

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 24 mai 2013

## **AVIS** **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

**relatif à l' « Évaluation de la possibilité du caractère zoonotique du nouveau coronavirus MERS-CoV (NCoV) »**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 13 mai 2013 par la Direction Générale de la Santé (DGS) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Évaluation de la possibilité du caractère zoonotique du nouveau coronavirus MERS-CoV (NCoV) ».

### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Un nouveau coronavirus humain a été identifié en septembre 2012 à partir de prélèvements de deux patients atteints d'un syndrome respiratoire sévère en Arabie Saoudite (juin et septembre 2012). Le tout premier cas, identifié rétrospectivement suite à cette découverte, date d'avril 2012 chez un patient présentant lui aussi un syndrome respiratoire sévère en Jordanie. Au 22 mai 2013, le bilan international s'élève à 43 cas notifiés officiellement et 21 décès. La létalité apparente de cette nouvelle infection virale humaine s'élève à plus de 50 %. Plusieurs pays ont été touchés par ce virus mais l'essentiel des cas déclarés se concentre actuellement au Moyen-Orient. En France, deux cas humains ont été identifiés : le premier diagnostiqué à la date du 7 mai 2013 revenait d'un voyage aux Émirats arabes unis et le second cas était hospitalisé dans la même chambre que le premier patient et a été diagnostiqué le 12 mai 2013.

Plusieurs noms ont été utilisés pour ce virus à ce jour : « NCoV » (peut-être le plus répandu pour nouveau coronavirus), « human betacoronavirus 2c Erasmus Medical Center/2012 » (hCoV-EMC/2012), « hCoV 2c England-Qatar », « hCoV 2c Jordan N3 », mais dernièrement le nom de « Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus » (MERS-CoV) a été validé par le groupe de travail des coronavirus au sein du comité international de la taxonomie des virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV*) (de Groot *et al.* 2013). Dans cet avis, la dénomination utilisée sera MERS-CoV.

L'origine de l'infection est inconnue à ce jour même si elle se concentre particulièrement dans la péninsule arabique. L'hypothèse d'une source animale a été évoquée mais aucune preuve n'a été apportée en ce sens. Suite à une caractérisation génétique approfondie, le nouveau virus s'avère appartenir au genre *Betacoronavirus* qui contenait jusqu'à présent 3 virus pouvant infecter les humains et notamment le coronavirus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV).

Suite à l'identification du nouveau virus, l'OMS a recommandé la mise en œuvre d'une surveillance mondiale, déclinée pour l'Union Européenne par le *European Centre for Diseases Control* avec une définition de cas commune. En France, la surveillance a été implémentée dès octobre 2012 par l'InVS (Institut national de Veille Sanitaire).

La classification de ce nouveau virus dans le même genre que celui du SARS-CoV engendre la crainte du développement de l'infection suivant un schéma semblable à l'épidémie de SRAS de 2002-2003, qui a compté 8098 cas et 774 décès au total (WHO 2004). De plus, l'origine de la contamination étant toujours inconnue et de nombreux virus émergents ayant une origine animale, l'hypothèse d'un réservoir animal nécessite d'être investiguée rapidement. C'est pourquoi la DGS (Direction Générale de la Santé) a saisi l'Anses en urgence pour compiler les informations disponibles sur l'éventuel caractère zoonotique de cette infection.

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le groupe d'expertise collective d'urgence « GECU Coronavirus » entre le 13 et le 23 mai 2013. Trois réunions téléphoniques ont été organisées les 14, 17 et 21 mai 2013. L'Avis a été validé par le GECU par voie télématique le 23 mai 2013.

Ce GECU, multidisciplinaire, regroupe des compétences complémentaires (épidémiologie, virologie humaine et animale, faune sauvage, médecine humaine et vétérinaire).

L'expertise s'est appuyée sur plusieurs documents scientifiques et consultations :

- L'Avis du Haut Conseil de la santé publique du 19 mars 2013 qui a été fourni par la DGS ;
- Des documents bibliographiques, référencés à la fin du présent avis ;
- "*Updated Rapid Risk Assessment : Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus*" de l'ECDC du 16 mai 2013 (ECDC 2013) ;
- La consultation du Dr. François Moutou (Anses Maisons-Alfort-Laboratoire de santé animale) sur la biologie des chiroptères.

L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) a également été contactée par les experts.

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GECU

#### 1. Éléments de caractérisation du MERS-CoV

##### 1.1. Parenté génétique entre le MERS-CoV et d'autres coronavirus

Les coronavirus sont des virus enveloppés dont le génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive. Ce génome est de très grande taille (environ 30 000 nucléotides), il présente une grande diversité génétique et une évolution marquée par un haut niveau de recombinaison. Les coronavirus sont actuellement divisés en 4 genres : *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Deltacoronavirus*. Les coronavirus humains connus à ce jour appartiennent aux genres *Alphacoronavirus* (HCoV-229E et HCoV-NL63) et *Betacoronavirus* (HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV et MERS-CoV) (Figure 1).

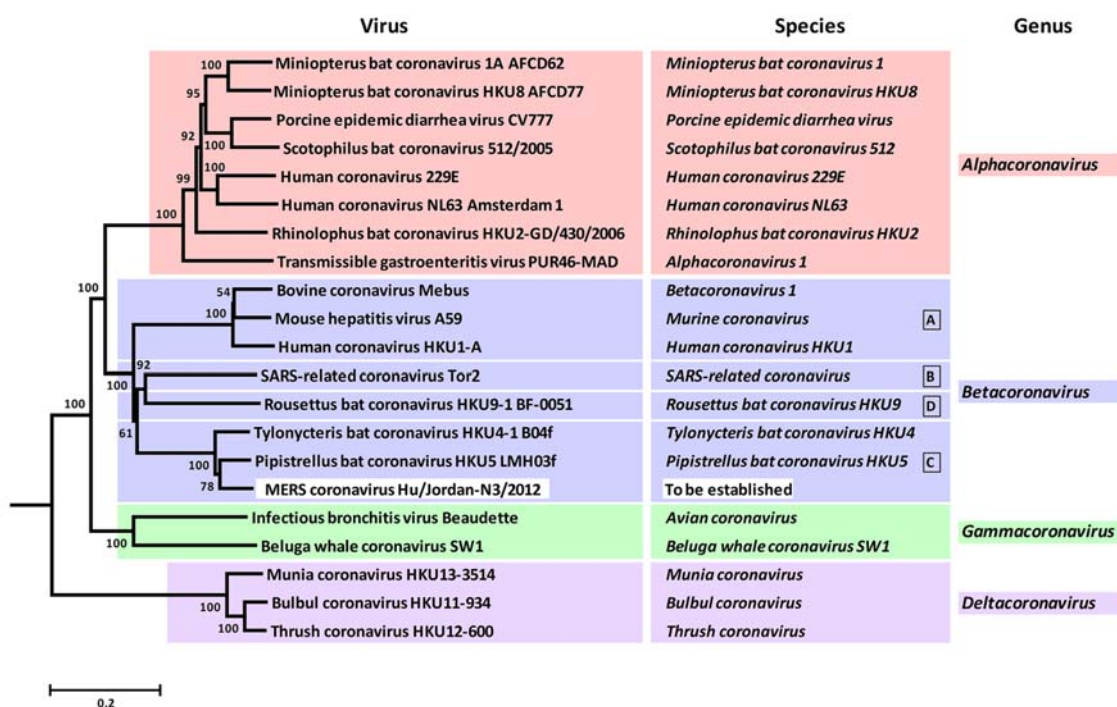


Figure 1 : Relations phylogénétiques au sein de la famille *Coronaviridae* montrant les espèces virales apparentées au MERS-CoV dans le genre *Betacoronavirus* ; arbre enraciné généré à partir de la séquence en acides aminés des domaines conservés de la polyprotéine 1ab (de Groot *et al.* 2013)

Le genre *Betacoronavirus*, qui héberge le MERS-CoV, est lui-même subdivisé en quatre lignées génétiques notées A, B, C et D (Lau *et al.* 2012) (Tableau 1). Le MERS-CoV appartient à la lignée C, lignée dans laquelle il est l'unique virus identifié infectant les humains : il est clairement distinct des trois autres *Betacoronavirus* humains connus qui appartiennent aux lignées A (virus HKU1 et HCoV-OC43) ou B (SARS-CoV) (van Boheemen *et al.* 2012; Zaki *et al.* 2012). Au sein du genre *Betacoronavirus*, le SARS-CoV et le MERS-CoV sont donc classés dans des lignées génétiques différentes, même si ces deux virus apparaissent cliniquement proches dans l'expression des symptômes de la maladie.

Les *Betacoronavirus* sont un genre viral très représenté dans la population animale (Figure 1). Un recensement non exhaustif des espèces animales connues à ce jour comme pouvant être infectées par ces virus est présenté dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Recensement non exhaustif des *Betacoronavirus* identifiés à ce jour et de leurs espèces hôtes

Lignée	Espèce virale	Espèces	Références
A	Coronavirus bovin et apparentés (BCoV, bovine like- CoV)	<i>Bovidae</i> , <i>Bos frontalis</i> , <i>Kobus ellipsiprymnus</i> et <i>Hippotragus niger</i> , <i>Cervidae</i> ; <i>Odocoileus virginianus</i> et <i>Cervus unicolor</i>	Alekseev <i>et al.</i> (2008) Rajkhowa <i>et al.</i> (2007)
	Gi CoV OH3	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Hasoksuz <i>et al.</i> (2007)
	Non précisé	<i>Camelus dromedarius</i>	Wünschmann <i>et al.</i> (2002)
	ECoV	<i>Equus caballus</i>	Davis <i>et al.</i> (2000)
	PHEV	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Greig <i>et al.</i> (1962)
	CrCoV	<i>Canis lupus familiaris</i>	Erles <i>et al.</i> (2003)
	RbCoV HKU14	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lau <i>et al.</i> (2012)
	ACoV	<i>Vicugna pacos</i>	Jin <i>et al.</i> (2007)
	HCoV-OC43	<i>Homo sapiens</i>	Hamre and Procknow (1966)
	HCoV-HKU1	<i>Homo sapiens</i>	
	Murine coronavirus MHV	<i>Mus Musculus</i>	Coley <i>et al.</i> (2005)
	RCV/SDAV coronavirus du rat et virus de la sialodacryoadénite	<i>Rattus rattus</i>	Easterbrook <i>et al.</i> (2008) Miura <i>et al.</i> (2007)
	B	Severe acute respiratory syndrome Coronavirus SARS-CoV	<i>Homo sapiens</i>
SARS related Rhinolophus bat coronavirus		<i>Rhinolopus sp.</i>	Lau <i>et al.</i> (2005)
civet-SARS-related-coronavirus		<i>Nyctereutes procyonoides</i> , <i>Paguma larvata</i>	
C	HKU4 Ty-BatCoV HKU4	<i>Miniopterus pusillus</i>	Woo <i>et al.</i> (2006)
	HKU5 Pi-BatCoV HKU5	<i>Pipistrellus sp.</i>	Woo <i>et al.</i> (2006)
	MERS-CoV	<i>Homo sapiens</i>	Zaki <i>et al.</i> (2012) van Boheemen <i>et al.</i> (2012)
D	Ro-BaCoV HKU9	<i>Rousettus lechenaulti</i>	Woo <i>et al.</i> (2007)
	Nomenclature non définie, isolat appelé VM 314	<i>Pipistrellus sp.</i> <i>Nycteris sp</i>	Annan <i>et al.</i> (2013)

Le MERS-CoV s'est avéré être proche de plusieurs *Betacoronavirus* animaux :

- Le MERS-CoV appartient à la lignée C des *Betacoronavirus*, comme les virus BatCov-HKU4 (isolé d'une chauve-souris du genre *Tylonycteris*) et BatCov-HKU5 (isolé d'une chauve-souris du genre *Pipistrellus*) (Figure 1). Les séquences génomiques complètes des virus HKU4 et HKU5 sont connues : dans les sept domaines conservés de la réplicase virale (polyprotéine 1ab) qui servent de base à la taxonomie des *Betacoronavirus* (domaines respectivement situés dans les protéines nsp 3, 5, 12, 13, 14, 15 et 16), le MERS-CoV ne présente que 75 à 77 % d'identité aminopeptidique avec HKU4 et HKU5. Ce pourcentage d'identité aminopeptidique est suffisamment faible (< 90 %, selon les critères de l'ICTV) pour considérer que bien qu'appartenant à la même lignée génétique, HKU4, HKU5 et MERS-CoV constituent des espèces virales différentes (van Boheemen *et al.* 2012).
- Le MERS-CoV semble présenter une parenté génomique supérieure avec le virus VM314/2008 détecté chez une chauve-souris du genre *Pipistrellus* aux Pays-Bas en 2008 (Reusken *et al.* 2010). Le MERS-CoV possède en effet 98 % d'identité aminopeptidique sur une séquence de 272 acides aminés (traduite à partir d'un fragment de 816 paires de base amplifié dans le gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante de ce virus de pipistrelle (Annan *et al.* 2013; van Boheemen *et al.* 2012). La zone étudiée correspond à l'une de celle communément utilisée pour une première approche phylogénétique chez les *Betacoronavirus*, et suggère donc une parenté génétique importante. Cependant, il convient de souligner que cette parenté repose sur une séquence génétique extrêmement courte. Un très court fragment (131 nucléotides) de l'extrémité 3' du gène S – la plus conservée – de VM314 a également été comparée à MERS-CoV et confirmerait les parentés génétiques. Des virus apparentés à VM314 ont été détectés par des techniques moléculaires dans 14,7 % des 272 prélèvements fécaux réalisés chez le genre *Pipistrellus* en Ukraine, Roumanie, Pays-Bas et Allemagne (Annan *et al.* 2013).

### 1.2. Infection expérimentale d'animaux de laboratoire

Très peu d'études ont jusqu'à présent été publiées pour décrire l'infection expérimentale d'animaux de laboratoire par le MERS-CoV (Tableau 2). Munster *et al.* (2013), en infectant six macaques rhésus et après autopsie des animaux ayant développé des signes cliniques suite à l'inoculation, ont pu compléter les postulats de Koch et attribuer la maladie de ces singes au MERS-CoV.



Tableau 2 : Liste des espèces animales infectées expérimentalement par le MERS-CoV en laboratoire

Espèce animale	Âges	Reproduction expérimentale	Publication
Primates non humains			
Macaques rhésus <sup>1</sup>	Animaux entre 6 et 12 ans, 6 animaux étudiés	Oui, signes cliniques dans les 24 heures	Munster <i>et al.</i> (2013)
Macaques cynomolgus <sup>1</sup>	Animaux jeunes	Non	Dire d'expert dans <i>Science</i> (Enserink 2013)
Autres espèces			
Furets <sup>2</sup>		Non	Dire d'expert dans <i>Science</i> (Enserink 2013)
Souris <sup>2</sup>		Non	Dire d'expert dans <i>Science</i> (Enserink 2013)
Hamster <sup>2</sup>		Non	Dire d'expert dans <i>Science</i> (Enserink 2013)

<sup>1</sup> Infection réalisée à partir de la souche fournie par le *Erasmus Medical Center* et préparée selon van Boheemen *et al.* (2012).

<sup>2</sup> Dire d'expert, pas d'information supplémentaire disponible sur la ou les souches utilisées.

La possibilité d'infection expérimentale du macaque rhésus présente donc un intérêt particulier pour l'étude de la physiopathologie de l'infection virale.

### 1.3. Propagation du virus en culture cellulaire

Au total, 3 articles étudient la propagation du virus MERS-CoV pour l'essentiel dans des lignées cellulaires continues : Zaki *et al.* (2012), Müller *et al.* (2012) et Chan *et al.* (2013a). L'ensemble des cellules étudiées est regroupé dans le Tableau 3, Annexe 1.

Cette longue liste de lignées cellulaires qui supportent la multiplication virale est cependant à interpréter avec précaution. En effet, la permissivité d'une culture cellulaire n'est pas forcément représentative d'une aptitude du virus à se multiplier chez l'espèce animale dont provient la lignée cellulaire. Ainsi, la permissivité des cultures cellulaires est à bien distinguer du tropisme d'organe et du tropisme d'espèce.

Le MERS-CoV présente cependant la particularité de se multiplier aussi sur des lignées cellulaires de chiroptères, ce qui n'est pas habituel au sein des *Betacoronavirus*.

La réplication du MERS-CoV dans des fragments de tissus bronchiques et pulmonaires humains maintenus en survie ex-vivo a été démontrée (Chan *et al.* 2013a).

### 1.4. Récepteur DPP4 (CD26)

#### ■ Information sur le récepteur chez l'Homme

Plusieurs études ont permis d'identifier un récepteur cellulaire utilisé par le virus pour initier l'infection. Ce récepteur est appelé la Dipeptidyl Peptidase IV (DPP4) ou CD26 (Cluster of Differentiation 26). Il est différent de celui utilisé par le SARS-CoV, le *Human Angiotensin-Converting Enzyme 2* (hACE2). Le récepteur DPP4 est considéré comme ubiquiste dans l'organisme humain avec une présence élevée dans les cellules non-ciliées de l'épithélium bronchique (Chan *et al.* 2013a). Sont également cités par ordre

décroissant de densité de récepteurs dans les tissus : les reins, les poumons et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Chan *et al.* 2013c).

#### ■ **Présence du récepteur chez les animaux**

L'identification du récepteur au virus, l'étude de sa conservation chez les espèces animales et l'étude de sa distribution dans les tissus sont primordiales pour l'avancée des connaissances sur la physiopathologie et la transmissibilité de l'infection, ainsi que pour l'évaluation de la capacité du virus à infecter différentes espèces animales.

La protéine DPP4 est présente chez l'Homme mais également chez plusieurs espèces animales : mammifères, oiseaux, reptiles et amphibiens. Au sein même des mammifères, la comparaison des séquences protéiques montre un pourcentage d'homologie avec le DPP4 humain compris entre 99 et 72 % (Tableau 4 Annexe 2). Ce sont les séquences des primates non humains qui sont les plus proches de la séquence humaine mais peut être également cité le cheval, dont le récepteur atteint 90 % d'homologie avec la séquence humaine. Les chiroptères quant à eux se situeraient à 82 % d'homologie. En revanche ce pourcentage d'homologie diminue fortement (en dessous de 70 %) pour les non-mammifères.

### **1.5. Tests diagnostiques utilisables pour la recherche de MERS-CoV ou de virus apparentés chez l'animal**

#### ■ **Échantillons à analyser**

Compte-tenu du tropisme respiratoire et/ou digestif de la plupart des coronavirus connus à ce jour, les prélèvements à recommander pour un diagnostic virologique ou moléculaire seraient des échantillons respiratoires (écouvillons ou prélèvements plus profonds tels que lavage broncho-alvéolaire) ou digestifs (fèces).

#### ■ **Isolement viral**

L'isolement viral sur culture cellulaire peut être tenté, mais c'est une technique lourde, qui nécessite la manipulation de matières potentiellement infectieuses et il n'est pas sûr que le virus animal recherché ait les mêmes aptitudes à la culture sur lignées cellulaires que celles du MERS-CoV (Tableau 3 Annexe 1). Toutefois il est à souligner que l'isolement est indispensable à entreprendre à terme pour une étude comparée des virus humains et de leurs éventuels parents animaux.

#### ■ **Détection du génome viral**

Les techniques de RT-PCR décrites pour le dépistage du génome de MERS-COV l'ont été en vue d'un diagnostic chez l'Homme et s'adressent spécifiquement à ce virus (absence de réaction croisée avec les autres coronavirus humains). La méthode retenue pour un dépistage en première intention est la RT-PCR en temps réel dite UpE, qui cible une région en amont du gène E (Corman *et al.* 2012a). Il est recommandé de compléter la détection par un test de RT-PCR de confirmation ciblant un autre gène : des protocoles ciblant les gènes ORF1b ou ORF1a (RT-PCR en temps réel), ou les gènes RdRp ou N (RT-PCR classique plus séquençage) ont été décrits (Corman *et al.* 2012a; Corman *et al.* 2012b). La détection du génome viral dépend de la cinétique d'excrétion du virus dans les prélèvements analysés. Des cas de RT-PCR négatives chez des sujets symptomatiques ayant été en contact avec des cas avérés de MERS-CoV ont été rapportés (Corman *et al.* 2012b). Les auteurs considèrent que ces cas de non détection peuvent s'expliquer par la diminution progressive de la charge virale dans les excréta des malades, comme cela avait déjà été observé chez des patients atteints de SARS-CoV à mesure que l'on s'éloignait de la date d'apparition des symptômes (Peiris *et al.* 2003).

En ce qui concerne le dépistage moléculaire d'autres coronavirus que MERS-CoV chez l'animal, et pour tenir compte du fait qu'un éventuel virus animal parental s'étant adapté à l'homme pourrait présenter des différences génétiques non négligeables avec la

séquence de MERS-CoV, l'utilisation de protocoles de RT-PCR applicables à la détection de différents coronavirus serait à recommander (de Souza Luna *et al.* 2007; Vijgen *et al.* 2008) ainsi que cela a été récemment mis en œuvre chez les chiroptères (Annan *et al.* 2013). Ces protocoles ciblant les séquences conservées dans le gène de la RdRp, moins exprimé que ceux d'autres protéines virales au cours du cycle de réplication des coronavirus, une sensibilité inférieure de ces RT-PCR consensus par rapport aux protocoles plus spécifiques décrits plus haut n'est pas à exclure.

#### ■ Détection sérologique

Le dépistage sérologique des anticorps induits pas l'infection pourrait permettre de dépister l'infection par un coronavirus après que l'excrétion virale ait pris fin, et donc à un moment après infection où la détection par RT-PCR pourrait déjà ne plus être possible. Il permettrait également de réaliser des enquêtes séro-épidémiologiques.

Plusieurs études ont rapporté chez l'homme l'utilisation du test d'immunofluorescence indirecte à partir de cellules infectées et fixées (Buchholz *et al.* 2013; Chan *et al.* 2013b; Corman *et al.* 2012b; Zaki *et al.* 2012) ou le test de séroneutralisation (Chan *et al.* 2013b). Les deux techniques nécessitent la manipulation au laboratoire d'un virus vivant présentant des parentés antigéniques avec le virus recherché, avec les exigences de confinement (biosécurité) qui découlent de l'utilisation de virus infectieux (au moins jusqu'à fixation des cellules pour ce qui concerne l'immunofluorescence). Si la séroneutralisation est la technique de référence concernant la spécificité des anticorps détectés, les réactions d'immunofluorescence sont en revanche connues chez les coronavirus pour conduire à de nombreuses réactions croisées. Ainsi l'existence de structures antigéniques conservées entre MERS-CoV et les coronavirus OC43 ou SARS-CoV conduirait-elle les anticorps induits par ces différents virus à réagir de façon croisée dans les tests d'immunofluorescence (Buchholz *et al.* 2013; Chan *et al.* 2013b). Pour éviter ce dernier écueil, les derniers développements des tests d'immunofluorescence font appel à une lignée cellulaire exprimant la protéine S ou N (Corman *et al.* 2012b). Cette approche, encore en cours de validation, présente à la fois l'avantage de n'exprimer dans les cellules utilisées que la protéine S, qui présente le plus de variation entre les différents coronavirus (donc d'améliorer la spécificité du test d'immunofluorescence qui en résulte) et de ne pas nécessiter la manipulation de virus infectieux (donc d'améliorer la sécurité au laboratoire).

En matière de coronavirus animaux, de fortes parentés génétiques existent entre certains *Betacoronavirus* (notamment au sein de l'espèce virale *Betacoronavirus* 1, *cf.* Tableau 1). Cette proximité génétique laisse supposer que certaines protéines conservées pourraient conduire à l'existence de réactions sérologiques croisées entre différents coronavirus (*cf.* supra). Compte-tenu de ces possibles réactions sérologiques croisées, la spécificité de la détection d'éventuels anticorps anti-MERS-CoV chez l'animal serait à analyser avec la plus grande attention.

## 2. Éléments d'épidémiologie

Les données épidémiologiques relatives à la plupart des cas humains (survenus au Moyen-Orient) ne sont pas disponibles.

Les deux premiers cas humains, qui ont donné lieu à l'identification du virus, sont survenus en Arabie Saoudite en juin et septembre 2012. Des études rétrospectives ont permis d'identifier des cas dès avril 2012 en Jordanie grâce aux programmes de surveillance mis en place suite aux épisodes de H5N1 et du SARS-CoV. Les investigations rétrospectives se sont basées sur les échantillons prélevés dans ce cadre de recherche à la suite des différentes recommandations qui ont été faites (ECDC 2013; WHO 2013).

Suite aux premiers cas, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a décidé d'une surveillance internationale, relayée en Europe par le European Centre for Diseases



Control (ECDC), et mise en œuvre en France par l'InVS. À l'échelle mondiale, 43 cas ont été diagnostiqués au 22 mai 2013 et 21 sont décédés selon le bilan officiel de l'OMS.

La majorité des cas est survenue dans la péninsule arabique (Figure 2). Au 22 mai, trente-et-un cas dont 16 décès sont survenus en Arabie Saoudite, majoritairement dans le gouvernorat d'Al-Ahsa, situé à l'est du pays, zone frontalière des Émirats arabes unis. Il y a eu en outre 8 cas en Europe (4 au Royaume-Uni, 2 en Allemagne, et 2 en France), dont 5 concernaient des voyageurs de retour de la péninsule arabique ou des pays frontaliers.

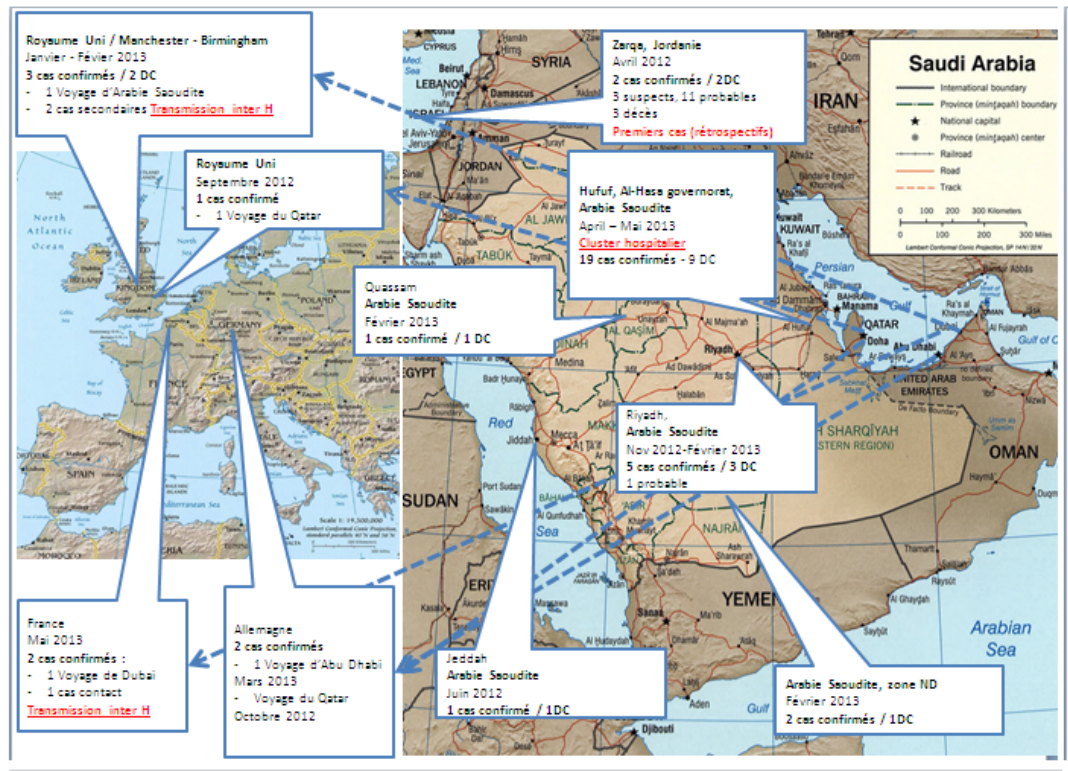


Figure 2 : Carte de répartition des cas humains du MERS-CoV à la date du 14 mai 2012 (InVS 2013)

Les données cliniques et épidémiologiques disponibles sont très parcellaires et ne permettent pas de proposer des hypothèses sur la dynamique de l'épidémie, ni d'avoir de certitudes sur les modes de transmission. Cependant, les autorités saoudiennes ont fait état, chez plusieurs patients, de co-morbidités graves, chroniques, débilantes ou immunosuppressives. L'âge des patients atteints est en moyenne de 54 ans variant de 24 à 64 ans (à la date du 14 mai). Aucun cas pédiatrique n'a été à ce jour officiellement déclaré. Un sex-ratio homme/femme de 5 pour 1 a été rapporté pour les 34 premiers cas (ECDC 2013). Les experts ignorent si ces éléments d'épidémiologie reflètent une sensibilité augmentée, une exposition supérieure ou des conditions d'accès aux soins différentes. Les contacts avec les animaux sont traités au paragraphe 2.5.

### 2.1. Matières virulentes et possibilités de transmission

Le virus a été isolé à partir de prélèvements pulmonaires profonds (lavages broncho-alvéolaires et crachats induits). Les analyses de prélèvements naso-pharyngés se sont toutes révélées négatives (Bermingham *et al.* 2012).

Chez certains patients une insuffisance rénale aiguë a été décrite (Pebody *et al.* 2012), bien que son origine ne soit pas connue à ce jour (néphrite d'origine virale ou syndrome de défaillance multi-viscérale). Il n'y a pas, pour l'instant, d'informations disponibles sur l'éventuelle infectiosité du sang, des urines et des selles chez les patients infectés.

## 2.2. Pathologies et infections concomitantes chez certains patients infectés par le MERS-CoV

Il est probable que tous les cas ne sont pas connus : d'une part des patients atteints de formes moins graves pourraient ne pas être reconnus comme infectés par le MERS-CoV ; d'autre part des cas survenant chez des voyageurs ou des migrants pourraient ne pas être rapportés. Il pourrait donc y avoir une sous déclaration importante.

L'aspect nosocomial doit être pris en compte dans la transmission de la maladie et la comorbidité semble être un facteur de risque aggravant.

La co-infection par différents virus respiratoires (virus influenza A et virus parainfluenza 2) a été rapportée chez deux patients atteints de MERS-CoV.

## 2.3. Transmissions interindividuelles

### ■ Études sur la circulation du MERS-CoV dans la population humaine dans la péninsule arabique

Il existe peu d'études qui permettent de documenter la circulation du MERS-CoV dans la population :

- Une première étude est décrite par Zaki *et al.* (2012)

Des analyses ont été réalisées sur des contemporains du cas d'avril 2012 en Jordanie, à partir de sérums collectés avant l'émergence de l'épidémie entre 2010 et 2012. Cette technique n'a pas permis de montrer que des patients prélevés entre 2010 et 2012 avaient été infectés par le MERS-CoV. Ce virus ne circulait donc pas largement dans la région d'étude, au cours des deux années précédant sa mise en évidence. Ainsi, les cas saoudiens sont survenus dans une région dont le virus semblait apparemment absent au cours des deux années précédentes et dont la densité de population est élevée pour la région, sans que l'épidémie n'évolue selon un mode explosif au vu des données disponibles.

- La deuxième étude est due à Gautret *et al.* (2013) : les auteurs ont recherché le virus MERS-CoV chez des patients ayant voyagé en Arabie Saoudite pour le pèlerinage à La Mecque (Hajj) en 2012. Des écouvillons nasaux ont été réalisés au retour de ces patients, qui étaient nombreux (83%) à montrer des symptômes respiratoires. Le virus MERS-CoV n'a pu être détecté dans aucun de ces prélèvements. Ces résultats seraient en faveur d'une faible circulation du virus dans cette zone, même s'il convient de souligner que les prélèvements concernaient l'appareil respiratoire supérieur (écouvillons nasaux) et non profond, comme c'est aujourd'hui préconisé pour la recherche du virus MERS-CoV.

Ainsi, les données épidémiologiques disponibles ne permettent pas de confirmer ni d'infirmer la circulation du MERS-CoV chez l'Homme dans les régions étudiées du Moyen Orient.

### ■ Données provenant des cas humains avérés

La transmission aux contacts autour des cas avérés a rarement été rapportée.

Cette transmission interhumaine a été établie avec certitude dans quatre occasions. Une transmission nosocomiale a été établie dans le cluster français, les 2 cas ayant partagé une chambre d'hôpital non confinée et dans le cluster au Royaume-Uni chez des membres de la famille du patient hospitalisé. Dans le cluster jordanien une contamination du personnel soignant a été établie (Hijawi *et al.* 2013). Le cluster d'Arabie-Saoudite est toujours actif, dans un hôpital du gouvernorat d'Al-Hasa : au 22 mai, il compte 22 patients dont 2 soignants et 10 décès. Son investigation est en cours par les autorités sanitaires saoudiennes et aucune information n'a été diffusée pour le moment.

D'autres éléments disponibles, autour des cas avérés viennent étayer l'hypothèse d'une transmission interhumaine limitée du MERS-CoV par rapport au SARS-CoV. En effet, le premier patient français a effectué un voyage organisé au sein d'un groupe de 39 personnes dont aucune autre n'a présenté de symptômes évocateurs de l'infection. Les participants ont été soigneusement interrogés pour essayer de déterminer si ce patient avait eu des activités non partagées avec les autres, sans qu'aucune piste n'émerge de ces interrogatoires. L'hypothèse alimentaire a également été explorée mais n'a pas été fructueuse : l'ensemble des repas a été pris en commun par le groupe de voyageurs, mais il est à noter que l'interrogatoire a eu lieu plus de 3 semaines après le retour, rendant imprécis les souvenirs sur les consommations alimentaires (communication InVS).

Dans le cluster britannique, le premier malade s'est avéré être allé en pèlerinage dans la région de la Mecque et de Médine, à l'ouest de l'Arabie Saoudite, à une période où la concentration humaine est forte et les échanges importants (Birmingham *et al.* 2012; HPA UK Novel Coronavirus Investigation team 2013). Cependant, au cours de ces périodes de pèlerinage, aucune explosion de cas n'a été notifiée et les cas se déclarent tout au long de l'année sans saisonnalité particulière, ce qui est habituel pour un virus émergent.

Des études d'investigations des contacts ont été conduites pour le cas allemand (patient originaire du Qatar) pour lequel il n'a pas été rapporté de transmission interindividuelle une fois ce patient arrivé sur le sol allemand (Buchholz *et al.* 2013).

#### 2.4. Contacts des patients avec des animaux

Le contact direct avec des animaux vivants n'a été documenté que pour trois cas. Ces trois patients ont eu des contacts directs avérés avec des dromadaires (Buchholz *et al.* 2013; Pebody *et al.* 2012), des chèvres (Buchholz *et al.* 2013), des moutons (Pebody *et al.* 2012) ou des animaux de ferme sans plus de précisions (AlBarrak *et al.* 2012). Cependant aucune analyse virologique ou sérologique de ces animaux n'a été publiée à ce jour.

Le premier cas français, qui a effectué un voyage dans la péninsule arabique, n'a pas rapporté avoir eu de contact direct avec des animaux. Le groupe a visité un marché aux dromadaires, mais la visite a eu lieu à la fin du marché, en l'absence d'animaux. Une visite a également inclus la présence d'un fauconnier mais les voyageurs n'ont pas eu de contacts directs avec les oiseaux : le fauconnier a « installé » le faucon sur leur bras après leur avoir fait enfiler un gant de fauconnerie. D'autres voyageurs du même groupe ont rapporté la même exposition.

À ce jour, il n'existe aucun élément d'information concernant les éventuels contacts avec des animaux qu'auraient pu avoir les cas humains survenus dans la péninsule arabique, ni sur d'éventuels prélèvements et analyses réalisés sur ces animaux.

Il est impossible à ce stade d'exclure des contacts indirects avec des animaux (par exemple *via* des supports souillés par des matières virulentes d'origine animale).

### 3. Éléments de réflexion sur un éventuel caractère zoonotique de l'infection par le MERS-CoV

Concernant l'origine animale du virus MERS-CoV, aucune donnée épidémiologique publiée actuellement, ne démontre le caractère zoonotique de l'infection.

#### 3.1. Hypothèses de transmission

En l'absence de telles données, les experts du Gecu ont envisagé différentes hypothèses :

- Le MERS-CoV circulait dans la population humaine depuis un certain temps et, pour des raisons inconnues, sa pathogénicité aurait été modifiée ;
- Le MERS-CoV aurait une origine animale.

#### ■ Hypothèse d'une modification d'un virus déjà implanté dans la population humaine

Plusieurs arguments plaident en défaveur d'une origine humaine pour le MERS-CoV :

- La première enquête sérologique effectuée dans les populations ne met pas en évidence de séroprévalence importante dans les deux années précédant le premier cas (Zaki *et al.* 2012) ;
- Suivant les règles générales de co-évolution des virus et de leurs hôtes, le fort pouvoir pathogène soudain d'un virus est une caractéristique qui peut être associée à un virus émergent ;
- Le profil génétique du MERS-CoV est éloigné des autres *Betacoronavirus* humains connus ;
- L'origine géographique essentiellement localisée au Moyen-Orient n'est pas en faveur d'une circulation ancienne du virus dans la population humaine : les autres coronavirus infectant l'Homme depuis de longues années (HCoV-229E, HCoV-OC43, NL63 et HKU1) ont une répartition ubiquiste.

#### ■ Hypothèse d'une transmission à l'Homme d'un virus d'origine animale

Dans le principe, lors de la transmission d'un virus de l'animal à l'Homme, trois scénarios peuvent être envisagés :

- Le franchissement direct de la barrière d'espèce du réservoir animal vers l'Homme :
  - soit de manière sporadique et ancienne, avec adaptation à l'Homme puis transmission interhumaine efficace (scénario 1) ;
  - soit de manière répétée de l'animal à l'Homme, associée également à une capacité de transmission interhumaine (scénario 2) ;
- Le franchissement de la barrière d'espèce *via* une espèce animale jouant le rôle d'hôte intermédiaire : à partir d'une espèce animale sauvage réservoir, une autre espèce sauvage plus proche de la population humaine, ou une espèce animale domestique, pourrait se contaminer et transmettre le virus à l'Homme (scénario 3).

À ce stade des connaissances, aucun schéma ne peut être ni exclu, ni privilégié. Néanmoins, les données épidémiologiques disponibles pour la population humaine suggèrent que le virus était absent de la région d'Arabie Saoudite au cours des deux années précédant l'émergence et que la transmissibilité interhumaine semble limitée (*cf.* paragraphe 2.). Donc le scénario 1 n'est pas le plus probable. Les éléments suivants sont indifféremment favorables aux scénarios 2 et 3 :

- Ainsi qu'il est indiqué au point 1.1, les *Betacoronavirus* sont un genre viral très représenté dans les populations animales ;

- La biologie des coronavirus montre un haut potentiel évolutif, ainsi que des franchissements de barrière d'espèce, suivies d'émergences réussies. Ceci a été mis en évidence pour l'Homme et l'animal, pour plusieurs virus : par exemple, pour les *Betacoronavirus*, dans le cas du BCoV des bovins et l'HCoV-OC43 ainsi que dans le cas du SARS-CoV (Vijgen et al. 2006) ;
- Le récepteur viral actuellement identifié, le DPP4 (cf. point 1.4) est présent chez l'Homme mais également chez de nombreuses espèces animales ;
- Ce virus se multiplie dans de nombreuses lignées cellulaires (cf. point 1.3), contrairement aux autres coronavirus humains connus, ce qui a été suggéré par certains auteurs comme l'indication d'une restriction d'hôtes moins forte ;
- La présence de virus apparentés génétiquement au MERS-CoV a été démontrée chez des chauves-souris européennes du genre *Pipistrellus*. Le prototype de ces virus, dénommé VM-314, n'est encore que très partiellement séquencé (cf. point 1.1). Ils restent à isoler et à caractériser de façon approfondie ;
- Le phénomène de franchissement de la barrière d'espèce des chiroptères vers l'Homme est déjà connu pour différents virus, de façon directe ou via un hôte intermédiaire (par exemple SARS-CoV et virus Nipah).

### 3.2. Espèces animales d'intérêt

Dans l'état actuel des données publiées et dans l'hypothèse d'une origine animale du virus, il est possible d'envisager les chiroptères comme un plausible réservoir sauvage, au moins ancestral, du MERS-CoV. Il faut d'ailleurs souligner la caractérisation, aujourd'hui très incomplète, des virus apparentés à MERS-CoV détectés dans le genre *Pipistrellus*. Toutefois, il existe une grande variété d'espèces de chauves-souris dont plus de mille sont répertoriées dans le monde et 46 dans la péninsule arabique (Annexe 3). D'autre part, la comparaison de la situation de la péninsule arabique et celle de l'Europe doit être envisagée avec précaution (pas d'étude virologique sur les chiroptères de la péninsule arabique et biologie des espèces différentes).

Par ailleurs, les contacts directs entre les chiroptères et l'Homme étant peu fréquents, le passage à l'Homme doit s'en doute s'envisager préférentiellement au travers de contacts indirects (urine, guano, etc.) ou de l'existence d'un hôte animal intermédiaire (fréquemment en contact avec les chiroptères comme avec l'Homme).

Enfin, d'autres animaux que les chiroptères pourraient s'avérer constituer le réservoir principal du virus.

- En ce qui concerne les contacts indirects avec les chiroptères, cette hypothèse est notamment vérifiée dans le cas du virus Nipah (du genre *Henipavirus* dans la famille des *Paramyxoviridae*) et de son réservoir chauve-souris : ces chiroptères frugivores mangeaient les dattes dans les palmeraies où la population se contaminait par contact avec l'urine ou la salive de ces animaux lors de la consommation de fruits frais. De même le génome du SARS-CoV est détectable dans les fèces de chauve-souris, même s'il a été observé que cet environnement n'est pas favorable à la structure du virus et pourrait l'inactiver (Le Gouil and Manuguerra 2012).
- En ce qui concerne l'existence d'un éventuel hôte animal plus proche de l'Homme : il a été rapporté des contacts entre certains malades et des dromadaires ainsi que des petits ruminants (cf. point 2.6) sans que ces pistes n'aient été confirmées par la publication de résultats d'enquêtes épidémiologiques ou d'investigations virologiques vétérinaires. Il convient toutefois de noter que la caractérisation génétique du MERS-CoV le place en position éloignée des coronavirus aviaires (aucun *Betacoronavirus* aviaire n'est connu à ce jour, tous les



coronavirus des oiseaux étant classés dans les genres *Gamma-* et *Deltacoronavirus*). Les mammifères seraient donc plus probablement concernés par ce rôle d'hôte proche de l'Homme, si celui-ci venait à être confirmé.

À noter enfin que l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) considère aujourd'hui l'infection par le MERS-CoV comme relevant de la santé humaine, dans l'attente d'éléments épidémiologiques ou analytiques s'avérant en faveur d'une transmission zoonotique. L'OIE reste en relation avec les autorités sanitaires des pays concernés ainsi qu'avec l'OMS et la FAO pour encourager les recherches destinées à investiguer cette hypothèse.

### **3.3. Possibilité d'une infection animale de type zoonose inversée**

Une zoonose inversée (*reverse zoonosis*) est une infection humaine qui peut être transmise de l'Homme à l'animal. Si l'origine animale de l'infection par le MERS-CoV est importante à rechercher pour comprendre l'épidémiologie de la maladie, un éventuel aspect de zoonose inversée vers les animaux d'élevage ou de compagnie ne doit pas non plus être négligé. Si une telle hypothèse était avérée :

- De tels animaux pourraient amplifier le virus à proximité de l'Homme,
- Par ailleurs, s'ils étaient à la fois réceptifs au virus et porteurs d'autres coronavirus susceptibles de recombinaison avec le MERS-CoV, des animaux domestiques proches de l'Homme pourraient permettre une dynamique forte Homme/Animal et donc une augmentation de la probabilité de l'apparition de recombinaisons.

Des études pourraient à l'avenir être menées dans ce domaine dans les zones d'origine de l'épidémie, mais également en Europe.

## **4. Conclusions et recommandations**

Le MERS-CoV appartient au genre des *Betacoronavirus*. Trois autres *Betacoronavirus* humains sont connus à ce jour, deux provoquant essentiellement des infections respiratoires bénignes (HCoV-OC43 et HKU1), et le SARS-CoV, de la lignée B, à l'origine de l'épidémie de 2002-2003. Le nouveau coronavirus MERS-CoV, pathogène pour l'Homme, est le seul virus humain de la lignée C, les autres virus de cette lignée C infectant les chiroptères. Le MERS-CoV a été identifié en septembre 2012 et le premier cas rapporté rétrospectivement date d'avril 2012.

Différents éléments sont aujourd'hui peu favorables à une origine humaine de ce virus. Il faut cependant noter le caractère incomplet des données épidémiologiques disponibles pour la grande majorité des cas humains recensés.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données épidémiologiques documentées sur les contacts avec des animaux qu'aurait pu avoir l'essentiel des cas humains, ce qui ne permet pas, aujourd'hui, de démontrer une origine zoonotique. En l'absence de telles données, les experts du « GECU coronavirus » ont envisagé les différentes hypothèses, à la lumière des éléments génétiques, biologiques et épidémiologiques aujourd'hui connus. Plusieurs d'entre eux pourraient être en faveur de l'hypothèse d'une origine animale, au moins ancestrale :

- Le haut potentiel évolutif des coronavirus, avec des franchissements de barrière d'espèce déjà mis en évidence entre l'Homme et l'animal ;
- L'ubiquité du récepteur actuellement identifié, le DPP4, exprimé par de nombreuses espèces animales ;
- La capacité de ce virus à se multiplier dans de nombreuses lignées cellulaires, contrairement aux autres coronavirus humains connus.

Si l'origine animale de ce virus est à envisager, il n'est pas possible aujourd'hui de privilégier un scénario zoonotique plutôt qu'un autre. Néanmoins, certains éléments virologiques peuvent permettre de se focaliser sur un réservoir animal plutôt constitué d'une espèce mammifère, sauvage ou non. La mise en évidence, chez *Pipistrellus sp.*, de virus partiellement caractérisés comme génétiquement apparentés au MERS-CoV, d'une part, et le phénomène de franchissement de la barrière d'espèce des chiroptères à l'Homme déjà connu pour plusieurs infections virales dont le *Betacoronavirus* du SARS-CoV, d'autre part, incitent à investiguer de façon plus approfondie le rôle des chiroptères.

Toutefois, les contacts directs entre les chiroptères et l'Homme étant peu fréquents, le passage à l'Homme doit s'en doute s'envisager préférentiellement au travers de contacts indirects (urine, guano, *etc.*) ou de l'existence d'un hôte animal intermédiaire (fréquemment en contact avec les chiroptères comme avec l'Homme). L'existence d'un autre réservoir animal que les chiroptères, plus fréquemment en contact avec l'Homme que ces derniers, ne peut actuellement être exclu.

À la suite de cet avis, le GECU formule les recommandations suivantes :

- En l'absence d'un réservoir identifié pour l'infection au Moyen-Orient, prendre en compte la recommandation aux voyageurs formulée par l'ECDC (ECDC 2013) : respecter des bonnes pratiques d'hygiène et éviter le contact avec les animaux ou leurs déchets ;
- Encourager la publication par les autorités sanitaires des différents pays des résultats épidémiologiques dont les anamnèses et commémoratifs des cas humains, notamment à propos des contacts avec les animaux ;
- Encourager la publication des résultats des études virologiques vétérinaires qui ont pu être conduites en complément de l'étude des cas humains ;
- Favoriser la collaboration des autorités médicales et vétérinaires si ces éléments suggèrent un rôle des contacts avec les animaux ;
- Promouvoir la recherche des mammifères pouvant être réservoir potentiel (à affiner en fonction des commémoratifs récoltés), l'hypothèse aviaire semblant moins probable dans un premier temps ;
- Réaliser la caractérisation génétique approfondie des virus des chiroptères qui s'avèrent les plus proches du MERS-CoV ;
- Approfondir l'étude de la biologie des chiroptères de la péninsule arabe : espèces présentes, modes de vie, habitat, alimentation, *etc.* et en particulier dans le gouvernorat d'Al-Ahsa.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du GECU Coronavirus.

**Le directeur général**

Marc Mortureux

**MOTS-CLES**

MERS-CoV, NCoV, *Betacoronavirus*, SRAS, zoonose, réservoir animal, chauve-souris, péninsule arabique.

**BIBLIOGRAPHIE**

Al-Agaili A (2003) Bats of Saudi Arabia. pp. 56

AlBarrak AM, Stephens GM, Hewson R, Memish ZA (2012) Recovery from severe novel coronavirus infection. *Saudi Medical Journal* **33**(12), 1265-1269.

Alekseev KP, Vlasova AN, *et al.* (2008) Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J Virol* **82**(24), 12422-31.

Annan A, Baldwin HJ, *et al.* (2013) Human Betacoronavirus 2c EMC/2012-related Viruses in Bats, Ghana and Europe. *Emerging Infectious Diseases* **19**(3), 456-9.

Bermingham A, Chand M, *et al.* (2012) Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveillance* **17**.

Buchholz U, Müller MA, *et al.* (2013) Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German hospital, October-November 2012. *Eurosurveillance* **18**(8).

Chan JF-W, Chan K-H, *et al.* (2013a) Differential Cell Line Susceptibility to the Emerging Novel Human Betacoronavirus 2c EMC/2012: Implications for Disease Pathogenesis and Clinical Manifestation. *Journal of Infectious Diseases* **207**(11), 1743-1752.

Chan KH, Chan JFW, *et al.* (2013b) Cross-reactive antibodies in convalescent SARS patients' sera against the emerging novel human coronavirus EMC (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. *Journal of Infection*.

Chan RWY, Chan MCW, *et al.* (2013c) Tropism and innate immune responses of the novel human betacoronavirus lineage C virus in human ex vivo respiratory organ cultures. *Journal of Virology*.

Coley SE, Lavi E, Sawicki SG, Fu L, Schelle B, Karl N, Siddell SG, Thiel V (2005) Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *Journal of Virology* **79**(5), 3097-3106.

Corman V, Eckerle I, *et al.* (2012a) Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveillance* **17**(39), 20285ii.

Corman VM, Müller MA, *et al.* (2012b) Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (HCoV-EMC) infections. *Eurosurveillance* **17**(49).

Davis E, Rush BR, Cox J, DeBey B, Kapil S (2000) Neonatal enterocolitis associated with coronavirus infection in a foal: A case report. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **12**(2), 153-156.

de Groot RJ, Baker SC, *et al.* (2013) Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV); Announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*.

de Souza Luna LK, Heiser V, *et al.* (2007) Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(3), 1049-1052.

Easterbrook JD, Kaplan JB, Glass GE, Watson J, Klein SL (2008) A survey of rodent-borne pathogens carried by wild-caught Norway rats: a potential threat to laboratory rodent colonies. *Lab Anim* **42**(1), 92-8.

ECDC (2013) Rapid Risk Assessment: Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus ECDC.

Enserink M (2013) Emerging diseases. New coronavirus reveals some of its secrets. *Science* **340**(6128), 17-8.

Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J (2003) Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology* **310**(2), 216-223.

Gautret P, Charrel R, *et al.* (2013) Lack of nasal carriage of novel corona virus (HCoV-EMC) in French Hajj pilgrims returning from the Hajj 2012, despite a high rate of respiratory symptoms. *Clinical Microbiology and Infection*.

Greig A, Mitchell D, Corner A, Bannister G, Meads E, Julian R (1962) A hemagglutinating virus producing encephalomyelitis in baby pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* **26**(3), 49.

Hamre D, Procknow JJ A new virus isolated from the human respiratory tract. In 'Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)', 1966, pp. 190-193

Harrison DL, Bates PJJ (1991) 'The mammals of Arabia.' (Harrison Zoological Museum Sevenoaks)

Hasoksuz M, Alekseev K, Vlasova A, Zhang X, Spiro D, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Saif LJ (2007) Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. *J Virol* **81**(10), 4981-90.

Hijawi B, Abdallat M, Sayaydeh A, Alqasrawi S, Haddadin A, Jaarour N, Alsheikh S, Alsanouri T (2013) Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: epidemiological findings from a retrospective investigation. *Eastern Mediterranean Health Journal* **19**, **Supplement 1**, 12-18.

HPA UK Novel Coronavirus Investigation team (2013) Evidence of person-to-person transmission within a family cluster of novel coronavirus infections, United Kingdom, February 2013. *Eurosurveillance* **18**(11).

InVS (2013) Bulletin hebdomadaire internationale du 7 au 14 mai 2013.

- Jin L, Cebra CK, Baker RJ, Mattson DE, Cohen SA, Alvarado DE, Rohrmann GF (2007) Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. *Virology* **365**(1), 198-203.
- Kindler E, Jonsdottir HR, *et al.* (2013) Efficient replication of the novel human betacoronavirus EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential. *mBio* **4**(1), e00611-12.
- Lau SK, Woo PC, *et al.* (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(39), 14040-14045.
- Lau SK, Woo PC, *et al.* (2012) Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A coronavirus, rabbit coronavirus HKU14, from domestic rabbits. *J Virol* **86**(10), 5481-96.
- Le Gouil M, Manuguerra J Persistence of SARS-CoV in bat feces (*Rhinolophus ferrumequinum*) and implications for the ecology of SARS-CoV related viruses in nature. In '15th ICID', 2012, Bangkok Thailand,
- Miura TA, Wang J, Holmes KV, Mason RJ (2007) Rat coronaviruses infect rat alveolar type I epithelial cells and induce expression of CXC chemokines. *Virology* **369**(2), 288-98.
- Müller MA, Raj VS, *et al.* (2012) Human Coronavirus EMC Does Not Require the SARS-Coronavirus Receptor and Maintains Broad Replicative Capability in Mammalian Cell Lines. *mBio* **3**(6).
- Munster VJ, de Wit E, Feldmann H (2013) Pneumonia from Human Coronavirus in a Macaque Model. *New England Journal of Medicine* **368**(16), 1560-1562.
- Pebody RG, Chand MA, *et al.* (2012) The United Kingdom public health response to an imported laboratory confirmed case of a novel coronavirus in September 2012. *Eurosurveillance* **17**(40).
- Peiris J, Chu C, *et al.* (2003) Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *The Lancet* **361**(9371), 1767-1772.
- Poutanen SM, Low DE, *et al.* (2003) Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *New England Journal of Medicine* **348**(20), 1995-2005.
- Rajkhowa S, Rajkhowa C, Hazarikai GC (2007) Serological evidence of coronavirus infection in mithuns (*Bos frontalis*) from India. *OIE Revue Scientifique et Technique* **26**(3), 747-753.
- Reusken CB, Lina PH, Pielaat A, de Vries A, Dam-Deisz C, Adema J, Drexler JF, Drosten C, Kooi EA (2010) Circulation of group 2 coronaviruses in a bat species common to urban areas in Western Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **10**(8), 785-791.
- van Boheemen S, de Graaf M, *et al.* (2012) Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *mBio* **3**(6).
- Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M, Van Ranst M (2006) Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine



hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. *J Virol* **80**(14), 7270-4.

Vijgen L, Moës E, Keyaerts E, Li S, Van Ranst M (2008) A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol* **454**, 3-12.

WHO (2004) WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome (SARS). World Health Organization.

WHO (2013) Case-control study to assess potential risk factor related to human illness caused by novel coronavirus. World Health Organization.

Wilson DE, Reeder DM (2005) 'Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (Vol I and II).' (Johns Hopkins University Press) 2142p

Woo PC, Lau SK, *et al.* (2006) Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology* **351**(1), 180-187.

Woo PC, Wang M, *et al.* (2007) Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *Journal of Virology* **81**(4), 1574-1585.

Wünschmann A, Frank R, Pomeroy K, Kapil S (2002) Enteric coronavirus infection in a juvenile dromedary (*Camelus dromedarius*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **14**(5), 441-444.

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2012) Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine* **367**(19), 1814-1820.

**ANNEXE(S)**

**Annexe 1**

**Tableau 3 : Résumé des différentes cultures cellulaires effectuées et leurs résultats**

Lignée cellulaire	Abréviation	Propagation	Equipe scientifique
<b>Cellules animales</b>			
Rein de macaque rhésus	LLC-MK2	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a) Müller <i>et al.</i> (2012) Zaki <i>et al.</i> (2012)
Rein de singe	MA104	Non	Müller <i>et al.</i> (2012)
Rein de singe vert africain	Vero	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a) Zaki, van Boheemen <i>et al.</i> (2012)
Rein de chien Madin-Darby	MDCK	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Rein de chat	CRFK	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Rein de porc	PK-15	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Rein de porc	PS	Oui	Müller <i>et al.</i> (2012)
Rein de lapin	RK-13	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Rein de <i>Rousettus aegyptiacus</i>	RoNi/7	Oui	Müller <i>et al.</i> (2012)
Rein de <i>Myotis daubentonii</i>	MyDauNi/2	Oui	Müller <i>et al.</i> (2012)
Fibroblastes pulmonaires de civette	CL-1	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Fibroblastes primaires d'embryon de souris	3T3	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Rein de rat ( <i>rattus norvegicus</i> )	RK3E	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
	RMC	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Fibroblaste de poulet	DF-1	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
<i>Aedes albopictus</i>	C6-36	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Nouvelle lignée cellulaire à partir de l'espèce <i>Carollia perspicillata</i>	CarNi/1	Oui	Müller <i>et al.</i> (2012)
<b>Cellules humaines</b>			
Cellules humaines de l'épithélium pulmonaire qui ressemblent morphologiquement et fonctionnellement aux cellules du	HAE	Oui mais extrêmement difficile d'avoir des déductions et de connaître les sites préférentiels	Kindler <i>et al.</i> (2013)

système respiratoire supérieur			
Carcinome épidermique laryngale	Hep-2	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Adénocarcinome pulmonaire	A549	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Adénocarcinome pulmonaire	Calu-3	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Fibroblaste pulmonaire embryonnaire	HFL	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Adénocarcinome colorectal	Caco-2	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Carcinome hépatocellulaire	Huh-7	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Carcinome cervical	HeLa	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Rein fœtaux	HEK	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Cellules rénales humaines cancéreuses	769-P	Oui	Müller <i>et al.</i> (2012)
Rhabdomyosarcome	RD	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Tératocarcinome neuronal	NT2	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Monocytes de sang périphérique, leucémie monocytique aiguë	THP-1	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Monocytes d'un lymphome histiocytaire	U937	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Lymphocytes B d'un lymphome de Burkitt	Raji	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Lymphocytes T d'une leucémie des cellules T	H9	Non	Chan <i>et al.</i> (2013a)
Histiocytome malin	His-1	Oui	Chan <i>et al.</i> (2013a)

Annexe 2

Tableau 4 : Pourcentage d'homologie de la protéine dipeptidyl-peptidase IV de différentes espèces animales en comparaison avec la séquence humaine. Classement par pourcentage décroissant

Espèces animales	% d'homologie	Espèces animales	% d'homologie
<i>Pan troglodytes</i>	99 %	<i>Mus musculus</i>	84 %
<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	99 %	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	82 %
<i>Nomascus leucogenys</i>	99 %	<i>Myotis davidii</i>	81 %
<i>Pongo abelii</i>	99 %	<i>Heterocephalus glaber</i>	80 %
<i>Macaca mulatta</i>	98 %	<i>Sarcophilus harrisii</i>	74 %
<i>Macaca fascicularis</i>	98 %	<i>Monodelphis domestica</i>	73 %
<i>Callithrix jacchus</i>	96 %	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	72 %
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	96 %	<i>Columba livia</i>	66 %
<i>Otolemur garnettii</i>	93 %	<i>Bos grunniens mutus</i>	65 %
<i>Ceratotherium simum simum</i>	90 %	<i>Gallus gallus</i>	64 %
<i>Equus caballus</i>	90 %	<i>Taeniopygia guttata</i>	64 %
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	90 %	<i>Anolis carolinensis</i>	63 %
<i>Trichechus manatus latirostris</i>	90 %	<i>Gloydus breviceaudus</i>	62 %
<i>Orcinus orca</i>	89 %	<i>Pseudechis australis</i>	62 %
<i>Bos taurus</i>	89 %	<i>Pseudechis porphyriacus</i>	62 %
<i>Canis lupus familiaris</i>	89 %	<i>Cryptophis nigrescens</i>	62 %
<i>Ovis aries</i>	88 %	<i>Tropidechis carinatus</i>	62 %
<i>Sus scrofa</i>	88 %	<i>Pseudonaja textilis</i>	62 %
<i>Felis catus</i>	88 %	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	62 %
<i>Cavia porcellus</i>	88 %	<i>Hoplocephalus stephensii</i>	62 %
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	88 %	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	62 %
<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	88 %	<i>Notechis scutatus</i>	61 %
<i>Mustela putorius furo</i>	87 %	<i>Demansia vestigiata</i>	61 %
<i>Dasypus novemcinctus</i>	87 %	<i>Xenopus laevis</i>	59 %
<i>Rattus norvegicus</i>	85 %	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	58 %
<i>Cricetulus griseus</i>	85 %		

## Annexe 3 :

*Chiroptères de la péninsule arabe, François Moutou (Anses Maisons-Alfort-Laboratoire de santé animale)*

La référence historique pour les mammifères, et donc les chiroptères, de la péninsule arabe est *The Mammals of Arabia* de Harrison and Bates (1991). La zone géographique couverte comprend les pays et territoires suivants : Iraq, Syrie, Liban, Jordanie, Israël, Palestine, la péninsule du Sinaï, Koweït, Arabie Saoudite, Qatar, Émirats arabes unis, Oman, Yémen et les quelques îles situées au large des côtes de ces pays.

Dans cet ouvrage, 46 espèces sont mentionnées, réparties en 8 familles, Ptéropodidés (2 espèces), Emballonuridés (3 espèces), Rhinopomatidés (3 espèces), Molossidés (5 espèces), Vespertilionidés (23 espèces), Nyctéridés (1 espèce), Rhinolophidés (6 espèces) et Hipposidéridés (3 espèces). Toutes sont insectivores sauf les deux roussettes (Ptéropodidés), qui sont frugivores. Certaines de ces espèces sont plutôt marginales à la péninsule, d'autres y sont nettement mieux réparties. Ces espèces sont souvent associées à des gîtes en milieu rocheux et adaptées à des terrains de chasse dégagés (steppe, désert). La présence de points d'eau est importante. Les cartographies disponibles montrent néanmoins une répartition plutôt limitée à la périphérie de la péninsule, avec un évitement apparent de la grande zone centrale, le « quartier vide ». Cela peut correspondre également en partie à un biais dans l'échantillonnage.

Une étude plus récente trouvée sur Internet et consacrée aux seuls chiroptères d'Arabie Saoudite (Al-Agaili 2003) en recense 38 espèces, à savoir : Ptéropodidés (3 espèces), Emballonuridés (3 espèces), Rhinopomatidés (3 espèces), Molossidés (5 espèces), Vespertilionidés (14 espèces), Nyctéridés (1 espèce), Rhinolophidés (4 espèces) et Hipposidéridés (5 espèces).

Un ouvrage de synthèse comme *Mammal Species of the World* de Wilson and Reeder (2005), dans le chapitre consacré aux chiroptères, met à jour la systématique complexe de l'ordre mais les taxons ne sont pas triés par pays et le recensement des espèces citées dans un moins un des pays de la péninsule serait un peu fastidieux.

Ceci dit, au vu des données actuelles connues concernant l'écologie de ces espèces, parfois présentes bien au-delà de cette région, parfois volontiers anthropophiles, il paraît délicat de chercher une explication à l'émergence d'un coronavirus pathogène pour l'espèce humaine à partir de ces seules informations. D'après les données disponibles, toutes les espèces connues de chiroptères présents sur la péninsule ne semblent pas avoir été testées vis à vis des coronavirus. Le contexte de chaque contamination humaine serait à revoir le plus exhaustivement possible. La notion de « réservoir » est peut-être à distinguer de celle de « vecteur », le « cheval de Troie » à partir duquel le virus a pu passer d'une espèce à une autre, comme semble avoir été le cas pour l'épisode du SRAS. Dans ce dernier cas, la civette palmiste masquée (*Paguma larvata*) avait peut-être joué ce rôle.