



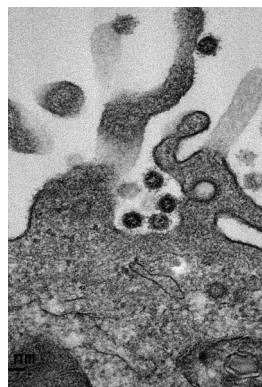
► Le SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2*), qui a émergé à la fin de l'année 2019 en République populaire de Chine, est responsable d'une crise sanitaire mondiale qui a entraîné le confinement de plus de 3 milliards d'individus et l'arrêt brutal de l'économie planétaire. Dans ce contexte, une course contre la montre est lancée afin de développer, dans les plus brefs délais, un traitement permettant d'enrayer la pandémie. Une étude de l'équipe de Volker Thiel, parue dans le journal *Nature*, rapporte la mise au point d'une technique de génétique inverse pour le SARS-CoV-2, leur ayant permis de recréer le virus en seulement quelques semaines. Les perspectives de ces travaux sont très intéressantes puisqu'elles permettent d'envisager la manipulation génétique du virus et ainsi le développement d'outils précieux qui seront utiles pour combattre l'infection. Si la technique représente également un saut technologique qui permettra d'améliorer nos connaissances sur le virus, elle porte aussi en elle le germe d'un possible mésusage et la création d'un virus à des fins malveillantes. Les avantages et inconvénients de recréer le SARS-CoV-2 dans cette période de pandémie sont discutés dans cet article. ◀

Le SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2*) a émergé dans la ville de Wuhan, située dans la province du Hubei en République populaire de Chine, à l'automne 2019. Les premiers syndromes de pneumopathie d'origine inconnue ont été officiellement notifiés à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) le 31 décembre 2019 [1]. Le virus en cause a été isolé le 7 janvier 2020 et son génome rendu public quatre jours plus tard (Figure 1) [2, 3]. L'exportation de cas de maladie COVID-19 (*coronavirus disease*

Une course contre la montre

Création du SARS-CoV-2 en laboratoire, un mois après son émergence !

Frédéric Iseni¹, Jean-Nicolas Tournier²⁻⁴



¹Institut de recherche biomédicale des armées, Unité de virologie, Département Microbiologie et maladies infectieuses, 1 place général Valérie André, 91220 Brétigny-sur-Orge, France.

²Institut de recherche biomédicale des armées, Unité Biothérapies anti-infectieuses et immunité, Département Microbiologie et maladies infectieuses, Brétigny-sur-Orge, France.

³Institut Pasteur, unité génomique virale et vaccination, CNRS UMR 3569, Paris, France.

⁴École du Val-de-Grâce, Paris, France.

jean-nicolas.tournier@intradef.gouv.fr

jean-nicolas.tournier@pasteur.fr

2019) depuis la République populaire de Chine vers d'autres pays d'Asie et d'Europe s'est intensifiée depuis la mi-février 2020 et a touché les cinq continents. Le 11 mars 2020, la situation épidémiologique a conduit l'OMS à qualifier l'épidémie de COVID-19 de pandémie. Au 9 juillet 2020, plus de 12 millions de personnes ont été infectées par le SARS-CoV-2 à travers le monde et près de 550 000 en sont décédées selon le site de l'université Johns Hopkins¹.

En France, les premiers cas confirmés de COVID-19 ont été signalés le 25 janvier 2020 [4], et la première souche de SARS-CoV-2 a été isolée par le centre national de référence (CNR) des maladies respiratoires à l'Institut Pasteur le 31 janvier 2020. À la mi-mars, le SARS-CoV-2 circulait dans toutes les régions, y compris, ultra-marines. Certaines régions ont été plus particulièrement touchées : le Grand-Est, l'Île-de-France, les Hauts-de-France et Auvergne-Rhône-Alpes [5]. Au 9 juillet 2020, plus de 206 000 cas ont été confirmés en France et plus de 28 600 décès sont survenus en lien direct avec la maladie.

Le 4 mai 2020, la revue *Nature* publiait en *preview* un article de l'équipe de Volker Thiel de l'université de Berne en Suisse qui décrivait une méthode pour la reconstruction synthétique du SARS-CoV-2 à partir de séquences publiées sur internet [6]. Nous discutons, ici, de l'intérêt de ces travaux dans la perspective actuelle d'une crise pandémique.

Vignette (Photo © Philippe Roingard et Sébastien Eymieux, Université de Tours, France).

¹ <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

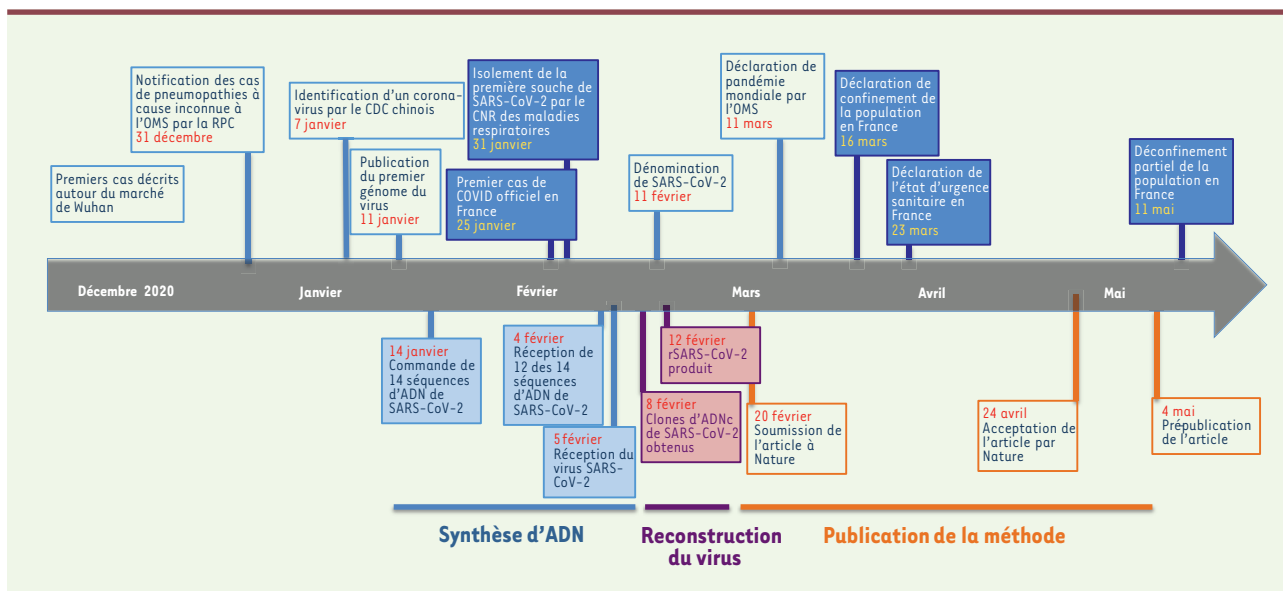


Figure 1. Cinétique de l'épidémie et de la reconstruction synthétique du SARS-CoV-2. Au-dessus de la flèche : encadré bleu, fond blanc : épidémie en République populaire de Chine ; encadré bleu, fond bleu : épidémie en France. En dessous de la flèche : encadré bleu, fond bleu ciel : étape de synthèse des gènes ; encadré violet, fond rose : reconstruction du virus ; encadré orange, fond blanc : publication de la méthode.

Les coronavirus humains

Les coronavirus sont des virus enveloppés dont le génome à ARN monocaténaire de polarité positive fait partie des plus grands génomes de virus à ARN connus (leur taille varie entre 26 à 32 kb [7]). Ils appartiennent à la sous-famille des *Orthocoronavirinae* (qui contient 4 genres α , β , δ , γ coronavirus). Certains virus des genres α et β peuvent infecter l'homme [8]. À ce jour, sept coronavirus ont été identifiés comme pathogènes pour l'homme, dont 4 sont responsables des « rhumes hivernaux » (HCoV-229E, -OC43, -NL63 et -HKU1). À côté de ces virus connus depuis les années 1960, trois virus du genre β ont récemment émergé conduisant à des épidémies humaines associées à des syndromes de détresse respiratoire sévères et une forte mortalité : le SARS-CoV en 2003, le *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS)-CoV en 2012, et en 2019, le SARS-CoV-2. Les 3 dernières émergences de coronavirus ont conduit à des taux de mortalité non négligeables (pour mémoire 11 % pour le SARS-CoV, 34,4 % pour le MERS-CoV) et une estimation de 0,7 % pour le SARS-CoV-2 en France [9]. Si les deux premières émergences ont été contenues, le SARS-CoV-2 a échappé à tout contrôle du fait de sa contagiosité importante pendant les 48 heures avant les manifestations cliniques et de son taux important de patients asymptomatiques. Il est d'ores et déjà clairement établi que la pandémie actuelle, qui a nécessité la mise en confinement de plus de la moitié de l'humanité, va entraîner des dégâts socio-économiques majeurs avec des répercussions en terme de santé publique à long terme qui seront loin d'être négligeables.

La génétique inverse appliquée aux coronavirus

Avec l'essor concomitant de la biologie moléculaire et du séquençage, la génétique inverse s'est développée pour les virus eucaryotes, à

l'orée des années 1980 et le travail pionnier de David Baltimore avec le poliovirus [10] (pour revue voir [11]) (→).

(→) Voir le Forum de J.N. Tournier, m/s n° 2, février 2019, page 181

La possibilité de produire des virus à partir d'un clone d'ADN complémentaire (ADNc) s'est ensuite étendue à l'ensemble des grandes familles virales. Le développement de la génétique inverse a révolutionné le monde de la virologie et elle est, de nos jours, un outil indispensable permettant la manipulation génétique des virus. La production de virus mutants permet, entre autres, de disséquer les mécanismes moléculaires de l'infection et donc, à terme, de comprendre la pathogenèse virale. Elle permet également d'envisager la conception rationnelle de candidats vaccins.

Comme toutes les grandes familles de virus, les coronavirus ont bénéficié du développement de la méthode de la génétique inverse. Même si les virus à ARN de polarité positive sont généralement plus faciles à manipuler, les coronavirus ont longtemps résisté à la génétique inverse du fait de la grande taille de leur génome et de la difficulté d'obtenir des clones d'ADNc stables.

Toutefois, en 2000, Fernando Almazan *et al.* ont réussi à cloner les 28,5 kb (kilobases) du génome du coronavirus de la gastro-entérite porcine (TGEV) dans un chromosome artificiel bactérien (BAC) [12]. Ce dernier a ensuite été introduit dans des cellules permissives à l'infection. Le transcrit produit par ces cellules à partir du clone d'ADNc, correspondant au génome viral, a permis le développement de l'infection virale. Ce tour de

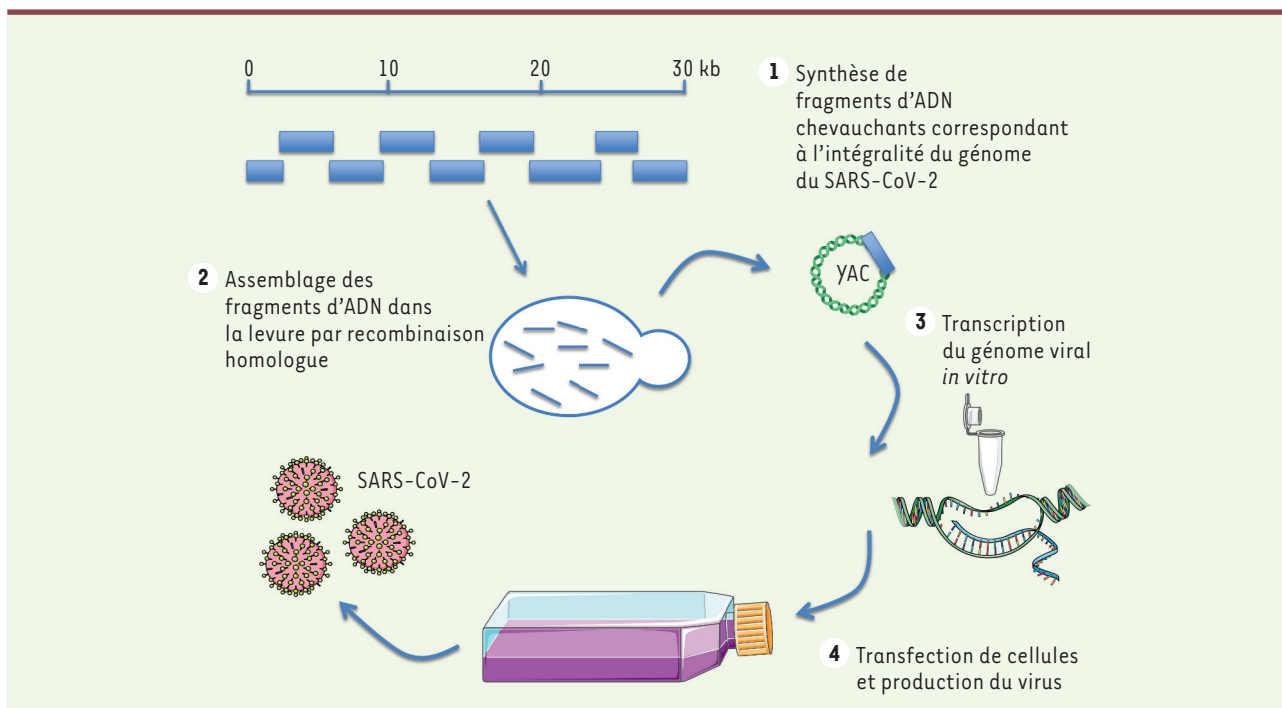


Figure 2. Schéma des étapes de la reconstruction du SARS-CoV-2. Voir le texte pour le détail des différentes étapes.

force technique a ouvert la voie à la production, par génétique inverse, de virus à ARN sans limite de taille de génome [13]. L'utilisation de la même technologie a permis par la suite le clonage du génome et la production d'autres coronavirus dont, en particulier, le SARS-CoV [14] et le MERS-CoV [15].

Production du SARS-CoV-2 par génétique inverse

Dans leur publication du 4 mai 2020 dans la revue *Nature*, l'équipe de Volker Thiel rapporte le développement d'une nouvelle plateforme de génétique inverse leur ayant permis la production du SARS-CoV-2 en moins d'un mois. La technologie est fondée sur le clonage du génome viral dans un chromosome artificiel de levure (*yeast artificial chromosome* ou YAC) produit chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'intérêt d'utiliser la levure pour le clonage est lié au fait que cet organisme eucaryote unicellulaire a la capacité d'assembler différents fragments d'ADN ayant des séquences chevauchantes par recombinaison homologue. Cette technique, appelée TAR (*transformation-associated recombination*) *cloning*, a déjà été utilisée avec succès pour le clonage de gros virus à ADN comme l'herpès simplex de type 1 [16].

Afin de cloner les 30 kb du génome du SARS-CoV-2, les auteurs ont produits 12 fragments d'ADN chevauchants correspondant à l'ensemble du génome (Figure 2). Ces fragments d'ADN ont été soit synthétisés (par la société *GenScript*) sous forme de plasmides, soit obtenus par RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) dès lors que le génome viral a été disponible dans leur laboratoire. L'ensemble des 12 fragments d'ADN ainsi que le vecteur TAR ont ensuite été introduits dans des levures. Le chromosome YAC contenant

le génome viral (sous forme d'ADNc) est alors généré *in cellulo* par assemblage des différents fragments d'ADN par recombinaison homologue. Les YAC produits sont ensuite purifiés et caractérisés pour garantir leur bon assemblage. La technique de TAR *cloning* se révèle être très efficace puisque plus de 95 % des clones (29 sur 30) ont été validés lors du clonage du génome du SARS-CoV-2. Le YAC est ensuite linéarisé, transcrit par l'ARN polymérase du bactériophage T7 et coiffé² *in vitro*. L'ARN ainsi produit, qui correspond au génome viral, est alors électroporé avec l'ARN messager (ARNm) codant la protéine N (nucléoprotéine) du SARS-CoV-2 dans des cellules BHK-21 (une lignée fibroblastique dérivée de cellules de rein de hamster). Ces cellules sont ensuite co-cultivées avec des cellules VeroE6 (cellules rénales de singe) dans lesquelles l'infection virale est visible 2 jours plus tard (Figure 2). Un aspect remarquable du protocole présenté dans cet article est que le délai nécessaire entre la transformation des levures avec les fragments d'ADN et la production du virus n'excède pas une semaine !

Grâce à la technique décrite, les auteurs ont également produit avec succès le MERS-CoV, le coronavirus de l'hépatite murine (MHV) et deux variants du SARS-CoV-2 (le

² La coiffe consiste en l'ajout d'un nucléotide à guanine sur l'extrémité 5' de l'ARN suivi de sa méthylation sur l'azote 7 de la base, ainsi que de la méthylation en 2' du ribose du premier ou des deux premiers nucléotides du transcrite primaire. Elle protège l'ARN de la dégradation.

SARS-CoV-2-GFP et le synSARS-CoV-2-GFP, voir ci-dessous) exprimant la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP).

Intérêt de recréer le SARS-CoV-2 en période de pandémie

La génétique inverse permet de recréer des virus à partir de clones d'ADNc. Initialement la manipulation génétique des virus était laborieuse car elle nécessitait le clonage des génomes après amplification du matériel viral (par PCR ou RT/PCR). Pour cela il fallait disposer du virus au laboratoire. De nos jours, la possibilité de faire synthétiser *de novo* (auprès de sociétés de biotechnologies) de grands fragments d'ADN permet un accès beaucoup plus facile à cette technologie. Il est ainsi intéressant de noter que le virus synSARS-CoV-2-GFP (syn pour *synthetic*), produit au cours de cette étude, a été recréé uniquement à partir de fragments d'ADN synthétiques, c'est-à-dire qu'aucun des 19 fragments d'ADN utilisés pour produire le virus n'a été amplifié à partir de l'ARN génomique viral. Cela n'est pas anodin et démontre qu'aujourd'hui, il est possible dans un laboratoire sans expertise particulière en virologie, de produire un virus en moins d'un mois à partir d'une séquence publiée sur internet.

La possibilité de pouvoir recréer (et modifier) le SARS-CoV-2 est une avancée majeure qui sera très utile pour accompagner les futures études sur ce virus. À l'heure actuelle, l'un des objectifs principal pour lutter contre la pandémie est la mise au point d'un vaccin. La technologie mise en place ici permet d'envisager la production par mutagénèse dirigée d'un virus atténué (et donc non pathogène) pouvant induire une protection chez des individus avant qu'ils soient infectés par le virus sauvage. De la même manière, de nombreux laboratoires développent des projets de recherche dans le but d'identifier des molécules ayant la capacité d'inhiber le SARS-CoV-2. Pour ce type d'activité, la possibilité de travailler avec un virus produisant un marqueur fluorescent (ici la GFP) est très intéressante car il permet le criblage d'un grand nombre de molécules rapidement, l'efficacité des inhibiteurs étant inversement corrélée à l'intensité de la fluorescence émise par les cellules infectées. En termes de diagnostic, le synSARS-CoV-2-GFP revêt également un intérêt majeur et sera d'une grande utilité, notamment pour le développement des tests de séroneutralisation³. Enfin, un autre avantage de cette technique est la facilité avec laquelle les différents virus recombinants produits peuvent être ensuite partagés avec la communauté scientifique. En effet, il ne devient plus nécessaire d'envoyer du virus vivant (avec les risques que cela comporte) mais uniquement l'ADNc (ici le YAC) à partir duquel le virus peut être produit en culture cellulaire. À réception de l'ADN, le virus pourra ainsi être recréé dans un autre laboratoire en moins d'une semaine.

Les risques inhérents à cette technologie

Les risques inhérents à cette technologie sont, en revanche, tout aussi évidents. Le succès épidémiologique du SARS-CoV-2 est devenu un

quelques mois le cauchemar de tous les responsables politiques, économiques, sanitaires et sociaux de la planète. Même si le taux de mortalité intrinsèque du virus n'atteint pas les niveaux des virus classés dans les armes biologiques de guerre [17], et qu'il s'attaque à une frange âgée de la population, il n'y a jamais eu, de mémoire humaine, d'arrêt si brutal de l'économie planétaire en temps de paix. La capacité de nuisance du SARS-CoV-2 ne fait donc aucun doute. Bien qu'ayant été revue avant sa parution pour sa potentielle dualité, que les anglo-saxons dénomment par l'acronyme DURC (pour *dual use research of concern*), cette publication porte en elle le germe de la possible recréation du virus, surtout si nous arrivons un jour à nous en débarrasser et à l'éradiquer. La question ici est de comprendre, au-delà de la prouesse technique, l'intérêt du travail au regard de la dangerosité intrinsèque de pouvoir reconstruire ce virus pathogène *ex nihilo*.

Avant l'épidémie due au SARS-CoV-2, la question s'était déjà posée plusieurs fois, notamment en 2018, lorsque le groupe de David Evans, en collaboration avec la société *Tonix Pharmaceuticals*, a utilisé la biologie synthétique pour recréer le virus horsepox (virus alors disparu) appartenant à la même famille que le virus de la variole [18]. Même si ces travaux ont été justifiés par le développement d'un vaccin antivariolique, il n'en demeure pas moins que la disponibilité sur internet des séquences du génome de la variole ainsi que le protocole pour produire un poxvirus permet d'envisager la recréation (malveillante) de ce virus éradiqué. De la même façon, le virus influenza de la grande épidémie de grippe espagnole de 1918, a été recréé en laboratoire par biologie de synthèse, dans le but de comprendre la pathogénicité de ce virus [19]. Là encore, ces travaux ont été soumis à beaucoup de questionnements, tant les conséquences auraient été dramatiques en cas de rupture du confinement du laboratoire dans lequel le virus a été resynthétisé [20].

Le premier article ayant prouvé expérimentalement la faisabilité de recréer un virus à partir d'une séquence virale disponible et de l'ADN synthétique date de 2002 avec le poliovirus [21]. L'objectif du travail était justement d'alerter sur les dangers potentiels de ce genre d'expérimentations. Une des conséquences de la reconstruction du virus de la poliomyélite a été la décision de conserver des stocks de vaccin contre la poliomyélite, même après son éradication potentielle [22]. Ainsi, au-delà de l'audace et de la rapidité de reconstruction de ces virus par des équipes entraînées, le rapport du bénéfice de ces techniques sur leurs dangers inhérents doit être mesuré avec beaucoup de soin et de prudence.

³ Neutralisation du virus par action des anticorps.

En réalité, le succès de la biologie de synthèse pour le SARS-CoV-2 a rebattu les cartes et inversé les questionnements. Jusqu'à présent, nous avons des maladies virales éradiquées ou en voie de l'être (variole, poliomyélite, rougeole) et pour lesquelles la biologie de synthèse représentait un vrai danger car elle pouvait faciliter leur réémergence. Ici, la situation est inversée : la COVID-19 est une maladie émergente sans vaccin, pour laquelle la biologie de synthèse permettrait peut-être de faciliter l'acquisition des connaissances nécessaires à son éradication.

À l'heure où ses lignes sont rédigées, l'épidémie de COVID-19 fait encore rage même si le pic épidémique semble dépassé. Le vaccin contre le SARS-CoV-2 ne reste encore qu'un espoir, et l'éradication du virus qu'un horizon encore plus lointain. Mais, dans cette perspective, une chose est désormais acquise, le plus urgent est de disposer d'un vaccin, quelle que soit son origine. ♦

SUMMARY

A race against the clock: creation of SARS-Cov-2 in the laboratory, a month after its emergence!

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2, which emerged in China at the end of 2019, is responsible for a global health crisis resulting in the confinement of more than 3 billion people worldwide and the sharp decline of the world economy. In this context, a race against the clock is launched in order to develop a treatment to stop the pandemic as soon as possible. A study published in *Nature* by the Volker Thiel team reports the development of reverse genetics for SARS-CoV-2 allowing them to recreate the virus in just a few weeks. The perspectives of this work are very interesting since it will allow the genetic manipulation of the virus and thus the development of precious tools which will be useful to fight the infection. Even though this approach represents a technological leap that will improve our knowledge of the virus, it also carries the germ of possible misuse and the creation of the virus for malicious purposes. The advantages and disadvantages of recreating SARS-CoV-2 in this pandemic period are discussed in this mini-synthesis. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020 ; 395 : 497-506.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020 ; 382 : 727-33.

- Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020 ; 579 : 265-9.
- Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* 2020 ; S1473-3099(20)30200-0.
- Gámbaro F, Behillil S, Baidaliuk A, et al. Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in France. *BioRxiv* 2020. 2020.04.24.059576; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.059576>.
- Thao TTN, Labrousseau F, Ebert N, et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2294-9.
- Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009 ; 7 : 439-50.
- Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2013 ; 11 : 836-48.
- Salje H, Tran Kiem C, Lefrancq N, et al. Estimating the burden of SARS-CoV-2 in France. *Science* 2020 ; eabc3517. doi: 10.1126/science.abc3517.
- Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981 ; 214 : 916-9.
- Tournier JN. L'éradication des maladies infectieuses virales mise en danger par les avancées de la biologie synthétique. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 181-6.
- Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z, et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 5516-21.
- Lai MM. The making of infectious viral RNA: no size limit in sight. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 5025-7.
- DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* 2007 ; 81 : 1701-13.
- Almazan F, DeDiego ML, Sola I, et al. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio* 2013 ; 4 : e00650-13.
- Oldfield LM, Grzesik P, Voorhies AA, et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E8885-E94.
- Tournier JN, Peyrefitte CN, Biot F, et al. The threat of bioterrorism. *Lancet Infect Dis* 2019 ; 19 : 18-9.
- Noyce RS, Lederman S, Evans DH. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0188453.
- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005 ; 310 : 77-80.
- Tournier JN, Garin D. Deadly paleoviruses: a bioweapon Pandora's box? *Lancet Infect Dis* 2006 ; 6 : 254-5.
- Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 2002 ; 297 : 1016-8.
- Cello J, Paul AV, Wimmer E. Vaccines should be kept even if polio is wiped out. *Nature* 2002 ; 418 : 915.

TIRÉS À PART

J.N. Tournier

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie sur les sites de :

la Société Française de Myologie
www.sfmyologie.org



la filière de santé neuromusculaire FILNEMUS
www.filmemus.fr

