



**HAL**  
open science

# Étude et suivi de la résistance des virus influenzae A aux inhibiteurs de la neuraminidase

Alexandre Gaymard

► **To cite this version:**

Alexandre Gaymard. Étude et suivi de la résistance des virus influenzae A aux inhibiteurs de la neuraminidase. Virologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1135 . tel-02356404

**HAL Id: tel-02356404**

**<https://theses.hal.science/tel-02356404>**

Submitted on 8 Nov 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1135

## THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de  
l'Université Claude Bernard Lyon 1

**École Doctorale 341**  
Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation

**Spécialité de doctorat** Virologie  
**Discipline** Physiologie, interaction et biologie des organismes

Soutenue publiquement le 25/09/2019 par :  
**Alexandre, Guillaume GAYMARD**

---

# Étude et suivi de la résistance des virus influenzae A aux inhibiteurs de la neuraminidase

---

Devant le jury composé de :

Pr <b>Jean-Luc GUERIN</b>	PU (INRA, ENV de Toulouse)	Rapporteur
Dr <b>Marie-Anne RAMEIX-WELTI</b>	MCU-PH (Université Versailles St Quentin en Yvelines)	Rapporteuse
Pr <b>Florence ADER</b>	PU-PH (Université Lyon 1)	Examinatrice
Pr <b>Bruno LINA</b>	PU-PH (Université Lyon 1)	Examinateur
Dr <b>Jacques GAILLAT</b>	PH (CH Annecy)	Examinateur
Dr <b>Vanessa ESCURET</b>	MCU-PH (Université Lyon 1)	Directrice de Thèse
Dr <b>Émilie FROBERT</b>	MCU-PH (Université Lyon 1)	Co-directrice de Thèse



# UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. le Pr. Frédéric FLEURY
Présidence du Conseil Académique	M. le Pr. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Pr. Didier REVEL
Vice-Président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLEE
Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	M. le Pr. Philippe CHEVALIER
Directeur Générale des Services	M. Damien VERHAEGHE

## COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est	M. le Pr. Gilles RODE
Faculté de Médecine Lyon Sud - Charles Mérieux	Mme la Pr. Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Mme la Pr. Christine VINCIGUERRA
Faculté d'Odontologie	Mme. la Pr. Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	M. Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Mme la Pr. Anne-Marie SCHOTT

## COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	M. F. DE MARCHI
Département Biologie	M. le Pr. F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Mme C. FELIX
Département GEP	M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	M. le Pr. S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	M. le Pr. G. TOMANOV
Département Mécanique	M. le Pr. H. BEN HADID
Département Physique	M. le Pr. J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	M. Y. VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	M. le Pr. B. ANDRIOLETTI
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Mme. la Pr. I. DANIEL
Polytech Lyon	M. le Pr. E. PERRIN
UFR Biosciences	Mme. la Pr. K. GIESLER
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	M. le Pr. C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	M. P. CHAREYRON
Institut de Science Financière et d'Assurances	M. N. LEBOISNE

# Laboratoire d'Accueil

Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine - Virpath

Centre International de Recherche en Infectiologie - CIRI

INSERM U1111 - CNRS UMR 5308 - ENS de Lyon - UCBL1

Faculté de médecine RTH Laennec

7-11 rue Guillaume Paradin - 69372 Lyon cedex 08

*À ma famille,*

*À mes parents et mon fréro,*

*À Camille et Côme, My home forever.*

# Remerciements

## Aux membres de mon Jury :

Je tiens à remercier le **Dr Marie-Anne Rameix-Welti** et le **Pr Jean-Luc Guérin** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. J'espère que la lecture « distrayante » de ce manuscrit ne vous accompagnera pas trop pendant vos vacances estivales.

Un grand merci également au **Pr Florence Ader** et au **Dr Jacques Gaillat** qui ont eu la gentillesse d'accepter de juger ce travail pour y apporter leur vision clinique. Je vous prie de trouver dans ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

Merci au **Pr Bruno Lina**, qui m'a accueilli dans son laboratoire en 2014. Je vous remercie pour votre disponibilité et vos conseils qui me permettent de progresser en permanence. Je suis honoré de la confiance que vous m'accordez et j'espère pouvoir continuer à travailler dans votre service.

Je tiens à remercier chaleureusement le **Dr Émilie Frobert**, qui a accepté de co-encadrer ce travail. Merci pour ton aide et ton soutien durant ce travail. Je suis d'accord avec toi, les virus des herpès peuvent parfois présenter un certain intérêt ! En tout cas j'ai hâte de continuer nos projets communs en commençant par l'encadrement de Grégory Quéromès.

Finalement un immense merci au **Dr Vanessa Escuret**, d'avoir accepté de m'encadrer pendant ces cinq dernières années. Merci à toi de m'avoir fait découvrir l'univers de la virologie mais également d'avoir partagé l'ensemble de tes connaissances sur les virus influenzae. Tu as toujours été disponible et à l'écoute pour résoudre l'ensemble des problèmes qui se sont présentés au cours de notre travail. Tu es la directrice de thèse parfaite et j'espère que cette thèse n'est, pour toi, que la première d'une longue série. J'ai hâte de pouvoir continuer à travailler avec toi.

## À mes amis et collègues

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet par leur participation, leur soutien et pour nos échanges :

- À **Maxime, Ludivine, Yann et Pauline** : à quand le prochain weekend ensemble ?
- Aux **Grégory**, vous allez devoir me supporter encore quelques temps.
- À l'équipe de virologie Lyonnaise : **Florence, Geneviève, Maude, Jean-Sébastien, Marion, Martine, Yahia, Isabelle, Laurence, Vinca, Caroline C, Caroline S, Marie-Paule, Christophe, Jean-Claude** et **Mary-Anne**
- À **Mendy** et **Murielle** sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir
- À l'ensemble du personnel du Laboratoire de Virologie et de l'unité VirPatH, pour leur disponibilité, leur patience et surtout la gentillesse dont ils ont fait preuve face à mes demandes.

# Résumé

Les virus influenzae sont des pathogènes importants ayant un impact à la fois écologique et en santé publique humaine. En effet chez l'Homme, ces virus sont responsables de la grippe, qu'elle soit saisonnière, pandémique ou zoonotique. Face à ces infections, très peu d'options thérapeutiques sont disponibles : seuls les inhibiteurs de neuraminidase (INA) sont recommandés par l'OMS mais des résistances ont été décrites. Les substitutions H274Y, E119V et R292K sont les substitutions de résistance retrouvées le plus fréquemment dans les neuraminidases des virus influenzae humains. Dans notre travail, l'étude des résistances aux INA a été organisée autour de deux axes, d'une part via le suivi clinique et biologique de la résistance chez les patients et d'autre part, via l'étude de l'impact des substitutions de résistance dans des neuraminidases aviaires. La surveillance de ces résistances au sein du Centre National de Référence des virus des infections respiratoires a permis la caractérisation du génome de virus influenza A(H1N1)pdm09 dans un contexte d'excrétion chronique en présence d'un traitement par INA chez un patient atteint de déficit immunitaire combiné sévère mais aussi le développement et l'évaluation de la PCR digitale pour le diagnostic de la substitution H274Y dans les virus A(H1N1). Notre travail a ensuite permis l'analyse des substitutions H274Y, E119V+I222L et R292K sur l'ensemble des sous-types de neuraminidases des virus influenzae A grâce à la production de virus réassortants. La substitution H274Y se retrouve préférentiellement dans les N1 mais est responsable d'une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir pour toutes les neuraminidases du groupe 1 (N1, N4, N5 et N8). La substitution E119V entraîne une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir variable en fonction des neuraminidases avec un impact plus important pour les N2, N7, N9 et N5. De plus l'association des substitutions E119V+I222L entraîne un effet synergique sur ce phénotype de résistance à l'oseltamivir. Enfin la substitution R292K entraîne une diminution de la sensibilité à tous les INA dans toutes les neuraminidases du groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9). Au niveau mécanistique, la production d'une N9 recombinante portant la substitution R292K a montré un impact majeur de la substitution sur l'activité enzymatique. De plus, un développement technologique pour la caractérisation des particules virales (microscopie électronique, RT-ddPCR, comptage particulaire, spectrométrie de masse), toujours en cours au laboratoire, va nous permettre d'aller plus loin dans l'analyse des mécanismes qui sous-tendent l'apparition de ces résistances.

## Mots-Clés

Virus influenza A, résistance à l'oseltamivir, substitutions H274Y, E119V, E119V+I222L et R292K, neuraminidase, effet synergique

# Study of the influenza A virus susceptibility to neuraminidase inhibitors

## Abstract

Influenza viruses are important human pathogens that are responsible for flu, whether seasonal, pandemic or zoonotic. Very few therapeutic options are available against these pathogens and neuraminidase inhibitors (NAI) are the only antiviral agents recommended by the WHO for treatment and prophylaxis of influenza virus infections. NAI resistance has already been described and the H274Y, E119V and R292K neuraminidase substitutions are the most frequently encountered substitutions responsible for oseltamivir resistance. During this work, we focused the NAI resistance study around two main objectives: first, we monitored clinical and biological resistance in treated patients and then we studied the impact of substitutions responsible for NAI resistance using avian neuraminidases. For NAI resistance monitoring, viral genomic diversity of a child's influenza A(H1N1)pdm09 was characterized in the context of a severe combined immunodeficiency and a chronic viral excretion despite antiviral treatment. For a better detection of H274Y substitution in A(H1N1) influenza viruses, a digital droplet PCR was developed and evaluated. At a more fundamental level, resistance substitutions H274Y, E119V ± I222L and R292K were analysed for all influenza A neuraminidase subtypes using reassortant viruses. To summarize, H274Y substitution is preferentially isolated in N1 but also decreases oseltamivir susceptibility in all group 1 neuraminidases (N1, N4, N5 and N8). The E119V substitution impact on oseltamivir susceptibility depends on the neuraminidase and decreases oseltamivir susceptibility especially within N2, N7, N9 and N5. Moreover, the E119V+I222L substitutions has a synergistic effect on oseltamivir resistance profile. The R292K substitution decreases all NAI susceptibility for all group 2 neuraminidases (N2, N3, N6, N7 and N9). The production of a recombinant N9 bearing the R292K substitution allows to highlight the substitution impact on the sialidase activity. Development of new technological tools to characterise viral population are still in progress to allow a more accurate analysis of the mechanisms that underlie the NAI resistance.

## Key Words

Influenza A virus, oseltamivir susceptibility, neuraminidase, H274Y, E119V, E119V+I222L and R292K substitutions

# Table des Matières

<b>UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1</b> .....	<b>I</b>
<b>Laboratoire d'Accueil</b> .....	<b>II</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>IV</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>Table des Matières</b> .....	<b>VII</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>IX</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>X</b>
<b>Liste des Annexes</b> .....	<b>X</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>XI</b>
<b>Introduction et objectifs</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie A : Contexte bibliographique</b> .....	<b>5</b>
<b>Chapitre 1 : Généralités sur les virus influenzae</b> .....	<b>6</b>
1.1. Introduction .....	6
1.2. Chapitre d'ouvrage publié.....	6
<b>Chapitre 2 : Virus influenzae A aviaires sous surveillance</b> .....	<b>37</b>
2.1. Introduction .....	37
2.2. Virus A(H5N1).....	39
2.3. Virus A(H5N6) et A(H5N8) .....	43
2.4. Virus A(H7N9).....	48
<b>Chapitre 3 : Les inhibiteurs de la neuraminidase</b> .....	<b>63</b>
3.1. Introduction .....	63
3.2. Présentation des différents inhibiteurs de la neuraminidase .....	65
3.3. Diagnostic des résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase .....	67
3.4. Mécanismes des résistances .....	68
3.5. Résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus humains A(H1N1) .....	69
3.6. Résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus humains A(H3N2) .....	73
3.7. Résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus aviaires .....	76
<b>Chapitre 4 : Autres antiviraux actifs contre les virus influenzae</b> .....	<b>79</b>
4.1. Introduction .....	79
4.2. Diagnostic des résistances aux antiviraux autres que les INA .....	80
4.3. Les adamantanes.....	80
4.4. Les inhibiteurs du complexe polymérase.....	81
4.5. Autres antiviraux .....	86
4.6. Autres stratégies de traitement.....	88
<b>Chapitre 5 : La balance fonctionnelle entre hémagglutinine et neuraminidase</b> .....	<b>91</b>
5.1. Introduction .....	91
5.2. Revue publiée .....	93

<b>Partie B : Résultats liés à la surveillance des virus résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase .....</b>	<b>105</b>
<b>Chapitre 1 : Prise en charge et étude de la diversité virale au cours d'une infection par le virus A(H1N1)pdm09 .....</b>	<b>109</b>
1.1. Introduction .....	109
1.2. Article publié.....	109
<b>Chapitre 2 : Mise au point de la ddPCR pour le diagnostic de la substitution H274Y dans les virus A(H1N1).....</b>	<b>121</b>
2.1. Introduction .....	121
2.2. Article publié.....	122
<b>Partie C : Résultats expérimentaux sur l'étude des mécanismes de résistances.....</b>	<b>131</b>
<b>Chapitre 1 : Étude de l'impact de la substitution H274Y sur les neuraminidases du groupe 1 .....</b>	<b>133</b>
1.1. Introduction .....	133
1.2. Article soumis.....	135
<b>Chapitre 2 : Étude de l'impact des substitutions E119V±I222L et R292K sur les neuraminidases du groupe 2.....</b>	<b>165</b>
2.1. Introduction .....	165
2.2. Article publié.....	167
Supplementary data.....	179
<b>Chapitre 3 : Caractérisation des neuraminidases N9 portant la substitution R292K .....</b>	<b>181</b>
3.1. Introduction .....	181
3.2. Matériels et Méthodes .....	182
3.3. Optimisation de la production de neuraminidases recombinantes .....	189
3.4. Résultats .....	194
3.5. Discussion.....	199
<b>Partie D : Discussion et Perspectives .....</b>	<b>203</b>
<b>Chapitre 1 : Discussion.....</b>	<b>204</b>
1.1. La surveillance des résistances.....	204
1.2. Les mécanismes de résistances.....	207
<b>Chapitre 2 : Conclusion et perspectives.....</b>	<b>215</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>219</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>221</b>
<b>Publications et communications personnelles.....</b>	<b>247</b>

# Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Nombre d'infections humaines par le virus A(H5N1) en fonction du mois et du pays de diagnostic entre 2004 et 2017. ....	40
<b>Figure 2</b> : Génotypes des virus A(H5N1) isolés en Asie entre 1999 et 2004. ....	42
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'évolution des virus A(H5N6). ....	44
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de l'évolution des virus A(H5N8). ....	46
<b>Figure 5</b> : Carte des foyers d'épizooties dues aux virus A(H5N8) HPAI en Europe entre le 26/10/2016 et le 12/03/2017. ....	47
<b>Figure 6</b> : Nombre d'infections humaines par le virus A(H7N9) en fonction du mois entre 2013 et 2019.....	48
<b>Figure 7</b> : Organisation phylogénique et structure des neuraminidases. ....	64
<b>Figure 8</b> : Structures de l'acide sialique et des inhibiteurs de neuraminidases. ....	65
<b>Figure 9</b> : Fréquence de détection des virus influenzae résistants aux antiviraux circulant depuis 2000.....	69
<b>Figure 10</b> : Superposition du site actif d'une N1 sauvage (jaune) et d'une N1 avec la substitution H274Y (vert) avec de l'oseltamivir (A) ou du zanamivir (B).....	71
<b>Figure 11</b> : Superposition du site actif d'une N1 (vert) et d'une N2 (jaune) avec de l'oseltamivir...	72
<b>Figure 12</b> : Superposition du site actif d'une N9 non substituée (vert) et d'une N9 portant la substitution R292K (Rose) avec soit de l'oseltamivir (A) soit du zanamivir (B). ....	73
<b>Figure 13</b> : Superposition du site actif d'une N1 (vert) et d'une N2 (jaune) avec de l'oseltamivir...	74
<b>Figure 14</b> : Superposition du site actif d'une N2 sauvage et d'une N2 portant la substitution E119V. ....	75
<b>Figure 15</b> : Microscopie électronique de cellules MDCK infectées par le virus influenza. ....	91
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de la balance hémagglutinine - neuraminidase.....	92
<b>Figure 17</b> : Etapes techniques nécessaires à la réalisation d'une ddPCR. ....	121
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique des étapes de production et d'étude des virus réassortants sauvages ou porteurs de la substitution H274Y. ....	134
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique des étapes de production et d'étude des virus réassortants sauvages ou porteurs des mutations R292K ou E119V±I222L.....	166
<b>Figure 20</b> : Montage génétique de la N9 recombinante. ....	184
<b>Figure 21</b> : Représentation schématique des étapes de production des Bacmids recombinants. ....	185
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique des étapes de production et de purification des neuraminidases recombinantes. ....	186
<b>Figure 23</b> : Résultats des tests de mise au point de la transfection du bacmid à la production de la protéine recombinante. ....	190
<b>Figure 24</b> : Détection des neuraminidases recombinantes après purification par affinité.....	191
<b>Figure 25</b> : Résultats d'une purification par chromatographie d'exclusion de taille. ....	192

<b>Figure 26</b> : Détection des neuraminidases recombinantes durant l'ensemble du processus de purification. ....	193
<b>Figure 27</b> : Activité et affinité pour les virus réassortants et les protéines recombinantes.....	195
<b>Figure 28</b> : Ratio des $CI_{50}$ pour les virus réassortants porteurs d'une N9 (gauche) et les protéines recombinantes (droite). ....	196
<b>Figure 29</b> : Superposition du site actif d'une N2 sauvage et d'une N2 portant la substitution I222L. ....	211

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Nombre de cas humains et de décès dus à des infections par des virus aviaires de 1959 à Mai 2019. ....	38
<b>Tableau 2</b> : Valeurs moyennes des $CI_{50}$ de l'oseltamivir et du zanamivir obtenues par test fluorimétrique sur les isolats de la surveillance globale (2005-2018). ....	108
<b>Tableau 3</b> : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les virus réassortants et les protéines recombinantes. ....	198

## Liste des Annexes

### Annexes

<b>Annexe : Séquences des amorces</b> .....	<b>220</b>
Amorces de clonage N9 dans p1138 .....	220
Amorces de clonage N9 recombinante dans pFastBac .....	220
Amorces de mutagenèse dirigée pour l'obtention de la N9 mutée R292K.....	220
Amorces de séquençage de l'insert dans le bacmid ou le baculovirus .....	220

# Abréviations

**4-Mu** : 4-méthylumbélliférone

**A/Mo** : A/Moscow/10/99 (H3N2)

**A/PR8** : A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)

**A(H1N1)pdm09** : Virus humain pandémique apparu en 2009

**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger

**ATP / GTP** : Adénosine / Guanosine Triphosphate

**ATU** : Autorisation Temporaire d'Utilisation

**Br07Y / Br07H**: A/Brisbane/59/2007 (H1N1) résistant à l'oseltamivir / sensible à l'oseltamivir

**ddPCR** : PCR digitale (*droplet digital PCR*)

**CE<sub>50</sub>** : Concentration d'antiviral diminuant de 50% le nombre de plages de lyses

**CI<sub>50</sub>** : Concentration d'INA inhibant 50% de l'activité enzymatique maximale

**CNR** : Centre National de Référence

**CPE** : Effet Cytopathique

**Ct** : *Cycle threshold*

**CRB** : Centre de Ressources Biologiques

**DANA** : Acide 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminique (Neu5Ac2en)

**DICS** : Déficit Immunitaire Combiné Sévère

**ECP** : Effet Cytopathique

**ECDC** : *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centre européen de prévention et contrôle des maladies)

**EMEM** : *Eagle's minimal essential medium*

**ESA** : Epidémiologie en Santé Animale

**FAO** : *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

**GROG** : Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe

**HA** : Hémagglutinine

**HCL / IAI**: Hospices Civils de Lyon / Institut des Agents infectieux

**IAFP / IAHP**: Influenza Aviaires Faiblement Pathogènes / Hautement Pathogènes

**IMPDH** : Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase

**INA** : Inhibiteurs de Neuraminidase

**IV** : Intraveineuse

**Kcat** : Constante catalytique

**Kd** : Constante de dissociation

**Km** : Constante de Michaëlis et Menten

**LAM** : Leucémie Aigüe Myéloïde

**LNR** : Laboratoire National de Référence

**L-Glu** : L-Glutamine  
**M** : Protéine de matrice  
**MDCK (-SIAT)** : *Madin Darby Canine Kidney (-Sialic Acid Over Expression)*  
**MOI** : *Multiplicity of infection*  
**MUNANA** : acide 2'-(4-méthylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminique  
**NA** : Neuraminidase  
**NP** : Nucléoprotéine  
**NS** : Protéines Non Structurales  
**OIE** : *World Organisation for Animal Health* (Organisation Mondiale de la Santé Animale)  
**ONCFS** : l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé (ou *WHO: world health organization*)  
**PA** : Protéine Acide  
**PB** : Protéines Basiques (PB1 et PB2)  
**PS** : Pénicilline - Streptomycine  
**qPCR** : *quantitative Polymerase Chain Reaction*  
**RENAL** : Réseau National des Laboratoires Hospitaliers  
**RT** : *Reverse Transcription*  
**SDRA** : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe  
**SFM / SFV**: Société Française de Microbiologie / de Virologie  
**SFVi** : Sérum de Veau Foetal inactivé  
**VASP** : *Vasodilator-stimulated phosphoprotein*  
**VRS** : Virus Respiratoire Syncytial

Par convention les mutations de résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase sont numérotées selon la position analogue de l'acide aminé dans la neuraminidase de sous-type N2.

Dans ce document nous avons utilisé les abréviations d'une lettre pour chaque acide aminé qui sont rappelées ci-dessous :

Acide aminé	Abréviation d'une lettre	Acide aminé	Abréviation d'une lettre
Alanine	<b>A</b>	Leucine	<b>L</b>
Arginine	<b>R</b>	Lysine	<b>K</b>
Acide Aspartique	<b>D</b>	Méthionine	<b>M</b>
Asparagine	<b>N</b>	Phénylalanine	<b>F</b>
Cystéine	<b>C</b>	Proline	<b>P</b>
Acide Glutamique	<b>E</b>	Sérine	<b>S</b>
Glutamine	<b>Q</b>	Thréonine	<b>T</b>
Glycine	<b>G</b>	Tryptophane	<b>W</b>
Histidine	<b>H</b>	Tyrosine	<b>Y</b>
Isoleucine	<b>I</b>	Valine	<b>V</b>

# **Introduction et objectifs**

Les virus influenzae sont d'importants pathogènes pour l'Homme. Tous les ans dans le monde, les infections grippales saisonnières causent plusieurs millions de cas graves dont des centaines de milliers se concluent par des décès (1). De plus, certains sous-types émergents provenant du réservoir zoonotique présentent une sérieuse menace pour la santé humaine et/ou pour l'économie de certains pays via les risques de zoonoses et dans de rares cas le risque pandémique. Les vingt dernières années ont vu émerger plusieurs virus influenzae A antigéniquement uniques et potentiellement hautement pathogènes pour l'Homme ou pour l'animal, notamment les virus A(H5N1), A(H7N9), A(H5N6) et A(H5N8) (2,3). Les infections humaines par certains de ces sous-types peuvent être associées à un très fort taux de mortalité, avoisinant les 60% pour les infections par les virus aviaires A(H5N1) et de plus de 40% pour les virus A(H7N9).

Face à ces infections, très peu d'options thérapeutiques sont disponibles. La vaccination reste le traitement préventif de choix mais le temps nécessaire à l'élaboration et à la fabrication des vaccins ainsi que leur efficacité variable en fonction du virus et/ou de l'âge du patient ne permettent pas d'en faire un traitement adapté aux crises sanitaires. Dans ces situations et bien que de nouveaux antiviraux commencent à apparaître, les inhibiteurs de neuraminidase (INA) restent à ce jour la seule classe thérapeutique recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans le traitement et la prévention des gripes aiguës (4).

Le laboratoire « Virologie et Pathologie humaine » (VirPath, CIRI - INSERM U1111 - CNRS UMR 5308 - ENS de Lyon - UCBL1) propose une approche globale et intégrative de l'étude des virus influenzae partant de la surveillance des virus circulants jusqu'au traitement des infections causées par ces virus. Le laboratoire est organisé autour de plusieurs groupes de travail et nos activités de recherche s'intègrent complètement au groupe se concentrant sur l'étude de la balance fonctionnelle entre les deux glycoprotéines de surfaces (hémagglutinine et neuraminidase) dans l'infection, l'évolution et la pathogénicité des virus influenzae. De plus, la collaboration étroite avec le laboratoire associé au Centre National de Référence (CNR) des virus des infections respiratoires (France Sud) et le service de virologie situé au sein de l'Institut des Agents Infectieux (IAI) des Hospices Civils de Lyon (HCL), nous permet de développer une thématique de recherche translationnelle se basant sur la surveillance et la description des résistances présentes dans un contexte clinique puis de caractériser les propriétés enzymatiques des neuraminidases résistantes aux INA.

Cette organisation m'a permis de mener une thèse s'appuyant parfaitement sur mon statut hospitalo-universitaire avec à la fois un objectif clinique de suivi de la résistance aux INA mais aussi un objectif d'étude des mécanismes liés à ces résistances dans des neuraminidases issues du réservoir aviaire. En effet, ces antiviraux sont des inhibiteurs compétitifs de la neuraminidase, empêchant notamment le relargage des nouveaux virions à la surface des cellules infectées. Depuis leur mise sur le marché, des résistances aux INA ont été décrites chez des virus porteurs de substitutions dans leur neuraminidase. Par exemple, la substitution d'une histidine (H) par une tyrosine (Y) en position 274 (H274Y) est la plus fréquente chez les virus porteurs d'une N1 humaine. Chez les virus porteurs d'une N2 humaine ce sont les substitutions d'une arginine (R) par une lysine (K) en position 292

(R292K) et celle d'un acide glutamique (E) par une valine (V) en position 119 (E119V) qui sont les deux plus fréquentes. Dans certains cas, l'association de plusieurs substitutions a montré un effet synergique sur la résistance aux INA notamment pour les substitutions en position 222 (5).

Les virus portant ces substitutions sont principalement sélectionnés par le traitement antiviral chez des patients immunodéprimés. Cependant, certains virus résistants à l'oseltamivir ont émergé en absence de pression de sélection grâce à la présence d'autres substitutions capables de compenser l'effet potentiellement délétère des substitutions de résistance aux INA (6,7). Une surveillance continue des virus influenzae est donc indispensable pour détecter l'émergence de nouvelles résistances aux INA. Le premier objectif de cette thèse a été de participer au suivi de ces résistances en collaborant à la caractérisation approfondie du génome des virus influenzae dans un contexte d'excrétion chronique malgré un traitement par INA chez un enfant atteint de déficit immunitaire combiné sévère (DICS). De plus, le suivi des résistances et leur diagnostic dans des prélèvements de patients nécessite des techniques adaptées et sensibles pour pouvoir mettre en évidence le plus tôt possible la présence d'une sous-population virale porteuse d'une substitution de résistance. Dans ce but, nous avons développé et évalué les performances de la PCR digitale (RT-ddPCR) en comparaison des performances des méthodes classiques de biologie moléculaire (RT-qPCR) et des techniques de séquençage haut débit pour la recherche de la substitution H274Y. Ce travail a été réalisé d'une part sur des souches de référence sensibles ou résistantes aux INA pour évaluer la sensibilité des différentes techniques, puis nous avons appliqué ce protocole au suivi de plusieurs patients immunodéprimés.

Le second objectif de cette thèse a été de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'émergence de substitutions de résistance aux INA. En effet, l'impact de ces substitutions sur les caractéristiques et la structure des neuraminidases ainsi que les mécanismes responsables de l'émergence de souches résistantes ne sont pas encore connus précisément. De plus, la détection et l'étude des substitutions de résistance aux INA se limitent majoritairement à l'étude des neuraminidases retrouvées chez les virus infectant l'Homme : N1, N2 et dernièrement N9. L'étude des autres sous-types de neuraminidases retrouvés dans le réservoir zoonotique est presque inexistante malgré leur potentiel émergent. Le groupe de travail d'experts de l'OMS sur la surveillance de la sensibilité aux antiviraux a reconnu que les connaissances actuelles étaient insuffisantes pour pouvoir interpréter les substitutions d'acides aminés dans les sous-types de neuraminidases autres que N1 et N2. La septième réunion de ce groupe d'août 2018 a d'ailleurs conclu à la nécessité de surveiller la sensibilité des virus zoonotiques aux antiviraux (8). Notre travail a consisté dans un premier temps à analyser l'impact des substitutions H274Y, E119V±I222L et R292K connues pour conférer une résistance aux INA sur les neuraminidases humaines N1 et N2 sur l'ensemble des sous-types de neuraminidases des virus influenzae A. Pour cela, nous avons produit par génétique inverse des virus réassortants composés d'un fond génétique commun associé à chaque sous-type de neuraminidase avec ou sans substitution. Pour chaque virus réassortant, nous avons étudié le niveau de résistance, les propriétés enzymatiques et la stabilité

des neuraminidases. Dans la continuité de ces premiers résultats, nous avons voulu approfondir les mécanismes expliquant l'apparition de ces résistances. Dans ce but, nous avons mis au point, au sein de notre laboratoire, la production de protéines recombinantes à l'aide d'un système d'expression en baculovirus ainsi que différentes techniques de quantification et de caractérisation des particules virales. Ce développement technologique toujours en cours au laboratoire nous a obligés à nous focaliser sur la N9 pour l'étude de la substitution R292K.

Ce manuscrit présente les résultats de nos travaux et s'organise autour de quatre grands axes. Le premier axe présentera les notions essentielles entourant notre thématique de recherche commençant par quelques généralités sur les virus influenzae, la présentation des principaux virus émergents issus du réservoir aviaire et un résumé des connaissances sur les antiviraux contre les virus influenzae. Cette première partie se terminera par la description de la notion de balance hémagglutinine-neuraminidase qui est la thématique centrale de notre groupe de recherche. Le deuxième et troisième axes mettront en avant les résultats des travaux réalisés au cours de cette thèse : une partie sera centrée sur les résultats de la surveillance des virus résistant aux INA, tandis que l'autre partie détaillera les résultats expérimentaux sur l'étude des mécanismes de résistances. Enfin le quatrième axe de ce manuscrit permettra la discussion de ces différents résultats et l'exposition des perspectives en cours ou à venir.

## **Partie A : Contexte bibliographique**

# Chapitre 1 : Généralités sur les virus influenzae

## 1.1. Introduction

Les virus influenzae appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont divisés en quatre genres distincts : les influenzavirus A, B, C et D. La classification de ces virus repose sur la taille de leur génome et les caractéristiques antigéniques de leurs protéines (9). Bien que les virus influenzae A, B et C peuvent être isolés chez l'homme, les virus de type C sont très faiblement pathogènes et ne causent que des infections asymptomatiques ou bénignes (10). En revanche, les virus de type A et B sont responsables tous les ans de centaines de millions d'infections au cours des épidémies saisonnières provoquant, dans les pays industrialisés, une augmentation de l'absentéisme au travail ou à l'école et donc des conséquences économiques importantes (11). De plus, ces infections grippales saisonnières engendrent trois à cinq millions de cas sévères et 290 000 à 650 000 décès par an dans le monde (1). Les virus de type A peuvent également être à l'origine de pandémie dévastatrice dans les populations humaines comme la « grippe espagnole » de 1918 responsable de plusieurs dizaines de millions de morts dans le monde. Depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, quatre pandémies liées aux virus influenzae A ont été enregistrées.

Ces différents éléments font des virus influenzae des pathogènes majeurs pour l'Homme. Il est donc important que le corps médical soit formé à la prise en charge et au diagnostic de ces infections. Dans ce but, nous avons rédigé le chapitre 39 de la seconde édition du *Traité de Virologie Médicale* intitulé « Virus Influenza ». Cet ouvrage a été réalisé en partenariat avec la Société Française de Microbiologie (SFM) et la Société Française de Virologie (SFV) pour actualiser les connaissances en virologie médicale des biologistes, des internes, des étudiants, des enseignants et des cliniciens. Ce document expose les mécanismes des infections virales, la réponse immunitaire élaborées par l'organisme, les traitements curatifs ou préventifs de ces infections et le rôle propre des différentes familles virales en pathologie humaine.

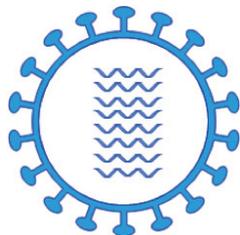
## 1.2. Chapitre d'ouvrage publié

**GAYMARD A., Pichon M., Bouscambert-Duchamp M., Lina B. Chapitre 39 : Virus Influenza.**

**Traité de virologie clinique, 2019.**

Alexandre Gaymard - Maxime Pichon -  
Maude Bouscambert-Duchamp - Bruno Lina

### Virus influenza

<b>Famille :</b> <i>Orthomyxoviridae</i>	
<b>Genres :</b> <i>Influenzavirus A, B, C</i> et <i>D</i>	
<b>Génome :</b> ARN monocaténaire linéaire de polarité négative segmenté (8 segments); 10 à 15 kb au total	<b>Taille :</b> 80 à 120 nm

## 1 - Introduction

La famille des *Orthomyxoviridae* est composée de 7 genres : *Isavirus*, *Quaranzavirus*, *Thogotovirus* et les 4 genres *Influenzavirus A, B, C* et *D*. Bien que les virus influenza de types A, B et C puissent être isolés chez l'être humain, seuls les virus de types A et B sont responsables de la grippe, les virus de type C étant responsables de simples rhinites.

La grippe est une infection respiratoire épidémique survenant chaque hiver dans les régions tempérées et toute l'année dans les régions intertropicales. Cette infection virale entraîne une mortalité et une morbidité très élevées, avec 290 000 à 650 000 décès par an (estimations de l'OMS). Les virus de type A sont classés en sous-types en fonction de leurs glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). Seuls les sous-types A(H1N1) et A(H3N2) sont actuellement responsables d'infections chez l'être humain même si les autres sous-types, d'origine zoonotique, peuvent exceptionnellement l'infecter. Parmi les virus de type B, 2 lignages appelés B/Yamagata et B/Victoria coexistent et cocirculent à l'échelle planétaire depuis les années 1980. La survenue annuelle d'épidémies s'explique par l'évolution permanente de ces virus à ARN, par un mécanisme de glissement antigénique à des rythmes

différents et non linéaires. Ce glissement est le reflet de la modification des glycoprotéines de surface du virus, cibles principales de la réponse immunitaire. Chaque hiver, un virus plus ou moins variant antigéniquement, non reconnu par la réponse immunitaire préexistante de la population, est capable de réinfecter des individus ayant déjà été infectés dans le passé.

Bien que la plupart des infections observées n'entraînent pas de complication, le pouvoir pathogène de ces virus est important. Chez certains individus présentant des facteurs de risque, la grippe peut entraîner des formes graves et un diagnostic rapide devient un enjeu majeur pour une prise en charge adaptée. Des antiviraux spécifiques sont venus compléter efficacement l'arsenal thérapeutique qui ne comportait que le vaccin jusqu'au début des années 2000.

La grande variabilité des virus grippaux, le risque pandémique et leur pouvoir pathogène imposent une surveillance très étroite des virus circulants à la fois chez l'être humain et chez l'animal, ainsi que le développement de nouveaux moyens thérapeutiques ou préventifs.

Dans ce chapitre, nous décrivons uniquement les virus présentant un intérêt en pratique médicale : les virus influenza A et B.

## 2 - Historique

La grippe est une maladie infectieuse particulièrement contagieuse circulant chez l'être humain depuis très longtemps. Les 1<sup>res</sup> descriptions d'épidémies d'infections respiratoires durant plusieurs semaines (évoquant d'épidémies de grippe) ont été faites par Hippocrate en 412 avant J.-C., puis au Moyen Age dans les armées de Charlemagne. C'est en Angleterre, en 1510, qu'a été faite une description précise des épidémies de grippe survenant par épisodes fréquents mais irréguliers et d'intensité variable touchant préférentiellement les personnes âgées.

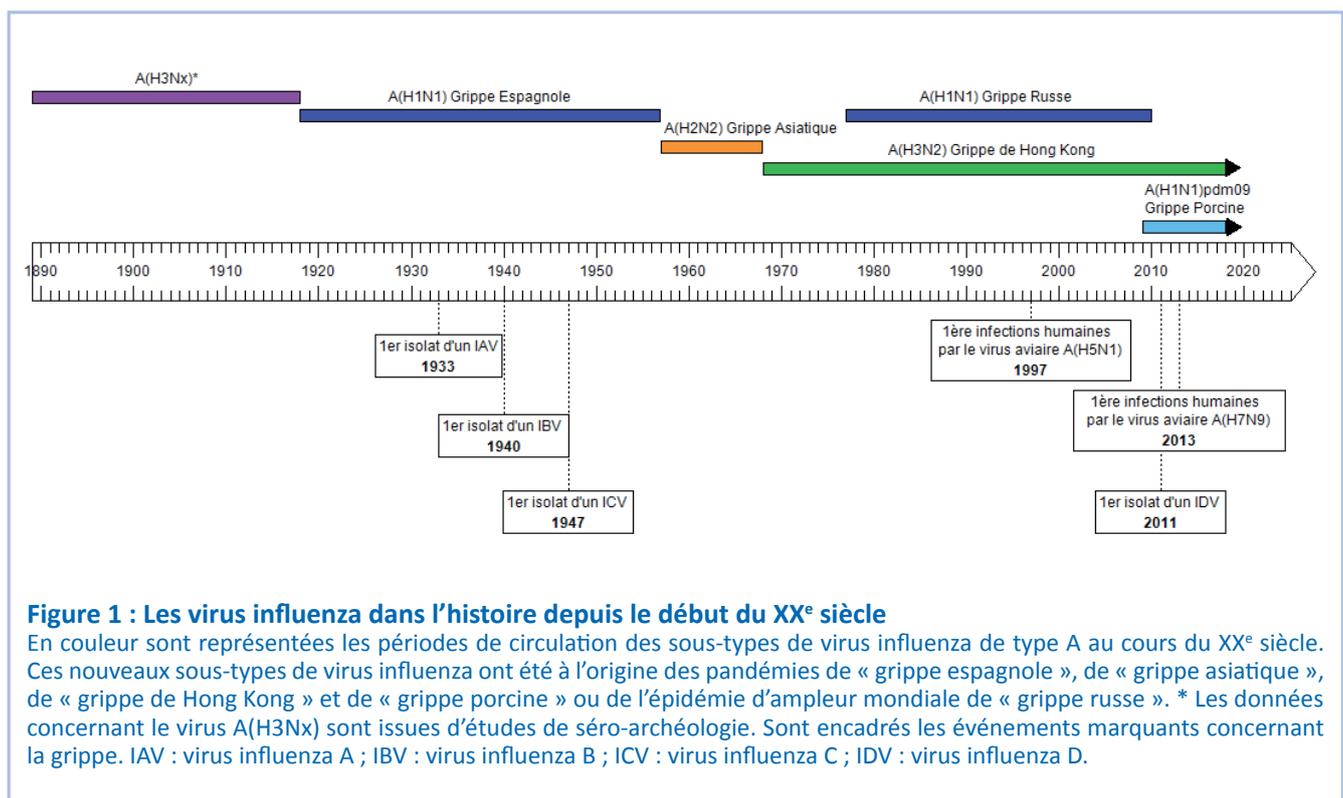
Ensuite, en 1781 puis en 1830, ont été décrites des épidémies massives débutant en Asie avant de diffuser en Russie puis en Europe, rappelant la diffusion mondiale des virus pandémiques. La 1<sup>re</sup> description détaillée d'une pandémie date de 1890, à l'occasion d'une épidémie majeure en Russie due vraisemblablement à un virus A(H3Nx), le type de neuraminidase étant toujours débattu.

Au cours du XX<sup>e</sup> siècle, les connaissances sur la grippe se sont améliorées : distinction entre épidémies saisonnières et pandémies, description de l'agent étiologique d'origine virale par Richard E. Shope en 1920, puis isolement du virus influenza de type A humain par Wilson Smith, Christopher Andrews et Patrick Laidlaw en 1933. Les virus influenza de type B ont été isolés en 1940, de type C en 1947 et de type D plus récemment en 2011 (Fig. 1).

Depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle, plusieurs pandémies ont été décrites chez l'être humain. En 1918, l'émergence d'un virus A(H1N1) a été responsable de la grippe dite « espagnole ». Ce virus, responsable de plusieurs dizaines de millions de décès dans le monde, pourrait provenir directement du réservoir aviaire. En 1957, une 2<sup>e</sup> pandémie dite « asiatique » a été responsable de près d'un million de morts dans le monde. Le virus A(H2N2) issu du réassortiment entre un virus aviaire et le virus circulant A(H1N1) de 1918, s'imposa et circula jusqu'en 1968. Cette année-là, le virus A(H2N2) de 1957 a été remplacé par un virus A(H3N2) responsable de la 3<sup>e</sup> pandémie ou « grippe de Hong Kong » avec environ 4 millions de morts dans le monde. Ce virus pandémique proviendrait également d'un réassortiment entre des virus aviaires et le virus humain circulant A(H2N2). En 1977, la réémergence de virus A(H1N1) proches des virus ayant circulé dans les années 1950 a donné lieu à l'épidémie mondiale dite de la « pseudo-pandémie russe ». Depuis cette date, en plus des virus de type B, cocirculent 2 sous-types de virus de type A chez l'être humain : A(H1N1) et A(H3N2) (Fig. 1).

La 1<sup>re</sup> pandémie du XXI<sup>e</sup> siècle ou « grippe porcine » fut causée par la transmission à l'être humain en 2009 d'un virus A(H1N1) (noté A(H1N1)pdm09) issu d'un réassortiment entre 4 virus dont 3 ne circulant que chez le porc et le virus humain A(H3N2). Depuis 2009, le virus A(H1N1)pdm09 continue à circuler lors des épidémies saisonnières. Il a complètement remplacé les souches A(H1N1) pré-pandémiques (Fig. 1).

De nos jours, la grippe est encore l'une des principales causes de morbidité et de mortalité par maladie infectieuse en France et dans le Monde.



### 3 - Structure du virus

#### 3.1. Nomenclature

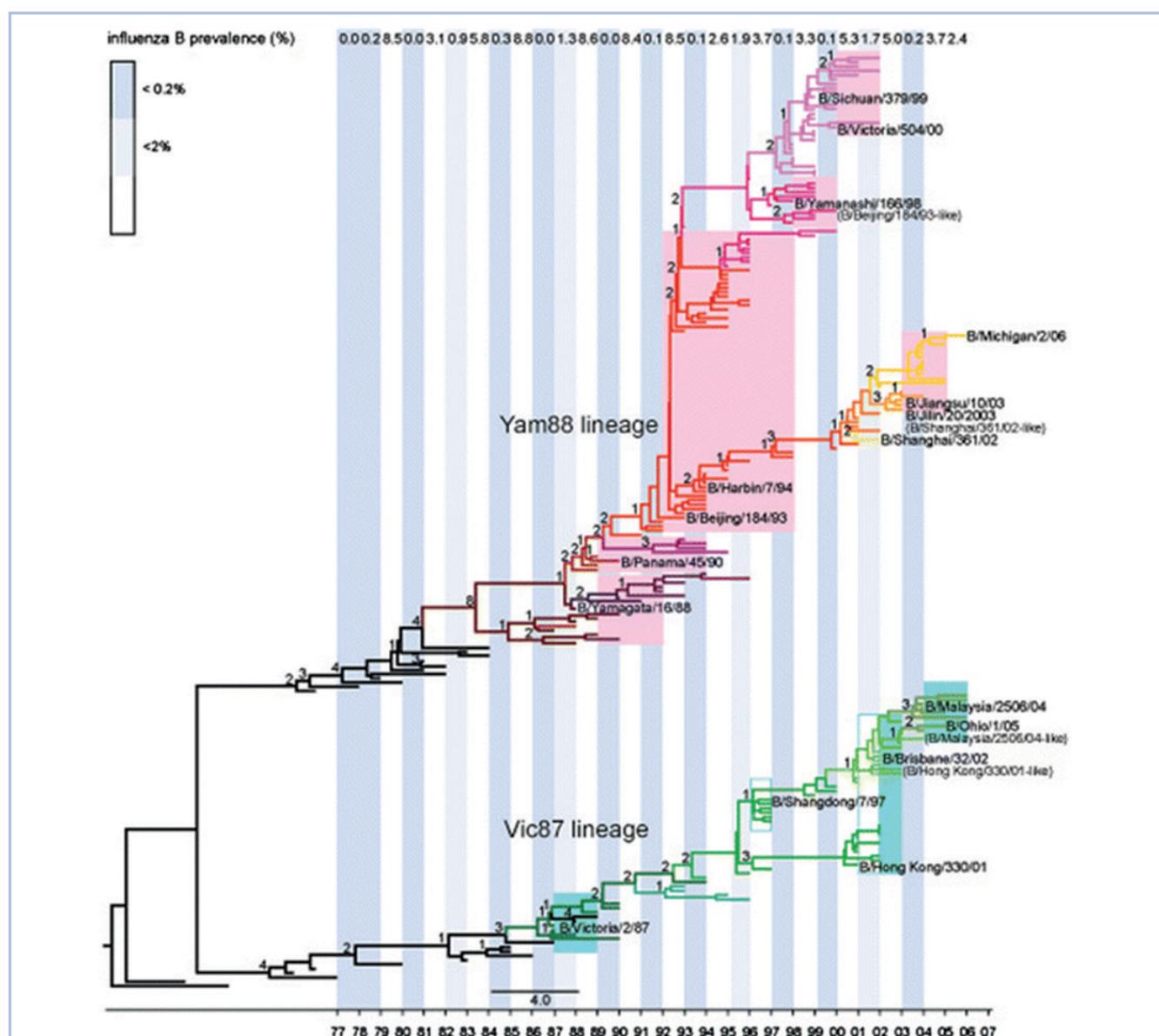
Les types de virus influenza sont définis selon les caractères antigéniques de leur nucléoprotéine (NP) et de leur protéine de matrice (M).

Depuis 1980, les virus influenza sont classés selon la nomenclature internationale de l'OMS : type antigénique viral A, B, C ou D / hôte d'isolement de la souche si non humaine / lieu (ville) d'isolement initial / numéro d'identification de la souche / année du 1<sup>er</sup> isolement ; par exemple C/Paris/1/67. Pour les virus de type A, le sous-type en fonction de la nature antigénique de leur hémagglutinine et de leur neuraminidase (HxNx) complète ce nom : par exemple A/Côte/0608/2018 (H3N2).

La dénomination des virus B se fait sur le même modèle : par exemple B/Phuket/2205/2015. Ces virus se divisent en 2 lignages qui circulent depuis les années 1980 : B/Yamagata et B/Victoria (Fig. 2).

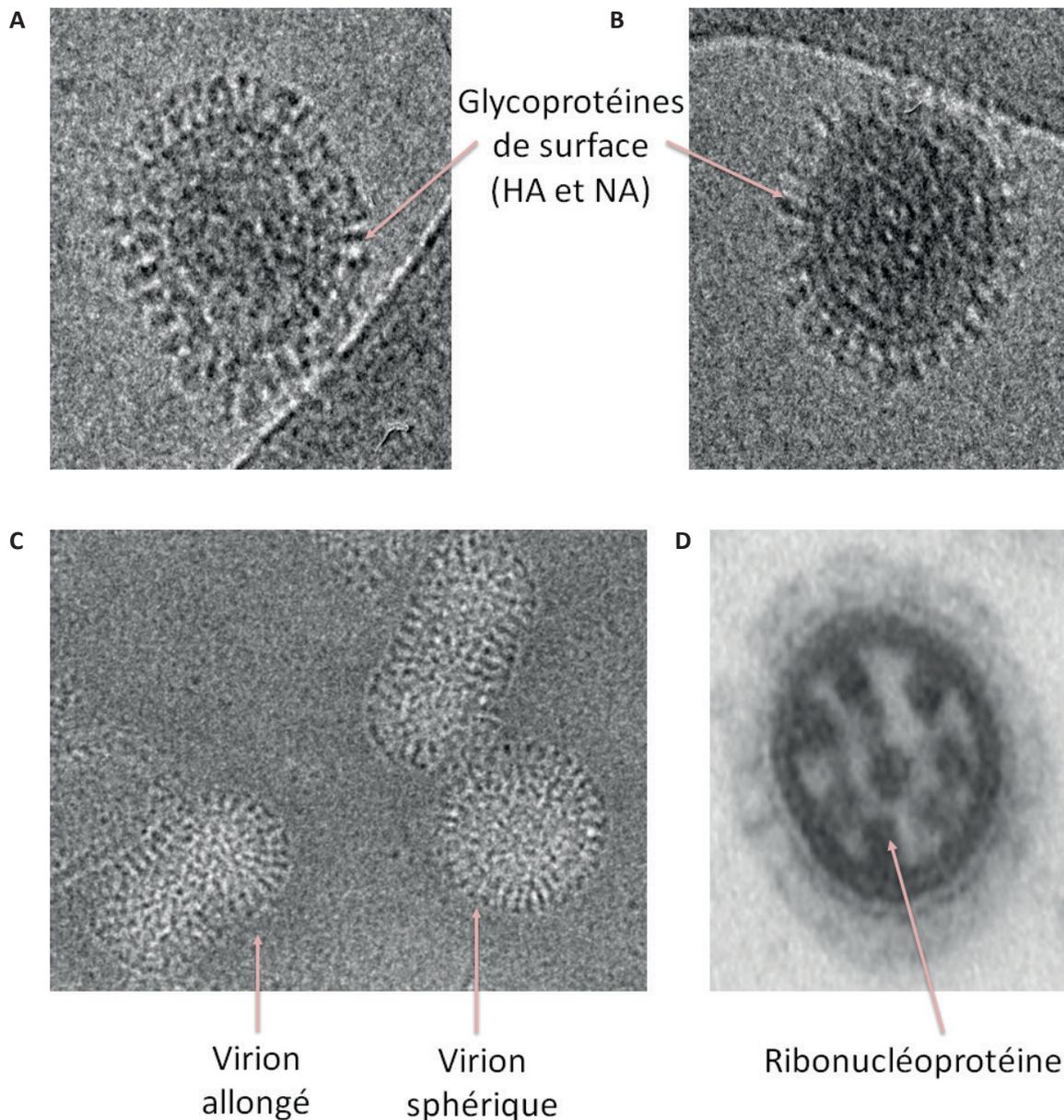
#### 3.2. Structure des virions

Les virions sont majoritairement de forme sphérique, enveloppés, à capsidie hélicoïdale mesurant entre 80 et 120 nm. Les formes plus allongées peuvent atteindre jusqu'à 200 nm (Fig. 3). Trois protéines majeures sont intégrées dans la membrane de la capsidie virale, formant les glycoprotéines de surface des virus de type A : l'hémagglutinine (HA ou H), la neuraminidase (NA ou N) et le canal à proton transmembranaire tétramérique (M2). Ces protéines sont les cibles des anticorps (HA et NA) et des molécules antivirales (NA et M2). Du fait de leur variabilité, notamment sous la pression de sélection immunitaire, l'analyse



**Figure 2 : Evolution génétique des virus influenza B depuis 1977**

L'arbre phylogénétique représenté ci-dessus montre le schéma d'évolution des virus influenza B. Deux lignages de virus influenza B (Victoria [Vic] et Yamagata [Yam]) cocirculent mais n'évoluent pas de la même façon. Le lignage Yamagata évolue beaucoup plus vite avec l'apparition et la cocirculation depuis les années 1990 de 2 clades.



**Figure 3 : Cryo-microscopie électronique de virus influenza de type A**

A et B. Photographies de virions A(H1N1), les spicules à la surface correspondent aux glycoprotéines. C et D : photos de virions A(H3N2) de formes diverses. D : coupe de virion permettant d'observer les 8 ribonucléoprotéines (RNPv).

de séquences de HA et de NA sont utilisées pour les études épidémiologiques. L'enveloppe lipidique du virus, obtenue par bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire est couverte sur sa face interne par des oligomères de protéine de matrice de type 1 (M1) (Fig. 4). Les virus de type B présentent une structure proche avec 4 protéines d'enveloppe : HA, NA et NB-BM2 remplaçant la protéine M2 présente chez les virus de type A.

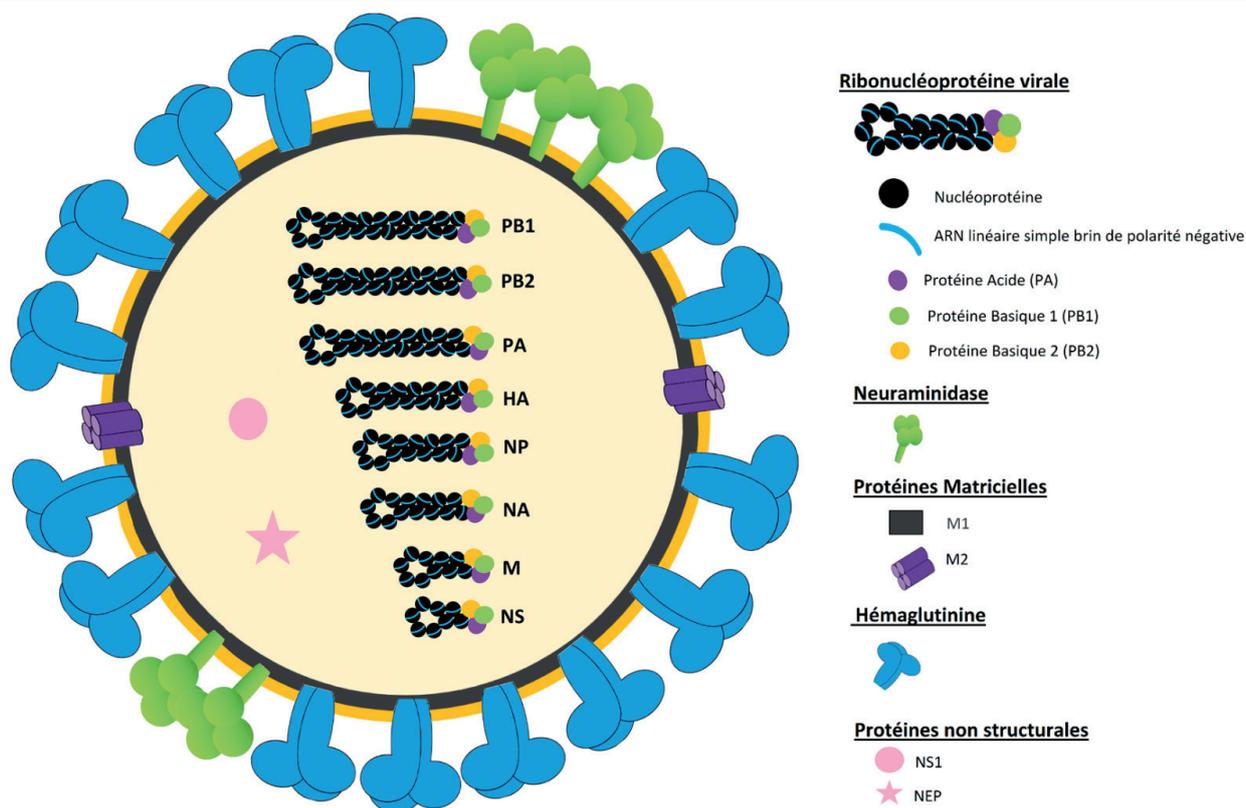
### 3.3. Génome viral et rôle des protéines virales

Le génome des virus influenza est constitué d'un ARN monocaténaire linéaire de polarité négative, d'environ 13,5 kb, pluri-segmenté (8 segments pour les virus de types A et B, et 7 pour les virus de types C et D). Les segments d'ARN viral (ARNv) sont liés à la nucléoprotéine (NP), l'ensemble interagissant

avec les protéines du complexe de la polymérase virale (protéine acide ou PA, protéine basique 1 ou PB1 et protéine basique 2 ou PB2) pour former les ribonucléoprotéines virales (RNPv, Fig. 4). L'ensemble des segments codent jusqu'à 17 protéines virales présentant des fonctions variables (Tab. 1).

### 3.4. Glycoprotéines d'enveloppe

Les virus influenza présentent à leur surface des glycoprotéines possédant des fonctions à la fois complémentaires et antagonistes au cours du cycle de multiplication (Fig. 5). Ces glycoprotéines permettent l'attachement et l'internalisation du virus dans la cellule (HA) mais également sa libération en fin de cycle (NA) grâce à l'utilisation d'une cible cellulaire commune, l'acide sialique (ou acide N-5-acétylneuraminique). Une multiplication virale efficace dépend de la balance



**Figure 4 : Représentation schématique d'un virus influenza de type A**

Les glycoprotéines (hémagglutinine [HA] et neuraminidase [NA]) et la protéine de matrice M2 sont insérées dans l'enveloppe virale. La protéine de matrice M1 tapisse la face interne de l'enveloppe virale qui est également associée à des protéines non structurales : NS1 (protéine non structurale 1) et NEP (protéine d'export nucléaire). La particule virale de type A renferme 8 ribonucléoprotéines constituées des segments d'ARN viral recouverts de nucléoprotéine (NP) et associés au complexe polymérase (PB1, PB2 et PA) (Claire Bulteau).

HA/NA, c'est-à-dire de l'équilibre entre les fonctions de ces glycoprotéines évaluées par la mesure de l'affinité de la HA et de l'activité sialidasique de la NA. La balance HA/NA jouerait un rôle important dans l'évolution des virus au sein d'une espèce, notamment pour l'adaptation d'un virus influenza à un nouvel hôte et pour l'émergence de résistance aux inhibiteurs de la NA (INA). Les acides sialiques sont fixés à l'extrémité des glycoprotéines ou glycolipides cellulaires par des liaisons de type  $\alpha 2,3$  ou  $\alpha 2,6$ . La distribution des acides sialiques  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$  dans l'arbre respiratoire varie en fonction des espèces (voir paragraphe 7.1).

**L'hémagglutinine (HA).** Les HA représentent environ 80% des glycoprotéines de surface des virus A. Les 16 sous-types de HA, dits « classiques », sont répartis en 2 groupes et 4 clades : le groupe 1 contenant les clades H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13, H16) et H9 (H8, H9, H12) et le groupe 2 comprenant les clades H3 (H3, H4, H14) et H7 (H7, H10, H15). Il est à noter que depuis 2013, 2 nouvelles HA ont été décrites chez des virus isolés de chauves-souris (H17 et H18).

Les HA sont organisées en homotrimères dont chaque monomère se compose de 2 chaînes polypeptidiques : la chaîne HA1, composée d'un domaine globulaire contenant un site d'attachement aux acides sialiques (*receptor binding site*, RBS) et des sites antigéniques ; la chaîne HA2, composée d'une tige fibreuse

permettant l'ancrage de la protéine dans l'enveloppe virale et du peptide fusion. La libération de ces chaînes polypeptidiques se fait par clivage d'un précurseur, HA0, par les protéases spécifiques sécrétées par les cellules non ciliées du tractus respiratoire humain et digestif aviaire. L'efficacité du clivage dépend du sous-type de HA, du pH et des protéases présentes dans le milieu. Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (IAHP) (Encadré 2) possèdent une séquence polybasique entre les polypeptides HA1 et HA2 pouvant être clivée par des enzymes ubiquitaires telles que des sérines protéases. Ce clivage facilité permet la multiplication de ces virus en dehors du tractus respiratoire favorisant ainsi la diffusion systémique dans l'organisme infecté.

**La neuraminidase (NA).** Les NA représentent environ 20% des glycoprotéines de surface des virus de type A. Elles sont isolées ou groupées à la surface du virus. Ce sont des enzymes à activité sialidasique hydrolysant le lien entre l'acide sialique et le sucre adjacent. Les NA possèdent 3 rôles majeurs au cours de la multiplication virale. Elles dégradent le mucus riche en acides sialiques, aidant ainsi la progression du virus et l'accès aux cellules épithéliales dans le tractus respiratoire, elles facilitent l'activation des HA et enfin permettent le détachement des nouveaux virions de la surface des cellules hôtes après bourgeonnement.

Tableau 1 : Fonctions des protéines codées par les 8 segments des virus influenza de types A et B

Segment d'ARN viral	Protéine	Fonctions des protéines
1	PB2	Sous-unité du complexe polymérase permettant la reconnaissance de la coiffe en 5' des ARNm
2	PB1	Sous-unité du complexe polymérase permettant l'élongation de l'ARNm
	PB1-F2 <sup>a</sup>	Activité pro-apoptotique et facteur de virulence
	PB1-N40 <sup>a</sup>	Régulation de l'expression de PB1 par rapport à PB1-F2
3	PA	Sous-unité du complexe polymérase avec activité endonucléasique
	PA-X <sup>a</sup>	Modulation de la réponse immunitaire et facteur de virulence
	PA-N155 <sup>a</sup>	Fonction inconnue
	PA-N182 <sup>a</sup>	Fonction inconnue
4	HA	Glycoprotéine de surface et antigène majeur ayant un rôle dans la liaison aux acides sialiques et dans la fusion membranaire
5	NP	Rôle dans la liaison, la synthèse et l'export nucléaire des ARN
6	NA	Glycoprotéine de surface avec une activité sialidasique permettant la libération des virions
	NB <sup>b</sup>	Glycoprotéine servant de canal ionique
7	M1	Protéine de matrice permettant l'export nucléaire des RNPv et le bourgeonnement
	M2 <sup>a</sup>	Canal à proton permettant la fusion membranaire et l'assemblage du virion
	BM2 <sup>b</sup>	
	M42 <sup>a</sup>	
8	NS1	Inhibition de la réponse antivirale par antagonisme de l'IFN et rôle dans l'expression cellulaire des ARNm
	NEP (ou NS2)	Export nucléaire des RNPv
	NS3 <sup>a</sup>	Rôle dans l'adaptation du virus à la souris ?

<sup>a</sup> concerne les virus de type A et <sup>b</sup> concerne les virus de type B. HA : hémagglutinine ; M : matrice ; NA : neuraminidase ; NEP : protéine d'export nucléaire ; NS : protéine non structurale ; PA : protéine acide ; PB : protéine basique ; RNPv : ribonucléoprotéine virale.

Les 10 sous-types de NA, dits « classiques », sont classés en 3 groupes : le groupe 1 (N1, N4, N5 et N8), le groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9) et le groupe 3 composé des NA des virus de type B. Comme pour les HA, 2 nouvelles NA ont été décrites chez des virus isolés de chauves-souris en 2013 (N10 et N11).

La NA est un homotétramère dont chaque monomère se divise en une tige ancrée dans l'enveloppe virale et une tête globulaire portant un site actif qui se fixe aux acides sialiques. Seule la forme tétramérique de la NA présente une activité enzymatique qui dépend des conditions environnementales telles que la température et/ou le pH.

### 3.5. Nucléoprotéine (NP), complexe polymérase (PA, PB1 et PB2) et protéines mineures

La NP est une des protéines les plus abondantes dans la particule virale et chaque molécule de NP peut s'associer à 24 nucléotides. Cette protéine se fixe à l'ARNv en exposant ses bases vers l'extérieur et permet la formation des RNPv. La NP possède également 2 signaux de localisation nucléaire permettant l'import nucléaire des RNPv.

Le complexe de l'ARN polymérase ARN-dépendante est un hétérotrimère formé de 3 protéines : 2 protéines basiques (PB1 et PB2) et une protéine acide (PA).

La protéine PB1 porte le domaine catalytique de l'activité ARN polymérase ARN-dépendante, ainsi que 2 sites de liaison : un pour les ARNv et un pour les ARNm. La protéine PB2 se lie à la coiffe des ARNm cellulaires avant clivage par la protéine PA (Fig. 5). La protéine PA joue un rôle dans la localisation nucléaire de la synthèse d'ARNv, l'activité de réplication de la polymérase et l'assemblage du génome au moment du bourgeonnement.

La plupart des virus de type A aviaires et humains possèdent une protéine PB1-F2 codée par le segment 2 (Tab. 1) sur un cadre de lecture alternatif en aval de l'ARNm de PB1. L'expression de cette protéine est corrélée à une excrétion massive de virus sans modification de pathogénicité notable. Toutes les souches pandémiques humaines qui contiennent un segment PB1 d'origine aviaire, A(H1N1) de 1918, A(H2N2) de 1957 et A(H3N2) de 1968, codent une PB1-F2 fonctionnelle. La protéine PB1-F2 possède une activité pro-apoptotique sur les cellules monocytaires et neutrophiles, après recrutement par activation de la voie NF- $\kappa$ B pro-inflammatoire. Il est démontré, dans le modèle murin, que PB1-F2 favorise la surinfection pulmonaire par les bactéries à Gram positif.

PB1-N40 est la forme tronquée à l'extrémité N-terminale de PB1. Cette protéine découverte en 2009 a été observée dans de nombreuses souches de virus influenza A issues de différentes espèces. PB1-N40 ne semble pas indispensable à la multiplication du virus mais permet une régulation de l'expression des protéines PB1 et PB1-F2, favorisant la multiplication virale.

Chez le virus A(H1N1)pdm2009, le domaine N-terminal de la protéine PA (PA-X) a été identifié comme un facteur responsable de la suppression de l'expression de certains gènes cellulaires permettant une modulation de la réponse immunitaire. Cette protéine est un facteur de virulence.

Enfin, PA-N155 et PA-N182 sont 2 formes tronquées à l'extrémité N-terminale de PA. Ces protéines ont été détectées dans plusieurs souches de virus influenza A issues de différentes espèces. Ces protéines n'ont pas d'activité polymérase et leur rôle n'a pas encore pu être déterminé.

### 3.6. Protéines de matrice (M1 et M2)

La protéine M1 tapisse la totalité de la surface interne de l'enveloppe virale pour en assurer la rigidité, formant ainsi des liaisons avec la partie intracellulaire des glycoprotéines HA et NA ainsi qu'avec les RNPv. L'accumulation membranaire de la protéine M1 en fin de cycle viral est une étape cruciale de la maturation des virus.

Pour les virus de type A, les tétramères de protéines M2 forment un canal à proton transmembranaire permettant l'acidification de la particule virale indispensable pour le changement de conformation de la HA lors de la décapsidation (Fig. 5).

La protéine M42 est un variant de la protéine M2, transcrite à partir d'un 2<sup>nd</sup> codon d'initiation. Ce variant n'est présent que dans une minorité de souches du virus influenza A mais il conserve les domaines majeurs de la protéine M2 lui conférant donc la même fonction.

Les virus influenza de type B possèdent 2 canaux ioniques formés par la protéine BM2 et la protéine NB codées par 2 segments différents (Tab. 1).

### 3.7. Protéines non structurales (NS1 et NEP)

NS1 est une protéine non structurale du virion exprimée à de très fortes concentrations dans le noyau de la cellule infectée. Cette protéine est un facteur de virulence par ses fonctions de régulation de la synthèse d'ARNm cellulaires et d'inhibition du système IIFN et elle joue aussi un rôle dans la régulation de la morphologie du virion.

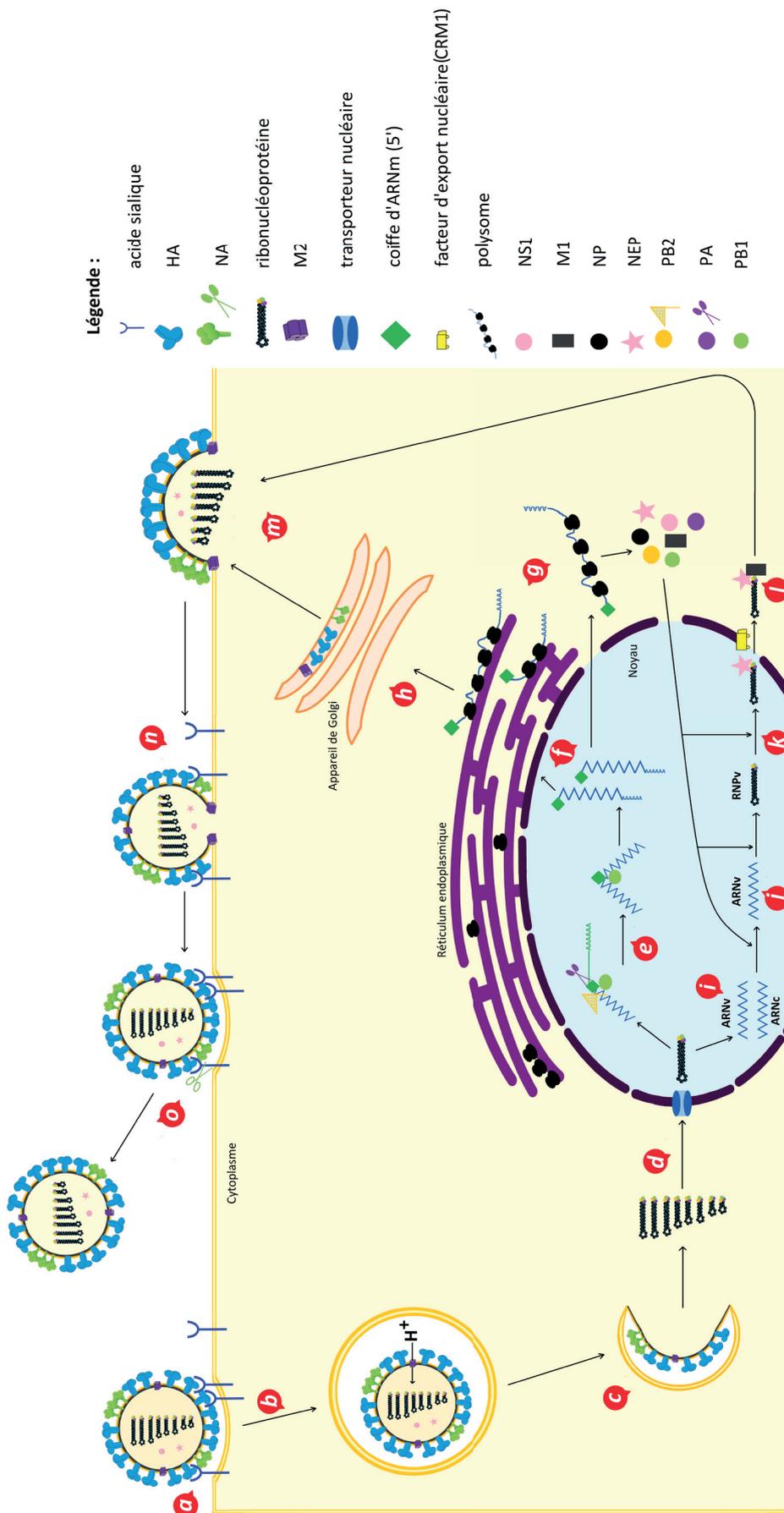
La protéine d'export nucléaire (*nuclear export protein*, NEP) (anciennement NS2) joue un rôle dans la sortie des ARNv hors du noyau puis dans le transport des RNPv vers la membrane cellulaire, en interagissant avec la protéine M1 dans le cytoplasme (Fig. 5). En effet, NEP possède un domaine reconnu par un facteur cellulaire d'export nucléaire, le CRM1 (*chromosome region maintenance protein 1*).

NS3 est une isoforme de la protéine NS1 observée dans une minorité de souches du virus influenza A. L'expression de cette protéine est généralement associée à l'adaptation de la souche virale à un nouvel hôte. Elle a été principalement observée lors de l'adaptation de souches humaines chez la souris.

## 4 - Multiplication du virus : de la cellule au modèle animal

### 4.1. Cycle de multiplication cellulaire

Le virus se fixe à la cellule cible grâce aux interactions entre la HA et les acides sialiques. Après fixation, le virus est internalisé dans la cellule hôte par endocytose. L'environnement acide de la vésicule endosomale va alors jouer 2 rôles fondamentaux : i) initiation du changement conformationnel des HA permettant l'exposition du peptide de fusion situé à l'extrémité N-terminale de la chaîne HA2, et ii) ouverture du canal à protons M2 permettant l'acidification de la particule virale. L'activation du peptide de fusion de la HA va enclencher le rapprochement et la fusion de la membrane endosomale avec l'enveloppe virale. L'acidification de la particule virale induit également la séparation des RNPv de la couche protéique M1 et la libération des segments viraux dans le cytoplasme cellulaire. Les protéines constituant les RNPv (NP et complexe polymérase) possèdent des signaux reconnus par les facteurs de transport nucléaires



**Figure 5 : Cycle de multiplication des virus influenza de type A**

a) Fixation de l'hémagglutinine (HA) virale sur les récepteurs cellulaires : les acides sialiques. b) Pénétration du virus par endocytose. c) Acidification de la particule virale par entrée de protons via le canal M2 permettant le changement de conformation de la HA et la fusion entre membrane virale et membrane endosomale. d) Libération et translocation des ribonucléoprotéines virales (RNPv) vers le noyau. e) Capture de la coiffe sur des ARNm cellulaires : la sous-unité PB2 se lie à la coiffe des ARNm cellulaires qui sera clivée par la sous-unité PA. La récupération de cette coiffe permet l'initiation de la polymérisation des ARNm viraux par la sous-unité PB1. f) Les ARNm viraux sont polyadénylés puis exportés vers le cytoplasme. g) Traduction des ARNm viraux en protéines par les ribosomes cellulaires soit dans le cytoplasme pour la production de PB2, PB1, PA, NP, M1, NS1 et NEP, soit dans le réticulum endoplasmique pour les protéines HA, NA et M2. h) Maturation et transport des protéines membranaires (HA, NA et M2) via l'appareil de Golgi. i) Synthèse d'un ARN complémentaire de polarité positive (ARNc) à partir des ARN viraux de polarité négative (ARNv). j) Synthèse d'un ARNv à partir des ARNc. k) Association des ARNv néoformés au complexe polymérisase (PB1, PB2 et PA), à des nucléoprotéines (NP) pour reformer des RNPv qui, en présence de NEP, vont être exportées vers le cytoplasme grâce au facteur d'export nucléaire (*chromosome region maintenance protein-1*, CRM1). l) Association dans le cytoplasme à la protéine M1 qui assurera le transport des RNPv en direction de la zone de bourgeonnement. m) Migration et assemblage de tous les composants viraux au niveau des radeaux lipidiques de la cellule. n) Bourgeonnement. o) Libération des virions par clivage des acides sialiques grâce à l'action de la neuraminidase (NA) (Claire Bulteau).

de la cellule hôte permettant le transit des RNPv du cytoplasme vers le noyau. Après le passage des pores nucléaires, les ARNv vont servir de matrice pour la transcription et la réplication.

La transcription en ARNm commence par la capture par le complexe polymérase d'une coiffe présente sur les ARNm cellulaires. La sous-unité PB2 se lie à la coiffe des ARNm cellulaires qui sera clivée par la sous-unité PA. La récupération de la coiffe permet l'initiation de la polymérisation des ARNm viraux par la sous-unité PB1. A la fin de la transcription, les ARNm viraux sont polyadénylés puis exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines. La synthèse de PB2, PB1, PA, NP, M1, NS1 et NEP se fait directement dans le cytoplasme, tandis que celle des protéines ancrées dans l'enveloppe virale (HA, NA et M2) se fait dans le réticulum endoplasmique. Ces protéines membranaires subissent ensuite des modifications post-traductionnelles puis sont transportées *via* l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire.

Les ARNv vont également être utilisés pour la réplication du génome viral par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité positive (ARNc). Les ARNc restent dans le noyau et s'associent aux protéines NP et au complexe polymérase pour former des RNP complémentaires (RNPc). Enfin, les RNPc vont servir de matrice à la synthèse des ARNv de polarité négative pour reformer des RNPv.

L'export nucléaire des RNPv vers le site d'assemblage est possible grâce à des interactions entre les ARNv, la protéine NEP et un facteur cellulaire d'export nucléaire, le CRM1. Une fois dans le cytoplasme, la protéine NEP présente sur les RNPv va interagir avec la protéine M1 pour permettre le transport du génome viral vers la surface cellulaire. L'assemblage des particules virales se fait de façon ordonnée au niveau des radeaux lipidiques de la membrane cytoplasmique et se termine par le bourgeonnement des virions grâce aux interactions entre les protéines M1, M2 et les parties cytoplasmiques des glycoprotéines. À l'extérieur de la cellule, les virions sont libérés par l'activité sialidasique des NA.

Ce cycle de multiplication virale est similaire pour tous les types de virus influenza (Fig. 5). Pour les virus de type B, l'acidification de la particule virale se fait, comme pour les virus de type A, par l'activation de canaux ioniques : les protéines NB et BM2.

## 4.2. Modèles de cultures cellulaires

Différentes lignées cellulaires sont utilisées pour l'isolement des virus influenza, ainsi que des autres virus respiratoires : LLC-MK2 (cellules de rein de singe rhésus), Vero (cellules de rein de singe vert africain), A549 (cellules de carcinome de poumon humain), Hep-2 (cellules de carcinome de larynx humain) et MRC-5 (fibroblastes embryonnaires de poumon humain). Certaines lignées sont spécifiquement dédiées à la culture des virus influenza comme les MDCK (cellules

de rein de chien Madin-Darby) qui sont les plus performantes pour l'amplification de ce virus. En effet, ces cellules possèdent à leur surface de nombreux acides sialiques  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$  (voir paragraphe 7.1). Par ailleurs, les cellules 293T (cellules embryonnaires de rein humain) sont utilisées dans des protocoles de recherche de génétique inverse pour la production de virus recombinants. Des lignées modifiées ont également été développées telles que les MDCK-SIAT qui surexpriment par rapport aux cellules MDCK standards, les acides sialiques  $\alpha 2,6$ . Ces lignées favorisent l'infection cellulaire par des virus influenza humains et réduisent le risque d'apparition de mutations d'adaptation sur l'hémagglutinine du virus amplifié en cas de passages successifs sur cellules. Plus récemment ont été développés des systèmes de culture en 3 dimensions constitués de protéines et de composants de matrice extracellulaire. Ces systèmes permettent de reproduire plus fidèlement l'expression protéique, la prolifération, la différenciation et le métabolisme des cellules au cours de l'infection.

## 4.3. Modèles animaux

Plusieurs modèles animaux existent et sont utilisés pour diverses applications. Leur sensibilité à l'infection virale, les sites de multiplication des virus, le développement de symptômes et la létalité dépendent de la nature et de la répartition des récepteurs acides sialiques dans l'organisme de chaque animal.

Bien que la souris ne soit pas naturellement infectée par les virus influenza, elle est un modèle largement répandu pour l'étude moléculaire des interactions virus-hôte. La plupart des virus influenza humains n'entraînent pas de maladie létale sans adaptation préalable. En revanche, les virus aviaires se multiplient dans le tractus respiratoire de la souris. Le développement des souris *knock-out* permet de mieux comprendre la contribution de la génétique et de la réponse immunitaire de l'hôte dans la virulence et la pathogénicité des virus influenza.

Le furet est le modèle animal de choix pour l'étude de la clinique et de la transmissibilité des virus influenza. En effet, le furet infecté par un virus influenza développe une rhinite fébrile plus ou moins associée à des atteintes bronchiques et pulmonaires.

Le cobaye est également un modèle intéressant pour l'étude de la transmission des virus influenza et de leur pathogénicité. Les virus humains, porcins et aviaires peuvent être détectés dans les poumons et le nasopharynx des animaux infectés, suggérant une multiplication efficace du virus, sans pour autant présenter de signes cliniques de la maladie. Ces animaux ne meurent pas d'infection grippale, même après infection par des souches très pathogènes telles que le virus A(H5N1) hautement pathogène ou le virus A(H1N1) pandémique de 1918.

Les virus influenza infectent divers primates non humains tels que les chimpanzés, les gibbons, les

babouins, les macaques crabiers (ou cynomolgus), les rhesus et les singes-écureuils. Ces animaux développent des symptômes de grippe identiques à ceux observés chez l'être humain et constituent donc d'excellents modèles pour étudier la pathogénicité des virus influenza bien qu'ils soient plus difficiles à utiliser (coût, conditions de confinement ...). Des travaux ont déjà été réalisés dans ces modèles pour évaluer la pathogénicité des virus influenza A(H1N1) de 1918, A(H5N1) aviaires et, plus récemment A(H1N1)pdm09.

## 5 - Épidémiologie des infections grippales humaines

### 5.1. Circulation, saisonnalité et impact des virus influenza

La grippe est une maladie infectieuse virale aiguë associée chaque année à une morbidité et une mortalité très importantes. A l'échelle mondiale, l'OMS recense entre 3 et 5 millions de cas sévères et 290 000 à 650 000 décès par an. En France, au cours de l'épidémie grippale 2016-2017 qui a duré 6 semaines, plus de 2 millions de consultations ambulatoires, 40 000 admissions aux urgences et 7 600 hospitalisations ont été enregistrées. Parmi les patients hospitalisés, 1 sur 5 (1 300) a présenté une forme sévère nécessitant une prise en charge en réanimation. En plus de l'impact médical, la grippe est associée à un coût financier annuel majeur (plus de 100 millions d'euros) pour la société (arrêts de travail, absentéisme pour garde d'enfants ...).

Chaque épidémie saisonnière est différente, allant de la circulation d'un seul sous-type de virus de type A ou B à la cocirculation de 2 à 3 virus (Fig. 6). Dans tous les pays tempérés de l'hémisphère Nord, l'épidémie de grippe saisonnière peut débuter dès le mois de décembre et durer 6 à 12 semaines. Dans les zones tempérées de l'hémisphère Sud, l'épidémie de grippe est observée pendant l'hiver austral (juin à septembre) selon une dynamique similaire à celle de l'hémisphère Nord. Enfin, dans les zones tropicales et intertropicales, le virus circule toute l'année, préférentiellement durant la saison humide. Il arrive donc qu'il y ait dans ces régions, 2 pics épidémiques significatifs durant la même année. Ainsi, les zones tempérées sont probablement « réensemencées » chaque hiver à partir des zones intertropicales.

### 5.2. Mécanismes d'évolution des virus influenza

Les virus influenza connaissent une évolution génétique et antigénique rapide. En effet, sous la pression de sélection immunitaire de la population humaine principalement, les glycoprotéines de surface HA et NA évoluent selon 2 mécanismes : la dérive antigénique ou « *drift* » et, plus rarement, la cassure antigénique ou « *shift* ».

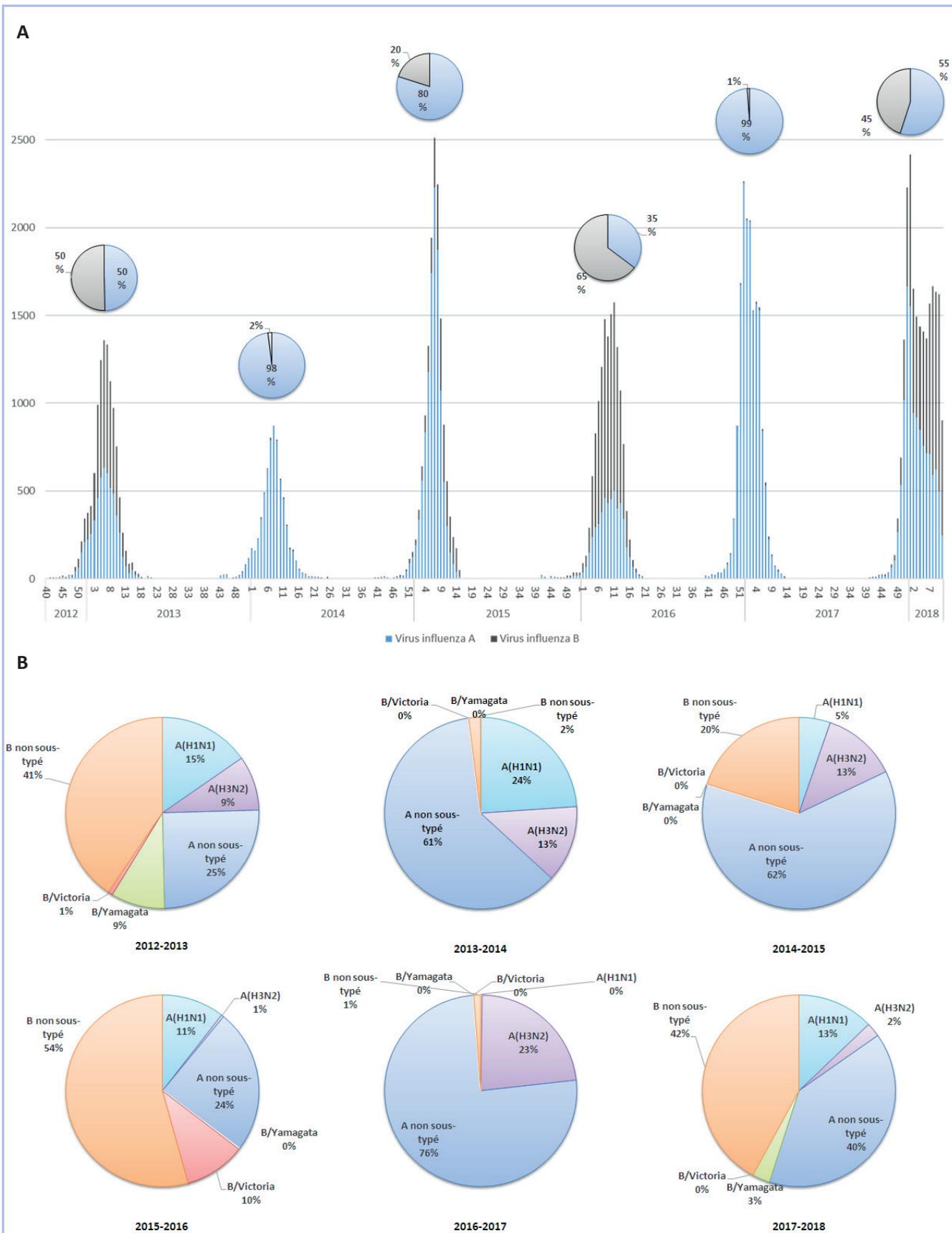
**Dérive antigénique.** La dérive antigénique s'explique par des modifications mineures ou majeures au niveau des acides aminés des sites antigéniques d'au moins 1 des 2 glycoprotéines de surface (HA et/ou NA). Ces substitutions d'acides aminés sont très fréquentes pour les virus influenza car ils possèdent une ARN polymérase ARN-dépendante sans fonction correctrice, ce qui entraîne des mutations aléatoires à la fréquence de 1/10 000 nucléotides.

Les HA et NA humaines évoluent bien plus rapidement que les segments internes (PB2, PB1, PA, NP et M1) car la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte est plus importante vis-à-vis de ces protéines de surface. Chez l'être humain, une dérive antigénique est observée pour les 3 types de virus selon des modèles différents (Fig. 7). Par exemple, les virus influenza du type A évoluent rapidement au sein d'un même sous-type. Ceci explique que le virus circulant durant un hiver n'est pas totalement neutralisé par les anticorps de la population parce qu'il est différent du virus responsable de l'épidémie de l'hiver précédent. Les virus du types B et C évoluent plus lentement.

**Cassure antigénique et émergence d'un virus pandémique.** Une cassure antigénique survient quand le changement observé modifie le sous-type de la HA ou de la NA du virus. Généralement, elle est le résultat d'un phénomène de réassortiment génétique suite à l'échange de segments d'ARN génomique lors de la coinfection d'une même cellule par 2 virus influenza A différents (voir chapitre 2). Les 2 génomes issus de chacun des virus influenza sont alors répliqués puis transcrits dans les mêmes compartiments cellulaires (Fig. 5) et vont pouvoir s'associer en fin de cycle pour donner un nouveau virion potentiellement composé d'un mélange de segments d'origines différentes. Lorsque ce nouveau virus arbore une glycoprotéine différente des virus circulant dans la population humaine, il s'agit d'un nouveau sous-type viral potentiellement pandémique.

Ce phénomène de réassortiment génétique peut être observé entre des virus issus d'hôtes différents. Par exemple, le réassortiment entre des virus humains et aviaires est à l'origine des virus pandémiques A(H2N2) de 1957 et A(H3N2) de 1968 tandis que le virus pandémique A(H1N1) de 2009 est issu d'un quadruple réassortiment entre des virus d'origines différentes (porcine, aviaire et humaine) (Fig. 8).

Une cassure antigénique peut également être observée lors de l'apparition de changements majeurs au niveau des HA ou NA d'un virus influenza A à l'origine de l'émergence d'un nouveau virus dans une population immunologiquement naïve vis-à-vis de ce sous-type. En 1918, un virus A(H1N1) aviaire s'est progressivement adapté à l'être humain suite à une modification majeure du site de reconnaissance RBS de son hémagglutinine. Ce virus aviaire a été introduit chez l'être humain par transmission directe depuis le réservoir aviaire provoquant ainsi la pandémie de « grippe espagnole » de 1918 (Fig 1).



**Figure 6 : Circulation des virus influenza de types A et B en France entre 2012 et 2018**

A. L'histogramme représente la circulation des virus influenza A et B (nombre de prélèvements positifs par semaine) en fonction des semaines entre 2012 et 2018. Pour chaque saison un diagramme circulaire résume les pourcentages de virus influenza A et B détectés. B. Pourcentages relatifs de circulation des sous-types viraux en France pour chaque saison de 2012 à 2018 (données du réseau OMS, FluNet).

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<b>Influenza A(H3N2)</b>																				
A/Sydney/5/97	■	■																		
A/Moscow/10/99			■	■	■	■	■													
A/Fujian/411/2002							■													
A/California/7/2004								■												
A/Wisconsin/67/2005									■	■										
A/Brisbane/10/2007											■	■								
A/Perth/16/2009													■	■						
A/Victoria/361/2011															■	■				
A/Texas/50/2012																■	■			
A/Switzerland/9715293/2013																		■		
A/Hong_Kong/4801/2014																			■	■
<b>Influenza A(H1N1)</b>																				
A/Beijing/262/95	■	■																		
A/New_Caledonia/20/99			■	■	■	■	■	■	■	■										
A/Solomon_Islands/3/2006											■									
A/Brisbane/59/2007												■	■							
A/California/7/2009													■	■	■	■	■	■	■	■
A/Michigan/45/2015																				■
<b>Influenza B</b>																				
B/Beijing/184/93 (Yam)	■	■	■																	
B/Sichuan/379/99 (Yam)				■																
B/Hong_Kong/330/2001 (Vic)					■	■														
B/Shanghai/361/2002 (Yam)							■	■												
B/Malaysia/2506/2004 (Vic)									■	■										
B/Florida/4/2005 (Yam)											■									
B/Brisbane/60/2008 (Vic)												■	■	■	■	■	■	■	■	■
B/Wisconsin/1/2010 (Yam)															■	■				
B/Massachusetts/2/2012 (Yam)																■	■			
B/Phuket/3073/2013 (Yam)																		■	■	■

**Figure 7 : Evolution de la composition vaccinale au cours du temps**

Liste des souches prototypes sélectionnées dans la composition vaccinale de 1998 à 2017. Ces modifications annuelles sont le reflet de l'évolution antigénique des virus influenza. Les virus A(H3N2) évoluent plus rapidement que les virus A(H1N1). En 2009, le virus prototype du virus pandémique A(H1N1)pdm09 (A/California/7/2009) a remplacé les souches A(H1N1) pré-pandémiques. Ce virus a peu évolué pendant 7 ans par l'absence de pression de sélection dans une population encore partiellement naïve. Depuis 2017, il évolue progressivement. Concernant les virus de type B, le graphique évoque une évolution rapide mais il s'agit en fait d'une alternance de souche B/Victoria ou B/Yamagata dans la composition du vaccin trivalent. Depuis 2012, l'OMS propose 2 souches de virus B pour la formulation de vaccins quadrivalents (la souche représentée en violet foncé est présente dans les vaccins tri- et quadrivalent et la souche représentée en violet clair est présente uniquement dans les formulations quadrivalentes).

### 5.3. Réseaux de surveillance des virus influenza et de la grippe

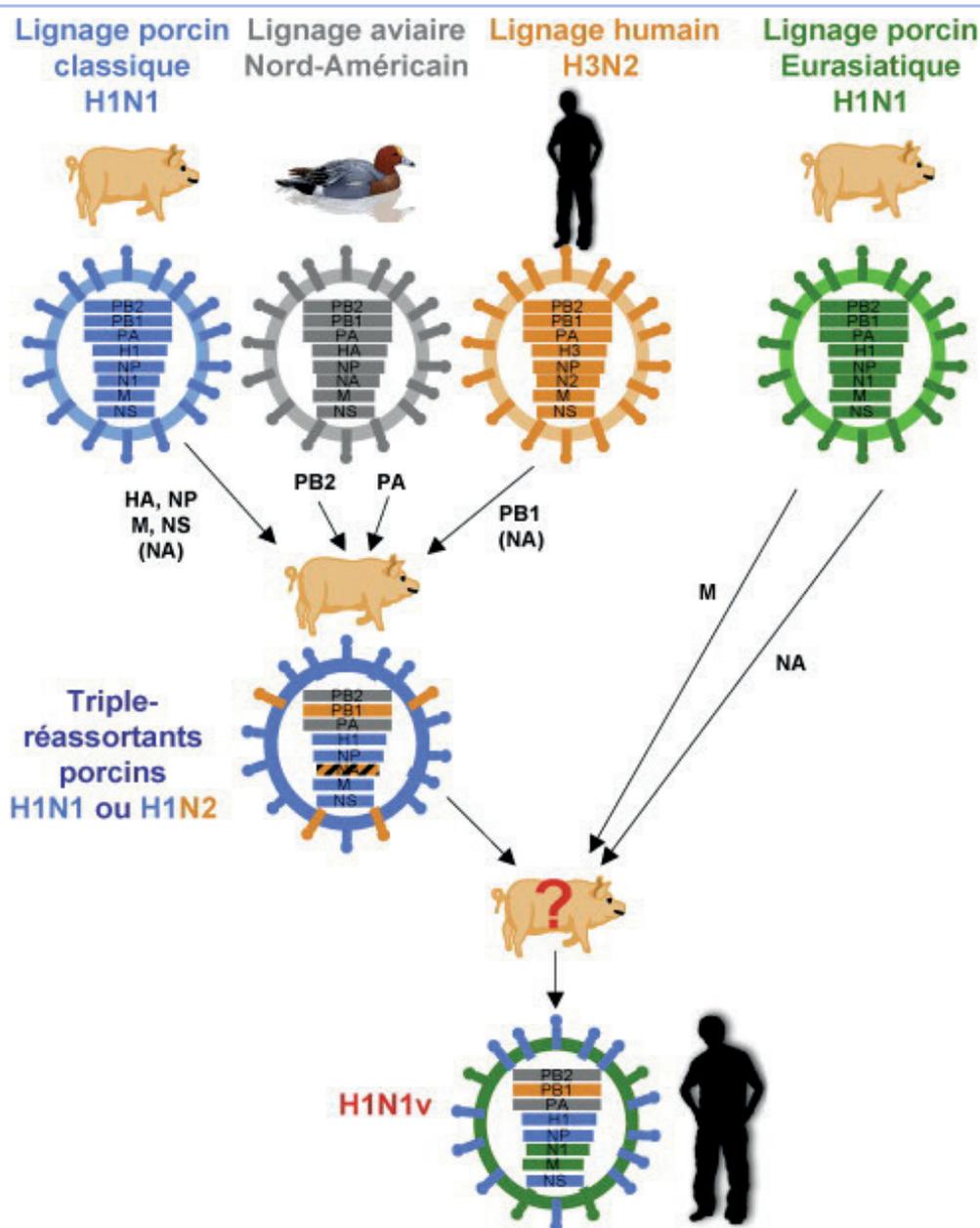
En raison de leur variabilité et du risque d'émergence de nouveaux virus, les virus influenza sont parmi les virus les plus surveillés à l'échelle mondiale. La surveillance virologique des virus influenza a pour objectifs : i) la détection et la caractérisation des 1<sup>ers</sup> virus circulant chaque année ; ii) l'identification de la population cible (âge) ; iii) le suivi hebdomadaire du nombre de cas ; et iv) l'évolution des virus influenza circulants sur le territoire ainsi que l'étude des variations antigéniques et génétiques des virus circulants pour évaluer la concordance entre virus circulants et vaccins. Cette dernière mission suppose aussi d'envoyer des souches représentatives de l'épidémie vers les centres de référence mondiaux de l'OMS afin de déterminer la composition vaccinale pour l'hiver suivant. Enfin, les CNR doivent aussi

caractériser des virus émergents (virus zoonotiques isolés chez l'être humain par exemple) et donner l'alerte en cas d'apparition d'un événement inhabituel (comme l'émergence de résistance aux antiviraux, de formes cliniques inhabituelles ou d'émergence et/ou la diffusion d'un virus zoonotique). Les acteurs de la surveillance sont exposés dans l'encadré 1.

## 6 - Physiopathologie et pouvoir pathogène chez l'être humain

### 6.1. Pouvoirs infectieux et pathogène

La grippe est une infection des voies aériennes supérieures pouvant évoluer vers une infection des voies aériennes inférieures. Le principal site



**Figure 8 : Origine du virus influenza A(H1N1)pdm09**

Des analyses phylogénétiques ont permis d'établir l'origine de chacun des segments du virus pandémique A(H1N1) pdm2009. Les segments NA et M dérivent d'un virus porcin du lignage eurasiatique. Les autres segments dérivent d'un virus porcin A(H1N1) ou A(H1N2) « triple réassortant porcin » qui est constitué de segments d'origines aviaire (PB2 et PA), humaine (PB1 d'un virus A(H3N2)) et porcine (HA, NP, M, NS) dérivant d'un virus A(H1N1) du lignage classique (Munier *et al.*, *Pathol Biol*, 2010).

de multiplication des virus est l'épithélium de la muqueuse du nasopharynx (Fig. 9). L'infection peut ensuite se propager de proche en proche le long de l'arbre respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires et provoquer un tableau de pneumonie virale dont la complication ultime est le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA).

## 6.2. Mode de transmission

La transmission est principalement aérienne mais elle peut être également manuportée. La transmission se fait par inhalation ou contact au niveau des conjonctives de gouttelettes de salive infectée. Le patient infecté est contagieux durant 5 à 8 j, avec un maximum d'excrétion virale à 48 h. Il est également

contagieux 12 à 24 h avant le début des symptômes (Fig. 10).

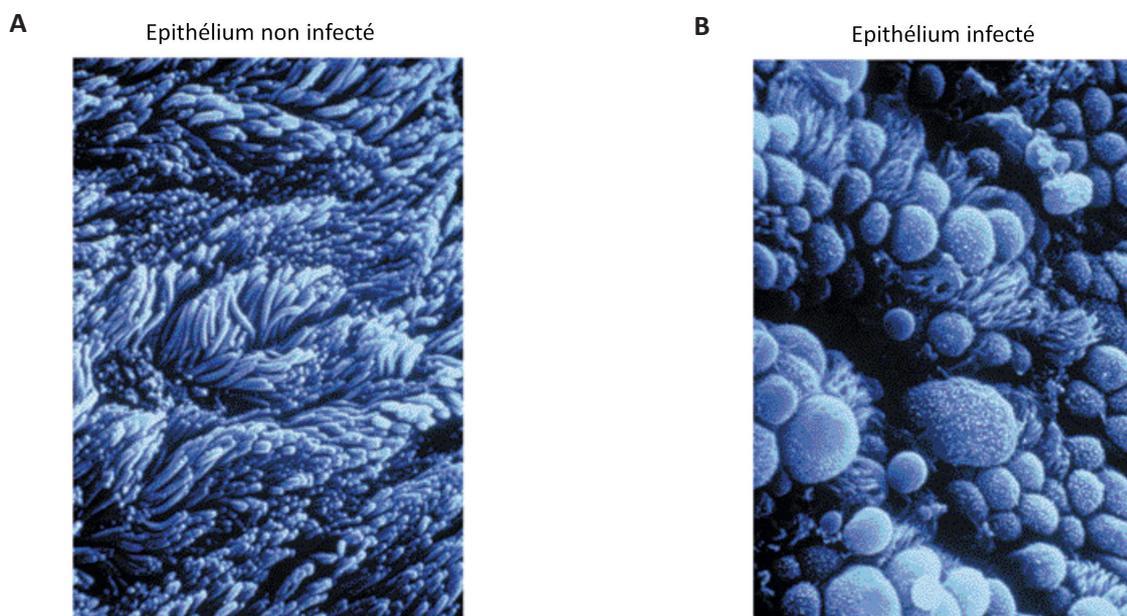
Des travaux récents ont montré que le virus pouvait rester infectieux plusieurs jours sur des surfaces inertes (tables, poignées de porte) ainsi que sur des pièces de monnaie et des billets de banque permettant une transmission manuportée.

Le  $R_0$  (index de reproduction de base), indicateur mathématique évaluant la contagiosité d'un virus, est pour le virus influenza estimé entre 1,4 et 2,8 selon les études. Il reste donc plus faible que celui d'autres virus comme celui de la rougeole ( $R_0 = 18$ ) ou des oreillons ( $R_0 = 10$ ).

### Encadré 1 : Réseaux de surveillance des virus influenza et de la grippe

Au niveau mondial, le système global de surveillance et de réponse de l'OMS (*WHO global influenza surveillance and response system*, GISRS) réalise ses missions *via* des laboratoires de référence. En 2017, le réseau comportait environ 140 CNR (dont 3 en France : à l'Institut Pasteur de Paris, à l'Institut des Agents Infectieux des Hospices Civils de Lyon et à l'Institut Pasteur de Guyane), 6 centres collaborateurs (Melbourne en Australie, Beijing en Chine, Tokyo au Japon, Londres au Royaume-Uni, Atlanta et Memphis aux Etats-Unis) ainsi que 4 Laboratoires de régulation essentiels (Woden en Australie, Tokyo au Japon, Hertfordshire au Royaume-Uni et Silver Spring aux Etats-Unis). Certains outils sont utilisés pour la collecte de données de surveillance en temps réel tel que le réseau FluNet.

En France, la surveillance repose sur les prélèvements réalisés par un réseau de médecins généralistes et de pédiatres (Réseau Sentinelle). Les données virologiques sont associées à des données épidémiologiques de terrain (activité médicale, vente d'antipyrétiques ...). Ces données cumulées permettent d'estimer chaque semaine le nombre de cas de grippe, ainsi que la dynamique de l'épidémie grippale. En complément de cette surveillance communautaire, il existe aussi une surveillance hospitalière basée sur le réseau national des laboratoires hospitaliers (RENAL) qui rapporte chaque semaine le nombre d'analyses réalisées sur des prélèvements respiratoires, ainsi que le nombre d'infections confirmées. Ces données ne comportent pas d'information clinique mais complètent celles de la surveillance communautaire. Enfin, ces informations sont centralisées par Santé publique France et les centres d'interventions en régions. Des données complémentaires (nombre de passages aux urgences pour syndrome grippal *via* le réseau d'organisation de la surveillance coordonnée des urgences [OSCOUR], nombre de cas de grippe grave hospitalisés en réanimation, et nombre de cas de syndrome grippal vus par SOS Médecins) sont également collectées afin de préciser l'impact de la grippe sur le système de santé lui permettant ainsi d'adapter son organisation en temps réel. Enfin, l'ensemble de ces informations sont communiquées sous la forme de bulletins hebdomadaires transmis à l'ECDC et à l'OMS.



**Figure 9 : Modification de la muqueuse nasale de furet au cours de l'infection par un virus influenza**

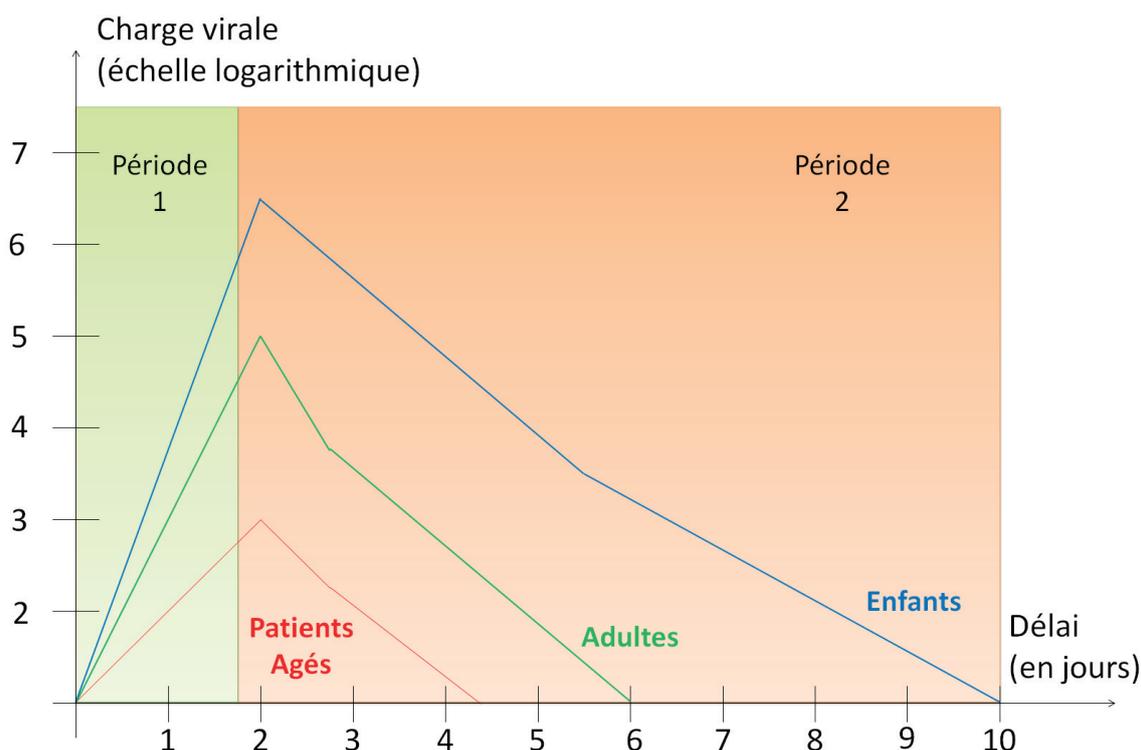
Aspect en microscopie à balayage électronique. A. Epithélium cilié de furet non infecté. B. Après infection, on observe la destruction des cils et de l'épithélium ainsi que la sécrétion de boules de mucus (source : Aventis Pasteur).

### 6.3. Pathogénèse

D'une façon générale, les enfants sont plus fréquemment infectés car plus exposés que les adultes avec un taux d'attaque, quel que soit le virus, jusqu'à 10 fois supérieur. Cependant, le nombre de formes graves et de décès est beaucoup plus faible chez les enfants que chez les individus de plus de 65 ans, ces derniers présentant très souvent des facteurs de risque

cliniques (Tab. 2). Pour certains virus, la plus grande pathogénicité observée s'explique par l'acquisition par ces virus de facteurs de virulence (Tab. 3).

Le pouvoir pathogène des virus influenza est différent en fonction du type et du sous-type viral. Le virus A(H1N1)pdm09 présente des similitudes antigéniques avec les virus A(H1N1) ayant circulé entre 1945 et 1955 (Fig. 1). Les personnes de plus de 65 ans sont



**Figure 10 : Représentation de la charge virale nasale par classe d'âge en fonction du délai depuis la contamination**

La période 1 correspond à la période d'incubation et la période 2 à la période symptomatique. La charge virale nasale est le reflet de l'excrétion de virus influenza dans les sécrétions respiratoires (et donc de la contagiosité interhumaine). L'excrétion virale commence avant la période symptomatique et est d'autant plus longue que l'individu est jeune. Le niveau et la durée d'excrétion sont inversement corrélés avec l'âge. De plus, le niveau d'excrétion virale atteint son maximum au début de la période symptomatique.

donc moins touchées lorsqu'elles sont exposées à ce sous-type car elles ont une immunité résiduelle qui les protège d'une forme sévère. Le virus A(H1N1) pdm09 continue à toucher essentiellement les adultes jeunes (immunologiquement naïfs) de 40 à 55 ans et c'est dans cette classe d'âge que sont majoritairement observés les SDRA.

Les virus A(H3N2) circulant actuellement sont significativement différents des virus ayant préalablement circulé dans la population. De plus, ils évoluent plus vite sur le plan antigénique (Fig. 7) et sont donc à l'origine d'épidémies de plus grande ampleur avec un impact très important chez les personnes de plus de 65 ans. Au cours des épidémies dues au virus A(H3N2) sont observés de nombreux foyers dans les établissements hospitaliers pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) avec des taux d'attaque allant jusqu'à 70% pour une létalité de 5% à 8%.

Les virus influenza de type B, quant à eux, sont à l'origine d'épidémies plus modérées, touchant principalement les enfants d'âge scolaire (entre 5 et 15 ans) sous la forme de tableaux cliniques simples associés à des douleurs abdominales. Ce type d'épidémie épargne relativement, mais pas complètement, les adultes et les personnes âgées.

#### 6.4. Formes cliniques de la grippe

La grippe est une rhinopharyngite polymorphe, ce qui rend impossible la description d'un tableau unique caractéristique de l'infection par le virus influenza. Différentes définitions de cas probables de grippe existent. La définition de l'ECDC repose sur l'association d'au moins un symptôme systémique (fièvre, maux de tête, altération de l'état général ou myalgie) et d'un symptôme respiratoire (toux, pharyngite, dyspnée). La définition de l'OMS considère comme une forme clinique de grippe toute toux fébrile dans les 10 j précédant la consultation. Face à ces hétérogénéités, il est important de comprendre qu'il existe de nombreuses formes cliniques de grippe, d'évolution variable et dont le diagnostic de certitude repose quasi exclusivement sur la confirmation virologique.

La grippe dite « simple » est une infection due au virus influenza qui ne nécessite pas d'hospitalisation. La triade fièvre, toux et fatigue est le plus souvent retrouvée. En fonction de l'âge, la fièvre peut être plus ou moins élevée (faible chez la personne âgée, majeure chez l'enfant). Il est possible de voir une grande variété de symptômes allant de formes symptomatiques majeures à des tableaux cliniques frustrés (Tab. 4). Plus de 30% des personnes infectées restent asymptomatiques, sans que leur participation à la dissémination du virus soit certaine.

**Tableau 2 : Principaux facteurs de risques cliniques et biologiques prédisposant à des formes sévères de la maladie grippale**

Facteurs de risque	Principales situations
Facteurs cliniques constitutionnels	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cardiopathies congénitales cyanogènes ou avec HTAP</li> <li>• Valvulopathies graves</li> <li>• Drépanocytose</li> <li>• Thalassémie</li> <li>• Déficit immunitaire primitif</li> <li>• Prématurité jusqu'à l'âge de 1 an</li> </ul>
Facteurs cliniques acquis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pathologie chronique (asthme, BPCO, insuffisance respiratoire chronique, dysplasie bronchopulmonaire, mucoviscidose, valvulopathies graves, troubles du rythme cardiaque, coronaropathies, antécédent d'accident vasculaire cérébral avec ou sans paralysie, affections neuromusculaires graves, néphropathies chroniques graves, diabète, déficit immunitaire ...)</li> <li>• Vie dans un établissement de soins de suite ainsi que dans un établissement médico-social d'hébergement (quel que soit l'âge)</li> <li>• Obésité (IMC <math>\geq</math> 40)</li> <li>• Grossesse</li> </ul>
Facteurs génétiques	<p>De nombreuses mutations touchant les gènes suivants ont été décrites comme facteurs de risque dans la maladie grippale :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Voie des ATPases et GTPases (ATP6V0D1, Rab5-Rab7 ...)</li> <li>• Complexe d'internalisation des vésicules de clathrine</li> <li>• Complexe NuP (NuP98 et NuP153)</li> <li>• Protéine de choc thermique (HSP90 ...)</li> <li>• ADN polymérase (ADN pol III ...)</li> <li>• Protéines de la cascade du phosphatidyl-inositol</li> <li>• Cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17, TNF ...)</li> </ul>
Facteurs environnementaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbiome altéré par prise d'antibiotique préalable</li> <li>• Surinfection bactérienne</li> </ul>

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; IMC : indice de masse corporelle ; NuP : nucléoporine.

Bien que polymorphe, le syndrome grippal est classiquement un tableau d'asthénie fébrile douloureuse à début brutal. D'autres signes sont généralement associés : des signes respiratoires (de gravité variable en fonction du terrain), des signes généraux et une ré-ascension de la fièvre assez évocatrice entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> j (« V grippal »). Le virus est présent dans les voies aériennes supérieures quelques heures avant le début des symptômes et jusqu'à 3 à 5 j après, chez l'adulte, contre 7 à 10 j chez l'enfant (Fig. 10). Le risque de transmission à partir d'un patient infecté est directement corrélé à la quantité de virus excrétée (maximum à 48 h puis faible après 5 à 7 j). En revanche, les symptômes, reflets de la réponse immunitaire dirigée contre le virus, peuvent être encore présents à distance, notamment la fatigue, les myalgies et les arthralgies. Ce tableau clinique, spontanément régressif, ne nécessite généralement que repos et traitement symptomatique.

Certaines personnes, parce qu'elles présentent des facteurs de risque (âge ou pathologie chronique sous-jacente), sont susceptibles de développer des

complications au décours de la grippe (Tab. 2). Les surinfections bactériennes sont les complications les plus fréquentes (25% à 50% des complications). Elles sont observées à tout âge mais surtout aux âges extrêmes de la vie. Chez la personne de plus de 65 ans, ces surinfections sont principalement dues à des bactéries à Gram positif : *Streptococcus pneumoniae*\*surtout, ou *pyogenes* dans une moindre mesure), *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*\* (\*en régression depuis la vaccination). Des surinfections des voies aériennes supérieures sont principalement observées chez les enfants âgés de 6 mois à 1 an ou chez ceux ayant des antécédents d'otites moyennes aiguës à *Streptococcus pneumoniae* ou *Moraxella catharralis*. Souvent bénignes, elles entraînent une persistance de la fièvre au-delà d'1 semaine et nécessitent le recours à une antibiothérapie adaptée.

Les individus présentant des pathologies cardiorespiratoires (telles que asthme, bronchopneumopathie obstructive ou insuffisance cardiaque) ont un risque important de voir leurs

Tableau 3 : Principaux facteurs modifiant la virulence du virus influenza et/ou sa résistance aux inhibiteurs de neuraminidase

Segment concerné	Mutation décrite dans la littérature	Impact sur la pathogénie virale
HA	Modification du site de clivage	Si disparition : défaut de fusion des membranes (diminution de virulence) Si présence d'un site polybasique : clivage par des enzymes ubiquitaires favorisant la diffusion des virus dans l'organisme (augmentation de virulence)
	D190E - D225G	Défaut d'attachement aux acides sialiques (diminution de virulence)
PB2	E627K	Amélioration de la multiplication virale notamment à 33°C (adaptation à l'hôte humain)
	D701N	Amélioration de la liaison à l'importine des mammifères (adaptation à l'hôte humain)
	R591-G590S	Amélioration de la multiplication virale (augmentation de virulence)
	E158G	Amélioration de la multiplication virale (augmentation de virulence)
PB1	S66N	Augmentation de la survenue des infections secondaires (diminution de virulence)
	Del 11 AA	Abolition des facteurs de transcription
	E92D	Amélioration de la multiplication virale en présence d'IFN (augmentation de virulence)
NA	H275Y - I223R/V - S247N - N295S	Résistance de niveau variable aux INA : A(H1N1)
	R292K - N294S - E119V	Résistance de niveau variable aux INA : A(H3N2)
	R150K - D197N/E/Y - I222T/L - S249G - N294S - R374K	Résistance de niveau variable aux INA : virus influenza B
M	L26F - V27A - A30T - S31N	Mutation canal à proton - Résistance constante aux adamantanes
NS2	M16I	Amélioration de la multiplication virale (augmentation de virulence)

AA : acides aminés ; Del : délétion ; HA : hémagglutinine ; INA : inhibiteurs de neuraminidase ; M : protéine de matrice ; NA : neuraminidase ; NS : protéine non structurale ; PB : protéine basique.

pathologies sous-jacentes se décompenser au cours de la grippe. Les individus atteints de pathologies métaboliques (diabète, obésité morbide), d'affections associées à une immunodépression (cancer, infections virales chroniques) et les femmes enceintes sont identifiés comme à risque de développer des formes graves (Tab. 2).

Des manifestations neurologiques peuvent être observées. Elles sont dues à une réponse pro-inflammatoire excessive lors de la réponse immunitaire à l'infection (« orage cytokinique »), expliquant que la recherche du virus dans le LCS reste très souvent négative (50% à 90% suivant les études) et que dans 75% des cas les signes neurologiques sont absents au début des symptômes respiratoires. Les complications les plus fréquentes chez le jeune enfant sont les convulsions simples, d'évolution favorable,

expliquées par la forte hyperthermie. Des formes neurologiques plus sévères telles que des encéphalites ou des tableaux d'encéphalopathie sont rapportés associant des convulsions généralisées, des troubles du comportement ou un coma pouvant entraîner le décès. Des formes familiales d'encéphalopathies, et une plus forte prévalence de complications neurologiques (encéphalites) observées dans les populations asiatiques (japonaise et taïwanaise), suggèrent l'existence d'une prédisposition génétique au développement de ces formes neurologiques.

Des syndromes de Reye peuvent survenir en cas de prise d'acide acétylsalicylique chez l'enfant au cours d'une grippe (contre-indication formelle). Ce syndrome associe des atteintes hépatique (stéatose) et neurologique (encéphalopathie).

**Tableau 4 : Fréquence des signes cliniques d'une grippe simple**

Signe clinique	% des cas présentant cette symptomatologie
Asthénie	85
Fièvre - Frisson	85
Rhinorrhée	80
Céphalée	70
Myalgie	65
Toux	60
Expectoration	60
Mal de gorge	45
Nausée - Vomissement	55
Douleur abdominale	10
Diarrhée	5

Des myosites, parfois très invalidantes, sont observées lors d'infection chez l'enfant par un virus influenza de type B. Ces myosites aiguës sont souvent rapidement régressives et sans séquelles.

La grippe est également l'une des étiologies fréquentes du syndrome de Guillain-Barré (réaction auto-immune contre le système nerveux périphérique entraînant des paralysies progressives).

Enfin, des complications réno-vasculaires ont été rapportées mais restent rares : rhabdomyolyses sévères, syndromes hémolytiques et urémiques, coagulations intravasculaires disséminées, insuffisances rénales aiguës, glomérulonéphrites aiguës, tubulopathies interstitielles et syndromes de Goodpasture. De rares cas de myocardites ont également été rapportés.

Exceptionnellement, certaines formes de grippe évoluent en « grippe maligne » avec un tableau d'atteinte pulmonaire extrêmement sévère de type SDRA. Ce tableau clinique nécessite des manœuvres de réanimation complexes telles que l'ECMO (méthode d'oxygénation extracorporelle). Ces formes cliniques peuvent survenir chez tous les individus bien que les femmes enceintes soient particulièrement à risque du fait d'une augmentation des volumes plasmatiques et du rythme cardiovasculaire durant la grossesse. Au décours d'une grippe banale, le patient se plaint d'un essoufflement plus ou moins prononcé. Cette notion de dyspnée doit être considérée comme un signal d'alarme devant motiver l'hospitalisation rapide du

patient. En effet, l'évolution en SDRA est très brutale avec une dégradation des fonctions respiratoires, un œdème pulmonaire aigu et une défaillance multiviscérale. Malgré une prise en charge adaptée en réanimation, avec ventilation mécanique ou parfois la mise sous ECMO, le taux de mortalité reste très élevé (plus de 30%). En cas de guérison, elle est complète et sans séquelles pulmonaires.

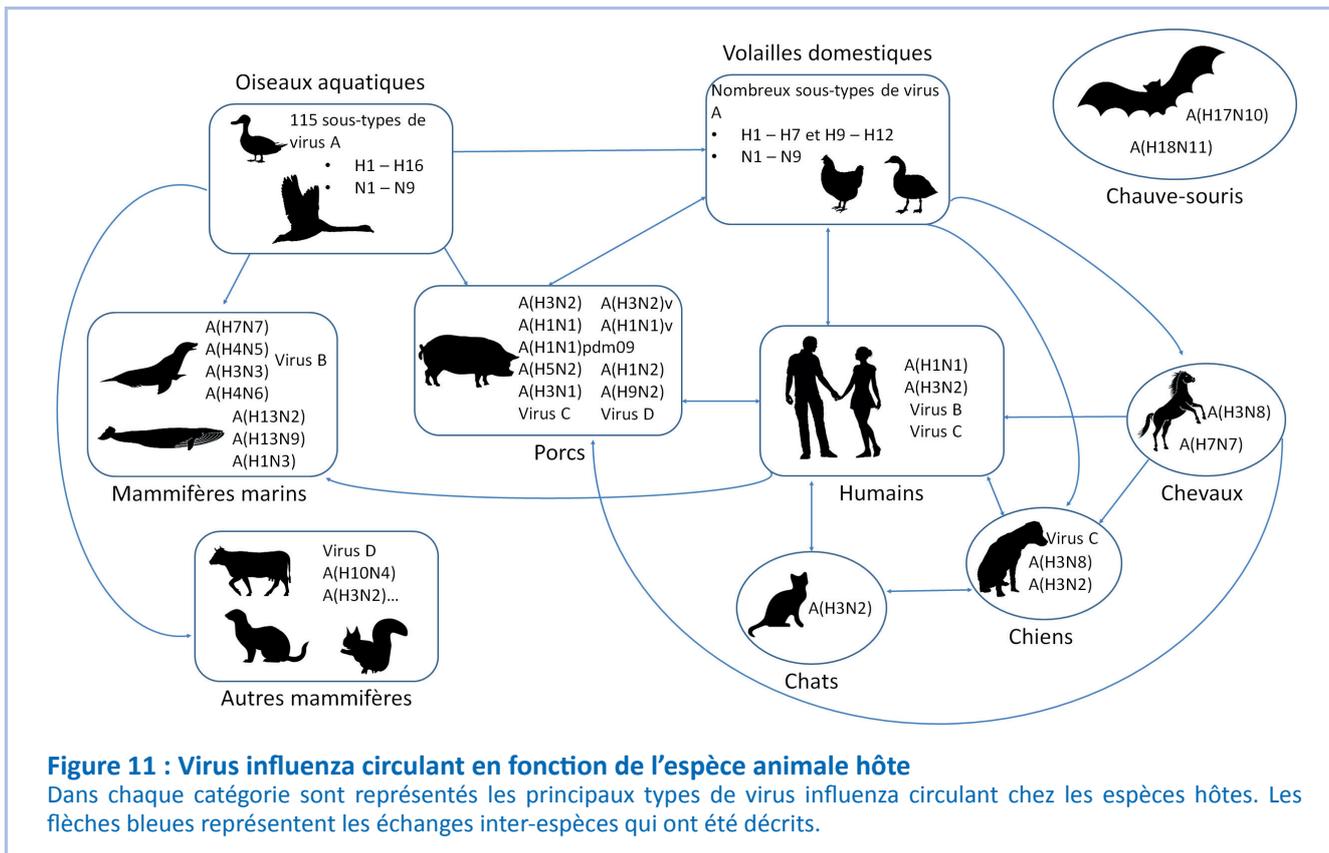
## 7 - Virus zoonotiques

Les virus influenza de type A peuvent infecter un grand nombre d'espèces animales différentes : les mammifères dont l'être humain, la volaille domestique (poules, oies ...) mais leur réservoir est constitué par les oiseaux sauvages aquatiques (canards, cygnes ...). Chez les mammifères, il existe une spécificité d'espèce en fonction des sous-types viraux. Par exemple, les virus A(H3N8) infectent les phoques, les chiens et les chevaux tandis que les virus A(H3N2), plutôt les chats, les chiens, les porcs et l'être humain. En revanche, parmi les 198 combinaisons HxNx possibles, seuls 117 sous-types viraux ont été décrits dont 115 ont été observés dans le réservoir aviaire et 2 uniquement chez la chauve-souris (Fig. 11). Ces derniers semblent très éloignés des autres virus influenza, notamment du fait d'une HA qui ne se fixe pas au même type de récepteur et d'une NA qui ne possède pas d'activité sialidasique.

Les virus de type B, principalement humains, ont également été décrits chez les phoques suite à un transfert d'une souche humaine en 1995. Expérimentalement, ces virus sont également capables d'infecter les porcs et les furets.

### 7.1. La restriction d'hôte et la barrière d'espèces

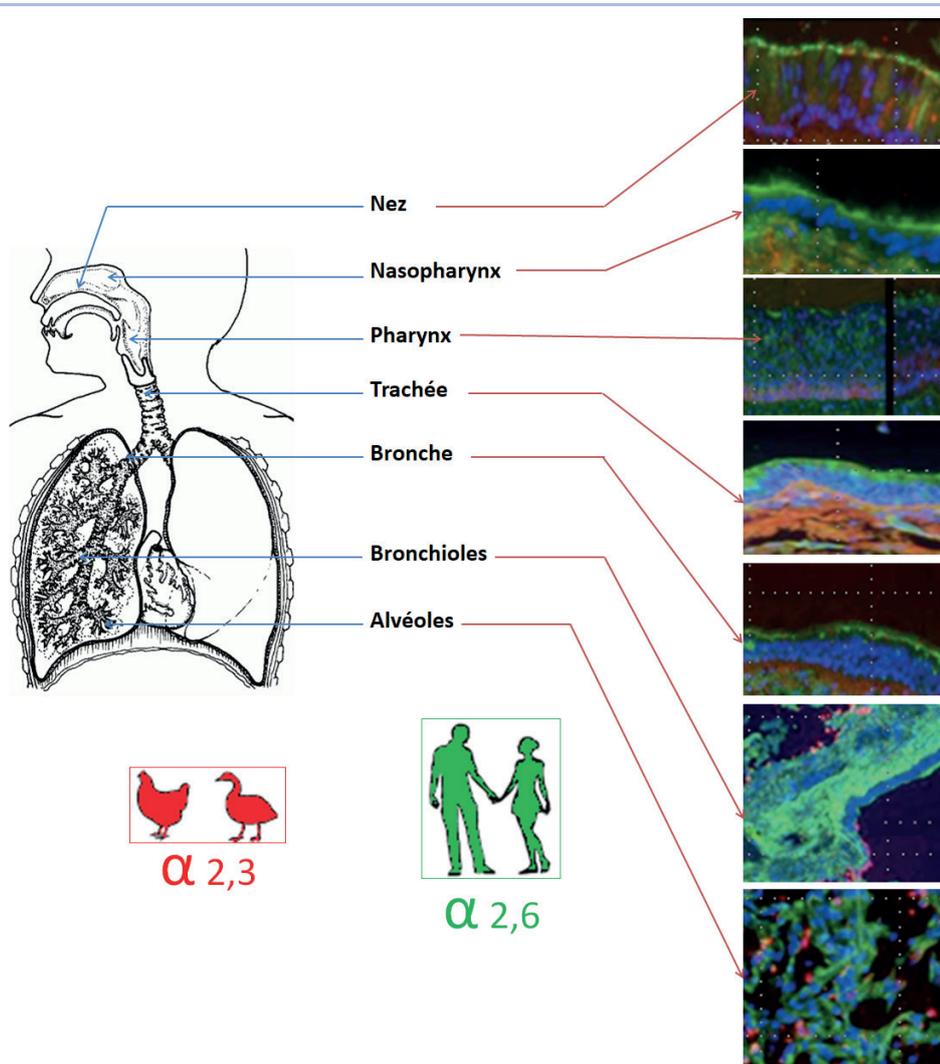
La pathogénicité et la restriction d'hôtes des virus influenza de type A dépendent en grande partie des spécificités de fixation des HA aux acides sialiques et de la répartition anatomique des acides sialiques en fonction des espèces (Fig. 12). Les HA des virus humains reconnaissent préférentiellement les acides sialiques  $\alpha 2,6$  présents au niveau de l'épithélium respiratoire supérieur chez l'être humain et seront donc principalement responsables d'infections respiratoires hautes (grippes saisonnières). A l'opposé, les HA des virus aviaires fixent avec une meilleure affinité les acides sialiques  $\alpha 2,3$  présents au niveau de l'intestin et au niveau des voies aériennes supérieures chez l'oiseau, mais au niveau des voies aériennes inférieures chez l'être humain. Les virus aviaires seront donc plus facilement responsables chez l'être humain d'infections respiratoires basses (pneumonies virales). Le porc possède autant de récepteurs  $\alpha 2,3$  que  $\alpha 2,6$  au niveau de son tractus respiratoire, il peut donc être infecté à la fois par des virus influenza d'origines aviaire, humaine et porcine. Le porc est donc un



**Figure 11 : Virus influenza circulant en fonction de l'espèce animale hôte**

Dans chaque catégorie sont représentés les principaux types de virus influenza circulant chez les espèces hôtes. Les flèches bleues représentent les échanges inter-espèces qui ont été décrits.

Exemplaire auteur - Reproduction et diffusion interdites



**Figure 12 : Répartition des acides sialiques dans le tractus respiratoire humain**

Le marquage vert représente les acides sialiques  $\alpha$ 2,6 et le marquage rouge, les acides sialiques  $\alpha$ 2,3.

maillon important de la chaîne de transmission et d'adaptation des virus zoonotiques, facilitant à la fois l'adaptation des virus aviaires aux mammifères et les échanges de gènes entre différents sous-types. Cette espèce joue donc un rôle majeur dans l'émergence de virus potentiellement pandémiques (exemple du virus A(H1N1)pdm09, Fig. 8).

La spécificité de reconnaissance des acides sialiques par les HA ne suffit pas à expliquer la spécificité d'espèce des virus influenza, la NA joue un rôle également. Les NA fixent à la fois les acides sialiques  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$  mais elles clivent les acides sialiques  $\alpha 2,3$  avec une meilleure efficacité, cette efficacité variant en fonction de l'adaptation du virus à son hôte. C'est la balance entre la HA et la NA qui est fondamentale pour permettre au virus d'avoir un bon « fitness », c'est-à-dire de réaliser une infection, une multiplication et une transmission efficaces (Fig. 13).

Les autres segments d'ARN génomique jouent aussi un rôle important dans la spécificité d'hôte, notamment les sous-unités du complexe polymérase qui doivent être fonctionnelles dans le nouvel hôte (Tab. 3). Par exemple, le résidu 627 de la protéine PB2 est un acide aminé important qui serait impliqué dans la virulence et la restriction d'hôte. Les virus aviaires qui possèdent une protéine PB2 avec une lysine en position 627 sont plus virulents et se répliquent à des températures plus basses favorisant l'infection des voies aériennes supérieures chez l'être humain.

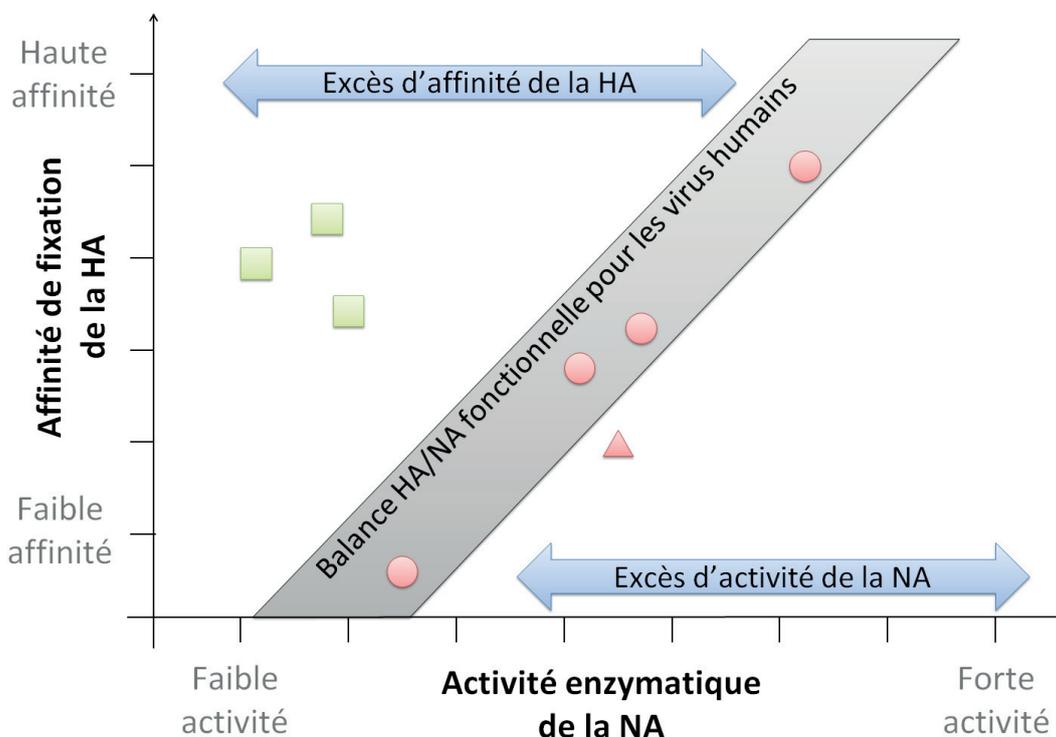
Les infections occasionnelles d'une espèce par un virus influenza de type A d'une autre espèce peuvent entraîner l'adaptation et la circulation de ce virus dans son nouvel hôte. Cette adaptation nécessite le franchissement d'un certain nombre d'obstacles (regroupés dans le terme de « barrière d'espèces »). Trois étapes fondamentales doivent être franchies avant qu'un virus influenza ne puisse s'adapter à un nouvel hôte : i) la transmission entre 2 espèces nécessite des contacts étroits entre l'espèce infectée et l'espèce réceptrice ; ii) la réalisation de cycles de multiplication complets chez le nouvel hôte ; et iii) la transmission entre individus de la nouvelle espèce. Les 2 dernières étapes peuvent se faire par mutations ou réassortiments successifs, directement dans le nouvel hôte ou dans un hôte intermédiaire (porc par exemple).

## 7.2. Epizooties par les virus aviaires et porcins

Les virus influenza de type A sont responsables d'épizooties (infections chez les animaux) chez les oiseaux (Encadré 2) ou les porcs (Encadré 3).

## 7.3. Infections humaines par des virus aviaires et porcins

Chez l'être humain, la grippe aviaire et les autres gripes zoonotiques entraînent des manifestations diverses allant de la conjonctivite bénigne à la pneumopathie sévère pouvant être mortelle. Les caractéristiques



**Figure 13 : Représentation schématique de la balance hémagglutinine (HA)/neuraminidase (NA) optimale pour les virus influenza humains**

Les virus pandémiques humains (ronds rouges) sont disposés autour d'un axe représentant l'équilibre « idéal » entre l'affinité de la HA et l'activité de la NA. Une souche humaine mal adaptée à l'être humain (triangle rouge) et des souches porcines (carrés verts) non adaptées à l'être humain s'éloignent de cette balance optimale du fait d'une affinité HA ou d'une activité NA trop fortes.

**Encadré 2 : Epizootie due au virus influenza A chez les oiseaux**

Chez les oiseaux, on distingue 2 types de souches virales circulantes ayant des pathogénicités différentes : les virus influenza aviaires faiblement (IAFP) ou hautement (IAHP) pathogènes. Un virus devient hautement pathogène s'il possède un site de clivage polybasique dans la HA et/ou s'il provoque une surmortalité au cours d'infections expérimentales chez la poule. Indispensable, le site de clivage polybasique n'est pas suffisant pour expliquer à lui seul la pathogénicité dans d'autres espèces, notamment chez l'être humain.

La majorité des virus influenza retrouvés chez les oiseaux sauvages sont des IAFP qui se multiplient au niveau du système digestif et sont excrétés dans les fientes, ce qui facilite leur dissémination par contamination fécale-orale. Ces virus sont généralement responsables d'infections asymptomatiques, d'où leur sous-estimation, ou de tableaux associant de légers signes respiratoires à une diminution du taux de ponte des volailles d'élevage. À l'opposé, les infections par des virus IAHP sont plus rares mais s'accompagnent d'une mortalité quasi systématique par diffusion systémique du virus dans tous les organes des volailles domestiques. En revanche, les oiseaux sauvages présentent une mortalité plus faible lors d'une infection par un virus IAHP et participent donc à la dissémination de ces virus.

L'infection de la volaille domestique se fait soit par contact direct avec des fientes infectées provenant des oiseaux sauvages (d'où l'importance des élevages couverts), soit par transmission à bas bruit entre exploitations (mouvement de personnel, de matériels ou d'animaux). Les épidémies détectées dans les exploitations commerciales ont des répercussions économiques, du fait de l'abattage nécessaire de tout l'élevage, et sanitaires pour les exploitants et leur entourage.

Depuis 2014, 77 pays ont rapporté la détection de 13 sous-types de virus aviaires. Actuellement, différentes souches, A(H5N1), A(H5N2), A(H5N6), A(H5N8), A(H7N8) et A(H7N9), sont régulièrement à l'origine de foyers d'infections aviaires sous haute surveillance des autorités de santé publique. En France, les hivers 2015-2016 et 2016-2017 ont été marqués par des épizooties majeures dues à la circulation de virus IAHP dans de nombreuses exploitations du Sud-Ouest. En 2015-2016, une grande diversité de souches, A(H5N1), A(H5N2) et A(H5N9) ne provenant pas de la faune sauvage, ont été responsables d'infections dans plus de 80 exploitations. Ces virus, apparentés à des virus influenza identifiés comme faiblement pathogènes, avaient acquis un site de clivage polybasique par accumulation de mutations. Le virus possédant cette H5 devenue hautement pathogène fut, *a priori*, l'ancêtre commun des différents sous-types détectés qui ont émergé progressivement après réassortiments génétiques successifs. En 2016-2017, l'épizootie de plus de 450 foyers d'infection fut déclenchée par l'introduction et la circulation d'un virus A(H5N8) hautement pathogène provenant de la faune sauvage. Les virus A(H5N8) ont été détectés pour la 1<sup>re</sup> fois en 2010 et diffusent depuis dans le monde entier et particulièrement en Europe. Ces 2 exemples d'épizootie d'origines différentes illustrent la complexité des moyens à mettre en œuvre pour la surveillance et le contrôle de la circulation des virus aviaires.

**Encadré 3 : Epizootie due au virus influenza A chez les porcs**

Chez le porc, les infections par le virus influenza A sont responsables d'une symptomatologie souvent frustrée. Elles se manifestent majoritairement par des écoulements nasaux, une toux, des difficultés respiratoires et parfois des conjonctivites.

Le très grand nombre de sous-types différents de virus porcins est le résultat de nombreux événements d'introduction de virus humains ou aviaires et de réassortiment entre virus chez ce mammifère facilement infecté par des virus d'origines diverses. Les réassortiments étudiés sont nombreux ces dernières années, probablement à cause des pratiques d'élevage mais aussi de l'intensification de la surveillance de ces animaux. À l'opposé, le glissement antigénique est plus lent que chez l'être humain car la durée de vie des porcs est beaucoup plus courte. Les virus A(H1N1), A(H1N2) et A(H3N2) sont devenus panzootiques chez le porc et cocirculent actuellement dans le monde. Ces sous-types viraux sont subdivisés en lignées génétiques dépendantes de leur région de circulation (Amérique, Europe et Asie).

L'épidémiologie des virus porcins est de plus en plus complexe. Entre 2009 et 2013, 14 lignages de virus différents issus de réassortiments ont été identifiés dans des exploitations porcines en Europe.

de la maladie (période d'incubation, sévérité des symptômes et pronostic clinique) dépendent du sous-type de virus responsable de l'infection. L'ensemble des infections humaines par des sous-types aviaires rapportées est résumé dans le tableau 5. Les infections liées aux virus A(H5N6), A(H5N1) et A(H7N9) ont été responsables d'un tableau clinique sévère avec une évolution très rapide en pneumonie virale associée dans certains cas à un SDRA ou une défaillance multiviscérale. Les infections par les virus A(H5N6) sont graves mais très peu nombreuses. Les infections les plus fréquentes sont dues aux virus A(H5N1) et A(H7N9) (Encadré 4).

Les virus porcins sont responsables de zoonoses généralement asymptomatiques ou bénignes. Dans

de rares cas, les infections sont plus sévères voire mortelles. Elles touchent environ 75% des personnes en contact avec des porcs. Depuis 2010, le virus A(H3N2) variant (noté A(H3N2)v) ayant acquis le gène *M* du virus A(H1N1)pdm09 est devenu le principal responsable d'infections humaines en Amérique du Nord. Plus de 370 cas d'infections par ce virus ont été recensés avec un pic en 2012 (296 cas). Depuis, le nombre de cas a nettement diminué et reste stable autour d'une dizaine de déclarations par an grâce à la mise en place de recommandations d'hygiène clairement expliquées aux usagers de parcs d'attractions, très répandus aux Etats-Unis, dont toutes les activités sont en lien avec des porcs.

#### Encadré 4 : Point sur les infections humaines par les virus A(H5N1) et A(H7N9)

##### Virus A(H5N1)

Les 1<sup>ers</sup> foyers d'infection par le virus A(H5N1) ont été rapportés en 1997 à Hong Kong avec 18 cas humains dont 6 décès. Le virus avait déjà été isolé chez l'oiseau dans des fermes du sud de la Chine avant le 1<sup>er</sup> cas humain rapporté. C'est en 2003 que de nombreux cas humains ont été de nouveaux diagnostiqués ; depuis, un total de 860 cas ont été signalés dans 16 pays avec un taux de mortalité supérieur à 50%. En 2006, le virus se répand en Europe de l'Ouest et en Afrique. Cette extension sensibilise les autorités sanitaires de nombreux pays qui s'organisent pour élaborer des plans de préparation à une éventuelle pandémie. C'est en Egypte, en 2015, qu'a été observé le plus grand nombre de cas d'infections humaines par ce virus (136 cas). Depuis, le nombre de cas ne fait que diminuer chaque année.

Depuis 2003, la plupart des cas sont de jeunes adultes ou des enfants, tous exposés à des oiseaux contaminés sur des marchés d'animaux vivants ou hébergés à leur domicile, après des opérations de plumage ou de jeux. Seuls un contact étroit et une exposition à une très forte quantité de virus rendent possible la contamination et aucune transmission interhumaine de ce virus n'a pour l'instant été démontrée. Ces individus ont présenté, en plus du tableau respiratoire, des symptômes extra-pulmonaires (conjonctivites, troubles gastro-intestinaux et/ou cytolysse hépatique). La mortalité, fortement liée à l'âge, dépend également de la précocité de la prise en charge.

##### Virus A(H7N9)

Depuis 2013, le virus A(H7N9), apparu en Chine, cause des vagues épidémiques au cours de chaque saison hivernale. Il est le virus aviaire responsable du plus grand nombre d'infections humaines et tous les cas rapportés ont un lien avec la Chine. Le virus A(H7N9) est un virus faiblement pathogène chez l'oiseau, alors que, chez l'être humain il cause des infections respiratoires sévères avec un taux de mortalité d'environ 40%. Au cours de l'hiver 2016-2017, la vague épidémique a été particulièrement importante, représentant à elle seule plus de 30% des 1 565 cas décrits depuis 2013.

Le virus A(H7N9) a émergé *via* le réassortiment d'au moins 4 virus aviaires : A(H7N3) pour le gène *HA*, A(H2N9) et/ou A(H11N9) pour le gène *NA*, et 2 sous-groupes génétiquement distincts de virus A(H9N2) pour les 6 autres gènes. Les virus A(H9N2) sont très surveillés car ils possèdent un fond génétique stable capable de se réassortir avec d'autres gènes de *HA* et de *NA*, soutenant l'émergence de nouveaux virus ; ainsi les virus A(H5N1) et A(H10N8) ont, comme A(H7N9), des gènes issus du réassortiment avec A(H9N2). Le réassortiment avec les gènes internes des virus A(H9N2) a donc favorisé l'expansion du virus A(H7N9) portant des glycoprotéines de surface originaires d'oiseaux aquatiques.

Contrairement aux virus A(H5N1), la plupart des cas humains infectés par le virus A(H7N9) sont des adultes de plus de 40 ans. Ces infections surviennent principalement chez des individus en contact avec les volailles. Il a par ailleurs été rapporté une possible transmission interhumaine entre individus hospitalisés. De façon préoccupante, des évolutions génétiques du virus A(H7N9) ont été décrites, avec notamment l'apparition d'un site de clivage polybasique dans la H7, classant ces souches en virus hautement pathogènes pour les oiseaux. L'impact de ce changement sur la pathogénicité chez l'être humain n'est pour l'instant pas connu. De par sa capacité à infecter l'être humain, sa possible transmissibilité et son évolution rapide, le virus A(H7N9) est un virus classé comme à fort potentiel pandémique.

Tableau 5 : Nombre de cas humains et de décès dus à des infections par des virus aviaires de 1959 à 2018

Virus influenza A aviaires	Années de circulation des virus	Nombre d'infections humaines	Nombre de décès (%)
<b>A(H5N1)</b>	<b>1997, 2003 - 2017</b>	<b>860</b>	<b>454 (53)</b>
<b>A(H7N9)</b>	<b>2013 - 2018</b>	<b>1565</b>	<b>612 (39)</b>
A(H7N7)	2003, 2013	99	1 (1)
A(H9N2)	1998 - 2017	40	1 (2,5)
A(H7N3)	2002 – 2006, 2012	12	0
A(H5N6)	2014 - 2017	17	11 (65)
A(H7N2)	2002 - 2017	6	0
A(H10N7)	2010	4	0
A(H10N8)	2013	3	2 (67)
A(H6N1)	2013	1	0

Les virus notés en gras sont classés comme à risque pandémique ; leur épidémiologie est détaillée dans l'encadré 4.

Les virus influenza d'origine porcine ou aviaire doivent absolument faire l'objet d'une surveillance étroite car ils peuvent participer à l'émergence de nouvelles souches potentiellement pandémiques. Le meilleur exemple reste à ce jour le virus A(H1N1) pdm09 responsable de la pandémie de 2009 (Fig. 8). Des précautions sont prises telles que la vaccination obligatoire contre la grippe des personnels au contact de porcs afin de réduire le risque de coinfection par un virus humain et un virus porcin qui pourrait être à l'origine de l'émergence d'un nouveau virus réassortant.

## 8 - Diagnostic au laboratoire

### 8.1. Prélèvements

Malgré un tableau clinique évocateur de grippe, le diagnostic de certitude ne peut être fait que par la détection du virus dans un prélèvement respiratoire. D'autres agents respiratoires viraux (virus respiratoire syncytial, métapneumovirus, rhinovirus ...) ou bactériens (*Mycoplasma pneumoniae* par exemple) peuvent donner un syndrome d'allure grippale. Le virus se multipliant dans un 1<sup>er</sup> temps dans les voies aériennes

supérieures, le prélèvement respiratoire peut se faire par écouvillonnage (de préférence avec un système constitué d'un écouvillon floqué et d'un milieu de transport adapté) du nasopharynx, ou après instillation nasale puis aspiration de sérum physiologique. Le recueil efficace de cellules du nasopharynx (riches en virus) est la condition indispensable pour un diagnostic fiable. Ce prélèvement doit être fait rapidement après le début des symptômes, idéalement dans les 48 premières heures, en tout cas jamais au-delà de 7 j. Chez l'individu immunodéprimé, l'excrétion virale peut être plus longue.

En cas d'infection respiratoire basse, il est important d'associer un prélèvement profond de type aspiration trachéale, crachat induit ou lavage broncho-alvéolaire.

La grippe est une infection aiguë de courte durée. De ce fait, la recherche du virus ne peut se faire que pendant la courte période de multiplication du virus dans les voies aériennes de l'individu. Chez un individu immunodéprimé, l'excrétion virale peut durer plusieurs semaines. La sérologie n'a aucun intérêt pour le diagnostic d'une infection grippale aiguë.

En cas de risque d'infection par un virus zoonotique, les prélèvements doivent être acheminés directement au CNR. En effet, les outils du diagnostic orientés

vers les virus humains ne sont pas adaptés pour la détection de tels virus, risquant de donner des résultats faussement négatifs. Par ailleurs, ces virus et ces prélèvements doivent être manipulés *a priori* en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3.

## 8.2. Les différents outils du diagnostic

Le diagnostic de la grippe bénéficie d'outils de détection de 1<sup>re</sup> intention, couramment utilisés dans les laboratoires de microbiologie ou les laboratoires d'urgence (*point of care*, POC) tels que les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD), tests de biologie moléculaire (RT-PCR en temps réel, outils multiplex de type syndromique). Des techniques plus anciennes de détection directe du virus par immunofluorescence ou par ELISA dans les cellules du patient sont encore utilisées par certains laboratoires. Ces techniques nécessitent 30 min à 2 h de manipulation et des qualifications techniques approfondies du personnel. Progressivement, elles disparaissent au profit des techniques moléculaires de type RT-PCR. Il existe également des d'outils de 2<sup>e</sup> intention, permettant la caractérisation d'un virus isolé chez un patient. Ces outils (isolement viral en culture cellulaire, sous-typage par RT-PCR, séquençage, caractérisation antigénique...) sont utilisés dans les laboratoires spécialisés de centre hospitalo-universitaire ou les CNR.

### • Tests de diagnostic de 1<sup>re</sup> intention

**Tests diagnostiques rapides ou TROD.** Ces tests unitaires peuvent être réalisés directement au lit du malade ou en 1<sup>re</sup> intention au laboratoire. Il s'agit de tests immunochromatographiques sur membrane, développés pour détecter la nucléoprotéine virale NP, conservée pour les virus de type A comme B, exprimée en abondance dans le virus et dans la cellule infectée. Ces tests donnent un résultat en 15 à 20 min, spécifiques mais significativement moins sensibles que les tests de biologie moléculaire. Une grippe ne peut donc pas être exclue sur un TROD négatif. Certains TROD, sur le même principe, sont associés à un système d'amplification du signal détecté par un lecteur, améliorant très nettement les performances de sensibilité.

**RT-PCR en temps réel.** La biologie moléculaire est devenue la référence dans le domaine du diagnostic des infections respiratoires. Les tests de RT-PCR en temps réel sont rapides, fiables, spécifiques et sensibles. Ils ciblent essentiellement le gène *M* dont la séquence est très stable, les trousse diagnostiques permettant ensuite de faire la distinction entre virus influenza A et B. Une approche semi-quantitative, donnant une estimation de la charge virale dans le prélèvement est possible. D'autres outils ont été développés pour des analyses au coup par coup. Ces automates font, en une étape, l'extraction et l'amplification et sont particulièrement utilisés dans les POC. Les trousse actuellement disponibles permettent en plus d'identifier le type de virus de type A ou B, de déterminer le sous-type de virus de

type A par détection spécifique de la HA (H1 ou H3). Pour ces trousse, comme pour celles réalisant la détection générique (gène *M*), une évaluation de leur sensibilité doit être réalisée régulièrement du fait du risque de mutation sur la cible moléculaire.

**Approche syndromique.** Ses tests permettent simultanément la détection des virus de types A et B, le sous-typage des virus de type A et la détection de 10 à 20 autres agents pathogènes viraux ou bactériens en moins de 2 h. Aujourd'hui, cette approche syndromique est en plein essor avec la mise à disposition des laboratoires et des POC d'automates très simplifiés. Ce type d'outil permet le diagnostic étiologique rapide de l'épisode infectieux en cours (voir chapitre 52). Généralement faciles à mettre en œuvre, ces outils ont encore un coût très élevé en comparaison avec les outils utilisés en routine au laboratoire.

### • Tests spécialisés de 2<sup>e</sup> intention (laboratoires spécialisés)

**L'isolement des virus en culture de cellules.** Cette technique n'est pas utile pour la prise en charge du patient en 1<sup>re</sup> intention. Après inoculation du prélèvement sur des lignées cellulaires adaptées (majoritairement MDCK ou éventuellement LLC-MK2), l'obtention de la souche virale nécessite en moyenne entre 3 et 5 j. Après l'observation d'un ECP, le virus est caractérisé soit par immunofluorescence, soit par mesure de l'activité HA. L'isolement de la souche en culture permet de réaliser des analyses complémentaires :

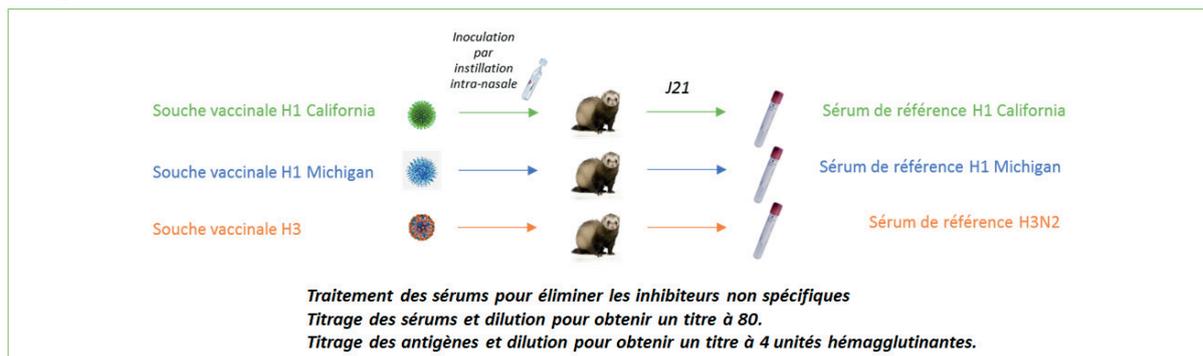
- La caractérisation antigénique par inhibition de l'hémagglutination permet de détecter une dérive antigénique du virus circulant par rapport à un virus de référence, généralement le virus présent dans la composition du vaccin de l'hiver en cours (Fig. 14). Cette technique est utilisée également pour la caractérisation des lots de semences vaccinales issues de l'industrie pharmaceutique avant la production des vaccins. L'évolution récente des virus A(H3N2) vers des souches faiblement hémagglutinantes complique l'identification de ces souches, justifiant l'utilisation d'analyses phylogénétiques.

- La caractérisation antigénique de la neuraminidase, dont les objectifs sont les mêmes que pour l'hémagglutinine (mesure de la dérive antigénique de la NA). A noter que cette caractérisation peut aussi être faite, comme pour l'hémagglutinine, à l'aide d'analyses phylogénétiques.

- La sensibilité phénotypique aux antiviraux (voir chapitre 10). Un test reposant sur la capacité de la NA virale à lyser un substrat dont le produit émet de la fluorescence est souvent utilisé, en présence et en absence de l'antiviral testé.

- L'évaluation de l'immunité humorale d'un patient vis-à-vis d'un virus influenza (statut sérologique du patient ou évaluation de l'efficacité vaccinale). Cette évaluation se fait par des tests d'inhibition de l'hémagglutination ou par des tests de séroneutralisation (voir chapitre 8).

## 1 PRÉPARATION DES SÉRUMS ET DES ANTIGÈNES

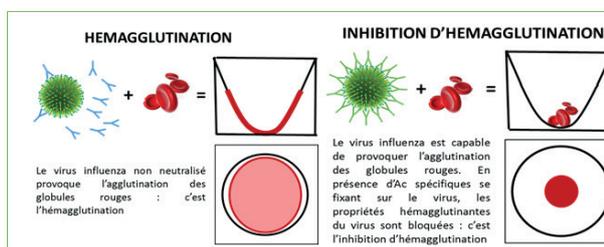


## 2 PRINCIPE DE RÉALISATION DE LA RÉACTION DE CARACTERISATION ANTIGÉNIQUE

Etape 1 : Dilutions en série des 3 sérums de référence  
 Etape 2 : Ajout d'une concentration 4U de virus A/H1 California

Etape 3 : Incubation 1h à température ambiante  
 Etape 4 : Ajout d'une quantité fixe de globules rouges

Titre final du sérum	80	160	320	640	1280	2560
California homologue	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination
Michigan homologue	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination
H3N2 hétérologue	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination



## 3 INTERPRÉTATION DES RÉACTIONS VIS-À-VIS DES 2 SOUCHES A/H1N1 DE REFERENCE

RÉACTIVITÉ VIS-À-VIS DE L'Ag CALIFORNIA		RÉACTIVITÉ VIS-À-VIS DE L'Ag MICHIGAN		RÉACTIVITÉ VIS-À-VIS DU VIRUS À CARACTÉRISER	
Titre final du sérum	Titre	Titre final du sérum	Titre	Titre final du sérum	Titre
California homologue	1280	California homologue	320	California homologue	640
Michigan homologue	320	Michigan homologue	640	Michigan homologue	160
H3N2 hétérologue	< 80	H3N2 hétérologue	< 80	H3N2 hétérologue	< 80

		Sérums de référence		
		A/California/2009	A/Michigan/2015	H3N2
Souches virales	A/California/2009	1280	320	< 80
	A/Michigan/2015	320	640	< 80
	Virus à caractériser	640	160	< 80

**Conclusion :** le virus à caractériser est un virus influenza A(H1N1) apparenté A/California/2009

### Figure 14 : Caractérisation antigénique d'un virus influenza par inhibition d'hémagglutination

Le virus A(H1N1) à caractériser est mis en contact avec des sérums de référence vaccinaux homologues anti-A(H1N1) et un sérum hétérologue anti-A(H3N2) pendant 1 h à température ambiante. Sont ensuite ajoutés des globules rouges de cobaye (à noter que pour la caractérisation des virus grippaux d'origine aviaire, on ajoute des globules rouges de poule). L'hémagglutinine du virus influenza provoque alors l'agglutination des globules rouges (hémagglutination) sauf lorsqu'il est neutralisé par des anticorps (Ac). Pour chaque souche (vaccinale ou à caractériser), une réaction d'inhibition d'hémagglutination (IHA) est donc réalisée avec les sérums de référence. Un profil d'IHA, déterminé par la dernière dilution de sérum permettant l'inhibition, met en évidence l'adéquation entre antigènes viraux et sérums de référence. Ainsi, par comparaison des profils obtenus, il est possible de définir de quel virus de référence le virus à analyser est le plus proche sur le plan antigénique.

**Le séquençage.** Quelle que soit la technologie utilisée (Sanger ou séquençage haut-débit, voir chapitre 8), l'analyse des séquences de la HA et de la NA ont plusieurs applications, notamment la recherche des mutations conférant une résistance aux INA et la recherche de facteurs de virulence (Tab. 3). A chaque épisode d'introduction d'un nouveau virus dans la population humaine (A(H1N1)pdm09, A(H3N2)v porcine en 2013 ...), le séquençage rapide du virus émergent a permis de déterminer la cartographie de ses segments d'ARN génomique et d'anticiper sa virulence et sa capacité à être reconnu par les anticorps de la population générale et donc son potentiel pandémique. Ces analyses *in silico* sont possibles par comparaison des séquences obtenues avec les séquences de référence des virus d'origine animale ou des virus ayant circulé chez l'être humain les années précédentes.

### 8.3. Objectif et indications du diagnostic virologique

La demande de diagnostic de grippe au laboratoire a pour principaux objectifs de déterminer l'étiologie d'un tableau respiratoire, d'adapter la prise en charge du patient et d'améliorer la prévention des infections nosocomiales. En effet, mettre en évidence l'étiologie grippale de l'infection aiguë en cours permet de mettre en place un traitement antiviral spécifique pour raccourcir la durée de la maladie et diminuer le risque de complications, surtout chez les individus présentant des facteurs de risque (Tab. 2). Il permet également la mise en place de mesures d'isolement de type « air », en plus des précautions standard, afin d'éviter la transmission à l'entourage et de limiter la transmission nosocomiale. Il permet également de mettre en évidence un échec vaccinal chez les individus vaccinés. Pour le cas particulier des individus immunodéprimés, le diagnostic initial pourra être complété par un suivi de l'excrétion virale afin de s'assurer que le traitement est efficace. Enfin la notion d'une infection grippale permet de réagir de manière adaptée en cas de survenue de complications (pneumonie virale, surinfection bactérienne). En pratique, le diagnostic virologique d'une infection par un virus influenza devra être proposé à tout patient hospitalisé pour un syndrome grippal, notamment pendant la période hivernale, ou s'il revient d'un voyage dans une zone potentiellement contaminée (hémisphère Sud pendant l'été par exemple). Il devra aussi être proposé aux patients connus pour avoir des facteurs de risque s'ils sont suspects d'une infection, qu'ils soient vaccinés ou non. Enfin, lors de la survenue de cas groupés d'infections respiratoires dans une structure hospitalière, ou dans un EHPAD, quelle que soit la situation épidémiologique, le diagnostic virologique doit être réalisé sur les 1<sup>ers</sup> cas identifiés.

### 8.4. Suspicion d'infection par un virus aviaire ou porcine

Les consignes sont, en cas d'apparition de signes respiratoires ou d'une conjonctivite chez des personnes

au contact d'animaux connus pour être infectés par des virus zoonotiques, d'adresser le patient à la structure hospitalière la plus proche afin d'y réaliser des prélèvements adaptés (crachat induit, écouvillon nasal, écouvillon conjonctival en cas de conjonctivite) en protégeant le préleveur (port de gants, masque et lunettes). Ces prélèvements devront être acheminés en urgence au CNR pour confirmer ou infirmer rapidement la présence d'un virus zoonotique.

## 9 - Traitement

### 9.1. Traitement symptomatique

La prise en charge d'une grippe simple, chez un patient ne présentant aucun facteur de risque, repose sur un traitement symptomatique associant paracétamol, hydratation et repos. Un arrêt de travail de quelques jours aura, de plus, l'effet bénéfique de limiter la transmission du virus.

### 9.2. Traitement spécifique

Pour les individus présentant des facteurs de risque, ou une forme grave, un traitement antiviral spécifique doit être proposé en complément du traitement symptomatique et des mesures d'hygiène. Les traitements historiques de la classe des adamantanes (amantadine ou rimantadine) sont des inhibiteurs de la protéine M2 des virus influenza de type A. En raison de la résistance de la majorité des souches virales, ces molécules ne sont plus disponibles en France.

Depuis 2010, les INA sont la seule classe d'antiviraux recommandée par l'OMS dans le traitement et la prophylaxie des infections par les virus de types A et/ou B. Actuellement, seuls 2 INA sont autorisés dans le monde entier : l'oseltamivir et le zanamivir. Deux nouveaux INA, le laninamivir et le pérāmivir, sont en cours d'évaluation clinique, mais sont déjà autorisés dans certains pays. Le laninamivir est utilisé dans le traitement des infections grippales simples sans complications. Le pérāmivir et le zanamivir peuvent être utilisés par voie intraveineuse (IV) dans les gripes sévères ou lors d'excrétion prolongée du virus avec résistance à l'oseltamivir. En France, le traitement antiviral de 1<sup>re</sup> intention est l'oseltamivir. Administré par voie orale, l'efficacité maximale est obtenue si le traitement est administré dans les 48 premières heures suivant l'apparition des symptômes. Le traitement classique dure 5 j et peut être administré à tous les âges. En cas de développement de résistance, la seule alternative thérapeutique est le zanamivir IV, en ATU (autorisation temporaire d'utilisation). Le zanamivir inhalé qui avait été proposé de 1999 à 2009 n'est actuellement plus commercialisé en France.

Devant cet arsenal thérapeutique restreint, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours d'évaluation, avec de nouvelles cibles et des

mécanismes d'action originaux. Certaines molécules ont un effet contre les sous-unités du complexe polymérase : inhibiteurs de PB2 comme le pimodivir (VX-787) ou le baloxavir marboxil (S-033188), et les inhibiteurs de PA (L-742,001). Le favipiravir (T-705), antiviral prometteur à large spectre, actif contre tous les virus à ARN de polarité positive ou négative, est un inhibiteur de l'ARN polymérase qui va entraîner l'apparition de nombreuses mutations au cours de la multiplication virale, ce qui favorise la formation d'une large proportion de virus non viables. Cet antiviral est déjà autorisé au Japon dans le traitement des infections par les virus influenza après échec des INA.

Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, l'association de plusieurs molécules antivirales possédant des mécanismes d'actions et/ou des profils de résistance différents pourrait limiter l'apparition de virus résistants et agir de façon synergique. L'association amantadine/ribavirine/oseltamivir pour le traitement de la grippe chez l'adulte à risque de complications est en cours d'évaluation. D'autres associations sont envisagées : oseltamivir/ribavirine, favipiravir/oseltamivir, ribavirine/péramivir ou encore antiviraux/immunomodulateurs. Il faut rester vigilant concernant les associations d'antiviraux ; par exemple, l'association oseltamivir *per os* et zanamivir inhalé est à proscrire, ces 2 molécules ayant des effets antagonistes en raison d'une compétition au niveau de leur cible d'action commune et ce malgré leurs voies d'administrations différentes.

### 9.3. Les résistances aux traitements spécifiques

Pour les adamantanes, les virus influenza de type B sont naturellement résistants, et 30% des virus de type A sensibles développent une résistance empêchant la fixation des adamantanes sur la protéine M2 après 3 j de traitement. Depuis 2009, les virus A(H1N1)pdm09 circulants sont tous résistants aux adamantanes, de même que l'ensemble des virus A(H3N2), justifiant la non recommandation de leur prescription.

Les résistances aux INA sont dues à des mutations dans la séquence de la NA entraînant des substitutions d'acides aminés à proximité ou dans le site actif de l'enzyme. Ces substitutions, dépendant du sous-type viral, les plus fréquemment observées *in vivo* sont la H275Y dans les N1, la R292K et la E119V dans les N2. Les résistances aux INA ont une faible prévalence, variant en fonction du sous-type viral, et peuvent dans de rares cas devenir dominantes. En 2007, les virus saisonniers A(H1N1) se sont séparés en 2 clades : l'un sensible et l'autre résistant à l'oseltamivir. Ces derniers sont apparus en Europe, au cours de l'hiver 2007-2008, et sont devenus majoritaires lors de l'hiver 2008-2009. En 2009, ces virus ont ensuite été remplacés par le virus pandémique A(H1N1)pdm09 qui est sensible à l'oseltamivir.

Dans ce contexte, la surveillance et l'étude des mécanismes de résistance sont des éléments indispensables à la lutte antigrippale.

## 10 - Prévention

### 10.1. Mesures d'hygiène

En complément de son traitement, la mise en place de mesures d'hygiène et de mesures barrières simples telles que le port d'un masque chirurgical par le patient, le renouvellement régulier de l'air de sa chambre, et une friction des mains avec une solution hydro-alcoolique (après un mouchage ou éternuement), sera très utile pour limiter la transmission du virus.

### 10.2. La vaccination actuelle

La vaccination est le meilleur moyen de lutte contre la grippe. Il existe 2 types de vaccins disponibles en France : des vaccins inactivés sans adjuvants administrés par voie injectable (en intramusculaire ou en sous-cutanée) ou des vaccins vivants atténués administrés par aérosol (voie nasale). Ces derniers sont indiqués chez l'enfant de 2 à 18 ans. Le vaccin injectable est une alternative dès l'âge de 3 mois et nécessite en cas de primo-vaccination l'injection de 2 demi-doses à 1 mois d'intervalle. La campagne de vaccination, organisée par les autorités de santé tous les ans, à partir de début octobre, vise à réduire la mortalité associée à la grippe, en proposant la vaccination gratuite à l'ensemble des individus présentant des facteurs de risque (soit environ 10 millions de Français). Outre les individus à risque, cette vaccination est recommandée pour tout individu au contact d'un individu à risque (principe de la prévention par « *cocooning* ») et pour tous les personnels soignants. Cette vaccination est aussi fortement recommandée dans les EHPAD pour les résidents comme pour le personnel. La vaccination permet de réduire significativement la mortalité très élevée dans ces structures. Du fait des variations antigéniques, la composition vaccinale est revue tous les ans. Depuis l'automne 2018, les vaccins disponibles en France comportent 4 composantes vaccinales (quadrivalents) avec un représentant des virus A(H1N1)pdm09, 1 pour les virus A(H3N2) et 1 pour chacun des 2 lignages B (Yamagata et Victoria).

L'efficacité des vaccins dépend de l'adéquation entre les virus de la composition vaccinale et les virus circulants. Lorsque le vaccin comporte des virus vaccinaux antigéniquement identiques aux virus circulants, l'efficacité vaccinale est optimale, de l'ordre de 80% chez la personne de moins de 65 ans et de 60% pour la personne de plus de 65 ans. En cas d'apparition, durant l'épidémie, d'un variant antigéniquement différent du virus vaccinal, l'efficacité vaccinale peut baisser de manière significative.

### 10.3. Les vaccins du futur

L'utilisation des vaccins contre la grippe est en pleine évolution et personnalisable. Il est démontré que le vaccin atténué est plus efficace chez les enfants, alors que les vaccins à haute dose antigénique peuvent induire une meilleure protection chez les personnes âgées.

De nouveaux vaccins sont en cours de commercialisation, comme des vaccins protéiques purifiés (disponibles aux Etats-Unis), qui semblent induire une excellente protection post-vaccinale. Des vaccins dits « universels » sont également en cours de développement. Ils devraient permettre d'induire une protection à long terme (plusieurs années) même contre des virus qui présenteraient des variations antigéniques.

---

## 11 - Conclusion et perspectives

---

La grippe est une infection fréquente, peut-être la plus fréquente des infections saisonnières. Son impact est souvent sous-estimé alors que la mortalité et la morbidité induites, maintenant bien mesurées, sont reconnues comme très importantes. Le développement récent d'outils diagnostiques simples,

fiables et largement répandus, a permis aux cliniciens de mieux connaître cette maladie aux multiples facettes. L'apport des technologies de séquençage de nouvelle génération et de protéomique permettront d'améliorer les connaissances sur l'infection grippale.

Les virus influenza sont un parfait exemple du concept « *One Health* » qui illustre l'interdépendance entre la santé humaine et la santé animale. Une amélioration de la surveillance transversale de la circulation de ces virus dans toutes les espèces animales est donc un objectif majeur des prochaines années. Mais les perspectives les plus attendues, apportées par une approche intégrative de cette maladie, permettront la mise à disposition de nouveaux moyens de lutte contre la grippe, actuellement en cours de développement (outils thérapeutiques [antiviraux] et prophylactiques [vaccins]) ainsi qu'une meilleure identification des individus qui en bénéficieront le plus.

### Messages importants

- Les virus influenza sont des virus dont le génome à ARN segmenté explique leur capacité d'évolution rapide.
- Les virus influenza humains de type A (A(H3N2) et A(H1N1)) et B (lignages Yamagata et Victoria) sont les virus respiratoires responsables des épidémies annuelles de grippe.
- La surveillance des virus influenza d'origine zoonotique doit être renforcée pour permettre un meilleur suivi des nombreuses souches circulantes dans les différentes espèces animales. Les virus pandémiques ayant touché l'être humain au cours du siècle dernier sont tous issus de virus zoonotiques.
- La grippe se manifeste généralement par un début brutal et une fièvre importante (> 38°C) mais d'autres manifestations sont décrites.
- L'utilisation d'antiviraux adaptés administrés précocement, selon les recommandations de l'OMS, permet d'améliorer l'évolution de la maladie et de réduire le risque de complications.
- Chez les individus présentant des facteurs de risque et le personnel soignant, la vaccination antigrippale saisonnière est prise en charge à 100% en France. La couverture vaccinale reste encore trop faible, et justifie le ciblage des populations à risque et les campagnes de communication effectuées par l'Assurance Maladie. La dérive antigénique des virus circulants justifie la mise à disposition d'un nouveau vaccin chaque année.
- La surveillance des caractéristiques des virus influenza circulants est assurée par un réseau unique associant l'OMS, les laboratoires collaborateurs OMS (CNR Virus des infections respiratoires), des médecins (réseaux sentinelles), les hôpitaux (réseau RENAL). Les bulletins hebdomadaires du réseau donnent des informations en temps réel sur l'évolution de l'épidémie permettant aux structures de soins de s'organiser. Ils informent également sur l'émergence de variants viraux échappant à la vaccination saisonnière ou présentant des résistances aux antiviraux.
- Les nouveaux outils de biologie moléculaire désormais disponibles permettent d'améliorer le diagnostic étiologique et la prise en charge des individus.

### Pour en savoir plus ...

1. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviridae. *In* Fields Virology, Sixth Edition, DM Knipe and PM Howley (Eds), Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, p.1186-1243.
2. Gaymard A, Frobert E, Lina B, Escuret V. Infections humaines par les virus influenza A(H7N9) : émergence des virus, évolution et risque pandémique. *Virologie* 2017; 21: 255-65.
3. Biquand E, Demeret C. Résolution de la structure de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN trimérique des virus influenza : son impact sur notre compréhension des interactions de la polymérase avec les facteurs viraux et cellulaires. *Virologie* 2016; 20: 302-20.
4. Le Briand N, Casalegno JS, Escuret V, Gaymard A, Lina B, Ottmann M, Frobert E. La balance HA-NA des virus influenza A(H1N1), *Virologie* 2016; 20: 47-60.
5. Pichon M, Pelissier R, Valette M, Lina B, Josset L. Diversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires *Virologie* 2018; 22: 173-82.



# Chapitre 2 : Virus influenzae A aviaires sous surveillance

## 2.1. Introduction

Parmi les virus influenzae, ceux de type A peuvent circuler chez un grand nombre d'espèces animales mais leur réservoir est constitué par les oiseaux sauvages aquatiques (12). Dans ce réservoir, on distingue deux types de souches virales circulantes de pathogénicité différente : les virus influenzae aviaires faiblement (IAFP) ou hautement (IAHP) pathogènes. Un virus devient hautement pathogène s'il possède un site de clivage polybasique dans son hémagglutinine et/ou s'il provoque une surmortalité au cours d'infections expérimentales chez la poule (13). Indispensable, le site de clivage polybasique n'est pas suffisant pour expliquer la pathogénicité dans d'autres espèces, notamment chez l'Homme (14,15). Par exemple, les virus A/Anhui/1/2013 (H7N9) ne possèdent pas ce site mais sont responsables de pneumopathies virales avec un taux de mortalité d'environ 40% chez l'Homme. Actuellement, seules certaines souches portant une H5 ou une H7 ont été classées comme virus IAHP. La majorité des virus influenzae retrouvés chez les oiseaux sont des IAFP. Ils se répliquent au niveau du système digestif et sont excrétés dans les fientes, ce qui facilite leur dissémination par contamination oro-fécale. Ces virus sont généralement responsables d'infections asymptomatiques ou de tableaux associant de légers signes respiratoires à une diminution du taux de ponte des volailles d'élevage (16). À l'opposé, les infections par des virus IAHP sont plus rares mais s'accompagnent d'une mortalité quasi-systématique par diffusion systémique du virus dans tous les organes des volailles domestiques.

Depuis 2014, 77 pays ont rapporté la détection d'au moins 13 sous-types de virus influenzae aviaires. Différentes souches, A(H5N1), A(H5N2), A(H5N6), A(H5N8), A(H7N8), A(H7N9) sont régulièrement à l'origine de foyers d'infections aviaires sous haute surveillance des autorités de santé publique (17). Les virus A(H5N8), caractérisés IAHP, mais n'ayant à ce jour causé aucune infection humaine, ont été détectés pour la première fois en Chine en 2010 et ont provoqué plusieurs épizooties majeures, notamment en 2014 puis en 2016 (18). L'épizootie de 2016-2017 a été particulièrement sévère en Europe, surtout dans les élevages du Sud-Ouest de la France.

Dans certains cas, les virus influenzae A aviaires peuvent infecter l'Homme et être responsables de zoonoses. Ces virus sont d'ailleurs considérés comme le parfait exemple du concept « *One Health* », illustrant l'interdépendance entre la santé humaine et la santé animale (19). De plus, ces gripes zoonotiques entraînent des manifestations diverses allant de la conjonctivite à la pneumopathie pouvant être mortelle. Les caractéristiques de la maladie (période d'incubation, sévérité des symptômes et pronostic clinique) dépendent du sous-type de virus responsable de l'infection. Les infections liées aux virus A(H5N1), A(H5N6) et A(H7N9) sont les plus graves et sont responsables d'un tableau clinique sévère avec une évolution très rapide en pneumonie virale associée dans certains cas à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ou une défaillance multiviscérale.

Différents sous-types de virus influenzae aviaires ont été rapportés pour causer ponctuellement des infections humaines avant la diffusion des virus A(H5N1) mais ces cas étaient très rares. Depuis 1997, des zoonoses majoritairement bénignes liées aux virus influenzae A sont rapportées de plus en plus fréquemment (20). En revanche, il n'est pas clair de savoir si cette augmentation reflète un accroissement de la circulation des virus influenzae A entre les oiseaux et l'Homme ou la conséquence de l'amélioration des techniques de diagnostic et de surveillance. L'ensemble des infections humaines par des sous-types aviaires est résumé dans le Tableau 1.

<b>Sous-type de virus influenza A</b>	<b>Nombre d'infections humaines</b>	<b>Nombre de décès</b>
<b>A(H5N1)</b>	<b>861</b>	<b>454</b>
<b>A(H5N6)</b>	<b>22</b>	<b>12</b>
A(H6N1)	1	0
A(H7N2)	7	0
A(H7N3)	12	0
A(H7N4)	1	0
A(H7N7)	99	1
<b>A(H7N9)</b>	<b>1568</b>	<b>615</b>
A(H9N2)	50	1
A(H10N7)	4	0
<b>A(H10N8)</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

**Tableau 1 : Nombre de cas humains et de décès dus à des infections par des virus aviaires de 1959 à Mai 2019. Les virus en gras sont responsables d'un taux de mortalité supérieur à 40%. Tableau adapté de (2,21).**

Enfin, le passage d'un virus influenza A aviaire dans un nouvel hôte peut entraîner son adaptation et sa circulation dans ce nouvel hôte. Cette adaptation nécessite le franchissement d'un certain nombre d'obstacles : c'est la barrière d'espèce. Trois étapes fondamentales doivent être franchies avant qu'un virus influenza ne puisse s'adapter à un nouvel hôte : i) la transmission entre deux espèces nécessite des contacts étroits entre l'espèce infectée (exemple des volailles) et l'espèce réceptrice (exemple de l'Homme), ii) la réalisation de cycles répliatifs complets chez le nouvel hôte, iii) la transmission entre individus de la nouvelle espèce. Les deux dernières étapes peuvent se faire par mutations ou réassortiments successifs, soit directement dans le nouvel hôte, soit chez un hôte alternatif ou intermédiaire. Par exemple, le porc est un maillon important pour l'adaptation de certains virus aviaires à une transmission humaine (22). Lorsqu'un virus influenza aviaire arrive à franchir la barrière d'espèce, il se retrouve dans une population humaine immunologiquement naïve et peut être à l'origine d'une pandémie.

Au cours des quatre dernières pandémies, les virus en cause avaient pour origine le réservoir aviaire. En 1918, l'émergence d'un virus A(H1N1) a été responsable de la « grippe espagnole » et bien que son origine ne soit pas complètement élucidée, il pourrait provenir directement du réservoir aviaire (23). En 1957, le virus A(H2N2) responsable d'une pandémie dite « asiatique » était issu du réassortiment entre un virus aviaire et le virus circulant A(H1N1) de 1918. En 1968, le virus A(H2N2) de 1957 a été remplacé par un virus A(H3N2) responsable de la troisième pandémie et provenant à nouveau d'un réassortiment entre des virus aviaires et le virus humain circulant A(H2N2). Plus récemment, en 2009, la première pandémie du XXI<sup>ème</sup> siècle a été causé par un virus A(H1N1) (noté A(H1N1)pdm09) issu d'un réassortiment entre un virus « triple réassortant » présent chez le porc mais contenant des gènes de virus aviaires et le virus humain A(H3N2) (24).

Finalement, qu'ils soient ou non responsables de zoonose, les virus influenzae aviaires à potentiel zoonotique sont très étroitement surveillés et étudiés.

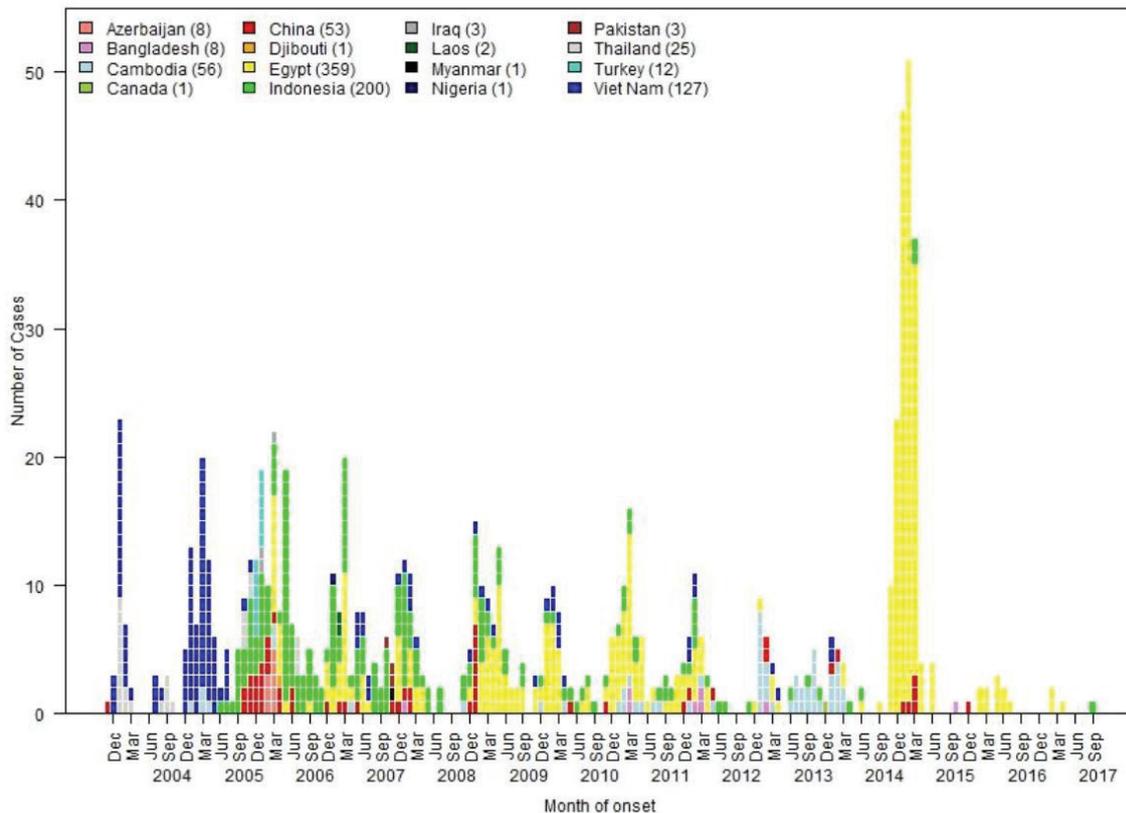
## **2.2. Virus A(H5N1)**

### **2.2.1. Épidémiologie**

En 1996, des virus influenzae A aviaires de type A(H5N1) ont causé des infections chez des oies dans la province de Guangdong en Chine (virus apparentés à A/goose/Guangdong/1/96 ; clade 0). Ces virus ont ensuite été responsables d'une épidémie chez les volailles en 1997 (clade 7), qui serait à l'origine des premiers foyers d'infections humaines (25). Ces virus A(H5N1) classés comme IAHP ont persisté mais ne causant que quelques rares épidémies dans des fermes Chinoises et Hongkongaises entre 1997 et 2003 (26,27). De 2003 à 2005, différents clades ont continué de circuler chez la volaille provoquant un nombre croissant d'infections retrouvées dans plusieurs pays asiatiques (17). En avril 2005, ces virus provoquèrent la première épidémie majeure dans la faune sauvage (clade 2.2) avec la mort de plus de 60 000 oiseaux, en particulier au niveau du Lac Qinghai en Chine, l'un des principaux points de passage dans les flux migratoires en Asie (28,29). En l'espace de quelques mois, ils se sont disséminés le long des routes migratoires avec une première détection en dehors de l'Asie en Juillet 2005 (Russie) puis des mises en évidence successives dans de nombreux pays d'Europe (dont la France avec un élevage de dindes touché dans l'Ain), d'Afrique, du Moyen Orient et une persistance en Asie (17). En 2009, de nouveaux virus A(H5N1) (clade 2.2) retrouvés autour du lac Qinghai ont disséminé chez les oiseaux migrateurs et la volaille, du Japon à l'Inde. Enfin, en 2015, les virus A(H5N1) (clade 2.3.2.1.c) ont causé à nouveau la mort de nombreux oiseaux sauvages autour du lac Qinghai et ont ensuite été détectés chez les volailles en Chine, Cambodge, Côte d'Ivoire, Ghana, Nigéria et Vietnam (17,30–32).

Chez l'homme les premières infections par les virus A(H5N1) IAHP ont eu lieu en 1997 à Hong Kong avec 18 cas humains dont 6 décès (clade 7) (33). De 1997 à 2003, aucune infection humaine par ce virus n'a été dépistée mais depuis 2003, 861 cas ont été signalés dans 17 pays avec un taux de mortalité supérieur à 50% (Figure 1 et Tableau 1) (21). Au début, les infections humaines par ce

virus touchaient majoritairement les pays asiatiques (clade 1 et clade 2.1.2 ou 2.1.3) (Thaïlande, Vietnam, Indonésie et Chine) mais à partir de 2006 l'Europe de l'Ouest et l'Afrique ont été touchés suivant ainsi la diffusion du virus dans le réservoir aviaire. C'est l'Egypte, qui déclara le plus grand nombre d'infections humaines (clade 2.2.1.1 et 2.2.1.2), soit 358 cas par ces virus sur une période de plus de 11 ans (2006-2017) avec un pic massif de 136 cas en 2015 (Figure 1). Depuis, le nombre d'infections par le virus A(H5N1) diminue chaque année. En 2018, aucune infection humaine par ce virus n'a été rapportée mais début 2019, le Népal a pour la première fois déclaré le diagnostic d'une infection à A(H5N1) chez un jeune homme de 21 ans qui est décédé à l'hôpital de complications respiratoires (34).



**Figure 1 : Nombre d'infections humaines par le virus A(H5N1) en fonction du mois et du pays de diagnostic entre 2004 et 2017. Figure adaptée de (21).**

### 2.2.2. Clinique des infections

Chez les oiseaux la clinique des infections par les virus A(H5N1) IAHP est très variable d'une espèce à l'autre. Par exemple chez le poulet, l'infection peut causer une cyanose, une hémorragie au niveau des membres, de la toux, une conjonctivite, un encombrement des voies respiratoires, une dépression et de l'inappétence. Dans cette espèce, le taux de mortalité peut atteindre plus de 50% dans les 24 premières heures (35–37). En revanche, d'autres espèces d'oiseaux telles que les canards ou les cygnes présentent des infections asymptomatiques avec les virus A(H5N1) (27,28).

Chez l'Homme, la plupart des cas sont de jeunes adultes ou des enfants (âges médians allant de 18 à 26 ans), tous exposés à des oiseaux contaminés sur des marchés d'animaux vivants ou

hébergés à leur domicile, après des opérations de plumage ou des jeux. Seul un contact étroit et une exposition à une très forte quantité de virus rendent possible la contamination par les virus A(H5N1) alors que des contacts plus accidentels ou temporaires peuvent être à l'origine d'infections par les virus A(H7N9) (26). Pour l'instant, aucune transmission interhumaine de ce virus n'a été démontrée formellement. Le tableau clinique reprend l'ensemble des symptômes respiratoires que l'on peut retrouver au cours d'une infection grippale avec un risque d'évolution rapide vers des atteintes respiratoires basses (pneumonie virale) pouvant s'aggraver par un SDRA et/ou une défaillance multiviscérale. Les infections humaines par les virus A(H5N1) se caractérisent également par une forte proportion de symptômes extra-pulmonaires (conjonctivites, troubles gastro-intestinaux et/ou cytolysse hépatique). Ces cas ont été associés à différents clades mais aucune différence d'expression clinique n'a été mise en évidence entre eux. En revanche, la mortalité de plus de 50% (Tableau 1) est fortement liée à l'âge et dépend de la précocité de la prise en charge (26,38).

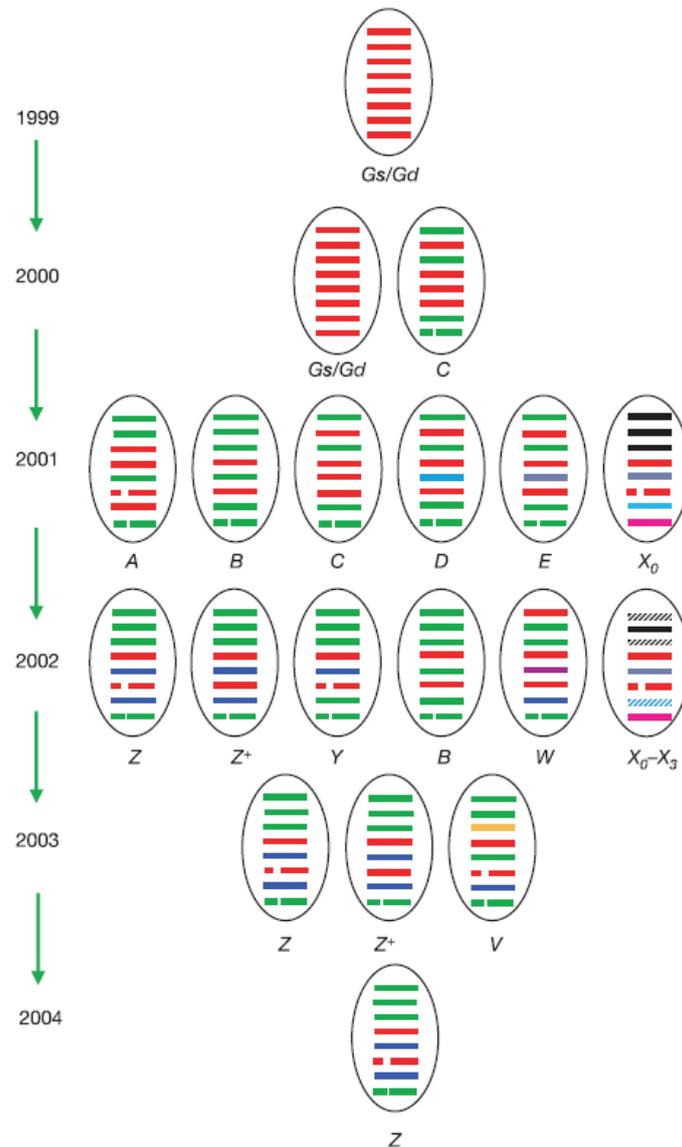
La prise en charge est basée principalement sur un traitement symptomatique adapté à la gravité des signes cliniques (ventilation, intubation, mesures réanimatrices...) associé à un antiviral spécifique de la classe des INA. Lors du traitement, plusieurs cas de résistances aux INA ont pu être décrits suite à l'apparition de la substitution H274Y dans la N1 (Voir Partie A, Chapitre 3).

### **2.2.3. Caractéristiques génétiques des virus A(H5N1)**

Plusieurs études ont analysé les virus A(H5N1) IAHP pour déterminer leur origine et leur évolution au cours du temps. Ces virus seraient tous apparentés au A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) mais auraient évolué très rapidement suite à des réassortiments avec plusieurs sous-types différents : 21 réassortants ont été identifiés entre 1996 et 2003. Ces virus réassortants possèdent une hémagglutinine commune apparentée au virus IALP A/England/50-92/91 (H5N1) et leur neuraminidase N1 serait issue soit du virus A/England/50-92/91 (H5N1) soit du virus A/AfricanStl/ENG.Q/983/79 (H7N1). Pour les six autres gènes, les origines sont multiples et différentes pour chacun des 21 réassortants étudiés. Il est tout de même à noter que pour chaque réassortant au moins un de ces six gènes est apparenté à un virus A(H9N2) (39,40). Cette caractéristique semble être un élément majeur pour l'émergence de virus aviaires à potentiel zoonotique et est actuellement retrouvée dans les virus A(H5N6), A(H7N9) et A(H10N8) ayant causé des infections humaines (41).

Au début, la classification des virus A(H5N1) s'est faite sur la base de leur constitution génomique permettant de suivre l'apparition et la sélection des réassortants au cours du temps. En 2001, six génotypes ont été décrits comme circulant dans le réservoir aviaire (A, B, C, D, E et X<sub>0</sub>). En 2002, huit nouveaux génotypes ont été décrits (V, W, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, Y, Z et Z<sup>+</sup>) alors que les génotypes A, C, D et E avaient arrêté de circuler. Par la suite le nombre de génotypes isolés dans les foyers d'infections par les virus A(H5N1) n'a cessé de diminuer jusqu'à ne retrouver plus que trois génotypes en 2003 (V, Z et Z<sup>+</sup>) et enfin majoritairement le génotype Z à partir de 2004 (42,43). Le suivi de ces génotypes nécessite le génome complet des virus A(H5N1). Ce dernier n'étant pas

systématiquement séquencé, le groupe de travail commun issu de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'OMS travaillant sur l'évolution des virus A(H5N1) proposa dès 2008 une uniformisation de la nomenclature pour classer ces virus à partir du clade génétique de leurs hémagglutinines H5 (44). Cette classification repose sur la distinction de dix clades (clade 0 à 9), dont plusieurs n'ont pas été isolés depuis 2008 alors que d'autres continuent à circuler et à se diversifier imposant des révisions de la nomenclature pouvant définir jusqu'à cinq sous-classifications au sein d'un clade historique (ex : clade 2.3.2.1.c) (45,46). Les infections humaines sont dues à des virus issus de plusieurs clades : clade 0, 1, 2 et 7.



**Figure 2 : Génotypes des virus A(H5N1) isolés en Asie entre 1999 et 2004.** Les huit segments de gènes sont représentés par des barres horizontales (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M et NS) dont la couleur représente le lignage d'origine. Les espaces blancs dans les segments de gène correspondent à des délétions. La couleur rouge correspond aux segments provenant d'un virus A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1). La couleur bleu ciel correspond aux segments provenant d'un virus A/duck/Hong Kong/Y280/97-like (H9N2). Les autres couleurs représentent des segments provenant de différents virus influenzae A aviaires non identifiés. Figure adaptée de (43).

Au cours des dix dernières années, de nombreux sous-types viraux IAHP contenant une hémagglutinine H5, ont été isolés dans le réservoir aviaire. Le groupe de travail évaluant l'évolution des virus A(H5N1) a donc élargi son champ d'expertise à l'évolution des hémagglutinines H5 apparentées au virus A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) qui se retrouvent aujourd'hui dans différents sous-types d'intérêts : A(H5N1), A(H5N2), A(H5N6) et A(H5N8) (47).

### **2.3. Virus A(H5N6) et A(H5N8)**

#### **2.3.1. Caractéristiques génétiques des virus porteurs d'une H5**

Comme décrit précédemment, les virus contenant une hémagglutinine H5 apparentés à la souche A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) sont apparus à la fin des années 1990 et ont évolué formant de nombreux clades. Dès 2005, des virus porteurs d'une H5 du clade 2.3.4 sont isolés et caractérisés, et vont rapidement se diffuser et se diversifier. En 2015, une révision de la nomenclature de ces virus fait apparaître le clade 2.3.4.4 au sein duquel se trouvent de nombreux sous types viraux issus de multiples réassortiments : A(H5N1), A(H5N2), A(H5N3), A(H5N5), A(H5N6) et A(H5N8) (47). Le nombre et la diversité de ces sous-types émergents expliquent en partie la réapparition et la ré-augmentation des foyers d'infections dus à des virus A(H5Nx) IAHP observés à partir de 2013 (17). Les virus présents dans le clade 2.3.4.4 peuvent être à nouveau subdivisés en quatre groupes phylogénétiquement distincts : A – D. Les groupes A et B sont constitués majoritairement de virus A(H5N8), alors que les groupes C et D sont constitués majoritairement de virus A(H5N6) (48,49).

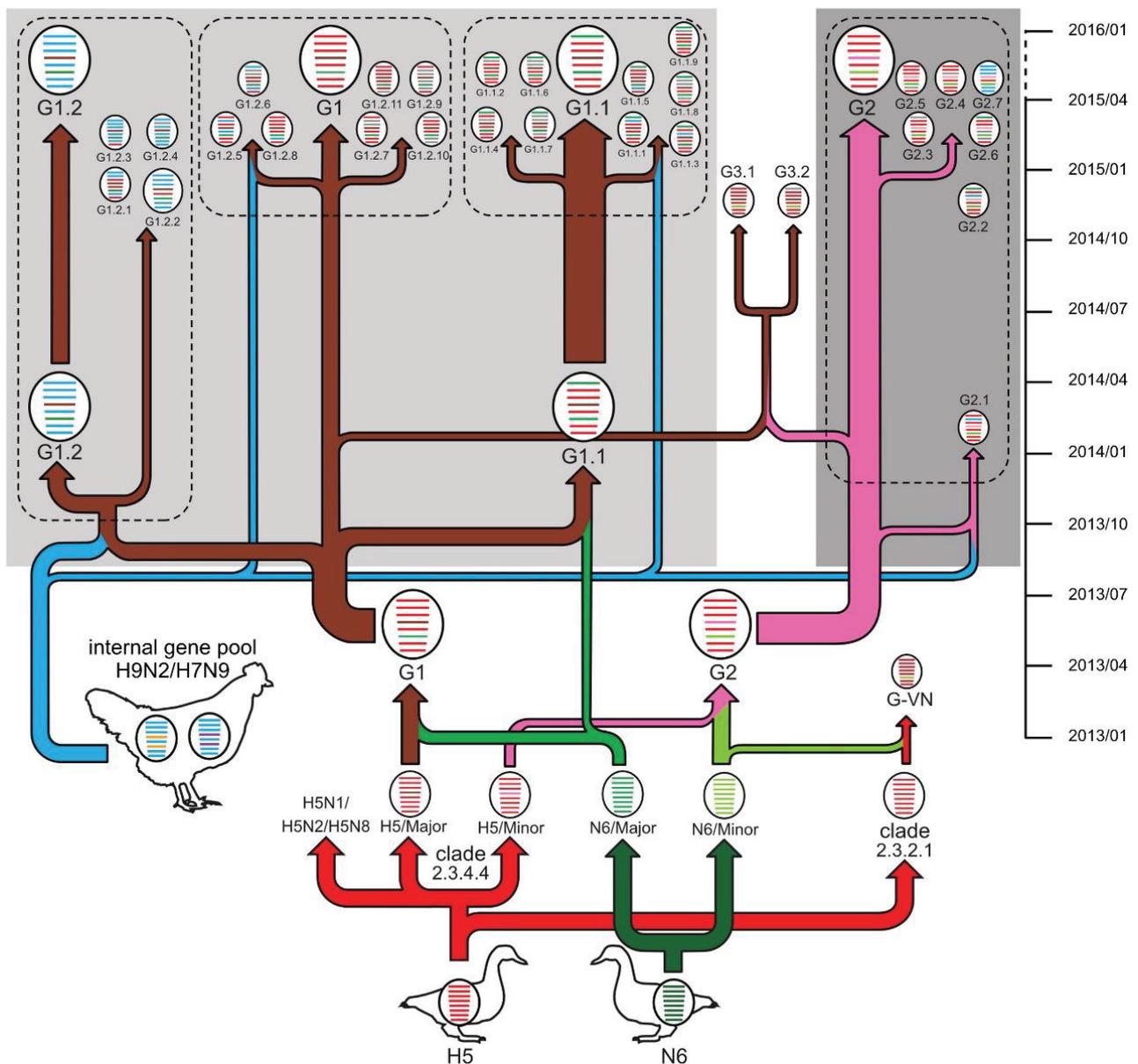
Globalement, il est très difficile de déterminer précisément l'origine génétique des virus aviaires car les phénomènes de réassortiments sont très fréquents et les segments de gènes peuvent provenir de nombreux sous-types issus de virus IALP ou IAHP.

#### **2.3.2. Épidémiologie et clinique des infections par le virus A(H5N6)**

Les virus A(H5N6) ont été détectés pour la première fois au Laos en 2014 chez des poulets et des canards puis se sont diffusés au Vietnam et en Chine (17). Depuis cinq ans, ces virus se répandent en Asie touchant maintenant le Japon, la Corée, le Myanmar, les Philippines et Hong-Kong. Les virus A(H5N6) ont supplanté les virus A(H5N1) et sont devenus le sous-type dominant dans la volaille représentant près de 40% des virus influenzae aviaires isolés en Chine. Leur répartition est très hétérogène en fonction des régions (6% à 62%) avec une prédominance nette dans les marchés de volailles vivantes situés dans le Sud de la Chine. Ces virus touchent de nombreuses espèces mais sont isolés préférentiellement des canards qui pourraient être un maillon majeur dans la chaîne de transmission d'autant plus que ces virus IAHP provoquent des infections généralement asymptomatiques chez ces animaux (50).

Entre 2014 et 2016, 34 génotypes de virus A(H5N6) ont pu être caractérisés lors de la surveillance systématique de l'environnement et des marchés de volailles vivantes en Chine (Figure 3). Ces différents génotypes sont issus de plusieurs événements indépendants de réassortiment et ont pu

évoluer en parallèle au cours du temps. On peut noter deux réassortiments majeurs entre des virus porteurs d'une H5 du clade 2.3.4.4 et une N6 probablement originaire d'un virus A(H6N6), ayant donné naissance début 2013 aux deux génotypes G1 et G2 (ou groupe C et D en fonction des auteurs) (49–51). En 2014, le génotype G1 s'est réassorti pour créer le génotype G1.1 contenant le segment PB2 d'un virus A(H6N6) avec le fond génétique du virus G1 ; et le génotype G1.2 contenant les gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase du virus G1 avec le fond génétique d'un virus A(H9N2) ou A(H7N9). Le génotype G1.1 est majoritaire chez les canards et a causé un cas d'infection humaine tandis que le génotype G1.2 est principalement retrouvé dans la volaille et a causé plus de cinq cas humains. Les autres génotypes ont également évolué en parallèle et subi divers réassortiments (Figure 3). Les génotypes G1 et G2 ont aussi été responsables de cas humains (50).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'évolution des virus A(H5N6).** Les huit segments de gènes sont représentés par des barres horizontales (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M et NS) dont la couleur représente le lignage d'origine. L'épaisseur des flèches représente le nombre d'isolats correspondant à chaque voie d'évolution. Figure adaptée de (50).

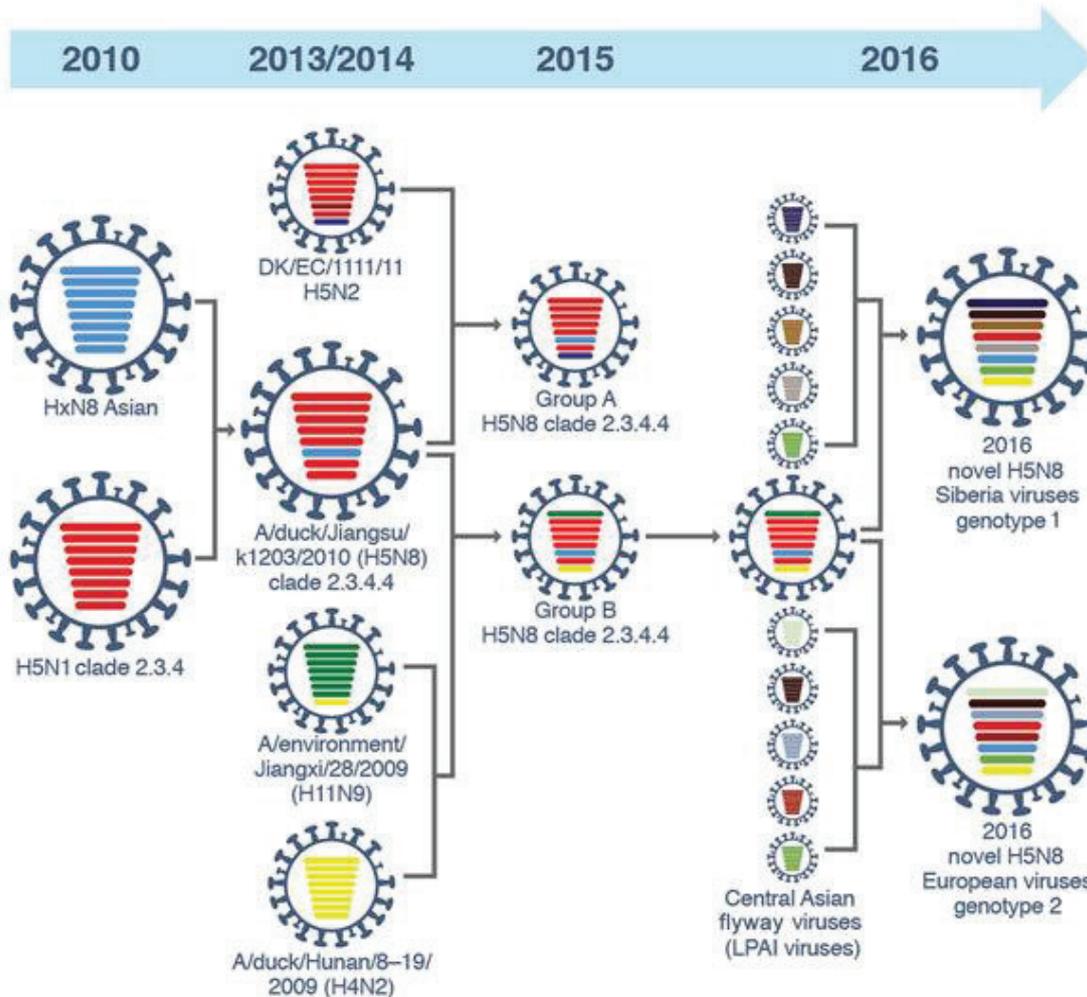
Très récemment, en 2017, de nombreux pays Européens ont commencé à rapporter des détections des virus A(H5N6) IAHP touchant aujourd'hui plus d'une dizaine de pays : Grèce, Suisse, Pays Bas, Suède, Slovaquie, Royaume-Uni, Irlande, Allemagne, Danemark et Finlande (17). Des rapports récents montrent que ces derniers ne se seraient pas diffusés depuis l'Asie mais seraient issus du réassortiment entre un virus A(H5N8) IAHP du groupe B et des virus IALP présents en Europe (52).

Chez l'Homme, le premier cas d'infection par un virus A(H5N6) date de 2015, puis au total 22 cas ont été signalés avec un taux de mortalité supérieur à 50% (Tableau 1) (3,53). Tous les cas humains ont été rapportés en Asie et ont eu des contacts préalables avec des volailles vivantes. La clinique de ces infections est similaire à celle observée lors des infections par les virus A(H5N1) IAHP bien que ces virus ne soient pas adaptés pour une réplication efficace chez les mammifères (50,54). La prise en charge de ces infections nécessite l'utilisation des INA. Si à ce jour aucune substitution de résistance n'a été détectée dans les cas humains, la substitution H274Y a été retrouvée dans des virus isolés chez la volaille dans les régions du Yunnan (50).

### **2.3.3. Épidémiologie et clinique des infections par le virus A(H5N8)**

Les premiers virus A(H5N8) porteurs de H5 du clade 2.3.4.4 ont été détectés en Chine en 2010 (55,56), suite au réassortiment entre un virus A(H5N1) du clade 2.3.4.4 et un virus non identifié A(HxN8). Par la suite, ce virus a subi de nouveaux phénomènes de réassortiments donnant naissance au groupe A représentant les virus contenant le segment NS d'un virus A(H5N2) et au groupe B représentant les virus contenant les segments PB2 d'un virus A(H11N9) et NS d'un virus A(H4N2) (49,57). Début 2014, des foyers d'infections par les virus A(H5N8) groupe A et B ont été détectés en Corée. Puis en 2014-2015, de multiples cas d'infections par les virus A(H5N8) du groupe A ont été rapportés chez les oiseaux domestiques et sauvages dans différentes parties du globe : Asie, Europe, Moyen Orient, Amériques du Nord. Cette dissémination géographique a permis de distinguer trois groupes de virus ; le groupe A1 qui a touché Europe et l'Est de l'Asie, le groupe A2 qui a touché l'Amérique du Nord et le groupe A3 qui a touché l'Est de l'Asie. Ces trois groupes ont alors évolué parallèlement avant d'être réintroduits en Asie via la Corée (49,56). En général, les virus A(H5N8) sont moins pathogènes que les A(H5N1) pour les oiseaux sauvages aquatiques. Le transport de ces virus hors d'Asie a donc pu se faire lors des migrations (52,58).

Il est également intéressant de noter que des réassortiments entre des virus A(H5N8) du groupe A et des virus IALP, entraînant l'apparition de nouveaux sous-type A(H5N1), A(H5N2) et A(H5N8) ont été retrouvés localement au Japon, Taïwan, Canada, USA et Europe (Allemagne, Pays Bas, Royaume Uni) (56). Ces nouveaux virus ont ensuite pu se diffuser rapidement chez les volailles domestiques notamment en Amérique du Nord (59).

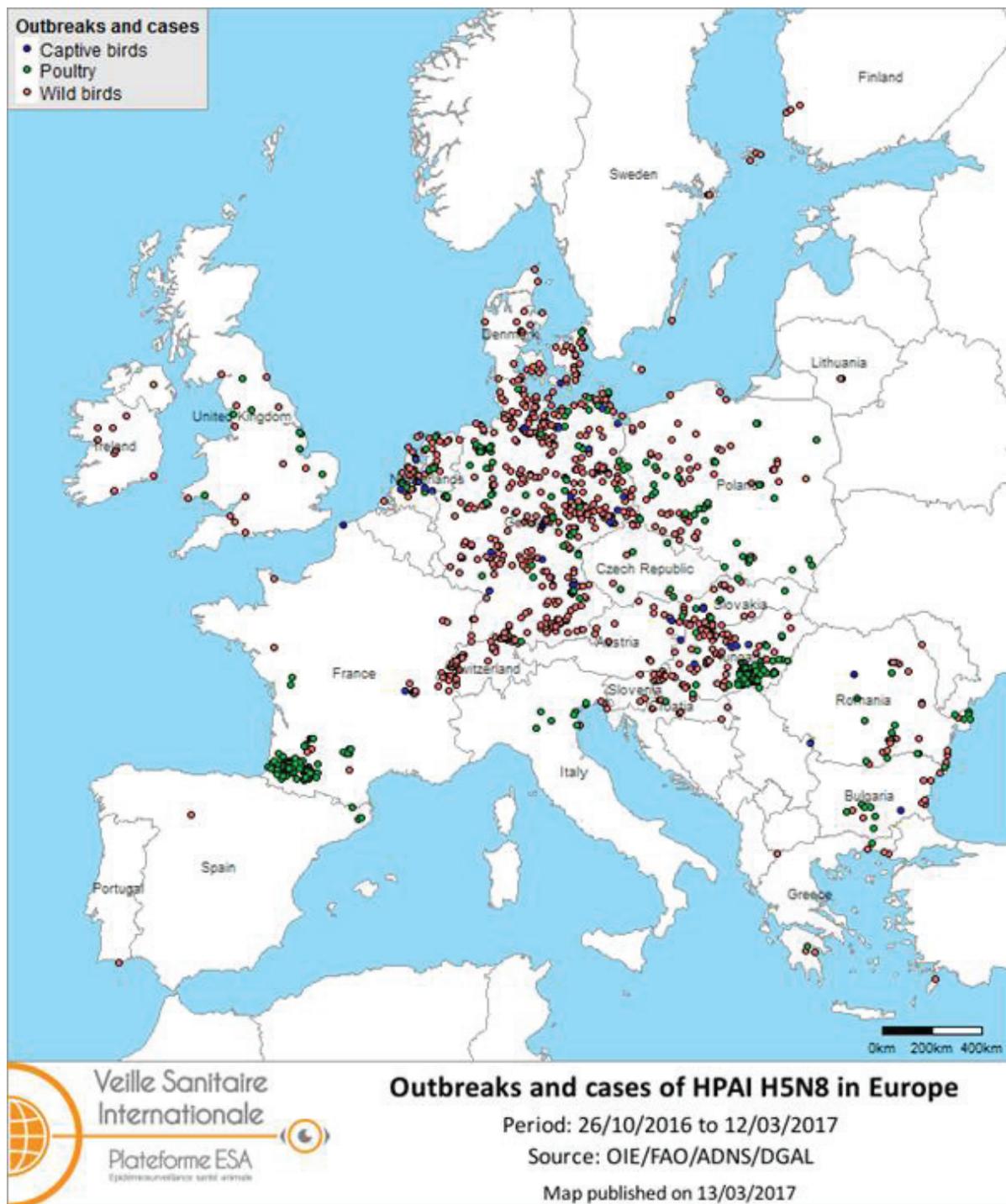


**Figure 4 : Représentation schématique de l'évolution des virus A(H5N8).** Les huit segments de gènes sont représentés par des barres horizontales (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M et NS) dont la couleur représente le lignage d'origine. Figure adaptée de (57).

Plus récemment, en 2016, les virus du groupe B jusqu'alors cantonné à la Chine se sont également réassortis avec de nombreux sous-type de virus IALP se propageant en Sibérie (60) puis en Europe, au Moyen Orient et en Afrique causant des épizooties majeures (49). Ces virus forment ainsi deux nouveaux génotypes : le virus A(H5N8) sibérien ou génotype 1 et le virus A(H5N8) européen ou génotype 2 (Figure 4) (57). Ces derniers beaucoup plus pathogènes que les précédents ont parfois causé une mortalité importante d'oiseaux aquatiques sauvages (52). En France, l'épizootie a touché majoritairement les élevages du Sud-ouest de la France avec plus de 480 foyers détectés entre 2016 et 2017 (Figure 5) (61). Heureusement ces virus A(H5N8) sont peu pathogènes et faiblement transmissibles par voies respiratoires dans le modèle furet (62). À ce jour aucun cas d'infection humaine par A(H5N8) n'a été rapporté.

Pour finir, il est important de noter que l'apparition de souches IAHP n'est pas uniquement dus au réassortiment de virus dont l'un possède au préalable une hémagglutinine avec un site de clivage polybasique. Par exemple en France, au cours de l'hiver 2015-2016, 77 foyers dus à de nouveaux virus porteurs de H5 IAHP phylogénétiquement bien distincts des H5 décrites précédemment ont été déclarés dans les élevages de volailles et canards du Sud-Ouest. Ces virus IAHP portant la H5

étaient classées dans différents sous-types : A(H5N9), A(H5N1), A(H5N2), A(H5Nx). Une des hypothèses expliquant l'émergence de ces virus est leur circulation à bas bruit parmi les élevages de canards puis leur transmission aux volailles auprès desquelles ils auraient acquis un nouveau site de clivage polybasique par accumulation de mutations (63). Ces épizooties se sont terminées par la mise en place d'un vide sanitaire et l'arrêt des exploitations et de la production de foie gras pendant plusieurs semaines (64,65).

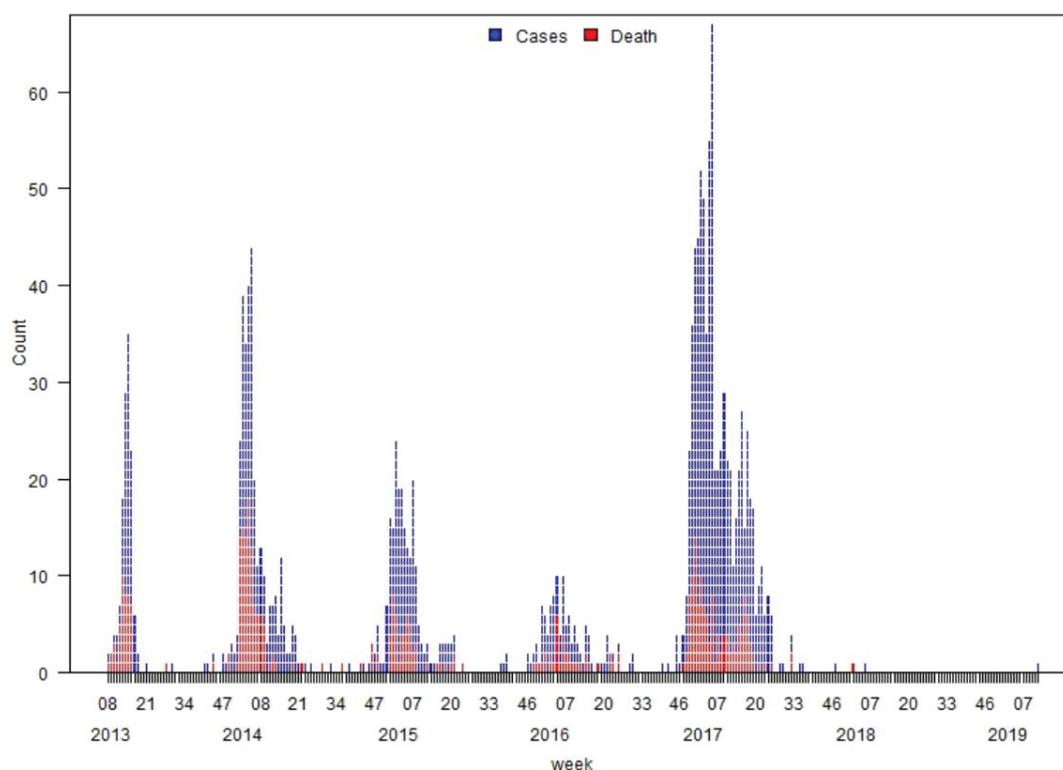


**Figure 5 :** Carte des foyers d'épizooties dues aux virus A(H5N8) HPAI en Europe entre le 26/10/2016 et le 12/03/2017. Les foyers détectés chez les volailles domestiques sont représentés en vert, les foyers issus de la faune sauvage en rouge et les foyers provenant d'oiseaux captifs en bleu. Figure adaptée de (66).

## 2.4. Virus A(H7N9)

### 2.4.1. Contexte

En Mars 2013, une seconde zoonose d'importance liée à un virus A(H7N9) est apparue en Chine (67). Ce virus a causé cinq vagues épidémiques d'importance variable au cours des six dernières saisons hivernales (Figure 6). Au 10 Mai 2019, 1 568 cas ont été recensés dont 615 décès localisés en Chine ou en lien direct avec la Chine. Le virus A(H7N9) est un virus IALP mais cause chez l'homme des infections respiratoires graves avec un taux de mortalité d'environ 40% (Tableau 1). Au cours de l'hiver 2016-2017, la vague épidémique a été particulièrement importante représentant à elle seule plus d'un tiers des infections humaines mais depuis seulement quelques cas sporadiques ont été rapportés (Figure 6) (21). Comme pour les autres infections par des virus influenzae A aviaires, les contaminations humaines par le virus A(H7N9) sont liées à des contacts avec des volailles infectées, notamment dans les exploitations et les marchés de volailles vivantes très populaires en Chine. La diminution massive du nombre d'infections humaines depuis 2017 peut être reliée à la mise en place dans plusieurs provinces Chinoises en juillet 2017 d'un programme massif de vaccination des volailles par un vaccin inactivé produit par génétique inverse (3).



**Figure 6 : Nombre d'infections humaines par le virus A(H7N9) en fonction du mois entre 2013 et 2019. Figure adaptée de (21).**

En plus de sa facilité à infecter l'homme, des évolutions du virus A(H7N9) ont été rapportées récemment avec l'apparition d'un site de clivage polybasique dans la H7, faisant de ces souches des virus IAHP. L'impact de ce changement sur la transmission et la pathogénicité humaine n'est pour l'instant pas connu (68).

Au vu de sa capacité à infecter l'homme, de sa transmissibilité et de son évolution, le virus A(H7N9) est considéré comme un virus à potentiel pandémique et fait l'objet d'une surveillance rapprochée. Dans ce contexte nous avons été invités par le journal Virologie à publier une revue de la littérature sur les virus A(H7N9) et leurs impacts au cours des infections humaines. De plus, des substitutions responsables de résistances aux INA ont été mises en évidence chez des patients sous traitement antiviral (69,70). La N9 de ces virus a donc été le candidat de choix pour la mise au point et l'étude des mécanismes d'apparitions de la résistance aux INA présentés dans la Partie C Chapitres 2 et 3 de ce document.

#### **2.4.2. Revue publiée**

**GAYMARD A, Frobert E, Lina B, Escuret V. Infections humaines par les virus influenza A(H7N9) : émergence des virus, évolution et risque pandémique.**

**Virologie, 2017;21:11.**



# Infections humaines par les virus influenza A(H7N9) : émergence des virus, évolution et risque pandémique

Alexandre Gaymard<sup>1,2</sup>

Emilie Frobert<sup>1,2</sup>

Bruno Lina<sup>1,2</sup>

Vanessa Escuret<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon,  
Université Claude-Bernard–Lyon 1,  
Faculté de médecine Lyon-Est,  
ENS Lyon, CIRI, Inserm U1111, CNRS  
UMR5308, Virpath, 69372 Lyon, France

<sup>2</sup> Hospices civils de Lyon,  
Centre national de référence  
virus influenzae France-Sud,  
Laboratoire de virologie, IAI, CBN,  
Groupement hospitalier nord, 69317,  
Lyon cedex 04, France  
<vanessa.escuret@univ-lyon1.fr>

**Résumé.** Depuis 2013, les virus influenza aviaires A(H7N9) se sont propagés en Chine causant cinq vagues épidémiques (1557 cas humains recensés, 605 décès). Les virus A(H7N9) ont émergé suite au réassortiment de plusieurs virus aviaires : les gènes internes proviennent notamment de virus A(H9N2) circulant chez les volailles. Les tableaux cliniques sont sévères avec pneumonie (> 80 %) et évolution rapide vers le syndrome de détresse respiratoire aiguë ; mais des études de séroprévalence suggèrent de possibles formes modérées. Les formes graves touchent principalement des patients âgés ou ayant des co-morbidités. L'infection survient après contact avec des volailles vivantes infectées et environ 10 % des virus analysés présentent des mutations de résistance à l'oseltamivir. Les virus A(H7N9) sont faiblement pathogènes chez les volailles rendant la surveillance difficile. Dernièrement, une insertion de quatre acides aminés basiques dans le site de clivage de l'hémagglutinine (HA) a été détectée suggérant une évolution possible vers des virus hautement pathogènes. Malgré une liaison de la H7 aux acides sialiques  $\alpha 2,3$  et  $\alpha 2,6$ , des études en modèles furets montrent une transmission limitée par voie respiratoire, cohérente avec l'absence de transmission interhumaine soutenue. Les virus A(H7N9) ont un potentiel pandémique et font donc l'objet d'une surveillance rapprochée.

**Mots clés :** virus influenza aviaire A(H7N9), Chine, syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), exposition à la volaille, transmission interhumaine limitée

**Abstract.** Since 2013, avian influenza A(H7N9) viruses were responsible for five epidemics in China (at least 1,557 human cases, 605 deaths). A(H7N9) viruses emerged upon multiple reassortments of avian influenza viruses and its internal genes are coming from enzootic A(H9N2) viruses in poultry. Human infections are severe with pneumonia (>80 %) and rapid evolution to acute respiratory distress syndrome. However, moderate forms are suggested by seroprevalence studies and severe infections are associated with older age and comorbidity factors. Infections arose after exposure to live infected poultry, in addition, 10 % of analyzed viruses had oseltamivir-resistance mutations in NA. A(H7N9) viruses are low pathogenic for poultry and surveillance is difficult. Recently, a four basic amino-acids insertion in HA cleavage site was detected, suggesting a possible evolution towards highly pathogenic avian viruses. H7 can bind to  $\alpha 2,6$  or  $\alpha 2,3$  sialic-acid but the limited respiratory droplet transmission in ferret model is consistent with a non-sustained human-to-human transmission. With a potential pandemic risk, A(H7N9) viruses remain under close surveillance.

**Key words:** avian influenza A(H7N9) viruses, China, acute respiratory distress syndrome (ARDS), poultry exposure, limited human-to-human transmission

Tirés à part : V. Escuret

## Introduction

Les premiers cas d'infections chez l'homme par les virus influenza aviaires A(H7N9) ont été rapportés par le *Chinese Center for Disease Control and Prevention* en mars 2013. À la date du 25 juillet 2017, à l'issue de cinq vagues épidémiques successives, 1557 cas d'infections humaines (causant au moins 605 décès) par les virus influenza aviaires A(H7N9) ont été déclarés à l'OMS [1]. Avant 2013, les virus influenza aviaires porteurs d'une hémagglutinine de type 7 (virus H7N7, H7N2 et H7N3) avaient causé seulement des infections modérées de type conjonctivite avec quelques infections respiratoires chez l'homme, essentiellement après contact avec des oiseaux infectés, en Grande-Bretagne, aux États-Unis, en Italie, au Canada et aux Pays-Bas [2]. L'épisode le plus important correspond à des conjonctivites (et quelques symptômes respiratoires) suite à des infections par des virus A(H7N7) aux Pays-Bas en 2003 (89 cas dont un décès) [3].

Après un bilan épidémiologique sur les cas d'infections humaines par les virus A(H7N9), sur leur sévérité et leur prise en charge, cette revue a pour objet de faire un point sur l'origine de l'émergence et sur l'évolution de ces virus. Enfin, le risque pandémique lié à ces virus influenza aviaires A(H7N9) sera abordé.

### *Historique et caractéristiques des vagues épidémiques d'infections humaines par les virus influenza A(H7N9)*

La première vague d'infections humaines par les virus influenza aviaires A(H7N9) a eu lieu entre février et avril 2013. Les vagues épidémiques suivantes se sont produites entre novembre 2013 et mai 2017 avec des pics en période hivernale (janvier-février). La dernière vague épidémique (hiver 2016-2017) a été caractérisée par une augmentation importante du nombre de cas comparée aux quatre hivers précédents (*figure 1*).

### **Épidémiologie**

Le nombre de cas rapportés a été de 135, 320, 224, 119 et au moins 759 (octobre 2016-août 2017) pour les cinq vagues épidémiques [1, 4-6]. La plus longue période épidémique correspond à la quatrième vague (hiver 2015-2016) avec plus de 73 jours consécutifs (espace interquartile) [7].

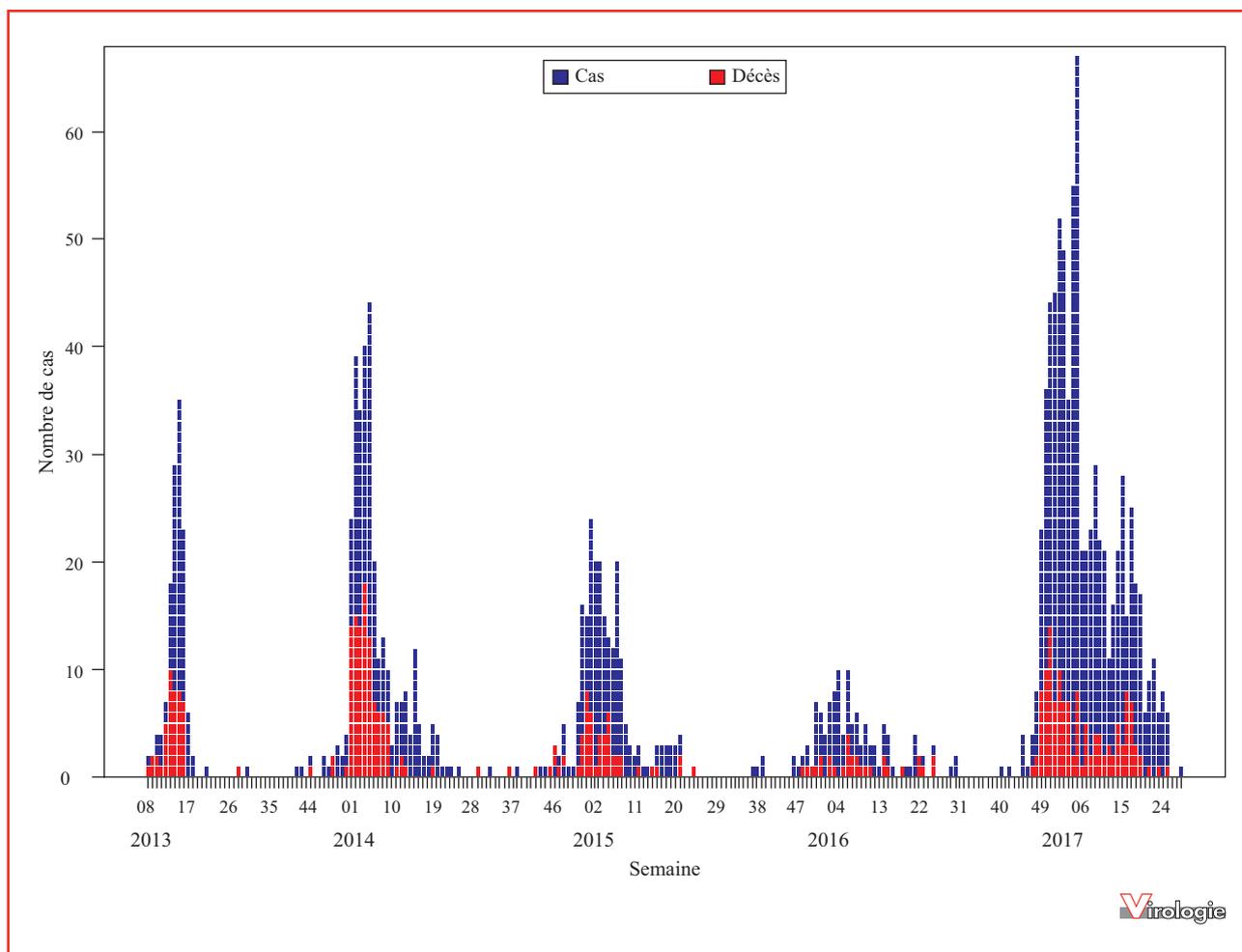
Au niveau géographique, depuis 2013, les infections humaines sont majoritairement survenues dans des provinces du sud-est de la Chine mais avec une expansion géographique de plus en plus présente [6, 8] (*figure 2*). La première vague a commencé avec un cas humain à Shanghai le 19 février 2013 (officiellement rapporté le 31 mars 2013) [9]. L'épidémie s'est ensuite poursuivie en mars et avril, la plupart des cas étant rapportés des provinces de

Jiangsu, Zhejiang et Shanghai, toutes localisées à l'est de la Chine. La deuxième vague épidémique (hiver 2013-2014) a été caractérisée par un nombre de cas et une extension géographique plus importants dont la majorité des cas provenaient de la région de Guangdong située au sud de la Chine. Les premiers cas de la troisième vague épidémique (hiver 2014-2015) ont été détectés dans la province de Xinjiang à l'ouest de la Chine, puis la plupart des cas ont ensuite été détectés dans le sud (Guangdong, Hong Kong, Guizhou, Fujian) et l'est de la Chine (Jiangsu) [10]. Un grand nombre des cas rapportés au cours de la quatrième vague épidémique (hiver 2015-2016) provenaient des régions du sud-est de la Chine mais des cas ont aussi été décrits dans la province de Liaoning (au Nord-Est) jusque-là non touchée, indiquant l'expansion du virus à de nouveaux territoires géographiques [7, 11]. Enfin, la cinquième vague (hiver 2016-2017) a été marquée par le plus grand nombre d'infections humaines rapporté à ce jour [1,4,5]. Cette dernière vague a été caractérisée par un démarrage très précoce avec une forte augmentation du nombre de cas rapportés dès début décembre 2016 (*figure 1*). Le nombre de cas et la dispersion géographique des cas ont été plus importants qu'au cours des épidémies précédentes avec une expansion à plus de districts et comtés au sein des provinces affectées [12, 13]. Cette expansion géographique est toujours en cours dans le nord de la Chine avec un premier cas décrit début juin 2017 dans la province de Mongolie en Chine intérieure [14]. Au cours des différentes vagues, des cas ont aussi été décrits hors de Chine, notamment à Hong Kong, à Taïwan, à Macao, en Malaisie et au Canada mais systématiquement chez des personnes ayant voyagé en Chine.

Un bilan réalisé à l'issue des quatre premières épidémies a montré que, dans 85 % des cas (659/775), les patients ont rapporté une exposition à des volailles vivantes (marchés de volailles et/ou basses-cours) dans les deux semaines précédant la survenue des signes cliniques. Vingt-cinq personnes (3 %) rapportent avoir un lien épidémiologique (vivant sous le même toit ou travaillant avec ou autre lien) avec une personne infectée par le virus A(H7N9) [7]. Les transmissions interhumaines, bien que rares, sont donc possibles en cas de contact direct très étroit répété et/ou prolongé [15, 16].

### **Caractéristiques cliniques des patients ayant une infection symptomatique par les virus influenza A(H7N9)**

Les infections par les virus A(H7N9) sont sévères avec un taux de mortalité estimé à 41 % à l'issue de la quatrième vague épidémique (hiver 2015-2016). Lors d'un bilan réalisé sur 547 patients pour lesquels des données étaient disponibles, 95 % avaient de la fièvre, 81 % de la toux et 85 % avaient une infection sévère [7, 11]. Les



**Figure 1.** Nombre de cas confirmés d’infections humaines par les virus A(H7N9) depuis 2013 (décès en rouge). Figure extraite du rapport OMS du 25 juillet 2017 [1] qui reprend les cas rapportés à l’OMS par semaine depuis 2013. La dernière vague épidémique (hiver 2016-2017) apparaît nettement plus importante que les précédentes vagues.

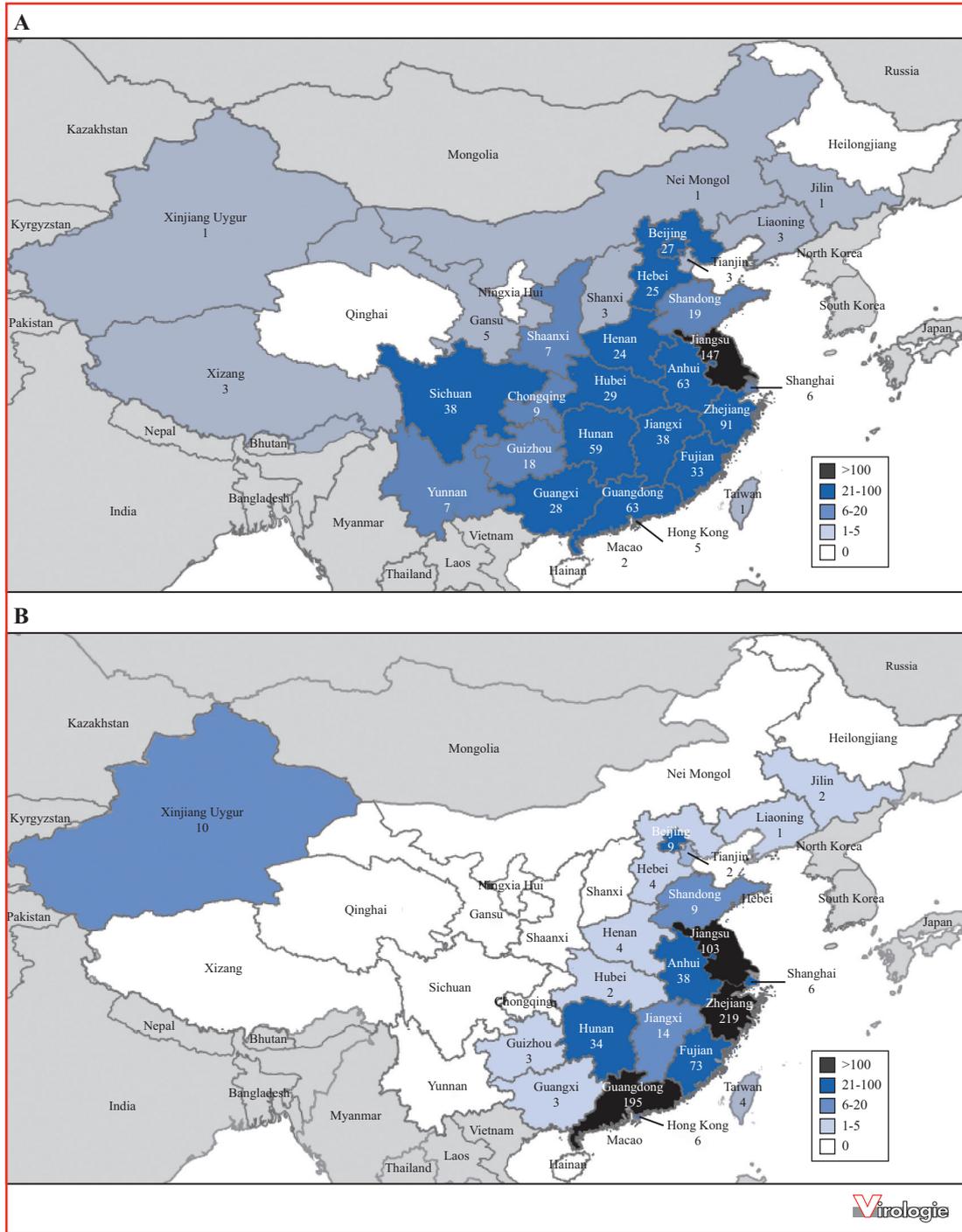
infections sévères ont été plus fréquemment observées chez les femmes enceintes [17], les personnes âgées et ceux présentant des maladies chroniques sous-jacentes [18]. Ces infections sont définies comme sévères si le patient a au moins un des critères suivants [13] :

- une radiographie pulmonaire indiquant des lésions multilobaires avec une augmentation de taille de plus de 50 % en 48 heures ;
- une dyspnée ou une fréquence respiratoire de plus de 24 fois par minute pour un adulte ;
- une hypoxie sévère avec un taux d’O<sub>2</sub> saturé ≤ 92 % et recevant 3 à 5 L d’O<sub>2</sub> par minute ;
- un état de choc, ou syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ou syndrome de détresse multi-organes.

Il est également intéressant de noter que, sur les 547 patients étudiés, 68 % ont été admis en réanimation et 53 % avaient

au moins un antécédent médical (bronchopneumopathie chronique obstructive, diabète, hypertension, obésité et/ou atteinte pulmonaire ou cardiaque chronique).

Une étude épidémiologique récente basée sur 1220 cas humains au cours des cinq vagues épidémiques a permis de détailler les évolutions épidémiologiques des cas humains depuis l’apparition du virus. Au cours de la première vague, les patients infectés par les virus A(H7N9) étaient relativement âgés (âge médian de 61 ans, les adultes de plus de 60 ans représentaient 54 % des cas) [12]. Le fait que ce type d’individu soit plus touché aurait pu être le reflet de différences au niveau socioéconomique, en supposant que ces patients soient plus en contact avec les volailles, ou au niveau de la présence de comorbidités entraînant un risque accru d’infection sévère [11]. Au cours des vagues épidémiques suivantes, une augmentation constante du nombre



**Figure 2.** Distribution géographique des cas d'infections humaines par les virus influenza A(H7N9) dans les provinces de Chine. (A) Du 1<sup>er</sup> octobre 2016 au 7 août 2017 (cinquième vague épidémique) et (B) du 1<sup>er</sup> mars 2013 au 30 septembre 2016 (vagues épidémiques 1 à 4). Comme le montrent ces figures, il y a eu quasiment autant de cas au cours de la cinquième vague qu'au cours de l'ensemble des quatre premières vagues épidémiques. La majorité des infections humaines par les virus A(H7N9) se sont produites dans le sud-est de la Chine et surtout dans les provinces de Zhejiang, Guangdong et Jiangsu mais avec des cas décrits dans l'Ouest (province de Xinjiang) en 2015 au cours de la troisième vague et au Nord-Est (province de Liaoning) en 2016 au cours de la quatrième vague. Extrait de la publication de Kile *et al.* [6].

d'adultes d'âge moyen (16-59 ans) touchés par ce virus a été observée passant de 41 % lors de la première vague à 57 % lors de la cinquième vague (hiver 2016-2017). Depuis 2013, l'origine des populations touchées a évolué vers globalement moins de cas en zones urbaines et plus de cas en zones semi-urbaines et rurales. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la fermeture de grands marchés de volailles vivantes en zone urbaine alors que des marchés plus petits en zones semi-urbaines ou rurales étaient maintenus. Il est possible que la prévalence de volailles infectées par les virus A(H7N9) soit plus importante qu'auparavant, expliquant le plus grand nombre de cas rapportés au cours de la cinquième vague [12]. En revanche, aucune modification clinique n'a été observée au cours des cinq vagues épidémiques et ces infections touchent majoritairement les hommes quelle que soit la vague épidémique étudiée (68 à 71 % des cas).

Des cas d'infections humaines avec des signes cliniques faibles à modérés sont très probables [11], mais leur taux n'est pas connu [19, 20]. Les études de séroprévalence, basées sur un test d'inhibition d'hémagglutination (IHA) avec confirmation par test de microneutralisation en cas de titre IHA > 20, menées chez les personnes travaillant dans les marchés de volailles vivantes, montrent une absence d'anticorps spécifiques en 2012 avant l'émergence du virus [21] et une augmentation de la prévalence des anticorps anti-A(H7N9) de 7,2 % en mai 2013 à 14,9 % en décembre 2013 [22]. Aucun des travailleurs testés n'a présenté de confirmation virologique d'infection à A(H7N9). Ces résultats de séroprévalence suggèrent donc une proportion non négligeable d'infections asymptomatiques ou modérées par les virus A(H7N9) chez les personnes exposées aux volailles vivantes en Chine.

À ce jour, on ne sait pas si la virulence particulière de ce virus est liée à des caractères spécifiques du virus ou à des caractères de l'hôte.

### Traitement des infections chez l'homme et bases moléculaires de la résistance aux antiviraux

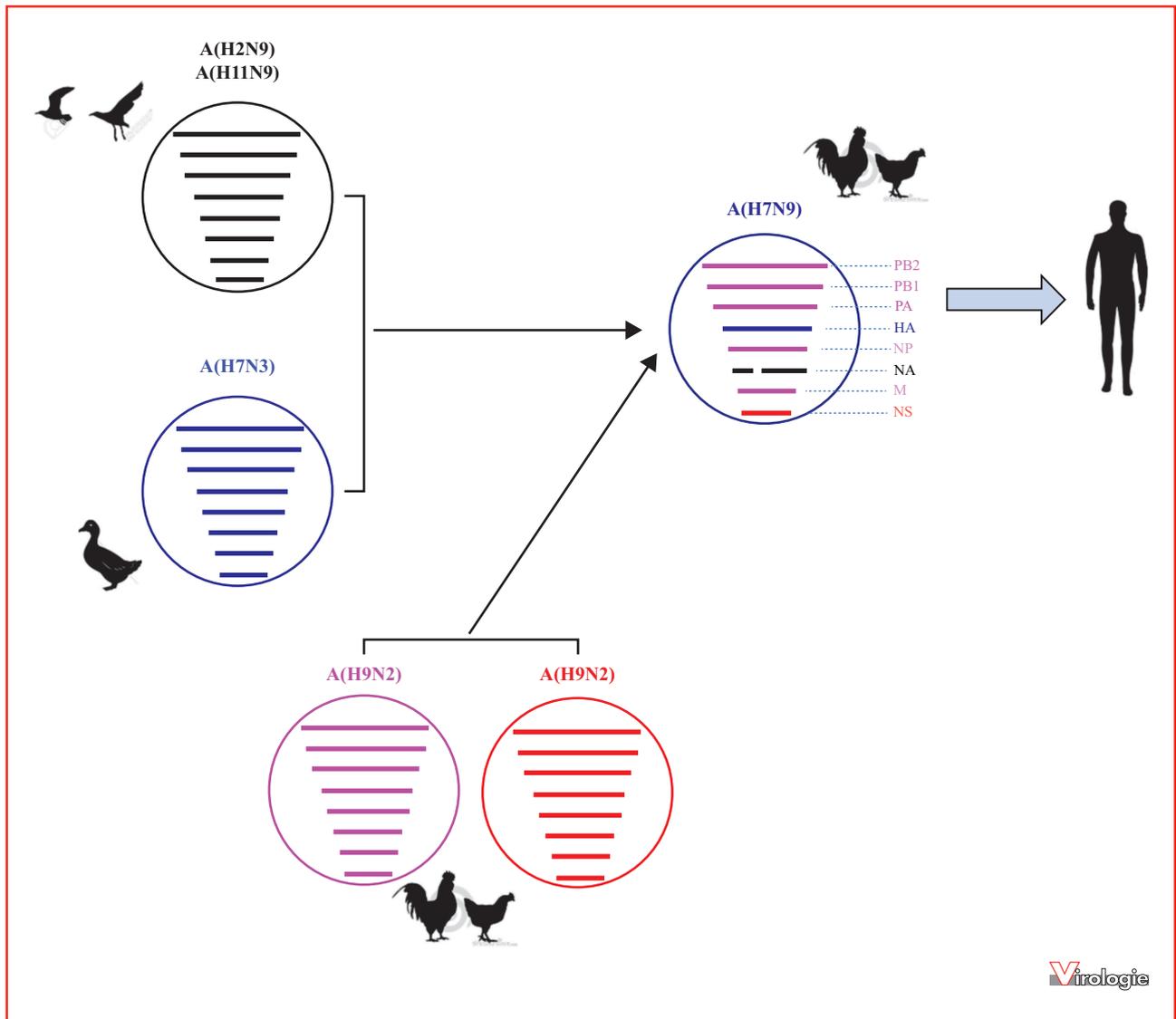
La protéine M2 de tous les virus A(H7N9) possède la substitution S31N qui confère une résistance aux adamantanes (amantadine et rimantadine) [6, 23]. Les inhibiteurs de neuraminidase (INA) sont donc le seul traitement antiviral actuellement recommandé pour les infections humaines par les virus influenza A(H7N9).

Des virus porteurs de la substitution R292K dans la NA (numérotation dans N2 ; R294K si numérotation dans N9) ont été isolés chez certains patients infectés par les virus A(H7N9) et traités par l'oseltamivir. Cette substitution confère un très haut niveau de résistance à l'oseltamivir et au peramivir (IC<sub>50</sub> augmentées de 4 610 et 563 fois respectivement) mais n'augmente l'IC<sub>50</sub> du zanamivir que de 11 fois [24]. Une étude réalisée dans notre labora-

toire sur des virus réassortants (fond génétique provenant de A/Moscow/10/1999 (H3N2)) porteurs de N9 sauvage ou substituée en R292K (numérotation dans N2) a également montré des augmentations d'IC<sub>50</sub> pour l'oseltamivir et le zanamivir respectivement à 9 631 et 21 fois [25]. De plus, la substitution R292K entraîne une forte diminution de l'activité et de l'affinité de la neuraminidase [25]. La réduction des performances catalytiques de la N9 pourrait expliquer une capacité de réplication plus faible ou retardée en cellules MDCK de virus réassortants utilisant le fond génétique de A/Anhui/1/2013 (H7N9) et porteurs de N9 mutée R292K par rapport à la N9 sauvage [26]. Cependant, des études menées dans des modèles animaux à partir de virus réassortants ayant le fond génétique de A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) et la N9 de A(H7N9) montrent que la présence de la substitution R292K ne diminue pas la réplication en cellules épithéliales trachéobronchiques humaines ni la virulence chez la souris ni la transmission par voie respiratoire chez le cochon d'Inde [24]. *In vivo*, les prélèvements respiratoires de patients infectés par A(H7N9) et traités par oseltamivir contiennent des mélanges de population de virus sauvages et substitués [27]. Les infections de furets avec des populations clonales de virus A(H7N9) porteurs de N9 sauvages (R292 à 93 %) ou de N9 résistantes à l'oseltamivir (K292 à 94 %) ont montré une transmission similaire de ces virus par contact direct ou par voie respiratoire. En revanche, le virus porteur de N9 mutée K292 a été remplacé de façon compétitive par le virus sauvage en absence de pression de sélection [28]. L'analyse de la séquence des gènes codant la neuraminidase des virus de la cinquième vague (hiver 2016-2017) montre qu'environ 10 % des virus analysés possèdent des mutations de résistance connues ou suspectées pour conférer une résistance aux INA mais la plupart des échantillons ont été prélevés après l'instauration d'un traitement antiviral [4, 6]. Pour finir, seul un échantillon de l'environnement a présenté une substitution de résistance aux INA alors qu'aucun des isolats provenant des volailles n'en possédait [29].

### Origine de l'infection et évolution des virus influenza A(H7N9)

Le contact avec des volailles infectées par les virus A(H7N9) est à l'origine de l'infection. Des prélèvements réalisés dans les marchés de volailles vivantes ont permis d'isoler des virus A(H7N9) ayant une homologie étroite avec les virus isolés chez les cas humains du même secteur géographique [30]. De plus, la fermeture des marchés mi-avril 2013 a permis un rapide déclin des cas humains et les arbres phylogénétiques montrent que, pour chaque vague épidémique, les virus provenant des cas humains ou des volailles sont regroupés au niveau phylogénétique [31].



**Figure 3.** Origine du virus influenza A(H7N9).

D'après une figure de la revue de Watanabe *et al.* [11].

Les segments sont schématisés par ordre de taille pour tous les virus comme indiqué sur le virus A(H7N9). Le segment de la NA est représenté avec une interruption pour schématiser la délétion de 69 à 73 AA présente dans la tige des NA des virus A(H7N9). Les virus influenza A(H7N9) proviennent du réassortiment génétique d'au moins quatre virus influenza A. La HA est proche de celle de virus A(H7N3) isolés de canards de l'est de la Chine. La NA est proche de celle de virus A(H2N9) et A(H11N9) isolés d'oiseaux migrateurs sauvages. Les six autres segments sont similaires à ceux de virus A(H9N2) circulant de façon enzootique chez les volailles domestiques en Chine.

Les analyses phylogénétiques ont révélé que les virus influenza A(H7N9) ont émergé *via* le réassortiment d'au moins quatre virus influenza aviaires. Le gène de la HA des virus A(H7N9) est proche de celui des virus influenza A(H7N3) isolés de canards dans l'est de la Chine en 2010-2011. Le gène de la NA est voisin de celui des virus influenza aviaires A(H2N9) et/ou A(H11N9) isolés chez des oiseaux migrateurs sauvages le long des cou-

loirs de migration de l'Est asiatique. Les six autres gènes proviennent vraisemblablement de deux sous-groupes distincts de virus A(H9N2) circulant dans l'est de la Chine (*figure 3*). Les virus A(H7N9) possèdent une hétérogénéité génétique suggérant qu'ils sont issus de plusieurs événements de réassortiments génétiques [32]. Un total de 27 génotypes de virus influenza A(H7N9) a été observé au cours de la première vague avec des gènes internes

divers provenant de plusieurs lignages de virus A(H9N2) circulant chez les volailles mais avec des gènes HA et NA conservés. Les virus A(H9N2) sont enzootiques chez les volailles et se répliquent bien chez cet hôte. De plus, ces virus possèdent un fond génétique stable capable de se réassortir avec d'autres gènes de HA et de NA, facilitant l'émergence de nouveaux virus ; ainsi, les virus A(H5N1) et A(H10N8) ont comme A(H7N9) des gènes issus du réassortiment avec A(H9N2) [23, 33, 34]. Le réassortiment avec les gènes internes des virus A(H9N2) a donc facilité l'expansion des virus A(H7N9) portant des glycoprotéines de surface originaires d'oiseaux aquatiques. La diversité génétique observée peut être causée soit par des réassortiments séquentiels après que les virus aient été introduits dans différentes régions soit par des réassortiments distincts s'étant produits simultanément [31]. L'analyse du génome complet des virus A(H7N9) des deux premières vagues a montré l'établissement de clades de virus géographiquement distincts. Cette diversité géotypique est due, encore une fois, à l'acquisition de gènes internes provenant de virus A(H9N2) locaux suite à des réassortiments génétiques. Les virus ayant circulé au cours de la troisième vague ont émergé à partir de ceux de la deuxième vague indiquant la présence continue et l'évolution de ces virus malgré la disparition des cas humains au cours des périodes estivales [31, 35].

Contrairement aux virus influenza aviaires hautement pathogènes (*highly pathogenic avian influenza* [HPAI]), comme les virus A(H5N1) responsables de taux de mortalité élevés chez les volailles et d'infections sévères chez l'homme, les virus A(H7N9) sont des virus faiblement pathogènes chez les volailles (*low pathogenic avian influenza* [LPAI]) mais sont également responsables d'infections sévères chez l'homme. Le caractère LPAI des virus A(H7N9) les rend plus difficiles à déceler et favorise leur persistance au sein des populations de volailles [36]. Cependant, ce caractère semble évoluer chez ces virus. En effet, lors de la cinquième vague (hiver 2016-2017), une insertion de quatre acides aminés basiques au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine (HA) a été mise en évidence sur 35 virus A(H7N9) issus de 27 échantillons humains et de huit échantillons environnementaux, rendant ces virus A(H7N9) HPAI. Les virus HPAI possèdent entre les chaînes peptidiques HA1 et HA2 un site de clivage polybasique reconnu et clivé par des protéases intracellulaires ubiquitaires conduisant à des infections systémiques et participant à la virulence des virus HPAI chez les volailles. Deux virus A(H7N9) HPAI isolés de cas humains (dont un léthal [37]) ont été récemment caractérisés. Outre l'insertion des quatre acides aminés basiques (KRTA), ces virus possèdent les substitutions G186V dans la HA et E627K dans PB2 facilitant leur entrée et leur réplication dans les cellules de mammifères, ainsi que la substitution R292K

dans la N9 responsable d'une résistance à l'oseltamivir [38].

Les analyses phylogénétiques réalisées à partir des isolats de cas humains ou d'environnements de marché de volailles vivantes au cours de la cinquième vague indiquent que les virus A(H7N9) ont divergé en deux lignages distincts, le lignage *Pearl River Delta* et *Yangtze River Delta*, la majorité des derniers virus circulant appartient à ce dernier lignage. Les résultats préliminaires des dernières analyses antigéniques indiquent une évolution antigénique des derniers virus A(H7N9) du lignage *Yangtze River Delta* par rapport aux premiers virus A(H7N9) et aux candidats vaccins [4]. De plus, les virus A(H7N9) HPAI présentent également des propriétés antigéniques divergentes de celles des virus LPAI. L'OMS a donc récemment adapté les recommandations vaccinales et ajouté deux souches A(H7N9) LPAI et HPAI, toutes deux apparentées au lignage *Yangtze River Delta* comme candidats vaccins additionnels [38].

#### *Risque pandémique potentiel des virus influenza A(H7N9) ?*

Pour causer une pandémie, un virus influenza initialement aviaire doit franchir deux barrières. La première barrière est la barrière d'espèces située à l'interface entre le réservoir naturel représenté par les oiseaux sauvages aquatiques et l'homme. Les hommes sont normalement peu exposés aux oiseaux sauvages, mais les infections d'hôtes intermédiaires comme les porcs ou les volailles auxquels l'homme est plus fréquemment exposé vont favoriser le franchissement de la barrière d'espèces. La deuxième barrière est celle de la transmission interhumaine. Des mécanismes de mutations génétiques et de réassortiments génétiques successifs avec des virus circulant chez les animaux domestiques et chez l'homme vont permettre aux virus d'évoluer et d'obtenir un potentiel pandémique [39].

#### **Franchissement de la barrière d'espèces**

La question cruciale à laquelle cherchent à répondre les virologues est de savoir comment les virus influenza aviaires sont capables de franchir la barrière inter-espèces et d'infecter l'homme. Les marqueurs moléculaires des virus A(H7N9) associés à des mécanismes d'adaptation à l'hôte humain ou à des mécanismes de virulence sont récapitulés dans le *tableau 1*. La HA et la sous-unité PB2 de la polymérase jouent notamment un rôle majeur dans la restriction d'hôte des virus influenza.

#### *Rôle de la HA*

La HA des virus influenza aviaires se lie préférentiellement aux acides sialiques liés en  $\alpha 2,3$  au galactose (SA $\alpha 2,3$ Gal) terminal des glycoprotéines des cellules

**Tableau 1 Marqueurs moléculaires retrouvés chez les virus influenza A(H7N9) et associés à des mécanismes d'adaptation à l'hôte humain ou à des mécanismes de virulence. Adapté du rapport de l'OMS du 10 février 2017 [20].**

Protéine	Fonction	Substitution, insertion ou délétion	Mécanisme d'adaptation aux cellules humaines ou <i>mécanisme de virulence</i>
HA	Attachement du virus à la cellule hôte	<b>G186V<sup>a</sup></b> <b>Q226L/I<sup>a</sup></b>	Augmente la liaison aux SA $\alpha$ 2,6Gal ; liaison à la fois aux SA $\alpha$ 2,3Gal et aux SA $\alpha$ 2,6Gal
	Seules les HA clivées peuvent changer de conformation pour permettre la fusion entre membranes virales et endosomales cellulaires	<b>Insertion d'AA</b>	<i>Clivage de la HA possible par des protéases intracellulaires de l'hôte</i>
NA	Propagation des virions	<b>Délétion de la tige</b>	Signe d'adaptation à la volaille domestique, diminution de l'activité de la NA
PB2	Réplication (liaison à la coiffe située en région 5' des ARNm de l'hôte)	<b>E627K</b>	Augmente l'activité polymérase (augmente la liaison de PB2 et NP dans les cellules de mammifères)
		<b>D701N</b>	Augmente la transmission chez le cochon d'Inde
PA	Réplication (activité endonucléase permettant de générer les oligonucléotides coiffés en 5' pour amorcer la transcription des ARNm viraux)	<b>V100A</b> <b>K356R</b> <b>S409N</b>	Signe d'adaptation aux cellules humaines
		<b>L336M</b>	Augmente l'activité polymérase chez la souris
PB1	Réplication (activité ARN polymérase ARN dépendante)	<b>I368V</b>	Augmente la transmission chez le furet
PB1-F2	Facteur de virulence	<b>87 à 90 AA</b>	<i>Pathogénicité accrue chez la souris</i>
NS1	Échappement du virus à la réponse immune de l'hôte	<b>N205S</b>	<i>Échappement à la réponse de l'hôte</i>

AA : acides aminés ; HA : hémagglutinine ; NA : neuraminidase ; SA $\alpha$ 2,3Gal ou SA $\alpha$ 2,6Gal : acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,3 ou en  $\alpha$ 2,6 au galactose terminal de glycoprotéines cellulaires. Le caractère italique indique un mécanisme de virulence.

<sup>a</sup> Numérotation dans H3.

épithéliales intestinales des oiseaux. Chez l'homme, les récepteurs SA $\alpha$ 2,3Gal sont essentiellement présents au niveau des alvéoles pulmonaires tandis que d'autres récepteurs, les acides sialiques liés en  $\alpha$ 2,6 au galactose terminal (SA $\alpha$ 2,6Gal), sont présents au niveau des cellules épithéliales nasales, pharyngées et bronchiques [40]. Cette répartition est un facteur limitant la transmission interhumaine de virus aviaires et explique que la capacité de la HA à reconnaître les SA $\alpha$ 2,6Gal soit un facteur important pour le franchissement de la barrière d'espèces. Les capacités de liaison aux acides sialiques peuvent être déterminées grâce à des puces portant des glycanes naturels ou synthétiques [41].

Les virus A(H7N9) (LPAI ou HPAI) ont une bonne affinité à la fois pour les SA $\alpha$ 2,3Gal et les SA $\alpha$ 2,6Gal pouvant

expliquer leur capacité à circuler parmi les volailles tout en ayant la capacité d'infecter l'homme [38, 42, 43]. Depuis 2013, tous les virus A(H7N9) isolés des cas humains ou des volailles infectées portent des substitutions G186V et Q226L/I dans la HA (numérotation dans H3 après suppression du peptide signal ou G177V et Q217L/I dans HA1 de H7). La présence d'isoleucine (I) ou leucine (L) en position 226 permet une fixation de la HA à la fois sur les SA $\alpha$ 2,3Gal et SA $\alpha$ 2,6Gal alors que la présence de glutamine (Q) en 226 permet une liaison préférentielle de la HA sur les SA $\alpha$ 2,3Gal. Cette substitution Q226L/I a probablement émergé suite à la réplication chez les volailles et faciliterait l'infection des cellules de mammifères [11]. Des études ont cependant montré que la liaison aux SA $\alpha$ 2,6Gal est faible, voire négligeable, par rapport à la

liaison aux SA $\alpha$ 2,3Gal [44]. Contrairement à ce qui est observé pour les virus A(H5N1) qui ne se lient qu'aux SA $\alpha$ 2,3Gal, la liaison des virus A(H7N9) aux SA $\alpha$ 2,6Gal pourrait cependant leur conférer un avantage pour infecter les voies aériennes supérieures chez l'homme [38]. Une étude récente basée sur l'expression transitoire de H7 recombinantes solubles a montré que la présence de trois mutations dans H7 suffit à faire basculer l'affinité de liaison vers des SA $\alpha$ 2,6Gal plutôt que SA $\alpha$ 2,3Gal et à permettre une liaison accrue aux cellules épithéliales de trachée humaine [45]. En plus de son affinité pour les différents récepteurs, la stabilité de la HA aux conditions de pH et de température paraît être un déterminant de la transmission aérienne des virus influenza. Il a déjà été démontré que le seuil de pH déclenchant le changement conformationnel de la HA permettant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale est plus faible pour les virus humains que pour les virus aviaires [46]. Dans la H7 des virus A(H7N9), la substitution G219S, d'une part, augmente l'affinité de liaison aux SA $\alpha$ 2,3Gal et SA $\alpha$ 2,6Gal mais, d'autre part, diminue la stabilité au pH acide et à la chaleur (50 °C). L'association d'une substitution K58I à la substitution G219S maintient une liaison plus forte aux deux types de récepteurs tout en augmentant la stabilité à l'acidité et à la chaleur ; ainsi, des associations de substitutions pourraient stabiliser la HA et favoriser la transmission aérienne des virus A(H7N9) [47].

#### Rôle de la NA

Les virus A(H7N9) ont tous une délétion de 69 à 73 acides aminés dans la tige de leur NA [11, 20]. Il est connu que les virus influenza aviaires isolés chez les volailles ont souvent une tige NA raccourcie [48] qui est moins efficace lors de la libération des virions après bourgeonnement car elle a plus de difficultés à atteindre son substrat [49]. Une NA à tige courte compromet aussi la dégradation du mucus respiratoire et donc la transmission par voie respiratoire [50]. Une étude récente très détaillée sur les propriétés de la N9 a montré que cette glycoprotéine participe à la liaison aux SA $\alpha$ 2,6Gal de par la présence d'un site secondaire d'héماغglutination mais également *via* le site catalytique de la NA elle-même. La N9 contribuerait donc à faciliter la fixation des virus au niveau des voies respiratoires hautes. En revanche, le clivage par la N9 des SA $\alpha$ 2,6Gal est peu efficace et est donc compatible avec une transmission aérienne limitée [51].

#### Rôle de PB2

La protéine PB2 fait partie du complexe polymérase et porte la substitution E627K dans la majorité des virus A(H7N9) isolés chez l'homme. Cette substitution est connue pour conférer une réplication efficace dans des cellules de mammifères et elle est apparue suite à la réplication chez

l'homme, les virus isolés chez les volailles possédant un E627 dans PB2 [11]. D'autres virus A(H7N9), isolés chez l'homme mais ne possédant pas cette substitution, présentent d'autres substitutions (D701N ou Q591K) dans PB2 qui confèrent une réplication accrue dans les cellules de mammifères [52] et qui ont également émergé suite à leur réplication chez l'homme [11]. Lors de la cinquième vague épidémique, sur 83 virus A(H7N9), 59 portaient la substitution E627K et dix portaient la substitution D701N dans PB2 [20].

#### Études de pathologie et de transmission en modèles animaux

Les études de pathologie liée à A(H7N9) menées chez le furet montrent que ces virus infectent les voies respiratoires hautes et basses causant des signes cliniques significatifs chez le furet. Les études de transmission de virus A(H7N9) dans ce modèle indiquent que les virus se transmettent efficacement par contact direct et de façon plus limitée dans environ un tiers des cas par les gouttelettes de sécrétions respiratoires [43, 53-55]. Les virus peuvent aussi se répliquer dans les tissus du tractus respiratoire porcin [56] soulignant le risque potentiel d'adaptation de ces virus et la nécessité de surveiller tout changement dans ses capacités de transmission et d'éventuelles autres substitutions d'adaptation. À ce jour, les virus A(H7N9) sont donc capables de franchir la première barrière de transmission inter-espèces mais il n'y a pas de transmission interhumaine soutenue de ces virus.

#### Risque de diffusion dans la population humaine

La Chine est le pays le plus peuplé et on y trouve aussi le plus grand nombre de volailles, canards et porcs. Les interactions fréquentes entre ces espèces et la faune sauvage fournissent l'interface idéale pour la transmission.

Un facteur important permettant de déterminer si un nouveau virus pourra émerger et causer une pandémie est d'établir le degré d'immunité que possède la population vis-à-vis de ce virus. Les dernières études en date montrent une séroprévalence à 14,9 % en décembre 2013 chez les travailleurs exposés aux volailles infectées alors que la population générale non exposée au virus était séronégative [22]. Parmi les *clusters* de cas humains décrits, une transmission interhumaine limitée mais non soutenue a été mise en évidence. Ainsi, des personnes, sans contact avec des volailles et ayant été en contact prolongé avec un cas malade (membre de la famille), ont pu être infectées [15, 16]. Des études de suivi des 2600 cas contacts de 139 cas avérés ont été menées afin d'établir l'étendue des cas secondaires ; parmi les 28 cas ayant développé des signes respiratoires, aucun n'était positif pour le A(H7N9) détecté par RT-PCR [57].

À ce jour, d'après le CDC, les virus influenza A(H7N9) présentent un risque faible pour la santé publique et un risque pandémique potentiel jugé modéré à sévère. Pour se préparer à ce risque potentiel, deux souches récentes du lignage *Yangtze River Delta*, apparentées à A/Guangdong/17SF003/2016 (HPAI) et A/Hunan/2650/2016 (LPAI), ont été sélectionnées pour la préparation de nouveaux candidats vaccins [4].

## Conclusion

Les virus A(H7N9) restent sous surveillance. Le nombre de cas plus important lors de la dernière vague épidémique ainsi que la mise en évidence d'infections par les A(H7N9) HPAI suggèrent que ces virus continuent d'évoluer et qu'il faut rester vigilant sur le risque d'une éventuelle transmission interhumaine. Cependant, les facteurs qui sous-tendent la transmission interhumaine sont encore mal connus et de multiples adaptations semblent nécessaires pour qu'un virus aviaire puisse devenir capable de transmission interhumaine par voie respiratoire. La nécessité d'accumuler des changements génétiques est un frein à l'émergence d'un virus pandémique. Malgré tout, l'accroissement de la population humaine et les contacts avec des réservoirs aviaires peuvent favoriser l'émergence d'un virus influenza pandémique d'origine aviaire. Afin d'essayer de freiner l'expansion du virus, les autorités chinoises ont débuté en juillet 2017 dans les provinces de Guangdong et Guangxi un programme de vaccination des volailles par un vaccin inactivé produit par génétique inverse associant H5 et H7 [58]. La surveillance des virus influenza et le développement de nouveaux antiviraux plus efficaces demeurent impératifs pour faire face à la menace d'un virus influenza pandémique.

**Liens d'intérêts :** Vanessa Escuret déclare des liens d'intérêts avec Sanofi Pasteur (interventions en symposium en 2013).

Bruno Lina déclare des frais de déplacement pour interventions avec GSK et Sanofi Pasteur.

Alexandre Gaymard et Emilie Frobert déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

- World Health Organization. *Influenza at the human-animal interface*. Geneva: WHO, 2017. Disponible sur : [who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/Influenza\\_Summary\\_IRA\\_HA\\_interface\\_07\\_25\\_2017.pdf?ua=1](http://who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_07_25_2017.pdf?ua=1) (consulté le 29/8/2017).
- Belser JA, Bridges CB, Katz JM, Tumpey TM. Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7. *Emerg Infect Dis* 2009 ; 15 : 859-65.
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, *et al.* Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 1356-61.
- Iuliano AD, Jang Y, Jones J, *et al.* Increase in human infections with novel asian lineage avian influenza A(H7N9) viruses during the fifth epidemic – China. October 2016-February 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017 ; 66 : 254-5.
- Center for Infectious Disease Research and Policy. University of Minnesota : CIDRAP, 2017. Disponible sur : [cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/06/analysis-h7n9-china-finds-age-geographic-shifts](http://cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/06/analysis-h7n9-china-finds-age-geographic-shifts). (consulté le 6/6/2017).
- Kile JC, Ren R, Liu L, *et al.* Increase in human infections with novel asian lineage avian influenza A(H7N9) viruses during the fifth epidemic - China. October 1, 2016-August 7, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017 ; 66 : 928-32.
- Xiang N, Li X, Ren R, *et al.* Assessing Change in Avian Influenza A(H7N9) Virus Infections During the Fourth Epidemic - China. September 2015-August 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016 ; 65 : 1390-4.
- European Centre for Disease Prevention Control. *Human infection with avian influenza A(H7N9) virus - fifth update, 27 January 2017*. Stockholm : ECDC, 2017.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of avian influenza A(H7N9) virus causing severe human illness - China. February-April 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013 ; 62 : 366-71.
- Xie S, Jia W, Lin Y, *et al.* Third Wave of Influenza A(H7N9) Virus from Poultry, Guangdong Province, China, 2014-2015. *Emerg Infect Dis* 2015 ; 21 : 1657-60.
- Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. *Trends Microbiol* 2014 ; 22 : 623-31.
- Wang X, Jiang H, Wu P, *et al.* Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013-17 : an epidemiological study of laboratory-confirmed case series. *Lancet Infect Dis* 2017 ; 17 : 822-32.
- Zhou L, Ren R, Yang L, *et al.* Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China. September-December 2016. *Western Pac Surveill Response J* 2017 ; 8 : 6-14.
- Center for Infectious Disease Research and Policy. *H7N9 in another China province ; Pertussis vaccine and infants ; Sapovirus outbreak variant*. University of Minnesota : Cidrap, 01/06/2017. Disponible sur : [cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/06/news-scan-jun-01-2017](http://cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/06/news-scan-jun-01-2017). (consulté le 6.6.2017).
- Xiao XC, Li KB, Chen ZQ, *et al.* Transmission of avian influenza A(H7N9) virus from father to child: a report of limited person-to-person transmission, Guangzhou, China. January 2014. *Euro Surveill* 2014 ; 19 : 20837.
- Hu J, Zhu Y, Zhao B, *et al.* Limited human-to-human transmission of avian influenza A(H7N9) virus, Shanghai, China. March to April 2013. *Euro Surveill* 2014 ; 19 : 20838.
- Liu S, Sha J, Yu Z, *et al.* Avian influenza virus in pregnancy. *Rev Med Virol* 2016 ; 26 : 268-84.
- Liu B, Havers F, Chen E, *et al.* Risk factors for influenza A(H7N9) disease—China, 2013. *Clin Infect Dis* 2014 ; 59 : 787-94.
- Lin YP, Yang ZF, Liang Y, *et al.* Population seroprevalence of antibody to influenza A(H7N9) virus, Guangzhou, China. *BMC Infect Dis* 2016 ; 16 : 632.
- World Health Organization. *Analysis of recent scientific information on avian influenza A (H7N9) virus*. Geneva: WHO, 2017. [who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/avian\\_influenza/riskassessment\\_AH7N9\\_201702/en/](http://who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/riskassessment_AH7N9_201702/en/) (consulté le 24/4/2017).
- Bai T, Zhou J, Shu Y. Serologic study for influenza A (H7N9) among high-risk groups in China. *N Engl J Med* 2013 ; 368 : 2339-40.

22. Wang X, Fang S, Lu X, *et al.* Seroprevalence to avian influenza A(H7N9) virus among poultry workers and the general population in southern China: a longitudinal study. *Clin Infect Dis* 2014; 59: e76-83.
23. Gao R, Cao B, Hu Y, *et al.* Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med* 2013; 368: 1888-97.
24. Hai R, Schmolke M, Leyva-Grado VH, *et al.* Influenza A(H7N9) virus gains neuraminidase inhibitor resistance without loss of in vivo virulence or transmissibility. *Nat Commun* 2013; 4: 2854.
25. Gaymard A, Charles-Dufant A, Sabatier M, *et al.* Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group 2 neuraminidase (N2, N3, N6, N7 and N9). *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 3036-45.
26. Wu Y, Bi Y, Vavricka CJ, *et al.* Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Res* 2013; 23: 1347-55.
27. Yen HL, McKimm-Breschkin JL, Choy KT, *et al.* Resistance to neuraminidase inhibitors conferred by an R292K mutation in a human influenza virus H7N9 isolate can be masked by a mixed R/K viral population. *MBio* 2013; 4: e00396-413.
28. Yen HL, Zhou J, Choy KT, *et al.* The R292K mutation that confers resistance to neuraminidase inhibitors leads to competitive fitness loss of A/Shanghai/1/2013 (H7N9) influenza virus in ferrets. *J Infect Dis* 2014; 210: 1900-8.
29. Center for Infectious Disease Research Policy. *WHO: H7N9 antiviral resistance likely arose after treatment.* University of Minnesota: CIDRAP, 2017, Disponible sur : [cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/03/who-h7n9-antiviral-resistance-likely-arose-after-treatment](http://cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/03/who-h7n9-antiviral-resistance-likely-arose-after-treatment) (consulté le 6.6.2017).
30. Bao CJ, Cui LB, Zhou MH, *et al.* Live-animal markets and influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med* 2013; 368: 2337-9.
31. Zhu H, Lam TT, Smith DK, Guan Y. Emergence and development of H7N9 influenza viruses in China. *Curr Opin Virol* 2016; 16: 106-13.
32. Liu D, Shi W, Shi Y, *et al.* Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural and coalescent analyses. *Lancet* 2013; 381: 1926-32.
33. Guan Y, Shorridge KF, Krauss S, Webster RG. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong ? *Proc Natl AcadSci U S A* 1999; 96: 9363-7.
34. Chen H, Yuan H, Gao R, *et al.* Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 2014; 383: 714-21.
35. Lam TT, Zhou B, Wang J, *et al.* Dissemination, divergence and establishment of H7N9 influenza viruses in China. *Nature* 2015; 522: 102-5.
36. Liu J, Xiao H, Wu Y, Liu D, Qi X, Shi Y, Gao GF. H7N9: a low pathogenic avian influenza A virus infecting humans. *Curr Opin Virol* 2014; 5: 91-7.
37. Ke C, Mok CKP, Zhu W, *et al.* Human Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus. *China. Emerg Infect Dis* 2017; 23: 1332-40.
38. Zhu W, Zhou J, Li Z, *et al.* Biological characterisation of the emerged highly pathogenic avian influenza (HPAI) A(H7N9) viruses in humans, in mainland China, 2016 to 2017. *Euro Surveill* 2017; 22: 30533.
39. Richard M, de Graaf M, Herfst S. Avian influenza A viruses: from zoonosis to pandemic. *Future Virol* 2014; 9: 513-24.
40. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440: 435-6.
41. Air GM. Influenza virus-glycan interactions. *Curr Opin Virol* 2014; 7: 128-33.
42. Yang H, Carney PJ, Chang JC, Villanueva JM, Stevens J. Structural analysis of the hemagglutinin from the recent 2013 H7N9 influenza virus. *J Virol* 2013; 87: 12433-46.
43. Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, *et al.* Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 2013; 501: 556-9.
44. Xu R, de Vries RP, Zhu X, *et al.* Preferential recognition of avian-like receptors in human influenza A H7N9 viruses. *Science* 2013; 342: 1230-5.
45. de Vries RP, Peng W, Grant OC, *et al.* Three mutations switch H7N9 influenza to human-type receptor specificity. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006390.
46. Galloway SE, Reed ML, Russell CJ, Steinhauer DA. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003151.
47. Schrauwen EJ, Richard M, Burke DF, *et al.* Amino Acid Substitutions That Affect Receptor Binding and Stability of the Hemagglutinin of Influenza A/H7N9 Virus. *J Virol* 2016; 90: 3794-9.
48. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999; 73: 1146-55.
49. Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 2001; 79: 177-85.
50. Blumenkrantz D, Roberts KL, Shelton H, Lycett S, Barclay WS. The short stalk length of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus neuraminidase limits transmission of pandemic H1N1 virus in ferrets. *J Virol* 2013; 87: 10539-51.
51. Benton DJ, Wharton SA, Martin SR, McCauley JW. Role of Neuraminidase in Influenza A(H7N9) Receptor Binding. *J Virol* 2017; 91: e02293-2316.
52. Gao Y, Zhang Y, Shinya K, *et al.* Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000709.
53. Richard M, Schrauwen EJ, de Graaf M, *et al.* Limited airborne transmission of H7N9 influenza A virus between ferrets. *Nature* 2013; 501: 560-3.
54. Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, *et al.* Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. *Science* 2013; 341: 183-6.
55. Xu L, Bao L, Deng W, *et al.* Novel avian-origin human influenza A(H7N9) can be transmitted between ferrets via respiratory droplets. *J Infect Dis* 2014; 209: 551-6.
56. Jones JC, Baranovich T, Zaraket H, Guan Y, Shu Y, Webby RJ, Webster RG. Human H7N9 influenza A viruses replicate in swine respiratory tissue explants. *J Virol* 2013; 87: 12496-8.
57. Li Q, Zhou L, Zhou M, *et al.* Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China. *N Engl J Med* 2014; 370: 520-32.
58. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). H7N9 situation update. FAO, 2017. [fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/situation\\_update.html](http://fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/situation_update.html). (consulté le 29/8/2017).



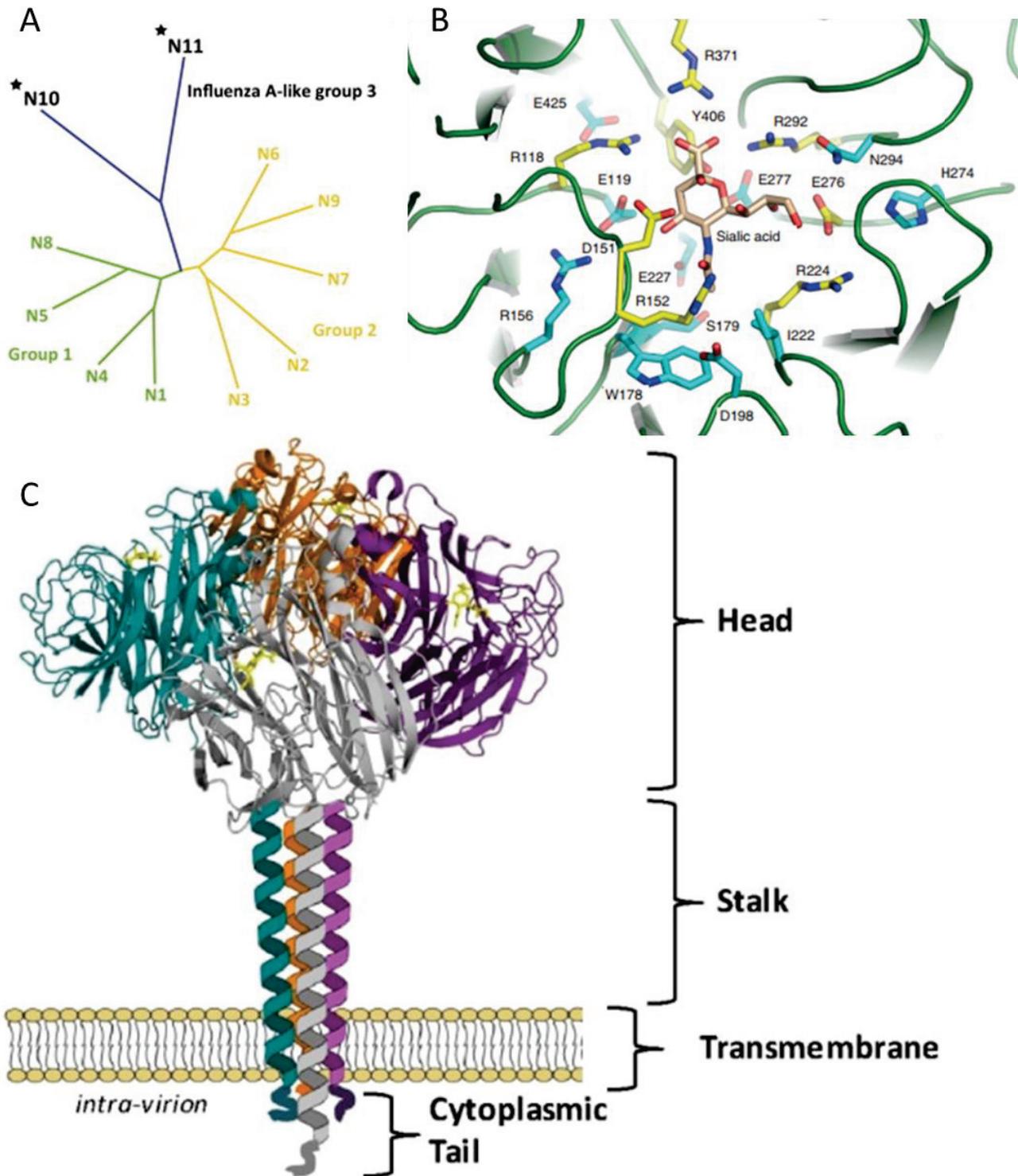
# Chapitre 3 : Les inhibiteurs de la neuraminidase

## 3.1. Introduction

Les seuls antiviraux actuellement disponibles et recommandés contre les virus influenzae ciblent les neuraminidases qui sont des glycoprotéines transmembranaires de type 2 représentant environ 20% des glycoprotéines de surface (71). Les neuraminidases sont impliquées dans la propagation des virus en hydrolysant les liaisons de conformation  $\alpha 2,6$  ou  $\alpha 2,3$  entre l'acide sialique (Neu5ac) et la molécule d'hydrate de carbone adjacente (galactose terminal) des glycoprotéines et glycolipides. Cette action se produit à différents niveaux du cycle viral, i) en permettant de diminuer la viscosité du mucus riche en mucines glycosylées et facilitant la diffusion du virus dans le tractus respiratoire, ii) en favorisant le déplacement des virions à la surface des cellules avant la phase d'internalisation du virus (72), iii) en clivant les acides sialiques terminaux des glycoprotéines virales facilitant l'activation de l'hémagglutinine et empêchant l'agrégation des particules virales, iv) enfin en clivant les résidus d'acides sialiques terminaux des glycoprotéines et glycolipides cellulaires permettant la séparation des virions nouvellement formés (73).

Au niveau phylogénétique, les neuraminidases sont classées en groupes distincts. Pour les virus influenzae A, le groupe 1 contient N1, N4, N5 et N8 ; le groupe 2 contient N2, N3, N6, N7 et N9. Les N10 et N11 identifiées dans des virus influenzae A isolés chez des chauves-souris font partie du groupe 3 (Figure 7A) (74,75).

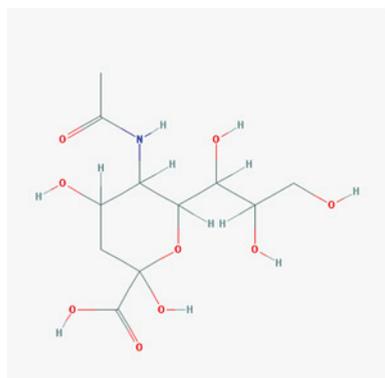
Au niveau structural, les neuraminidases sont des homotétramères dont chaque monomère est organisé en 4 domaines : la partie N-terminale cytoplasmique (0-7 acides aminés), un domaine transmembranaire hydrophobe (7-29 acides aminés), une tige de longueur variable et la tête globulaire qui contient le site actif (Figure 7C) (76–78). Ce site actif forme une cavité composée de deux types d'acides aminés très conservés entre les sous-types de neuraminidases : les acides aminés catalytiques (R118, l'acide aspartique [D] en position 151 [D151], D152, R224, E276, R292, R371 et Y406) en contact direct avec le substrat et les acides aminés structuraux (E119, R156, le tryptophane [W] en position 178 [W178], la sérine [S] en position 179 [S179], D198, l'isoleucine [I] en position 222 [I222], E227, E277, H274, l'asparagine [N] en position 294 [N294] et E425) qui maintiennent la structure de la poche catalytique (Figure 7B) (79).



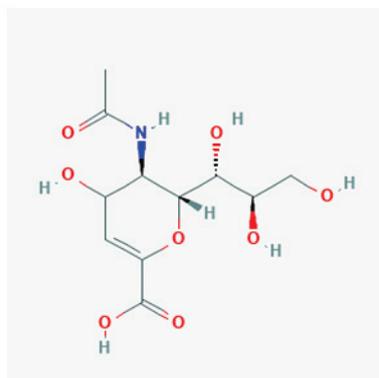
**Figure 7 : Organisation phylogénique et structure des neuraminidases.** A/ Arbre phylogénique présentant les onze neuraminidases des virus influenzae A réparties en trois groupes : le groupe 1 en vert, le groupe 2 en jaune et les neuraminidases isolées chez les chauves-souris en bleu (groupe 3). Figure adaptée de (74). B/ Représentation du complexe entre un acide sialique et le site actif de la N2. Les acides aminés catalytiques sont représentés en jaune et les acides aminés structuraux sont représentés en bleu. Figure adaptée de (80). C/ Représentation de la structure d'une neuraminidase tétramérique avec les quatre domaines constituant chaque monomère. Chaque monomère est représenté d'une couleur différente (gris, orange, vert et violet). Figure adaptée de (78).

### 3.2. Présentation des différents inhibiteurs de la neuraminidase

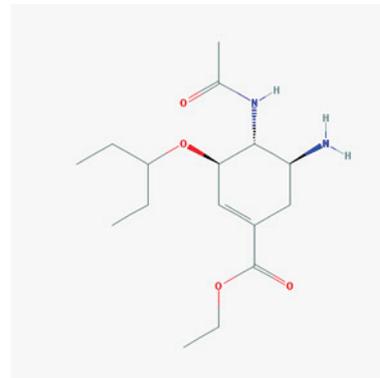
Le rôle essentiel des neuraminidases au cours du cycle viral ainsi que la présence d'un site actif contenant des acides aminés catalytiques et structuraux très conservés, fait de cette enzyme une cible idéale pour le développement d'antiviraux anti-influenza. Les INA sont des molécules actives à la fois sur les virus influenzae A et B.



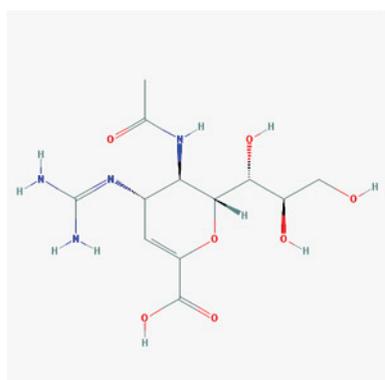
Acide  $\alpha$ -N-acetylneuraminique,  
Acide sialique



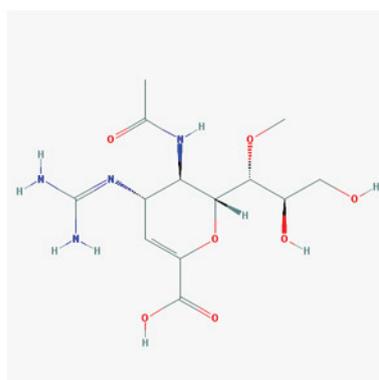
DANA



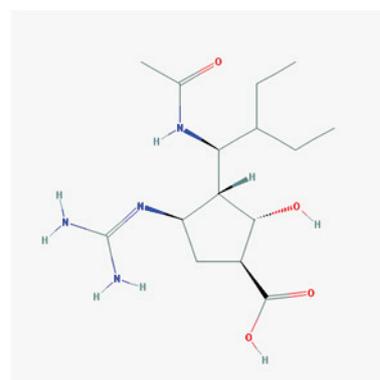
Oseltamivir



Zanamivir



Laninamivir



Peramivir

**Figure 8 : Structures de l'acide sialique et des inhibiteurs de neuraminidases.** Adaptée de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Le développement des INA a débuté en 1969 avec la découverte de l'acide 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminique (Neu5Ac2en ou DANA) qui est un inhibiteur naturel de la neuraminidase de *Vibrio cholerae* (81). Cette molécule n'a jamais été utilisée en raison de son manque de spécificité et d'efficacité chez l'animal. La résolution des premières structures de neuraminidases (N9 et N2) dans les années 80 a permis la découverte des INA anti-influenza (82). Le zanamivir (4-guanidino-DANA) est proche du Neu5Ac2en dont le groupement 4-hydroxyl est remplacé par un groupe guanidino basique permettant une meilleure liaison aux résidus E119 et E227 (83). Le zanamivir, mis sur le marché en 1999, n'est actif que par inhalation et des modifications structurales de cette molécule ont conduit à la découverte et la commercialisation en 2001 de l'oseltamivir actif par voie orale sous la forme d'une prodrogue : l'oseltamivir phosphate (84). La forme active, l'oseltamivir

carboxylate comporte une base cyclohexène et un groupement hydrophobe volumineux (chaîne 6-pentyl ether) qui ne lui permet de se fixer dans le site actif de la neuraminidase qu'après réorientation du résidu E276 permettant la constitution d'une poche hydrophobe (85). L'oseltamivir et le zanamivir existent aussi sous forme directement active pour une administration intraveineuse (IV). Plus récemment, deux nouvelles molécules sont venues compléter la classe des INA. Le peramivir porte une base cyclopentane ainsi qu'un groupement 4-guanidino et une chaîne latérale hydrophobe (86) ; sa biodisponibilité étant faible par voie orale il est utilisé par voie parentérale (87). Le laninamivir est un INA à longue durée d'action qui contient un groupe 4-guanidino et un groupe 7-méthoxy (Figure 8). Administrée par inhalation en dose unique, la prodrogue laninamivir octanoate est convertie en laninamivir au niveau des poumons (88).

Depuis 2010, les INA sont la seule classe d'antiviraux recommandée par l'OMS dans le traitement et la prophylaxie des infections par les virus influenzae A et B (4,89). Actuellement, seuls deux INA sont autorisés dans le monde : l'oseltamivir (Roche) et le zanamivir (GlaxoSmithKline). Le laninamivir (Daiichi Sankyo company Ltd) et le peramivir (Biocryst) sont en cours d'évaluation clinique dans de nombreux pays mais sont déjà disponibles au Japon (laninamivir et peramivir), en Corée du Sud (peramivir), en Chine (peramivir) et aux Etats-Unis (peramivir) (90–92). Le laninamivir (voie inhalée) est utilisé au Japon dans le traitement des infections grippales simples, sans complication. Le peramivir et le zanamivir sont utilisés par voie IV dans les gripes sévères ou lors d'excrétion prolongée du virus avec résistance à l'oseltamivir. Actuellement seul l'oseltamivir *per os* est disponible en France. Son usage est recommandé chez les patients nécessitant une hospitalisation ou ayant des facteurs de risque, dès lors que ces patients présentent une infection respiratoire aiguë pendant la période de circulation des virus grippaux, sans attendre une confirmation virologique (93). Dans les cas de grippe grave et/ou résistante à l'oseltamivir, il est possible d'utiliser le zanamivir IV après l'obtention d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

L'efficacité clinique des INA pour le traitement des infections par les virus influenzae est restée longtemps débattue car la plupart des études montrant un effet bénéfique présentent des biais et/ou des conflits d'intérêts avec les industriels producteurs de ces traitements (94). Récemment, des méta-analyses ont permis de recueillir des données fiables sur l'efficacité de l'oseltamivir en cas de grippe non compliquée concluant à une diminution d'environ 24 heures de la durée des symptômes et une augmentation faible du risque de nausées et vomissements (95,96). La méta-analyse PRIDE (compilation de 78 études observationnelles sur 29 234 patients de tous âges entre 2009 et 2011) a étudié l'impact des INA chez les patients hospitalisés et infectés par le virus A(H1N1)pdm09 montrant une diminution de la mortalité d'environ 20% chez l'adulte quel que soit le délai de prise du traitement. Cette réduction de la mortalité pouvant atteindre 50% en cas de prise d'INA moins de 48 heures après le début des signes cliniques (97). L'étude la plus récente conclut également à une baisse des hospitalisations et des complications respiratoires nécessitant un traitement par antibiotique (98). Enfin, les INA se sont montrés efficaces contre les virus aviaires lors de tests *in vitro* et précliniques mais leur efficacité chez l'Homme est difficile à évaluer en raison du manque de

données et du faible nombre de cas observés. Une étude de 2010 a évalué qu'un traitement par oseltamivir réduirait d'environ 50% la mortalité au cours d'une infection par le virus A(H5N1) (99). Aucune étude n'a été menée sur l'efficacité de l'oseltamivir lors d'infections humaines par le virus A(H7N9). Seule une comparaison entre l'oseltamivir et la combinaison oseltamivir et peramivir a été évaluée en rétrospectif ne montrant aucun bénéfice à l'association (100).

Comme tous les traitements médicamenteux, les INA présentent des effets indésirables tels que des troubles digestifs (nausées après administration orale principalement), des réactions allergiques allant d'éruptions cutanées aux chocs anaphylactiques, des bronchospasmes (administration inhalée principalement), des troubles du système nerveux central (convulsion, délire...), des troubles hépatiques.

### 3.3. Diagnostic des résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase

Bien qu'efficace, l'utilisation des INA en clinique s'est accompagnée de l'apparition de substitutions de résistance. La sensibilité des virus influenzae aux INA et les substitutions responsables de résistance doivent être recherchées et diagnostiquées pour adapter au mieux la prise en charge des patients.

*In vitro*, la réplication des virus influenzae sur cellules *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) est indépendante de l'activité de la neuraminidase rendant impossible les tests phénotypiques d'inhibition de la croissance virale évaluant la sensibilité aux INA. L'utilisation de cellules MDCK enrichies en acide sialique  $\alpha$ 2,6 (*MDCK Sialic Acid Over Expression* ou MDCK-SIAT) permet d'augmenter l'impact de la neuraminidase sur la multiplication virale *in vitro* mais de façon insuffisante pour faire des tests phénotypiques (101). Seuls les tests enzymatiques permettent d'estimer la sensibilité des virus influenzae aux INA en évaluant l'inhibition de l'activité sialidasique de leur neuraminidase, soit par des techniques de fluorescence, soit de chimiluminescence. Les techniques de fluorescence utilisent notamment un substrat de petite taille, l'acide 2'-(4-méthylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminique (MUNANA) qui libère, après clivage par une neuraminidase active, de la 4-méthylumbelliférone (4-Mu) fluorescente. Ces tests permettent d'obtenir la concentration d'INA inhibant 50% de l'activité enzymatique maximale ( $CI_{50}$ ), après incubation des virus en présence de différentes concentrations d'INA. Les deux méthodes sont efficaces pour la détection des résistances mais leurs résultats ne sont pas toujours comparables : les  $CI_{50}$  mesurées par chimiluminescence sont plus faibles que celles mesurées par fluorescence (102). En revanche la chimiluminescence est facile à mettre en place et a une meilleure reproductibilité. Les écarts observés entre ces deux techniques peuvent s'expliquer en partie par l'utilisation de substrats différents n'ayant pas forcément la même affinité pour les neuraminidases étudiées (103).

Le lien précis entre résistance *in vitro* ( $CI_{50}$ ) et résistance clinique n'est pas clairement établi pour les virus influenzae. Malgré cela, l'OMS a défini des seuils classant ces virus en fonction du rapport

entre la  $CI_{50}$  du virus étudié et la moyenne des  $CI_{50}$  mesurées chez des virus apparentés sensibles. Les virus influenzae A sont ainsi définis comme ayant une sensibilité normale (rapport inférieur à 10), réduite (rapport compris entre 10 et 100) ou très réduite (rapport supérieur à 100) aux INA (104). Pour les virus influenzae B, les valeurs limites du rapport sont inférieures mais l'interprétation se fait de la même façon. Au cours de la surveillance, chaque laboratoire de référence va tester un échantillonnage de virus circulant afin d'obtenir les  $CI_{50}$  moyennes de référence pour chaque sous-type de virus influenzae (Voir Partie B, Tableau 2).

Dans la grande majorité des cas, le diagnostic des résistances aux antiviraux utilise la culture cellulaire pour l'isolement et l'amplification des virus. La reprise des virus en culture cellulaire dépend de la charge virale initiale : plus cette charge virale est faible plus il sera difficile de récupérer le virus responsable de l'infection. De plus, la multiplication virale en culture peut entraîner des biais, soit par sélection d'une sous-population présente en minorité dans le prélèvement initial, soit par l'ajout de mutations successives influençant le phénotype viral final (102,105). Les virus récupérés en culture ne sont donc pas forcément le reflet fidèle des populations présentes *in vivo*.

Pour compenser ces biais, les mutations de résistance peuvent être recherchées par biologie moléculaire (RT-PCR) ou séquençage favorisant une détection rapide des mutations directement dans le prélèvement initial. Pour pouvoir mettre en place ces techniques, les substitutions responsables de résistances doivent avoir été préalablement identifiées et caractérisées par les tests phénotypiques. Au cours de ces dernières années, l'amélioration des techniques de biologie moléculaire favorise la détection des sous-populations virales minoritaires et permet d'obtenir les caractéristiques de la population virale responsable de l'infection (106). Nous avons d'ailleurs travaillé sur la mise au point et l'évaluation d'une technique de RT-ddPCR en comparaison d'une RT-qPCR et du séquençage haut débit pour la mise en évidence de la substitution H274Y responsable de résistance à l'oseltamivir (Voir Partie B, Chapitre 2).

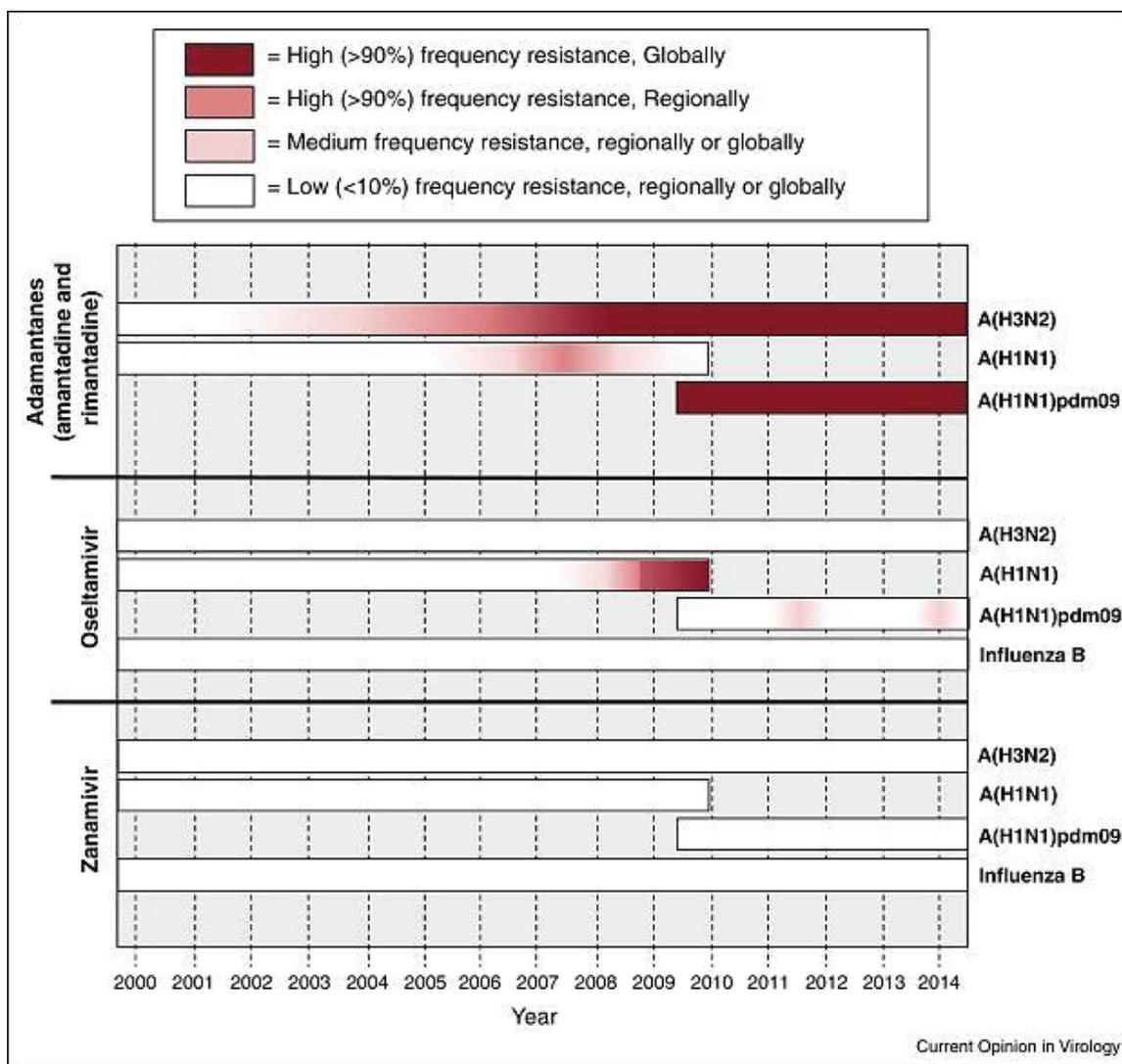
### **3.4. Mécanismes des résistances**

Les résistances des virus influenzae aux INA sont dues à des mutations dans la séquence de la neuraminidase entraînant des substitutions d'acides aminés à proximité ou dans le site actif de l'enzyme. Les substitutions touchent principalement les acides aminés structuraux modifiant la forme du site actif et donc l'affinité pour les INA. Les substitutions des acides aminés catalytiques sont plus rares et s'accompagnent d'un impact important sur l'activité de la neuraminidase pouvant diminuer le fitness viral. Les sites actifs des neuraminidases sont très conservés entre les virus influenzae mais les légères différences structurales existantes expliquent l'apparition de substitutions spécifiques à certains sous-types de neuraminidases (80). De plus, l'impact des substitutions sur la résistance peut varier en fonction de l'INA étudié : la prévalence des résistances à l'oseltamivir est plus élevée que celle observée avec le zanamivir. L'oseltamivir est l'INA le plus utilisé dans le monde facilitant le développement de variants résistants. De plus, le zanamivir a une structure plus proche des acides sialiques que l'oseltamivir : les substitutions de résistances au zanamivir seront donc

généralement plus délétères pour la réplication virale. Enfin, la fixation de l'oseltamivir nécessitant un changement conformationnel du site actif, toutes les substitutions affectant ce changement conformationnel vont diminuer l'affinité et entraîner une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir. Par exemple les substitutions H274Y, R292K ou N294S vont empêcher la rotation du E276 entraînant une forte résistance à l'oseltamivir mais une faible modification de la sensibilité au zanamivir (107).

Les substitutions responsables de résistances aux INA les plus fréquemment observées *in vivo* sont la H274Y dans les N1, la E119V puis la R292K dans les N2 (108). Bien que moins fréquentes d'autres substitutions aux positions : 116, 117, 119, 136, 151, 155, 198, 222, 245, 246, 247, 249, 294, 329, 331, 391 et 432 ont été identifiées dans des prélèvements issus de la surveillance comme étant responsables d'une diminution de la sensibilité aux INA des virus influenzae A (109).

### 3.5. Résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus humains A(H1N1)



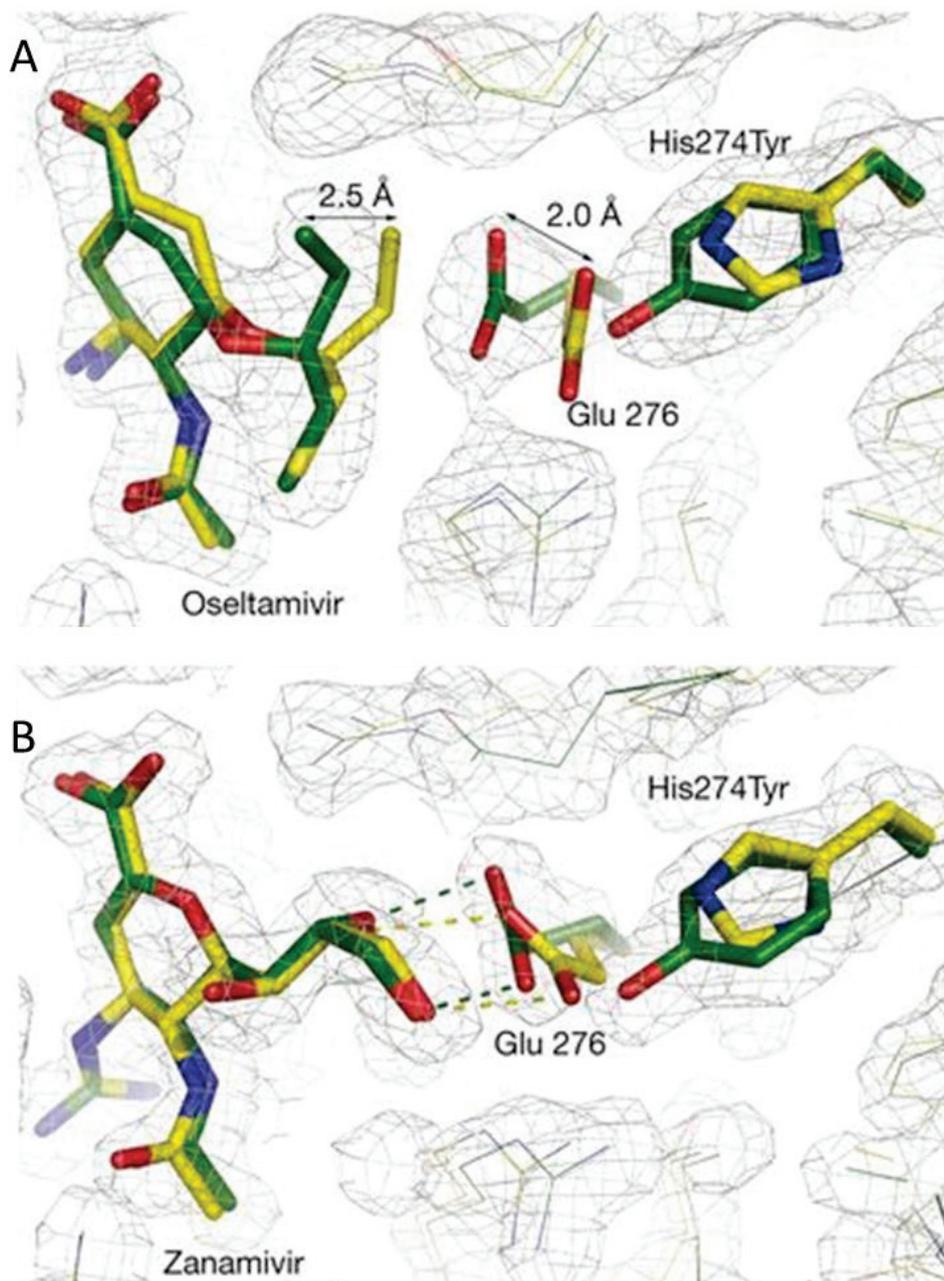
**Figure 9 : Fréquence de détection des virus influenzae résistants aux antiviraux circulant depuis 2000.** Plus la couleur vire du blanc au rouge plus la fréquence de détection des souches résistantes est élevée. Les virus influenzae B naturellement résistants aux adamantanes ne sont pas représentés. Figure adaptée de (110).

La première introduction des INA sur le marché date de 1999. Des études rétrospectives sur des virus influenzae circulant avant cette date n'ont détecté aucune résistance aux INA (111). Ces résistances ont donc une faible prévalence naturelle qui varie en fonction du sous-type viral : elles sont plus rares pour les virus influenzae B et les virus A(H3N2) que pour les virus A(H1N1). L'évolution de la prévalence pour la substitution H274Y dans les virus A(H1N1) a permis un changement de paradigme sur les résistances aux INA.

Entre 1999 et 2004, seulement 0,3% des virus A(H1N1) circulant présentaient une diminution de sensibilité à l'oseltamivir (112). Les substitutions responsables de ces résistances étaient décrites comme ayant un impact très délétère sur l'activité enzymatique entraînant une mauvaise répllication et transmission virale. Il était communément admis que l'apparition d'un virus dominant résistant aux INA était peu probable. Au cours de l'hiver 2007-2008, les virus saisonniers apparentés au virus A/Brisbane/59/2007 (H1N1) se sont séparés en deux clades : le clade 2B correspondant à des virus sensibles à l'oseltamivir mais résistants aux adamantanes (abrégé Br07H) et le clade 2C composé de virus résistants à l'oseltamivir et sensibles aux adamantanes (abrégé Br07Y). Les virus Br07Y sont apparus en Europe chez des patients sans traitement préalable et portaient la substitution H274Y (6). Cette souche présentait un bon fitness viral et s'est diffusée dans le monde entier avant d'être remplacée par le virus A(H1N1)pdm09 (80). L'étude de la souche Br07Y a mis en évidence des substitutions compensatrices dans la N1 (substitution de l'acide aminé V234 par une méthionine [M] [V234M], de R222 par une glutamine [Q] [R222Q], K329E, D344N, et de l'acide aminé D354 par une glycine [G] [D354G]) qui ont permis de conserver une activité sialidasique suffisante (7,113). L'association de ces substitutions avec d'autres substitutions dans l'hémagglutinine (substitution de la thréonine [T] en position 86 par une K [T86K], K144E et R192K) aurait permis une légère modification de son affinité et un échappement immunitaire du virus. Ces modifications présentes sur les deux glycoprotéines de surface auraient permis de recentrer la balance hémagglutinine-neuraminidase sur la balance optimale pour l'Homme expliquant la rapide diffusion de cette souche (114–116). Ainsi, l'ensemble des virus A(H1N1) isolés lors de l'hiver 2008-2009 étaient résistants à l'oseltamivir (117). Puis, en 2009 ces virus résistants ont été remplacés par les virus pandémiques A(H1N1)pdm09 qui sont majoritairement sensibles à l'oseltamivir (Figure 9). Depuis, des variants résistants du virus A(H1N1)pdm09 avec la substitution H274Y ont été isolés à la fois chez des patients sous traitement (118,119) et chez des patients sans traitement antiviral mais ils ne se sont pas diffusés largement (120,121).

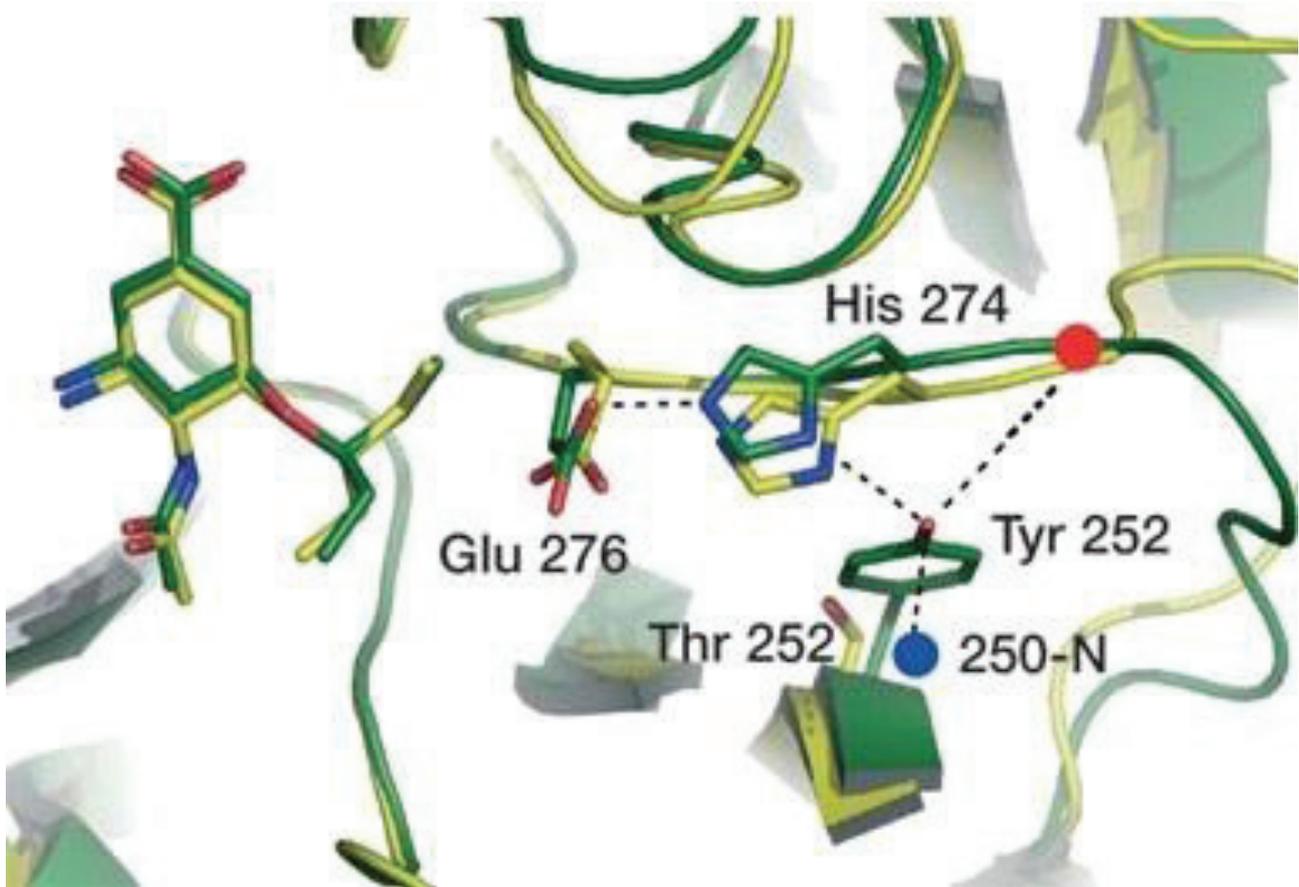
La substitution H274Y touche un acide aminé structural entraînant une résistance de haut niveau à l'oseltamivir sans perte d'activité mais avec une diminution de l'affinité de la N1 substituée (Voir Partie C, Chapitre 1) (107). La substitution de l'histidine par la tyrosine, plus volumineuse, entraîne le déplacement du E276 de deux ångström (Å) vers l'intérieur du site actif déstabilisant la poche hydrophobe nécessaire à la fixation du groupement pentyloxy de l'oseltamivir. Le zanamivir ne nécessitant pas de changement conformationnel de l'acide aminé E276, peut se fixer malgré la présence de la substitution H274Y (Figure 10) (107).

Dans les neuraminidases du groupe 2, la présence d'un petit acide aminé (thréonine, T) en position 252 permet d'accueillir la substitution H274Y sans impacter significativement le positionnement de l'acide aminé E276 (Figure 11) (75).



**Figure 10 :** Superposition du site actif d'une N1 sauvage (jaune) et d'une N1 avec la substitution H274Y (vert) avec de l'oseltamivir (A) ou du zanamivir (B). Les pointillés représentent des liaisons hydrogènes. Figure adaptée de (107).

Depuis 2010, le CNR des virus des infections respiratoires (France Sud) surveille la circulation des virus influenzae porteurs de mutations de résistance aux INA en testant environ 30 isolats de chaque sous-type majoritaire ayant circulé (Tableau 2) et en caractérisant les virus isolés chez les patients ayant une excrétion prolongée (>7 jours). Parmi plus de 400 virus A(H1N1)pdm09 testés, le CNR a détecté onze virus porteurs de la substitution H274Y entre 2010 et 2018 et un virus porteur de la substitution N294S en 2013-2014.



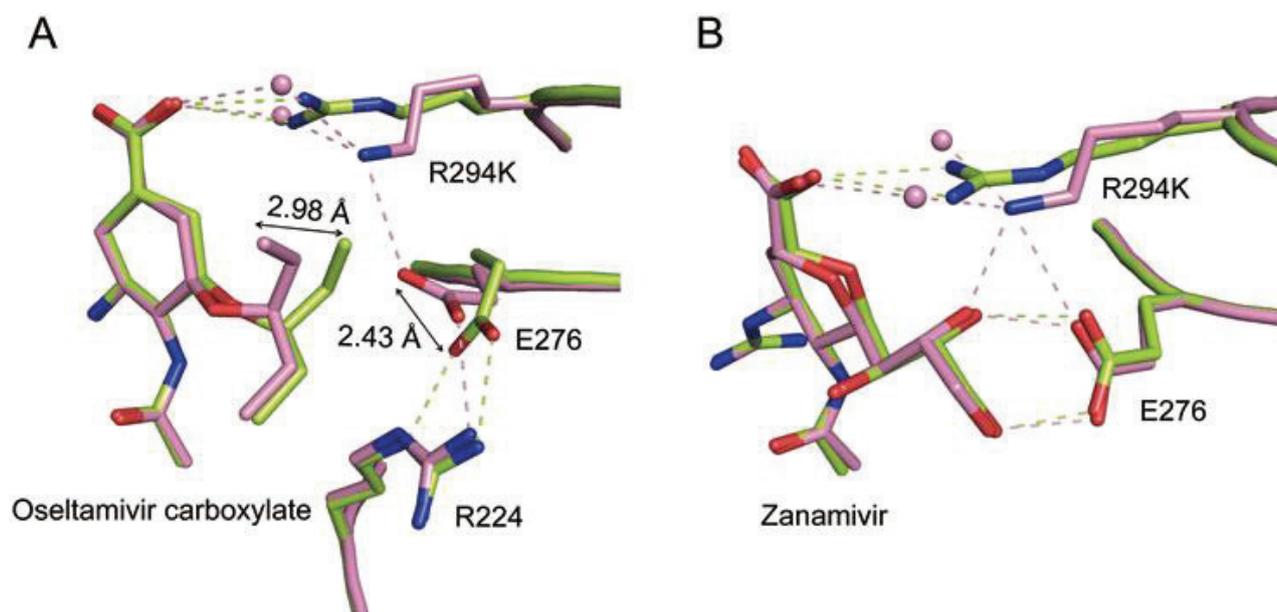
**Figure 11** : Superposition du site actif d'une N1 (vert) et d'une N2 (jaune) avec de l'oseltamivir. Les pointillés noirs représentent des liaisons hydrogènes. Figure adaptée de (75).

Plusieurs des cas ont été investigués et caractérisés complètement pour donner lieu à deux publications. En 2013-2014, un patient atteint de DICS a excrété du virus influenza A(H1N1)pdm09 pendant six mois malgré des traitements par oseltamivir et zanamivir IV. La présence de mélange de variants avec détection de la substitution H274Y a été retrouvée par les techniques conventionnelles puis a été confirmée par séquençage à haut débit (Voir Partie B, Chapitre 1). En 2014-2015, deux patients ont excrété des virus porteurs de la substitution H274Y, un enfant de deux ans atteint d'un DICS et un patient de 47 ans souffrant d'un lymphome à cellule B. Les prélèvements de ces patients ont servi à comparer les performances de détections de la substitution H274Y entre la RT-qPCR, RT-ddPCR et le séquençage à haut débit (Voir Partie B, Chapitre 2).

Au niveau mondial, l'OMS publie une mise à jour annuelle des données de surveillance sur la circulation des souches résistantes aux INA. Depuis 2012-2013, 266 virus ont été isolés avec la substitution H274Y dont trois avec une substitution associée (I222R ou I222K ou G146R) et ont tous montré un profil de sensibilité très réduite à l'oseltamivir et au peramivir. Il est également important de noter que les virus porteurs des substitutions Q136R ou Q136K ont un profil de sensibilité très réduite au zanamivir et au peramivir et une sensibilité réduite au laninamivir (122). Les virus porteurs de la substitution S247R ont un profil de sensibilité très réduite au laninamivir et au peramivir et une sensibilité réduite au zanamivir et à l'oseltamivir (123). Enfin, d'autres substitutions ont été identifiées comme responsable d'une sensibilité réduite à au moins un des INA (108,122–126).

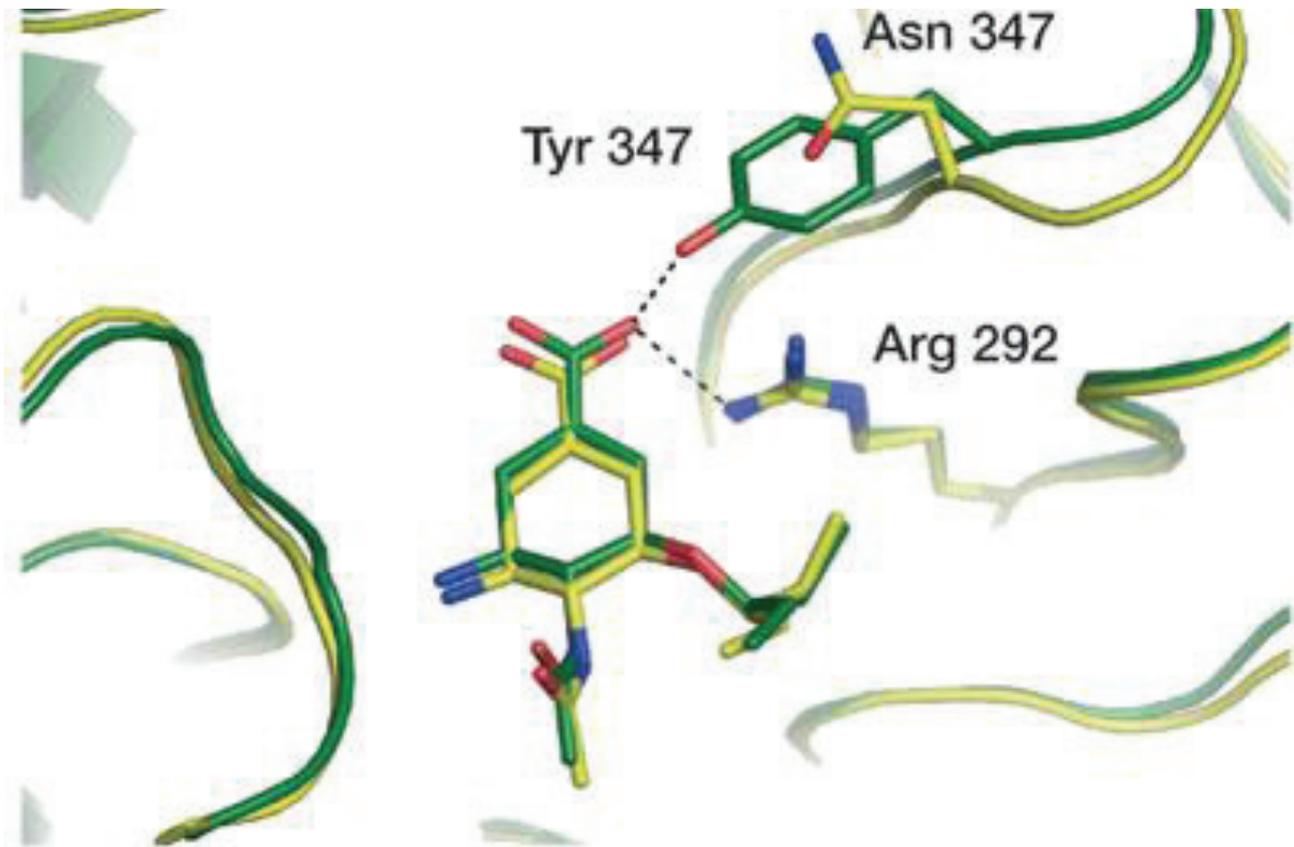
### 3.6. Résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus humains A(H3N2)

L'apparition de résistances dans les virus A(H3N2) est moins fréquente que dans les virus A(H1N1) (108,122–126). En plus de la surveillance systématique de ces virus, des études ciblées ont été menées pour observer l'apparition de résistances aux INA en présence de traitement. En 2004, les substitutions R292K, E119V et N294S ont été identifiées dans une cohorte d'enfants en comparant des prélèvements avant et après traitement par oseltamivir (127). Entre 2005 et 2017, deux autres études ont confirmé ces résultats avec la mise en évidence des substitutions R292K et E119V pour les virus A(H3N2) et H274Y pour les virus A(H1N1) (128,129).



**Figure 12 :** Superposition du site actif d'une N9 non substituée (vert) et d'une N9 portant la substitution R292K (Rose) avec soit de l'oseltamivir (A) soit du zanamivir (B). Les pointillés représentent des liaisons hydrogènes et les ronds des molécules d'eau. La numérotation utilisée dans cette figure est celle de la N9 : la position notée 294 correspond à la position 292 dans la N2. Les distances notées correspondent aux déplacements des acides aminés suite à l'insertion de la substitution R292K. Figure adaptée de (130).

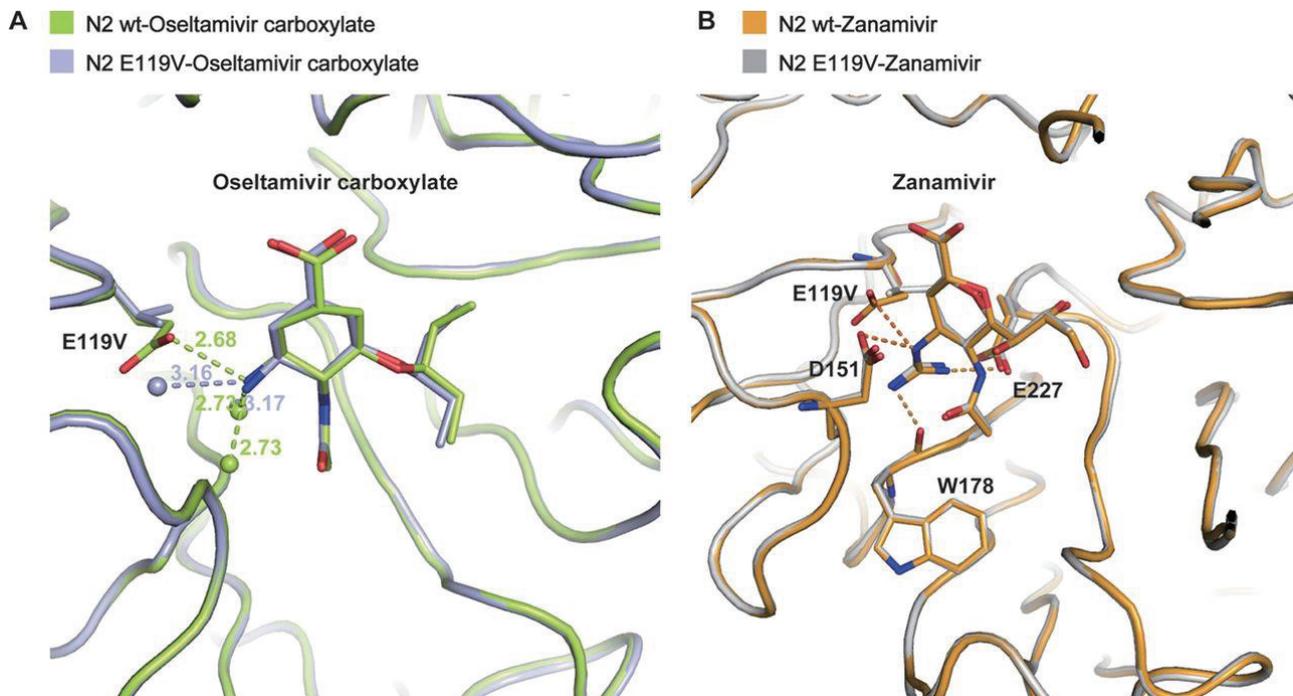
La substitution de résistance R292K a été identifiée avant même la mise sur le marché de l'oseltamivir ; c'est également une des deux plus fréquentes dans les virus humains porteurs de N2. Cette substitution touche directement un acide aminé catalytique entraînant une résistance de haut niveau à l'oseltamivir par la perte d'une liaison hydrogène entre le site actif de la neuraminidase et le groupement carboxylate de l'oseltamivir (85). De plus, elle va empêcher la rotation du E276 indispensable à la création de la poche permettant une bonne fixation de l'oseltamivir (Figure 12) (131). Ces modifications s'accompagnent d'une diminution importante de l'activité de la neuraminidase impactant la pathogénicité et la transmissibilité des virus (132,133). La substitution R292K n'est pas responsable de résistance dans la N1 car l'acide aminé Y347 compense la perte de la liaison hydrogène avec le substrat (Figure 13) (75).



**Figure 13 : Superposition du site actif d'une N1 (vert) et d'une N2 (jaune) avec de l'oseltamivir. Les pointillés noirs représentent des liaisons hydrogènes. Figure adaptée de (75).**

De nombreuses substitutions en position 119 ont été étudiées au regard de la résistance aux INA mais seules deux ont été isolées *in vivo* dans les N2 : la E119V et la E119I. La substitution E119V induit une résistance à l'oseltamivir mais n'impacte ni la sensibilité au zanamivir ni au peramivir. Cette substitution diminue l'activité de la neuraminidase (5) mais n'atténue pas la capacité répliquative ni la transmissibilité par contact (134,135). Au niveau structural, la substitution E119V entraîne la perte d'une liaison hydrogène entre le site actif de la N2 et le groupement amine de l'oseltamivir. L'absence d'impact de cette substitution sur la fixation du zanamivir serait due à un nombre de liaisons hydrogènes plus important entre le site actif de la N2 et la molécule pouvant compenser la perte de celui fait par l'acide aminé en position 119 (Figure 14) (136). La substitution E119I a été isolée chez un enfant immunodéprimé traité par de l'oseltamivir. Elle confère une résistance combinée à l'oseltamivir et au peramivir mais ne diminue pas la sensibilité au zanamivir (102).

En 2012-2013, le CNR des virus des infections respiratoires (France Sud), a retrouvé des virus A(H3N2) porteurs de la substitution E119V chez une patiente de 24 ans allogreffée de moelle (LAM) qui a excrété du virus pendant deux mois.



**Figure 14 : Superposition du site actif d'une N2 sauvage et d'une N2 portant la substitution E119V.** Les pointillés représentent des liaisons hydrogènes et les ronds des molécules d'eau. A/ La N2 substituée en position 119 (bleu) perd une liaison hydrogène avec l'oseltamivir à la différence de la N2 sauvage (vert). B/ La N2 sauvage (orange) possède quatre liaisons hydrogènes avec l'oseltamivir dont une seule est perdue en présence de la substitution E119V (gris). Figure adaptée de (136).

Comme pour la position 119, de nombreuses substitutions ont été étudiées en position 222 dont seulement trois ont été trouvées *in vivo* : la I222V, la I222T et la substitution de l'acide aminé I222 par une leucine (L) (I222L). La substitution I222L a été observée dans des virus A(H5N1) isolés soit chez l'oiseau soit chez le furet sans pression de sélection, mais également dans des virus influenzae B isolés chez un patient traité par INA. Cette substitution modifie faiblement la résistance des virus porteurs d'une N1 (137) ; en revanche elle est responsable d'un haut niveau de résistance chez les virus influenzae B (138). *In vitro*, l'association des substitutions E119V et I222L dans une N2 a un effet synergique sur la résistance aux INA (5). La substitution I222T est responsable de résistance à l'oseltamivir dans les virus influenzae B (139). Récemment, cette substitution a été retrouvée dans des virus A(H7N9) (Voir paragraphe 1.7., ci-dessous) et dans des virus A(H3N2) mais son impact sur la résistance n'a pas été étudié (140). Enfin, la substitution I222V a été observée dans des virus porteurs d'une N1 (112) et dans des virus A(H3N2) en association avec la mutation E119V. Cette substitution seule influence peu la sensibilité des virus aux INA mais son association avec la substitution E119V va entraîner un effet synergique sur la résistance des virus à l'oseltamivir (141). Dans le virus A(H3N2) la substitution I222V compense l'impact de la substitution E119V sur le fitness viral (142).

D'autres cas rares de résistance aux INA ont été observés *in vivo*. La substitution N294S a déclenché une résistance à l'oseltamivir chez un enfant traité et infecté par un virus A(H3N2) (127). Une délétion entre les positions 245 et 248 dans la N2 d'un virus A(H3N2) a été observée chez un

enfant immunodéprimé après plus de 100 jours de traitement par oseltamivir et chez un autre patient après seulement 5 jours de traitement. Cette délétion entraîne une résistance combinée à l'oseltamivir et au zanamivir (143,144). La surveillance OMS sur la circulation des souches résistantes aux INA a isolé, en 2014-2015, un virus portant la substitution N142S entraînant une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir et au zanamivir et une sensibilité diminuée au laninamivir et au peramivir (125). Cette surveillance relève également tous les ans de nouvelles substitutions entraînant une sensibilité diminuée des virus A(H3N2) aux INA (108,122–126). Enfin dans des cas extrêmes certains virus isolés ne possédaient pas de neuraminidase et étaient donc résistants à tous les INA (Voir partie A, Chapitre 5) (145).

### **3.7. Résistances aux inhibiteurs de la neuraminidase des virus aviaires**

Les études de surveillance de la susceptibilité aux INA des virus influenzae aviaires sont relativement peu nombreuses. Il est donc très difficile de mettre en avant la circulation de substitutions de résistance et d'évaluer le risque d'émergence d'une souche résistante aux INA dans le réservoir zoonotique.

#### **3.7.1. Résistances aux INA des virus A(H5N1)**

Lors du traitement des infections humaines par les virus A(H5N1), plusieurs cas de résistances aux INA ont pu être décrits suite à l'apparition de la substitution H274Y dans la neuraminidase N1 ( $CI_{50} > 700nM$ ) (146,147). L'analyse des  $CI_{50}$  pour l'oseltamivir de virus influenzae A(H5N1) isolés chez l'homme, en Asie, de 1997 à 2005, montre une variation naturelle du niveau de sensibilité selon les N1 mais les  $CI_{50}$  restent dans des valeurs faibles entre 0,09 et 2,3 nM (148). Dans le réservoir aviaire, sans pression de sélection, plusieurs études ont également montré une importante variabilité de la sensibilité des virus A(H5N1) à l'oseltamivir avec des  $CI_{50}$  variant de 0,08 à 307 nM et la détection de substitution liée à un phénotype résistant tels que S246N, N294S et E119A±I117V (149,150).

#### **3.7.2. Résistance aux INA des virus A(H7N9)**

Les virus A(H7N9) qui circulent en Chine depuis 2013 sont majoritairement sensibles aux INA (oseltamivir, zanamivir et peramivir) (151) mais certaines substitutions responsables de résistances ont été observées suite à la mise en place du traitement au cours d'infections sévères. L'apparition de ces substitutions peut être liée à une remontée de la charge virale et à une progression des symptômes (152). La substitution R292K a été la plus fréquemment décrite ; elle s'accompagne d'un haut niveau de résistance à l'oseltamivir et au peramivir mais entraîne des modifications moindres de la sensibilité au zanamivir et au laninamivir. De plus, elle ne semble pas diminuer ni la réplication, ni la transmission du virus contrairement à ce qui a pu être observé dans les virus A(H3N2) (153). D'autres substitutions ont été retrouvées chez des patients infectés par le virus A(H7N9) : la modification d'une alanine (A) par une T en position 246 (A246T), la E119V, et les I222K/R. Les

substitutions E119V, I222R et I222K sont responsables d'une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir sans diminution du fitness viral (70). La substitution I222K augmente également la virulence de la souche A(H7N9) chez la souris (69).

### 3.7.3. Résistance aux INA d'autres virus influenzae zoonotiques

Les résistances dans les neuraminidases issues du réservoir zoonotique sont très peu étudiées en raison de leur faible prévalence et de leur impact minime sur la santé humaine. Mais la diffusion mondiale des virus A(H5N8), ainsi que le risque pandémique provenant des virus A(H5N1) et A(H7N9) a forcé l'OMS à reconnaître que les connaissances actuelles étaient insuffisantes pour pouvoir interpréter l'impact des substitutions d'acides aminés connues pour conférer une résistance aux INA dans les neuraminidases des virus infectant l'Homme, dans d'autres sous-types de neuraminidases. En Août 2018, le groupe de travail sur la surveillance de la sensibilité aux antiviraux a mis en avant la nécessité de réaliser une surveillance globale de la sensibilité des virus zoonotiques aux antiviraux (8)

Quelques études environnementales ont tout de même été réalisées pour rechercher les substitutions de résistances des virus influenzae isolés à partir de prélèvement de l'environnement et dans différentes espèces animales quel que soit le sous-type de neuraminidase. Par exemple, en 2011, une équipe Suédoise a étudié 6 221 séquences de neuraminidases (5 720 séquences provenaient de virus aviaires, 379 de virus porcins et 122 de virus isolés dans l'environnement) et ont pu retrouver des substitutions de résistances dans 151 séquences (132 issus de virus aviaire et 18 de virus porcins et un virus de l'environnement) (154). L'impact de ces substitutions a été observé après la sélection de 21 virus issus du réservoir aviaire et portant une N1, N3, N6 ou N9. Ces substitutions entraînent des changements de sensibilité aux INA très variables en fonction de la souche virale et de la substitution en cause. De plus, il est intéressant de noter que les valeurs de  $CI_{50}$  mesurées pour les virus définis comme sauvages étaient également très variables en fonction du sous-type : par exemple pour le zanamivir les  $CI_{50}$  étaient de 1,2 nM pour un virus A(H1N1) à 25,4 nM pour un virus A(H4N6) en passant par 9,7 nM pour un virus A(H2N3) (155).

Une autre étude portant sur 91 isolats de virus influenzae aviaires divers porteurs de N1 a montré des gammes de  $CI_{50}$  allant de 0,5 à 154 nM. Sept virus avaient des  $CI_{50} > 50$  nM pour l'oseltamivir et les substitutions détectées étaient situées hors du site actif de la neuraminidase (156). De même pour 73 isolats aviaires porteurs de N6 (1976 à 2010), 10% présentaient des  $CI_{50}$  entre 5 et 50 nM et seulement deux virus avaient une substitution connues dans leur neuraminidase : la I222V (157).

Finalement, nos travaux ainsi que ceux d'autres équipes, bien que mené *in vitro*, ont contribué à faire avancer les connaissances sur la résistance aux INA pour les virus influenzae A d'origine aviaire (Voir Partie C). Deux études *in vitro* portant sur différentes substitutions insérées par mutagenèse aléatoire soit dans les neuraminidases du groupe 1 (N4, N5 et N8) soit dans celles du groupe 2 (N3, N7 ou N9) ont permis d'étudier certaines substitutions responsables de résistances

en fonction du sous-type de neuraminidase (158,159). La substitution H274Y semble prédominante dans les neuraminidases du groupe 1 (N1, N4, N5 et N8) et induit une résistance élevée à l'oseltamivir, la sensibilité au zanamivir étant conservée (Voir Partie C, Chapitre 1) (107,158). Cette substitution peut induire une résistance à l'oseltamivir dans les N3 et N9 (159,160). La substitution R292K semble très spécifique des neuraminidases du groupe 2 et peut impacter la sensibilité à la fois à l'oseltamivir et au zanamivir (sauf pour la N2) (Voir Partie C, Chapitre 2 et 3). La substitution E119V est retrouvée dans les N2, N7, N9 et N5 entraînant surtout une résistance à l'oseltamivir (Voir Partie C, Chapitre 2). Les substitutions E119G (pour N3 et N7) et E119D (pour N6 et N7) entraînent surtout une résistance au zanamivir (158,159). Les autres substitutions identifiées par les travaux de génétique inverse après mutagenèse aléatoire et sélection de variants sous pression de sélection sont R152N pour N7, E276D pour N4 et N7, et R371K pour N6. Ces substitutions présentaient un impact faible à modéré en terme d'augmentation des  $CI_{50}$  (158,159).

Si l'on résume, chaque neuraminidase semble posséder des substitutions de résistance aux INA qui lui sont propres et qu'il n'est pas toujours possible de dégager un clivage net entre neuraminidases du groupe 1 et du groupe 2 pour toutes ces substitutions. De plus, les virus résistants peuvent devenir dominants, faisant de la surveillance et de l'étude des mécanismes de résistance des éléments indispensables à la lutte contre les virus influenzae.

# Chapitre 4 : Autres antiviraux actifs contre les virus influenzae

## 4.1. Introduction

Bien que les INA soient la seule classe d'antiviraux recommandée par l'OMS dans le traitement et la prophylaxie des infections par les virus influenzae A et B, d'autres solutions thérapeutiques existent pour lutter contre les infections grippales. Dans un premier temps, il existe des moyens de prévention pour limiter la transmission du virus comme l'application des mesures d'hygiène simple (lavage de mains, port de masque...) ou l'utilisation de la vaccination dans l'entourage ou directement chez les personnes à risques de complications.

La vaccination est le meilleur moyen de prévention contre les infections par les virus influenzae. Elle doit être réalisée au plus tard deux à trois semaines avant le début de l'épidémie hivernale et renouvelée annuellement pour être efficace. Chaque année, l'OMS émet des recommandations sur la composition vaccinale prenant en compte les souches virales qui ont circulé durant l'hiver précédent (hémisphère Nord et Sud) et qui sont les plus susceptibles d'être responsables de la prochaine épidémie hivernale. Depuis 2014, l'OMS utilise également un modèle prédictif de l'émergence des clades majoritaires pouvant être responsables des variations antigéniques (161). Pour l'hiver 2019-2020, la composition du vaccin grippal pour l'hémisphère Nord se fera à partir des souches virales A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09-like, A/Kansas/14/2017 (H3N2)-like, B/Colorado/06/2017-like (Lignage B/Victoria/2/87); B/Phuket/3073/2013-like (lignage B/Yamagata/16/88) (162). Parmi ces souches, le choix du virus A(H3N2) a été le plus compliqué et a nécessité un mois de surveillance supplémentaire en raison de la co-circulation dans des proportions importantes de deux clades (3C.2a1b et 3C.3a) antigéniquement et génétiquement distincts. Finalement le choix du virus A/Kansas/14/2017 (H3N2)-like permettrait d'obtenir une bonne protection contre les virus du clade 3C.3a majoritaires en fin de saison et la souche A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like présente dans le vaccin des années précédentes aurait permis la production d'anticorps reconnaissant les souches récentes du clade 3C.2a1b (162). En France, depuis 2018, les vaccins quadrivalents sont disponibles et doivent être utilisés dans la stratégie vaccinale vis-à-vis de la grippe saisonnière en remplacement des vaccins trivalents.

Malgré ces moyens de prévention, la grippe reste une maladie infectieuse très contagieuse. Lors d'une infection bénigne chez les patients ne présentant pas de facteurs de risques, un traitement symptomatique composé de paracétamol, une bonne hydratation et un arrêt de travail est généralement suffisant. Chez les personnes à risques de complications ou en cas d'infections sévères, cette prise en charge symptomatique reste limitée et l'utilisation d'antiviraux devient indispensable. Or, l'arsenal thérapeutique restreint aux INA est parfois insuffisant, notamment en cas d'émergence d'un nouveau sous-type de virus influenza, de présence d'une substitution de

résistance aux INA ou lors d'infections très sévères, obligeant la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouvelles molécules antivirales contre ces virus.

#### **4.2. Diagnostic des résistances aux antiviraux autres que les INA**

La sensibilité des virus influenzae aux antiviraux peut être étudiée par des tests phénotypiques tels que l'inhibition de la multiplication virale en présence de concentrations croissantes d'antiviraux. Une quantité de virus titrée est mise en culture sur cellules MDCK avec différentes concentrations d'antiviraux puis après une incubation variable entre 24 et 72 heures le virus est quantifié. Cette quantification peut se faire par dénombrement des plages de lyses permettant d'obtenir la  $CE_{50}$  qui est la concentration d'antiviral nécessaire à la diminution de 50% du nombre de plages de lyses comparée à un témoin. La quantification virale peut également se faire par d'autres méthodes tel que des techniques de biologie moléculaire (196). Ces tests phénotypiques sont très peu réalisés et sont réservés à des laboratoires spécialisés.

De plus, comme pour les INA, les mutations de résistance peuvent être recherchées par biologie moléculaire (RT-PCR) ou séquençage. Mais ces mutations doivent avoir été préalablement identifiées et caractérisées par les tests phénotypiques.

#### **4.3. Les adamantanes**

Les adamantanes sont des molécules qui étaient utilisées dans le traitement et la prophylaxie des infections par les virus influenzae A avant la découverte des INA (163). La classe des adamantanes est composée de deux molécules : l'amantadine et la rimantadine qui possèdent un mécanisme d'action commun en inhibant l'activité du canal à proton M2 des virus influenzae A. Bien que leur mécanisme d'action soit similaire, ces deux molécules ne possèdent pas le même site de fixation sur la protéine M2 (164,165) et aucune ne se fixe sur le canal à protons des virus influenzae B, naturellement résistants. Pour les virus influenzae A, une résistance aux adamantanes peut apparaître après trois jours de traitement chez 30% des patients. Cette forte prévalence des résistances est due à des substitutions empêchant la fixation des adamantanes sur la protéine M2 mais n'entraînant aucun impact ni sur le fonctionnement de cette protéine ni sur le fitness viral. Une seule mutation en position 26, 27, 30, 31, 34 ou 38 de la protéine M2 permet d'obtenir une résistance croisée à l'amantadine et la rimantadine (166,167).

La surveillance généralisée des virus influenzae a montré une augmentation de la fréquence de circulation de souches résistantes aux adamantanes même en l'absence d'utilisation de ces traitements. En 2005-2006, la prévalence des souches résistantes atteignait 90% des virus A(H3N2) et 15% des virus A(H1N1) avec de grandes disparités régionales (168). En 2007, les virus saisonniers apparentés au virus A/Brisbane/59/2007 (H1N1) se sont séparés en deux clades : Br07H résistant aux adamantanes et Br07Y sensible aux adamantanes. Ce dernier s'est diffusé mondialement et est devenu majoritaire dès l'hiver 2008-2009 entraînant une chute de la résistance

aux adamantanes (169). Puis en 2009, le virus A(H1N1)pdm09 résistant aux adamantanes à cause de la substitution S31N dans la protéine M2, a complètement remplacé les virus saisonniers A(H1N1) (Figure 9) (170). Depuis 2010, plus de 99% des virus A(H1N1)pdm09 et A(H3N2) sont résistants aux adamantanes mais en 2017, l'Australie a pu observer une augmentation significative du nombre de virus A(H3N2) sensibles (15 / 461, 3.3%) circulant (171).

Les virus responsables de zoonoses ne sont pas épargnés par les résistances aux adamantanes. Les virus A(H5N1) peuvent être résistants à ces molécules à cause de différentes substitutions notamment en position 26, 27 30 et 31 de la protéine M2 (172). Les virus A(H7N9) semblent majoritairement résistants aux adamantanes à cause d'une substitution S31N dans la protéine M2 (173). Tous les sous-types de virus influenzae A peuvent présenter une résistance aux adamantanes mais certains sous-types semblent plus touchés que d'autres. Globalement plus de 45% (14 132/31 251) des séquences de M2 obtenues avant 2013 présentaient une substitution de résistance aux adamantanes (174).

Depuis plusieurs années, le traitement par les adamantanes n'est plus recommandé comme traitement des infections grippales aiguës en raison de son absence d'efficacité sur les virus influenzae B, de la présence d'effets indésirables (troubles digestifs : constipations, douleurs abdominales, nausées / troubles du système nerveux central : agitations, cauchemars, hallucinations, troubles de la coordination musculaire) et de la fréquence élevée d'apparition de résistances (175). Mais ces molécules pourraient s'avérer utiles en cas d'émergence d'un sous-type viral résistant aux INA et sensible aux adamantanes ou lors de l'utilisation combiné de plusieurs molécules antivirales avec des cibles différentes.

#### **4.4. Les inhibiteurs du complexe polymérase**

L'ARN polymérase ARN dépendante des virus influenzae est composée de trois sous-unités, PB1 (Protéine Basique 1), PB2 (Protéine Basique 2) et PA (Protéine Acide) et permet la transcription et la réplication du génome viral (Voir Partie A, Chapitre 1). Des traitements antiviraux existants ou en cours de développement ciblent les différentes sous-unités de ce complexe polymérase et agissent selon différents mécanismes d'actions : le baloxavir marboxil est un inhibiteur de la sous-unité PA, le pimodivir est un inhibiteur de la sous-unité PB2 et le favipiravir est un analogue nucléosidique inhibiteur de l'élongation de l'ARN par le complexe polymérase. D'autres molécules sont en développement à des stades précliniques (176–178).

##### **4.4.1. Le baloxavir marboxil**

En 2018, le baloxavir marboxil (Xofluza®) a été autorisé au Japon (février) pour le traitement de la grippe non compliquée A ou B chez l'enfant et l'adulte (poids  $\geq$  10kg) puis aux USA (octobre) avec les mêmes indications chez des patients âgés de 12 ans ou plus (179,180).

Le baloxavir marboxil (S-033188) est une molécule inhibant l'activité endonucléase dépendante de la coiffe de la sous-unité PA. Cette molécule est métabolisée en forme active (le baloxavir acide) qui inhibe l'initiation de la synthèse de l'ARNm viral en formant des liaisons stables avec deux ions manganèse dans le site actif de PA. La métabolisation de la prodrogue en métabolite actif est rapide mais l'élimination hépatique du baloxavir acide est longue (demi-vie de 50 à 90 heures) et permet l'administration par voie orale d'une dose unique (177). Les premières études *in vitro* ont montré une très bonne efficacité pour inhiber les virus influenzae A (CE<sub>50</sub> moyenne de 1,4 à 3,1 nM) et B (CE<sub>50</sub> moyenne de 4,5 à 8,9 nM). Le baloxavir s'est également montré efficace sur des virus résistants aux adamantanes et aux INA (H274Y) et sur différents sous-types de virus influenzae A issus du réservoir aviaire (181). L'association de baloxavir et d'un INA a montré un effet synergique permettant de protéger des souris d'une infection létale par les virus influenzae. Cette association permet également une baisse significative du titre viral dans les poumons 24 heures après la mise en route du traitement (182).

Chez l'Homme, un essai de phase II réalisé chez 400 adultes ayant une grippe non compliquée traités par une dose unique de baloxavir marboxil (10 mg, 20 mg, ou 40 mg) versus placebo a montré une diminution significative du titre viral (3 à 4 log<sub>10</sub> en fonction de la dose) en 24 heures et des symptômes cliniques raccourcis de 28 heures en moyenne chez les patients traités (183). L'essai clinique de phase III CAPSTONE-1 a été réalisé chez 1 436 patients âgés de 12 à 64 ans et présentant une infection grippale A ou B non compliquée depuis moins de 48 heures. Ces patients ont été traités par placebo, ou une dose unique de baloxavir marboxil (40 mg ou 80 mg), ou de l'oseltamivir 75 mg (2 fois par jour pendant 5 jours). La durée des signes cliniques était significativement plus courte chez les patients traités par antiviraux versus placebo (53,7 heures pour le baloxavir marboxil ou 53,8 heures pour l'oseltamivir vs 80,2 heures) et la durée d'excrétion du virus était de 24 heures seulement dans les groupes baloxavir marboxil versus 72 heures pour le groupe oseltamivir et 96 heures pour le groupe placebo (184). Un second essai clinique de phase III, CAPSTONE-2 a été réalisé chez 1 163 patients risquant de faire une grippe grave et présentant une infection grippale A ou B depuis moins de 48 heures. Les résultats obtenus dans cette population à risques sont similaires à ceux obtenus dans l'essai CAPSTONE-1. D'autres essais de phase III sont en cours pour évaluer le baloxavir chez les enfants de moins de 12 ans (NTC03629184) et chez des patients hospitalisés faisant une grippe compliquée (NTC03684044) (177,180).

Le baloxavir marboxil est très bien toléré avec des effets secondaires principalement digestifs (nausée, diarrhée...) chez 4 à 5% des patients. De même, aucun effet indésirable majeur n'a été rapporté lors des essais d'association baloxavir marboxil et oseltamivir (185,186). En revanche, un des inconvénients majeurs de cette molécule est la rapide apparition de mutations de résistances au sein de la sous-unité PA. Dès les premiers tests *in vitro* des variants ont été isolés avec une substitution sur l'acide aminé I38 (I38T/M/ ou phénylalanine F) de PA entraînant une diminution de sensibilité au baloxavir de 10 à 100 fois (181). En clinique, bien que très rares, ces substitutions peuvent être retrouvées en l'absence de traitement antiviral (187). Lors des essais cliniques, les

substitutions I38T/M dans PA étaient retrouvées dans 2 à 24% des patients traités par baloxavir marboxil (176). De plus, la durée des signes cliniques était moins réduite chez les patients traités par baloxavir marboxil et présentant un virus muté (108,184)

L'arrivée prochaine de ce nouveau traitement en Europe, ainsi que le risque d'émergence de variants résistants nécessitent une surveillance accrue des virus influenzae. Au sein du CNR des virus des infections respiratoires (France Sud), nous avons commencé un travail de surveillance des substitutions dans la PA liées à une résistance vis-à-vis de ce nouveau traitement et nous avons pour objectif de mettre au point une technique d'analyse de la sensibilité phénotypique pour pouvoir suivre les patients traités dès la mise sur le marché de cette molécule.

#### 4.4.2. Le pimodivir

Le pimodivir (JNJ63623872 ou JNJ-872 ou VX-787), découvert par la firme Vertex en 2014, est un composé qui inhibe la sous-unité PB2 des virus influenzae A en se liant au site de liaison de la coiffe, empêchant la liaison du ligand naturel 7-méthyl GTP et la synthèse d'ARNm viral (188,189). Cette molécule a un effet antiviral puissant sur les virus influenzae A *in vitro* mais est inactif contre les virus influenzae B en raison des différences structurales entre les PB2 de ces deux virus (188). Les études *in vitro* ont montré une bonne efficacité pour inhiber les virus influenzae A (CE<sub>50</sub> moyenne de 0,2 à 22,9 nM) même sur des virus résistants aux adamantanes et aux INA (H274Y) ou sur des sous-types de virus influenzae A issus du réservoir aviaire. De plus, comme pour le baloxavir, l'association du pimodivir et d'un INA (oseltamivir, zanamivir) ou du favipiravir a montré un effet synergique permettant de protéger des souris d'une infection létale (177,188).

Chez l'homme, un essai thérapeutique de phase IIb (Essai Topaz) a été mené chez des adultes présentant une grippe non compliquée (évoluant depuis moins de 48 heures), répartis dans quatre bras de traitement avec une prise deux fois par jour pendant cinq jours : placebo, pimodivir 300 mg, pimodivir 600 mg et pimodivir 600 mg plus oseltamivir 75 mg. La diminution de la charge virale nasale était plus rapide dans les bras comprenant du pimodivir 600mg ou l'association pimodivir 600mg plus oseltamivir 75mg. En revanche, la durée des symptômes n'était pas significativement diminuée (190). Un autre essai de phase IIb chez des patients à risques de complications comparant oseltamivir versus pimodivir 600 mg plus oseltamivir a montré des résultats similaires avec en plus une légère diminution du risque de complications chez les patients traités avec la bithérapie (176). Ces deux études ont permis la mise en place de deux essais de phase III (saison 2017-2018) : le premier (NTC03376321) évalue le pimodivir chez des patients de 13 à 85 ans et hospitalisés ; le second (NTC03381196) évalue le pimodivir chez des patients de 13 à 85 ans à risques de développer des complications (176,177,183).

Le pimodivir est bien toléré avec des effets secondaires principalement digestifs (nausée, diarrhée...) dépendant de la dose. D'autres effets rares ont été relevés comme une élévation des transaminases (élimination à 99% par voie hépatique) ou une diminution du nombre de neutrophiles

circulants (183,190,191). Comme pour tout traitement anti-infectieux, des mutations de résistances dans PB2 ont été identifiées *in vitro* et *in vivo*. La substitution M431I dans PB2 serait responsable d'une baisse de la sensibilité d'environ 60 fois et a été retrouvée chez 10% des patients traités en monothérapie avec du pimodivir (191). D'autres substitutions dans PB2 (S324K/N/R, F325L, S337P, K376N/R, T378S et N510K) ont été relevées chez les patients traités mais aucun test de sensibilité au pimodivir n'a été réalisé (176,177,190).

#### 4.4.3. Le favipiravir

Le favipiravir ou T-705 (6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide) est un analogue de nucléoside inhibiteur à large spectre de virus à ARN dont les virus influenzae A, B, C (192). Après être entré dans la cellule, ce composé est monophosphaté par une phosphoribosyl transférase puis est converti par des kinases cellulaires en forme triphosphate capable d'inhiber l'ARN polymérase ARN dépendante des virus influenzae. La forme triphosphate du favipiravir inhibe de façon compétitive l'incorporation d'ATP et de GTP dans les transcrits d'ARN ainsi que lors de la réplication des ARN viraux (193–195). De façon similaire à la ribavirine, le favipiravir va également avoir un effet mutagène montré *in vitro* (196).

Le favipiravir (AVIGAN®, Toyama Chemicals) a été approuvé au Japon en 2014 pour traiter les infections dues aux virus influenzae émergents contre lesquels les INA seraient inefficaces. Les études *in vitro* et chez la souris ont montré une bonne efficacité pour inhiber tous les virus influenzae ( $CE_{50}$  moyenne de 0,03 à 3,53  $\mu\text{g/mL}$ ) y compris les souches résistantes aux adamantanes et aux INA (H274Y) ainsi que les souches aviaires A(H5N1) ou A(H7N9) (197–199). De plus, comme pour les autres traitements agissant sur le complexe polymérase, l'association avec un INA a montré un effet synergique permettant d'obtenir, à 96 heures, 100% de survie chez des souris après infection par la souche A(H5N1) IAHP (197,200).

Chez l'Homme, de nombreux essais cliniques ont été réalisés pour tester différents schémas d'administration. En raison de sa pharmacocinétique complexe, l'administration du favipiravir nécessite deux doses d'attaques de 1 800 mg le premier jour puis la prise de 800 mg deux fois par jour sur les quatre jours suivants (177). Deux essais cliniques de phase III ont été menés chez des patients adultes sains présentant des infections grippales non compliquées. Le premier essai a regroupé 594 patients et a mis en évidence une diminution de la durée des symptômes de 15 heures alors que le deuxième essai regroupant 668 patients n'a retrouvé qu'une diminution de six heures dans le groupe traité par rapport au groupe placebo. En revanche, les deux essais montrent que chez les patients traités l'excrétion de virus infectieux (isolement par culture cellulaire) est raccourcie d'un jour (177,183).

D'autres études de phase trois contre placebo sont actuellement en cours en Europe et aux États-Unis, pour évaluer cette molécule dans différentes infections virales. Le favipiravir a notamment été utilisé lors de l'épidémie Ébola d'Afrique de l'ouest en 2015 (201) ce qui a permis de récolter des

observations sur sa tolérance. Dans ce contexte, le favipiravir est bien toléré malgré des effets secondaires digestifs (nausée, diarrhée...), une possible élévation de l'uricémie et/ou des transaminases et une diminution du nombre de neutrophiles circulants (177,202). En revanche, le favipiravir est contre-indiqué chez la femme enceinte ou allaitante car un effet tératogène a été mis en évidence lors des études précliniques (177). De plus, le favipiravir peut être retrouvé dans le sperme et dans le lait maternel imposant une grande prudence en période pré-conceptionnelle et lors de l'allaitement. Enfin, ce traitement antiviral engendre très peu de résistance dans les populations virales même après traitement (195,203). Récemment, un virus A(H1N1)pdm09 a été généré *in vitro* avec une sensibilité diminuée de 30 fois au favipiravir. Cette résistance est médiée par des substitutions à la fois au sein de la sous-unité PB1 (K229R) et PA (P653L) du complexe polymérase (204). Chez les patients, plusieurs substitutions dans les sous-unités PB1, PB2 et PA ont été retrouvées après traitement par le favipiravir mais à ce jour aucun lien n'a été démontré avec un phénotype résistant (177,205).

#### **4.4.4. Autres inhibiteurs de la synthèse d'ARN viral**

D'autres molécules ayant une action sur le complexe polymérase ont été testées ou sont en développement pour le traitement des infections par les virus influenzae

La ribavirine (Virazole®) est une molécule antivirale à large spectre qui est active contre de nombreux virus à ADN et à ARN. C'est un analogue de la guanosine qui va dans sa forme monophosphatée inhiber l'IMPDH (inosine 5'-monophosphate dehydrogenase) et diminuer les taux de GTP disponibles (206). Sous forme triphosphatée, elle va s'incorporer dans l'ARN viral transcrit, et ainsi bloquer l'élongation de l'ARN et entraîner un effet mutagène (207). Dans les études *in vitro* datant des années 1970, la ribavirine s'était avérée très efficace contre tous types de virus influenzae (CE<sub>50</sub> de 2,5 à 22,5 µM) (208,209). En revanche, chez l'Homme, les études cliniques ont conclu que la ribavirine administrée par voie orale n'était pas efficace contre la grippe en raison des doses utilisées trop faibles (210–212). D'autres voies d'administration ont été testées mais les nombreux effets secondaires ont limité l'utilisation de la ribavirine dans le traitement de la grippe. Finalement, cette molécule a un effet additif ou synergique avec les INA dans des modèles animaux (213) et plusieurs tests d'association sont en cours chez l'Homme (Voir paragraphe 4.6., ci-dessous).

Le RO-7 est un inhibiteur de l'activité endonucléase de PA découvert en 2016 (178,214). Ce dernier a montré une bonne activité *in vitro* (CE<sub>50</sub> de 1,1 à 21,6 nM) sur une large sélection de virus influenzae circulant chez l'Homme ou présents dans le réservoir aviaire. L'utilisation du RO-7 a protégé des souris d'une infection létale par les virus influenzae tout en diminuant significativement la charge virale dans leurs poumons (214,215). Comme le RO-7 est structuralement très proche du baloxavir marboxil, les substitutions de l'acide aminé I38 de la PA entraînent une diminution de la sensibilité des virus influenzae à cette molécule (CE<sub>50</sub> pouvant aller jusqu'à 538 nM) (176).

Le CC-42344 est une des molécules les plus récentes qui agit en inhibant l'activité de PB2. Cette molécule a été créée à partir des structures cristallographiques de plusieurs PB2 issues de différents sous-types de virus influenzae. Les données précliniques ne sont pas encore publiées mais cette molécule présenterait une bonne activité (CE<sub>50</sub> de 0,1 à 9 nM) et pourrait être administrée par voie orale, en IV ou en inhalation. Des substitutions dans PB2 (F363L) ont déjà été mis en évidence pour entraîner une diminution de la sensibilité *in vitro*. Chez l'Homme, une étude de Phase I est prévue pour 2019 (176).

## **4.5. Autres antiviraux**

Les inhibiteurs du complexe polymérase sont les molécules les plus avancées dans leurs développements et les plus répandues dans le monde faisant de cette classe thérapeutique une future référence dans le traitement des infections grippales. Mais de nombreux autres antiviraux possédant des mécanismes d'action originaux sont en cours d'évaluation pour essayer de compléter l'arsenal thérapeutique vis-à-vis de ces infections.

### **4.5.1. DAS181 ou fludase**

Le DAS181 (ou fludase) est une sialidase ciblant les acides sialiques des cellules humaines et empêchant le virus de se fixer à son récepteur cellulaire Cette molécule est une protéine de fusion recombinante composée d'un domaine catalytique sialidasique (dérivé d'*Actinomyces viscosus*) fusionné avec une séquence d'ancrage à la surface cellulaire. Le DAS181 n'est pas toxique pour les cellules et s'est avéré efficace contre des isolats cliniques et des souches de laboratoire *in vitro* (216). Des essais menés chez la souris ont confirmé l'efficacité de cette sialidase contre des virus A(H5N1) (217) et contre des virus A(H7N9) sensibles ou résistants à l'oseltamivir (218). Lors des essais de phase IIb chez l'homme, l'administration de DAS181 a permis une diminution significative de la charge virale par rapport au groupe recevant un placebo mais il n'a pas été mis en évidence de différence entre les groupes en terme d'amélioration des signes cliniques (219). Cette molécule est généralement bien tolérée mais peut entraîner des perturbations du bilan hépatique (219). De plus, des anticorps anti-DAS181 apparaissent chez les patients traités et ne permettent pas de traitement à long terme ou répété par cette molécule (220).

### **4.5.2. Nitazoxanide**

Le nitazoxanide de la classe des thiazolides est un antiviral à large spectre, administré par voie orale dont le métabolite actif est le tizoxanide. Le nitazoxanide a été développé initialement comme antiprotozoaire et est utilisé dans le traitement des infections à *Giardia* ou *Cryptosporidium spp* mais il est également actif contre des bactéries et des virus à ARN ou ADN (221). Le tizoxanide a un effet antiviral contre les virus influenzae en interférant dans la maturation et l'assemblage de l'hémagglutinine. Il empêche le passage de l'hémagglutinine du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, bloque la glycosylation terminale de l'hémagglutinine et empêche la sortie de

virions matures de la cellule hôte (222). Les essais de phase II et III menés chez des patients adultes ayant une grippe non compliquée ont montré que la durée des signes cliniques est significativement diminuée (>20 heures) chez les patients traités par nitazoxanide par rapport aux patients du groupe placebo. La durée de l'excrétion virale est également diminuée, en revanche il n'a pas été montré d'amélioration par rapport à une monothérapie par oseltamivir (183,221,223). Plus largement un essai de phase II a été réalisé chez 260 patients hospitalisés avec une infection respiratoire aiguë d'origine virale mais sans distinction du pathogène responsable. Aucune réduction de la durée d'hospitalisation n'a été observée chez les patients traités par nitazoxanide par rapport au placebo (176). À ce jour, aucun virus influenza avec une sensibilité diminuée au nitazoxanide n'a pu être isolé (108).

#### **4.5.3. Arbidol ou umifenovir**

L'arbidol ou umifenovir est un antiviral à large spectre, administré par voie orale, qui n'est disponible qu'en Russie et en Chine pour la prophylaxie et le traitement des infections grippales A et B. Le mécanisme d'action antivirale de l'arbidol contre les virus influenzae a été récemment élucidé en étudiant la structure du cristal de l'hémagglutinine du virus A(H3N2) de 1968 et celle du virus A(H7N9) de 2013 couplées à cette molécule. L'arbidol se lie au niveau des trimères de l'hémagglutinine dans une poche hydrophobe située à l'interface entre deux protomères et agit comme une sorte de colle qui stabilise l'hémagglutinine dans un état de pré-fusion et empêche les réarrangements conformationnels à faible pH au niveau de l'endosome (224).

Concernant l'efficacité de cette molécule, les études disponibles montrent une diminution du risque de pneumonie dans les modèles murins mais également chez les patients traités. L'arbidol semble être actif sur les virus influenzae A et B comprenant les virus A(H5N1) et les virus porteurs de la substitution de résistance H274Y. Cette molécule doit être administrée quatre fois (200 mg) par jour pendant cinq jours ce qui peut nuire à la compliance et donc à son efficacité (176,183).

#### **4.5.4. Anticorps monoclonaux**

Des anticorps monoclonaux ciblant différentes protéines virales sont en cours de développement dans le traitement des gripes sévères.

On retrouve des anticorps monoclonaux ciblant des régions hautement conservées au niveau de la tige de l'hémagglutinine. Certains de ces anticorps se lient préférentiellement aux hémagglutinines du groupe 1 ou du groupe 2, d'autres peuvent se lier aux hémagglutinines des deux groupes comme par exemple les anticorps monoclonaux MHAA4549A (225) ou MEDI8852 (226) ou VIS410 (227). Ces anticorps vont agir via une action antivirale directe en se fixant sur l'hémagglutinine et en inhibant les étapes de fusion précoces mais vont également favoriser la cytotoxicité et la phagocytose. Les essais cliniques de phase I et II semblent prometteurs en terme de sécurité (176,228,229). Les essais de phase II évaluant l'utilisation du VIS410 (4g ou 2g) ou du MHAA4549A

(3,6 g ou 8,4 g) par rapport à un placebo n'ont pas permis de montrer une réduction dans la durée des symptômes chez les patients infectés par des virus influenzae A. Mais ces anticorps sont actuellement en cours d'évaluation en combinaison avec d'autres antiviraux tels que les INA ou le baloxavir marboxil (176).

Un autre anticorps monoclonal ciblant un épitope conservé dans la région N-terminale de M2 des virus influenzae A est également en cours de développement (228,229). Quel que soit l'anticorps monoclonal, il ne paraît pas envisageable de pratiquer une immunisation passive généralisée mais ces anticorps à large spectre pourraient permettre de traiter des infections sévères causées par des virus influenzae zoonotiques ou des infections prolongées chez des patients immunodéprimés.

#### **4.5.5. Inhibiteurs de la neuraminidase : nouvelles approches**

De nouveaux INA basés sur la structure du substrat 2,3-difluoro-sialic-acid ont été décrits. Ces molécules nécessitent l'activité catalytique de la neuraminidase pour se fixer mais, contrairement aux autres INA, ce ne sont pas des inhibiteurs compétitifs et leur efficacité dépend d'une lente rotation de l'inhibiteur lié de façon covalente. Ils sont actifs contre des virus influenzae résistants à l'oseltamivir et/ou au zanamivir et ont un effet antiviral *in vitro* en cellules MDCK. Dans le modèle souris, l'effet antiviral est similaire à celui du zanamivir (230).

#### **4.6. Autres stratégies de traitement**

Nous avons vu précédemment que de nombreux antiviraux aux mécanismes d'action variés sont en cours d'études. La majorité sont encore à des stades très précoces de leur développement et pour la plupart des phénomènes de résistances ont déjà été décrits au moins *in vitro*. Mais l'arrivée de ces nouvelles classes thérapeutiques permet aussi d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques en permettant l'association de plusieurs molécules dans des bi ou tri thérapies. De plus, l'essor des nouvelles technologies telle que la transcriptomique a ouvert la voie au repositionnement, pour le traitement de la grippe, de molécules déjà présentes sur le marché dans d'autres indications.

Le repositionnement thérapeutique de molécules déjà commercialisées permet la mise au point d'essais cliniques très rapide car toutes les étapes préalables à une mise sur le marché ont déjà été réalisées. Cette démarche a permis de découvrir des molécules avec un effet antiviral direct en agissant sur le virus comme le nitazoxanide qui est un antiparasitaire (Voir paragraphe 4.5.2., ci-dessus) ou la clarithromycine qui est un antibiotique de la classe des macrolides. Ce dernier aurait un effet antiviral contre la grippe en diminuant l'expression des acides sialiques à la surface des cellules épithéliales (231) et en inhibant la production des protéines virales (232). Nous pouvons également évoquer le naproxène qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) inhibant les cyclooxygénases de type I et II et qui s'avère capable de se lier à la nucléoprotéine (NP) virale au

niveau de son site de liaison à l'ARN conduisant à l'inhibition de l'interaction ARN-NP et donc à une activité antivirale (233).

Une autre approche actuellement explorée dans notre laboratoire consiste à essayer de bloquer des cibles cellulaires indispensables au virus de la grippe afin de bloquer son cycle viral (234). En se basant sur les comparaisons de signatures transcriptomiques de cellules non infectées et infectées par différents virus influenzae A, plusieurs molécules caractérisées dans la base de données Connectivity Map ont été identifiées comme pouvant inverser la signature transcriptomique pour revenir à l'état de base non infecté (235). Dans un premier temps, des travaux menés *in vitro* ont permis d'identifier la midodrine comme un potentiel candidat. Un PHRC a été accepté pour mener un essai clinique (FLUMED) au cours des hivers 2012, 2013 et 2014 chez des adultes faisant une infection grippale A non compliquée. Au total 35 patients (13 infections à A[H1N1] et 22 à A[H3N2]) ont reçu de la midodrine (75 mg/j pendant cinq jours) et 40 patients (16 infections à A[H1N1] et 24 à A[H3N2]) étaient non traités. La décroissance moyenne de la charge virale dans les lavages de nez n'était pas significativement différente entre les deux groupes. Un avenant d'un autre essai clinique mené au laboratoire (essai COMBINA) a permis de comparer les signatures transcriptomiques chez des patients au cours d'une infection par un virus influenza et à distance de cette infection. De nouvelles molécules de la base Connectivity Map, capables d'inverser cette signature transcriptomique, ont alors pu être identifiées et après une première étude de leur effet antiviral *in vitro*, en modèle souris et en modèle d'épithélium humain reconstitué, le diltiazem a été identifié comme étant la molécule ayant les meilleurs effets antigrippaux (236). Un PHRC est en cours depuis l'hiver 2017 pour évaluer son effet antiviral associé à l'oseltamivir comparé à l'oseltamivir en monothérapie chez des patients hospitalisés en soins intensifs pour une infection grippale sévère (PHRC FLUNEXT, NCT03212716 ; investigateur principal Dr Rosa-Calatrava).

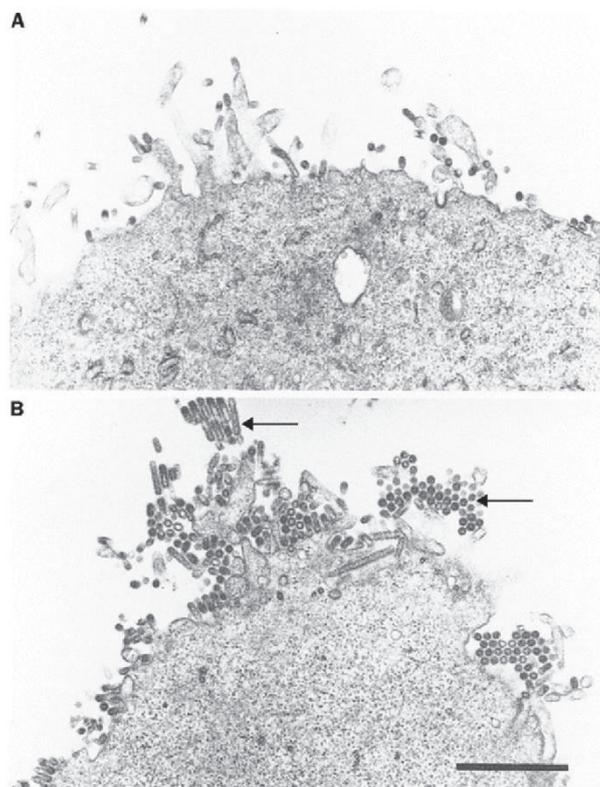
Outre le repositionnement thérapeutique, l'association de plusieurs molécules antivirales possédant des mécanismes d'actions et/ou des profils de résistances différents pourraient limiter l'apparition de virus résistants et agir de façon synergique comme cela a été démontrée dans d'autres maladies virales. Pour la grippe, un essai clinique de phase IIb/III alliant le repositionnement thérapeutique et l'association de plusieurs molécules a été mené en 2015 chez 217 adultes hospitalisés infectés par le virus A(H3N2). Ce travail a comparé un groupe traité pendant cinq jours par oseltamivir seul (75 mg deux fois par jour) versus un groupe traité pendant deux jours par la trithérapie clarithromycine 500 mg, naproxen 200 mg et oseltamivir 75 mg deux fois par jour, suivi par trois jours de traitement par oseltamivir seul (75 mg deux fois par jour). Les patients ayant reçu la trithérapie présentaient une mortalité à 30 ou 90 jours abaissée par rapport aux patients traités par oseltamivir seul (237). Cette étude utilisant des molécules déjà disponibles montre des résultats encourageants qui méritent d'être confirmés. D'autres associations sont envisagées mais les études sont en cours ou dans des étapes précliniques : oseltamivir plus ribavirine, favipiravir plus oseltamivir, ribavirine plus peramivir, baloxavir marboxil plus INA, antiviraux plus anticorps monoclonaux ou encore antiviraux plus immunomodulateurs (176,238,239).

Néanmoins, la vigilance s'impose concernant les associations d'antiviraux ; par exemple, l'association oseltamivir *per os* et zanamivir inhalé est à proscrire, ces deux molécules ayant des effets antagonistes en raison de leur cible d'action commune malgré leur voie d'administration différente (essais BIVIR et COMBINA) (240,241). De plus, certaines associations n'apportent rien au traitement ou peuvent avoir un impact non négligeable sur la résolution de la pathologie en raison de leur toxicité. Un essai clinique a permis d'évaluer l'association Amantadine, Ribavirine et Oseltamivir pour le traitement de l'adulte à risques de complications (NCT01227967). Cette association a montré un effet antiviral plus important que le traitement en monothérapie par oseltamivir ; en revanche la durée des symptômes était allongée en raison de la toxicité de la trithérapie (242). Cette même association n'a pas montré de réduction de la mortalité lors d'une comparaison avec l'oseltamivir en monothérapie au cours d'infections graves par le virus A(H1N1)pdm09 nécessitant une ventilation mécanique (243).

# Chapitre 5 : La balance fonctionnelle entre hémagglutinine et neuraminidase

## 5.1. Introduction

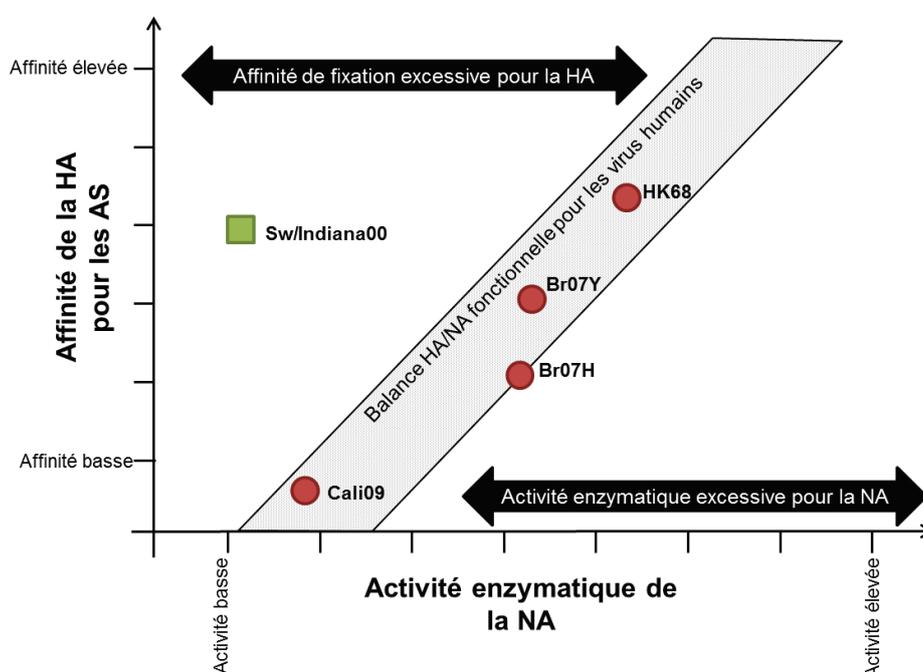
L'étude des deux glycoprotéines de surface des virus influenzae et de leurs interactions correspond à un axe de recherche majeur pour notre équipe. En effet, par leurs cibles communes et leurs différents rôles dans le cycle viral : l'hémagglutinine et la neuraminidase sont complémentaires et un équilibre entre leurs activités est indispensable à la bonne réplication virale (Voir Partie A, Chapitre 1). Si l'hémagglutinine fixe les acides sialiques avec une affinité trop importante ou si l'activité de la neuraminidase n'est pas suffisante comme en présence d'INA, les nouveaux virions ne seront pas relargués correctement (Figure 15) (244).



**Figure 15 :** *Microscopie électronique de cellules MDCK infectées par le virus influenza. A/ Image prise en l'absence d'INA. B/ Image prise en présence d'oseltamivir. Les flèches représentent des agrégats de particules virales. Figure adaptée de (84).*

Lors de l'étude de la balance entre les deux glycoprotéines, le principal obstacle est l'absence de technique standardisée ne permettant que très difficilement la comparaison des résultats entre les équipes. Les techniques évaluant la balance dans son ensemble sont très rarement utilisées. L'exemple le plus simple est la comparaison du titre hémagglutinant des virus à 37°C (neuraminidase active) et à 4°C (neuraminidase inactive) (245). Malheureusement dans la plupart des cas, les propriétés de l'hémagglutinine et de la neuraminidase sont étudiées séparément.

L'affinité de l'hémagglutinine représentée par l'inverse de la constante de dissociation ( $K_d$ ) pour chaque acide sialique peut être estimée par différentes techniques. Ces dernières années, l'étude de cette affinité passe généralement par une analyse en « *Glycan array* » permettant d'étudier les capacités de fixation de la protéine vis-à-vis de plusieurs centaines de sucres au cours de la même mesure. D'autres techniques plus faciles d'accès, comme l'ELISA, permettent également d'étudier l'affinité des hémagglutinines mais pour un nombre restreint de substrats. La fonctionnalité enzymatique de la neuraminidase est évaluée par des techniques de chimiluminescence ou de fluorescence qui vont permettre d'obtenir la constante de Michaëlis et Menten ( $K_m$ ) (inverse de l'affinité), la  $V_{max}$  et dans certains cas la constante catalytique ( $K_{cat}$ ) de la neuraminidase pour son substrat (103,246,247). L'étude fonctionnelle de ces deux glycoprotéines doit se faire de façon concomitante pour permettre l'utilisation de représentations graphiques exposant l'affinité de l'hémagglutinine en fonction de l'activité de la neuraminidase et permettant ainsi de faciliter la compréhension et la visualisation de cette balance (Figure 16).



**Figure 16 : Représentation schématique de la balance hémagglutinine - neuraminidase.** Cette figure représente l'affinité de l'hémagglutinine (HA) en fonction de l'activité de la neuraminidase (NA). La balance optimale pour les virus humains est représentée en gris. Cinq souches de virus influenzae A sont représentées comme exemple : en vert le virus porcin A/swine/India/P12439/2000 (H1N2 ; Sw/Indiana00) et en rouge les virus humains A/Brisbane/59/2007 sensible à l'oseltamivir (H1N1; Br07H), A/Brisbane/59/2007 résistant à l'oseltamivir (H1N1; Br07Y), A/California/04/2009 (H1N1; Cali09) et A/Hong Kong/68 (H3N2; HK68). La substitution H274Y dans la neuraminidase de la souche Br07Y a diminué son activité permettant l'obtention d'une balance fonctionnelle optimale. Figure adaptée de (248).

La balance hémagglutinine - neuraminidase n'est qu'un des nombreux paramètres pouvant moduler la variabilité des virus influenzae. Cette balance est tout de même un élément clef du franchissement de la barrière d'espèce, de l'adaptation et de l'évolution des virus influenzae au sein d'un nouvel

hôte mais également pour l'apparition et le maintien des substitutions de résistances aux INA. En effet, certaines substitutions d'acides aminés à proximité du site actif de la neuraminidase sont à l'origine des résistances aux INA et sont généralement associées à une chute de l'activité sialidasique entraînant un déséquilibre de la balance entre les deux glycoprotéines (249,250). Ce déséquilibre peut avoir des conséquences sur le fitness viral ce qui expliquerait l'apparition de souches résistantes majoritairement chez les patients immunodéprimés et/ou en présence d'une pression de sélection par le traitement antiviral (251,252). Comme vu précédemment, en 2007-2008, la souche résistante à l'oseltamivir du virus saisonnier A/Brisbane/59/2007 (H1N1) est apparue chez des patients sans traitement préalable (6,117) et s'est diffusée dans le monde entier avant d'être remplacée par le virus A(H1N1)pdm09 (80). L'étude de cette souche a mis en évidence des substitutions compensatrices dans la N1 et la H1 pouvant être à l'origine d'un rééquilibrage de la balance hémagglutinine - neuraminidase en faveur d'un virus avec un meilleur fitness que le virus saisonnier circulant les années précédentes (114–116). De plus, certains cas particuliers sont de très bons exemples de la flexibilité de la balance entre ces deux glycoprotéines et de son impact sur l'apparition des résistances. Plusieurs virus sans neuraminidase, nommés A(H3N-), ont été isolés chez des patients (145). Ces souches ne possédant pas le segment codant pour la neuraminidase sont donc résistantes à tous les INA (253) et avaient en contrepartie une hémagglutinine avec une très faible affinité. Bien que les modifications de l'hémagglutinine ne soient pas directement responsables de la résistance aux INA, elles favoriseraient la restauration d'une balance optimale permettant à une souche résistante de se diffuser dans la population humaine.

Afin d'actualiser les connaissances sur cette notion nous avons publié deux revues centrées sur la balance hémagglutinine – neuraminidase. La première traitant de la balance dans sa globalité a été publiée dans « *Clinical Microbiology and Infection* » et la deuxième se focalisant sur la balance spécifique des virus A(H1N1) a été publiée dans *Virologie* (254).

## 5.2. Revue publiée

**GAYMARD A, Le Briand NL, Frobert E, Lina B, Escuret V. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses.**

**Clinical Microbiology and Infection. 2016;22(12):975-83.**





## Review

## Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses

A. Gaymard<sup>1,2,3</sup>, N. Le Briand<sup>1,3</sup>, E. Frobert<sup>1,2</sup>, B. Lina<sup>1,2</sup>, V. Escurat<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup> Université Lyon, Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon Est, CIRI Inserm U1111, équipe Virpath, Lyon, France<sup>2</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence virus influenzae France Sud, Laboratoire de Virologie, Groupement Hospitalier Nord, Lyon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Available online 15 July 2016

Editor: T. Avšič-Zupanc

## Keywords:

Antiviral resistance

Haemagglutinin

Haemagglutinin/Neuraminidase balance

Host adaptation

Influenza viruses

Neuraminidase

## ABSTRACT

Seasonal influenza A and B viruses are important human pathogens responsible for significant morbidity and mortality worldwide. In addition, influenza A zoonotic viruses are a constant pandemic threat. These viruses present two major surface glycoproteins: the haemagglutinin (HA) and the neuraminidase (NA). These two glycoproteins both recognize the sialic acid and have complementary activities, the HA binds the sialic acid through its receptor-binding site, the NA is a receptor-destroying enzyme that cleaves  $\alpha$ 2-3 and  $\alpha$ 2-6-linked sialic acids. Therefore, the functional HA/NA balance is a critical factor for a good viral fitness and plays a major role in overcoming the host barrier and the efficiency of sustained human-to-human transmission. Although the two glycoproteins are in constant evolution, the HA/NA balance seems to remain stable in human viruses because an optimal balance is required to maintain good viral fitness. Understanding the evolution of influenza viruses requires an in-depth exploration of the HA/NA balance. **A. Gaymard, CMI 2016;22:975**

© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Influenza viruses (IV) are important human pathogens. They cause seasonal epidemics, pandemics and sporadic zoonotic infections. Each year there is a seasonal influenza epidemic responsible for 2 to 5 million severe cases and 250 000 to 500 000 deaths worldwide [1]. These repetitive epidemics are mainly due to an antigenic drift that permits escape from pre-existing human immunity. Pandemics are due to another mechanism, the antigenic shift allowing human infection and efficient human-to-human transmission with influenza A viruses (IAV) from zoonotic origin against which the human population is immunologically naive. For instance, the emergence of the A(H1N1)pdm09 was due to a specific gene constellation with segments from avian origin and swine origin [2]. However, the minimum requirement for an IAV to cause a pandemic is the presence of a new zoonotic haemagglutinin (HA) (i.e. A(H3N2) virus in 1968). Regarding zoonotic infections, they are

mostly due to avian strains. In 1996, a highly pathogenic avian influenza (HPAI) A(H5N1) virus emerged in China, causing almost 1000 human cases in 12 years, with a mortality rate of about 55%. More recently, a low pathogenic avian influenza (LPAI) A(H7N9) virus caused outbreaks in eastern China with a high mortality rate (40%) in humans. From their emergence, these viruses have been monitored and analysed to assess their potential to become pandemic viruses [1,3].

The IV contains two major transmembrane glycoproteins: HA and neuraminidase (NA). The antigenic and genetic diversity of these two glycoproteins are used to determine the IAV subtype. In addition, these two glycoproteins recognize the same host cell molecule: the sialic acid (SA) (generic term for the N- or O-substituted derivatives of neuraminic acid) and have a complementary role in the replication cycle. The HA initiates the virus entry by binding to the SA and the NA facilitates the virion release from infected cells through its sialidase activity. Moreover, these two glycoproteins are also linked to infectivity, transmissibility, virulence, host specificity and resistance to antiviral treatment. So, the equilibrium between the HA binding affinity and the NA enzymatic activity, also called the HA/NA functional balance, has to be optimal for good viral fitness (i.e. an efficient replication and transmission).

\* Corresponding author. V. Escurat, Virologie et Pathologie Humaine, U1111 – Inserm, CIRI, UCBL1, Bâtiment B, 4<sup>ème</sup> étage, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France.

E-mail address: [vanessa.escurat@chu-lyon.fr](mailto:vanessa.escurat@chu-lyon.fr) (V. Escurat).

<sup>3</sup> These authors are the first co-authors.

This review aims to summarize the knowledge on the HA/NA balance. First, we will describe briefly the HA and the NA, then we will explore the HA/NA balance in the host adaptation, its role in IV evolution within the human population, and in the antiviral resistance.

## Haemagglutinin

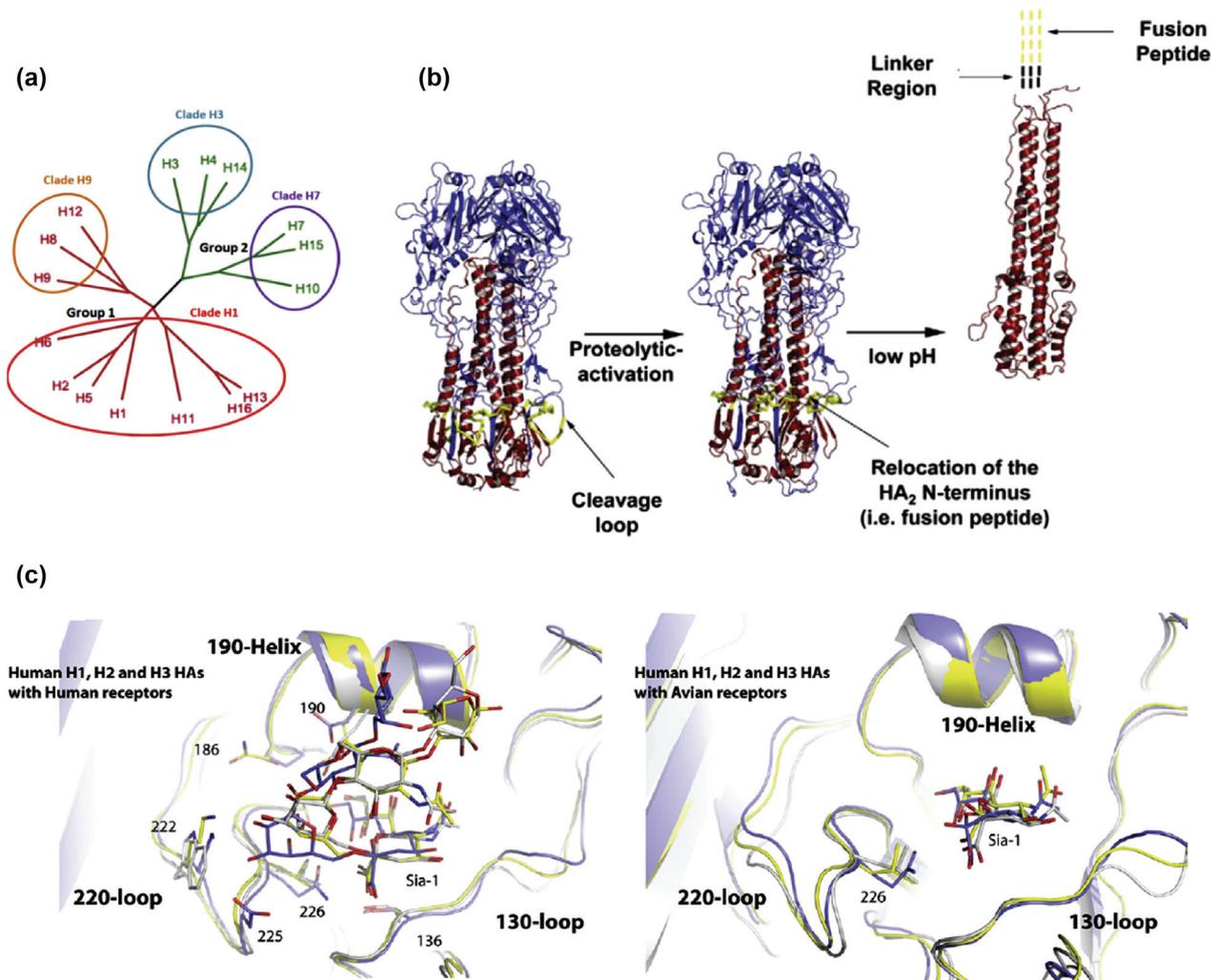
The HA is the major glycoprotein of IV and it represents 80% of the surface glycoproteins. The ratio HA/NA is approximately 300HA/40NA for the A(H3N2) [4]. Moreover, the quantity of the two glycoproteins is influenced by the genetic background and subtype of the virus [5]. HA plays two major roles during IV infection: it binds to the terminal SA of glycoproteins or glycolipids from the cell membrane, and it allows the fusion between viral and endosomal membranes [6].

The HA is a trimeric glycoprotein and each monomer has two polypeptide chains: HA1 and HA2. There are 16 classical subtypes

of HA, which are classified in two groups and four clades: group 1 contains the H1 clade (H1, H2, H5, H6, H11, H13, H16) and the H9 clade (H8, H9, H12) and group 2 includes the H3 clade (H3, H4, H14) and the H7 clade (H7, H10, H15) (Fig. 1a) [2]. Recently, two more HA were discovered exclusively in bats (H17 and H18) [7]. Sequence similarities for HA1 are 58% between H1 and H5, 46% to 48% between H1/H5 and H9, and 35% to 37% between group 2 and group 1 HA [8].

The three-dimensional structure of HA is divided into a globular domain, which is on top of an elongated stem region. The globular domain is composed of the HA1 and contains the Receptor Binding Site (RBS) and the antigenic sites. The stem region is the HA2 polypeptide and contains the fusion-peptide at its N-terminus [6].

The RBS binds to a terminal monosaccharide of the glycoproteins and glycolipids on the host cells: the SA. The HA has a higher affinity for the SA 'N-5-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)'. This Neu5Ac can be linked to the penultimate galactose of the glycoproteins and glycolipids in two different ways:  $\alpha$ 2,3 or  $\alpha$ 2,6 linkages



**Fig. 1.** Phylogenetic organization and structure of haemagglutinin (HA). (a) The phylogenetic tree contains 16 HAs classified into two groups and four clades. Group 1 depicted in red is divided into two clades: the clade H1 (circled in red) and the clade H9 (circled in orange). Group 2 HA depicted in green is also divided into two clades: clade H3 (circled in blue) and clade H7 (circled in purple) (adapted from [64]). (b) The trimeric HA molecule is shown as a ribbon representation, with the HA1 subunit coloured in blue, the HA2 subunit coloured in red, and residues corresponding to the fusion peptide coloured in yellow. The activation of the HA is associated with some conformational changes in the HA structure. A relocation of the fusion peptide occurs after a proteolytic activation within the cleavage loop, followed by an extrusion of the fusion peptide in an acidic environment, allowing the fusion between the virion and the endosomal membranes (adapted from [16]). (c) This figure shows overlaps of the receptor-binding domains of human HAs from different subtypes (H1, H2 and H3) in complex with the human receptor (left) and avian receptor (right). The HA and carbon atoms of the ligand are coloured in blue for H1, in yellow for H2 and in grey for H3 (adapted from [64]).

(Fig. 1c). The HA specificity for  $\alpha$ 2,3 or  $\alpha$ 2,6 SA depends on the HA origin. The HA of human-adapted IV preferentially recognizes receptors with a terminal  $\alpha$ 2,6 SA whereas avian IV preferentially recognizes receptors with a terminal  $\alpha$ 2,3 SA [9]. The HA receptor specificity and the presence of  $\alpha$ 2,6 and  $\alpha$ 2,3 SA at different anatomical sites of infection, are crucial determinants of host tropism, transmission and pathogenicity. The  $\alpha$ 2,6 SA are found on bronchial epithelial cells of the human upper respiratory tract and the  $\alpha$ 2,3 SA are found on epithelial cells of the birds' intestine and on the lower respiratory tract of humans [10]. This receptor specificity may explain in part the contrast in the severity of the seasonal IV and the avian influenza A(H5N1) or A(H7N9) viruses. However, other avian IV (A(H5N9) and A(H6N1)) can also infect the lower respiratory tract but do not induce viral pneumonia [11]. The predominance of the  $\alpha$ 2,6 SA in the upper respiratory tract of humans is likely to contribute to the limited avian to human transmission. It has also been suggested that mucus in the human airway is rich in soluble  $\alpha$ 2,3 SA, which can trap the avian viruses and inhibit replication and spread.

The HA specificity and affinity for each receptor is determined by amino acids located in the RBS that depend on the HA subtype [12,13]. For instance, the amino acids located at positions 190 and 225 (H3 numbering) are very important for receptor specificity of H1 subtype and amino acids at positions 226 and 228 (H3 numbering) are the most important for H2 and H3 [2]. Single amino acid substitutions at only a few positions adjacent to the RBS are responsible for antigenic drift in human IV [14].

The HA affinity alone does not guarantee a successful infection, replication and transmission, but it plays an important role in the functional HA/NA balance between the HA and NA.

The HA is synthesized as a precursor named HA0, which needs to be cleaved into the two polypeptide chains, HA1 and HA2. This cleavage generates the N-terminus of the fusion peptide allowing the fusion between virion surface and endosomal membrane. The HA0 cleavage is performed by several proteases secreted by non-ciliated cells in the human respiratory epithelium and in the bird gastrointestinal tract [6,15]. The cleavage efficiency depends on the proteases, the pH and the HA subtype. After this cleavage, the pH and temperature are also important for the HA conformational change, which allows fusion between the viral particle and the endosomal membrane (Fig. 1b). The optimal pH for the activation of the HA of A/Hong Kong/1968 is 5.6 at 37°C and it increases concomitantly with the temperature [16]. However, the HA binding is effective even at low temperature [6,16]. The HA fusion properties represent a host-range restriction factor and it was recently demonstrated that human H1 had a lower fusion pH (5.2–5.4) than Eurasian avian-like swine IAV (pH around 6.0) [17].

For HPAI viruses, there is a polybasic sequence in the cleavage site between HA1 and HA2 that can be recognized and cleaved by ubiquitous intracellular enzymes (serine proteases of the subtilisin family like furin) and it may be responsible for systemic infections and virulence of HPAI [18]. However, the presence of this polybasic sequence is not enough to explain the pathogenicity of IAV in humans [19]. For instance the influenza A(H7N9) virus that caused the last outbreak has no polybasic sequence. Furthermore, the insertion of this sequence in a seasonal A(H3N2) virus does not affect virulence *in vivo* [20].

Finally, glycosylation sites are also found in the globular domain and in the elongated stem region with two different roles. On the one hand, glycosylations in the globular domain near the RBS and antigenic sites can change the HA affinity for SA and modify the immune response. On the other hand, glycosylations in the stem region can be important for the maturation and cleavage of HA [21].

## Neuraminidase

Neuraminidase is the second glycoprotein of IV and represents 20% of the surface glycoproteins. On the virion surface, a single spike of NA or local clusters of NA can be observed surrounded by HA [4]. The NA is a glycoside hydrolase mediating hydrolysis of the link between the SA bound to HA, and the adjacent sugar. NA plays three major roles during IV infections: (i) it facilitates the access of viruses to the epithelial cells by degrading mucins rich in sialic acids of the respiratory tract, (ii) it desialylates the virion and/or the cell surface, optimizing the fusogenic potential of the HA, and (iii) it promotes the release of new virions and prevents their aggregation on the host cell surface [22]. Furthermore, although much less abundant than the HA at the viral surface, the NA has an antigenic role and plays a part in the antigenic drift. It has been shown that neutralizing antibodies against NA were located at conformational epitopes surrounding the NA active site. [23].

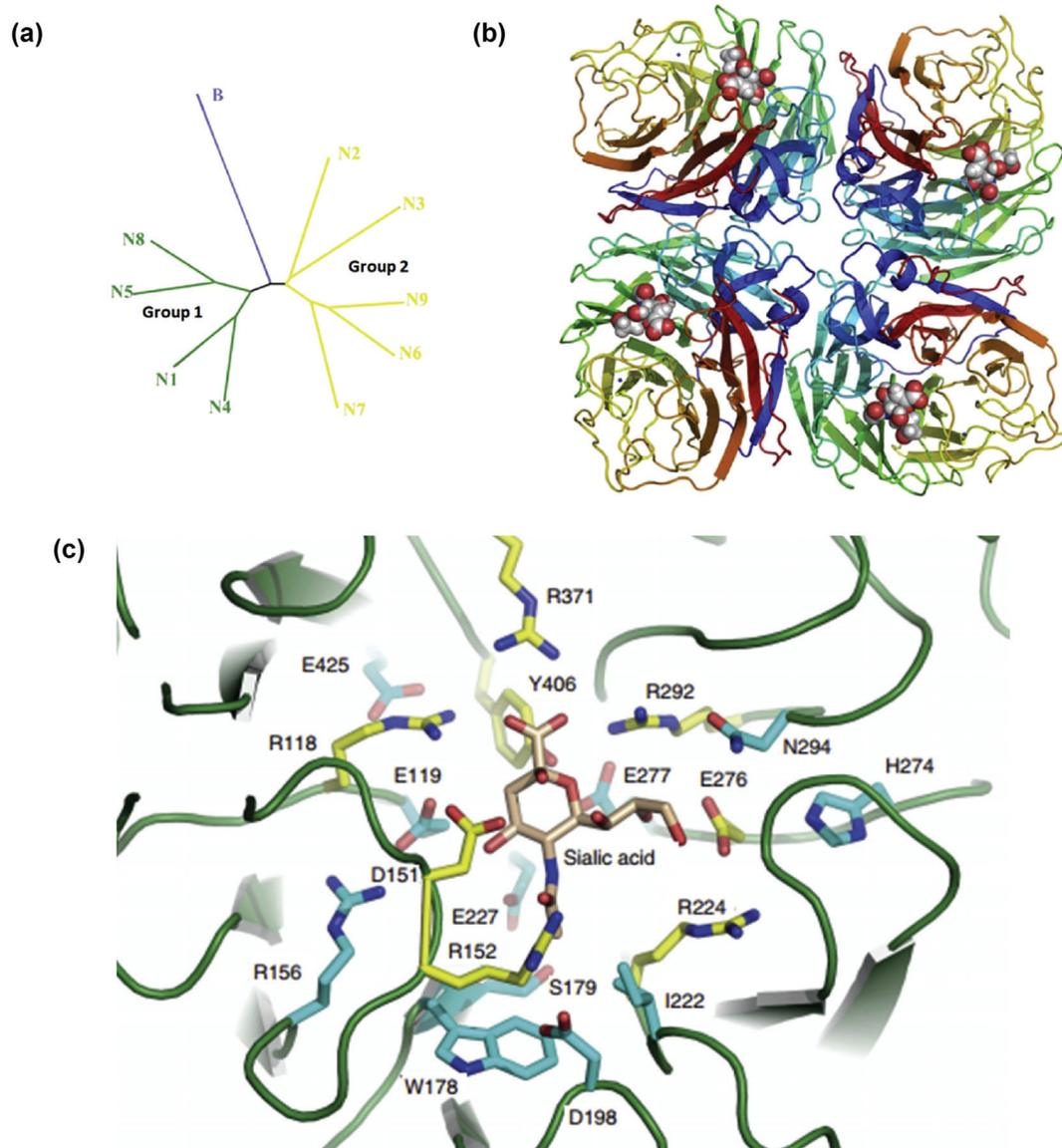
The nine classical subtypes of NA are classified into three groups: group 1 contains the N1, N4, N5, N8, group 2 contains the N2, N3, N6, N7, N9 and the third group contains NA of influenza B viruses (IBV; Fig. 2a). Recently, two more NA were discovered exclusively in bats (N10 and N11) [7]. Phylogenetic analysis showed similarities of sequence of 56% between N1 and N8; 43% to 48% between N1 or N8 compared with N2 or N9 and 27% to 33% between NA of IBV and IAV [8].

Neuraminidase is a tetramer of four identical polypeptide chains (Fig. 2b). Each monomer is mushroom-shaped and is composed of a rod anchored to the viral membrane, surmounted by a globular head domain that carries the enzyme active site [23]. This active site forms a shallow cavity at the surface of the globular head of each monomer; its amino acid sequence and its spatial conformation are highly conserved. Eleven conserved amino acids (named catalytic amino acids) make contact with a transition state analogue inhibitor (2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid) and six other conserved amino acids (named framework amino acids) form a 'second shell' that holds the active site residues in place (Fig. 2c) [24]. Moreover, some NAs (N9, N2 and N1) have a second SA binding site, bearing no resemblance to either the NA active site or the HA SA binding site but showing haemabsorbing activity. Comparisons of sequences of the second binding site suggested that avian viruses have a haemabsorbing activity whereas human viruses do not [25–27], but the function of the haemabsorbing activity in avian IAV has yet to be fully established.

The sialidase enzymatic activity of the NA can only be ensured when the NA is in tetrameric form. Moreover, this activity depends on environmental conditions. Optimum enzyme activity is obtained for a pH between 5.5 and 6.5 at a temperature of 37°C. NA possesses two calcium-ion binding sites and this cation is necessary for the NA activity and stability. A third Ca<sup>2+</sup>-ion binding site was discovered in the N1 of the 1918 strain and the 2009 pandemic strain of A(H1N1) IV (abbreviated 1918 A(H1N1) and A(H1N1) pdm09, respectively) but its impact on NA activity is unknown [23]. No Ca<sup>2+</sup> was reported at this third site in A(H5N1) IV, although the sequences in this region are highly conserved [8].

As for HA, the NA also recognizes the SA in  $\alpha$ 2,3 or  $\alpha$ 2,6 conformation but cleaves the  $\alpha$ 2,3 SA more efficiently than  $\alpha$ 2,6 SA. Studies on human IV showed an increase of specific NA activity against  $\alpha$ 2,6 SA with time, suggesting that the NA specificity followed the change of HA specificity from avian ( $\alpha$ 2,3 SA) to human ( $\alpha$ 2,6 SA) [28,29].

Neuraminidase possesses several potential glycosylation sites, where oligosaccharides are added on asparagine (Asn) residues. The number of glycosylation sites varies depending on NA and adaptation of a strain to its host. Glycosylation is important not only for the maturation of the NA, but also for adaptation to a new host.



**Fig. 2.** Phylogenetic organization and structure of neuraminidase (NA). (a) The phylogenetic tree contains ten NAs that are classified into three groups. The NA of influenza A viruses are classified in group 1 (N1, N4, N5, N8) coloured in green and group 2 (N2, N3, N6, N7, N9) coloured in yellow; the NA of influenza B viruses are coloured in blue (adapted from [64]). (c) This figure shows a ribbon representation of an NA tetramer viewed from the top of the molecule. For each monomer the six blades that make up the structure are separately coloured (adapted from [64]). (d) The active site of N2 NA in complex with sialic acid is represented. Residues involved in catalysis are shown as yellow sticks and framework residues in cyan sticks. The positions of some key binding residues are shown with nitrogens in blue and oxygens in red (adapted from ref. [60]).

The N1 of A(H1N1)pdm09 possess eight potential glycosylation sites and as for the HA, the number of glycosylations may increase when a strain adapts to a new host species.

As for the HA, the NA activity alone does not guarantee a successful infection, replication and transmission, but it needs a real stable balance between the HA and NA activities to obtain good viral fitness.

#### HA/NA balance

Haemagglutinin binds to SA on target cells to initiate the virus infection, whereas NA cleaves SA from the cell surface and extra-cellular environment to release new virions and promote virus spreading to other cells. If HA fixes SA with a too high affinity or if the NA has a very low activity, as is the case in the presence of inhibitors, the new virus would not be released properly [22]. Any

modification in the HA or NA activity can change the viral fitness. Reverse genetic studies showed that the introduction of an E190K (H1 numbering) substitution in the HA from an A(H1N1) strain, increased the affinity of the HA for its receptor and reduced the *in vitro* replication capacity and the *in vivo* virulence and transmission in mice model [30]. Other reverse genetics studies showed that the reduced replicative capacities of IV with an increased HA affinity could be restored by an increased NA activity [31]. Other teams have studied the association between wild-type HA and NA, and mutated ones (E190K HA and short-stalked NA) exhibiting respectively decreased affinity and activity. The best combination for viral growth was the association of the two wild-type proteins or the association of both mutated proteins suggesting that the HA/NA balance has a greater impact on viral growth than the HA affinity or the NA activity alone [32]. There are other examples showing that any alteration in HA or in NA may cause a

modification of the functional HA/NA balance and have an impact on viral growth kinetics or *in vitro* fitness. Some extreme cases have to be pointed out, like the A(H3N2) virus found with a non-functional HA but that was capable of replication. In this case, the IV receptor binding activity was entirely shifted from HA to NA [33,34]. On the other hand, four A(H3N-) influenza viruses were isolated *in vivo* from patients [35]. These virus isolates have an A(H3N2) genetic background without the NA gene and protein. They also have a very low HA affinity to compensate for the lack of NA [36]. The HA/NA balance is usually affected in three situations: i.e. (i) adaptation to a new SA expression pattern following inter-species transmission, (ii) antigenic drift, and (iii) presence of antivirals targeting the NA.

#### Methods to evaluate the HA/NA balance

There is no standard method to evaluate the HA/NA balance. The most frequent way is to study each glycoprotein (HA or NA) separately. The HA affinity against different substrates ( $\alpha 2,3$  or  $\alpha 2,6$  SA) can be estimated by glycan binding assay [37]. The affinity is represented by the inverse of the dissociation constant ( $K_d$ ): a high  $K_d$  corresponds to a low HA affinity. The NA activity can be assessed by different methods such as chemiluminescence, fluorescence and glycan array assay [37–39]. These techniques allow us to calculate the  $K_m$  (using the Michaelis–Menten equation), which represents the inverse of the NA affinity and the  $V_{max}$  or the catalytic constant ( $K_{cat}$ ), which corresponds to the NA enzymatic activity. A harmonization for the HA/NA balance evaluation is difficult to achieve because the results obtained with the different techniques are not comparable.

A figure that represents the HA binding affinity as a function of the NA enzymatic activity might permit a visualization of the HA/NA balance (Fig. 3). Casalegno *et al.* expressed  $K_d$  against a

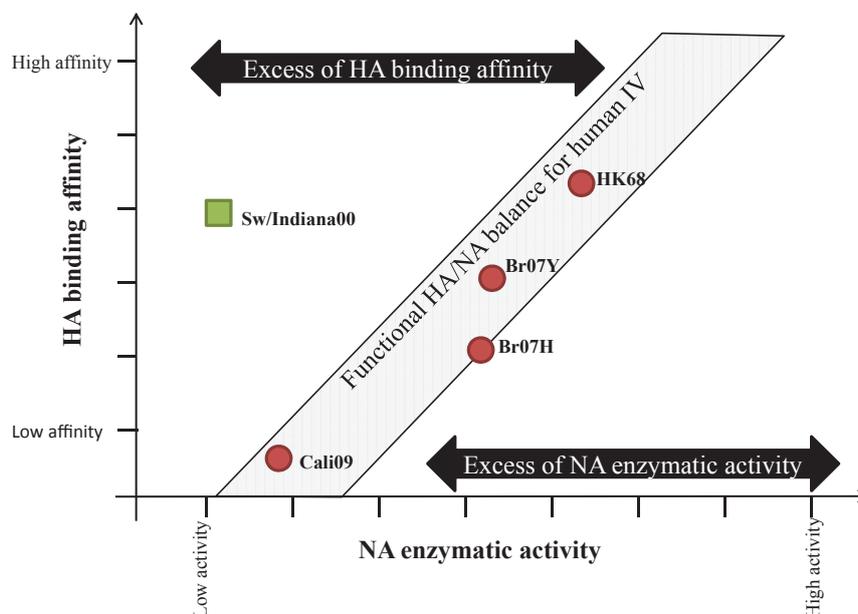
biotinylated sialylglycopolymer for different HA according to the NA activity [40]. Xu *et al.* used two different representations with the HA binding activity ( $K_d$ ) according to the NA enzymatic activity expressed either by  $K_{cat}$  or by the ratio between  $K_{cat}$  and  $K_m$  [41].

The experiments evaluating the activity or the affinity of the two glycoproteins can be performed either on purified proteins or on whole viruses, allowing us to distinguish the theoretical HA/NA balance from the functional HA/NA balance, respectively. Indeed, the HA/NA balance depends on the one hand on each glycoprotein characteristics and on the other hand on glycoprotein quantity and arrangement on the virus surface.

To directly measure the balance, various teams used the loss of HA titre at 37°C compared with erythrocyte agglutination conducted at 4°C. At 4°C, the NA is inactive and the HA can bind to its receptors and agglutinate the erythrocytes. At 37°C, the NA becomes active: hence, the loss of HA titre evaluates the equilibrium between HA affinity and NA activity. The use of erythrocytes from different species allows the study of the HA/NA balance against different types of receptors [40,42]. More recently, Benton *et al.* used a biophysical approach based on bio-layer interferometry to measure the HA/NA balance in real time. This technique measures virus binding and release from a surface coated with specific receptor ( $\alpha 2,3$  or  $\alpha 2,6$  SA) in both the presence and absence of NA inhibitors [43]. A standard protocol needs to be determined for more reproducible and comparable results.

#### HA/NA balance and host adaptation

Few studies characterize the role of HA/NA balance in the host adaptation. Matrosovich *et al.* first described the balance between HA affinity and NA activity as a critical factor in host adaptation. They revealed that additional glycosylation of the HA and a shortened NA stalk are characteristic features of the H5 and H7 chicken



**Fig. 3.** Schematic representation of the functional haemagglutinin/neuraminidase (HA/NA) balance. This figure represents the HA binding affinity as a function of the NA enzymatic activity. The HA binding affinity may be expressed by the dissociation constant ( $K_d$ ) and the NA enzymatic activity may be expressed by the catalytic constant ( $K_{cat}$ ) or by the ratio between the  $K_{cat}$  and the Michaelis–Menten constant ( $K_{cat}/K_m$ ). The optimal HA/NA balance in human is represented by the grey zone in which the strength of the HA binding affinity is correlated with the NA enzymatic activity. To illustrate this functional HA/NA balance between the HA and the NA, five strains of influenza A viruses (IAV) are represented. The green square represents a swine strain of IAV: A/swine/Indiana/P12439/00 (H1N2; sw/Indiana00). The four red circles represent four human strains of IAV: A/Brisbane/59/2007 H275 oseltamivir susceptible (H1N1; Br07H), A/Brisbane/59/2007 Y275 oseltamivir resistant (H1N1; Br07Y), A/California/04/2009 (H1N1; Cali09) and A/Hong Kong/68 (H3N2; HK68). The NA-H275Y substitution in Br07Y strain decreased the NA activity permitting an HA/NA balance optimal for human infection. In 2008–2009 the Br07Y strain became worldwide spread. The use of such a graphic representation of the HA/NA balance allows more comparable and readable results for this balance. Adapted from [40,41].

IAV [44]. A short-stalked NA is inefficient in releasing and dis-aggregating progeny virus because the active site cannot access its substrate efficiently [32]. The presence of carbohydrate at the HA head decreased the affinity of the virus for cell receptors [44]. This finding indicates that changes in both HA and NA may be required for the adaptation of IV to a new host.

Since 1957, the A(H3N2) specific NA activity against  $\alpha$ 2,6 SA has increased over time to match its HA specificity. However, NA activity of the contemporary human IV still has an  $\alpha$ 2,3 SA specificity [29]. The presence of  $\alpha$ 2,3 SA in human upper respiratory tract mucus could be an important factor in viral transmissibility and could be a barrier for interspecies transmission. So the HA/NA balance very likely needs to be adapted for fixing the host specific receptor and to overcome the mucus barrier [42].

More recently, the HA/NA balance was shown to be important for A(H1N1)pdm09 host adaptation. The comparison between the HA/NA balance of the A(H1N1)pdm09 IV and the related swine viruses have shown significant differences. The swine HA had a higher affinity for a large group of glycans (microarray assay) than the pandemic H1, but a similar NA activity. The HA/NA balance observed for A(H1N1)pdm09 was identical to the balance of the last century pandemic IAV and this balance may be specific to humans [41]. Another study compared respiratory-droplet transmissibility in ferrets between swine IAV and A(H1N1)pdm09 IV. Only the A(H1N1)pdm09 and one swine IV isolated in China over a 13-year period, the A/swine/Hong Kong/915/04 (sw915), showed respiratory transmission in ferrets. The sw915, like the A(H1N1)pdm09, contains six segments deriving from the North American 'triple reassortant' swine IAV and the M gene from the Eurasian swine IAV, hence these two viruses differed only by the NA gene. The introduction of the N1 from A(H1N1)pdm09 into the sw915 increased its respiratory transmissibility. The introduction of the same NA gene in another swine IAV did not confer respiratory transmission [45]. Hence, a unique gene constellation and HA/NA balance are suggested to play both a critical role in acquisition of efficient and sustained human-to-human transmissibility.

#### *Adaptation and evolution of the HA/NA balance in human A(H1N1) IV*

Few data about the impact of HA/NA balance on virus evolution are available. The available data concern mostly the A(H1N1) IV, (especially the 1918 A(H1N1), the A(H1N1)pdm09 and the seasonal A(H1N1) IV) due to either their large circulation during the last century or their important mortality rate.

Spanish flu caused about 50–100 million deaths worldwide in two consecutive winters. The HA of the 1918 A(H1N1) IV had the E190D (H1 numbering) substitution, that conferred a double affinity for  $\alpha$ 2,3 and  $\alpha$ 2,6 SA and is likely to have participated in crossing the species barrier from avian reservoir to humans. The G222D (H1 numbering) substitution allowed to restrict the HA specificity to  $\alpha$ 2,6 SA [46].

The A(H1N1)pdm09 virus, responsible for the twentieth century first pandemic, emerged in Mexico and had unique features of reassortment between IAV. The HA gene was related to the classical swine A(H1N1) (1930) and the NA gene was related to Eurasian avian-like swine A(H1N1) (1979). [2]. The acquisition of four key substitutions in the HA could have also contributed to the emergence of this pandemic IAV in humans. The A200T, A219I, R133K and A227E (H1 numbering) substitutions decreased the affinity of HA for  $\alpha$ 2,6 SA and brought the HA/NA balance to the equilibrium probably necessary for its emergence [41]. The comparison of the HA and NA properties between A(H1N1)pdm09 and the parental swine viruses that did not emerge in humans, showed that the NA activity differed between these strains but that the HA affinity of

the swine strains for  $\alpha$ 2,6 SA was higher than that of the A(H1N1)pdm09 IV. The optimal HA/NA balance observed for the A(H1N1)pdm09 IV was not found in parent strains from swine. This shows that an appropriate HA/NA balance was necessary for the emergence of an IAV in humans [41].

The HA affinity of the 1918 A(H1N1) IV for a substrate mimicking  $\alpha$ 2,6 SA, was higher than that of the A(H1N1)pdm09 IV, and the NA activity of the 1918 A(H1N1) IV against the MUNANA substrate was also greater than that of the A(H1N1)pdm09 IV. The lower HA affinity for its receptor, complemented by a reduction in the NA activity, led to a balance that presumably permitted the emergence of the A(H1N1)pdm09 IV in humans [41]. Contrary to seasonal IV that had an HA able to recognize only the  $\alpha$ 2,6 SA, the A(H1N1)pdm09 IV had an HA capable of recognizing both  $\alpha$ 2,6 and  $\alpha$ 2,3 SA with functional properties closer to that of conventional swine viruses than seasonal human viruses [47].

Among the seasonal viruses circulating before 2007, resistance to oseltamivir detected on NA was not frequent (<1% of A(H1N1) IV). During the 2008–2009 seasons, the prevalence of A(H1N1) IV resistant to oseltamivir bearing the H275Y substitution (N1 numbering) was >90%. These oseltamivir-resistant viruses emerged during the 2007–2008 season and were isolated in patients who did not receive oseltamivir treatment [48]. The N1 of 2007–2008 seasonal IV with the N1-H275Y substitution had a higher affinity for the MUNANA substrate, and a higher activity compared with the previous oseltamivir-sensitive reference vaccine strains from 1999–2006. These oseltamivir-resistant IV corresponded to the emergence of a new HA variant (A/Brisbane/59/2007) and had a better fitness, probably due to a better HA/NA balance, than viruses bearing a wild-type NA [49]. These strains had spread during the 2008–2009 season and have been replaced in 2009 by the A(H1N1)pdm09 IV for which <1% of the strains are resistant to oseltamivir. The emergence of these A(H1N1) IV bearing an H275Y mutation in NA illustrates the impact of influenza virus evolution on HA/NA balance and fitness of human-adapted IV. We will precisely describe those viruses in the next section.

By the end of 2009, the A(H1N1)pdm09 had evolved into two clusters I and II, based on the differences of nine nucleotides located on genes encoding the HA, NA, PB2, NP and M1 [50]. Viruses of cluster II have spread more than those of cluster I. One virus of cluster II, A/New York/06/2009 (NY06, June 2009) compared with A/California/04/2009 (Cali09, April 2009), acquired four substitutions in the HA (P83S, T200A, S203T and I321V, H1 numbering) and two substitutions in NA (V106I and N248D, N1 numbering) inducing an increase of the HA affinity for  $\alpha$ 2,6 SA and an increased NA activity towards glycans (microarray assay), leading to a new equilibrium of the HA/NA balance. These substitutions facilitated the transmission in humans [41]. A polymorphism of the residue D222G/N/E (H1 numbering), located in the RBS of the HA and involved in binding to the SA, has been observed since 2009. The D222G substitution increased the HA affinity for  $\alpha$ 2,3 SA, but decreased the HA affinity for the  $\alpha$ 2,6 SA and could be the cause of viral pneumonia observed in patients. D222N/E substitutions increased the HA affinity for both types of SA. By altering the HA affinity for the SA, the D/G/E substitutions modified the HA/NA balance of these viruses and therefore their replicative capacity. This could be the cause of inefficient transmission and sporadic observation of these strains [40]. These data demonstrate the importance of HA/NA balance on viral fitness during virus adaptation and evolution in humans.

Since its emergence in 2009, a co-evolution of mutations at positions 106, 200 and 248 (N1 numbering) had been clearly identified in the NA of the different A(H1N1)pdm09 strains (unpublished data). At the beginning of the pandemic, viruses presented the 106V-200N-248N combination. Shortly after the

emergence of the A(H1N1)pdm09, two intermediate strains carrying either the V106I or the N248D substitutions in NA appeared. Ultimately, both substitutions at positions 106 and 248 were present on all IAV strains by the end of 2009, and circulated until the 2012 season. During this season, the 106I reverted to 106V (I106V) and was systematically accompanied by a substitution at position 200 (N200S), leading to circulating viruses harbouring NA with 106V-200S-248D combination (unpublished data). The introduction by reverse genetics of these substitutions in the A/Lyon/969/09 genetic background increased NA activity and did not significantly change the NA affinity for the SA (unpublished data). To date, most of the A(H1N1)pdm09 strains remain antigenically similar to the A/California/07/2009 reference strain. However, amino acid substitutions in HA were important for antigenic change in other subtypes. Hence, some studies tried to identify amino acid substitutions supporting antigenic change and whether they impact on receptor binding specificity. Variants bearing HA-N156G or HA-N156S were the only ones to reduce binding to  $\alpha$ 2,6-linked SA [14,51].

#### HA/NA balance and antiviral resistance

Since 2010, NA-inhibitors (NAIs) are the only class of antivirals recommended by the WHO for the treatment and prophylaxis of influenza A and B infections [52,53]. Two NAIs are currently licensed worldwide for therapeutic and prophylactic uses: oseltamivir (F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) and zanamivir (GlaxoSmithKline, Brentford, UK). Two new NAIs, laninamivir (Daichi Sankyo Company Ltd, Tokyo, Japan) and peramivir (BioCryst, Durham, NC, USA), are currently in clinical evaluation in different countries but have already been approved in Japan (laninamivir and peramivir), Korea (peramivir) and the USA (peramivir). Laninamivir is used in Japan in non-severe influenza infections, peramivir is the only intravenous NAI and can be used in severe IV infections. NAIs bind to the NA active site with a higher affinity than the natural SA and prevent the release of new virions from infected cells.

The HA/NA balance has a direct impact on exploration of NAI resistance that cannot be tested by phenotypic testing but by enzymatic testing only. Indeed, replication of human IV in Madin–Darby canine kidney cells is independent of viral NA although the use of modified Madin–Darby canine kidney cells overexpressing  $\alpha$ 2,6 SA had improved the dependency of viral replication on NA and increased IV sensitivity to NAIs [54].

Neuraminidase substitutions have been described to cause NAIs resistance. They are mostly subtype dependent, like H275Y (N1 numbering) found in A(H1N1) and A(H5N1) IV or R292K and E119V (N2 numbering) found in A(H3N2) and A(H7N9) IV. The characteristics of these NA substitutions were largely determined but the impact on the functional balance between HA and NA has not been studied well. Substitutions leading to the NAIs resistance induced a decrease of the NA activity that changed the HA/NA balance and often induced a critical decrease of viral fitness [55,56]. This modification may explain why most cases of resistant IV to NAIs emerged in patients undergoing treatment, especially children and immunocompromised patients [57,58]. However, in 2007–2008, seasonal A(H1N1) viruses bearing an H275Y substituted N1 emerged in patients who were not under oseltamivir treatment [49,59]. This variant had very good fitness and became dominant worldwide just before the A(H1N1)pdm09 appeared [60]. Some teams explored why this virus spread worldwide even with the H275Y substitution, which is known to impact the NA activity and affinity. Several substitutions have been identified (V234M, R222Q, K329E, D344N, H275Y and D354G, N1 numbering) in the NA that could counteract the effects of the H275Y substitution. These additional substitutions allowed the NA-H275Y to maintain its

activity [48]. Substitutions in the HA (T86K, K144E and R192K, H1 numbering) could have mediated neutralizing antibody escape and decreased receptor binding affinity, which may have contributed to increase the viral fitness [61–63]. Modifications in both HA and NA proteins were therefore needed to restore the HA/NA balance and to obtain the A(H1N1) oseltamivir-resistant strain that spread worldwide.

Ferraris *et al.* isolated viruses with an A(H3N2) genetic background and a very low HA affinity but lacking both NA gene and protein [35,36]. Without the NA protein these viruses were resistant to all NAIs. Another example of the compensatory role between HA and NA may be observed in IAV cultures with NA inhibitors, which can select mutants capable of replicating. The study of these mutants has shown only changes in the HA. These changes always decreased the HA affinity for SA and allowed the virus release without the need of NA activity.

In summary, HA substitutions did not induce direct NAI resistance, however modifications in the HA are very important to adapt or restore the functional balance with a substituted NA. The HA/NA balance is one of the key factors for spreading an NAI-resistant strain in the human population.

#### Conclusion

The HA/NA balance is very flexible and its status has greater impact on viral replication than HA affinity or NA activity alone. The respective features of HA (binding) and NA (cleavage) together with the optimal functional HA/NA balance are crucial parameters to allow cross barrier species infection and to sustain an efficient human-to-human transmission for zoonotic IAV. Moreover, HA and NA evolve constantly by successive amino acid substitutions and if these modifications alter the previous HA/NA equilibrium, it may induce combined changes in the two glycoproteins.

The HA/NA balance is difficult to measure and hence is not well studied or even explored. This would require a harmonization of the techniques used to determine the HA binding affinity, the NA enzymatic activity and the representation of this balance. Some teams have already worked to describe the functional HA/NA balance on whole IV from patients, using reverse genetics approaches. The first data showed that the description of this balance must integrate a large set of characteristics, much beyond the simple combined analysis of the HA affinity and NA catalytic activity to SA. There is a need for an understanding of the physical interactions between these proteins on the surfaces of the IV, including their density, their physical distribution, and the possible long-range interactions. Hence, studies on HA/NA balance remain necessary to address questions about IV evolution, pathogenesis and cross-species transmission.

#### Transparency declaration

BL is a member of the scientific board of the GEIG; of Immuniser Lyon, and a member of the ESWI Board of Directors. AG, NLB, EF and VE do not have any conflicts of interest to declare.

#### Funding

There was no specific financial support for this study.

#### Acknowledgements

We thank Steven J. Gamblin, John J. Skehel and David A. Steinhauer for their help on haemagglutinin and neuraminidase figures. We thank Hamish Croford and Mark Andrew Johnston for their advice on English.

## References

- [1] World Health Organization. WHO | Monthly Risk Assessment Summary. WHO; 2015. [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/HAIRisk\\_Assessment/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAIRisk_Assessment/en/) [accessed 18.12.15].
- [2] Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:590–603.
- [3] CIDRAP. Avian Flu Scan. CIDRAP n.d. [http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective?key=&page=1&f\[0\]=field\\_related\\_topics%3A49](http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective?key=&page=1&f[0]=field_related_topics%3A49) [accessed 17.08.15].
- [4] Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, et al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:19123–7.
- [5] Moules V, Terrier O, Yver M, Riteau B, Moriscot C, Ferraris O, et al. Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology* 2011;414:51–62.
- [6] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza haemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 2000;69:531–69.
- [7] Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003657.
- [8] Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006;443:45–9.
- [9] Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, et al. Glycan microarray analysis of the haemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol* 2006;355:1143–55.
- [10] Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006;440:435–6.
- [11] Van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 2007;171:1215–23.
- [12] Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and receptor specificity of the haemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 2006;312:404–10.
- [13] Tumpey TM, Maines TR, Hoeven NV, Glaser L, Solórzano A, Pappas C, et al. A two-amino acid change in the haemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 2007;315:655–9.
- [14] Koel BF, Burke DF, Bestebroer TM, van der Vliet S, Zondag GCM, Bervaet G, et al. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science* 2013;342:976–9.
- [15] Rott R, Klenk H-D, Nagai Y, Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S16–9.
- [16] Galloway SE, Reed ML, Russell CJ, Steinhauer DA. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS Pathog* 2013;9.
- [17] Baumann J, Kouassi NM, Foni E, Klenk H-D, Matrosovich M. H1N1 Swine influenza viruses differ from avian precursors by a higher pH optimum of membrane fusion. *J Virol* 2016;90:1569–77.
- [18] Suguitan AL, Matsuoka Y, Lau Y-F, Santos CP, Vogel L, Cheng LI, et al. The multibasic cleavage site of the haemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. *J Virol* 2012;86:2706–14.
- [19] Schrauwen EJA, Herfst S, Leijten LM, van Run P, Bestebroer TM, Linster M, et al. The multibasic cleavage site in h5n1 virus is critical for systemic spread along the olfactory and hematogenous routes in ferrets. *J Virol* 2012;86:3975–84.
- [20] Schrauwen EJA, Bestebroer TM, Munster VJ, de Wit E, Herfst S, Rimmelzwaan GF, et al. Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. *J Gen Virol* 2011;92:1410–5.
- [21] Klenk H-D, Wagner R, Heuer D, Wolff T. Importance of haemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res* 2002;82:73–5.
- [22] Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 2002;12:159–66.
- [23] Air GM. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* 2012;6:245–56.
- [24] Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J* 1992;11:49–56.
- [25] Hausmann J, Kretzschmar E, Garten W, Klenk HD. N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has haemadsorbing activity. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 7):1719–28.
- [26] Uhlenhorff J, Matrosovich T, Klenk H-D, Matrosovich M. Functional significance of the haemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. *Arch Virol* 2009;154:945–57.
- [27] Varghese JN, Colman PM, van Donkelaar A, Blick TJ, Sahasrabudhe A, McKimm-Breschkin JL. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11808–12.
- [28] Baum LG, Paulson JC. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the haemagglutinin receptor specificity. *Virology* 1991;180:10–5.
- [29] Kobasa D, Kodihalli S, Luo M, Castrucci MR, Donatelli I, Suzuki Y, et al. Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J Virol* 1999;73:6743–51.
- [30] Gen F, Yamada S, Kato K, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T. Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its haemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. *Arch Virol* 2013;158:1003–11.
- [31] Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk H-D. Interdependence of haemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* 2000;74:6316–23.
- [32] Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 2001;79:177–85.
- [33] Hooper KA, Bloom JD. A mutant influenza virus that uses an N1 neuraminidase as the receptor-binding protein. *J Virol* 2013;87:12531–40.
- [34] Lin YP, Gregory V, Collins P, Kloess J, Wharton S, Cattle N, et al. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol* 2010;84:6769–81.
- [35] Ferraris O, Kessler N, Valette M, Lina B. Evolution of the susceptibility to antiviral drugs of A/H3N2 influenza viruses isolated in France from 2002 to 2005. *Vaccine* 2006;24:6656–9.
- [36] Richard M, Erny A, Caré B, Traversier A, Barthélémy M, Hay A, et al. Rescue of a h3n2 influenza virus containing a deficient neuraminidase protein by a haemagglutinin with a low receptor-binding affinity. *PLoS One* 2012;7:e33880.
- [37] Stevens J, Blixt O, Paulson JC, Wilson IA. Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:857–64.
- [38] Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, et al. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol* 2003;41:742–50.
- [39] Cohen M, Fisher CJ, Huang ML, Lindsay LL, Plancarte M, Boyce WM, et al. Capture and characterization of influenza A virus from primary samples using glycan bead arrays. *Virology* 2016;493:128–35.
- [40] Casalegno J-S, Ferraris O, Escuret V, Bouscambert M, Bergeron C, Linès L, et al. Functional balance between the haemagglutinin and neuraminidase of influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 Variants. *PLoS One* 2014;9.
- [41] Xu R, Zhu X, McBride R, Nycholath CM, Yu W, Paulson JC, et al. Functional balance of the haemagglutinin and neuraminidase activities accompanies the emergence of the 2009 H1N1 influenza pandemic. *J Virol* 2012;86:9221–32.
- [42] Zanin M, Marathe B, Wong S-S, Yoon S-W, Collin E, Oshansky C, et al. Pandemic swine H1N1 influenza viruses with almost undetectable neuraminidase activity are not transmitted via aerosols in ferrets and are inhibited by human mucus but not swine mucus. *J Virol* 2015;89:5935–48.
- [43] Benton DJ, Martin SR, Wharton SA, McCauley JW. Biophysical measurement of the balance of influenza A haemagglutinin and neuraminidase activities. *J Biol Chem* 2015;290:6516–21.
- [44] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of h5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999;73:1146–55.
- [45] Yen H-L, Liang C-H, Wu C-Y, Forrest HL, Ferguson A, Choy K-T, et al. Haemagglutinin–neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14264–9.
- [46] Glaser L, Stevens J, Zamarin D, Wilson IA, García-Sastre A, Tumpey TM, et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus haemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol* 2005;79:11533–6.
- [47] Gerlach T, Kühling L, Uhlenhorff J, Laukemper V, Matrosovich T, Czudai-Matwicz V, et al. Characterization of the neuraminidase of the H1N1/09 pandemic influenza virus. *Vaccine* 2012;30:7348–52.
- [48] Duan S, Govorkova EA, Bahl J, Zaraket H, Baranovich T, Seiler P, et al. Epistatic interactions between neuraminidase mutations facilitated the emergence of the oseltamivir-resistant H1N1 influenza viruses. *Nat Commun* 2014;5:5029.
- [49] Rameix-Welti M-A, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000103.
- [50] Fereidouni SR, Beer M, Vahlenkamp T, Starick E. Differentiation of two distinct clusters among currently circulating influenza A(H1N1)v viruses, March–September 2009. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2009;14.
- [51] Koel BF, Mögling R, Chutinimitkul S, Fraaij PL, Burke DF, van der Vliet S, et al. Identification of amino acid substitutions supporting antigenic change of influenza A(H1N1)pdm09 viruses. *J Virol* 2015;89:3763–75.
- [52] Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. Influenza drug resistance. *Semin Respir Crit Care Med* 2011;32:409–22. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1283281>.
- [53] World Health Organization. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic influenza A(H1N1) 2009 and other influenza viruses. Geneva: WHO; 2010.

- [54] Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts NA, Klenk H-D. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol* 2003;77:8418–25.
- [55] Wong DDDY, Choy K-T, Chan RWY, Sia SF, Chiu H-P, Cheung PPH, et al. Comparable fitness and transmissibility between oseltamivir-resistant pandemic 2009 and seasonal H1N1 influenza viruses with the H275Y neuraminidase mutation. *J Virol* 2012;86:10558–70.
- [56] Yang J-R, Huang Y-P, Chang F-Y, Hsu L-C, Huang H-Y, Pan Y-T, et al. Characterization of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Taiwan in 2009–2011. *J Med Virol* 2013;85:379–87.
- [57] Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2008;41:13–9.
- [58] Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 2004;103:199–203.
- [59] Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A(H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerg Infect Dis* 2009;15:552–60.
- [60] Escuret V, Ferraris O, Lina B. The antiviral resistance of influenza virus. *Therapy* 2011;8:741–62.
- [61] Behera AK, Basu S, Cherian SS. Molecular mechanism of the enhanced viral fitness contributed by secondary mutations in the hemagglutinin protein of oseltamivir resistant H1N1 influenza viruses: modeling studies of antibody and receptor binding. *Gene* 2015;557:19–27.
- [62] Ginting TE, Shinya K, Kyan Y, Makino A, Matsumoto N, Kaneda S, et al. Amino acid changes in hemagglutinin contribute to the replication of oseltamivir-resistant H1N1 influenza viruses. *J Virol* 2012;86:121–7.
- [63] Wu WL, Lau S-Y, Chen Y, Wang G, Mok BW-Y, Wen X, et al. The 2008–2009 H1N1 influenza virus exhibits reduced susceptibility to antibody inhibition: Implications for the prevalence of oseltamivir resistant variant viruses. *Antiviral Res* 2012;93:144–53.
- [64] Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 2010;285:28403–9.



## **Partie B : Résultats liés à la surveillance des virus résistants aux inhibiteurs de la neuraminidase**

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises dans la Partie A, la surveillance des virus influenzae est indispensable à notre compréhension des mécanismes de circulation et d'émergence des différents sous-types viraux. Cette surveillance doit se faire chez l'Homme et dans le réservoir zoonotique afin de mieux connaître les souches de virus circulant dans les différentes espèces mais également pour pouvoir évaluer le risque d'émergence des souches virales à potentiels pandémiques ou portant déjà des substitutions de résistances aux différents traitements antiviraux.

La surveillance des virus influenzae chez l'animal est très complexe et doit se faire dans de nombreuses espèces animales aussi bien au sein d'élevages que dans la faune sauvage. Dans le réservoir aviaire, elle repose sur deux stratégies distinctes : i) la surveillance événementielle recherchant des virus sur des écouvillons trachéaux et cloacaux prélevés suite à une suspicion clinique d'infection ; ii) la surveillance active ou programmée consistant à la recherche d'infections par des techniques sérologiques dans les élevages et/ou par biologie moléculaire sur des écouvillons cloacaux issus de la faune sauvage (255). Au niveau international, cette surveillance repose principalement sur l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Au début des années 2000, devant la propagation mondiale des virus A(H5N1), la FAO et l'OIE se sont associées et ont renforcé leurs liens en créant le réseau OFFLU pour lutter d'abord contre les virus influenzae aviaires puis en 2009, en étendant son action à tous les virus influenzae animaux. Ce réseau a pour objectif de faciliter les échanges (données, matériel biologique...) entre les laboratoires du réseau, de proposer une expertise vétérinaire (prévention, diagnostic, surveillance et contrôle des virus influenzae) aux pays membres et de mettre en lumière les besoins de recherche sur les virus influenzae d'origine animale. Enfin, une des actions majeures de ce réseau est la collaboration avec l'OMS afin de participer au développement précoce de vaccins humains (256).

En France, la surveillance des virus influenzae aviaires dans les élevages repose sur la collaboration entre des vétérinaires sanitaires, des techniciens d'élevage et la direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations tandis que la surveillance de l'avifaune sauvage se fait grâce à des ornithologues et des agents de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS). Ces différents acteurs peuvent réaliser des prélèvements qui seront ensuite analysés au sein d'un réseau de laboratoires vétérinaires encadrés par le laboratoire national de référence (LNR) sur les virus influenzae aviaires de l'Anses (Laboratoire de Ploufragan - Plouzané) (257). Les infections par ces virus sont à déclaration obligatoire et les résultats de la surveillance sont transmis à l'OIE et à la FAO et sont rendus accessibles via la plateforme française d'épidémiosurveillance en santé animale (ESA) (66).

Chez l'Homme, les réseaux de surveillance de la grippe combinent surveillance communautaire, hospitalière, épidémiologique et virologique dans le but, chaque année, de détecter et caractériser les virus circulants, mesurer l'impact de la grippe sur les populations et étudier les variations antigéniques des virus responsables de l'épidémie afin d'actualiser la composition vaccinale. Au niveau mondial, le système global de surveillance et de réponse de l'OMS (*WHO Global Influenza*

*Surveillance and Response System* ou GISRS) établi en 1952 surveille via des laboratoires de références, la circulation des virus influenzae. En 2018, ce réseau comprenait 140 CNR dont trois en France (à l'Institut Pasteur de Paris, à l'IAI des HCL, et à l'Institut Pasteur de Guyane), six centres collaborateurs (Melbourne, Beijing, Tokyo, Londres, Atlanta et Memphis) ainsi que quatre laboratoires essentiels de régulation (Woden, Tokyo, Hertfordshire et Silver Spring) (258). De plus, des systèmes de surveillance en temps réel par internet ont été créés comme FluNet depuis 1996.

En France, la surveillance des virus influenzae a été mise en place au début des années 1980 avec la création du réseau des Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe ou GROG. Depuis 2014, la surveillance de la grippe communautaire est structurée autour du réseau Sentinelles, constitué de médecins généralistes et de pédiatres, qui permet le recueil de prélèvements respiratoires chez des patients présentant un syndrome grippal (fièvre supérieure à 39°C, d'apparition brutale avec douleurs musculaires et signes respiratoires). Les données virologiques obtenues sur ces prélèvements sont également associées à des données épidémiologiques de terrain (activité médicale, vente d'antipyrétiques...) ce qui permet d'estimer chaque semaine le nombre de cas de grippe, ainsi que la dynamique de l'épidémie grippale en France. En complément de la surveillance communautaire, la surveillance hospitalière est basée sur le Réseau National des Laboratoires Hospitaliers (RENAL) qui rapportent, chaque semaine, le nombre de tests qu'ils ont réalisés sur des prélèvements respiratoires, ainsi que le nombre d'infections confirmées. Ces données ne comportent pas d'information clinique mais complètent celles de la surveillance communautaire (259). Enfin, l'ensemble de ces informations sont centralisées par Santé Publique France qui les associe à des données complémentaires (nombre de passages aux urgences pour syndrome grippal via le réseau OSCOUR, nombre de cas de grippe grave hospitalisés en réanimation et nombre de cas de syndrome grippal vu par SOS Médecins) afin de préciser l'impact et la nature de la circulation des virus influenzae au cours de la saison hivernale (260). L'ensemble de ces informations est communiqué sous la forme de bulletin hebdomadaire et transmis au centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC) et à l'OMS dans le cadre de la surveillance internationale.

Au cœur de ce réseau, les CNR jouent un rôle majeur en collectant les prélèvements et en permettant le diagnostic et le suivi des épidémies liées aux infections respiratoires. Par exemple, pour la saison 2017-2018, les trois CNR français ont reçu et analysé 5 764 prélèvements respiratoires dont 3 907 positifs (67,8%) pour un virus influenza provenant principalement du réseau sentinelles (environ 50%) et de laboratoires hospitaliers (environ 40%) (261). Pour les échantillons provenant du réseau Sentinelles, une recherche systématique des autres virus respiratoires tel que le virus respiratoire syncytial (VRS), le metapneumovirus et les rhinovirus/enterovirus est réalisée permettant également le suivi de ces pathogènes (262). En plus du suivi épidémiologique, les CNR ont pour mission de surveiller et de dépister les virus potentiellement résistants aux antiviraux et notamment aux INA. Cette surveillance passe à la fois par l'étude des virus grippaux isolés dans la population générale ou de patients hospitalisés en fonction de leur situation géographique et des

caractéristiques antigéniques des souches mais également par la recherche systématique de la résistance chez les patients traités ayant une excrétion prolongée (supérieur à sept jours). Dans ce contexte, les résultats de la caractérisation approfondie du génome des virus influenzae suite à une excrétion chronique malgré un traitement par INA chez un patient atteint de déficit immunitaire combiné sévère sont présentés dans le Chapitre 1 de la partie B de ce document (ci-dessous). En routine, l'évaluation de la sensibilité aux antiviraux des souches circulantes se base soit sur leur caractérisation génétique par séquençage, soit sur la détection d'une mutation connue par RT-qPCR (H274Y pour N1), soit quand un isolat est disponible, par un test fluorimétrique permettant l'obtention de  $CI_{50}$  reflétant les variations phénotypiques de sensibilité d'un virus grippal aux INA (Tableau 2). Dans ce contexte, nous avons développé et évalué les performances de la PCR digitale (RT-ddPCR) en comparaison des performances des méthodes classiques de biologie moléculaire (RT-qPCR) et des techniques de séquençage haut débit pour la recherche de la substitution H274Y pour les N1. Les résultats de ces tests sont présentés dans le Chapitre 2 de la partie B de ce document (ci-dessous).

Neuraminidase (NA) (Années de circulation)	N (nombre de virus)	$CI_{50}$ oseltamivir Moyenne $\pm$ ET (nM)	$CI_{50}$ zanamivir Moyenne $\pm$ ET (nM)
N1 (2005-2006)	150	1,66 $\pm$ 0,70	1,17 $\pm$ 0,53
N1 H274 (2007-2008)	232	1,36 $\pm$ 0,70	1,54 $\pm$ 0,71
N1 Y274 (2007-2008)	158	606,56 $\pm$ 59,57	1,42 $\pm$ 0,08
N1 (Depuis 2009)	385	0,42 $\pm$ 0,07	0,57 $\pm$ 0,11
N2 (Depuis 2005-2006)	804	0,34 $\pm$ 0,07	0,85 $\pm$ 0,17
B (Depuis 2005-2006)	512	12,05 $\pm$ 3,52	5,06 $\pm$ 3,10

**Tableau 2 :** Valeurs moyennes des  $CI_{50}$  de l'oseltamivir et du zanamivir obtenues par test fluorimétrique sur les isolats de la surveillance globale (2005-2018). Les isolats détectés comme résistants aux antiviraux ou provenant de patients présentant des excrétions prolongées ou porteurs de mutations connues pour conférer une résistance à l'oseltamivir ou au zanamivir ont été exclus de ces moyennes qui correspondent aux valeurs des isolats sensibles (à l'exception des isolats de 2007-2008 noté N1 Y274) dans le cadre de la surveillance globale. ET : Écart Type.

# Chapitre 1 : Prise en charge et étude de la diversité virale au cours d'une infection par le virus A(H1N1)pdm09

## 1.1. Introduction

Dans ce travail, nous décrivons l'évolution d'une infection grave de plus de six mois par un virus A(H1N1)pdm09 chez un enfant atteint de DISC. Au cours de cette infection, le patient a reçu une greffe de sang de cordon pour traiter son déficit immunitaire et permettre une meilleure réponse immunitaire face à l'infection. Le suivi virologique a été effectué en temps réel par les techniques virologiques conventionnelles de culture et de biologie moléculaire (RT-qPCR avec estimation de la charge virale grâce au Ct [cycle threshold]) mais également par la recherche spécifique de la mutation responsable de la substitution de résistance H274Y via une technique maison de RT-qPCR. Le génome viral a été séquencé de façon rétrospective par deux techniques de séquençage à haut débit afin de caractériser au mieux la population virale dans ce contexte exceptionnel d'excrétion prolongée.

Au cours de son infection, le patient a d'abord été traité par oseltamivir (cinq jours) ce qui a induit l'apparition d'une faible proportion de virus porteurs de la substitution H274Y dans la N1. Par la suite, la greffe de sang de cordon a été rapidement suivie par un traitement comprenant zanamivir IV associé à des immunoglobulines IV, permettant une diminution de la charge virale. À l'arrêt de ces traitements, un rebond de la charge virale a été observé et c'est finalement grâce à la reconstitution immunitaire que le virus influenza est devenu indétectable. En plus de la substitution H274Y, le séquençage a permis de mettre en évidence la présence d'une faible proportion de variants de virus influenzae porteurs de la substitution E119A dans la N1. Un virus recombinant porteur de cette substitution a montré une diminution de sa sensibilité vis-à-vis de plusieurs INA et notamment au zanamivir et laninamivir (263).

La caractérisation approfondie des variants viraux chez les patients immunodéprimés présentant une excrétion prolongée permet de mieux appréhender la complexité de la diversité des virus influenzae. De plus ce suivi présentera un intérêt majeur pour faciliter la prise en charge et l'orientation thérapeutique lorsque les nouveaux antiviraux antigrippes seront disponibles.

## 1.2. Article publié

Pichon M., Picard C., Simon B., **GAYMARD A.**, Renard C., Massenavette B. Malcus C., Monneret G., Morfin-Sherpa F., Valette M., Javouhey E., Millat G., Lina B., Josset L., Escuret V. **Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency.**

**Antiviral Research.** 2018;160:1-9





## Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency



Maxime Pichon<sup>a,b,3</sup>, Caroline Picard<sup>a,b,1,2,3</sup>, Bruno Simon<sup>a</sup>, Alexandre Gaymard<sup>a,b</sup>,  
Cécile Renard<sup>c</sup>, Bruno Massenavette<sup>d</sup>, Christophe Malcus<sup>e</sup>, Guillaume Monneret<sup>e</sup>,  
Florence Morfin-Sherpa<sup>a,b</sup>, Martine Valette<sup>a,b</sup>, Etienne Javouhey<sup>d</sup>, Gilles Millat<sup>f</sup>, Bruno Lina<sup>a,b</sup>,  
Laurence Josset<sup>a,b</sup>, Vanessa Escuret<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des virus des infections respiratoires, Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex 04, France

<sup>b</sup> Univ Lyon, CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS, UCBL1, équipe Virpath, Faculté de Médecine Lyon Est, 7-11 Rue Guillaume Paradin, F-69372, Lyon Cedex 08, France

<sup>c</sup> Hospices Civils de Lyon, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Unité Protégée, 1 Place Joseph Renaut, F-69008, Lyon, France

<sup>d</sup> Hospices Civils de Lyon, Service de Réanimation Pédiatrique, Hôpital Femme Mère Enfant, Groupement Hospitalier Est, 59 Boulevard Pinel, F-69677, Bron, France

<sup>e</sup> Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'Immunologie, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, F-69437, Lyon Cedex 03, France

<sup>f</sup> Hospices Civils de Lyon, Plateforme de séquençage diagnostique, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est, F-69677, Bron, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Influenza A(H1N1)pdm09 virus  
Oseltamivir resistance  
Intravenous zanamivir  
Next-generation sequencing  
NA-H275Y substitution  
NA-E119A substitution

### ABSTRACT

**Introduction:** A child with severe combined immunodeficiency (SCID) had an influenza A(H1N1)pdm09 infection with viral excretion longer than 6 months, during 2013–2014 influenza season, despite cord blood transplantation and antiviral treatments.

**Methods:** Conventional real-time RT-PCR methods were used to estimate viral load and to detect the presence of the common N1 neuraminidase (NA) H275Y substitution responsible for oseltamivir resistance. Next-generation sequencing (NGS) of influenza viruses was performed retrospectively to characterize viral quasispecies in specimens.

**Results:** The patient was first treated with oral oseltamivir, leading to detection of low-levels of NA-H275Y substitution. Concomitant cord blood cell transplantation, intravenous administration of zanamivir and immunoglobulins led to an increase in white blood cells and influenza viral load decrease. A viral rebound occurred as soon as the antiviral treatment was discontinued. Eventually, influenza viral load was negated with immune reconstitution. NGS found influenza quasispecies harboring NA-E119A substitution (10.3%). Moreover, NGS showed that viral genomic diversity evolved under antiviral treatment and immune status.

**Conclusions:** Conventional virological techniques were sufficient for influenza infection follow-up but NGS performances allowed characterization of viral variants evolution in this specific case of prolonged influenza virus infection. New and efficient treatments against influenza in immunocompromised patients are needed.

### 1. Introduction

The duration of influenza viral shedding is usually about 6 days in immunocompetent patients but increase in function of the immunity impairment (Baz et al., 2006; Boivin et al., 2002; Memoli et al., 2014).

In immunocompromised patients, influenza virus infections are more severe, with an elevated risk of antiviral resistance after selection in treated patients (Memoli et al., 2014).

Neuraminidase (NA) inhibitors (NAI) are the only anti-influenza drugs recommended by WHO. In France, only oral oseltamivir and

\* Corresponding author. Laboratoire de Virologie – Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex 04, France.

E-mail address: [vanessa.escuret@chu-lyon.fr](mailto:vanessa.escuret@chu-lyon.fr) (V. Escuret).

<sup>1</sup> CIRI, Centre National de référence des fièvres hémorragiques virales, Unité de biologie des infections virales émergentes, Institut Pasteur, F-69007, Lyon, France.

<sup>2</sup> correspond to present address of author no longer at the institution where the work was performed.

<sup>3</sup> These authors contributed equally to the work.

intravenous (IV) zanamivir (upon special authorization) are available. In immunocompromised patients, IV zanamivir may be considered an option for the first line of treatment (Marty et al., 2017), but there is currently no consensus recommendation. However, oseltamivir and zanamivir combined is not recommended as it could lead to a competitive antagonism (Duval et al., 2010). Furthermore, a phase II clinical trial conducted in patients at risk of complications that investigated the combination oseltamivir, amantadine and ribavirin versus oseltamivir monotherapy did not find any clinical benefit of the combination treatment; the median duration of symptoms was 4.5 days in the combination arm and 4.0 days in the monotherapy arm (Beigel et al., 2017).

The 2007/2008 winter season was marked by the emergence of seasonal A (H1N1) influenza viruses bearing a NA-H275Y substitution responsible for oseltamivir resistance in untreated patients. However, since the 2009 pandemic, oseltamivir treatment in immunocompromised patients is the leading cause of oseltamivir resistance (Hurt et al., 2012; Okomo-Adhiambo et al., 2015; Takashita et al., 2013).

Currently, influenza virus genomic diversity study is focused on hemagglutinin antigenic evolution and matching with current vaccines. Next-generation sequencing (NGS) allows precise influenza genomic diversity assessment of individual specimens and a longitudinal evaluation over the course of infection and the immune status of a patient. However, NGS has been rarely used to characterize prolonged influenza A(H1N1)pdm09 or A(H3N2) infection in immunocompromised patients (Eshaghi et al., 2014; Ghedin et al., 2011, 2012; Trebbien et al., 2017), and only two papers report viral quasispecies investigation in severe combined immunodeficiency (SCID) patients, infected with respiratory syncytial virus (RSV) (Grad et al., 2014) or influenza A(H3N2) virus (Rogers et al., 2015).

In this paper, we describe severe influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in a SCID child with more than 6 months of viral excretion. Viral genomic diversity under immune and antiviral treatment selection was studied using conventional techniques and NGS.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics

This study was approved by the ethics committee of Hospices Civils de Lyon on July 18, 2017. To protect anonymity of the patient the precise dates of specimen collection was not given. Respiratory samples were collected for regular disease management during hospital stay and no additional samples were taken.

### 2.2. Virological diagnosis of influenza virus infection

A total of 12 nasopharyngeal aspirates (NPA) and 21 nasopharyngeal swabs (NS) were collected from March to August 2014. Subsequently, virus culture medium was added to obtain at least 1.5 mL final volume. All clinical samples were screened for the presence of influenza virus using the respiratory MWS Influenza A/B R-GENE® real time reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (rt RT-qPCR) assay (Argène bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) that can detect both influenza A and B viruses. RNA was extracted from 200 µL of sample using the automated NucliSENS® easyMAG® system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Elution was performed in 50 µL. Influenza A subtyping was performed using in-house RT-qPCR (CNR des virus des infections respiratoires, Institut Pasteur, Paris).

### 2.3. Cells and viral culture

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (obtained from ATCC; CCL34) were maintained in serum-free medium (EMEM; Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 1% L-Glutamine (200 nM;

Lonza), 2% of penicillin-streptomycin (10,000U penicillin/mL; 10,000U streptomycin/mL; Lonza). Cells were maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Respiratory samples were cultured on MDCK cells to isolate virus; two passages were performed prior to NA inhibition assays. Viral culture was performed at 34 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.4. NA activity and inhibition assays

Oseltamivir carboxylate was provided by Hoffmann-La Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and zanamivir by GlaxoSmithKline (GSK, Brentford, UK). The fluorometric inhibition assays were performed using a MFX fluorometer (Dynex technologies, Chantilly, VA, USA) as described previously, except MES buffer was at pH 6.4 (Ferraris et al., 2005). The NA inhibition assay was performed using a standardized amount of NA activity (10 nmol/h/mL). The NA activity was calculated as the quantity of 2'-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) degraded to 4-methylumbelliferone in 1 h per mL of viral suspensions (nmol/h/mL). The inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) is the drug concentration (nM) able to inhibit 50% of the NA activity and was calculated using SigmaPlot software v 8.0 (Systat software, San Jose, CA, USA).

### 2.5. RT-qPCR for quantification of the NA-H275Y substitution in clinical samples

RT-qPCR for NA-H275Y substitution quantification in N1 was performed on 28 specimens as previously described (Escuret et al., 2012). Briefly, probes were specific for 275Y (FAM-probe) or H275 (VIC-probe). The assay was performed on the ABI7500 thermocycler (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA) that was programmed as follows: 50 °C for 15 min (RT), 95 °C for 2 min (polymerase activation), then 45 cycles at 95 °C for 15 s (denaturation), and 60 °C for 40 s (annealing; elongation; reading of fluorescence). A Ct value higher than 45 was considered as negative for the rest of the study.

### 2.6. Influenza A(H1N1)pdm09 next-generation sequencing

Six NPA samples (collected on post-infection day 14, 99, 111, 115, 121, and 136) and two NS specimens (collected on post-infection day 40 and 72) were included in this study. Extraction was performed as for the diagnosis step. Nucleic acids were stored at –80 °C. Sequences corresponding to each influenza A genomic segment were obtained by a commercial multiplex RT-PCR using the PathAmp™ Flu A reagents kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), controlled on a 1% agarose gel. After purification using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Beverly, MA, USA). Quality and quantity of DNA was evaluated using a NanoDrop1000 spectrophotometer and Qubit 2.0 HS DNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Sequencing of these amplicons was performed using two different NGS methodologies. On the one hand, samples were sequenced using PGM technologies, as previously described (Pichon et al., 2017). Library was prepared manually using 100ng of DNA; using Ion Xpress™ plus Library Preparation kit (Life Technologies). After purification using Agencourt AMPure XP beads, quality and quantity of each library was verified using the 2100 Bioanalyzer (DNA High Sensitivity Chip, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). They were then diluted and pooled in equimolar amounts (26pM) before emulsification and sequencing. Emulsified libraries were finally loaded onto a Ion 318v2 chip (Life Technologies) then sequenced on an Ion-Torrent sequencer following the manufacturer's instructions (Ion PGM™ 200 Sequencing v2 protocol, Life Technologies).

On the other hand, amplicons were sequenced using an Illumina sequencing platform (Illumina, San Diego, CA, USA) to reinforce observed results on PGM platform. Briefly, after mechanical shearing on M220 Focused-ultrasonicator™, (Covaris Inc., Woburn, MA, USA), end-

repair, adenylation, and adapter ligation were performed using NextFlex™ Rapid DNA Sequencing Bundle (Bio Scientific, Austin, TX, USA). Size selection was performed to obtain 150–250 to 700 bp DNAC (corresponding to a 150-bp-insert). Amplification was performed according to the manufacturer's recommendations, quality was then checked using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and followed by quantification of each library on Lab Chip® GX Touch DNA High-Sensitivity (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). All libraries were pooled and sequenced on Illumina NextSeq 500® (Illumina) using a MidOutput cartridge (Illumina). The reads obtained on the sequencing platform were submitted to NCBI's Sequence Read Archive and can be found under project number SUB3709326.

### 2.7. Bioinformatic analysis

The sequence reads, obtained from Ion PGM and Illumina NextSeq, were analyzed separately but followed the same bioinformatic procedure except for technology-dependent settings. The reads were trimmed using cutadapt (v0.4.4) (Martin, 2011), for adapters and low base quality removal (Phred score < 20). Reads smaller than 50 bases and, for Illumina NextSeq only, the paired reads with which they were associated, were excluded. Since the studied strain belonged to clade 6, its representative, A/South Africa/3626/2013 (GISAID Isolate 175880), was used as reference for further steps (Supplementary Figure) (Bogner et al., 2006). Mapping was conducted with the BWA-MEM algorithm (v0.7.15) (Li, 2014) using default settings except for gap opening and extension penalties set to 10 and 2, respectively, to increase indel stringency. Sorted mapped reads were manually inspected through Fastqc (v0.11.5) to verify read quality. Single nucleotide polymorphism (SNP) calling was divided into two steps. First, variant calling files (vcf) were generated with naive variant caller (Biomina Galaxy platform) (Blankenberg et al., 2014)), only excluding bases presenting a base- or a mapping- Phred score < 20. Second, a homemade vcf analysis python script was used that applied filters to validate SNPs retrieved previously and generate end-user workable files. Briefly, to this purpose, a quantitative strand bias (SB) score was calculated to estimate an uncertainty for variants frequencies reported (Guo et al., 2012a, 2012b). For each position, a depth-adapted threshold was calculated following a *t*-test distribution and corresponded to the lowest variant frequency detected with 99% power of detection for a given depth. These SNPs required to have a SB score lesser than 1.0, corresponding to an uncertainty at least smaller than reported frequency, and an estimated minimal frequency greater than both an arbitrary (5%) and a depth-adapted threshold. SB score could only be calculated for paired-end files; therefore, no correction could be applied to Ion PGM SNP frequencies. Results reported in this study were based on validated SNPs found in both Ion PGM and Illumina Nextseq sequencing and their estimated minimal frequency. Segment sequences with a low coverage (mean depth < 2,000X) were excluded from analysis.

## 3. Results

### 3.1. Patient clinical history

A five-month-old child was admitted for oxygen-requiring interstitial pneumonia associated with bronchiolitis symptoms. These respiratory symptoms had started 14 days before hand (considered as Day 0, DO) and were due to an influenza virus infection diagnosed on NPA at D14 (Fig. 1A). Within his first months of life, he had presented two episodes of acute pyelonephritis and an episode of wheezing complicated by oral candidiasis due to steroid treatment. These iterative infections led to immunological analyses to be performed that found agammaglobulinemia and a defect of T and NK cells suggesting an X-SCID.

In order to correct the SCID, and despite the ongoing influenza infection, the patient underwent allogeneic cord blood transplantation on

D83, previously conditioned by fludarabine, melphalan and anti-lymphocyte serum association. Immunosuppressive therapy was based on cyclosporin and steroids. Aplasia ended on D97 with an increase in neutrophils and monocytes but lymphopenia persisted until lymphocytes increased on D173 and from D206 to D219 (Fig. 1B). The patient's condition deteriorated in the weeks following cord blood transplantation; severe respiratory distress (due to influenza infection concomitant with innate immunity reconstitution but with persistent lymphopenia) leading to intensive care unit (ICU) admission from D99 to D138. A graft-versus-host-disease (GvHD) was suspected due to hepatic impairment characterized by moderate hepatic cytolysis (2-fold increase of liver transaminases on D123) and important cholestasis (35-fold increase of gamma glutamyl transferases on D129). Thus, immunosuppression with cyclosporin and steroids was maintained but these drugs were responsible for hypertension. Due to persistent cholestasis, the patient was admitted again to the ICU on D220 to undergo plasmapheresis, and cyclosporin was replaced by tacrolimus on D222. The patient was also infected by a bocavirus and norovirus II whose viral loads also varied according to the immunity and were still detected on D236 and D240. Finally, the patient died on D243.

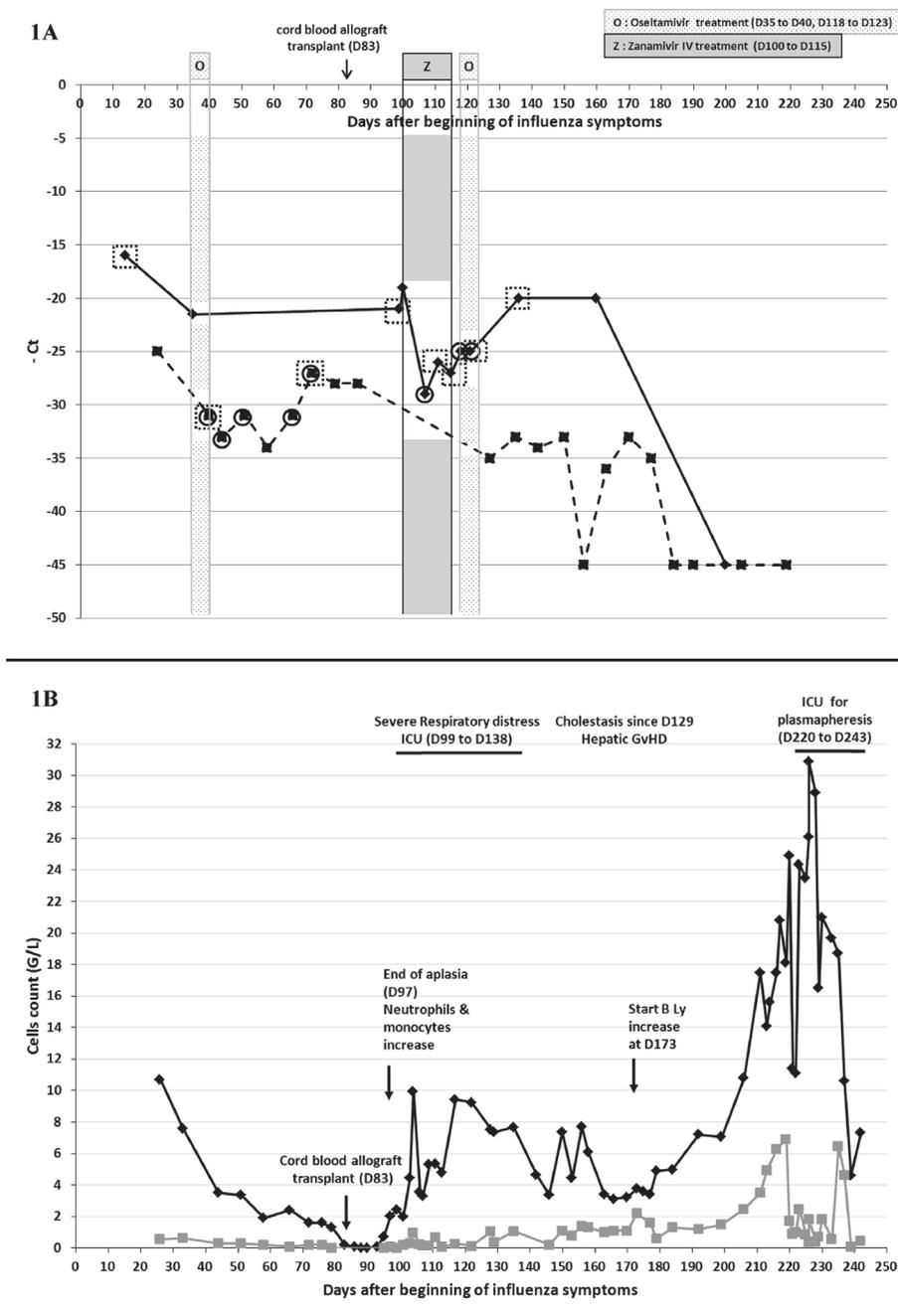
### 3.2. Influenza viral infection and antiviral treatment

Influenza virus detection remained positive in respiratory samples for 6 months (last positive specimen on D177) despite NAI treatment (Fig. 1A). Oral oseltamivir (15 mg twice daily) was administered from D35 to D40. A temporary authorization for the compassionate use of IV zanamivir was obtained on D100 since an oseltamivir-resistant subpopulation was detected. This treatment, associated with IV immunoglobulins, was extended during 15 days. This treatment, concomitant with partial immune reconstitution, allowed an influenza viral load decrease around 2 log<sub>10</sub> copies/mL on NPA (Fig. 1A, Table 1). However, insufficient data on a potential toxicity during extended use led to discontinue IV zanamivir and initiate another oseltamivir therapy from D118 to D123, as the oseltamivir-resistant subpopulation had lowered, but this treatment was inefficient. The viral load was correlated to immune reconstitution (Fig. 1). The white blood cells decrease between D117 and D146, associated to the antiviral stop led to a viral load rebound (very close Ct for NPA specimens at D136 and D100). Finally, the viral clearance was obtained when immune reconstitution was sufficient.

### 3.3. Evaluation of susceptibility of influenza virus to NAI using conventional techniques

During the clinical management of the patient, 11 NPA and 17 NS, collected between D14 to D177 after the onset of symptoms, were found to be positive for influenza A viruses (Table 1) and secondarily subtyped as an A(H1N1)pdm09 virus. The viral loads for NPA samples were higher as this sampling method allows recovering more cells than NS (Fig. 1A). A proportion of 11%–29% of influenza viruses bearing a NA-H275Y substitution were detected, after oseltamivir therapy, on NS performed on D40, D44, D51, D66 and D72 but not D58 when viral load was very low (Ct = 34). This subpopulation appeared just after oseltamivir treatment (from D35 to D40), persisted at least up to D121 (Table 1) during which there was low immune pressure (Fig. 1B). After cord blood allograft transplant, on D83, the respiratory distress worsened as viral load increased at D86 at which time no 275Y variants could be detected. On D107, the highest proportion of 275Y variants (24%) were detected and the viral load was the lowest since transplant (Ct = 29; Table 1).

The 275Y substitution was detected on several specimens but only at a low proportion (≤29%) (Table 1, Table 3) and only wild-type viruses were selected after cell culture. Fourteen influenza virus isolates were obtained after culture and all presented normal inhibition by oseltamivir (mean ± SD oseltamivir IC<sub>50</sub>: 0.38 ± 0.18 nM) and



**Fig. 1.** Influenza viral load in clinical specimens (1A) and white blood cell counts (1B) during the course of influenza A(H1N1)pdm09 infection follow-up. (1A) Real-time RT-qPCR cycle thresholds (Ct) were inversely proportional to the influenza virus load in the respiratory sample. Inverted y-axis allows an easier comprehension of viral load kinetics. The x-axis represents days of specimen sampling after beginning of influenza clinical symptoms considered as D0. Diamonds represent nasopharyngeal aspirates (NPA) and squares nasopharyngeal swabs (NS). Viral load kinetics were represented by discontinuous or continuous lines depending of the sample nature (NPA and NS respectively). The H275Y NA substitution presence was tested by RT-qPCR in all specimens collected until D156. Specimens with detection of a proportion of 275Y NA substitution are circled. Specimens used for influenza deep genome sequencing are indicated with a dashed square. Treatments by oseltamivir or zanamivir are noted by shades of gray (light gray for oseltamivir and dark gray for zanamivir). Note that Ct could not be strictly superposed between NPA and NS, due to the difference between these sampling methods. (1B) The x-axis represents days after beginning of influenza clinical symptoms considered as D0. Absolute counts are expressed in G/L (corresponding to  $10^6$  Cells/ml). White blood cells are presented with a black line and include polynuclear cells, lymphocytes and monocytes. Lymphocytes are presented with a gray line. Aplasia ended at D97 with a rapid increase in the neutrophil count followed by an increase in monocyte count. Lymphopenia persisted on T and NK cells. Note that lymphocytes increase was due to B lymphocytes increase at D173 and from D206 to D219. Abbreviations: ICU, intensive care unit; Ly, lymphocytes; GvHD, graft versus host disease.

zanamivir (mean  $\pm$  SD zanamivir  $IC_{50}$ :  $0.51 \pm 0.13$  nM).

### 3.4. Influenza A(H1N1)pdm09 virus deep sequencing

Whole genome sequencing of influenza A was performed by NGS on the first specimen (D14) after the onset of symptoms and on a selection of the next following specimens with a possible variant selection by antiviral treatment (D40, D72, D99, D111, D115, D121, and D136).

The sequencing depth and coverage was better in specimens with a higher viral load (D14, D99, and D136 specimens; Fig. 2A) and for shorter segments (Fig. 2B). In particular, PB1 and PA segments had a low mean depth ( $< 2,000\times$ ) at D111 and D115 (Fig. 2B). Viral genomic diversity was the greatest in the D115 specimen at the end of zanamivir treatment, especially on the NP segment (Fig. 2C). Hemagglutinin (HA) and NA segments presented the highest number of substitutions on the first D14 specimen compared to the A/South Africa/3626/2013 virus

reference strain (GISAID reference 175880) (Table 2). PB2, NP then PA and NS1 segments presented four and three substitutions respectively; PB1, NS2 and M segments were very conserved (Table 2). Within-host influenza virus genomic diversity revealed that NP, HA, PB2 and NS1 segments were the most variable (Table 3). The analysis of PB1 and PA genome segments found a limited number of mutations and two distinct deletions on PB1 segment at D136 (Table 3). Matrix segment harbored few minor polymorphisms but no amino-acid substitutions of their consensus sequence. The NA sequencing was consistent with the specific H275Y RT-qPCR with 29% of 275Y variants in specimen at D72 and only H275 variants in specimens at D111 and D115 (Table 1, Table 3). A low proportion (10.3%) of NA-E119A substitution was detected at D111 during IV zanamivir treatment (Table 3).

**Table 1**

Influenza A(H1N1)pdm09 analysis and phenotypic characterization of sequential specimens collected from the patient and course of antiviral therapy.

Days <sup>a</sup>	Specimen origin	H or Y275 NA substitution quantification <sup>b</sup> (log <sub>10</sub> copies/mL of specimen)		Viral Culture result	NA activity (nmol 4Mu/h/mL) <sup>c</sup>	Mean IC <sub>50</sub> ± SD (nM) <sup>f</sup>	
		H275	Y275(%)			oseltamivir	zanamivir
14 <sup>f</sup>	NPA	7.38	0	IAV	164	0.21 ± 0.11	0.32 ± 0.04
24	NS	4.84	0	IAV	117	0.26 ± 0.11	0.42 ± 0.06
35 <sup>d</sup>	NPA	7.71	0	IAV	124	0.22 ± 0.01	0.44 ± 0.04
40 <sup>d,f</sup>	NS	3.89	3.00 (12%)	N	ND	ND	ND
44	NS	3.04	2.66 (29%)	N	ND	ND	ND
51	NS	3.36	2.73 (19%)	IAV	88	0.63 ± 0.18	0.49 ± 0.01
58	NS	2.91	0	N	ND	ND	ND
66	NS	3.36	2.46 (11%)	N	ND	ND	ND
72 <sup>f</sup>	NS	4.71	4.16 (22%)	IAV	68	0.41 ± 0.15	0.81 ± 0.28
79	NS	4.16	0	IAV	76	0.81 ± 0.16	0.50 ± 0.03
86	NS	5.09	0	IAV	101	0.31 ± 0.04	0.63 ± 0.18
93	NS	3.10	0	N	ND	ND	ND
99 <sup>f</sup>	NPA	6.63	0	IAV	96	0.51 ± 0.10	0.60 ± 0.06
100	NPA	7.77	0	IAV	85	0.35 ± 0.11	0.57 ± 0.07
107 <sup>e</sup>	NPA	5.13	4.63 (24%)	N	ND	ND	ND
111 <sup>e,f</sup>	NPA	6.30	0	IAV	19	0.25 ± 0.03	0.45 ± 0.06
115 <sup>e,f</sup>	NPA	5.73	0	N	ND	ND	ND
118 <sup>d</sup>	NPA	5.03	3.79 (5%)	N	ND	ND	ND
121 <sup>d,f</sup>	NPA	4.95	3.93 (9%)	IAV	38	0.27 ± 0.04	0.50 ± 0.25
127	NS	0	0	N	ND	ND	ND
135	NS	3.92	0	N	ND	ND	ND
136 <sup>f</sup>	NPA	7.59	0	IAV	55	0.36 ± 0.18	0.43 ± 0.16
142	NS	3.12	0	IAV	ND	ND	ND
150	NS	3.47	0	N	ND	ND	ND
156	NS	0	0	N	ND	ND	ND
160	NPA	ND	ND	IAV	ND	ND	ND
163	NS	ND	ND	N	ND	ND	ND
170	NS	ND	ND	N	ND	ND	ND
177	NS	ND	ND	N	ND	ND	ND

We used reference strains for validation of the NA inhibition assays.

For A/California/07/2009 reference strain (reference for wild-type H275 NA), the mean oseltamivir IC<sub>50</sub> was 0,44 ± 0,21 nM and zanamivir IC<sub>50</sub> was 0,65 ± 0,15 nM.

For A/LyonChu/48.307/2009 isolate (reference for variant 275Y NA) (Escuret et al., 2012), the mean oseltamivir IC<sub>50</sub> was 147,87 ± 45,80 nM and zanamivir IC<sub>50</sub> was 0,52 ± 0,14 nM.

Abbreviations: Ct, cycle threshold; IC<sub>50</sub>, NAI concentration able to inhibit 50% of the NA activity; IAV, Influenza A Virus; N, Negative; NA, neuraminidase; ND, not determined, NPA Naso Pharyngeal Aspirates, NS: nasal swabs; 4Mu, 4-methylumbelliferone.

Samples D184, D190, D200, D205, and D219 were not represented as influenza detection remained negative at these time points.

<sup>a</sup> Days after beginning of influenza symptoms.

<sup>b</sup> The quantification of the proportion of a wild type H275 NA or variant 275Y NA substitution were performed using an in house RT-qPCR. As only low proportion (≤29%) of 275Y NA substitution were detected, only wild type viruses were selected after cell culture.

<sup>c</sup> The NA activity and IC<sub>50</sub> were determined using the MUNANA substrate as described in materials and methods section. The mean IC<sub>50</sub> + SD of influenza A isolates are duplicates.

<sup>d</sup> Sampled under antiviral treatment (oseltamivir).

<sup>e</sup> Sampled under antiviral treatment (zanamivir).

<sup>f</sup> Samples that were sequenced using NGS.

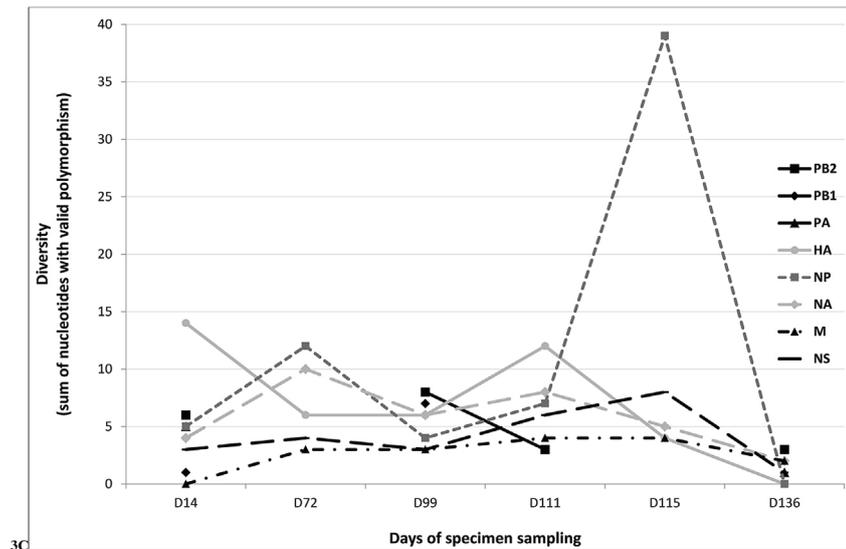
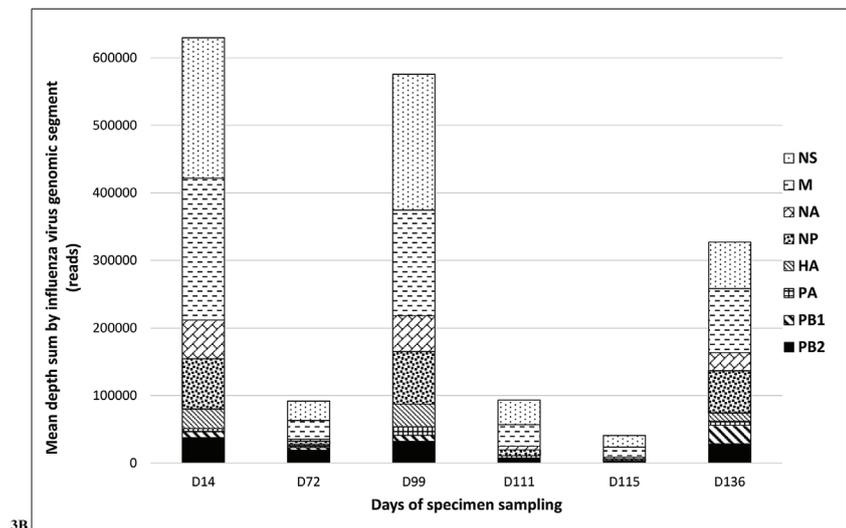
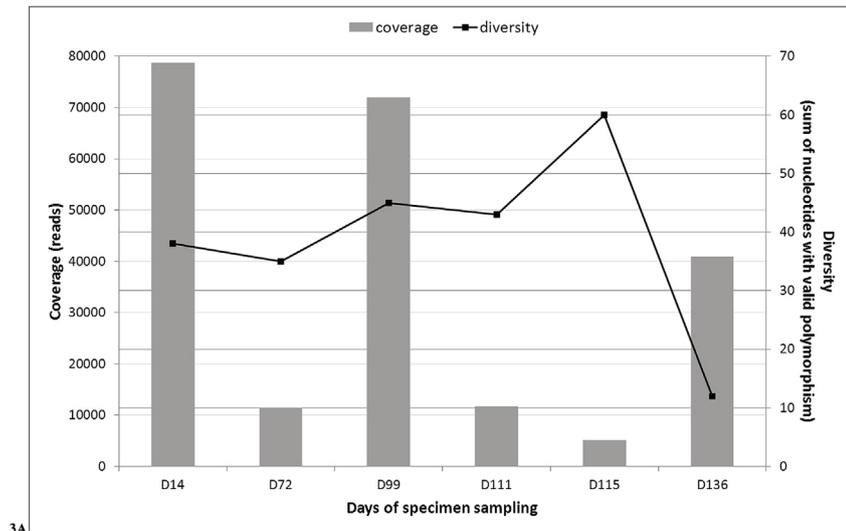
#### 4. Discussion

The present study combines specimen whole influenza genome sequencing, clinical data, and antiviral treatment of a SCID patient infected by influenza A(H1N1)pdm09 virus.

The late SCID diagnosis led to perform the cord blood transplantation with an ongoing infection, which is known to have a poor outcome (Rivers and Gaspar, 2015). Influenza infections in immunocompromised patients require effective antiviral agents but only oseltamivir and zanamivir are available.

IV zanamivir as late add-on therapy has been described to have a limited effectiveness; however most patients were immunocompromised (Fraaij et al., 2011). In the case presented here, we observed a partial viral response with a 2 log<sub>10</sub> copies/mL decrease in seven days. This observation is consistent with a median decrease in viral load of 1.81 log<sub>10</sub> copies/mL after 2 days of IV zanamivir treatment of children (phase II assay) (Bradley et al., 2017). In previously published cases, IV zanamivir was also associated with viral load decrease although with WB cells increase and persistent lymphopenia

(Dulek et al., 2010). It was reported to be effective in stem cell transplanted teenagers; however, although IV zanamivir decreased influenza viral load, genome clearing was only observed more than 4 months later, following immune reconstitution (Ghosh et al., 2012). IV zanamivir was discontinued after the usual 15 days of treatment (Dohna-Schwake et al., 2010; Dulek et al., 2010; Gaur et al., 2010). In another clinical case, IV zanamivir was administered for a total of 34 days without notification of particular adverse events (Ghosh et al., 2012). In this situation, owing to important cholestasis on D129, the hepatotoxicity of IV zanamivir was questioned. Hepatotoxicity of IV zanamivir was hypothesized in a case of pediatric liver transplant (Dohna-Schwake et al., 2010) without any serious adverse events detected in other patients (Dulek et al., 2010; Fraaij et al., 2011). IV zanamivir in adults led to liver enzyme elevations during a Phase II evaluation (Marty et al., 2014). However no increased hepatotoxicity was noted in the IV zanamivir groups in the phase III trial in adults (Marty et al., 2017) and in the phase II trial in children (Bradley et al., 2017). In this child's history, the 14-day interval between IV zanamivir treatment discontinuation and appearance of liver injury signs suggests that



**Fig. 2.** Influenza viral sequence coverage and genomic diversity. (2A) Influenza viral sequence coverage and genomic diversity: viral sequence coverage corresponds to the mean number of reads obtained for influenza virus genome segments for each specimen, and global genomic diversity is the sum of nucleotides identified for all the segments with a mean depth > 2,000X. (2B) Mean depth by influenza viral genomic segment. (2C) Viral genomic diversity according to segment: viral genomic diversity is the sum of nucleotides identified with a valid polymorphism on each genome segment. Only the results of diversity obtained when mean depth was > 2,000X are presented. Due to insufficient coverage, data for specimens at D40 and D121 were not presented. Results for PB2, PB1 and PA segments at D72 and D115 and for PB1 segment at D111 are not shown. Day of specimen sampling correspond to the day after beginning of influenza symptoms.

hepatotoxicity resulted from GvHD and/or from immunosuppressive drugs toxicity.

As only few antivirals were available, conventional virological techniques were sufficient to allow the influenza infection follow-up

and antiviral adaptation. However, we only had very partial information thus we performed retrospectively an NGS analysis to characterize viral genomic diversity along the course of this prolonged influenza episode. NGS allowed the study of influenza viral quasispecies, under

**Table 2**

Amino acid homology between the patient's first specimen and the A/South Africa/3626/2013 reference strain sequences.

Protein	Substitutions (variant %) <sup>a</sup> in first specimen at D14 by comparison with the A/SouthAfrica/3626/2013
PB2	M28K (7.7%), E72D (8.9%), T102N, T129I <sup>§</sup> (12.7%)
PB1	R687Q
PA	R356K, D529N, K716N
HA	K119R (14.6%), E127D, H138Q, A139D (7.6%), K142R (12.6%), N162S, S183P (44.5%), A186T (11.5%), D187G (8.4%), S190I (8.6%), I216K (58.8%), E224V (36.9%), V524L
NP	G17E (37.9%), I41T <sup>§</sup> (8.1%), N101D, V119I (45.8%)
NA	L40I, V81I (5.3%), L85I, M242I (18.3%), G249R, N307K
M1	None
M2	None
NS1	M6R (57.5%), T76A, V178I (15.4%)
NS2	M6R (57.5%)

The A/South Africa/3626/2013 strain (GISAID sequence n° 175880) was used as a reference. For HA, the numbering system was based on the mature HA sequence, without the 17 amino-acid residues of the signal peptide.

Variant populations detected by Illumina sequencing only are indicated with a §.

<sup>a</sup> When a mix of wild type and variant amino acids was detected, the proportion (%) of variant substitution was indicated between parentheses.

antiviral and altered-immune pressures, crosschecked on two different platforms, which support the validity of results reported. However, differences in viral populations could be influenced by the sampling site as it was shown for NGS analysis of bronchoalveolar lavages and NS collected the same day (Trebien et al., 2017). Moreover, the longer segments (PB2, PB1, and PA) presented a lower coverage in both techniques. This technical limitation led to an absence of conclusion as to whether large deletions were due to a technical problem or truly reflected the presence of defective interfering particles (Dimmock and Easton, 2014; Saira et al., 2013). Similarly to RSV studies, genomic diversity was shown unequally distributed along the viral genome with highly-conserved regions and highly-varying regions (Do et al., 2015). In this study, we observed variation in genomic diversity among segments, with most of the variation occurring in proteins exposed to antibody neutralization (HA or NA) but also in NP and less in M or PA segments. The high genomic diversity detected in NP may reflect a bias of selection as the coverage was the lowest for this D115 specimen (Fig. 2A). Viral genomic diversity seemed to increase concomitantly with selection by immunity and lymphocytes recovery after cord blood allograft or by antiviral treatment, as previously reported for RSV infection in an SCID patient (Grad et al., 2014). We did not detect the D222G substitution in HA known to be associated to illness severity (Casalegno et al., 2014; Goka et al., 2014). Severe respiratory distress was concomitant with partial immune reconstitution leading to inflammation; viral clearance was observed only when lymphocytes increased (Gooskens et al., 2016).

NGS allowed a better characterization of influenza variants selected by antiviral treatment. The NA-H275Y substitution is the most frequently encountered in N1, under oseltamivir pressure, despite lowering viral fitness (Abed et al., 2014). These data are consistent with the present study where NA 275Y variants were repeatedly detected only as a minority under antiviral pressure; corresponding influenza virus isolates were oseltamivir-sensitive suggesting that NA 275Y variants were outcompeted by wild-type viruses. Our results were consistent for specimens tested both with RT-qPCR and NGS. Our results are consistent with previous studies demonstrating that 275Y variants were present at concentration below the threshold value in first specimens and were selected by oseltamivir treatment (Ghedini et al., 2011, 2012). *In vitro* studies suggested that oseltamivir could expand diversification of influenza virus by facilitating accumulation of virions in intercellular spaces (Mori et al., 2015). This accumulation allows cell-to-cell transmission and co-infection between defective and helper viruses (Mori

et al., 2015). In the case presented herein we could not ascertain whether oseltamivir treatment could increase viral genomic diversity, as coverage was insufficient for specimens at D40 and D121 (sampled just after the end or during oseltamivir treatment). However, as discussed above, oseltamivir was responsible for selection of oseltamivir-resistant variants and then for evolution of viral genomic diversity.

In the present case, NGS allowed E119A minor variants detection under zanamivir selection. The emergence of substitutions E119G and E119D in N1 have been described in two cases of very immunocompromised patients under IV zanamivir treatment (L'Huillier et al., 2015; Tamura et al., 2015). Mainly mixes of E119G and E119D substitution were detected but E119A was also detected in one specimen at a very low percent (0.5%) (L'Huillier et al., 2015). *In vitro*, seasonal A(H1N1) influenza viruses bearing a NA-E119A substitution were selected with laninamivir (Samson et al., 2014). A recombinant A(H1N1)pdm09 virus harboring a NA-E119A substitution exhibited a 90- and 17-fold increase in zanamivir and oseltamivir IC<sub>50</sub> respectively and a reduced NA activity (36% compared to wild type NA) (Samson et al., 2014).

## 5. Conclusions

To conclude, the present report demonstrated that NGS is particularly relevant in specific situations, as major immune defects, where minor viral variants could reveal a risk of antiviral efficacy loss. However, to modify clinical management of influenza infection in immunocompromised patients, the use of NGS would need implementation of bioinformatics pipelines and softwares to obtain results rapidly and the development of alternative efficient antiviral agents against influenza.

## Funding information

This study was performed in the field of the global surveillance of the susceptibility of influenza viruses to antiviral agents (performed by WHO and by the Centre National de Référence des virus des infections respiratoires supported by Santé Publique France (SPF) in France).

## Transparency declarations

### (1) Conflict of interest

M.P. received a travel grant from Therdiag and Hologic to attend the ESCV 2017 and 2018 Conferences.

A.G. received a travel grant from Cobas to attend the RICAI 2017 Conference.

M.V. received a grant from Medical Wire to attend the ECCMID 2017 Congress.

B.L. is the co-Chair of the Global Influenza Initiative, a member of the scientific committee of the Global Hospital Influenza Surveillance Network, a member of the Foundation for Influenza. He received a travel grant from Alere to attend the RICAI 2017 Conference, and a travel Grant from Seegene to attend the ECCMID conference in 2017. All personal remuneration stopped in September 2010.

L.J. served on the French Advisory Board for SANOFI on the 'Quadrivalent Influenza Vaccine' in 2017.

V.E. received a travel grant from Roche Pharmaceuticals to attend the Fourth ESWI Conference and declares potential conflict of interests with Sanofi-Pasteur (intervention in symposia in 2013).

All other authors C.P., B.S., C.R., B.M., C.M., G.M., F.M.S., E.J., G.M. have no conflicts of interest to declare.

(2) This work has not been presented in any meeting.

## Acknowledgements

We thank Gwendolyne Burfin (Centre National de Référence des virus des infections respiratoires), for her technical assistance and development

**Table 3**  
Amino acid homology between the first and subsequent specimens sequences.

Protein	Substitutions (variant%) <sup>a</sup> in subsequent specimens compared to first specimen at D14					
	specimen at D72	specimen at D99	specimen at D111	specimen at D115	specimen at D136	
PB2	NI	T16P (7.0%)	T129I* (57.5%)	NI	V89M	
		T129I* (71.4%)				
		Y704H (12.9%)	L716R (5.3%)		D680G (13.4%)	
		A722T (10.4%)	L725P (6.7%)			
PB1	NI	L725P (30.3%)	NI	NI	K11X (56.6%) (2nt)	
		E297D (17.7%)				
PA HA	NI	E237K (41.6%)	E237K (59.0%)	NI	K744X (23.7%) (1nt) E237K	
		V19L (11.1%)				
NP	K142R* (54.0%) S183P* A186T* (55.0%)	K142R*	K142R* (84.3%)	K142R*	K142R*	
		S183P*	S183P* (84.9%)	S183P*	S183P*	
		A186T*	A186T* (84.2%)	A186T*	A186T*	
			I216K (86.2%)			
			E224V (12.0%)			
	V119I* (88.8%)	V119I* (11.1%)	A286S* (40.9%)		I460V (8.0%)	G17E*
		A286S* (25.4%)	R293K <sup>§</sup> (8.1%)		G17E* (76.6%)	
					G34D (5.4%)	
					I41T* (63.1%)	
					I109V <sup>§</sup> (6.6%)	
NA	S482N <sup>§</sup> (6.7%) G96E (7.2%) M242I* (19.3%)		N50S <sup>§</sup> (5.8%)			
			E119A (10.3%)			
			M242I* (29.8%)	M242I* (81.5%)		
M1 M2	None V68M (5.1%)	None None	None None	None	F62V (62.4%)	
NS1	M6R* (30.6%)	None	M6R* (9.8%)	S82N <sup>§</sup> (6.8%)	S82N	
				M6R* (66.7%)		
				I90L <sup>§</sup> (5.7%)		
				Q109K (8.9%)		
NS2	V178I* (58.9%) M6R* (30.6%) M83I (6.9%)	V157I (6.7%)			V178I*	
		V178I* (80.9%)	V178I* (81.1%)	V178I* (25.2%)		
		None	M6R* (9.8%)	M6R* (66.7%)		
				S29N <sup>§</sup> (6.4%)		

We considered only the result obtained for segments with a mean depth > 2000 X. Due to insufficient coverage, data for specimens at D40 and D121 were not presented. For HA, the numbering system was based on the mature HA sequence, without the 17 amino-acid residues of the signal peptide.

Specimen at D72 was a NS. Other specimens at D99, D111, D115 and D136 were NPA.

Variant populations detected in first specimen at D14 by comparison with A/South Africa/3626/2013 reference strain but with various proportions in subsequent specimens are indicated with \*.

Variant populations detected by Illumina sequencing only are indicated with a <sup>§</sup>.

Deletions of two nucleotides and one nucleotide detected in PB1 segment at D136 were responsible for amino acid deletions K11X and K744X respectively.

Abbreviations: D, Day; NI, not interpretable; NPA, nasopharyngeal aspirate.

<sup>a</sup> The proportion (%) of variant substitution was indicated between parentheses.

of H275Y RTqPCR and Rémi Fanget for his valuable help on viral culture and IC<sub>50</sub> determination. We want to thank as well Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for his valuable help in manuscript preparation.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://>

[doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.009](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.009).

#### References

- Abed, Y., Pizzorno, A., Bouhy, X., Rhéaume, C., Boivin, G., 2014. Impact of potential permissive neuraminidase mutations on viral fitness of the H275Y oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 virus in vitro, in mice and in ferrets. *J. Virol.* 88, 1652–1658.
- Baz, M., Abed, Y., McDonald, J., Boivin, G., 2006. Characterization of multidrug-resistant

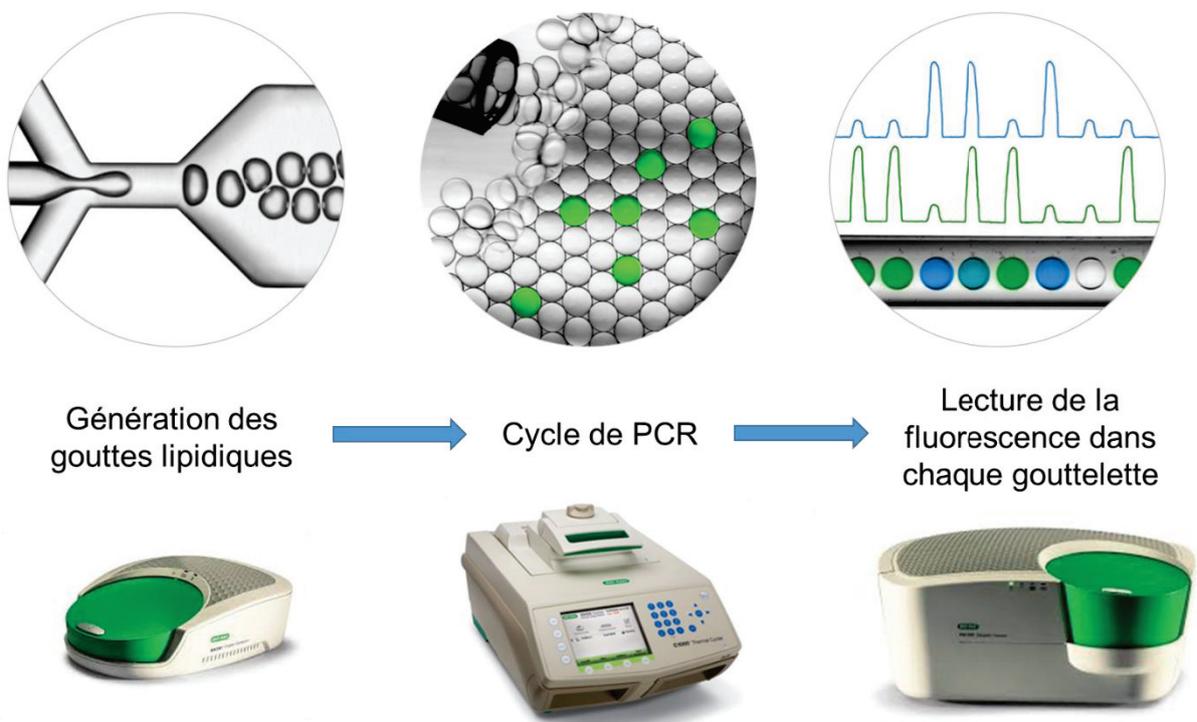
- influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1555–1561.
- Beigel, J.H., Bao, Y., Beeler, J., Manosuthi, W., Slandzicki, A., Dar, S.M., Panuto, J., Beasley, R.L., Perez-Patrigone, S., Suwanpimolkul, G., Losso, M.H., McClure, N., Bozzolo, D.R., Myers, C., Holley, H.P., Hoopes, J., Lane, H.C., Hughes, M.D., Davey, R.T., Team, I.S., 2017. Oseltamivir, amantadine, and ribavirin combination antiviral therapy versus oseltamivir monotherapy for the treatment of influenza: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 17, 1255–1265.
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Bouvier, E., Baker, D., Afgan, E., Stoler, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., Team, G., 2014. Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. *Genome Biol.* 15, 403.
- Bogner, P., Capua, I., Cox, N.J., Lipman, D.J., 2006. A global initiative on sharing avian flu data. *Nature* 442, 981.
- Boivin, G., Goyette, N., Bernatchez, H., 2002. Prolonged excretion of amantadine-resistant influenza A virus quasi species after cessation of antiviral therapy in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* 34, E23–E25.
- Bradley, J.S., Blumer, J.L., Romero, J.R., Michaels, M.G., Munoz, F.M., Kimberlin, D.W., Pahud, B., DeBiasi, R.L., Yamamoto, G., Roberts, G., Hossain, M., Shortino, D., Yates, P.J., Adams, B., Peppercorn, A., 2017. Intravenous zanamivir in hospitalized patients with influenza. *Pediatrics* 140.
- Casalegno, J.-S., Ferraris, O., Escuret, V., Bouscambert, M., Bergeron, C., Lines, L., Excoffier, T., Valette, M., Frobert, E., Pillet, S., Pozzetto, B., Lina, B., Ottmann, M., 2014. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PLoS One* 9.
- Dimmock, N.J., Easton, A.J., 2014. Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals? *J. Virol.* 88, 5217–5227.
- Do, L.A., Wilms, A., Van Doorn, H.R., Lam, H.M., Sim, S., Sukumar, R., Tran, A.T., Nguyen, B.H., Tran, T.T., Tran, Q.H., Vo, Q.B., Dac, N.A., Trinh, H.N., Nguyen, T.T., Binh, B.T., Le, K., Nguyen, M.T., Thai, Q.T., Vo, T.V., Ngo, N.Q., Dang, T.K., Cao, N.H., Tran, T.V., Ho, L.V., Farrar, J., Jong, M., Chen, S., Nagarajan, N., Bryant, J.E., Hibberd, M.L., 2015. Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution. *J. Gen. Virol.* 96, 3470–3483.
- Dohna-Schwake, C., Schweiger, B., Felderhoff-Müser, U., Fiedler, M., Kaiser, G.M., Paul, A., Germer, P., Lainka, E., Hoyer, P.F., 2010. Severe H1N1 infection in a pediatric liver transplant recipient treated with intravenous zanamivir: efficiency and complications. *Transplantation* 90, 223–224.
- Dulek, D.E., Williams, J.V., Creech, C.B., Schuler, A.K., Frangoul, H.A., Domm, J., Denison, M.R., Chappell, J.D., 2010. Use of intravenous zanamivir after development of oseltamivir resistance in a critically ill immunosuppressed child infected with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1493–1496.
- Duval, X., van der Werf, S., Blanchon, T., Mosnier, A., Bouscambert-Duchamp, M., Tibi, A., Enouf, V., Charlois-Ou, C., Vincent, C., Andreoletti, L., Tubach, F., Lina, B., Menétré, F., Lepout, C., Group, B.S., 2010. Efficacy of oseltamivir-zanamivir combination compared to each monotherapy for seasonal influenza: a randomized placebo-controlled trial. *PLoS Med.* 7, e1000362.
- Escuret, V., Cornu, C., Boutitie, F., Enouf, V., Mosnier, A., Bouscambert-Duchamp, M., Gaillard, S., Duval, X., Blanchon, T., Lepout, C., Gueyffier, F., Van Der Werf, S., Lina, B., 2012. Oseltamivir-zanamivir biotherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antivir. Res.* 96, 130–137.
- Eshaghi, A., Shalhoub, S., Rosenfeld, P., Li, A.M., Higgins, R.R., Stogios, P.J., Savchenko, A., Bastien, N., Li, Y., Rotstein, C., Gubbaya, J.B., 2014. Multiple influenza A (H3N2) mutations conferring resistance to neuraminidase inhibitors in a bone marrow transplant recipient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7188–7197.
- FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Available at <http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Date accessed 07/02/2018.
- Ferraris, O., Kessler, N., Lina, B., 2005. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antivir. Res.* 68, 43–48.
- Fraaij, P.L., van der Vries, E., Beersma, M.F., Riezebos-Brilman, A., Niesters, H.G., van der Eijk, A.A., de Jong, M.D., Reis Miranda, D., Horrevorts, A.M., Ridwan, B.U., Wolfhagen, M.J., Houmes, R.J., van Dissel, J.T., Fouchier, R.A., Kroes, A.C., Koopmans, M.P., Osterhaus, A.D., Boucher, C.A., 2011. Evaluation of the antiviral response to zanamivir administered intravenously for treatment of critically ill patients with pandemic influenza A (H1N1) infection. *J. Infect. Dis.* 204, 777–782.
- Gaur, A.H., Bagga, B., Barman, S., Hayden, R., Lamptey, A., Hoffman, J.M., Bhojwani, D., Flynn, P.M., Tuomanen, E., Webby, R., 2010. Intravenous zanamivir for oseltamivir-resistant 2009 H1N1 influenza. *N. Engl. J. Med.* 362, 88–89.
- Ghedini, E., Holmes, E.C., DePasse, J.V., Pinilla, L.T., Fitch, A., Hamelin, M.E., Papenburg, J., Boivin, G., 2012. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J. Infect. Dis.* 206, 1504–1511.
- Ghedini, E., Laplante, J., DePasse, J., Wentworth, D.E., Santos, R.P., Lepow, M.L., Porter, J., Stelrecht, K., Lin, X., Operario, D., Griesemer, S., Fitch, A., Halpin, R.A., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Holmes, E.C., St George, K., 2011. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J. Infect. Dis.* 203, 168–174.
- Ghosh, S., Adams, O., Schuster, F.R., Borkhardt, A., Meisel, R., 2012. Efficient control of pandemic 2009 H1N1 virus infection with intravenous zanamivir despite the lack of immune function. *Transpl. Infect. Dis.* 14, 657–659.
- Goka, E.A., Vallye, P.J., Mutton, K.J., Klapper, P.E., 2014. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Arch. Virol.* 159, 3167–3183.
- Gooskens, J., Marijt, W.A., van Essen, E.H., Rimmelzwaan, G.F., Kroes, A.C., 2016. Host immunity dictates influenza A(H1N1)pdm09 infection outcome in hematology-oncology patients. *Bone Marrow Transplant.* 51, 138–141.
- Grad, Y.H., Newman, R., Zody, M., Yang, X., Murphy, R., Qu, J., Malboeuf, C.M., Levin, J.Z., Lipsitch, M., DeVincenzo, J., 2014. Within-host whole-genome deep sequencing and diversity analysis of human respiratory syncytial virus infection reveals dynamics of genomic diversity in the absence and presence of immune pressure. *J. Virol.* 88, 7286–7293.
- Guo, Y., Cai, Q., Samuels, D.C., Ye, F., Long, J., Li, C.I., Winther, J.F., Tawn, E.J., Stovall, M., Lähteenmäki, P., Malila, N., Levy, S., Shaffer, C., Shyr, Y., Shu, X.O., Boice, J.D., 2012a. The use of next generation sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA mutation. *Mutat. Res.* 744, 154–160.
- Guo, Y., Li, J., Li, C.I., Long, J., Samuels, D.C., Shyr, Y., 2012b. The effect of strand bias in Illumina short-read sequencing data. *BMC Genomics* 13, 666.
- Hurt, A.C., Hardie, K., Wilson, N.J., Deng, Y.M., Osbourn, M., Leang, S.K., Lee, R.T., Iannello, P., Gehrig, N., Shaw, R., Wark, P., Caldwell, N., Givney, R.C., Xue, L., Maurer-Stroh, S., Dwyer, D.E., Wang, B., Smith, D.W., Levy, A., Booy, R., Dixit, R., Merritt, T., Kelso, A., Dalton, C., Durrheim, D., Barr, I.G., 2012. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. *J. Infect. Dis.* 206, 148–157.
- L'Huillier, A.G., Abed, Y., Petty, T.J., Cordey, S., Thomas, Y., Bouhy, X., Schibler, M., Simon, A., Chalandon, Y., van Delden, C., Zdobnov, E., Boquete-Suter, P., Boivin, G., Kaiser, L., 2015. E119D neuraminidase mutation conferring Pan-resistance to neuraminidase inhibitors in an A(H1N1)pdm09 isolate from a stem-cell transplant recipient. *J. Infect. Dis.* 212, 1726–1734.
- Li, H., 2014. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics* 30, 2843–2851.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12.
- Marty, F.M., Man, C.Y., van der Horst, C., Francois, B., Garot, D., Mánez, R., Thamlikitkul, V., Lorente, J.A., Alvarez-Lerma, F., Brealey, D., Zhao, H.H., Weller, S., Yates, P.J., Peppercorn, A.F., 2014. Safety and pharmacokinetics of intravenous zanamivir treatment in hospitalized adults with influenza: an open-label, multicenter, single-arm, phase II study. *J. Infect. Dis.* 209, 542–550.
- Marty, F.M., Vidal-Puigserver, J., Clark, C., Gupta, S.K., Merino, E., Garot, D., Chapman, M.J., Jacobs, F., Rodriguez-Noriega, E., Husa, P., Shortino, D., Watson, H.A., Yates, P.J., Peppercorn, A.F., 2017. Intravenous zanamivir or oral oseltamivir for hospitalized patients with influenza: an international, randomised, double-blind, double-dummy, phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* 5, 135–146.
- Memoli, M.J., Athota, R., Reed, S., Czajkowski, L., Bristol, T., Proudfoot, K., Hagey, R., Voell, J., Fiorentino, C., Ademposi, A., Shoham, S., Taubenberger, J.K., 2014. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs non-immunocompromised hosts. *Clin. Infect. Dis.* 58, 214–224.
- Mori, K., Murano, K., Ohniwa, R.L., Kawaguchi, A., Nagata, K., 2015. Oseltamivir expands quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. *Sci. Rep.* 5, 9163.
- Okomo-Adhiambo, M., Fry, A.M., Su, S., Nguyen, H.T., Elal, A.A., Negron, E., Hand, J., Garten, R.J., Barnes, J., Xiyan, X., Villanueva, J.M., Gubareva, L.V., Group, U.I.A.W., 2015. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses, United States, 2013–14. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 136–141.
- Pichon, M., Gaymard, A., Josset, L., Valette, M., Millat, G., Lina, B., Escuret, V., 2017. Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: comparison with qPCR and next generation sequencing analysis. *Antivir. Res.* 145, 160–167.
- Rivers, L., Gaspar, H.B., 2015. Severe combined immunodeficiency: recent developments and guidance on clinical management. *Arch. Dis. Child.* 100, 667–672.
- Rogers, M.B., Song, T., Sebra, R., Greenbaum, B.D., Hamelin, M.E., Fitch, A., Twaddle, A., Cui, L., Holmes, E.C., Boivin, G., Ghedin, E., 2015. Intrahost dynamics of antiviral resistance in influenza A virus reflect complex patterns of segment linkage, reassortment, and natural selection. *mBio* 6.
- Saira, K., Lin, X., DePasse, J.V., Halpin, R., Twaddle, A., Stockwell, T., Angus, B., Cozzi-Lepri, A., Delfino, M., Dugan, V., Dwyer, D.E., Freyberg, M., Horban, A., Losso, M., Lynfield, R., Wentworth, D.N., Holmes, E.C., Davey, R., Wentworth, D.E., Ghedin, E., Group, I.F.S., Group, I.F.S., 2013. Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *J. Virol.* 87, 8064–8074.
- Samson, M., Abed, Y., Desrochers, F.M., Hamilton, S., Luttick, A., Tucker, S.P., Pryor, M.J., Boivin, G., 2014. Characterization of drug-resistant influenza virus A(H1N1) and A(H3N2) variants selected in vitro with laninamivir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5220–5228.
- Takahashi, E., Fujisaki, S., Kishida, N., Xu, H., Imai, M., Tashiro, M., Odagiri, T., Japan, I.V.S.G.o., 2013. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir. Viruses* 7, 1390–1399.
- Tamura, D., DeBiasi, R.L., Okomo-Adhiambo, M., Mishin, V.P., Campbell, A.P., Loehelt, B., Wiedermann, B.L., Fry, A.M., Gubareva, L.V., 2015. Emergence of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 virus variants in an immunocompromised child treated with oseltamivir and zanamivir. *J. Infect. Dis.* 212, 1209–1213.
- Trebbien, R., Pedersen, S.S., Vorborg, K., Franck, K.T., Fischer, T.K., 2017. Development of oseltamivir and zanamivir resistance in influenza A(H1N1)pdm09 virus, Denmark, 2014. *Euro Surveill.* 22.



# Chapitre 2 : Mise au point de la ddPCR pour le diagnostic de la substitution H274Y dans les virus A(H1N1)

## 2.1. Introduction

Une des missions majeures des CNR des virus des infections respiratoires est le développement et la diffusion de nouvelles techniques de diagnostic et d'identification des virus influenzae, VRS et des principaux autres virus respiratoires (261). Pour répondre à cette expertise, nous avons profité de la mise à disposition sur la plateforme de séquençage des HCL d'un équipement de PCR digitale (droplet digital PCR, ddPCR) de chez BioRad, le QX 200, pour mettre au point la RT-ddPCR permettant la détection de la mutation à l'origine de la substitution H274Y dans les virus A(H1N1). Nous avons ensuite optimisé et comparé les performances de cette technique avec la méthode classique de biologie moléculaire (RT-qPCR) utilisée au CNR en appliquant ces techniques sur des dilutions et des mélanges en proportions variées entre des isolats viraux sauvages donc sensibles et des isolats viraux portant la substitution de résistance H274Y. Finalement, ces tests ont été appliqués rétrospectivement aux prélèvements respiratoires reçus pour deux patients ayant présenté une excrétion prolongée de virus apparentés au A(H1N1)pdm09 et les résultats ont été comparés aux séquences obtenues par séquençage haut débit.



**Figure 17 :** *Étapes techniques nécessaires à la réalisation d'une ddPCR. Figure adaptée des informations présentées sur <http://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology>*

Pour rappel, la technique de ddPCR permet le partitionnement et la répartition de l'extrait d'acide nucléique associé au mix de PCR dans plusieurs milliers de gouttelettes lipidiques. La réaction de PCR traditionnelle se produit alors dans chaque gouttelette puis la fluorescence est lue en point final au sein des différentes gouttelettes (Figure 17). Une quantification absolue peut alors être calculée, sans gamme de calibration, grâce à des calculs basés sur la loi de Poisson et donc sur le nombre d'évènements positifs (rare) parmi un grand nombre de réactions. Une des limites majeures de cette technologie repose sur la saturation rapide de la technique si la charge virale est élevée, nécessitant la dilution préalable des extraits.

Les résultats présentés dans l'article ci-dessous ont montré, qu'après optimisation, la RT-ddPCR s'est avérée plus sensible que la RT-qPCR, permettant de détecter 0,3% de variant porteur de la mutation H274Y dans une population sauvage contre environ 10% pour la RT-qPCR. Malgré ces résultats encourageants, la technique n'a pas été adoptée en routine car nous ne disposons pas du matériel sur le site du CNR. De plus, la détection de si faibles proportions de variants résistants n'a pour l'instant pas d'impact sur la prise en charge clinique en raison de la quasi-absence d'alternative thérapeutique.

## **2.2. Article publié**

Pichon M.\*, **GAYMARD A.\***, Josset L., Valette M., Millat G., Lina B., Escuret V. **Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: comparison with qPCR and next generation sequencing analysis.**

**Antiviral Research. 2017 S0166-3542(17)30431-X**

\* Co-premiers auteurs



Contents lists available at ScienceDirect

## Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)

# Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: Comparison with qPCR and next generation sequencing analysis



Maxime Pichon <sup>a, b, 1</sup>, Alexandre Gaymard <sup>a, b, 1</sup>, Laurence Josset <sup>a, b</sup>, Martine Valette <sup>a</sup>, Gilles Millat <sup>c</sup>, Bruno Lina <sup>a, b</sup>, Vanessa Escuret <sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des virus Influenzae France Sud, Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex 04, France

<sup>b</sup> Univ Lyon, Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon Est, CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, équipe Virpath, F-69372, Lyon Cedex 08, France

<sup>c</sup> Hospices Civils de Lyon, Plateforme de séquençage diagnostique, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est, F-69677, Bron, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 June 2017

Received in revised form

28 July 2017

Accepted 31 July 2017

Available online 3 August 2017

## Keywords:

RT-droplet digital PCR

RT-qPCR

Next generation sequencing

H275Y substitution

Influenza viruses

Oseltamivir resistance

## ABSTRACT

**Introduction:** The H275Y substitution in neuraminidase (NA) confers oseltamivir-resistance in A(H1N1) influenza viruses (IV). Droplet digital PCR (ddPCR) is a new technique to explore single nucleotide polymorphisms. The aim of this study was to compare the performances of reverse transcriptase (RT)-ddPCR, RT-qPCR and next generation sequencing (NGS). We also analyzed the proportions of H275Y-NA substitution for two immunosuppressed patients with sustained shedding of A(H1N1)pdm09 IV.

**Methods:** RT-qPCR was performed using the ABI7500 platform. RT-ddPCR was carried out using the QX200 ddPCR platform. We strengthened our results by a NGS assay (Ion PGM™ sequencer). Discrimination performance and sensitivity of the RT-ddPCR assay were evaluated using mixes of wild type (WT) and mutated H275Y-NA-coding segments.

**Results:** The performance of RT-ddPCR was better than RT-qPCR, using NGS assay as a gold standard. RT-ddPCR was able to detect 0.28% oseltamivir-resistant IV in a WT IV population and 0.55% WT IV in an oseltamivir-resistant IV population. For the first patient, the H275Y-NA substitution was selected by oseltamivir treatment and reached about 50% of the IV population before dropping to less than 2% after treatment discontinuation which was under the lower limit of quantification by RT-qPCR and RT-ddPCR (<2%) after treatment stop. Then, five days after oseltamivir was re-introduced, the H275Y-NA substitution rose up to 100%. For the second patient, the H275Y-NA substitution reached about 30% two days after oseltamivir discontinuation.

**Conclusion:** RT-ddPCR demonstrated better performances than classical RT-qPCR to estimate oseltamivir-resistant IV proportions. This technique could be used to detect earlier emergence of H275Y-NA substitution.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

In the droplet digital PCR (ddPCR) technique, samples are emulsified into thousands of nanodroplets. Each one is used as unique bioreactor to enhance PCR quantification with an equal

sensitivity (Hindson et al., 2011, 2013). The absolute quantification without standard curve is one of the biggest advantages of ddPCR compared to other methods of quantitative PCR (qPCR). This quantification allows comparison between results from different samples or studies independently of the reaction efficiency (McDermott et al., 2013; Taylor et al., 2015). Studies using ddPCR techniques have already proved to be beneficial for human genome exploration and for samples with complex background (Rački et al., 2014; Sanmamed et al., 2015).

Neuraminidase inhibitors (NAIs) are the only antiviral agents recommended by the WHO against influenza viruses (IV) and oseltamivir is the most frequently used worldwide. Before 2007,

\* Corresponding author. Virpath - Grippe, de l'émergence au contrôle, Inserm U1111, CNRS UMR5308, CIRI, ENS Lyon, UCBL1, Bâtiment B, 4ème, étage, Faculté de Médecine, RTH Laënnec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372, Lyon Cedex 08, France.

E-mail address: [vanessa.escuret@univ-lyon1.fr](mailto:vanessa.escuret@univ-lyon1.fr) (V. Escuret).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

oseltamivir-resistant IV were very rare and detected mainly in children and immunosuppressed patients treated by oseltamivir (Ison et al., 2006; Sheu et al., 2008). However, in 2007–2008, seasonal A(H1N1) IV bearing a H275Y-substituted N1 emerged in patients who were not under oseltamivir treatment (Meijer et al., 2009; Rameix-Welti et al., 2008). This variant had a good fitness and became dominant worldwide just before the A(H1N1)pdm09 IV appeared (Escuret et al., 2011). Since then, the large majority of human IV was again susceptible to NAIs. Some localized community circulation clusters of oseltamivir-resistant IV were detected among patients without oseltamivir exposure in Australia in 2011 and in Japan in 2013–2014 (Hurt et al., 2012; Takashita et al., 2014). However, oseltamivir treatment in immunosuppressed patients was the main cause for oseltamivir-resistance in the USA in 2013–2014 (Okomo-Adhiambo et al., 2015). Detection of oseltamivir-resistant IV is still a challenge for immunosuppressed patients (Ghedini et al., 2012). In previous studies, we demonstrated that the limit of detection (LoD) for a variant population bearing a H275Y-NA substitution was around 10% using reverse transcriptase (RT)-qPCR (Escuret et al., 2014, 2012). ddPCR detect single nucleotide polymorphisms (SNP) with a higher sensitivity than qPCR (Hindson et al., 2011; Pekin et al., 2011). This performance may improve the detection of H275Y-NA substitution and management of oseltamivir-resistant IV infection.

In the present study, RT-ddPCR was optimized and the performances of RT-ddPCR was compared to that of RT-qPCR using mixes of well-characterized RNA samples from A(H1N1)pdm09 IV isolates bearing WT or H275Y-substituted NA. Specimens from immunosuppressed patients with prolonged A(H1N1)pdm2009 viral shedding were also analyzed using RT-ddPCR, RT-qPCR and NGS to assess performances of each techniques.

## 2. Material and methods

### 2.1. A(H1N1)pdm09 IV strain selection

Two A(H1N1)pdm09 IV strains were cultured on MDCK cells: i) the A/California/7/2009 (H1N1) IV with 100% H275-NA (A/WT); ii) the A/Lyon/CHU/48-307/2009 (H1N1) IV, an oseltamivir-resistant strain of A(H1N1)pdm09-like virus composed of 100% 275Y-NA (A/MUT) (GenBank Accession no: KY631546).

To assess performances of RT-ddPCR against RT-qPCR, geometric dilutions were tested as previously described (Taylor et al., 2015). Briefly, the A/WT RNA was diluted in a constant quantity of A/MUT RNA (“WT” scale) and the A/MUT RNA was diluted in a constant quantity of A/WT RNA (“MUT” scale). IV subpopulation at the following proportion was obtained: i) 50%, ii) 25%, iii) 10%, iv) 3.57%, v) 1.82%, vi) 1.22%, vii) 0.55%, viii) 0.28%, and ix) 0.14%. Doing so, 18 different samples were obtained.

### 2.2. Patient samples

Two immunosuppressed patients who had a prolonged excretion (more than 7 days) of A(H1N1)pdm09 IV were analyzed. Briefly, the first patient was a 2-year-old child with severe combined immunodeficiency syndrome, hospitalized in intensive care unit for severe influenza associated with picornavirus infection. Oseltamivir treatment was used three times (from Day (D)0 to D5, D26 to D31 and D37 to D46). The patient died at D54. Respiratory specimens analyzed were collected at D0, D13, D23, D26, D31 and D45 (Fig. 1). For this patient, samples were all nose-throat swabs except at D0 and D45 which were nasopharyngeal aspirations.

The second patient was a 47-year-old man treated for a B cell lymphoma. A five-day oseltamivir treatment was initiated at D0 after sampling for influenza diagnosis. Analyzed samples were

collected at D0, D7 and D9 (Fig. 1). The patient died at D13. D0 and D7 samples for this patient were nose-throat swabs; the D9 sample was a bronchoalveolar aspiration.

All samples were obtained during usual clinical management of the patients and were analyzed accordingly to the French institutional rules at the time of the study and local ethical committee practice.

### 2.3. DNA purification and sample analysis

Viral RNA was extracted from culture supernatants or respiratory samples using the Easy Mag platform (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) according to the manufacturer’s instruction. Extracted RNA was conserved at - 80 °C until analysis. All samples were diagnosed using the routine kit Influenza A/B r-gene® RT-qPCR (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France).

Samples were then tested by three different methods: NGS method, the in-house RT-qPCR used for H275Y substitution detection and the newly developed RT-ddPCR.

### 2.4. RT-qPCR

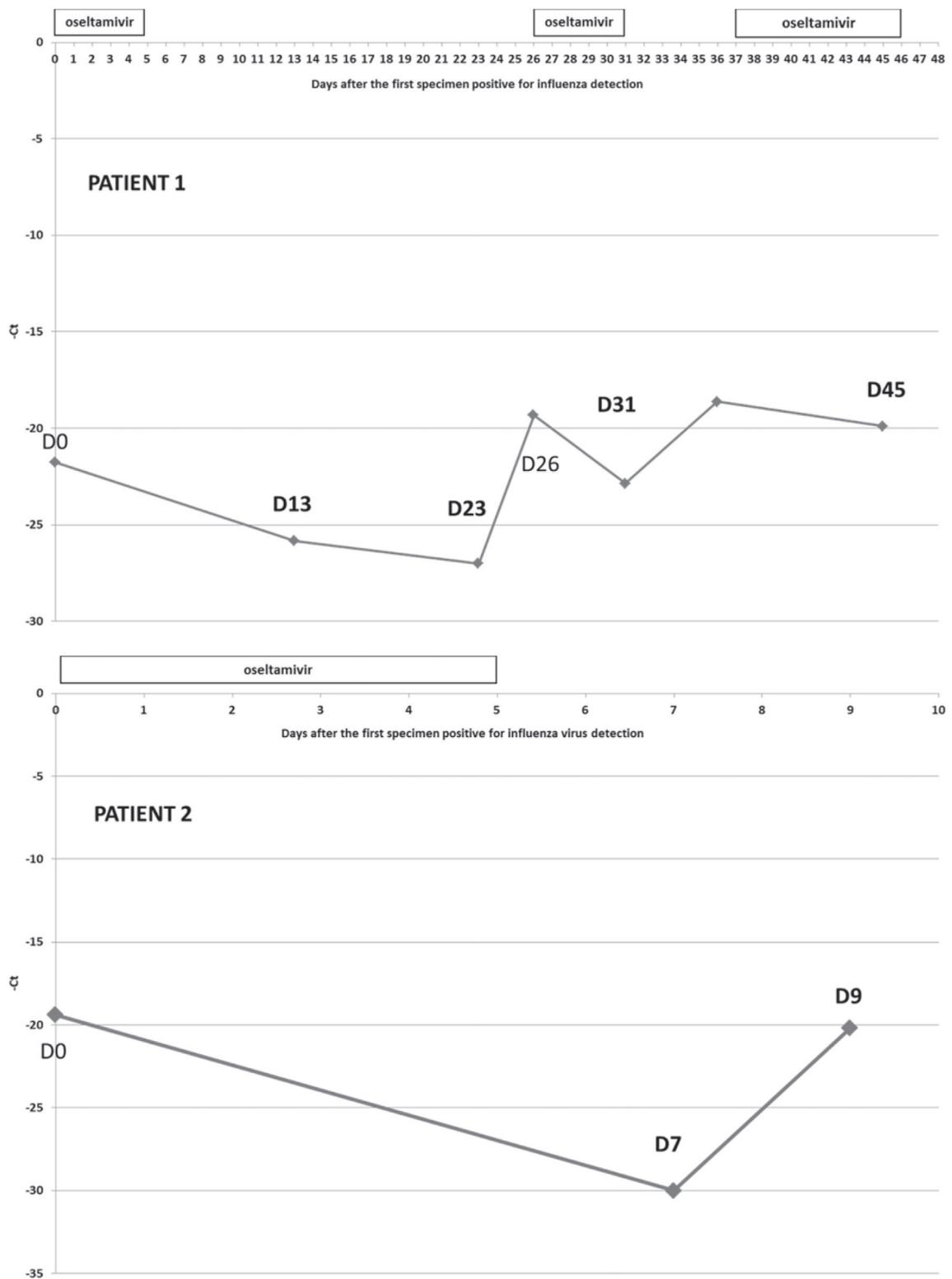
RT-qPCR was performed as previously described (Escuret et al., 2012). Briefly, probes were specific for 275Y (FAM-probe) or H275 (VIC-probe). The assay was performed on the ABI7500 thermocycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) programmed as follows: 50 °C for 15 min (RT), 95 °C for 2 min (polymerase activation) then 45 cycles at 95 °C for 15 s (denaturation) and 60 °C for 40 s (annealing; elongation; reading of fluorescence). When volumes were sufficient, samples were analyzed in triplicate on different days.

### 2.5. RT-ddPCR

The same primers and probes were used for RT-ddPCR and RT-qPCR assays. We used the One-step RT-ddPCR super mix (BioRad, CA, USA), according to the manufacturer’s instructions, except for the use of dithiothreitol component (see results section 3.1). Droplet generation was done using the QX200™ droplet generator (BioRad) on 20 µL of RT-ddPCR reaction mix composed of sample RNA, primers, probes and RT-ddPCR super mix. The generated droplets were transferred to a 96-well plate. The reaction was performed in a C1000 deep well Thermocycler (BioRad) programmed as follows: 50 °C for 60 min (RT); 95 °C for 15 min (Taq polymerase activation), then 40 cycles at 95 °C for 30 s (denaturation) and 55 °C for 1 min (annealing) followed by a post-cycling step at 98 °C for 10 min (enzyme inactivation) and infinite hold at 4 °C. Annealing temperature was adapted by a thermal gradient experiment. After reaction the plate was immediately transferred to the QX200 reader (BioRad) and results were acquired using the FAM and VIC channel, according to manufacturer’s recommendations.

Results interpretation was performed using QuantaSoft software (BioRad) and thresholds were set in manual mode. The false positive results (FPR) were defined as VIC-positive droplets in the 275Y-NA controls or FAM-positive droplets in the H275-NA controls or any positive droplets in the negative controls. As for RT-qPCR, when volumes were sufficient, samples were analyzed in triplicate, on different days.

For both, RT-ddPCR and RT-qPCR, a coefficient of variance (CV) under 20% was defined as a good reproducibility to obtain an accurate viral quantification.



**Fig. 1. Influenza viral load kinetics in clinical specimens.** Real-time RT-qPCR Cycle thresholds (Ct) were inversely proportional to the influenza virus load. Inverted y-axis allowed an easier comprehension of viral load kinetics. The day (D) of sampling after the first viral detection are indicated. The day of sampling is indicated in bold characters for samples with 275Y-NA substitution detection (at least by one method RT-qPCR, RT-ddPCR or NGS).

2.6. Sequencing and analysis

Extracted viral RNA was converted to cDNA then amplified using PathAmpFluA PCR kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA).

Libraries preparation was performed using the NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Sequencing was performed on Ion PGM™ platform using a 316 chip kit V2 (Life technologies).

After reads processing (trimming, demultiplexing, alignment), pileup variants were analyzed using SAM tools (Li et al., 2009). Each nucleotide, coding for Histidine (CAT/CAC) or Tyrosine (TAT/TAC) amino acid at the position 275 of the NA, were quantified. Coverage value described the number of reads that align to a known reference bases. We considered as the LoD of the NGS technologies the hundredth of the observed coverage. This determination justified the depth threshold of at least  $100\times$  (minimum for a LoD of 1%). Sequencing results were considered for comparisons as a reference.

### 2.7. NA activity and inhibition assays

Oseltamivir carboxylate was provided by Hoffmann-La Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, and zanamivir by GlaxoSmithKline (GSK, Brentford, UK). The fluorometric inhibition assays were performed using a MFX fluorometer (Dynex technologies, Chantilly, VA, USA) as described in a previous study, except MES buffer was at pH 6.4 (Ferraris et al., 2005). The NA inhibition assay was performed using a standardized amount of NA activity (10 nmol/h/mL). The NA activity was calculated as the quantity of 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) degraded to 4-methylumbelliferone in 1 h per mL of viral suspensions (nmol/h/mL). The inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were calculated using Sigma Plot software (Sigma Plot 8.0, Windows).

### 2.8. Statistical analysis

For both RT-qPCR and RT-ddPCR, the H275/275Y abundance was

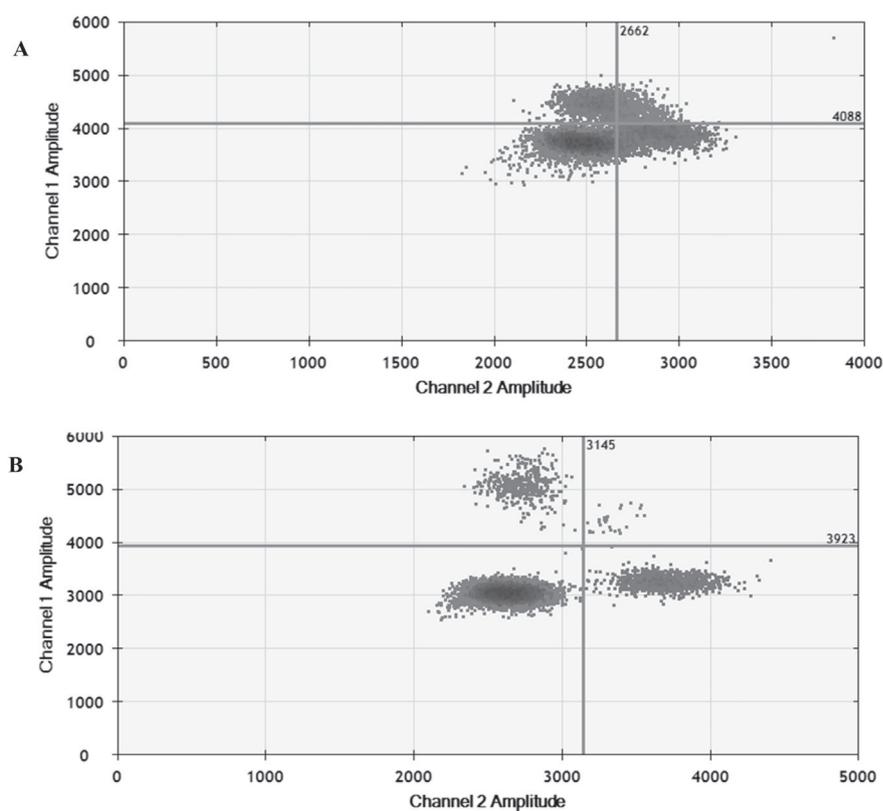
calculated from the mean concentration of the triplicate ( $WT/(MUT + WT) \times 100$ ) or ( $MUT/(MUT + WT) \times 100$ ). Repeatability was verified by the coefficient of variance (CV) (standard deviation/mean  $\times 100$ ). Statistical tests were performed using Graph Prism software. A p-value  $< 0.05$  was considered as significant.

## 3. Results

### 3.1. RT-qPCR protocols are not adaptable to RT-ddPCR platform straight away

First, the RT-qPCR protocol used in our laboratory for diagnostic and quantification of the IV subpopulation with H275Y-NA substitution was transposed to the ddPCR platform. The same cycling parameters, primers and probes associated with the platform-specific super mixes were first used in both RT-ddPCR and RT-qPCR assays. After the first ddPCR assay, the fluorescence level for positive and negative droplets did not part enough using the 2D view in Quanta soft software (Fig. 2A). The annealing temperature (using a thermal gradient), primers and probes concentrations were therefore optimized. The dithiothreitol from the ddPCR super mix was also suppressed. Moreover, sample concentration should not be too high to allow good quantification. Samples with Ct  $< 23$  had to be diluted ten-fold to avoid droplet saturation and to obtain some VIC/FAM negative droplets; otherwise the software cannot distinguish positive and negative droplets.

Results obtained after optimization allowed a sufficient fluorescence differentiation between positive and negative droplets to distinguish four types of droplets: VIC-positive/FAM-negative



**Fig. 2.** Cloud representation of results on QX200 ddPCR platform. A) Representation of insufficiently discriminated viral subpopulations. B) Representation of correctly discriminated viral subpopulations. VIC was detected in Channel 1 and FAM was detected in Channel 2. Lower left cloud represents double negative droplet (FAM and VIC negative droplets). Upper right cloud represents double positive droplet (FAM and VIC positive droplet with both H275- and 275Y-NA detected). Lower right cloud represents FAM positive and VIC negative droplets (only 275Y-NA). Upper left cloud represents FAM negative and VIC positive droplets (only H275-NA). The best discrimination condition was observed with a perfect separation of these four clouds associated to most of the droplets detected in the upper left or lower right clouds.

droplets, VIC-negative/FAM-positive droplets, VIC/FAM-positive droplets, VIC/FAM-negative droplets (Fig. 2B).

### 3.2. Performance of RT-ddPCR on viral supernatant compared to RT-qPCR

The LoD for the RT-ddPCR assay was determined using the FPR quantity of 275Y-NA or H275-NA spotted in the negative controls. Using these controls, the FPR was  $0.071 \pm 0.077$  copies/ $\mu\text{L}$  for the VIC probe (H275-NA) and  $0.044 \pm 0.069$  copies/ $\mu\text{L}$  for the FAM probe (275Y-NA). The LoD was also evaluated by the FPR proportion of 275Y-NA detected in WT IV controls (100% H275-NA) or the FPR proportion of H275-NA identified in substituted IV controls (100% 275Y-NA). The mean FPR proportion was  $0.047 \pm 0.071\%$  for the 275Y-NA detection in WT IV controls and  $0.070 \pm 0.052\%$  for the H275-NA detection in substituted IV controls. The LoD for each SNP was calculated as the mean FPR proportion or quantity plus three times the standard deviation (SD): thus 0.30 copies/ $\mu\text{L}$  or 0.23% for H275-NA detection and 0.25 copies/ $\mu\text{L}$  or 0.26% for 275Y-NA detection. Using RT-qPCR, the LoD for SNP detection in an IV subpopulation was estimated at 10% in a previous study (Escuret et al., 2014, 2012).

To evaluate and compare the performance of RT-ddPCR against RT-qPCR two geometric dilutions were tested. For ddPCR, strong linearity between the expected and the observed 275Y-NA or H275-NA detection was obtained (slope =  $1.009 \pm 0.003628$ , y-intercept =  $0.05340 \pm 0.1664$ ,  $R^2 = 0.9995$  and slope =  $1.000 \pm 0.003698$ , y-intercept =  $-0.4161 \pm 0.1812$ ,  $R^2 = 0.9995$ , respectively) for all dilutions tested (Fig. 3A). For RT-qPCR, linearity was observed only for dilution above the LoD (10% of the studied SNP) (Fig. 3B). For RT-ddPCR, the smallest H275-NA

abundance that could be measured as significantly different from the FPR proportion observed in the substituted IV controls was 0.55% ( $p < 0.01$ ). The smallest 275Y-NA abundance that could be detected as significantly different from the FPR proportion observed in the WT IV controls was 0.28% ( $p < 0.01$ ).

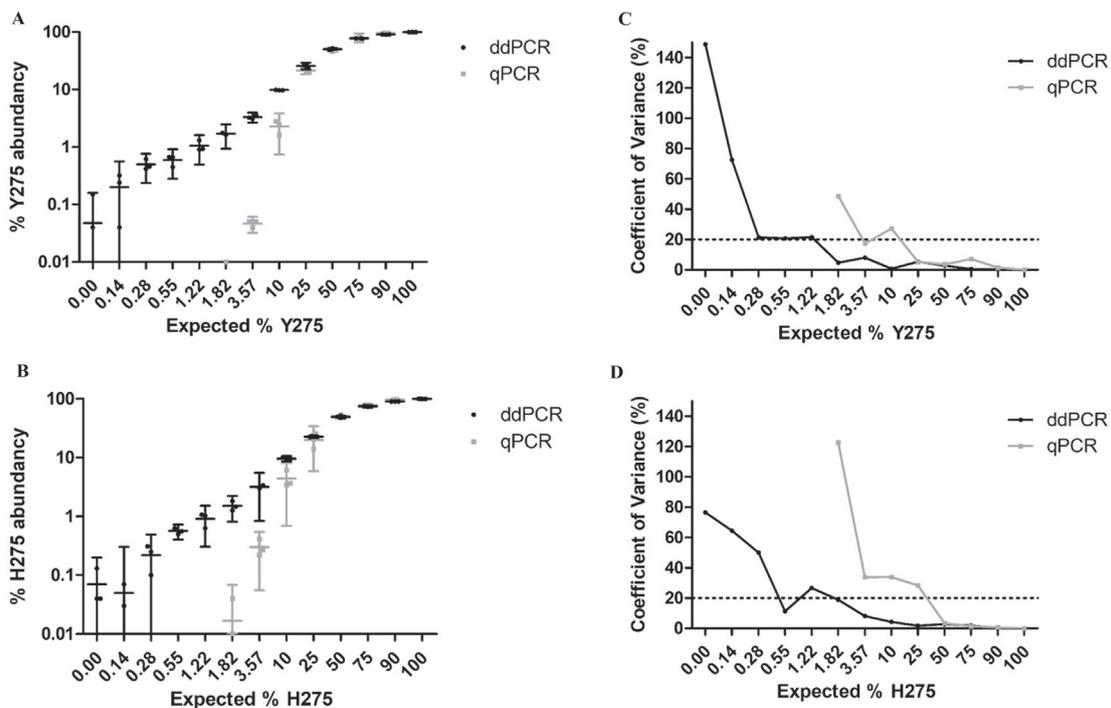
Using RT-qPCR protocols, the 275Y-NA detection had a CV under 20% only for abundance between 25% and 100%. The H275-NA detection had a CV under 20% only for abundance between 50% and 100%. For RT-ddPCR protocols, the 275Y-NA detection had a CV under 20% for abundance between 1.82% and 100%. The H275-NA detection had a CV under 20% for abundance between 3.57% and 100% (Fig. 3C and D).

In summary, the performance of RT-ddPCR was better with a LoD at 0.28% and 0.55% (275Y-NA and H275-NA detection respectively) against 10% for RT-qPCR and with an accurate quantification beginning between 1.82% (275Y-NA detection) and 3.57% (H275-NA detection) against 25% and 50% respectively for RT-qPCR.

### 3.3. Performance of RT-ddPCR in clinical samples as compared to RT-qPCR and NGS

Clinical samples were analyzed in triplicate using RT-ddPCR and RT-qPCR (except samples at D0 and D23 for the first patient due to insufficient sample quantity). NGS quantification was obtained for all samples, except at D23 in patient 1, as well as D7 and D9 in patient 2 because of depth below  $100\times$  (83, 4 and  $82\times$  respectively). These sampling correspond to low viral loads (Ct PCR H275 = 32.7; 36.1 and 26.5 respectively). All other NGS depth were sequenced above  $100\times$  threshold (at least  $205\times$ ) and were considered as sufficiently sequenced.

For the first patient, 275Y-NA IV population was detected in the



**Fig. 3. Analytical performances of ddPCR and qPCR.** Observed versus expected proportion of oseltamivir-resistant (A) and wild type-virus (B) using ddPCR (black) and qPCR (grey). Error bars correspond to 95% confidence interval (95CI) of the value. 95CI decreased when reproducibility increased. ddPCR detected both H275-NA and 275Y-NA substitution for the whole dilution scale. qPCR failed to detect both viruses from 1.82% expected proportion. The coefficient of variance (CV) for each dilution point for oseltamivir-resistant (C) and wild-type (D) virus using ddPCR (black) and qPCR (grey) is shown. As expected, quantification CV increased when proportion of the subpopulation decreased. The 20%-threshold, illustrated by the dotted line was crossed for a dilution ten-to-twenty-time higher by qPCR than by ddPCR reflecting lack of reproducibility of qPCR in low frequency viral subpopulations.

D13 sample at 40.7% by RT-qPCR, 46.7% by RT-ddPCR and 56.5% by NGS. Then this population dropped to 6.2% at D23 (detected by RT-ddPCR only) and to 0% at D26. After new oseltamivir treatment, 275Y-NA substitution was identified at 100% using RT-qPCR, 97.5% and 100% using RT-ddPCR and 96.1% and 97.8% using NGS for D31 and D45 samples, respectively (Table 1). The RT-ddPCR results were consistent with those of RT-qPCR except the difference at D23 but the results were below the RT-qPCR LoD (Table 1). NGS detected 275Y-NA viral population in whole sufficiently covered samples (D0, 13, 26, 31 and 45). This technology found persistence of 275Y-NA viruses at a very low proportion (0.02%), with a very important depth (12,862 $\times$ ), 22 days after oseltamivir treatment was discontinued. Moreover, H275-NA viral population remained present at the end of the clinical history with a sufficient depth to be confident in the quantification (205  $\times$  for the 3.90% quantification result and 601  $\times$  for the 2.16% quantification result; Table 1).

For the second patient, NGS found a minor resistant IV subpopulation (0.11%) in the first sample; however NGS could not be performed on other samples due to insufficient depth. For the D7 sample, RT-qPCR and RT-ddPCR were consistent and detected 70.7% and 67.6% of H275-NA viral subpopulation, respectively. A significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed in D9 sample between the results obtained with RT-ddPCR and RT-qPCR. The RT-ddPCR could have overestimated the 275Y-NA abundance compared to RT-qPCR (25.3% vs. 3.5%). For this sample the IC<sub>50</sub> results correlated more with a low 275Y-NA IV subpopulation. For this patient RT-qPCR CV was higher than for the RT-ddPCR, remaining below 20% for all but one sample (on the D7, 275Y-NA with a mean abundance of 29.3%; Table 1).

For all samples from the two patients CV remained below 20% for RT-ddPCR showing good analytical performances. For RT-qPCR, the CV obtained were higher but remained below the 20% limit except for the D7 sample from patient 2 (CV = 37.40%; Table 1).

#### 4. Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first using at the same time RT-PCR, RT-ddPCR and NGS assay to evaluate performances and clinical application in Influenza virus field of research. NGS was defined as a gold standard to analyze proportion of

targeted sequences. In the present study, a 316 chip on Ion Torrent PGM™ (Life technologies) was used and results of NGS could be impacted by the sample viral load. Depth coverage was insufficient in samples with a Ct greater than 27 (determined by influenza diagnosis RT-qPCR), justifying the exclusion of some samples. This limitation may be theoretically overcome by: using more efficient NGS platform, such as the Illumina platforms (NextSeq500, MiSeq, or HiSeq series for example), or reducing the number of sequenced samples per run. These solutions would dramatically increase the cost of sequencing (Liu et al., 2012). In this study, we have shown very precise results (below 1%). It is important to keep in mind that very rare subpopulation quantification could be RT-PCR- or sequencing-introduced artifacts.

Conversely to NGS, RT-ddPCR and RT-qPCR are only able to detect a precise mutation. Therefore the aim of the present study was to compare the performances of the three techniques regarding only the SNP detection responsible for the H275Y-NA substitution.

The RT-ddPCR assays need optimization and a direct transposition of qPCR protocol on this platform remained impossible (Taylor et al., 2015). Using ddPCR assay, an absolute quantification is easy to obtain but ranges from 1 to 100 000 copies per sample (Hindson et al., 2011). Saturation is one of the main inconvenient observed with ddPCR assay when used directly for diagnosis because some negative droplets are required otherwise the system cannot distinguish positive and negative droplets. Herein, samples with high viral load (Ct < 23 determined by influenza diagnosis RT-qPCR) had to be diluted. Thus, a diagnosis qPCR assay estimating viral load remained capital in the analytic process. Moreover, multiplex syndrome PCR is not sufficient to be followed by ddPCR because quantification is usually not available for this technique. Another difficulty during ddPCR assay concerns the analysis of results. Separation between different group of droplets (or clouds) may not be sufficient. The cut-off between positive and negative clouds was difficult to establish, in particular for samples with few copies of the target DNA or using non-optimized ddPCR protocols. Some bioinformatics software, such as “definetherain” might be used to classify the ambiguous droplets between positive and negative droplets, thus limiting the number of false positive droplets (Jones et al., 2014). These bioinformatics tools are fitted for

**Table 1**

Comparison between RT-qPCR, RT-ddPCR and NGS for the detection of influenza virus subpopulation with H275Y-NA substitution in clinical specimens of two immunocompromised patients.

Date	Ct of routine influenza detection RT-qPCR <sup>a</sup>	Specific H275Y RT-qPCR						Specific H275Y RT-ddPCR				NA sequencing by NGS			Enzymatic assay for IC <sub>50</sub> $\pm$ SD (nM)	
		H275		275Y		CV (%)	H275		275Y		Coverage value <sup>b</sup>	H275	275Y	Oseltamivir	Zanamivir	
Mean (%)	Mean (Cq)	CV (%)	Mean (%)	Mean (Cq)	Mean (%)		CV (%)	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)		Mean (%)				
<b>Patient 1</b>																
Day 0	21.8	100.0%	25.0 <sup>d</sup>	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	0.02%	0.0%	112.2%	769	100.0%	0.0%	0.41 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.14
Day 13 <sup>c</sup>	25.8	59.3%	30.8	2.6%	40.7%	30.5	3.76%	53.3%	2.1%	46.7%	2.3%	2972	43.5%	56.5%	36.66 $\pm$ 38.45	0.37 $\pm$ 0.05
Day 23	27.0	100.0%	31.9 <sup>d</sup>	NA	0.0%	NA	NA	93.8%	0.70%	6.2%	10.7%	83	NA	NA	0.39 $\pm$ 0.08	1.39 $\pm$ 1.55
Day 26	19.3	100.0%	23.2	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	NA	0.0%	NA	12862	100.0%	0.02%	NR	NR
Day 31 <sup>c</sup>	22.9	0.0%	NA	NA	100.0%	28.8	NA	2.5%	7.6%	97.5%	0.2%	205	3.90%	96.1%	159.75 $\pm$ 73.04	0.53 $\pm$ 0.14
Day 45 <sup>c</sup>	19.9	0.0%	NA	NA	100.0%	26.6	NA	0.0%	NA	100.0%	NA	601	2.16%	97.8%	177.65 $\pm$ 33.30	0.50 $\pm$ 0.65
<b>Patient 2</b>																
Day 0	19.4	100.0%	28.2	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	NA	0.00%	NA	2776	99.9%	0.1%	NR	NR
Day 7 <sup>c</sup>	30.0	70.7%	38.2	15.5%	29.3%	38.6	37.40%	67.6%	6.39%	32.4%	13.3%	4	NA	NA	NR	NR
Day 9 <sup>c</sup>	20.2	96.5%	26.2	0.5%	3.5%	30.4	14.29%	74.7%	1.47%	25.3%	4.4%	82	NA	NA	0.43 $\pm$ 0.27	0.29 $\pm$ 0.01

<sup>a</sup> The influenza virus detection was performed using Influenza A/B r-gene<sup>®</sup> RTqPCR (bioMérieux, Argène) kit.

<sup>b</sup> Coverage value described the number of reads that align to a known reference base (here coding CAT or GAT at the amino acid position 275 of the NA segment).

<sup>c</sup> Statistically significant differences between RT-qPCR and RT-ddPCR ( $p < 0.05$ ).

<sup>d</sup> All means were determined after having performed the experimentations (for RT-ddPCR and RT-qPCR) in triplicates except for D0 and D23 samples from patient 1 due to insufficient quantity of sample. All means for NGS were determined for a coverage value > 100  $\times$ . Abbreviations: CV: coefficient of variance, IC<sub>50</sub>: oseltamivir or zanamivir concentration able to inhibit 50% of the NA activity, SD: standard deviation, NA: not applicable.

SyberGreen ddPCR assays but not for Taqman probes. This software should be adapted to all protocols to optimize the analysis of results and to overcome the subjective part of this analysis.

One of the main advantages of the ddPCR techniques over qPCR ones is a better sensitivity and precision (Ghedin et al., 2012). In the present study, the dilution scale of MUT RNA with a constant quantity of WT RNA background and the inverse experiment showed better performances for the ddPCR assays compared to the qPCR assays. The ddPCR had a LoD of approximately 0.5% against 10% for qPCR and an accurate quantification between 1.82% (275Y-NA detection) and 3.57% (H275Y-NA detection) against 25% (275Y-NA detection) and 50% (H275Y-NA detection) for qPCR. Regarding detection of 275Y-NA abundance in clinical samples from patients infected by A(H1N1)pdm09 IV and treated with oseltamivir, results were consistent between the three different technologies used. However, NGS was able to detect a low percent of WT IV subpopulation in a treated patient when the other techniques detected only a resistant IV population (patient 1 at D45). Similarly, NGS was able to detect 0.11% of IV with the H275Y-NA substitution at D0 in patient 2. Excluding possible artifacts introduced by the RT-PCR, this could reflect the presence of resistant viral subpopulation even before any antiviral treatment. This observation might have predicted the antiviral response in this immunosuppressed patient and oseltamivir-resistant subpopulation made part of quasispecies viral populations containing both drug-susceptible and -resistant mutations (Ghedin et al., 2012). The oseltamivir-resistant IV with the H275Y-NA substitution may be frequent at very low level in infected hosts because of the decreased viral fitness caused by this substitution. However, the A(H1N1)pdm09 IV with H275Y-NA substitution is frequently selected by oseltamivir treatment in immunosuppressed patients with a prolonged shedding (Ghedin et al., 2011).

The ddPCR technology is a major improvement for pathogen or SNP quantification (Arvia et al., 2017). However, the advantage of an ultrasensitive detection for oseltamivir-resistant viral subpopulation has to be certainly assessed. Usual techniques as pyrosequencing assays or RT-qPCR assays are not reliable to detect less than 10% of the viral population with the H275Y-NA substitution (Taylor et al., 2015). This sensitivity may be sufficient for clinical management, the adaptation of antiviral treatment could be justified by the sole phenotypic modification (Boivin, 2013). In France, intravenous zanamivir is the only alternative for patients infected by an oseltamivir-resistant IV. The European guidelines for management of influenza infections in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients recommend at least 10 days of oseltamivir treatment in immunosuppressed patients. Intravenous zanamivir is an alternative treatment during severe IV infection when oseltamivir gut absorption is impaired (Engelhard et al., 2013). Oseltamivir-resistance diagnosis is one more argument to obtain special authorization for the intravenous zanamivir treatment. Nonetheless, immunity improvement is one of the key to be more effective during severe IV infections albeit the antiviral treatment. Moreover, a prolonged IV shedding in patients treated by NAIs (>10 days) has to be addressed by switching antiviral therapy without waiting for a precise quantification of H275Y-NA substitution in the IV population (Boivin, 2013). Comparison between zanamivir and oseltamivir treatment as the first treatment option during severe IV infections did not find any benefit of intravenous zanamivir (Marty et al., 2017). Other clinical assays have to be performed in immunosuppressed patients to assess whether intravenous zanamivir as a first line of treatment would have any advantage compared to oseltamivir treatment.

The ddPCR technique is interesting regarding precision for a reliable SNP quantification as it could detect earlier an oseltamivir-resistant IV subpopulation with the H275Y-NA substitution.

However, the beneficial impact of this technology in the management of influenza-infected patients will be significant only if new therapeutic options for influenza infections become available.

### Conflict of interest

V.E. received a travel grant from Roche Pharmaceuticals to attend the Fourth European Scientific Working Group on Influenza (ESWI) Influenza Conference and declares potential conflict of interests with Sanofi-Pasteur (intervention in symposia).

B.L. declares potential conflicts of interests with Roche, GSK, BMS, and BioCryst. B.L. is a member of the scientific board of the GEIG and of the ESWI Board of Directors.

M.P., A.G., L.J., M.V. and G.M. do not have any conflicts of interest to declare.

A part of this work was presented as a poster (Abstract ID: 31) during the 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology (ESCV2016) in September 2016, Lisbon, Portugal.

### Funding information

This study was supported by internal funding and performed in the field of the global surveillance of the susceptibility of influenza viruses to antiviral agents [performed by WHO and by the NIC (National Influenza Centre) for South of France supported by INVS (Institut National de Veille Sanitaire) in France].

### Acknowledgements

We are very grateful to Rémi Fanget, Gwendolyne Burfin and all the technicians of the molecular biology and virology laboratories for their advice and help with this study.

We are grateful to BioRad laboratories for freely providing ddPCR QX200 platform. This manufacturer has not been involved in the manuscript writing, reviewing or decision to publish this study.

### References

- Arvia, R., Sollai, M., Pierucci, F., Urso, C., Massi, D., Zakrzewska, K., 2017. Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J. Virol. Methods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.003>.
- Boivin, G., 2013. Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 7 (Suppl. 3), 18–23. <http://dx.doi.org/10.1111/irv.12176>.
- Engelhard, D., Mohty, B., de la Camara, R., Cordonnier, C., Ljungman, P., 2013. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients: summary of ECIL-4 (2011), on behalf of ECIL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. *Transpl. Infect. Dis.* 15, 219–232. <http://dx.doi.org/10.1111/tid.12054>.
- Escuret, V., Collins, P.J., Casalegno, J.-S., Vachieri, S.G., Cattle, N., Ferraris, O., Sabatier, M., Frobert, E., Caro, V., Skehel, J.J., Gambliin, S., Valla, F., Valette, M., Ottmann, M., McCauley, J.W., Daniels, R.S., Lina, B., 2014. A novel I221L substitution in neuraminidase confers high-level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J. Infect. Dis.* 210, 1260–1269. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu244>.
- Escuret, V., Cornu, C., Boutitie, F., Enouf, V., Mosnier, A., Bouscambert-Duchamp, M., Gaillard, S., Duval, X., Blanchon, T., Lepout, C., Gueyffier, F., Van Der Werf, S., Lina, B., 2012. Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antivir. Res.* 96, 130–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.08.002>.
- Escuret, V., Ferraris, O., Lina, B., 2011. The antiviral resistance of influenza virus. *Therapy* 8, 741–762. <http://dx.doi.org/10.2217/tyt.11.79>.
- Ferraris, O., Kessler, N., Lina, B., 2005. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antivir. Res.* 68, 43–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.004>.
- Ghedin, E., Holmes, E.C., DePasse, J.V., Pinilla, L.T., Fitch, A., Hamelin, M.-E., Papenburg, J., Boivin, G., 2012. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J. Infect. Dis.* 206, 1504–1511. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/>

- jjs571.
- Ghedini, E., Laplante, J., DePasse, J., Wentworth, D.E., Santos, R.P., Lepow, M.L., Porter, J., Stellrecht, K., Lin, X., Operario, D., Griesemer, S., Fitch, A., Halpin, R.A., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Holmes, E.C., St George, K., 2011. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J. Infect. Dis.* 203, 168–174. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq040>.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83, 8604–8610. <http://dx.doi.org/10.1021/ac202028g>.
- Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L., Tewari, M., 2013. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* 10, 1003–1005. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2633>.
- Hurt, A.C., Hardie, K., Wilson, N.J., Deng, Y.M., Osbourn, M., Leang, S.K., Lee, R.T.C., Iannello, P., Gehrig, N., Shaw, R., Wark, P., Caldwell, N., Givney, R.C., Xue, L., Maurer-Stroh, S., Dwyer, D.E., Wang, B., Smith, D.W., Levy, A., Booy, R., Dixit, R., Merritt, T., Kelso, A., Dalton, C., Durrheim, D., Barr, I.G., 2012. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. *J. Infect. Dis.* 206, 148–157. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis337>.
- Ison, M.G., Gubareva, L.V., Atmar, R.L., Treanor, J., Hayden, F.G., 2006. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J. Infect. Dis.* 193, 760–764. <http://dx.doi.org/10.1086/500465>.
- Jones, M., Williams, J., Gärtner, K., Phillips, R., Hurst, J., Frater, J., 2014. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain”. *J. Virol. Methods* 202, 46–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.020>.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The sequence alignment/map format and SAM-tools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2078–2079. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/251364>.
- Marty, F.M., Vidal-Puigserver, J., Clark, C., Gupta, S.K., Merino, E., Garot, D., Chapman, M.J., Jacobs, F., Rodriguez-Noriega, E., Husa, P., Shortino, D., Watson, H.A., Yates, P.J., Peppercorn, A.F., 2017. Intravenous zanamivir or oral oseltamivir for hospitalised patients with influenza: an international, randomised, double-blind, double-dummy, phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* 5, 135–146. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30435-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30435-0).
- McDermott, G.P., Do, D., Litterst, C.M., Maar, D., Hindson, C.M., Steenblock, E.R., Legler, T.C., Jouvenot, Y., Marrs, S.H., Bemis, A., Shah, P., Wong, J., Wang, S., Sally, D., Javier, L., Dinio, T., Han, C., Brackbill, T.P., Hodges, S.P., Ling, Y., Klitgord, N., Carman, G.J., Berman, J.R., Koehler, R.T., Hiddessen, A.L., Walse, P., Bousse, L., Tzonev, S., Hefner, E., Hindson, B.J., Cauly, T.H., Hamby, K., Patel, V.P., Regan, J.F., Wyatt, P.W., Karlin-Neumann, G.A., Stumbo, D.P., Lowe, A.J., 2013. Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal. Chem.* 85, 11619–11627. <http://dx.doi.org/10.1021/ac403061n>.
- Meijer, A., Lackenby, A., Hungnes, O., Lina, B., van-der-Werf, S., Schweiger, B., Opp, M., Paget, J., van-de-Kasstele, J., Hay, A., Zambon, M., 2009. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 552–560. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.181280>.
- Okomo-Adhiambo, M., Fry, A.M., Su, S., Nguyen, H.T., Elal, A.A., Negron, E., Hand, J., Garten, R.J., Barnes, J., Xiyang, X., Villanueva, J.M., Gubareva, L.V., 2013–14 US Influenza Antiviral Working Group, 2015. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses, United States, 2013–14. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 136–141. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.141006>.
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C.B., Millot, F., El Harrak, A., Hutchison, J.B., Larson, J.W., Link, D.R., Laurent-Puig, P., Griffiths, A.D., Taly, V., 2011. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab. Chip* 11, 2156–2166. <http://dx.doi.org/10.1039/c1lc20128j>.
- Racki, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., Ravnikar, M., 2014. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10, 42. <http://dx.doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>.
- Rameix-Welti, M.-A., Enouf, V., Cuvelier, F., Jeannin, P., van der Werf, S., 2008. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog.* 4, e1000103. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000103>.
- Sanmamed, M.F., Fernández-Landázuri, S., Rodríguez, C., Zárate, R., Lozano, M.D., Zubiri, L., Perez-Gracia, J.L., Martín-Algarra, S., González, A., 2015. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin. Chem.* 61, 297–304. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2014.230235>.
- Sheu, T.G., Deyde, V.M., Okomo-Adhiambo, M., Garten, R.J., Xu, X., Bright, R.A., Butler, E.N., Wallis, T.R., Klimov, A.I., Gubareva, L.V., 2008. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3284–3292. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00555-08>.
- Takashita, E., Ejima, M., Itoh, R., Miura, M., Ohnishi, A., Nishimura, H., Odagiri, T., Tashiro, M., 2014. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 19.
- Taylor, S.C., Carbonneau, J., Shelton, D.N., Boivin, G., 2015. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J. Virol. Methods* 224, 58–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.014>.

## **Partie C : Résultats expérimentaux sur l'étude des mécanismes de résistances**

La surveillance est un élément majeur de la lutte contre les virus influenzae mais reste insuffisante pour anticiper l'impact de l'émergence d'un nouveau sous-type viral dans une population naïve ou l'impact fonctionnel des substitutions connues dans certains sous-types qui apparaîtraient dans d'autres sous-types. C'est notamment le cas pour les substitutions responsables d'une résistance aux INA. En effet, très peu de travaux ont été réalisés pour étudier la sensibilité aux INA des virus aviaires porteurs de neuraminidases très diverses (Voir Partie A, Chapitre 3). Les études actuelles portent majoritairement sur les virus aviaires responsables de zoonoses, comme A(H5N1) et A(H7N9). Cependant, face au risque pandémique, il serait intéressant de pouvoir prédire le niveau de sensibilité des virus aviaires aux INA ainsi que le risque d'émergence d'un virus aviaire résistant à ces antiviraux et ayant un fitness conservé. Ce manque d'information a été relayé en 2018 par le groupe de travail d'experts de l'OMS sur la surveillance de la sensibilité aux antiviraux qui a reconnu les connaissances actuelles comme insuffisantes pour pouvoir interpréter les substitutions d'acides aminés dans les sous-types de neuraminidases autres que les N1 et N2 humaines (8).

Devant ce constat, notre travail s'est concentré sur des moyens pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'émergence de substitutions de résistance aux INA. En effet, l'impact de ces substitutions sur les caractéristiques et la structure des neuraminidases ainsi que les mécanismes responsables de l'émergence de souches résistantes ne sont pas encore connus précisément. Mais plusieurs hypothèses peuvent être envisagées comme le réassortiment génétique avec un virus humain porteur d'une résistance aux INA ou l'apparition d'une résistance *de novo* avec ou sans pression de sélection par persistance d'INA dans l'environnement. La première hypothèse a été explorée dans notre laboratoire par des expériences de co-infection entre un virus A(H1N1)pdm09 et un virus pré-pandémique résistant à l'oseltamivir permettant l'isolement et la caractérisation complète des réassortants générés notamment en terme de pathogénicité dans le modèle souris (264,265). La deuxième hypothèse nécessite une connaissance préalable des substitutions pouvant être responsables d'une résistance au sein de chaque type de neuraminidase. Pour explorer cette question, nous avons produit par génétique inverse des virus réassortants composés d'un fond génétique commun associé à une neuraminidase soit sauvage donc sensible, soit substituée au niveau de différentes positions connues pour conférer une résistance aux INA dans les N1 et N2 d'origine humaine. Nous avons donc testé l'impact des substitutions H274Y dans les neuraminidases du groupe 1 (N1, N4, N5 et N8) et E119V±I222L ou R292K dans les neuraminidases groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9). Pour chaque virus réassortant, nous avons étudié le niveau de résistance, les propriétés enzymatiques et la stabilité des neuraminidases. Puis, pour approfondir les mécanismes liant ces substitutions aux phénotypes de résistance, nous avons débuté un développement technologique facilitant la caractérisation des virus produits et l'étude des propriétés intrinsèques de la neuraminidase en s'affranchissant de l'impact du fond génétique grâce à la production de protéines recombinantes à l'aide d'un système d'expression en baculovirus.

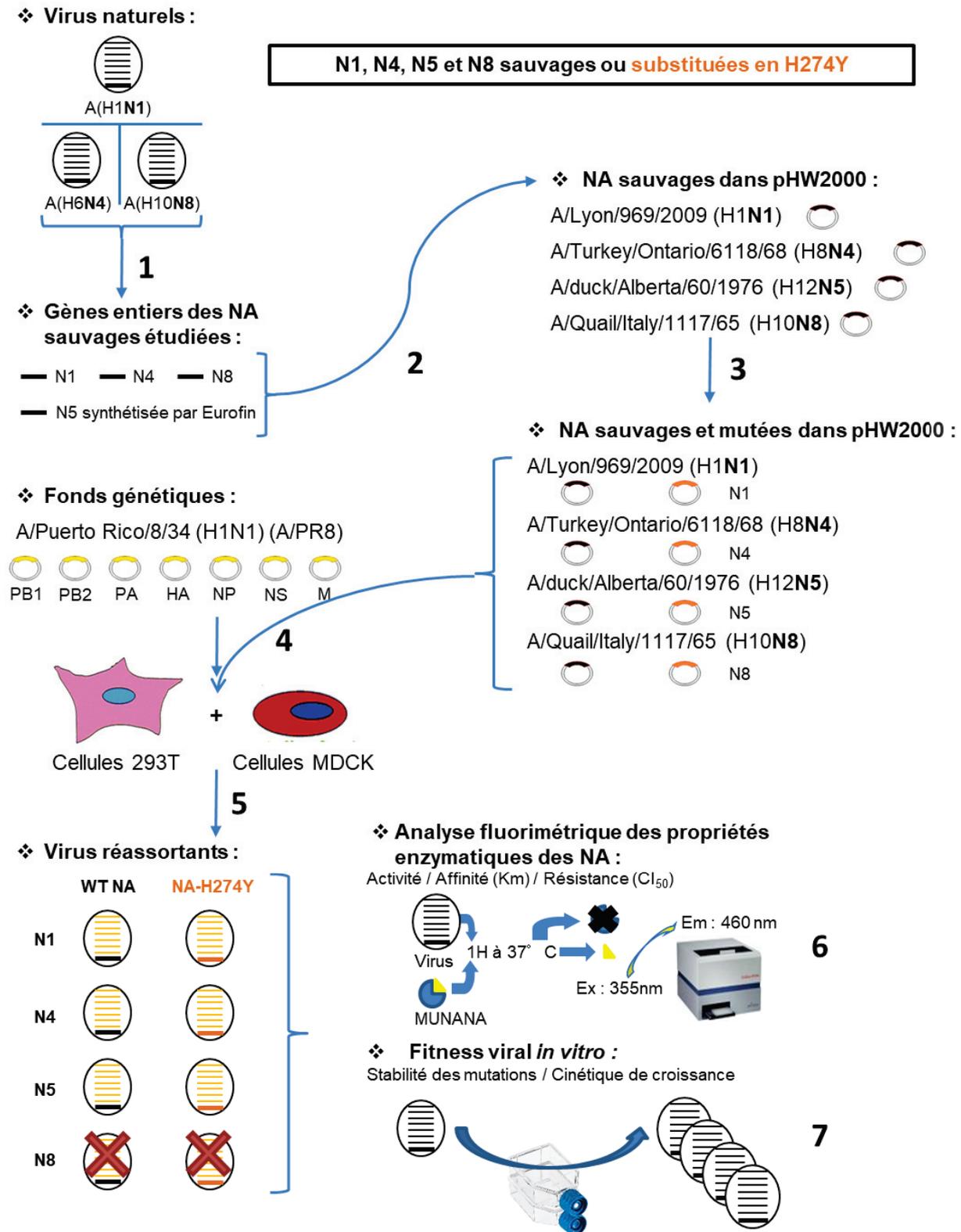
# Chapitre 1 : Étude de l'impact de la substitution H274Y sur les neuraminidases du groupe 1

## 1.1. Introduction

Les neuraminidases des virus influenzae A sont nombreuses et peuvent être classées en deux groupes phylogénétiquement distincts. Chez l'Homme, les virus A(H1N1)pdm09 porteurs d'une neuraminidase du groupe 1 peuvent présenter des résistances aux INA notamment en présence de la substitution H274Y. Cette dernière est la substitution de résistance la plus fréquemment observée dans les virus A(H1N1) alors qu'elle n'est pas retrouvée dans les virus A(H3N2) (Voir Partie A, Chapitre 3). Nous avons donc choisi d'évaluer l'impact de cette substitution dans les autres neuraminidases du groupe 1 (N4, N5 et N8).

Les virus réassortants, produits par génétique inverse, portant une N1, N4 ou N5 sauvage (WT, *wild type*) ou substituée H274Y associée aux autres segments du virus A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR8) ont permis de déterminer l'activité, l'affinité ainsi que la sensibilité aux INA de chaque neuraminidase du groupe 1 (Figure 18). La substitution H274Y diminue à la fois l'affinité et l'activité des neuraminidases et ces diminutions s'accompagnent le plus souvent d'une diminution de la réplication virale *in vitro*. La sensibilité des neuraminidases aux INA a été évaluée en mesurant les  $CI_{50}$  pour chaque virus. En l'absence de référentiel pour interpréter ces valeurs, nous avons choisi d'utiliser les critères d'interprétation de la résistance aux INA définis par l'OMS et utilisés pour les virus influenzae A humains (Voir Partie A, Chapitre 3). Dans ce contexte, tous les virus substitués H274Y présentaient une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir et une sensibilité normale au zanamivir et au laninamivir.

Ces travaux ont fait l'objet d'une soumission dans le « *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* » mais n'ont pas encore été acceptés pour publication car nous n'avions pas pu obtenir de virus réassortants porteurs de neuraminidases de type N8 malgré le clonage réussi de la N8 d'origine aviaire dans le plasmide pHW2000. Ces virus n'ont pas pu être récupérés même après supplémentation des milieux de culture par de la neuraminidase exogène laissant envisager une incompatibilité entre le segment de la neuraminidase du virus A/Quail/Italy/1117/65 (H10N8) et le fond génétique issu du virus A/PR8. Malgré cet échec, la récente épizootie majeure causée par les virus A(H5N8) IAHP en Europe et notamment en France nous a permis, grâce à une collaboration avec le laboratoire de Ploufragan (Dr Pascale Massin et Dr Nicolas Etteradossi), d'obtenir la N8 de ces virus préalablement clonée dans un plasmide pHW2000. L'étude des virus porteurs de cette nouvelle N8 a fait l'objet d'une partie du projet d'un étudiant en M2, Guilhem Vazzoler. Des travaux de caractérisation complémentaires des virus réassortants, notamment en termes de quantité de neuraminidase à la surface des particules virales, sont prévus pour fin 2019 avant de soumettre à nouveau ce travail.



**Figure 18:** Représentation schématique des étapes de production et d'étude des virus réassortants sauvages ou porteurs de la substitution H274Y. 1/ Amplification des virus natifs sur MDCK ; 2/ Clonage des neuraminidases dans le plasmide pHW2000 ; 3/ Mutagenèse dirigée permettant d'obtenir la substitution H274Y ; 4/ Association du fond génétique et des neuraminidases lors d'une étape de génétique inverse ; 5/ amplification des virus réassortants ; 6/ étude enzymatique des neuraminidases ; 7/ cinétique de croissance des virus réassortants et étude de la stabilité de la résistance.

## 1.2. Article soumis

**GAYMARD A.\***, Picard C.\* , Frobert E., Casalegno J.S., Sabatier M., Cortay J.C., Ferraris O., Rosa-Calatrava M., Valette M., Ottmann M., Lina B., Escuret V. **Antiviral resistance and enzymatic characteristics for influenza A viruses bearing a group 1 neuraminidase (N1, N4 or N5) with the H274Y substitution.**

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy** – soumis / \* Co-premiers auteurs



**Antiviral resistance and enzymatic characteristics for influenza A viruses bearing a group 1 neuraminidase (N1, N4 or N5) with the H274Y substitution**

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>GAYMARD, Alexandre; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Laboratoire de Virologie</p> <p>PICARD, Caroline; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1</p> <p>FROBERT, Emilie; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Laboratoire de Virologie</p> <p>CASALEGNO, Jean-Sébastien; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Laboratoire de Virologie</p> <p>SABATIER, Murielle; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1</p> <p>CORTAY, Jean-Claude; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1</p> <p>FERRARIS, Olivier; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1</p> <p>ROSA-CALATRAVA, Manuel; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1</p> <p>VALETTE, Martine; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Laboratoire de Virologie</p> <p>OTTMANN, Michèle; Université de Lyon, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1</p> <p>Lina, Bruno; Université Lyon 1 Faculté de Médecine Lyon-Est, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1; Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Laboratoire de Virologie</p> <p>ESCURET, Vanessa; Université Lyon 1 Faculté de Médecine Lyon-Est, Virpath Inserm U1111 CNRS UMR5308 CIRI UCBL1; Hospices Civils de Lyon, Laboratoire de Virologie</p>
Keywords:	influenza A viruses, group-1 neuraminidases, oseltamivir-resistance, NA-H274Y substitution, NA-H275Y substitution

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Confidential: for peer review only

1 **Antiviral resistance and enzymatic characteristics for influenza A viruses bearing a group 1**  
2 **neuraminidase (N1, N4 or N5) with the H274Y substitution**

3 **Running title: Group 1 neuraminidases and oseltamivir-resistance**

4 Alexandre Gaymard\*<sup>1,2</sup>, Caroline Picard\*<sup>1,2,3</sup>, Emilie Frobert<sup>1,2</sup>, Jean-Sébastien Casalegno<sup>1,2</sup>,  
5 Murielle Sabatier<sup>1</sup>, Jean-Claude Cortay<sup>1,4</sup>, Olivier Ferraris<sup>1,5</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>1</sup>, Martine  
6 Valette<sup>2</sup>, Michèle Ottmann<sup>1</sup>, Bruno Lina<sup>1,2</sup>, Vanessa Escuret<sup>1,2,#</sup>

7 \*Alexandre Gaymard and Caroline Picard are co-authors and participated equally to this work;

8 <sup>1</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS Lyon, CIRI, Inserm U1111, CNRS  
9 UMR5308, Virpath, F-69372, Lyon, France

10 <sup>2</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence virus influenzae France Sud, Laboratoire  
11 de Virologie, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex04, France ;

12 <sup>3</sup> CIRI, Centre National de référence des fièvres hémorragiques virales, Unité de biologie des  
13 infections virales émergentes, Institut Pasteur, F-69007, Lyon, France

14 <sup>4</sup> CRCL, Inserm U1052, CNRS UMR5286, F-69008, Lyon, France

15 <sup>5</sup> Unité de Virologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, F-91220, Brétigny sur Orge,  
16 France

17 **# Corresponding author**

18 Dr Vanessa Escuret

19 Virpath - Grippe, de l'émergence au contrôle

20 UMR5308, U1111 –Inserm, CNRS, UCBL1, ENS, CIRI

21 Bâtiment B, 4<sup>ème</sup> étage

22 Faculté de Médecine Lyon Est site RTH Laënnec

23 7 Rue Guillaume Paradin

24 69372 LYON CEDEX 08

25 Tél 1: (33) (0)4 78 77 10 08

26 Tél 2: (33) (0)4 78 77 87 11

27 Fax : (33) (0)4 78 77 87 51

28 Email : vanessa.escuret@univ-lyon1.fr

29 **(abstract word count : 243)**

30 **(text word count : 3481)**

31

Confidential: for peer review only

32 **Abstract**

33 **Background.** While subtype specific substitutions linked to neuraminidase (NA)-inhibitors (NAI)  
34 resistance are well described in human N1 and N2, little is known about resistance for other NA  
35 subtypes in zoonotic influenza viruses (IV). The aim of this study was to determine if compared to  
36 the human N1, the H274Y-substitution (N2 numbering) had a similar impact on the other group 1  
37 NA of avian IV (N4, N5, N8).

38 **Methods.** Reassortant IV bearing wild-type (WT) or H274Y-substituted N1, N4, N5 and N8 were  
39 prepared for production by reverse genetics and subsequent determination of antiviral susceptibility  
40 to NAI, neuraminidase activity, mutation stability and *in vitro* virus fitness in MDCK cells.

41 **Results.** The WT NA activities between reassortant viruses could be ranked as follow: N5>N1>N4;  
42 IV with N8 could not be rescued. Using NAIs-resistance interpretation criteria used for human NA,  
43 IV bearing N4 and N5 with NA-H274Y substitution had a highly reduced inhibition (HRI) by  
44 oseltamivir but a normal inhibition by zanamivir and laninamivir. Viruses bearing a NA-H274Y  
45 substitution had a lower affinity for MUNANA substrate than their WT counterpart. The *in-vitro*  
46 fitness in MDCK cells was reduced for viruses bearing the N4-H274Y substitution compared to all  
47 other reassortant viruses.

48 **Conclusions.** The NA-H274Y substitution lead to viruses with a HRI by oseltamivir for all group-1  
49 NAs studied with no reduction in virus fitness or catalytic activity in MDCK cells, except for N4.  
50 The surveillance and understanding of NAIs-resistance in zoonotic IV are important for optimal  
51 disease management.

52 **Keywords:** influenza A viruses, group-1 neuraminidases, oseltamivir-resistance, NA-H274Y  
53 substitution, NA-H275Y substitution.

54

## 55 1. Introduction

56 Influenza A viruses (IAV) have two major surface glycoproteins: the hemagglutinin (HA) and the  
57 neuraminidase (NA). Briefly, the HA is the major glycoprotein (ratio around 300 HA for 40 NA)  
58 that mediates virus entry by (i) binding to terminal sialic acid of cellular glycoconjugates and (ii)  
59 permitting subsequent fusion between viral and endosomal membranes after an acidic-pH induced  
60 conformational change of the HA<sup>1,2</sup>. The NA has a sialidase activity permitting virions release from  
61 cell surfaces after budding<sup>3</sup>. The NA is a homotetramer and its active site is located at the centre of  
62 each subunit. The NA active site forms a pocket composed of conserved residues in all IAVs  
63 including catalytic residues that interact directly with the substrate and framework residues that  
64 stabilize the active site<sup>4</sup>. The NAs are divided into three phylogenetic groups: group 1 (N1, N4, N5  
65 and N8), group 2 NAs (N2, N3, N6, N7 and N9) from IAV, and NA from influenza B viruses<sup>4</sup>.

66 Today, neuraminidase inhibitors (NAI) are active against all influenza viruses (IV), and are the only  
67 class of antivirals recommended by the WHO against human IV infections<sup>5</sup>. Oseltamivir is the  
68 most frequently used NAI. Between 1999 et 2006, oseltamivir-resistant IV were very rare and  
69 reported in immunocompromised patients treated by oseltamivir<sup>6,7</sup>. However, a stable and fit  
70 oseltamivir-resistant A(H1N1) IV bearing the H274Y substitution in N1 emerged in Europe and  
71 spread rapidly worldwide in 2007-2008. This phenomenon was not due to usage of antivirals, but  
72 was concomitant with the emergence of a new seasonal A(H1N1) IV variant that may have  
73 facilitated the emergence of the H274Y substitution in N1<sup>8,9</sup>.

74 In 2009, the emergence of the A(H1N1)pdm09 IV susceptible to all NAIs displaced the oseltamivir-  
75 resistant seasonal A(H1N1) IV<sup>10</sup>. However, two community clusters of A(H1N1)pdm09 IV bearing  
76 a H274Y substitution in N1 have been reported in 2011 in Australia<sup>11</sup> and in 2013 in Japan<sup>12</sup> in  
77 patients without oseltamivir exposure. As a consequence of this Japanese community cluster, the  
78 H274Y substitution in N1 was the most frequent substitution responsible for HRI by oseltamivir in  
79 2013-2014<sup>13</sup>. However, oseltamivir treatment of immunocompromised patients remained the  
80 leading cause for oseltamivir-resistance emergence in A(H1N1)pdm09 IV<sup>14</sup>.

81 In the community based surveillance, during the 2014-2015 Northern hemisphere influenza season,  
82 the detection of IV with HRI by NAI remained a rare event<sup>15</sup>.

83 Concerning human infection with avian A(H5N1) IV, some oseltamivir-induced resistance  
84 associated to the NA-H274Y substitution leading to treatment failure have been reported<sup>16-18</sup>.

85 This emphasizes the need to further investigate if this H274Y substitution known to confer HRI by  
86 oseltamivir in human and avian N1 has similar consequences on the other group 1 NAs.

87 The aim of our study was to evaluate the impact of this H274Y substitution in all group 1 NAs. To  
88 this end, we constructed reassortant IAV bearing wild type (WT) or substituted NA by reverse  
89 genetics and determined their antiviral susceptibility together with the enzymatic characteristics of  
90 these NAs. In addition, we performed growth kinetics and multiple passages in MDCK cells to  
91 study *in vitro* viral fitness and mutation stability.

## 92 **2. Materials and Methods**

### 93 **2.1. *Viruses and Cells***

94 The A/Lyon/969/2009(H1N1) IV was the first A(H1N1)pdm09 IV characterized by the National  
95 Influenza Center in Lyon<sup>19,20</sup>. IAVs with N4 and N8 [A/Turkey/Ontario/6118/68 (H8N4),  
96 A/Quail/Italy/1117/65 (H10N8)] were kindly provided in 2005 by Alan Hay (WHO Collaborating  
97 Centre of reference and research on influenza, NIMR, Mill Hill, London). The N5 originated from  
98 A/duck/Alberta/60/1976 (H12N5) IV (Pubmed accession number AB288335). This N5 was  
99 synthesized by Eurofins MWG/Operon and cloned in a pUC 57 vector.

100 Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells purchased from ATCC (CCL34) were used for reverse  
101 genetics, production, titration and passages of viruses. MDCK cells were mainly maintained in  
102 serum free Ultra-MDCK medium (Lonza) supplemented with 1% of L-Glutamine (L-Glu) and 2%  
103 of penicillin-streptomycin (PS) (Lonza). MDCK cells used for reverse genetics were maintained in  
104 Eagle minimum essential medium (EMEM) with Earle's Balanced Salt Solution without L-Glu

105 (Lonza) supplemented with 1% of L-Glu, 2% of PS, 10% of fetal bovine serum (FBS) (Lonza) and  
106 1% nonessential amino acids (Lonza).

107 293T cells purchased from ATCC (CRL-11-268) were used for reverse genetics and maintained in  
108 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5g/L glucose without L-Glu (Lonza)  
109 supplemented with 1% of L-Glu, 2% of PS and 10% of FBS.

## 110 **2.2. Cloning of neuraminidases in pHW2000 plasmid and mutagenesis**

111 Briefly, after extraction of viral RNAs (QIAamp viral RNA mini kit; Qiagen), two step RT-PCR  
112 was carried out as previously described for full-length amplification of N1, N4 and N8 gene  
113 segments<sup>21</sup>. After separation and purification (gel extraction kit Macherey Nagel), NA segments  
114 were cloned in an intermediate vector (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing;  
115 Invitrogen); except for N5 which was synthesized in pUC57. Then N1, N4, N5 segments were  
116 digested with *BsmBI* enzyme and N8 segment was digested with *AarI* (NEBiolabs), then each  
117 segment was purified and ligated (T4 DNA ligase NEBiolabs) into pHW2000.

118 Mutations were introduced in NA genes cloned in pHW2000 using QuickChange II XL site-  
119 directed mutagenesis kit (Stratagene) and appropriate primers (available on request) for H274Y  
120 substitution in N1, N4, N5 and N8. All numbering used in this paper are based on the N2  
121 numbering. All recombinant plasmids were sequenced (Genoscreen, Lille) to ensure the fidelity to  
122 the initial gene segment and/or the presence of the desired mutations.

## 123 **2.3. Generation of viruses by reverse genetics**

124 An eight-plasmid DNA transfection system was used to generate viruses using the  
125 A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) IV (abbreviated A/PR8)<sup>20</sup>. 293T cells in co-culture with MDCK cells  
126 (ratio of 70:30) were transfected by eight cDNA (PB2, PB1, PA, HA, NP, M, NS and NA of  
127 interest) cloned in the pHW2000 (1µg per plasmid) in the presence of lipofectamine (Life  
128 Technologies) in an OptiMEM medium (Gibco) with 0.3% BSA (Sigma). At 24 hours post-  
129 transfection, medium was changed and 1µg/mL of trypsin (Roche) was added to the culture.

130 Supernatants were harvested 72 hours post-transfection. Reassortant viruses bearing WT or H274Y-  
131 substituted N1, N4 or N5 were all rescued in the A/PR8 background to ensure comparison of NA  
132 enzymatic properties in a similar background. We could not rescue viruses bearing WT or  
133 substituted N8 neither in the A/PR8 nor using a A(H1N1)pdm09 background<sup>21</sup>. For N8, we also  
134 did reverse genetics experiments adding *Clostridium perfringens*' NA (2 mU/mL, Sigma) but  
135 without success. Experiments were performed in compliance with biosecurity conditions required  
136 by the French legislation.

#### 137 2.4. NA activity and inhibition assays

138 Oseltamivir carboxylate, zanamivir and laninamivir were kindly provided by Hoffmann-La Roche,  
139 Ltd., GlaxoSmithKline and Daiichi-Sankyo, respectively. The NA activity assay and the  
140 fluorometric inhibition assay were performed using a FLUOstar OPTIMA fluorometer (BMG  
141 LABTECH) as described in a previous study<sup>22</sup>, except MES buffer (pH 6.4) was used. Total NA  
142 activities were calculated as the quantity of 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid  
143 (MUNANA) substrate (Sigma) degraded to 4-methylumbelliferone (4-Mu) in 1 hour per mL of  
144 viral suspensions (nmol of 4-Mu/h/mL). The NA inhibition assay was performed using a  
145 standardized amount of NA activity (10 nmol of 4-Mu/h/mL). The inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>)  
146 were calculated using GraphPad (Prism) software. Interpretations of IAV inhibition by NAIs were  
147 based on fold increases in IC<sub>50</sub> values compared with values for susceptible viruses: normal  
148 inhibition (NI) was defined as <10-fold inhibition; reduced inhibition (RI), as 10 to 100-fold  
149 inhibition; and highly reduced inhibition (HRI), as >100-fold inhibition<sup>23</sup>.

#### 150 2.5. Enzymatic kinetic analysis of NA activities

151 The Michaelis-Menten constant (K<sub>m</sub>) was evaluated in virus supernatants, using the MUNANA  
152 substrate as previously described<sup>8,24</sup>. The 4-Mu fluorescence was measured each minute over 1  
153 hour with a FLUOstar Optima fluorometer (BMG Labtech). The initial velocity was calculated for

154 each substrate concentration and integrated into a non-linear Michaelis-Menten equation by the  
155 MARS program (BMG) to calculate  $K_m$ .

#### 156 **2.6. Infectious titres**

157 Infectious titres (TCID<sub>50</sub>/mL) were determined as end-point-titration assays on confluent MDCK  
158 cells in 96-well plates. Briefly, 50µL of serial 10-fold dilutions of each virus were inoculated into  
159 four replicate wells. The 96-well plates were incubated at 34°C for four days, and the presence of  
160 viruses in supernatants was then evaluated by checking for the cytopathic effects (CPE) and using a  
161 hemagglutination assay, with guinea pig erythrocytes (0.5%). Infectious titres were calculated using  
162 the Reed and Muench statistical method <sup>25</sup>.

#### 163 **2.7. Passages in MDCK cells**

164 Reverse genetics supernatants (200µL) were used to infect confluent MDCK cells in 24-well plates  
165 in EMEM (Lonza) supplemented with 1% L-Glu, 2% PS and 1µg/mL of trypsin (Infection  
166 Medium). Supernatants were harvested 72 hours post-infection (p.i.) depending on the induced CPE.  
167 Viruses that did not induce a CPE were harvested at 96 hours p.i. and inoculated again on MDCK  
168 cells until a CPE appears. Passage 1 (P1) (or P2 for viruses with a late CPE) supernatants (1mL)  
169 were used to infect confluent MDCK cells (25cm<sup>2</sup> flask) at a MOI of 10<sup>-3</sup> in order to obtain a  
170 sufficient virus production. Supernatants (P2 or P3) were harvested three days p.i. Then to evaluate  
171 the mutation stability, viruses were passaged successively in 24-well plates of MDCK cells for five  
172 more passages at a MOI of 10<sup>-3</sup>, except virus bearing a WT- or substituted-N5 which were passaged  
173 only three times.

#### 174 **2.8. NA sequencing**

175 Extraction of viral RNAs from MDCK supernatants was performed using the QIAmp Viral RNA  
176 Mini Kit (Qiagen). Two steps RT-PCR was performed using AMV RT (Promega), PFU-UltraII  
177 Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies) and specific primers (available on request).

178 Sanger sequencing of NA in all recombinant plasmids and NA extractions were performed on ABI  
179 Prism 3730XL DNA Analysers (Genoscreen Lille, France). Sequences were then analysed by  
180 SeqMan software.

### 181 **2.9. Kinetics in MDCK cells**

182 Confluent MDCK cells (25 cm<sup>2</sup> flask) were infected with each reassortant viruses at a MOI of 10<sup>-3</sup>.  
183 At the indicated hours p.i. (0h, 7h, 23h, 29h, 47h, 53h, 71h and 77h) 200µL of supernatants were  
184 harvested. Infectious titres of each collection were determined as described in a previous section.

### 185 **2.10. Statistical analysis**

186 The results of the activity, the Km and the IC<sub>50</sub> assays were analysed by a two-tailed Mann-Whitney  
187 test using GraphPad (Prism) software. The results were considered significantly different if the *P*  
188 value was <1% (*P*<0.01).

## 189 **3. Results**

### 190 **3.1. Growth and stability of viruses in MDCK cells**

191 Viruses bearing a N1 or a N5 (WT or substituted) induced a CPE after one passage in MDCK cells  
192 following reverse genetics experiments whereas viruses with WT or substituted N4 needed two  
193 passages in MDCK cells before a CPE was obtained. Viruses bearing the WT or substituted N8  
194 could not be rescued despite using another genetic background nor despite assays with *Clostridium*  
195 *perfringens*' NA added to the medium.

196 Considering viral production, all reassortant IAVs had viral titres between 6.30 and 9.07  
197 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL and titres remained stable for all passages (data not shown). No reversion of  
198 mutations was observed and no unexpected mutations were detected after three (for IV with N5) to  
199 five (for IV with N1 or N4) additional passages on MDCK cells.

### 200 3.2. Enzymatic characterization of NAs (Activity, Km) and inhibition assays (IC<sub>50</sub>)

201 The WT NA activities could be ranked as follow: N5 $\geq$ N1>N4. The NA-H274Y substitution  
202 induced a 2 to 2.5 fold decrease of the NA activity (Table1). The NA activities were also  
203 normalized against the viral titres and expressed as the quantity of 4-Mu formed during 1 hour per  
204 TCID<sub>50</sub> (nmol of 4-Mu/h/TCID<sub>50</sub>). There were no significant differences between the normalized  
205 NA activities of the WT NAs and their corresponding H274Y substituted-NAs. The normalized NA  
206 activities for viruses with a WT N1 and N5 were not significantly different (1.36E-07 and 1.61E-07  
207 nmol of 4-Mu/h/TCID<sub>50</sub>, respectively), but they were higher than the activity of the WT N4 (6.31E-  
208 08 nmol of 4-Mu/h/TCID<sub>50</sub>,  $P=0.010$  and  $0.009$ , respectively). Moreover, the normalized NA  
209 activities for all viruses bearing a substituted NA were also not significantly different (Figure 1A).

210 The Km represents the affinity of the NA for the MUNANA substrate. The lower the Km, the  
211 higher the affinity of the NA for its substrate is. The affinity for all WT NAs were significantly  
212 different and could be ranked as follow, conversely to the NA activities: N4>N1 ( $P<0.001$ ) >N5  
213 ( $P<0.001$ ). However, the affinity of the substituted N1 and N4 were not significantly different (73.4  
214 and 84.9  $\mu$ M of MUNANA, respectively) but they were higher than the affinity of the substituted  
215 N5 (177.5  $\mu$ M of MUNANA,  $P<0.001$  for both NAs) (Figure1B). To compare the impact of the  
216 NA-H274Y substitution on the Km between different reassortant IAVs, we calculated the Km ratio  
217 (substituted NA Km/corresponding WT NA Km). The NA-H274Y substitution induced a 2.2 to 3.6-  
218 fold decrease of NA affinity compared to corresponding WT NA (Table 1).

219 A graphic representation of oseltamivir, zanamivir and laninamivir IC<sub>50</sub> for the different reassortant  
220 viruses showed a similar impact of the studied H274Y-substitution in all group-1 NAs (Figure 2).  
221 Interpretations of the IAV inhibition by NAIs were based on WHO recommendations for human  
222 IAV as explained in methods section <sup>23</sup>. Viruses bearing the NA-H274Y substitution had a HRI by  
223 oseltamivir with a 161 to 614-fold increase in oseltamivir IC<sub>50</sub> according to the NA subtypes  
224 (Figure 2A). All these reassortant viruses had only a slight increase of the zanamivir and  
225 laninamivir IC<sub>50</sub> and presented a NI by these two NAI (Figure 2B and 2C).

### 226 3.3. Replicative capacity in MDCK cells

227 In replication kinetics experiments, the viral titre peaks of reassortant viruses with WT NA were  
228 obtained between 53 and 71 hours p.i. and were between 8.63 and 8.92 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL. The titre  
229 peaks of viruses with substituted NA were similar, between 8.30 and 9.13 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL. Viruses  
230 bearing the N5-H274Y substitution had a titre peak at 47h p.i. Viruses bearing the N1- or N4-  
231 H274Y substitution had later (between 71 and 77h) titre peaks and viruses with the N4-H274Y  
232 substitution had the lowest titre peak. At 29 hours p.i. the viral titre for viruses bearing the N4-  
233 H274Y substitution was only 4.80 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL and was lower than for all other viruses (Figure  
234 3).

### 235 4. Discussion

236 NAIs are the first-line of defense against a potential pandemic IAV but, except for A(H5N1) IV,  
237 little is known about NAI-resistance in avian IV. The drug susceptibility analysis of 125 avian  
238 A(H5N1) IV isolated from poultry in Vietnam between 2009 and 2011 revealed only one isolate  
239 with a NA-H274Y substitution conferring HRI by oseltamivir<sup>26</sup>. Between 2002 and 2007 only 4  
240 out of 1340 NA sequences from avian A(H5N1) IV isolates had a H274Y substitution<sup>18</sup>. Analysis  
241 of N1 antiviral susceptibility for avian and swine IAV revealed that oseltamivir susceptibility  
242 ranged widely among these viruses. When sequenced, the NA-H274Y substitution could not be  
243 detected in these oseltamivir-resistant IAV. However, other residue changes (ie. V267I, N307D and  
244 V321I) that may distort the hydrophobic pocket and impact NA active site were found in N1<sup>27</sup>.  
245 Toward a pandemic risk, a large number of NA sequences from avian isolates were screened for  
246 NA mutations known to confer at least RI by oseltamivir and/or zanamivir in human NA. Some NA  
247 substitutions were detected for N1, N5 and N8. The most frequent substitutions encountered were  
248 I117V in N1 and D198N in N5. *In vivo*, the H274Y substitution was detected in avian N1 but not in  
249 N4, N5 or N8<sup>28</sup>. The lack of *in vivo* isolates with N4- or N5- or N8-H274Y substitution could  
250 suggest a low fitness of IAV bearing such substituted NA in the absence of oseltamivir selection.

251 The impact of NA substitutions on NAIs susceptibility was rarely measured on avian IV isolates.  
252 To overcome this gap of knowledge, at least for the most frequent substitution encountered and  
253 associated to HRI by oseltamivir in N1 (NA-H274Y substitution), an investigation on recombinant  
254 viruses with different NAs was required. To our knowledge, our study is the first that reports the  
255 impact of the N4 and N5-H274Y substitution on both NAIs  $IC_{50}$  and NA enzymatic properties.  
256 However, we studied only one representative of each group 1 NA and other NAs could behave  
257 differently. We used the same A/PR8 background, known to be very permissive, in order to rescue  
258 and compare the impact of the mutation on the different NA subtypes. The genetic background has  
259 an impact on the glycoproteins quantities at the virion surface and on viral fitness, then results may  
260 be different with another viral background<sup>29</sup>.

261 Briefly, we showed that WT NA activities ( $N5 \geq N1 > N4$ ) ranked conversely to WT NA affinities for  
262 MUNANA substrate ( $N4 > N1 > N5$ ). NAs bearing the H274Y-substitution had a 2 fold decrease in  
263 NA activities whereas NA affinity was decreased mostly for H274Y-N4 (3.6 fold compared to 3  
264 and 2.2 fold for N5 and N1 respectively); as a consequence H274Y-substituted NA affinities ranked  
265  $N1 \geq N4 > N5$ . Considering the N1 enzymatic properties, our results on the N1 from the  
266 A(H1N1)pdm09 IV were similar to previous publications on other N1: the H274Y substitution in  
267 N1 induced a 2 fold decrease of NA affinity and a HRI by oseltamivir<sup>20,30</sup>. In IAV bearing N4 or  
268 N5-H274Y substitution, a HRI by oseltamivir but NI by zanamivir and laninamivir were found.  
269 Zanamivir and laninamivir have a very close structure explaining the similar impact of the H274Y-  
270 substitution on these NAI<sup>31</sup>. The IAV bearing the N4-H274Y substitution had the lowest *in vitro*  
271 fitness. This was supported by the need for a supplementary culture passage after reverse genetics  
272 and by kinetics experiments that showed lower viral titres compared to all other viruses. This  
273 reduced fitness may be related to the lowest NA activity of IAV bearing a WT N4 and to a more  
274 important impact of the H274Y substitution on N4 affinity for MUNANA substrate.

275 Considering previous studies on group 2 NAs, reassortant IAV bearing a N2-H274Y substitution  
276 had an oseltamivir  $IC_{50}$  of  $2.23 \pm 0.20$  nM (9.4 fold increase compared to IAV with WT N2)<sup>32</sup>. This

277 substitution induced only a 2.8-fold increase in oseltamivir IC<sub>50</sub> for a recombinant N2 protein<sup>33</sup>. In  
278 a recent study, IAV bearing a N3, N7 or N9-H274Y substitution had 12.2, 17.4 and 90.3 fold  
279 increase in oseltamivir IC<sub>50</sub> compared to IAV with corresponding WT NA<sup>34</sup>. These results suggest  
280 that the NA-H274Y substitution impact seems more NA-subtype dependent in group 2 than in  
281 group 1 NAs.

282 Zanamivir and oseltamivir were designed to target NA active site based on X-ray crystallographic  
283 structures available for N2 and N9<sup>35,36</sup>. Structural differences between group 1 and group 2 NAs  
284 could explain the differences of the NA-H274Y substitution impact on the susceptibility to  
285 oseltamivir according to the NA subtype. The main difference between group 1 and group 2 NAs  
286 was the presence of a 150-loop and a 150-cavity adjacent to the active site in group 1 NAs<sup>4,37</sup>.  
287 However this 150-cavity was not detected in the crystal structure of the N1 from A(H1N1)pdm09  
288 IV and the N1-H274Y substitution impact did not seem to have been modified by this structural  
289 change<sup>38</sup>. Another difference between group 1 and group 2 NAs was found at position 252 where  
290 the Y residue was usually conserved in N1 while a T or a H residue were found in group 2 NAs.  
291 Structural studies had shown that the conformation of E276 residue was important for an adapted  
292 oseltamivir binding in N1. Therefore, a Y252 residue added to a Y274 residue may prevent the  
293 rotation of the E276 residue required for accommodating the oseltamivir hydrophobic chain in N1<sup>39</sup>.  
294 Indeed Y is an aromatic bulky hydrophobic residue which stops the movement of other residue in  
295 the catalytic site.

296 A recent study focused on structural analysis of a N3 bearing an Y252 residue. The N3-H274Y  
297 substitution induced an oseltamivir IC<sub>50</sub> of 8.31 nM (16.6 fold increase versus WT N3) for this  
298 recombinant N3 protein. Therefore the Y252 residue added to Y274 residue induced only a RI by  
299 oseltamivir in this N3. Then this Y252 residue was not the only residue explaining HRI by  
300 oseltamivir. The conserved W295 residue and the variable residue in position 296 were suggested to  
301 be crucial determinants of HRI by oseltamivir in N3<sup>33</sup>. In this study, the residue in position 296  
302 was a K for the N3; in our study, the residue in position 296 was a H, R and N for N1, N4 and N5

303 respectively. The other residues in position 252, 276 and 295 were Y, E, and W respectively and  
304 were conserved for the N3 and the studied N1, N4 and N5. Then the interaction of the residues in  
305 position 296 with the W295 residue should be studied by comparison of crystal structure of WT or  
306 H274Y substituted NA in order to better understand the mechanism by which NA-H274Y  
307 substitution induced HRI by oseltamivir in group 1 NAs.

### 308 **Conclusions**

309 This study was performed on IV bearing a single representative of group-1 NAs. It provided  
310 preliminary data suggesting that H274Y-substitution is responsible for a HRI by oseltamivir in IV  
311 bearing N1, N4 or N5 with a conserved inhibition by zanamivir or laninamivir. The investigation of  
312 NA substitutions likely to confer HRI by oseltamivir should be continued in a larger number of  
313 avian and swine IAV isolates.

### 314 **Acknowledgements**

315 We thank Corinne Bergeron and Mathieu Yver for the A(H1N1)pdm09 reverse genetics system.  
316 We thank Mark Andrew Johnston for his advice on the English language. We also thank Stephanie  
317 Blaizot for his advice on statistical analysis.

### 318 **Funding information**

319 This study was supported by internal funding and performed in the field of the global surveillance  
320 of the susceptibility of influenza viruses to antiviral agents [performed by WHO and by the NIC  
321 (National Influenza Centre) for South of France supported by INVS (Institut National de Veille  
322 Sanitaire) in France].

### 323 **Transparency declarations**

#### 324 **(1) Conflict of interest**

325 V.E. received a travel grant from Roche Pharmaceuticals to attend the Fourth European Scientific  
326 Working Group on Influenza (ESWI) Influenza Conference in 2011 and declares potential conflict  
327 of interests with Sanofi-Pasteur (intervention in symposia in 2013).

328 B.L. declares potential conflicts of interests with Roche, GSK, BMS, and BioCryst. B.L. is a  
329 member of the scientific board of the GEIG and of the ESWI Board of Directors.

330 A.G., C.P., M.S., J.C.C., J.S.C., O.F., M.R.C., M.V., M.O. do not have any conflicts of interest to  
331 declare

332 (2) A part of this work was presented as an **oral presentation** (O 99) during the congress

333 “RICAI2014” November 27<sup>th</sup> 2014, Paris, France.

334

### 335 References

336 1. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The Influenza  
337 Hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 531–69.

338 2. Harris A, Cardone G, Winkler DC, *et al.* Influenza virus pleiomorphy characterized by  
339 cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**: 19123–19127.

340 3. Air GM. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; **6**: 245–56.

341 4. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, *et al.* The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase  
342 suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006; **443**: 45–9.

343 5. World Health Organization. *WHO Guidelines for Pharmacological management of Pandemic*  
344 *Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses*. 2010. Available at:  
345 [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mngt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf).

346 6. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, *et al.* Surveillance for neuraminidase inhibitor  
347 resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008.  
348 *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3284–92.

349 7. Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, Treanor J, Hayden FG. Recovery of drug-resistant influenza  
350 virus from immunocompromised patients: a case series. *J Infect Dis* 2006; **193**: 760–4.

351 8. Rameix-Welti M-A, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic properties of the  
352 neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural  
353 resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* 2008; **4**: e1000103.

354 9. Bloom JD, Gong LI, Baltimore D. Permissive secondary mutations enable the evolution of  
355 influenza oseltamivir resistance. *Science* 2010; **328**: 1272–5.

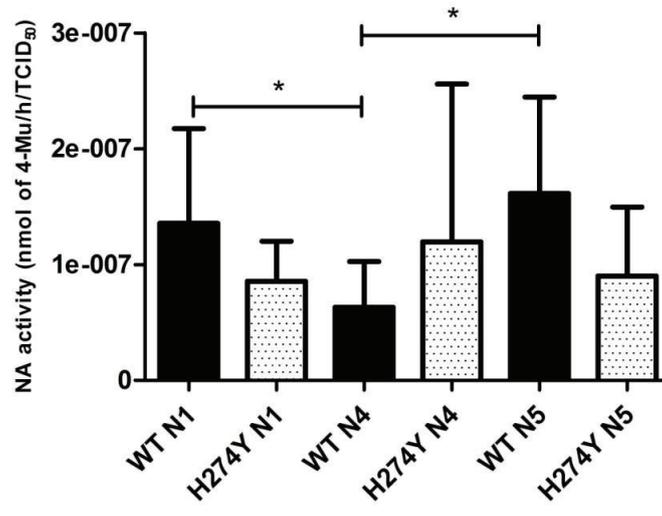
356 10. Hurt AC. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr Opin*  
357 *Virol* 2014; **8**: 22–9.

358 11. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, *et al.* Characteristics of a Widespread Community Cluster of  
359 H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *J Infect Dis* 2012; **206**: 148–  
360 57.

- 361 12. Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, *et al.* Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant  
362 influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic  
363 periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; **7**: 1390–9.
- 364 13. Takashita E, Meijer A, Lackenby A, *et al.* Global update on the susceptibility of human  
365 influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013–2014. *Antiviral Res* 2015; **117**: 27–38.
- 366 14. Okomo-Adhiambo M, Fry AM, Su S, *et al.* Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09  
367 Viruses, United States, 2013–14. *Emerg Infect Dis* 2015; **21**: 136–41.
- 368 15. Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, *et al.* Global update on the susceptibility of human  
369 influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015. *Antiviral Res* 2016; **132**: 178–85.
- 370 16. de Jong MD, Thanh TT, Khanh TH, *et al.* Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza  
371 A (H5N1) Infection. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2667–72.
- 372 17. Le QM, Kiso M, Someya K, *et al.* Avian flu: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*  
373 2005; **437**: 1108–1108.
- 374 18. Govorkova EA, Baranovich T, Seiler P, *et al.* Antiviral resistance among highly pathogenic  
375 influenza A (H5N1) viruses isolated worldwide in 2002–2012 shows need for continued monitoring.  
376 *Antiviral Res* 2013; **98**: 297–304.
- 377 19. Ottmann M, Duchamp MB, Casalegno J-S, *et al.* Novel influenza A(H1N1) 2009 in vitro  
378 reassortant viruses with oseltamivir resistance. *Antivir Ther* 2010; **15**: 721–6.
- 379 20. Ferraris O, Escuret V, Bouscambert M, *et al.* H1N1 influenza A virus neuraminidase modulates  
380 infectivity in mice. *Antiviral Res* 2012; **93**: 374–80.
- 381 21. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length  
382 amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001; **146**: 2275–89.
- 383 22. Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a  
384 study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase  
385 inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* 2005; **68**: 43–8.
- 386 23. World Health Organization. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza  
387 antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Relevé Épidémiologique Hebd*  
388 *Sect Hygiène Secrétariat Société Nations Wkly Epidemiol Rec Health Sect Secr Leag Nations* 2012;  
389 **87**: 369–74.
- 390 24. Casalegno J-S, Bouscambert-Duchamp M, Caro V, *et al.* Oseltamivir-resistant influenza  
391 A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res* 2010; **87**: 242–8.
- 392 25. Reed LJ, Muench H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints,. *Am J*  
393 *Epidemiol* 1938; **27**: 493–7.
- 394 26. Nguyen HT, Nguyen T, Mishin VP, *et al.* Antiviral Susceptibility of Highly Pathogenic Avian  
395 Influenza A(H5N1) Viruses Isolated from Poultry, Vietnam, 2009–2011. *Emerg Infect Dis* 2013;  
396 **19**: 1963–71.
- 397 27. Stoner TD, Krauss S, DuBois RM, *et al.* Antiviral Susceptibility of Avian and Swine Influenza  
398 Virus of the N1 Neuraminidase Subtype. *J Virol* 2010; **84**: 9800–9.

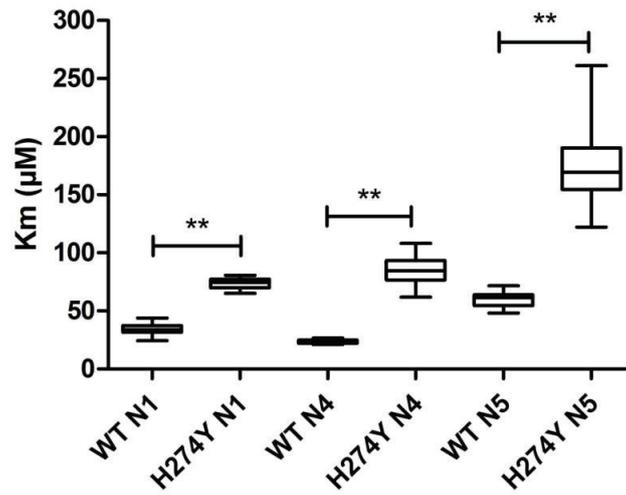
- 399 28. Orozovic G, Orozovic K, Lennerstrand J, Olsen B. Detection of Resistance Mutations to  
400 Antivirals Oseltamivir and Zanamivir in Avian Influenza A Viruses Isolated from Wild Birds Tripp  
401 R, ed. *PLoS ONE* 2011; **6**: e16028.
- 402 29. Moulès V, Terrier O, Yver M, *et al.* Importance of viral genomic composition in modulating  
403 glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology* 2011; **414**: 51–62.
- 404 30. Rameix-Welti MA, Agou F, Buchy P, *et al.* Natural Variation Can Significantly Alter the  
405 Sensitivity of Influenza A (H5N1) Viruses to Oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**:  
406 3809–15.
- 407 31. Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H, Kubo S. CS-8958, a Prodrug of  
408 the New Neuraminidase Inhibitor R-125489, Shows Long-Acting Anti-Influenza Virus Activity.  
409 *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 186–92.
- 410 32. Richard M, Deléage C, Barthélémy M, *et al.* Impact of influenza A virus neuraminidase  
411 mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors.  
412 *J Clin Virol* 2008; **41**: 20–4.
- 413 33. Li Q, Qi J, Wu Y, *et al.* Functional and structural analysis of influenza virus neuraminidase N3  
414 offers further insight into the mechanisms of oseltamivir resistance. *J Virol* 2013; **87**: 10016–24.
- 415 34. Song M-S, Marathe BM, Kumar G, *et al.* Unique Determinants of Neuraminidase Inhibitor  
416 Resistance among N3, N7, and N9 Avian Influenza Viruses. *J Virol* 2015; **89**: 10891–900.
- 417 35. Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen  
418 neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 1983; **303**: 35–40.
- 419 36. Baker AT, Varghese JN, Laver WG, Air GM, Colman PM. Three-dimensional structure of  
420 neuraminidase of subtype N9 from an avian influenza virus. *Proteins* 1987; **2**: 111–7.
- 421 37. Wang M, Qi J, Liu Y, *et al.* Influenza A Virus N5 Neuraminidase Has an Extended 150-Cavity  
422  $\nabla$ . *J Virol* 2011; **85**: 8431–5.
- 423 38. Li Q, Qi J, Zhang W, *et al.* The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in  
424 its active site. *Nat Struct Mol Biol* 2010; **17**: 1266–8.
- 425 39. Collins PJ, Haire LF, Lin YP, *et al.* Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus  
426 neuraminidase mutants. *Nature* 2008; **453**: 1258–61.
- 427
- 428

429 1A



430

431 1B



432

433

434 **Figure 1**

435

436

437

438

439

440 **Figure 1: NA activities and affinities in reassortant influenza A viruses depending on the NA**  
441 **subtypes**

442 Data presented are mean values  $\pm$  standard error for NA activities and mean values with minimum  
443 and maximum for NA affinities (Km).

444 NA activities and Km were determined using fluorometric assays, as described in Methods.

445 (1A) The NA activities were normalized against the viral titer and expressed as the quantity of 4-  
446 Methylumbelliferone released per h and per TCID<sub>50</sub>.

447 (1B) The Km represents the affinity of the NA for the MUNANA substrate. The lower is the Km  
448 and the higher is the affinity of the NA for its substrate.

449 Normalized NA activities and Km for reassortant IAV bearing a WT or substituted N1, N4 or N5  
450 were represented on this figure. The results were analysed by a Mann-Whitney test using Graphpad  
451 (Prism) software,\*  $P < 0.01$  and \*\*  $P < 0.001$ .

452 Abbreviation: 4-Mu, 4-Methylumbelliferone. IAV, influenza A virus. h, hour. NA, neuraminidase.

453 TCID<sub>50</sub>, median tissue culture infective dose, ie virus doses infecting 50% of the cell culture. WT,  
454 wild-type.

455

456

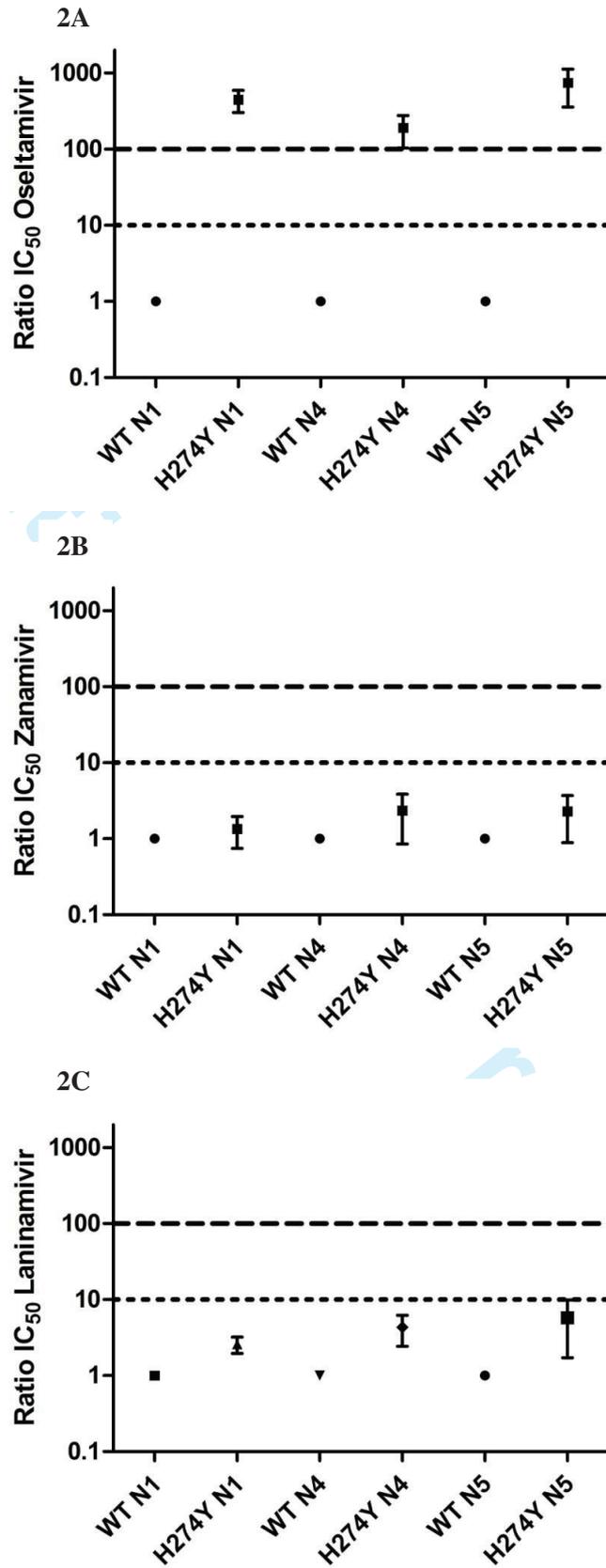
457

458

459

460

461 **Figure 2**



462 **Figure 2: Oseltamivir, Zanamivir and Laninamivir IC<sub>50</sub> ratios according to the NA subtype**  
463 **and NA-substitution**

464 Data presented are mean values ± standard error.

465 IC<sub>50</sub> were determined using fluorometric assays, as described in Methods. The ratios correspond to  
466 the fold differences in the oseltamivir IC<sub>50</sub> between reassortant IAV with a variant NA and IAV  
467 with the corresponding WT NA.

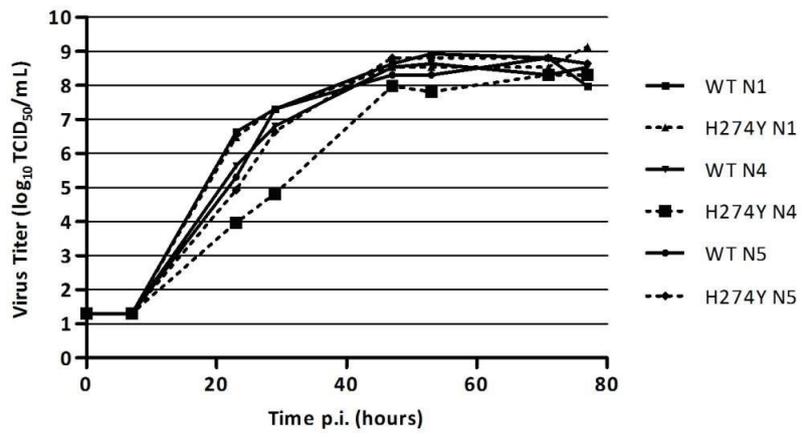
468 Oseltamivir (2A), zanamivir (2B) and laninamivir (2C) IC<sub>50</sub> ratios for reassortant IAV bearing a  
469 WT or a substituted N1, N4 or N5 are represented on this figure.

470 Interpretations of NA inhibition by oseltamivir are based on fold increases in IC<sub>50</sub> values compared  
471 to values for IAV with WT NA: normal inhibition (NI) was defined as <10-fold inhibition; reduced  
472 inhibition (RI), as 10 to 100-fold inhibition; and highly reduced inhibition (HRI), as >100-fold  
473 inhibition. The dotted line represents the 10-fold inhibition and the dashed line represents the 100-  
474 fold inhibition.

475 Abbreviation: IAV, influenza A virus. IC<sub>50</sub>, NAIs concentration able to inhibit 50% of the NA  
476 activity. WT, wild-type.

477

478



479

480

481 **Figure 3**

482

ntial: for peer review only

483 **Figure 3: Growth kinetics of reassortant influenza A viruses in MDCK cells**

484 Virus growth kinetics were assessed under 1-step conditions, using MDCK cells with the same  
485 passage history. The IAV were obtained by reverse genetics and produced in 25cm<sup>2</sup> flask. Each  
486 IAV from virus production was used at a MOI of 10<sup>-3</sup> to infect MDCK cells in the presence of  
487 trypsin (1 µg/mL). At 0, 7, 23, 29, 47, 53, and 77 hours after infection, 200 µL of supernatants were  
488 harvested and titrated (TCID<sub>50</sub>/mL) as described in Methods.

489 Growth kinetics of reassortant IAV bearing a WT (solid line) or H274Y (dotted line) substituted N1,  
490 N4 or N5 are represented on this figure.

491 Abbreviation: IAV, influenza A virus. TCID<sub>50</sub>, median tissue culture infective dose. p.i., post-  
492 infection.

493

494

Viruses with different NA	K <sub>m</sub> (μM) <sup>b</sup> (Ratio) <sup>c</sup>	Activity (nmol of 4-Mu/h/mL)	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>d</sup> (Ratio) <sup>e</sup>		
			Oseltamivir	Zanamivir	Laminamivir
WT N1	34.12 ± 5.44	19.33 ± 7.08	0.27 ± 0.09	0.46 ± 0.18	0.56 ± 0.23
H274Y substituted N1	73.39 ± 4.93 (2.2) **	9.86 ± 2.99	<b>116.18 ± 32.63 (430) **</b>	0.56 ± 0.19 (1.2)	1.36 ± 0.26 (2.4)
WT N4	23.75 ± 1.69 ##	9.77 ± 3.49 #	0.96 ± 0.48 ##	0.98 ± 0.43 ##	1.20 ± 0.67
H274Y substituted N4	84.88 ± 13.39 (3.6) **	5.31 ± 1.76	<b>154.41 ± 32.33 (161) ** +</b>	1.96 ± 0.67 (2) ++	4.37 ± 1.50 (3.6) **
WT N5	59.82 ± 6.84 ## JJ	45.75 ± 30.44 J	0.68 ± 0.28 ##	0.67 ± 0.32	0.46 ± 0.18
H274Y substituted N5	177.46 ± 35.31 (3.0) ** ++ JJ	18.07 ± 10.40	<b>368.32 ± 77.51 (542) ** ++ JJ</b>	1.16 ± 0.36 (1.7) ++ JJ	2.22 ± 0.76 (4.8) **

495

496 **Table 1**

497

498 **Table 1: Mean values of Km, activity and IC<sub>50</sub> for each reassortant influenza A viruses**

499 We measured Km, activity and IC<sub>50</sub> for each reassortant IAV bearing a WT or substituted NA at each MDCK passage following reverse genetics. Data  
500 are presented as mean values ± SD of Km, activity or IC<sub>50</sub> values obtained for one sort of reassortant IAV at different MDCK passages. Results were  
501 analysed by a two-tailed Mann-Whitney test using GraphPad (Prism) software.

502 \*  $P < 0.01$  and \*\*  $P < 0.001$  for the test against the corresponding WT NA. #  $P < 0.01$  and ##  $P < 0.001$  for the test between WT N4 or N5 against the WT  
503 N1. J  $P < 0.01$  and JJ  $P < 0.001$  for the test between WT N4 against the WT N5. +  $P < 0.01$  and ++  $P < 0.001$  for the test between H274Y substituted N4 or  
504 N5 against the H274Y substituted N1. 1  $P < 0.01$  and 11  $P < 0.001$  for the test between H274Y substituted N4 against the H274Y substituted N5.

505 <sup>a</sup> Names of the reassortant IAV NA with the the A/PR8 background.

506 <sup>b</sup> Km were determined using fluorometric assays and the MUNANA substrate, as described in Materials and Methods.

507 <sup>c</sup> Numbers in parentheses correspond to the fold differences in the Km between reassortant IAV with substituted NA versus the corresponding IAV  
508 with WT NA. The Km represents the affinity of the NA for the MUNANA substrate. The lower the Km, the higher the affinity of the NA for its  
509 substrate is.

510 <sup>d</sup> IC<sub>50</sub> were determined using fluorometric assays, as described in Materials and Methods.

511 <sup>e</sup> Numbers in parentheses correspond to the fold differences in the IC<sub>50</sub> between reassortant IAV with a substituted NA versus the corresponding IAV  
512 with WT NA. Interpretations of IAV inhibition by NAIs are based on fold increases in IC<sub>50</sub> values compared to values for susceptible viruses: normal  
513 inhibition was defined as <10-fold inhibition; reduced inhibition, as 10 to 100-fold inhibition; and highly reduced inhibition, as >100-fold inhibition  
514 (bold characters).

- 515 Abbreviation: Km, Michaelis-Menten constant. IAV, influenza A virus. NA, neuraminidase. NAIs, Neuraminidase inhibitors. IC<sub>50</sub>, NAIs concentration
- 516 able to inhibit 50% of the NA activity. WT, wild-type. A/PR8, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).
- 517

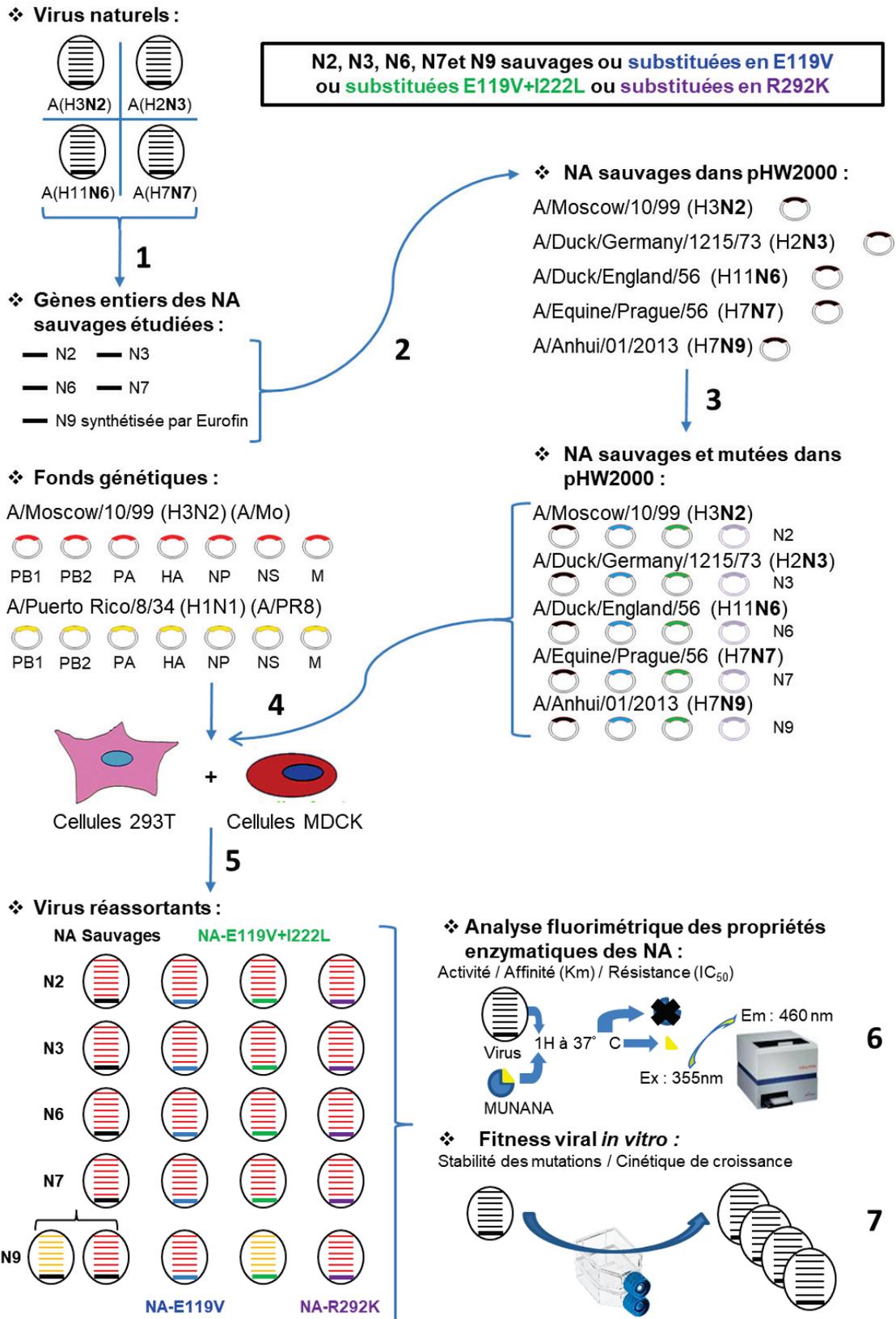
## Chapitre 2 : Étude de l'impact des substitutions

### E119V±I222L et R292K sur les neuraminidases du groupe 2

#### 2.1. Introduction

Les virus A(H3N2), porteurs d'une neuraminidase du groupe 2, sont responsables avec les virus A(H1N1) des épidémies saisonnières chez l'Homme. Au cours de ces infections et principalement après la mise en place d'un traitement par INA des résistances peuvent apparaître et mener les patients face à des impasses thérapeutiques. Pour les virus A(H3N2), les substitutions responsables des résistances aux INA les plus fréquemment observées *in vivo* sont la E119V et la R292K apparaissant chez des patients très immunodéprimés et sous pression de sélection (108,122–126). Ces mêmes mutations ont été observées au cours d'infections sévères chez l'Homme par les virus aviaires émergents A(H7N9) après la mise en place d'un traitement par INA. Actuellement, environ 10% des virus A(H7N9) seraient porteurs de la substitution R292K chez les patients traités par oseltamivir (Voir Partie A, Chapitre 2) (266). Il est donc possible que les substitutions de résistance aux INA aient un impact différent au sein d'un même groupe en fonction de la neuraminidase dans laquelle elles apparaissent. De plus, des substitutions secondaires en position 222 de la neuraminidase ont également été décrites pour avoir un rôle synergique sur le phénotype de résistance (Voir Partie A, Chapitre 3). Nous avons donc choisi d'évaluer l'impact de ces substitutions dans l'ensemble des neuraminidases du groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9).

Les virus réassortants ont été produits et analysés en utilisant la même méthodologie que celle décrite dans le chapitre précédent pour les virus porteurs de la substitution H274Y. Ainsi, les virus porteurs de neuraminidases sauvages (WT) du groupe 2 ont été comparés à des virus portant des neuraminidases substituées (E119V±I222L ou R292K). Ces virus ont été construits avec un fond génétique commun issu soit du virus A/Moscow/10/99 (H3N2) (abrégé A/Mo) soit A/PR8 (Figure 19). Tous les virus porteurs des substitutions R292K et E119V+I222L présentaient une diminution de leur sensibilité à l'oseltamivir. Cette diminution de sensibilité était d'intensité variable et pouvait toucher d'autres INA. La substitution E119V diminuait la sensibilité à l'oseltamivir seulement pour les virus porteurs de N2, N7 ou N9. Enfin, il est intéressant de noter que les virus portant la substitution R292K présentaient une diminution d'affinité pour leur substrat tandis que ceux porteurs de la substitution E119V présentaient une affinité accrue.



**Figure 19 :** Représentation schématique des étapes de production et d'étude des virus réassortants sauvages ou porteurs des mutations R292K ou E119V±I222L. 1/ Amplification des virus natifs sur MDCK ; 2/ Clonage des neuraminidases dans le plasmide pHW2000 ; 3/ Mutagenèse dirigée permettant d'obtenir les substitutions R292K, E119V ou I222L ; 4/ Association du fond génétique et des neuraminidases lors d'une étape de génétique inverse ; 5/ Amplification des virus réassortants ; 6/ Étude enzymatique des neuraminidases ; 7/ Cinétique de croissance des virus réassortants et étude de la stabilité de la résistance.

Que ce soit pour la substitution H274Y dans les virus A(H1N1) ou les substitutions E119V+I222L pour les virus A(H3N2), des travaux antérieurs ont montré une diminution d'expression de la neuraminidase mutée par rapport à la neuraminidase sauvage à la surface des cellules infectées (5,267). Mais les mécanismes conduisant à cette baisse d'expression de la neuraminidase ne sont pas encore connus et potentiellement différents selon les neuraminidases et les substitutions de résistance. Afin d'aller plus loin dans cette problématique nous avons entamé un développement technologique, décrit dans le chapitre suivant, pour permettre l'étude de la N9 sauvage ou présentant la substitution R292K.

## **2.2. Article publié**

GAYMARD A., Charles-Dufant A., Sabatier M., Cortay J.-C., Frobert E., Picard C., Casalegno J.-S., Rosa-Calatrava M., Ferraris O., Valette M., Ottmann M., Lina B., Escuret V. **Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group 2 neuraminidase (N2, N3, N6, N7 and N9).**

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2016 ; 71, 3036–3045.**



## Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group 2 neuraminidase (N2, N3, N6, N7 and N9)

Alexandre Gaymard<sup>1,2</sup>, Aymeric Charles-Dufant<sup>1</sup>, Murielle Sabatier<sup>1</sup>, Jean-Claude Cortay<sup>1</sup>, Emilie Frobert<sup>1,2</sup>, Caroline Picard<sup>1</sup>, Jean-Sébastien Casalegno<sup>1,2</sup>, Manuel Rosa-Calatrava<sup>1</sup>, Olivier Ferraris<sup>1</sup>, Martine Valette<sup>1,2</sup>, Michèle Ottmann<sup>1</sup>, Bruno Lina<sup>1,2</sup> and Vanessa Escuret<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon Est, CIRI Inserm U1111, équipe Virpath, F-69008, Lyon, France; <sup>2</sup>Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence virus influenzae France Sud, Laboratoire de Virologie, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon cedex 04, France

\*Corresponding author. Virpath-Grippe, de l'émergence au contrôle, U1111 Inserm, CNRS, UCBL1, ENS, CIRI, Bâtiment B, 4<sup>ème</sup> étage, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France. Tel: +(33)-(0)4-78-77-10-08/(33)-(0)4-78-77-87-11; Fax: +(33)-(0)4-78-77-87-51; E-mail: vanessa.escuret@univ-lyon1.fr

Received 18 February 2016; returned 22 April 2016; revised 1 June 2016; accepted 2 June 2016

**Objectives:** While subtype-specific substitutions linked to neuraminidase (NA) inhibitor resistance are well described in human N1 and N2 influenza NAs, little is known about other NA subtypes. The aim of this study was to determine whether the R292K and E119V + I222L substitutions could be associated with oseltamivir resistance in all group 2 NAs and had an impact on virus fitness.

**Methods:** Reassortant viruses with WT NA or variant N2, N3, N6, N7 or N9 NAs, bearing R292K or E119V + I222L substitutions, were produced by reverse genetics. The antiviral susceptibility, activity,  $K_m$  of the NA, mutation stability and *in vitro* virus fitness in MDCK cells were determined.

**Results:** NA activities could be ranked as follows regardless of the substitution:  $N3 \geq N6 > N2 \geq N9 > N7$ . Using NA inhibitor resistance interpretation criteria used for human N1 or N2, the NA-R292K substitution conferred highly reduced inhibition by oseltamivir and the N6- or N9-R292K substitution conferred reduced inhibition by zanamivir and laninamivir. Viruses with the N3- or N6-E119V substitution showed normal inhibition by oseltamivir, while those with the N2-, N7- or N9-E119V substitution showed reduced inhibition by oseltamivir. Viruses with NA-E119V + I222L substitutions showed reduced inhibition (N3 and N6) or highly reduced inhibition (N2, N7 and N9) by oseltamivir. Viruses bearing the NA-R292K substitution had lower affinity and viruses bearing the NA-E119V substitution had higher affinity for the MUNANA substrate than viruses with corresponding WT NA.

**Conclusions:** NA-R292K and E119V + I222L substitutions conferred reduced inhibition by oseltamivir for all group 2 NAs. Surveillance of NA inhibitor resistance for zoonotic and human influenza viruses and the development of novel antiviral agents with different targets should be continued.

### Introduction

Influenza A viruses (IAVs) are important human pathogens. These viruses present two major surface glycoproteins: haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). HA initiates the virus entry by binding to terminal sialic acid (SA) of cellular glycoconjugates.<sup>1</sup> NA facilitates the virion release from infected cells through its sialidase activity.<sup>2</sup> By recognizing the same host cell molecule, these glycoproteins have a complementary role in the replication cycle.

The NAs are divided into three phylogenetic groups: NA from influenza B viruses (IBVs) and group 1 (N1, N4, N5 and N8) and group 2 (N2, N3, N6, N7 and N9) NA from IAVs.<sup>3</sup> NA is a

homotetramer and the active site is located at the centre of each subunit. The active site forms a pocket composed of conserved residues in all IAVs: it includes catalytic residues (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 and Y406) that interact directly with the substrate and framework residues (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, E277, N294 and E425) that stabilize the active site.<sup>4,5</sup> All the numbering used in this paper is based on the N2 numbering.

Owing to its conserved structure and its essential role in viral propagation, NA is an attractive target for antiviral therapy. NA inhibitors (NAIs) are the only class of antivirals recommended by the WHO for the treatment and prophylaxis of influenza A

and B infections<sup>6</sup>; NAIs bind to the NA active site with a higher affinity than the natural SA and prevent the release of new virions from infected cells.<sup>7</sup> Two NAIs are currently licensed worldwide for therapeutic and prophylactic uses: oseltamivir (F. Hoffmann-La Roche) and zanamivir (GlaxoSmithKline). Two new NAIs, laninamivir (Daiichi Sankyo Company Ltd) and peramivir (BioCryst), are currently in clinical evaluation in different countries, but have already been approved in Japan (laninamivir and peramivir), Korea (peramivir) and the USA (peramivir).

The R292K and the E119V substitution are the most frequently encountered substitutions responsible for oseltamivir resistance in the N2 subtype.<sup>8–12</sup> The framework substitution (I222L) has been described to induce reduced inhibition (RI) by oseltamivir and zanamivir in A(H3N2) and in IBV.<sup>13,14</sup> An A(H3N2) virus bearing the N2-E119V+I222V substitutions was isolated from an immunocompromised child<sup>8</sup> and more recently the N2-E119V+I222L substitutions were shown to have a combinatorial effect on oseltamivir resistance.<sup>15</sup>

The recent human infections by avian IAV, H5N1 and H7N9 raise the issue of their treatment and the risk of emergence of NAI resistance. Since spring 2013, an A(H7N9) virus emerged in China causing human cases of severe respiratory infection, which can evolve towards acute respiratory distress syndrome and multiorgan failure.<sup>16</sup> Some mutations associated with NAI resistance have already been observed in patients infected by the A(H7N9) virus. The R292K substitution is the most frequent one, but E119V, I222K and I222R substitutions have also been found in a patient infected by A(H7N9) virus.<sup>17</sup>

In this study, we wanted to test if R292K and E119V+I222L substitutions known to cause NAI resistance in N2 had the same effect on the other group 2 NAs. To this end, we constructed reassortant viruses bearing WT or mutated NA by reverse genetics and determined their antiviral susceptibility together with the enzymatic characteristics of the NA. Growth kinetics and multiple passages in MDCK cells allowed us to study the *in vitro* virus fitness and mutation stability.

## Methods

### Viruses and cells

IAVs with N3, N6 and N7 were provided in 2005 by the WHO Collaborating Centre for reference and research on influenza, NIMR, Mill Hill, London [A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3), A/Duck/England/56 (H1N6) and A/Equine/Prague/56 (H7N7)]. The N9 gene segment from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) (GISAID accession number EPI439509) was synthesized by Eurofins. All IAVs with a human N2 (A/Moscow/10/99 (H3N2)) were produced previously in our laboratory and were already used for a previous study.<sup>18</sup>

MDCK cells purchased from ATCC (CCL34) were used for reverse genetics, production, titration and passages of viruses. MDCK cells were maintained in serum-free medium supplemented with 1% L-glutamine (L-Glu) and 2% penicillin/streptomycin (PS) (Lonza).

293T cells purchased from ATCC (CRL-11-268) were used for reverse genetics and maintained in DMEM with 4.5 g/L glucose without L-Glu supplemented with 1% L-Glu, 2% PS and 10% FBS (Lonza).

### Cloning of NAs in pHW2000 plasmid and mutagenesis

Briefly, after extraction of viral RNAs (QIAamp viral RNA mini kit; Qiagen), two-step RT-PCR was carried out as previously described for full-length

amplification of N3, N6 and N7 gene segments.<sup>19</sup> After separation and purification (gel extraction kit Macherey Nagel), NA segments were cloned in an intermediate vector (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing; Invitrogen); except for N9, which was synthesized in pUC57. Then each segment was digested with the BsmBI enzyme (NEBiolabs), then purified and ligated (T4 DNA ligase NEBiolabs) into pHW2000.

Mutations were introduced in NA genes (N2, N3, N6, N7 and N9) cloned in pHW2000 using a QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and appropriate primers (available on request) for each substitution (R292K and E119V±I222L).

### Generation of viruses by reverse genetics

An eight-plasmid DNA transfection system was used to generate viruses using the A/Moscow/10/99 (H3N2) (abbreviated A/Moscow) background or the A/PuertoRico/8/1934 (H1N1) (abbreviated A/PR8) background as previously described.<sup>19</sup> 293T cells in co-culture with MDCK cells (ratio of 70:30) were transfected by eight cDNA (PB2, PB1, PA, HA, NP, M, NS and NA of interest) cloned in the pHW2000 (1 µg per plasmid) in the presence of Lipofectamine (Life Technologies) in an OptiMEM medium (Gibco) with 0.3% BSA (Sigma). At 24 h post-transfection, transfection medium was changed and 1 µg/mL trypsin (Roche) was added to the culture. Supernatants were harvested 72 h post-transfection. Only viruses bearing the E119V+I222L-substituted N9 or the WT N9 were produced using an A/PR8 background. Experiments were performed in compliance with biosecurity conditions required by the French legislation.

### NA activity and inhibition assays

Oseltamivir carboxylate, zanamivir and laninamivir were kindly provided by Hoffmann-La Roche, Ltd, GlaxoSmithKline and Daiichi-Sankyo respectively. The NA activity assay and the fluorometric inhibition assay were performed using a FLUOstar OPTIMA fluorimeter (BMG LABTECH) as described in a previous study.<sup>20</sup> Total NA activities were calculated as the quantity of 2'-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate (Sigma) degraded to 4-methylumbelliferone (4-Mu) in 1 h per mL of viral suspensions (nmol of 4-Mu/h/mL). The NA inhibition assay was performed using a standardized amount of NA activity (10 nmol of 4-Mu/h/mL). The inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were calculated using GraphPad (Prism) software. Interpretations of IAV inhibition by NAIs are based on fold increases in IC<sub>50</sub> values as compared with values for susceptible viruses: normal inhibition (NI) was defined as <10-fold inhibition; RI was defined as 10–100-fold inhibition; and highly RI (HRI) was defined as >100-fold inhibition.<sup>21</sup>

### Enzymatic kinetic analysis of NA activities

The K<sub>m</sub> was evaluated in virus suspensions, using the MUNANA substrate as previously described.<sup>22,23</sup> The 4-Mu fluorescence was measured each minute over 1 h with a FLUOstar Optima fluorimeter (BMG Labtech). The initial velocity was calculated for each substrate concentration and integrated into a non-linear Michaelis–Menten equation by the MARS program (BMG) to calculate K<sub>m</sub>.

### Infectious titres

Infectious titres (TCID<sub>50</sub>/mL) were determined as end-point titration assays on confluent MDCK cells in 96-well plates. Briefly, 50 µL of serial 10-fold dilutions of each virus were inoculated into four replicate wells. The 96-well plates were incubated at 34°C for 4 days, and the presence of viruses in supernatants was then evaluated by checking for the CPE and using a haemagglutination assay, with chicken erythrocytes (0.5%). Infectious titres were calculated using the Reed and Muench<sup>24</sup> statistical method.

### Passages in MDCK cells

Reverse genetic supernatants (200  $\mu$ L) were used to infect confluent MDCK cells in 24-well plates in EMEM (Lonza) supplemented with 1% L-Glu, 2% PS and with 1  $\mu$ g/mL trypsin (Infection Medium). Supernatants were harvested 72 h post-infection (p.i.) depending on the induced CPE. Viruses that did not induce a CPE were harvested at 96 h p.i. and inoculated again on MDCK cells until a CPE appeared. Passage 1 (P1) (or P2 for viruses with a late CPE) supernatants (1 mL) were used to infect confluent MDCK cells (25 cm<sup>2</sup> flask) at moi 10<sup>-3</sup> or 10<sup>-2</sup> to obtain sufficient virus production. Supernatants (P2 or P3) were harvested 3 days p.i. Viruses were then passaged successively in 24-well plates of MDCK cells for three more passages at moi 10<sup>-3</sup>.

### NA sequencing

Extraction of viral RNAs, from the first and last MDCK passage supernatants, was performed using the QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Two-step RT-PCR was performed using AMV RT (Promega), PFU-UltraII Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies) and specific primers (available on request).

Sanger sequencing of NA in all recombinant plasmids and NA extractions was performed on ABI Prism 3730XL DNA Analysers (Genoscreen Lille, France). Sequences were then analysed using SeqMan software.

### Kinetics in MDCK cells

Confluent MDCK cells (25 cm<sup>2</sup> flask) were infected with reassortant viruses from virus production at moi 10<sup>-3</sup>. At the indicated hours p.i. (0, 7, 23, 29, 47, 53, 71 and 77 h), 200  $\mu$ L of supernatants were harvested. Infectious titres of each collection were determined as described in a previous section.

### Statistical analysis

The results of the activity, the  $K_m$  and the IC<sub>50</sub> assays were analysed by a two-tailed Mann-Whitney test using GraphPad (Prism) software. The results were considered significantly different if the *P* value was <1% (*P*<0.01).

## Results

### Growth and stability of reassortant IAVs in MDCK cells

Viruses with the N6-, N7-, N9-R292K, N9-E119V and N7-E119V+I222L substitutions induced a CPE only after two passages in MDCK cells following reverse genetic experiments (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). Viruses bearing the N9-E119V+I222L substitution could be rescued only using an A/PR8 background. Considering viral production, all reassortant IAVs had viral titres between 6.30 and 8.80 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL and titres remained stable for all passages (Table S1). No reversion of mutations was observed after additional passages on MDCK cells and one additional mutation was detected only for IAV bearing R292K-N6 (Table S1).

### Enzymatic characterization of NAs (activity, $K_m$ ) and inhibition assays (IC<sub>50</sub>)

The NA activities were normalized against the viral titre and expressed as the quantity of 4-Mu formed during 1 h per TCID<sub>50</sub>. The NA activity for all viruses bearing a WT or substituted NA could be ranked as follows regardless of the substitution:

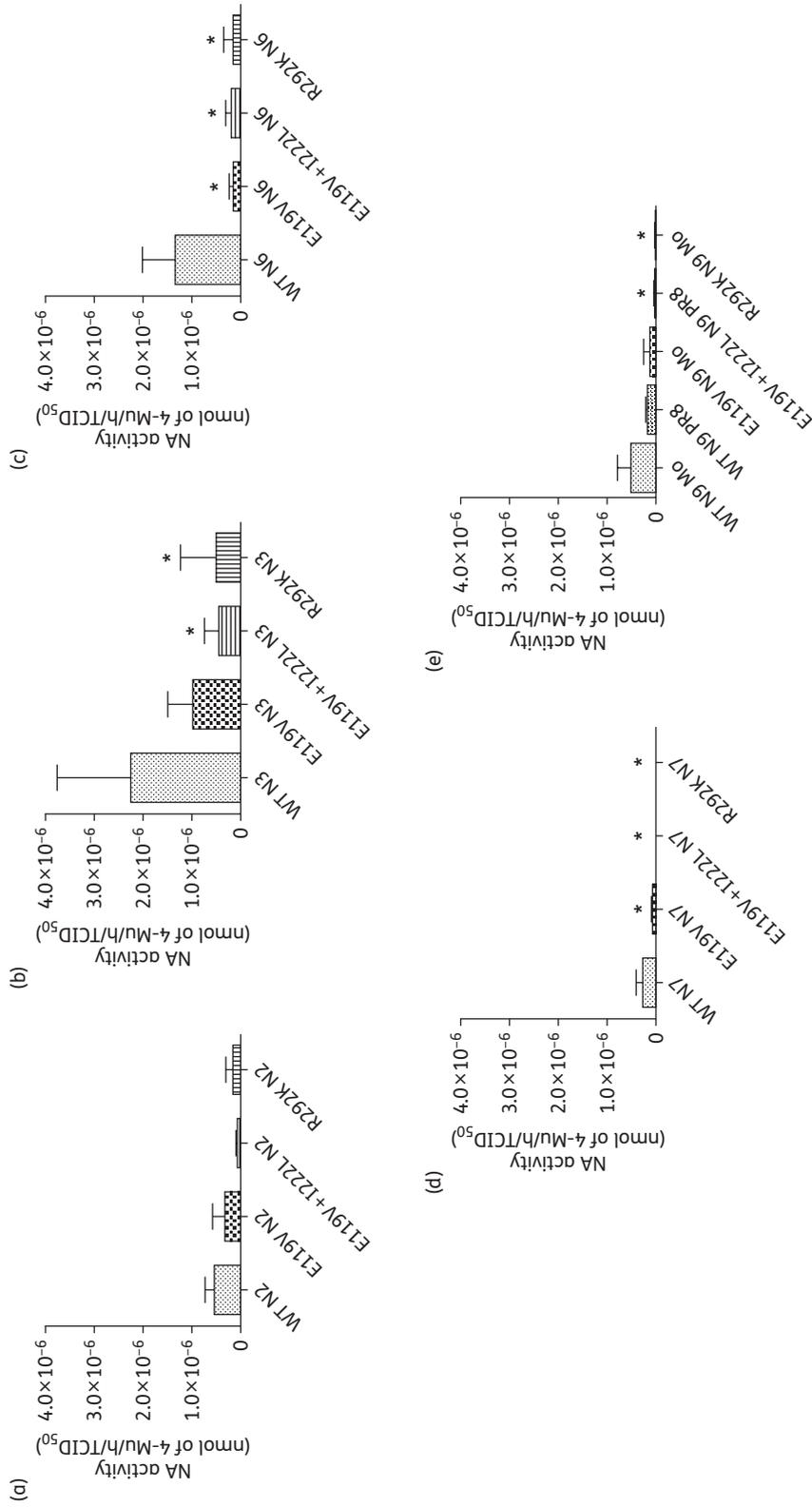
N3  $\geq$  N6 > N2  $\geq$  N9 > N7 (Figure 1). There was no significant difference between the two WT N9 activities using the A/Moscow or the A/PR8 background (5.23E-07 and 1.83E-07 nmol of 4-Mu/h/TCID<sub>50</sub>, respectively). The NA-R292K and NA-E119V+I222L substitutions decreased significantly NA activity compared with the WT NA activity (*P* between <0.0001 and 0.0091). However there was no difference between the activities of the double substituted NA and the R292K variant NA. Only the E119V variant N6 and N7 had a significantly decreased activity (*P*=0.0091 for both NAs) compared with that of the corresponding WT NA. The E119V+I222L variant N7 activities were always near 0 (Figure 1).

A graphic representation of oseltamivir IC<sub>50</sub> for the different reassortant viruses showed a quite similar impact of the studied NA substitutions for all group 2 NAs (Figure 2). Interpretations of the IAV inhibition by NAIs were based on WHO recommendations for human IAV as explained in the Methods section.<sup>21</sup> The NA-R292K substitution conferred HRI by oseltamivir with a 6175–20300-fold increase in oseltamivir IC<sub>50</sub> according to the NA subtypes (Figure 2). The N6 and N9-R292K substitution also conferred RI by zanamivir (21-fold increase in IC<sub>50</sub> for both viruses) and laninamivir (13- and 10-fold increase in IC<sub>50</sub>, respectively). All other reassortant viruses showed NI by zanamivir and laninamivir (Table 1). Viruses bearing E119V variant N3 or N6 showed NI by oseltamivir, whereas viruses with E119V variant N7 or N9 showed RI by oseltamivir (48- and 29-fold increase in IC<sub>50</sub>, respectively) and viruses with E119V variant N2 showed HRI by oseltamivir (296-fold increase in IC<sub>50</sub>). Viruses bearing E119V+I222L-substituted N3 or N6 showed RI by oseltamivir (46- and 90-fold increase in IC<sub>50</sub>, respectively) and those bearing E119V+I222L-substituted N2, N7 or N9 showed HRI by oseltamivir (1850-, 300- and 235-fold increase in IC<sub>50</sub>, respectively) (Table 1).

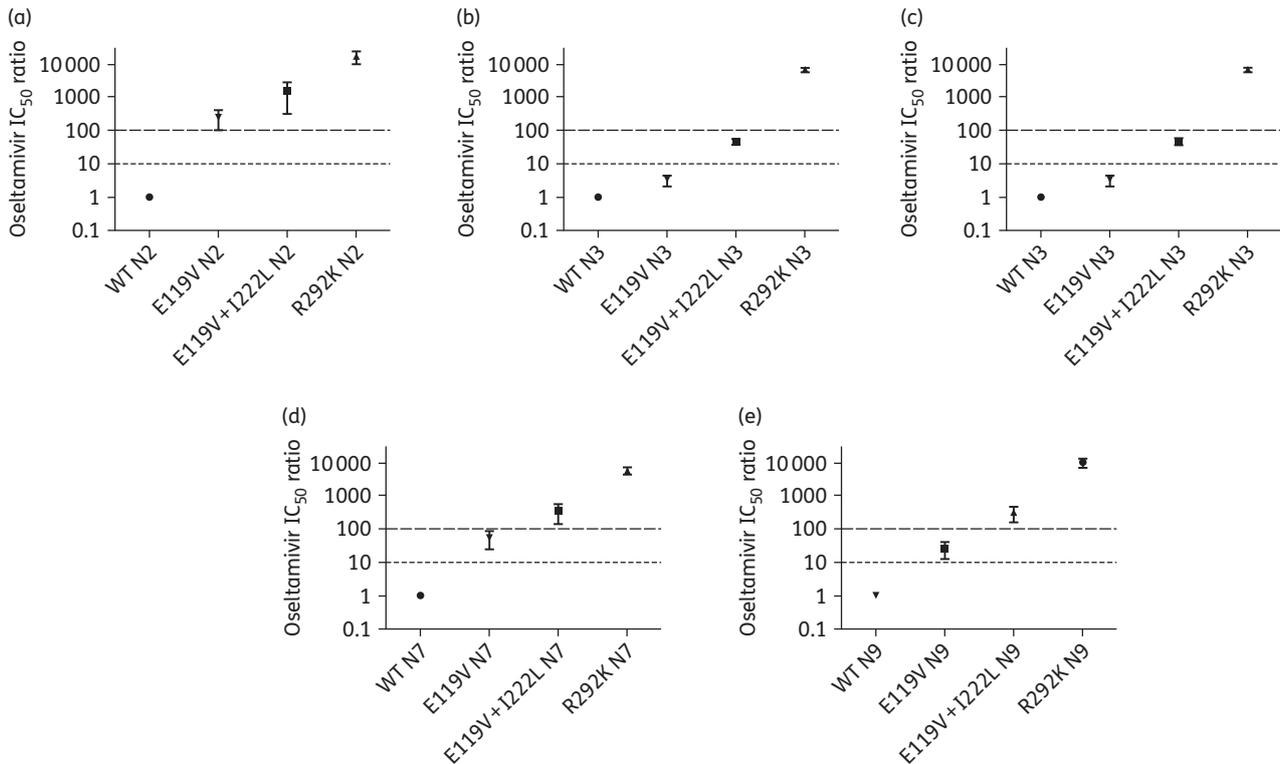
The  $K_m$  represents the affinity of the NA for the MUNANA substrate. The lower the  $K_m$ , the higher the affinity of the NA for its substrate. Comparisons of  $K_m$  values between IAVs bearing substituted NA versus WT NA showed significant differences for N3, N6, N7 and N9 (Table 1). To compare the  $K_m$  between different reassortant IAVs, we calculated the  $K_m$  ratio (mutated NA  $K_m$ /corresponding WT NA  $K_m$ ). The NA-R292K substitution induced a 4–13-fold decrease in NA affinity compared with WT NA. For all NA tested, the E119V substitution induced a 2–3-fold increase in NA affinity compared with the corresponding WT NA. The NA-E119V+I222L substitutions induced a 1.5-fold increase in NA affinity for the substituted N3, N6 and N9, but a 3-fold decrease in NA affinity for the substituted N2 compared with the corresponding WT NA.  $K_m$  could not be interpreted precisely for the E119V+I222L- and R292K-substituted N7 due to too low NA activity (Table 1).

### Replicative capacity in MDCK cells

In replication kinetics experiments, the viral titre peaks of reassortant viruses with WT NA were obtained at 53 h p.i. and were between 7.80 and 9.13 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL. Viruses bearing the NA-R292K substitution had later (usually at 71 h) and lower viral titre peaks (0.5–1 log-fold decrease) than viruses bearing the corresponding WT NA. Viruses bearing NA-E119V+I222L substitutions had viral titre peaks at 47–53 h p.i. that were 0.3–1.3-fold lower than those of viruses bearing corresponding WT NA. Viruses bearing WT or E119V+I222L-substituted N9



**Figure 1.** NA activities in reassortant IAVs depending on the NA subtype. Data are presented as mean ± SD. NA activities were determined using fluorometric assays, as described in the Methods section. NA activities were normalized against the viral titre and expressed as the quantity of 4-Mu released per hour and per TCID<sub>50</sub>. Normalized NA activities for reassortant IAVs bearing a WT NA or a substituted NA are presented: N2 (a), N3 (b), N6 (c), N7 (d) or N9 (e). Results were analysed by a two-tailed Mann-Whitney test using GraphPad (Prism) software. \*P < 0.01 for the test against the virus with the corresponding WT NA. Mo, A/Moscow background; PR8, A/PR8 background; TCID<sub>50</sub>, median tissue culture infective dose, i.e. virus dose infecting 50% of the cell culture.



**Figure 2.** Osetamivir IC<sub>50</sub> ratios according to the NA subtype and NA substitution. Data are presented as mean ± 95% CI. IC<sub>50</sub> was determined using fluorometric assays, as described in the Methods section. Ratios correspond to the fold differences in the osetamivir IC<sub>50</sub> between a reassortant IAV with a variant NA and IAV with the corresponding WT NA. Osetamivir IC<sub>50</sub> ratios for reassortant IAVs bearing a WT NA or a substituted NA are presented: N2 (a), N3 (b), N6 (c), N7 (d) or N9 (e). Interpretations of NA inhibition by osetamivir are based on fold increases in IC<sub>50</sub> values compared with values for IAV with WT NA: NI, <10-fold inhibition; RI, 10–100-fold inhibition; HRI, >100-fold inhibition. Dotted line represents the 10-fold inhibition; dashed line represents the 100-fold inhibition. IC<sub>50</sub>, NAI concentration able to inhibit 50% of the NA activity.

had the same viral peaks (peak times and peak titres) whatever the genetic background used (A/PR8 or A/Moscow). Viruses bearing the E119V-substituted NA had just later viral titre peaks than their corresponding viruses bearing a WT NA (at 53–71 h p.i.) (Figure 3). Viral titres were estimated to be significantly different if the viral titre variation between two reassortant viruses was >1 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL.

## Discussion

The aim of our study was to assess the impact of the NA-R292K or NA-E119V ± I222L substitutions for N2, N3, N6, N7 and N9 using a reverse genetic approach. A very recent work has identified NA amino acid substitutions associated with NAI resistance for N3, N7 and N9 subtypes using a random mutagenesis and reverse genetic (A/PR8 background) approach.<sup>25</sup> We confirmed that the E119V and R292K substitutions confer NAI resistance among all group 2 NAs, including N6. Despite a different genetic background, the IC<sub>50</sub> values that we observed are close to published results for WT or substituted N2, N3, N6, N7 and N9.<sup>17,25–29</sup> However our approach was only *in vitro*, we obtained results only for a single NA representing each subtype and other NAs for the same subtype could behave differently. We could not predict the fitness

of viruses bearing such NA substitutions in naturally occurring viruses. The virus bearing an N9-E119V+I222L substitution could be rescued only with the A/PR8 background known to be very permissive. Moreover, a previous study has demonstrated that quantities of glycoproteins at the virion surface are dependent on the genetic background and IAV subtype.<sup>30</sup>

The R292 residue is a catalytic and highly conserved residue that interacts with the carboxylate group on the C-2 of SA, osetamivir or zanamivir; the R292K substitution prevents this hydrogen bond interaction.<sup>3</sup> The E119 and I222 residues are framework residues and are highly conserved among all IAVs. This E119 amino acid forms a hydrogen bond with the hydroxyl group on the C-4 of SA, and with the amino group on the C-4 of osetamivir. The I222 amino acid has a side chain that forms with the W178 residue a hydrophobic pocket in which lies the methyl group of the acetamido group of the SA and osetamivir.<sup>7</sup> The E119V+I222L substitutions do not prevent SA linkage, but impair the optimal position of osetamivir.<sup>15</sup>

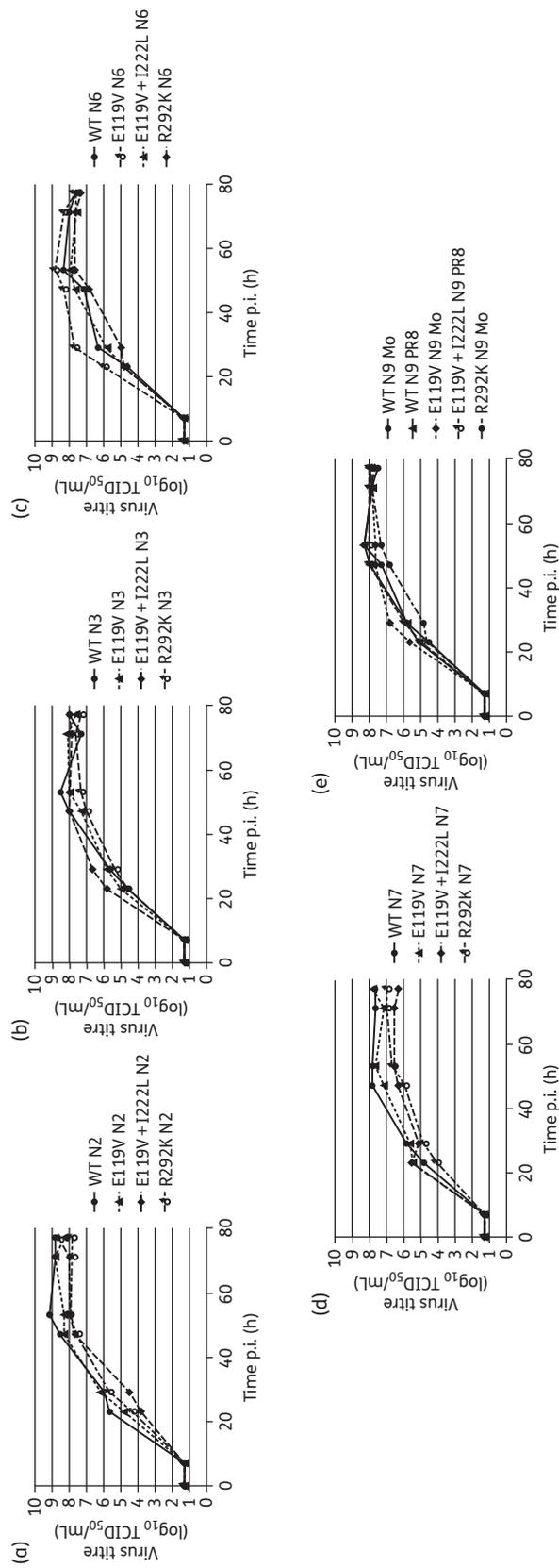
The R292K substitution is responsible for an important decrease in N2 activity and a reduced infectivity and viral fitness *in vivo*.<sup>31,32</sup> In human N2 subtype, the R292K substitution confers HRI by osetamivir (10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup>-fold increase in IC<sub>50</sub>) and RI by zanamivir.<sup>10,12</sup> The analysis of reassortant viruses obtained by reverse genetics gave similar results.<sup>33</sup> The R292K substitution was

**Table 1.** Mean values of  $K_m$  and  $IC_{50}$  for each reassortant IAV

Viruses with different NAs <sup>d</sup>	$K_m$ ( $\mu M$ ) <sup>b</sup> (ratio) <sup>c</sup>	Activity (nmol of 4-Mu/h/mL) <sup>b</sup>	$IC_{50}$ (nM) <sup>b</sup> (ratio) <sup>d</sup>		
			oseltamivir	zanamivir	laninamivir
WT N2	6.7 ± 1.2	101.4 ± 73.0	0.2 ± 0.0	1.9 ± 0.0	1.9 ± 0.0
E119V-substituted N2	3.1 ± 0.9 (0.5)	42.8 ± 30.7	<b>59.3 ± 23.2 (296)*#</b>	1.8 ± 0.4 (1)	2.4 ± 0.5 (1)
E119V + I222L-substituted N2	19.3 ± 1.8 (3)	9.9 ± 3.0	<b>370.0 ± 186.7 (1850)*#J</b>	10.4 ± 3.4 (5)	10.0 ± 1.8 (5)
R292K-substituted N2	30.7 ± 8.2 (5)	13.8 ± 7.4	<b>4060.0 ± 1051.0 (20300)*</b>	6.5 ± 2.2 (3)	5.1 ± 1.2 (3)
WT N3	87.8 ± 17.6	143.6 ± 30.3	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.5	2.9 ± 0.1
E119V-substituted N3	31.3 ± 2.3 (0.4)*#	103.0 ± 9.5	2.0 ± 0.5 (3)*#	1.4 ± 0.6 (1)#	2.0 ± 0.7 (0.7)
E119V + I222L-substituted N3	58.4 ± 6.3 (0.7)*#	43.3 ± 5.4	<b>27.5 ± 7.1 (46)*#J</b>	4.3 ± 1.1 (3)*#J	2.3 ± 0.4 (0.8)
R292K-substituted N3	328.8 ± 74.6 (4)*	13.7 ± 3.4	<b>4103.0 ± 663.3 (6838)*</b>	12.9 ± 2.7 (9)*	7.8 ± 1.9 (3)
WT N6	167.3 ± 52.7	67.8 ± 23.1	0.8 ± 0.2	3.0 ± 0.7	3.7 ± 1.0
E119V-substituted N6	58.3 ± 8.1 (0.3)*#	71.0 ± 3.6	6.9 ± 1.0 (9)*#	3.1 ± 0.9 (1)#	1.7 ± 0.4 (0.5)
E119V + I222L-substituted N6	132.6 ± 28.7 (0.8)#J	8.1 ± 1.2	<b>72.2 ± 10.6 (90)*#J</b>	9.2 ± 2.3 (3)*#J	3.1 ± 0.9 (0.9)
R292K-substituted N6	693.3 ± 226.7 (4)*	1.6 ± 1.2	<b>12924.0 ± 4252.0 (16155)*</b>	<b>63.4 ± 12.9 (21)*</b>	<b>49.2 ± 8.6 (13)</b>
WT N7	81.4 ± 6.4	19.0 ± 4.1	0.8 ± 0.2	4.2 ± 1.2	4.2 ± 1.4
E119V-substituted N7	30.3 ± 3.1 (0.3)*	6.3 ± 0.6	<b>38.5 ± 14.0 (48)*#</b>	4.9 ± 1.7 (1)#	2.2 ± 0.8 (0.5)
E119V + I222L-substituted N7	NI	ND	<b>240.3 ± 176.7 (300)*#J</b>	14.3 ± 10.1 (3)	5.7 ± 1.5 (1)
R292K-substituted N7	NI	ND	<b>4940.0 ± 2153.0 (6175)*</b>	29.8 ± 15.5 (7)*	16.7 ± 3.9 (4)
WT N9	163.6 ± 14.3	21.4 ± 4.6	0.7 ± 0.2	1.7 ± 0.8	1.5 ± 0.5
E119V-substituted N9	43.0 ± 2.6 (0.3)*#	29.0 ± 2.6	<b>20.1 ± 5.5 (29)*#</b>	2.9 ± 0.6 (2)*#	1.6 ± 0.8 (1)
WT N9 (PR8 background)	192.0 ± 1.0	12.7 ± 4.1	1.0 ± 0.8	1.3 ± 0.2	3.2 ± 1.0
E119V + I222L-substituted N9 (PR8 background)	119.3 ± 17.6 (0.6)*#J	3.4 ± 0.5	<b>235.3 ± 69.3 (235)*#J</b>	8.5 ± 2.8 (7)*#J	2.9 ± 0.2 (1)
R292K-substituted N9	2155.0 ± 1957.0 (13)*	0.7 ± 0.8	<b>6742.0 ± 2291.0 (9631)*</b>	<b>35.5 ± 6.3 (21)*</b>	<b>14.2 ± 4.8 (9)</b>

$K_m$ , Michaelis-Menten constant;  $IC_{50}$ , NAI concentration able to inhibit 50% of the NA activity; ND, undetectable; NI, not interpretable. We measured  $K_m$  activity and  $IC_{50}$  for each reassortant IAV bearing a WT or substituted NA at each MDCK passage following reverse genetics. Data are presented as mean ± SD of  $K_m$  activity or  $IC_{50}$  values obtained for one sort of reassortant IAV at different MDCK passages. Results were analysed by a two-tailed Mann-Whitney test using GraphPad (Prism) software. \* $P < 0.01$  for the test against the virus with the corresponding WT NA. # $P < 0.01$  for the test against the virus with the corresponding R292K-substituted NA. J $P < 0.01$  for the test against the virus with the corresponding E119V-substituted NA.

<sup>a</sup>Names of the NAs of reassortant IAVs with the A/Moscow background or the A/PR8 background (only for reassortant IAV with WT N9 or E119V + I222L-substituted N9). <sup>b</sup> $K_m$  activity and  $IC_{50}$  were determined using fluorometric assays and the MUNANA substrate, as described in the Methods section. <sup>c</sup>Numbers in parentheses correspond to the fold differences in the  $K_m$  between a reassortant IAV with variant NA versus the corresponding IAV with WT NA.  $K_m$  represents the affinity of the NA for the MUNANA substrate. The lower the  $K_m$ , the higher the affinity of the NA for its substrate. <sup>d</sup>Numbers in parentheses correspond to the fold differences in the  $IC_{50}$  between a reassortant IAV with a variant NA versus the corresponding IAV with WT NA. Interpretations of IAV inhibition by NAIs are based on fold increases in  $IC_{50}$  values compared with values for susceptible viruses; NI, <10-fold inhibition (no formatting); RI, 10–100-fold inhibition (italic and bold formatting); HRI, >100-fold inhibition (bold formatting).



**Figure 3.** Growth kinetics of reassortant IAVs in MDCK cells. Virus growth kinetics were assessed under one-step conditions, using MDCK cells with the same passage history. IAVs were obtained by reverse genetics and produced in 25 cm<sup>2</sup> flasks. Each IAV from virus production was used at  $10^{-3}$  to infect MDCK cells in the presence of trypsin (1  $\mu$ g/mL). At 0, 7, 23, 29, 47, 53 and 77 h p.i., 200  $\mu$ L aliquots of supernatants were harvested and titrated (TCID<sub>50</sub>/mL) as described in the Methods section. Growth kinetics of reassortant IAVs bearing a WT NA (solid line) or E119V-substituted (dotted line) or E119V + I222L-substituted (dashed line) or R292K-substituted (dashed and dotted line) NA are presented: (a), N3 (b), N6 (c), N7 (d) or N9 (e). TCID<sub>50</sub>, median tissue culture infective dose; Mo, A/Moscow background; PR8, A/PR8 background.

detected, as mixed viral population with WT virus, in patients infected by the avian influenza A (H7N9) virus that were treated with oseltamivir and steroids.<sup>34</sup> The analysis of viral clones bearing the N9-R292K substitution has shown oseltamivir IC<sub>50</sub> of 44 093 nM and zanamivir IC<sub>50</sub> of 283.5 nM.<sup>35</sup> Similar results were obtained for reassortant viruses bearing R292K substitution in N9 and for recombinant N9.<sup>25,36,37</sup> Our results show also very high oseltamivir IC<sub>50</sub> for IAV bearing N2, N3, N6, N7 or N9-R292K substitution. Moreover all our viruses bearing the R292K substitution had a higher zanamivir and laninamivir IC<sub>50</sub> than their corresponding WT viruses, but only IAVs with the N6- or N9-R292K substitution were classified with RI by these NAIs. These results may be explained by the use of WHO's interpretation criteria, which were defined on human IAV bearing N1 or N2. The difference between our results and previous work may be explained by the use of different avian NA and genetic background, which impact on glycoprotein quantity at the virion surface. This R292K substitution also decreases NA activity and seems to impact the viral fitness among all group 2 NA.

A lot of substitutions conferring different levels of resistance to either oseltamivir or zanamivir have been observed *in vivo* and *in vitro* for the E119 residue.<sup>11,38–40</sup> In this paper we were focused on the E119V substitution that is one of the two most frequent NA substitutions linked to NAI resistance in N2.<sup>41</sup> Viruses bearing an E119V-substituted N2 had between 20- and 1000-fold increase in oseltamivir resistance without any modification for other NAI susceptibility.<sup>8,11,39,40,42</sup> The variability of these results is due to the diversity in virus strains tested and technique used (chemiluminescence or fluorescence assay). Viruses with a N2-E119V substitution had the same NA activity or slightly higher activity than the corresponding WT viruses.<sup>8,15,40</sup> The affinity of mutated N2 (E119V) is higher than the corresponding WT N2.<sup>15,43</sup> Moreover the virus with a N2-E119V substitution had the same viral growth kinetics in MDCK cells<sup>15,39,43</sup> and the same transmissibility in ferrets as the corresponding WT viruses,<sup>33,44</sup> although aerosol transmission was decreased in guinea pig model.<sup>42</sup>

To our knowledge there was no detection of NA-E119V substitution reported in viruses bearing the N3, N6 or N7 isolated *in vivo*, but this substitution occurred in zoonotic N9, N2 and N1.<sup>45–47</sup> Marjuki et al.<sup>17</sup> isolated an A/Taiwan/1/2013 (H7N9) virus bearing the E119V substitution from a patient treated with oseltamivir. This virus showed RI by oseltamivir (84-fold decrease in oseltamivir susceptibility) and had a 9-fold decrease in zanamivir susceptibility. The A(H7N9) virus with an N9-E119V substitution showed an increased virulence in mice, comparable replication fitness in ferrets and the same viral growth kinetics in MDCK cells as the corresponding WT viruses.<sup>17</sup> In the study of Song et al.,<sup>25</sup> the E119V substitution conferred RI by oseltamivir only for N7 and N9. In our work N3- and N6-E119V-substituted viruses showed NI by oseltamivir, whereas viruses with N2-, N7- or N9-E119V substitutions showed RI by oseltamivir. This NA-E119V did not modify significantly NA activity or viral growth kinetics in MDCK cells compared with the corresponding WT NA. However, this substitution induced an increased NA affinity for MUNANA substrate, which could explain that all reassortant viruses remained susceptible to zanamivir whose structure is the closest to that of SA and to MUNANA.

Substitutions have already been described *in vivo* and *in vitro* at the 222 position (I222F/K/L/M/R/T/V) for IAV and IBV.<sup>13,14,47–50</sup> All these substitutions have different impacts on oseltamivir resistance. In this paper we were focused on the I222L substitutions.

This substitution is hardly found alone *in vivo*, but it may have an important role in NAI resistance.<sup>14,49,51,52</sup> A previous work conducted in our laboratory studied a reassortant A(H3N2) virus bearing the I222L mutated N2 with the A/Moscow background. This reassortant virus had a 10-fold increase in oseltamivir resistance without any impact on viral growth kinetics and NA activity.<sup>13</sup>

A combination of framework mutations may have a synergistic effect on NAI susceptibility. An E119V+I222V mutated NA was isolated from an immunocompromised child infected by an A(H3N2) virus.<sup>8</sup> This mutation caused a high resistance level to oseltamivir only. This virus had no impairment of viral growth kinetics in MDCK cells and the I222V substitution seemed to restore partially the viral fitness compared with the virus bearing the NA-E119V substitution alone.<sup>39</sup> The E119 and I222 residues affect different parts of the active site, and mutations at these sites have less chance to disturb the NA active site, explaining why viruses bearing a combination of substitutions at these two residues might maintain a good fitness. In all our reassortant viruses, the NA-E119V+I222L substitution induced an increase in the oseltamivir IC<sub>50</sub> and a decrease in NA activity. Contrary to previous results for N2, the E119V+I222L substitutions induced an increased affinity for the MUNANA substrate for N3, N6 and N9. For N7, activity was too low to interpret *K<sub>m</sub>* properly. The impact of the NA-E119V+I222L substitutions seems to be comparable for all group 2 NAs, but depends on the basal NA activity of corresponding WT NA, as a minimal NA activity is required to maintain correct *in vitro* viral fitness. The low activity observed for viruses with N2-E119V+I222L substitution was due to decreased NA quantity at the virion surface, whereas specific activity of the NA protein seemed to be higher than that of the WT virus.<sup>15</sup> The next step of our work will be to understand by which mechanisms the R292K and E119V+I222L substitutions decreased NA activity and compromised viral fitness in our reassortant viruses.

## Conclusions

Close monitoring of influenza viruses for changes at NA residues known to confer NAI resistance has to be continued for zoonotic and human IAVs.<sup>46</sup> This study also highlights the need for the development of novel anti-influenza drugs such as favipiravir, which targets the polymerase and may be used against influenza viruses with RI by NAIs.<sup>53,54</sup>

## Acknowledgements

One part of this work was presented as a poster (Abstract ID: 1580) during the congress 'ESCV2015' in Edinburgh, UK, 2015. Another part of this work was presented as an oral communication (no. 198) during the congress 'RICAI2015' in Paris, France, 2015.

We thank Mark Andrew Johnston for his advice on the English language. We also thank Stephanie Blaizot for her advice on statistical analysis.

## Funding

This study was supported by internal funding and performed in the field of the global surveillance of the susceptibility of influenza viruses to antiviral agents [performed by WHO and by the NIC (National Influenza Centre) for South of France supported by INVS (Institut National de Veille Sanitaire) in France].

## Transparency declarations

B. L. declares potential conflicts of interests with Roche, GSK, BMS and BioCryst. B. L. is a member of the scientific board of the GEIG and of the ESWI Board of Directors. V. E. received a travel grant from Roche Pharmaceuticals to attend the Fourth European Scientific Working Group on Influenza (ESWI) Influenza Conference and declares potential conflicts of interests with Sanofi-Pasteur (intervention in symposia). All other authors: none to declare.

## Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 531–69.
- Air GM. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; **6**: 245–56.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ *et al.* The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006; **443**: 45–9.
- Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983; **303**: 41–4.
- Colman PM, Hoynes PA, Lawrence MC. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* 1993; **67**: 2972–80.
- WHO. *WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and Other Influenza Viruses*. 2010. [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mngt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf).
- Von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2007; **6**: 967–74.
- Baz M, Abed Y, McDonald J *et al.* Characterization of multidrug-resistant influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 1555–61.
- Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL *et al.* Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J Infect Dis* 2006; **193**: 760–4.
- Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y *et al.* Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004; **364**: 759–65.
- Okomo-Adhiambo M, Demmler-Harrison GJ, Deyde VM *et al.* Detection of E119V and E119I mutations in influenza A (H3N2) viruses isolated from an immunocompromised patient: challenges in diagnosis of oseltamivir resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1834–41.
- Tamura D, Sugaya N, Ozawa M *et al.* Frequency of drug-resistant viruses and virus shedding in pediatric influenza patients treated with neuraminidase inhibitors. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 432–7.
- Richard M, Deléage C, Barthélémy M *et al.* Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 2008; **41**: 20–4.
- Escuret V, Collins PJ, Casalegno J-S *et al.* A novel I221L substitution in neuraminidase confers high-level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J Infect Dis* 2014; **210**: 1260–9.
- Richard M, Ferraris O, Erny A *et al.* Combinatorial effect of two framework mutations (E119V and I222L) in the neuraminidase active site of H3N2 influenza virus on resistance to oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2942–52.
- Gao H-N, Lu H-Z, Cao B *et al.* Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med* 2013; **368**: 2277–85.
- Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP *et al.* Characterization of drug-resistant influenza A(H7N9) variants isolated from an oseltamivir-treated patient in Taiwan. *J Infect Dis* 2015; **211**: 249–57.
- Richard M, Erny A, Caré B *et al.* Rescue of a H3N2 influenza virus containing a deficient neuraminidase protein by a hemagglutinin with a low receptor-binding affinity. *PLoS One* 2012; **7**: e33880.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001; **146**: 2275–89.
- Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* 2005; **68**: 43–8.
- WHO. Meetings of the WHO Working Group on Surveillance of Influenza Antiviral Susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Relevé Épidémiologique Hebd Sect Hygiène Secrétariat Société Nations Wkly Epidemiol Rec Health Sect Secr Leag Nations* 2012; **87**: 369–74.
- Casalegno J-S, Bouscambert-Duchamp M, Caro V *et al.* Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res* 2010; **87**: 242–8.
- Rameix-Welti M-A, Enouf V, Cuvelier F *et al.* Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* 2008; **4**: e1000103.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 1938; **27**: 493–7.
- Song M-S, Marathe BM, Kumar G *et al.* Unique determinants of neuraminidase inhibitor resistance among N3, N7, and N9 avian influenza viruses. *J Virol* 2015; **89**: 10891–900.
- Li Q, Qi J, Wu Y *et al.* Functional and structural analysis of influenza virus neuraminidase N3 offers further insight into the mechanisms of oseltamivir resistance. *J Virol* 2013; **87**: 10016–24.
- Stoner TD, Krauss S, Turner JCM *et al.* Susceptibility of avian influenza viruses of the N6 subtype to the neuraminidase inhibitor oseltamivir. *Antiviral Res* 2012; **93**: 322–9.
- Sun X, Li Q, Wu Y *et al.* Structure of influenza virus N7: the last piece of the neuraminidase ‘jigsaw’ puzzle. *J Virol* 2014; **88**: 9197–207.
- Gao HN, Yao HP, Liang WF *et al.* Viral genome and antiviral drug sensitivity analysis of two patients from a family cluster caused by the influenza A(H7N9) virus in Zhejiang, China, 2013. *Int J Infect Dis* 2014; **29**: 254–8.
- Moules V, Terrier O, Yver M *et al.* Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology* 2011; **414**: 51–62.
- Carr J, Ives J, Kelly L *et al.* Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Res* 2002; **54**: 79–88.
- Herlocher ML, Carr J, Ives J *et al.* Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res* 2002; **54**: 99–111.
- Yen H-L, Herlocher LM, Hoffmann E *et al.* Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4075–84.
- Hu Y, Lu S, Song Z *et al.* Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance. *Lancet* 2013; **381**: 2273–9.

- 35** Yen H-L, McKimm-Breschkin JL, Choy K-T et al. Resistance to neuraminidase inhibitors conferred by an R292K mutation in a human influenza virus H7N9 isolate can be masked by a mixed R/K viral population. *mBio* 2013; **4**: e00396–13.
- 36** Wu Y, Bi Y, Vavricka CJ et al. Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Res* 2013; **23**: 1347–55.
- 37** Sleeman K, Guo Z, Barnes J et al. R292K substitution and drug susceptibility of influenza A(H7N9) viruses. *Emerg Infect Dis* 2013; **19**: 1521–4.
- 38** Abed Y, Baz M, Boivin G. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir Ther* 2006; **11**: 971–6.
- 39** Simon P, Holder BP, Bouhy X et al. The I222V neuraminidase mutation has a compensatory role in replication of an oseltamivir-resistant influenza virus A/H3N2 E119V mutant. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 715–7.
- 40** Zürcher T, Yates PJ, Daly J et al. Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 723–32.
- 41** Takashita E, Meijer A, Lackenby A et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013–2014. *Antiviral Res* 2015; **117**: 27–38.
- 42** Bouvier NM, Lowen AC, Palese P. Oseltamivir-resistant influenza A viruses are transmitted efficiently among guinea pigs by direct contact but not by aerosol. *J Virol* 2008; **82**: 10052–8.
- 43** Roussy J-F, Abed Y, Bouhy X et al. Emergence of an oseltamivir-resistant influenza A/H3N2 virus in an elderly patient receiving a suboptimal dose of antiviral prophylaxis. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 4234–6.
- 44** Herlocher ML, Truscon R, Elias S et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis* 2004; **190**: 1627–30.
- 45** Achenbach JE, Bowen RA. Effect of oseltamivir carboxylate consumption on emergence of drug-resistant H5N2 avian influenza virus in mallard ducks. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2171–81.
- 46** Orozovic G, Orozovic K, Järhult JD et al. Study of oseltamivir and zanamivir resistance-related mutations in influenza viruses isolated from wild mallards in Sweden. *PLoS One* 2014; **9**: e89306.
- 47** Pizzorno A, Bouhy X, Abed Y et al. Generation and characterization of recombinant pandemic influenza A(H1N1) viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *J Infect Dis* 2011; **203**: 25–31.
- 48** Boltz DA, Douangngeun B, Phommachanh P et al. Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People’s Democratic Republic. *J Gen Virol* 2010; **91**: 949–59.
- 49** Hurt AC, Holien JK, Barr IG. In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H5N1) influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4433–40.
- 50** Pizzorno A, Abed Y, Bouhy X et al. Impact of mutations at residue I223 of the neuraminidase protein on the resistance profile, replication level, and virulence of the 2009 pandemic influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1208–14.
- 51** Govorkova EA, Ilyushina NA, Marathe BM et al. Competitive fitness of oseltamivir-sensitive and -resistant highly pathogenic H5N1 influenza viruses in a ferret model. *J Virol* 2010; **84**: 8042–50.
- 52** Itoh Y, Shichinohe S, Nakayama M et al. Emergence of H7N9 influenza A virus resistant to neuraminidase inhibitors in nonhuman primates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 4962–73.
- 53** Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res* 2013; **100**: 446–54.
- 54** L’Huillier AG, Abed Y, Petty TJ et al. The E119D neuraminidase mutation confers pan-resistance to neuraminidase inhibitors in an A(H1N1)pdm09 isolate from a stem-cell transplant recipient. *J Infect Dis* 2015; **212**: 1726–34.

## Supplementary data

**Table S1. Growth and stability of reassortant Influenza A viruses in MDCK cells**

Viruses with different NA	CPE at 72h post RG (P1)	new MDCK passage before production	Viral titers ( $\log_{10}$ [TCID <sub>50</sub> /mL])			NA sequencing	
			Post RG	flask production	last MDCK passage	on flask production	on 3 viruses on the last passage
WT N2	+++	no	8.07	8.80	8.08 ± 0.19	ND	ND
E119V substituted N2	+++	no	8.30	8.30	8.22 ± 0.83	ND	A356T, no other mutation
R292K substituted N2	++	no	7.97	7.80	8.30 ± 0.71	ND	G875A, no other mutation
E119V + I222L substituted N2	++	no	8.47	8.63	7.94 ± 0.19	ND	A356T & A664C, no other mutation
WT N3	+++	no	8.63	7.63	7.83 ± 0.22	ND	ND
E119V substituted N3	+++	no	8.30	7.80	8.02 ± 0.25	A356T, no other mutation	ND
R292K substituted N3	+++	no	7.30	7.30	7.52 ± 0.63	G878A, no other mutation	G878A, no other mutation
E119V + I222L substituted N3	+++	no	7.80	7.63	7.85 ± 0.19	A356T & A667C, no other mutation	A356T & A667C, no other mutation
WT N6	++ to +++	no	7.80	6.97	7.65 ± 0.14	ND	ND
E119V substituted N6	++ to +++	no	7.97	7.97	8.74 ± 0.29	A356T, no other mutation	ND
R292K substituted N6	negative	yes <sup>b</sup>	6.63	7.30	7.35 ± 0.25	T138C (silent mutation), G428A <sup>d</sup> , G878A	T138C (silent mutation), G428A <sup>d</sup> , G878A
E119V + I222L substituted N6	+ <sup>a</sup>	no	7.63	7.80	7.63 ± 0.29	A356T & A667C, no other mutation	A356T & A667C, no other mutation
WT N7	+++	no	8.30	7.63	7.91 ± 0.10	ND	ND
E119V substituted N7	+++	no	8.63	7.97	7.97 ± 0.17	A347T, no other mutation	ND
R292K substituted N7	+	yes <sup>b</sup>	6.80	6.97	6.80 ± 0.93	G869A, no other mutation	G869A, no other mutation <sup>e</sup>
E119V + I222L substituted N7	negative	yes <sup>b</sup>	6.13	6.30	7.63 ± 0.29	A347T & A658C, no other mutation	A347T & A658C, no other mutation
WT N9	+ <sup>a</sup>	no	5.30	6.30	7.56 ± 0.06	ND	ND
E119V substituted N9	+	yes <sup>b</sup>	4.97	7.80	8.47 ± 0.44	A344T, no other mutation	ND
E119V + I222L substituted N9	negative	yes <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
R292K substituted N9	negative	yes <sup>b</sup>	5.80	6.74	7.56 ± 0.67	G866A, no other mutation	G866A, no other mutation
WT N9 (PR8 background)	+++	no	6.97	9.07	7.88 ± 0.39	ND	ND
E119V + I222L substituted N9 (PR8 background)	+++	no	7.30	8.13	8.06 ± 0.25	A344T & A655C, no other mutation	A344T & A655C, no other mutation

This table summarises data for each reassortant IAV obtained by reverse genetics experiments. Passages were performed in 24 well-plate except for viral production performed in a flask of 25cm<sup>2</sup>.

Following reverse genetics experiments, supernatants were passaged once in MDCK cells and CPE was checked 72 hours later. For some viruses, a supplementary passage was required to obtain a +++ CPE meaning an infection of nearly all the cells in the well. Then a viral production was performed by a new passage in MDCK cells at a MOI 10<sup>-3</sup> except for reassortant viruses bearing R292K mutated -N6 or -N7 or -N9 (MOI 10<sup>-2</sup>). After viral production, next passages were performed at a MOI 10<sup>-3</sup> for all reassortant viruses.

Sequencing of NA gene was performed for viral production and after supplementary passages in MDCK cells to check the persistence of the NA mutations and eventual other mutations. Sequences were compared with the NA cloned in pHW2000 plasmids. We indicated the nucleotide position mutation considering A of ATG as the first nucleotide.

<sup>a</sup> : supernatants were collected 24 to 48h later (when CPE was +++)

<sup>b</sup> : a new passage was performed from the P1 supernatants

<sup>c</sup> : sequencing was performed for two viruses only

<sup>d</sup> : the G428A mutation is responsible for the R143Q substitution whom impact on NAI resistance is unknown

Abbreviations: AA, amino acid. CPE, cytopathic effect. IAV, influenza A viruses. MOI, multiplicity of infection. ND, not done. RG, reverse genetics experiment.

# Chapitre 3 : Caractérisation des neuraminidases N9 portant la substitution R292K

## 3.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans les travaux précédents, les substitutions de résistance aux INA induisent une baisse de l'activité sialidasique des neuraminidases. Ce phénomène dépend de la substitution, en particulier lorsqu'elle touche un acide aminé catalytique, mais aussi du sous-type de neuraminidase substitué. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette baisse d'activité : i) la substitution de résistance pourrait entraîner une modification du site actif empêchant la fixation de l'INA mais également des acides sialiques ; ii) la substitution pourrait impacter sur la structure globale de la neuraminidase empêchant la formation ou l'expression de cette glycoprotéine à la surface des virions. Dans ce cas, le blocage pourrait se faire à toutes les étapes de production de la protéine, c'est-à-dire au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel.

Les travaux précédents ont étudié l'impact de substitutions de résistance dans des virus réassortants issus de génétique inverse. Cette méthodologie a pour avantages d'uniformiser l'ensemble du bagage génétique de chaque virus ne se distinguant plus que par leur neuraminidase car le fond génétique utilisé peut influencer les résultats des études des glycoprotéines notamment en modifiant leur quantité à la surface des virions (268). Nos résultats ont été obtenus dans des virus composés d'un fond génétique issu soit du virus A/PR8 soit du virus A/Mo autorisant une comparaison directe entre les virus produits mais entravant toutes comparaisons avec des résultats présents dans d'autres études utilisant des fonds génétiques différents. De plus, il faut noter la grande difficulté à normaliser les tests enzymatiques par manque de caractérisation des particules virales. En effet, même avec un fond génétique commun la réplication virale peut être diminuée ou favorisée en fonction de la neuraminidase entraînant potentiellement la production de virions de formes différentes ou encore la production d'une proportion variée de particules défectives.

Plusieurs travaux dans la littérature ont cherché à étudier l'impact structural des substitutions de résistance montrant des modifications du site actif jouant sur la fixation du substrat et pouvant être à l'origine de la diminution d'activité (Voir Partie A, Chapitre 3) (75,107,130,136). D'autres études montrent que la baisse d'activité peut s'accompagner d'une diminution de la quantité de neuraminidase à la surface des cellules infectées et d'une diminution du titre viral (5,267,269). Cependant, pour s'affranchir de tout biais, nous avons souhaité analyser l'impact enzymatique de la substitution de résistance R292K dans la N9 à la fois dans un contexte viral maîtrisé en essayant de caractériser au mieux les virions produits et de comparer ces résultats à ceux obtenus pour la protéine purifiée. Dans ce but, nous avons mis au point, au sein de notre laboratoire, la production de protéines recombinantes à l'aide d'un système d'expression en baculovirus ainsi que différentes

techniques de quantification et de caractérisation des particules virales. Bien que ce développement technologique soit toujours en cours, nos premiers résultats sont présentés ici.

## **3.2. Matériels et Méthodes**

### **3.2.1. Virus et cellules**

Les deux virus recombinants utilisés dans cette étude ont été produits par génétique inverse dans un travail précédent (Voir Partie C, Chapitre 2) (270). Ils se composent d'un fond génétique issu du virus A/Mo comprenant les segments PB2, PB1, PA, HA, NP, M et NS ainsi que d'une N9 sauvage (WT) ou substituée en R292K. Le segment codant pour cette N9 a été synthétisé par Eurofins et est issu du virus A/Anhui/1/2013 (H7N9) responsable des premières vagues de cas humains en Chine (Voir Partie A, Chapitre 2).

Les cellules MDCK ont été achetées auprès de l'ATCC (CCL34) et ont été utilisées pour la culture des virus recombinants porteurs d'une des N9. Ces cellules ont été entretenues dans un milieu Ultra MDCK (Lonza) sans sérum de veau fœtal inactivé (SVFi) supplémenté avec 1% de L-Glutamine (L-Glu, 200 mM, Gibco, life technologies) et 2% de pénicilline (10 000 U/mL) plus streptomycine (10 000 U/mL, Gibco, life technologies) (PS).

Les cellules Sf9 (CelluloNet biobank BB-0033-00072) ont été mises à disposition par le Centre de Ressources Biologiques (CRB) de lignées cellulaires de la SFR BioSciences (UMS3444/US8) et ont été utilisées pour la transfection du Bacmid ainsi que pour la culture et le titrage de baculovirus. Ces cellules ont été entretenues en suspension dans du milieu SF900 II (Gibco, life technologies) supplémenté avec 10% de SVFi et 1% de PS.

Les cellules HighFive (CelluloNet biobank BB-0033-00072) ont été mises à disposition par le CRB de lignées cellulaires de la SFR BioSciences (UMS3444/US8) et ont été utilisées pour la production de neuraminidases recombinantes. Ces cellules ont été entretenues en suspension dans du milieu Express Five (Gibco, life technologies) sans SVFi supplémenté avec 10% de L-Glu.

### **3.2.2. Culture et concentration des virus recombinants**

Les virus issus de génétique inverse ont été utilisés après une phase de production décrite précédemment (270). Chaque virus a été inoculé à une MOI (*multiplicity of infection*) de  $10^{-3}$  sur cellules MDCK à confluence dans trois flasques multi-étages composées de cinq étages chacune (BD Falcon). La récolte des virus produits a été réalisée à 72 heures post-infection en fonction de l'avancement de l'effet cytopathique (CPE) (récolte entre 75 et 90% de destruction du tapis cellulaire) ce qui a permis d'obtenir 750 mL de virus dans du milieu d'infection composé d'EMEM (*Eagle's minimal essential medium*, Lonza) supplémenté avec 1% L-Glu, 2% PS et 1 µg/ml finale de trypsine virus (Roche). Le surnageant récolté a été clarifié par centrifugation à 2 000 g pendant 15 minutes avant d'être doublement concentré d'abord par filtration tangentielle puis par ultracentrifugation.

La filtration tangentielle a été réalisée avec une cassette vivaflow 50 (seuil à 100 KDa) (Sartorius), permettant la récupération d'environ 60 mL de virus concentré. Ces virus ont été à nouveau concentrés à travers un coussin de saccharose (25% (p/v) en NTE) par une ultracentrifugation à 160 000 g pendant deux heures à 4°C dans une ultracentrifugeuse optima L-80 XP (Beckman). Les culots ont ensuite été repris par un tampon NTE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl et 1 mM EDTA, pH=7,4) et conservés à -80°C.

### **3.2.3. Titrage infectieux**

Les titres infectieux (*median tissue culture infective dose*, TCID<sub>50</sub>/mL) ont été déterminés par titrage en point final sur des cellules MDCK confluentes dans des plaques 96 puits. Les cellules MDCK ont d'abord été lavées puis 150 µL de milieu d'infection ont été ajoutés dans chaque cupule. Les surnageants viraux dilués de dix en dix dans du milieu d'infection ont été distribués en quadruplicats dans les plaques sous 50 µL. À 96 heures post-infection à 34°C sous 5% CO<sub>2</sub>, la présence de virus influenzae dans les surnageants a été évaluée en recherchant le CPE et en utilisant un test d'hémagglutination avec des érythrocytes de poule (0,5%). Les titres infectieux ont été calculés en utilisant la méthode statistique de Reed et Muench (271).

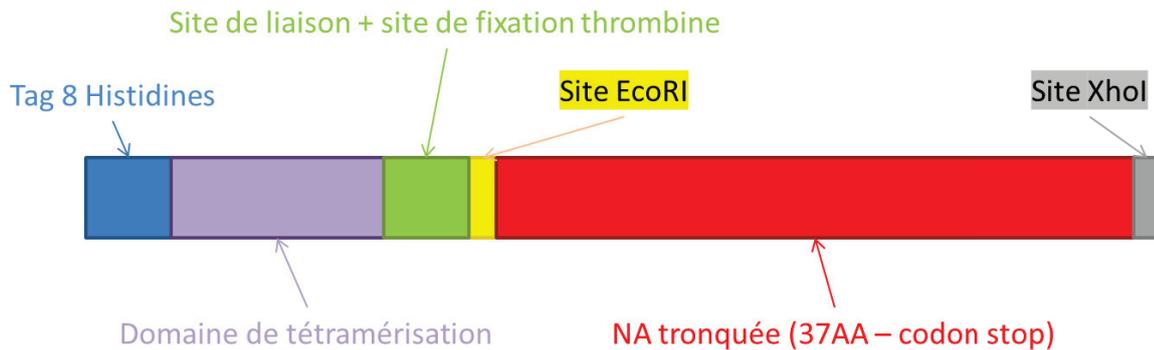
### **3.2.4. Titrage hémagglutinant**

Après dilution de deux en deux du surnageant viral à titrer, chaque dilution a été distribuée en triplicat dans une plaque 96 puits à fond conique, contenant au préalable 50 µL de tampon SALK 1X. Cinquante µL de globules rouges de cobaye à 0,8 % ou de poule à 0,5% en tampon SALK 1X ont ensuite été ajoutés dans chaque cupule. La lecture a été réalisée après une heure d'incubation à température ambiante. Le titre hémagglutinant est donné par l'inverse de la dilution de la dernière cupule positive.

### **3.2.5. Clonage, mutagenèse et préparation du Bacmid**

Pour le clonage de la N9, nous sommes repartis de la N9 WT insérée dans un plasmide pHW2000 produit pour une étude précédente (Voir Partie C, Chapitre 2) (270). Une PCR spécifique permettant l'insertion de deux sites de restriction enzymatique (EcoRI et XhoI) et l'amplification du gène de la neuraminidase, en partant du codon correspondant au 37<sup>ème</sup> acide aminé jusqu'au codon stop, a été réalisée à l'aide de l'ADN polymérase Q5® High Fidelity Hot start (New England Biolabs) et d'amorces spécifiques (Voir Annexe 1, 37NA9for et 480NA9rev). La N9 WT amplifiée a ensuite été insérée par recombinaison homologue dans un plasmide p1138 préalablement linéarisé et contenant un tag de huit histidines, un domaine de tétramérisation VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) et un site de fixation à la thrombine grâce au kit In-Fusion® HD cloning kit (Ozyme) (Figure 21A). Le montage génétique complet de la N9 WT recombinante a été amplifié par PCR à bout franc à l'aide de l'ADN polymérase Q5® High Fidelity Hot start et d'amorces spécifiques (Voir

Annexe 1, TOPOF et TOPON9R). L'amplicon a ensuite été inséré dans un plasmide pFastBac grâce au système Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen) (Figure 20).



```

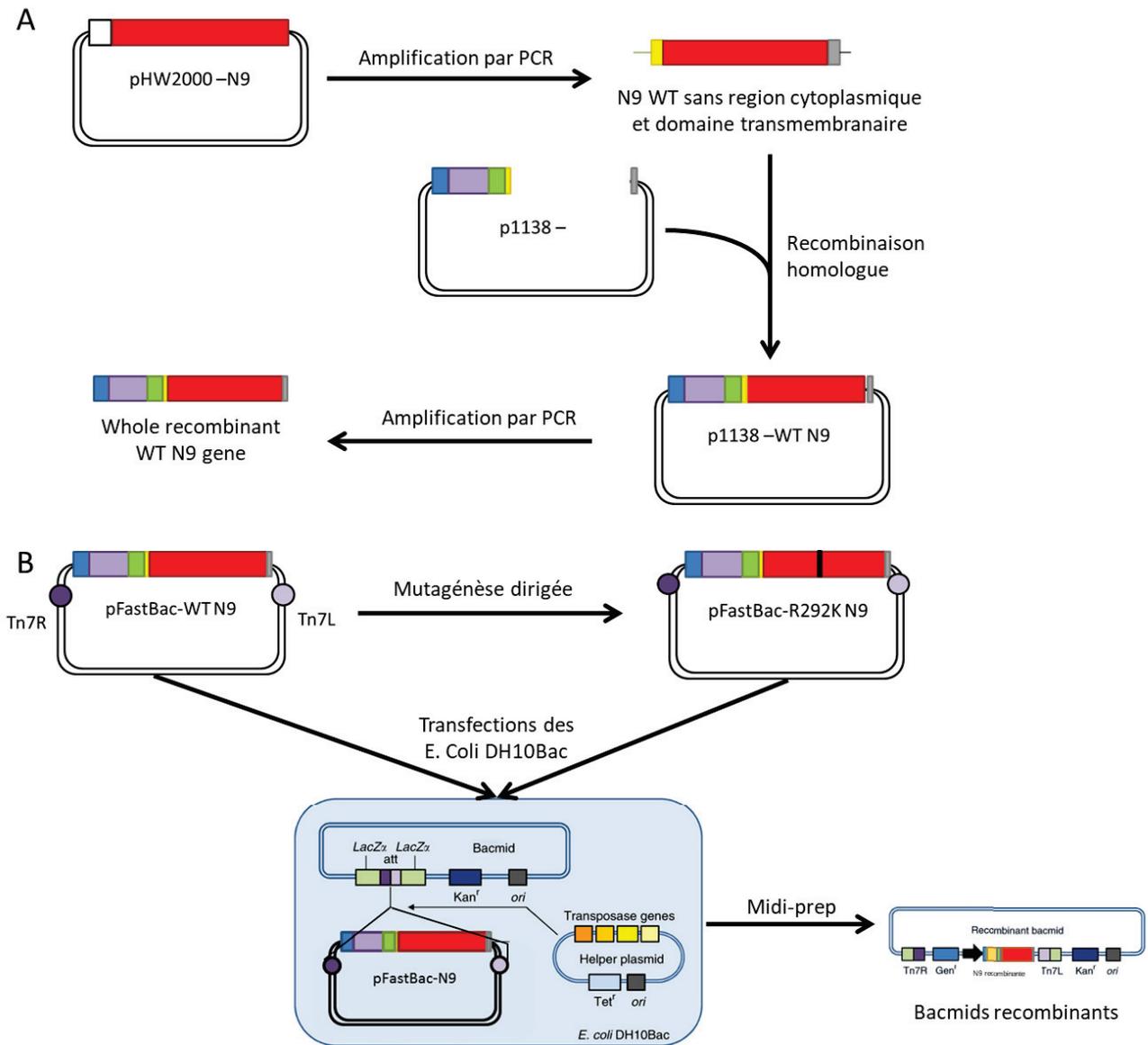
CACCATCACCACCATCACCATCACTCCTCAAGCGACTACAGCGATCTCCAACGGGTGAAACAGGAAGCTGCTGGAAGAGGTGAAGAAGGAGCTGCAGAAGGTCAAAG
AGGAGATCATTGAGGCCTTCGTACAGGAACCTCGCAAACGAGGCTCTTGGTTCAGAGAGGATCCCTAGTAGGTCGAATTCCTCAAGCAATATGAATGCAACTCCC
CCCCAAACAACCAAGTGTGTGTGAACCAACAATAATAGAAAGAAACATAACAGAGATAGTGTATCTGACCAACACCACCATAGAGAAGGAAATATGCCCCAAA
CTAGCAGAATACAGAAATTGGTCAAAGCCGCAATGTAACATTACAGGATTTGCACCTTTTTCTAAGGACAATTCGATTCGGCTTTCCGCTGGTGGGGACATCTGGGTG
ACAAGAGAACCTTATGTGTCATGCGATCTGACAAGTGTATCAATTTGCCCTTGGACAGGGAACAACACTAAACAACGGGCATTCAAATGACACAGTACATGATAG
GACCCCTTATCGGACCCTATTGATGAATGAGTTGGGTGTTCCATTTCAATTTGGGAACCAAGCAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAAGTTGTCACGATGGAAAAGC
ATGGTGCATGTTTGTGTAACGGGGGATGATGAAAATGCAACTGTAGCTTCAATTTACAATGGGAGGCTGTAGATAGTATTGGTTCATGGTCCAAAAAATCCTCA
GGACCCAGGAGTCGGAATGCGTTTGTATCAATGGAACCTGTACAGTAGTAATGACTGATGGGAGTGGCTTCAGGAAAAGCTGATACTAAAATACTATTCAATTGAGGAG
GGGAAAATCGTTCACTAGCCATTGTGAGGAAGTGTGCTCAGCATGTCGAGGAATGCTCCTGTTATCCTCGATATCCTGGTGTGAGATGTGTCTGAGAGACAACCTGG
AAAGGCTCCAATAGGCCATCGTAGATATAAATGTAAAGGATTATAGCATTGTTCCAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTGGAGACACACCCAGAAAAACGACAG
CTCCAGCAGTAGCCATTGCTTGGATCTAACAATGAGGAAGGTGGTCATGGAGTGAAGGCTGGGCCTTTGATGATGGAATGACGTGTGGATGGGAAGAACGATC
AGCGAGAAGTTACGCTCAGGATATGAAACCTTCAAAGTCAATGAAGGCTGGTCCAAACCAACTCCAATTCAGATAAATAGGCAAGTCATAGTTGACAGAGGTAA
TAGGTCGGTATTCTGTTATTTCTGTTGAAGGCAAAAGCTGCATCAATCGGTGCTTTATGTGGAGTTGATAAGGGGAAGGAAACAGGAAACTGAAAGTCTTGT
GGACCTCAAACAGTATTGTTGTGTTTGTGGCACCTCAGGTACATATGGAACAGGCTCATGGCTGATGGGGCGGACATCAATCTCATGCTATATACTCGAG

```

**Figure 20 : Montage génétique de la N9 recombinante.** La N9 produite par baculovirus se compose d'un tag histidine (bleu) pour la purification, d'un domaine de tétramérisation (violet) pour assurer sa conformation finale, d'un site de liaison à la thrombine (vert) pour éliminer la partie artificielle, de deux sites de restriction enzymatique (EcoRI en jaune et XhoI en gris) et de la N9 tronquée au 37<sup>ème</sup> acide aminé pour s'affranchir des parties intra-cytosolique et transmembranaire. La séquence codante utilisée est représentée en bas de la figure.

Après clonage dans le pFastBac, une mutation a été introduite dans le gène N9 en utilisant un kit de mutagenèse dirigée QuickChange II XL (Stratagene) et des amorces appropriées (Voir Annexe 1, N9g866a forward et N9g866a reverse) pour obtenir une N9 portant la substitution R292K (Figure 21B). La présence de l'insertion et de la mutation dans chaque pFastBac produit a été vérifiée par séquençage (Voir paragraphe 3.2.11., ci-dessous).

Le Bacmid contenant notre gène d'intérêt a été obtenu après transfection de bactérie Escherichia Coli DH10Bac (Système Bac-to-Bac®) contenant un Bacmid natif et un plasmide helper permettant l'insertion de notre région d'intérêt au sein du gène codant le peptide LacZα (Figure 21B). Les bactéries transformées qui ont un Bacmid d'intérêt ont été sélectionnées (bactérie blanche en l'absence de traduction du gène LacZα et résistance à trois antibiotiques : tétracycline [Euromedex], gentamycine [Euromedex] et kanamycine [Euromedex]). L'insertion et la mutation dans chaque Bacmid recombinant ont été vérifiées par séquençage (Voir paragraphe 3.2.11., ci-dessous).

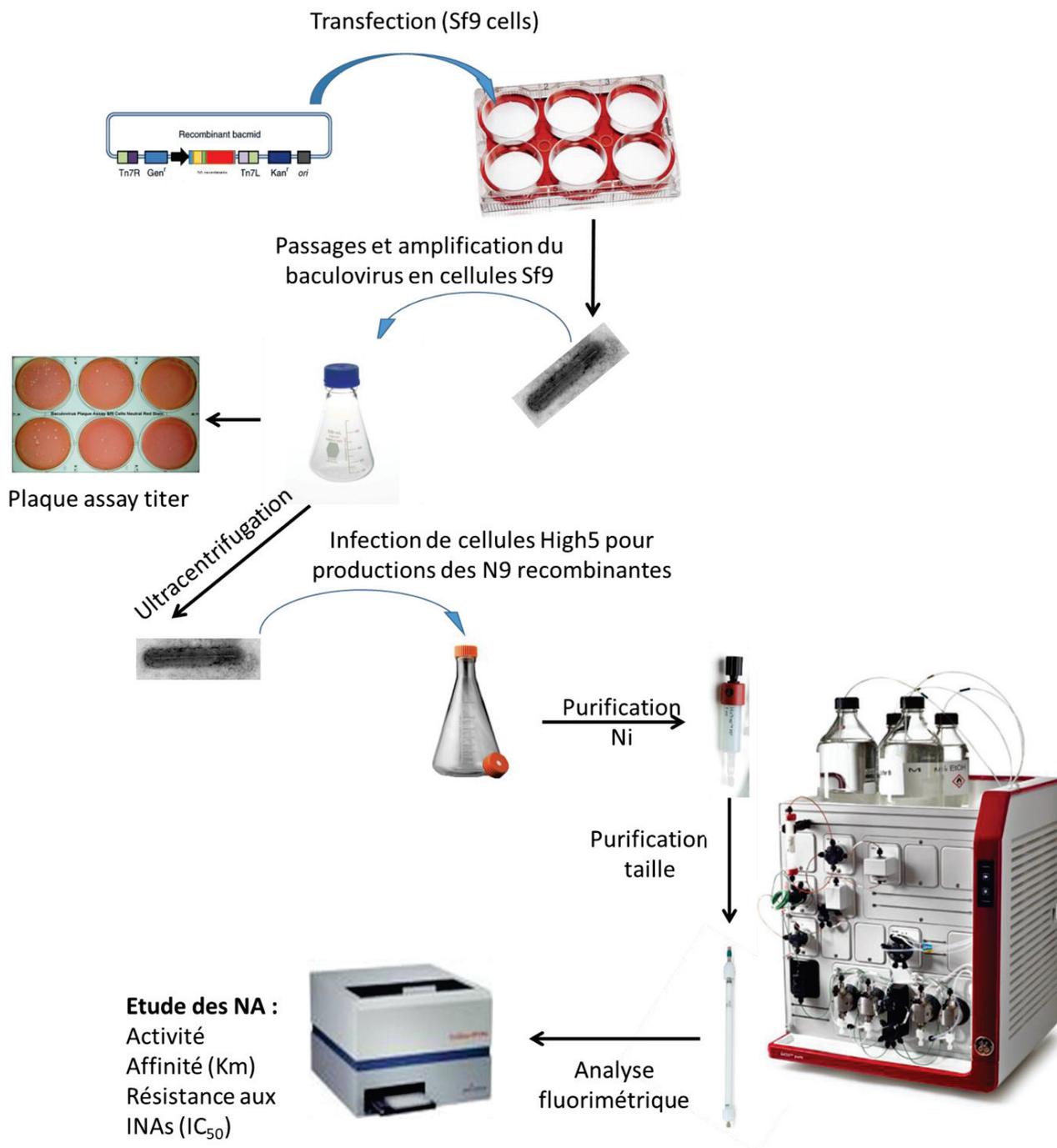


**Figure 21:** Représentation schématique des étapes de production des Bacmids recombinants. A/ Obtention par clonage et recombinaison homologue du montage génétique de la N9 recombinante. B/ Clonage du gène de la N9 recombinante, mutagenèse dirigée et production des bacmids recombinants porteurs du gène N9 sauvage ou muté R292K.

### 3.2.6. Production et culture des baculovirus

Un système de transfection de cellules Sf9 à partir d'un bacmid a été utilisé pour générer des baculovirus contenant nos neuraminidases d'intérêts. Les cellules Sf9 ont été transfectées par 2 µg de bacmid en présence de Cellfectin (Système Bac-to-Bac®) dans un milieu Grace's insect medium (Gibco, life technologies) sans aucune supplémentation. Vingt-quatre heures après la transfection, le milieu a été changé par du milieu de croissance composé de Sf900 II supplémenté avec 10% de SVFi, 1% PS et 0,1% de pluronic F68 (Sigma-Aldrich). Les surnageants contenant le baculovirus ont été récoltés 96 heures après la transfection et séquencés (Voir paragraphes 3.2.11., ci-dessous) (Figure 22).

Le surnageant issu de la transfection (P0) (1 mL) a été utilisé pour infecter  $10,0 \times 10^6$  de cellules Sf9 (flasque de  $175 \text{ cm}^2$ ). La récolte du P1 a eu lieu à 72 heures post-infection en fonction de l'aspect des cellules. Après titrage du baculovirus, le surnageant P1 a été utilisé pour infecter  $1,0 \times 10^9$  de cellules Sf9 (MOI=0,1) dans 1 L (réparti entre 4 erlens de 1 L) de milieu d'infection. Le surnageant P2 a ensuite été concentré par une ultracentrifugation à 160 000 g pendant deux heures et demie à  $4^\circ\text{C}$  dans une ultracentrifugeuse optima L-80 XP (Figure 22). Le baculovirus a été repris en PBS 1X avant d'être titré, séquencé et stocké à  $4^\circ\text{C}$  (Voir paragraphes 3.2.7. et 3.2.11., ci-dessous).



**Figure 22 :** Représentation schématique des étapes de production et de purification des neuraminidases recombinantes.

### 3.2.7. Titration en plaque de lyse du baculovirus

Des cellules Sf9 ont étéensemencées à raison de  $1,0 \times 10^6$  cellules (environ 50% de confluence) par puits dans des plaques six puits. Ces cellules ont ensuite été infectées par des dilutions en séries de raison dix de surnageant contenant le baculovirus. Après une incubation de deux heures sous agitation douce, les inoculas ont été retirés et les cellules recouvertes par un mélange de milieu Sf900 II 1,3X (Gibco, life technologies) et d'agarose 4% (Gibco, life technologies). Une fois solidifié, 2 mL de milieu Sf900 II supplémenté avec 10% SFVi a été ajouté dans chaque puits. Les plaques ont été visualisées 96 heures après une incubation à 27°C sans CO<sub>2</sub> (Figure 22). Les plages de lyse ont ensuite été dénombrées après coloration par une solution de rouge neutre à 0,1 mg/mL. Les titres ont été calculés avec la formule suivante :

$$\text{titre}(pfu/ml) = \text{nombre de plage de lyse} \times \text{facteur de dilution} \times \frac{1}{\text{Volume d'inoculum par puits}}$$

### 3.2.8. Production et purification des protéines recombinantes

Les neuraminidases recombinantes ont été produites après infection de cellules High Five à forte MOI. Succinctement, le baculovirus P2 ultracentrifugé a été utilisé pour infecter  $2,0 \times 10^9$  de cellules High Five (MOI=5) dans 1 L (répartis en 4 erlens de 1 L) de milieu Express five supplémenté par de la L-Glu (20 mM). Après une incubation de 50 heures à 27°C sans CO<sub>2</sub> avec une agitation douce, la récolte a été centrifugée pendant 20 minutes à 5 500 g pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants ont ensuite été filtrés à 0,22 µm avant d'être concentrés par filtration tangentielle sur une cassette vivaflow 200 (seuil à 10 kDa) (Sartorius). Le concentrat a été purifié par incubation avec 4 mL de résine Nickel (Qiagen) permettant la récupération des protéines taguées avec de l'histidine lors d'une élution avec de l'imidazole (500 mM, Sigma-Aldrich). Les 14 mL d'élution ont ensuite été concentrés et lavés par centrifugation dans des amicons® ultra 15 (seuil à 30 kDa, Millipore). Après dosage des protéines totales (Bradford, vWR, life science), les 500 µL de protéines concentrées ont été incubés à température ambiante sur la nuit avec de la thrombine (1 U par mg de protéine, Thrombine cleavage capture Kit, Novagen). Finalement, après élimination de la thrombine par affinité avec des billes de streptavidine, les neuraminidases ont été analysées et purifiées par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex™ 200 Increase 10/300GL (GE).

Les fractions protéiques correspondant aux tétramères de neuraminidase ont été récupérées. L'identification et la pureté des protéines ont été évaluées avant (gel natif, Mini protean TGX gradient 4 à 20%, Biorad) et après dénaturation (gel, Mini protean TGX 12%, Biorad) par une coloration au bleu de Coomassie et par la réalisation de western blots avec des anticorps anti-histidine (Cusabio) et des anticorps anti-N9 (BEI ressources). Enfin, la quantification des protéines a été effectuée par la méthode de Bradford et la caractérisation des propriétés enzymatiques a été réalisée par des techniques fluorimétriques (Voir paragraphe 3.2.9. et 3.2.10., ci-dessous).

### **3.2.9. Mesure de l'activité sialidasique et test d'inhibition enzymatique**

L'oseltamivir, le zanamivir et le laninamivir ont respectivement été fournis par Roche, Ltd., GlaxoSmithKline et Daiichi-Sankyo. Les tests d'activité sialidasique et d'inhibition enzymatique ont été réalisés à l'aide d'un fluorimètre FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH) comme décrit dans une étude précédente (272). Les activités sialidasiques totales ont été calculées comme la quantité de substrat, l'acide 2'-(4-méthylumbelliféryl)- $\alpha$ -DN-acétylneuraminique (MUNANA) (Sigma), dégradée en 4-méthylumbelliférone (4-Mu) en une heure par mL de suspension virale (4-Mu-nmol/h/mL). Le test d'inhibition enzymatique de la neuraminidase a été réalisé en utilisant une quantité d'activité totale normalisée (10 4-Mu-nmol/h/mL). Les  $CI_{50}$  ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad (Prism). L'interprétation de l'inhibition enzymatique des neuraminidases par les INA est basée sur l'augmentation de la  $CI_{50}$  par rapport à celle des virus sensibles (Voir Partie A, Chapitre 3).

### **3.2.10. Mesure des cinétiques enzymatiques (Km)**

Le Km a été évalué en utilisant le substrat MUNANA comme décrit précédemment (6,273). La fluorescence du 4-Mu a été mesurée chaque minute pendant une heure avec un fluorimètre FLUOstar Optima (BMG Labtech). La vitesse initiale a été calculée pour chaque concentration de substrat et intégrée dans une équation non linéaire de Michaelis-Menten par le programme MARS (BMG) pour calculer le Km.

### **3.2.11. Séquençage**

L'extraction de l'ADN du baculovirus, à partir des surnageants du premier et dernier passage sur cellules Sf9, a été réalisée à l'aide du kit Gentra® Puregene® Blood Core Kit (Qiagen). Une PCR ciblant la région insérée dans le baculovirus ou dans les bacmids a été réalisée à l'aide de l'ADN polymérase Q5® High Fidelity Hot start et d'amorces spécifiques (Voir Annexe 1, SV40 polyA reverse et Polyhedrin forward). Le séquençage par Sanger de l'amplicon ainsi que de tous les Bacmids a été réalisé sur des analyseurs ABI Prism 3730XL (Genoscreen Lille, France). Les séquences ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MEGA7 (274).

Pour les virus recombinants porteurs d'une N9, après extraction sur plateforme automatisée EasyMag (bioMérieux), chaque segment génomique a été rétro-transcrit et amplifié en utilisant un protocole de RT-PCR multiplex préalablement publié (275). La bibliothèque d'ADN a été préparée à l'aide du kit Nextera™ XT (Illumina) consistant en une fragmentation enzymatique, à l'ajout de codes-barres par PCR (12 cycles) et à une sélection de taille des fragments par des billes magnétiques. Les segments ont ensuite été séquencés à l'aide d'une plateforme de séquençage Illumina NextSeq 500® (Illumina) par une cartouche MidOutput (Illumina). L'analyse des résultats de séquençage a été réalisée comme décrite précédemment en utilisant un pipeline informatique standardisé (276,277).

### 3.2.12. Analyses statistiques

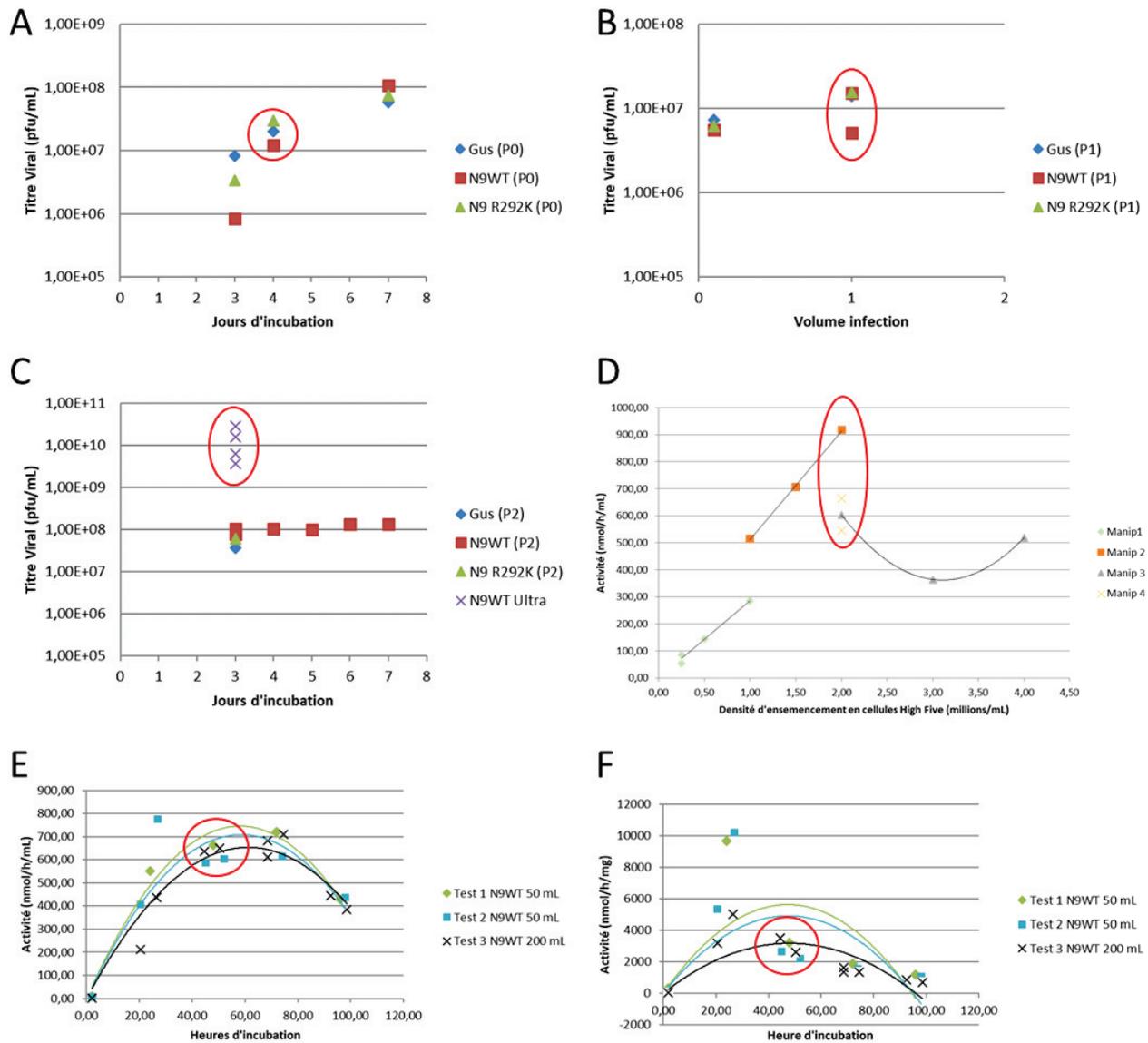
Les résultats des activités sialidasiques, des Km et les mesures de  $CI_{50}$  ont été analysés par un test de Mann–Whitney en utilisant le logiciel GraphPad (Prism). Les résultats ont été considérés comme significativement différents si  $p \leq 0,05$ .

### 3.3. Optimisation de la production de neuraminidases recombinantes

Au cours de cette thèse, le travail de mise au point s'est principalement concentré sur la production des neuraminidases ; du montage génétique à la purification et l'analyse de ces protéines recombinantes. La production des bacmids d'intérêts avait déjà été mise au point par le Dr Émilie Frobert ne nécessitant pas d'adaptation pour notre application à l'exception d'un changement de kit d'extraction. En effet les bacmids et baculovirus (bMON14272 du système Bac-to-Bac®) ayant un génome à ADN de taille supérieure à 135 kilobases (kb) nous avons dû utiliser les kits Gentra® Puregene® Blood Core Kit (Qiagen) ou NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) permettant l'extraction d'ADN de taille allant jusqu'à 300 kb alors que nous utilisons des kits ayant une limite d'extraction à environ 50 kb.

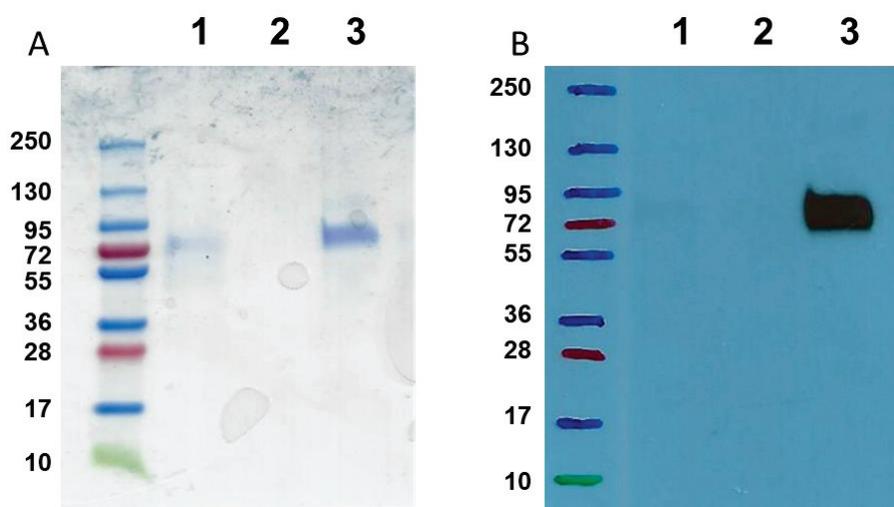
A l'inverse, l'obtention d'une concentration de baculovirus suffisante pour permettre une infection des cellules High Five dans des conditions optimales et la production de protéines recombinantes en quantité suffisante a nécessité un grand nombre d'adaptations des paramètres d'infections et de culture de ces virus. Nos premiers essais ont été réalisés avec des cellules d'insectes Sf9 et High Five adhérentes et entretenues en flasques. La difficulté de maintien de ces lignées ainsi que l'impossibilité d'augmenter leur production, nous ont obligés à rapidement envisager une culture en suspension de ces cellules.

Suite à la transfection du bacmid dans les cellules Sf9, nous avons testé plusieurs temps de récolte à 72, 96 heures et sept jours. Les titres viraux obtenus étant croissants et dépendants du délai de récolte, nous avons choisi la condition intermédiaire de récolte à 96 heures permettant d'allier un temps d'incubation court et une bonne production des baculovirus (Figure 23A). Lors du premier passage (P1) d'amplification des baculovirus, le temps d'incubation était adapté à la lyse cellulaire observable et nous avons testé une infection soit par une MOI standardisée à 0,1 soit par un volume de 1 mL de surnageant issu de la transfection (P0). Les résultats étant similaires nous avons choisi de faire notre première amplification en utilisant directement un volume de 1 mL de surnageant, économisant ainsi le temps de titrage du P0 (Figure 23B). Après ce P1 qui permet une augmentation des volumes de surnageant contenant le baculovirus, nous avons réalisé un deuxième passage d'amplification (P2) dans le but d'augmenter notre titre viral pour obtenir un titre supérieur à neuf  $\log_{10}$ pfu/mL. Nous avons dans un premier temps testé différents temps de récolte (3, 4, 5, 6 et 7 jours) mais en l'absence de différence sur le titre viral nous avons choisi de récolter dès 72 heures et d'ajouter une étape de concentration du virus par ultracentrifugation (Figure 23C).



**Figure 23 : Résultats des tests de mise au point de la transfection du bacmid à la production de la protéine recombinante.** Les cercles rouges correspondent aux conditions choisies dans notre protocole final. Les tests ont été réalisés soit avec les baculovirus contenant la N9 WT ou la N9 substituée en R292K soit avec le témoin positif noté Gus du kit Bac to Bac® de Invitrogen. Au cours de ces tests la quantité de baculovirus a été estimée par le titre viral et la quantité de protéines recombinantes produites par l'activité sialidasique mesurée dans le surnageant. A/ Test de la production de baculovirus en fonction du temps d'incubation post transfection (P0) dans des cellules Sf9. B/ Test de la production de baculovirus en fonction des volumes d'infection pour le premier passage d'amplification (P1) sur cellules Sf9. C/ Test de la production de baculovirus en fonction du temps d'incubation avec ou sans ultracentrifugation pour le deuxième passage d'amplification (P2) sur cellules Sf9. D/ Test de la production de neuraminidase en fonction des densités cellulaires de High Five utilisées. E/ Test de la production de neuraminidase en fonction du temps d'incubation post infection des cellules High Five. L'activité totale en nmol/h/mL et les courbes de tendance pour chaque cinétique de production ont été ajoutées. F/ Test de la production de neuraminidase en fonction du temps d'incubation post infection des cellules High Five. L'activité normalisée par la quantité de protéines totales (nmol/h/mg) et les courbes de tendance pour chaque cinétique de production ont été représentées.

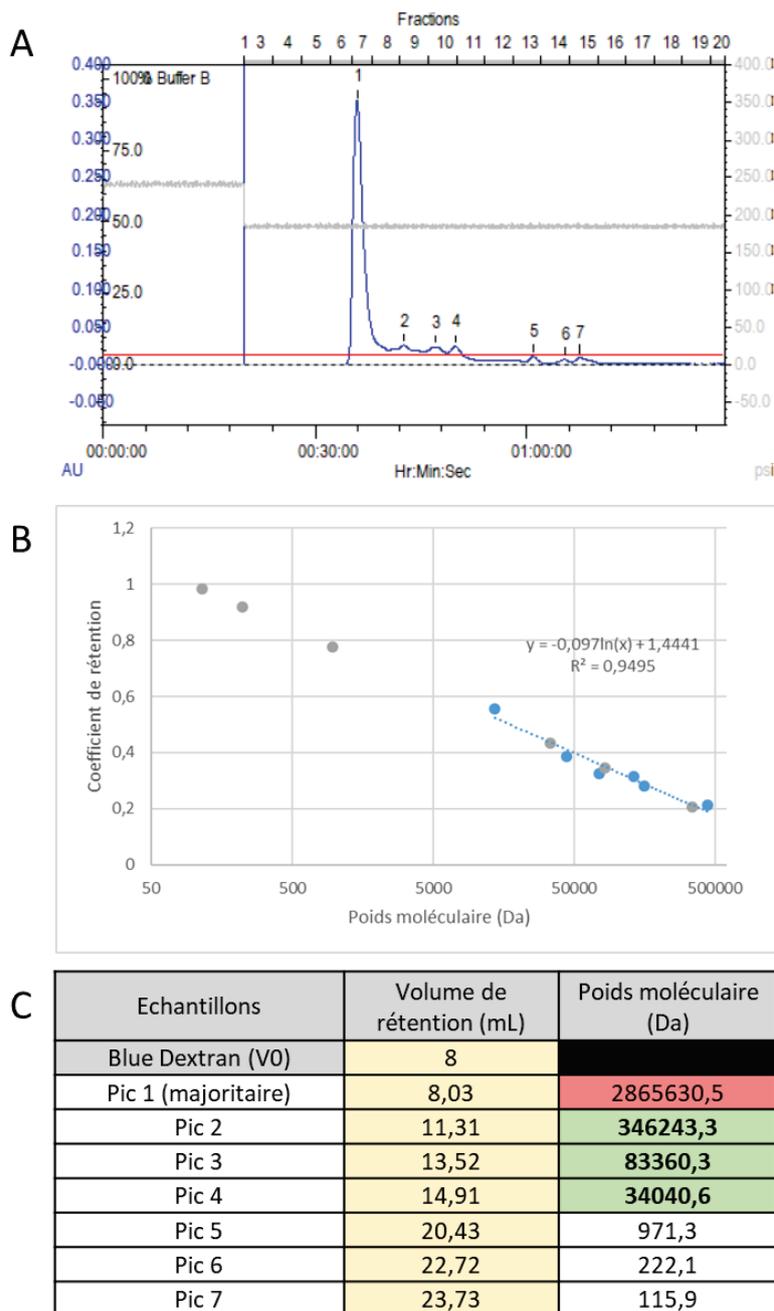
Une fois les baculovirus concentrés obtenus, des tests de productions de protéines recombinantes sur cellules High Five ont pu être réalisés. Cette production doit se faire après une infection à forte MOI, nous avons donc testé les MOI de 5 et 10 pour finalement sélectionner une MOI de 5 afin de limiter les volumes de baculovirus utilisés à chaque production. La densité des cellules a également été testée et malgré une forte variabilité sur la quantité de protéines produites d'une expérimentation à l'autre, nous avons pu sélectionner la densité de  $2,0 \times 10^6$  cellules High Five par mL comme étant celle avec le meilleur rendement (Figure 23D). Enfin, la réalisation de cinétique de production de la neuraminidase recombinante a permis de fixer un temps de récolte à environ 50 heures pour obtenir l'activité totale maximale mais également la meilleure activité normalisée à la concentration de protéines totales du milieu permettant de limiter les contaminations par les protéines cellulaires et donc d'être dans des conditions favorables lors de la purification (Figure 23E et F).



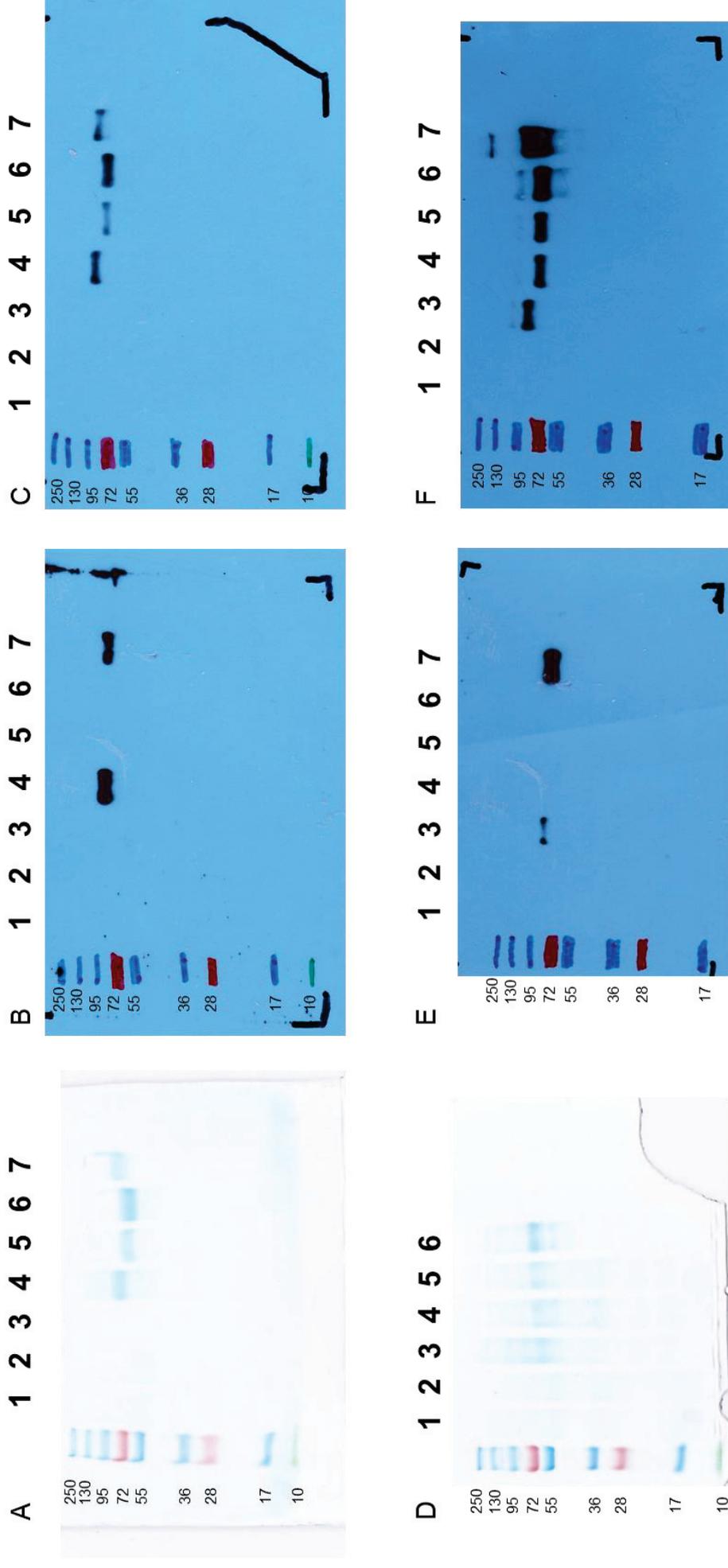
**Figure 24** : Détection des neuraminidases recombinantes après purification par affinité. Les dépôts 1, 2 et 3 de 30  $\mu$ L chacun correspondent respectivement à du surnageant de culture, de la N9 WT après purification par chromatographie d'affinité avant concentration et la N9 WT purifiée après concentration. A/ Coloration au bleu de Coomassie des protéines dénaturées après migration dans un gel à 12%. B/ Western Blot avec anticorps anti-histidines des protéines dénaturées après migration dans un gel à 12%.

Lors des premiers essais de purification par affinité entre les ions nickels et le tag histidine, les neuraminidases recombinantes récupérées étaient indétectables lors des colorations en bleu de Coomassie, lors des western-blots mais également lors du dosage protéique avec un réactif de Bradford (Figure 24). Seul le dosage de l'activité enzymatique était suffisamment sensible pour pouvoir attester de la présence de neuraminidases actives dans nos échantillons. Ces faibles rendements nous ont obligés à augmenter les volumes de production de 50 mL à 1 L et de rajouter plusieurs étapes de concentration soit par centrifugation (Amicon®) soit par filtration tangentielle (Vivaflow®) (Figure 24). De plus, nous avons observé une déchélation des ions nickels lors de nos essais de purification en chromatographie d'affinité. En effet, la présence de détergent dans les milieux de culture pour les cellules High Five favorise la dégradation des colonnes contenant des ions métalliques notamment lors d'un contact prolongé (information fournie par GE health care).

Dans notre protocole final, un litre de production de neuraminidase recombinante a été produit, concentré et lavé d'une majorité de détergents au cours d'une étape supplémentaire de filtration tangentielle (Vivaflow®).



**Figure 25 : Résultats d'une purification par chromatographie d'exclusion de taille.** A/ Chromatogramme obtenu après passage d'un échantillon N9 WT. Présence de sept pics dont un très nettement majoritaire. Chacun des sept pics observés peut être rapporté à une calibration préalable de notre colonne de séparation pour évaluer son poids moléculaire (B et C). B/ Représentation graphique du coefficient de rétention par la colonne de séparation en fonction du poids moléculaire. Les points bleus correspondent à notre gamme de calibration, les points gris représentent chaque pic observé sur le chromatogramme. C/ Tableau récapitulatif des résultats. Le bleu dextran n'est pas retenu par la colonne et permet d'évaluer le volume de rétention. Les poids moléculaires représentés en rouge sont supérieurs à la capacité de rétention de la colonne, ceux en vert sont compris dans notre gamme de calibration et ceux en blanc sont inférieurs à la capacité de séparation de notre colonne.



**Figure 26 : Détection des neuraminidases recombinantes durant l'ensemble du processus de purification.** De gauche à droite sont présentés après dénaturation les résultats de la coloration au bleu de Coomassie (A et D), du western-blot avec l'anticorps anti-histidine (B et E) et du western blot avec l'anticorps anti-N9 (C et F). Les résultats pour la protéine sauvage (A, B et C) et mutée (D, E et F) sont présentés. Les puits 1 et 2 correspondent respectivement au concentrat post-vivaflow et au surmaging après purification. Les puits 4 et 5 (A, B et C) ou 3 et 4 (D, E et F) correspondent respectivement aux éluions avant et après incubation avec la thrombine. Les puits 6 correspondent aux pics majoritaires avec la chromatographie d'exclusion de taille. Enfin le puits 7 est un témoin positif composé de monomère dénaturé de N9 WT avec un tag histidine.

Notre objectif principal étant de travailler sur la fraction active et purifiée contenant les tétramères, nous avons ajouté une étape de chromatographie d'exclusion de taille permettant de séparer les différentes formes d'une neuraminidase. Nos essais ont mis en évidence un pic majoritaire contenant nos neuraminidases actives qui étaient éluées en même temps que le volume de rétention de la colonne (Figure 25A). Les protéines présentes dans cette fraction avaient donc un poids moléculaire supérieur à 600 kDa alors que le poids attendu d'un tétramère est compris entre 200 et 250 kDa (Figure 25B et C). Ce phénomène confirmé par des gels natifs a été attribué à la formation d'agrégats solubles composés de tétramères actifs de neuraminidases. Après avoir testé plusieurs tampons pour désagréger nos neuraminidases, nous avons finalement ajouté une étape de lyse par la thrombine. Cette étape permet la séparation entre la partie artificielle (Tag histidine et domaine de tétramérisation VASP) et l'ectodomaine de la neuraminidase. Cette séparation n'impacte pas ou peu l'activité totale, permettant de justifier la conservation de nos neuraminidases recombinantes sous forme tétramérique active. La suppression du domaine VASP, très probablement à l'origine de l'agrégation, a permis la récupération de tétramères solubles (278).

Le protocole final de production et de purification des neuraminidases recombinantes via un système en baculovirus est complexe et nécessite de très nombreuses étapes contrairement à ce qui peut être exposé dans la littérature (279,280). Ce processus a permis l'obtention des N9 WT et N9 substituée en R292K sous forme tétramérique pure et en quantité suffisante pour être détectée, quantifiée, et pour réaliser l'ensemble des tests enzymatiques permettant leur caractérisation (Voir paragraphe 3.4., Figure 26). Malgré cette réussite et l'optimisation constante, nous conservons un rendement médiocre avec la perte d'au moins 90% de l'activité totale présente dans le surnageant protéique avant purification.

### **3.4. Résultats**

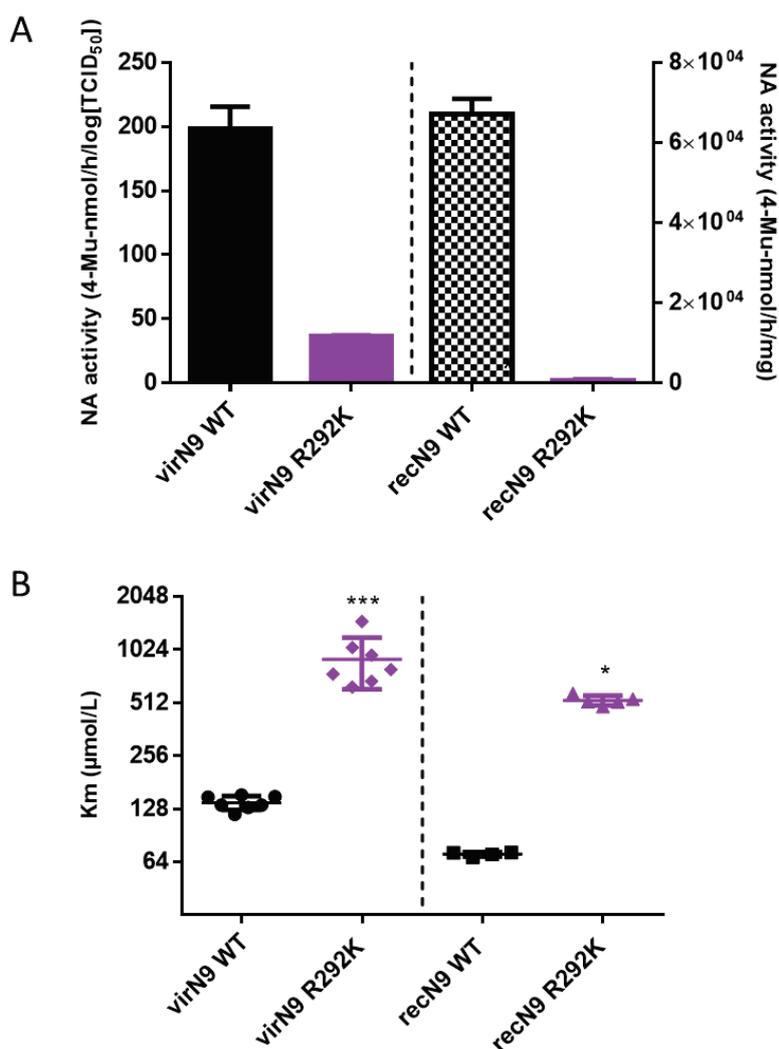
#### **3.4.1. Virus réassortants**

Après la double concentration, les virus recombinants porteurs soit de la N9 WT, soit de la N9 substituée en R292K ont été obtenus respectivement à des titres infectieux de 8,65 et 7,78  $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  et à des titres hémagglutinants de 1 458 et 13 122 UHA (Tableau 3).

Les activités enzymatiques ont été normalisées par rapport au titre infectieux et sont exprimées en  $4\text{-Mu-nmol/h}/\log_{10}\text{TCID}_{50}$ . La différence entre les activités des virus n'est pas significative en raison de l'utilisation d'un test non paramétrique (Mann–Whitney) (tripliquât par virus). Néanmoins, l'activité des virus porteurs de la N9 WT ( $198,0 \pm 17,5$   $4\text{-Mu-nmol/h}/\log_{10}\text{TCID}_{50}$ ) est six fois plus importante que celle des virus porteurs de la N9 substituée ( $36,2 \pm 17,5$   $4\text{-Mu-nmol/h}/\log_{10}\text{TCID}_{50}$ ) (Figure 27A).

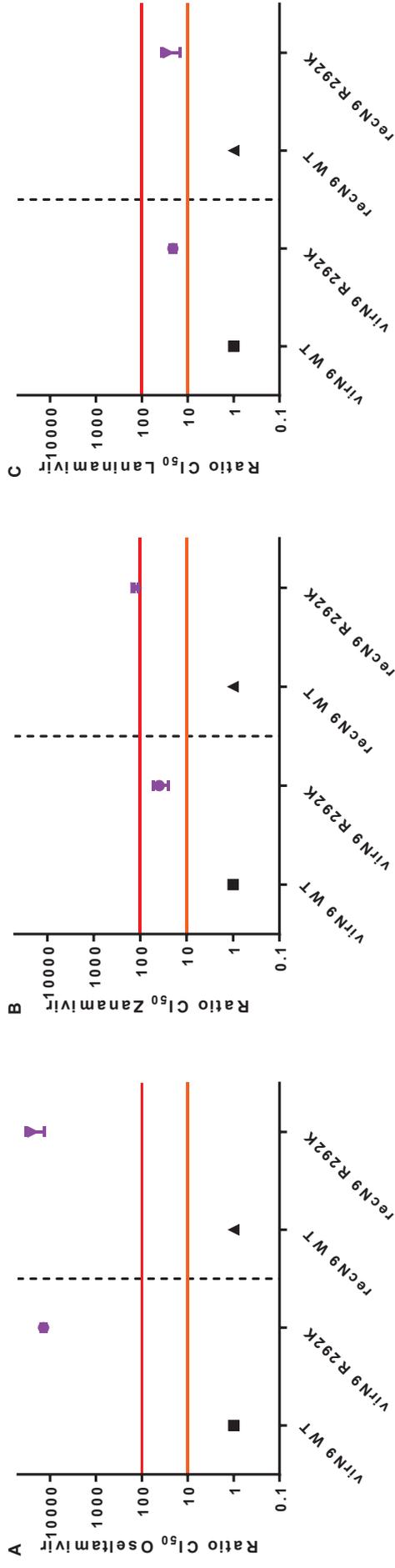
Le  $K_m$  représente l'affinité de la neuraminidase pour son substrat, le MUNANA. Pour interpréter les  $K_m$ , il ne faut pas oublier que plus le  $K_m$  est élevé plus l'affinité est basse et réciproquement. La présence de la substitution R292K dans la N9 s'accompagne d'une chute significative de l'affinité

avec un Km de  $138 \pm 13 \mu\text{mol/L}$  pour les virus porteurs de la N9 WT contre  $901 \pm 294 \mu\text{mol/L}$  pour les virus substitués en R292K ( $p = 0,0006$ ) (Tableau 3, Figure 27B).



**Figure 27 : Activité et affinité pour les virus réassortants et les protéines recombinantes.** Les données représentées sont les valeurs moyennes  $\pm$  l'écart type. Les résultats ont été analysés par un test de Mann-Whitney avec les logiciels GraphPad (Prism) ; \* correspond à un  $p < 0.05$  et \*\*\* à un  $p < 0.001$ . A/ L'activité sialidasique est normalisée en fonction du titre infectieux ( $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) pour les virus (gauche) et de la concentration protéique (mg/mL) pour les protéines recombinantes (droite). Les mesures d'activité ont au moins été réalisées en triplicat. B/ Représentation des Km mesurés, sachant que plus le Km est élevé plus l'affinité est basse. Le Km des virus a été mesuré au cours de sept expérimentations indépendantes. Le Km des protéines recombinantes a été testé par au moins quatre expérimentations indépendantes.

Les  $\text{CI}_{50}$  ont été interprétées selon les recommandations de l'OMS en fonction du rapport entre la valeur des  $\text{CI}_{50}$  du virus substitué et la valeur des  $\text{CI}_{50}$  du virus sensible. La substitution R292K entraîne une augmentation d'au moins 14 000 fois la valeur des  $\text{CI}_{50}$  de l'oseltamivir pour les virus porteurs d'une N9 classant ces virus comme ayant une sensibilité très diminuée. L'impact de cette substitution sur la résistance au zanamivir et au laninamivir semble plus modéré mais les virus restent classés comme ayant une sensibilité diminuée à ces molécules avec des ratios de 37 pour le zanamivir et de 20 pour le laninamivir (Tableau 3, Figure 28).



**Figure 28 : Ratio des  $CI_{50}$  pour les virus réassortants porteurs d'une N9 (gauche) et les protéines recombinantes (droite).** Les données présentées sont les moyennes  $\pm$  l'écart type. Chaque  $CI_{50}$  a été mesurée quatre fois sur les protéines recombinantes. Les ratios sont présentés pour l'oseltamivir (A), le zanamivir (B) et le laninamivir (C). L'interprétation de la résistance vis-à-vis des INA se base sur l'augmentation des valeurs de  $CI_{50}$  des virus ou protéines substitués par rapport aux valeurs du virus ou de la protéine sauvage correspondante. La sensibilité est normale en dessous d'un ratio de 10, la sensibilité est diminuée si le ratio est entre 10 et 100 et la sensibilité est très diminuée pour les ratios supérieurs à 100. Le seuil à 10 est représenté en orange et le seuil à 100 en rouge.

### 3.4.2. Protéines recombinantes

Les neuraminidases recombinantes sous forme tétramérique active ont été obtenues après une double purification en affinité et en exclusion de taille. La qualité de nos éluions a été évaluée par une coloration au bleu de Coomassie et des western-blots avec un marquage soit par un anticorps anti-histidines soit par un anticorps anti-N9 (Figure 26). Après incubation avec la thrombine, les protéines montrent une légère différence de migration liée à la perte du tag histidine et du domaine de tétramérisation. De plus, l'anticorps anti-Histidine ne se fixe plus confirmant la séparation complète entre l'ectodomaine de la N9 et le domaine artificiel de notre montage. En fin de processus, les neuraminidases purifiées et concentrées présentent des concentrations similaires entre la N9 WT et la N9 substituée en R292K (Tableau 3).

Les activités enzymatiques ont été normalisées par rapport à la concentration protéique et sont exprimées en 4-Mu-nmol/h/mg. La différence entre les activités des virus n'est pas significative en raison de l'utilisation d'un test non paramétrique (Mann–Whitney) (tripliquât par protéine). Cependant l'activité de la N9 WT ( $67\,085,0 \pm 3\,854,0$  4-Mu-nmol/h/mg) est 90 fois plus importante que celle de la N9 substituée ( $719,8 \pm 151,0$  4-Mu-nmol/h/mg) (Figure 27A).

Concernant l'étude des Km pour les neuraminidases recombinantes, la substitution R292K dans la N9 s'accompagne d'une chute significative de l'affinité avec un Km de  $70,5 \pm 2,0$   $\mu\text{mol/L}$  pour la N9 WT contre  $527,2 \pm 33,3$   $\mu\text{mol/L}$  pour la N9 substituée ( $p = 0,01$ ) (Tableau 3, Figure 27B).

Les  $CI_{50}$  ont été interprétées comme précédemment. La substitution R292K entraîne une augmentation de presque 23 000 fois la valeur des  $CI_{50}$  de l'oseltamivir avec les N9 confirmant l'importante diminution de la sensibilité des virus porteurs de cette substitution. L'impact de cette dernière sur la résistance au zanamivir et au laninamivir est plus modéré mais les protéines recombinantes présentent tout de même des ratios de 134 pour le zanamivir et de 28 pour le laninamivir (Tableau 3, Figure 28) confirmant un impact de cette mutation sur la sensibilité vis-à-vis des trois INA.

Virus ou protéines recombinants	Km ( $\mu$ M) (Ratio) <sup>a</sup>	Activité (4-Mu-nmol/h/mL)	Titre infectieux ( $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /mL)	Titre hémagglutinants (UHA) <sup>b</sup>	Concentration protéique (mg/mL)	CI <sub>50</sub> (nM) (Ratio) <sup>a</sup>		
						Oseltamivir	Zanamivir	Laninamivir
virN9 WT	138,4 ± 12,55 (n=7)	1 973,3 ± 174,7 (n=3)	8,65 ± 0,14 (n=3)	1 458 / 4 096 (n=3)	NC	0,6 ± 0,2 (n=4)	1,4 ± 0,6 (n=4)	1,4 ± 0,2 (n=4)
virN9 R292K	901,3 ± 293,9 (6,5) *** (n=7)	339,0 ± 4,2 (n=2)	7,78 ± 0,51 (n=3)	13 122 / > 8 192 (n=3)	NC	8 480,0 ± 731,0 (14 133) ** (n=4)	51,6 ± 4,3 (37) ** (n=4)	27,4 ± 3,7 (20) ** (n=4)
recN9 WT	70,5 ± 2,0 (n=4)	40 421,6 ± 10 480,5 (n=3)	NC	NC	0,60 ± 0,13 (n=3)	0,6 ± 0,03 (n=3)	0,9 ± 0,07 (n=3)	1,4 ± 0,1 (n=3)
recN9 R292K	527,2 ± 33,3 (7,5) * (n=5)	548,5 ± 288,7 (n=4)	NC	NC	0,55 ± 0,16 (n=4)	13 781,0 ± 5247,0 (22 968) * (n=3)	120,6 ± 7,5 (134) * (n=3)	38,8 ± 18,1 (28) * (n=3)

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les virus réassortants et les protéines recombinantes.**

Les données présentées correspondent aux moyennes ± l'écart type avec entre parenthèses le nombre d'expériences réalisées (n=). Les résultats ont été comparés indépendamment pour les virus réassortants et pour les protéines recombinantes à l'aide d'un test de Mann-Whitney avec le logiciel GraphPad (Prism) ; \* correspond à un p<0,05, \*\* à un p<0,01, \*\*\* à un p<0,001 et \*\*\*\* à un p<0,0001. NC : non concerné.

a/ Les nombres entre parenthèses correspondent au ratio entre les résultats du virus ou de la protéine substituée par rapport au virus ou à la protéine sauvage.

b/ Les titres hémagglutinants ont été réalisés avec des globules rouges de poules et de cobayes (poule / cobaye).

### 3.5. Discussion

La substitution R292K est une des substitutions de résistance aux INA la plus fréquemment observée dans la N2 des virus humains A(H3N2) après la substitution E119V. En revanche, elle est très largement prédominante dans les N9 des virus aviaires A(H7N9). Si l'impact de cette substitution est bien caractérisé dans la littérature, ce n'est pas le cas pour les mécanismes induisant la résistance. Ce travail a donc eu pour objectif d'explorer les liens entre la substitution R292K dans la N9 et le phénotype de résistance associé en travaillant à la fois sur des virus issus de génétique inverse et sur des neuraminidases recombinantes purifiées. Cette étude a nécessité un important développement technique pour la production et la purification des neuraminidases recombinantes qui permettra également d'explorer d'autres substitutions dans des neuraminidases d'origines diverses.

Depuis 2013, les virus A(H7N9) apparus en Chine ont causé cinq vagues épidémiques et ont été responsables de plus de 1 560 cas humains avec une mortalité d'environ 40 % (21). Devant la gravité de ces infections, la mise en place d'un traitement par INA doit se faire le plus tôt possible et sur des durées prolongées. Au cours de l'hiver 2016-2017, la cinquième vague épidémique a été particulièrement importante se caractérisant par une augmentation de la diversité génétique au sein des virus A(H7N9) circulants (281). L'association d'une pression de sélection par les INA et de cette grande diversité génétique a favorisé l'apparition de variants résistants. Parmi eux, la substitution R292K est retrouvée dans une majorité des souches résistantes suite à un traitement par oseltamivir mais aussi dans de plus rares cas avant la mise en place des antiviraux ou encore dans des virus issus de l'environnement ou du réservoir aviaire (281,282). Contrairement à ce qui est observé dans les virus A(H3N2) humains, la présence de cette substitution ne semble donc pas ou peu impacter le fitness des virus A(H7N9). Cette observation reste à confirmer car les études expérimentales sont encore contradictoires. Certaines équipes montrent une diminution du fitness viral notamment chez le furet (69,283) alors que d'autres mettent en avant des capacités répliquatives *in vitro*, une pathogénicité dans le modèle souris et une transmissibilité chez le cochon d'inde identique entre les virus sauvages et substitués (153,284). Devant le risque d'émergence et de maintien d'une substitution de résistance dans ces virus, nous avons choisi d'étudier la substitution R292K dans la N9 issue de la souche prototype responsable des infections humaines depuis 2013 : A/Anhui/1/2013 (H7N9).

La substitution R292K est responsable d'une diminution importante de l'activité sialidasique des N9 par rapport aux neuraminidases sauvages. Dans notre système, cette diminution était de plus de 80% sur les virus issus de génétique inverse et de plus de 90% sur les protéines recombinantes. Une étude récente a analysé l'activité sialidasique et l'expression de N9 issus de plusieurs lignages portant ou non des substitutions de résistance après transfections de plasmides contenant la neuraminidase dans des cellules 293T. Ce protocole expérimental a également montré une diminution de plus de 90 % de l'activité sialidasique à la surface des cellules (160). En plus de

l'impact sur l'activité enzymatique, la substitution R292K a entraîné une division par sept de l'affinité des N9 pour leur substrat que ce soit sur les virus de génétique inverse ou sur les protéines recombinantes. Des résultats similaires ont été retrouvés dans la littérature avec des augmentations de Km pour les virus substitués comprises entre cinq et onze fois les valeurs obtenues avec les virus sauvages (130,284). D'autres résultats font état d'augmentations de Km pouvant aller jusqu'à plus de 180 fois mais ces mesures ont été réalisées à partir de souches virales différentes (A/Anhui/1/2013 et A/Shanghai/1/2013), ne permettant pas d'exclure la présence d'autres mutations dans le génome viral renforçant ce phénomène (130).

L'analyse des virus A(H7N9) circulants et portant la substitution R292K a mis en évidence une augmentation des  $CI_{50}$  de l'ensemble des INA. L'augmentation est majeure à la fois pour l'oseltamivir (multiplication des  $CI_{50}$  entre 4 500 et 135 000) et le peramivir (multiplication des  $CI_{50}$  entre 400 et 1 700) classant ces virus comme ayant une sensibilité très réduite à ces INA (69,130,153,284,285). L'impact de la substitution R292K sur les  $CI_{50}$  du laninamivir (multiplication des  $CI_{50}$  entre 20 et 30) et du zanamivir (multiplication des  $CI_{50}$  entre 11 et 80) est moins important mais les virus sont tout de même classés comme ayant une sensibilité réduite vis-à-vis de ces INA (69,130,153,284,285). L'étude de cette substitution dans des virus réassortants porteurs d'une N9 obtenue par génétique inverse et dans des neuraminidases recombinantes ont donné des résultats similaires (130,160,285,286). Les modèles utilisés au cours de notre travail permettent également d'obtenir des résultats concordants avec des  $CI_{50}$  augmentées de 14 000 à 23 000 fois pour l'oseltamivir, de 37 à 134 fois pour le zanamivir et de 20 à 30 fois pour le laninamivir. Ces résultats sont également renforcés par d'autres approches méthodologiques. Par exemple, une étude de 2015 a identifié des substitutions d'acides aminés associées à des résistances aux INA dans des neuraminidases du groupe 2 d'origine aviaire (N3, N7 et N9) en utilisant un protocole de mutations aléatoires associé à une sélection *in vitro* par oseltamivir ou zanamivir. Les substitutions identifiées ont également été caractérisées dans des virus réassortants obtenus par génétique inverse avec un fond A/PR8. La N9 utilisée dans ce travail était issue du virus A/Duck/Memphis/546/1974 (H11N9) et a confirmé la possibilité d'émergence et de maintien des substitutions E119V et R292K dans une N9 (159). De plus, les niveaux de résistance aux INA observés sur cette N9 étaient similaires à ce qui peut être observé sur les virus issus de cas humains récents.

Certaines précautions sont à prendre pour l'interprétation de nos résultats. Tout d'abord notre méthodologie étant centrée sur l'étude d'un seul représentant de N9, ne permet pas d'exclure un impact différent de la substitution R292K sur d'autres N9. De plus, la sensibilité des virus réassortants et des protéines recombinantes a été étudiée en utilisant les critères d'interprétation des  $CI_{50}$  définis par l'OMS (104). Ces critères ont été fixés pour les virus influenzae A humains portant soit une N1 soit une N2 et ne sont pas forcément adaptés à tous les virus influenzae A. Enfin, les différences que nous observons entre nos résultats et certains résultats présents dans la littérature peuvent être dues à l'utilisation de neuraminidase et/ou d'un fond génétique différents. En effet, le fond génétique influence la quantité de glycoprotéines à la surface des virus ce qui va

impacter les résultats d'activité enzymatique (268). Par exemple, un fond génétique qui favorisera l'expression de la neuraminidase à la surface des virions augmentera l'activité sialidasique du virus ce qui pourrait compenser la chute d'activité observable avec les substitutions de résistances. Nos résultats ont été obtenus, soit dans des virus réassortants composés d'un fond génétique commun (virus A/Mo) autorisant une comparaison directe entre les virus produits car ils ne se différencient que par leur neuraminidase, soit dans des protéines recombinantes permettant de nous affranchir du contexte viral et de l'impact des autres segments du génome.

L'apparition de résistance en présence de la substitution R292K, peut être mise en lien direct avec la chute d'activité sialidasique des neuraminidases substituées. Sur les virus, toute modification de l'activité sialidasique est difficile d'interprétation car elle peut être influencée par de très nombreux paramètres comme la forme des particules virales, la concentration des particules virales, la proportion relative de particules défectives, la présence de débris cellulaires portant à leur surface des neuraminidases. Il est donc indispensable de caractériser la composition complexe des surnageants de culture contenant les virus étudiés qu'ils soient issus d'un protocole de génétique inverse ou de l'isolement de souches circulantes. Dans notre travail, les résultats d'activité enzymatique ont été normalisés vis-à-vis du titre infectieux pour conserver une cohérence avec les résultats des deux précédentes études (Voir Partie C, Chapitres 1 et 2). Avec nos données les plus récentes, une normalisation par le titre hémagglutinant a également été réalisée pour prendre en compte la présence de particules non infectieuses dans le milieu et a montré des résultats similaires à ceux présentés précédemment avec une chute de plus de 90% de l'activité sialidasique pour les virus ayant une NA substituée en R292K.

Cette chute d'activité entre les virus sauvages et les virus porteurs de la substitution pourrait être liée à deux mécanismes distincts ; soit la substitution va avoir un impact direct sur la structure du site actif ou de la neuraminidase ; soit la substitution va entraîner une diminution de l'expression des neuraminidases à la surface des virions. Il est clair que la substitution R292K touchant un acide aminé catalytique dans la N9, va avoir un impact sur les fonctions enzymatiques de la protéine. Nos résultats confirment cette hypothèse car nous retrouvons une diminution équivalente de l'activité et de l'affinité des N9 substituées entre les observations faites sur les virus réassortants et sur les protéines recombinantes. De plus, l'impact structural de cette substitution sur le site actif de la N9 a été décrit dans d'autres études. En effet, l'acide aminé catalytique R292 est très conservé au sein des virus influenzae car il interagit directement avec le groupement carboxylate en C2 des acides sialiques ou des INA. La substitution R292K entraîne donc des modifications d'interaction entre les INA et le site actif avec notamment la perte de liaisons hydrogènes directes entre le site actif et le groupement carboxylate des INA (85). A la place, des liaisons indirectes via des molécules d'H<sub>2</sub>O sont observées entre l'acide aminé 292K et les INA entraînant une fixation plus faible de la molécule au site actif et expliquant pourquoi la sensibilité vis-à-vis de tous les INA est impactée (Figure 12) (130). De plus, cet acide aminé va interagir avec l'acide aminé E276 empêchant la création d'une poche pour la fixation du groupement pentyloxy de l'oseltamivir et expliquant l'importante

augmentation des  $CI_{50}$  avec cette molécule (Voir Partie A, Chapitre 3 et Figure 12) (130,131). La fixation du zanamivir et du laninamivir ne nécessite pas de modification structurale au niveau de l'acide aminé E276. L'impact de cette substitution sur la résistance à l'oseltamivir sera donc plus important que celui observé avec le zanamivir et le laninamivir.

Si l'impact de la substitution R292K sur le site actif de la N9 est indéniable, on peut se demander si l'expression de la neuraminidase substituée est également touchée pouvant entraîner un effet synergique sur le phénotype de résistance aux INA. En effet, la substitution H274Y diminue l'activité de la N1 des virus A(H1N1) et cette diminution d'activité s'accompagnerait d'une diminution d'expression de la neuraminidase à la surface des cellules (267,269,287). De plus des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire ont montré que l'association des substitutions E119V+I222L diminue également l'expression de la N2 substituée en comparaison à une N2 sauvage (5). Enfin, un travail récent par une équipe Australienne, a montré que l'impact des substitutions de résistance sur l'expression des neuraminidases dépend de la substitution étudiée mais également de la souche virale étudiée. Dans cette étude, plusieurs substitutions de résistance étaient étudiées après insertion dans des N9 issues de deux lignages différents. Dans leur système, la substitution R292K n'entraîne pas ou peu de diminution de l'expression des N9 à la surface des cellules (160). Pour confirmer ces résultats, nous allons poursuivre le développement de différentes techniques permettant la quantification relative des glycoprotéines de surface ainsi que la caractérisation des particules virales présentes dans les surnageants de culture. Si la diminution de l'expression des neuraminidases substituées à la surface des virions se confirme, une étude approfondie des mécanismes conduisant à cette baisse d'expression devra être réalisée afin de mieux comprendre les étapes clés de l'émergence de nouveaux virus résistants.

## **Partie D : Discussion et Perspectives**

# Chapitre 1 : Discussion

## 1.1. La surveillance des résistances

La surveillance des virus influenzae est un outil puissant permettant de recueillir des données en temps réel sur l'évolution et l'émergence des souches virales circulantes. Comme décrit dans la Partie B de ce document, cette surveillance est structurée au niveau national par les CNR et LNR et au niveau mondial via l'OMS, la FAO et l'OIE. L'organisation de la surveillance se fait donc au sein de deux branches parallèles l'une dédiée aux virus influenzae humains et l'autre aux virus influenzae animaux. Malgré la présence de souche virale spécifique dans chaque espèce animale, les virus influenzae sont connus pour être à l'origine de zoonoses voire de pandémies lors de l'émergence d'un nouveau sous-type chez l'Homme. Ces virus possèdent une capacité de franchissement de la barrière d'espèce et présentent donc un lien fort entre la santé humaine et la santé animale. Bien que les deux branches de la surveillance échangent en permanence, l'étude et le suivi de l'ensemble des virus influenzae au sein d'une structure commune pourrait favoriser le développement et l'expansion du concept « One health » tout en permettant une meilleure évaluation du risque global lié aux virus influenzae.

La surveillance est aussi indispensable pour l'étude de la résistance aux traitements antiviraux. En effet, pour les INA l'impact des substitutions de résistance présentes dans le virus va être dépendant à la fois du sous-type de neuraminidase mais également du fond génétique du virus. Par exemple, la substitution H274Y est très largement prédominante dans les virus résistants porteurs d'une N1 alors qu'elle est absente chez les virus résistants portant une N2 (108,122–126,288). On pourrait donc facilement conclure à une substitution spécifique du groupe 1 des neuraminidases, mais récemment elle a été retrouvée dans la N9 de virus A(H7N9) infectant l'Homme (286). Bien que minoritaire dans ce contexte, cette substitution était responsable d'une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir (multiplication des  $CI_{50}$  par 34 à 58) (286,289). De plus, avant 2008, la substitution H274Y était connue pour avoir un impact majeur sur le fitness des virus A(H1N1), empêchant son émergence et sa diffusion au niveau mondial (251). Ce paradigme a dû être complètement revu suite à l'émergence des virus Br07Y qui malgré la présence de la substitution H274Y dans leur N1 ont conservé un fitness optimal leur permettant de devenir majoritaire dès l'hiver suivant (Voir Partie A, Chapitre 3). Seule la surveillance des virus influenzae a permis de mettre en évidence et de suivre ce phénomène avant de pouvoir en étudier les mécanismes au laboratoire. L'apparition de substitutions additionnelles permettant de compenser les effets d'une substitution de résistance est complexe à prédire et nécessite donc une surveillance en temps réel des souches circulantes.

En plus de la surveillance globale des virus influenzae, la surveillance et le suivi des infections grippales chez les patients à risques, notamment immunodéprimés, permet d'optimiser leur prise en charge. Chez ces patients, les infections grippales sont généralement plus sévères avec des

excrétions prolongées pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois et avec un risque accru d'émergence de résistance surtout suite à la mise en place d'un traitement par INA (290). Le suivi des excrétions prolongées permet également la description de nouvelle substitution de résistance telle que la substitution I222L dans les virus influenzae B responsable d'une sensibilité très réduite à l'oseltamivir (138). L'interprétation des détections et quantifications des variants résistants chez les patients reste difficile. En effet, contrairement à l'augmentation des  $CI_{50}$  dans des mélanges de virus sensibles et résistants, aucun lien ne peut être établi entre la quantification des substitutions de résistance et la résistance clinique au traitement par INA (138). La seule conclusion possible est que la présence d'un variant minoritaire porteur d'une substitution de résistance représente un risque d'échec thérapeutique. Dans ce contexte nous pouvons utiliser diverses technologies (séquençage haut débit, digital PCR) pour étudier les sous-populations virales et comprendre leur dynamique d'évolution tout en étant le plus précoce possible dans le diagnostic des résistances.

Au cours de notre travail, la diversité du génome viral a pu être analysée par une étude longitudinale chez un patient immunodéprimé présentant un DICS (Voir Partie B, Chapitre 1). Ce patient a été infecté par un virus influenza pendant plus de six mois malgré l'utilisation d'INA mettant en avant la nécessité d'avoir des molécules antivirales très actives pour compenser l'immunodépression. Malheureusement, en France, seul l'oseltamivir est disponible facilement, le zanamivir IV peut être utilisé après l'obtention d'une ATU. Chez ce patient, l'utilisation d'oseltamivir a favorisé la réplication d'un virus A(H1N1)pdm09 porteur de la substitution H274Y atteignant jusqu'à 30% des variants présents dans un échantillon. Ce virus résistant présentait une perte de fitness objectivée par sa disparition progressive après l'arrêt du traitement mais également par l'impossibilité de l'isoler lors des cultures virales qui étaient dominées par la sous-population sensible. Depuis 2009, la substitution H274Y a été isolée à la fois chez des patients sous traitement (118,119) et chez des patients sans traitement antiviral mais elle n'a pas diffusé largement (120,121), très certainement à cause d'un impact, pour l'instant, non compensé sur le fitness viral. L'émergence d'un virus résistant pourrait faire suite à sa présence en très faible proportion dès le début de l'infection (291,292). Dans notre cas, aucune substitution de résistance n'a été détectée dans le premier prélèvement reçu (D14), n'excluant pas leur présence dans des proportions extrêmement faibles rendant indétectable ces sous-populations même par séquençage haut débit. En revanche l'utilisation de cette technologie de séquençage en plus des techniques virologiques conventionnelles a permis la caractérisation dynamique des variants viraux sélectionnés au cours des traitements par INA et la recherche d'autres mutations associées à la résistance. La substitution E119A dans la N1 a aussi pu être identifiée dans un échantillon. Cette substitution entraîne une diminution de la sensibilité des virus au zanamivir et laninamivir (263). De plus, la diversité génomique virale évolue au cours d'une infection prolongée et une augmentation a pu être observée lors de la restauration immunitaire après la greffe de sang de cordon. Cette augmentation de la diversité a déjà été rapportée sur un autre virus respiratoire à ARN, le VRS, chez un patient présentant des facteurs de risques similaires (293). La présence d'une pression de sélection lors d'un traitement par INA pourrait également augmenter

la diversité virale par accumulation et mise en contact de virus normaux et déficitaires dans les espaces péri-cellulaires (294). Cette augmentation de la diversité favoriserait les réassortiments et réarrangements génétiques augmentant le risque d'émergence de mutations compensatoires et/ou de mutations amplifiant le phénotype de résistance. Dans notre étude, des limitations techniques liées au séquençage nous ont empêchés d'évaluer ce phénomène ou de détecter la présence de particules défectives. Ces dernières peuvent avoir un rôle direct dans la pathogénicité des virus influenzae (295) justifiant le développement de techniques spécifiques pour les détecter (Voir Partie C, Chapitre 2, ci-dessous).

La présence d'une sous-population virale résistante est un facteur de risque d'infection prolongée chez les patients traités par un INA (296). La mise au point et l'utilisation de nouvelles technologies avec une grande sensibilité tels que le séquençage haut débit ou la PCR digitale est donc nécessaire afin de pouvoir détecter le plus précocement possible l'émergence des sous-populations virales résistantes. Nous avons donc pu tester et comparer les performances de trois techniques (séquençage haut débit, RT-ddPCR et RT-qPCR) pour la détection de la substitution H274Y dans des virus A(H1N1). Le séquençage haut débit est la méthode la plus coûteuse et la plus difficile à mettre en place car elle nécessite des compétences précises à la fois techniques pour la réalisation des analyses et bio-informatiques pour l'interprétation des résultats. De plus, ces résultats de séquençage peuvent se voir limiter par manque de données notamment pour les échantillons présentant de faible charge virale (297). Dans ce travail, tous les échantillons présentant un Ct supérieur à 27 n'ont pas permis d'obtenir une couverture suffisante fixée à 100X. A l'opposé, le séquençage haut débit permet d'avoir une sensibilité exceptionnelle en fonction de la profondeur obtenue sur certaines positions d'intérêts. Nous avons ainsi pu mettre en avant la présence d'une sous-population résistante dès le prélèvement initial chez l'un des deux patients étudiés. Ce résultat aurait pu prédire la réponse thérapeutique au traitement par oseltamivir (291). Le séquençage haut débit a également permis de détecter la persistance de population sensible dans tous les prélèvements même à des taux inférieurs à 2%. Ce phénomène a également pu être observé chez des patients infectés par des virus A(H7N9) (282) et pourrait être représentatif d'un meilleur fitness des souches sensibles persistantes même en présence d'une pression de sélection. Enfin le séquençage haut débit permet d'étudier l'ensemble du génome des virus et donc de mettre en évidence l'apparition de nouvelles mutations responsables de résistance ou des mutations pouvant avoir un impact sur la pathogénicité comme celle responsable de la substitution D222G dans l'hémagglutinine (245). Les techniques de RT-qPCR et RT-ddPCR sont plus faciles d'accès et moins coûteuses à mettre en place mais elles sont aussi limitées à un nombre restreint de mutations connues au préalable. La RT-ddPCR est une technique récente permettant d'obtenir une sensibilité et une précision de quantification bien supérieures aux techniques usuelles de RT-qPCR. En revanche, contrairement à ce qui peut être mis en avant par les constructeurs, le passage de la RT-qPCR à la RT-ddPCR n'est pas transparent et nécessite l'adaptation des protocoles techniques avec une optimisation des concentrations d'amorces, des températures du cycle d'amplification et de la

composition du mix réactionnel (avec ou sans dithiothreitol) (298,299). De plus, cette technologie peut rapidement être saturée limitant son intérêt pour un diagnostic direct. En cas de charge virale élevée ( $Ct < 23$ ), l'ensemble des gouttelettes produites seront positives ne permettant plus l'application des modèles mathématiques basés sur la loi de Poisson pour obtenir une quantification absolue. Ainsi, il reste nécessaire d'avoir une estimation de la quantité d'ADN cible (qPCR) dans notre échantillon avant le passage en ddPCR (299). Finalement la ddPCR, de par ses performances et sa relative simplicité de mise en œuvre, pourrait avoir toute sa place dans le diagnostic des sous-populations des virus influenzae mais une telle précision de détection ne modifie pour l'instant pas la prise en charge clinique des patients. En pratique, la mise en place du zanamivir IV est recommandée dès lors que l'excrétion virale dure plus de dix jours sous oseltamivir (300).

L'optimisation thérapeutique et le développement de nouvelles molécules antivirales passent également par une meilleure compréhension des mécanismes liés aux résistances et à leur émergence.

## 1.2. Les mécanismes de résistances

Le deuxième axe de ce travail a été orienté vers l'élargissement de nos connaissances sur l'impact des substitutions de résistance connues dans les neuraminidases humaines après insertion sur des neuraminidases issues du réservoir aviaire mais également sur l'étude des mécanismes responsables de l'émergence de ces phénotypes de résistance. Dans ce but nous avons choisi d'étudier les substitutions de résistances les plus fréquemment isolées dans des échantillons cliniques. Nous avons donc sélectionné la substitution H274Y pour l'étude dans les neuraminidases du groupe 1 et les substitutions E119V et R292K dans les neuraminidases du groupe 2 (108,122–126). Nous nous sommes également appuyés sur des travaux préliminaires réalisés dans le laboratoire pour ajouter à notre analyse une double substitution (E119V+I222L) ayant un effet synergique sur le phénotype de résistance dans les N2 (5,301).

Deux études récentes par une équipe Coréenne ont identifié des substitutions d'acides aminés associées à des résistances aux INA dans des neuraminidases d'origine aviaire en utilisant un protocole de mutations aléatoires associé à une sélection *in vitro* par oseltamivir ou zanamivir. Les substitutions identifiées ont également été caractérisées dans des virus réassortants obtenus par génétique inverse avec un fond A/PR8. La première de ces études a travaillé avec certaines neuraminidases du groupe 2 (N3, N7 et N9) et confirme la possibilité d'émergence et de maintien de la substitution R292K dans une N3 et des substitutions E119V et R292K dans une N7 ou une N9 (159). La seconde étude a travaillé principalement avec les neuraminidases du groupe 1 (N4, N5 et N8) mais également avec la N6 du groupe 2 pour laquelle on retrouve la substitution R292K. En revanche, dans les neuraminidases du groupe 1, plusieurs substitutions de résistances ont été retrouvées sans réussir à dégager une tendance commune pour toutes les neuraminidases de ce groupe (158). Notre travail montre que la substitution H274Y pour les neuraminidases du groupe 1 (N1, N4 et N5) et E119V±I222L et R292K pour les neuraminidases du groupe 2 (N2, N3, N7 et N9)

entraînent une augmentation des  $CI_{50}$  de l'oseltamivir. De plus, malgré l'utilisation de fonds génétiques différents, nos résultats de  $CI_{50}$  sont comparables à ceux préalablement publiés pour des neuraminidases sauvages ou substituées issues de tous les sous-types (69,157–160,302–304).

Notre étude présente certaines limites, notre méthodologie étant centrée : i) sur une démarche *in vitro* et ii) sur l'étude d'un seul représentant de chaque sous-type de neuraminidases ne permettant pas d'exclure un impact différent des substitutions sur d'autres neuraminidases issues d'un même sous-type. Il est intéressant de noter que les virus portant une N8 issue d'un virus A(H10N8) (A/Quail/Italy/1117.65) n'ont pas pu être récupérés malgré l'utilisation de deux fonds génétiques différents associés à l'ajout de neuraminidase exogène et le virus réassortant porteur d'une N9 avec la double substitution E119V+I222L a nécessité un changement de fond génétique pour être récupéré. Ces difficultés peuvent être évocatrices d'une incompatibilité entre les gènes du fond génétique et la neuraminidase aviaire. De plus, le fond génétique utilisé lors d'expérimentation de génétique inverse peut influencer sur les résultats d'études des glycoprotéines car il peut modifier leur quantité à la surface des virions (268). Nos résultats ont été obtenus dans des virus réassortants composés d'un fond génétique issu soit du virus A/PR8 soit du virus A/Mo et la comparaison des résultats n'a été réalisée qu'entre des virus présentant un fond génétique commun pour qu'ils ne se différencient que par leur neuraminidase. Malheureusement, l'utilisation d'un fond génétique commun empêche l'étude de la balance fonctionnelle entre hémagglutinine et neuraminidase. Ces limitations nous empêchent également de prédire le fitness viral (réplication et transmission) des virus acquérant naturellement ces substitutions.

La substitution de résistance H274Y est la plus fréquemment retrouvée dans les échantillons cliniques. Elle était isolée ponctuellement dans les virus A(H1N1) avant de se diffuser mondialement et devenir majoritaire en 2008. Depuis l'apparition des virus pandémiques A(H1N1)pdm09, cette substitution est à nouveau retrouvée occasionnellement chez les patients en présence d'une pression de sélection. Plusieurs groupes d'infections par ces virus portant la substitution H274Y en l'absence de traitement préalable par INA ont été décrits mais ils ne se sont pas diffusés largement (Voir partie A, Chapitre 3). Que ce soit dans les virus pré-pandémiques ou issus de la pandémie de 2009, la substitution H274Y entraîne une sensibilité très réduite à l'oseltamivir (multiplication de  $CI_{50}$  comprise entre 220 et 2 597) et une sensibilité réduite ou très réduite au peramivir (multiplication de  $CI_{50}$  comprise entre 50 et 1 100). En revanche la sensibilité au zanamivir et au laninamivir n'est pas impactée (108,122–126,288). Cette substitution a également été isolée dans des virus A(H5N1) infectant l'Homme entraînant exactement le même profil de résistance que dans les virus humains A(H1N1) (146,147,288). En revanche, la substitution H274Y n'a jamais été retrouvée dans les N4, N5 et N8 (154,155) laissant envisager un impact plus important sur le fitness des virus portant ces neuraminidases. Dans leur étude, Choi et al. n'ont pas récupéré de virus portant la substitution H274Y après leur protocole de mutation aléatoire associé à la sélection en présence d'INA renforçant l'idée d'une mauvaise permissivité des N4, N5 et N8 en comparaison aux N1 pour cette substitution. L'étude de cette substitution dans l'ensemble de ces neuraminidases en induisant son

apparition par un protocole de mutagenèse dirigée a montré un impact similaire dans toutes les neuraminidases du groupe 1 avec une sensibilité très diminuée à l'oseltamivir et au peramivir tandis que la sensibilité au zanamivir n'était pas modifiée (158). Nos résultats concordent parfaitement avec cette observation montrant une sensibilité très réduite à l'oseltamivir et une sensibilité normale au zanamivir et au laninamivir pour tous les virus porteurs d'une neuraminidase du groupe 1 substituée en H274Y. Considérant les autres propriétés enzymatiques de ces neuraminidases substituées, l'affinité est divisée par 2 ou 3 et l'activité peut également être légèrement diminuée mais de manière inégale en fonction des neuraminidases (148,158,265). L'impact structural de la substitution H274Y n'a été étudié que dans les N1 où elle est responsable du déplacement de E276 déstabilisant la poche hydrophobe nécessaire à la fixation du groupement pentyloxy de l'oseltamivir (Voir Partie A, Chapitre 3 et Figure 10) (107).

Exceptionnellement, la substitution H274Y a été retrouvée dans des virus portant une neuraminidase du groupe 2. Deux souches de virus A(H5N6) portant la substitution H274Y dans leur neuraminidase ont été isolées dans le réservoir aviaire mais leur profil de résistance n'a pas été établi (50). Cette substitution a également été retrouvée dans des virus A(H7N9) infectant l'Homme (289). Le profil de résistance qui en découle est difficilement prévisible. Dans les N2, N6 et N7, la substitution H274Y ne semble avoir presque aucun impact sur la sensibilité aux INA (158,159,301). En revanche, cette substitution est responsable d'une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir pour les virus porteur d'une N9 (multiplication des  $CI_{50}$  comprise entre 35 et 90) (159,160,286). Dans les N3 la substitution H274Y entraîne un profil de résistance à l'oseltamivir très variable avec une multiplication des  $CI_{50}$  comprise entre 16,6 à plus de 12 000 (159,302). Au niveau structural, la présence d'un petit acide aminé T252 dans les neuraminidases du groupe 2 à la place du Y252 retrouvé dans les N1 permettrait d'accueillir la substitution H274Y sans impacter de façon significative le positionnement de l'acide aminé E276 (Voir Partie A, Chapitre 3 et Figure 11) (75). Ces informations sont à relativiser car l'étude d'une N3 présentant un Y252 associé à la substitution H274Y ne montre qu'un impact mineur sur le phénotype de résistance à l'oseltamivir. D'autres acides aminés, comme le W295 ou celui en position 296, pourrait également jouer un rôle dans la résistance à l'oseltamivir en présence de la substitution H274Y (302).

De nombreuses substitutions de l'acide aminé E119 dans les neuraminidases ont été observées *in vivo* et *in vitro*. Ces substitutions peuvent être à l'origine de résistances d'intensité variable aux INA (102,142,159,305,306). Notre travail s'est focalisé sur l'étude de la substitution E119V qui est la plus fréquemment responsable de résistance à l'oseltamivir chez les virus porteurs d'une N2 (124). Chez ces virus, les  $CI_{50}$  de l'oseltamivir sont multipliées entre 20 et 1 000 alors que les  $CI_{50}$  des autres INA ne sont pas modifiées (134,141,142,159,306). Cette disparité dans les résultats observés peut être expliquée par la diversité des souches virales testées mais également par l'utilisation de différentes techniques d'évaluation de la résistance (chimiluminescence ou fluorescence) (102). Les virus porteurs d'une N2 avec la substitution E119V ont une affinité augmentée et une activité similaire ou un peu plus élevée que les virus avec la N2 sauvage (5,141,306). De plus, ces virus

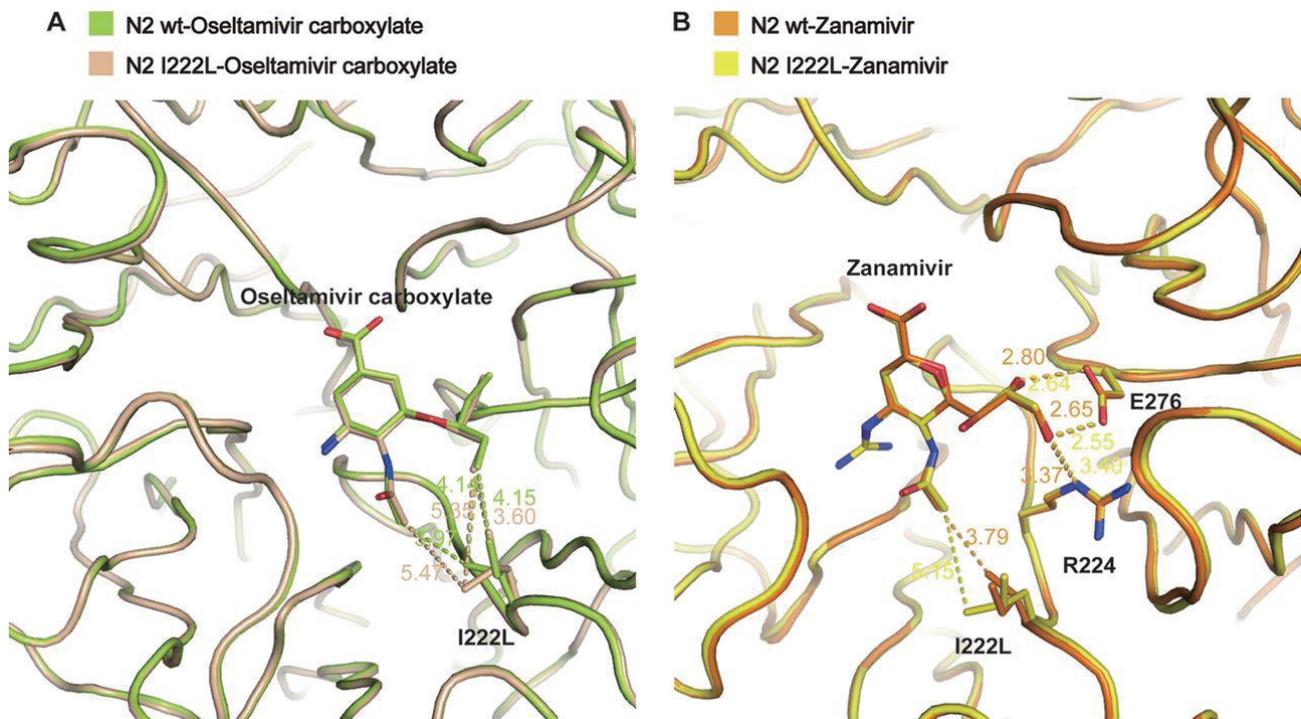
substitués présentent les mêmes cinétiques de croissance *in vitro* en cellules MDCK et la même transmissibilité *in vivo* dans le modèle furet que les virus porteurs de la N2 sauvage (5,135,142,307,308). En revanche, certains auteurs montrent une diminution de la transmission par aérosol des virus porteurs de N2 substituée en E119V chez le porc (134,142).

À notre connaissance, la substitution E119V n'a jamais été isolée *in vivo* dans des virus porteurs d'une N3, N6 ou N7 mais elle a déjà été retrouvée naturellement dans des virus porteurs de différentes N1, N2 et N9 (155,309,310). Un virus A/Taiwan/1/2013 (H7N9) portant la substitution E119V a été isolé chez un patient traité par oseltamivir et présentait une sensibilité réduite à cet INA ( $CI_{50}$  multipliées par 84). Ces virus étaient responsables d'une augmentation de la virulence chez la souris et présentaient une cinétique de réplication identique aux souches sauvages à la fois *in vivo* chez le furet et *in vitro* en cellules MDCK (69). La sensibilité à l'oseltamivir des virus A(H7N9) issus des deux lignages les plus récents était également très diminuée en présence de la substitution E119V ( $CI_{50}$  multipliées entre 135 et 388) (160). Les deux études coréennes ont montré que la substitution E119V entraînait une sensibilité réduite à l'oseltamivir pour les virus porteurs d'une N5, N7 ou d'une N9 mais elle n'était pas retrouvée dans les autres neuraminidases (158,159). Dans notre étude, les virus réassortants porteurs d'une N2, N7 ou N9 avec la substitution E119V étaient de sensibilité réduite à l'oseltamivir alors que les virus porteurs d'une N3 ou d'une N6 présentaient des  $CI_{50}$  multipliées par trois et par neuf respectivement. Cette substitution n'a modifié ni la réplication en cellules MDCK ni la sensibilité aux autres INA pour les virus réassortants. Dans certaines neuraminidases du groupe 1 (N1 et N5) la substitution E119V s'accompagne d'une diminution de la sensibilité pour tous les INA, avec notamment une multiplication des  $CI_{50}$  du zanamivir comprise entre 136 et 2 144 (158,288).

Comme pour la position 119, différentes substitutions de l'acide aminé I222 ont été décrites *in vivo* et *in vitro* dans les virus influenzae (137,138,301,311). Chacune de ces substitutions peut avoir un impact différent sur le profil de résistance aux INA. Notre travail a été centré sur la substitution I222L qui est difficilement retrouvée seule *in vivo* mais qui pourrait avoir un rôle important dans l'émergence de variants résistants aux INA (138,312–314). Lors d'un travail précédent, notre laboratoire a étudié cette substitution dans des virus réassortants portant une N2 humaine avec le fond génétique du virus A/Mo. Ces virus réassortants présentaient une très légère diminution de leur sensibilité à l'oseltamivir ( $CI_{50}$  multipliées par dix) mais aucune modification ni de l'activité sialidasique, ni de leur croissance *in vitro* (301).

La combinaison de plusieurs substitutions sur des acides aminés structuraux peut avoir un effet synergique dans les phénomènes de résistance aux INA. Une double substitution E119V+I222V a été trouvée chez un enfant immunodéprimé traité par oseltamivir et stéroïdes lors d'une infection par le virus A(H3N2) (141). Ce virus doublement substitué présentait une sensibilité très réduite à l'oseltamivir mais aucune diminution de sa croissance *in vitro* sur cellules MDCK. L'apparition de la substitution I222V semble améliorer le fitness viral comparé aux virus porteurs d'une N2 avec seulement la substitution E119V (142). Les acides aminés structuraux E119 et I222 sont très

conservés au sein de tous les virus influenzae A mais sont situés à deux extrémités du site actif des neuraminidases donc leur substitution ne devrait que peu gêner la fixation des acides sialiques naturels. Les virus portant des combinaisons de substitutions sur ces positions peuvent donc conserver un bon fitness viral bien qu'ils présentent une baisse de la sensibilité aux INA. Dans nos virus réassortants la double substitution E119V+I222L a été responsable d'une augmentation uniquement des  $CI_{50}$  de l'oseltamivir. En présence de la double substitution, des différences notables ont été observées entre la N2 et les autres neuraminidases du groupe 2 : i) l'activité sialidasique a chuté pour toutes les neuraminidases du groupe 2 mais cette diminution était beaucoup plus marquée pour N3, N6, N7 et N9 ; ii), l'affinité pour le MUNANA a augmenté pour les virus réassortants porteurs d'une N3, N6 ou N9 contrairement aux virus avec la N2. L'affinité des virus porteurs d'une N7 doublement substituée n'était pas interprétable en raison d'une activité trop faible. L'impact de ces substitutions sur la résistance et le fitness viral semble comparable pour toutes les neuraminidases du groupe 2 mais peut également dépendre du niveau d'activité de base de la neuraminidase sauvage car un minimum d'activité sialidasique semble nécessaire à la bonne réplication du virus.



**Figure 29 : Superposition du site actif d'une N2 sauvage et d'une N2 portant la substitution I222L.** Les pointillés représentent des liaisons hydrogènes. A/ La N2 substituée en position 222 (beige) possède des liaisons hydrogènes affaiblies avec les groupements de l'oseltamivir à la différence de la N2 sauvage (vert). B/ Les liaisons avec le zanamivir sont identiques que ce soit avec la N2 sauvage (orange) ou en présence de la substitution I222L (jaune). Figure adaptée de (136).

Une étude cristallographique publiée en décembre 2016 a analysé les structures d'une N2 sauvage ou substituée par E119V, I222L et E119V+I222L. Ces résultats ont permis d'avoir un premier aperçu des modifications structurales engendrées par ces substitutions sur la fixation de l'oseltamivir et du zanamivir. Au niveau structural, l'acide aminé E119 permet la formation d'une liaison hydrogène

avec le groupement carboxylate en C4 des acides sialiques et des INA tandis que l'acide aminé I222 interagit avec les acides aminés W178, A246, la chaîne carbonée de l'E276 et la chaîne latérale du R224 pour former une poche hydrophobe dans laquelle vient se positionner le méthyle du groupement acétamide présent sur les acides sialiques et l'oseltamivir (136,315). La substitution E119V va entraîner la perte de la liaison hydrogène entre le groupement amine de l'oseltamivir et la chaîne latérale de l'acide aminé E119. En présence de zanamivir, la substitution E119V entraîne la perte de la liaison hydrogène entre le groupement guanidine du zanamivir et l'acide aminé en position 119, en revanche les interactions supplémentaires avec les acides aminés E227 et W178 sont conservées ce qui expliquerait le faible effet de cette substitution sur la sensibilité des virus au zanamivir (Voir Partie A, Chapitre 3 et Figure 14) (136). La substitution I222L seule affaiblit l'interaction entre les INA et la poche hydrophobe alors qu'elle n'entraîne pas de diminution de la sensibilité (Figure 29) (136). Enfin la double substitution E119V+I222L entraîne à la fois la perte d'une liaison hydrogène entre les INA et l'acide aminé en position 119 et une perturbation des interactions avec la poche hydrophobe formée par l'acide aminé en position 222 (Figure 14 et Figure 29). Pour l'oseltamivir, cette double substitution modifie les liaisons avec tous les groupements fonctionnels de la molécule à l'exception du groupement carboxylate ce qui explique la diminution importante de sensibilité. Avec le zanamivir, l'effet synergique des deux substitutions est également présent mais semble moins important grâce aux liaisons supplémentaires faites avec les acides aminés E227 et W178 (136).

La substitution R292K a été isolée *in vivo* dans des virus humains A(H3N2) et dans des virus A(H7N9) au cours d'une infection humaine. Dans les N2, cette substitution est responsable d'une diminution importante de l'activité sialidasique associée à une réduction de l'infectiosité et du fitness viral *in vivo* (132,316). Contrairement à ce qui est observé dans les virus A(H3N2) humains, la présence de cette substitution ne semble pas ou peu impacter le fitness des virus A(H7N9) (Voir Partie C, Chapitre 3). Que ce soit dans les N2 ou dans les N9, cette substitution confère une sensibilité très réduite à l'oseltamivir ( $CI_{50}$  multipliées par plusieurs milliers) et une sensibilité réduite au zanamivir (multiplication des  $CI_{50}$  comprise entre 10 et 134) (127,128,284,288). Les études de la substitution R292K dans des virus réassortants porteurs d'une N2 ou N9 obtenus par génétique inverse et dans des neuraminidases recombinantes ont donné des résultats similaires (130,135,159,160,285). Notre travail montre également d'importantes augmentations des  $CI_{50}$  de l'oseltamivir dans les virus réassortants porteurs d'une neuraminidase du groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9) avec la substitution R292K. De plus, tous nos virus porteurs de cette substitution présentaient une augmentation des  $CI_{50}$  du zanamivir et du laninamivir bien que seuls les virus avec une N6 ou une N9 étaient classés comme ayant une sensibilité réduite à ces deux molécules. Les critères d'interprétation des  $CI_{50}$  définis par l'OMS ont été utilisés pour classer la sensibilité des virus réassortants étudiés (104). Ces critères ont été fixés pour les virus influenzae A humains portant soit une N1 soit une N2 et ne sont pas forcément adaptés à tous les virus influenzae A. Nos observations faites sur les virus issus de génétique inverse ont été confirmées lors de l'étude des

N9 recombinantes produites via un système baculovirus. Les études de Song et al. et de Choi et al. confirment la possibilité pour la substitution R292K d'être sélectionnée et de se maintenir dans des virus portant une neuraminidase du groupe 2. Dans leurs travaux, la substitution R292K entraînait une sensibilité très réduite à l'oseltamivir ( $CI_{50}$  multipliées par plus de 15 000) et au peramivir (multiplication des  $CI_{50}$  comprise entre 414 et 2 068). La sensibilité au zanamivir était réduite mais dans des proportions moindres (multiplication des  $CI_{50}$  comprise entre 21 et 51) (158,159).

Bien que n'ayant jamais été isolé *in vivo*, la substitution R292K a également été étudiée *in vitro* par des protocoles de génétique inverse dans des neuraminidases du groupe 1. Dans les N1, cette substitution a un impact variable en fonction des études, pouvant être responsable d'une légère diminution de la sensibilité soit à l'oseltamivir (317) soit au zanamivir (318). A l'opposé dans les N4 et N8, la substitution R292K peut être responsable d'une très forte diminution de la sensibilité à l'oseltamivir ( $CI_{50}$  multipliées par plus de 50 000) et au peramivir ( $CI_{50}$  multipliées par plus de 8 000) et une diminution de la sensibilité au zanamivir (multiplication des  $CI_{50}$  comprise entre 93 et 465). Enfin la substitution R292K dans une N5 semble avoir un impact intermédiaire avec une  $CI_{50}$  multipliée par 964 pour l'oseltamivir et par 284 pour le peramivir tandis que la sensibilité reste normale pour le zanamivir (158). Au niveau structural, l'acide aminé catalytique R292 est très conservé au sein des virus influenzae car il interagit directement avec le groupement carboxylate en C2 des acides sialiques, de l'oseltamivir et du zanamivir. La substitution R292K a été étudiée presque exclusivement au sein des N9, ce qui ne permet pas de présager de son impact dans les autres neuraminidases. La substitution R292K entraîne la perte d'une liaison hydrogène entre le site actif de la neuraminidase et le groupement carboxylate de l'oseltamivir (85). De plus, elle va empêcher la rotation du E276 indispensable à la création de la poche permettant une bonne fixation de l'oseltamivir (Figure 12) (131). La substitution R292K n'est pas responsable de résistance dans la N1 car l'acide aminé Y347 compense la perte de la liaison hydrogène avec le substrat (Figure 13) (75). Cette compensation n'est pas retrouvée pour les autres neuraminidases du groupe 1.

L'ensemble des substitutions décrites précédemment (H274Y, E119V±I222L et R292K) s'accompagne systématiquement d'une chute de l'activité sialidasique. Cette diminution se produit dans des proportions différentes en fonction de la substitution et du sous-type de neuraminidase étudiée mais peut être facilement liée au phénotype de résistance. Toute modification de l'activité sialidasique mesurée dans un contexte viral, est difficile d'interprétation car de nombreux paramètres vont avoir une influence (forme des particules virales, concentration des particules virales, proportion relative de particules défectives...). Il est donc indispensable de caractériser la composition complexe des surnageants de culture contenant les virus étudiés qu'ils soient issus d'un protocole de génétique inverse ou de l'isolement de souches circulantes. Dans ce but, différentes techniques de quantification et de caractérisation des particules virales sont en cours de développement au sein du laboratoire.



## Chapitre 2 : Conclusion et perspectives

En résumé de nos travaux sur les différentes substitutions de résistance :

- La substitution H274Y se retrouve préférentiellement *in vivo* dans les N1 mais son impact est identique pour toutes les neuraminidases du groupe 1 (N1, N4, N5 et N8) en induisant une sensibilité très diminuée seulement à l'oseltamivir. Pour le groupe 2, la substitution H274Y a un impact variable mais peut être responsable d'une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir.
- La substitution E119V entraîne une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir variable en fonction des neuraminidases avec un impact plus important pour les N2, N7, N9 et N5. D'autres substitutions présentes à cette position peuvent également entraîner une résistance aux INA et notamment au zanamivir : E119G ou E119D (158,159). De plus l'association des substitutions E119V+I222L entraîne un effet synergique sur le phénotype de résistance à l'oseltamivir pour l'ensemble des neuraminidases du groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9).
- Enfin la substitution R292K entraîne une diminution de la sensibilité à tous les INA dans toutes les neuraminidases du groupe 2. L'effet de cette substitution est surtout majeur pour l'oseltamivir. Attention, toutefois cette substitution peut avoir un effet très variable au sein des neuraminidases du groupe 1 pouvant varier de l'absence d'impact à de très fortes diminutions de la sensibilité. Bien que l'on puisse distinguer des tendances, ces substitutions sont donc à surveiller dans l'ensemble des virus influenzae.

Le phénotype de résistance associé à ces substitutions s'accompagne d'une diminution de l'activité sialidasique des neuraminidases : soit modérée (division par 2 en présence de la substitution H274Y dans la N1) soit majeure (diminution de 90 % de l'activité en présence de la substitution R292K dans la N9). Cette diminution peut être liée à deux mécanismes distincts ; soit la substitution va avoir un impact direct sur la structure du site actif de la neuraminidase soit la substitution va entraîner une diminution de l'expression des neuraminidases à la surface des virions. Des équipes ont évalué l'expression et l'activité des neuraminidases à la surface de cellules 293T après transfection transitoire d'un plasmide codant la neuraminidase d'intérêt associé à un tag V5. Les premiers travaux utilisant cette technique ont permis de montrer que la diminution de l'activité observée en présence de la substitution H274Y dans les virus A(H1N1) s'accompagne d'une diminution équivalente de la quantité de neuraminidases à la surface des cellules (267,269). Dans des travaux plus récents, Farrukee et al. ont montré que l'impact de chaque substitution sur l'expression des neuraminidases à la surface des cellules dépendait de la substitution étudiée mais aussi de l'origine de la neuraminidase étudiée. Par exemple, pour la substitution R292K, l'expression des N9 était normale alors que l'activité était fortement diminuée ; à l'opposé la diminution de l'activité observée avec les substitutions E119V ou H274Y était liée à une diminution de l'expression des N9 à la surface des cellules. En présence de la substitution I222T, l'expression de la N9 et son activité étaient dépendantes du lignage dont provenait la N9 ; soit augmentées si la N9 provenait du lignage A/Pearl

soit diminuées si elle provenait du lignage A/Yangtze (160). Cette technique efficace ne prend pas en compte l'ensemble des composants viraux et notamment le fond génétique pouvant influencer grandement l'expression des glycoprotéines de surface (268). Dans notre laboratoire nous avons donc montré que la diminution d'activité dans la N2 avec la double substitution E119V+I222L était liée à une diminution de la quantité totale de N2 à la surface des virions alors que l'activité sialidasique semblait être plus élevée que celle de la protéine sauvage (5). Dans cette étude, la quantification de la neuraminidase a été réalisée par ELISA avec un anticorps monoclonal IgG anti-A/Mo N2 (5). La quantification des autres neuraminidases issues du groupe 2 peut être plus complexe car les anticorps monoclonaux spécifiques ne sont pas tous commercialement disponibles. Des étapes supplémentaires de production de ces anticorps seraient donc nécessaires avant toute quantification de ces neuraminidases à la surface des virions. Pour pouvoir continuer l'exploration de l'expression des glycoprotéines de surface en s'affranchissant de la difficulté de production des anticorps monoclonaux, nous sommes en train de mettre au point l'analyse des protéines présentes dans nos surnageants par spectrométrie de masse. Cette technique est réalisée en partenariat avec les équipes de la plateforme « *Protein Science Facility* » située au sein de la SFR Biosciences à Lyon. En résumé, nos échantillons viraux seront lysés puis digérés avant d'être marqués et mélangés pour analyse. Cette technique nous permettra d'évaluer les quantités relatives de chaque protéine virale entre un virus sauvage et le virus résistant porteur de la substitution d'intérêt. La spectrométrie de masse pourrait également permettre l'obtention d'une quantification absolue des protéines présentes dans les échantillons mais cela nécessite le développement de peptides rapporteurs permettant de calibrer la quantification.

Pour comprendre l'impact des substitutions de résistance sur les propriétés enzymatiques des neuraminidases, il est nécessaire de pouvoir mesurer et comparer les activités sialidasiques entre différents virus. Or, cette activité est dépendante de nombreux paramètres liés à chaque virus, il est donc indispensable de pouvoir caractériser les virions présents dans nos surnageants de culture. L'étude des protéines recombinantes est une technique permettant d'avoir accès à l'ensemble de la caractérisation enzymatique de la neuraminidase en l'absence d'interférence liée aux fonds génétiques et aux autres protéines environnantes mais ces techniques sont très lourdes à mettre en place et ne permettent l'étude que d'une sélection restreinte de protéines. De plus, le montage artificiel avec un domaine de tétramérisation nécessaire à la production de ces protéines peut influencer les résultats obtenus. Nous sommes donc en train de développer plusieurs solutions permettant de caractériser les virions produits au cours de nos expérimentations. Dans un premier temps, nous devons obtenir une quantification fiable des virions produits qu'ils soient infectieux ou non. Pour cela, nous allons pouvoir tester la quantification particulière sur des automates spécialisés tel que le Virus Counter® (Ozyme) qui après un marquage permet le compte précis des virions présent en solution ou encore l'analyseur de nanoparticules qNano (Izon Science) qui permet d'obtenir une distribution de la taille des particules virales et une mesure d'un potentiel zeta dont les variations peuvent être liées à des différences de composition et/ou de forme des particules virales.

En plus de l'analyse particulière, nous allons quantifier les génomes viraux par une technique de RT-qPCR développée au laboratoire ciblant une région très conservée du segment M (319). Cette technique sera adaptée à une plateforme de PCR digitale simplifiant la quantification en s'affranchissant de la gamme de calibration. Nous exploiterons également cette plateforme pour quantifier les particules défectives présentes dans nos surnageants. Pour ce faire nous nous appuyerons sur la méthode publiée en 2016 permettant d'évaluer pour chaque gène la quantité de segment tronqué et de segment entier via l'amplification de couples d'amorces conçus pour amplifier soit une région interne de chaque segment soit une région externe des segments (320). Dans un deuxième temps, une description morphologique des virus produits pourra être réalisée par microscopie électronique à transmission après une coloration négative. En effet l'aspect pléomorphe des virus influenzae (virus allongé vs virus rond) peut être à l'origine de différence importante quant à la concentration des glycoprotéines de surface présentes dans un échantillon.

L'ensemble de ces méthodes va permettre de mieux caractériser les populations virales étudiées pour avancer dans la compréhension des mécanismes de résistance aux INA. Mais ces techniques pourront également être applicables à l'étude de l'ensemble des résistances décrites lors de l'utilisation de futurs antiviraux. En effet, l'arrivée prochaine du baloxavir marboxil dans le traitement de la grippe nécessitera l'adaptation de nos systèmes de surveillance mais également de nos techniques d'études de la résistance. Un des inconvénients majeurs de cette molécule est la rapide apparition de mutations de résistances dont les plus fréquentes correspondent à une substitution sur l'acide aminé I38 (I38T/M/F) dans PA entraînant une diminution de sensibilité au baloxavir de 10 à 100 fois (181). En clinique, bien que très rares, ces substitutions peuvent être retrouvées en l'absence de traitement antiviral (187). Nous avons donc commencé un travail de surveillance des substitutions dans la PA liées à une résistance vis-à-vis de ce nouveau traitement dans les prélèvements séquencés au CNR des virus des infections respiratoires France Sud entre 2016 et 2019. Parmi les 609 séquences analysées (179 A[H1N1], 323 A[H3N2], 79 B/Yamagata, 28 B/Victoria), nous n'avons retrouvé aucune substitution au niveau de l'acide aminé I38 en revanche un virus A(H1N1) présentait la substitution E199G dans sa PA. Cette substitution a été décrite dans des virus A(H3N2) comme ayant un impact mineur sur la sensibilité (multiplication des  $CE_{50}$  par 5) mais elle n'a jamais été testée dans les virus A(H1N1) (321). Il est donc nécessaire de développer au sein du réseau de surveillance des techniques standardisées d'études phénotypiques de la sensibilité à cette nouvelle molécule. Ce manque de données illustre bien la nécessité de poursuivre nos efforts à la fois dans le domaine de la surveillance mais également au niveau fondamental pour mieux comprendre les mécanismes liés à la résistance afin d'orienter au mieux les schémas thérapeutiques du futur, notamment lorsque différentes classes thérapeutiques pouvant parfois être associées seront présentes sur le marché.



## **Annexes**

## Annexe : Séquences des amorces

### Amorces de clonage N9 dans p1138

37NA9for            5' TAGTAGGTCTGAATTCCTAAAACCGGGCTGCAAT 3'

480NA9rev           5' TCAGATCTCACTCGAGTTAGAGGAAGTACTCTATTTTAGCC 3'

### Amorces de clonage N9 recombinante dans pFastBac

TOPOF              5' CACCATCACCACCATCACCAT 3'

TOPON9R            5' TTAGAGGAAGTACTCTATTTTAGCC 3'

### Amorces de mutagenèse dirigée pour l'obtention de la N9 mutée R292K

N9g866a forward    5' GAATTACCTGCACATGCAAGGACAATTGGCAGGGC 3'

N9g866a reverse    5' GCCCTGCCAATTGTCCTTGCATGTGCAGGTAATTC 3'

### Amorces de séquençage de l'insert dans le bacmid ou le baculovirus

Polyhedrin forward  5' AAATGATAACCATCTCGC 3'

SV40 polyA reverse  5' GGTATGGCTGATTATGATC 3'

## **Bibliographie**

1. World Health Organization. WHO | Influenza (Seasonal). WHO. 2018 [cité 26 avr 2019]. Disponible sur: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
2. CIDRAP. Avian Flu Scan. CIDRAP. 2019 [cité 26 avr 2019]. Disponible sur: [http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective?key=&page=1&f\[0\]=field\\_related\\_topics%3A49](http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective?key=&page=1&f[0]=field_related_topics%3A49)
3. World Health Organization. WHO | Monthly Risk Assessment Summary. WHO. 2019 [cité 26 avr 2019]. Disponible sur: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/HAI\\_Risk\\_Assessment/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/HAI_Risk_Assessment/en/)
4. World Health Organization. WHO Guidelines for Pharmacological management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. 2010. Disponible sur: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mn.gt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mn.gt.pdf)
5. Richard M, Ferraris O, Erny A, Barthelemy M, Traversier A, Sabatier M, et al. Combinatorial Effect of Two Framework Mutations (E119V and I222L) in the Neuraminidase Active Site of H3N2 Influenza Virus on Resistance to Oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2942-52.
6. Rameix-Welti M-A, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog.* 2008;4(7):e1000103.
7. Rameix-Welti M-A, Munier S, Le Gal S, Cuvelier F, Agou F, Enouf V, et al. Neuraminidase of 2007-2008 influenza A(H1N1) viruses shows increased affinity for sialic acids due to the D344N substitution. *Antivir Ther.* 2011;16(4):597-603.
8. World Health Organization. Rapport de la septième réunion du groupe de travail d'experts de l'OMS sur la surveillance de la sensibilité aux antiviraux dans le cadre du Système mondial de surveillance de la grippe et de riposte. 2019 [cité 26 avr 2019]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310846/WER9407.pdf>
9. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2019 [cité 3 juill 2019]. Disponible sur: <https://talk.ictvonline.org/>
10. Gouarin S, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Brouard J, Cuvillon-Nimal D, et al. Study of influenza C virus infection in France. *J Med Virol.* 2008;80(8):1441-6.
11. Heikkinen T, Silvennoinen H, Heinonen S, Vuorinen T. Clinical and socioeconomic impact of moderate-to-severe versus mild influenza in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(7):1107-13.
12. Chan JF-W, To KK-W, Tse H, Jin D-Y, Yuen K-Y. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends Microbiol.* 2013;21(10):544-55.
13. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* 2000;19(2):463-82.

14. Schrauwen EJA, Herfst S, Leijten LM, van Run P, Bestebroer TM, Linster M, et al. The Multibasic Cleavage Site in H5N1 Virus Is Critical for Systemic Spread along the Olfactory and Hematogenous Routes in Ferrets. *J Virol.* 2012;86(7):3975-84.
15. Schrauwen EJA, Bestebroer TM, Munster VJ, de Wit E, Herfst S, Rimmelzwaan GF, et al. Insertion of a multibasic cleavage site in the haemagglutinin of human influenza H3N2 virus does not increase pathogenicity in ferrets. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 6):1410-5.
16. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine.* 2007;25(30):5637-44.
17. World Organisation for Animal Health. Portail sur l'Influenza Aviaire. OIE. 2019 [cité 15 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/mise-a-jour-sur-linfluenza-aviaire/2019/>
18. Pohlmann A, Starick E, Harder T, Grund C, Höper D, Globig A, et al. Outbreaks among Wild Birds and Domestic Poultry Caused by Reassorted Influenza A(H5N8) Clade 2.3.4.4 Viruses, Germany, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(4):633-6.
19. World Organisation for Animal Health. Une seule santé: OIE. OIE. 2017 [cité 4 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.oie.int/fr/pour-les-medias/onehealth-fr/>
20. Freidl G, Meijer A, de Bruin E, de Nardi M, Munoz O, Capua I, et al. Influenza at the animal–human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Eurosurveillance.* 2014;19(18):20793.
21. World Health Organization. WHO | Situation updates - Avian influenza. WHO. 2018 [cité 26 avr 2019]. Disponible sur: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/avian\\_influenza/archive/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/archive/en/)
22. Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus ADME. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: From exposure to establishment in humans. *Vaccine.* 2012;30(30):4419-34.
23. Taubenberger JK. The origin and virulence of the 1918 « Spanish » influenza virus. *Proc Am Philos Soc.* 2006;150(1):86-112.
24. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. *N Engl J Med.* 2009;361(3):225.
25. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology.* 1998;252(2):331-42.
26. Bui C, Bethmont A, Chughtai AA, Gardner L, Sarkar S, Hassan S, et al. A Systematic Review of the Comparative Epidemiology of Avian and Human Influenza A H5N1 and H7N9 - Lessons and Unanswered Questions. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63(6):602-20.
27. Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(28):10452-7.
28. Chen H, Smith GJD, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, et al. H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature.* 2005;436(7048):191.

29. Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang X-W, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. 2005;309(5738):1206.
30. Naguib MM, Kinne J, Chen H, Chan K-H, Joseph S, Wong P-C, et al. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 2.3.2.1c in hunting falcons and kept wild birds in Dubai implicate intercontinental virus spread. *J Gen Virol*. 2015;96(11):3212-3212.
31. Shittu I, Meseko CA, Gado DA, Olawuyi AK, Chinyere CN, Anefu E, et al. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in Nigeria in 2015: evidence of widespread circulation of WA2 clade 2.3.2.1c. *Arch Virol*. 2017;162(3):841-7.
32. Tosh C, Nagarajan S, Kumar M, Murugkar HV, Venkatesh G, Shukla S, et al. Multiple introductions of a reassortant H5N1 avian influenza virus of clade 2.3.2.1c with PB2 gene of H9N2 subtype into Indian poultry. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2016;43:173-8.
33. Yuen K, Chan P, Peiris M, Tsang D, Que T, Shortridge K, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *The Lancet*. 1998;351(9101):467-71.
34. World Health Organization. Information on Avian Influenza A (H5N1) Identified in Human in Nepal. WHO. 2019 [cité 9 mai 2019]. Disponible sur: [http://www.searo.who.int/nepal/documents/emergencies/Avian\\_Influenza\\_A\\_In\\_Human/en/](http://www.searo.who.int/nepal/documents/emergencies/Avian_Influenza_A_In_Human/en/)
35. El-Zoghby EF, Aly MM, Nasef SA, Hassan MK, Arafa A-S, Selim AA, et al. Surveillance on A/H5N1 virus in domestic poultry and wild birds in Egypt. *Virol J*. 2013;10:203.
36. Dubey SC, Dahal N, Nagarajan S, Tosh C, Murugkar HV, Rinzin K, et al. Isolation and characterization of influenza A virus (subtype H5N1) that caused the first highly pathogenic avian influenza outbreak in chicken in Bhutan. *Vet Microbiol*. 2012;155(1):100-5.
37. Cui J, Qu N, Guo Y, Cao L, Wu S, Mei K, et al. Phylogeny, Pathogenicity, and Transmission of H5N1 Avian Influenza Viruses in Chickens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 [cité 10 mai 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5515836/>
38. Hui DS-C. Review of clinical symptoms and spectrum in humans with influenza A/H5N1 infection. *Respirology*. 2008;13:S10-3.
39. Zhao Z-M, Shortridge KF, Garcia M, Guan Y, Wan X-F. Genotypic diversity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 9):2182-93.
40. Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the « internal » genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9363-7.
41. Goneau LW, Mehta K, Wong J, L'Huillier AG, Gubbay JB. Zoonotic Influenza and Human Health—Part 1: Virology and Epidemiology of Zoonotic Influenzas. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(10):37.
42. Guan Y, Peiris JSM, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8950-5.

43. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJD, Xu KM, Duan L, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 2004;430(6996):209-13.
44. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):e1.
45. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012;6(1):1-5.
46. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2009;3(2):59-62.
47. Smith GJD, Donis RO, World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5 Evolution Working Group. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;9(5):271-6.
48. Lee D-H, Bahl J, Torchetti MK, Killian ML, Ip HS, DeLiberto TJ, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses and Generation of Novel Reassortants, United States, 2014–2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(7):1283-5.
49. Lee D-H, Bertran K, Kwon J-H, Swayne DE. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *J Vet Sci*. 2017;18(Suppl 1):269-80.
50. Bi Y, Chen Q, Wang Q, Chen J, Jin T, Wong G, et al. Genesis, Evolution and Prevalence of H5N6 Avian Influenza Viruses in China. *Cell Host Microbe*. 2016;20(6):810-21.
51. Yang L, Zhu W, Li X, Bo H, Zhang Y, Zou S, et al. Genesis and Dissemination of Highly Pathogenic H5N6 Avian Influenza Viruses. Williams BRG, éditeur. *J Virol*. 2017;91(5):e02199-16.
52. Beerens N, Heutink R, Pritz-Verschuren S, Germeraad EA, Bergervoet SA, Harders F, et al. Genetic relationship between poultry and wild bird viruses during the highly pathogenic avian influenza H5N6 epidemic in the Netherlands, 2017-2018. *Transbound Emerg Dis*. 2019;
53. Yang Z-F, Mok CKP, Peiris JSM, Zhong N-S. Human Infection with a Novel Avian Influenza A(H5N6) Virus. *N Engl J Med*. 2015;373(5):487-9.
54. Herfst S, Mok CKP, van den Brand JMA, van der Vliet S, Rosu ME, Spronken MI, et al. Human Clade 2.3.4.4 A/H5N6 Influenza Virus Lacks Mammalian Adaptation Markers and Does Not Transmit via the Airborne Route between Ferrets. *mSphere*. 2018 [cité 13 mai 2019];3(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5750386/>
55. Lee Y-J, Kang H-M, Lee E-K, Song B-M, Jeong J, Kwon Y-K, et al. Novel Reassortant Influenza A(H5N8) Viruses, South Korea, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1087-9.
56. Lee D-H, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song C-S, Swayne DE. Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds. *J Virol*. 2015;89(12):6521-4.

57. El-Shesheny R, Barman S, Feeroz MM, Hasan MK, Jones-Engel L, Franks J, et al. Genesis of Influenza A(H5N8) Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(8):1368-71.
58. Russell CA. Sick birds don't fly...or do they? *Science.* 2016;354(6309):174-5.
59. Claes F, Morzaria SP, Donis RO. Emergence and dissemination of clade 2.3.4.4 H5Nx influenza viruses-how is the Asian HPAI H5 lineage maintained. *Curr Opin Virol.* 2016;16:158-63.
60. Lee D-H, Sharshov K, Swayne DE, Kurskaya O, Sobolev I, Kabilov M, et al. Novel Reassortant Clade 2.3.4.4 Avian Influenza A(H5N8) Virus in Wild Aquatic Birds, Russia, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(2):359-60.
61. Bronner A, Niqueux E, Schmitz A, Bouquin SL, Huneau-Salaün A, Guinat C, et al. Description de l'épisode d'influenza aviaire hautement pathogène en France en 2016-2017. *Bull Épidémiologique Santé Anim Aliment.* 2017;(79). Disponible sur: [https://be.anses.fr/sites/default/files/N-016\\_2017-08-11\\_IAHP-FR\\_final.pdf](https://be.anses.fr/sites/default/files/N-016_2017-08-11_IAHP-FR_final.pdf)
62. Richard M, Herfst S, van den Brand JMA, Lexmond P, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, et al. Low Virulence and Lack of Airborne Transmission of the Dutch Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N8 in Ferrets. *PLoS ONE.* 2015;10(6):e0129827.
63. Briand F-X, Schmitz A, Ogor K, Le Prioux A, Guillou-Cloarec C, Guillemoto C, et al. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. *Eurosurveillance.* 2017 [cité 12 juill 2017];22(9). Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22729>
64. Schnirring L. Nations pare back avian flu efforts, but tough new steps in France. *CIDRAP.* 2017 [cité 19 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/04/nations-pare-back-avian-flu-efforts-tough-new-steps-france>
65. Andronico A, Courcoul A, Bronner A, Scoizec A, Lebouquin-Leneveu S, Guinat C, et al. Highly pathogenic avian influenza H5N8 in south-west France 2016-2017: A modeling study of control strategies. *Epidemics.* 2019;
66. ESA. Plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale | French National Epidemiological Surveillance Platform for Animal Health. ESA. 2019 [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.plateforme-esa.fr/>
67. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *N Engl J Med.* 2013;368(20):1888-97.
68. Iuliano AD, Jang Y, Jones J, Davis CT, Wentworth DE, Uyeki TM, et al. Increase in Human Infections with Avian Influenza A(H7N9) Virus During the Fifth Epidemic - China, October 2016-February 2017. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66(9):254-5.
69. Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, Jones J, De La Cruz JA, Sleeman K, et al. Characterization of drug-resistant influenza A(H7N9) variants isolated from an oseltamivir-treated patient in Taiwan. *J Infect Dis.* 2015;211(2):249-57.

70. Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, De La Cruz JA, Davis CT, Villanueva JM, et al. Neuraminidase Mutations Conferring Resistance to Oseltamivir in Influenza A(H7N9) Viruses. *J Virol*. 2015;89(10):5419-26.
71. Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, et al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):19123-7.
72. Sakai T, Nishimura SI, Naito T, Saito M. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Sci Rep*. 2017;7:45043.
73. Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol*. 2018 [cité 16 mai 2019];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6062596/>
74. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. 2014;22(4):183-91.
75. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*. 2006;443(7107):45-9.
76. Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*. 1983;303(5912):35-40.
77. Air GM. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012;6(4):245-56.
78. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol*. 2019 [cité 16 mai 2019];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6362415/>
79. Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J*. 1992;11(1):49.
80. Escuret V, Ferraris O, Lina B. The antiviral resistance of influenza virus. *Therapy*. 2011;8(6):741-62.
81. Meindl P, Tuppy H. [2-Deoxy-2,3-dehydrosialic acids. II. Competitive inhibition of *Vibrio cholerae* neuraminidase by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acylneuraminic acids. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1969;350(9):1088-92.
82. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*. 1983;303(5912):41-4.
83. Von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*. 1993;363(6428):418-23.
84. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet*. 2000;355(9206):827-35.
85. Varghese JN, Smith PW, Sollis SL, Blick TJ, Sahasrabudhe A, McKimm-Breschkin JL, et al. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure*. 1998;6(6):735-46.

86. Babu YS, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El-Kattan Y, et al. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem*. 2000;43(19):3482-6.
87. McLaughlin MM, Skoglund EW, Ison MG. Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(12):1889-900.
88. Watanabe A, Chang S-C, Kim MJ, Chu DW-S, Ohashi Y, MARVEL Study Group. Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: A double-blind, randomized, noninferiority clinical trial. *Clin Infect Dis*. 2010;51(10):1167-75.
89. Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. Influenza drug resistance. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(4):409-22.
90. Kohno S, Yen M-Y, Cheong H-J, Hirotsu N, Ishida T, Kadota J, et al. Phase III randomized, double-blind study comparing single-dose intravenous peramivir with oral oseltamivir in patients with seasonal influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5267-76.
91. Yamashita M. Laninamivir and its prodrug, CS-8958: long-acting neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza. *Antivir Chem Chemother*. 2010;21(2):71-84.
92. Ison MG. Antiviral Treatments. *Clin Chest Med*. 2017;38(1):139-53.
93. Haut conseil de la Santé Publique. Grippe saisonnière. Recommandation de prescription des antiviraux. Paris: HCSP; 2018. Disponible sur: <http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=530>
94. Jefferson T, Doshi P. Multisystem failure: the story of anti-influenza drugs. *BMJ*. 2014;348:g2263.
95. Jefferson T, Jones M, Doshi P, Spencer EA, Onakpoya I, Heneghan CJ. Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *BMJ*. 2014;348:g2545.
96. Heneghan CJ, Onakpoya I, Thompson M, Spencer EA, Jones M, Jefferson T. Zanamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *BMJ*. 2014;348:g2547.
97. Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Al Khuwaitir TSA, Al Mamun A, et al. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med*. 2014;2(5):395-404.
98. Dobson J, Whitley RJ, Pocock S, Monto AS. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *The Lancet*. 2015;385(9979):1729-37.
99. Adisasmito W, Chan PKS, Lee N, Oner AF, Gasimov V, Aghayev F, et al. Effectiveness of antiviral treatment in human influenza A(H5N1) infections: analysis of a Global Patient Registry. *J Infect Dis*. 2010;202(8):1154-60.

100. Zhang Y, Gao H, Liang W, Tang L, Yang Y, Wu X, et al. Efficacy of oseltamivir-peramivir combination therapy compared to oseltamivir monotherapy for Influenza A (H7N9) infection: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2016;16:76.
101. Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts NA, Klenk H-D. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol.* 2003;77(15):8418-25.
102. Okomo-Adhiambo M, Demmler-Harrison GJ, Deyde VM, Sheu TG, Xu X, Klimov AI, et al. Detection of E119V and E119I mutations in influenza A (H3N2) viruses isolated from an immunocompromised patient: challenges in diagnosis of oseltamivir resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1834-41.
103. Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, et al. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):742-50.
104. World Health Organization. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012;87(39):369-74.
105. Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Sleeman K, Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, et al. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Res.* 2010;85(2):381-8.
106. Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, Boivin G. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J Virol Methods.* 2015;224:58-66.
107. Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, et al. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature.* 2008;453(7199):1258-61.
108. Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Res.* 2018;157:38-46.
109. World Health Organization. WHO | Laboratory methodologies for testing the antiviral susceptibility of influenza viruses: Neuraminidase inhibitor (NAI). WHO. 2018 [cité 16 mai 2019]. Disponible sur: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/antiviral\\_susceptibility/nai\\_overview/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_overview/en/)
110. Hurt AC. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr Opin Virol.* 2014;8:22-9.
111. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, Hay A, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2264-72.

112. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2395-402.
113. Duan S, Govorkova EA, Bahl J, Zaraket H, Baranovich T, Seiler P, et al. Epistatic interactions between neuraminidase mutations facilitated the emergence of the oseltamivir-resistant H1N1 influenza viruses. *Nat Commun.* 2014;5:5029.
114. Behera AK, Basu S, Cherian SS. Molecular mechanism of the enhanced viral fitness contributed by secondary mutations in the hemagglutinin protein of oseltamivir resistant H1N1 influenza viruses: modeling studies of antibody and receptor binding. *Gene.* 2015;557(1):19-27.
115. Ginting TE, Shinya K, Kyan Y, Makino A, Matsumoto N, Kaneda S, et al. Amino acid changes in hemagglutinin contribute to the replication of oseltamivir-resistant H1N1 influenza viruses. *J Virol.* 2012;86(1):121-7.
116. Wu WL, Lau S-Y, Chen Y, Wang G, Mok BW-Y, Wen X, et al. The 2008-2009 H1N1 influenza virus exhibits reduced susceptibility to antibody inhibition: Implications for the prevalence of oseltamivir resistant variant viruses. *Antiviral Res.* 2012;93(1):144-53.
117. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):552-60.
118. Alonso M, Rodríguez-Sánchez B, Giannella M, Catalán P, Gayoso J, López Bernaldo de Quirós JC, et al. Resistance and virulence mutations in patients with persistent infection by pandemic 2009 A/H1N1 influenza. *J Clin Virol.* 2011;50(2):114-8.
119. Hurt AC, Deng YM, Ernest J, Caldwell N, Leang L, Iannello P, et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses circulating during the first year of the influenza A(H1N1) 2009 pandemic in the Asia-Pacific region, March 2009 to March 2010. *Eurosurveillance.* 2011;16(3).
120. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Leang SK, et al. Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *J Infect Dis.* 2012;206(2):148-57.
121. Meijer A, Jonges M, van Beek P, Swaan CM, Osterhaus AD, Daniels RS, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 virus in Dutch travellers returning from Spain, August 2012. *Eurosurveillance.* 2012;17(36):20266.
122. Meijer A, Rebelo-de-Andrade H, Correia V, Besselaar T, Drager-Dayal R, Fry A, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Res.* 2014;110:31-41.
123. Gubareva LV, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Huang W, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. *Antiviral Res.* 2017;146:12-20.
124. Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res.* 2015;117:27-38.

125. Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015. *Antiviral Res.* 2016;132:178-85.
126. Whitley RJ, Boucher CA, Lina B, Nguyen-Van-Tam JS, Osterhaus A, Schutten M, et al. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008-2011: the Influenza Resistance Information Study (IRIS). *Clin Infect Dis.* 2013;56(9):1197-205.
127. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *The Lancet.* 2004;364(9436):759-65.
128. Tamura D, Sugaya N, Ozawa M, Takano R, Ichikawa M, Yamazaki M, et al. Frequency of drug-resistant viruses and virus shedding in pediatric influenza patients treated with neuraminidase inhibitors. *Clin Infect Dis.* 2011;52(4):432-7.
129. Rath B, Chen X, Spies V, Muehlhans S, Obermeier P, Tief F, et al. Prospective surveillance of antiviral resistance in hospitalized infants less than 12 months of age with A(H3N2) influenza infection and treated with oseltamivir. *Antivir Ther.* 2017;22(6):515-22.
130. Wu Y, Bi Y, Vavricka CJ, Sun X, Zhang Y, Gao F, et al. Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Res.* 2013;23(12):1347-55.
131. Smith BJ, McKimm-Breshkin JL, McDonald M, Fernley RT, Varghese JN, Colman PM. Structural studies of the resistance of influenza virus neuraminidase to inhibitors. *J Med Chem.* 2002;45(11):2207-12.
132. Herlocher ML, Carr J, Ives J, Elias S, Truscon R, Roberts N, et al. Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res.* 2002;54(2):99-111.
133. Hurt AC, Nor'e SS, McCaw JM, Fryer HR, Mosse J, McLean AR, et al. Assessing the viral fitness of oseltamivir-resistant influenza viruses in ferrets, using a competitive-mixtures model. *J Virol.* 2010;84(18):9427-38.
134. Bouvier NM, Lowen AC, Palese P. Oseltamivir-Resistant Influenza A Viruses Are Transmitted Efficiently among Guinea Pigs by Direct Contact but Not by Aerosol. *J Virol.* 2008;82(20):10052-8.
135. Yen H-L, Herlocher LM, Hoffmann E, Matrosovich MN, Monto AS, Webster RG, et al. Neuraminidase Inhibitor-Resistant Influenza Viruses May Differ Substantially in Fitness and Transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4075-84.
136. Wu Y, Gao F, Qi J, Bi Y, Fu L, Mohan S, et al. Resistance to Mutant Group 2 Influenza Virus Neuraminidases of an Oseltamivir-Zanamivir Hybrid Inhibitor. *J Virol.* 2016;90(23):10693-700.
137. Boltz DA, Douangngeun B, Phommachanh P, Sinthasak S, Mondry R, Obert C, et al. Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 4):949-59.

138. Escuret V, Collins PJ, Casalegno J-S, Vachieri SG, Cattle N, Ferraris O, et al. A Novel I221L Substitution in Neuraminidase Confers High-Level Resistance to Oseltamivir in Influenza B Viruses. *J Infect Dis.* 2014;210(8):1260-9.
139. Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, et al. Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA.* 2007;297(13):1435-42.
140. Lee HK, Tang JW-T, Loh TP, Hurt AC, Oon LL-E, Koay ES-C. Molecular surveillance of antiviral drug resistance of influenza A/H3N2 virus in Singapore, 2009-2013. *PLoS ONE.* 2015;10(1):e0117822.
141. Baz M, Abed Y, McDonald J, Boivin G. Characterization of multidrug-resistant influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. *Clin Infect Dis.* 2006;43(12):1555-61.
142. Simon P, Holder BP, Bouhy X, Abed Y, Beauchemin CAA, Boivin G. The I222V neuraminidase mutation has a compensatory role in replication of an oseltamivir-resistant influenza virus A/H3N2 E119V mutant. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):715-7.
143. Abed Y, Baz M, Boivin G. A novel neuraminidase deletion mutation conferring resistance to oseltamivir in clinical influenza A/H3N2 virus. *J Infect Dis.* 2009;199(2):180-3.
144. Memoli MJ, Hrabal RJ, Hassantoufighi A, Jagger BW, Sheng Z-M, Eichelberger MC, et al. Rapid selection of a transmissible multidrug-resistant influenza A/H3N2 virus in an immunocompromised host. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1397-403.
145. Ferraris O, Kessler N, Valette M, Lina B. Evolution of the susceptibility to antiviral drugs of A/H3N2 influenza viruses isolated in France from 2002 to 2005. *Vaccine.* 2006;24(44-46):6656-9.
146. de Jong MD, Thanh TT, Khanh TH, Hien VM, Smith GJD, Chau NV, et al. Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection. *N Engl J Med.* 2005;353(25):2667-72.
147. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KHL, et al. Avian flu: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature.* 2005;437(7062):1108-1108.
148. Rameix-Welti MA, Agou F, Buchy P, Mardy S, Aubin JT, Véron M, et al. Natural Variation Can Significantly Alter the Sensitivity of Influenza A (H5N1) Viruses to Oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3809-15.
149. Sood R, Kumar N, Bhatia S, Chanu KV, Gupta CL, Pateriya AK, et al. Neuraminidase inhibitors susceptibility profiles of highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated from avian species in India (2006-2015). *Antiviral Res.* 2018;158:143-6.
150. McKimm-Breschkin JL, Barrett S, Wong FYK, Pudjiatmoko null, Azhar M, Selleck P, et al. Identification of Indonesian clade 2.1 highly pathogenic influenza A(H5N1) viruses with N294S and S246N neuraminidase substitutions which further reduce oseltamivir susceptibility. *Antiviral Res.* 2018;153:95-100.

151. Gao H-N, Lu H-Z, Cao B, Du B, Shang H, Gan J-H, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med*. 2013;368(24):2277-85.
152. Hu Y, Lu S, Song Z, Wang W, Hao P, Li J, et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance. *The Lancet*. 2013;381(9885):2273-9.
153. Hai R, Schmolke M, Leyva-Grado VH, Thangavel RR, Margine I, Jaffe EL, et al. Influenza A(H7N9) virus gains neuraminidase inhibitor resistance without loss of in vivo virulence or transmissibility. *Nat Commun*. 2013;4:2854.
154. Orozovic G, Orozovic K, Lennerstrand J, Olsen B. Detection of Resistance Mutations to Antivirals Oseltamivir and Zanamivir in Avian Influenza A Viruses Isolated from Wild Birds. Tripp R, éditeur. *PLoS ONE*. 2011;6(1):e16028.
155. Orozovic G, Orozovic K, Järhult JD, Olsen B. Study of oseltamivir and zanamivir resistance-related mutations in influenza viruses isolated from wild mallards in Sweden. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89306.
156. Stoner TD, Krauss S, DuBois RM, Negovetich NJ, Stallknecht DE, Senne DA, et al. Antiviral Susceptibility of Avian and Swine Influenza Virus of the N1 Neuraminidase Subtype. *J Virol*. 2010;84(19):9800-9.
157. Stoner TD, Krauss S, Turner JCM, Seiler P, Negovetich NJ, Stallknecht DE, et al. Susceptibility of avian influenza viruses of the N6 subtype to the neuraminidase inhibitor oseltamivir. *Antiviral Res*. 2012;93(3):322-9.
158. Choi W-S, Jeong JH, Kwon JJ, Ahn SJ, Lloren KKS, Kwon H-I, et al. Screening for Neuraminidase Inhibitor Resistance Markers among Avian Influenza Viruses of the N4, N5, N6, and N8 Neuraminidase Subtypes. *J Virol*. 2018;92(1).
159. Song M-S, Marathe BM, Kumar G, Wong S-S, Rubrum A, Zanin M, et al. Unique Determinants of Neuraminidase Inhibitor Resistance among N3, N7, and N9 Avian Influenza Viruses. *J Virol*. 2015;89(21):10891-900.
160. Farrukee R, Butler J, Reading PC, Hurt AC. Characterization of substitutions in the neuraminidase of A(H7N9) influenza viruses selected following serial passage in the presence of different neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*. 2019;168:68-75.
161. Luksza M, Lässig M. A predictive fitness model for influenza. *Nature*. 2014;507(7490):57-61.
162. World Health Organization. WHO | Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019-2020 northern hemisphere influenza season. WHO. 2019 [cité 23 mai 2019]. Disponible sur: [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2019\\_20\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2019_20_north/en/)
163. Davies WL, Grunert RR, Haff RF, MCGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, et al. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). *Science*. 1964;144(3620):862-3.
164. Stouffer AL, Acharya R, Salom D, Levine AS, Di Costanzo L, Soto CS, et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*. 2008;451(7178):596-9.

165. Schnell JR, Chou JJ. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature*. 2008;451(7178):591-5.
166. Pielak RM, Schnell JR, Chou JJ. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7379-84.
167. Pielak RM, Chou JJ. Flu channel drug resistance: a tale of two sites. *Protein Cell*. 2010;1(3):246-58.
168. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis*. 2007;196(2):249-57.
169. Sheu TG, Fry AM, Garten RJ, Deyde VM, Shwe T, Bullion L, et al. Dual resistance to adamantanes and oseltamivir among seasonal influenza A(H1N1) viruses: 2008-2010. *J Infect Dis*. 2011;203(1):13-7.
170. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 2009;360(25):2605-15.
171. Hurt A, Komadina N, Deng Y-M, Kaye M, Sullivan S, Subbarao K, et al. Detection of adamantane-sensitive influenza A(H3N2) viruses in Australia, 2017: a cause for hope? *Eurosurveillance*. 2017 [cité 23 mai 2019];22(47). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5710658/>
172. Cheung C-L, Rayner JM, Smith GJD, Wang P, Naipospos TSP, Zhang J, et al. Distribution of Amantadine-Resistant H5N1 Avian Influenza Variants in Asia. *J Infect Dis*. 2006;193(12):1626-9.
173. Chen H, Yuan H, Gao R, Zhang J, Wang D, Xiong Y, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *The Lancet*. 2014;383(9918):714-21.
174. Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B, et al. Adamantane-Resistant Influenza A Viruses in the World (1902–2013): Frequency and Distribution of M2 Gene Mutations. *PLoS ONE*. 2015 [cité 23 mai 2019];10(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358984/>
175. Jefferson T, Demicheli V, Di Pietrantonj C, Rivetti D. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(2):CD001169.
176. Beigel JH, Nam HH, Adams PL, Krafft A, Ince WL, El-Kamary SS, et al. Advances in respiratory virus therapeutics – A meeting report from the 6th isirv Antiviral Group conference. *Antiviral Res*. 2019;167:45-67.
177. Hayden FG, Shindo N. Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(2):176-86.
178. Zhou Z, Liu T, Zhang J, Zhan P, Liu X. Influenza A virus polymerase: an attractive target for next-generation anti-influenza therapeutics. *Drug Discov Today*. 2018;23(3):503-18.
179. Genentech. Genentech Announces FDA Approval of XOFLUZA (Baloxavir Marboxil) for Influenza. Press Releases | Wednesday, Oct 24, 2018. Genentech. 2018 [cité 23 mai 2019].

Disponible sur: <https://www.gene.com/media/press-releases/14761/2018-10-24/genentech-announces-fda-approval-of-xofl>

180. Heo Y-A. Baloxavir: First Global Approval. *Drugs*. 2018;78(6):693-7.
181. Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, Yamamoto A, Omoto S, Baba K, et al. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res*. 2018;160:109-17.
182. Fukao K, Noshi T, Yamamoto A, Kitano M, Ando Y, Noda T, et al. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(3):654-62.
183. McKimm-Breschkin JL, Jiang S, Hui DS, Beigel JH, Govorkova EA, Lee N. Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Res*. 2018;149:118-42.
184. Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, Lee N, de Jong MD, Hurt AC, et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med*. 2018;379(10):913-23.
185. O'Hanlon R, Shaw ML. Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. *Curr Opin Virol*. 2019;35:14-8.
186. Kawaguchi N, Koshimichi H, Ishibashi T, Wajima T. Evaluation of Drug–Drug Interaction Potential between Baloxavir Marboxil and Oseltamivir in Healthy Subjects. *Clin Drug Investig*. 2018;38(11):1053-60.
187. Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, et al. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Eurosurveillance*. 2019;24(12):1900170.
188. Byrn RA, Jones SM, Bennett HB, Bral C, Clark MP, Jacobs MD, et al. Preclinical activity of VX-787, a first-in-class, orally bioavailable inhibitor of the influenza virus polymerase PB2 subunit. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(3):1569-82.
189. Clark MP, Ledebner MW, Davies I, Byrn RA, Jones SM, Perola E, et al. Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2. *J Med Chem*. 2014;57(15):6668-78.
190. Finberg RW, Lanno R, Anderson D, Fleischhackl R, van Duijnhoven W, Kauffman RS, et al. Phase 2b Study of Pimodivir (JNJ-63623872) as Monotherapy or in Combination With Oseltamivir for Treatment of Acute Uncomplicated Seasonal Influenza A: TOPAZ Trial. *J Infect Dis*. 2019;219(7):1026-34.
191. Trevejo JM, Asmal M, Vingerhoets J, Polo R, Robertson S, Jiang Y, et al. Pimodivir treatment in adult volunteers experimentally inoculated with live influenza virus: a Phase IIa, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Antivir Ther*. 2018;23(4):335-44.

192. Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, et al. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(4):977-81.
193. Furuta Y, Takahashi K, Kuno-Maekawa M, Sangawa H, Uehara S, Kozaki K, et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):981-6.
194. Sangawa H, Komeno T, Nishikawa H, Yoshida A, Takahashi K, Nomura N, et al. Mechanism of action of T-705 ribosyl triphosphate against influenza virus RNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5202-8.
195. Baranovich T, Wong S-S, Armstrong J, Marjuki H, Webby RJ, Webster RG, et al. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J Virol.* 2013;87(7):3741-51.
196. Vanderlinden E, Vrancken B, Van Houdt J, Rajwanshi VK, Gillemot S, Andrei G, et al. Distinct Effects of T-705 (Favipiravir) and Ribavirin on Influenza Virus Replication and Viral RNA Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(11):6679-91.
197. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 2013;100(2):446-54.
198. Kiso M, Takahashi K, Sakai-Tagawa Y, Shinya K, Sakabe S, Le QM, et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(2):882-7.
199. Cao R-Y, Xiao J-H, Cao B, Li S, Kumaki Y, Zhong W. Inhibition of novel reassortant avian influenza H7N9 virus infection in vitro with three antiviral drugs, oseltamivir, peramivir and favipiravir. *Antivir Chem Chemother.* 2014;23(6):237-40.
200. Marathe BM, Wong S-S, Vogel P, Garcia-Alcalde F, Webster RG, Webby RJ, et al. Combinations of Oseltamivir and T-705 Extend the Treatment Window for Highly Pathogenic Influenza A(H5N1) Virus Infection in Mice. *Sci Rep.* 2016;6:26742.
201. Bai C-Q, Mu J-S, Kargbo D, Song Y-B, Niu W-K, Nie W-M, et al. Clinical and Virological Characteristics of Ebola Virus Disease Patients Treated With Favipiravir (T-705)-Sierra Leone, 2014. *Clin Infect Dis.* 2016;63(10):1288-94.
202. Madelain V, Nguyen THT, Olivo A, de Lamballerie X, Guedj J, Taburet A-M, et al. Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55(8):907-23.
203. Daikoku T, Yoshida Y, Okuda T, Shiraki K. Characterization of susceptibility variants of influenza virus grown in the presence of T-705. *J Pharmacol Sci.* 2014;126(3):281-4.
204. Goldhill DH, Te Velthuis AJW, Fletcher RA, Langat P, Zambon M, Lackenby A, et al. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(45):11613-8.
205. Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, et al. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. *Antiviral Res.* 2016;132:170-7.

206. Potter CW, Phair JP, Vodinelich L, Fenton R, Jennings R. Antiviral, immunosuppressive and antitumour effects of ribavirin. *Nature*. 1976;259(5543):496-7.
207. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med*. 2000;6(12):1375-9.
208. Togo Y. In vitro effect of virazole against influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 1973;4(6):641-2.
209. Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, Larsson A, Misiorny A, Norén JO, et al. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;11(6):946-51.
210. Magnussen CR, Douglas RG, Betts RF, Roth FK, Meagher MP. Double-blind evaluation of oral ribavirin (Virazole) in experimental influenza A virus infection in volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;12(4):498-502.
211. Smith CB, Charette RP, Fox JP, Cooney MK, Hall CE. Lack of effect of oral ribavirin in naturally occurring influenza A virus (H1N1) infection. *J Infect Dis*. 1980;141(5):548-54.
212. Stein DS, Creticos CM, Jackson GG, Bernstein JM, Hayden FG, Schiff GM, et al. Oral ribavirin treatment of influenza A and B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(8):1285-7.
213. Dunning J, Baillie JK, Cao B, Hayden FG, International Severe Acute Respiratory and Emerging Infection Consortium (ISARIC). Antiviral combinations for severe influenza. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(12):1259-70.
214. Jones JC, Marathe BM, Lerner C, Kreis L, Gasser R, Pascua PNQ, et al. A Novel Endonuclease Inhibitor Exhibits Broad-Spectrum Anti-Influenza Virus Activity In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(9):5504-14.
215. Jones JC, Marathe BM, Vogel P, Gasser R, Najera I, Govorkova EA. The PA Endonuclease Inhibitor RO-7 Protects Mice from Lethal Challenge with Influenza A or B Viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5).
216. Malakhov MP, Aschenbrenner LM, Smee DF, Wandersee MK, Sidwell RW, Gubareva LV, et al. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1470-9.
217. Belser JA, Lu X, Szretter KJ, Jin X, Aschenbrenner LM, Lee A, et al. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1493-9.
218. Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, De La Cruz JA, Fry AM, Villanueva J, et al. An investigational antiviral drug, DAS181, effectively inhibits replication of zoonotic influenza A virus subtype H7N9 and protects mice from lethality. *J Infect Dis*. 2014;210(3):435-40.
219. Moss RB, Hansen C, Sanders RL, Hawley S, Li T, Steigbigel RT. A phase II study of DAS181, a novel host directed antiviral for the treatment of influenza infection. *J Infect Dis*. 2012;206(12):1844-51.
220. Zenilman JM, Fuchs EJ, Hendrix CW, Radebaugh C, Jurao R, Nayak SU, et al. Phase 1 clinical trials of DAS181, an inhaled sialidase, in healthy adults. *Antiviral Res*. 2015;123:114-9.

221. Rossignol J-F. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res.* 2014;110:94-103.
222. Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *J Biol Chem.* 2009;284(43):29798-808.
223. Haffizulla J, Hartman A, Hoppers M, Resnick H, Samudrala S, Ginocchio C, et al. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(7):609-18.
224. Kadam RU, Wilson IA. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(2):206-14.
225. Gupta P, Kamath AV, Park S, Chiu H, Lutman J, Maia M, et al. Preclinical pharmacokinetics of MHAA4549A, a human monoclonal antibody to influenza A virus, and the prediction of its efficacious clinical dose for the treatment of patients hospitalized with influenza A. *mAbs.* 2016;8(5):991-7.
226. Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, Neu U, McAuliffe JM, Benjamin E, et al. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell.* 2016;166(3):596-608.
227. Tharakaraman K, Subramanian V, Viswanathan K, Sloan S, Yen H-L, Barnard DL, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody is effective against H7N9. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(35):10890-5.
228. Koszalka P, Tilmanis D, Hurt AC. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial. *Influenza Other Respir Viruses.* 2017;11(3):240-6.
229. Nachbagauer R, Krammer F. Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(4):222-8.
230. Kim J-H, Resende R, Wennekes T, Chen H-M, Bance N, Buchini S, et al. Mechanism-based covalent neuraminidase inhibitors with broad-spectrum influenza antiviral activity. *Science.* 2013;340(6128):71-5.
231. Yamaya M, Shinya K, Hatachi Y, Kubo H, Asada M, Yasuda H, et al. Clarithromycin inhibits type a seasonal influenza virus infection in human airway epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(1):81-90.
232. Miyamoto D, Hasegawa S, Sriwilaijaroen N, Yingsakmongkon S, Hiramatsu H, Takahashi T, et al. Clarithromycin inhibits progeny virus production from human influenza virus-infected host cells. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(2):217-22.
233. Lejal N, Tarus B, Bouguyon E, Chenavas S, Bertho N, Delmas B, et al. Structure-based discovery of the novel antiviral properties of naproxen against the nucleoprotein of influenza A virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2231-42.
234. Pizzorno A, Padey B, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Drug Repurposing Approaches for the Treatment of Influenza Viral Infection: Reviving Old Drugs to Fight Against a Long-Lived Enemy. *Front Immunol.* 2019;10:531.

235. Josset L, Textoris J, Loriod B, Ferraris O, Moules V, Lina B, et al. Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS ONE*. 2010;5(10).
236. Pizzorno A, Terrier O, Nicolas de Lamballerie C, Julien T, Padey B, Traversier A, et al. Repurposing of Drugs as Novel Influenza Inhibitors From Clinical Gene Expression Infection Signatures. *Front Immunol*. 2019;10:60.
237. Hung IFN, To KKW, Chan JFW, Cheng VCC, Liu KSH, Tam A, et al. Efficacy of Clarithromycin-Naproxen-Oseltamivir Combination in the Treatment of Patients Hospitalized for Influenza A(H3N2) Infection: An Open-label Randomized, Controlled, Phase IIb/III Trial. *Chest*. 2017;151(5):1069-80.
238. Ilyushina NA, Hay A, Yilmaz N, Boon ACM, Webster RG, Govorkova EA. Oseltamivir-ribavirin combination therapy for highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(11):3889-97.
239. Smee DF, Bailey KW, Morrison AC, Sidwell RW. Combination treatment of influenza A virus infections in cell culture and in mice with the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201 and ribavirin. *Chemotherapy*. 2002;48(2):88-93.
240. Duval X, van der Werf S, Blanchon T, Mosnier A, Bouscambert-Duchamp M, Tibi A, et al. Efficacy of oseltamivir-zanamivir combination compared to each monotherapy for seasonal influenza: a randomized placebo-controlled trial. *PLoS Med*. 2010;7(11):e1000362.
241. Escuret V, Cornu C, Boutitie F, Enouf V, Mosnier A, Bouscambert-Duchamp M, et al. Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antiviral Res*. 2012;96(2):130-7.
242. Beigel JH, Bao Y, Beeler J, Manosuthi W, Slandzicki A, Dar SM, et al. Oseltamivir, amantadine, and ribavirin combination antiviral therapy versus oseltamivir monotherapy for the treatment of influenza: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2017 [cité 26 sept 2017]; Disponible sur: [http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(17\)30476-0/abstract](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(17)30476-0/abstract)
243. Kim W-Y, Young Suh G, Huh JW, Kim S-H, Kim M, Kim YS, et al. Triple-combination antiviral drug for pandemic H1N1 influenza virus infection in critically ill patients on mechanical ventilation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5703-9.
244. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H-D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol*. 2002;12(3):159-66.
245. Casalegno J-S, Ferraris O, Escuret V, Bouscambert M, Bergeron C, Linès L, et al. Functional Balance between the Hemagglutinin and Neuraminidase of Influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 Variants. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104009.
246. Cohen M, Fisher CJ, Huang ML, Lindsay LL, Plancarte M, Boyce WM, et al. Capture and characterization of influenza A virus from primary samples using glycan bead arrays. *Virology*. 2016;493:128-35.
247. Stevens J, Blixt O, Paulson JC, Wilson IA. Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(11):857-64.

248. Gaymard A, Briand NL, Frobert E, Lina B, Escuret V. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(12):975-83.
249. Wong DDY, Choy K-T, Chan RWY, Sia SF, Chiu H-P, Cheung PPH, et al. Comparable fitness and transmissibility between oseltamivir-resistant pandemic 2009 and seasonal H1N1 influenza viruses with the H275Y neuraminidase mutation. *J Virol.* 2012;86(19):10558-70.
250. Yang J-R, Huang Y-P, Chang F-Y, Hsu L-C, Huang H-Y, Pan Y-T, et al. Characterization of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Taiwan in 2009-2011. *J Med Virol.* 2013;85(3):379-87.
251. Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol.* 2008;41(1):13-9.
252. Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res.* 2004;103(1-2):199-203.
253. Richard M, Erny A, Caré B, Traversier A, Barthélémy M, Hay A, et al. Rescue of a H3N2 Influenza Virus Containing a Deficient Neuraminidase Protein by a Hemagglutinin with a Low Receptor-Binding Affinity. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e33880.
254. Briand NL, Casalegno J-S, Escuret V, Gaymard A, Lina B, Ottmann M, et al. La balance HA-NA des virus influenza A(H1N1). *Virologie.* 2016;20(1):47-60.
255. Alim'agri. Influenza aviaire : les mesures de biosécurité pour les opérateurs professionnels. Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. 2018 [cité 4 juin 2019]. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/influenza-aviaire-les-mesures-de-biosecurite-pour-les-operateurs-professionnels>
256. OIE. OFFLU Network of expertise on animal influenza. OFFLU. 2019 [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <http://www.offlu.net/index.php?id=1>
257. Anses. Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2019 [cité 4 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/laboratoire-de-ploufragan-plouzan%C3%A9-niort#onglet0-tab>
258. World Health Organization. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). WHO. 2019 [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/)
259. Grippenet. La surveillance de la grippe en France. grippenet.fr. 2019 [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.grippenet.fr/fr/la-grippe/la-surveillance-en-france/>
260. Santé publique France. Santé publique France. Santé publique France. 2019 [cité 4 juin 2019]. Disponible sur: <http://www.santepubliquefrance.fr/>
261. Centre National de Référence Virus des infections respiratoires. Rapport annuel d'activité - Saison 2017-2018. Centre National de Référence Virus des infections respiratoires (dont la grippe); 2018. Report No.: 2018.

262. Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Pichon M, Frobert E, Vallee J, Lina B, et al. Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014. *J Clin Virol.* 2018;102:12-8.
263. Samson M, Abed Y, Desrochers F-M, Hamilton S, Luttick A, Tucker SP, et al. Characterization of drug-resistant influenza virus A(H1N1) and A(H3N2) variants selected in vitro with laninamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5220-8.
264. Ottmann M, Duchamp MB, Casalegno J-S, Frobert E, Moulès V, Ferraris O, et al. Novel influenza A(H1N1) 2009 in vitro reassortant viruses with oseltamivir resistance. *Antivir Ther.* 2010;15(5):721-6.
265. Ferraris O, Escuret V, Bouscambert M, Casalegno J-S, Jacquot F, Raoul H, et al. H1N1 influenza A virus neuraminidase modulates infectivity in mice. *Antiviral Res.* 2012;93(3):374-80.
266. Gaymard A, Frobert E, Lina B, Escuret V. Infections humaines par les virus influenza A(H7N9): émergence des virus, évolution et risque pandémique. *Virologie.* 2017;21(6):255-65.
267. Bloom JD, Gong LI, Baltimore D. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science.* 2010;328(5983):1272-5.
268. Moulès V, Terrier O, Yver M, Riteau B, Moriscot C, Ferraris O, et al. Importance of viral genomic composition in modulating glycoprotein content on the surface of influenza virus particles. *Virology.* 2011;414(1):51-62.
269. Bloom JD, Nayak JS, Baltimore D. A Computational-Experimental Approach Identifies Mutations That Enhance Surface Expression of an Oseltamivir-Resistant Influenza Neuraminidase. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22201.
270. Gaymard A, Charles-Dufant A, Sabatier M, Cortay J-C, Frobert E, Picard C, et al. Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group 2 neuraminidase (N2, N3, N6, N7 and N9). *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(11):3036-45.
271. Reed LJ, Muench H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints,. *Am J Epidemiol.* 1938;27(3):493-7.
272. Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res.* 2005;68(1):43-8.
273. Casalegno J-S, Bouscambert-Duchamp M, Caro V, Schuffenecker I, Sabatier M, Traversier A, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res.* 2010;87(2):242-8.
274. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-4.

275. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St. George K, Hatta M, Kawaoka Y, et al. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J Virol*. 2009;83(19):10309-13.
276. Pichon M, Picard C, Simon B, Gaymard A, Renard C, Massenavette B, et al. Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency. *Antiviral Res*. 2018;160:1-9.
277. Simon B, Pichon M, Valette M, Burfin G, Richard M, Lina B, et al. Whole Genome Sequencing of A(H3N2) Influenza Viruses Reveals Variants Associated with Severity during the 2016-2017 Season. *Viruses*. 2019;11(2).
278. Kühnel K, Jarchau T, Wolf E, Schlichting I, Walter U, Wittinghofer A, et al. The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17027-32.
279. Margine I, Palese P, Krammer F. Expression of functional recombinant hemagglutinin and neuraminidase proteins from the novel H7N9 influenza virus using the baculovirus expression system. *J Vis Exp JoVE*. 2013;(81):e51112.
280. Xu R, Zhu X, McBride R, Nycholat CM, Yu W, Paulson JC, et al. Functional Balance of the Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Accompanies the Emergence of the 2009 H1N1 Influenza Pandemic. *J Virol*. 2012;86(17):9221-32.
281. Quan C, Shi W, Yang Y, Yang Y, Liu X, Xu W, et al. New Threats from H7N9 Influenza Virus: Spread and Evolution of High- and Low-Pathogenicity Variants with High Genomic Diversity in Wave Five. *J Virol*. 2018;92(11).
282. Zou X, Guo Q, Zhang W, Chen H, Bai W, Lu B, et al. Dynamic Variation and Reversion in the Signature Amino Acids of H7N9 Virus During Human Infection. *J Infect Dis*. 2018;218(4):586-94.
283. Yen H-L, Zhou J, Choy K-T, Sia SF, Teng O, Ng IH, et al. The R292K mutation that confers resistance to neuraminidase inhibitors leads to competitive fitness loss of A/Shanghai/1/2013 (H7N9) influenza virus in ferrets. *J Infect Dis*. 2014;210(12):1900-8.
284. Yen H-L, McKimm-Breschkin JL, Choy K-T, Wong DDY, Cheung PPH, Zhou J, et al. Resistance to Neuraminidase Inhibitors Conferred by an R292K Mutation in a Human Influenza Virus H7N9 Isolate Can Be Masked by a Mixed R/K Viral Population. *mBio*. 2013;4(4).
285. Sleeman K, Guo Z, Barnes J, Shaw M, Stevens J, Gubareva LV. R292K substitution and drug susceptibility of influenza A(H7N9) viruses. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9):1521-4.
286. Gubareva LV, Sleeman K, Guo Z, Yang H, Hodges E, Davis CT, et al. Drug Susceptibility Evaluation of an Influenza A(H7N9) Virus by Analyzing Recombinant Neuraminidase Proteins. *J Infect Dis*. 2017;216(suppl\_4):S566-74.
287. Butler J, Hooper KA, Petrie S, Lee R, Maurer-Stroh S, Reh L, et al. Estimating the Fitness Advantage Conferred by Permissive Neuraminidase Mutations in Recent Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses. *PLoS Pathog*. 2014;10(4):e1004065.

288. World Health Organisation. Summary of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors (NAI). 2018 [cité 3 juill 2019]. Disponible sur: [https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/antiviral\\_susceptibility/NAI\\_Reduced\\_Susceptibility\\_Marker\\_Table\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/NAI_Reduced_Susceptibility_Marker_Table_WHO.pdf?ua=1)
289. Dong Z, Xia Y, Ya X, Chen L, Liu C, Wang R, et al. Epidemiological and genetic characteristics of the fifth avian influenza A(H7N9) wave in Suzhou, China, from October 2016 to April 2017. *Virus Genes*. 2018;54(2):182-9.
290. Memoli MJ, Athota R, Reed S, Czajkowski L, Bristol T, Proudfoot K, et al. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clin Infect Dis*. 2014;58(2):214-24.
291. Ghedin E, Holmes EC, DePasse JV, Pinilla LT, Fitch A, Hamelin M-E, et al. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J Infect Dis*. 2012;206(10):1504-11.
292. Ghedin E, Laplante J, DePasse J, Wentworth DE, Santos RP, Lepow ML, et al. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J Infect Dis*. 2011;203(2):168-74.
293. Grad YH, Newman R, Zody M, Yang X, Murphy R, Qu J, et al. Within-host whole-genome deep sequencing and diversity analysis of human respiratory syncytial virus infection reveals dynamics of genomic diversity in the absence and presence of immune pressure. *J Virol*. 2014;88(13):7286-93.
294. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir expands quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. *Sci Rep*. 2015;5:9163.
295. Dimmock NJ, Easton AJ. Defective Interfering Influenza Virus RNAs: Time To Reevaluate Their Clinical Potential as Broad-Spectrum Antivirals? *J Virol*. 2014;88(10):5217-27.
296. Lina B, Boucher C, Osterhaus A, Monto AS, Schutten M, Whitley RJ, et al. Five years of monitoring for the emergence of oseltamivir resistance in patients with influenza A infections in the Influenza Resistance Information Study. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018;12(2):267-78.
297. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.
298. Basu AS. Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. *SLAS Technol*. 2017;22(4):369-86.
299. Denis JA, Nectoux J, Lamy P-J, Sciellour CRL, Guermouche H, Alary A-S, et al. Développement des analyses moléculaires par PCR digitale pour la pratique clinique : principes, mise en œuvre pratique et recommandations. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2018;76(5):505-23.
300. Boivin G. Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7 Suppl 3:18-23.

301. Richard M, Deléage C, Barthélémy M, Lin YP, Hay A, Lina B, et al. Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol.* 2008;41(1):20-4.
302. Li Q, Qi J, Wu Y, Kiyota H, Tanaka K, Suhara Y, et al. Functional and structural analysis of influenza virus neuraminidase N3 offers further insight into the mechanisms of oseltamivir resistance. *J Virol.* 2013;87(18):10016-24.
303. Sun X, Li Q, Wu Y, Wang M, Liu Y, Qi J, et al. Structure of influenza virus N7: the last piece of the neuraminidase « jigsaw » puzzle. *J Virol.* 2014;88(16):9197-207.
304. Gao HN, Yao HP, Liang WF, Wu XX, Wu HB, Wu NP, et al. Viral genome and antiviral drug sensitivity analysis of two patients from a family cluster caused by the influenza A(H7N9) virus in Zhejiang, China, 2013. *Int J Infect Dis.* 2014;29:254-8.
305. Abed Y, Baz M, Boivin G. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir Ther.* 2006;11(8):971-6.
306. Zürcher T, Yates PJ, Daly J, Sahasrabudhe A, Walters M, Dash L, et al. Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(4):723-32.
307. Roussy J-F, Abed Y, Bouhy X, Boivin G. Emergence of an Oseltamivir-Resistant Influenza A/H3N2 Virus in an Elderly Patient Receiving a Suboptimal Dose of Antiviral Prophylaxis. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4234-6.
308. Herlocher ML, Truscon R, Elias S, Yen H-L, Roberts NA, Ohmit SE, et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis.* 2004;190(9):1627-30.
309. Achenbach JE, Bowen RA. Effect of Oseltamivir Carboxylate Consumption on Emergence of Drug-Resistant H5N2 Avian Influenza Virus in Mallard Ducks. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2171-81.
310. Pizzorno A, Bouhy X, Abed Y, Boivin G. Generation and characterization of recombinant pandemic influenza A(H1N1) viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *J Infect Dis.* 2011;203(1):25-31.
311. Pizzorno A, Abed Y, Bouhy X, Beaulieu E, Mallett C, Russell R, et al. Impact of mutations at residue I223 of the neuraminidase protein on the resistance profile, replication level, and virulence of the 2009 pandemic influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1208-14.
312. Hurt AC, Holien JK, Barr IG. In vitro generation of neuraminidase inhibitor resistance in A(H5N1) influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4433-40.
313. Govorkova EA, Ilyushina NA, Marathe BM, McClaren JL, Webster RG. Competitive Fitness of Oseltamivir-Sensitive and -Resistant Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses in a Ferret Model. *J Virol.* 2010;84(16):8042-50.

314. Itoh Y, Shichinohe S, Nakayama M, Igarashi M, Ishii A, Ishigaki H, et al. Emergence of H7N9 Influenza A Virus Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Nonhuman Primates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4962-73.
315. Von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(12):967-74.
316. Carr J, Ives J, Kelly L, Lambkin R, Oxford J, Mendel D, et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Res*. 2002;54(2):79-88.
317. Baek YH, Song M-S, Lee E-Y, Kim Y, Kim E-H, Park S-J, et al. Profiling and characterization of influenza virus N1 strains potentially resistant to multiple neuraminidase inhibitors. *J Virol*. 2015;89(1):287-99.
318. Choi W, Shin J-Y, Jeong H-E, Jeong M-J, Kim S-J, Lee J-Y, et al. Generation and Characterization of Recombinant Influenza A(H1N1) Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors. *Osong Public Health Res Perspect*. 2013;4(6):323-8.
319. Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, et al. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(4):317-21.
320. Schwartz SL, Lowen AC. Droplet digital PCR: A novel method for detection of influenza virus defective interfering particles. *J Virol Methods*. 2016;237:159-65.
321. Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, Noshi T, Yamaguchi H, Kawai M, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep*. 2018;8(1):9633.



## **Publications et communications personnelles**

Les publications ou communications personnelles en lien avec ce travail de thèse sont grisées.

### Publications Internationales

- PI1. Pichon M.\*, **GAYMARD A.\***, Zamolo H., Bazire C., Valette M., Sarkozy F., Lina B. *Web-based analysis of adherence to influenza vaccination among French healthcare workers*. Journal of Clinical Virology 2019 - IF=3,101
- PI2. Pichon M., Picard C., Simon B., **GAYMARD A.**, Renard C., Massenavette B., Malcus C., Monneret G., Morfin-Sherpa F., Valette M., Javouhey E., Millat G., Lina B., Josset L., Escuret V. *Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency*. Antiviral Research 2018 - IF=4,307
- PI3. **GAYMARD A.**, Bouscambert-Duchamp M., Pichon M., Frobert E., Vallee J., Lina B., Casalegno J.S., Morfin F. *Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014*. Journal of Clinical Virology 2018 - IF=3,101
- PI4. Pichon M., **GAYMARD A.**, Bolze P.A., Gaucherand P., Mekki Y. *Lethal and atypical fetopathy caused by cytomegalovirus recurrence with isolated intra-abdominal complication in an immune woman*. Medical Case Reports and Reviews, 2018 – IF non applicable
- PI5. Pichon M., **GAYMARD A.**, Josset L., Valette M., Millat G., Lina B., Escuret V. *Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: Comparison with qPCR and next generation sequencing analysis*. Antiviral Research 2017 - IF=4,307
- PI6. Pichon M., **GAYMARD A.**, Lebaill-Carval K., Frobert E., Beaufils E., Chene G., Tommasino M., Lina B., Gaucherand P., Gautheret-Dejean A., Bonnafous P., Gheit T., Buenerd A., Lamblin G., Mekki Y. *Vaginal neoplasia induced by an unusual papillomavirus genotype in a woman with inherited chromosomally integrated HHV-6*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2017 - IF=1,183
- PI7. **GAYMARD A.**, Charles A., Sabatier M., Cortay J.C., Frobert E., Picard C., Casalegno J.S., Ferraris O., Valette M., Ottmann M., Lina B., Escuret V. *Impact on antiviral resistance of E119V, I222L and R292K substitutions in influenza A viruses bearing a group 2 neuraminidase (N2, N3, N6, N7 and N9)*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016 – IF=5,217
- PI8. **GAYMARD A.**, Le Briand N., Frobert E., Lina B., Escuret V. *Functional balance between Neuraminidase and Hemagglutinin in influenza viruses*. Clinical Microbiology and Infection, 2016 - IF=5,394
- PI9. **GAYMARD A.**, Pichon M., Degaud M., Tasse J., Dupieux C., Laurent F. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the environment of public transport: data from the metropolitan network in Lyon, France*. International Journal of Antimicrobial Agents; 2016 - IF=4,253

### Publications Françaises

- PF1. Destras G., **GAYMARD A.**, Ducastelle S., Morfin F., Bensoussan D., Ader F., Frobert E. *Infection à adénovirus non contrôlée en transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques : premier cas d'immunothérapie adoptive à Lyon*. Médecine et Maladies infectieuses, soumis - IF=1,307

- PF2. Pichon M., Gebeile R., Lina B., Jacquet G., **GAYMARD A.** Quel prélèvement pour le transport des mycoplasmes, eSwab® ou écouvillon sec ? *Annales de Biologie Clinique*, 2019 - IF=0,401
- PF3. **GAYMARD A.**, Pichon M., Bal A., Massoud M., Buenerd A., Massardier J., Combourieu D., Guibaud L., Gaucherand P., Lina B., Mekki Y., Morfin F., Bolze P.A. *Prise en charge diagnostique et clinique d'une varicelle en cours de grossesse autour de cas cliniques.* *Annales de Biologie Clinique*, 2018 - IF=0,401
- PF4. **GAYMARD A.**, Lina B., Escuret V. *Infections humaines par les virus influenza A(H7N9) : émergence du virus, évolution et risque pandémique.* *Virologie*, 2017 - IF=0,036
- PF5. Le Briand N., Casalegno J.S., Escuret V., **GAYMARD A.**, Lina B., Ottmann M., Frobert E. *La balance HA-NA des virus influenza A (H1N1).* *Virologie*, 2016 - IF=0,036

## Chapitre d'Ouvrage

- CH1. **GAYMARD A.**, Pichon M., Bouscambert-Duchamp M., Lina B. *Virus Influenza. Traité de virologie clinique*, 2018

## Communications Orales

- CO1. **GAYMARD A.** *Présentation de la section Jeune microbiologiste (SFM-JM) de la Société Française de Microbiologie (SFM).* JFV, Lyon, Mars 2019
- CO2. **GAYMARD A.**, Halfon-Domenech C., Destras G., Billaud G., Escuret V., Morfin F., Gautheret A., Frobert E. *Transmission horizontale d'une d'HHV-6B intégrée au chromosome (iciHHV-6B) par greffe de cellules souches hématopoïétiques chez un enfant âgé de 10 ans.* JFV, Lyon, Mars 2019
- CO3. Destras G., Ducastelle S., **GAYMARD A.**, Lina B., Morfin F., Ader F., Frobert E. *Adoptive immunotherapy as a new therapeutic perspective for patients who underwent allogeneic stem cells transplantation: case report of the first implementation of adenovirus-specific T-cells transfer in Lyon.* I4ID, Décembre 2018, Lyon
- CO4. Pichon M., **GAYMARD A.**, Verneau V., Buenerd A., Gaucherand P., Bolze P.A., Mekki Y. *Severe fetopathy caused by cytomegalovirus recurrence with isolated intra-abdominal complication in an immune woman.* ESCV, Septembre 2016, Lisbonne
- CO5. **GAYMARD A.**, Charles A., Sabatier M., Ottmann M., Lina B., Escuret V. *Impacts des substitutions E119V, I222L et R292K dans les neuraminidases du groupe 2 chez les virus influenza A.* RICAI, Décembre 2015, Paris

## Communications Affichées

- CA1. Queromes G., **GAYMARD A.**, Valette M., Bresson M., Sabatier M., Lina B., Escuret V., Frobert E. *Evolution of the Hemagglutinin / Neuraminidase Balance of Human Influenza A Viruses.* 1<sup>er</sup> Journée ResaFLU, Mars 2019, Lyon
- CA2. **GAYMARD A.**, Destras G., Billaud G., Morfin F., Sénéchal A., Frobert E. *Intérêt d'un dépistage de l'HHV-8 chez les patients greffés : cas rapporté d'une contamination suite à une greffe pulmonaire.* JFV, Mars 2019, Lyon
- CA3. **GAYMARD A.**, Pichon M., Ibranosyan M., Barthelemy D., Semanas Q., Simon B., Etievant S., Frobert E., Valette M., Bouscambert M., Billaud G., Lina B., Casalegno J-S., Josset L.,

- Morfin F. *Epidemiology of respiratory syncytial virus circulating in Lyon, France, between 2014 and 2018*. JFV, Mars 2019, Lyon
- CA4. **GAYMARD A.**, Pichon M., Barthelemy D., Semanas Q., Simon B., Etievant S., Frobert E., Valette M., Bouscambert M., Billaud G., Casalegno J.S., Lina B., Josset L., Morfin F. *Genetic characterization of respiratory syncytial virus circulating in Lyon, France, between 2010 and 2018*. ESCV, Septembre 2018, Athènes
- CA5. Destras G., Ducastelle S., **GAYMARD A.**, Lina B., Morfin F., Ader F., Frobert E. *Adoptive immunotherapy as a new therapeutic perspective for patients who underwent allogeneic stem cells transplantation*. ESCV, Septembre 2018, Athènes
- CA6. **GAYMARD A.**, Pichon M., Valette M., Fiorini S., Rivat N., Billaud G., Morfin F., Lina B., Escuret V. *Détection des virus Influenzae et VRS sur le cobas®Liat® System*. RICAI, Décembre 2017, Paris
- CA7. Etievant S., Barthelemy D., Thomas M., Valette M., **GAYMARD A.**, Gillet Y., Lina B., Morfin F., Josset L., Pichon M. *RSV infections during 2014 -2016 epidemics: clinical and sequencing characteristics in University Hospital of Lyon, France*. ESCV, Septembre 2017, Stresa
- CA8. Pichon M. , **GAYMARD A.**, Jeannoel M., Charre C., Valette M., Schuffenecker I., Morfin F., Lina B. *Evaluation of Liferiver™ respiratory viral kit in a hospitalized population*. ESCV, Septembre 2017, Stresa
- CA9. Pichon M., Joly M., **GAYMARD A.**, Barthelemy D., Casalegno JS., Billaud G., Radenne S., Cotte L., Benchaib M, Lina B., Devouassaux-Shisheboran M., Mekki Y. *Papillomavirus des patients consultants en proctologie pour ASCUS au CHU de Lyon, France*. RICAI, Décembre 2016, Paris
- CA10. Pichon M., **GAYMARD A.**, Lebail-Karval K., Beaufils E., Chene G., Lina B., Gheit T., Mekki Y. *Vaginal intraepithelial neoplasia induced by unusual papillomavirus subtype associated with high load of human herpes virus 6*. ESCV, Septembre 2016, Lisbonne. 10<sup>ème</sup> conference sur les Human Herpesvirus 6 et 7. Juillet 2017, Berlin
- CA11. **GAYMARD A.** and Pichon M., Josset L., Valette M., Millat G., Lina B., Escuret V. *Characterisation of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunocompromised patients using ddPCR: comparison with deep sequencing analysis*. ESCV, Septembre 2016, Lisbon
- CA12. Bouscambert-Duchamp M., Casalegno J.S., **GAYMARD A.**, Frobert E., Vallee J., Lina B., Morfin F. *Emergence of the novel ON1 genotype of respiratory syncytial virus A in France between 2010 and 2014 : relations with clinical features*. ECCMID, Avril 2016, Amsterdam
- CA13. **GAYMARD A.**, Charles A., Sabatier M., Ottmann M., Lina B., Escuret V. *Are R292K, E119V and I222L substitutions associated with antiviral resistance in all Influenza virus subtypes within group 2 neuraminidases (N3, N6, N7, and N9)?* ESCV, Septembre 2015, Edimbourg. Obtention du **prix** récompensant les meilleurs posters. ESWI Influenza conference, September 2017, Riga
- CA14. **GAYMARD A.** and Pichon M., Degaud M., Tasse J., Dupieux C., Laurent F. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in environment of public transport: data from metropolitan in Lyon, France*. ECCMID, Avril 2015, Copenhagen



# Étude et suivi de la résistance des virus Influenzae A aux inhibiteurs de la neuraminidase

GAYMARD Alexandre

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON ; 2019

## Résumé

Les virus influenzae sont des pathogènes importants ayant un impact à la fois écologique et en santé publique humaine. En effet chez l'Homme, ces virus sont responsables de la grippe, qu'elle soit saisonnière, pandémique ou zoonotique. Face à ces infections, très peu d'options thérapeutiques sont disponibles : seuls les inhibiteurs de neuraminidase (INA) sont recommandés par l'OMS mais des résistances ont été décrites. Les substitutions H274Y, E119V et R292K sont les substitutions de résistance retrouvées le plus fréquemment dans les neuraminidases des virus influenzae humains. Dans notre travail, l'étude des résistances aux INA a été organisée autour de deux axes, d'une part via le suivi clinique et biologique de la résistance chez les patients et d'autre part, via l'étude de l'impact des substitutions de résistance dans des neuraminidases aviaires. La surveillance de ces résistances au sein du Centre National de Référence des virus des infections respiratoires a permis la caractérisation du génome de virus influenza A(H1N1)pdm09 dans un contexte d'excrétion chronique en présence d'un traitement par INA chez un patient atteint de déficit immunitaire combiné sévère mais aussi le développement et l'évaluation de la PCR digitale pour le diagnostic de la substitution H274Y dans les virus A(H1N1). Notre travail a ensuite permis l'analyse des substitutions H274Y, E119V±I222L et R292K sur l'ensemble des sous-types de neuraminidases des virus influenzae A grâce à la production de virus réassortants. La substitution H274Y se retrouve préférentiellement dans les N1 mais est responsable d'une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir pour toutes les neuraminidases du groupe 1 (N1, N4, N5 et N8). La substitution E119V entraîne une diminution de la sensibilité à l'oseltamivir variable en fonction des neuraminidases avec un impact plus important pour les N2, N7, N9 et N5. De plus l'association des substitutions E119V+I222L entraîne un effet synergique sur ce phénotype de résistance à l'oseltamivir. Enfin la substitution R292K entraîne une diminution de la sensibilité à tous les INA dans toutes les neuraminidases du groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9). Au niveau mécanistique, la production d'une N9 recombinante portant la substitution R292K a montré un impact majeur de la substitution sur l'activité enzymatique. De plus, un développement technologique pour la caractérisation des particules virales (microscopie électronique, RT-ddPCR, comptage particulaire, spectrométrie de masse), toujours en cours au laboratoire, va nous permettre d'aller plus loin dans l'analyse des mécanismes qui sous-tendent l'apparition de ces résistances.