

Avertissement : le texte ci-dessous est la traduction en français d'un article publié en 2015 en langue anglaise (<https://www.nature.com/articles/nm.3985?fbclid=IwAROIITfDIT-uxNFpvtQHxFrF6QaF1hKE1Ey2TPreI17XfUIbpUIAosDc>) dans le journal Nature Medicine en libre accès sur internet. Elle a pour but de permettre une lecture affranchie de la difficulté de l'anglais technique pour les personnes ne maîtrisant ni l'anglais ni le vocabulaire de la recherche en virologie et la microbiologie. Bien que rigoureuse cette traduction ne saurait d'aucune façon être citée comme les dires des auteurs du texte original. Les phrases essentielles à la compréhension sont surlignées en jaune.

Un foyer de coronavirus de chauves-souris ressemblant au SARS pourrait contaminer les êtres humains

Vineet D Menachery¹, Boyd L Yount Jr¹, Kari Debbink^{1,2}, Sudhakar Agnihothram³, Lisa E Gralinski¹, Jessica A Plante¹, Rachel L Graham¹, Trevor Scobey¹, Xing-Yi Ge⁴, Eric F Donaldson¹, Scott H Randell^{5,6}, Antonio Lanzavecchia⁷, Wayne A Marasco^{8,9}, Zhengli-Li Shi⁴ & Ralph S Baric^{1,2}

L'émergence du syndrome respiratoire aiguë causé par le coronavirus SARS-CoV ainsi que du syndrome respiratoire du Moyen-Orient causé par le coronavirus MERS-CoV illustre la menace de transmission virale inter-espèces conduisant à des épidémies chez l'être humain. Ici, nous examinons le potentiel pathogénique d'un virus de type SARS, SHC014-CoV, qui circule dans les populations de chauves-souris fer à cheval chinoises [1]. En utilisant le mécanisme de transcription inverse du SARS-CoV [2], nous avons créé et caractérisé un virus chimérique qui exprime la protéine de surface S SHC014 ('spicule') d'un coronavirus des chauves-souris sur la structure de base d'un virus SARS-CoV adapté aux souris. Les résultats indiquent que les virus du groupe 2b qui encodent la protéine SHC014 peuvent utiliser efficacement de multiples orthologues du récepteur humain ACE2 (enzyme de conversion de l'angiotensine 2) impliqué dans le SARS. Ces virus se répliquent avec efficacité dans les cellules des voies respiratoires supérieures en atteignant des concentrations *in vitro* comparables aux souches épidémiques du SARS-CoV. De plus, des expériences *in vivo* démontrent la réplication du virus chimérique dans les poumons des souris avec un effet pathogénique notable. L'évaluation des thérapies immunes contre le SARS et des modalités prophylactiques montre peu d'efficacité; que ce soit par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux ou de vaccins il n'a pas été possible de neutraliser l'infection des virus chimériques CoVs portant cette nouvelle protéine S. Sur la base de ces découvertes, nous avons dérivé synthétiquement dans son intégralité un virus SHC014 recombinant et démontré sa capacité robuste de réplication virale *in vitro* et *in vivo*. Notre travail suggère un risque potentiel de ré-émergence du SARS-CoV à partir de virus circulants à l'heure actuelle dans les populations de chauves-souris.

L'émergence du SARS-CoV a marqué une nouvelle ère dans la transmission inter-espèces de graves maladies respiratoires qui se répandent autour du globe avec un impact économique massif à cause de la mondialisation [3,4]. Depuis lors, plusieurs souches virales — influenza A H5N1, H1N1 et H7N9 et MERS-CoV — ont émergé des populations animales, causant des maladies considérables par leur mortalité et leurs dégâts économiques dans les régions affectées⁵. Bien que les actions de santé publique menées ont été capables d'arrêter l'épidémie de SARS-CoV[4] des études méta-génomiques récentes ont permis d'identifier les séquences de virus très semblables, circulant dans les populations de chauves-souris chinoises et pouvant engendrer de futures menaces [1,6]. Cependant, les séquences ne fournissent que peu d'information permettant d'identifier et de se préparer contre des virus pré-pandémiques futurs. Pour pouvoir examiner l'émergence potentielle chez l'être humain des CoVs circulant chez les chauves-souris, nous avons construit un virus chimérique qui encode une nouvelle protéine S ('spicule') provenant d'une zoonose CoV — c'est-à-dire la séquence du RsSHC014-CoV isolée des chauves-souris fer à cheval chinoises [1] — dans le contexte d'un virus SARS-CoV adapté aux souris. Le virus hybride ainsi construit nous a permis d'évaluer la capacité de cette nouvelle protéine S de causer une maladie indépendamment des autres mutations d'adaptation nécessaires dans sa structure naturelle. Avec cette approche nous avons caractérisé *in vivo* dans les cellules respiratoires supérieures humaines une infection CoV dont la médiation est assurée par la protéine SHC014 et testé l'efficacité des thérapies immunes à disposition contre le virus hybride SHC014-CoV. Prise dans son ensemble, cette stratégie a permis à partir de données méta-génomiques d'aider à prédire et se préparer pour de futur virus émergent.

Les séquences de SHC014 des autres virus RsWIV1-CoV montrent que ces CoVs sont les voisins les plus proches de la souche épidémique du SARS-CoV (Fig. 1a,b); cependant, il y a quelques différences importantes dans les 14 acides aminés ('résidues') qui se lient au récepteur humain ACE2, le récepteur du SARS-CoV, dont cinq jouent un rôle critique pour une variété d'hôtes : Y442, L472, N479, T487 et Y491 (ref. 7). In WIV1, trois de ces acides aminés diffèrent de ceux de la souche épidémique SARS-CoV Urbani, mais ces différences ne doivent pas altérer la capacité à se lier au ACE2 (Supplément Fig. 1a,b et Supplément Table 1). Ce fait est confirmé par des expériences de pseudotypage qui mesurent la capacité de lentivirus encodant les protéines S de WIV1 de pénétrer les cellules exprimant le récepteur

¹Department of Epidemiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA. ²Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA. ³National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas, USA. ⁴Key Laboratory of Special Pathogens and Biosafety, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, China. ⁵Department of Cell Biology and Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA. ⁶Cystic Fibrosis Center, Marsico Lung Institute, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA. ⁷Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona Institute of Microbiology, Zurich, Switzerland. ⁸Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁹Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. Correspondence should be addressed to R.S.B. (rbaric@email.unc.edu) or V.D.M. (vineet@email.unc.edu).

ACE2 humain (Supplément Fig. 1) et également par des essais de réplication *in vitro* du virus WIV1-CoV (ref. 1). Par contre, 7 des 14 acides aminés du SHC014 interagissant avec le ACE2 diffèrent de ceux du SARS-CoV, dont cinq sont critiques pour conférer une capacité à se lier à grande variété d'hôtes (Supplément Fig. 1c et Supplément Table 1). Ces changements, associés à l'impossibilité des lentivirus exprimant la protéine S SHC014 de pénétrer les cellules (Supplément Fig. 1d), suggère que la protéine SHC014 ne peut pas se lier au récepteur humain ACE2. Cependant, comme il a été rapporté que des changements similaires sur des souches de SARS-CoV ont permis la liaison au ACE2 [7,8], des essais fonctionnels additionnels étaient requis pour le vérifier. Nous avons donc introduit la protéine S du SHC014-CoV dans le squelette (structure de base) d'un virus SARS-CoV pouvant se répliquer et adapté aux souris (nous nous référons dans ce qui suit au CoV chimérique (virus hybride ainsi formé) comme le SHC014-MA15) à fin d'optimiser la possibilité d'étudier la pathogénie et les vaccins possibles chez les souris (Supplément Fig. 2a). Malgré les prédictions de modélisation de structure et les expériences de pseudotypage, le virus hybride SHC014-MA15 s'est révélé viable et se répliquait à de forts niveaux de concentration dans les cellules de type Vero (Supplément Fig. 2b).

Similairement au SARS, le SHC014-MA15 a besoin d'un récepteur fonctionnel ACE2 pour pénétrer les cellules et est susceptible de pouvoir utiliser les orthologues humains, de civettes ou de chauves-souris du récepteur ACE2 (Supplément Fig. 2c,d). Pour tester la capacité de la protéine SHC014 de permettre l'infection des voies respiratoires humaines, nous avons examiné leur sensibilité à ce virus en utilisant la lignée cellulaire Calu-3 2B4 (réf. 9). Nous avons observé la capacité de ce virus à les infecter et à produire une réplication robuste du SHC014-MA15, comparable à celle du SARS-CoV Urbani (Fig. 1c). Ces observations s'étendent aux cultures de cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures (HAE) largement infectées par les deux virus (Fig. 1d). Ensemble, ces données confirment la capacité des virus portant la protéine SHC014 d'infecter les cellules respiratoires et souligne la menace de transmission du SHC014-CoV à d'autres espèces.

Pour évaluer le rôle de la protéine SHC014 dans la médiation des infections *in vivo*, nous avons infecté des souris BALB/c de 10 semaines avec 10^4 unités (p.f.u.) de soit le SARS-MA15 ou le SHC014-MA15 (Fig. 1e-h). Les souris infectées avec le virus SARS-MA15 ont perdu du poids et sont mortes dans les 4 jours suivant l'infection (d.p.i.); par contre, les souris infectées par le SHC014-MA15 ont perdu du poids (10%) mais ne sont pas mortes.

(Fig. 1e). L'examen de la réplication virale a révélé des titres viraux presque équivalents dans les poumons infectés avec le SARS-MA15 ou le SHC014-MA15 (Fig. 1f). Les poumons des souris infectées par le SARS-MA15 étaient largement positifs au marquage antigénique au niveau des bronchioles et du parenchyme pulmonaire (Fig. 1g), ceux des souris infectées par le SHC014-MA15 présentaient des niveaux de marquage antigénique réduits (Fig. 1h). Par contre, aucune perte que marquage antigénique dans le parenchyme ni aucune réduction du score histologique global n'ont été observés suggérant une infection différentielle des tissus pulmonaires pour le SHC014-MA15 (pénétration moins profonde, note du traducteur) (Supplément Table 2). Subséquemment nous avons analysé l'infection chez des souris plus âgées (12-mois). Les souris infectées par le SARS-MA15 ont perdu du poids rapidement et ont succombé à l'infection (Supplément Fig. 3a,b). L'infection par le SHC014-MA15 a induit une perte poids durable, mais n'a présenté qu'une létalité minimale.

Figure 1 Les virus SARS se réplique dans les cellules des voies pulmonaires pour produire de la pathogénie *in vivo*. (a) Les séquences complètes des génomes des CoVs représentatifs sont alignées suivant un arbre phylogénétique comme décrit dans la section méthodes consultable en ligne. La barre d'échelle représente la substitution des nucléotides, avec soutien bootstrap supérieur à 70% marqué. L'arbre montre que les virus CoVs se divisent en trois groupes phylogéniques définis comme α -CoVs, β -CoVs et γ -CoVs. Les sous groupes rassemblés en grappes sont marqués comme 2a, 2b, 2c et 2d pour les β -CoVs et comme 1a et 1b pour les α -CoVs. (b) Les séquences d'acides aminés du domaines S1 des protéines S représentatives des β -CoVs du groupe 2b, incluant SARS-CoV, sont cartographiées phylogénétiquement. La barre échelonnée représente les substitutions d'acides aminés. (c,d) Réplication virale du SARS-CoV Urbani (noir) et du SHC014-MA15 (vert) après infection des cellules Calu-3 2B4 (c) ou de l'interface bien-différentié air-liquide des cultures cellulaires pulmonaires supérieures HAE (d) à une multiplicité d'infections (MOI) 0.01 pour les 2 types de cellules. Des échantillons ont été prélevés à différents temps en répliquant les mesures ($n = 3$) pour les expériences Calu-3 et HAE. (e,f) Perte de poids ($n = 9$ pour le SARS-CoV MA15; $n = 16$ pour le SHC014-MA15) (e) et réplication virale dans les poumons ($n = 3$ pour le SARS-CoV MA15; $n = 4$ pour le SHC014-MA15) (f) des souris BALB/c de 10-semaines BALB/c infectées par 1×10^4 p.f.u. de SARS-CoV MA15 (noir) ou SHC014-MA15 (vert) par voie intra-nasale (i.n.). (g,h) Images représentatives des coupes pulmonaires marquées pour les antigènes N du SARS-CoV de souris infectées avec le SARS-CoV-MA15 ($n = 3$ mice) (g) ou le SHC014-MA15 ($n = 4$ mice) (h). Pour chaque graphe, la valeur centrale représente la moyenne du groupe et les barres d'erreur définissent le s.e.m., 1 mm.

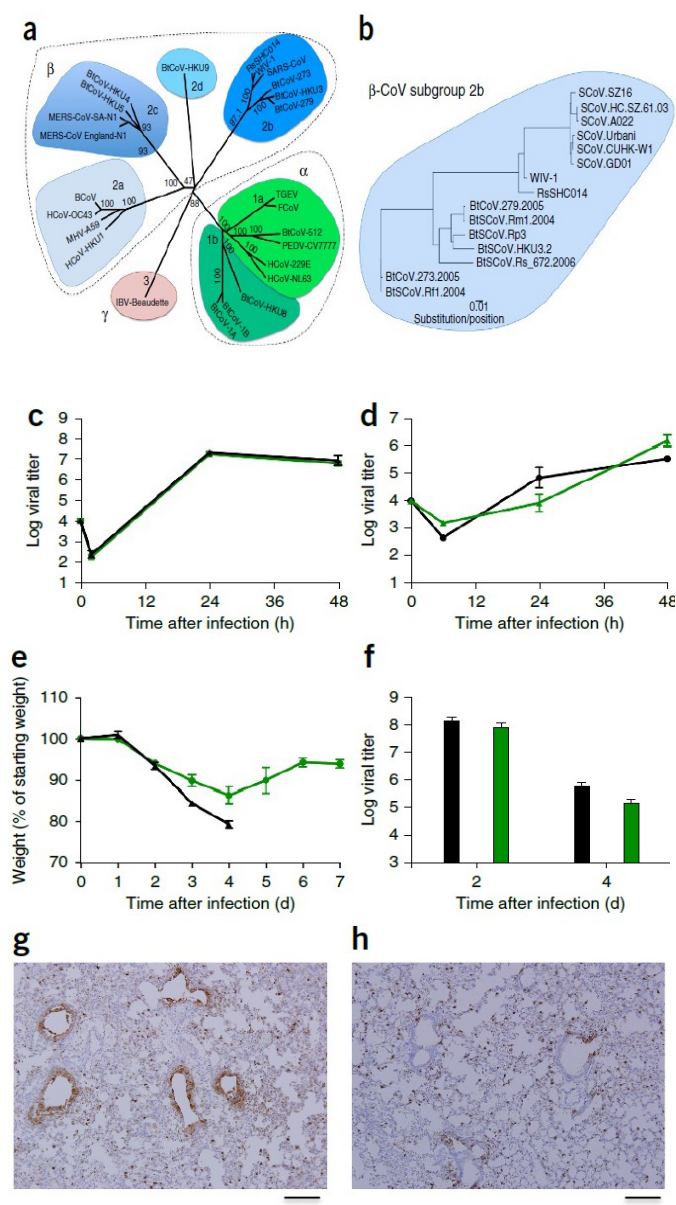
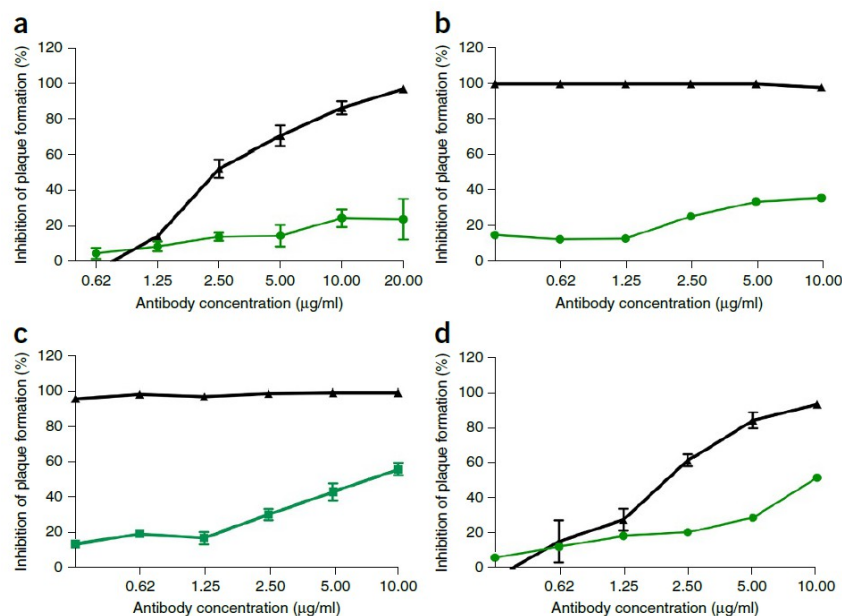


Figure 2 Les anticorps monoclonaux spécifiques du SARS-CoV Urbani présentent une efficacité marginale contre les autres CoVs ressemblant au SARS. **(a–d)** Des tests de neutralisation évaluant l'efficacité (mesurée comme une réduction du nombre de plaques) d'un panel d'anticorps monoclonaux (qui avaient tous été générés initialement contre l'épidémie de SARS-CoV) contre l'infection de cellules Vero avec le SARS-CoV Urbani (noir) ou le SHC014-MA15 (vert). Les anticorps testés étaient fm6 ($n = 3$ pour Urbani; $n = 5$ for SHC014-MA15)^{11,12} **(a)**, 230.15 ($n = 3$ pour Urbani; $n = 2$ pour SHC014-MA15) **(b)**, 227.15 ($n = 3$ pour Urbani; $n = 5$ for SHC014-MA15) **(c)** et 109.8 ($n = 3$ pour Urbani; $n = 2$ pour SHC014-MA15)¹³ **(d)**. Chaque point représente la valeur moyenne du groupe de mesures et les barres d'erreur définissent le s.e.m. Notons que les barres d'erreur pour les cellules Vero infectées par le SARS-CoV en **b,c** ne sont pas visibles car très petites.



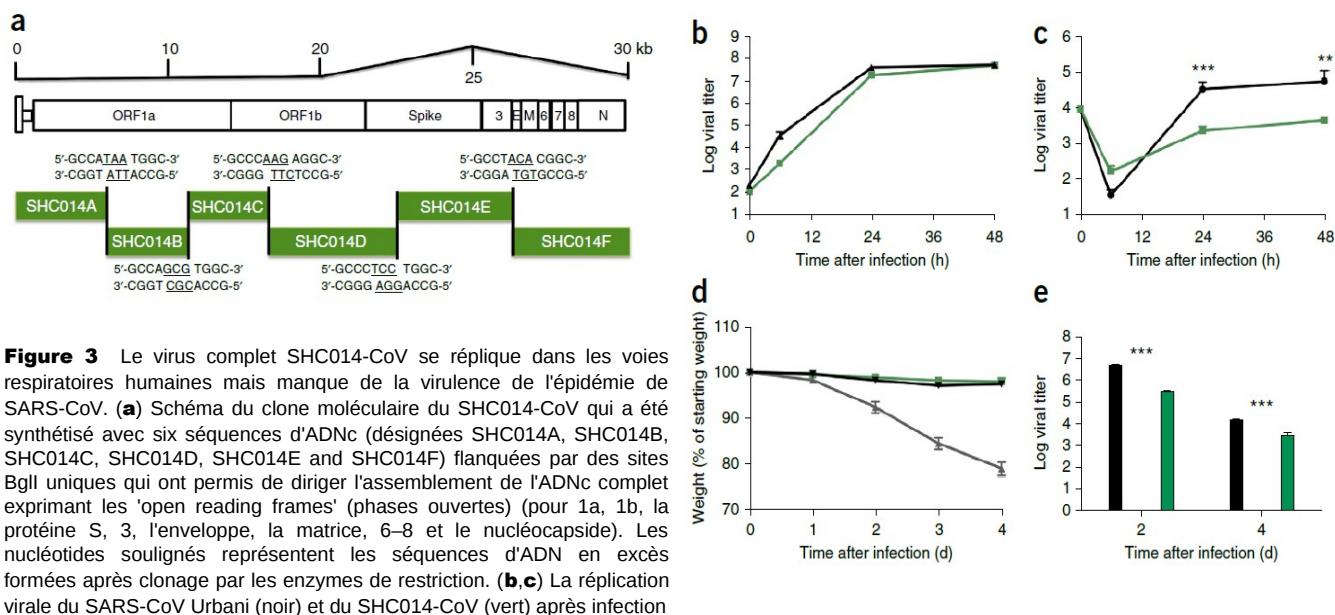
Les tendances des motifs de marquages antigéniques observées chez les jeunes souris se sont conservées chez les souris plus âgées (Supplément Table 3). Nous excluons la possibilité que l'infection par le SHC014-MA15 ait lieu via un autre récepteur sur la base d'une expérience utilisant des souris *Ace2*^{-/-}, qui n'ont pas montré de perte de poids ou présenté de marquage antigénique après infection par le SHC014-MA15 (Supplément Fig. 4a,b et Supplément Table 2). Dans leur ensemble, ces données indiquent que des virus comportant la protéine SHC014 sont capables d'induire une perte de poids chez les souris dans le contexte d'une structure de base de virus CoV.

Étant donné l'efficacité préclinique constatée des thérapies par anticorps monoclonaux dans le cas d'Ebola, tel que le ZMapp [10], nous avons donc ensuite cherché à déterminer l'efficacité des anticorps monoclonaux du SARS-CoV contre l'infection par le virus hybride SHC014-MA15. Quatre anticorps monoclonaux largement neutralisant les protéines S du SARS-CoV ont été identifiés précédemment et pourraient donc probablement être des agents possibles d'immunothérapie [11–13]. Nous avons examiné l'effet de ces anticorps sur la réplication virale (exprimée comme pourcentage d'inhibition de la réplication virale) et trouvé qu'alors que le SARS-CoV Urbani était fortement neutralisé par ces quatre anticorps à une concentration d'anticorps relativement faible (Fig. 2a–d) par contre la neutralisation n'opérait pas pour le SHC014-MA15. Le Fm6, un anticorps généré par les techniques 'phage display' et 'escape mutants' [11,12], n'a pas produit de niveaux significatifs d'inhibition de la réplication du SHC014-MA15 (Fig. 2a). De façon similaire, les anticorps 230.15 et 227.14, qui sont dérivés de cellules B mémoires de patients infectés par le SARS-CoV [13], n'ont également pas pu bloquer la réplication du SHC014-MA15 (Fig. 2b,c). Pour ces trois anticorps, les différences des séquences d'acides aminés entre les protéines S du SARS et SHC014 correspondaient à des changements directs ou adjacents des changements trouvés dans les 'escape' mutants du SARS-CoV (fm6 N479R; 230.15 L443V; 227.14 K390Q/E), ce qui explique probablement l'absence d'activité neutralisante des anticorps testés sur SHC014. Finalement, l'anticorps monoclonal 109.8 a été capable de produire une neutralisation de 50% du SHC014-MA15, mais seulement à haute concentration (10 μg/ml) (Fig. 2d). Ces résultats démontrent que des anticorps largement neutralisants contre le SARS-CoV n'ont qu'une efficacité marginale contre des souches émergentes de virus du type

SARS-CoV comme le SHC014-CoV.

Pour évaluer l'efficacité des vaccins existants contre l'infection par le SHC014-MA15, nous avons vacciné les souris âgées avec le virus complet du SARS-CoV doublement inactivé (DIV). Des travaux précédents ont montré qu'un DIV pouvait protéger les jeunes souris d'un challenge avec un virus homologue [14]; cependant, le vaccin échoue à protéger les animaux âgés qui présentent également une pathologie immune, indiquant la possibilité que leur état ait été aggravé à cause de la vaccination[15]. Ici nous avons trouvé que le DIV n'a pas conféré de protection vis-à-vis d'un challenge avec le SHC014-MA15 en terme de perte de poids et de concentration virale (Supplément Fig. 5a,b). Cela est cohérent avec des études précédentes qui ont montré qu'avec d'autres CoVs hétérologues du groupe 2b [15], des sérums de souris âgées vaccinées par DIV ont échoué à neutraliser le SHC014-MA15 (Supplément Fig. 5c). Notamment, la vaccination par DIV a produit des pathologies immunes marquées (Supplément Table 4) et de l'eosinophilie (Supplément Fig. 5d–f). L'ensemble de ces observations confirme que le vaccin par virus atténué ne protégerait pas contre une infection par SHC014 et pourrait probablement augmenter la maladie dans un groupe vacciné plus âgé (note du traducteur - ici les auteurs implicitement parlent des êtres humains!).

Au contraire de la vaccination des souris par DIV, l'utilisation de SHC014-MA15 comme vaccin vivant atténué a montré une protection croisée par rapport à un challenge avec le SARS-CoV, mais ces résultats présentent des défauts importants. Nous avons infecté des jeunes souris avec 10^4 p.f.u. de SHC014-MA15 et les avons observées pendant 28 j. Nous les avons ensuite exposées au SARS-MA15 au jour 29 (Supplément Fig. 6a). Infecter les souris avec une haute dose de SHC014-MA15 leur confère une protection contre un challenge avec une dose létale de SARS-MA15, bien qu'il n'y avait qu'une neutralisation minimal du SARS-CoV à partir des antisérums créés 28 j après l'infection par le SHC014-MA15 (Supplément Fig. 6b, 1:200). En l'absence d'un second boost d'anticorps, 28 d.p.i. représente le pic attendu de concentration en anticorps et implique que la protection contre le SARS-CoV diminuerait au cours du temps [16,17]. Des résultats similaires montrant la protection contre un challenge avec une dose létale de



des cellules Vero **(b)** et de l'interface air-liquide primaire bien différencié des cultures cellulaires HAE **(c)** à un MOI de 0.01. Les prélèvements d'échantillons ont été effectués à intervalle de temps ponctuels et répliquer plusieurs fois ($n = 3$) pour chaque groupe. Les données représentent une expérience pour les cellules Vero et les cellules HAE. **(d,e)** Perte de poids ($n = 3$ pour le SARS-CoV MA15, $n = 7$ pour le SHC014-CoV; $n = 6$ pour le SARS-Urbani) **(d)** et pour la réplication virale dans les poumons ($n = 3$ pour le SARS-Urbani et le SHC014-CoV) **(e)** chez des souris BALB/c de 10 s infectées par 1×10^5 p.f.u. de SARS-CoV MA15 (gris), SHC014-CoV (vert) et SARS-CoV Urbani (noir) par voie i.n. . Chaque point représente la moyenne du groupe et la barre d'erreur est défini par s.e.m. $^{**}P < 0.01$ et $^{***}P < 0.001$ en utilisant le test t de Student bilatéral pour chaque point.

SARS-CoV ont été observés chez les souris BALB/c âgées en ce qui concerne la perte de poids et la réplication virale (**Supplément Fig. 6c,d**). Cependant, l'infection par le SHC014-MA15 à la dose de 10^4 p.f.u. a induit une perte de poids $>10\%$ et une létalité chez certains animaux âgés (**Fig. 1** and **Supplément Fig. 3**). Nous avons observé que la vaccination avec une dose plus basse de SHC014-MA15 (100 p.f.u.), n'a pas produit de perte de poids, mais également ne permet pas de protéger les animaux âgés d'un challenge avec une dose létale de SARS-MA15 (**Supplément Fig. 6e,f**). Ensemble, ces données suggèrent qu'un challenge avec le SHC014-MA15 peut conférer une protection croisée contre SARS-CoV par l'intermédiaire d'épitopes (note du traducteur : les épitopes sont des petites séquences spécifiques d'acides aminés que les anticorps reconnaissent), mais que la dose requise induit de la pathogénie et empêche son utilisation comme vaccin atténué.

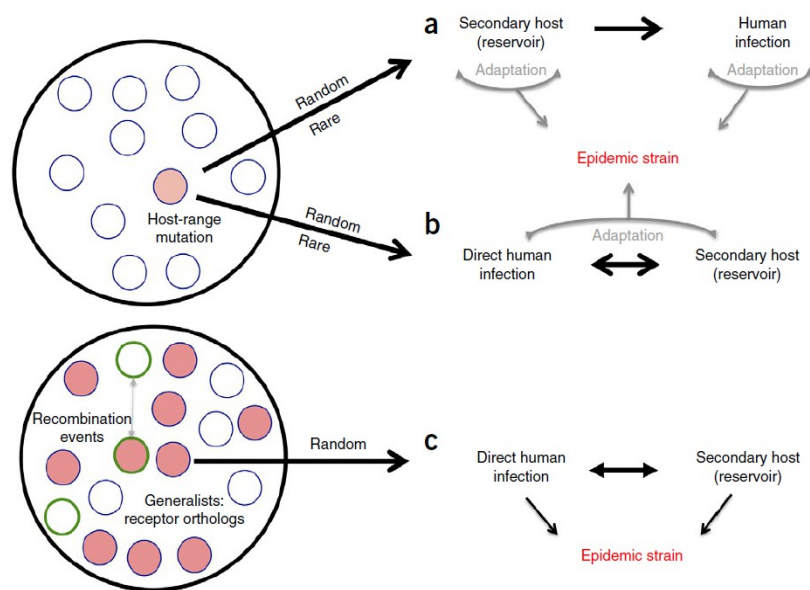
Ayant établi que la protéine SHC014 permet l'infection de cellules humaine et permet de causer une maladie respiratoire chez les souris, nous avons synthétisé le clone viral infectieux complet du SHC014-CoV de la même façon que pour le SARS-CoV (**Fig. 3a**)^[2]. La réplication dans les cellules Vero ne révèle aucun déficit pour le SHC014-CoV par rapport au SARS-CoV (**Fig. 3b**); cependant, le SHC014-CoV était atténué de façon significative ($P < 0.01$) dans les cultures primaire HAE 24 et 48 h après infection (**Fig. 3c**). L'infection *in vivo* de souris avec le clone complet de SHC014-CoV n'a démontré aucune perte de poids significative mais montré une réplication virale réduite dans les poumons comparé au SARS-CoV Urbani (**Fig. 3d,e**). Ensemble ces résultats établissent la viabilité du SHC014-CoV chez d'autres mammifères mais suggère que plus d'adaptation est nécessaire pour que sa réplication soit au même niveau que celle de l'épidémie de SARS-CoV dans les cellules respiratoires humaines et chez les souris (note du traducteur, ici les auteurs expliquent implicitement que sans l'ajout de la protéine S le SHC014-CoV de chauve souris est inopérant chez l'homme).

Pendant l'épidémie de SARS-CoV, des liens ont été rapidement établis entre les civettes palmistes et les souches CoV détectées chez

les humains [4]. Sur la base de cette information, l'hypothèse communément acceptée a émergé sur l'origine de l'épidémie SARS-CoV comme étant un virus de chauves-souris qui aurait contaminé les civettes et qui a évolué en incorporant des changements au niveau du domaine de liaison au récepteur (RBD) ACE2, améliorant ainsi son pouvoir de pénétration (réf. 18). La vente de civettes dans les marchés aux animaux vivants a permis le passage du virus aux humains avec des modifications subséquentes qui ont conduit à la souche épidémique (**Fig. 4a**). Cependant, l'analyse phylogénétique suggère que les souches humaines précoces du syndrome respiratoire était plus proche du CoV des chauves-souris que de celui des civettes [18]. De ce fait, une seconde hypothèse argumente qu'une transmission directe de la chauve-souris à l'homme a initié l'émergence de l'épidémie de SARS-CoV et que les civettes palmistes ont servi d'hôte et de réservoir secondaire pour perpétuer l'infection (**Fig. 4b**)^[19]. Cependant, selon ces deux paradigmes l'adaptation de la protéine S dans un hôte intermédiaire est vue comme une nécessité, avec la plupart des mutations attendues dans le RBD, facilitant de ce fait le pouvoir d'infection. Les deux théories impliquent que les réservoirs de CoV de chauves-souris sont limités et que les mutations qui permettent le saut d'espèce sont rares, réduisant la possibilité d'émergence future chez les humains (note du traducteur : il faut donc bien un processus intermédiaire...).

Bien que notre étude n'invalide pas la possibilité d'autres routes d'émergence, elle est en faveur d'un troisième paradigme dans lequel le réservoir de CoV de chauves-souris comportent en fait une protéine S toute prête et capable d'infecter l'être humain sans mutation ou adaptation (**Fig. 4c**). Cette hypothèse est illustrée par la capacité du virus chimérique contenant la protéine SHC014 insérée dans le squelette du virus SARS-CoV à causer de fortes infections à la fois dans les cultures de cellules des voies respiratoires humaines et chez les souris sans qu'il y ait besoin d'adaptation. Couplés avec les observations faites sur les CoV pathogéniques précédemment identifiés [3,20], nos résultats suggèrent que le matériel biologique de départ nécessaire pour que des souches de maladies SARS émergent circule à l'heure actuelle

Figure 4 Hypothèse de l'émergence des coronavirus. Les souches de coronavirus circulent dans un réservoir quasi-unique de chauves-souris. (a,b) Les théories traditionnelles de l'émergence du SARS-CoV posent que des mutants pouvant affecter d'autres hôtes (cercle rouge) représentent des événements aléatoires rares qui permettent l'infection d'hôtes alternatifs. L'hypothèse de l'hôte secondaire (a) se base sur l'argument qu'un hôte non humain est infecté par un virus de chauve-souris et que des adaptations subséquentes facilitent la transmission à l'être humain; et que les réplifications dans l'être humain finissent par conduire à la souche épidémique. L'hypothèse de la contamination directe (b) suggère que la transmission a lieu entre les chauves-souris et l'homme sans la nécessité d'un hôte intermédiaire; la sélection se produit alors dans la population humaine avec un virus très proche se répliquant dans un hôte secondaire, permettant la persistance continue du virus et son adaptation concomitantes dans les deux hôtes. (c) Les données des virus chimériques de type SARS indiquent qu'un réservoir quasi-unique à une espèce maintient une multiplicité de virus capable d'infecter les cellules humaines sans le besoin de mutations d'adaptation (cercle rouge). Bien que les adaptations dans les hôtes secondaires ou humains puissent être requises pour que l'épidémie émerge. Si des virus contenant la protéine SHC014 se recombinent avec un virus CoV virulent (cercles avec contour vert), alors la maladie épidémique peut résulter chez l'être humain. Des données existent en faveur de ces trois hypothèses.



dans des réservoirs animales. Notamment, bien que le virus SHC014-CoV requiert probablement des adaptations au niveau de son squelette (structure de base) pour pouvoir se transmettre à l'homme, la haute fréquence des recombinaisons observées dans la famille de virus CoV souligne la possibilité d'émergence future chez l'homme et le besoin de s'y préparer.

A ce jour, le screening génomique des populations animales a été utilisé principalement pour identifier des nouveaux virus dans le cadre de percées épidémiques [21]. L'approche entreprise ici étend ces données pour examiner la question de l'émergence virale et de l'efficacité thérapeutique. Nous considérons les virus portant la protéine SHC014 comme une menace potentielle à cause de leur capacité de se répliquer dans les cultures de cellules des voies respiratoires supérieures humaines, le meilleur modèle à disposition pour l'étude des maladies respiratoires humaines. De plus, la pathogénie observée chez les souris indique une capacité pour les virus contenant la protéine SHC014 de causer une maladie dans les modèles mammifères sans adaptation du RBD. Notamment, un tropisme différentiel observé dans le poumon comparé à celui du SARS-MA15 et l'atténuation de la séquence complète du SHC014-CoV dans les cultures HAE par rapport au SARS-CoV Urbani suggère le rôle d'autres facteurs au delà de la liaison au ACE2 — incluant la processivité de la protéine S (i.e. sa capacité à catalyser de multiples réaction sur la cible), l'accessibilité du récepteur ou l'antagonisme de la réponse immunitaire de l'hôte — peuvent contribuer à l'émergence. Cependant, des tests supplémentaires chez les primates sont requis pour affirmer avec certitudes le caractère pathogénique chez l'homme. De façon importante, l'échec des thérapeutiques à dispositions confirme le besoin critique d'autres études et le développement de traitements. Avec cette connaissance, des programmes de surveillance, de diagnostic et des traitements efficaces pourraient être produit pour se protéger contre l'émergence de CoV spécifiques du groupe 2b, tel que le SHC014-Cov, et cela peut (pourrait) être appliqué à d'autres groupes de CoV qui maintiennent similairement des réservoirs viraux hétérogènes.

En plus d'offrir une préparation contre de futur virus émergents, cette approche doit être considérée dans le contexte de la pause man-

datée par le gouvernement US sur les études "gain-of-function" (GOF) (c'est-à-dire une étude comme celle-là, note du traducteur) [22]. Sur la base de modèle précédent d'émergence (Fig. 4a,b), il n'était pas attendu que la création de virus chimériques tels que le SHC014-MA15 puisse accroître la pathogénie. Bien que le SHC014-MA15 soit atténué relativement au virus apparenté SARS-CoV adapté au souris, des études similaires qui ont examiné la pathogénie des CoVs avec la protéine S du virus souche Urbani dans le squelette du MA15 n'a pas démontré de perte de poids et montrait une répllication virale réduite [23]. Ainsi, relativement à la protéine S-MA15 du virus CoV Urbani, le SHC014-MA15 présente un gain de pathogénie (Fig. 1). Sur cette base, les panels d'experts scientifiques peuvent juger que des études similaires de construction de virus chimériques à partir de souches circulantes seraient trop risquées pour être poursuivies étant donnée qu'une augmentation de pathogénie dans les modèles mammifères ne peut être exclue. Couplé avec les restrictions sur les souches virales adaptées aux souris et sur le développement d'anticorps monoclonaux utilisant le principe des 'escape' mutants, le progrès des recherches sur l'émergence des CoVs et des thérapies efficaces pourrait être sévèrement limité. Dans leur ensemble, ces données et les restrictions imposées représentent une croisée des chemins pour les recherches GOF; le potentiel pour se préparer et mitiger les percées épidémiques futures doit être équilibré par rapport au risque de créer des pathogènes plus dangereux.

Dans le développement de politiques permettant d'avancer, il est important de considérer la valeur des données générées par ces recherches et si ce type d'études sur des virus chimériques autorisent plus d'investigation par rapport au risque inhérent qu'elles impliquent (note du traducteur : ce sont des justifications d'apprentis sorciers).

En résumé, notre approche a utilisé des données méta-génomiques pour identifier la menace potentielle que pose la circulation de virus de chauves-souris semblables au SARS-CoV. En raison de la capacité des virus chimériques portant la protéine spicule SHC014 de se répliquer dans les cultures de cellules de voies respiratoires humaines, causant de la pathogénie *in vivo* et échappant aux théra-

pies existantes, il y a un besoin à la fois pour la surveillance et des moyens thérapeutiques améliorés contre les virus SARS circulants. Notre approche ouvre également la possibilité d'utiliser des données méta-génomiques pour prédire les émergences virales infectieuses et appliquer cette connaissance à la préparation de traitements des futures épidémies. (note du traducteur : encore des justifications d'apprentis sorciers).

Méthodes

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

Remerciements

Research in this manuscript was supported by grants from the National Institute of Allergy & Infectious Disease and the National Institute of Aging of the US National Institutes of Health (NIH) under awards U19AI109761 (R.S.B.), U19AI107810 (R.S.B.), AI085524 (W.A.M.), F32AI102561 (V.D.M.) and K99AG049092 (V.D.M.), and by the National Natural Science Foundation of China awards 81290341 (Z.-L.S.) and 31470260 (X.-Y.G.), and by USAID-EPT-PREDICT funding from EcoHealth Alliance (Z.-L.S.). Human airway epithelial cultures were supported by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease of the NIH under award NIH DK065988 (S.H.R.). We also thank M.T. Ferris (Dept. of Genetics, University of North Carolina) for the reviewing of statistical approaches and C.T. Tseng (Dept. of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch) for providing Calu-3 cells. Experiments with the full-length and chimeric SHC014 recombinant viruses were initiated and performed before the GOF research funding pause and have since been reviewed and approved for continued study by the NIH. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.D.M. designed, coordinated and performed experiments, completed analysis and wrote the manuscript. B.L.Y. designed the infectious clone and recovered chimeric viruses; S.A. completed neutralization assays; L.E.G. helped perform mouse experiments; T.S. and J.A.P. completed mouse experiments and plaque assays; X.-Y.G. performed pseudotyping experiments; K.D. generated structural figures and predictions; E.F.D. generated phylogenetic analysis; R.L.G. completed RNA analysis; S.H.R. provided primary HAE cultures; A.L. and W.A.M. provided critical monoclonal antibody reagents; and Z.-L.S. provided SHC014 spike sequences and plasmids. R.S.B. designed experiments and wrote manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

Références

- Ge, X.Y. *et al.* Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* **503**, 535–538 (2013).
- Yount, B. *et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12995–13000 (2003).
- Becker, M.M. *et al.* Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19944–19949 (2008).
- Peiris, J.S., Guan, Y. & Yuen, K.Y. Severe acute respiratory syndrome. *Nat. Med.* **10**, S88–S97 (2004).
- Al-Tawfiq, J.A. *et al.* Surveillance for emerging respiratory viruses. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 992–1000 (2014).
- He, B. *et al.* Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. *J. Virol.* **88**, 7070–7082 (2014).
- Li, F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Res.* **100**, 246–254 (2013).
- Sheahan, T. *et al.* Mechanisms of zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus host range expansion in human airway epithelium. *J. Virol.* **82**, 2274–2285 (2008).
- Yoshikawa, T. *et al.* Dynamic innate immune responses of human bronchial epithelial cells to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *PLoS ONE* **5**, e8729 (2010).
- Qiu, X. *et al.* Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **514**, 47–53 (2014).
- Sui, J. *et al.* Broadening of neutralization activity to directly block a dominant antibody-driven SARS-coronavirus evolution pathway. *PLoS Pathog.* **4**, e1000197 (2008).
- Sui, J. *et al.* Effects of human anti-spike protein receptor binding domain antibodies on severe acute respiratory syndrome coronavirus neutralization escape and fitness. *J. Virol.* **88**, 13769–13780 (2014).
- Rockx, B. *et al.* Escape from human monoclonal antibody neutralization affects *in vitro* and *in vivo* fitness of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Infect. Dis.* **201**, 946–955 (2010).
- Spruth, M. *et al.* A double-inactivated whole-virus candidate SARS coronavirus vaccine stimulates neutralizing and protective antibody responses. *Vaccine* **24**, 652–661 (2006).
- Bolles, M. *et al.* A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J. Virol.* **85**, 12201–12215 (2011).
- Siegrist, C.-A. in *Vaccines* 6th edn. (eds. Plotkin, S.A., Orenstein, W.A. & Offit, P.A.) 14–32 (W.B. Saunders, 2013).
- Deming, D. *et al.* Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med.* **3**, e525 (2006).
- Graham, R.L., Donaldson, E.F. & Baric, R.S. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 836–848 (2013).
- Graham, R.L. & Baric, R.S. Recombination, reservoirs and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* **84**, 3134–3146 (2010).
- Agnihotram, S. *et al.* A mouse model for betacoronavirus subgroup 2c using a bat coronavirus strain HKU5 variant. *MBio* **5**, e00047-14 (2014).
- Relman, D.A. Metagenomics, infectious disease diagnostics and outbreak investigations: sequence first, ask questions later? *J. Am. Med. Assoc.* **309**, 1531–1532 (2013).
- Kaiser, J. Moratorium on risky virology studies leaves work at 14 institutions in limbo. *ScienceInsider* <http://news.sciencemag.org/biology/2014/11/moratorium-risky-virology-studies-leaves-work-14-institutions-limbo> (2014).
- Frieman, M. *et al.* Molecular determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis and virulence in young and aged mouse models of human disease. *J. Virol.* **86**, 884–897 (2012).