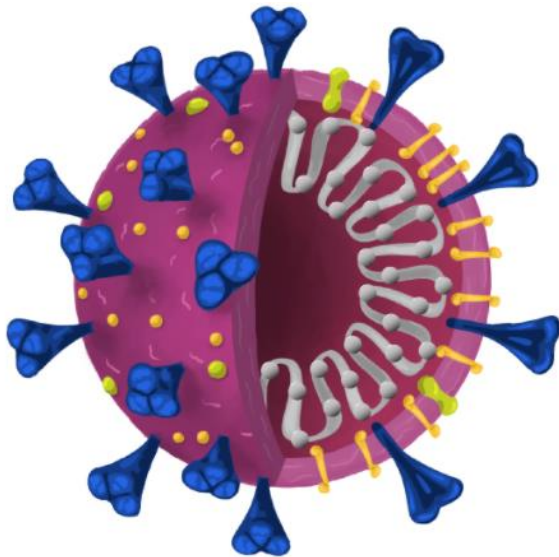


Variants SARS-CoV-2



Vincent THIBAUT

*Laboratoire de Virologie
CHU de Rennes
2 rue Henri le Guilloux
35033 Rennes cedex 9*

**IRSET - INSERM U1085
Université Rennes 1**

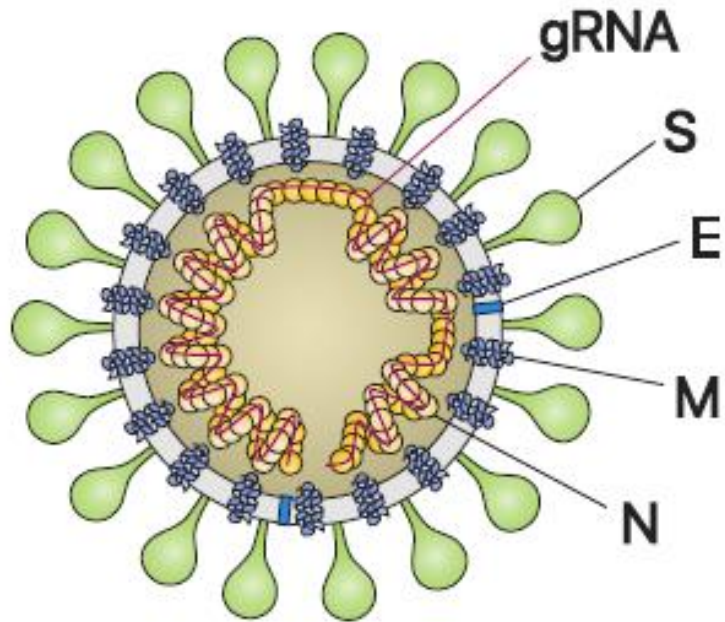


CENTRE
HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE
DE RENNES

UN PEU DE SCIENCE...

Les bases fondamentales

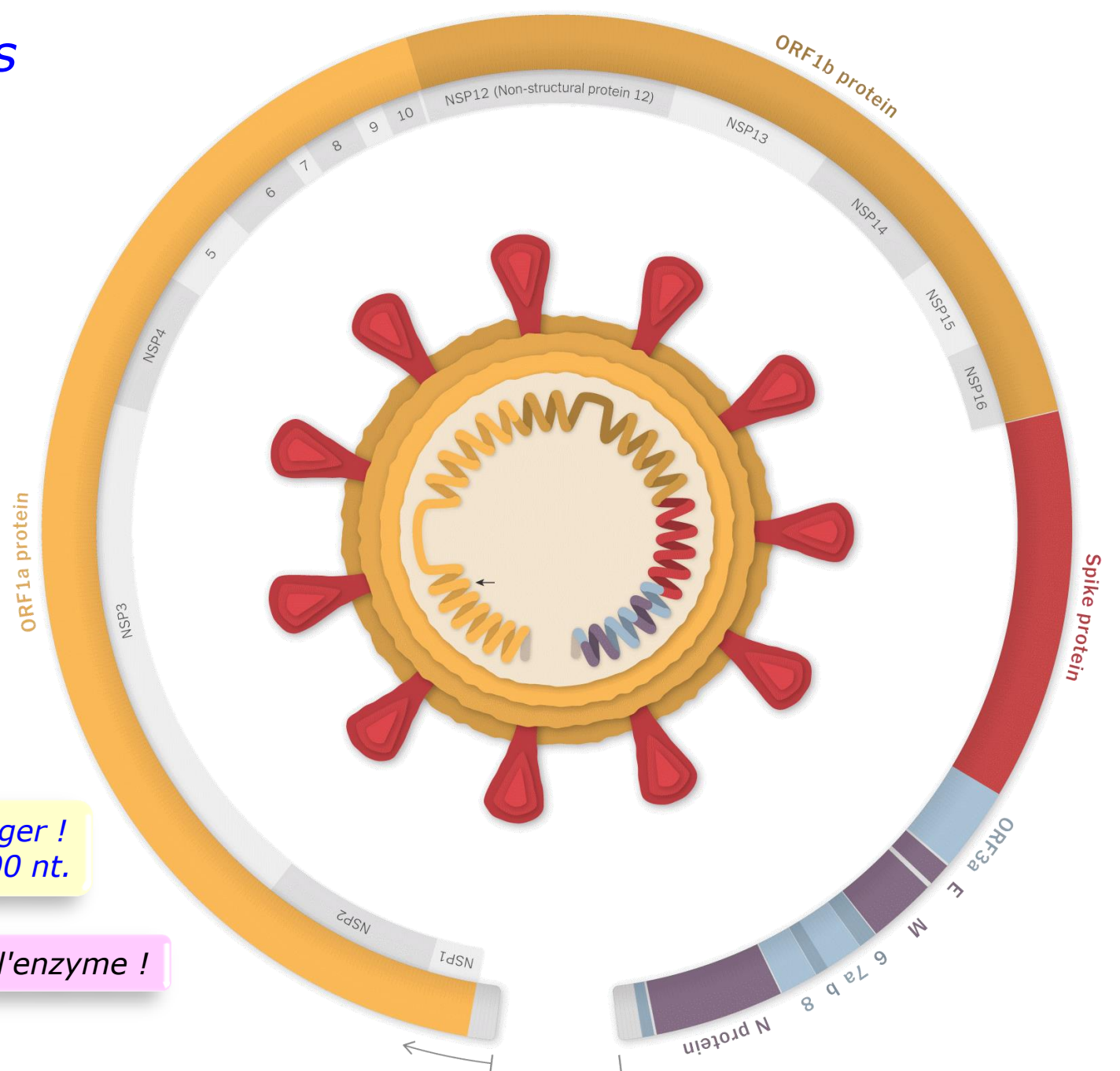
Le virus et son ARN



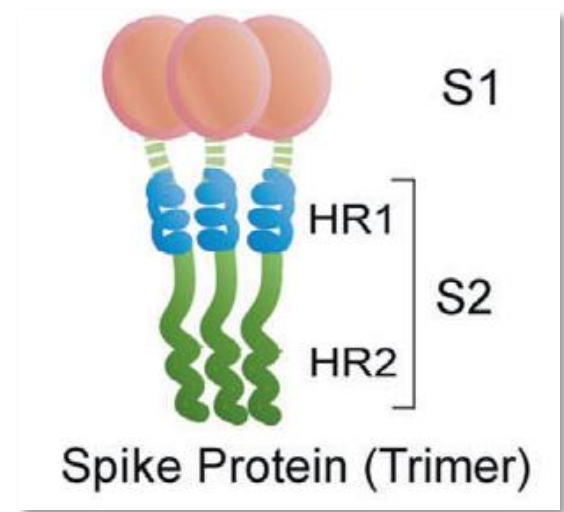
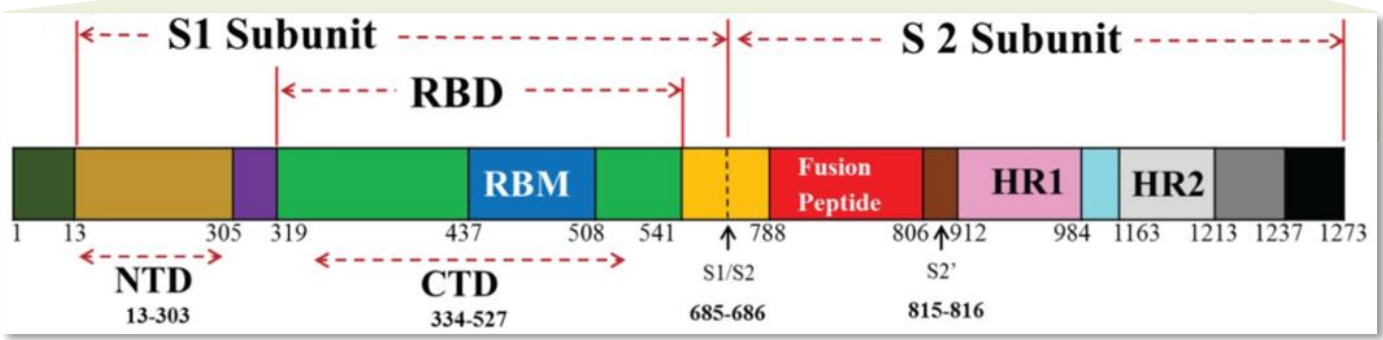
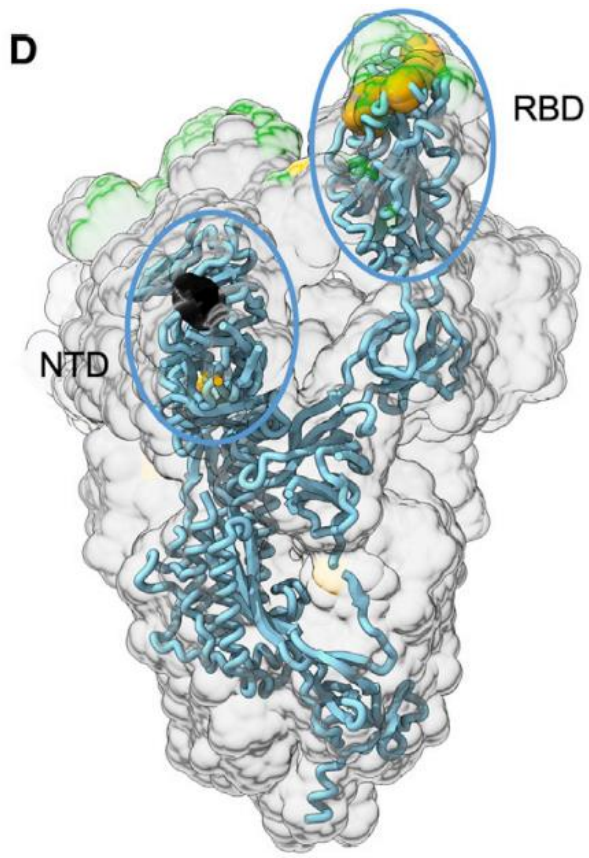
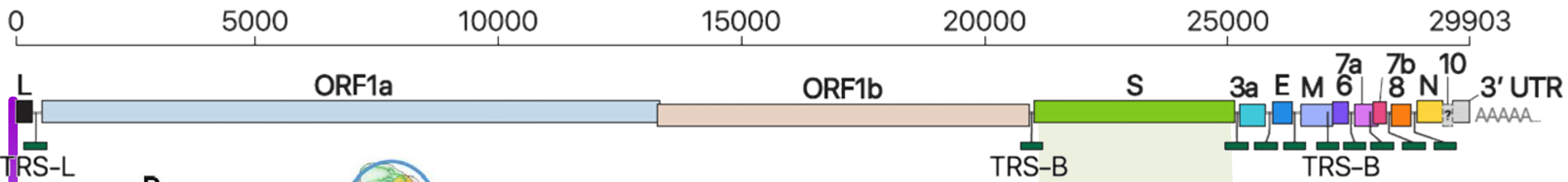
Un ARN équivalent d'un grand ARN messenger !
Environ 30 000 nt.

ARN = variabilité MAIS : activité correctrice de l'enzyme !

Mittal A, et al. (2020) PLoS Pathog 16(8): e1008762
Kim et al., 2020, Cell 181, 914-921

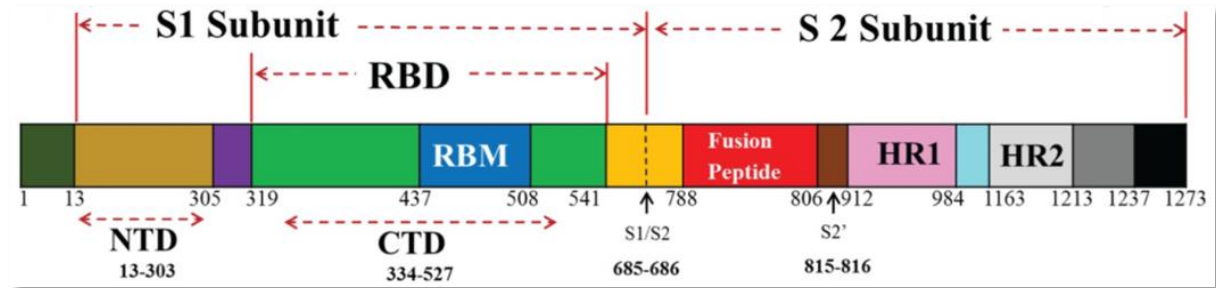
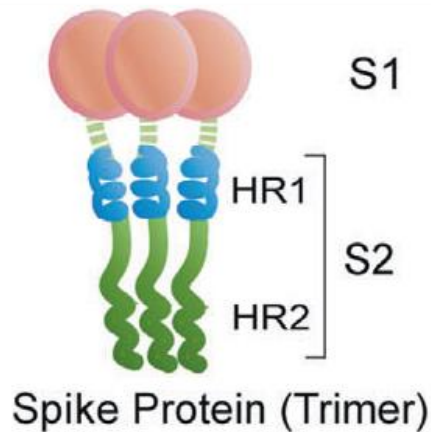
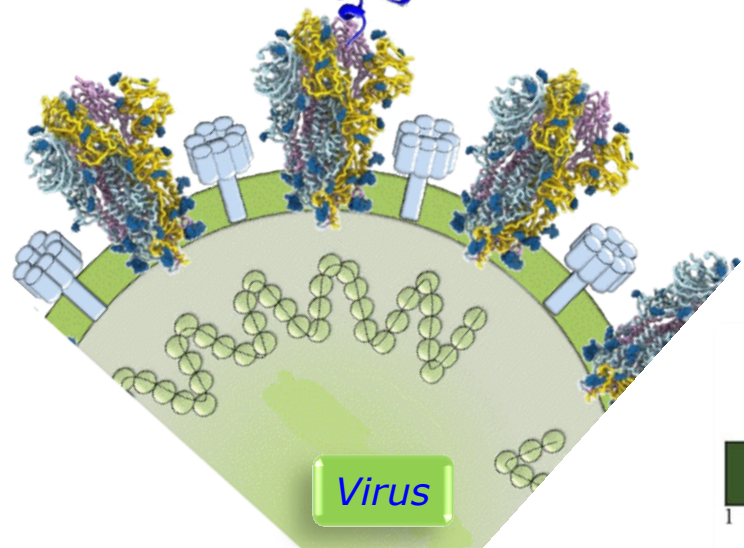
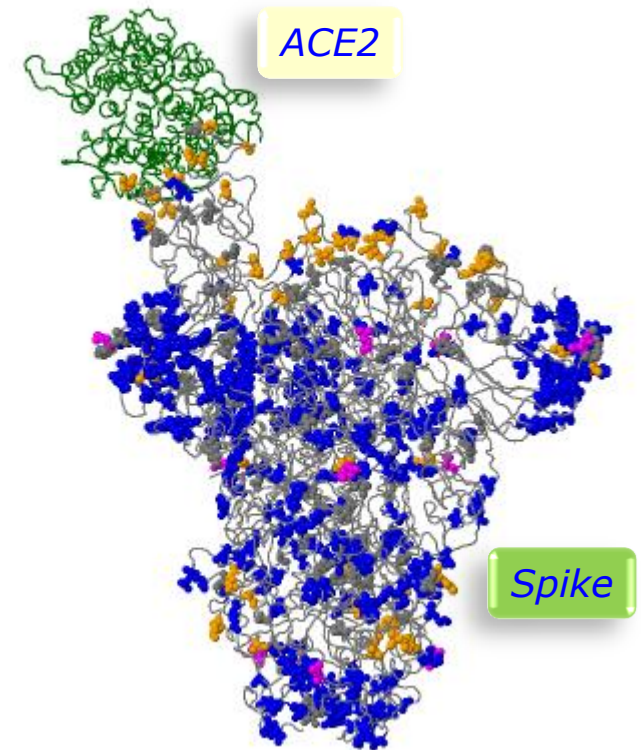
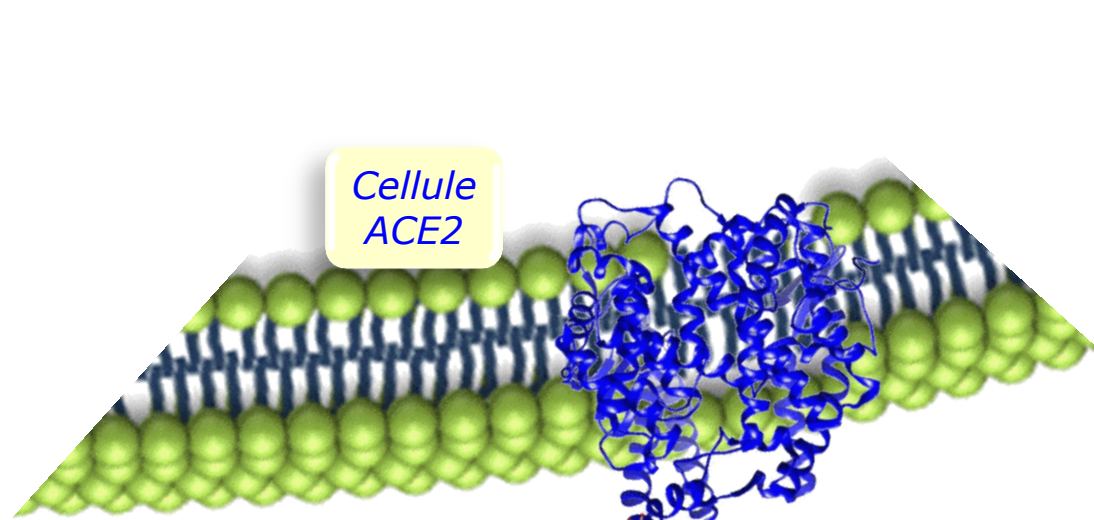


La protéine "Spike"



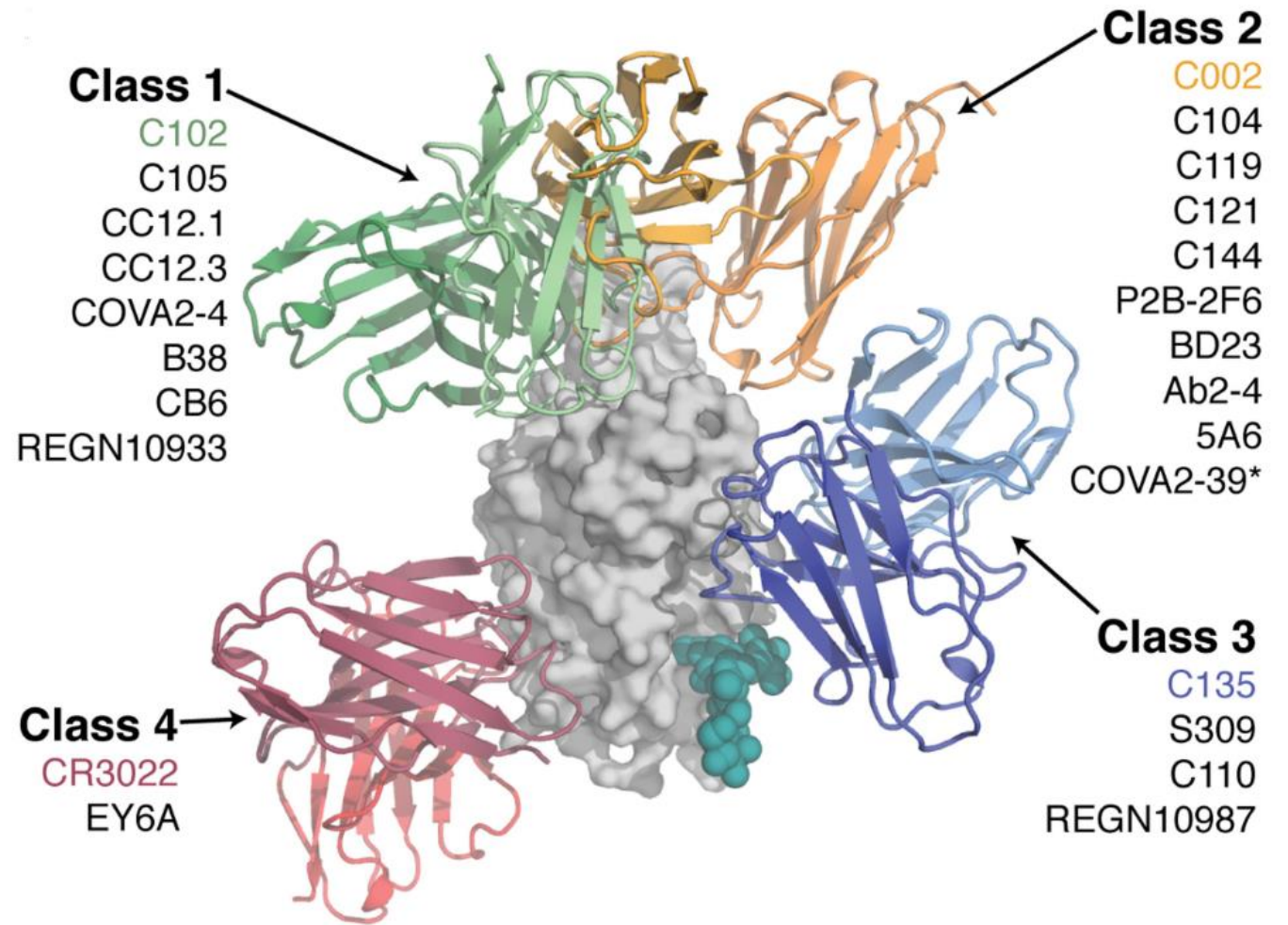
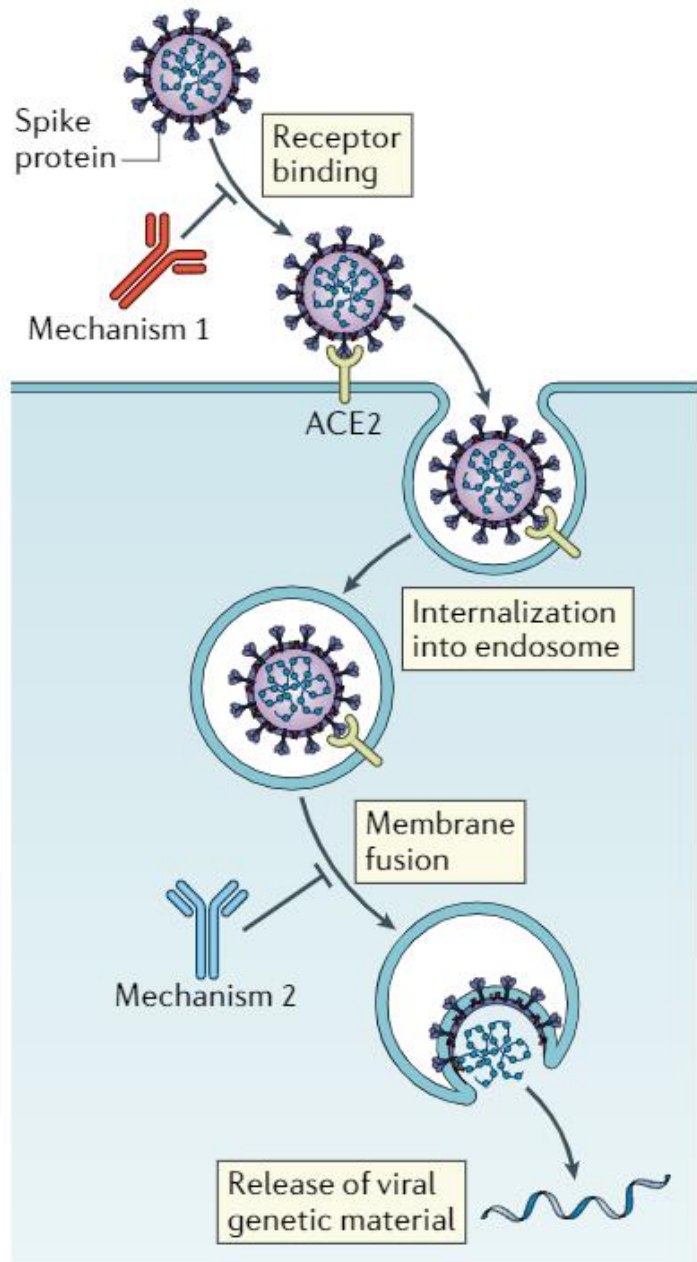
Mittal A, et al. (2020) PLoS Pathog 16(8): e1008762
 Kim et al., 2020, Cell 181, 914-921
 Zhou et al., 2021, Cell 189, 2348-2361

Les bases fondamentales : interactions virus-récepteur et anticorps



Saxena A, et al. (2020) *Virus Dis.* 31(4):399-407

Anticorps naturels ou artificiels



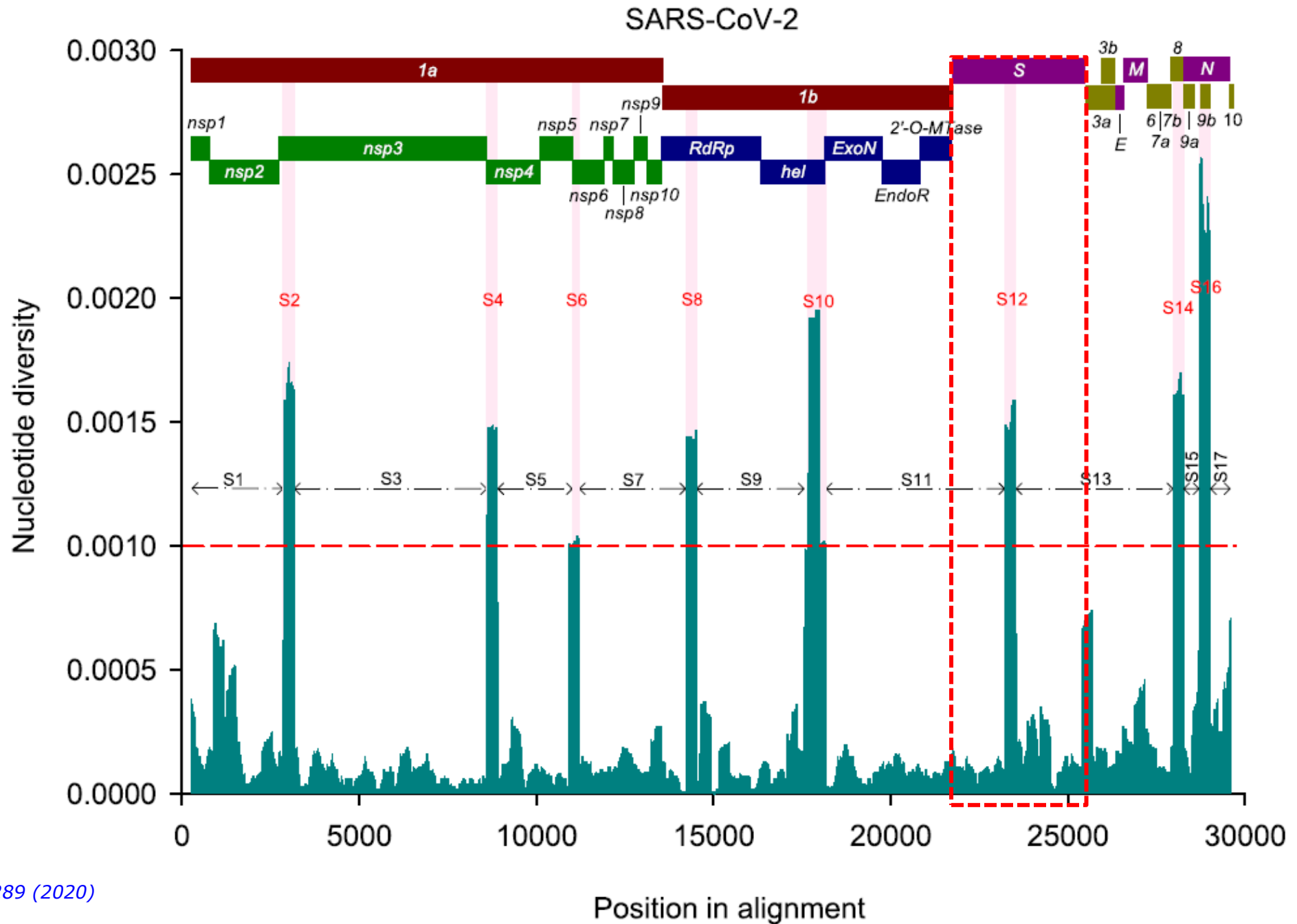
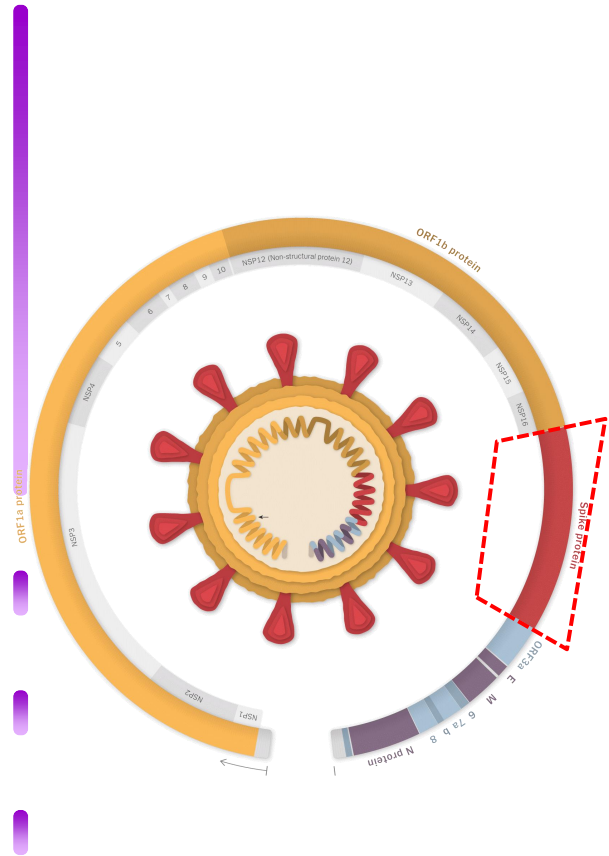
Action des Ac : risque de sélection de variants d'échappement !

Abraham *Nature Rev Imm* 2020 -10.1038/ s41577-020-0365-7

Barnes et al. *Nature* 2020 Dec;588(7839):682-687. doi: 10.1038/s41586-020-2852

LA VARIABILITÉ VIRALE

Diversité virale

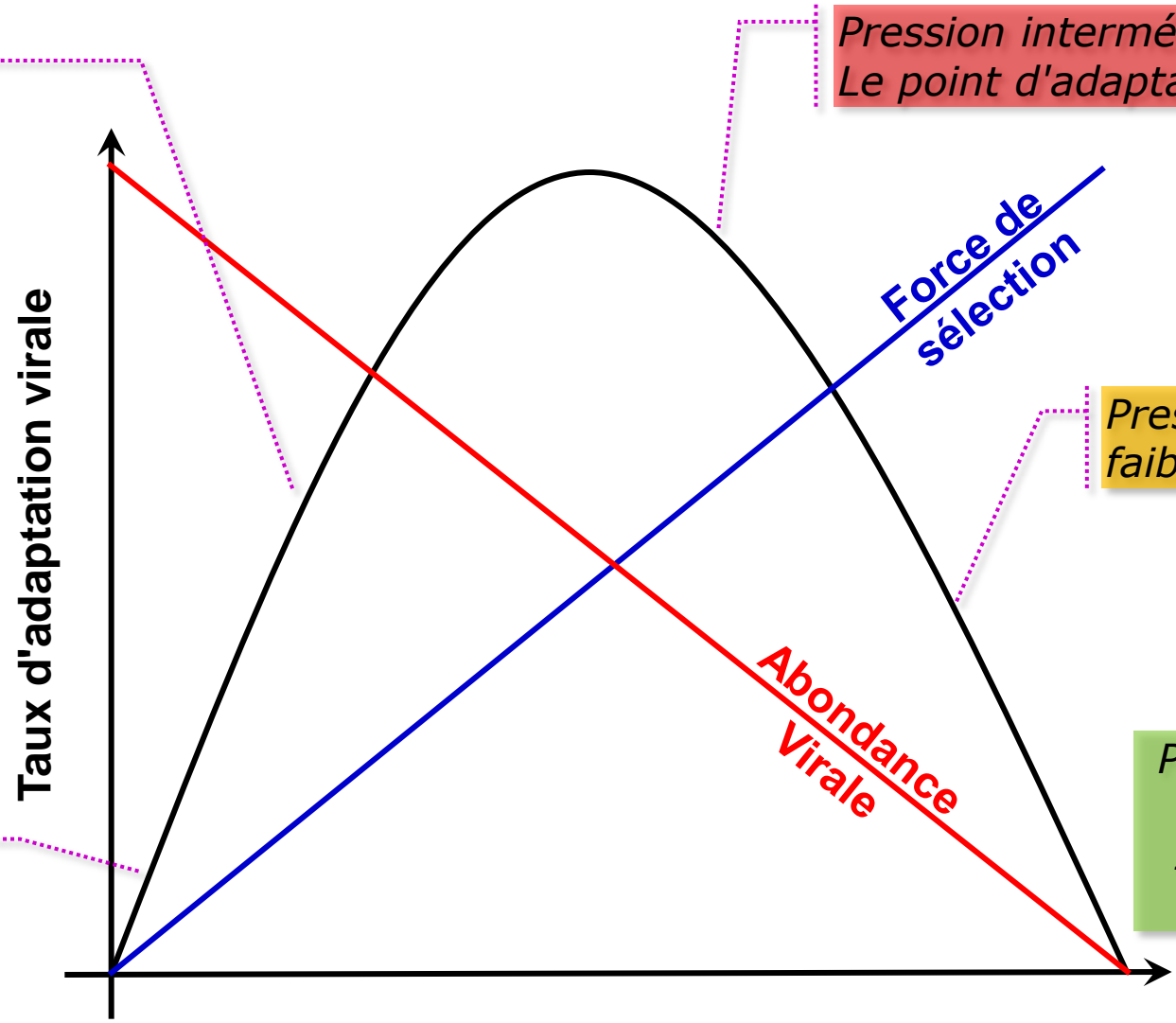


Morais et al. Scientific Reports volume 10, 18289 (2020)

Diagramme "phylodynamique"

Faible pression et peu d'adaptation. La population virale acquiert des mutations bénéfiques

Pression intermédiaire et forte adaptation
Le point d'adaptation virale le + rapide



Pression forte et faible adaptation

Potentiel limité pour les variants, le variant répliquant le mieux domine la population virale

Pression extrême sans adaptation
Infection rapidement résolutive

Pression de sélection (traitement)

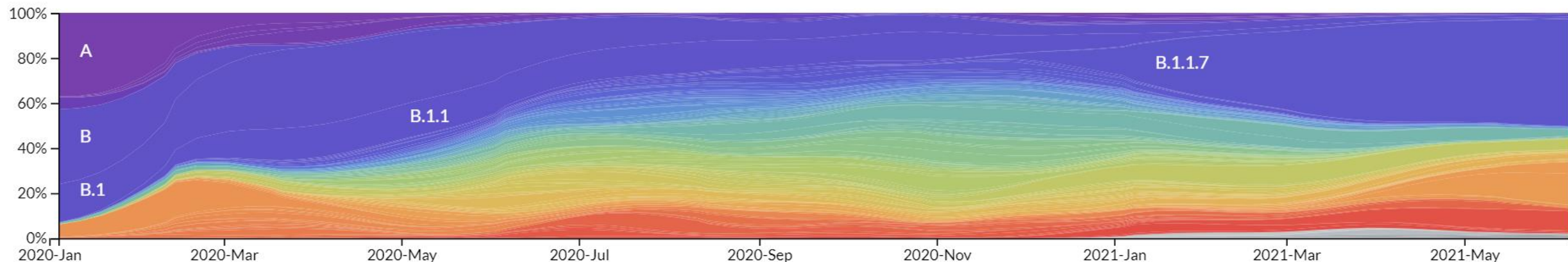
Adapted from Grenfell et al. Science, 2004—Vol 303, p327

Les ingrédients pour la sélection de variants

- Un virus à long ARN (30kb)
- Infection émergente
- Une épidémie à large échelle : pandémie / échanges internationaux
 - ✓ Recombinants ? [vigilance]
- Des situations cliniques "à risque" :
 - ✓ Immunodépressions : portage prolongé
 - ✓ Immunité partielle : vaccination partielle ou réponse imparfaite
 - ✓ Traitement par anticorps

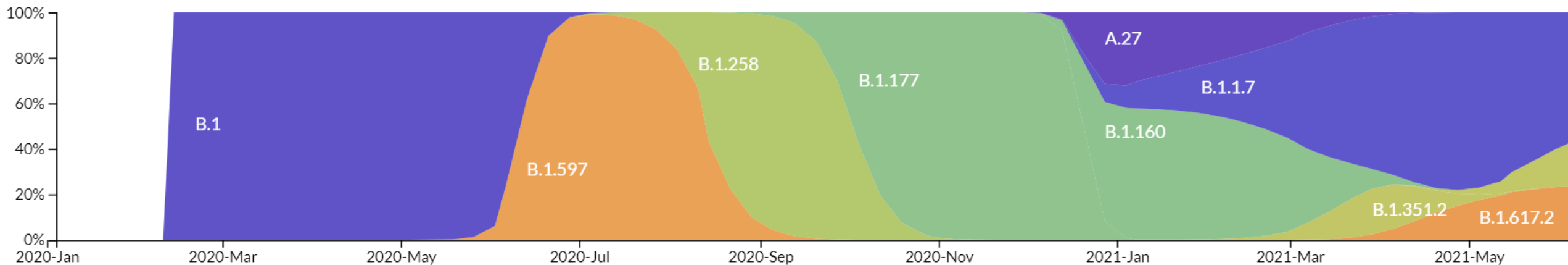
La dynamique virale mondiale : évolution des souches

Attention : biais liés aux capacités de séquençage de chaque pays



France

Frequencies (colored by PANGO Lineage and normalized to 100% at each time point for 23 out of a total of 3952 tips)



<https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>

La dynamique virale : évolution des souches

> 2 Millions de séquences !
La classification en clades

1200 lignées
105 en France ?

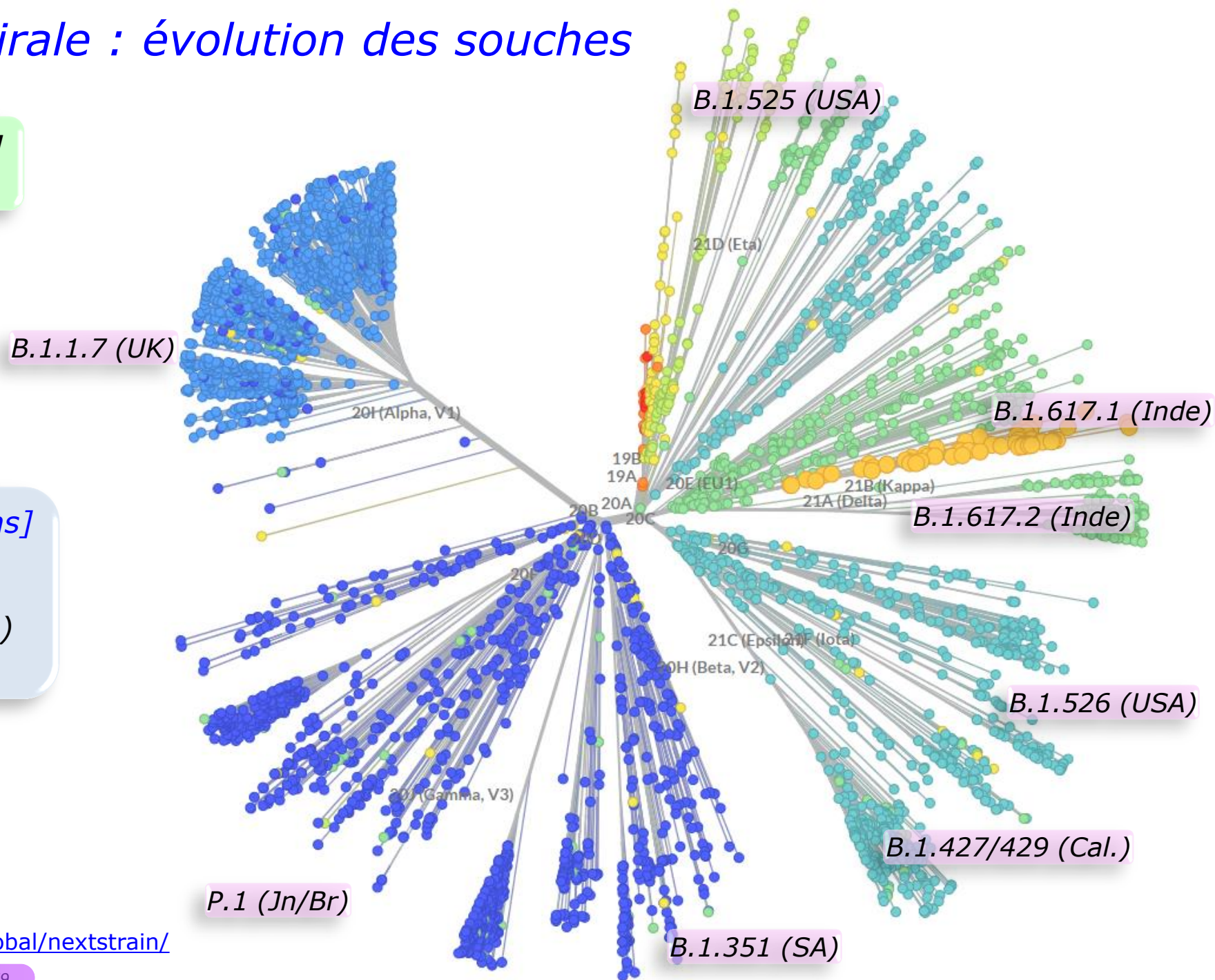
[multiplicité des classifications]

WHO : Alpha

Pango lineage : B.1.1.7

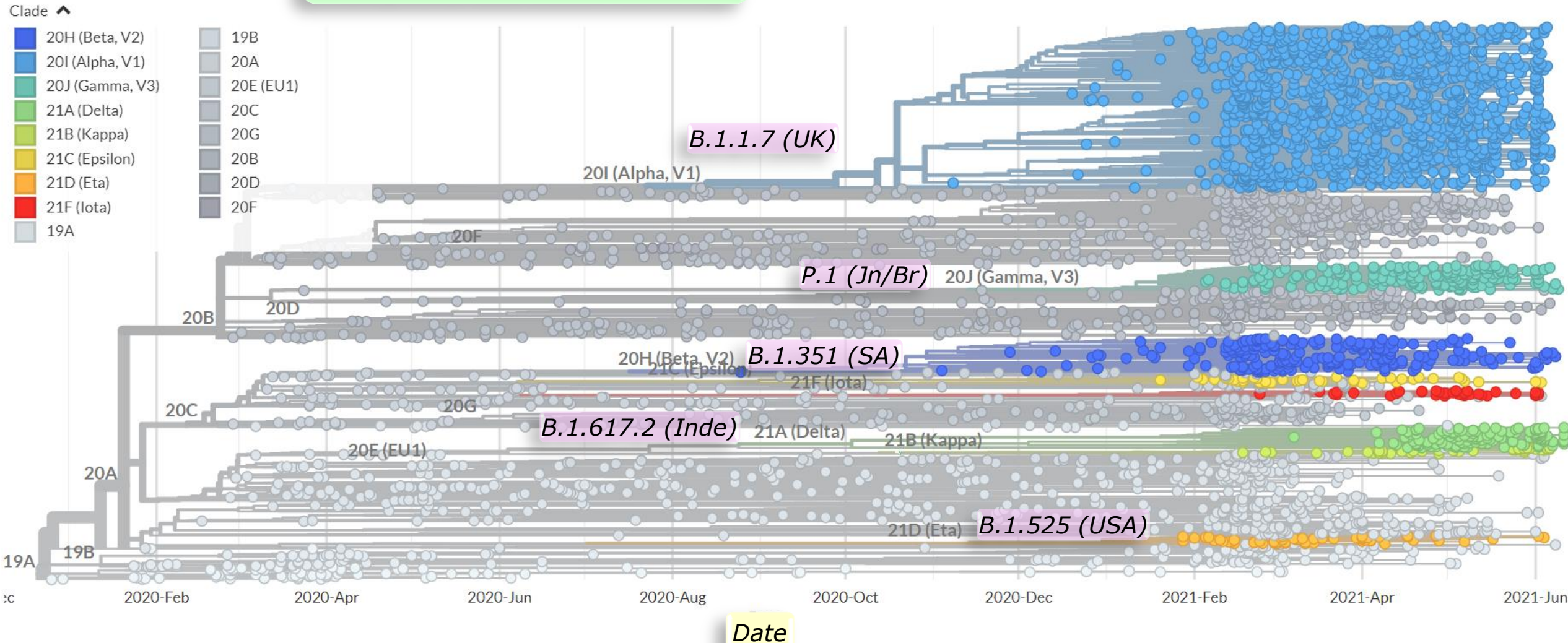
GISAID : GRY (GR/501Y.V1)

Nextstrain : 20I (V1)



La dynamique virale : évolution des souches

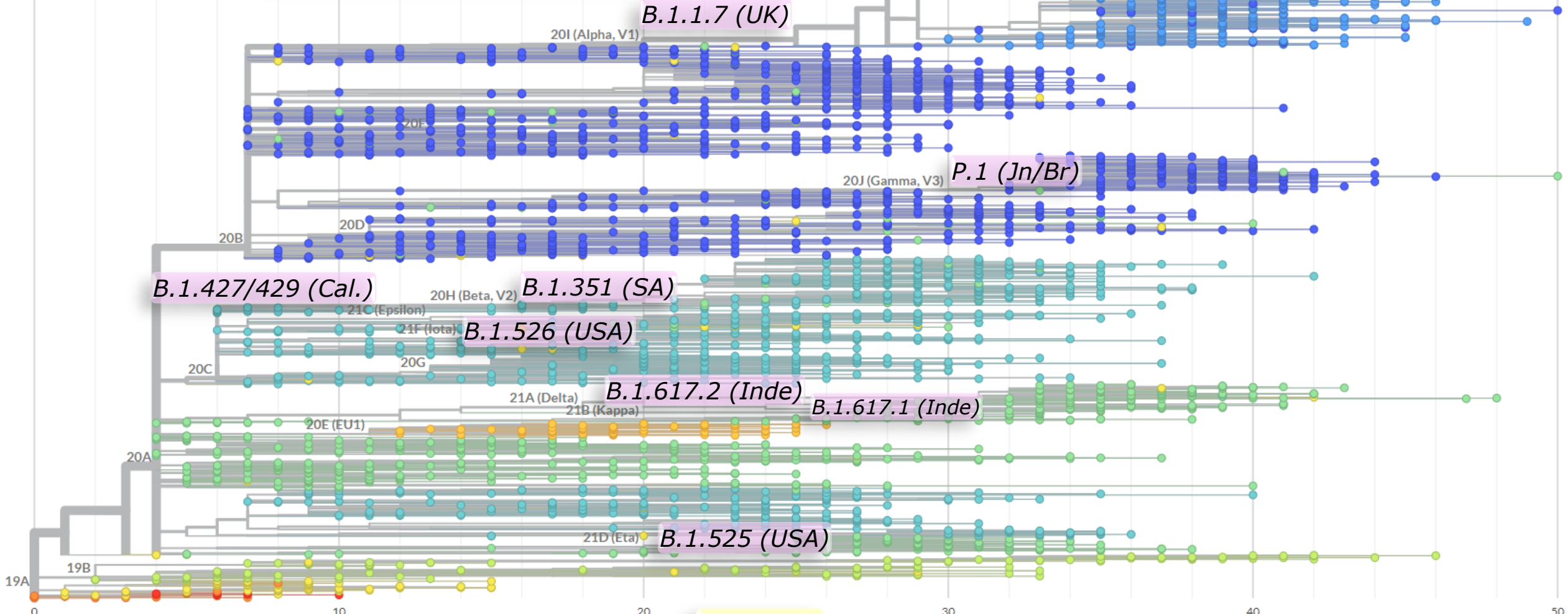
> 2 Millions de séquences !
[multiplicité des classifications]



La dynamique virale : évolution des souches

- GR
- GRY
- GH
- G
- S
- GV
- L
- V

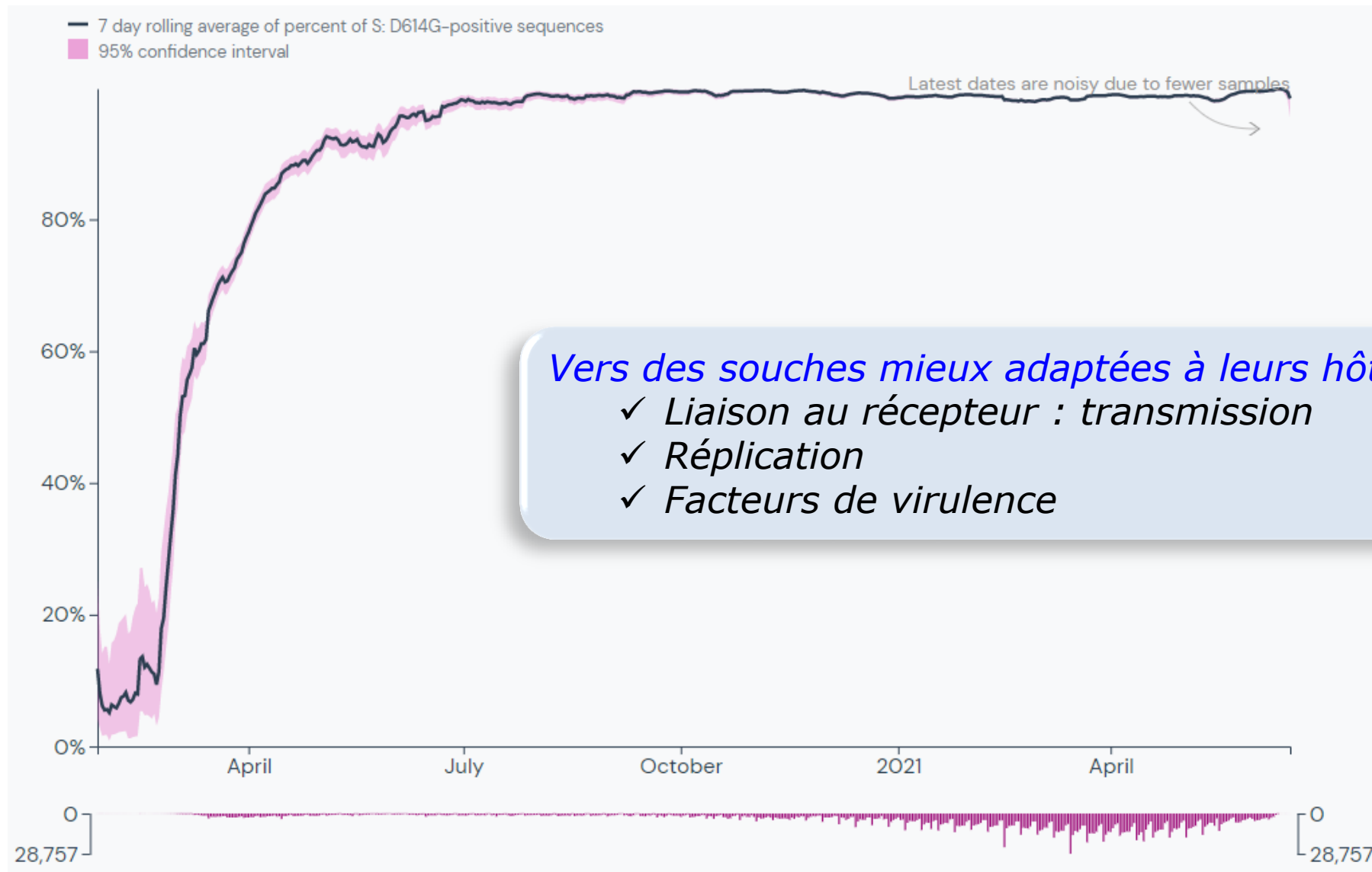
La classification en clades
[multiplicité des classifications]



<https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>

Mutations

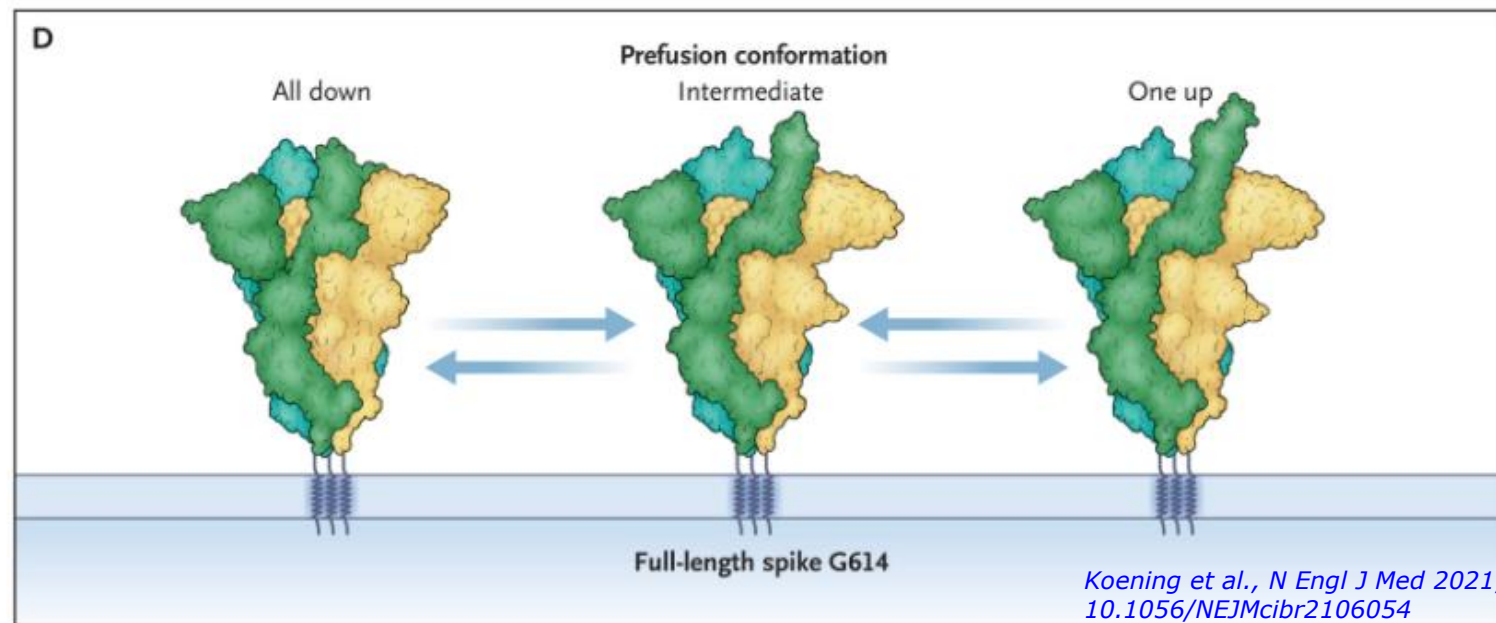
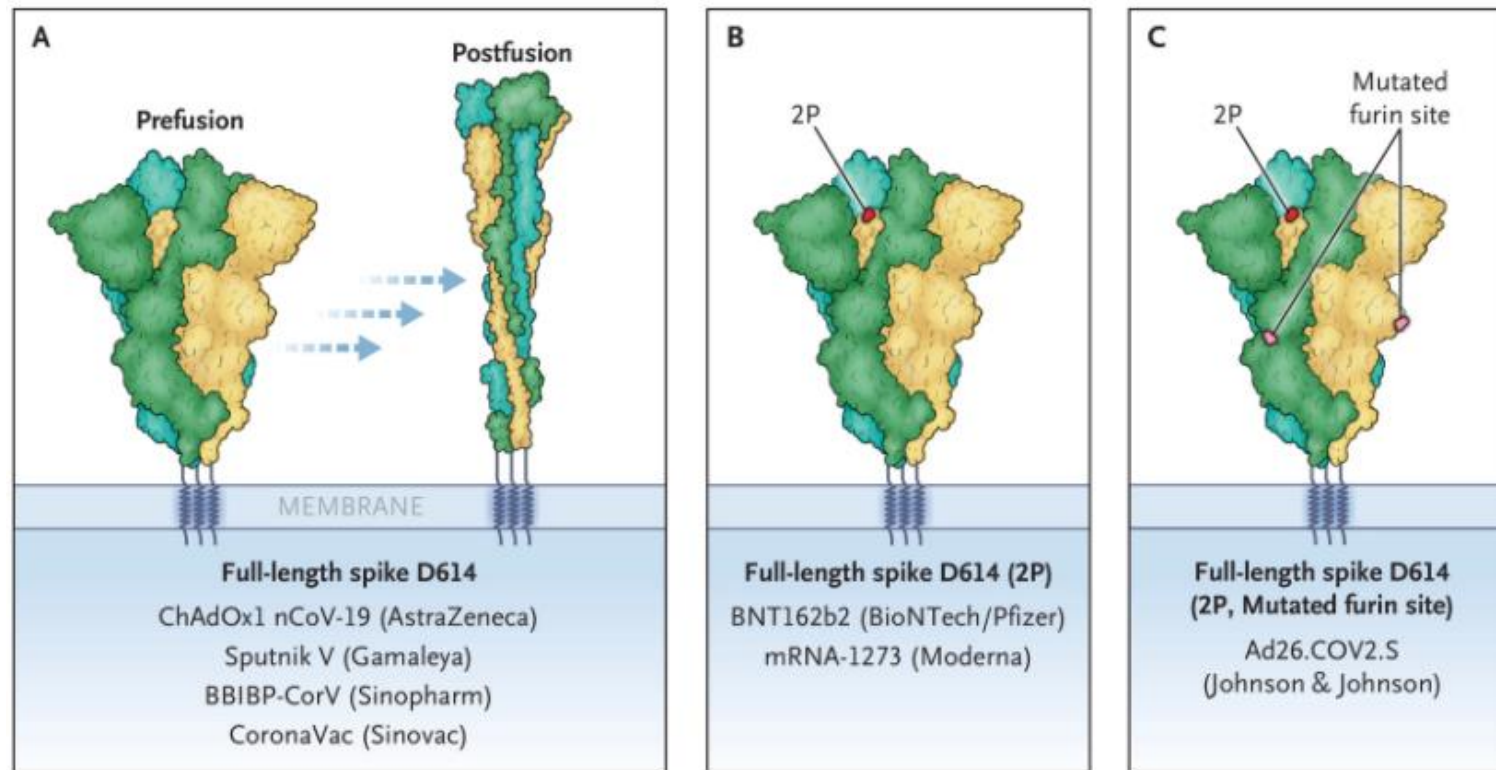
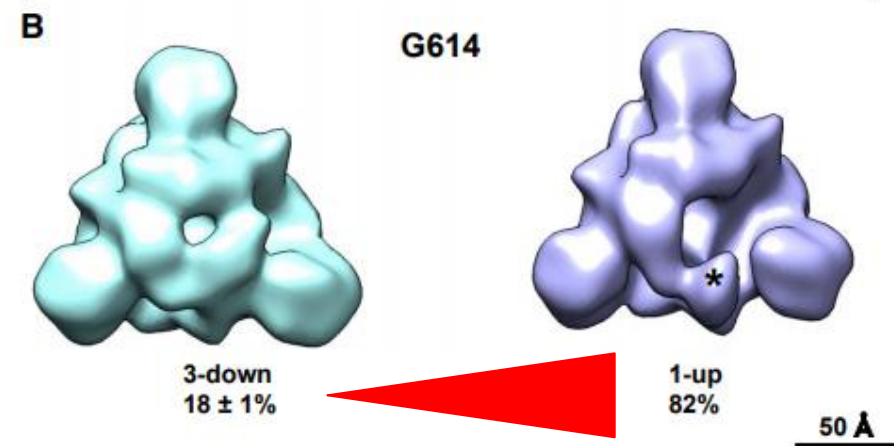
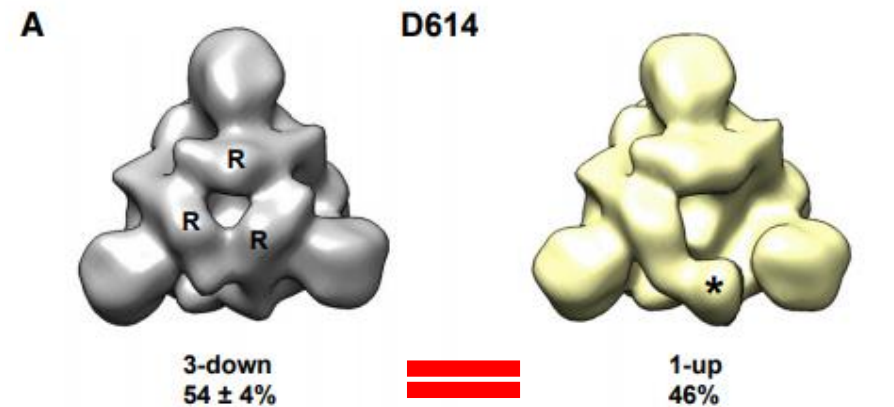
Un exemple caricatural : émergence de S:D614G



Vers des souches mieux adaptées à leurs hôtes

- ✓ *Liaison au récepteur : transmission*
- ✓ *Réplication*
- ✓ *Facteurs de virulence*

S:D614G un exemple d'impact



Weissman et al., 2021, *Cell Host & Microbe* 29, 23–31
January 13, 2021

Les enjeux de la variabilité virale

Sélection d'une souche virale la mieux adaptée à son hôte

Meilleure capacité répliquative et infectiosité augmentée (meilleure liaison à son récepteur)

Risques :

- ✓ **Echappement** à la réponse immunitaire
- ✓ Echappement aux **vaccins** ou aux traitements antiviraux (Ac)
- ✓ Emergence d'une souche plus pathogène
- ✓ **Faux négatifs** des tests moléculaires ou sérologiques

VOI, VOC, VUI, VHC, VUM...

Plusieurs dénominations (WHO, CDC, UK, ECDC, SPF...)

Variant of Interest : VOI

- Marqueurs génétiques avec modification de la liaison au récepteur, moindre efficacité des Ac neutralisants quels qu'ils soient, moindre efficacité de traitement, difficultés de détection diagnostique, transmissibilité ou pathogénicité accrue.
 - *B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma), B.1.427 (Epsilon), B.1.429 (Epsilon), B.1.617.2 (Delta)*

Variant of Concern : VOC

- Modifications génotypiques ou phénotypiques responsable d'une transmission communautaire ou multiples cas confirmés ou clusters ou a été détecté dans de multiples pays.

Variant of High Consequence

- Notion d'émergence avec diminution d'efficacité des mesures de prévention/traitement.

Une classification dynamique [WHO]

VOI: Variants of Interest

WHO label	Pango lineage	GISAID clade/lineage	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Alpha	B.1.1.7	GRY (formerly GR/501Y.V1)	20I (V1)	United Kingdom, Sep-2020	18-Dec-2020
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	South Africa, May-2020	18-Dec-2020
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	Brazil, Nov-2020	11-Jan-2021
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A	India, Oct-2020	VOI: 4-Apr-2021 VOC: 11-May-2021

VOC: Variants of Concern

WHO label	Pango lineage	GISAID clade/lineage	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Epsilon	B.1.427/B.1.429	GH/452R.V1	21C	United States of America, Mar-2020	5-Mar-2021
Zeta	P.2	GR/484K.V2	20B/S.484K	Brazil, Apr-2020	17-Mar-2021
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	Multiple countries, Dec-2020	17-Mar-2021
Theta	P.3	GR/1092K.V1	21E	Philippines, Jan-2021	24-Mar-2021
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	United States of America, Nov-2020	24-Mar-2021
Kappa	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	India, Oct-2020	4-Apr-2021
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	20D	Peru, Aug-2020	14-Jun-2021

Les variants à suivre [SPF]

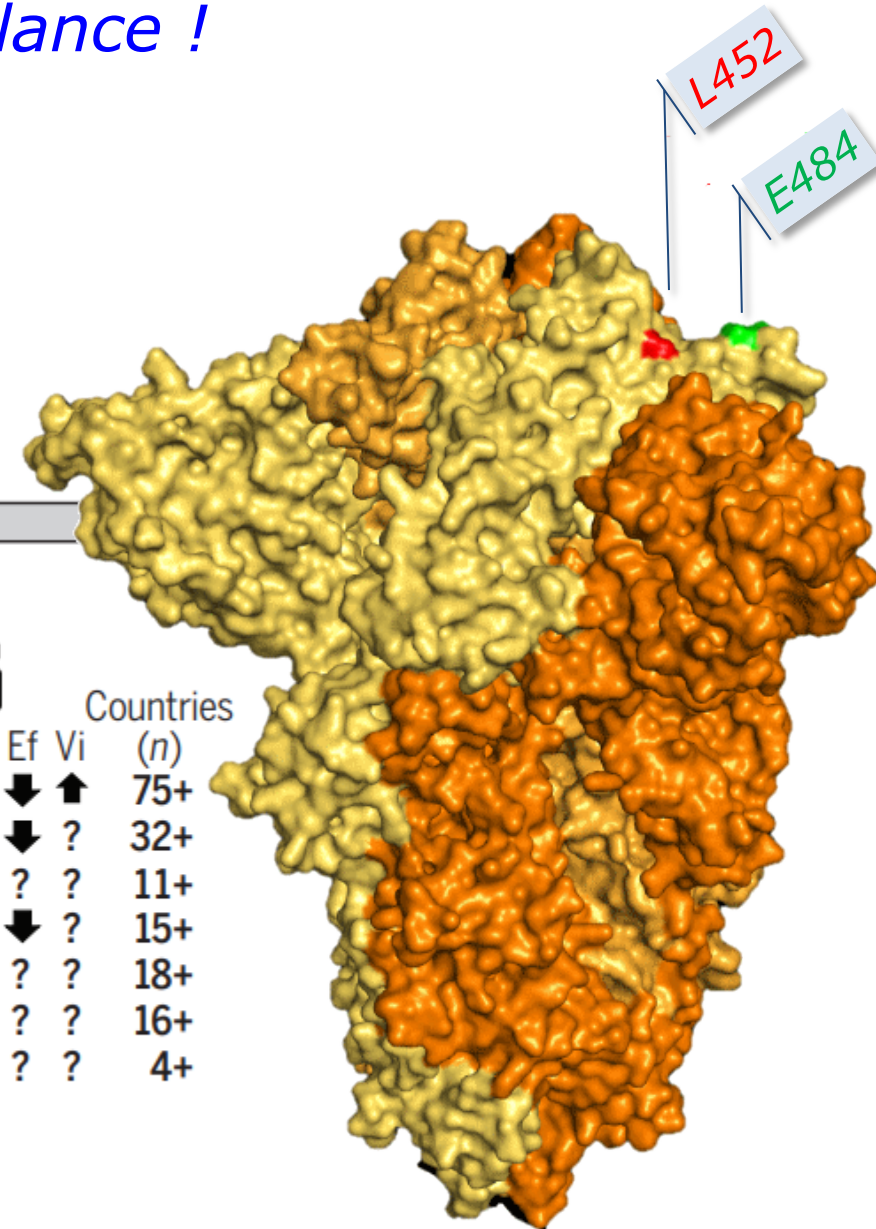
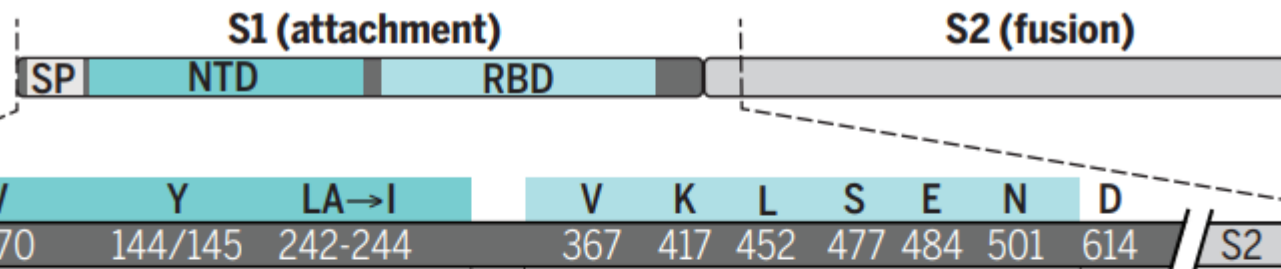
Mutation	Date de la 1ère séquence dans GISAID	Variants portant la mutation	Impact de la mutation
E484K	A l'international : 16/04/2020 En France : 12/11/2020	VOC 20H/501Y.V2 (B.1.351, Beta) VOC 20J/501Y.V3 (P.1, Gamma) VOC 20I/484K (B.1.1.7+E484K) VOI 20C/484K (B.1.526, Iota) VOI 20A/484K (B.1.525, Eta) VOI 20B/681H (B.1.1.318) VUM 20C/452R (B.1.526.1) VUM 20A/440K (B.1.619) VUM 20A/477N (B.1.620) VUM 20B/484K (P.2, Zeta)	Nombreuses données <i>in vitro</i> : - Diminution d'efficacité de la réponse humorale neutralisante (post-infection, post-vaccinale et anticorps monoclonaux) Données épidémiologiques : - Augmentation du nombre de variants porteurs cette mutation - Augmentation de la détection de cette mutation au niveau international (10% des séquences totales déposées dans GISAID et prélevées entre le 01/04/2021 et le 01/06/2020)
E484Q	A l'international : 09/03/2020 En France : 21/02/2021	VOC 20I/484Q (B.1.1.7+E484Q) VOI 21A/154K (B.1.617.1, Kappa)	Données <i>in vitro</i> très limitées : - Impact hypothétique sur l'efficacité de la réponse humorale neutralisante, non démontré Données épidémiologiques : - Nombre limité de variants porteurs de cette mutation - Faible détection de cette mutation au niveau international (0,3% des séquences totales déposées dans GISAID et prélevées entre le 01/04/2021 et le 01/06/2020)
L452R	A l'international : 17/03/2020 En France : 15/10/2020	VOC 21A/478K (B.1.617.2, Delta) VOI 21A/154K (B.1.617.1, Kappa) VUM 20C/452R (B.1.526.1) VUM 20C/452R (B.1.427 / B.1.429) VUM 19B/501Y (A.27)	Données <i>in vitro</i> assez nombreuses : - Diminution d'efficacité de la réponse humorale neutralisante (post-infection, post-vaccinale et anticorps monoclonaux) - Augmentation de l'affinité du virus pour son récepteur cellulaire Données épidémiologiques : - Augmentation du nombre de variants porteurs cette mutation - Augmentation de la détection de cette mutation au niveau international (7,5% des séquences totales déposées dans GISAID et prélevées entre le 01/04/2021 et le 01/06/2020)

<https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2021/circulation-des-variants-nouvelle-strategie-de-criblage-par-la-recherche-de-mutations-d-interet>

La protéine Spike sous surveillance !

Variant

- ✓ of interest (VOI),
- ✓ of concern (VOC),
- ✓ other variants...



Variant	13	69-70	144/145	242-244	303	319	367	417	452	477	484	501	541	614	Tr	Ef	Vi	Countries (n)
B.1.1.7		Δ	Δ							E/K	Y		G		↑	↓	↑	75+
B.1.351				Δ				N		K	Y		G		↑	↓	?	32+
P.1								N/T		K	Y		G		↑	?	?	11+
A.23.1							F								↑	↓	?	15+
B.1.525		Δ									K		G		?	?	?	18+
B.1.429								R					G		?	?	?	16+
B.1.526											N	K	G		?	?	?	4+

and/or ↗ ↘

A, Ala; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; N, Asn; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; Y, Tyr.

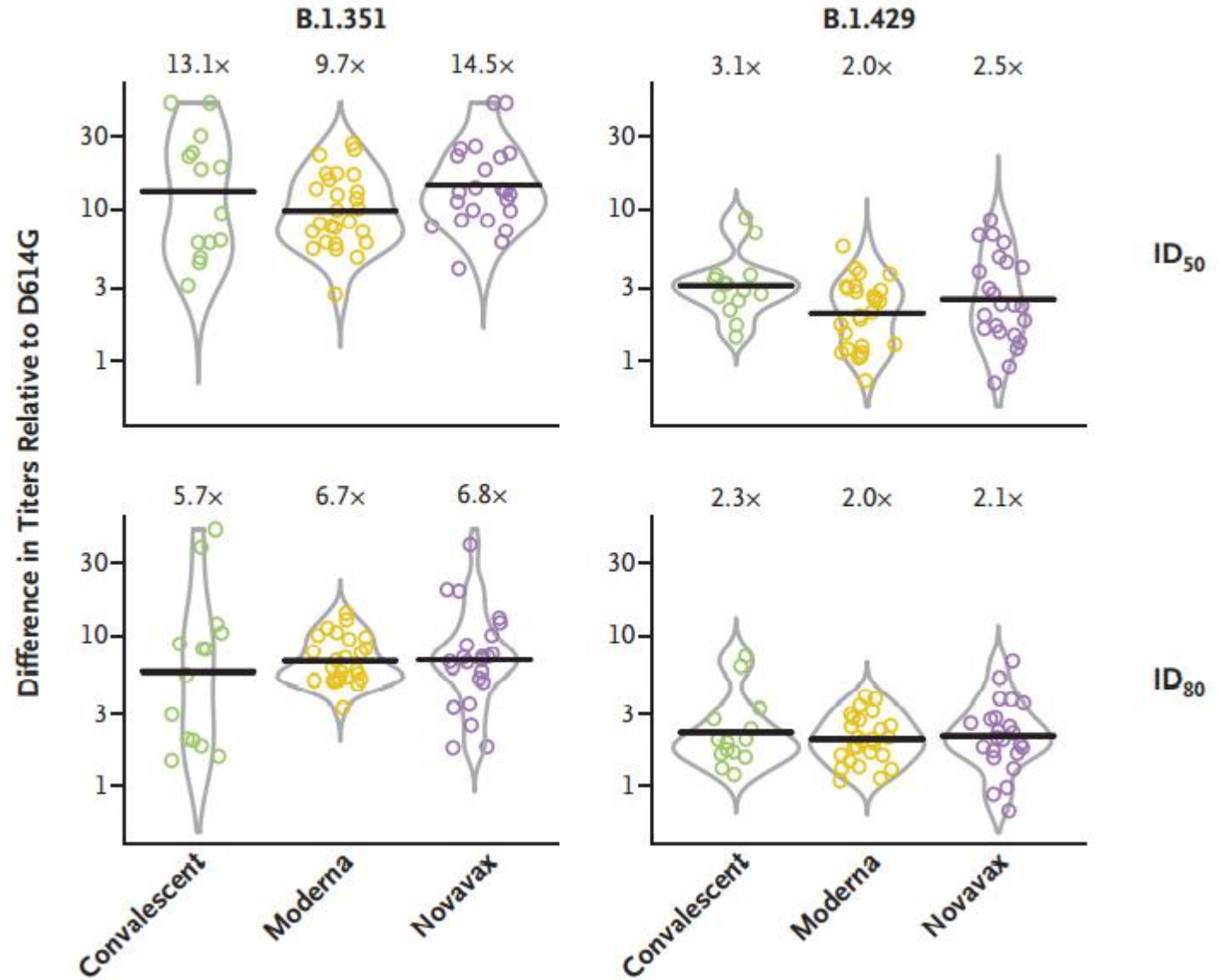
Difference in Neutralization Titers Relative to D614G

B.1.429 (Epsilon/USA):

✓ S13I, W152C, and L452R

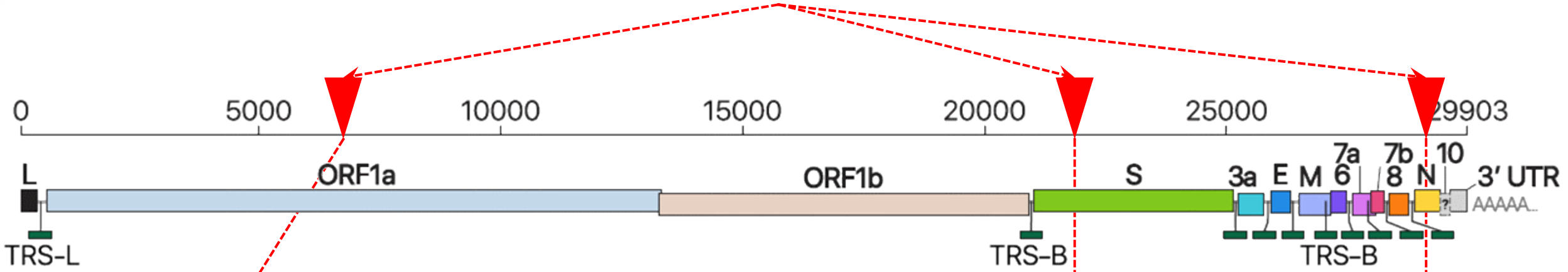
B.1.351 (Beta/SA) :

✓ L18F, D80A, D215G, Δ242–244, R246I, K417N, E484K, N501Y, and A701V



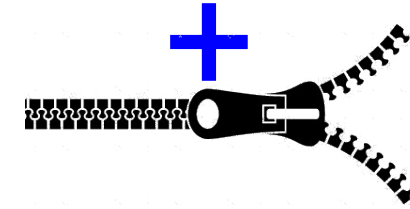
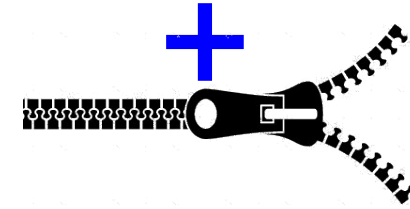
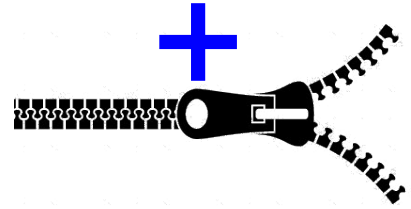
L'APPROCHE DIAGNOSTIQUE

Détection PCR - 3 cibles



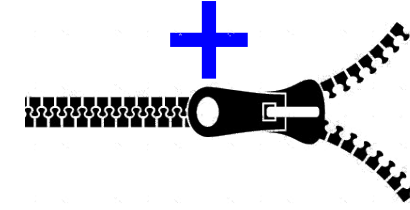
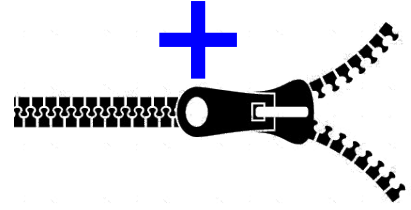
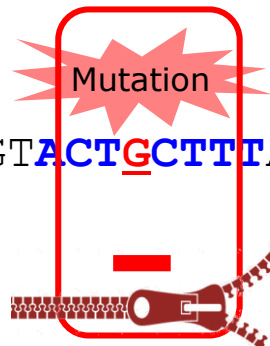
Positif 3 cibles

...TACCA**TTTAATGAT**GGTGTTTATTTTGCTTCCACTGAGAAGTCTAACTTTTTGGT**ACTACTTT**AGATTTCGAAGA**CCCAGTC**CCT...




Variant : Positif 2 cibles

...TACCA**TTTAATGAT**GGTGTTTATTTTGCTTCCACTGAGAAGTCTAACTTTTTGGT**ACTGCTTT**AGATTTCGAAGA**CCCAGTC**CCT...



En pratique

- 1^{er} niveau : **POSITIF** / **NEGATIF**
 - ✓ Criblage test diagnostique :
 - "gène S négatif" = variant britannique ou autre variant
- 2^{ème} niveau :
 - ✓ Criblage par test spécifique de variants : quels variants ?
 - Facilité de mise en œuvre, capacité importante
 - Information partielle voire fausse
- 3^{ème} niveau :
 - ✓ Séquençage ?
 - Classique : Sanger (une partie du génome)
 - NGS/WGS : Illumina et autres
 - Référence
 - Base internationale



J'ai un numéro de tél. !

-- 9- ----

ou

---- -8 ----

----- 90 59

02 99 28 90 59

Rendu des résultats

1/ Dépistage

BIOLOGIE MOLECULAIRE VIRALE

Nature du prélèvement : Lavage broncho-alvéolaire

SARS-CoV-2 Réactif TaqPath COVID-19 (ThermoFisher) -PCR temps réel- QS5(ThermoFisher)

Conclusion : Positif

2/ Criblage

Recherche de variant SARS-CoV-2 S-N501Y

Réactif VirSNIp SARS-CoV-2 Spike (TIBMOBBIOL) -PCR temps réel- LC480 (Roche)

Détection de la mutation S-N501Y : **Présence**

Détection de la mutation S-E484K : **Absence**

Détection de la mutation S-E484Q : **Non recherché**

Détection de la mutation S-L452R : **Non recherché**

3/ Séquençage

Classification		Substitutions protéiques d'intérêt ("S")							
Lignage NGS	Clade NGS	N501Y	A570D	H655Y	P681H	A701V	T716I	S982A	D1118H
<i>B.1.1.7</i>	<i>20I/501Y.V1</i>	X	X		X		X	X	X

En conclusion

SARS-CoV-2 : bon candidat à la variabilité génétique (ARN, taille génome)

Explosion des données de séquençage (NGS – WGS) : $>2.10^6$ séq.

Protéine Spike, mais pas uniquement (réplication, fitness, transmissibilité...)

Vigilance :

- ✓ Echappement à la réponse immunitaire / vaccins / traitement
- ✓ Difficultés diagnostiques ? (dépistage / Sérologie)

Caractérisation

- ✓ Criblage : intérêt limité (L452 / E484)
- ✓ Séquençage : cluster, échappement

