

XXVII<sup>èmes</sup> Actualités du Pharo  
06 Octobre 2022



# Place des OMICS dans l'alerte et la surveillance

Pierre-Edouard Fournier  
UMR VITROME, IRD, Aix-Marseille Univ, SSA  
IHU Méditerranée-Infection  
Marseille, France



XXVII<sup>èmes</sup> Actualités du Pharo  
06 Octobre 2022



## Place des OMICS dans l'alerte et la surveillance

La pandémie de Covid-19 a souligné les risques liés aux réservoirs zoonotiques d'agents pathogènes pour l'homme ainsi que la facilité de propagation des maladies infectieuses liée à la mondialisation croissante des échanges de population. Dans ce contexte, les outils d'analyse biologique à haut débit (« OMICS ») ont démontré tout leur potentiel pour permettre de comprendre l'épidémie. La génomique, par le séquençage massif des génomes des souches de SARS-Cov2 a permis de comprendre les mécanismes de diffusion du virus et d'appréhender son évolution. A ce jour, plus de 11 millions de séquences virales ont été produites dans le monde. En parallèle, les outils de séquençage à haut débit ont été adaptés à la caractérisation des flores microbiennes complexes par l'identification de tout acide nucléique dans un échantillon donné (métagénomique). Initialement réservée à l'étude du microbiote, la métagénomique a été rapidement adaptée au diagnostic rapide, permettant sans à priori de détecter dans un échantillon clinique tout type de microorganisme. Enfin, la métatranscriptomique, dont l'objet est d'identifier les gènes transcrits par un organisme donné, permet à présent de détecter des profils spécifiques d'infection bactérienne, virale ou parasitaire, allant jusqu'à caractériser le type d'agent en cause. Outre leur performance technologique et la quantité de séquences produites les techniques de séquençage à haut débit peuvent être mises en œuvre très rapidement, une réaction de séquence pouvant être produite à partir de tout type d'échantillon, dans tout type d'environnement, et en moins de 10 heures. Ces caractéristiques font des « OMICS » des outils particulièrement adaptés à la surveillance et à l'alerte des risques infectieux.

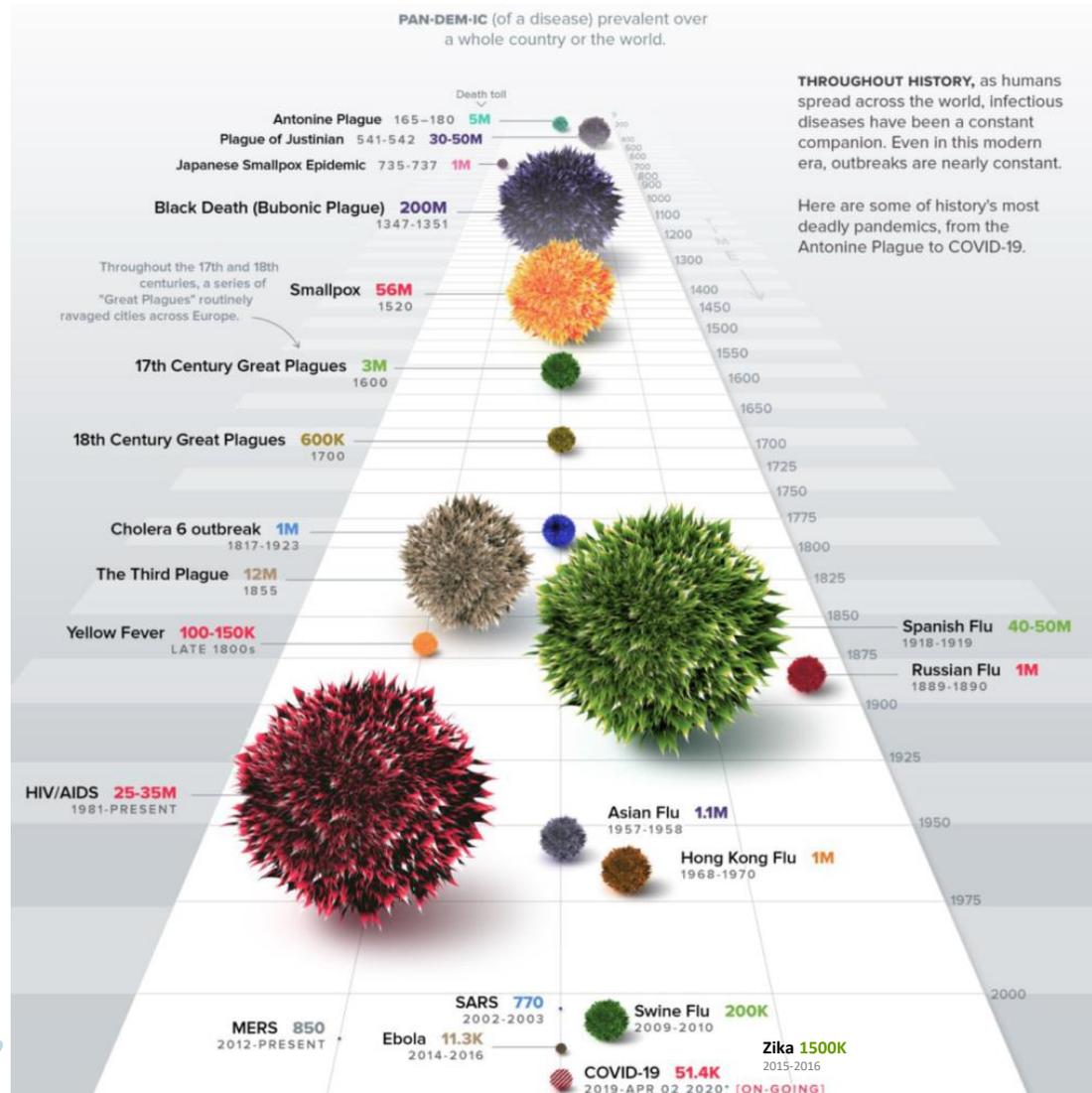
# Conflits d'intérêt

- Co-fondateur de la start-up Technojouvence

# Imprévisibles pandémies

• 'Pestes'

• 'Grippes'

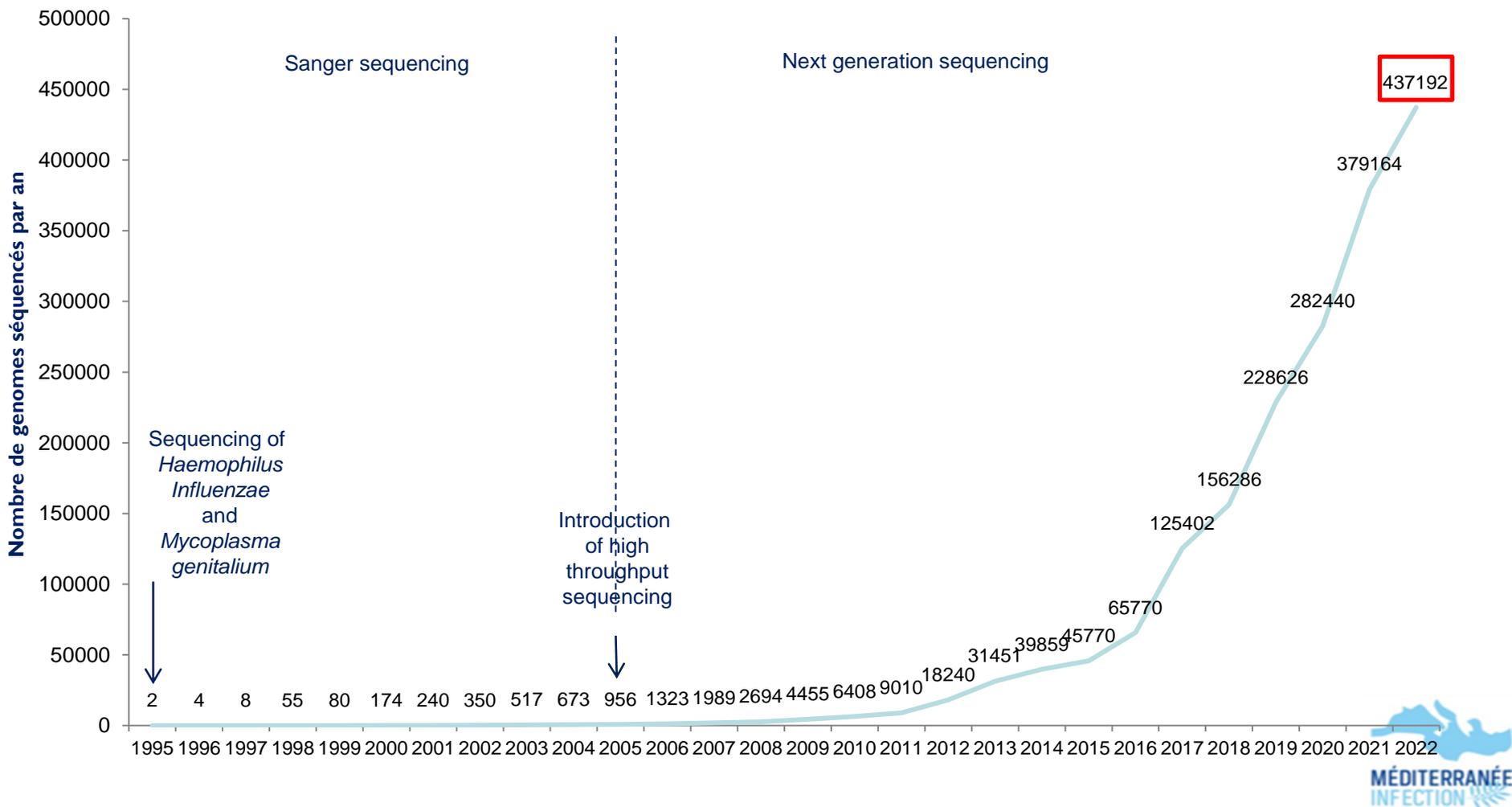


# Epidémies successives

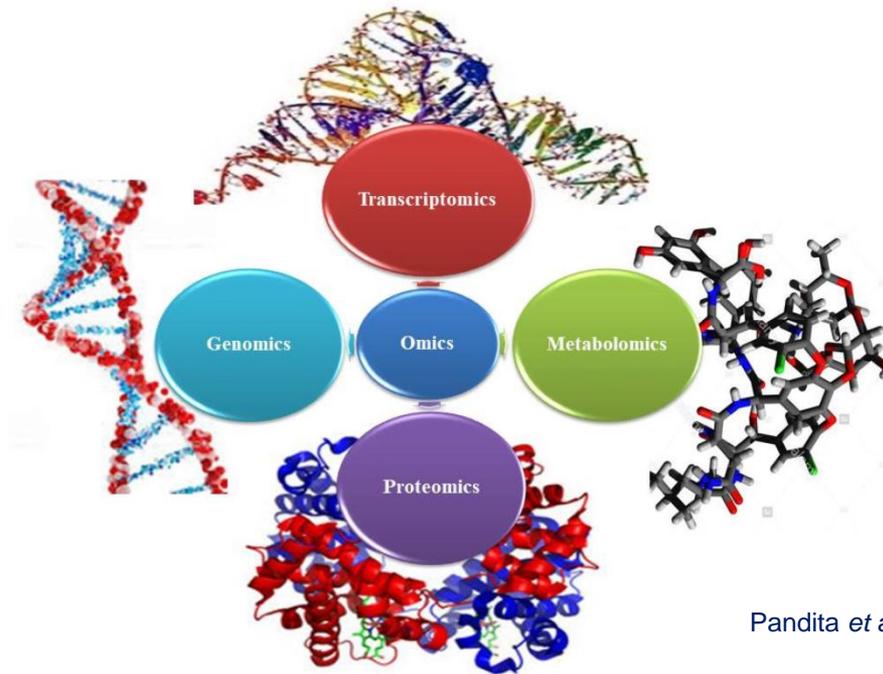
- Importantes conséquences sociales et économiques
- Dans de nombreuses épidémies, l'agent étiologique est inconnu au début
- Nécessité d'outils diagnostiques rapides et discriminants

# Génomique

## 1995 – 2022, 28 ans de séquençage génomique des bactéries



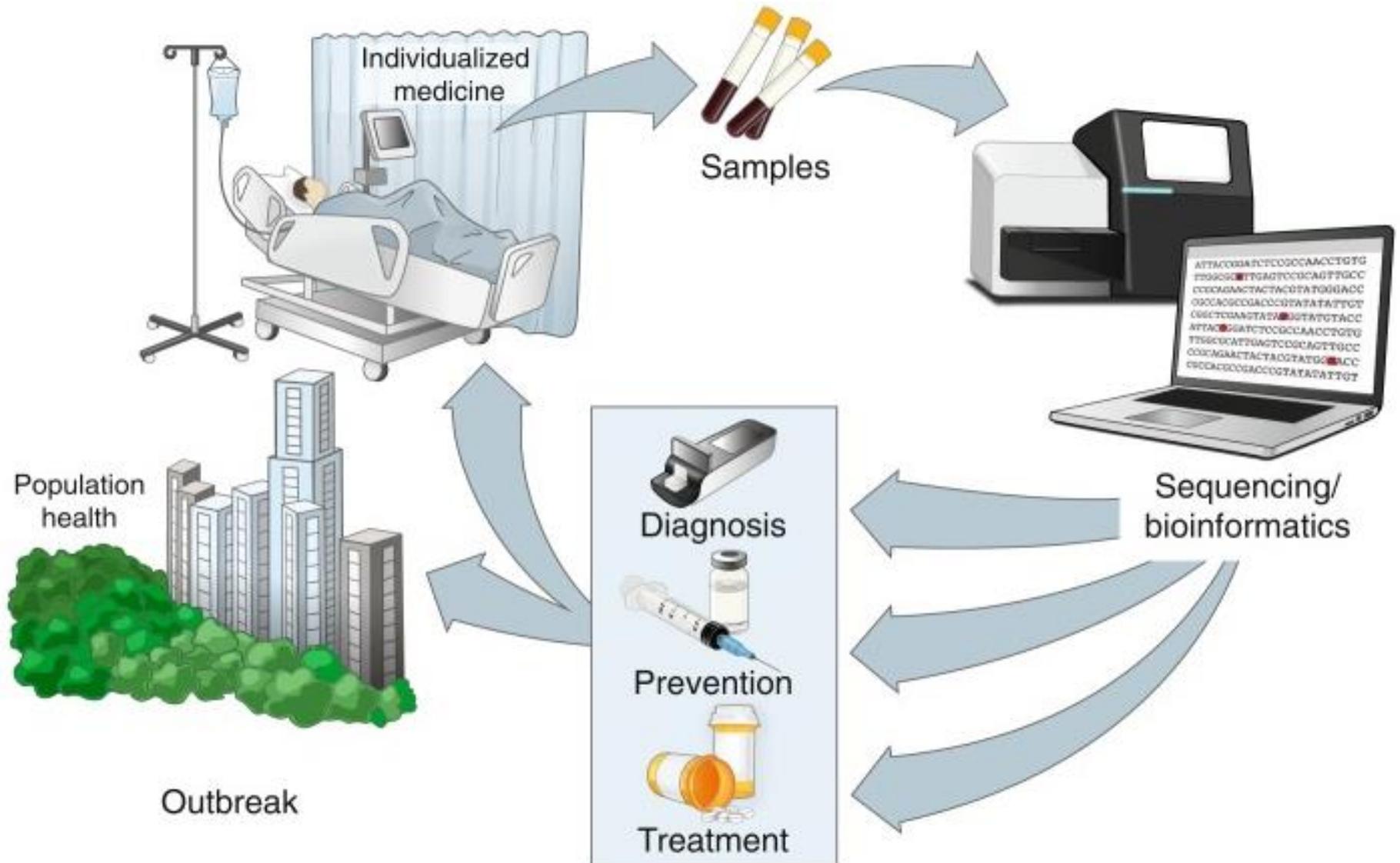
# OMICS



Pandita *et al.* *Cells* 2021;10:1296

➤ Epigenomics, metagenomics, microbiomics, lipidomics, glycomics

# Utilisation du séquençage pour le diagnostic des maladies infectieuses



# Utiliser la génomique pour la surveillance et le diagnostic?

- Génome = information génétique complète d'une souche
- Outil de génotypage ultime
- Données fiables et reproductibles
- Bases de données publiques en ligne
- Mais le diagnostic requiert de la rapidité pour impacter la prise en charge du patient

**Quelle méthode?**

# Evolution des méthodes de séquençage

## 1<sup>ère</sup> génération 1977

méthode de Sanger  
- Électrophorèse en gel



## 2<sup>nde</sup> génération (NGS) 2005

- 454 / Roche
- SOLiD systems
- Illumina (Solexa)
- Ion Torrent
- BGI



**Séquençage  
à haut débit**

## 3<sup>ème</sup> génération 2013

- *Séquençage mono-moléculaire*
- PacBio RS II (Pacific Biosciences)
- MinION (Oxford Nanopore)



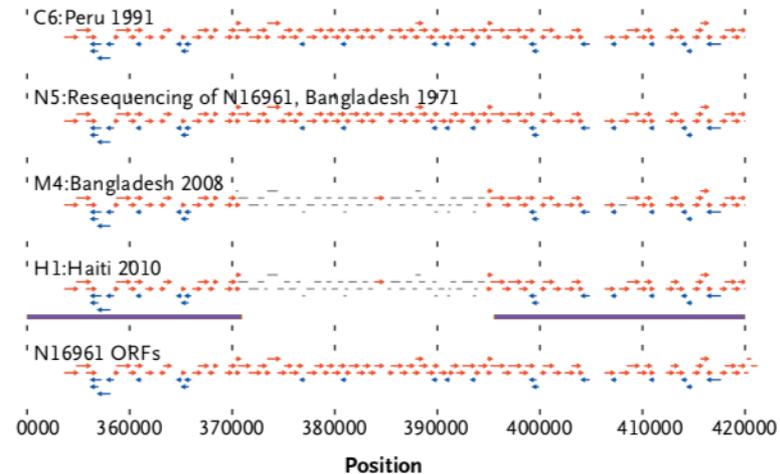
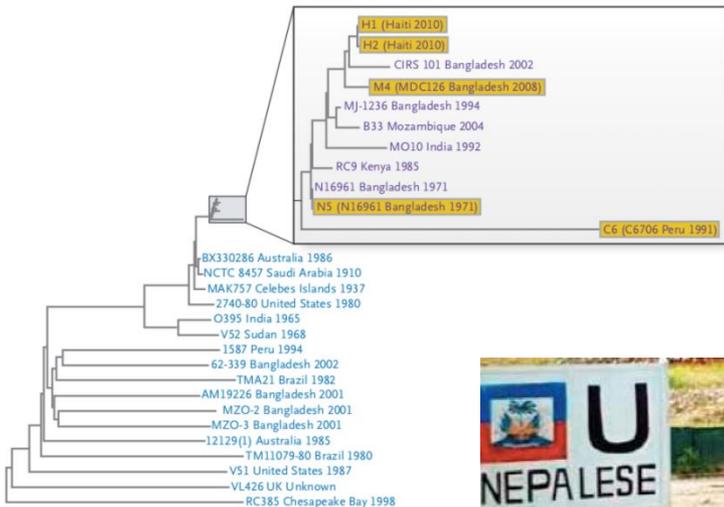
- Haut rendement mais
- Besoins accrus en bioinformatique

# Séquençage rapide pour l'investigation des épidémies

# Séquençage à partir d'isolats

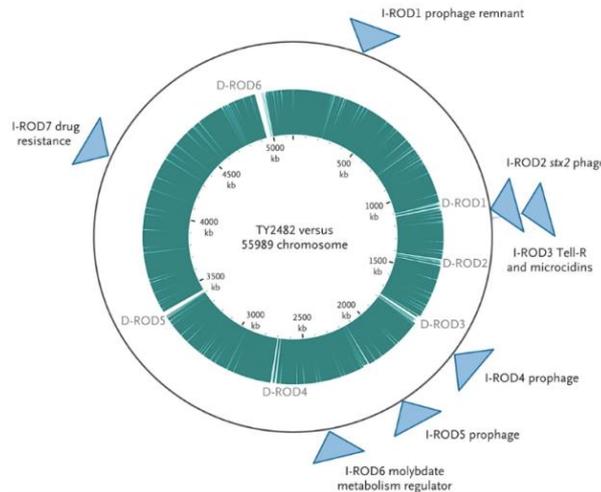
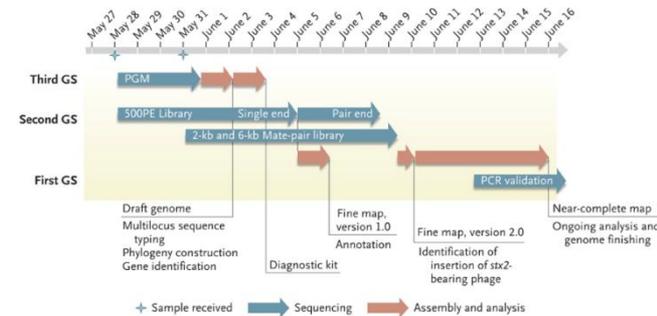
# Epidémie de cholera d'Haiti, 2010

- > 800,000 cas, > 10,000 morts
- Isolats H1 and H2 séquencés en PacBio
- L'origine asiatique des souches est prouvée par phylogénie et analyse du superintegron
- Rôle du bataillon népalais des casques bleus



# Epidémie d'*E. coli* O104:H4 en Allemagne

- Mai-Juin 2011, Allemagne du nord: épidémie de colites hémorragiques => 3,950 cas, 800 SHU, 53 morts
- Ion Torrent PGM
- *E. coli* entéroaggrégatif portant un prophage codant une shigatoxine



=> Identification de la source = graines germées de fenugrec importées d'Egypte

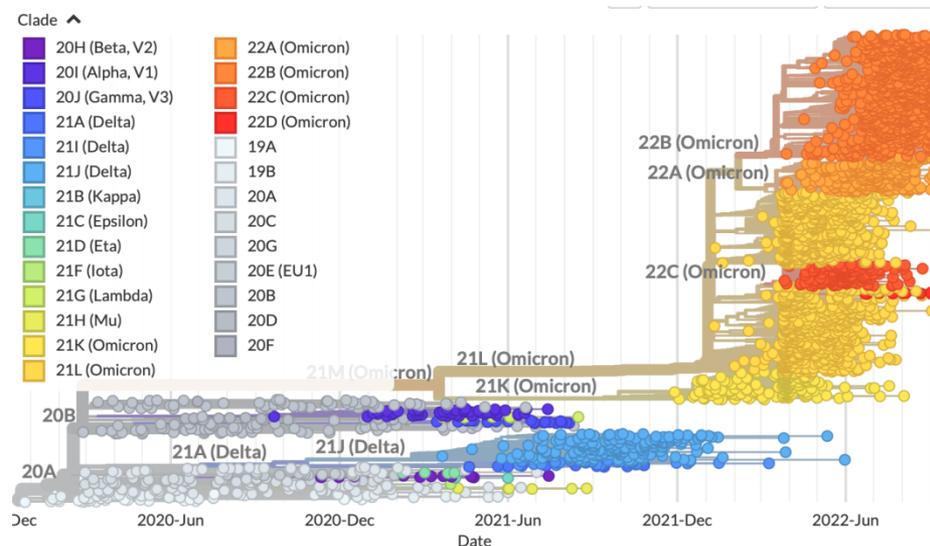
# Séquençage à partir d'échantillons cliniques

# COVID-19



Johns Hopkins coronavirus ressource center

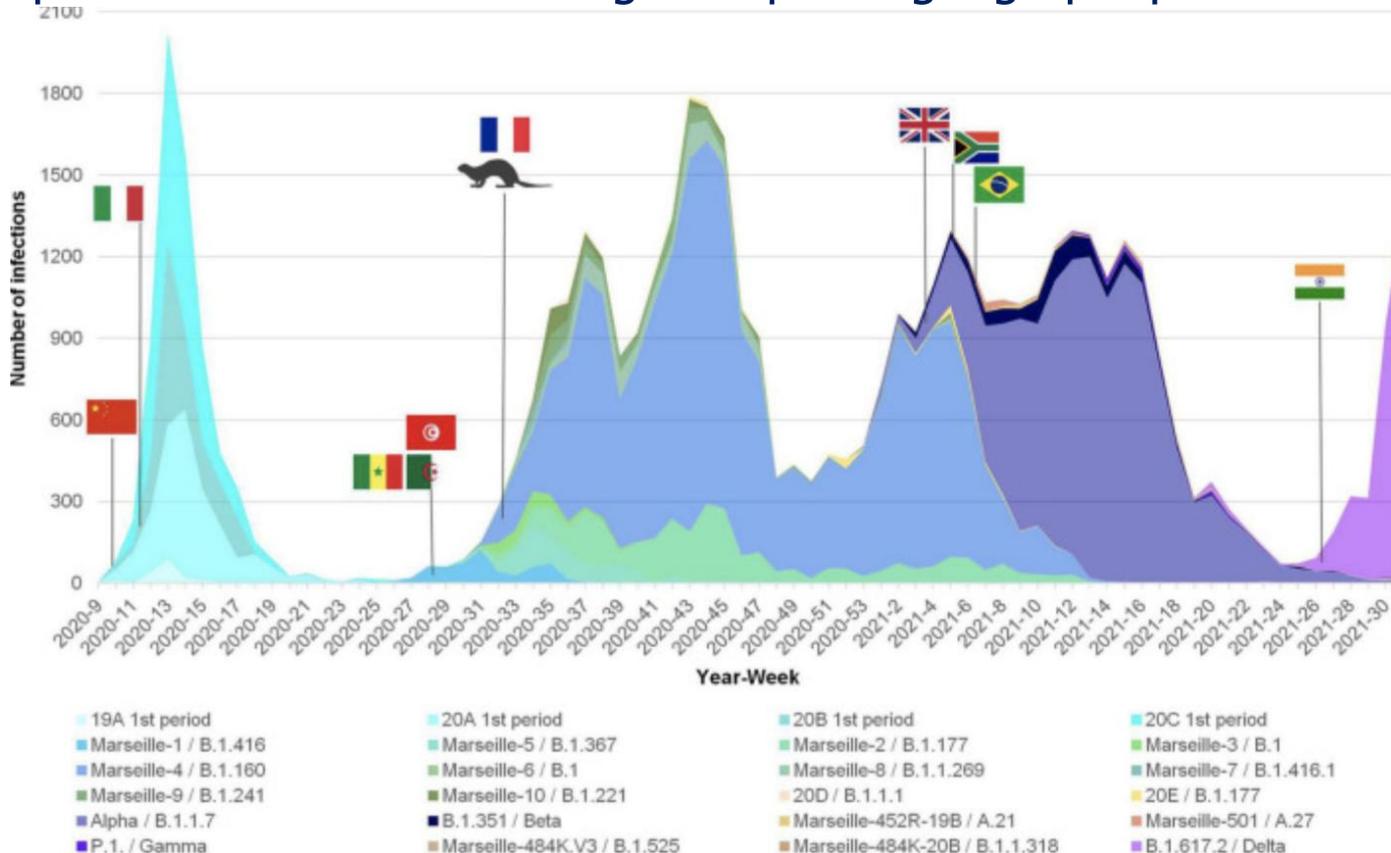
- 2019-2022: 614.9 millions de cas, > 6.5 millions de morts
- Séquençage génomique à partir des prélèvements naso-pharyngés
- 13.2 millions de séquences dans GISAID



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

# COVID-19

- Consortium EMERGEN => 660 000 séquences
- Identification et suivi des variants en métropole et dans les DOM-TOM
- Compréhension de l'évolution génétique et géographique du virus

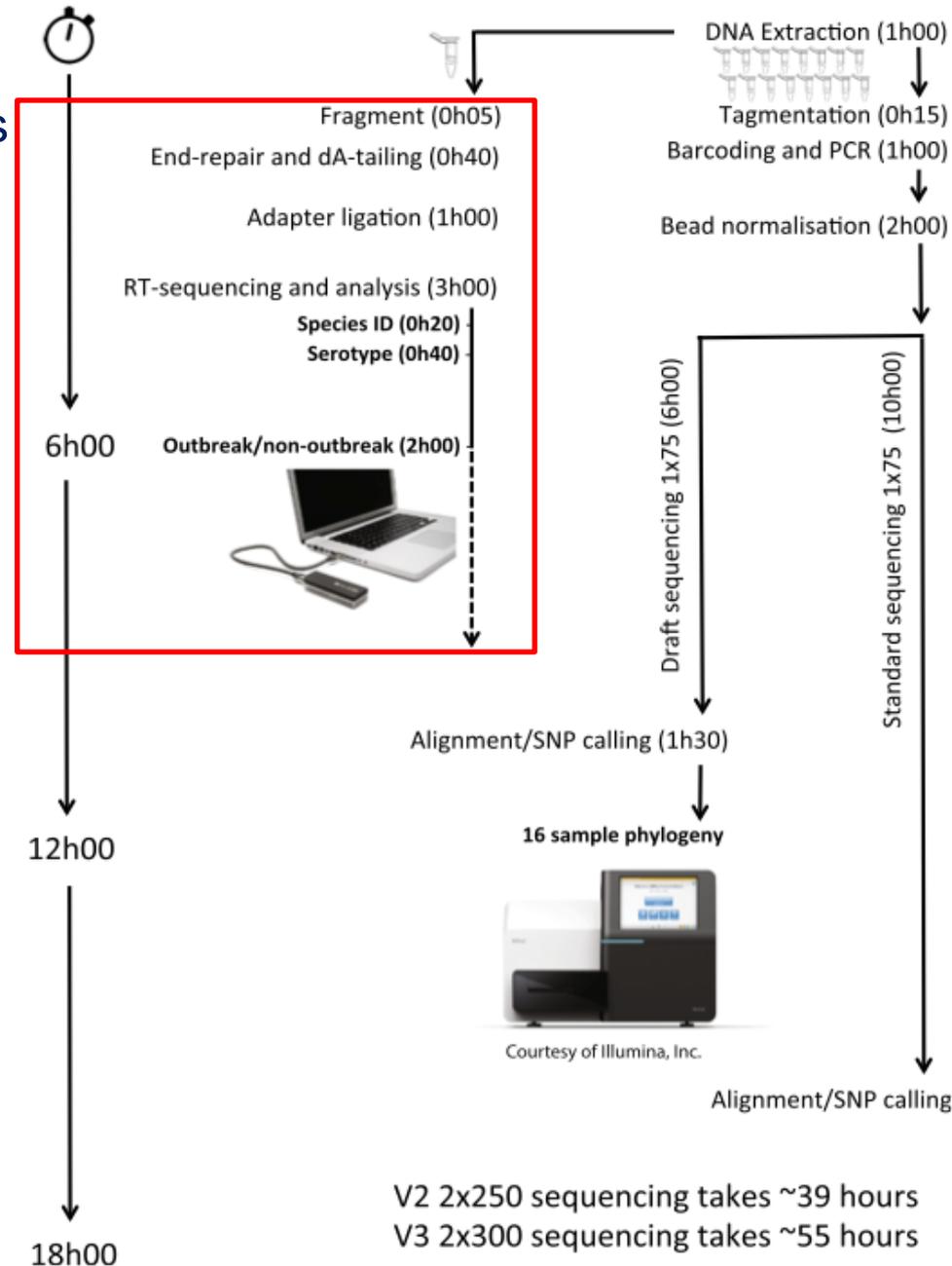
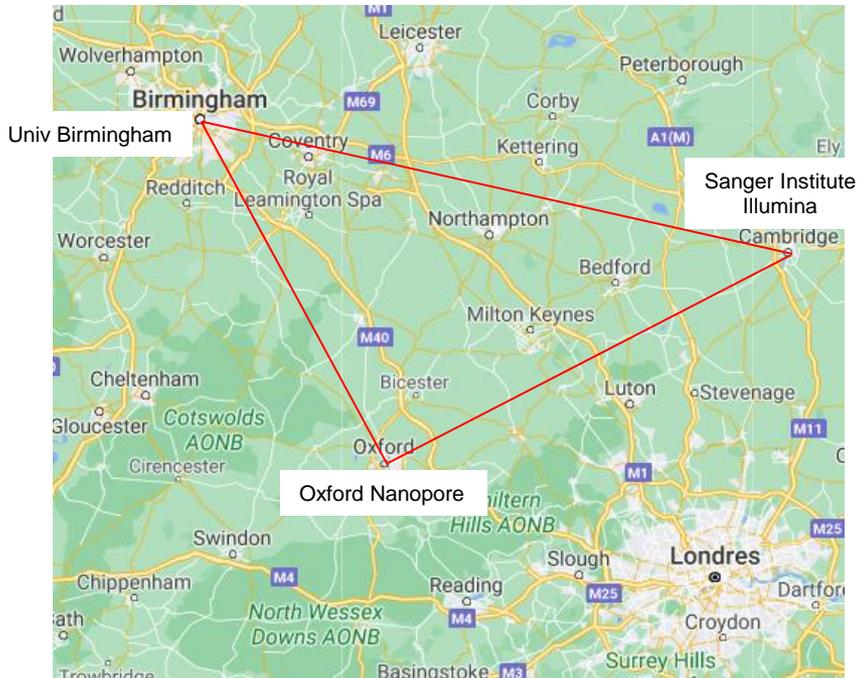


# Séquençage génomique en temps réel

# Séquençage génomique en temps réel

- 2015, Birmingham
- Epidémie de *S. enterica* Enteritidis
- 37 cas
- Séquençage dans la nuit de 16 souches
- Consommation d'oeufs allemands

(Quick J *et al.* Genome Biol 2015;16:114)



# Séquençage génomique en temps réel

## Genome analysis of *Listeria ivanovii* strain G770 that caused a deadly aortic prosthesis infection

M. Beye<sup>1</sup>, F. Gouriet<sup>1</sup>, C. Michelle<sup>1</sup>, J.-P. Casalta<sup>1</sup>, G. Habib<sup>1</sup>, D. Raoult<sup>1,2</sup> and P.-E. Fournier<sup>1</sup>

## Genomic analysis of a *Streptococcus pyogenes* strain causing endocarditis in a child

M. Beye<sup>1</sup>, K. El Karkouri<sup>1</sup>, N. Labas<sup>1</sup>, D. Raoult<sup>1,2</sup> and P.-E. Fournier<sup>1</sup> *New Microbe and New Infect* 2016; **10**: 87–92

[Infection](#)

April 2018, Volume 46, [Issue 2](#), pp 259–262 | [Cite as](#)

## *Kocuria massiliensis* sp. nov, a new bacterial species isolated from a patient with foot osteomyelitis

Authors

[Authors and affiliations](#)

Sophie Edouard, Pierre-Edouard Fournier, Mamadou Beye, Frédérique Gouriet, Gregory Dubourg, Jeremy Delerce,

Laure Swiader, Didier Raoult 

## Genomic analysis of a *Raoultella ornithinolytica* strain causing prosthetic joint infection in an immunocompetent patient

Mamadou Beye<sup>1</sup>, Issam Hasni<sup>1</sup>, Piseth Seng<sup>1,2</sup>, Caroline Michelle<sup>1</sup>, Bernard La Scola<sup>1</sup>, Didier Raoult<sup>1</sup> & Pierre-Edouard Fournier<sup>1,2</sup>

# Métagénomique clinique

# Métagénomique ciblée

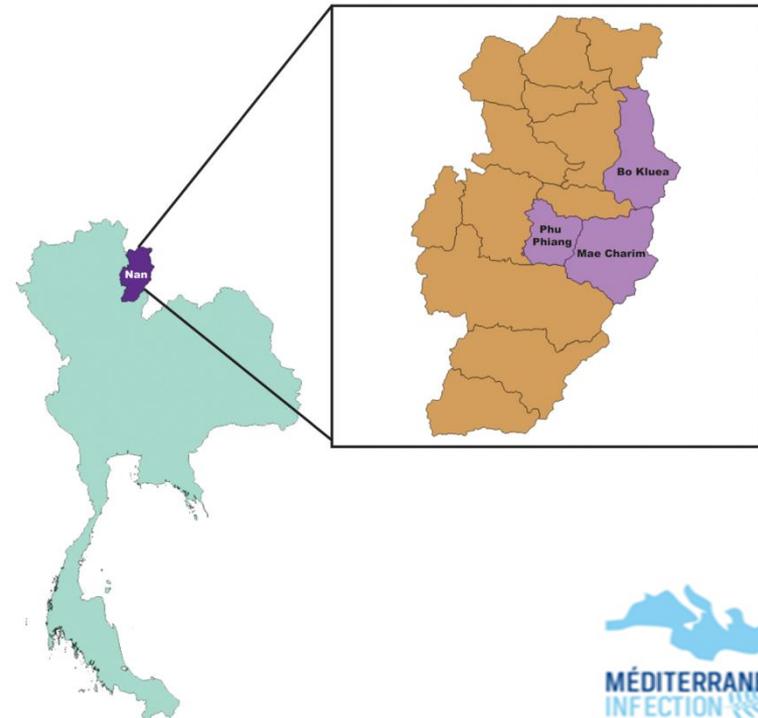
Turnbaugh PJ *et al. Nature.* 2009;457:480-4

- Remplace la culture et la PCR standard
- Essentiellement un fragment de l'ARNr 16S
- Permet virtuellement de détecter toute bactérie
- Mais pouvoir discriminatoire limité au rang de l'espèce
- Sous-estime les populations minoritaires

# Fièvres inexpliquées en Thaïlande

(Takhampunya R, et al. *Front Microbiol.* 2019;10:319)

- Screening du sang de 209 patients avec fièvre inexpliquée dans la province de Nan province, Thaïlande du nord
- 309 rongeurs et 420 pools d'ectoparasites de rongeurs et animaux de ferme
- Séquençage Illumina MiSeq
- *O. tsutsugamushi*, *Anaplasma* sp., *Bartonella* sp., *Leptospira* sp.
- Tous détectés chez homme et rongeurs



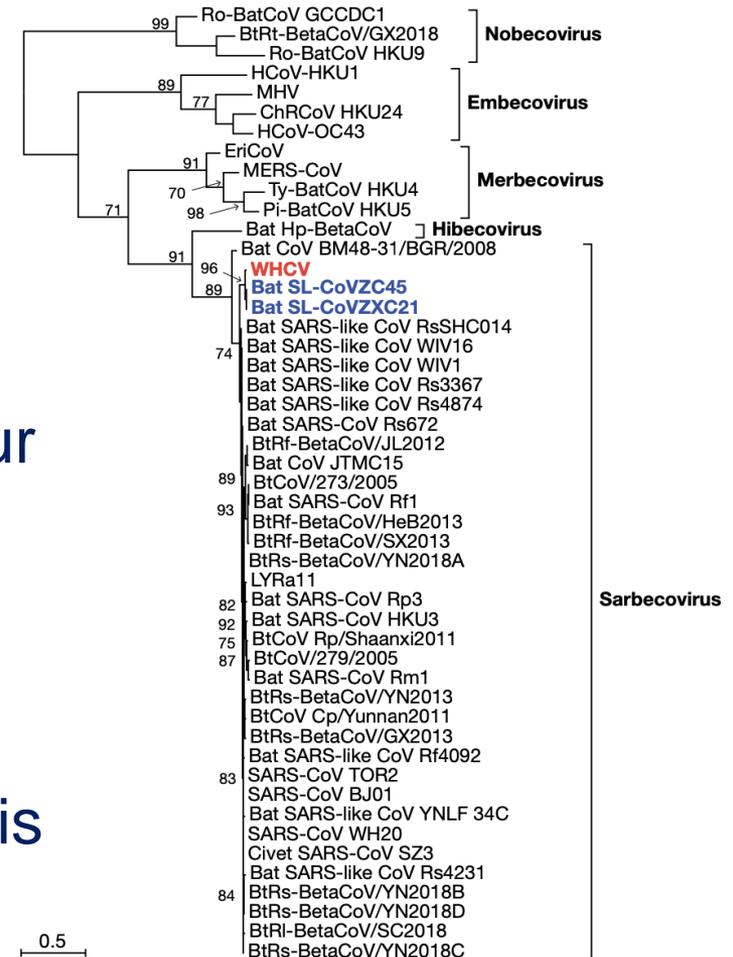
# Métagénomique non ciblée

(Chen H *et al. Clin Infect Dis.* 2020;71:S416-S426)

- Approche agnostique, «universelle»
- Séquençage de tout acide nucléique présent dans un échantillon donné
- Peut identifier virus, bactéries, champignons, parasites
  
- Mais sensibilité plus faible que les PCR spécifiques
- Pas de méthodes de séquençage ou d'analyse standardisées

# Découverte du SARS-CoV-2

Wu F, et al. *Nature*. 2020;579:265-9

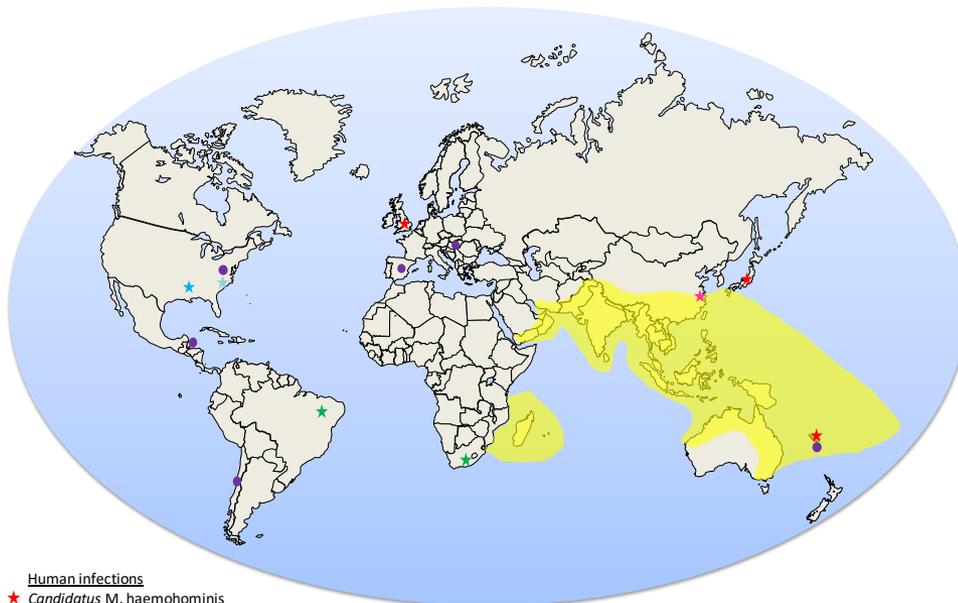
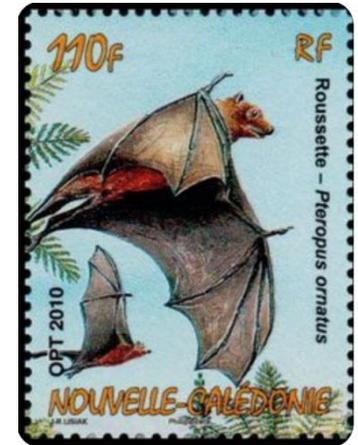


- Sang d'un employé d'un marché aux poissons de Wuhan
- Hospitalisé le 12 décembre 2019 pour Syndrome respiratoire sévère
- Séquençage Illumina Miseq sur LBA
- 56,565,928 reads
- Génome viral complet de 29,903 bp
- Très proche de virus de chauve-souris

# Candidatus Mycoplasma haemohominis

Descloux E et al. *Clin Infect Dis.* 2020; ciaaa1648

- 2011-2019: 15 patients atteints d'anémies hémolytiques autoimmunes potentiellement létales après contact avec des roussettes
- Séquençage génomique Illumina MiSeq à partir du sang
- 1,019,318 bp, proche d'autres hémomycoplasmes de chiroptères



#### Human infections

- ★ *Candidatus M. haemohominis*
  - ★ *M. ovis*
  - ★ *M. haemofelis*
  - ★ *M. haemosuis*
  - ★ *Candidatus M. haematoparvum* and *M. ovis*
  - *Candidatus M. haemohominis* in bats
- Yellow shaded area: Distribution of *Pteropus* sp. bats



# Métagénomique clinique en temps réel

# Diagnostic rapide des pneumonies

Charalampous T, et al. *Nature biotechnol.* 2019;37:783-792

- 41 patients, expectorations
- Séquençage shotgun ONT MinION vs culture
- Préparation + séquençage en 6 heures
- 96.6% sensibilité, 41.7% spécificité
- Identification des gènes de résistance
- Mais assemblage des génomes après 48h de séquençage

# Expérience à l'IHU Méditerranée Infection

## Abcès cérébraux



- 42 échantillons
- Séquençage ONT GridION  $\leq$  6 heures
- Vs culture
- Vs PCR (ARNr 16S; *Mycoplasma* sp.; *M. faucium*; *M. hominis*; *Streptococcus intermedius*; Archaea; *Aspergillus*; *Candida*; *Cysticercus*; *Cryptococcus*; *Histoplasma*)

# Culture vs PCR vs séquençage GridION

## Résultats concordants

Méthode Echantillon	Culture	PCR	Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, technique GridION)		
			Germes identifiés	Durée de run	% Non ident
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 0,03 % ( 60 )	00h23	0,8
2	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,4 % ( 515 )	1h00	1,06
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 14,34 % ( 16 518 )	00h36	0,32
4	<i>Nocardia</i> sp	<i>Nocardia pneumoniae</i>	<i>Nocardia</i> sp. 0,02 % ( 24 )	00h25	0,86
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0,67 % ( 670 )	00h18	0,51
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 0,05 % ( 155 )	1h15	1,26
7	négatif	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 0,05 % ( 103 )	00h27	1,32
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 0,01 % ( 20 )	00h25	0,44
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> 0,01 ( 15 )	2h50	0,13
10	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,42 ( 809 )	1h00	0,7
11	négatif	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i> 0,01 ( 20 )	00h40	1,24
12	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i> 0,37 % ( 1150 )	0h50	0,97
13	négatif	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i> 0,01 % ( 18 )	0h50	0,92
14	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermidius</i> 0,02 % ( 38 )	00h47	0,64

- 14 diagnostics monomicrobiens (33.3%)(7 – 18672 reads)
- 7 échantillons négatifs (16.7%)

# Culture vs PCR vs séquençage GridION

## Résultats concordants

15	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i>	Polymicrobien	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,7 % ( 1960 ) <i>Prevotella melaninogenica</i> 0,04 % ( 119 ) <i>Campylobacter gracilis</i> 0,02 % ( 57 ) <b>Citrobacter sp.</b> 0,01 % ( 18 ) <i>Eikenella corrodens</i> 3e-3% ( 9 ) <i>Streptococcus</i> sp. 3e-3 % ( 7 ) <i>Tannerella</i> sp. 4e-4 % ( 1 )	1h02	2,44
16	<i>Actinomyces oris</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,71 % ( 2914 ) <b>Porphyromonas sp.</b> 0,06 % ( 237 ) <i>Prevotella</i> 0,02 % ( 90 ) <i>Campylobacter gracilis</i> 0,01 % ( 54 ) <i>Eikenella exigua</i> 0,01 % ( 41 ) <i>Tannerella forsythia</i> 0,01 % ( 29 ) <i>Parvimonas micra</i> 0,01 % ( 23 )	00h20	1,77
17	<i>Streptococcus anginosus</i> <i>Prevotella spp</i>	<i>Prevotella spp</i>	<i>Prevotella sp.</i> 3e-3 % ( 5 ) <i>Streptococcus anginosus</i> 6e-4 % ( 1 )	00h25	0,39
18	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Porphyromonas bennonis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> 0,05 % ( 85 ) <i>Campylobacter ureolyticus</i> 0,01 % ( 18 ) <i>Peptoniphilus harei</i> 4e-3 % ( 7 ) <i>Trichomonas vaginalis</i> 1e-3 % ( 2 ) <i>Streptococcus</i> sp. 1e-3% ( 2 )	1h00	1,52
19	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Peptoniphilus harei</i> 0,01 % ( 47 ) <i>Finegoldia magna</i> 0,01 % ( 29 ) <i>Anaerococcus prevotii</i> 2e-3 % ( 5 ) <i>Enterobacter cloacae</i> 6e-4 % ( 2 )	0h50	0,81
20	<i>Prevotella corporis</i> <i>Finegoldia magna</i>	négatif	<i>Finegoldia magna</i> 0,01 % ( 19 ) <i>Prevotella intermedia</i> 2e-3 % ( 6 )	0h45	0,8
21	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,13 % ( 359 ) <b>Streptococcus intermedius</b> 0,05 % ( 129 ) <i>Parvimonas micra</i> 4e-3 % ( 11 )	0h50	0,81
22	<i>Nocardia paucivorans</i>	<i>Nocardia paucivorans</i>	Torque teno virus 11 0,02 % ( 36 ) <b>Nocardia sp.</b> ( 18 ) <i>Acinetobacter haemolyticus</i> ( 1 )	0h45	0,62
23	<i>Nocardia farcinica</i>	<i>Nocardia farcinica</i>	<i>Nocardia farcinica</i> 0,01% ( 22 ) Torque Teno mini 0,01 % ( 17 )	0h55	0,47
24	<i>Nocardia farcinica</i>	négatif	Torque teno virus 22 0,01 % ( 52 ) Betaherpesvirus 6B 2e-3% ( 8 ) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 2e-4 % ( 1 ) <i>Nocardia farcinica</i> 2e-4 % ( 1 )	2h10	1,24

- 10 diagnostics polymicrobiens concordants (23.8%)  
(1 – 2914 reads)

# Culture vs PCR vs séquençage GridION

## Résultats discordants

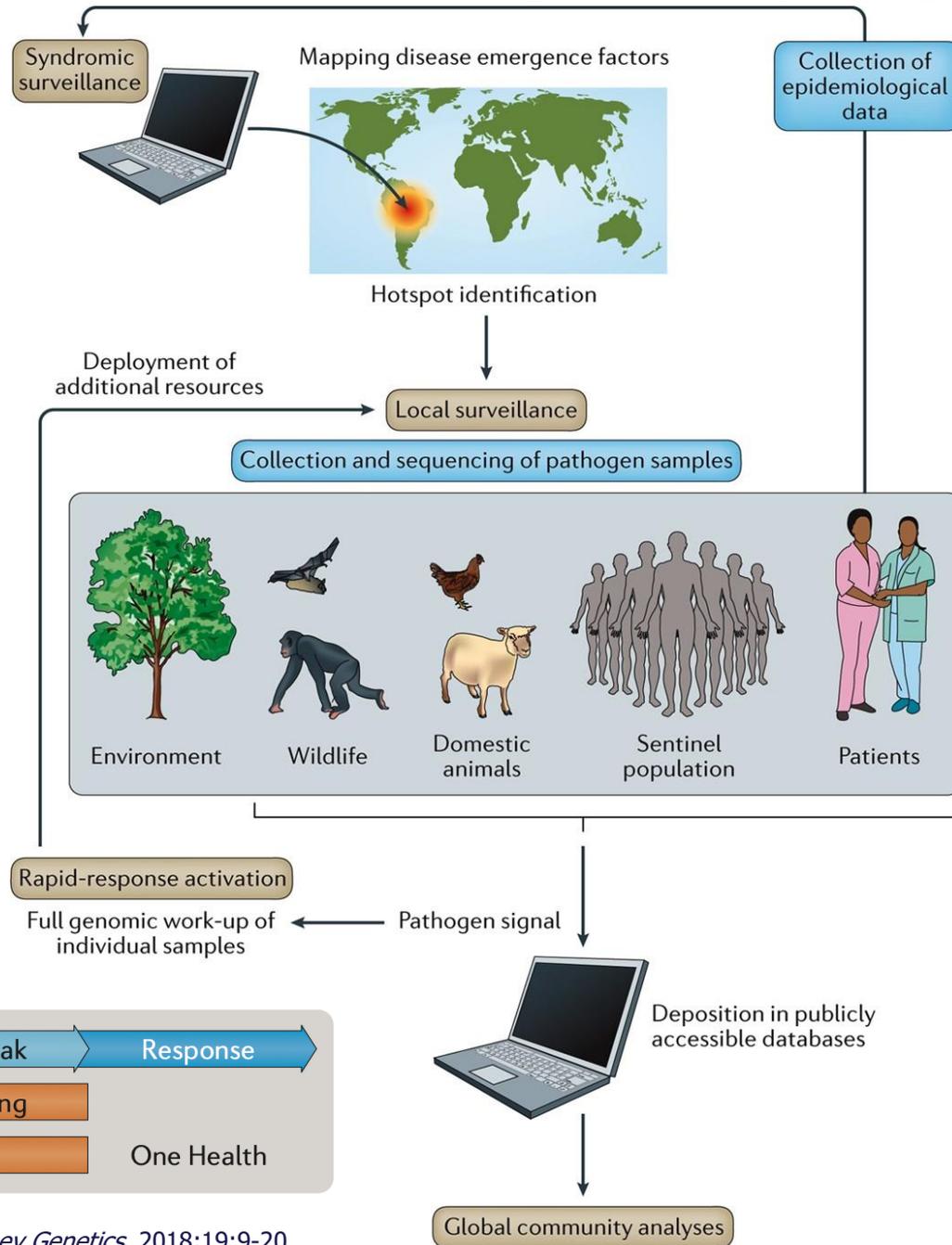
Méthode Echantillon	Culture	PCR	Séquençage métagénomique à haut débit en temps réel (Oxford Nanopore, technique GridION)		
			Germes identifiés	Durée de run	% Non ident
32	<i>Toxoplasma gondii</i>		négatif	2h00	0,38
33	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> 0,03 % ( 55 ) <i>Cutibacterium acnes</i> 0,01 % ( 18 )	20h30	0,22
34	<i>Cutibacterium acnes</i>	négatif	<i>Streptococcus intermedius</i> 0,04 % ( 104 )	0h49	1,1
35	négatif	négatif	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,01 % ( 230 )	00h39	0,56
36	<i>Cutibacterium acnes</i>	négatif	<i>Fusobacterium necrophorum</i> 0,49 % ( 1060 )	00h39	0,73
37	négatif	négatif	<i>Lactococcus lactis</i> 0,01 % ( 66 ) <i>Cutibacterium acnes</i> 0,01 % ( 57 )	22h	1,12
38	<i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,1 % ( 258 ) <i>Prevotella</i> sp. 0,01 % ( 15 ) <i>Tannerella forsythia</i> 1e-3 % ( 3 ) <i>Dialister pneumosintes</i> 4e-4 % ( 1 )	00h30	0,89
39	<i>Streptococcus anginosus</i>	négatif	<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0,37 % ( 1290 ) <i>Parvimonas micra</i> 0,01 % ( 27 ) <i>Eikenella corrodens</i> 2e-3 % ( 6 )	01h15	0,81
40	négatif	négatif	<i>Staphylococcus aureus</i> 3e-3 % ( 7 )	00h41	0,56
41	<i>Staphylococcus aureus</i>	négatif	Betaherpesvirus 7 3e-4 ( 1 )	3h00	0,11
42	négatif	négatif	<i>Staphylococcus hominis</i> 6e-4 % ( 1 )	1h40	0,35

- 11 diagnostics discordants (26%)  
=> Attention aux contaminations  
et à l'interprétation des résultats



**Utilisation du NGS en zone isolée**

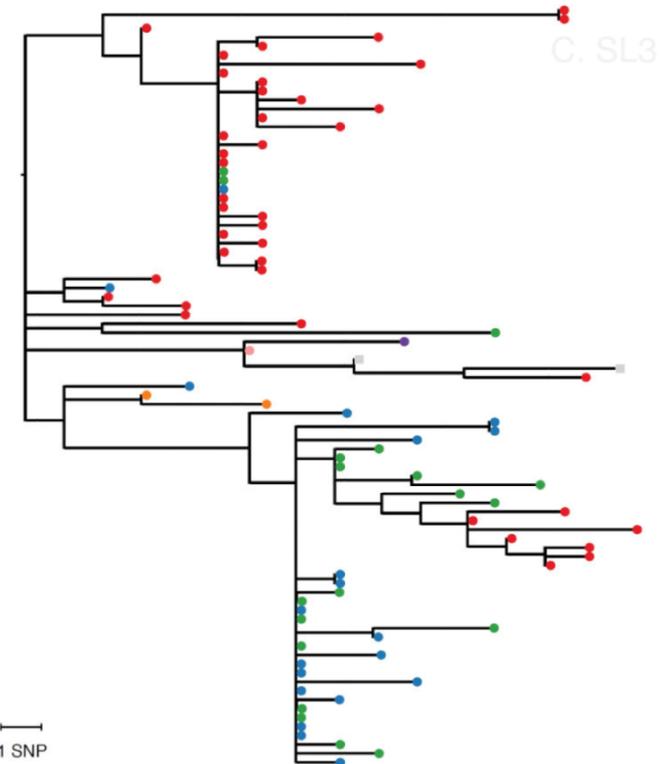
# Système de surveillance global des pathogènes



# Epidémie d'Ebola en Afrique de l'ouest

Quick J *et al. Nature.* 2016;530:228-32

- Sang total
- 142 virus
- Amplification pré-séquençage: 11 paires d'amorces



- Séquençage ONT MinION en Guinée: résultats < 24h
- mais problèmes d'instabilité du courant et de la connexion internet

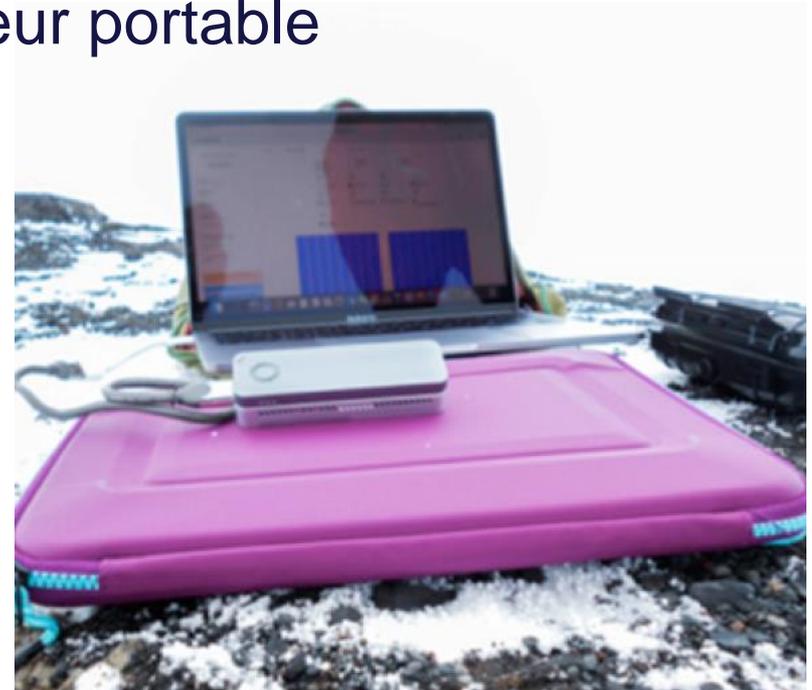
# Autres études en zones isolées

Elliott I *et al. Am J Trop Med Hyg.* 2020;102:408-14

- Etude de cas de tuberculose nosocomiale en Zambie, ONT MinION  
(Bates M *et al. Int J Mycobacteriol.* 2016;5:S24)
- Diagnostic de méningoencéphalite au Vietnam, ONT MinION (Hong NTT *et al. Open Forum Infect Dis.* 2020;7:ofaa046)
- Investigation d'une épidémie inhabituelle de paludisme au nord Sénégal, Illumina MiSeq (Sy M *et al. Malar J.* 2021;20:103)

# Encore plus loin! Station McMurdo, dry valleys, Antarctique

- Echantillon de sédiment d'un lac
- ONT MinION
- Courant généré par un ordinateur portable
- Calibration OK à  $-5^{\circ}$  C
- Séquençage OK à  $-1^{\circ}$  C



Johnson SS *et al.* *J Biomol Tech.* 2017;28:2-7

# Toujours plus loin!

## Station spatiale internationale, Sept 2016

- *E. coli*, *Mus musculus*, bactériophage Lambda
- ONT MinION
- 99.9% des 4.6 Mb du génome d'*E. coli* en 1 seul contig
- Bactériophage de 48.5 kb
- 16.3 kb du génome mitochondrial de *M. musculus*

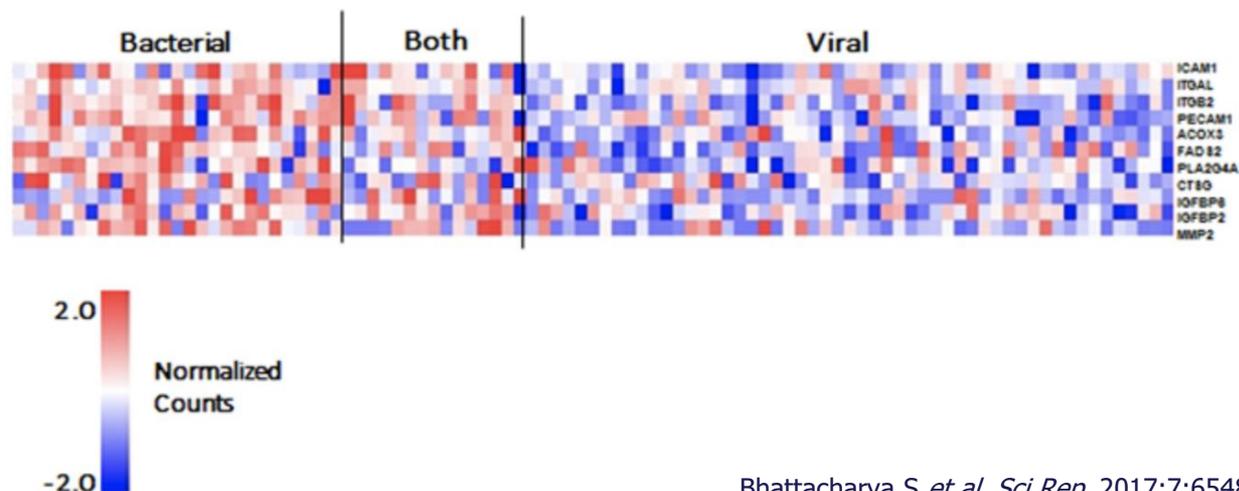


Castro-Wallace SL *et al. Sci Rep.* 2017;7:18022

# **La métatranscriptomique humaine peut-elle aider au diagnostic des infections?**

# L'analyse métatranscriptomique distingue les infections virales et bactériennes

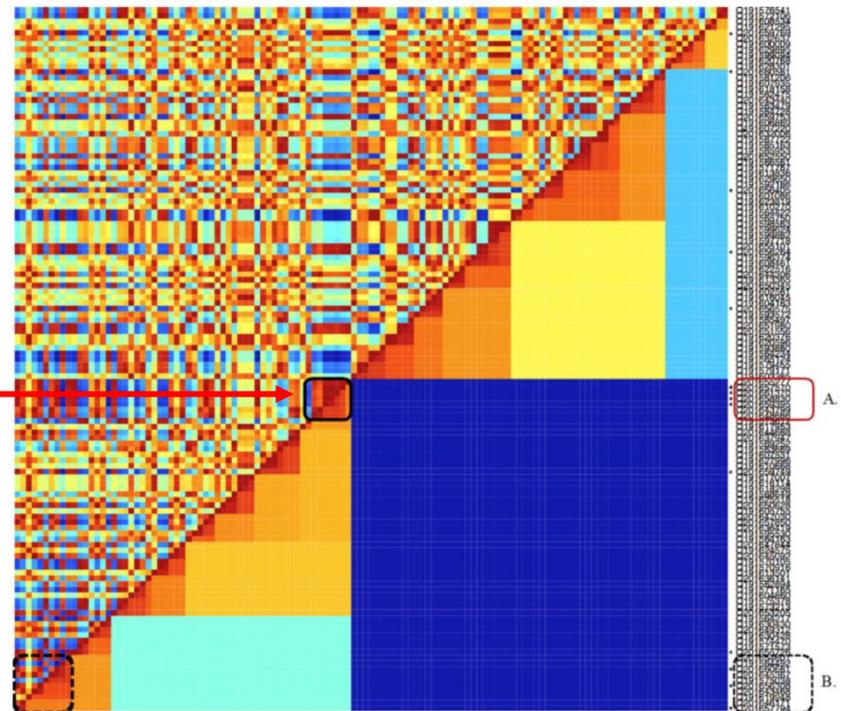
- 94 patients (41 infections bactériennes et 53 virales)
- Séquençage RNASeq Illumina HiSeq sur sang total
- L'expression de 11 gènes identifie les infections bactériennes avec une sensibilité de 79% et une spécificité de 83%



**Et la spectromique?**

# Utiliser les spectres de masse pour détecter les épidémies

- Identification des souches par spectrométrie de masse MALDI-TOFF
- Détection de clusters de souches par leur proximité protéique
- 3 pics discriminants => identification d'une épidémie de pneumonies à *S. pneumoniae*
- Mais pas de base de données publique



# Conclusions

- Les OMICS sont adaptés à l'alerte et la surveillance
- Le séquençage génomique ou métagénomique peut être réalisé en 6 heures pour moins de 100 euros
- Peut être réalisé à partir d'isolats ou de tout type d'échantillon clinique humain ou animal
- Approche versatile permettant de détecter tout ADN et ARN
- Peut remplacer culture et diagnostic moléculaire usuels

# Conclusions

- Peut être réalisé en zone isolée
- Le séquençage en temps réel constitue une source unique d'information pour identifier l'agent pathogène d'une épidémie, sa virulence et/ou sa résistance, et pour en suivre l'évolution
- Peut aussi donner accès aux informations génétiques humaines, notamment le profil transcriptionnel

# Mais il reste des obstacles

- Nécessite une implémentation à large échelle pour avoir un impact global en santé publique
- Le séquençage reste cher pour de nombreux pays
- Les méthodes de séquençage, assemblage et analyse génomique sont hétérogènes
- Nécessite des équipements informatiques puissants, rapides, fiables et faciles d'utilisation

# Pour en savoir plus

- Li N *et al. Small Meth.* 2020;5:2000792
- Gu W *et al. Nat Med.* 2021;27:115-24
- Gu W *et al. Annu Rev Pathol.* 2019;14:319-38
- Chiu CY & Miller SA. *Nat Rev Genet.* 2019;20:341-55
- Simner PJ *et al. Clin Infect Dis.* 2018;66:778-88
- Greninger AL. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18:605-15

# Remerciements

**Didier Raoult**

**Anthony Levasseur**

**Philippe Colson**

**Claudia Andrieu**

**Ludivine Brechard**

**Priscilla Jardot**