



L'analyse à grande échelle de la protéase principale du virus SRAS-CoV-2 révèle la présence marginale de mutants du variant Omicron du SRAS-CoV-2 résistants au nirmatrelvir en Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023

Venkata Duvvuri^{1,2*}, Fatima Shire^{1,3}, Sandra Isabel¹, Thomas Braukmann¹, Shawn Clark¹, Alex Marchand-Austin¹, Alireza Eshaghi¹, Hina Bandukwala¹, Nobish Varghese¹, Ye Li^{1,3}, Karthikeyan Sivaraman¹, Hadia Hussain¹, Kirby Cronin¹, Ashleigh Sullivan¹, Aimin Li¹, Austin Zygmunt^{1,4}, Karam Ramotar¹, Julianne Kus^{1,2}, Maan Hasso¹, Antoine Corbeil¹, Jonathan Gubbay¹, Samir Patel^{1,2}

Résumé

Contexte : En réponse à la pandémie de COVID-19, un nouvel antiviral oral appelé nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid^{MC}) a été autorisé au Canada en janvier 2022. Des études *in vitro* ont signalé des mutations dans la protéine M^{pro} qui peuvent être associées au développement de la résistance au nirmatrelvir.

Objectifs : Étudier la prévalence, la pertinence et les modèles temporels des mutations de M^{pro} chez les lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2 en Ontario, au Canada.

Méthodes : Au total, 93 082 séquences de gènes M^{pro} de décembre 2021 à septembre 2023 ont été analysées. Les mutations *in vitro* de M^{pro} ont été comparées à notre base de données à l'aide de pipelines de données internes pour déterminer la résistance au nirmatrelvir. Une régression binomiale négative a été réalisée pour analyser les tendances temporelles des chiffres de mutation de M^{pro} au cours de la période étudiée.

Résultats : Une tendance à la baisse a été observée dans les mutations non synonymes des séquences M^{pro}, montrant une réduction de 7,9 % (IC à 95 % : 6,5 %–9,4 %; $p < 0,001$) tous les 30 jours. La mutation P132H était la plus répandue (plus de 95 %) dans toutes les lignées d'Omicron. Des mutations *in vitro* résistantes au nirmatrelvir ont été trouvées dans 3,12 % ($n = 29/929$) des lignées d'Omicron avec un très faible dénombrement, allant de 1 à 19. Seules deux mutations, A7T ($n = 19$) et M82I ($n = 9$), ont montré une présence temporelle entre le BA.1.1 en 2022 et le BQ.1.2.3 en 2022, respectivement.

Conclusion : Les observations suggèrent qu'en septembre 2023, aucune résistance importante ou généralisée au nirmatrelvir ne s'était développée parmi les variants Omicron du SRAS-CoV-2 en Ontario. Cette étude souligne l'importance de créer des systèmes de surveillance automatisés pour suivre l'émergence de mutations résistantes au nirmatrelvir dans le virus SRAS-CoV-2, en utilisant les données génomiques générées en temps réel.

Cette oeuvre est mise à la disposition selon les termes de la licence internationale Creative Commons Attribution 4.0



Affiliations

¹ Santé publique Ontario, Toronto, ON

² Département médecine de laboratoire et pathobiologie, Faculté de médecine Temerty, Université de Toronto, Toronto, ON

³ Division des biostatistiques, École de santé publique Dalla Lana, Université de Toronto, Toronto, ON

⁴ Département de médecine familiale, Université d'Ottawa, Ottawa, ON

*Correspondance :
venkata.duvvuri@oahpp.ca



Citation proposée : Duvvuri VR, Shire F, Isabel S, Braukmann T, Clark ST, Marchand-Austin A, Eshaghi A, Bandukwala H, Varghese N, Li Y, Sivaraman K, Hussain H, Cronin K, Sullivan A, Li A, Zygmunt A, Ramotar K, Kus J, Hasso M, Corbeil A, Gubbay JB, Patel SN. L'analyse à grande échelle de la protéase principale du virus SRAS-CoV-2 révèle la présence marginale de mutants du variant Omicron du SRAS-CoV-2 résistants au nirmatrelvir en Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023. Relevé des maladies transmissibles au Canada 2024;50(10):399–409. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v50i10a05f>

Mots-clés : SRAS-CoV-2, Omicron, Paxlovid, nirmatrelvir-ritonavir, gène de la protéase principale (M^{pro}), mutations résistantes *in vitro*, surveillance de la génomique, Ontario

Introduction

Le nirmatrelvir-ritonavir (marque de commerce Paxlovid^{MC}, Pfizer Inc.) est un traitement antiviral administré par voie orale. Cette combinaison a reçu une autorisation d'utilisation d'urgence de la *Food and Drug Administration* des États-Unis en décembre 2021 (1–3). Le nirmatrelvir-ritonavir a par la suite été approuvé par Santé Canada pour les adultes atteints de la COVID-19 qui présentaient un risque élevé de devenir une maladie grave en janvier 2022 (4,5). Le nirmatrelvir (PF-07322332), un composant actif du Paxlovid, est un nouvel inhibiteur de la protéase 3 chymotrypsine du SRAS-CoV-2 (3CL^{pro}) ou de la protéase principale (M^{pro} , aussi appelée protéine non structurale, nsp5), qui est essentielle pour la réPLICATION et l'assemblage viraux. Ce mécanisme inhibiteur empêche la production de nouveaux virus dans les cellules infectées (6). Fait important, le nirmatrelvir est très spécifique à la protéase virale, ce qui réduit le risque d'effets hors cible sur les protéases humaines (7). Le ritonavir inhibe l'enzyme cytochrome P4503A4 (CYP3A4), une importante enzyme hépatique métabolisant les médicaments chez l'humain, augmentant les concentrations plasmatiques du nirmatrelvir *in vivo* (8).

Les études d'efficacité clinique sur le nirmatrelvir-ritonavir ont fait état d'un nombre moins élevé de visites à l'urgence, d'un nombre moins élevé d'hospitalisations et d'un taux de mortalité moindre, toutes causes confondues, chez les patients infectés par les variants préoccupants du SRAS-CoV-2 (Delta B.1.617.2 et Omicron B.1.1.529, BA.2, BA2.12.1, BA.4 et BA.5) (9–12). Une étude d'observation rétrospective menée en Ontario, au Canada, a révélé une réduction importante des admissions à l'hôpital en raison de la COVID-19 et de la mortalité toutes causes confondues chez les patients externes qui ont utilisé le nirmatrelvir-ritonavir entre avril et août 2022, et des avantages plus importants ont été constatés chez les personnes qui étaient sous-vaccinées ou non vaccinées et âgées de 70 ans et plus (13). Le Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales a révélé que 13 % ($n = 490/3\,731$) des patients adultes atteints de la COVID-19 ont reçu le nirmatrelvir-ritonavir, au moment de l'admission ou de l'hospitalisation au Canada, bien que les résultats sur l'efficacité du traitement ne soient toujours pas déclarés (14).

L'efficacité thérapeutique du nirmatrelvir-ritonavir peut être influencée par l'émergence de variants résistants. Compte tenu de l'évolution continue du virus SRAS-CoV-2 et des pressions de

sélection découlant de l'introduction du nirmatrelvir-ritonavir, une résistance est susceptible d'émerger (15). Des données probantes démontrant l'existence *in vitro* de variants du SRAS-CoV-2 résistants au nirmatrelvir (16–18), de la puissance variable du nirmatrelvir pour différents coronavirus humains (19) et de la résistance d'autres virus aux inhibiteurs de la protéase (20) appuient la nécessité d'une surveillance continue des séquences de gènes M^{pro} du SRAS-CoV-2 pour identifier rapidement les mutations qui peuvent affecter la puissance du nirmatrelvir. Une telle surveillance génomique pourrait fournir des informations sur les mécanismes de l'évasion antivirale qui sont cruciaux pour les orientations des politiques et pour le développement de la prochaine génération d'inhibiteurs M^{pro} (18).

Cette étude visait à étudier la prévalence, la pertinence et les modèles temporels des mutations de M^{pro} chez les lignées du SRAS-CoV-2 en circulation en Ontario. Tout d'abord, nous avons effectué une revue de la littérature scientifique et grise (de mai 2022 à août 2023) afin de dresser une liste des mutations de M^{pro} qui ont été caractérisées comme conférant une résistance *in vitro* au nirmatrelvir (21). Cette liste a ensuite été utilisée pour identifier la présence de mutations résistantes au nirmatrelvir dans l'ensemble de données. Nous avons ensuite analysé 93 082 séquences M^{pro} dérivées de spécimens cliniques positifs au variant Omicron du SRAS-CoV-2 séquencés en Ontario entre décembre 2021 et septembre 2023.

Méthodes

Sélection des échantillons cliniques et séquençage du génome entier du SRAS-CoV-2

Les laboratoires de diagnostic de l'Ontario ont fourni une proportion de tous les spécimens cliniques positifs au SRAS-CoV-2 à des laboratoires de séquençage du génome entier (SGE) désignés dans le cadre du Réseau génomique COVID-19 de l'Ontario (22). Les critères acceptables pour l'échantillonnage du SGE comprenaient un seuil de cycle de réaction en chaîne par polymérase (PCR) du SRAS-CoV-2 de 30 ou moins et un volume d'échantillon suffisant. La proportion d'échantillonnage variait de 10 % à 100 % et a été rajustée au fil du temps en fonction du nombre de cas prévu et de la capacité de séquençage du Réseau génomique COVID-19 de l'Ontario de décembre 2021



à septembre 2023. Le test PCR diagnostique du SRAS-CoV-2/COVID-19 était limité aux populations à risque élevé (23,24) et, par conséquent, la surveillance représentative ne concerne que les populations testées au moment de l'échantillonnage.

Principales séquences de protéase du SRAS-CoV-2

Les données de séquence brutes de la plate-forme Illumina ont été analysées à l'aide du pipeline ARTIC (version 1.7) (pipeline de l'Institut ontarien de recherche sur le cancer) et de la version 1.4 du schéma d'amorçage ARTIC. Le filtrage de la qualité post-analyse a été effectué à l'aide de la version 1.8 de ncov-tools. Les échantillons ont été annotés pour la lignée avec Pangolin (version 4.3) en utilisant les constellations (version 0.1.12) (Pangolin-assignment [version 1.15.1], Scorpio 0.3.17 et usher 0.5.6). Le pipeline ARTIC nanopolish v1.3.0-dev (rustine +0.3.1) et la version associée de ncov-tools ont été utilisés pour les échantillons séquencés sur la plate-forme nanopore. Toutes les séquences disponibles du gène M^{pro} du variant Omicron du SRAS-CoV-2 ($n = 93\,082$ séquences uniques) ont été recueillies entre le 1^{er} décembre 2021 et le 21 septembre 2023 à partir de la base de données du SGE du SRAS-CoV-2 de Santé publique Ontario (base de données du SGE du SRAS-CoV-2 de SPO). Ces séquences M^{pro} ont été testées par rapport au génome de référence SRAS-CoV-2, Wuhan-Hu-1 (accession n° NC_045512.2), afin d'identifier les mutations synonymes et non synonymes dans toutes les lignées d'Omicron.

Suivi temporel des principales mutations de protéases dans les lignées d'Omicron

Un pipeline interne de données scientifiques a été élaboré dans Python (version 3.9.16) pour suivre la temporalité et la prévalence des mutations de M^{pro} observées dans les lignées d'Omicron en Ontario. Un modèle additif généralisé avec fente cubique restreinte a été adapté au dénombrement des mutations transformées en logarithmes. Nous avons examiné les tendances des mutations non synonymiques du M^{pro} au cours de la période de l'étude; à partir de ces tendances, une régression binomiale négative (paquet R mgcv version 1.9-0) a été utilisée pour modéliser le déclin du nombre de mutations non synonymiques au fil du temps.

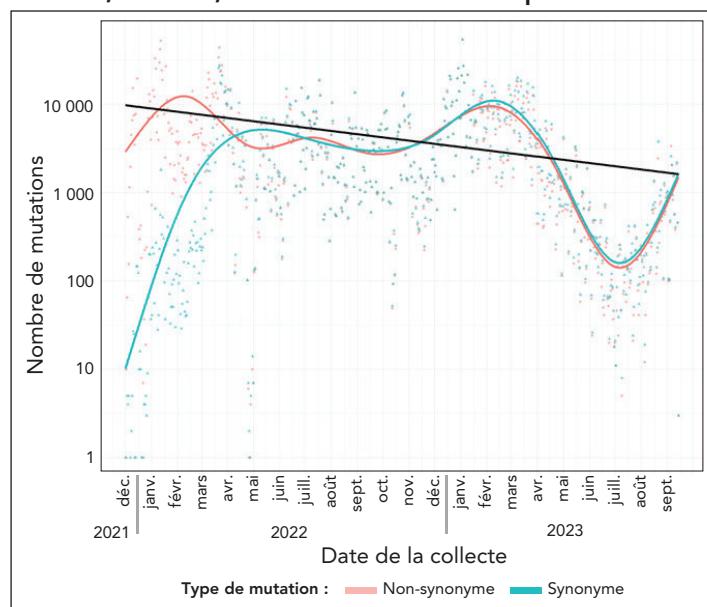
Résultats

Un total de 93 082 séquences de gènes M^{pro} correspondant à 929 lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2 en Ontario ont été analysées. Les lignées d'Omicron ont été regroupées en fonction de leur prévalence par rapport au nombre total de séquences analysées : faible (moins d'un pour cent) ou élevée (supérieure ou égale à un pour cent). Douze lignées du SRAS-CoV-2 ont été classées comme ayant une prévalence élevée. Les cinq lignées

présentant la prévalence la plus élevée au cours de la période définie sont les suivantes : BA.1.1 (9,3 %), XBB.1.5 (8,3 %), BQ.1.1 (7,8 %), BA.2 (7,4 %) et BA.5.2.1 (6,0 %).

Nous avons étudié l'évolution des séquences de nucléotides M^{pro} du SRAS-CoV-2; nous avons observé des variations cycliques pour les comptages totaux des mutations synonymes (aucun changement dans la séquence des protéines) et non synonymes (changement dans la séquence des protéines). La régression binomiale négative sur les mutations non synonymiques de M^{pro} a montré une diminution de 7,9 % (IC à 95 % : 6,5 %–9,4 %; $p < 0,001$) du nombre de mutations tous les 30 jours (figure 1). La charge mutationnelle non synonyme, avec des séquences porteuses d'au moins une mutation dans la séquence de protéines M^{pro}, représentait environ 67,7 % (207 AA/306 AA de M^{pro}) (figure 2). Le tableau 1 présente les détails des lignées à prévalence faible et élevée avec des mutations non synonymes de M^{pro} signalées dans au moins 10 séquences des données de séquence totales recueillies pour chaque lignée. Par exemple, la mutation T21I est observée dans 31 des 2801 séquences BA.2.12.1 totales au cours de la période d'étude. Seules six mutations, L67, L75, K90, A116, P184 et R279, se sont avérées communes dans les lignées à forte et faible prévalence; cependant, aucune de ces mutations n'était pertinente pour les mutations *in vitro* résistantes au nirmatrelvir.

Figure 1 : Tendances temporelles des mutations non synonymes et synonymes à l'aide d'une fente cubique restreinte dans les mutations observées dans les séquences nucléotidiques de la protéase principale (M^{pro}) des lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2 circulant en Ontario, Canada, de décembre 2021 à septembre 2023^a

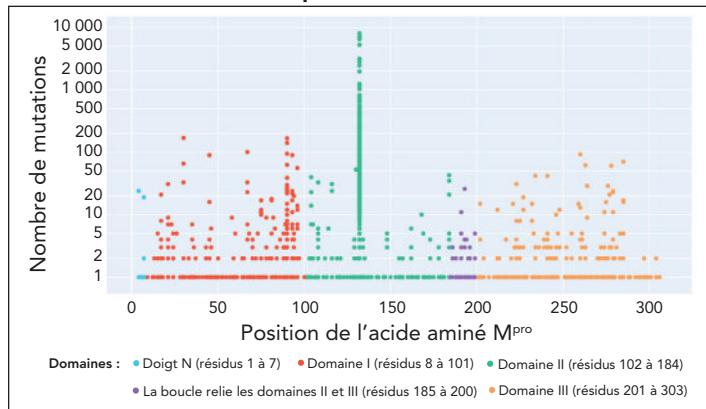


Abréviation : M^{pro}, protéase principale

^a Chaque cercle ou point plein représente une mutation et est codé en couleur sur la base des détails structuraux de la protéine M^{pro} (25). Le nombre de mutations est la valeur absolue observée des mutations à chaque position. L'axe des ordonnées transformé en logarithme présente le nombre de mutations



Figure 2 : Fardeau des mutations non synonymes observées dans la protéase principale (M^{pro}) des lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2 circulant en Ontario, Canada, de décembre 2021 à septembre 2023^a



Abréviation : M^{pro} , protéase principale

^a Chaque cercle solide ou point représente une mutation et est codé en couleur sur la base des détails structuraux de la protéine M^{pro} (25). Le nombre de mutations est la valeur absolue observée des mutations à chaque position. L'axe des ordonnées transformé en logarithme présente le nombre de mutations

Profil des mutations hautement prévalentes documentées dans les lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2, en Ontario

Des neuf mutations de M^{pro} les plus prévalentes dans le SRAS-CoV-2 (G15S, T21I, K88R, L89F, K90R, P108S, P132H, L205V et A260V) (17,26,27,32), mais avec une susceptibilité non altérée au nirmatrelvir (2,3), seule la P132H accumulée à une fréquence perceptible finit par représenter plus de 95 % des lignées d'Omicron en Ontario (27). La mutation K90R a été observée dans les lignées d'Omicron suivantes : BA.1.1, BA.2, BA.2.12.1, BA.5.2, BA.5.2.1, BQ.1, BQ.1.1 et XBB.1.15 (les taux dans la lignée allaient de 0,37 % à 2,14 %). Bien que la substitution d'A260V ait été observée dans 1,41 % (n = 92/6513 séquences) des variants BQ.1.1 circulent en 2022, la mutation T21I s'est accumulée dans la lignée BA.2.12.1 avec une fréquence de mutation de 1,1 % (n = 31/2801 séquences).

Tableau 1 : Mutations non synonymes de M^{pro} dont au moins 10 ont été observées dans les séquences de la lignée d'Omicron du SRAS-CoV-2 en, Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023

Région de structure de M^{pro}	Mutation ^a	Lignée Pango	Prévalence de la lignée ^b	Séquences totales	Nombre de séquences avec mutation	Fréquence ^c	Observation de la littérature antérieure (référence)
Doigt N (1 à 7 AA)	R4K	BQ.1.2	Faible	267	24	8,99	La mutation contribue à la dimérisation de M^{pro} (26)
	A7T	BA.1.1	Élevée	8 143	19	0,23	La mutation contribue à la dimérisation de M^{pro} (27–30)
Domaine I (8 à 101 AA)	M17V	XBB.1.5	Élevée	7 281	18	0,25	-
	T21I	BA.2.12.1	Élevée	2 801	31	1,11	Étude <i>in vitro</i> signalée comme mutation fondatrice ou précurseur (18)
	L30I	BQ.1.3	Faible	33	33	100	L30F, une mutation résistante au nirmatrelvir signalée <i>in vitro</i> (9), mais L30I n'a pas été testée
		BQ.1.3.1	Faible	170	170	100	-
		BQ.1.3.2	Faible	66	66	100	
	T45N	BE.4	Faible	90	90	100	-
		BE.4.1	Faible	16	16	100	
		CQ.2	Faible	16	16	100	
L67S	BA.5.2.1	Élevée	5 312	23	0,43	-	
L67V	BF.14	Faible	46	32	69,57	-	
	BQ.1.1.40	Faible	448	101	22,54		
L75F	BA.1.1	Élevée	8 143	11	0,14	-	
	BA.2	Élevée	6 551	12	0,18		
	BA.4.6	Élevée	1 250	17	1,36		
	BA.5.5	Faible	705	10	1,42		
S81C	XBB.1.5	Élevée	7 281	18	0,25	-	
K90R	BA.1.1	Élevée	8 143	95	1,17	Mutation prévalente dans les variants Beta (B.1.351) (27)	
	BA.2	Élevée	6 551	140	2,14		
	BA.2.12.1	Élevée	2 801	23	0,82		



SURVEILLANCE

Tableau 1 : Mutations non synonymes de M^{pro} dont au moins 10 ont été observées dans les séquences de la lignée d'Omicron du SRAS-CoV-2 en Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023 (suite)

Région de structure de M ^{pro}	Mutation ^a	Lignée Pango	Prévalence de la lignée ^b	Séquences totales	Nombre de séquences avec mutation	Fréquence ^c	Observation de la littérature antérieure (référence)
Domaine I (8 à 101 AA) (suite)	K90R (suite)	BA.5.2	Élevée	3083	24	0,78	Mutation prévalente dans les variants Beta (B.1.351) (27) (suite)
		BA.5.2.1	Élevée	5312	25	0,47	
		BQ.1	Élevée	1987	12	0,6	
		BQ.1.1	Élevée	6513	39	0,6	
		XBB.1.5	Élevée	7281	27	0,37	
		BA.2.3	Faible	751	166	22,1	
		BA.5.9	Faible	70	10	14,29	
		BF.14	Faible	46	29	63,04	
		BF.21	Faible	104	12	11,54	
		BQ.1.1.51	Faible	133	15	11,28	
Domaine II (102 à 184 AA)	T93I	BA.2.12.1	Élevée	2801	11	0,39	-
		XBB.1.5	Élevée	7281	6	0,08	-
	A94V	BU.1	Faible	20	20	100	-
	P96S	BQ.1.1	Élevée	6513	56	0,86	-
	P96L	XBB.1.5	Élevée	7281	14	0,19	-
Domaine II (102 à 184 AA)	V104I	BN.1.4	Faible	15	14	93,33	-
	P108T	BA.5.2.1	Élevée	5312	33	0,62	-
	A116V	XBB.1.5	Élevée	7281	31	0,43	-
Domaine II (102 à 184 AA)	A116T	BQ.1.2	Faible	267	24	8,99	-
	M130L	BA.5.2.9	Faible	534	53	9,93	-
	P168S	BA.5.1	Élevée	2452	10	0,41	Mutation prévalente dans les lignées préalables à Omicron (17)
	P184S	BA.1.1	Élevée	8143	21	0,26	
		BA.2.3	Faible	751	43	5,73	
	P184L	BQ.1.14	Faible	250	35	14	-
Boucle (185 à 200 AA)	A193V	XBB.1.16.1	Faible	227	4	1,76	-
Domaine III (201 à 303 AA)	V202I	BQ.1.2.3	Faible	289	15	5,19	-
	V212I	FL.7	Faible	17	12	70,59	-
	N221S	BQ.1.22	Faible	112	15	13,39	-
	F223L	BN.1.3.1	Faible	31	31	100	-
	L227F	BA.5.2.1	Élevée	5312	19	0,36	-
		BF.7	Élevée	999	12	1,2	
	L232F	BA.5.2	Élevée	3083	14	0,45	-
	A234V	BQ.1.13	Faible	435	42	9,66	-
	P241L	XBB.1.5	Élevée	7281	42	0,58	-
	H246Y	BA.5.1.15	Faible	10	10	100	-
	D248N	BU.1	Faible	20	12	60	-
	A260V	BQ.1.1	Élevée	6513	92	1,41	Aucun impact n'a été démontré sur le pouvoir réducteur du médicament dans les essais biochimiques (2,3)
	D263A	BQ.1.1	Élevée	6513	62	0,95	
	M264I	XBB.1.5	Élevée	7281	29	0,4	-



Tableau 1 : Mutations non synonymes de M^{pro} dont au moins 10 ont été observées dans les séquences de la lignée d'Omicron du SRAS-CoV-2 en, Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023 (suite)

Région de structure de M ^{pro}	Mutation ^a	Lignée Pango	Prévalence de la lignée ^b	Séquences totales	Nombre de séquences avec mutation	Fréquence ^c	Observation de la littérature antérieure (référence)
Domaine III (201 à 303 AA) (suite)	N274T	BQ.1.1	Élevée	6513	11	0,17	-
	N274S	BQ.1.14	Faible	250	10	4	-
	G275S	BN.1.5.2	Faible	18	16	88,89	-
	M276I	BA.5.1.2	Faible	154	28	18,18	-
	N277I	BA.5.1.23	Faible	236	21	8,9	-
	G278R	BF.7	Élevée	999	58	5,81	-
	R279C	BF.7	Élevée	999	23	2,3	-
		BA.5.5	Faible	705	22	3,12	-
		BF.1	Faible	95	11	11,58	-
	A285T	BA.2	Élevée	6551	16	0,24	La mutation contribue à la dimérisation de M ^{pro} (26) et à la diminution potentielle de l'efficacité catalytique de M ^{pro} (31)
		BF.1	Faible	95	11	11,58	-

Abbreviations : M^{pro}, protéase principale; -, sans objet

^a P132H, étant donné sa prédominance dans les lignées d'Omicron, a été exclu de ce tableau

^b Prévalence de la lignée : Les lignées d'Omicron ont été regroupées en fonction de leur prévalence par rapport au nombre total de séquences analysées : faible (moins d'un pour cent) ou élevée (supérieure ou égale à un pour cent)

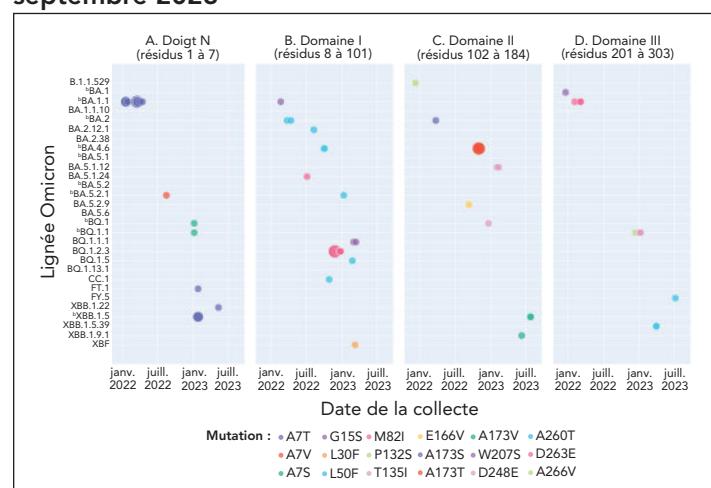
^c La formule utilisée pour calculer la fréquence est la suivante : (nombre de séquences avec mutation/total des séquences)*100

Faible prévalence et absence de temporalité de la résistance au nirmatrelvir chez les lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2, en Ontario

Seize des 34 mutations *in vitro* caractérisées comme résistantes au nirmatrelvir (2,3,32,33), correspondant à A7T/S/V (doigt N M^{pro}), G15S, L30F, L50F, M82I (domaine I de M^{pro}), P132S, T135I, E166V, A173S/T/V (domaine II de M^{pro}), Q189K, T196A (boucle reliant les domaines M^{pro} II et III de M^{pro}), W207S, D248E, A260T, D263E et A266V (domaine III de M^{pro}), ont été observés avec une spécificité de la lignée (3,12 %, n = 29/929 lignées) (figure 3). La charge de ces mutations variait de 1 à 19 comptages, l'A7T étant le plus fréquemment observé dans BA.1.1 (taux de lignée = 0,23 %, n = 19/8143 séquences; observé seulement une fois dans FT.1, XBB.1.22 et XBB.1.5), suivi de M82I dans neuf séquences de BQ.1.2.3. Le reste a été observé dans n = 4 séquences de BA.4.6 pour la mutation A173T, selon le tableau A1 de l'appendice. Seuls A7T et M82I affichaient une certaine temporalité; A7T a été remarqué pendant les semaines 3, 4 et 10 à 15 en 2022 parmi les lignées BA.1.1 et M82I pendant les semaines 46 à 51 à la fin de 2022 parmi les lignées BQ.1.2.3 (figure 3).

Nous avons également examiné notre base de données pour les mutants doubles (18,21,33–35), triples (2,3), quadruples et quintuplés (2,3), comme on l'a signalé dans la littérature, puisque ces mutations multiples ont le potentiel de conférer une

Figure 3 : Accumulation de mutations résistantes au nirmatrelvir caractérisées *in vitro* dans les lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2 et leurs modèles temporaux en Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023^{a,b}



^a Chaque cercle ou point plein représente un compte de la mutation M^{pro} codée par couleur correspondante et la taille du cercle plein indique sa valeur de comptage. Les mutations de M^{pro} répertoriées correspondent aux régions结构uelles de M^{pro} de la mutation (25)

^b Indique les lignées très répandues. Le tableau A1 de l'appendice indique le nombre de chaque mutation et les lignées associées au fil du temps

résistance synergique au nirmatrelvir. Cependant, aucune de ces mutations n'a été identifiée au sein des lignées de SRAS-CoV-2 en circulation au moment de l'échantillonnage en Ontario.



Discussion

Une analyse exhaustive des séquences de lignées de M^{pro} d'Omicron du SRAS-CoV-2 en Ontario a révélé qu'environ 3 % des lignées ($n = 29/929$) présentaient des mutations de M^{pro} caractérisées *in vitro* résistantes au nirmatrelvir, sans modèle temporel discernable.

Conformément à la littérature mondiale (26,27,32), la mutation faux-sens P132H dans la région du domaine II de la structure de M^{pro} était la plus répandue, avec une prévalence supérieure à 95 % dans toutes les lignées d'Omicron de l'Ontario. En outre, K90R, la mutation la plus répandue des variants Béta, a été observée avec une prévalence modeste dans les lignées d'Omicron de l'Ontario (27). Cependant, malgré leur prédominance, ces deux mutations n'ont pas été signalées comme réduisant la puissance du nirmatrelvir (2,3). Les évaluations structurelles de M^{pro} ont révélé que les deux mutations (P132H et K90R) sont distales par rapport au site de liaison du nirmatrelvir et ne modifient donc pas la conformation structurelle au niveau ou autour du site de liaison (34). La substitution A260V, une autre mutation de M^{pro} très prévalente observée dans les variants BQ.1.1 signalés comme un polymorphisme naturel peu fréquent, a été signalée dans l'essai clinique EPIC-HR avec impact sur la résistance au nirmatrelvir en attendant (2,3).

Dans notre ensemble de données, nous avons observé une faible fréquence de mutations ponctuelles de M^{pro} telles que T21I, P252L et T304I, qui sont connues pour fonctionner comme des mutations « précurseurs » de l'émergence de la résistance au nirmatrelvir dans le SRAS-CoV-2 (18). Ces trois mutations peuvent limiter indépendamment la réPLICATION du virus SRAS-CoV-2 (32), mais aucune donnée n'est disponible sur leur contribution potentielle à la résistance. Aucune des mutations à faible prévalence observées dans notre ensemble de données, y compris A7T et M82I, n'est impliquée dans la résistance au nirmatrelvir (35). Notamment, A7 est situé dans la région du doigt N, connue pour jouer un rôle dans la dimérisation qui est cruciale pour l'activité de l'enzyme de M^{pro} (28,29). Selon Iketani *et al.* (30), les variants présentant des mutations de A7 à V/C/S/T ont une activité protéasique comparable à celle du type sauvage. De manière cohérente, les études structurales suggèrent que la substitution de l'alanine par la thréonine en position 7 n'a qu'un effet modeste sur l'activité protéasique de M^{pro}, soit une réduction de l'efficacité 1,5 fois (29). Dans l'ensemble, ces études suggèrent que les mutations A7V/S/T observées dans les variants BA.1.1 au début de 2022 n'ont probablement pas contribué à la résistance au nirmatrelvir ou à l'activité protéasique. Aucune mutation *in vitro* connue résistante au nirmatrelvir n'a été trouvée (du 17 au 30 septembre 2023) dans les variants qui circulaient récemment en Ontario, EG.5.1.1, FL.1.5.1, HV.1, HK.3 et XBB.1.16.6 (36).

La tendance à la baisse observée dans les mutations M^{pro} non synonymes (figure 1) suggère la possibilité d'une réduction de l'hétérogénéité parmi les variants viraux circulants de l'Ontario ou d'une diminution de la propension de la protéine M^{pro} à évoluer en réponse à une pression sélective (27). Par ailleurs, Schwartz *et al.* (13) a rapporté que seulement 5 % des patients ($n = 8\,876/177\,545$) avaient été traités par le nirmatrelvir-ritonavir entre le 4 avril et le 31 août 2022, en Ontario. Ces données, bien que spécifiques à une brève période d'étude dans le cadre de notre étude, suggèrent une pression de sélection limitée, contribuant potentiellement à la plus faible prévalence des variants Omicron résistants aux antiviraux observés dans la population étudiée. Dans l'ensemble, nos observations suggèrent que les variants Omicron analysés au moment de la période d'étude n'ont pas encore développé de résistance significative et généralisée au nirmatrelvir (37).

Points forts et limites

L'un des principaux points forts de l'étude est l'analyse à grande échelle des séquences de M^{pro} des lignées d'Omicron qui ont circulé entre décembre 2021 et septembre 2023 en Ontario. Une analyse exhaustive a permis d'obtenir des renseignements sur les mutations *in vitro* pertinentes à la résistance au nirmatrelvir (fréquences de mutation et temporalité), l'activité de la protéase et l'identification des mutations de la fonction inconnue propre à notre ensemble de données qui peuvent être étudiées plus à fond dans des études expérimentales. L'une des principales limites de notre étude est sa généralisabilité, parce que seule une proportion d'échantillonnage définie a été séquencée à un moment donné (i.e., population ciblée pour les tests de diagnostic de la COVID-19, proportions de spécimens séquencés qui varient dans le temps, spécimens avec un seuil de cycle de PCR de moins de 30). En raison de ces critères stricts pour le séquençage des échantillons, notre ensemble de données d'étude pourrait ne pas être directement représentatif des séquences de M^{pro} de l'Ontario. De plus, l'absence de données sociodémographiques, cliniques et thérapeutiques a limité l'interprétation de nos résultats dans le contexte du traitement au nirmatrelvir-ritonavir.

Conclusion

Dans l'ensemble, nous avons constaté une très faible présence de souches mutantes résistantes au nirmatrelvir et un manque de temporalité. Nos données suggèrent que l'utilisation actuelle du nirmatrelvir-ritonavir ciblant des populations spécifiques en Ontario pourrait ne pas fournir de pression sélective pour l'émergence de mutants résistants (37). Enfin, cette étude soutient la nécessité d'une surveillance génomique continue et constitue également le fondement de la création d'un système de surveillance automatisé conçu pour suivre l'émergence de mutations résistantes au nirmatrelvir dans le virus du SRAS-CoV-2, en utilisant des données temporelles sur le génome. La capacité de suivre, en temps quasi réel, la fréquence des mutations associées à la résistance aux antimicrobiens peut



éclairer la gestion des antimicrobiens nécessaire pour maintenir l'efficacité des médicaments sur une plus longue période.

Déclaration des auteurs

V. D. — Conceptualisation, logiciels, analyse formelle, rédaction de la version originale, rédaction-révision et édition
 F. S. — Logiciels, analyse formelle, rédaction-révision et édition
 S. I. — Analyse formelle, rédaction-révision et édition
 T. B. — Rédaction-révision et édition
 S. C. — Analyse formelle, rédaction-révision et édition
 A. M. A. — Rédaction-révision et édition
 A. E. — Rédaction-révision et édition
 H. B. — Rédaction-révision et édition
 N. V. — Rédaction-révision et édition
 Y. L. — Logiciels, analyse formelle, rédaction-révision et édition
 K. S. — Rédaction-révision et édition
 H. H. — Rédaction-révision et édition
 K. C. — Rédaction-révision et édition
 A. S. — Rédaction-révision et édition
 A. L. — Rédaction-révision et édition
 A. Z. — Rédaction-révision et édition
 K. R. — Rédaction-révision et édition
 J. K. — Rédaction-révision et édition
 M. H. — Rédaction-révision et édition
 A. C. — Rédaction-révision et édition
 J. G. — Rédaction-révision et édition
 S. P. — Conceptualisation, rédaction-révision et édition
 Le contenu de cet article et les opinions qui y sont exprimées n'engagent que les auteurs et ne reflètent pas nécessairement ceux du gouvernement du Canada.

Intérêts concurrents

J. B. Gubbay est un rédacteur scientifique consultant rémunéré pour GIDEON Informatics, Inc., qui n'a aucun lien avec les travaux actuels. Tous les autres auteurs n'ont aucun intérêt concurrent à déclarer.

Remerciements

Nous remercions l'équipe du Service des bibliothèques de Santé publique Ontario qui a appuyé la recension des écrits et l'équipe de Santé publique Ontario qui a contribué à cette étude.

Références

2. U.S. Food and Drug Administration. Emergency Use Authorization (EUA) for Paxlovid (nirmatrelvir tablets co-packaged with ritonavir tablets) - Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Review. Silver Springs, MD: USDHHS; 2021. [Consulté le 21 août 2023]. <https://www.fda.gov/media/155194/download>
3. Pfizer Labs. Fact sheet for healthcare providers: Emergency Use Authorization for Paxlovid™. New York, NY: Pfizer; 2024. [Consulté le 26 août 2023]. <https://www.fda.gov/media/155050/download>
4. Santé Canada. Santé Canada homologue PAXLOVID™ pour les patients atteints d'une forme légère ou modérée de COVID-19 qui présentent un risque élevé d'évolution vers une forme grave de la maladie. Ottawa, ON : SC; 2022. [Consulté le 23 août 2023]. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/nouvelles/2022/01/sante-canada-homologue-paxlovidtm-pour-les-patients-atteints-dune-forme-legere-ou-moderee-de-covid-19-qui-presentent-un-risque-eleve-devolution-ver.html>
5. Ontario Health. Recommendations for Antiviral Therapy for Adults with Mild to Moderate COVID-19. [Consulté le 7 juil. 2024]. <https://www.ontariohealth.ca/sites/ontariohealth/files/Recommendations-for-Antiviral-Therapy-for-Adults-with-Mild-to-Moderate-COVID-19.pdf>
6. Hilgenfeld R. From SARS to MERS: Crystallographic Studies on Coronaviral Proteases Enable Antiviral Drug Design. FEBS J 2014;281(18):4085–96. [DOI PubMed](#)
7. Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: Basis for design of anti-SARS drugs. Science 2003;300(5626):1763–7. [DOI PubMed](#)
8. Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, Boras B, Cardin RD, Carlo A, Coffman KJ, Dantonio A, Di L, Eng H, Ferre R, Gajiwala KS, Gibson SA, Greasley SE, Hurst BL, Kadar EP, Kalgutkar AS, Lee JC, Lee J, Liu W, Mason SW, Noell S, Novak JJ, Obach RS, Ogilvie K, Patel NC, Pettersson M, Rai DK, Reese MR, Sammons MF, Sathish JG, Singh RSP, Steppan CM, Stewart AE, Tuttle JB, Updyke L, Verhoest PR, Wei L, Yang Q, Zhu Y. An Oral SARS-CoV-2 M^{pro} Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19. Science 2021;374(6575):1586–93. [DOI PubMed](#)
9. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, Abreu P, Bao W, Wisemandle W, Baniecki M, Hendrick VM, Damle B, Simón-Campos A, Pypstra R, Rusnak JM; EPIC-HR Investigators. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. N Engl J Med 2022;386(15):1397–408. [DOI PubMed](#)



10. Wong CKH, Au ICH, Lau KTK, Lau EHY, Cowling BJ, Leung GM. Real-World Effectiveness of Molnupiravir and Nirmatrelvir plus Ritonavir against Mortality, Hospitalisation, and in-Hospital Outcomes among Community-Dwelling, Ambulatory Patients with Confirmed SARS-CoV-2 Infection during the Omicron Wave in Hong Kong: An Observational Study. *Lancet* 2022;400(10359):1213–22. [DOI](#) [PubMed](#)
11. Aggarwal NR, Molina KC, Beaty LE, Bennett TD, Carlson NE, Mayer DA, Peers JL, Russell S, Wynia MK, Ginde AA. Real-World Use of Nirmatrelvir–Ritonavir in Outpatients with COVID-19 during the Era of Omicron Variants Including BA. 4 and BA. 5 in Colorado, USA: A Retrospective Cohort Study. *Lancet Infect Dis* 2023;23(6):696–705. [DOI](#) [PubMed](#)
12. Shah MM, Joyce B, Plumb ID, Sahakian S, Feldstein LR, Barkley E, Paccione M, Deckert J, Sandmann D, Gerhart JL, Hagen MB. Paxlovid Associated with Decreased Hospitalization Rate among Adults with COVID-19—United States, April–September 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2022;71(48):1531–7. [DOI](#) [PubMed](#)
13. Schwartz KL, Wang J, Tadrous M, Langford BJ, Daneman N, Leung V, Gomes T, Friedman L, Daley P, Brown KA. Population-Based Evaluation of the Effectiveness of Nirmatrelvir–Ritonavir for Reducing Hospital Admissions and Mortality from COVID-19. *CMAJ* 2023;195(6):E220–6. [DOI](#) [PubMed](#)
14. Mitchell R, Lee D, Pelude L, Comeau J, Conly J, Ellis C, Ellison J, Embil J, Evans G, Johnston L, Johnstone J, Katz K, Kibsey P, Lee B, Lefebvre MA, Longtin Y, McGeer A, Mertz D, Minion J, Smith S, Srigley J, Suh K, Tomlinson J, Wong A, Thampi N, Frenette C. Utilisation du nirmatrelvir/ritonavir chez les adultes admis à l'hôpital en raison de la COVID-19 pendant la phase omicron de la pandémie de COVID-19, Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales. Relevé des maladies transmissibles au Canada 2023;49(7/8):351–7. [DOI](#)
15. Banerjee A, Mossman K, Grandvaux N. Molecular Determinants of SARS-CoV-2 Variants. *Trends Microbiol* 2021;29(10):871–3. [DOI](#) [PubMed](#)
16. Hu Y, Lewandowski EM, Tan H, Zhang X, Morgan RT, Zhang X, Jacobs LMC, Butler SG, Gongora MV, Choy J, Deng X, Chen Y, Wang J. Naturally Occurring Mutations of SARS-CoV-2 Main Protease Confer Drug Resistance to Nirmatrelvir. *ACS Cent Sci* 2023;9(8):1658–69. [DOI](#) [PubMed](#)
17. Moghadasi SA, Heilmann E, Khalil AM, Nnabuife C, Kearns FL, Ye C, Moraes SN, Costacurta F, Esler MA, Aihara H, von Laer D, Martinez-Sobrido L, Palzkill T, Amaro RE, Harris RS. Transmissible SARS-CoV-2 Variants with Resistance to Clinical Protease Inhibitors. *Sci Adv* 2023;9(13):eade8778. [DOI](#) [PubMed](#)
18. Iketani S, Mohri H, Culbertson B, Hong SJ, Duan Y, Luck MI, Annavajhala MK, Guo Y, Sheng Z, Uhlemann AC, Goff SP, Sabo Y, Yang H, Chavez A, Ho DD. Multiple Pathways for SARS-CoV-2 Resistance to Nirmatrelvir. *Nature* 2023;613(7944):558–64. [DOI](#) [PubMed](#)
19. Li J, Wang Y, Solanki K, Atre R, Lavrijsen M, Pan Q, Baig MS, Li P. Nirmatrelvir Exerts Distinct Antiviral Potency against Different Human Coronaviruses. *Antiviral Res* 2023;211:105555. [DOI](#) [PubMed](#)
20. Clavel F, Hance AJ. HIV Drug Resistance. *N Engl J Med* 2004;350(10):1023–35. [DOI](#) [PubMed](#)
21. Santé publique Ontario. Impact des mutations de la protéase principale du SRAS-CoV-2 sur la résistance au nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid). Toronto, ON : SPO; 2022. [Consulté le 23 août 2023]. https://www.publichealthontario.ca/-/media/Documents/nCoV/ipac/2022/06/sars-cov2-protease-mutations-paxlovid-resistance.pdf?sc_lang=fr
22. Public Health Ontario. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - Variant of Concern Screening and Whole Genome Sequencing Surveillance. Toronto, ON: PHO; 2022. [Consulté le 9 oct. 2023]. <https://www.publichealthontario.ca/en/Laboratory-Services/Test-Information-Index/COVID-19-VoC>
23. Ministère de la santé de l'Ontario. Directives provinciales pour les tests de dépistage de COVID-19. Toronto, ON : MSO; 2023. [Consulté le 9 oct. 2023]. <https://files.ontario.ca/moh-covid-19-provincial-testing-guidance-fr.pdf>
24. Gouvernement de l'Ontario. Mise à jour de l'admissibilité au test PCR et des directives sur la gestion des cas et des contacts en Ontario. Toronto, ON : Gouvernement de l'Ontario; 2021. [Consulté le 23 oct. 2023]. <https://news.ontario.ca/en/backgrounder/1001387/updated-eligibility-for-pcr-testing-and-case-and-contact-management-guidance-in-ontario>
25. Kneller DW, Phillips G, O'Neill HM, Jedrzejczak R, Stols L, Langan P, Joachimiak A, Coates L, Kovalevsky A. Structural Plasticity of SARS-CoV-2 3CL M^{pro} Active Site Cavity Revealed by Room Temperature X-Ray Crystallography. *Nat Commun* 2020;11(1):3202. [DOI](#) [PubMed](#)
26. Ullrich S, Ekanayake KB, Otting G, Nitsche C. Main Protease Mutants of SARS-CoV-2 Variants Remain Susceptible to Nirmatrelvir. *Bioorg Med Chem Lett* 2022;62:128629. [DOI](#) [PubMed](#)



27. Lee JT, Yang Q, Gribenko A, Perrin BS Jr, Zhu Y, Cardin R, Liberator PA, Anderson AS, Hao L. Surveillance of SARS-CoV-2 M^{pro} Reveals High Sequence and Structural Conservation Prior to the Introduction of Protease Inhibitor Paxlovid. *mBio* 2022;13(4):e0086922. [DOI](#) [PubMed](#)
28. Arutyunova E, Khan MB, Fischer C, Lu J, Lamer T, Vuong W, van Belkum MJ, McKay RT, Tyrrell DL, Vederas JC, Young HS, Lemieux MJ. N-Terminal Finger Stabilizes the S1 Pocket for the Reversible Feline Drug GC376 in the SARS-CoV-2 M^{pro} Dimer. *J Mol Biol* 2021;433(13):167003. [DOI](#) [PubMed](#)
29. Chen SA, Arutyunova E, Lu J, Khan MB, Rut W, Zmudzinski M, Shahbaz S, Iyyathurai J, Moussa EW, Turner Z, Bai B, Lamer T, Nieman JA, Vederas JC, Julien O, Drag M, Elahi S, Young HS, Lemieux MJ. SARS-CoV-2 M^{pro} Protease Variants of Concern Display Altered Viral Substrate and Cell Host Target Galectin-8 Processing but Retain Sensitivity toward Antivirals. *ACS Cent Sci* 2023;9(4):696–708. [DOI](#) [PubMed](#)
30. Iketani S, Hong SJ, Sheng J, Bahari F, Culbertson B, Atanaki FF, Aditham AK, Kratz AF, Luck MI, Tian R, Goff SP, Montazeri H, Sabo Y, Ho DD, Chavez A. Functional Map of SARS-CoV-2 3CL Protease Reveals Tolerant and Immutable Sites. *Cell Host Microbe* 2022;30(10):1354–62.e6. [DOI](#) [PubMed](#)
31. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, Becker S, Rox K, Hilgenfeld R. Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved α-Ketoamide Inhibitors. *Science* 2020;368(6489):409–12. [DOI](#) [PubMed](#)
32. Ip JD, Wing-Ho Chu A, Chan WM, Cheuk-Ying Leung R, Umer Abdullah SM, Sun Y, Kai-Wang To K. Global Prevalence of SARS-CoV-2 3CL Protease Mutations Associated with Nirmatrelvir or Ensartrelvir Resistance. *EBioMedicine* 2023;91:104559. [DOI](#) [PubMed](#)
33. Zhou Y, Gammeltoft KA, Ryberg LA, Pham LV, Tjørnelund HD, Binderup A, Duarte Hernandez CR, Fernandez-Antunez C, Offersgaard A, Fahnøe U, Peters GHJ, Ramirez S, Bukh J, Gottwein JM. Nirmatrelvir-Resistant SARS-CoV-2 Variants with High Fitness in an Infectious Cell Culture System. *Sci Adv* 2022;8(51):eadd7197. [DOI](#) [PubMed](#)
34. Greasley SE, Noell S, Plotnikova O, Ferre R, Liu W, Bolanos B, Fennell K, Nicki J, Craig T, Zhu Y, Stewart AE, Steppan CM. Structural Basis for the in Vitro Efficacy of Nirmatrelvir against SARS-CoV-2 Variants. *J Biol Chem* 2022;298(6):101972. [DOI](#) [PubMed](#)
35. Heilmann E, Costacurta F, Moghadasi SA, Ye C, Pavan M, Bassani D, Volland A, Ascher C, Weiss AKH, Bante D, Harris RS, Moro S, Rupp B, Martinez-Sobrido L, von Laer D. SARS-CoV-2 3CLpro Mutations Selected in a VSV-Based System Confer Resistance to Nirmatrelvir, Ensartrelvir, and GC376. *Sci Transl Med* 2023;15(678):eabq7360. [DOI](#) [PubMed](#)
36. Santé publique Ontario. Résumé épidémiologique hebdomadaire : Surveillance génomique du SRAS-CoV-2 en Ontario, le 6 août 2024. Toronto, ON : SPO; 2023. [Consulté le 22 oct. 2023]. https://www.publichealthontario.ca/-/media/Documents/nCoV/epi/covid-19-sars-cov2-whole-genome-sequencing-epi-summary.pdf?rev=66a6cdcdde04046b0abb44b0eaf7d648f&sc_lang=fr
37. Sjaarda CP, Lau L, Simpson JT, Fattouh R, Biondi MJ, Maguire F, Campigotto A, Feng Y, Tozer K, Wong H, Sung WWL, Kim S, Marshall CR, Sheth PM, Kozak R. Prevalence of Low-Frequency, Antiviral Resistance Variants in SARS-CoV-2 Isolates in Ontario, Canada, 2020-2023. *JAMA Netw Open* 2023;6(7):e2324963. [DOI](#) [PubMed](#)



Appendice

Tableau A1 : Détection cumulative des mutations de M^{pro} résistantes au nirmatrelvir observées dans les lignées d'Omicron du SRAS-CoV-2 circulant en Ontario, au Canada, de décembre 2021 à septembre 2023

Mutation de M ^{pro}	Données actuelles	Lignée associée	Année de circulation de la lignée	Mutations résistantes au nirmatrelvir <i>in vitro</i> signalées dans chaque lignée
A7T	Émergence post-traitement	BA.1.1	2022	19
		FT.1	2023	1
		XBB.1.22	2023	1
		XBB.1.5	2023	2
A7V	Émergence post-traitement	BA.5.2.1	2022	1
A7S	Émergence post-traitement	BQ.1	2023	1
		BQ.1.1	2023	1
G15S	Essai biochimique, étude de sélection de la résistance	BA.1.1	2022	1
		BQ.1.1.1	2023	2
L30F	Émergence post-traitement	XBF	2023	1
L50F	Étude sur la sélection de la résistance	BA.2	2022	2
		BA.2.12.1	2022	1
		BA.4.6	2022	2
		CC.1	2022	1
		BA.5.2.1	2023	1
		BQ.1.5	2023	1
M82I	Émergence post-traitement	BA.5.1.24	2022	1
		BQ.1.2.3	2022	9
T135I	Essai biochimique	BQ.1	2022	1
		BA.5.1.12	2023	2
E166V	Analyse biochimique, émergence post-traitement	BA.5.2.9	2022	1
A173S	Essai biochimique, essai de culture cellulaire	BA.2	2022	1
A173T	Essai biochimique, essai de culture cellulaire	BA.4.6	2022	4
A173V	Essai biochimique, essai de culture cellulaire	XBB.1.5	2023	2
		XBB.1.9.1	2023	1
Q189K	Essai biochimique	XBB.1.5	2023	1
T196A	Émergence post-traitement	BA.2	2022	1
		BA.2.3	2022	1
		BA.4.1	2022	1
W207S	Émergence post-traitement	BA.1	2021	1
D248E	Essai biochimique	BQ.1.1	2023	3
A260T	Émergence post-traitement	FY.5	2023	1
		XBB.1.5.39	2023	2
D263E	Émergence post-traitement	BA.1.1	2022	3
A266V	Émergence post-traitement	BQ.1.1	2022	1

Abréviation : M^{pro}, protéase principale