

# Expériences en virologie : quels bénéfices et risques ?



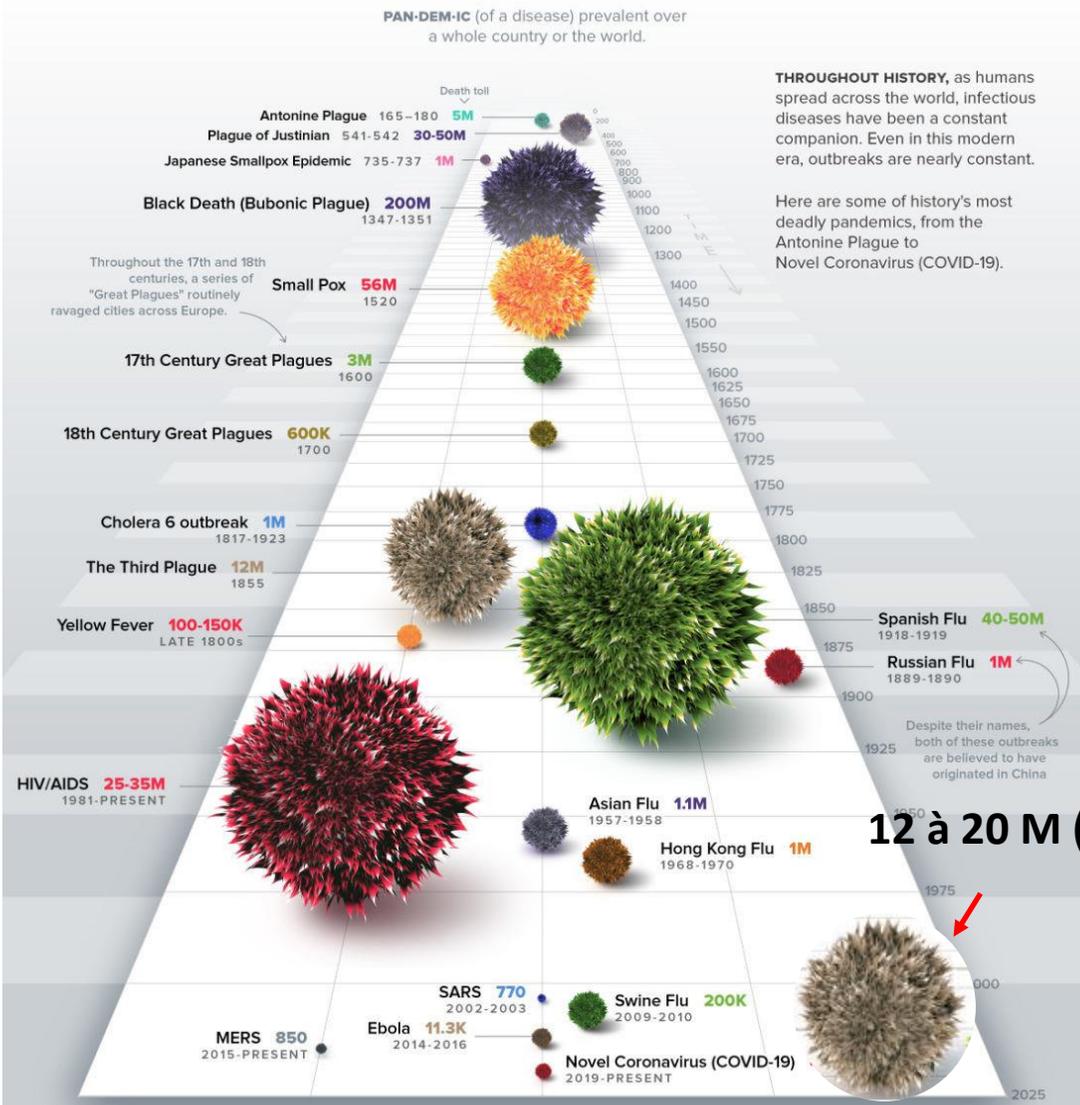
# Domaine d'expertise et conflits d'intérêts

- Thèse Université Libre de Bruxelles en Virologie moléculaires/biophysique
- Stages Post Doctoraux
  - Institut de Recherche Clinique de Montréal : Maturation des protéines d'enveloppe virales par la Furine
  - Inserm U372 : Virologie Moléculaire sur le VIH-1 (BSL3, génétique inverse)
- CR, puis DR CNRS au laboratoire AFMB à Marseille : Mécanismes de réplication des virus émergents
- Membre du CA de la Société Française de Virologie
- Pas de Conflits d'intérêt

« J'exprime ici une position personnelle qui ne reflète ni la position de la SFV, ni du laboratoire AFMB, ni celle du CNRS »

# La recherche en virologie est un enjeu de santé publique majeur

## HISTORY OF PANDEMICS



Les virus sont la deuxième cause d'émergence infectieuse

### Recherche en virologie

vaccins

antiviraux



- Eradication de la Variole
- Eradication de la Polio en cours
- Contrôle des épidémies (rougeole, rage, etc..)

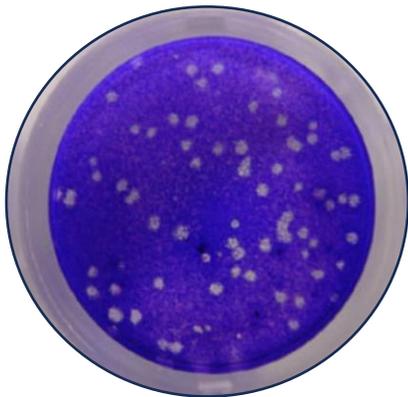
- Médicaments contre l'herpes
- Lutte contre le VIH
- Lutte contre le HCV etc...

# Questions clés de la recherche en virologie

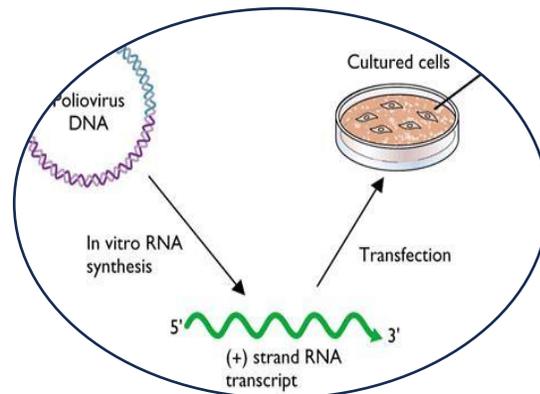
- Comprendre les fonctions des gènes viraux
- Identifier les mécanismes de virulence, pathogénèse
- Développer des contre mesures : **vaccins** ou **anti-viraux**
- Comprendre les mécanismes d'émergence virale et de franchissement de la barrière d'espèce

## Outils de recherche

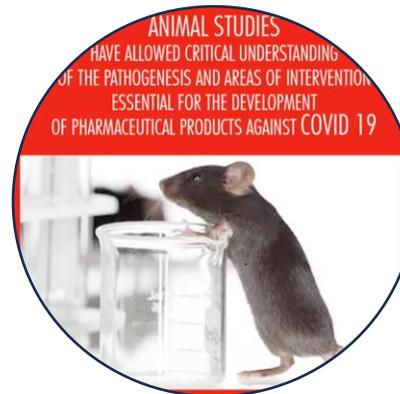
### Culture de virus : modèles cellulaires



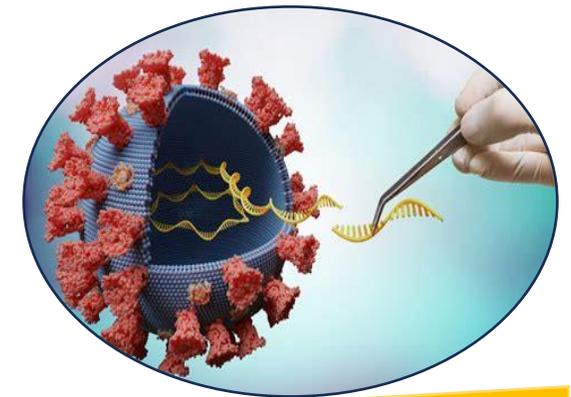
### Clonage des génomes



### Développement de modèles animaux



### Expériences de gain de fonction



Risques biologiques



# Définition : expériences de Gain de Fonction (GOF) et Perte de Fonction (LOF)

La recherche sur le Gain de Fonction (GOF) et la Perte de Fonction (LOF) sont deux méthodologies qui permettent aux scientifiques d'étudier les agents pathogènes. Ces approches de recherche modifient les génomes des agents pathogènes afin d'ajouter ou de supprimer des fonctionnalités, ce qui permet aux scientifiques d'examiner et de mieux comprendre le fonctionnement des agents pathogènes. Les expériences de GOF augmentent :

- 1) La production, réplication ou taux de croissance des agents pathogènes,
- 2) altérer le taux de survie ou gravité des symptômes dans les cellules ou organismes infectés,
- 3) Augmentent la transmission,
- 4) Augmente la résistance aux médicaments, aux vaccins, aux thérapies.

# Définitions

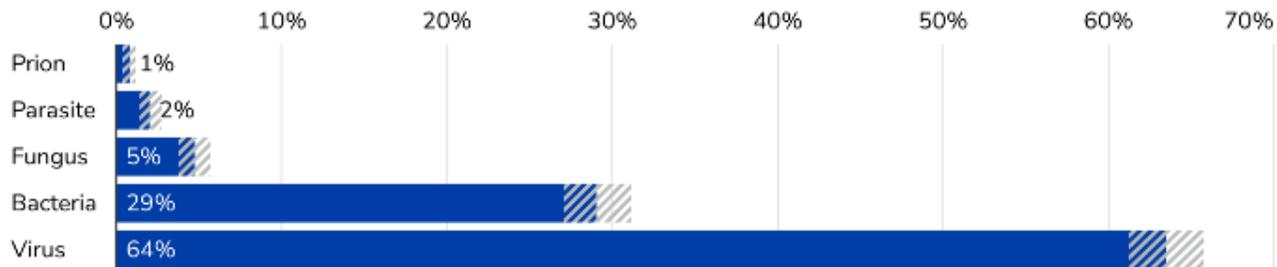
1. **Pathogène Pandémique Potentiel Renforcé (PPR/PPP)** : "un PPP [Pathogène Pandémique Potentiel] résultant du renforcement de la transmissibilité et/ou de la virulence d'un pathogène. Les PPP Renforcés ne comprennent pas les agents pathogènes naturels qui circulent dans la nature ou qui ont été récupérés dans la nature, quel que soit leur potentiel pandémique".
2. **Gain-Of-Function Research Of Concern (GOFROC)** : "Recherche susceptible de générer un agent pathogène qui est :
  1. Hautement transmissible et susceptible de se propager largement et de manière incontrôlable dans les populations humaines
  2. Hautement virulent et susceptible de provoquer une morbidité et/ou une mortalité importantes chez l'homme. »
3. **Recherche à double usage préoccupante (DURC)** : "recherche dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'elle fournisse des connaissances, des informations, des produits ou des technologies susceptibles d'être directement utilisés à mauvais escient pour constituer une menace importante ayant de vastes conséquences potentielles pour la santé et la sécurité publiques, les cultures agricoles et autres plantes, les animaux, l'environnement, le matériel ou la sécurité nationale".

1) United States Government Policy for Oversight of Life Sciences Dual Use Research of Concern

2) National Science Advisory Board for Biosecurity's Recommendations for The Evaluation and Oversight of Proposed Gain-Of-Function Research

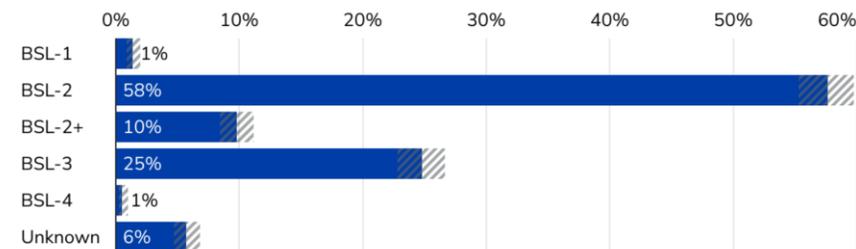
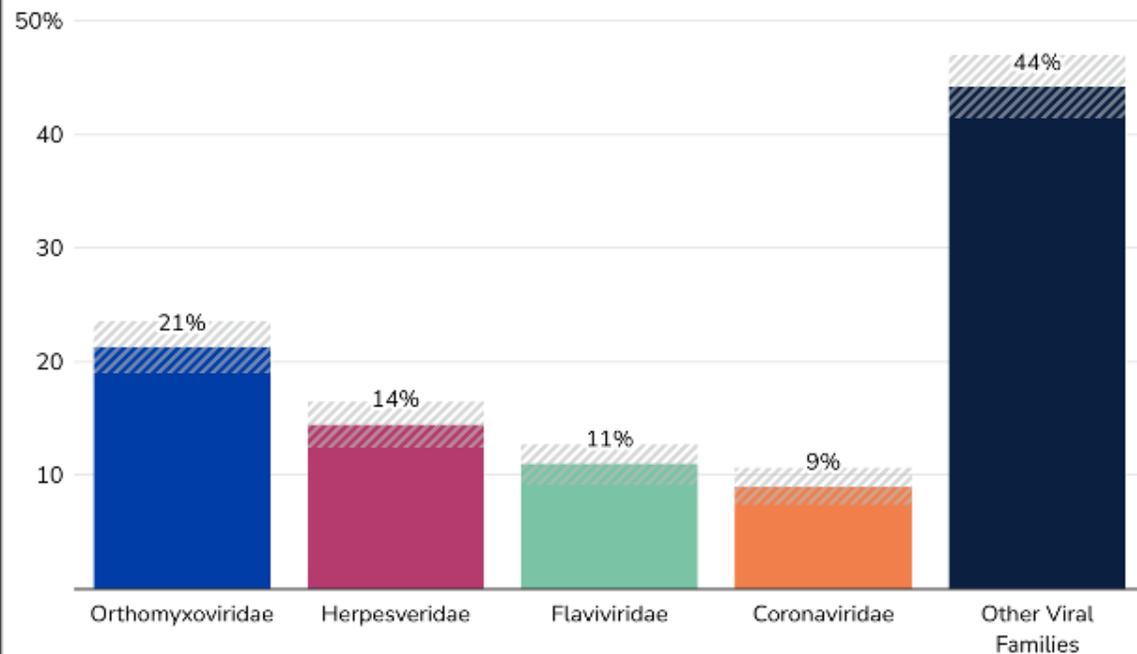
3) The NIH's Framework for Guiding Funding Decisions about Proposed Research Involving Enhanced Potential Pandemic Pathogens

# Les expériences de GOF ne concernent pas que la virologie :

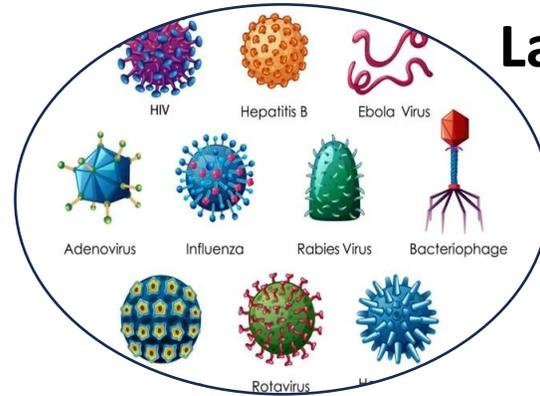


## Viral Families

Publications involving viruses, by viral family.

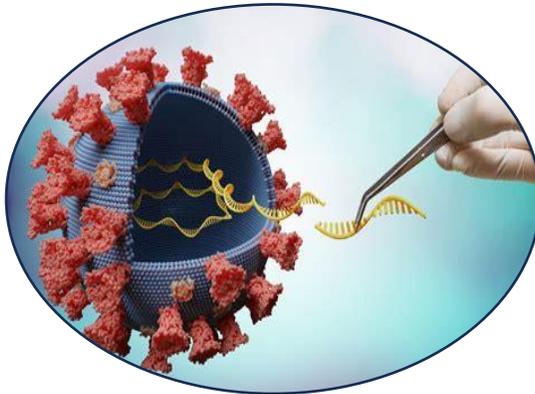


# Triangle du risque biologique



## La nature du virus

- Virus Animal
- Virus Humain
- Virus à Potentiel Pandémique (PPP)



## Nature des expériences

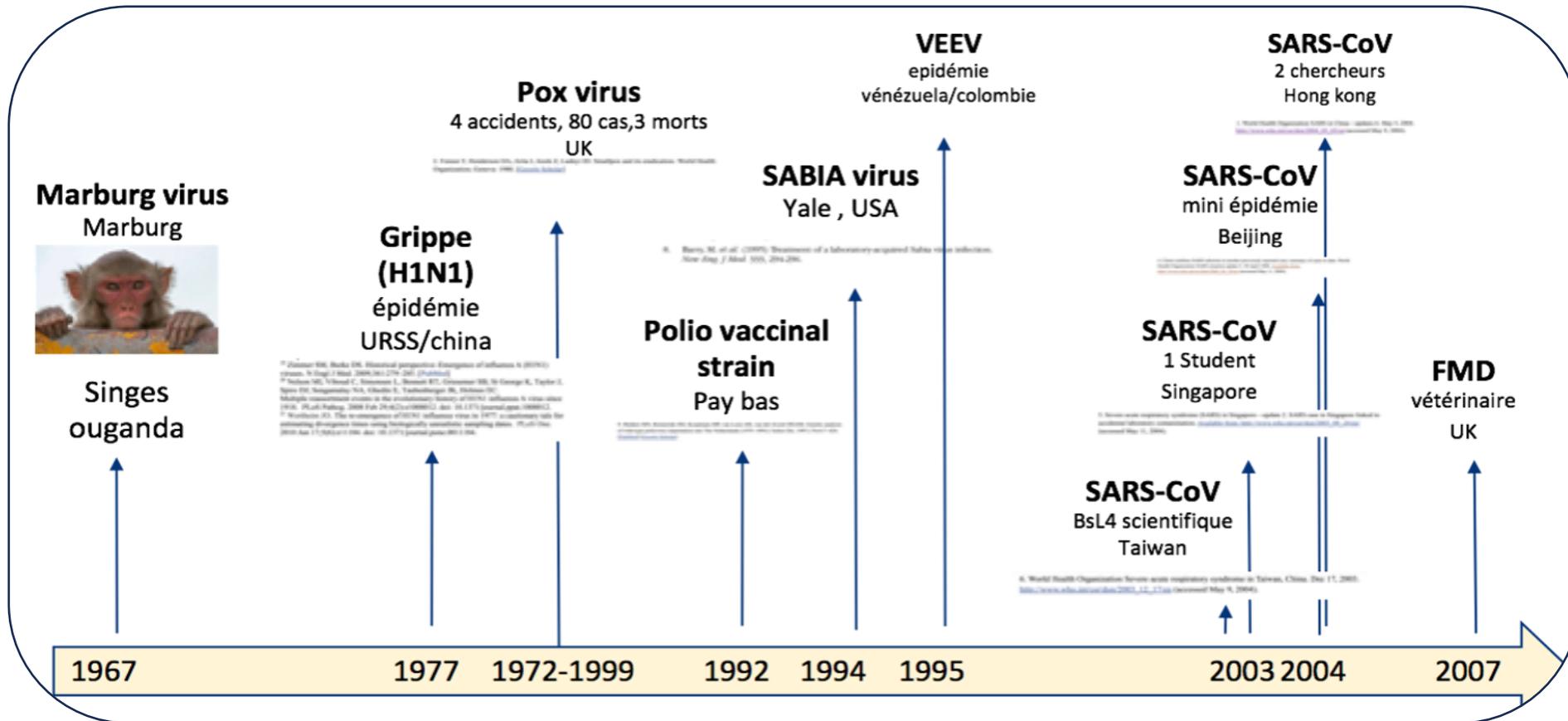
- Perte de Fonction (LOF)
- Passage en série
- Reconstruction virus synthétique
- Gain de Fonction (GOF)



## Confinement

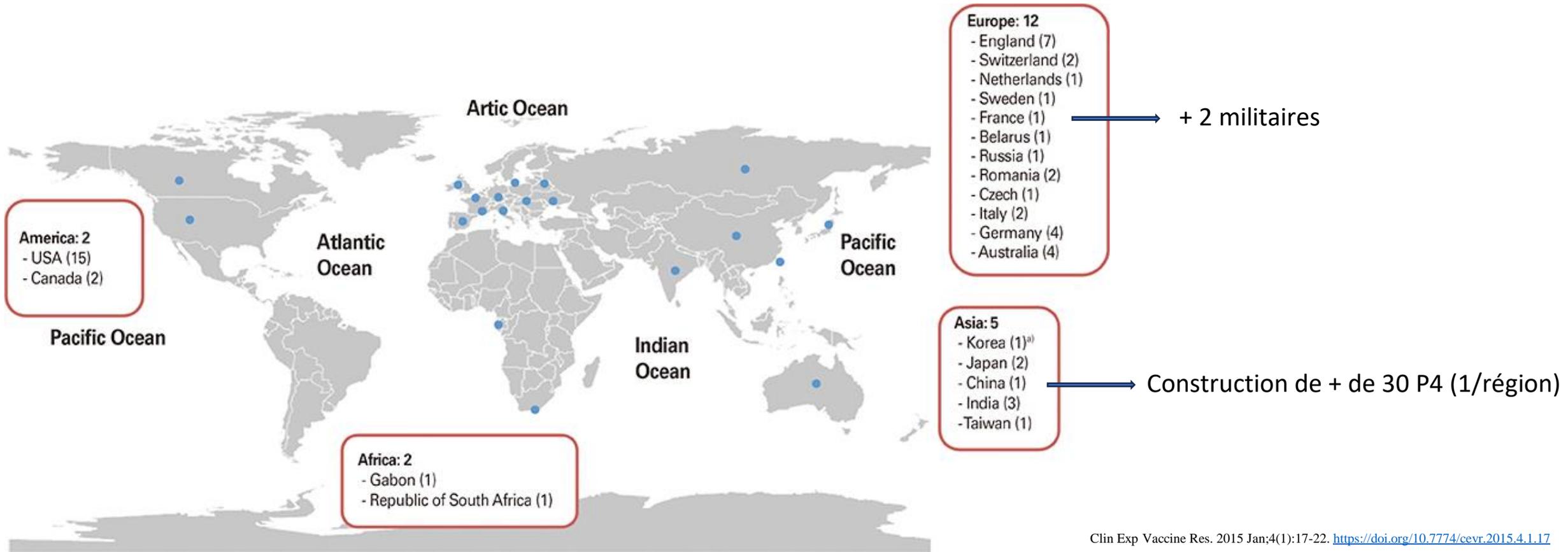
- BSL1
- BSL2
- BSL3
- BSL4

# Accidents de recherche décrits dans la littérature



- Les incidents sont fréquents
- Les accidents sont occasionnellement répertoriés/identifiés
- Comprendre les processus des accidents est essentiel pour adapter les pratiques de biosécurité

# Prolifération des laboratoires BSL3 et BSL4 : la course à l'armement



- La carte représente les P4/BSL4 civils
- Les USA sont passés de deux P4 en 1990 à 15 en 2015 et disposent d'environ 1300 P3
- La Chine annonce la construction d'un P4 par province (34) en 2021
- Les P3 et P4 sont majoritairement aux abords de grandes villes
- La construction de nouveaux P4 va-t-elle minimiser les risques ou induire une augmentation des expériences risquées?

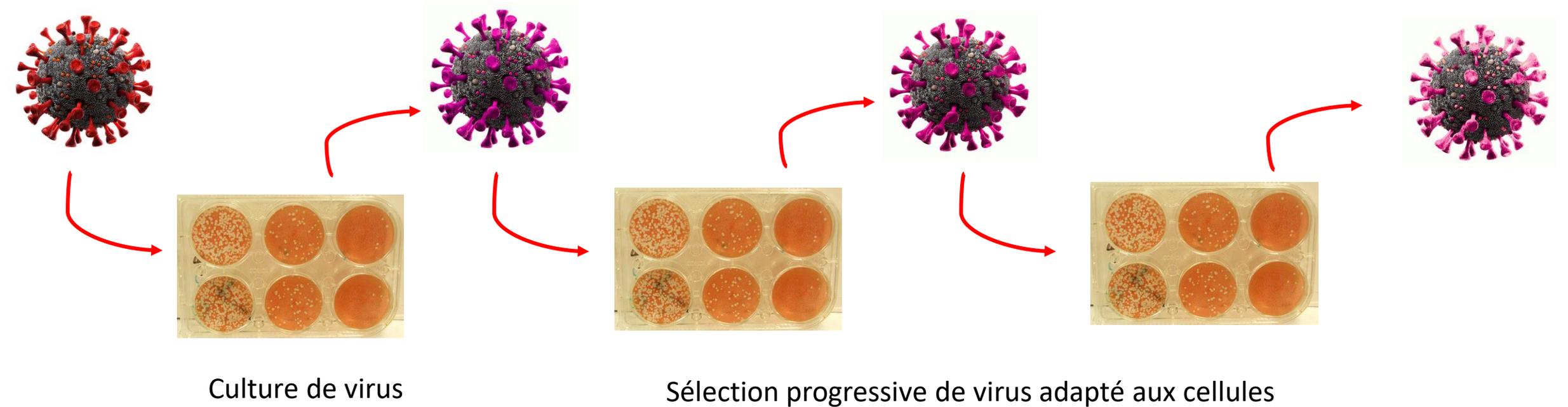
# Méthodes des expériences de GOF/LOF :

## Quelques exemples d'expériences à risques

- Passage en série sur cellules humaines
- Identification de mutants d'échappement viraux (vaccins, antiviraux)
- Expériences en modèles animaux (transgéniques humanisés)
- Génétique inverse (GOF/LOF)
- Reconstruction de virus éradiqués
- Gains de Fonctions (virus à Potentiel Pandémique PPP)

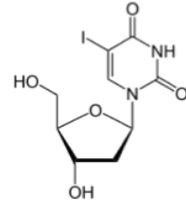


# 1) Passage en série sur cellules

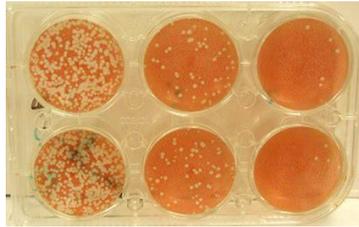
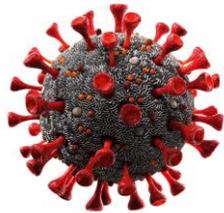


- Adapter un virus a une culture cellulaire
- Atténuer les virus pour limiter sa pathogénèse, développement de souches vaccinales
- Risques : adaptation du virus a un nouveau récepteur humain

## 2) Mutants d'échappement aux anti-viraux pour identifier les cibles thérapeutiques



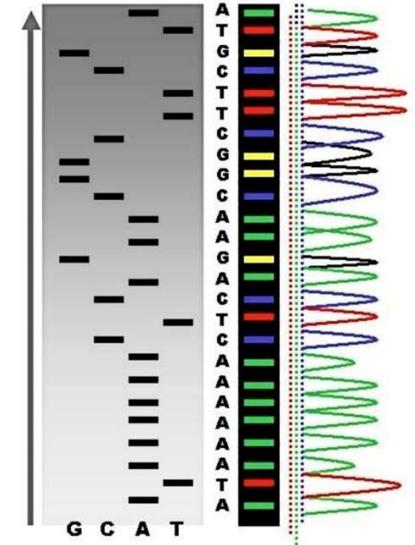
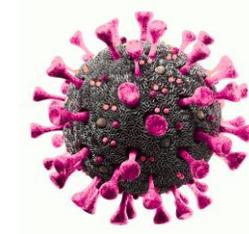
Molécule anti-virale



Culture de virus



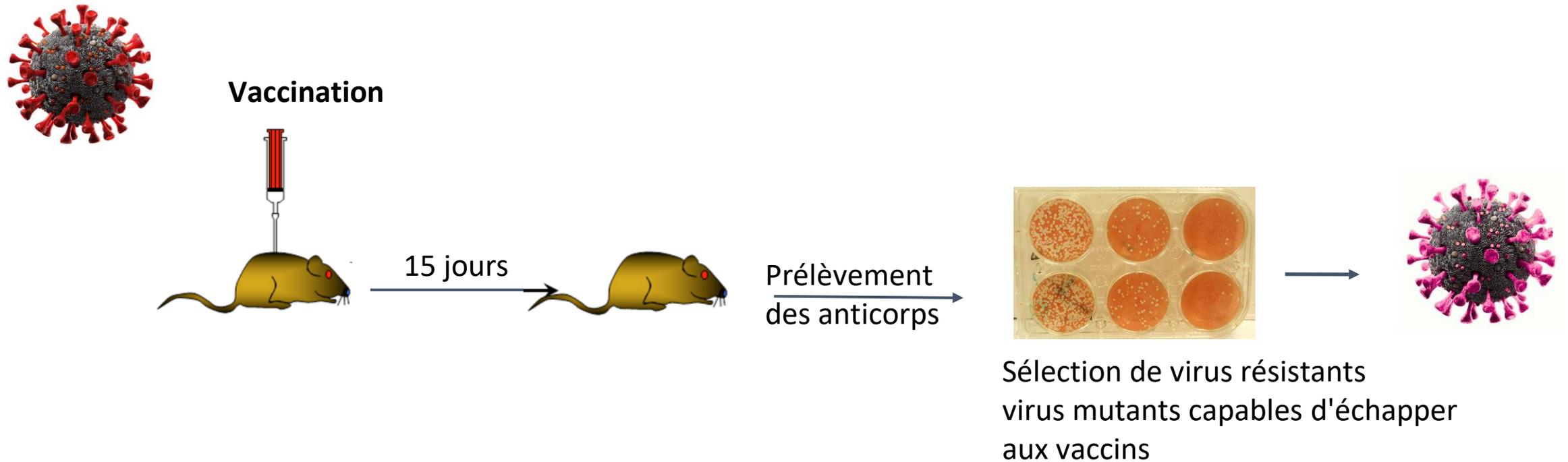
Sélection de virus résistants (Mutants)



Séquençage & identification des mutations de résistance

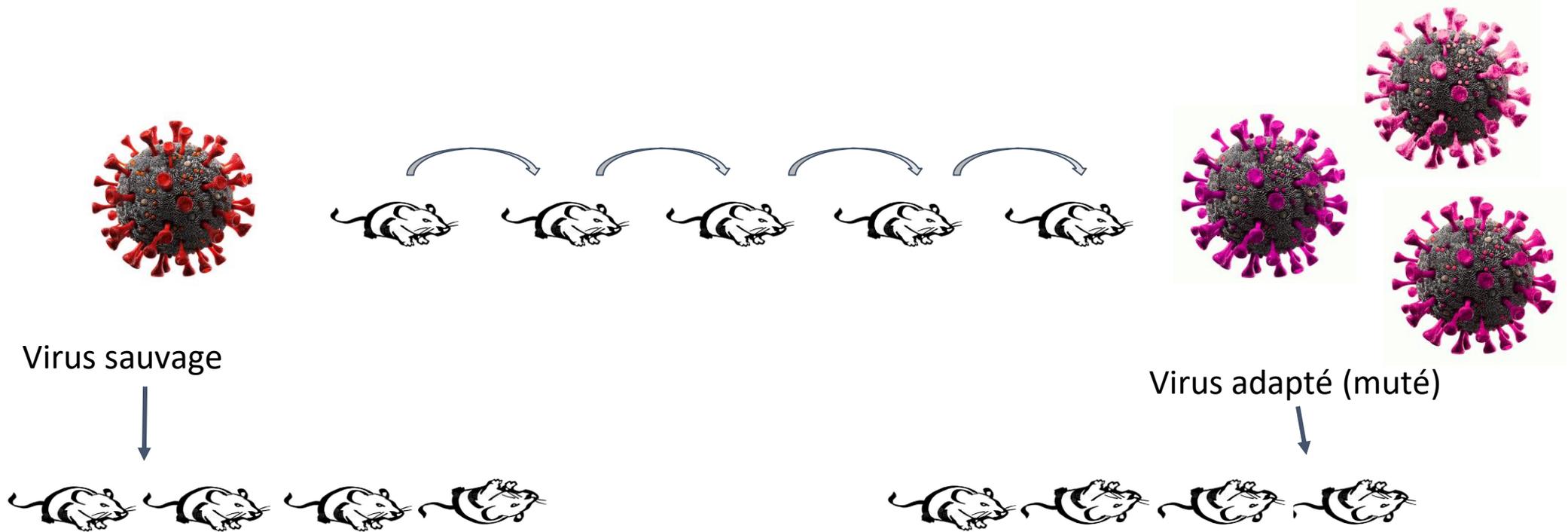
- Comprendre les principes d'action des médicaments
- Optimiser les anti-viraux et découvrir de nouvelles molécules
- Etape indispensable pour débuter des essais en modèles animaux
- Risques : propager des virus résistants aux médicaments

### 3) Comprendre les mécanismes d'échappement aux vaccins



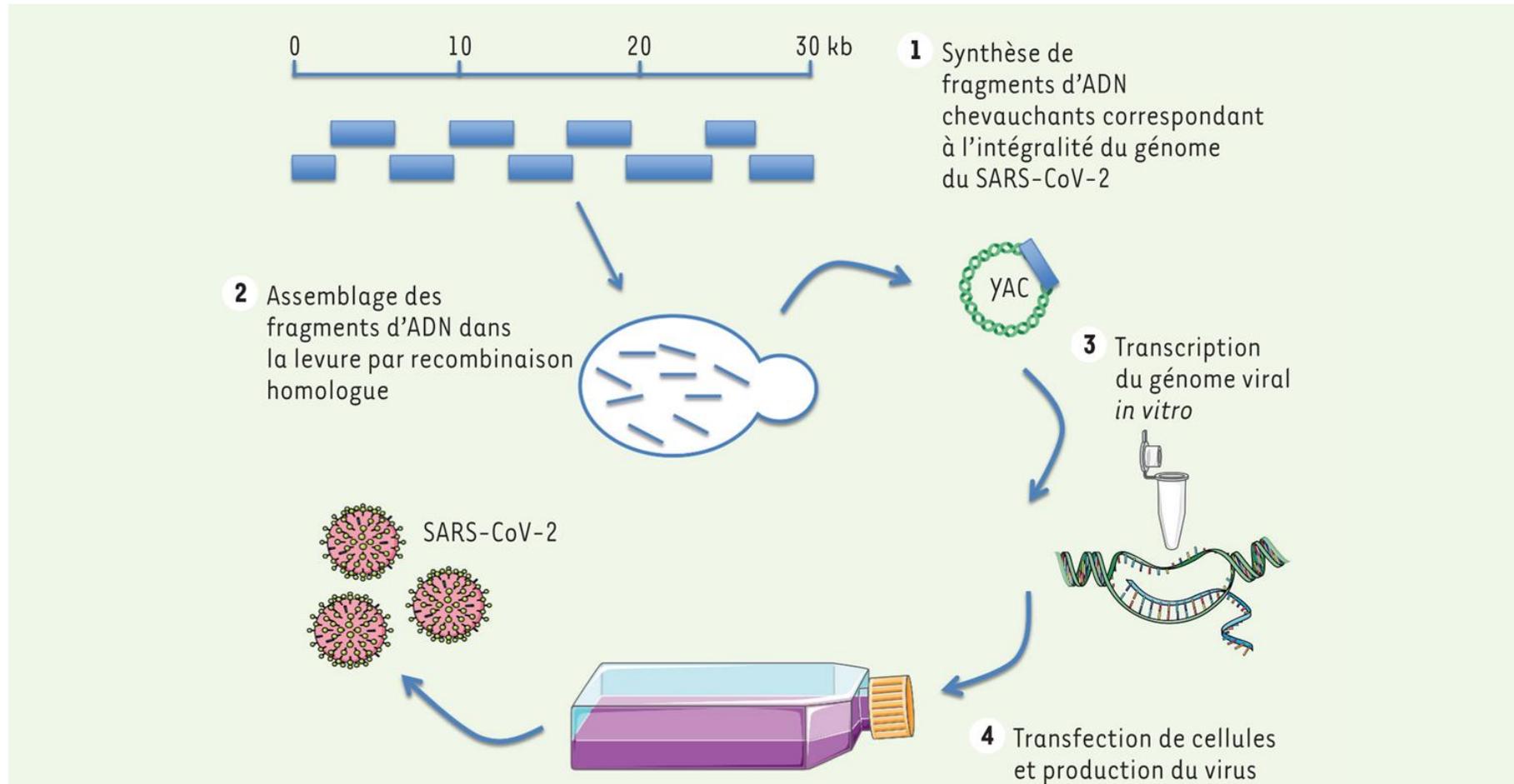
- Comprendre les mécanismes d'échappement au vaccins
- Identifier les risques associés à certaines mutations et surveiller leur apparition
- Se préparer au futur en élaborant des nouveaux vaccins plus robustes
- Risques : propager des virus résistants aux vaccins.

## 4) Expérience de passage en série en modèle animal humanisé



- Ces outils permettent de comprendre les mécanismes de franchissement de la barrière d'espèce.
- Ces expériences "accélèrent" l'évolution des virus.
- En utilisant des animaux "humanisés" les virus peuvent "s'adapter" aux récepteurs humains.
- Les virus ainsi "générés" n'existent pas dans la nature.
- Il est difficile de prédire quelle serait la trajectoire d'un tel virus s'il infectait un expérimentateur.
- Le risque biologique est important car on adapte les virus aux récepteurs humains.

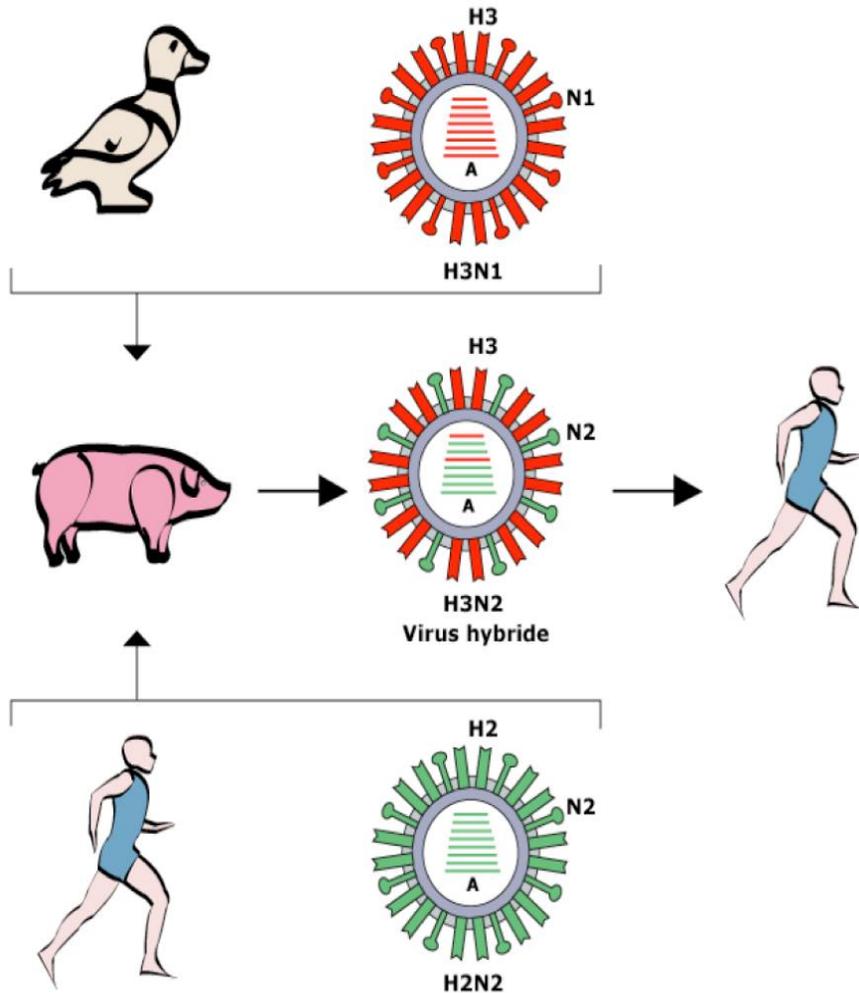
## 5) Assemblage de virus par fragments (bacmides)



- En 2005 le virus de la grippe espagnole a été synthétisé à partir des données de séquençage
- Il est possible de construire des CoV à partir de séquences synthétiques en moins d'un mois
- Ces virus synthétiques sont infectieux
- Ces outils permettent de construire des virus naturels ou chimériques (GOF)
- Nouveaux risques biologiques et possibilité de faire des GOF

# 6) Identification des facteurs de virulence de la grippe

Réassortiment génétique



Mutations associées à la pathogénèse chez l'humain

**Table 2 | Determinants of viral pathogenicity**

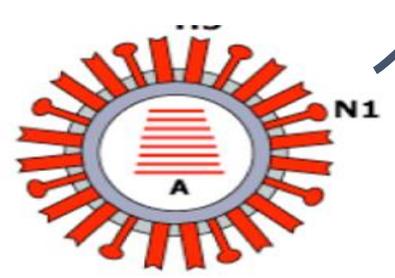
Protein	Position	Pathogenicity		Swine-origin H1N1 viruses	Function	Reference
		Low	High			
PB2	627	Glu	Lys	Glu	Replicative ability in some mammals, including humans	46, 47
	701	Asp	Asn	Asp	Nuclear import kinetics affecting replicative ability in mice	53, 55
PB1-F2	66	Asn	Ser	Truncated (11 aa)	Induction of apoptosis	74
HA	Cleavage site	Single basic aa	Multiple basic aa	Single basic aa	HA cleavage	45
NS1	92	Asp	Glu	Asp	Unknown (interferon response?)	65
	C terminus	Arg-Ser-Glu-Val, deletion	Glu-Ser-Glu-Val	11 C-terminal aa truncated	Unknown	69, 70

aa, amino acid(s).

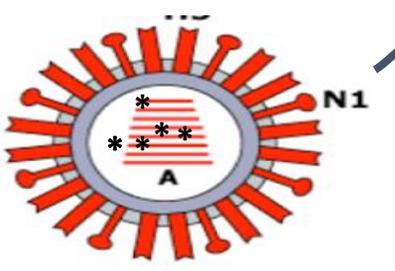
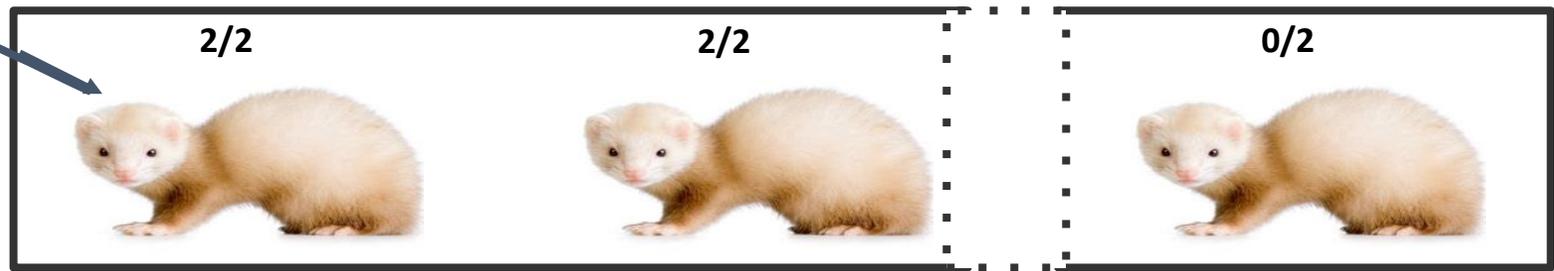
- Comprendre les mécanismes de franchissement de la barrière d'espèce
- Identifier les risques associés à certaines mutations et surveiller leur apparition
- Définir les politiques d'abattage systématiques
- Risque très faible (études observationnelles)

Mécanisme de franchissement de la barrière d'espèces du virus de la grippe

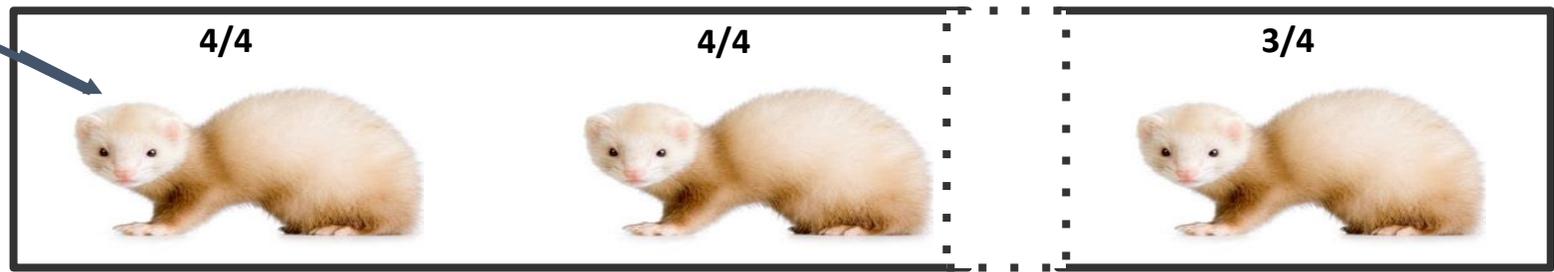
# Expériences de Gain de Fonction pour construire un virus optimisé pour la transmission chez les furets par aérosol



H5N1 sauvage



H5N1 Muté (5 mutations)  
(transmission par aérosol)



1. Russell CA, Fonville JM, Brown AEX, *et al.* Science 2012 ; 336 : 1541–1547.
2. Imai M, Watanabe T, Hatta M, *et al.* Nature 2012 ; 486 : 420–428.

# Bénéfices et risques de ces expériences de GOF

## 1. Bénéfices

- Identification des virus à haut risques pour le franchissement de la barrière d'espèce
- Guider les politiques de surveillance et d'abatage

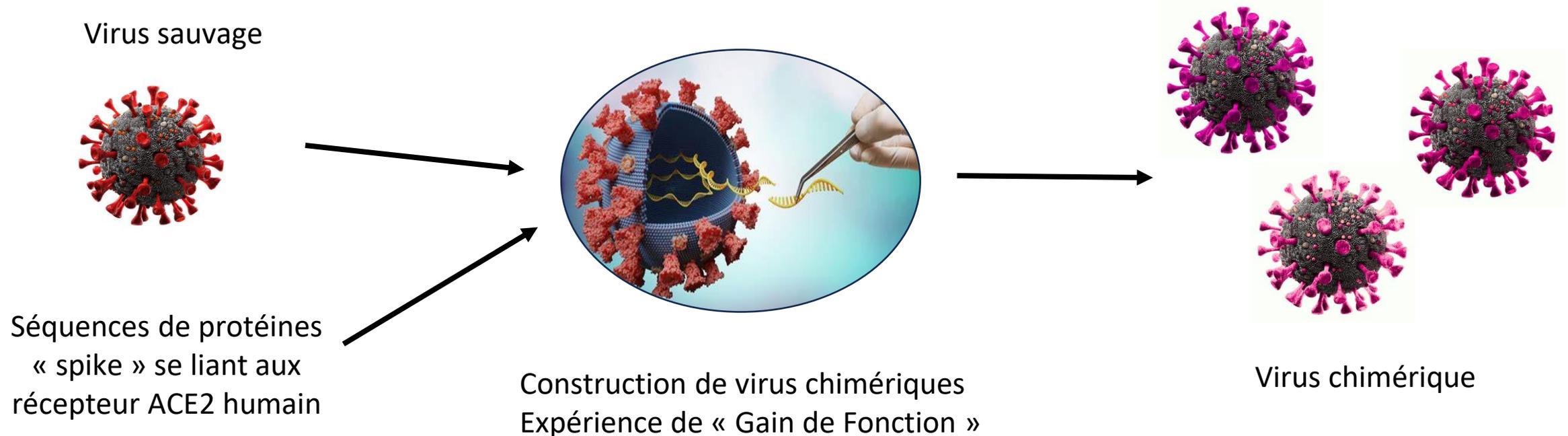
## 2. Risques

- Quelle serait la trajectoire d'un tel virus s'il échappait accidentellement au confinement ?
- La description des expériences est une « recette » pour créer des souches d'influenzae à potentiel pandémique

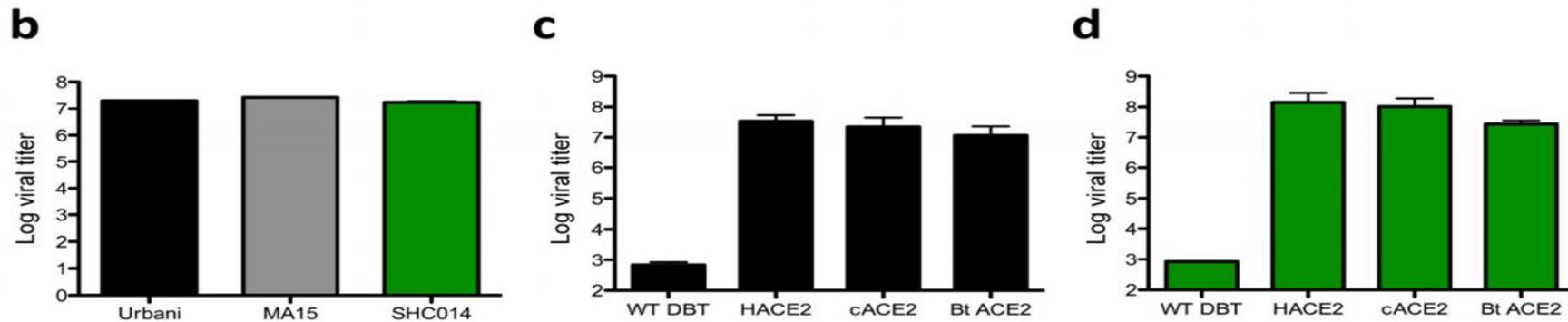
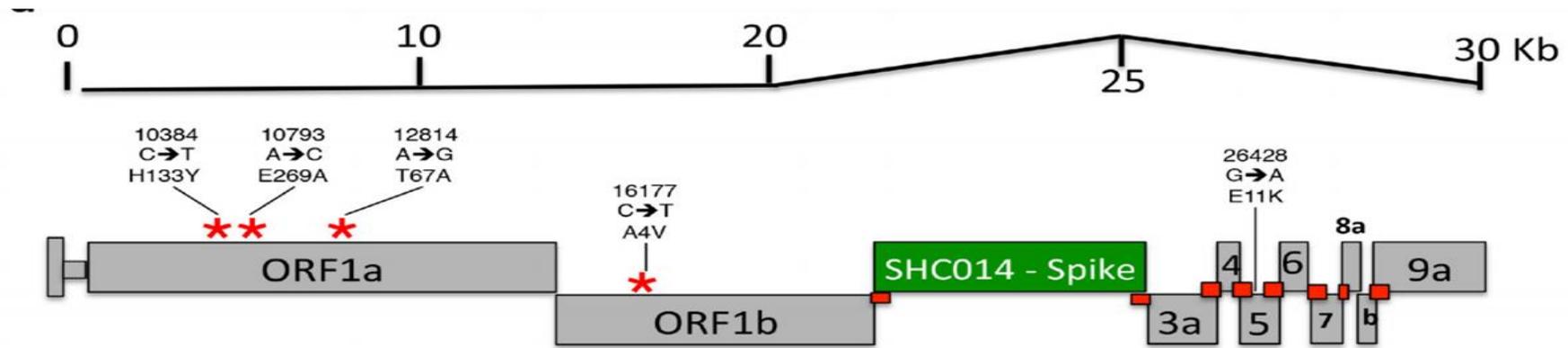
Remarque: les mutations n'ont pas été créées mais miment des mutations naturelles. Ces mutations ne sont toutefois pas apparues lors d'expérience de passage en séries

# 7) Expériences de Gain de Fonction pour identifier des Coronavirus potentiellement pathogènes chez l'humain

- **Objectif** : identifier s'il existe des coronavirus chez les chauves souris potentiellement infectieux chez l'humain pour pouvoir mettre en place des politique de surveillance ?
- **Difficulté** : la collecte de virus infectieux est difficile, alors que le séquençage des protéines Spikes (les clés) est facile. Les virus chimériques infectieux présentent un risque accru de transmission vers l'humain
- **Méthode** : construction de virus chimères.



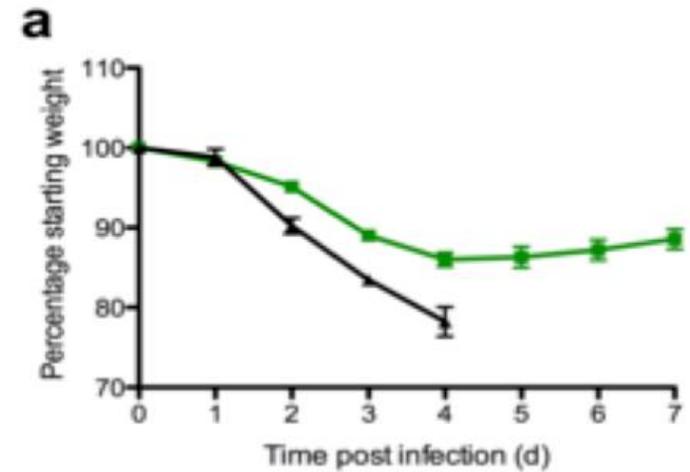
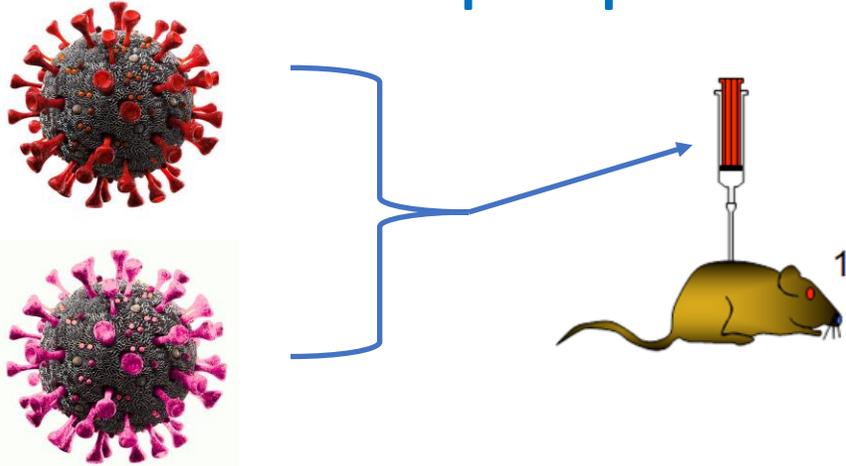
# Expériences de Gain de Fonction: Comment construire des virus chimériques qui franchissent la barrière d'espèce?



**Supplementary Figure 2: Chimeric SHC014-MA15 CoV is viable and utilizes ACE2 orthologs for entry.** (a) Organization of chimeric SARS-like virus which substitutes SHC014 (green) spike protein into the SARS-CoV mouse adapted (MA15) backbone. Amino acid changes between epidemic SARS-CoV Urbani and MA15 highlighted by stars. (b) End point titers 24 hours post infection following infection with wild-type Urbani (black,  $n = 1$ ), mouse adapted MA15 (Gray,  $n = 1$ ), or SHC014-MA15 CoV (green,  $n = 3$ ). (c,d) End point titers of (c) SARS-CoV Urbani or (d) SHC014-MA15 in wild-type or DBT cells expressing human, civet, or bat ACE2 receptors ( $n = 3$  for all groups). For each graphical figure, center value representative of group mean and error bars defined by SEM.

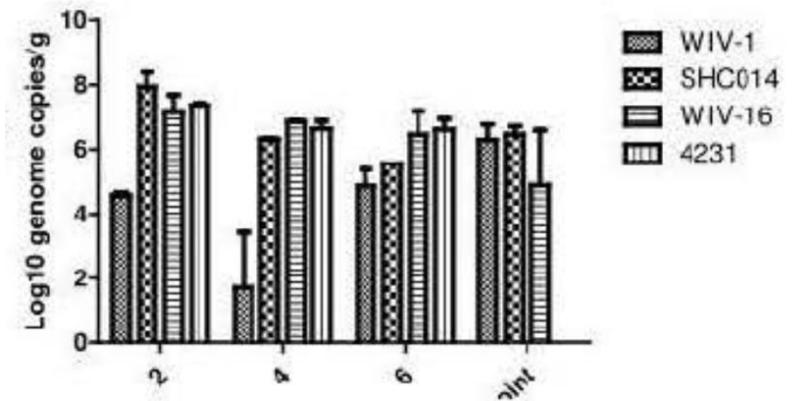
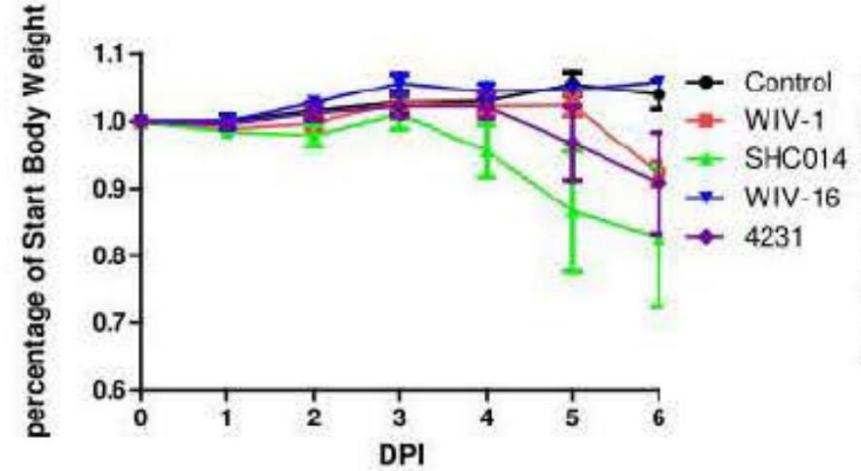
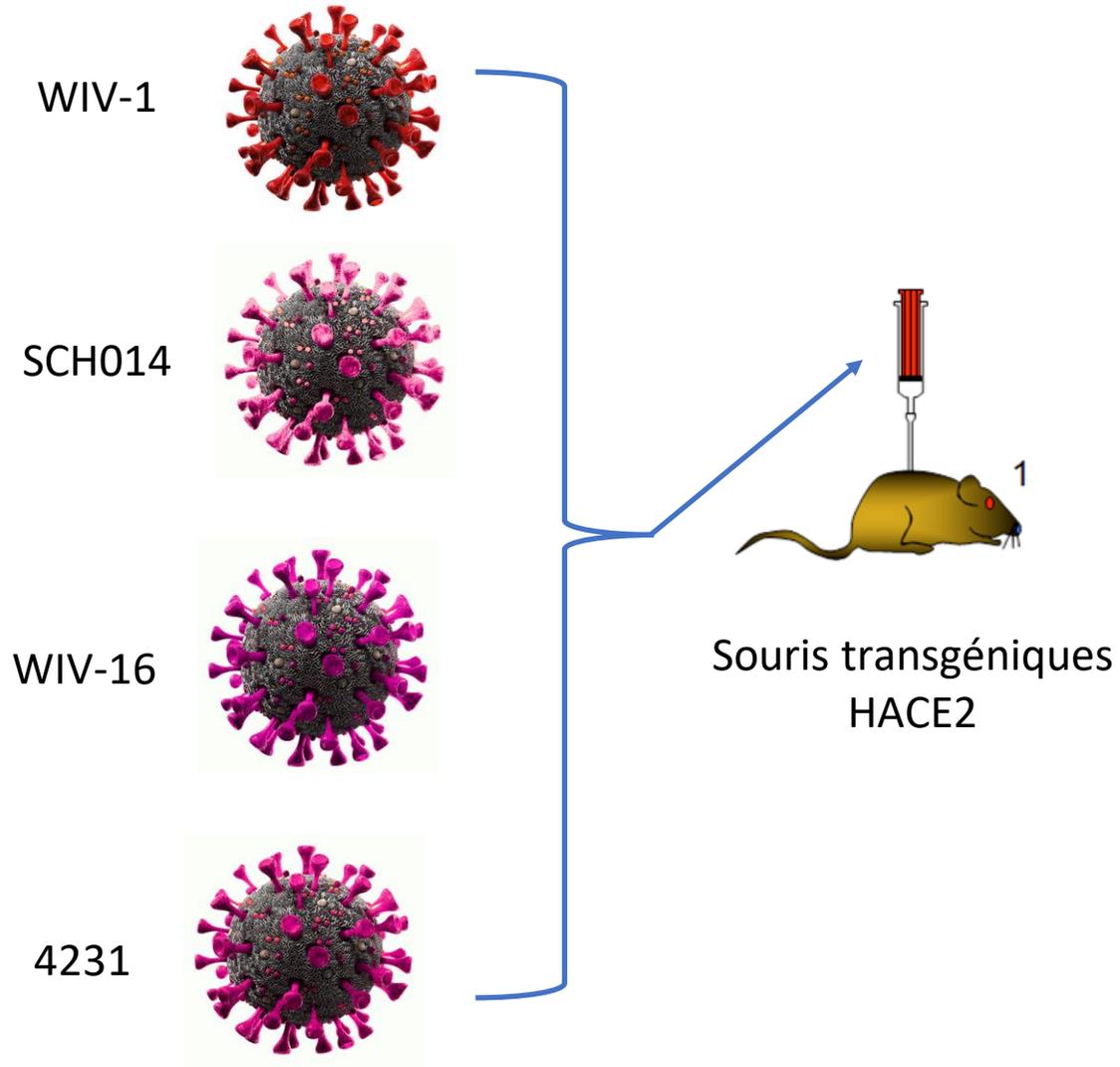
# Expériences de Gain de Fonction: Comment construire des virus

## chimériques qui franchissent la barrière d'espèce (2)?

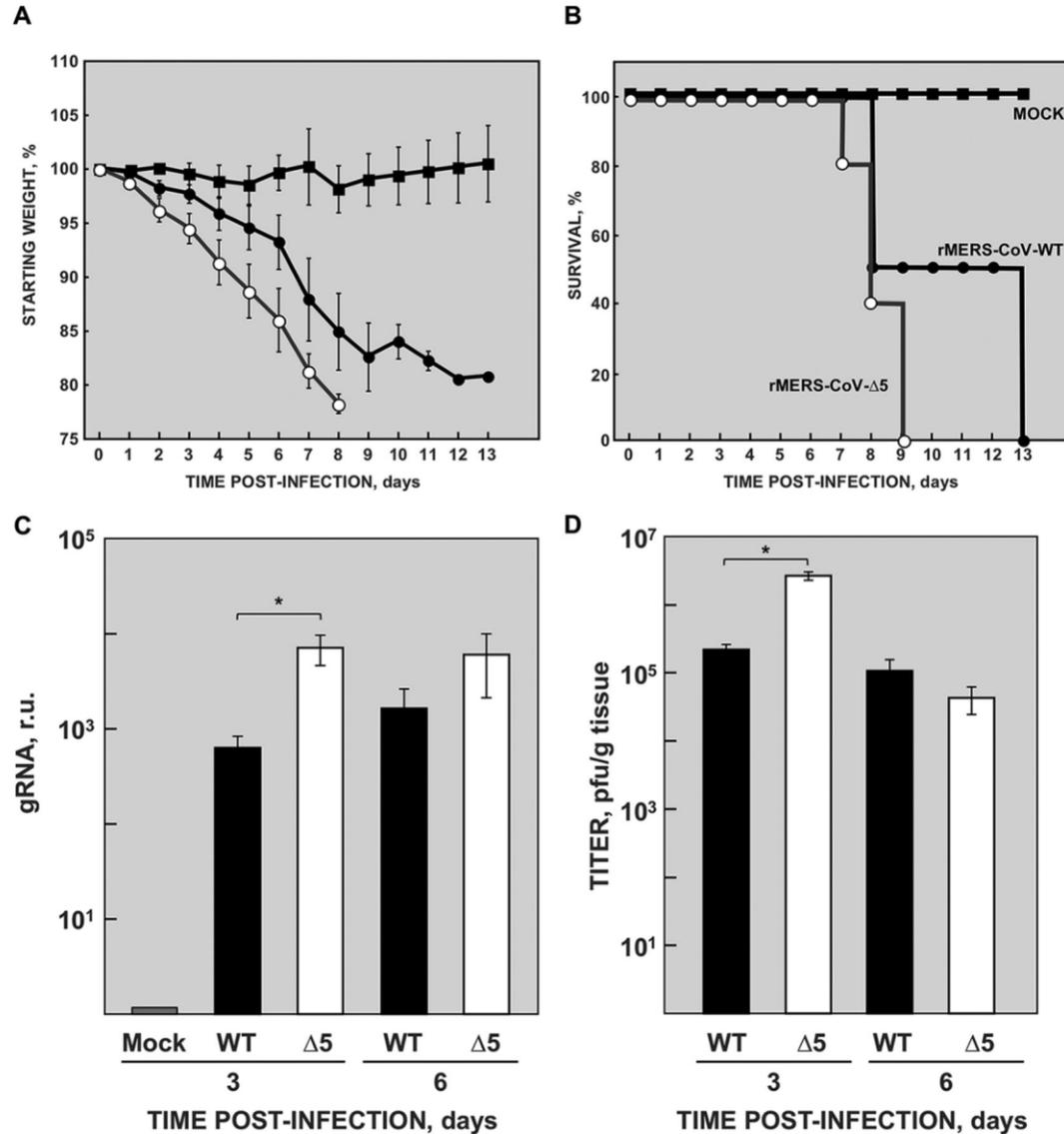


- Il est possible de construire des CoV chimériques à partir de séquences sans avoir isolé les virus.
- Ces virus synthétiques sont infectieux, et dans certains cas franchissent la barrière d'espèce.
- Ces outils permettent de mimer des processus de recombinaison naturelle à l'origine de zoonoses.
- Les virus ainsi "générés" n'existent pas dans la nature.
- Il est difficile de prédire quelle serait la trajectoire d'un tel virus s'il infectait un expérimentateur.
- Le risque biologique est important car certaines Spikes de CoV reconnaissent des récepteur ACE2 de nombreuses espèces.

# Le projet « Understanding the Risk of Bat Coronavirus Emergence » (NIH)



## 8) Des expériences de LOF aux résultats inattendus



La virulence de rMERS-MA-Δ5 a été analysée dans un modèle de souris hDPP4-KI. De manière inattendue, toutes les souris sont mortes après l'infection par rMERS-MA-Δ5, contrairement à celles infectées par le virus parental.

© | Virology | Research Article | 13 January 2021



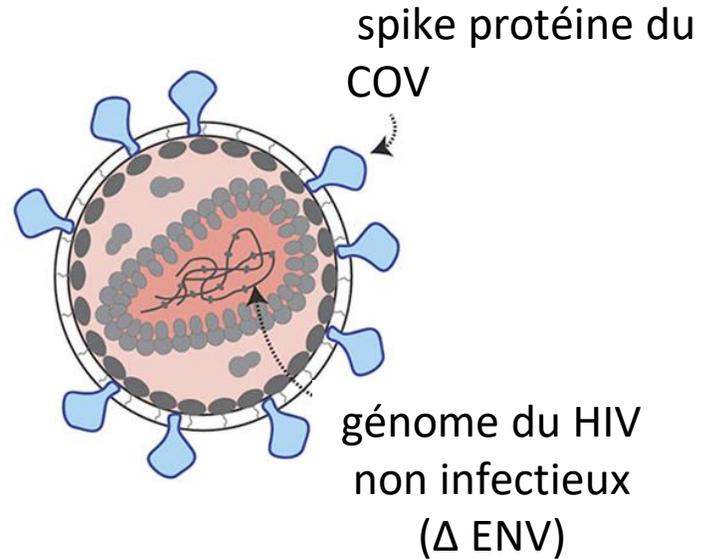
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Gene 5 Modulates Pathogenesis in Mice

Authors: Javier Gutierrez-Alvarez, Li Wang, Raul Fernandez-Delgado, Kun Li, Paul B. McCray Jr., Stanley Perlman, Isabel Sola, Sonia Zuñiga, Luis Enjuanes | AUTHORS INFO & AFFILIATIONS

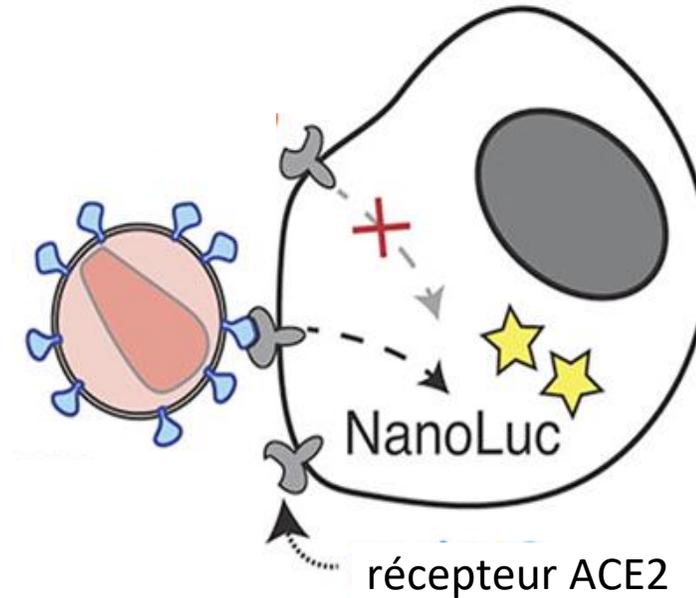
DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01172-20>



## Il existe des méthodes alternatives moins risquées : les pseudovirus ou virus non répliquatifs



Particule virale “pseudotypée”



- Il est possible de construire des pseudovirus capables de faire un seul cycle d'infection.
- Ces pseudotypes permettent de faire des études sur :
  - l'entrée du virus et le franchissement de la barrière d'espèce,
  - la neutralisation par les anticorps.
- Les pseudovirus ainsi “générés” ne sont pas infectieux.

## Régulations futures?

- **La régulation internationale des expériences en virologie est insuffisante.**
- **Le risque est international car les virus n'ont pas de passeport.**
- **Il est nécessaire de développer des outils tels que des “boîtes noires biologiques”\***  
**permettant le suivi des activités des laboratoires P3/P4 :**
  - archivage et déquencage des filtres à air ;
  - accès régulé en fonction des cahiers de laboratoire électroniques
- **Il serait nécessaire de créer une instance de contrôle internationale.**

\* Le rapport de la mission OMS peine à retracer les origines de l'épidémie de SARS-CoV-2 Decroly et al.,  
Virologie 25, 3 (p.148-52), Mai 2021.

# Take home message

- Les virus émergents sont un problème de santé publique majeur.
- Il est indispensable de pouvoir étudier les virus en laboratoire pour développer des vaccins et concevoir des médicaments.
- Les bénéfices de santé publique de ces contres mesures sont considérables.
- Les expériences de virologie comportent des risques et l'évaluation minutieuse de ces risques est un enjeu sociétal (international).
- Il est nécessaire de développer des nouveaux outils de virologie moléculaire pour travailler plus en sécurité.
- Des accidents de laboratoire sont documentés et l'analyse des accidents doit permettre d'adapter les mesures de sécurité.
- Les expériences de Gain de Fonction (GOF/GOFROC) en particulier sur les virus à potentiel pandémique posent question et cette question doit être arbitrée par nos sociétés.
- La régulation des expériences en virologie est très insuffisante et il serait nécessaire de créer une instance de contrôle internationale et de développer des outils tels que des "boîtes noires biologiques" permettant le suivi des activités des laboratoires P4 .

## Pour aller plus loin..

1. **Retrouver les origines du SARS-CoV-2 dans les phylogénies de coronavirus;** E. Sallard et al., Médecine/science, 36(8-9):783-796 Août 2020.
2. **Une course contre la montre Création du SARS-CoV-2 en laboratoire, un mois après son émergence !** F. Iseni et al., Médecine/science, 36(8-9):797-801 Août 2020.
3. **Les apprentis sorcier du génome,** B. Canard, E. Decroly & J. Van Helden et al., Le monde diplomatique a paraître février 2022, Octobre 2021.
4. **Origine de la Covid-19 : l'hypothèse de l'accident de laboratoire doit-elle être étudiée d'un point de vue scientifique ?**, V. Courtier & E. Decroly, The conversation Mai 2021.
5. **Covid : du diagnostic au contrôle de l'épidémie, la révolution du séquençage des virus**, V. Courtier & E. Decroly, The conversation Février 2022.
6. **Wuhan, un nouveau Hiroshima ?**, B. Canard et E. Decroly, Le monde diplomatique numéro hors série Manière de Voir 179, Octobre 2021.
7. **Le rapport de la mission OMS peine à retracer les origines de l'épidémie de SARS-CoV-2** Decroly et al., Virologie 25, 3 (p.148-52), Mai 2021.
8. **Est-il raisonnable de construire en laboratoire des virus potentiellement pandémiques chez l'homme qui n'existent pas dans la nature ?**, E. Decroly, Philosophie magazine 13 avril 2021.
9. **Gain-of-function and origin of Covid19.** Berche P, Presse Med. 2023 Jun 2;52(1):104167.
10. **L'éradication des maladies infectieuses virales mise en danger par les avancées de la biologie synthétique**, Med Sci (Paris), Volume 35, Number 2, Février 2019

# Quelques dates clés

- **1975** : Conférence d'Asilomar ([Paul Berg](#)).

Moratoire sur les manipulations [génétiques](#) afin d'éviter que des [bactéries génétiquement modifiées](#) (SV40) puissent se disperser dans l'environnement?

- **2003** : **Protocole de Carthagène sur les OGM** (196 pays – sauf USA et Vatican) autorise le développement des outils biotechnologiques à condition que des mesures de sécurité adéquates soient appliquées et que les risques associés à l'utilisation et à la dissémination d'OGM susceptibles d'avoir des incidences négatives sur l'environnement soient pris en compte.
- **2011 Expériences de “Gain de Fonction”** (GOF) sur le virus de la grippe aviaire H5N1 afin d'accroître la transmissibilité du virus par aérosols ([R. Fouchier](#) & [Y. Kawaoka](#)).
- **2014 Moratoire sur le financement des GOF USA** sur les virus à potentiel pandémiques transformés en protocole de surveillance “Potential Pandemic Pathogen Care and Oversight” (**P3CO**) en 2017.
- En France : Comité d'expertise des utilisations confinées d'OGM et réglementation micro-organismes et toxines “**MOT**” (2001,) régulant la détention et l'utilisation : les agents pathogènes humains et les toxines présentent un risque réel pour la santé et la sécurité humaines. L'opérateur de cette réglementation est **L'ANSM**.