègent au bout d'un certain temps. Pourquoi ? Il pressent que le virus pourrait produire une enzyme qui les dissocierait après un certain temps. Cette hypothèse est corroborée quelques années plus tard, en 1949, par un Britannique d'origine allemande, Alfred Gottschalk (1894-1973). Dans le laboratoire de Burnet à Melbourne, il découvre que le virus de la grippe possède un *Receptor Destroying Enzyme* (RDE), qui s'est avéré être une neuraminidase, désignée « N », capable de séparer les agrégats en coupant les acides sialiques où s'accrochent les hémagglutinines des virus. La neuraminidase libère ainsi les virus attachés aux hématies et aux cellules. Grâce aux sérums de convalescents et d'animaux, les souches de virus vont désormais être classées en fonction de leur hémagglutinine et de leur neuraminidase.

VI. - LA MISE AU POINT DU VACCIN CONTRE LA GRIPPE

Dès la découverte du virus humain en 1933, un des premiers objectifs des chercheurs est de préparer un vaccin. Les premiers pas sont incertains. En 1936, un virologue, Thomas Francis (1900-1969) (Figure 7) de l'Université de Michigan, étudie la réponse immune des patients et des animaux de laboratoire. Il n'hésite pas à inoculer des volontaires, par voie sous-cutanée, avec des virus vivants cultivés sur embryons de poulet. Il observe l'apparition d'anticorps protecteurs dans le sérum, avec un pic en deux semaines et une persistance pendant six mois. En 1936-1937, d'autres injectent des filtrats de poumons de souris, fourmillant de virus vivants, par voie intramusculaire à des enfants (!), ce qui induit une certaine protection. Dès lors, par sécurité – il était temps –, on décide, pour les essais de vaccination, d'inactiver les virus produits sur embryons de poulet ou sur poumons de souris. Au Royaume-Uni en 1937, William Smith administre, par voie sous-cutanée, des filtrats inactivés par le formaldéhyde à des militaires. Malheureusement, une épidémie survient avant la fin de l'essai et il ne sera pas possible d'en estimer l'efficacité. D'autres tentatives au Royaume-Uni réalisées avec des virus inactivés aux ultra-violets, restent infructueuses. Ces suspensions virales « brutes », inactivées par le formaldéhyde, entraînent l'apparition d'anticorps, mais ne font pas la preuve

de leur réelle efficacité. Ces échecs sont probablement dus à l'utilisation de virus inactivés peu immunogènes et à doses insuffisantes. De plus, ces vaccins entraînent de nombreux effets secondaires locaux et généraux (fièvre).

Les premiers succès viendront en 1942, à la suite de plusieurs améliorations techniques dans la préparation des vaccins. Tout d'abord, le nouveau procédé, mis au point par Burnet, de récolte du liquide allantoïde d'œufs embryonnés, permet l'obtention de grandes quantités de virus, que l'on peut titrer par hémagglutination et purifier par centrifugation à haute vitesse. Hirst réussit à induire de forts taux d'anticorps protecteurs chez les vaccinés, avec des suspensions virales inactivées et concentrées. Grâce à des essais réalisés sur plusieurs milliers de soldats en 1942 et 1943, on peut obtenir des taux de protection contre la grippe saisonnière de 70 à 80 %. Par la suite, l'efficacité et la tolérance de ces vaccins sont sans arrêt améliorés, suivant les progrès des connaissances sur le virus. Les firmes pharmaceutiques américaines produisent dès 1945 les premiers vaccins commerciaux. En 1946, on confirme la très bonne efficacité de ces vaccins, qui ont fortement diminué la mortalité, notamment chez les personnes âgées. En apparence, la crainte d'une résurgence pandémique s'éloigne.

L'immédiat après-guerre est marqué par une pandémie en 1947, révélant l'absence de protection par le vaccin. Cette alerte met le doigt, de façon inattendue, sur la variabilité des virus, inconnue à l'époque : le vaccin devient inefficace lorsqu'un virus nouveau apparaît. On découvrira par la suite les causes de l'évolution des virus. Dès lors, on préparera chaque année le vaccin avec le dernier virus isolé la saison précédente, en sorte de contrecarrer les variations du virus. La fabrication du vaccin devient une course entre le nouveau virus et le délai de production du vaccin. Aujourd'hui, la production du vaccin démarre par une décision de l'OMS en février de chaque année, qui préconise la souche de virus à utiliser, isolée l'hiver précédent.

En France, les premiers vaccins sont développés à l'Institut Pasteur, sous l'égide des pionniers, René Dujarric de La Rivière et Claude Hannoun, à partir des années 1950. Une production semi-industrielle d'un vaccin inactivé produit sur œuf embryonné démarre dès 1955. Ce vaccin va connaître un succès croissant. De quelques centaines de milliers de doses administrées en 1958, on passe à 4 millions de doses en 1976, à 7 millions de doses en 1981, pour atteindre un chiffre record, en 2008, de 9 millions de doses. Le vaccin est administré aux personnes de plus de 65 ans, aux enfants entre six mois et trois ans, aux patients fragiles atteints de maladies chroniques. Paradoxalement, on verra régresser le nombre de doses administrées à la population lors de la pandémie de 2009.

Conjointement, on cherche à améliorer la qualité des vaccins pour éviter les effets secondaires. À partir de 1966, des vaccins très purifiés sont préparés en traitant par des détergents (qui libèrent les antigènes viraux) les suspensions virales, qui sont ensuite ultra-centrifugés. On cherche

aussi à augmenter les rendements de culture de virus, pour pouvoir disposer plus rapidement des nouveaux vaccins, dès la fin de l'automne. D'abord, on doit adapter les virus sauvages, souvent difficiles à faire croître, par de multiples passages sur œuf embryonné. Ce procédé entraîne des mutations *in vitro*, préjudiciables à l'efficacité du vaccin. C'est pourquoi, aujourd'hui, on utilise des virus dits de « substitution », adaptés à la culture en masse. On croise des virus de laboratoire de croissance facile (H1N1, H3N2...), avec le virus « sauvage » proposé par l'OMS, en les cultivant conjointement. C'est ainsi que l'on obtient des virus de laboratoire, à croissance rapide, exprimant l'hémagglutinine et la neuraminidase du virus sauvage. D'excellents rendements sont obtenus sur milieu à œuf avec ces virus « réassortis ». Les antigènes viraux purifiés sont ensuite inactivés par le formaldéhyde et la β -propiolactone. La dose unitaire utilisée est habituellement l'équivalent de 15 microgrammes d'hémagglutinine. Pour améliorer la réponse en anticorps neutralisants chez les personnes âgées, on peut ajouter un « adjuvant », qui stimule l'immunité, comme l'hydroxyde d'alumine ou les « squalènes », dérivés du cholestérol provenant d'huile de poisson. Des procédés de culture sur cellules de rein de chien (dites MDCK) permettent de produire des vaccins exempts de protéines d'œuf allergisantes. On peut aussi fabriquer des virus vivants atténués, adaptés au froid et administrés par voie nasale. Le vaccin polyvalent contre la grippe saisonnière, renouvelé tous les ans, contient trois virus : un virus H1N1 dérivé de celui de 1977 (aujourd'hui remplacé par le virus H1N1 2009), un virus H3N2 isolé lors de la dernière saison et un virus B. Les vaccins inactivés confèrent une protection d'environ 70 % à 80 %.

VII. - LA DÉCOUVERTE DES MÉDICAMENTS ANTIVIRAUX

Dans les années 1960, les recherches s'intensifient pour découvrir des médicaments actifs contre les infections virales. On synthétise en 1963 des molécules cycliques dérivées de l'adamantane (l'amantadine et la rimantadine), qui se révèlent actives contre le virus de la grippe en culture cellulaire *in vitro*. La cible de ces molécules est une protéine virale (M2), qui joue le rôle de « canal ionique ». Ce « pore » acidifie les vacuoles où se niche le virus lors de son entrée dans les cellules, ce qui facilite le passage du virus dans le cytoplasme. L'amantadine inhibe la pénétration des virus en bloquant ce « pore ». Autorisés en 1976 aux États-Unis à titre prophylactique et thérapeutique, ces médicaments sont décevants, peu efficaces et d'un faible apport pour lutter contre la grippe. Il faut donc trouver d'autres armes pour tuer le virus.

Un chercheur australien, Graeme Laver (1929-2008) (Figure 8), va contribuer à la découverte d'une drogue efficace contre le virus de la grippe. Son histoire est singulière. Travaillant comme technicien à Melbourne en 1947 avec Alfred Gottschalk, il contribue à la découverte de la composition du RDE du virus influenza. En digérant la mucine d'œuf par l'enzyme, il réussit à démontrer que

l'acide sialique est son substrat. Il va à Londres faire une thèse de chimie organique, qu'il soutient en 1958, puis rejoint le laboratoire de Stephen Fazekas de St Groth, à la *John Curtin School* de l'*Australian National University*, pour travailler sur les antigènes du virus influenza, avec un jeune post-doctorant, Robert Webster, qui deviendra un des grands spécialistes du virus de la grippe. C'est là qu'il démontre que le virus H3N2 qui sévit en 1968 est un hybride « homme-porc ». Par la suite, alors que la plupart des chercheurs orientent leurs recherches sur l'hémagglutinine, Laver choisit de s'intéresser à la neuraminidase.

Laver est un esprit original. Dans les années 1960, il décide d'étudier le portage des virus de la grippe chez les oiseaux sauvages. Il installe un laboratoire de fortune sur une île déserte, à environ 80 kilomètres de la côte du Queensland, à hauteur de la Grande barrière de corail en Australie. Il reste d'abord trois semaines sur l'île Tryon, un paradis pour les oiseaux sauvages, sur lesquels il prélève des échantillons de fientes et de sang. Il trouve que ces oiseaux marins, notamment les puffins et les sternes, possèdent des anticorps contre la neuraminidase N2. Sur cette même île, il isole aussi en 1972 un virus aviaire possédant une neuraminidase inconnue, de type N9.

En 1977 à Canberra, il entreprend la cristallisation de l'enzyme, une opération très délicate qui permet de connaître la forme précise et détaillée de la protéine, ce qu'on appelle la « structure tridimensionnelle ». Pour cela, il lui faut cultiver en masse le virus – sur environ un millier d'œufs –, puis le concentrer par centrifugation. En 1978, il obtient facilement à partir d'une suspension très riche de virus, titrée à 50 milliards de particules par millilitre, des cristaux de la neuraminidase N2 d'un virus humain H3N2. En collaboration avec Peter Colman, cristallographe à Munich, Laver analyse ces cristaux aux rayons X, ce qui lui permet de visualiser la molécule en trois dimensions. La structure de l'enzyme est « résolue » en 1982 et les résultats sont publiés par la prestigieuse revue *Nature*. L'analyse de la protéine dévoile l'existence d'une « poche », où se lie l'acide sialique, le substrat de la neuraminidase. Ce travail est une approche pionnière, très novatrice, qui connaîtra par la suite d'autres grands succès, notamment avec la découverte des anti-protéases inhibant la multiplication du virus du sida.

La cavité « catalytique » de la neuraminidase est aussi son talon d'Achille. Réussir à la bloquer, c'est inhiber l'enzyme, c'est-à-dire arrêter la multiplication des virus. Malgré l'échec du criblage de plus de 25 000 molécules pour tenter d'inhiber l'enzyme, Laver s'acharne. Il découvre dans la littérature scientifique que deux chimistes autrichiens, P. Meindl et H. Tuppy, ont réussi à synthétiser en 1969 à Vienne un composé appelé « DANA », qui inhibe partiellement la neuraminidase et bloque la multiplication virale en culture cellulaire. Ces chercheurs ont testé chez l'animal la molécule et certains de ses dérivés organiques. En l'absence de résultats probants, ils abandonnent leurs recherches en 1977. Laver teste cette molécule DANA avec la neuraminidase cristallisée : elle se localise parfaitement

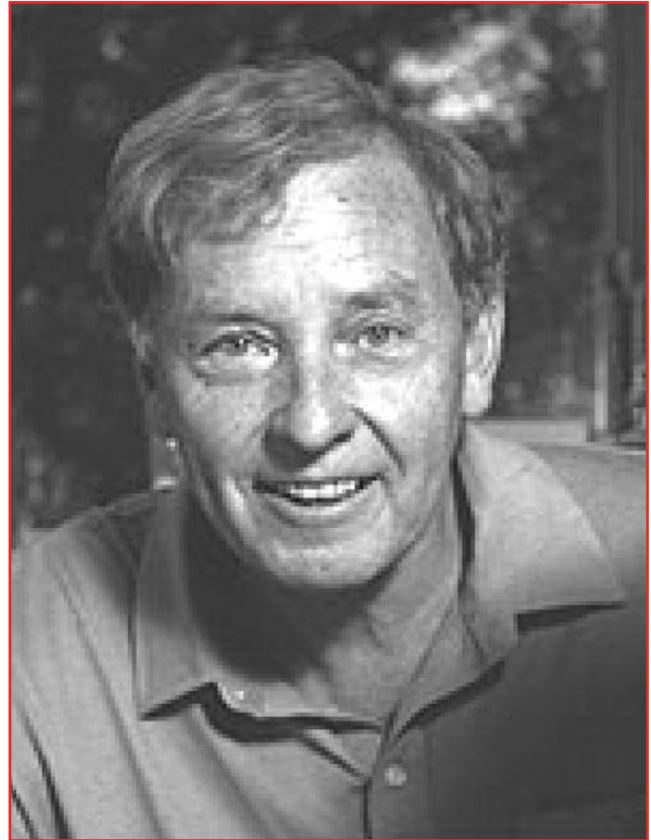


Fig. 8 - Graeme Laver (1929-2008).

dans la cavité catalytique de l'enzyme. Convaincu qu'il est possible d'améliorer l'affinité de ces molécules pour le site catalytique, il décide en 1985 de créer une *start-up*, la compagnie Biota. Il confie le travail de modification de DANA au chimiste Mark von Itzstein. Et cela marche. En 1993, ils publient dans *Nature* la découverte d'une drogue qui inhibe la neuraminidase et stoppe la multiplication virale. La molécule modifiée, découverte en 1989, a une affinité 10 000 fois plus grande que DANA, et reste sans action sur les neuraminidases des cellules humaines, un gage de non-toxicité. Aucune compagnie pharmaceutique n'est intéressée, à l'exception du laboratoire Glaxo qui achète la licence. Ainsi naît le zanamivir ou « Relenza ». Les essais cliniques de Glaxo commencent en 1994 en Virginie. La drogue est efficace et bien tolérée, administrable par inhalation. Pendant ce temps-là, la petite firme californienne Gilead produit, suivant la même approche, un inhibiteur très proche, l'oseltamivir ou « Tamiflu », administrable par voie orale. Le laboratoire suisse Roche achète le produit. On synthétise aujourd'hui cette molécule à partir d'une substance naturelle extraite de la badiane, « l'anis étoilé », qui n'a pas d'action anti-virale mais constitue une source abondante de molécules modifiables. Depuis, quatre grandes firmes pharmaceutiques cherchent à fabriquer de nouveaux inhibiteurs de la neuraminidase. On peut aujourd'hui traiter efficacement la grippe par ces anti-viraux, à condition de donner ces drogues précocement au cours de la maladie, ou à titre préventif après un contact avec un grippé. Administré au début de la grippe, l'oseltamivir

inhibe la multiplication virale et tarit les virus des sécrétions en 24 heures, ce qui raccourcit de quelques jours la durée de la grippe et arrête la contagion. L'infatigable Graeme Laver meurt à 79 ans en 2008, en allant à un congrès sur la grippe au Portugal.

L'arsenal thérapeutique contre la grippe comporte aussi des antibiotiques pour lutter contre les surinfections bactériennes, si fréquentes au cours de la grippe. Bien sûr, en cas de détresse respiratoire, les techniques de réanimation permettent d'éviter un grand nombre de morts. Très récemment, on a même utilisé des techniques d'oxygénothérapie, lorsque les poumons sont momentanément

obstrués, permettant de maintenir les fonctions vitales jusqu'à la reconstitution du tissu pulmonaire. Parmi les méthodes préventives, le lavage des mains évite les contaminations indirectes qui peuvent survenir au cours de la grippe. De même, la protection physique contre les aérosols de virus, par des masques, et les mesures d'isolement individuel ont démontré leur efficacité. Lorsque l'épidémie prend de l'ampleur, les mesures d'éviction scolaire et les interdictions des rassemblements peuvent faire chuter rapidement le nombre de cas de grippe.

Conflit d'intérêt : aucun.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ouvrages de référence : Barry J.M., *The great influenza. The*

epic story of the deadliest plague in History, Penguin, New York, 2004 ; Crosby A.W., *America's forgotten pandemic*, Cambridge University Press, 1989 ; Kolata G.B., *Flu: The Story*

of the Great Influenza Pandemic of 1918 and the Search for the Virus That Caused It, Macmillan, Farrar, Straus, Giroux, New York, 1999.