

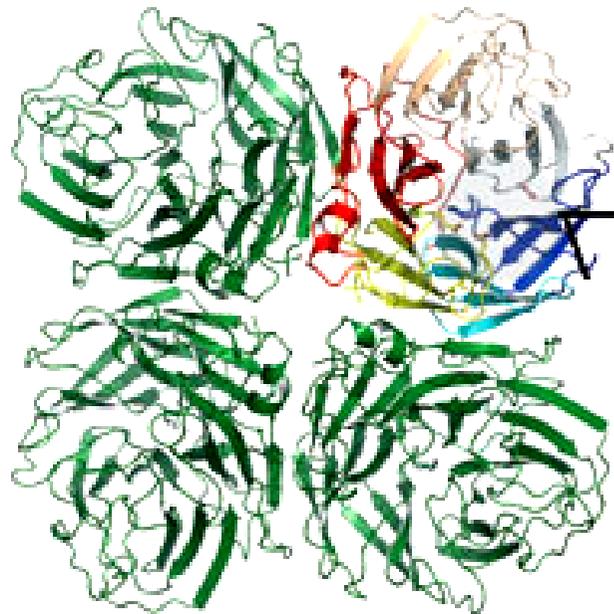
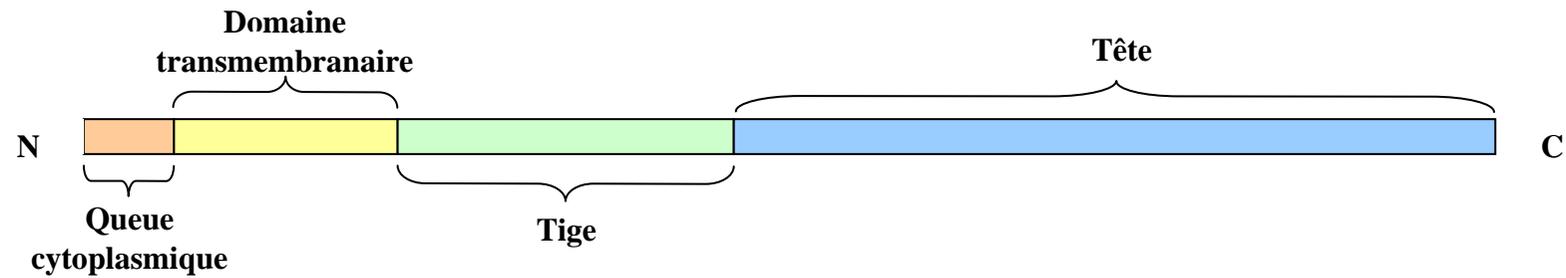
Emergence de la grippe A H1N1 résistant à l'oseltamivir en Europe

Vanessa Escuret, Murielle Sabatier, Martine Valette,
Olivier Ferraris, Bruno Lina

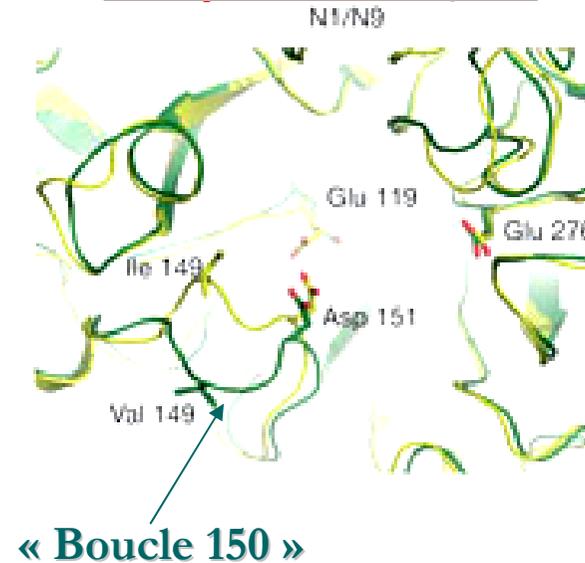
*VirGil, European Vigilance Network for the management of antiviral drug resistance
Centre National de Référence des virus influenza, France Sud
CNRS FRE 3011 - Université Claude Bernard Lyon I
Laboratoire de Virologie Est des Hospices Civils de Lyon*



Neuraminidase des virus influenza A



Comparaison N1/N9



Groupe 1
type N1, N4,
N5, N8

Groupe 2
type N2, N3,
N6, N7, N9

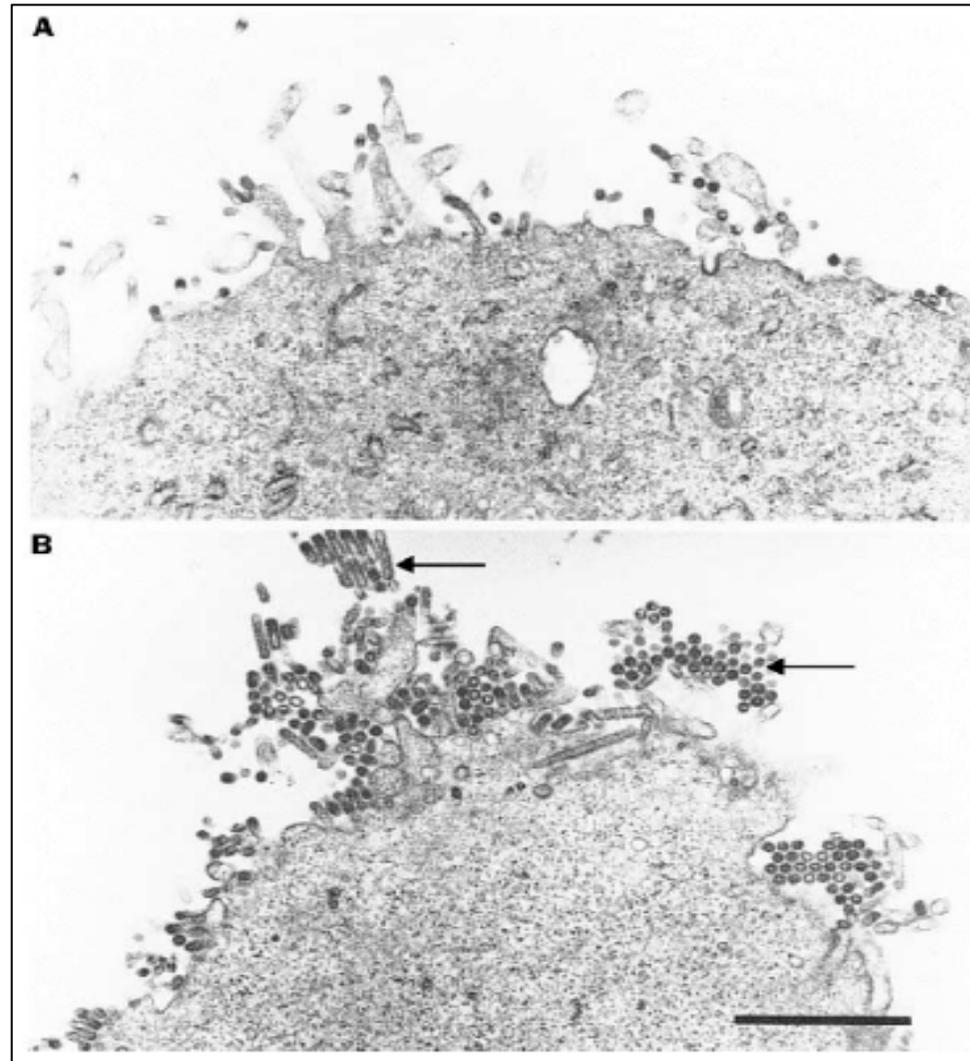
➤ libération des virions néoformés après bourgeonnement (fonction sialidase)

Action antivirale des Inhibiteurs de la Neuraminidase

Activité
neuraminidase

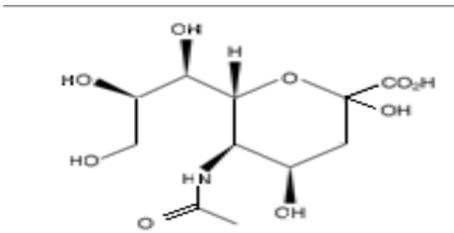
En présence
d'inhibiteurs de la
neuraminidase:

➤ Pas de libération
des virions
nouvellement
formés



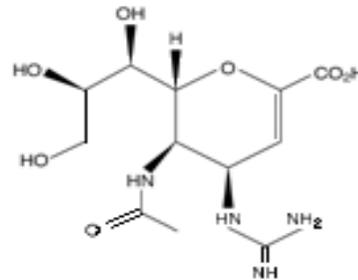
Cellules MDCK infectées par du virus Influenza A en
microscopie électronique (*Gubareva et al., Lancet 2000*)

Inhibiteurs de la Neuraminidase (INAs)



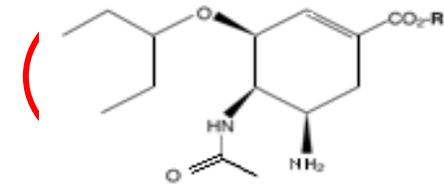
Ac N neuraminique

Acide N acétylneuraminique
=
Acide Sialique



Zanamivir

Zanamivir
(Relenza®)
Inhalation (2 x 5mg)
2x /j pendant 5 j



GS 4104 : RCH₂CH₃
GS 4071 : R = H

Oseltamivir

Oseltamivir
(Tamiflu®)
orale (prodrogue)
75 mg 2x /j pendant 5 j

- ✓ Analogues de l'acide sialique: bloquent le site actif de la NA
- ✓ Conservation de site actif de la NA : actifs sur les virus Influenza A et B
- ✓ Actifs seulement si administrés précocément, au plus tard 48 h après le début des signes cliniques

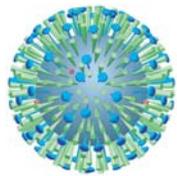
Jusqu'à présent faible taux de résistance aux INAs

- **Résultats de la surveillance systématique :**
 - **Aucune** souche résistante détectée avant l'utilisation des INAs (1996-1999) (*McKimm-Breschkin et al., AAC 2003*)
 - **0,35%** de résistance après 3 ans d'utilisation des INAs (1999-2002) (*Monto et al., AAC 2006*)
- **Etudes chez des patients traités :** % + élevé de souches résistantes (sélectionnées par le traitement antiviral)
 - patients immunocompétents
 - **Adultes** : **1 to 2 %** de R (*Gubareva et al., JID 2001*)
 - **Enfants** :
 - **5 %** de R (*Whitley et al., Pediatr Infect Dis J 2001*)
 - **16% to 18%** de R, technique de clonage (*Kiso et al., Lancet 2004; Ward et al., J Antimicrob Chemother 2005*)
 - **Patients immunodéprimés** : **3 cas d'apparition de R** (*Ison et al., JID 2006*)
 - **Infections à H5N1:** apparition de mutants résistants sous traitement (2/8) (*De Jong NEJM 2005*)

Sensibilité aux INAs : analyse **phénotypique** et **génotypique**

➤ Test fluorimétrique de l'activité neuraminidase

❖ Activité neuraminidase



1 H – 37°C

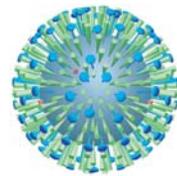
MUN
2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid

4-methylumbelliféronne

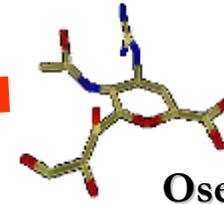
Ex : 355nm

Em : 460 nm

❖ Inhibition de l'activité neuraminidase



15 min – 37°C



Oseltamivir

ou

Zanamivir

administrés à

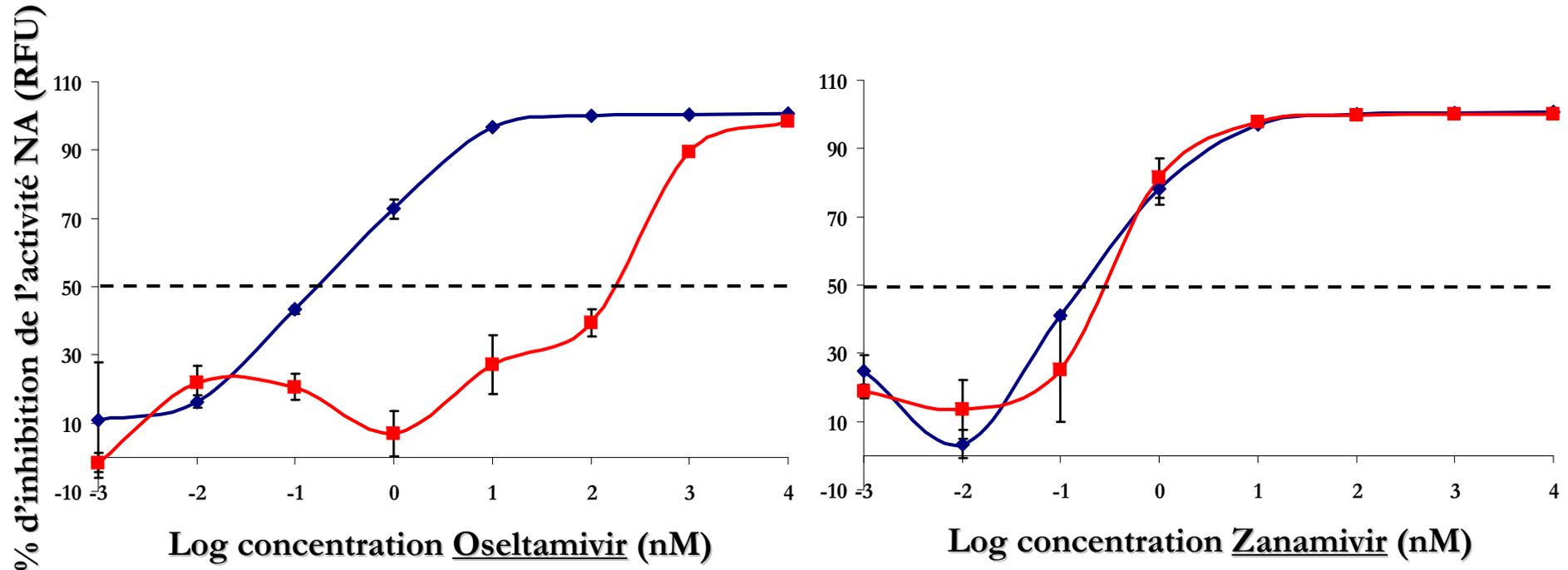
≠ concentrations

0,001 à 10000 ng/ml

➤ IC_{50} obtenue en duplicata pour chaque souche

➤ Séquençage des gènes de la neuraminidase et de l'hémagglutinine

Exemples de résultats des tests de sensibilité



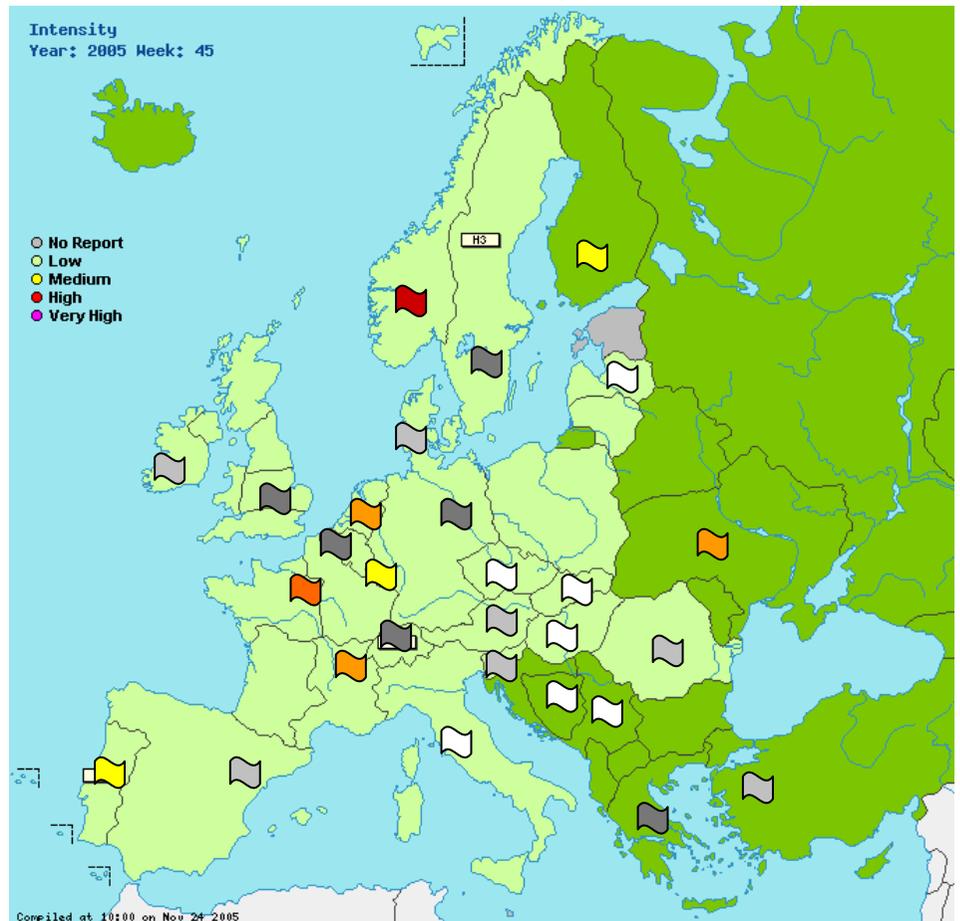
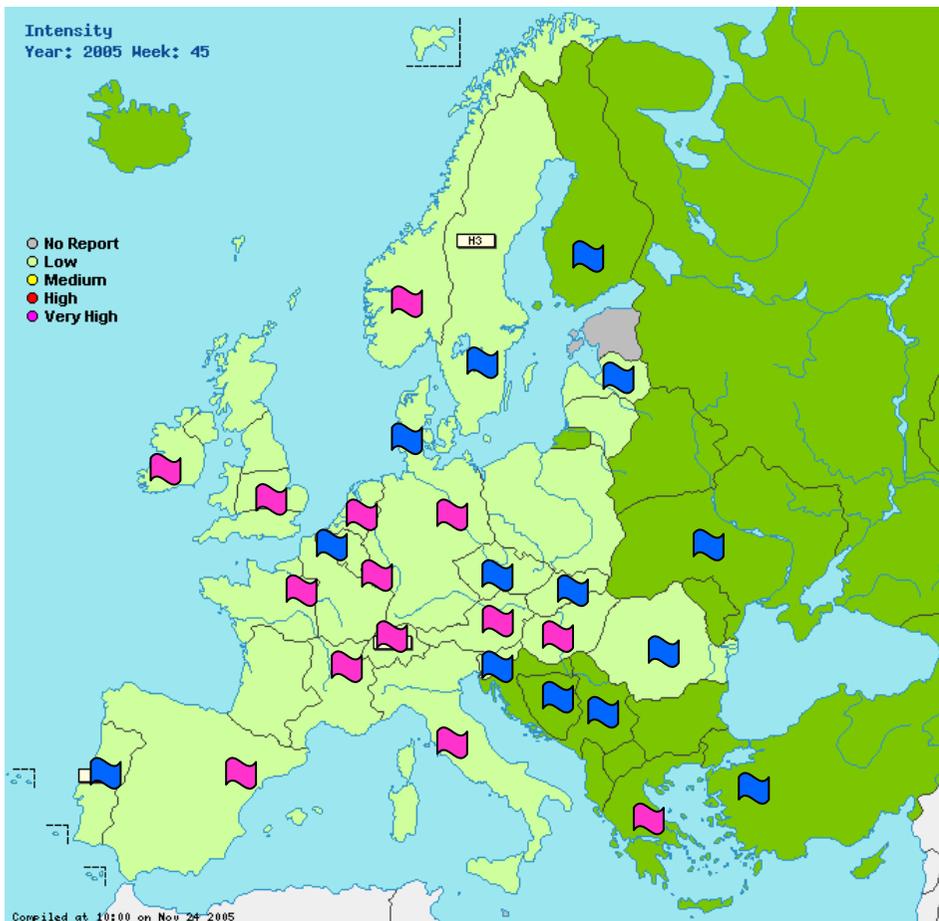
	Oseltamivir	Zanamivir
IC ₅₀ (nM)	Moyenne ± Ecart type	Moyenne ± Ecart type
A/Lyon/249/08 (H1N1) <u>274H</u>	0,82 ± 0,30	0,86 ± 0,14
A/Toulouse/601/08 (H1N1) <u>274Y</u>	663,85 ± 4,41	1,83 ± 0,20

➤ Les virus 274Y résistants à l'oseltamivir demeurent sensibles au zanamivir

Surveillance de la sensibilité de la grippe aux INAs en 2008 (Virgil – EISS)

-  5 à 49 souches testées
-  > 50 souches testées

-  0 to 1%
-  20 to 30%
-  > 50%
-  1 to 10%
-  30 to 40%
-  40 to 50%
-  10 to 20%



Pas de différence dans l'expression clinique des souches A(H1N1) sensibles ou résistantes à l'oseltamivir

Signes cliniques rapportés sur les formulaires remplis par les médecins du GROG

Nbre de patients Virus A(H1N1)	247 sensibles	204 résistants
Age moyen	19 ans	21 ans
Min / Max	0 - 81 ans	0 - 70 ans
Sex ratio H/F	1,2	1,1
Début brutal	88 %	87 %
Fièvre	100 %	99,5 %
Température moyenne	39,3°C	39,3°C
Asthénie	77 %	76 %
Myalgie	69 %	71 %
Mal de tête	66 %	73 %
Frissons	65 %	73 %
Toux	87 %	92 %
Rhinite	81 %	85 %
Pharyngite	65 %	73 %
Symptômes abdominaux	24 %	22 %
Bronchite	8 %	7 %
Otite moyenne	9 %	8 %

Mécanismes de l'émergence de cette résistance (1)

- **Emergence soudaine d'une proportion importante de souches de grippe A(H1N1) résistantes à l'oseltamivir, sensibles au zanamivir, mutées H274Y**
- Pour se lier à l'oseltamivir ou au peramivir (gpt hydrophobe en 6') : modification du site actif de N1 par création d'une poche hydrophobe en générant un lien interne entre E (Glu) 276 et R (Arg) 224
 - **remplacement de H (His) par Y (Tyr) plus large en 274**
 - ✓ **pourrait empêcher la réorientation de Glu en 276, donc empêcher la formation de la poche hydrophobe et la liaison à l'oseltamivir (*Ives et al., Antiviral Res 2002*)**
 - ✓ **n'empêche pas la liaison à l'acide sialique ou au zanamivir**

Mécanismes de l'émergence de cette résistance (2)

- Pas de pression de sélection directe due à l'usage préalable d'antiviraux
 - Taux de résistance élevé en Europe seulement
 - Pas ou très faible résistance au Japon (alors que INAs plus utilisés au Japon qu'en Europe)
- Apparition des souches résistantes concomitante de celle d'un nouveau variant apparenté à la souche vaccinale A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1):
 - De 1999 à 2006 : circulation de variants apparentés à A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)
 - dont les mutants A(H1N1) 274Y avaient des capacités de multiplication et de transmissibilité réduites *in vitro* et *in vivo* (*Ives et al., Antiviral Res 2002; Herlocher et al., JID 2004*)
 - Sélection d'un variant résistant avec de meilleures capacités de multiplication ?
 - Mutations compensatoires dans NA et/ou HA ?

Conclusions

- Les **réseaux** ont été capables de collecter des données virologiques et cliniques
- **Augmentation soudaine de moins de 1% à plus de 64% de virus A(H1N1) résistant à l'oseltamivir : stabilité de la mutation 274Y**
- **Pas de différence entre les souches 274H et 274Y dans**
 - la capacité de multiplication in vitro,
 - la présentation clinique et la sévérité,
 - la transmissibilité
- La **surveillance** de la sensibilité des virus grippaux aux antiviraux doit continuer
- La recherche de **nouvelles stratégies antivirales** contre la grippe est importante

Remerciements

- Olivier Ferraris
- Murielle Sabatier
- Maude Bouscambert
- Martine Valette

**FRE 3011 CNRS UCBL
& CNR Grippe France Sud, Lyon**



- Sylvie Van der Werf
- Vincent Enouf

**CNR Grippe France
Nord, Institut Pasteur, Paris**

- Jean-Marie Cohen
- Anne Mosnier
- Réseau Grog

GROG



Open Rome
Organize and Present Epidemiological Networks
Réseau d'Observation des Maladies et des Epidémies

- Isabelle Bonmarin
- Sophie Vaux

InVS



- Maria Zambon
- Olaf Hungnes
- Virgil network

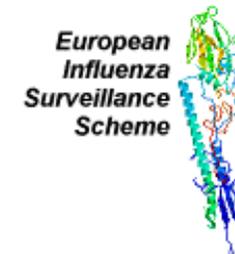
Virgil

- Alan Hay
- Lin Yi Pu

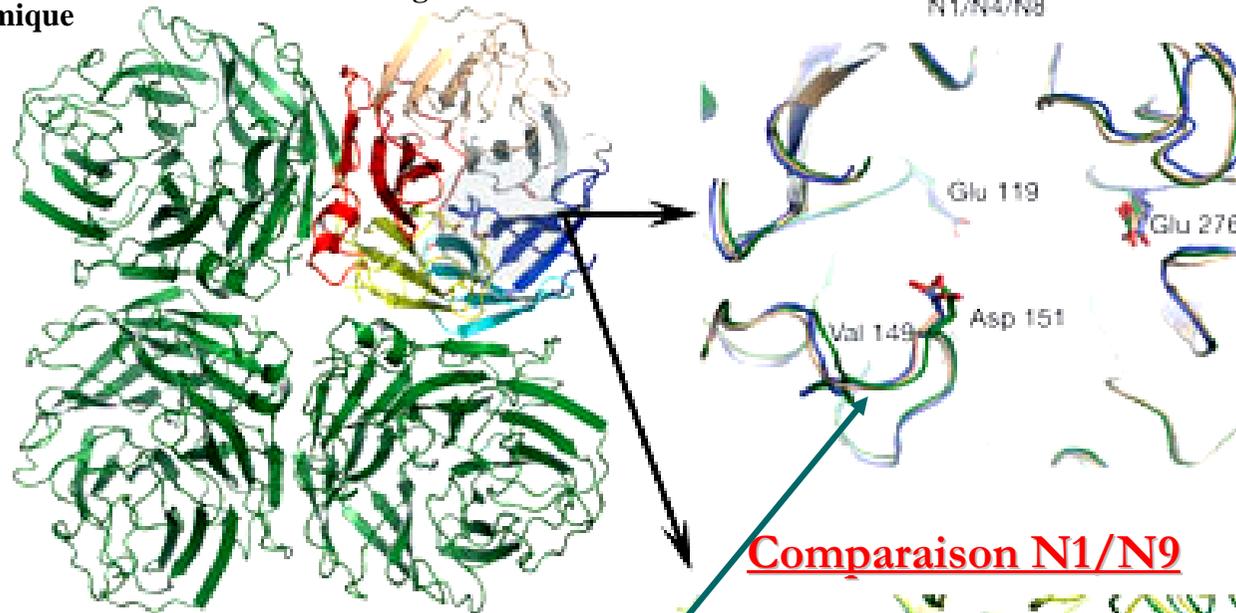
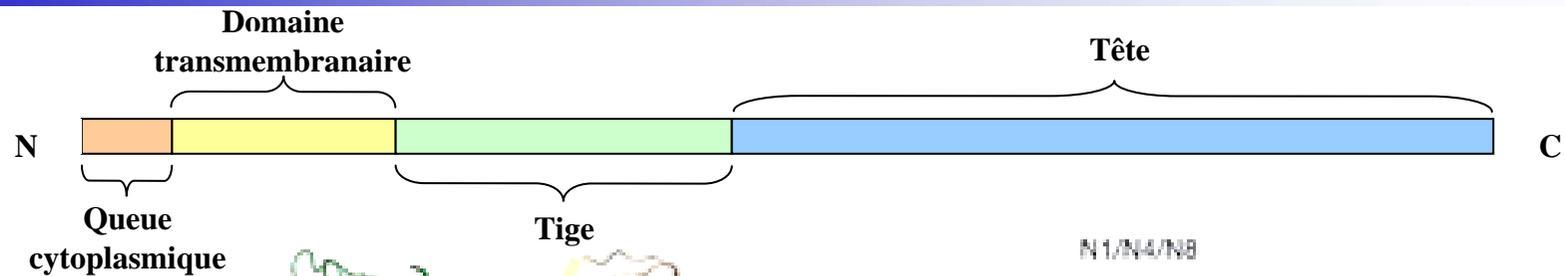
WHO CC (UK)

- Adam Meijer
- Koos Van der Veulden
- Réseau Eiss

EISS



Neuraminidase des virus influenza A

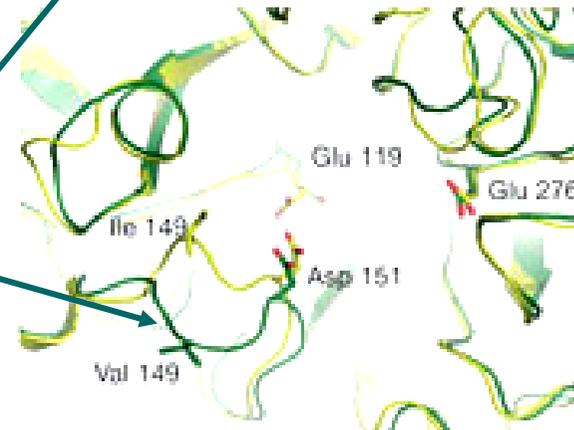


Groupe 1
type N1,
N4, N5,
N8

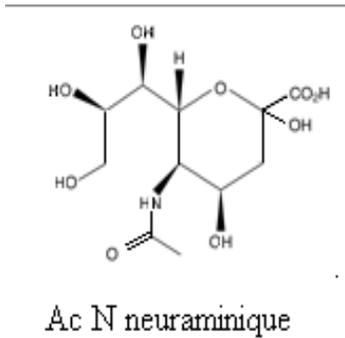
Comparaison N1/N9

Groupe 2
type N2, N3,
N6, N7, N9

« Boucle 150 »



Inhibiteurs de la neuraminidase (INAs)



Acide N acétylneuraminique
=
Acide Sialique

Zanamivir (Relenza®)

Inhalation (2 x 5mg)

2x /j pendant 5 j

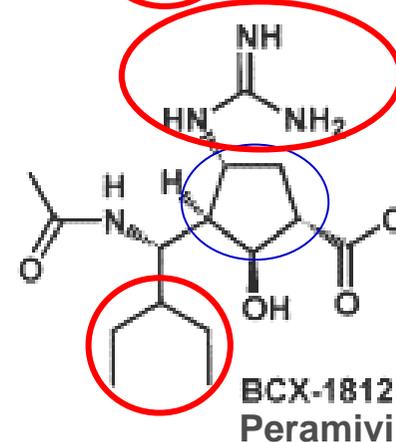
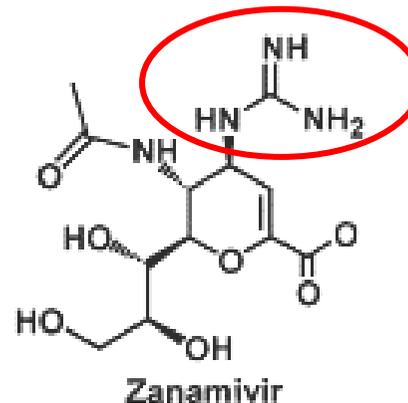
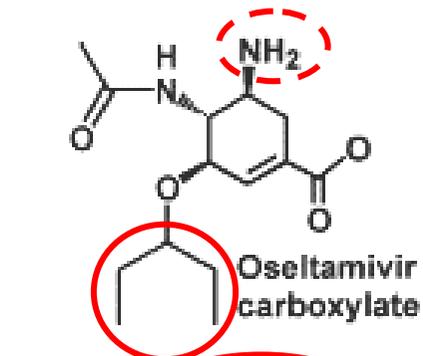
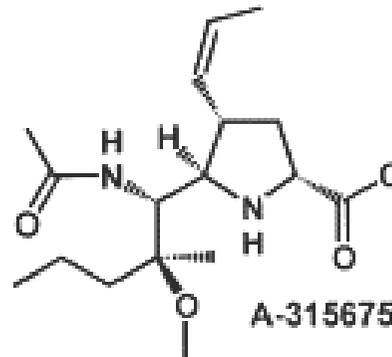
Oseltamivir (Tamiflu®)

orale (prodrogue)

75 mg 2x /j pendant 5 j

Analogues structuraux de l'acide sialique:
bloquent site actif NA

- ✓ Actifs sur les virus Influenza A et B
- ✓ Actifs si administrés précocément

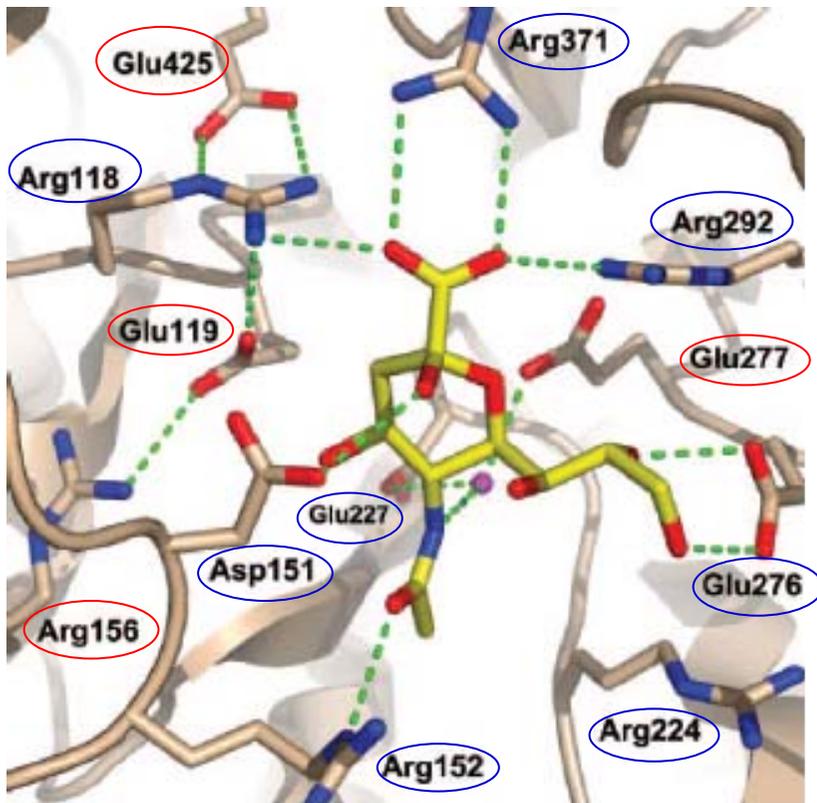


Mutations associées à la résistance aux INAs

fonction	position	virus	traitement	oseltamivir	zanamivir	peramivir
Structural	N119V	H3N2	Oseltamivir	R	S	S
	H274Y	H1N1	Oseltamivir	R	S	R
		H5N1	Oseltamivir	R	S	R
	D198N	B	Oseltamivir	R	S	S
Catalytique	R292K	H3N2	Oseltamivir	R	nd/R	nd
	R152K	B	Zanamivir	R	R	R

Données in vitro *LV Gubavera, Virus Research 2004*

Site actif de la Neuraminidase (N2)



Acides aminés du site catalytique de la Neuraminidase N2 et leurs relations avec le substrat, l'acide sialique

Yen et al., J Virol 2006

✓ acides aminés catalytiques

- interaction directe avec le substrat (l'acide sialique)

→ R118, D151, R152, R224, E227, E276, R292, R371, Y406

✓ acides aminés structuraux

- stabilisent le site actif

→ E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294, E425

Mutations de la Neuraminidase associées à la résistance aux INAs

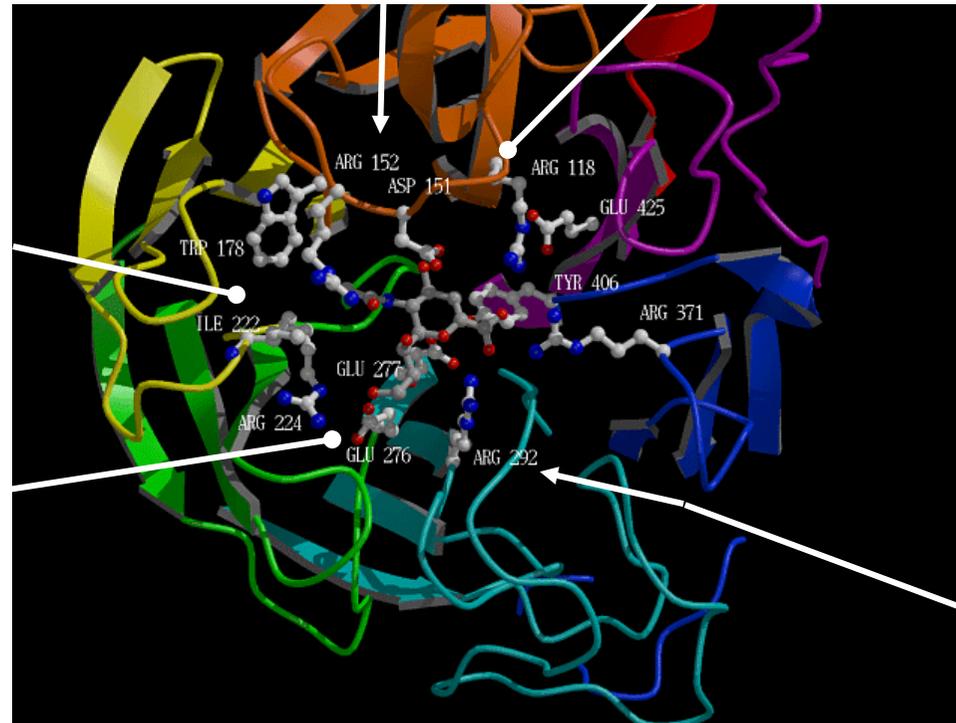
Différentes en fonction de la NA

B (R150K) in vivo
R152K * aa fonctionnel
R oseltamivir, R peramivir
R zanamivir

N2 in vivo, N9 in vitro
E119G,A,D,V* aa structural
R oseltamivir, S peramivir, S zanamivir

B (D197N,E)
in vivo
D198N *
aa structural
R oseltamivir
R/S zanamivir

N1 (H275Y)
in vitro, in vivo
H274Y*
aa structural
R oseltamivir
R peramivir
S zanamivir



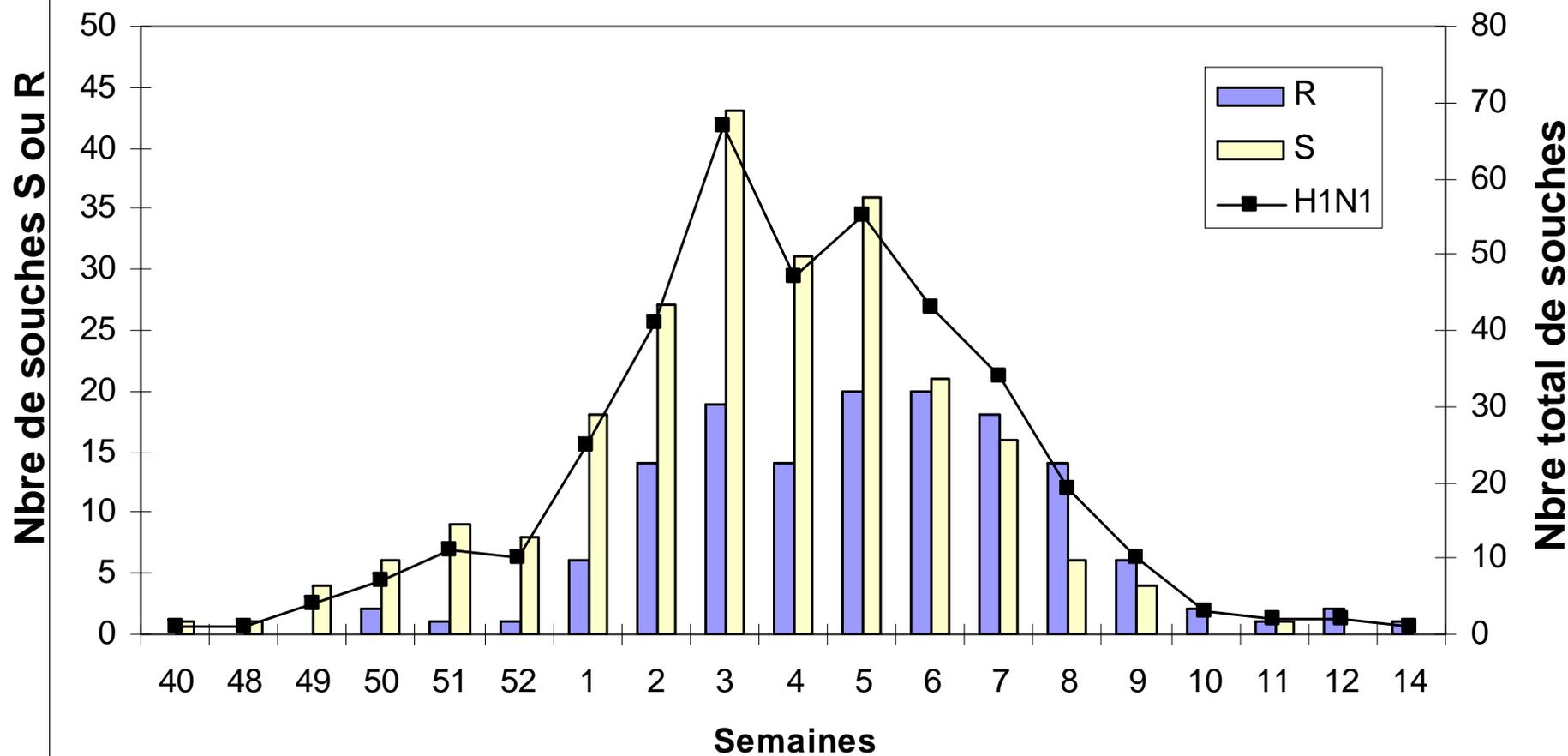
N2 in vivo
N2,N9, in vitro
R292K*
aa fonctionnel
R oseltamivir
R zanamivir

* Numérotation dans N2

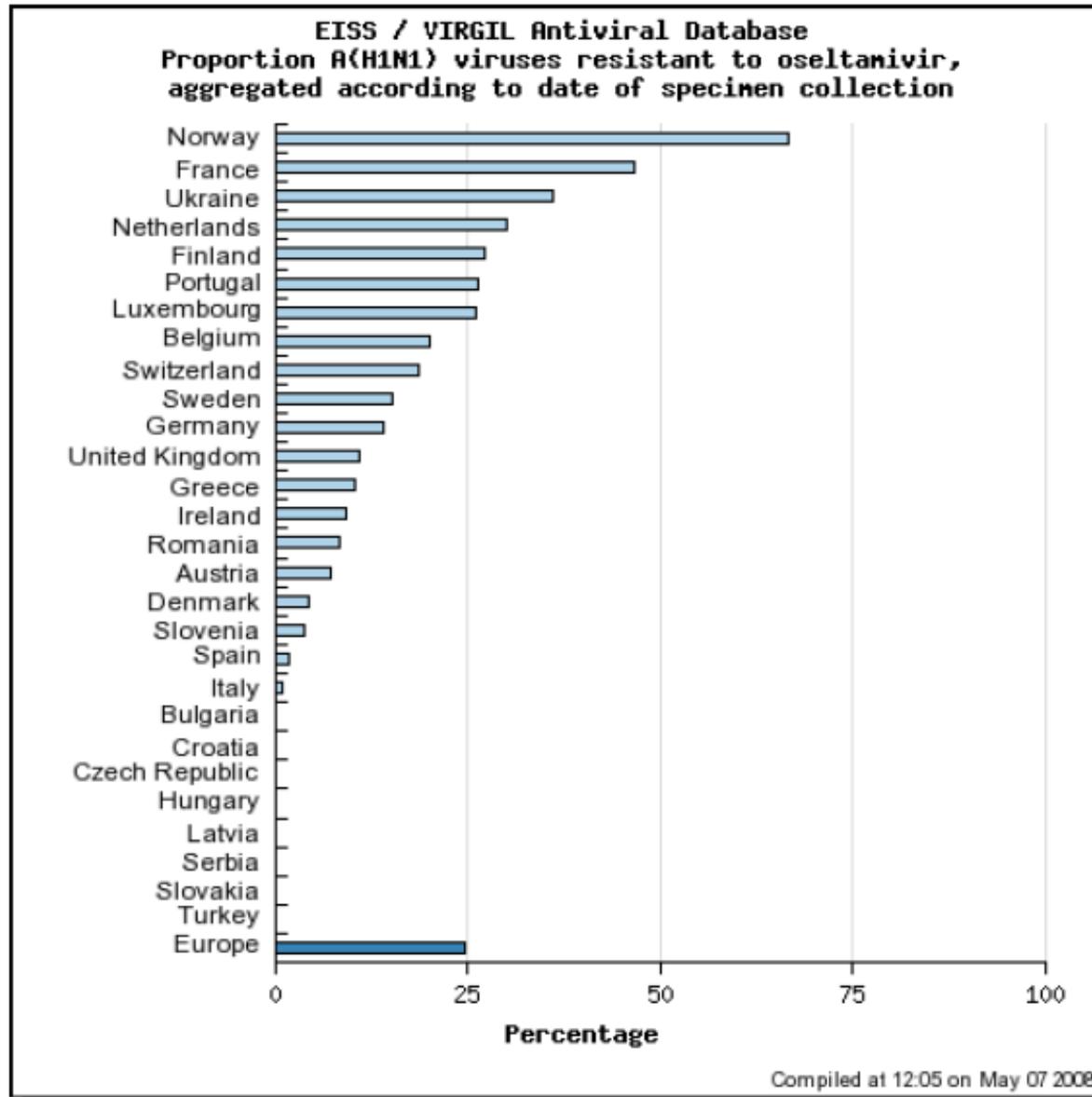
Résultats des tests fluorimétriques France Sud 2008

Sous-type	Nbre de souches	Activité NA	IC50 Oseltamivir (Moy ± ET nM)	IC50 Zanamivir (Moy ± ET nM)
H1N1 (app Solomon Island) sensibles à l'oseltamivir	232	107	1,36 ± 0,70	1,54 ± 0,71
H1N1 (app Solomon Island) résistantes à l'oseltamivir	140	142	564,56 ± 359,29	1,37 ± 1,17
➤ <u>Soit 37,6% de souches résistantes</u>				
H1N1 (app New Cal) résistante à l'oseltamivir	1	88	424,40 ± 157,91	0,89 ± 0,39
H3N2	8	326	0,39 ± 0,14	1,21 ± 0,70
B	22 (testées)	353	13,34 ± 3,43	9,02 ± 4,33

Hiver 2007-08 - France Sud - Sensibilité Isolats H1N1



Distribution des virus A(H1N1) résistants à l'oseltamivir en Europe: données cumulées (au 7 Mai 2008)



2800 virus testés

670 résistants à l'oseltamivir
(soit environ 24%)

Impact clinique et économique (réseau GROG)

Coordonnées
du préleveur



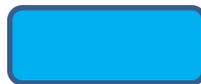
Formulaires : renseignements cliniques,
thérapeutiques



Echantillon ID Labo ID



Préleveur ID



Données Cliniques



Virology 1 souche



Virology 2 R or S



questions



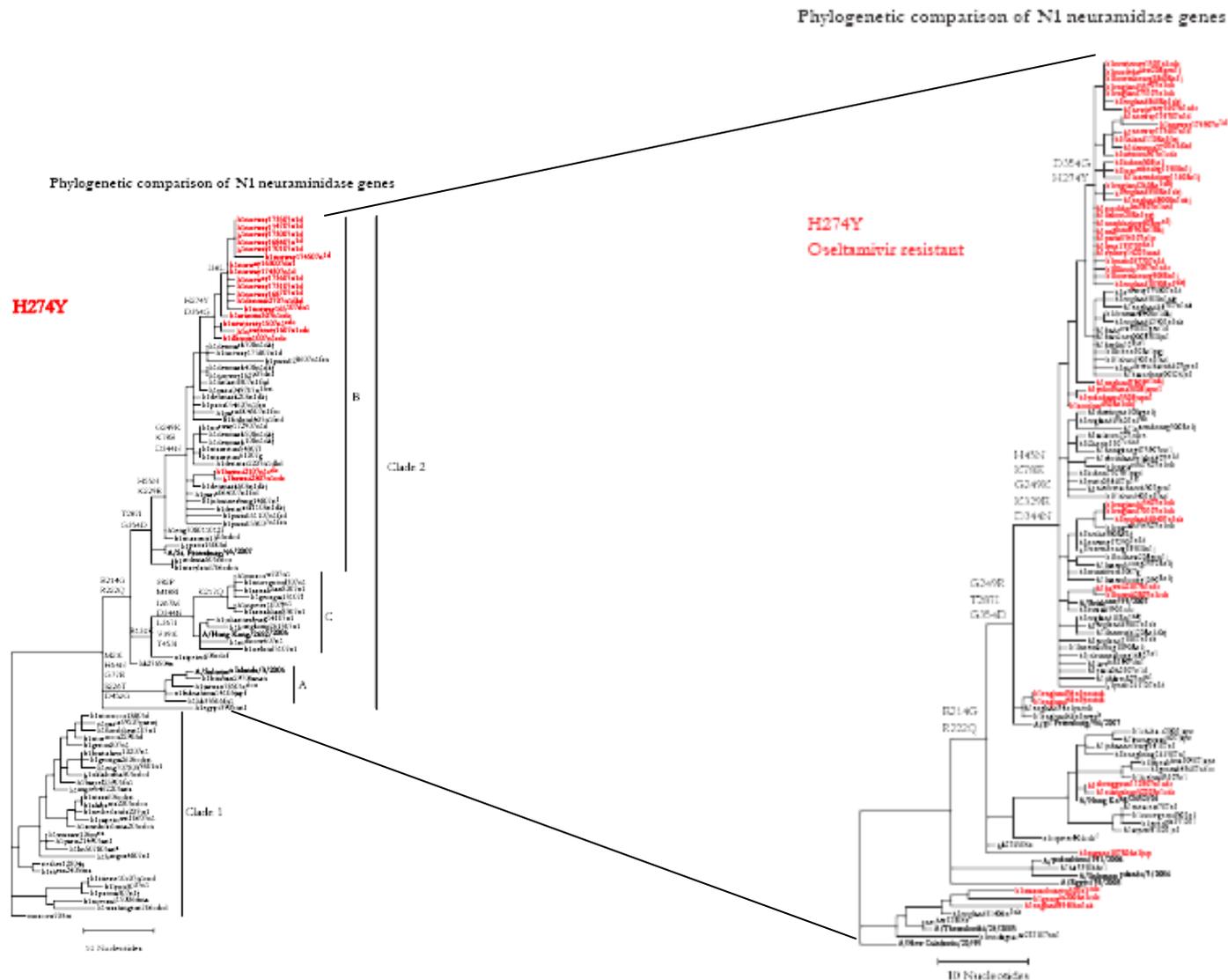
Impact



Questions sur :
- la clinique
- la thérapeutique

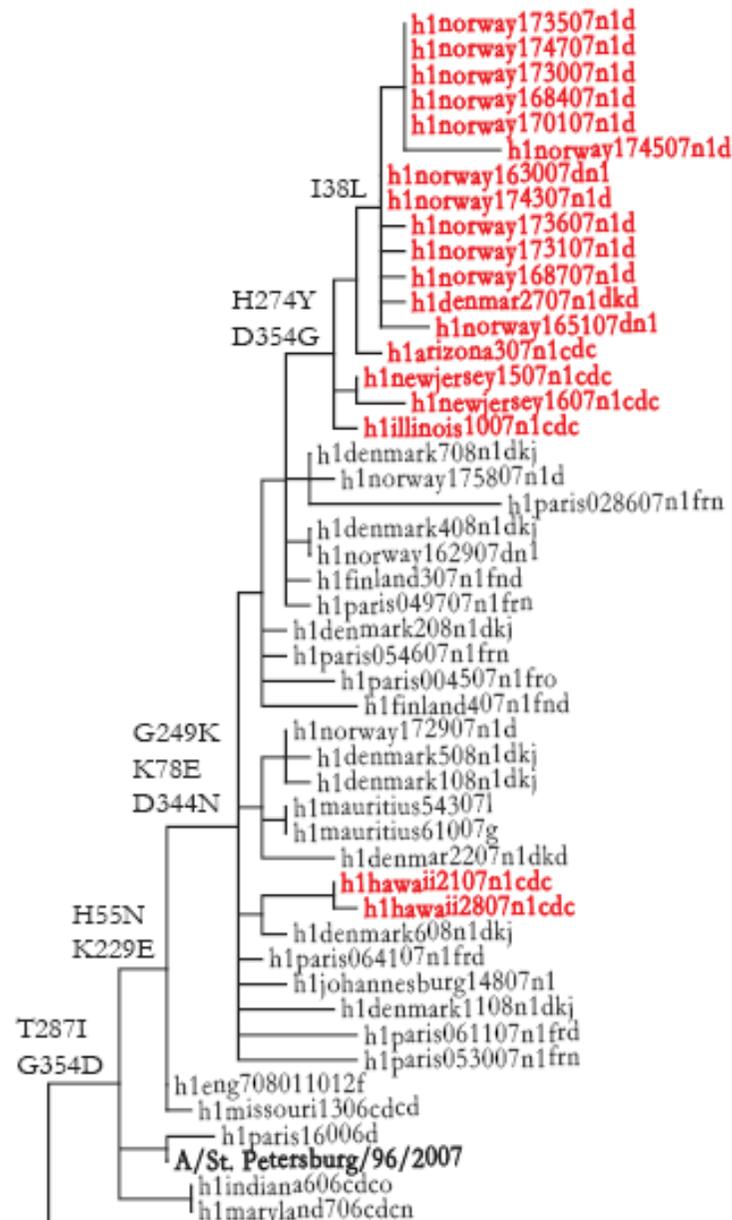


Phylogeny of NA of recent viruses



Evolution of the N1 gene

H274Y



B

Clade 2

Phylogeny of Ha

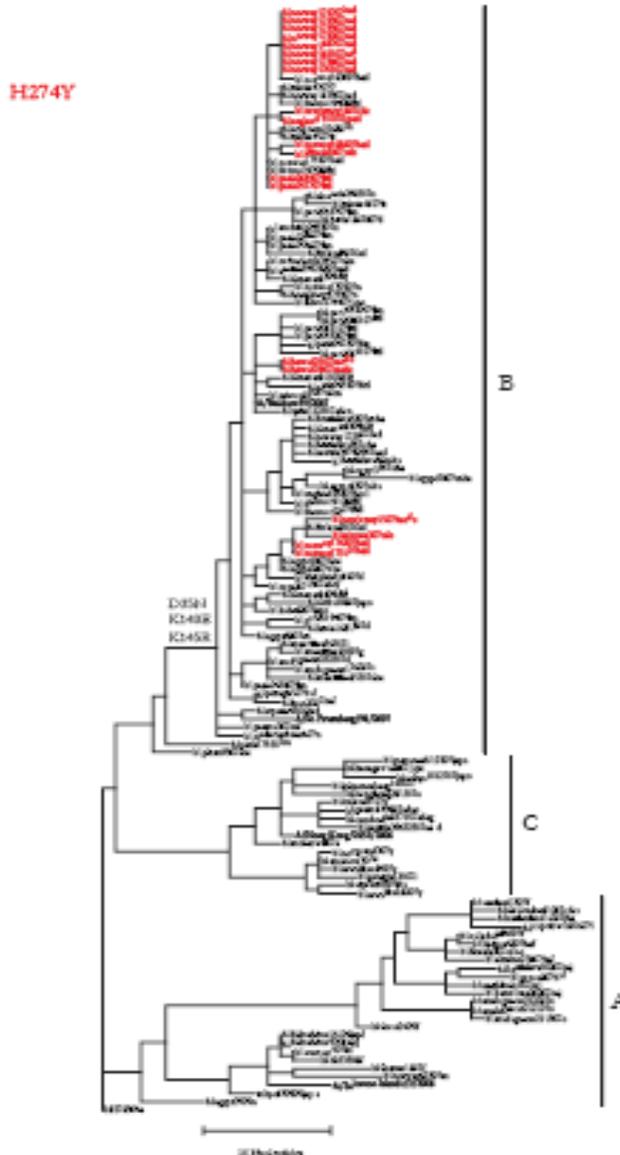
H1 virus Ha clusters in different groups

Multiclonal distribution

No resistant in sub clades A and C



Phylogénie de l'hémagglutinine



Les HA des virus H1 se répartissent dans différents groupes

distribution multiclonale des mutants 274Y mais

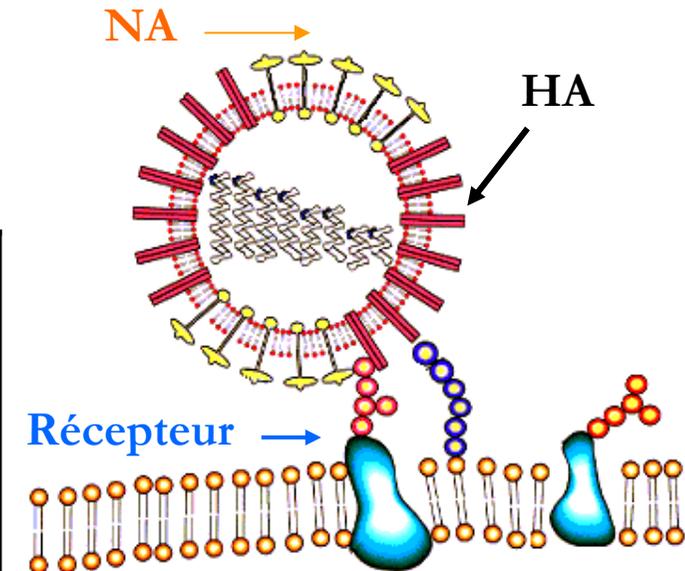
pas de résistants dans les sous-clades A et C

➤ Suggèrerait la présence de mutations compensatoires dans HA?

➤ Hypothèse à tester par exemple en génétique inverse

Mécanismes de résistance des virus Influenza virus aux INAs

Liaison HA/ Acide Sialique	Fonction NA	Libération virions	Capacité de multiplication
étroite	adaptée	+++++	+++++
étroite à modérée	↘	+/-	+/-
modérée à faible	↘	++	++



➤ Sensibilité aux INAs

➤ Résistance aux INAs

Ex des mutants résistants au zanamivir ou virus sans NA

- mutations dans HA
 - liaison HA / acide sialique modérée à faible,
 - nouveaux récepteurs pour HA ?
- la multiplication devient indépendante de la NA