

# Métagénomique panpathogène et transcriptomique, le diagnostic de maladies infectieuses 2.0

*Dr C. Rodriguez*

*CNR LE séquençage Covid*

*LBMR Métagénomique*

*Microbiology Dpt, INSERM U955 Team 18,*

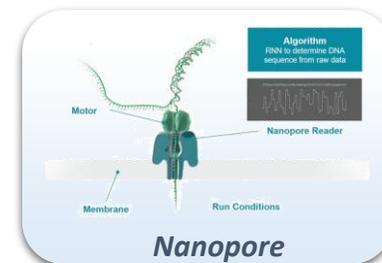
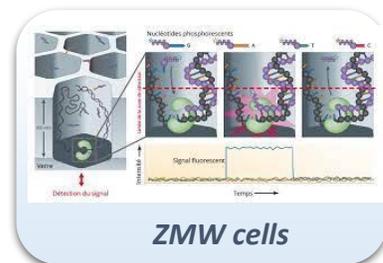
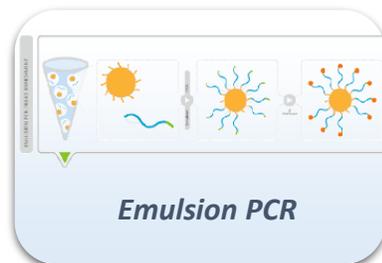
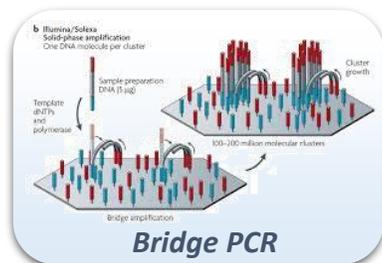
*University hospital Henri Mondor, APHP, Créteil, France*

# C'est quoi le NGS ?

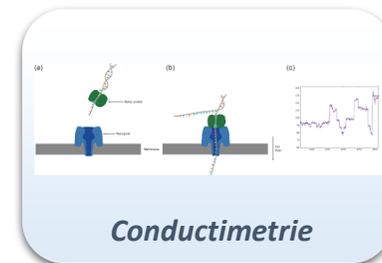
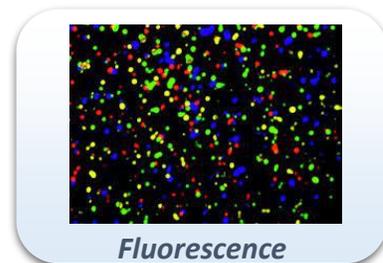
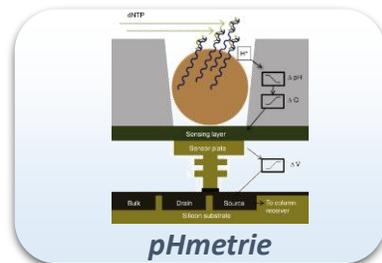
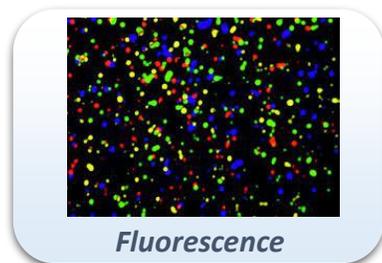
Plateforme



Isolement des séquences,  
amplification du signal

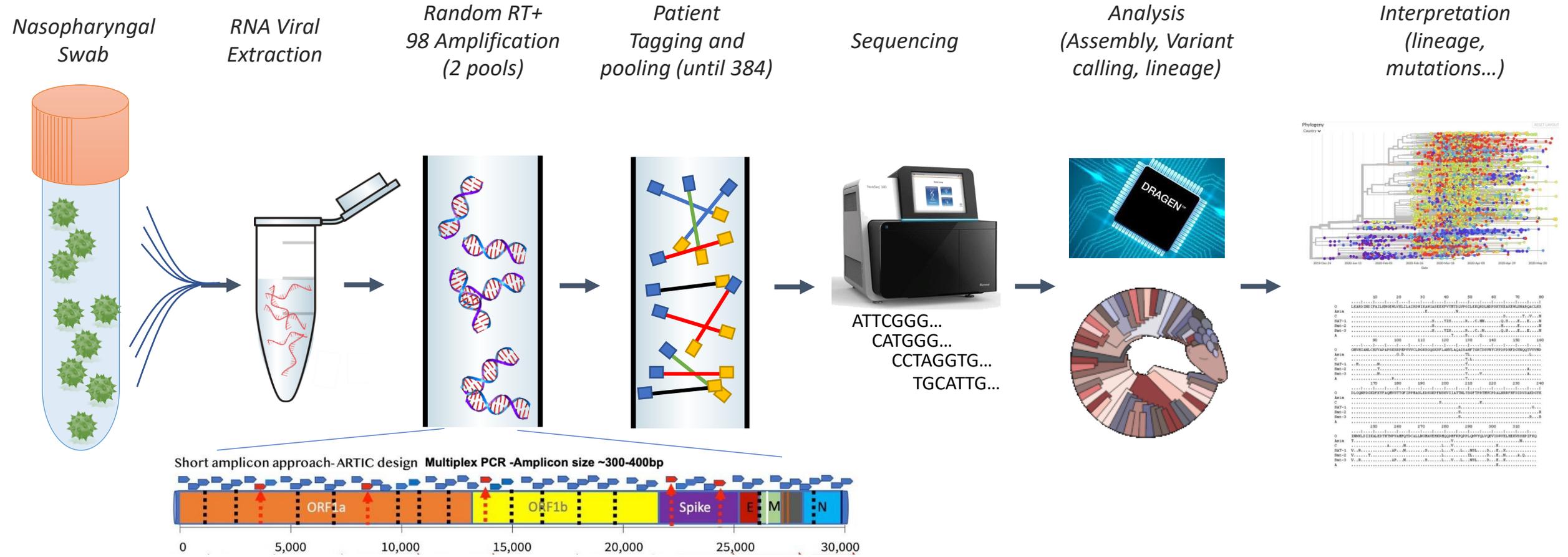


Acquisition du signal



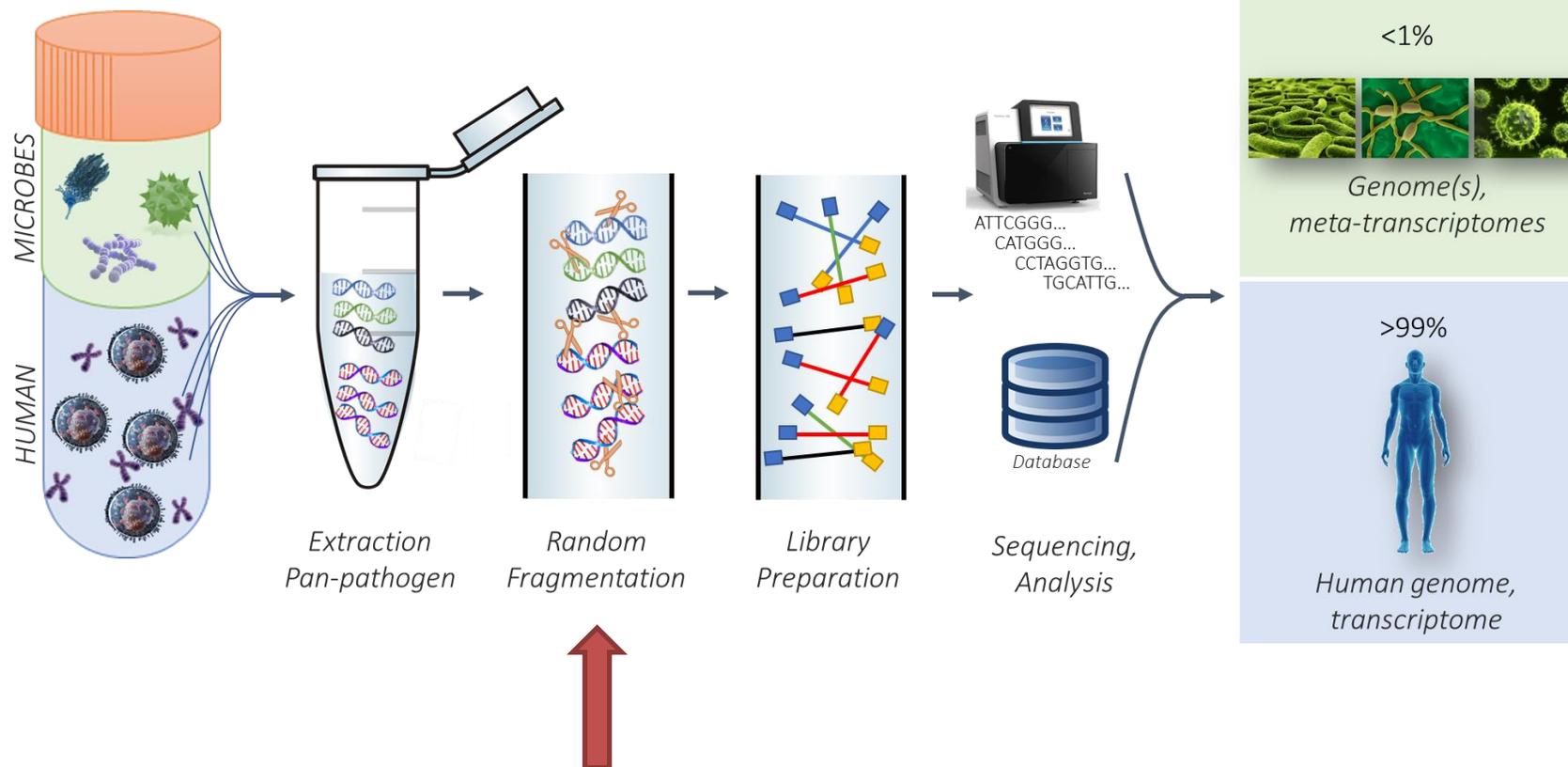
# Approche Amplicon

- Protocole CovidSeq (Illumina)



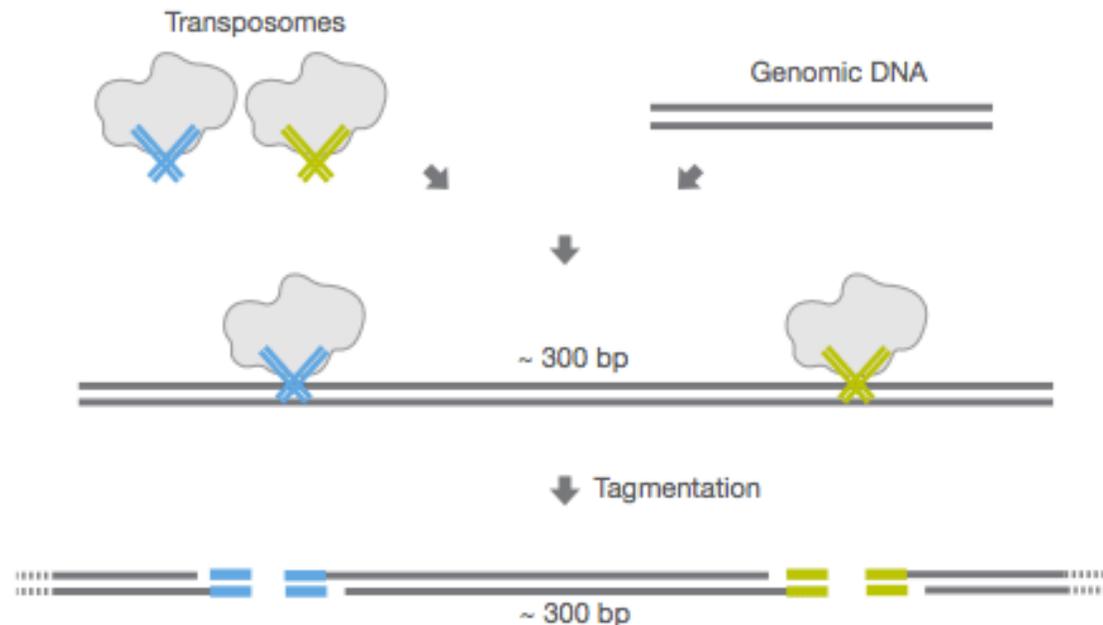
# Approche métagénomique Shotgun (SMg)

- Métagénomique : étude de la totalité du contenu génétique d'un échantillon par séquençage à haut débit
- Dans le cadre d'une infection chez l'homme :



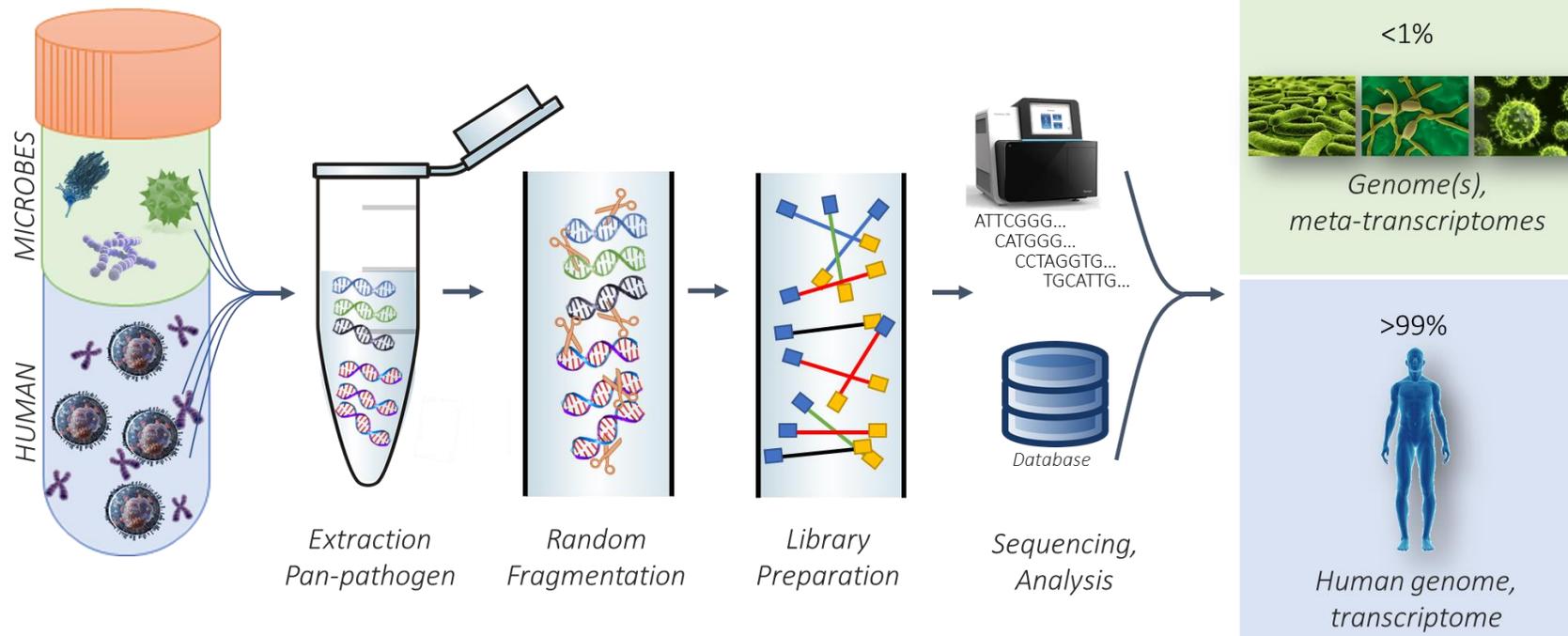
# Approche métagénomique Shotgun (SMg)

- Métagénomique : étude de la totalité du contenu génétique d'un échantillon par séquençage à haut débit
- Dans le cadre d'une infection chez l'homme :

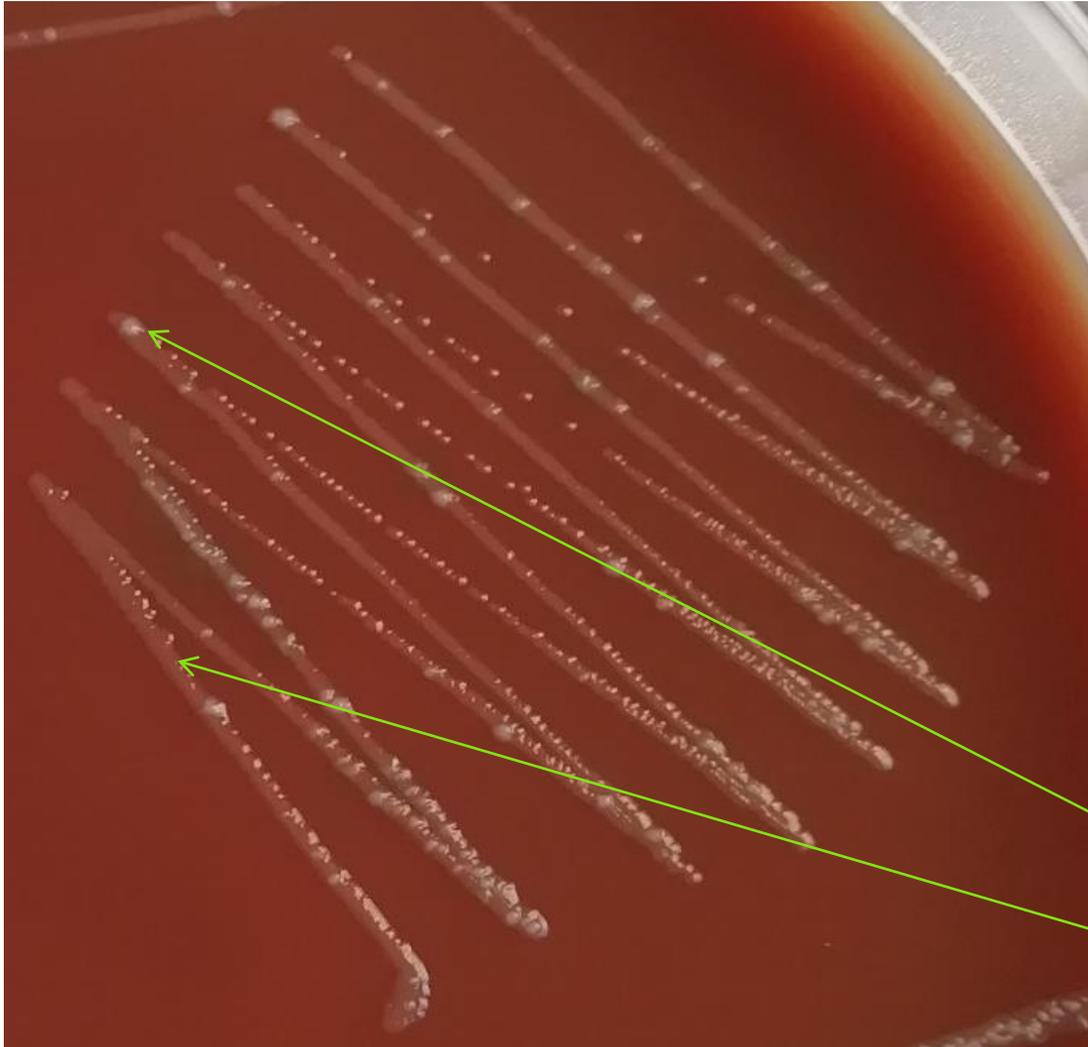


# Approche métagénomique Shotgun (SMg)

- Métagénomique : étude de la totalité du contenu génétique d'un échantillon par séquençage à haut débit
- Dans le cadre d'une infection chez l'homme :



# Exemple sur la documentation par SMg



## Résultats

### Bactéries

#### Quantité faible

Streptococcus sp. oral taxon 431		0.00000354
Streptococcus sp. A12		0.00000461
Haemophilus sp. oral taxon 036		0.00000481

Veillonella parvula		0.00000493
---------------------	--	------------

Neisseria meningitidis		0.00000797
------------------------	--	------------

Prevotella melaninogenica		0.00000933
---------------------------	--	------------

Streptococcus pseudopneumoniae		0.00000975
--------------------------------	--	------------

#### Quantité intermédiaire

Neisseria mucosa		0.00001054
------------------	--	------------

Haemophilus parainfluenzae		0.00001373
----------------------------	--	------------

Neisseria sicca		0.00002096
-----------------	--	------------

Streptococcus pneumoniae		0.00002158
--------------------------	--	------------

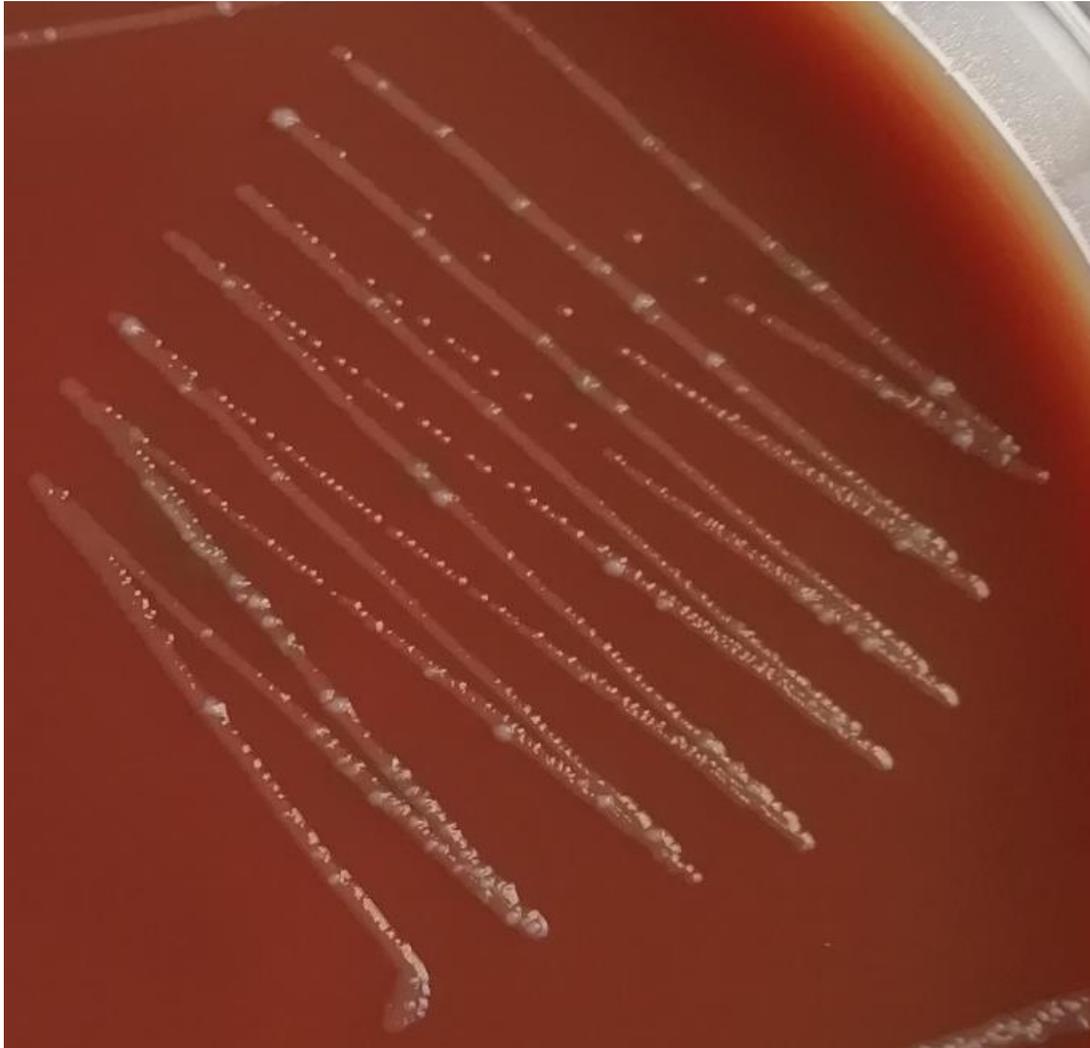
Streptococcus mitis		0.00002703
---------------------	--	------------

Prevotella jejuni		0.00002841
-------------------	--	------------

Staphylococcus aureus		0.00006137
-----------------------	--	------------

Haemophilus influenzae		0.00261808
------------------------	--	------------

# Exemple sur la documentation par SMg



Résultats rendu :

## **Bactéries**

Prédominance d'*Haemophilus influenzae* et présence de *S. aureus* au sein d'une flore ORL

## **Virus**

Absence

## **Champignons**

Absence

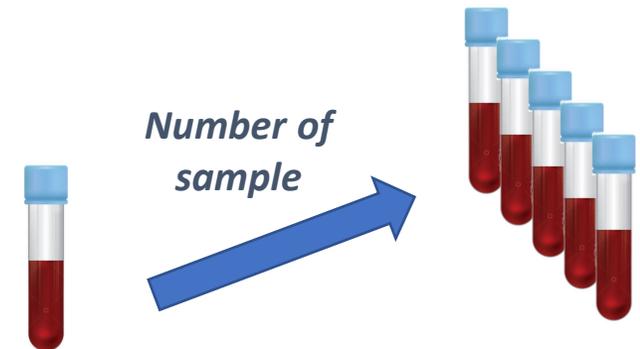
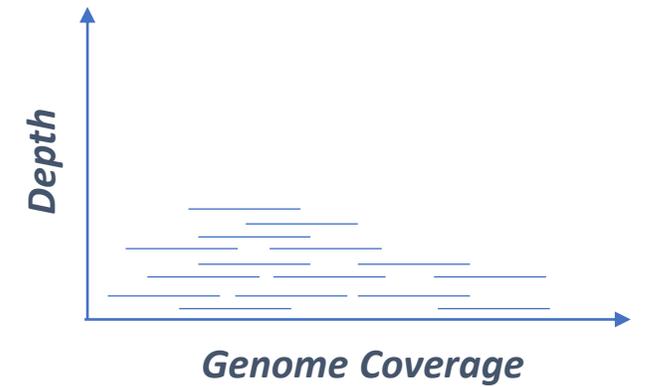
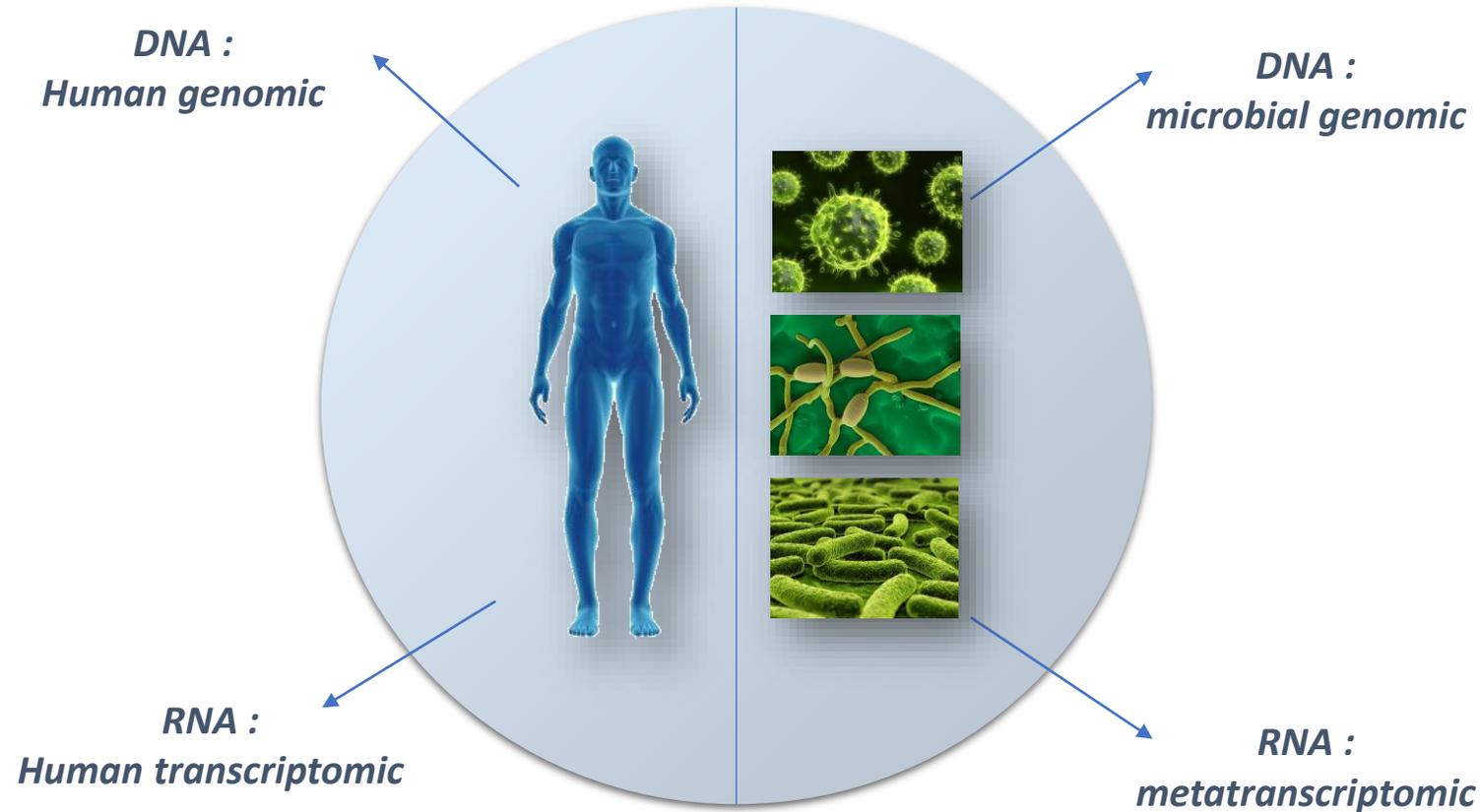
## **Parasites**

Absence

# Qu'est ce que ça apporte de plus ?

*Information qualitative :  
Approche sans a priori (Shotgun)*

*Information quantitative  
(Shotgun et amplicon)*



# NGS Henri Mondor



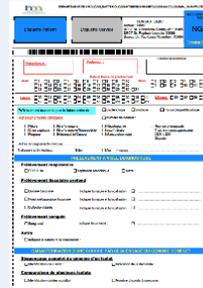
15189 & 17025  
CNR LE SARS-COV-2  
LBMR Métagénomique  
LBMR Comparaison de souches



Cliniciens



Tous types de  
prélèvements y  
compris Paraffine



Rapport de Métagénomique avec interprétation

Echantillon : 1507M100330  
Logiciel : Metagenic v2.1.1  
Date : 24-07-2019

Nombre de séquences

Librairies	ADN	ARN
Total	48 676 202	12 798 630
Filtres qualités	32 469 964	7 498 994

Séquences soustraites

	Humain	Taxons non pathogènes
	32 218 335	7 212 438

Séquences analysées

	Bactéries	Virus	Champignons	Parasites	Autres	
	307	110 797	0	417	1	
			1	974	0	
			0	1	1	
					34 804	98 084

Résultats

Bactéries

Non retrouvé

Virus

Quantité faible

Mumps rubulavirus 0.00000875 An

Champignons

## Plateforme GenoBioMICS



Extraction et pré-PCR



Préparation de librairie

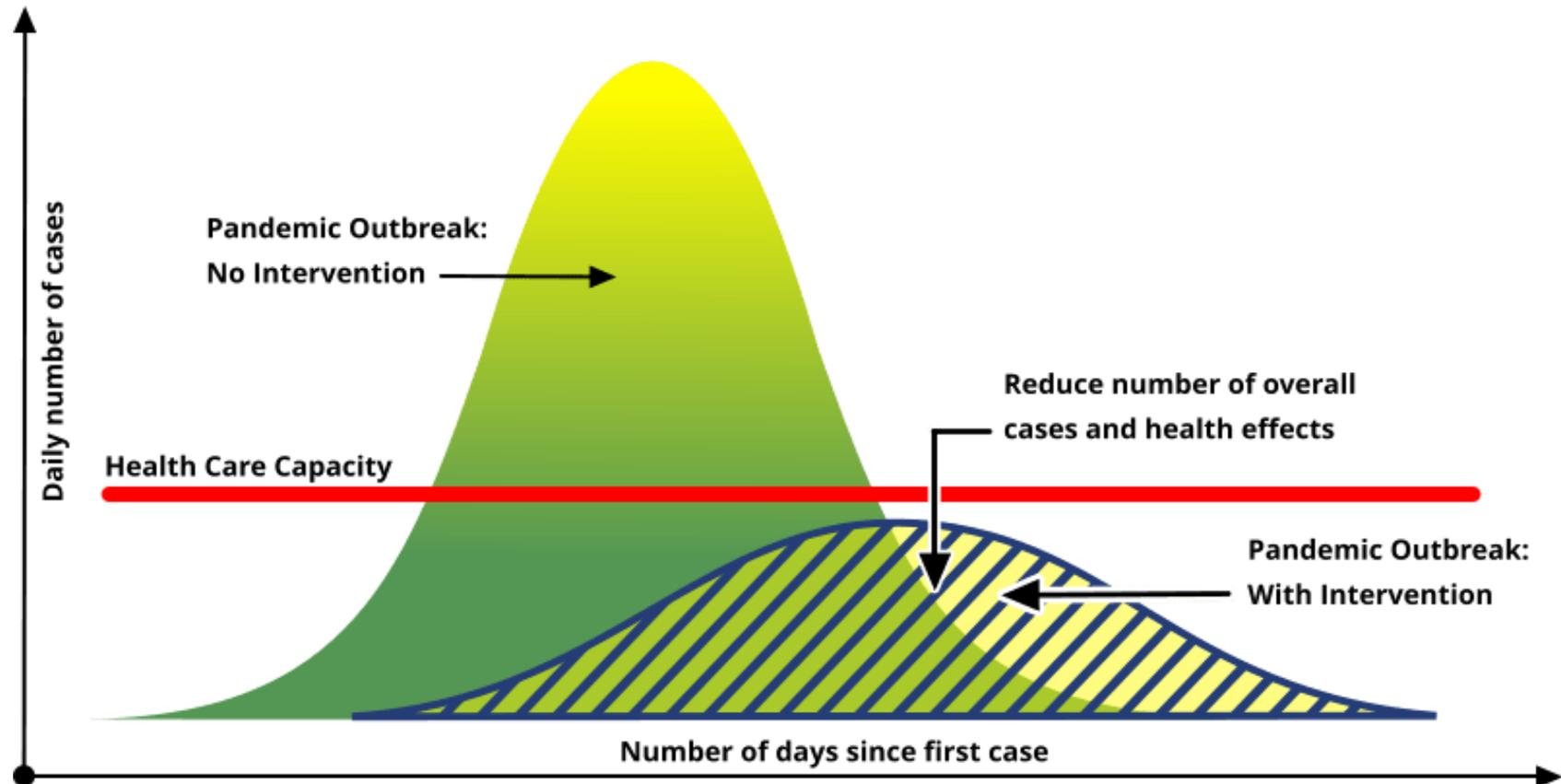


Séquençage



Analyse

# En maladies infectieuses ?



Adapted from: CDC. Interim pre-pandemic planning guidance: community strategy for pandemic influenza mitigation in the United States—early, targeted, layered use of nonpharmaceutical interventions. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2007. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11425>.

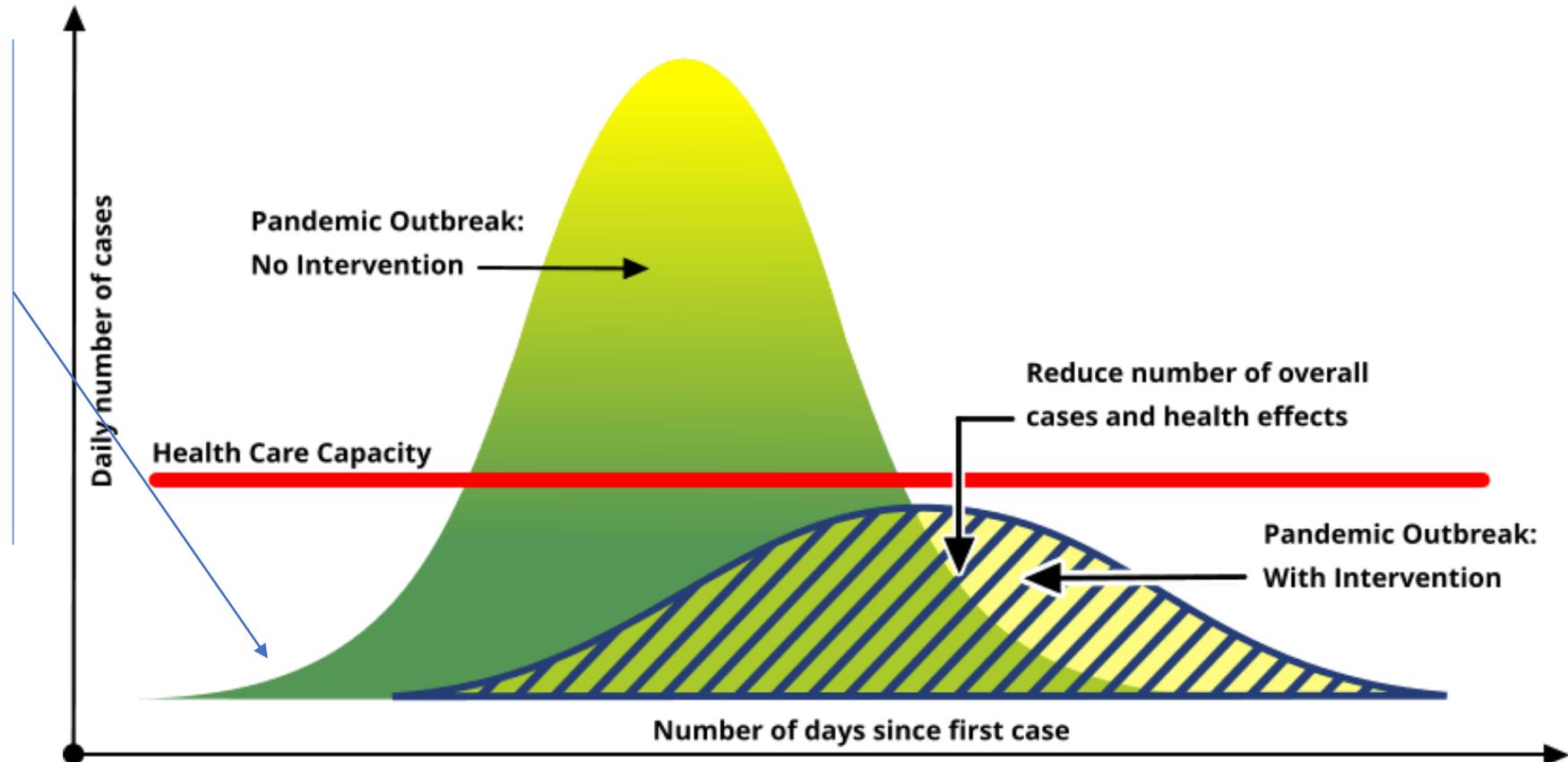
# En maladies infectieuses ?

## Techniques Shotgun

Surveillance  
environnementale

Surveillance  
animale

Surveillance  
Humaine  
et Diagnostic



Adapted from: CDC. Interim pre-pandemic planning guidance: community strategy for pandemic influenza mitigation in the United States—early, targeted, layered use of nonpharmaceutical interventions. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2007. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11425>.

# Phase pré-pandémique : Environnement

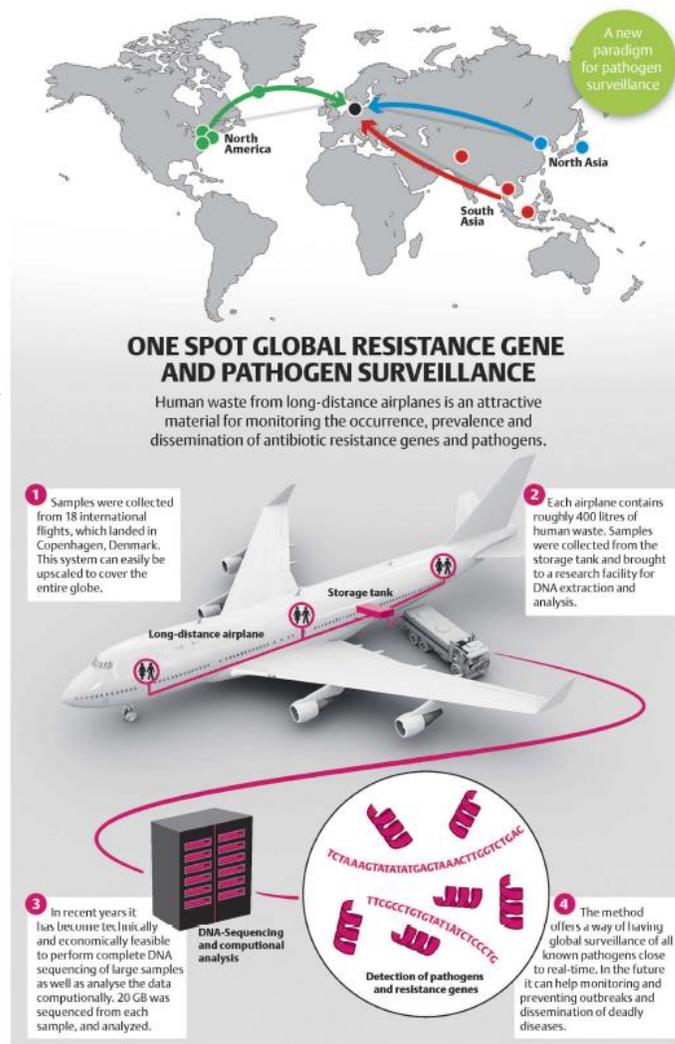


Figure 1. Origin of the 18 long-distance flights with destination being the international airport in Copenhagen, Denmark, as well as the analytic procedure applied. Figure created in Adobe Illustrator.

**OPEN** Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance

Thomas Nordahl Petersen<sup>1</sup>, Simon Rasmussen<sup>1</sup>, Henrik Hasman<sup>2</sup>, Christian Caroe<sup>3</sup>, Jacob Bælum<sup>4</sup>, Anna Charlotte Schultz<sup>5</sup>, Lasse Bergmark<sup>3</sup>, Christina A. Svendsen<sup>6</sup>, Ole Lund<sup>4</sup>, Thomas Sicheritz-Pontén<sup>4</sup> & Frank M. Aarestrup<sup>1</sup>

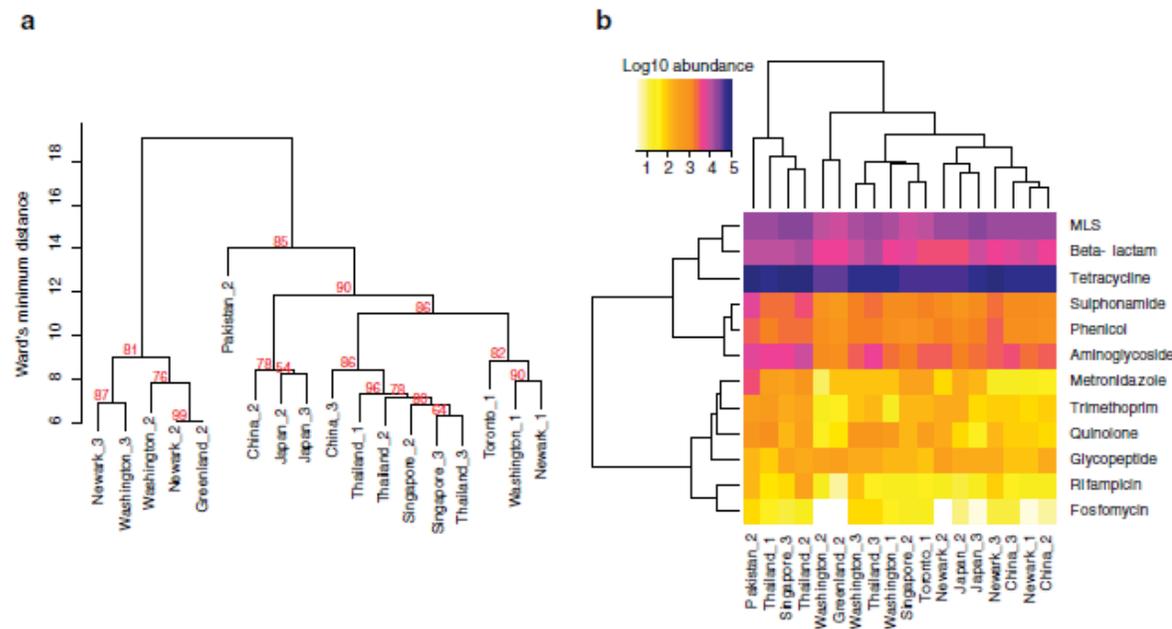


Figure 2. Geographical clustering of flight samples based on adjusted read abundance. a. Hierarchical clustering of flight samples based on normalized abundance of complete bacterial genomes and genomes from the human gut, bootstrap values are indicated in red and calculated using pvclust. Branch distance in the tree is Ward's minimum distance calculated using the Lance-Williams formula. b. Heatmap showing hierarchical clustering based on the normalized abundance of resistance gene classes. The abundance is in log10 scale from white (low), yellow, orange (intermediate), magenta, blue (high). MLS: macrolide, lincosamide, streptogramin.

# Phase pré-pandémique : Vecteurs



## RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi

James Angus Chandler <sup>†</sup>, Rachel M. Liu <sup>†</sup> and Shannon N. Bennett <sup>\*</sup>

<sup>†</sup>Department of Microbiology, California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA

« Sequences related to single stranded RNA viruses of the *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae* were uncovered, along with an unclassified genus of double-stranded RNA viruses. Phylogenetic analysis finds that in all three cases, the closest relatives of the identified viral sequences are other mosquito-associated viruses, suggesting widespread host-group specificity among disparate viral taxa. »

FIGURE 1. Collection locations and a summary of the microbial sequences identified in each sample.

# Phase pré-pandémique : Hommes



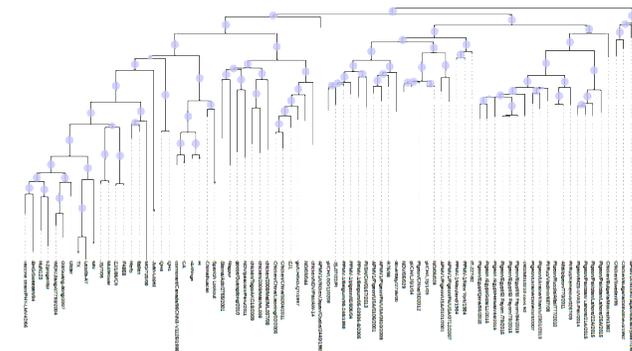
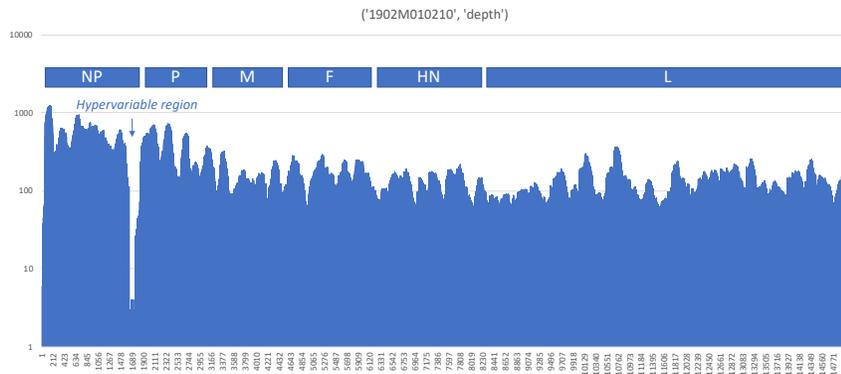
Patiente de 5 ans avec déficit immunitaire congénital, transplantée de moelle osseuse, développant une encéphalite grave puis un coma inexplicable au retour d'un voyage familial au Moyen-Orient

Diagnostic d'infection par **NDV**

- Maladie grave connue chez l'oiseau
- Aucun cas humain d'infection du SNC répertorié



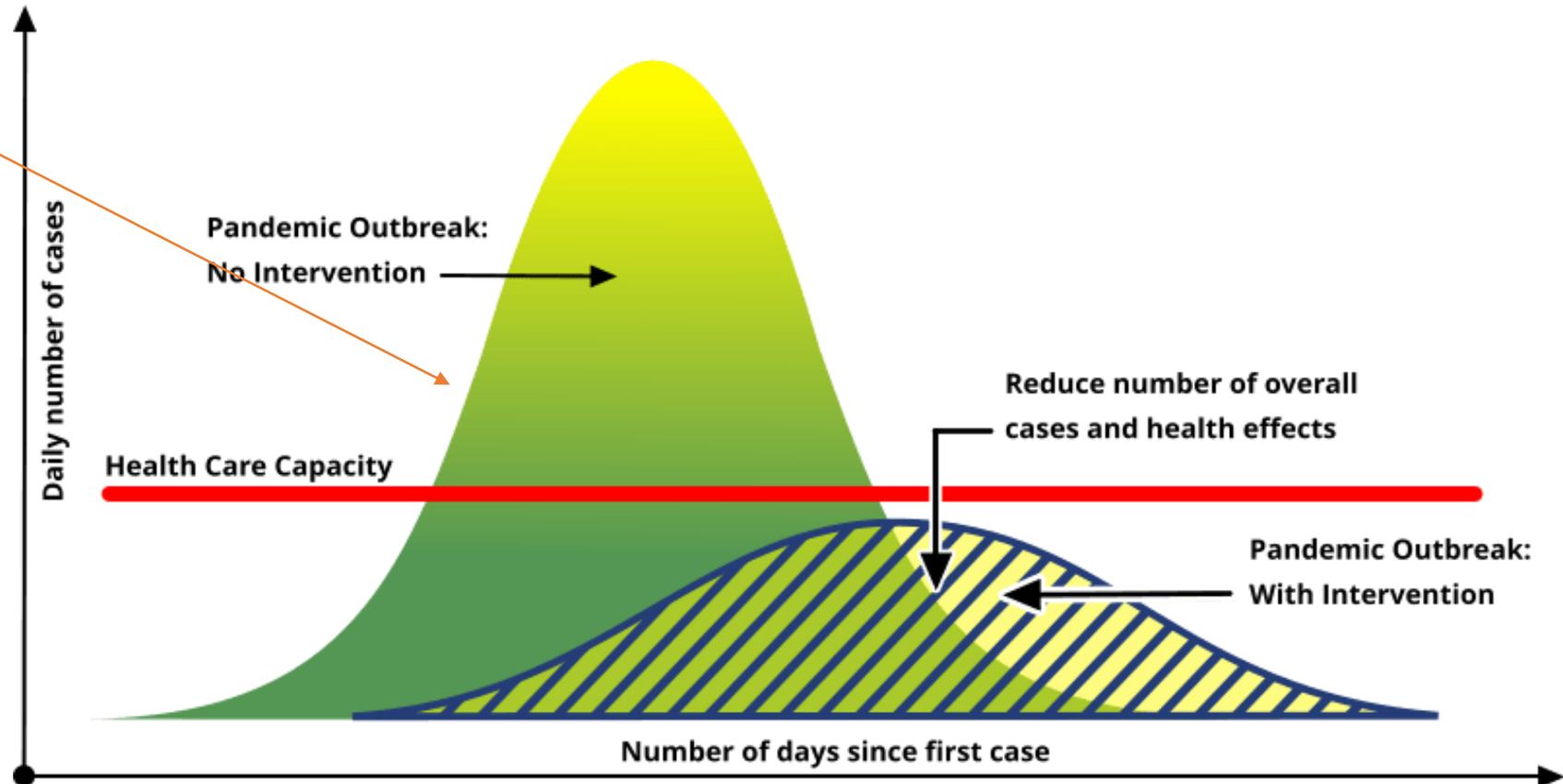
Séquence du génome complet et analyse phylogénétique ont montré que la souche virale circule au Moyen-Orient et qu'elle comporte de nombreux facteurs de virulence (P, F, HN)



# En maladies infectieuses ?

## Techniques Amplicons

Dépistage/diagnostic massif

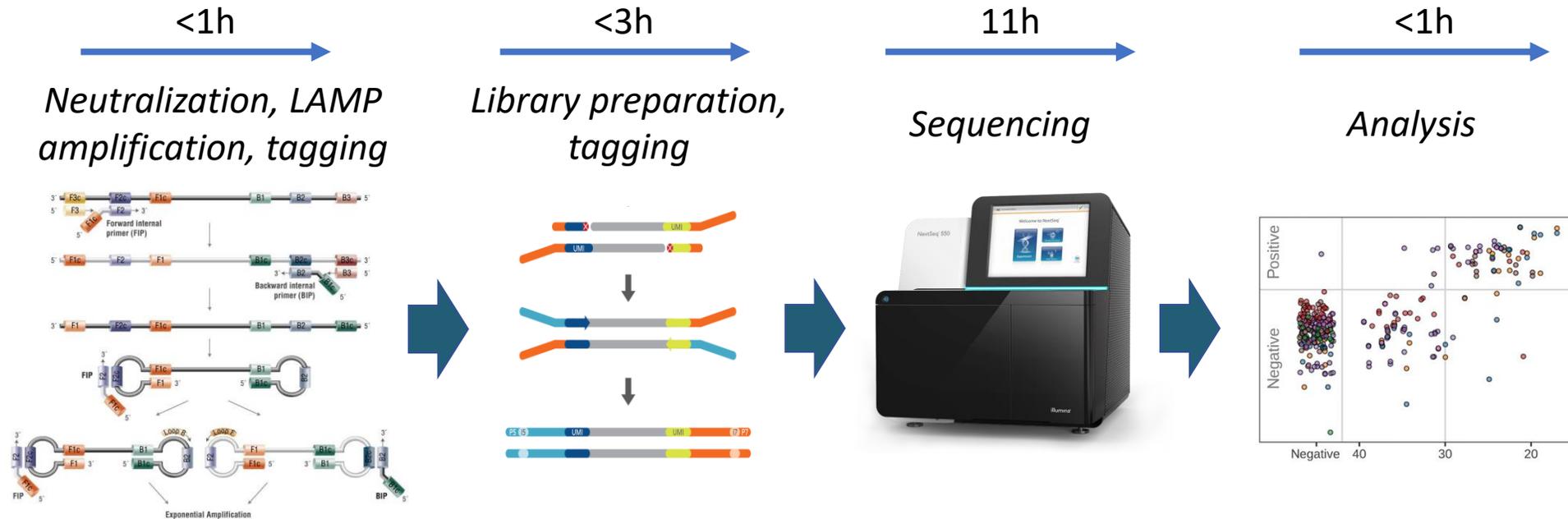
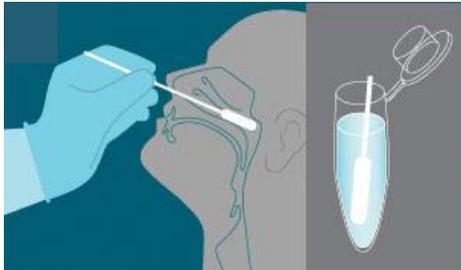


Adapted from: CDC. Interim pre-pandemic planning guidance: community strategy for pandemic influenza mitigation in the United States—early, targeted, layered use of nonpharmaceutical interventions. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2007. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11425>.

# Phase d'Expansion pandémique

- LAMP-Seq

Collection sample

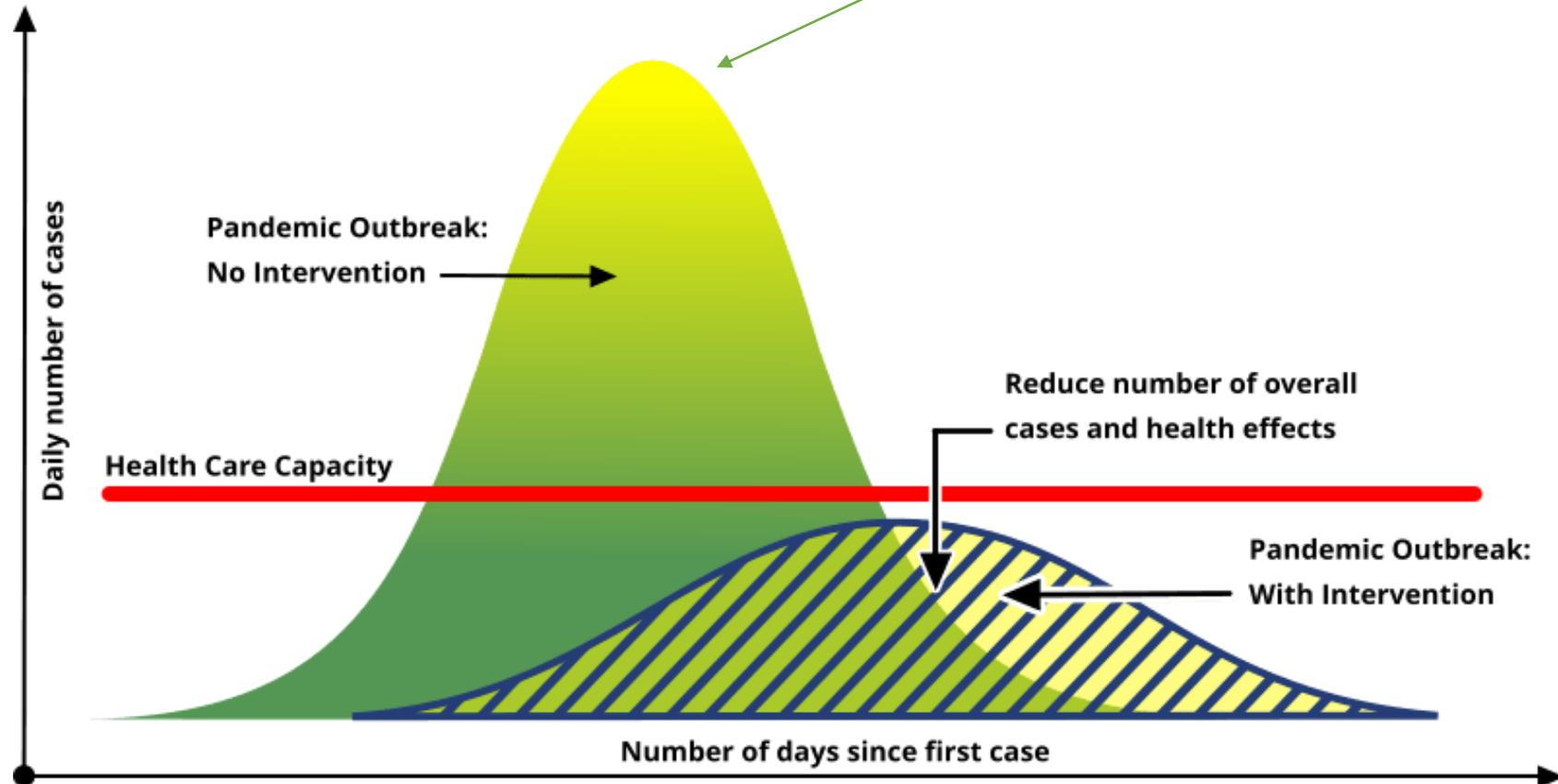


- ⇒ 40 000 samples in one run
- ⇒ <24h
- ⇒ 3€/sample
- ⇒ quickly adaptable to any pathogen

# En maladies infectieuses ?

## *Techniques Amplicons*

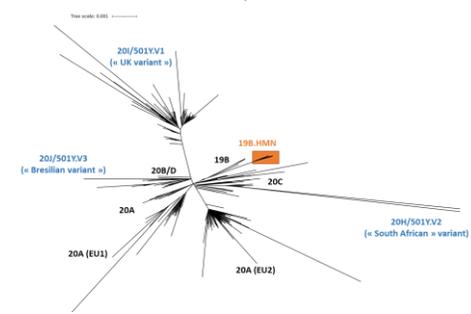
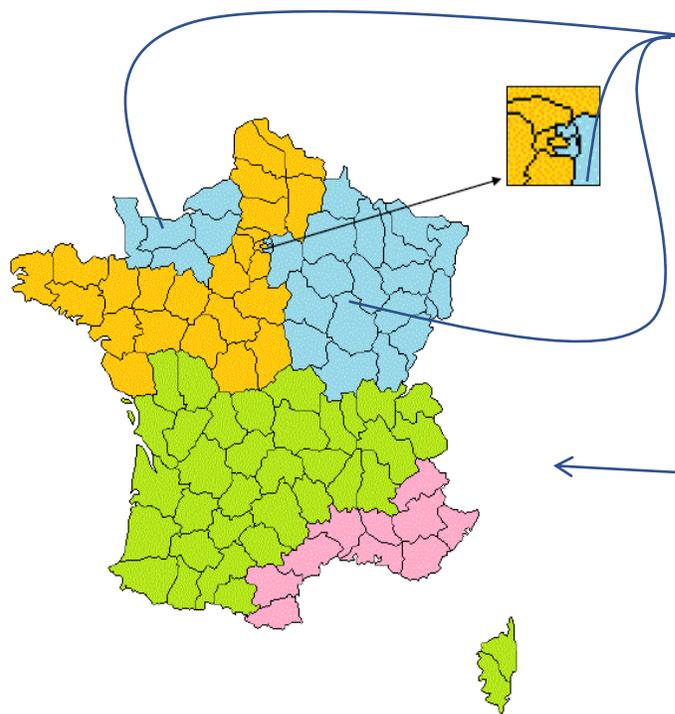
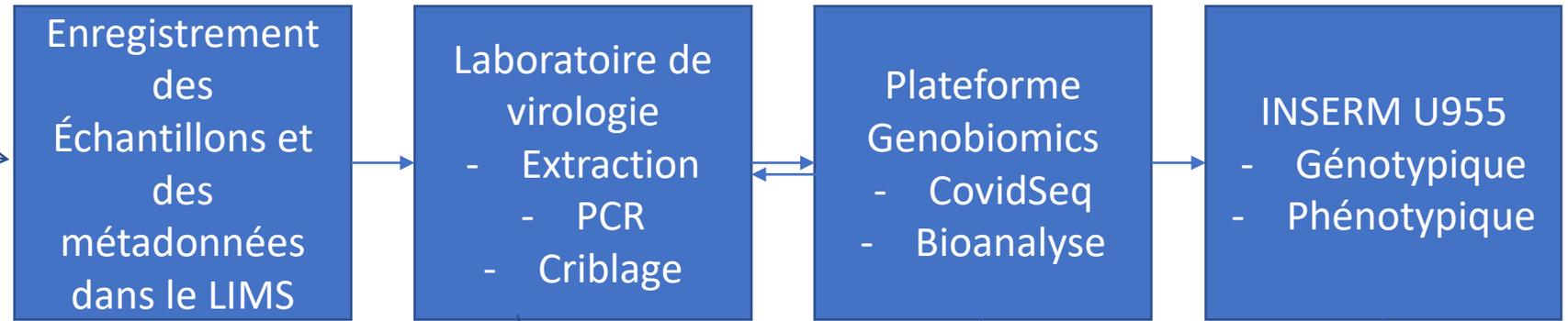
Surveillance/diagnostic  
évolution du virus



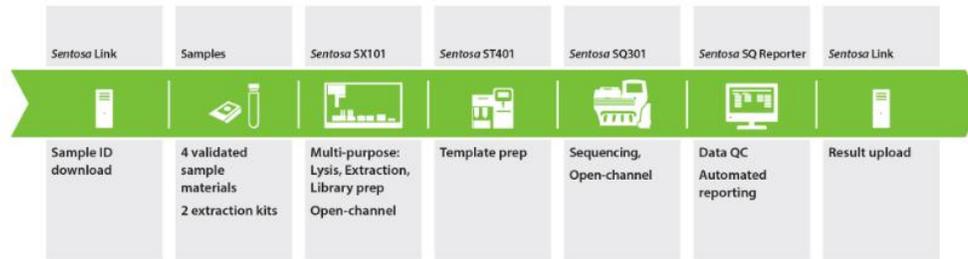
Adapted from: CDC. Interim pre-pandemic planning guidance: community strategy for pandemic influenza mitigation in the United States—early, targeted, layered use of nonpharmaceutical interventions. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2007. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11425>.

# Phase pandémique : Emergence de variants

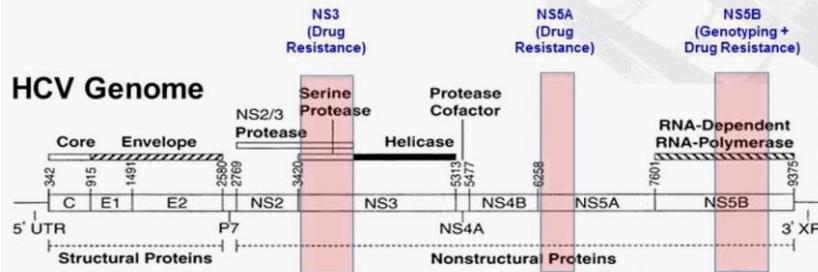
- COVID : Emergen



# Phase pandémique : recherche de résistance

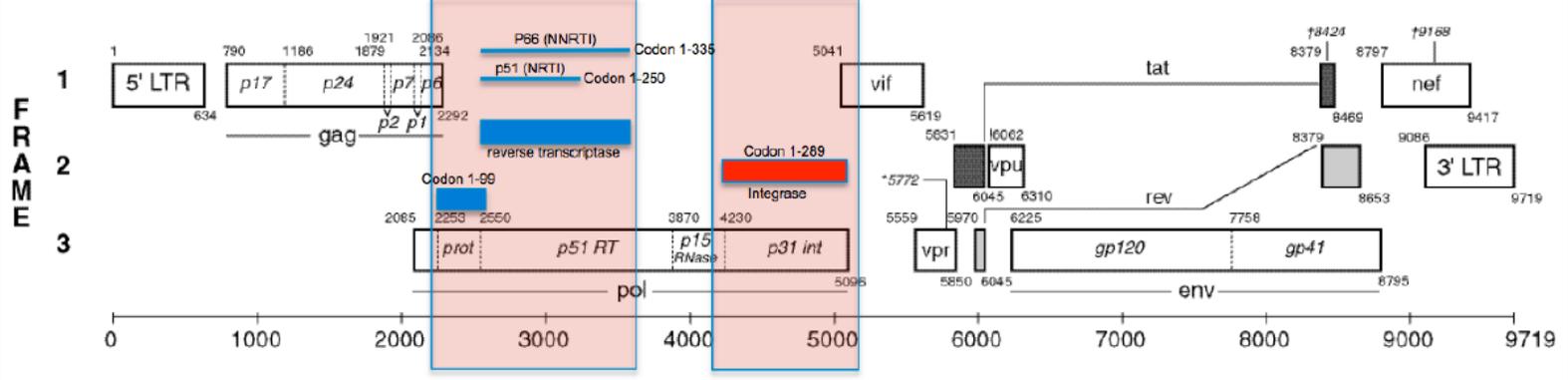


## Design concept

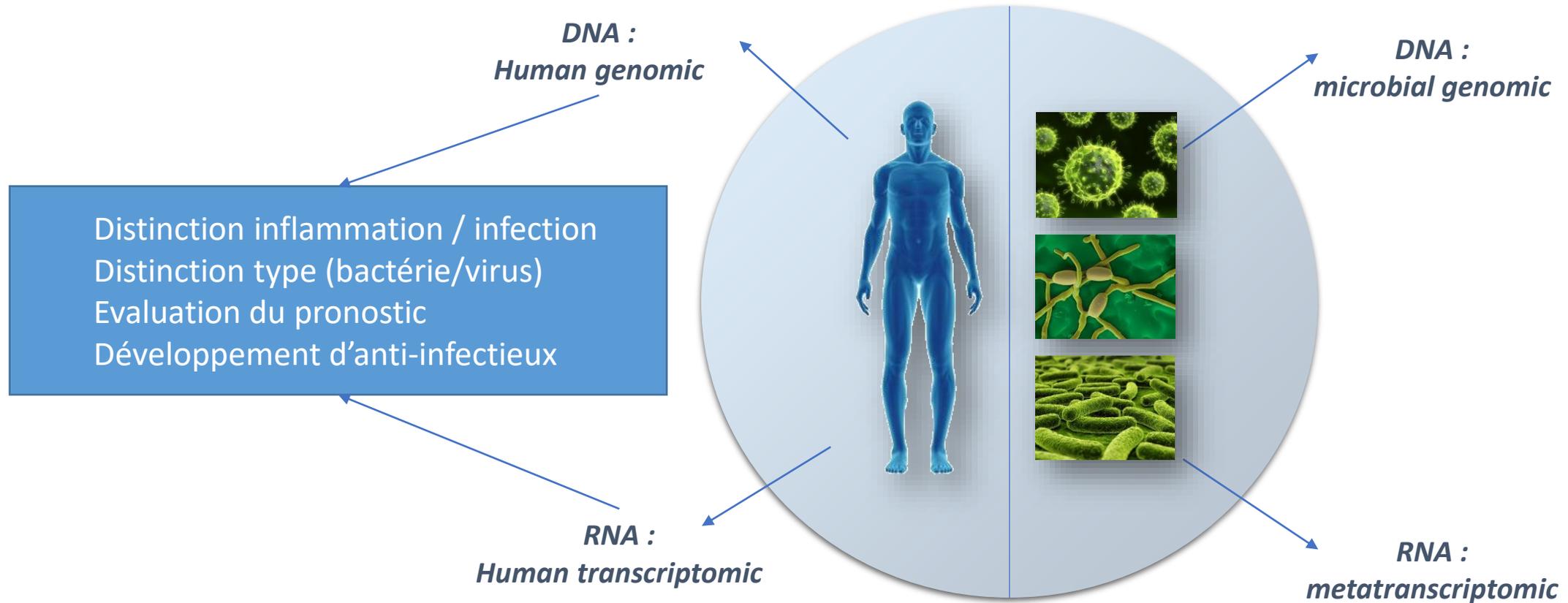


Target list includes NS3, NS5A and NS5B genes

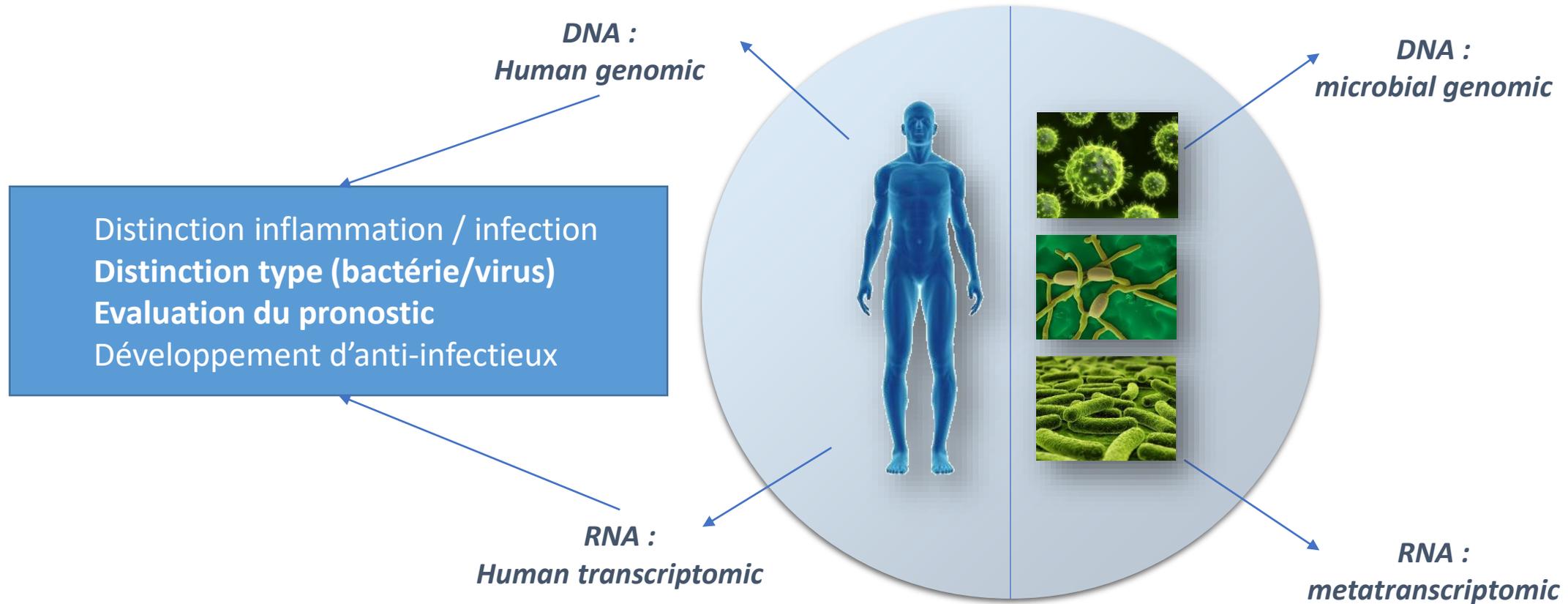
## HIV Genome



# Et demain ?

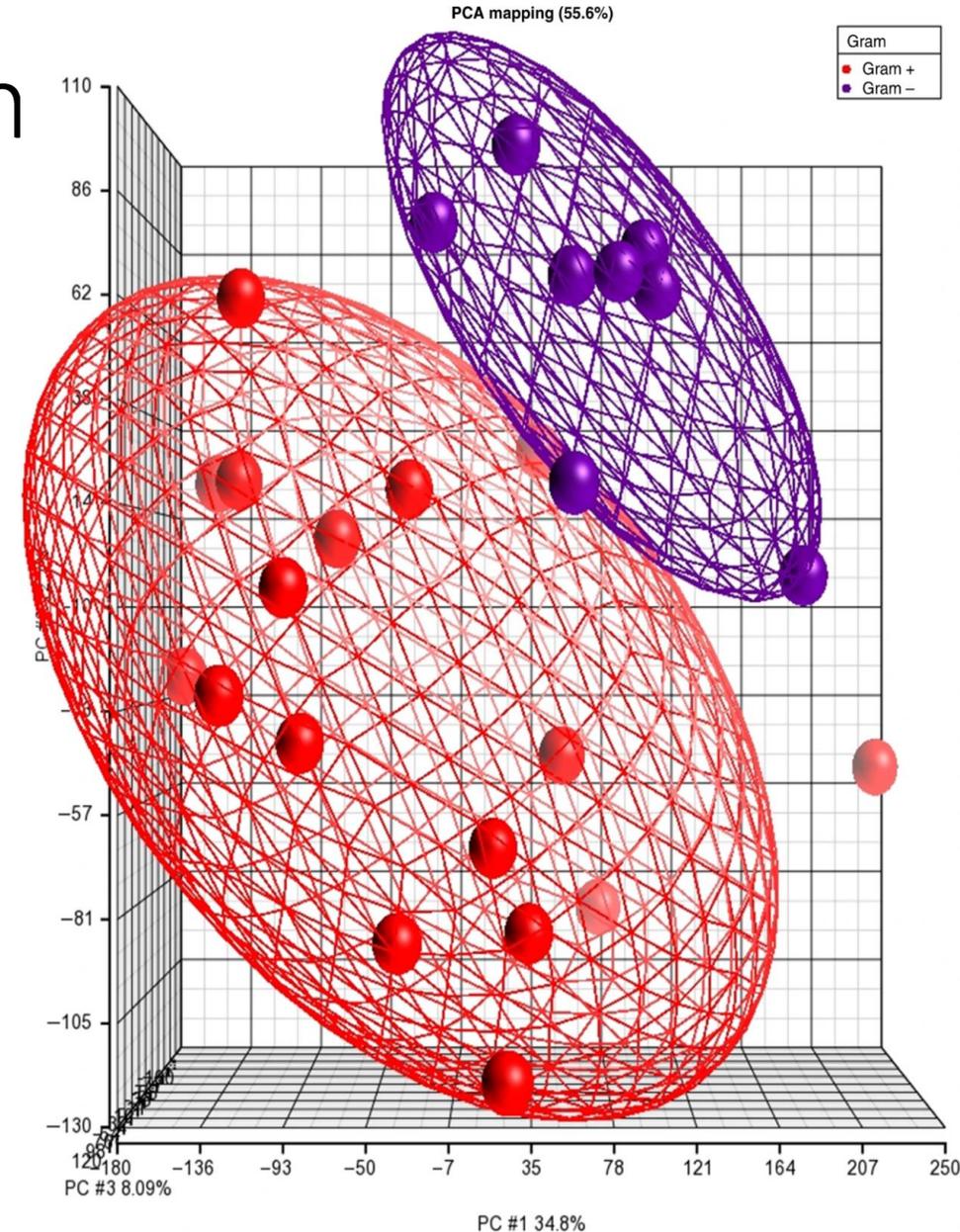


# Et demain ?



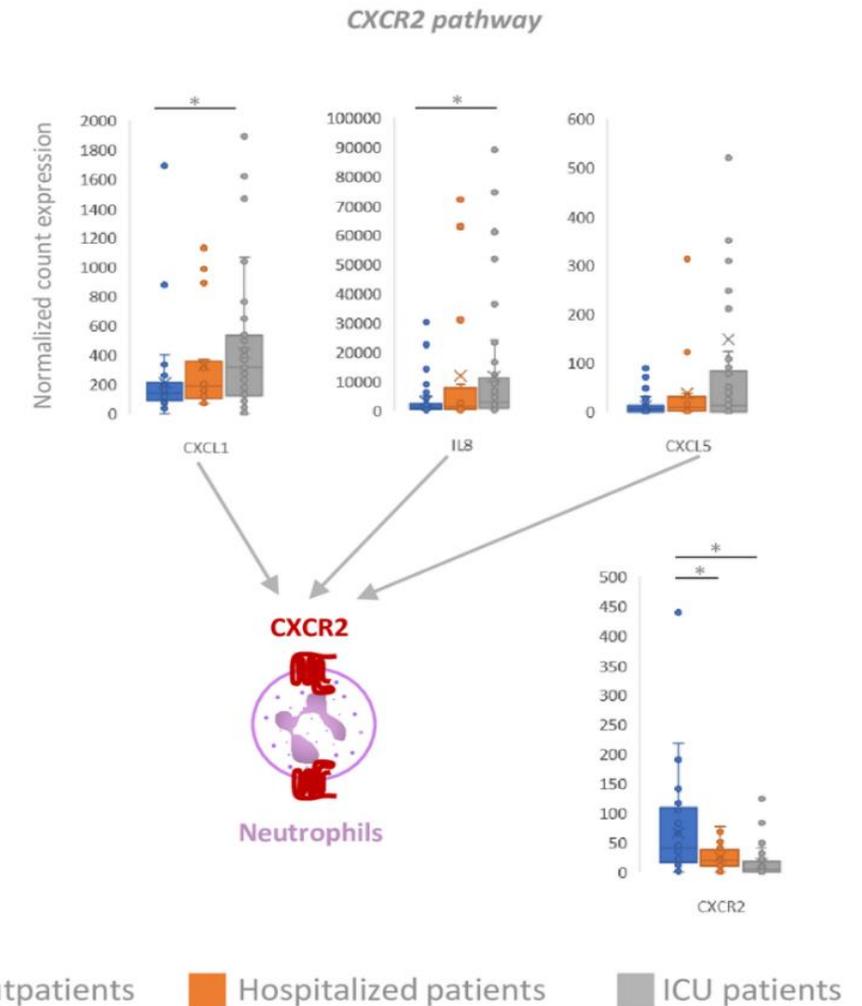
# Distinction du type d'infection

- 25 nouveaux nés prématurés et septiques
- Recherche de profil transcriptomique prédictif du type d'infection
- L'analyse en composante principale montre des signatures moléculaires distinctes entre infection Gram+ et Gram-



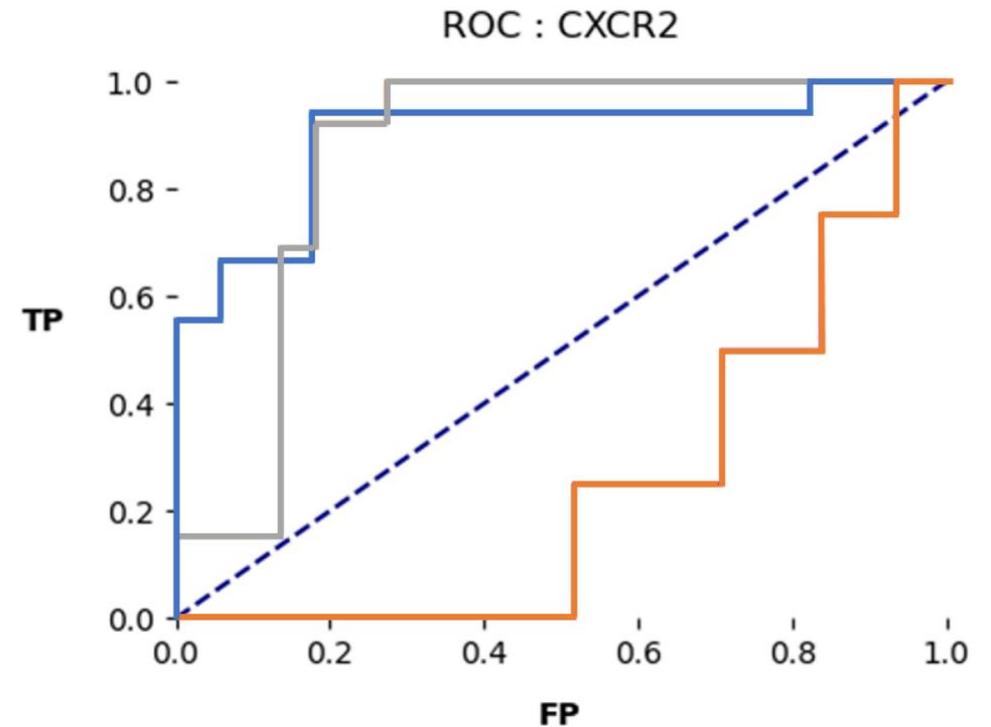
# Evaluation du pronostic

- 113 patients positifs au SARS-CoV-2, 3 groupes (ambu, mal inf, réa)
- Caractériser la génomique, métagénomique et transcriptomique de l'hôte
- Plus forte expression de cytokines pro-inflammatoires chez les patients en réanimation
- Aucun marqueur viral associé à la gravité

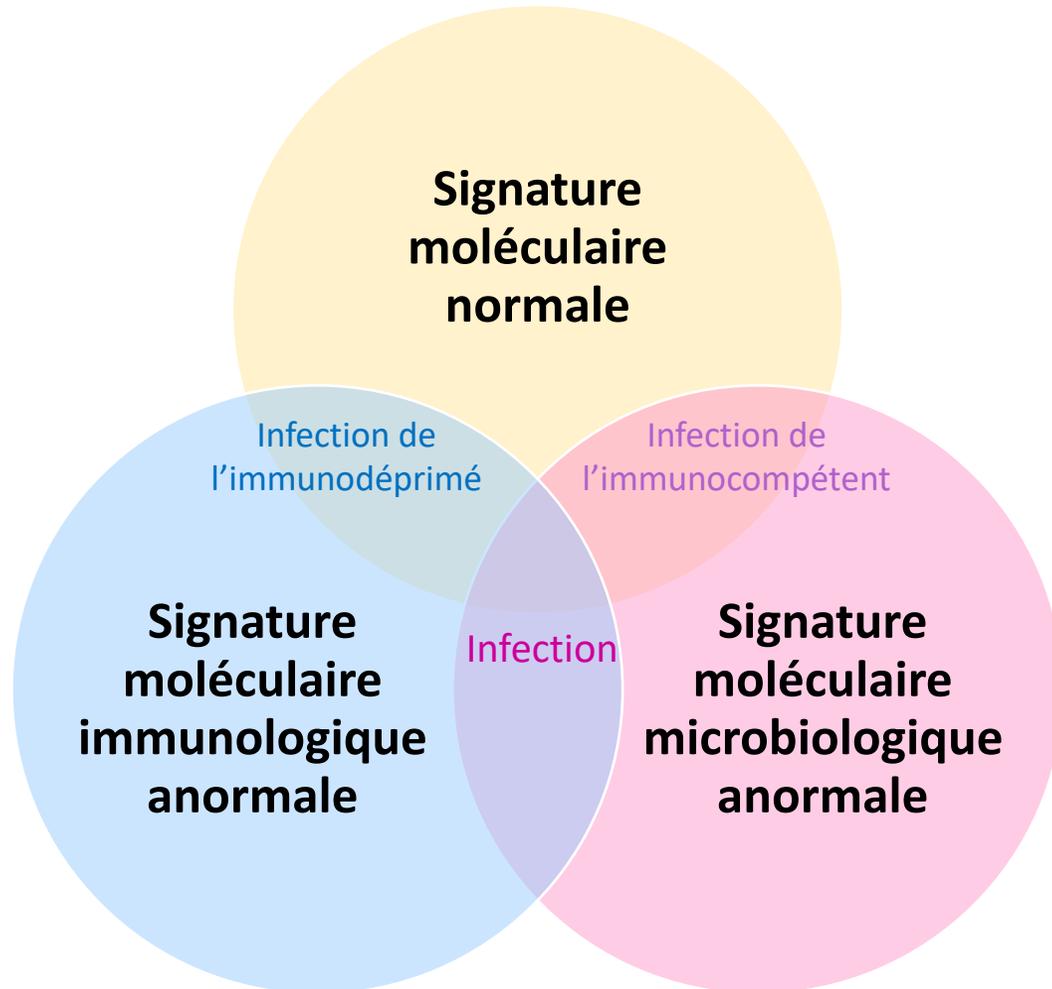


# Evaluation du pronostic

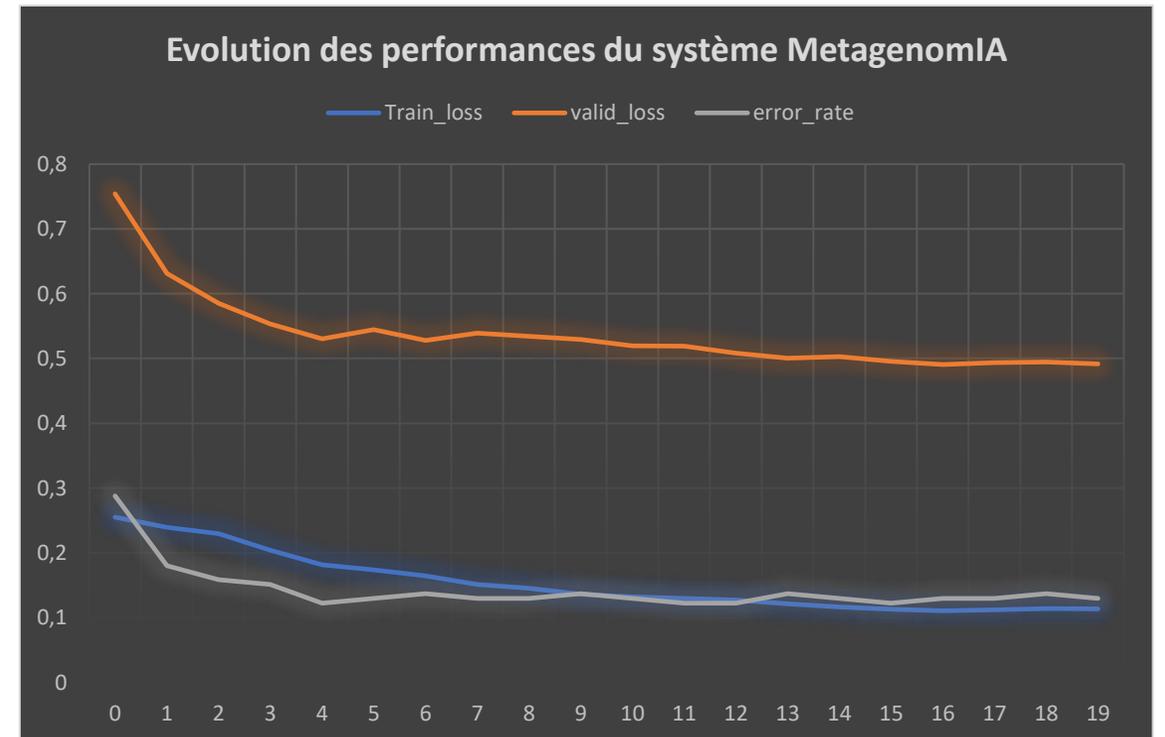
- Panel de transcrits prédictifs basé sur les données de transcriptomique
- AUC des ICU patients : 0,86
- AUC des Outpatients : 0,90



# Le NGS demain ?



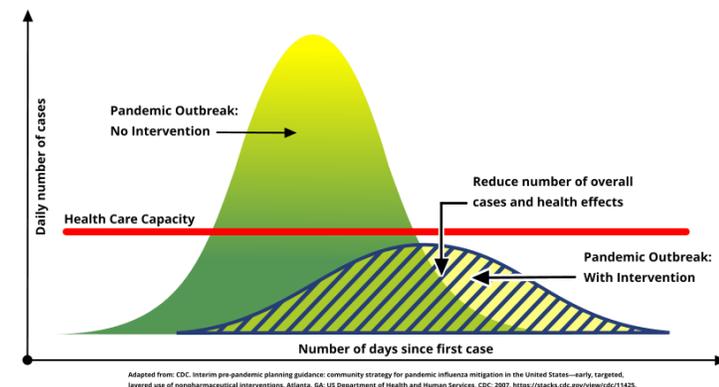
Thèse d'exercice Dr Amandine Caillault



Mémoire de DES Dr Pierre-Edouard Saint Antonin

# Conclusion (I)

- Le NGS apporte des solutions à chaque étape des épidémies pour :
  - Détecter précocement des émergences (pathogène, virulence, résistance...)
    - Réservoirs humains
    - Réservoirs animaux
    - Réservoirs environnementaux
  - Réaliser du diagnostic massif en attendant la disponibilité des tests
  - Surveiller l'évolution des microorganismes (nouveaux variants, résistance, mutation d'échappement immunitaire...) à l'échelon global et individuel



# Conclusion (II)

- L'intégration de l'ensemble des données en un seul diagnostic est un pas important vers une médecine simplifiée, personnalisée aux spécificités de l'hôte vis-à-vis de son infection
- Dans le futur, les signatures moléculaires globales analysées par IA permettront d'aller plus loin sur le diagnostic (maladies auto-immunes, cancers, inflammatoires, infectieuses...), la surveillance (émergences et réémergences), sur la prévision d'efficacité des traitements antiinfectieux, sur la prise en charge des patients (prévision de sévérité...)



# Remerciements

## MetaMIC Project

### Technique

Vanessa Demontant,  
Anais Nguyen

### Bioinformatique

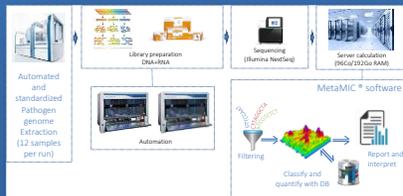
Guillaume Gricourt,  
Melissa Ndebi

### Experts microbio

Emilie Sitterle, Cécile Angebault,  
Françoise Botterel,  
Paul-Louis Woerther

### Responsables projets

Christophe Rodriguez,  
Jean-Michel Pawlotsky



## Contributors

Inserm U955 Team 18

French National Reference Center for  
hepatitis

Microbiology Dpt of Henri Mondor  
Hospital, Créteil, France

U2TI (infectious diseases unit), Henri  
Mondor, Créteil, France

All Clinicians and their patients



## Sponsors

