



CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

La science au service des hommes



Hôpitaux de Lyon

Université Claude Bernard



Lyon 1

Etonnants virus influenza!

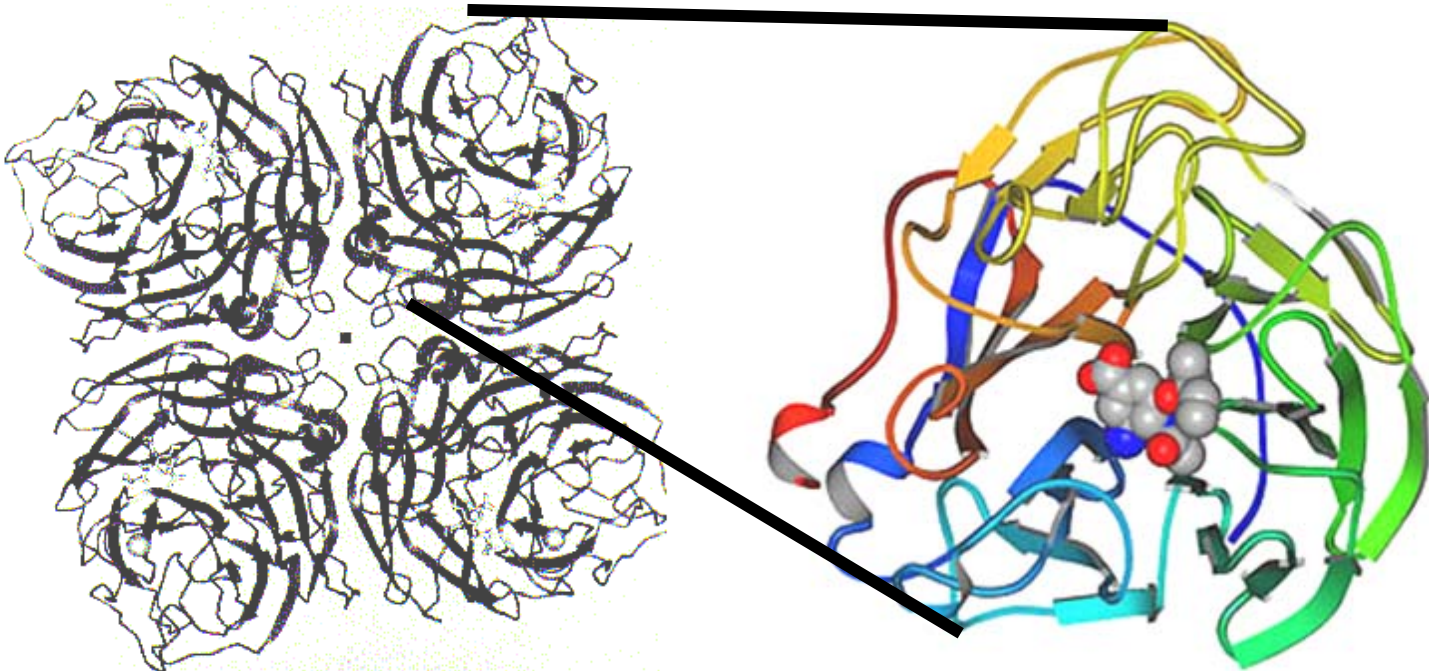
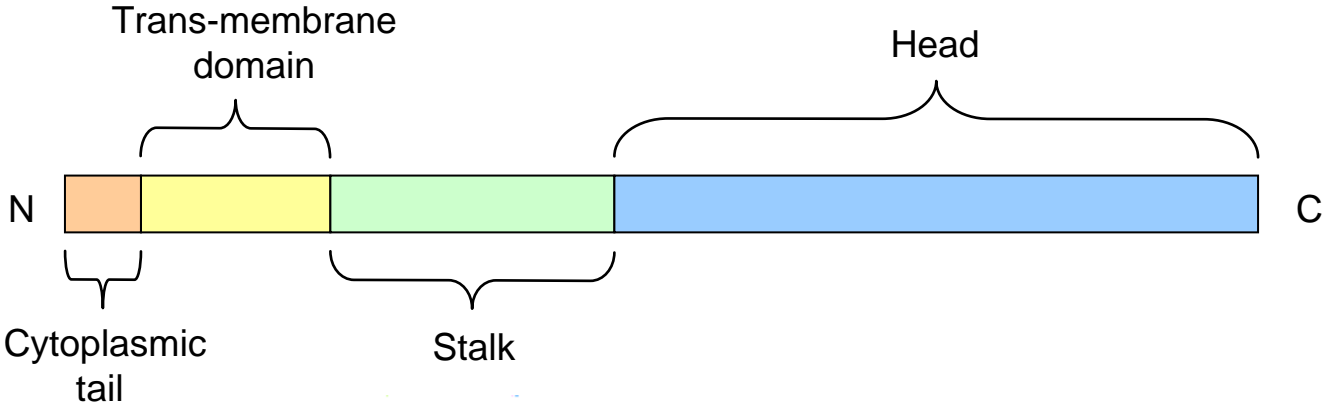
Bruno LINA

CNR des virus influenza, région sud

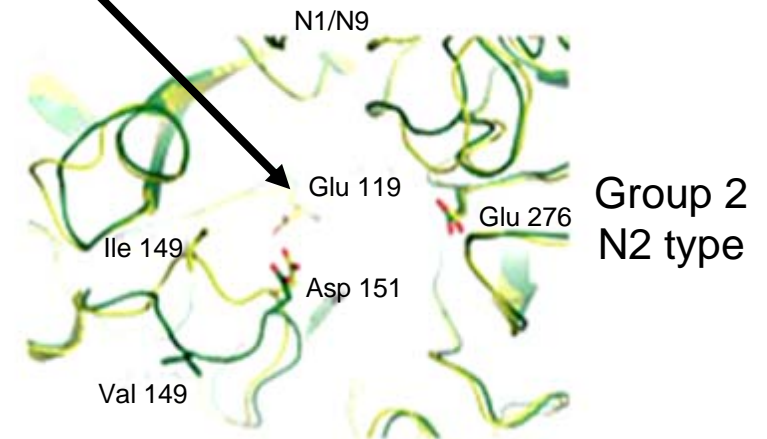
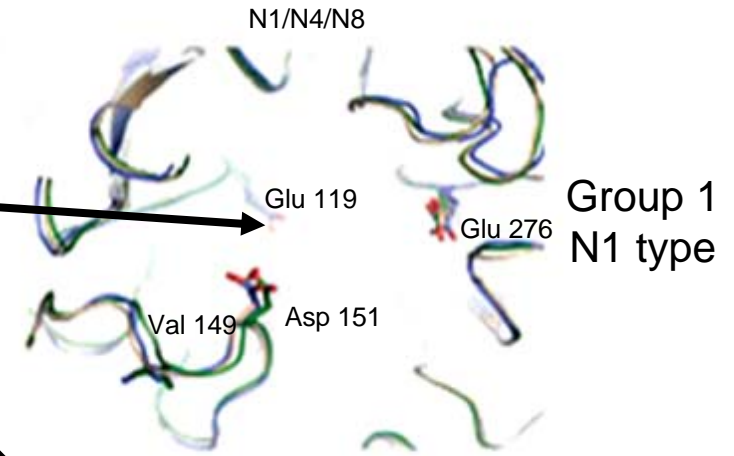
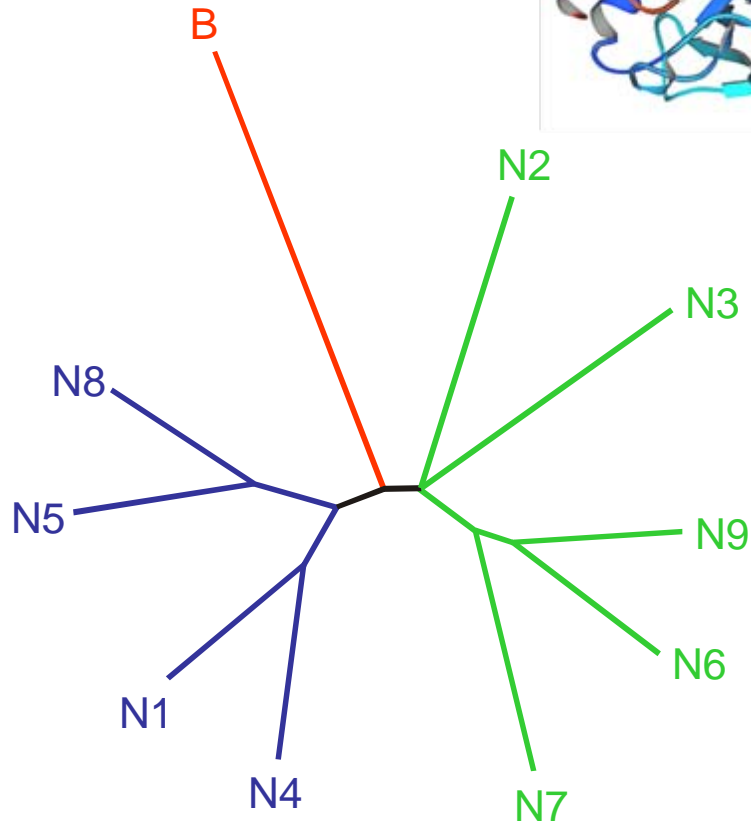
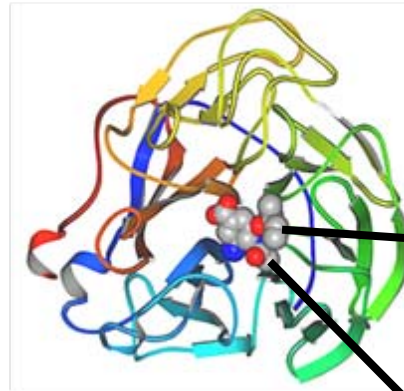
Laboratoire de virologie EST, GHE, HCL

FRE 3011 CNRS – UCBL, Lyon

Influenza neuraminidase



Variations dans la poche catalytique



Resistance chez influenza A

**R152K –
Catalytic mutation**

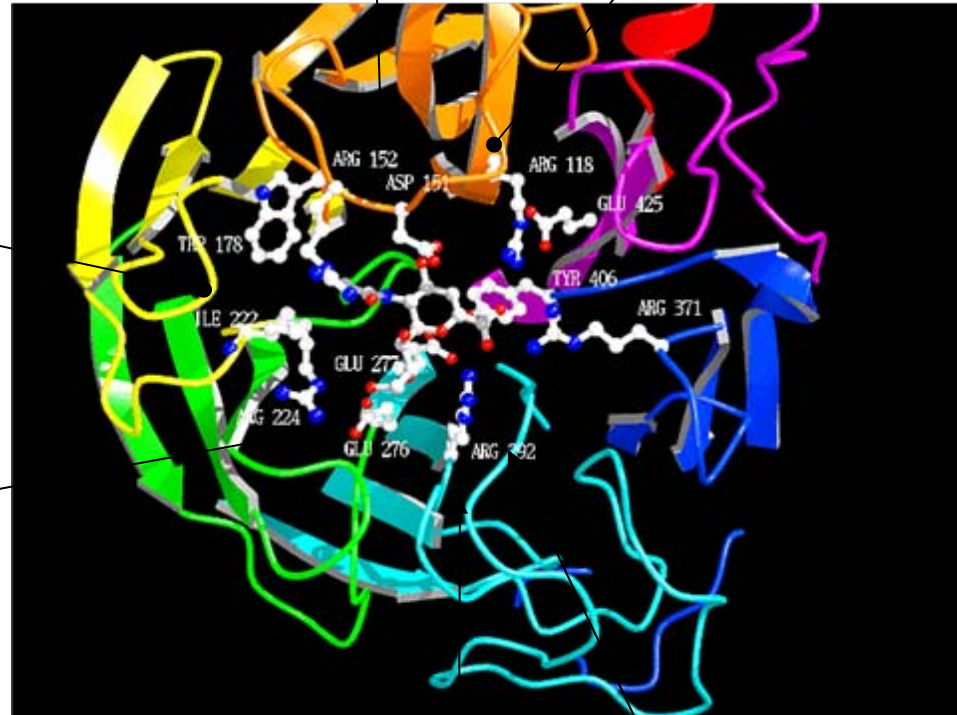
**E119V –
Framework mutation**

**D198N –
Framework
mutation**

**H274Y –
Framework
mutation**

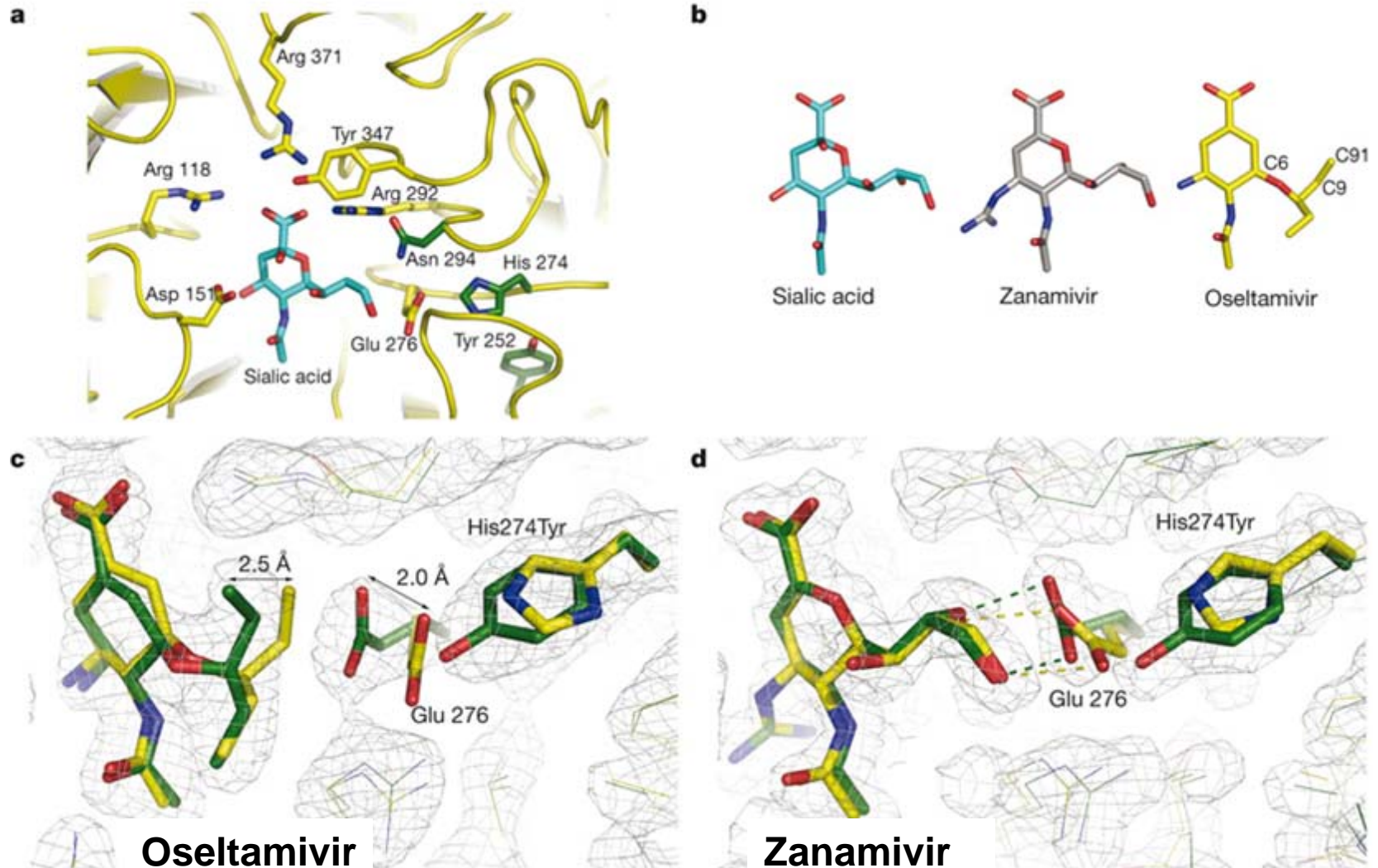
**Asn294Ser –
Framework mutation?**

**R292K –
Catalytic mutation**



Analyse structurale : Impact de la mutation H275Y / N1 A(H1N1)

Ex : Mutation H275Y sur N1 de A(H5N1)



(Attention : numérotation dans N2!)

(Collins et al., Nature 2008)

Données de la surveillance avant 2007

- Faible prévalence de la résistance
 - Homogène au niveau planétaire (0,4%)
 - Des différences de valeur d' IC_{50} sont observées en fonction des sous-types
 - Prévalence plus élevée chez l'enfant (jusqu' a 4% en moyenne)
- Identification de virus « outliers »
 - IC_{50} comprises entre 10 and 50nM chez les virus de type A
 - Pas de signatures génétique associées a ces IC_{50} élevées (nécessite un test phenotypique pour être détecté)
- Les virus résistants ont une vitalité (fitness) réduite

R152K –
Catalytic mutation

E119V –
Framework mutation

D198N –
Framework
mutation

H274Y –
Framework
mutation

Asn294Ser –
Framework mutation?

R292K –
Catalytic mutation



Activité NA et IC₅₀ pour oseltamivir carboxylate et zanamivir des virus A(H1N1), A(H3N2) et B isolés durant l'hiver 2007/2008

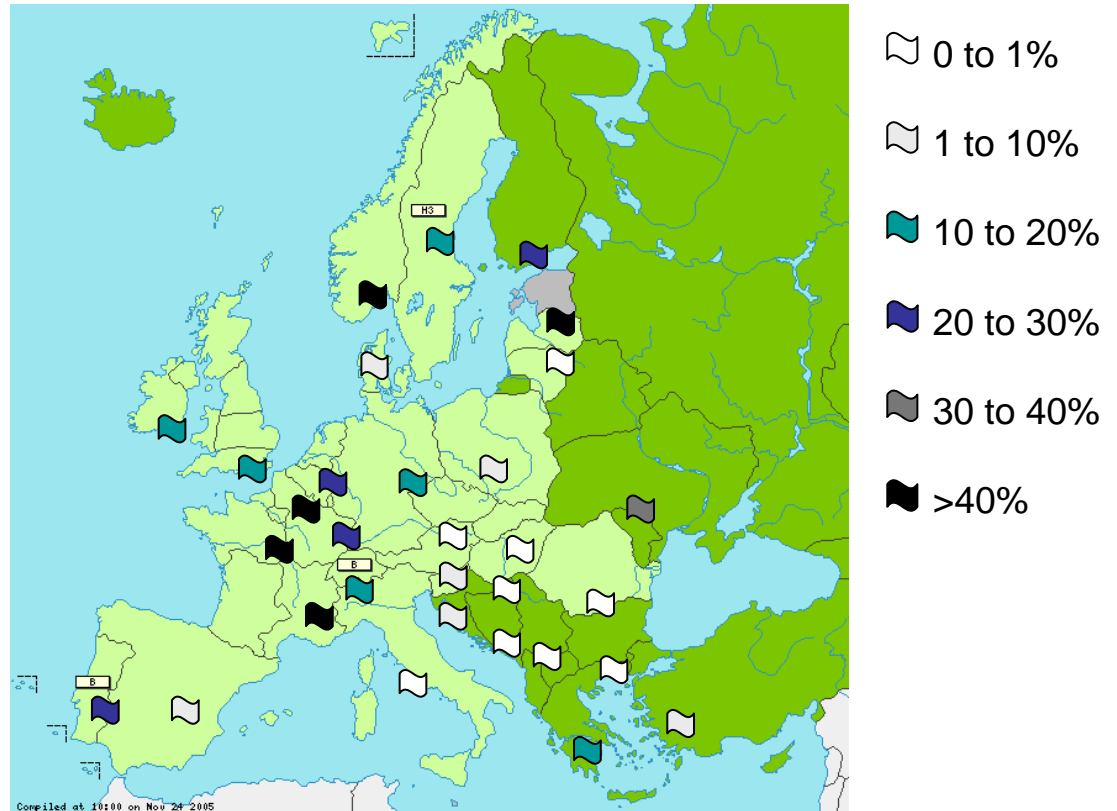
Influenza Virus Subtype	N	IC50 (nM)					
		NA activity (RFU*)		Oseltamivir carboxylate		Zanamivir	
		Mean ± SD	Max	Mean ± SD	Max	Mean ± SD	Max
A/H1N1 sensitive to OC	232	107 ± 91	804	1.36 ± 0.70	4.27	1.54 ± 0.71	5.14
A/H1N1 resistant to OC	142	141 ± 83	489	564.43 ± 357.08	2730.52	1.36 ± 1.16	11.89
A/H3N2	11	300 ± 143	635	0.40 ± 0.13	0.69	1.10 ± 0.64	2.36
B	50	288 ± 141	728	13.84 ± 3.18	22.95	10.79 ± 4.98	24.29

RFU : Relative Fluorescence Unit

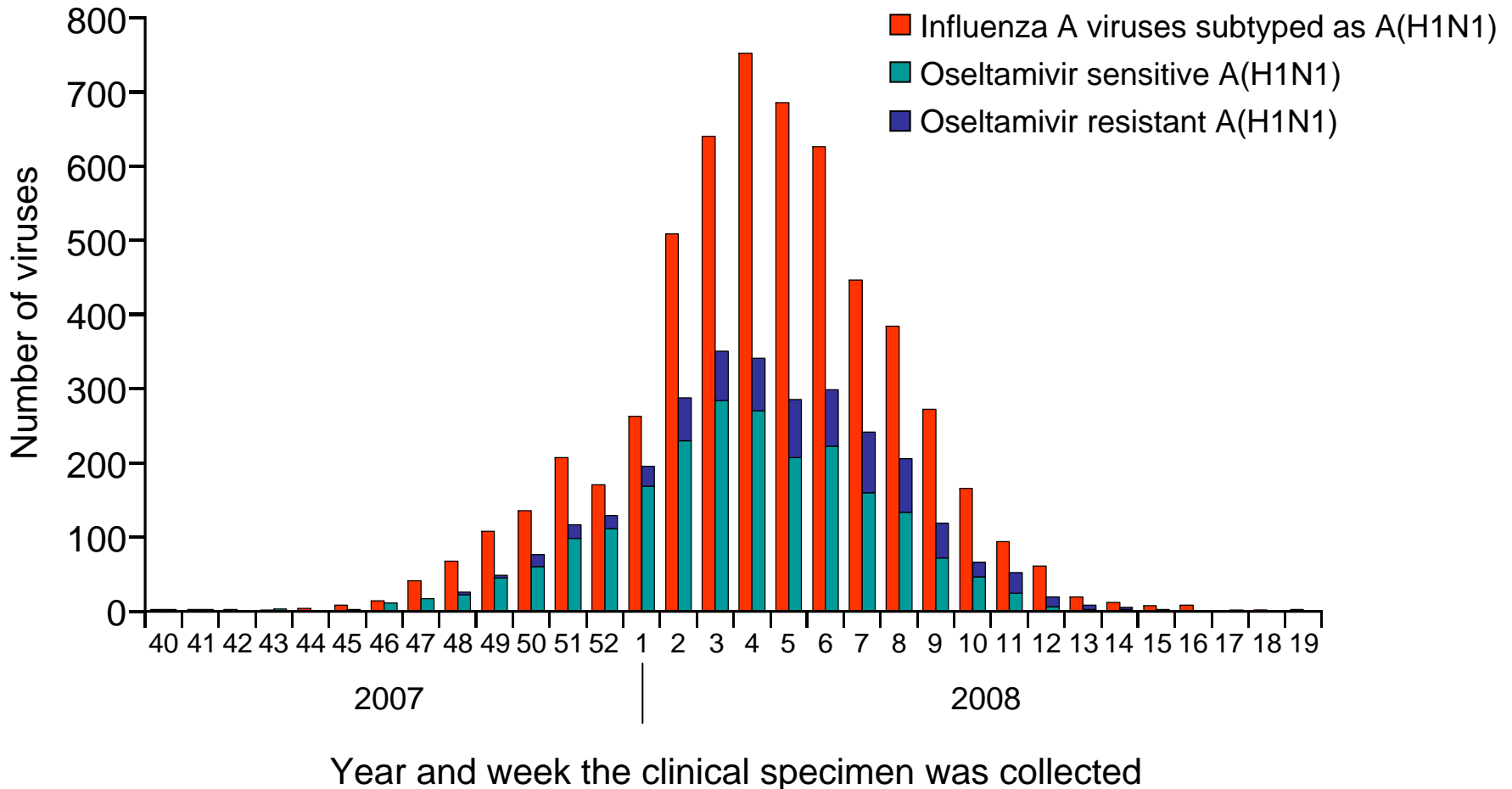
N : number of isolates tested

Pourcentage de virus A(H1N1) avec la mutation H274Y en Europe en 2007-2008

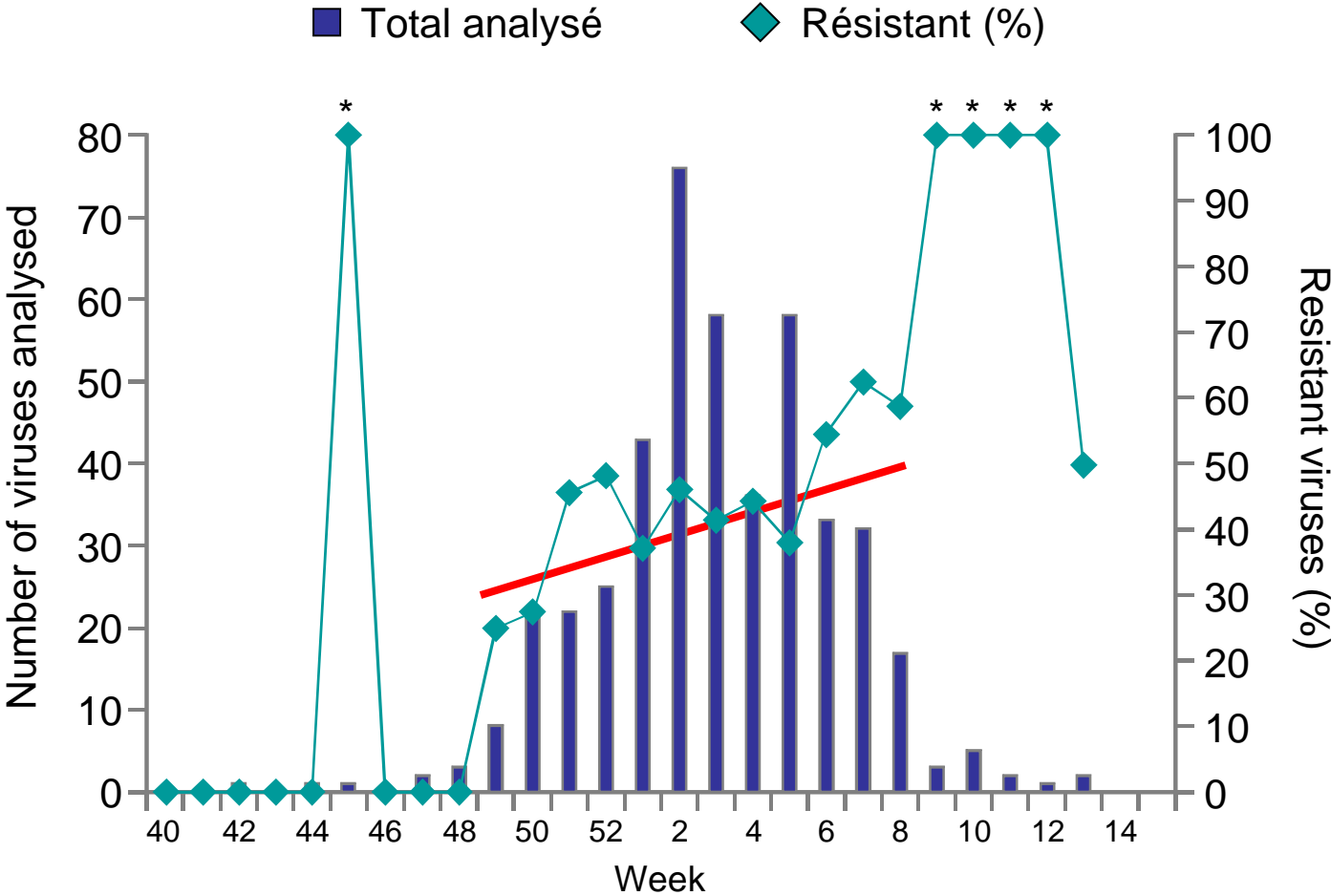
- C'est en Europe que les fréquences étaient les plus élevées
- Forte hétérogénéité
- Pas de lien avec l'utilisation des antiviraux
- Pas d'impact clinique
- Pas de lien avec la densité de population



Trend of A(H1N1) viruses in Europe

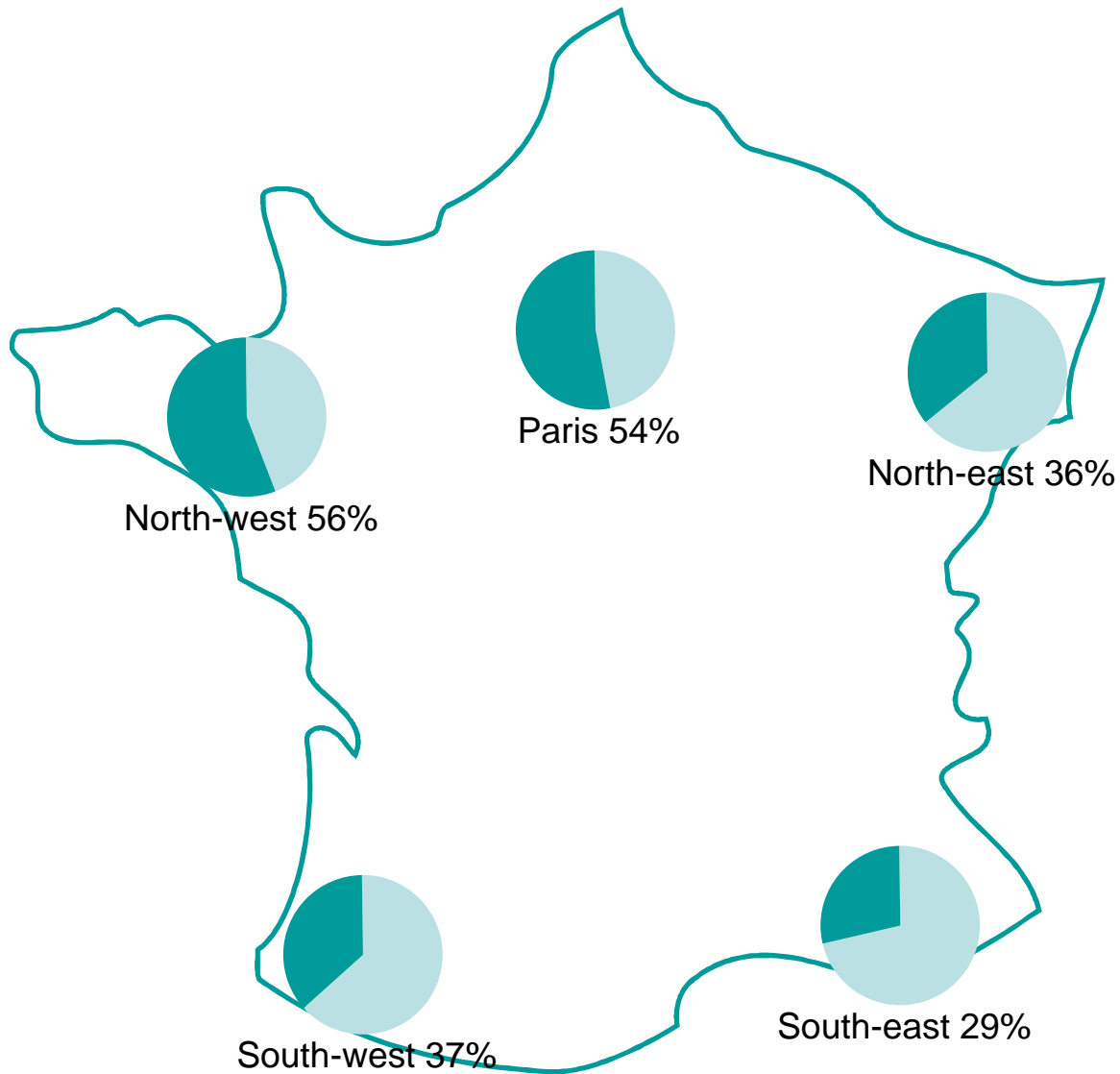


Dynamique en France



*Only one isolate

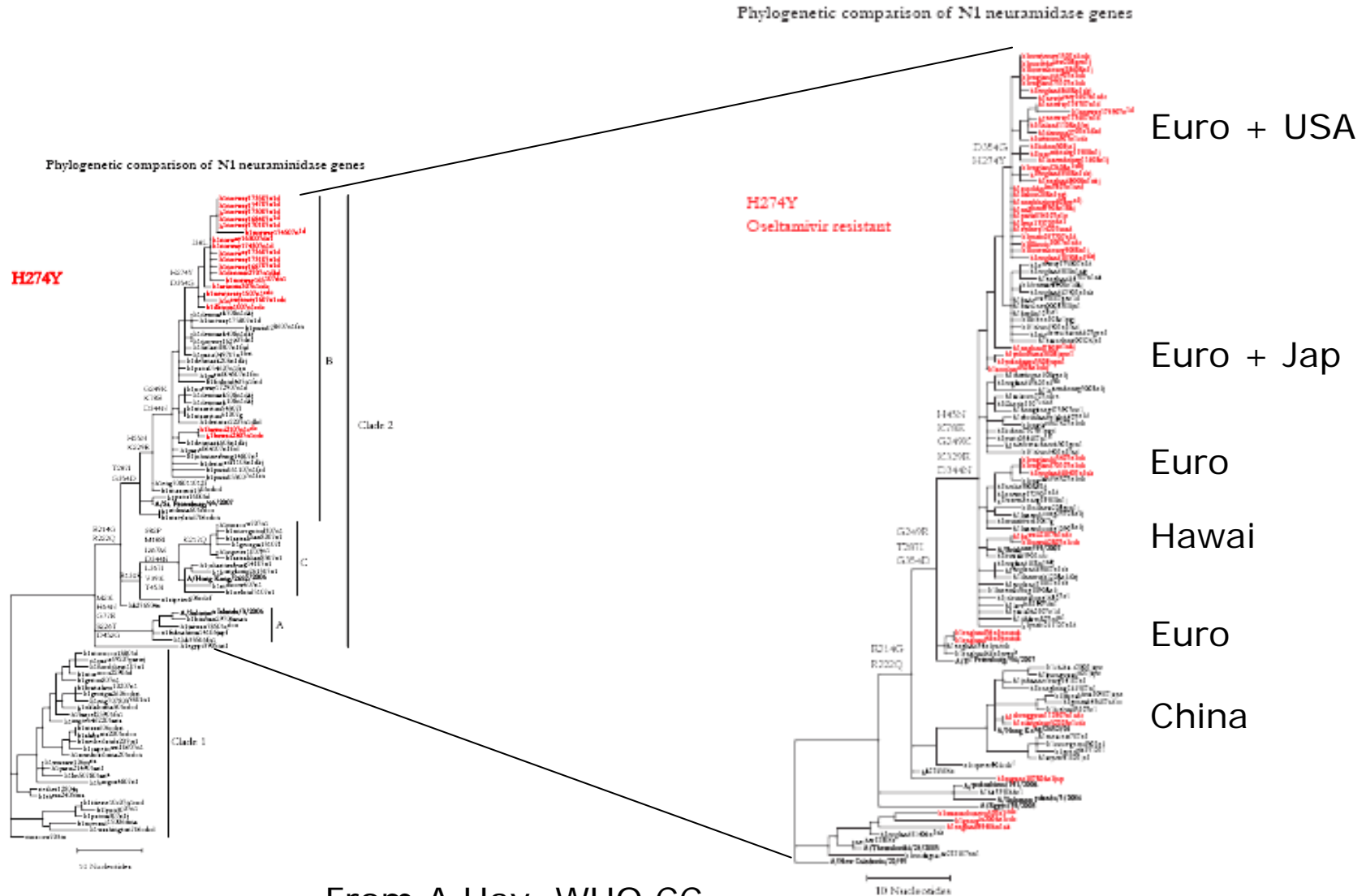
Distribution Régionale en France



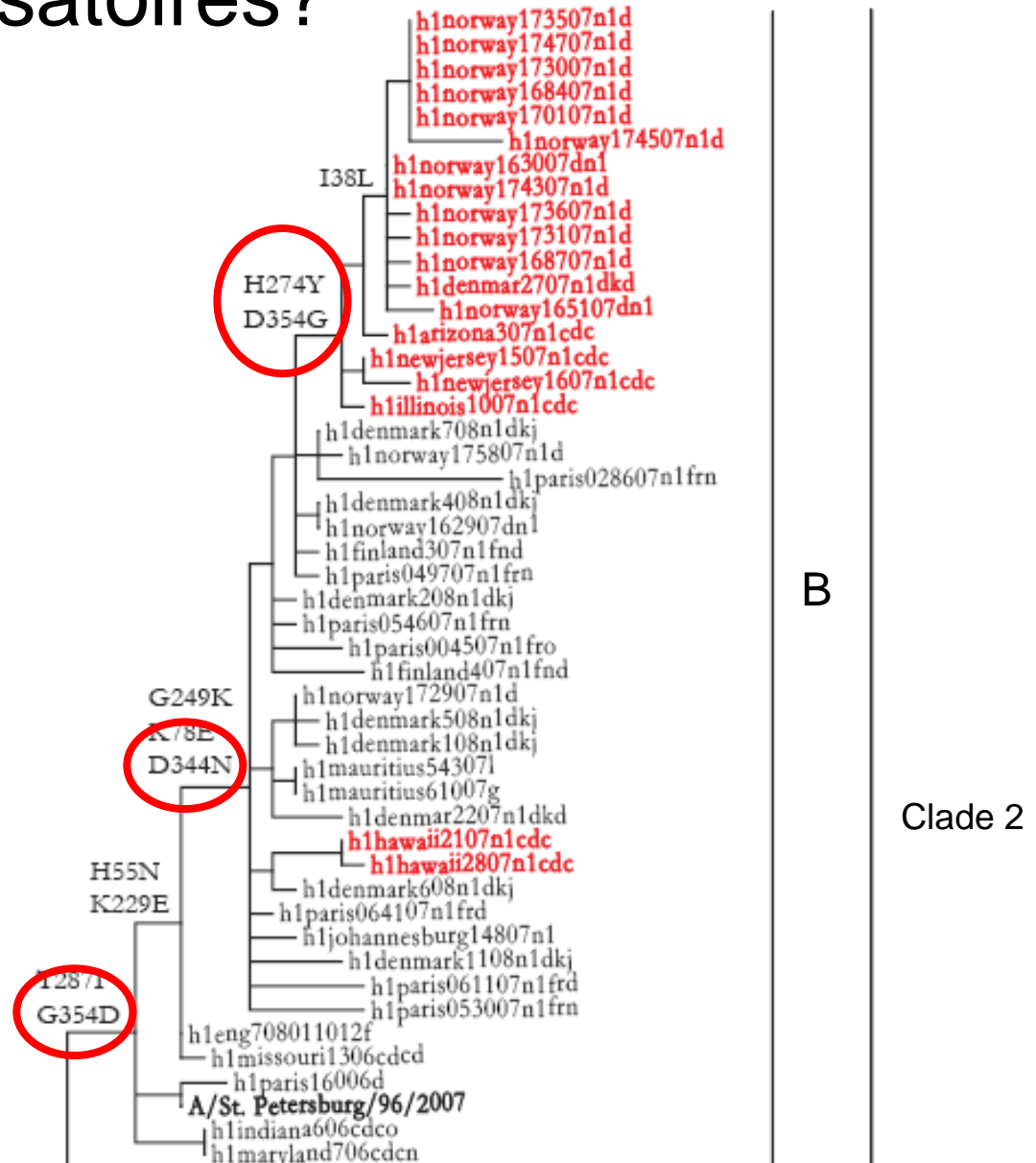
Caractérisation moléculaire des glycoprotéines de surface

- Excellentes vitalité et transmissibilité des virus H274Y
- Présence probable de mutations compensatoires sur NA ou HA
- De l'hétérogénéité a été observée (emergence polyclonale), mais parmi les clones, le clone Européen a diffusé sur toute la planète
- Les raisons de cette emergence ne sont pas encore comprises

Phylogénie des neuraminidases des virus récents



Mutations compensatoires?

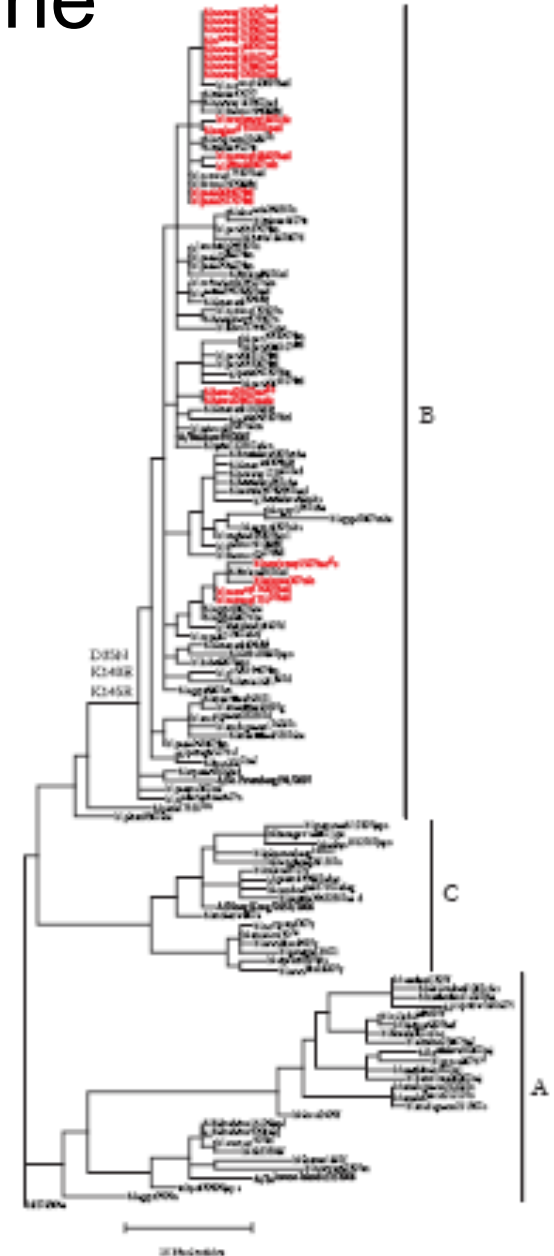


Phylogénie de l'hémagglutinine

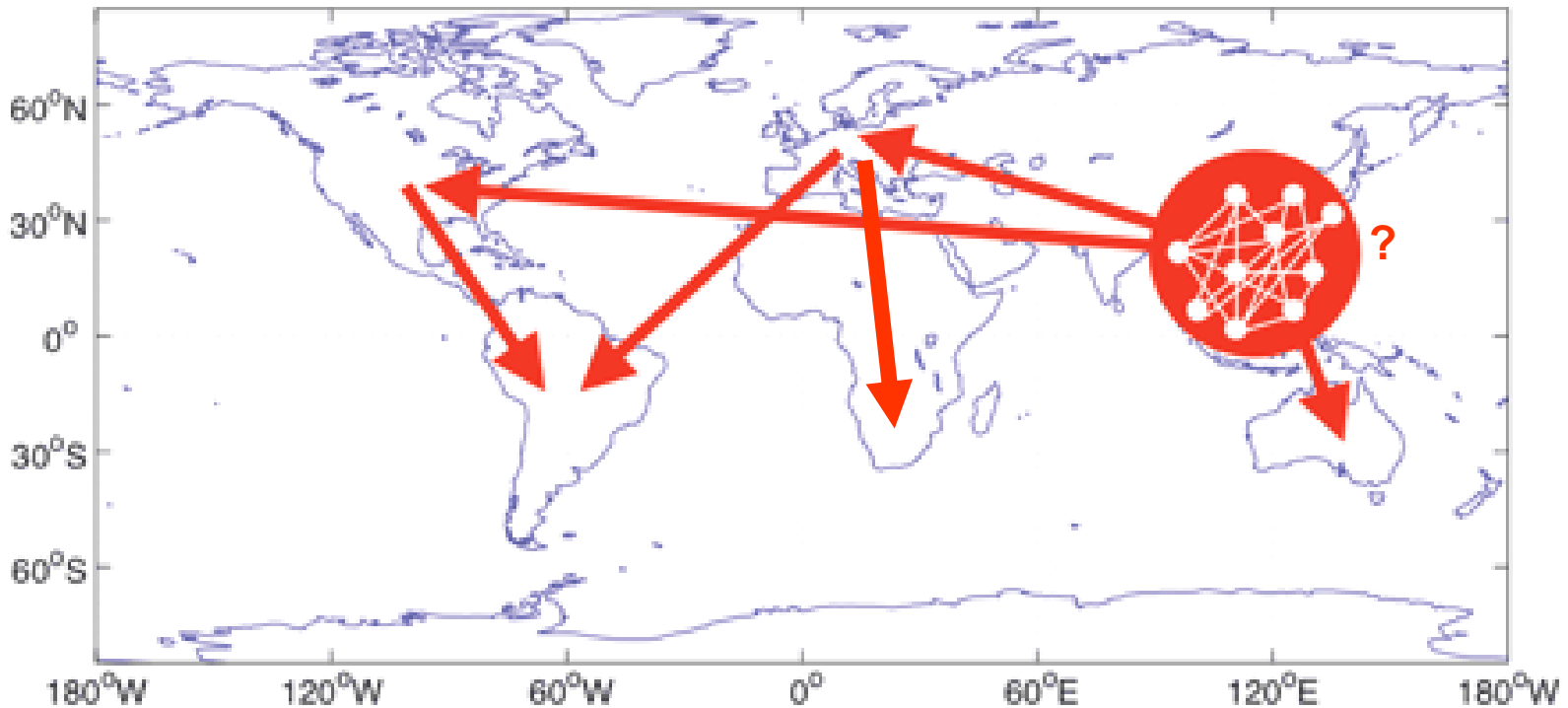
H1 pas de clonalité sur HA a l'intérieur du Groupe B

Pas de résistants dans les sous clades A and C

H274Y



Emergence et circulation des Influenza A/bribane-like (H1N1) H274Y



Adapted from Russell CA et al, Science, 2008

Influenza isolate strain characterisation: 2008/9 season. (Reported to EISS/ECDC)*

* Identical numbers for whole of Europe.

Europe EU/EEA, week 21/2009
Cumulative influenza virus isolate strain characterisations*
[Total N = 3397]

Antigenic and/or genetic characterisations - [N = 3397]



- A(H1) A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like [162,139,31]
- A(H3) A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like [2281,1791,541]
- B/Florida/4/2006-like (B/Yamagata/16/88 lineage) [30,22,12]
- B/Malaysia/2506/2004-like (B/Victoria/2/87 lineage) [919,832]
- A(H1) A/California/4/2009 swA(H1N1)-like [5,0,5]

Antigenic characterisations - [N = 2788]



A 72%
H1 6.6%
H3 93.4%
B 18%
Yam 3.2%
Vic 96.8%

Genetic characterisations - [N = 675]



Color code pie chart, strain name
[no# antigenic and/or genetic, no# antigenic, no# genetic]

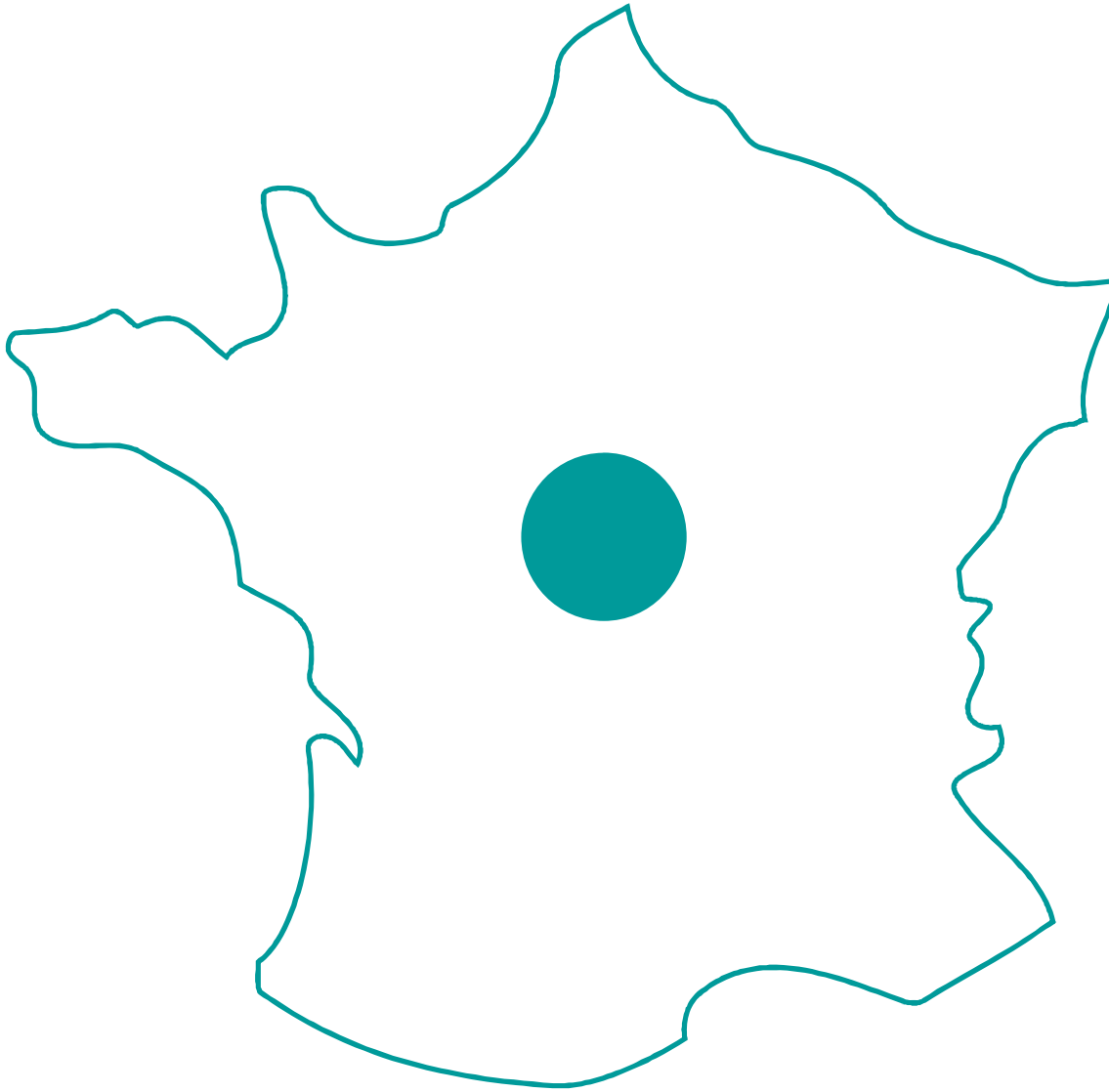
* Sentinel and non-sentinel respiratory specimens combined
Characterisations are based on the hemagglutinin protein (antigenic) or hemagglutinin gene (genetic).
Influenza A virus isolates of which the neuraminidase is not subtyped are presented as A(H1) and A(H3).

Table 1. Human influenza isolates, October 2008 - February 2009

Country	H1N1	H3N2	B	
	A/Bris 59/07		Yamagata lineage	Victoria lineage
October				
Argentina	1	1		
Cameroon	1		3	
France		5		
Germany		1	1	2
Ghana	1		4	
Hong Kong	1	2	1	
Madagascar	2	2		
Norway		1		
Spain			2	1
Sweden		4		
UK	3			1
November				
Algeria		1		
Cameroon	9		6	
Belgium		1		1
Denmark		2		
Egypt		6		
France	2	10	1	
Germany		2	1	
Ghana			7	
Hong Kong	2	1		
Italy		6	1	
Madagascar		2		
Mauritius		1		
Norway	1	4	1	
Portugal		1		
Romania		1		
Singapore	1			1
Spain				4
Sweden	1	2		
Switzerland		1		
UK	1			1
December				
Algeria		8		
Belgium		22		1
Cameroon	4		1	
Finland		6		
France	9	10		
Germany	4	13		5
Ghana			3	
Israel	5	3		
Italy		16		
Korea	9	1		
Latvia		4		
Luxembourg	1	4		
Morocco	6			3
Norway	4	11		
Portugal	4	12		
Singapore	1			
Slovakia		1		
Spain		34		
Sweden	2	5		
Switzerland		10	1	
UK	1	12		2
January 2009				
Belgium		50	1	1
Czech Republic	3	12		
Egypt			1	
Germany		2		
Greece		8		3
Iran	2			
Israel	4	8		3
Italy	5	14		
Latvia		2		
Morocco	15	7		
Norway		2		
Portugal	2	1		
Romania		9		
Slovakia	1	6		1
Slovenia		3		
Spain		11		
Switzerland		9	1	1
Tunisia		2		
February 2009				
Czech Republic	1			2
Total = 554	109	375	36	33
	20%	68%	69 (12%)	

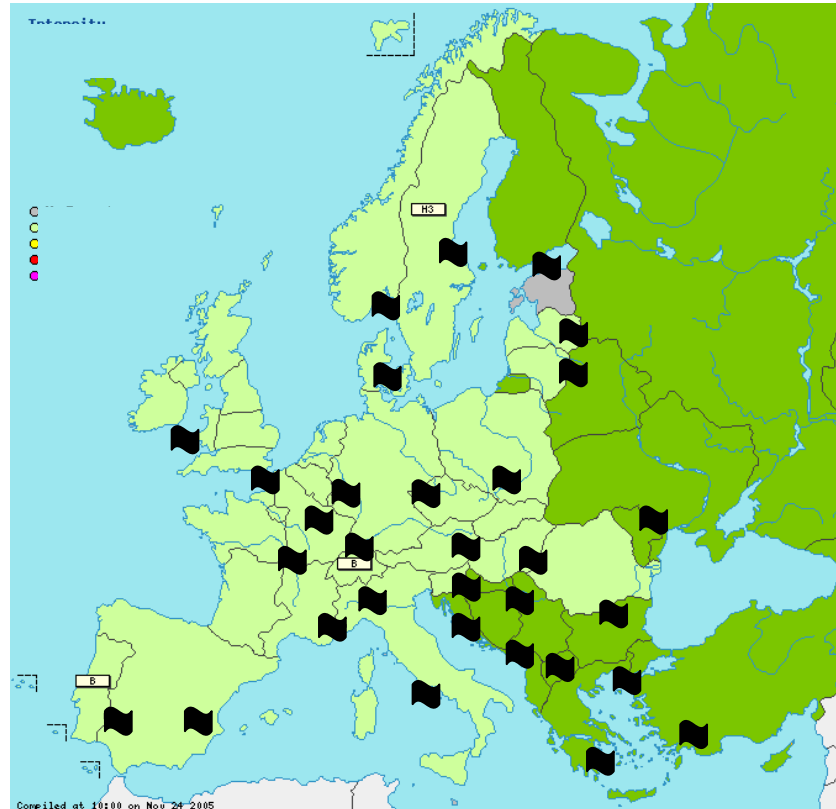
oseltamivir resistant

Distribution Régionale en France



Pourcentage de virus A(H1N1) avec la mutation H274Y en Europe en 2008-2009

- Situation identique dans tout l'hémisphère Nord
- Pas de lien avec l'utilisation des antiviraux
- Pas d'impact clinique



100%

Figure 2. Phylogenetic comparison of influenza H1N1 HA genes

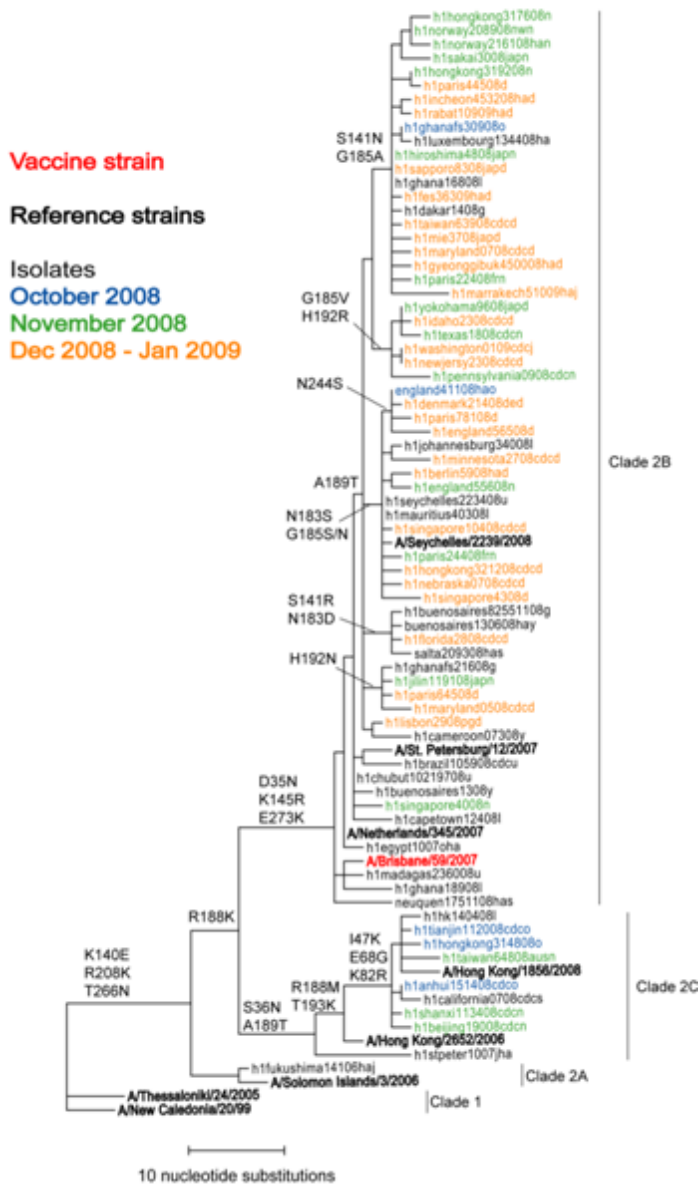
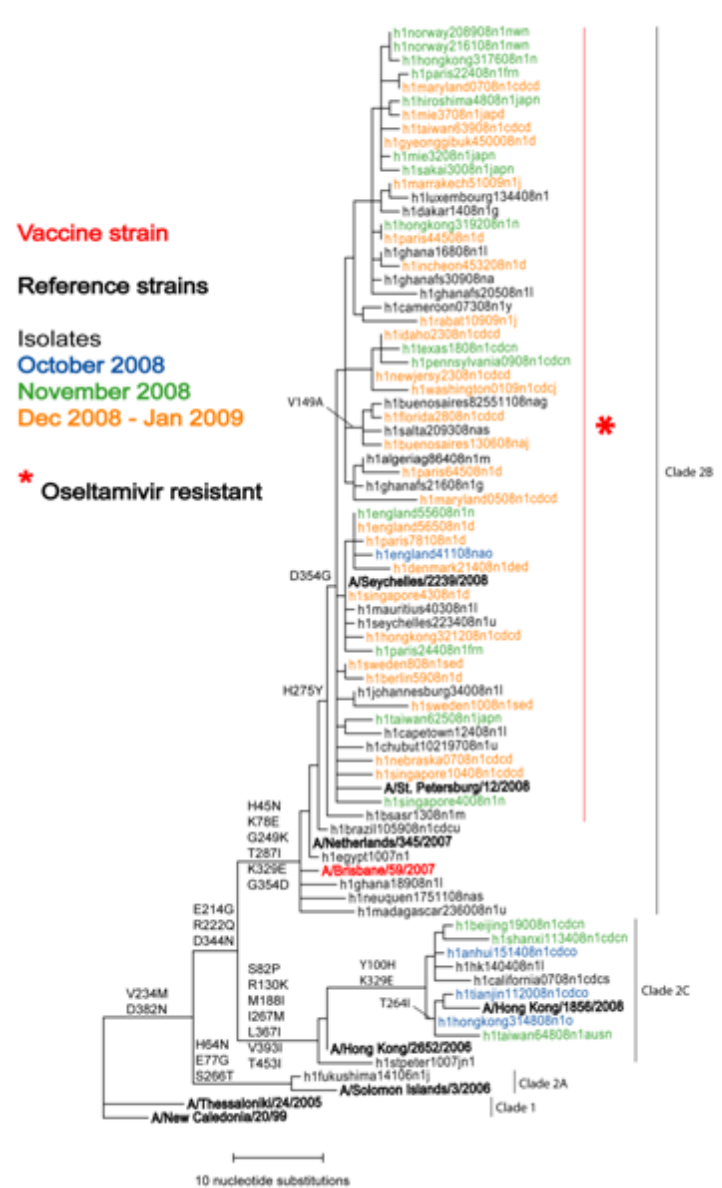


Figure 3. Phylogenetic comparison of H1N1 neuraminidase genes



Modifications des acides aminés des principaux lignages de A(H1N1)

Clade	Representative strain	Amino acid changes ¹	
		HA	NA ²
2B	A/Seychelles/2239/2008 (A/Brisbane/59/2007)	D35N K145R R188K E273K A 189T (S141N + G185A)* (N183S + G185S/N)* (S141R + N183D)* (G185V + H192R)* (H192N)* (N244S)*	H45N K78E G249K T287I K329E H275Y (V149A)
2C	A/Hong Kong/1856/2008	S36N I47K E68G K82R R188M A 189T T193K	S82P Y100H R130K M188I I267M K329E L367I V393I T453I (T264I)

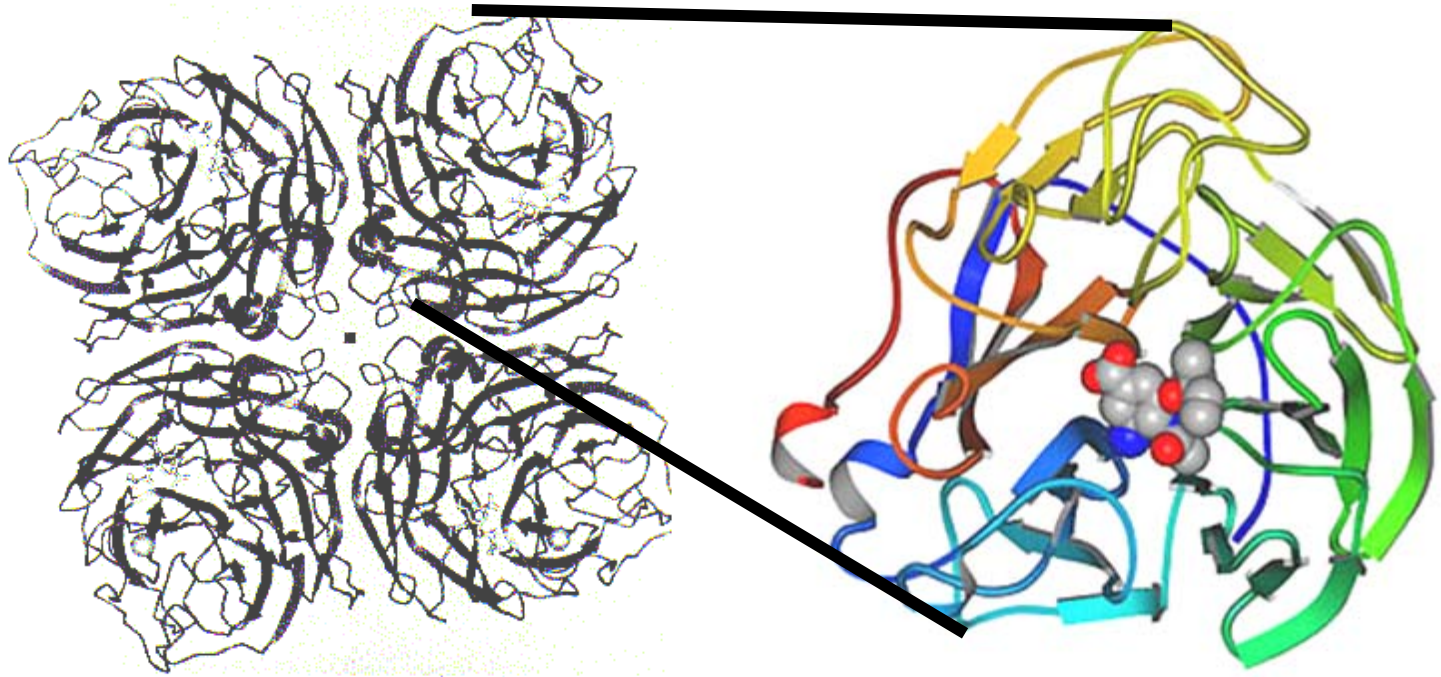
1. Relative to A/Solomon Islands/3/2006

2. E214G, R222Q and D344N are common to both 2B and 2C

* recent subgroups

Hypothèses pour l'émergence

Influenza neuraminidase

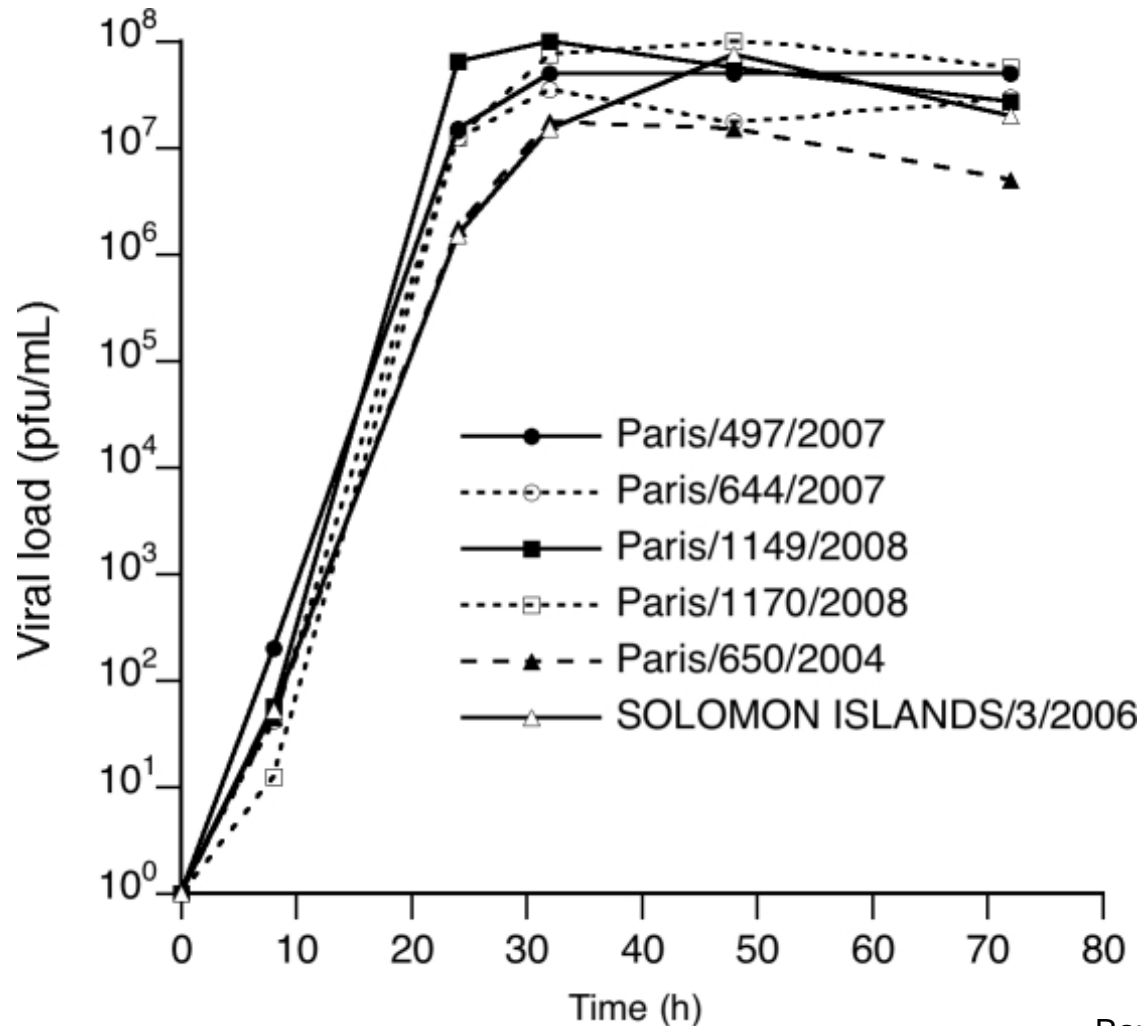


Propriété enzymatique de la neuraminidase et sensibilité aux INA des souches A(H1N1) depuis 1977

Souches de référence	Km moyen (μM)	VmR (RFU/sec)	Oseltamivir CI50(nM)	Zanamivir CI50(nM)	Titre hémagglutinant
<i>A/URSS/90/1977</i>	49.80	46.90	0.57	0.18	256
<i>A/Brazil/11/1978</i>	52.70	32.25	0.68	0.21	256
<i>A/Chile/1/1983</i>	39.80	6.63	0.32	0.73	256
<i>A/Singapore/6/1986</i>	46.20	28.87	1.96	0.82	256
<i>A/Beijing/262/1995</i>	45.40	21.30	0.97	0.46	64
<i>A/Johannesburg/82/1996</i>	37.40	21.80	0.97	0.39	64
<i>A/New Caledonia/20/1999</i>	44.70	22.20	0.58	0.52	128
<i>A/Solomon Islands/3/2006</i>	43.40	21.20	0.57	0.18	128
<i>A/Brisbane/59/2007</i>	21.57	59.45	0.31	0.71	256

Souches vaccinales et isolats	Sensibilité à l'oseltamivir	Souches vaccinales apparentées	Km (moy ± ET) (µM)	V max relatif (moy ±ET) (RFU/s)
Souches Vaccinales A(H1N1) depuis 1977	Sensibles		44,93 ± 4,95	25,00 ± 11,54
Saison 2005/2006	Sensibles	NC99	47,00 ± 6,38	24,54 ± 7,68
Saison 2005/2006	Résistants	NC99	89,30	29,50
Saison 2007/2008	Sensibles	Bris07	22,60 ± 4,7	51,68 ± 22,30
Saison 2007/2008	Résistants	Bris07	32,97 ± 7	55 ± 22,80
Saison 2008/2009	Résistants	Bris07	38,92 ± 9,17	53,46 ± 18,44

Taux de réplication comparatif des souches R et S (in vitro)



Conclusions

- Meilleur fitness et transmissibilités des souches H274Y par rapport aux souches sensibles
- Les mutations compensatoires restent à identifier
- Il existait une hétérogénéité moléculaire pour l'émergence, la diffusion a sélectionné le lignage européen
- Le mécanisme d'émergence n'a pas été la pression de sélection des INA, mais le meilleur fitness du virus résistant
- Risque pour les virus A H1N1v émergents

REMERCIEMENTS

- Olivier Ferraris FRE 3011 CNRS UCBL
- Maude Bouscambert & CNR Lyon
- Vanessa Escuret
- Martine Valette

- Sylvie Van der Werf CNR, Institut Pasteur, Paris
- Vincent Enouf

- Jean-Marie Cohen GROG
- Anne Mosnier

- Isabelle Bonmarin InVS
- Sophie Vaux

- Maria Zambon VIRGIL et CNRL
- Virgil network

- Olaf Hungnes NIC, Norway

- Alan Hay WHO CC (UK)
- Lin Yi Pu

- Adam Meijer EISS
- Koos Van der Veulden

- Angus Nicoll ECDC

