Séquençage à haut débit en pathologie infectieuse du système nerveux central

Christophe Rodriguez

Microbiology Dpt, INSERM U955 Team 18,

Responsable de la plateforme "Génomiques" IMRB/APHP,

University hospital Henri Mondor, APHP, Créteil, France,

HÔPITAUX UNIVERSITAIRES HENRI MONDOR
ALBERT CHENEVIER - JOFFRE-DUPUYTREN
EMILE ROUX - GEORGES CLEMENCEAU

Inserm

UPEC
Connaissance - Action

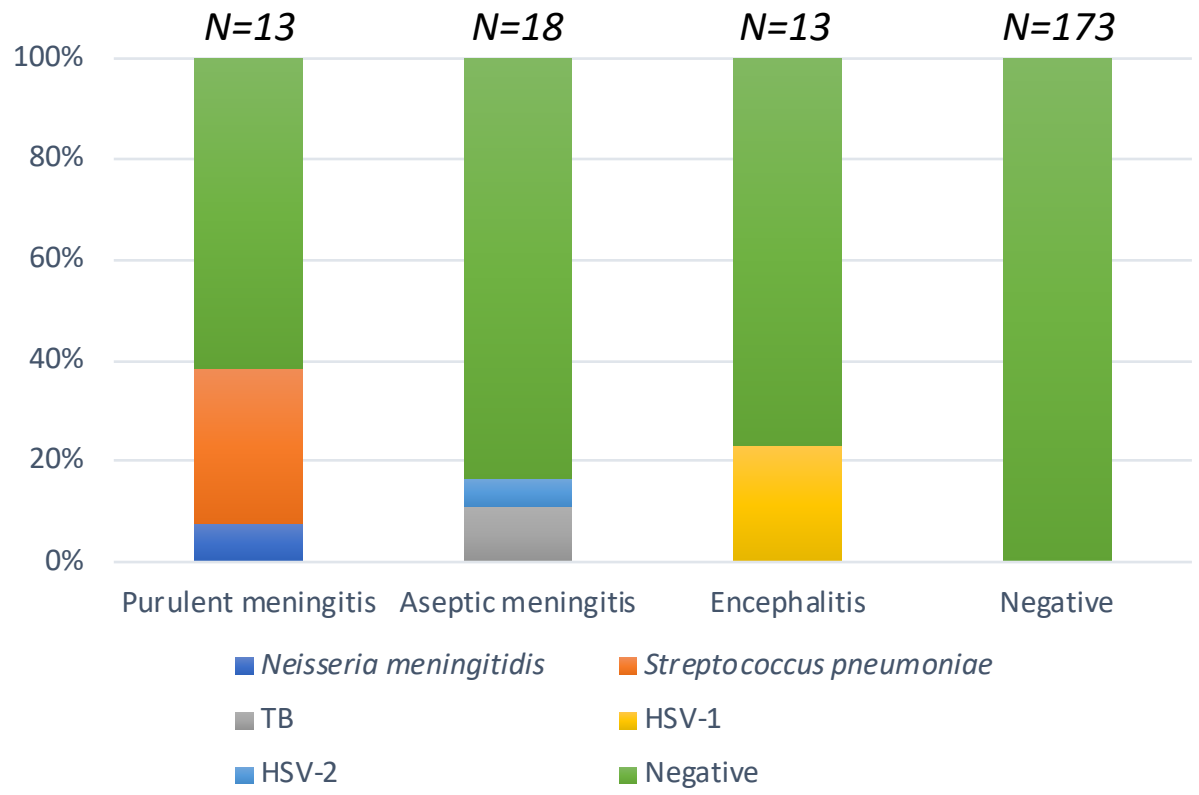
UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE MARNE

IMRB INSTITUT MONDOR DE RECHERCHE BIOMÉDICALE

anrs France REcherche Nord & sud Sida-hiv Hépatites
Agence autonome de l'Inserm

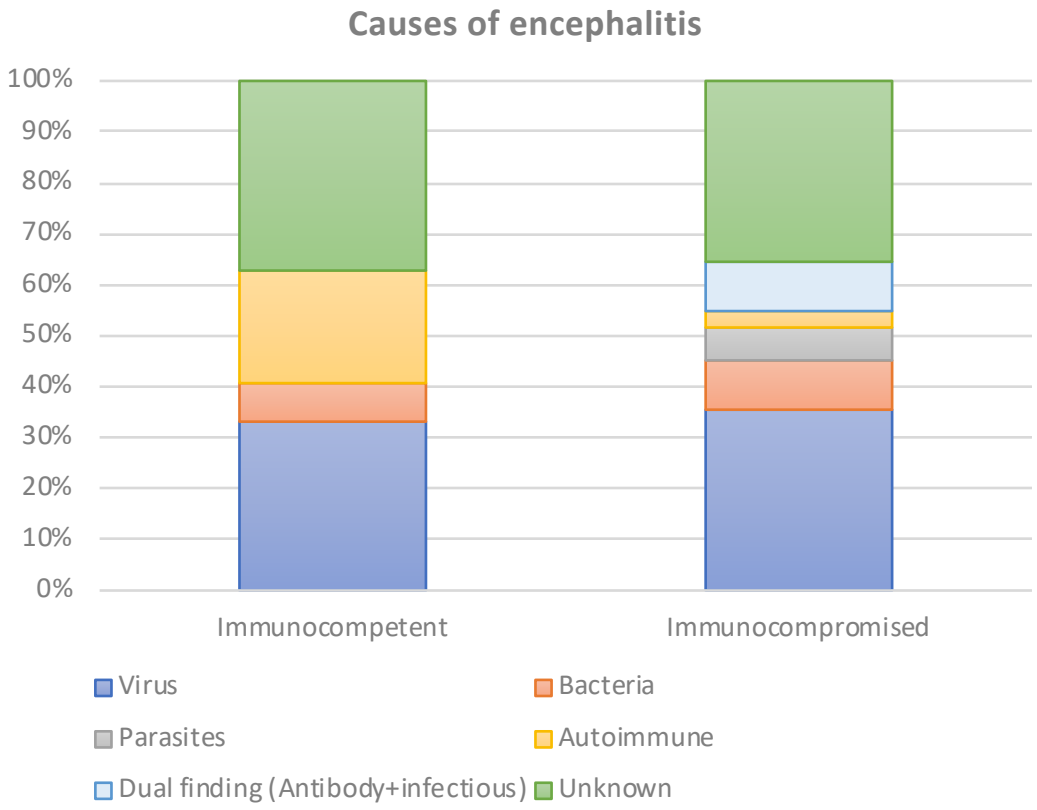
A propos des méningites ?

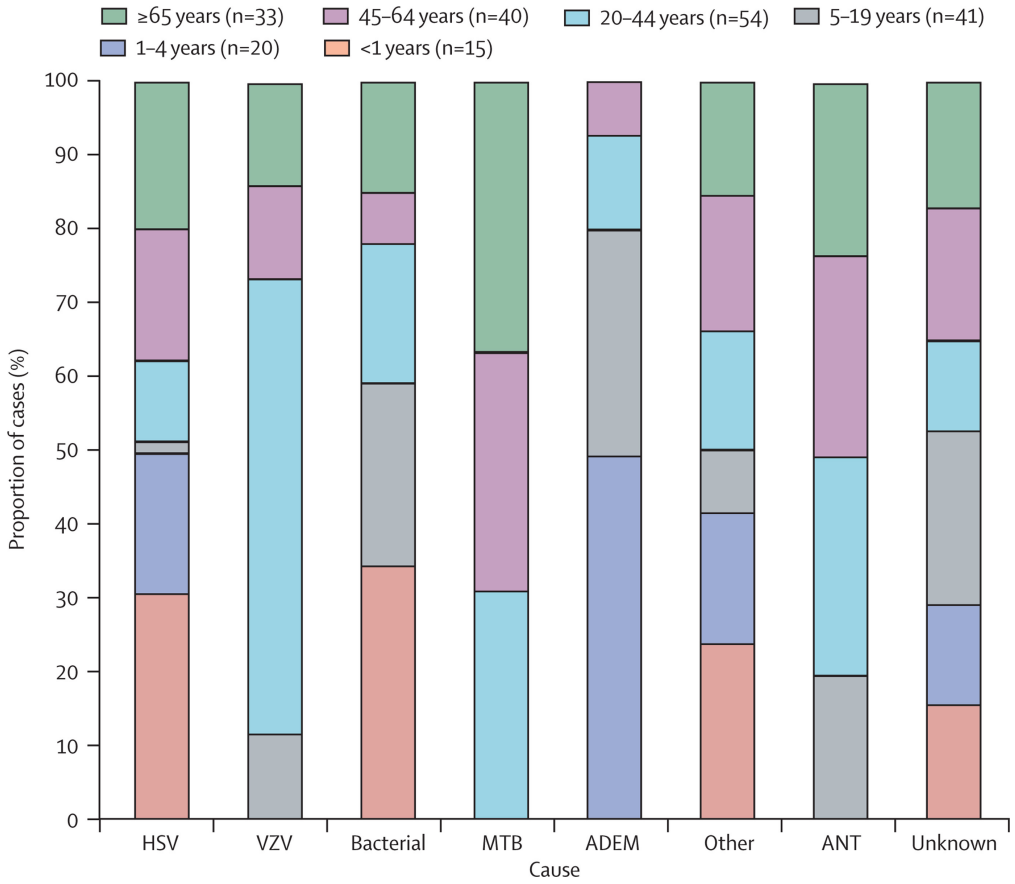
- Absence de recommandation sur le diagnostic en général
  - Reco sur les méningites bactériennes
- Etude réalisée en générale sur population particulière
  - Enfants
  - Méningites consécutives aux soins
  - …
- Absence d'étude épidémiologique d'ampleur



From Michael BD et al. ; QJM 2010

A propos des encéphalites ?





From Granerod J et al. ; Lancet Infect Dis 2010;10:835-844.

Infections du SNC

- Symptomatologie aspécifique pouvant être associée à de nombreuses autres pathologies
  - Cancers
  - Auto-immunes
  - Grande part restant sans réponse
- Diversité importante des pathogènes possiblement impliqués
- Documentation limitée à ce que l'on peut traiter (bactéries et virus du groupe Herpes en général)
- Peu de guidelines ou de consensus sur la documentation de ces infections
- Multiplication des outils diagnostics dont les performances ne sont pas toujours au rdv

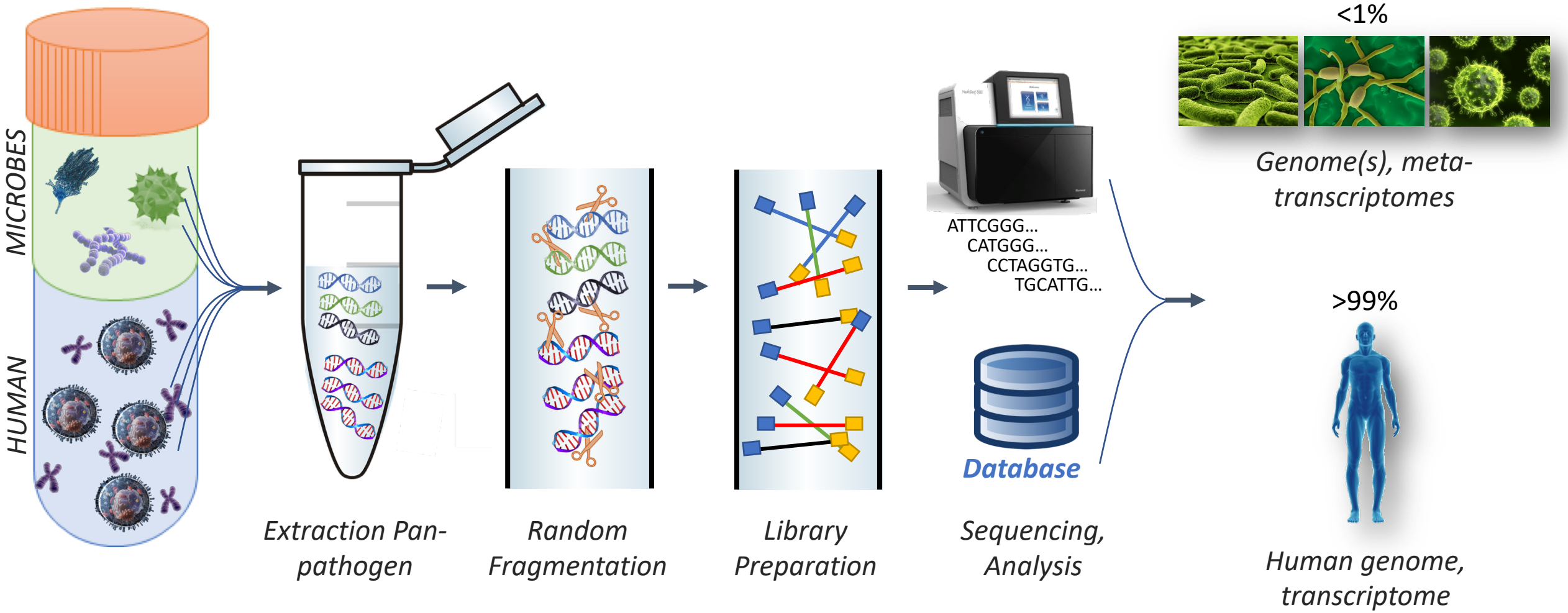
⇒Mauvaise connaissance de la documentation de ces pathologies
⇒Pas de recherche active sur de nouveaux traitements possibles…

Diagnostic microbiologique

- pourquoi c'est imparfait?

Organisms	Culture+MALDI-TOF	PCR Panels	Ag/Antibody	Sanger Amplicon	NGS Amplicon
Bacteria	Partial	Targeted	Targeted	16S	16S
Fungi	Partial	Targeted	Targeted	ITS	ITS
Virus	Not used	Targeted	Targeted	No	No
Plurimicrobial	partial	Targeted	Targeted	No	Partial
New pathogen	Limited	No	No	Limited	Limited
Characterization	Phenotypical Resistance	Mutation(s)	No	Target (VIH, VHC..)	Target (VIH, VHC..)
Host exploration	No	No	No	No	No

La métagénomique (SMg) en infectiologie?



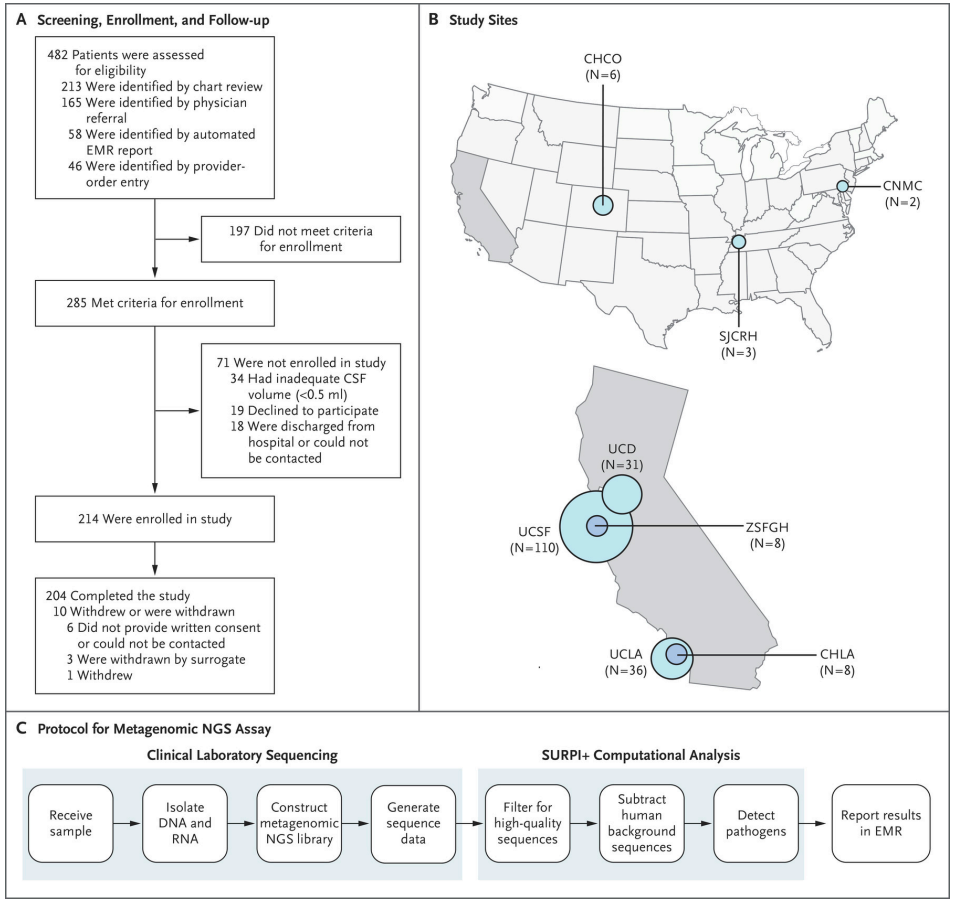
Diagnostic microbiologique

- Potentiel de la métagénomique ?

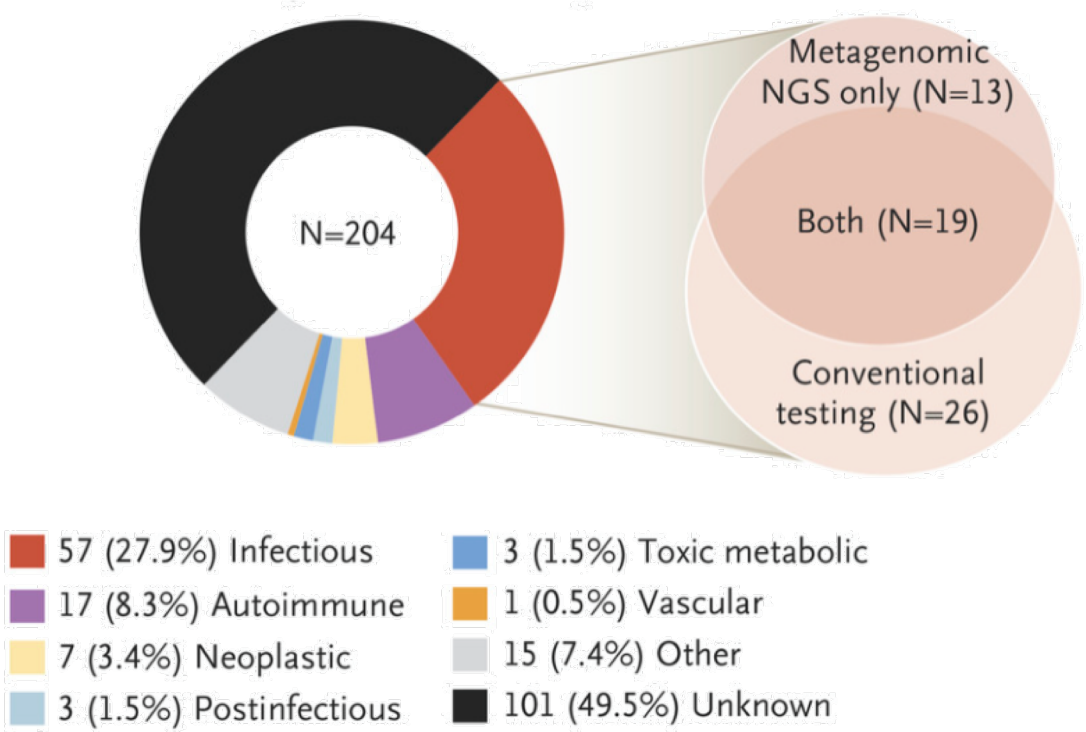
Organisms	Culture+MALDI-TOF	PCR Panels	Ag/Antibody	Sanger Amplicon	NGS Amplicon	Shotgun Metagenomic
Bacteria	Partial	Targeted	Targeted	16S	16S	Yes
Fungi	Partial	Targeted	Targeted	ITS	ITS	Yes
Virus	Not used	Targeted	Targeted	No	No	Yes
Plurimicrobial	partial	Targeted	Targeted	No	Partial	Yes
New pathogen	Limited	No	No	Limited	Limited	Yes
Characterization	Phenotypical Resistance	Mutation(s)	No	Target (VIH, VHC..)	Target (VIH, VHC..)	Whole genome
Host exploration	No	No	No	No	No	Yes

Première étude prospective d'ampleur

- 204 patients présentant une symptomatologie d'infection du SNC => 58 d'origine infectieuse +6% par la SMg



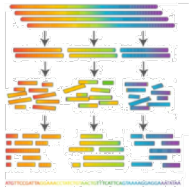
Established Diagnosis in the Study Patients



Wilson MR et al; N Engl J Med. 2019 Jun 13;380(24):2327-2340

La métagénomique MetaMIC

Automated and standardized Pathogen genome Extraction (12 samples per run)



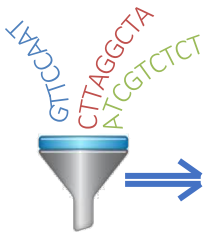
Library preparation DNA+RNA

Automation

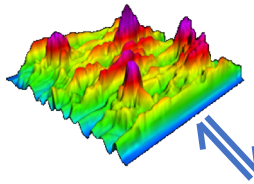
Sequencing (Illumina NextSeq)

Server calculation (96Co/192Go RAM)

MetaMIC ® software



Filtering



Classify and quantify with DB

Report and interpret

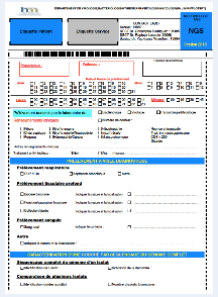
MetaMIC en routine

- Impasse diagnostique (workflow 5j)

Infectiologues

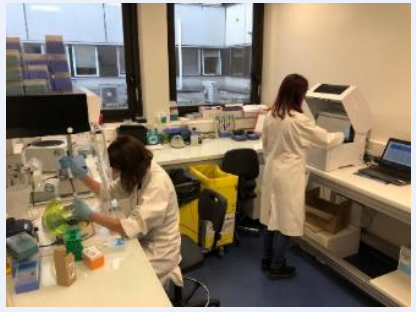
Prescription si syndrome infectieux,

Tous types de prélèvements y compris Paraffine



NGS platform

Extraction et pré-PCR



Préparation de librairie

Séquençage

Analyse

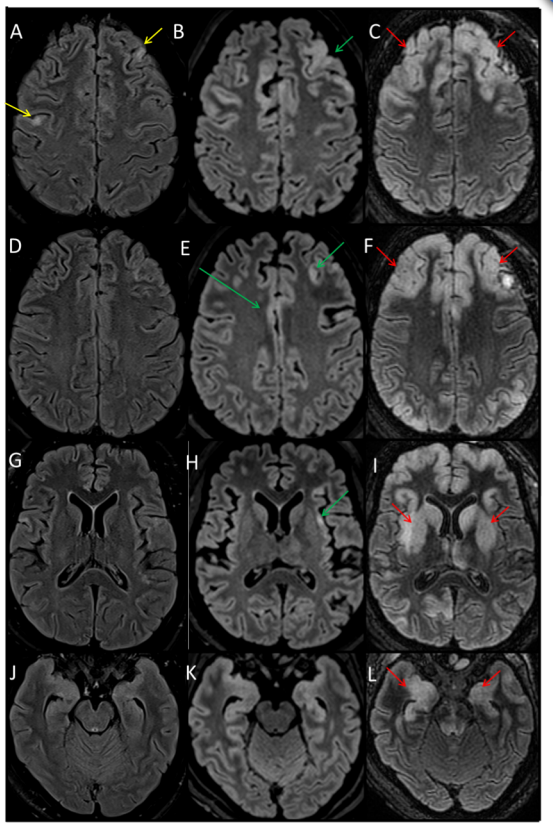
Ne rien oublier grâce au sans *a priori* (cas n°1)

Patient

- Femme de 28 ans, origine roumaine, vivant en France.

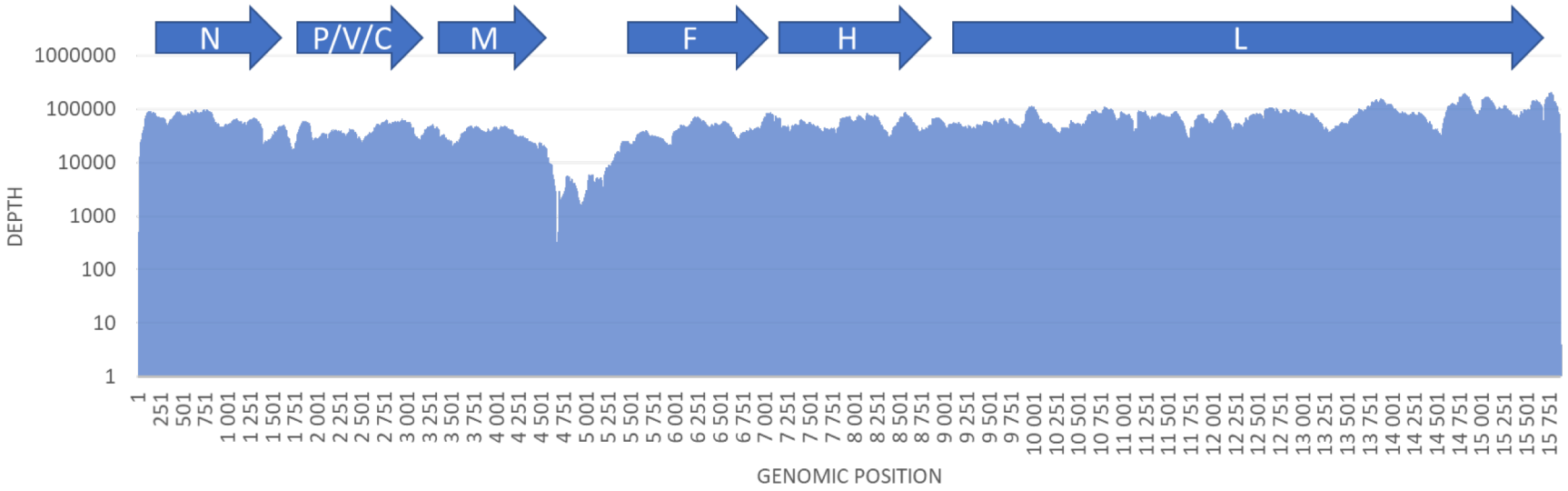
J0 — CHRU HÔPITAUX DE TOURS — J58 — HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PITIÉ SALPÊTRIÈRE CHARLES FOIX — HÔPITAUX UNIVERSITAIRES HENRI MONDOR — J 109

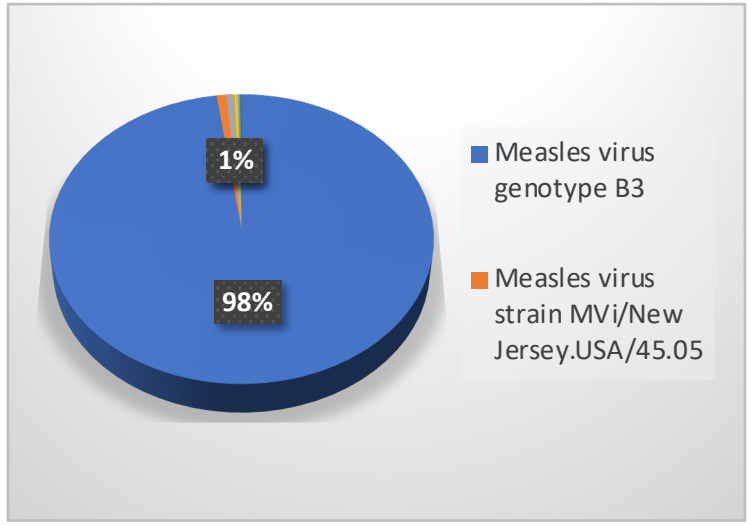
- J0 à J32 : 2 passages aux urgences pour crise épileptique
- J32 à J50 : Hospitalisation pour état de mal épileptique. Découverte d'un VIH (3.65 log cp/mL, CD4 26/mm3) et initiation d'un traitement. LCR neg.
- J50 à J58 : Nouveaux épisodes de myoclonie, hémiparésie gauche, anomalies IRM, coma (Glasgow 14 à 6) -> transfert en unité de soins intensifs neuro à PSL
- J59-61 : Ré-exploration microbiologique négative du LCR (viro : HSV, VZV, CMV, EBV, HHV6, EV, HIV, JCPyV), bactério/BK, champignons (*Aspergillus*), et parasites (*Cryptococcus neoformans*) ; SMg négative ; taux élevé d'IL6.
- D59-D94 : Amplification des anomalies à l'IRM
- D98 : biopsie cérébrale et envoi à HMN pour exploration par SMg
- D105 : Diagnostic par SMg
- D109 : décès



Rodriguez et al; EID 2020

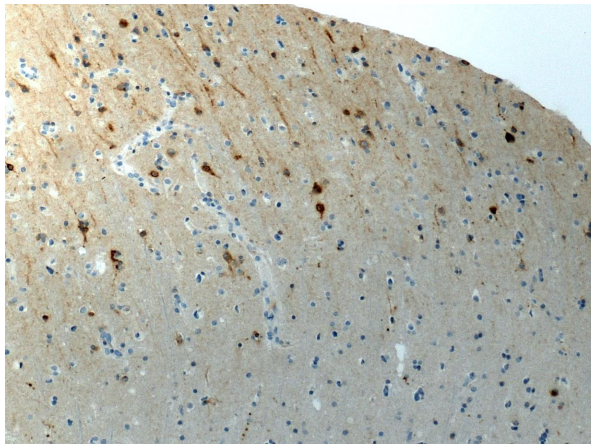
Diagnostic par MetaMIC : La rougeole

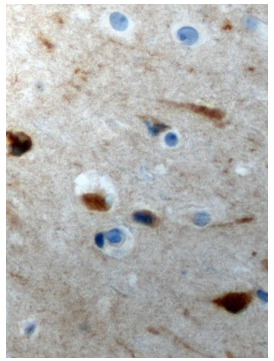




CHU CAEN NORMANDIE

Confirmation par PCR du diagnostic et du génotype
Confirmation de négativité du LCR





Confirmation par immunomarquage

Rodriguez et al; EID 2020

Profiter du panel le plus large possible (case n°2)

Patient

- Enfant de 12 ans, en post greffe de moelle pour un déficit immunitaire combiné, reconstitution immunitaire jugée solide, autorisation de sortie

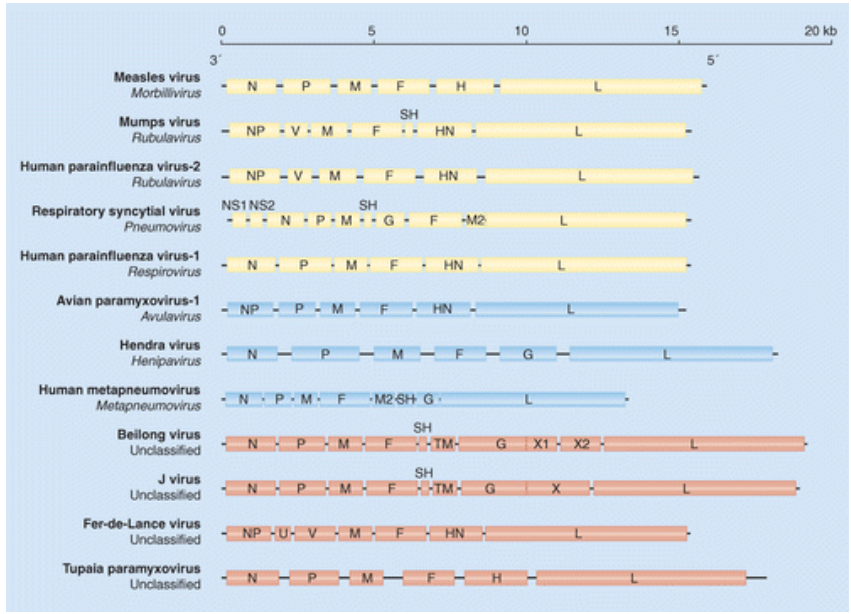
Day 0 → Necker Enfants Malades Hôpital Universitaire → Hôpitaux Universitaires Henri Mondor (Albert Chenevier - Joffre-Dupuytren - Emile Roux - Georges Clemenceau) → Day 48

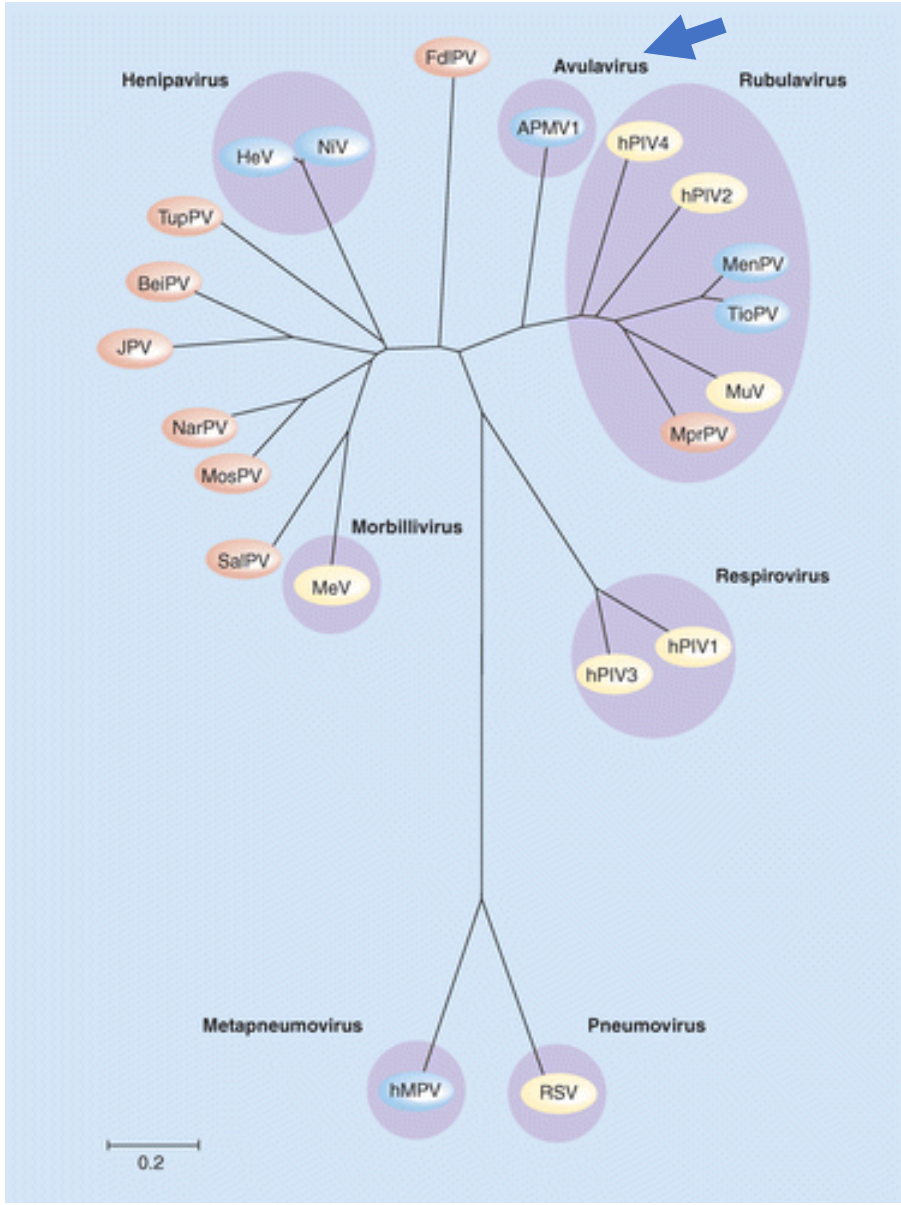
- Janvier 2019 : Voyage à Dubaï en lien avec une association, séjour dans un hôtel de luxe, pas de sortie à l'extérieur. Retour le 17/01/19
- 18/01/19 : hospitalisation en réanimation pour un tableau de méningo-encéphalite subaiguë avec atteinte nécrosante des noyaux gris centraux sans étiologie retrouvée par les techniques classiques. Traitements immunosuppresseurs entrepris + séances d'échanges plasmatiques. Sans succès.
- 20/02 Dégradation à Glasgow 4, transfert en réanimation, biopsie cérébrale envoyée à Mondor.
- 05/03 Diagnostic par SMg mais début de nécrose au niveau des NGC droits sans espoir de récupération.
- 07/03 -> 15/03 Soins palliatifs puis Décès

Winter et al ; en préparation

Détection du Newcastle Disease

La maladie de Newcastle, aussi appelée « pseudopeste aviaire », « pneumoencéphalite aviaire » ou « maladie de Ranikhet », est une maladie présente partout dans le monde, très contagieuse et souvent grave, qui affecte les oiseaux, notamment les volailles domestiques. La morbidité et la mortalité varient fortement selon la virulence de la souche, l'immunité et l'état de l'animal et d'autres facteurs environnementaux.

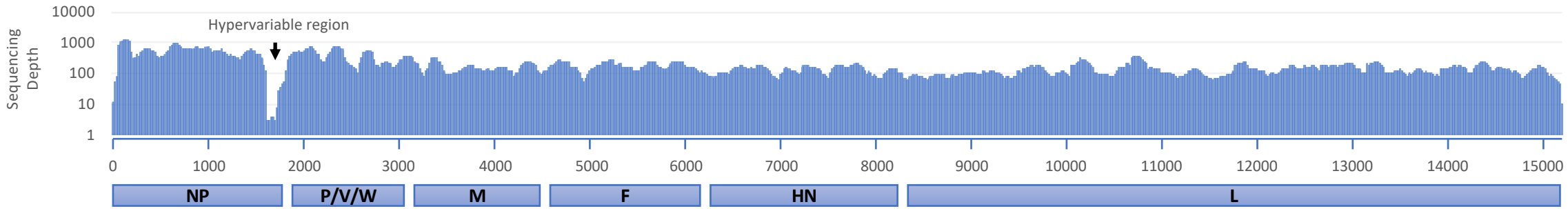




Winter et al ; en préparation

Caractéristiques du virus

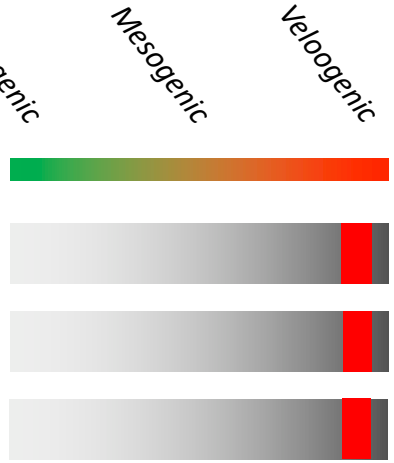
A



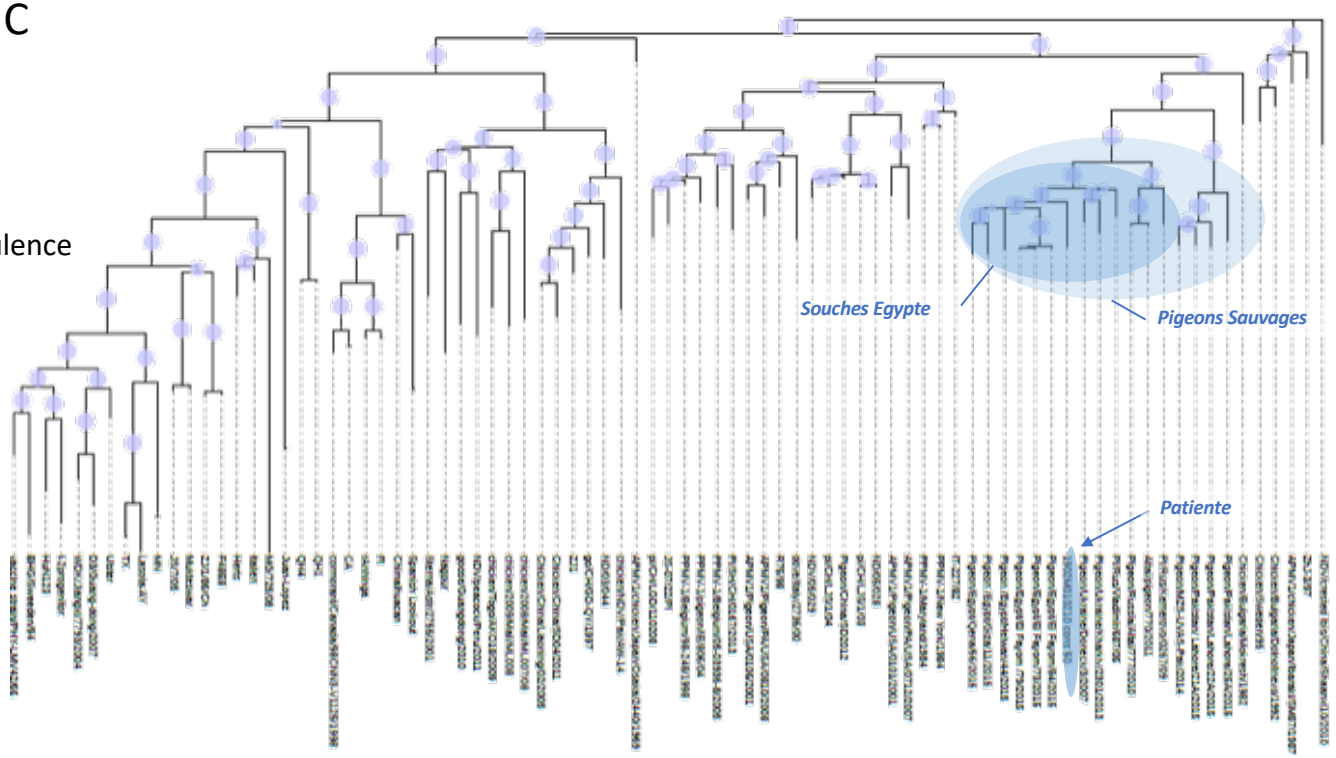
B

Caracteristics of the patients strain

V protein of 239aa + Zinc Finger CTD
F cleavage site : ^{112}K-R-Q-K-R-F^{117}
HN protein of 571aa



C



Winter et al ; en préparation

New pathogen emergence (case n°3)

Patient

- Mme P, 58 ans, lymphome en 2002 avec rémission complète, hypogammaglobulinémie liée à un possible déficit immunitaire non étiqueté, syndrome myélodysplasique , hépatite auto-immune avec cirrhose (Child B) contrôlée sous Sirolimus.

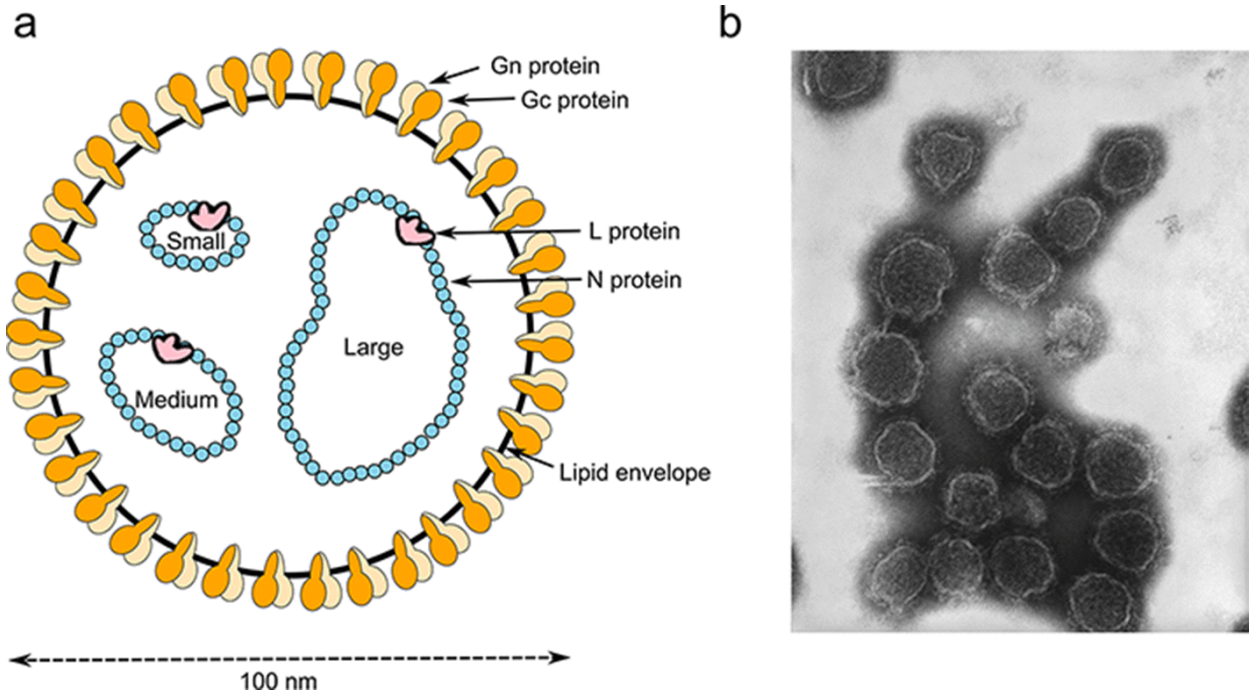
Oct 18 → HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PITIÉ SALPÊTRIÈRE CHARLES FOIX → Nov 18 → HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PITIÉ SALPÊTRIÈRE CHARLES FOIX → HÔPITAUX UNIVERSITAIRES HENRI MONDOR (ALBERT CHENEVIER - JOFFRE-DUPUYTREN - EMILE ROUX - GEORGES CLEMENCEAU) → Mar 19

- Oct 2018 : Premiers épisodes de troubles neurologiques et consultations aux urgences de la PSL
- Nov 2018 : Admission aux urgences et transfert en neurologie. Nombreuses explorations bactériologiques et immunitaires sans diagnostic étiologique.
- Février 2019 : Aggravation des signes neuro, transfert en réa-neuro, LCR avec qq élts, IFN alpha +++. IRM du 23/02/19 évoquant une possible encéphalite. Biopsie envoyée à Mondor.
- Diagnostic 15/03
- Décès le 27/03/19.

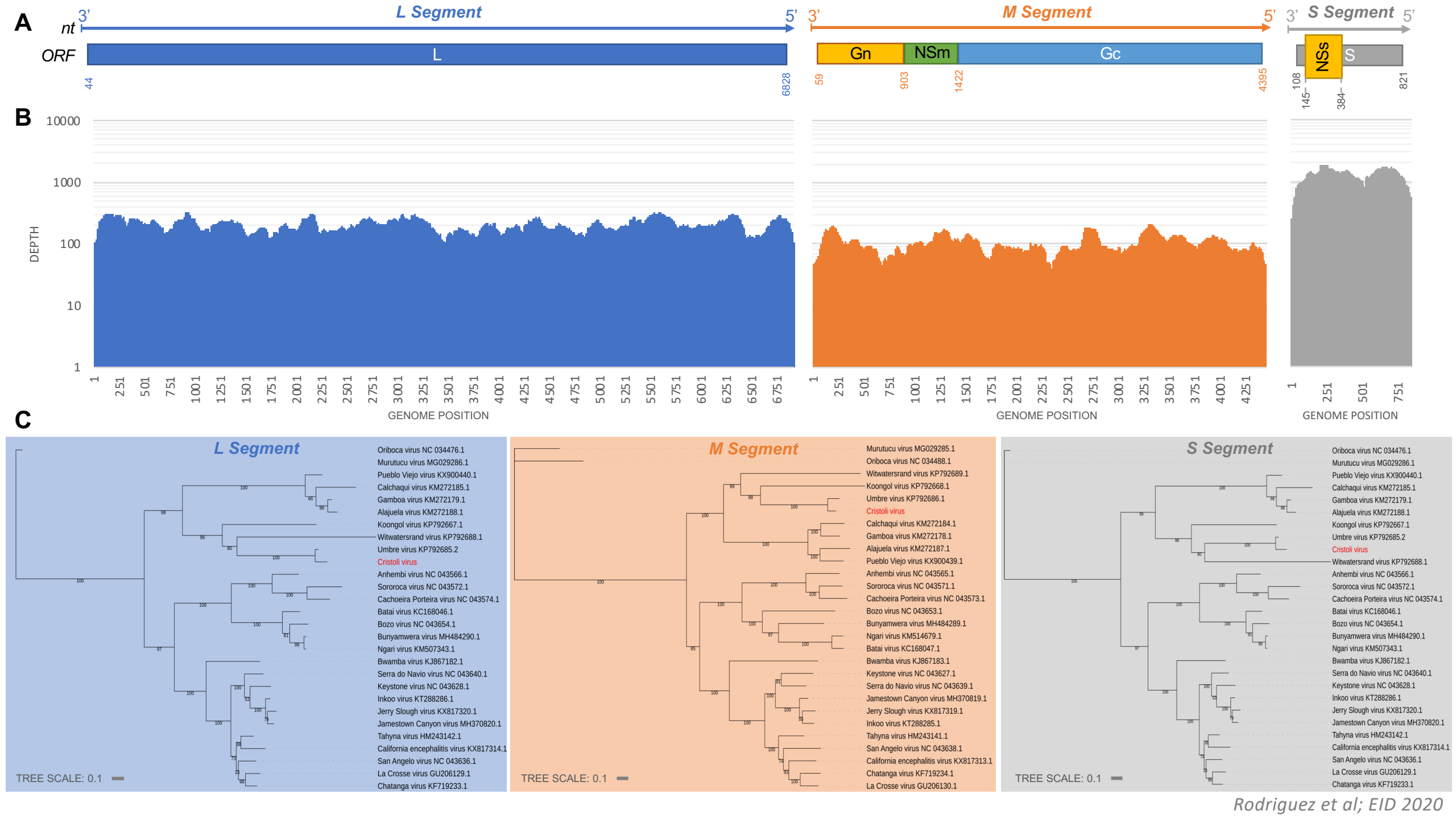
Rodriguez et al; EID 2020

Résultats MetaMIC

- *Orthobunyavirus,* serogroup Turlock
  - Possiblement Little Sussex ou Umbre mais impossibilité du logiciel de le déterminer précisément, quantité intermédiaire
  - Lancement de l'algo de reconstruction *de novo (c'est à dire sans référence)*



Rodriguez et al; EID 2020



Rodriguez et al; EID 2020

Le Parisien

Abonnés Société

Comment des chercheurs de Créteil ont découvert le nouveau virus Cristoli

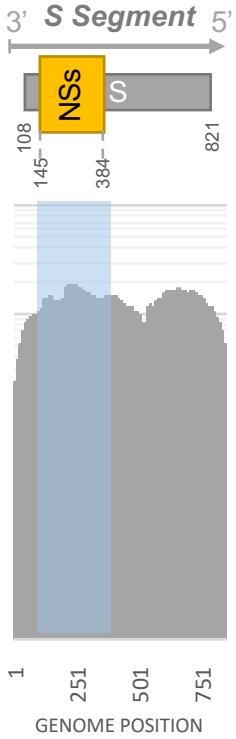
Une équipe de l'hôpital Henri-Mondor a identifié un virus responsable d'une inflammation du cerveau. Les chercheurs ont utilisé la même technique qui a permis aux Chinois de découvrir le Covid-19.

Hospitalisée à la Pitié-Salpêtrière, une femme a succombé à une encéphalite (inflammation du cerveau) probablement due à ce virus. LP/Frédéric Dugit

Rodriguez et al; EID 2020

La protéine NSs

- Détection d'un cadre de lecture codant correspondant à une protéine NSs
- Charge de transcrit N+NSs 10x plus importante que le reste du virus -> lien avec la virulence ?

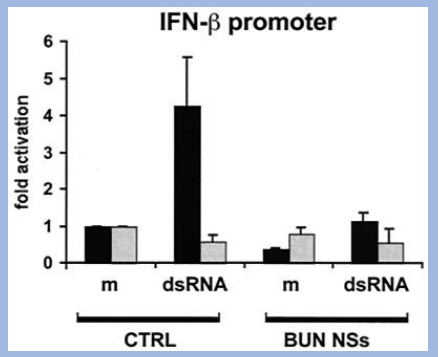


Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Induction of Alpha/Beta Interferon

Friedemann Weber,[1] Anne Bridgen,[2] John K. Fazakerley,[3] Hein Streitenfeld,[1] Nina Kessler,[1] Richard E. Randall,[4] and Richard M. Elliott[2]*

Abteilung Virologie, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg, D-79008 Freiburg, Germany,[1] and Division of Virology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G11 5JR,[2] Laboratory for Clinical and Molecular Virology, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 1QH,[3] and School of Biology Sciences, University of St. Andrews, Fife KY16 9TS,[4] Scotland, United Kingdom

Received 12 February 2002/Accepted 9 May 2002

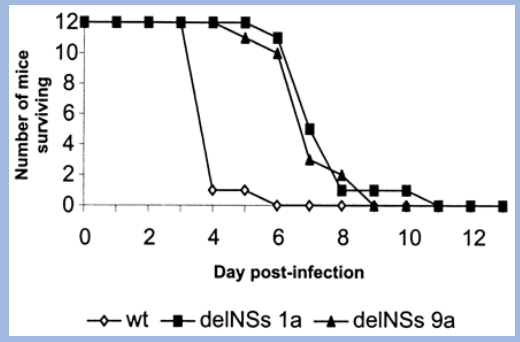


Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis

Anne Bridgen*†, Friedemann Weber*†, John K. Fazakerley‡, and Richard M. Elliott*§

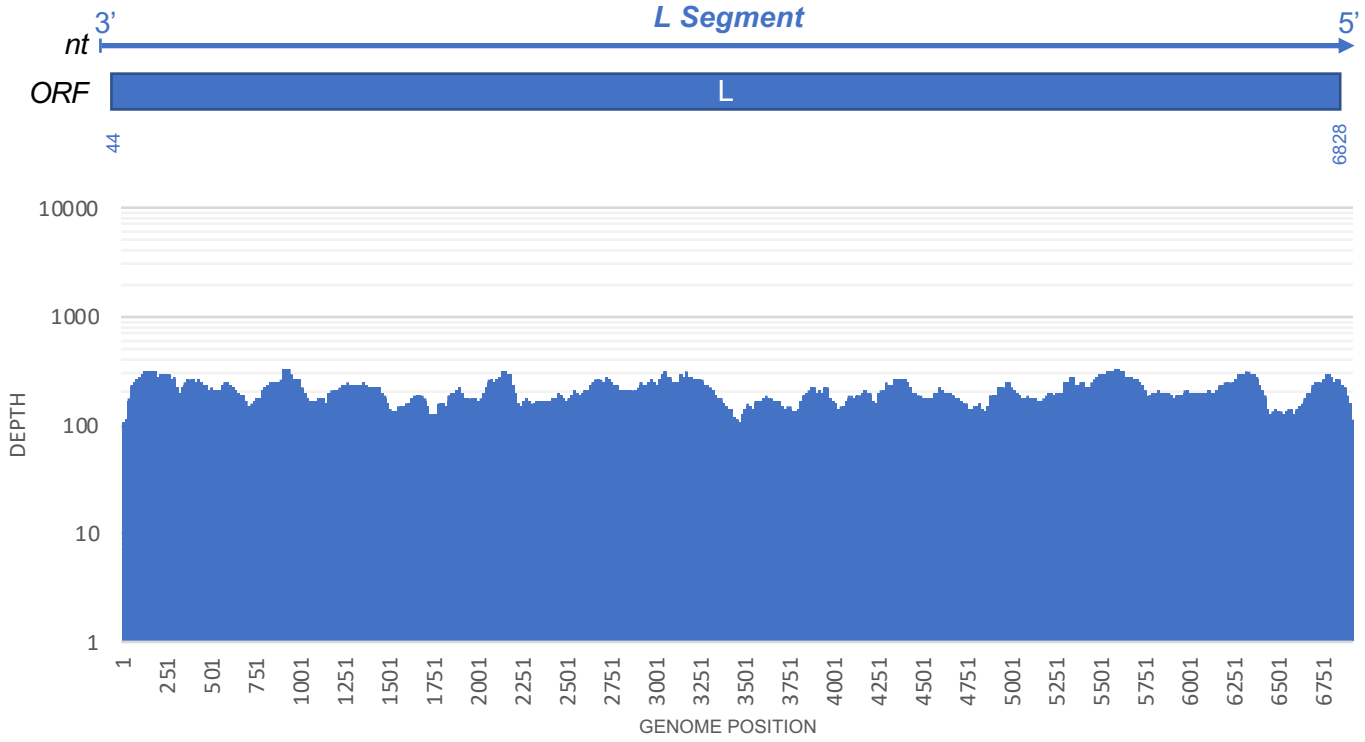
*Division of Virology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G11 5JR, Scotland, United Kingdom; and ‡Laboratory for Clinical and Molecular Virology, University of Edinburgh, Summerhall, Edinburgh EH9 1QH, Scotland, United Kingdom

Communicated by Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, October 31, 2000 (received for review September 13, 2000)

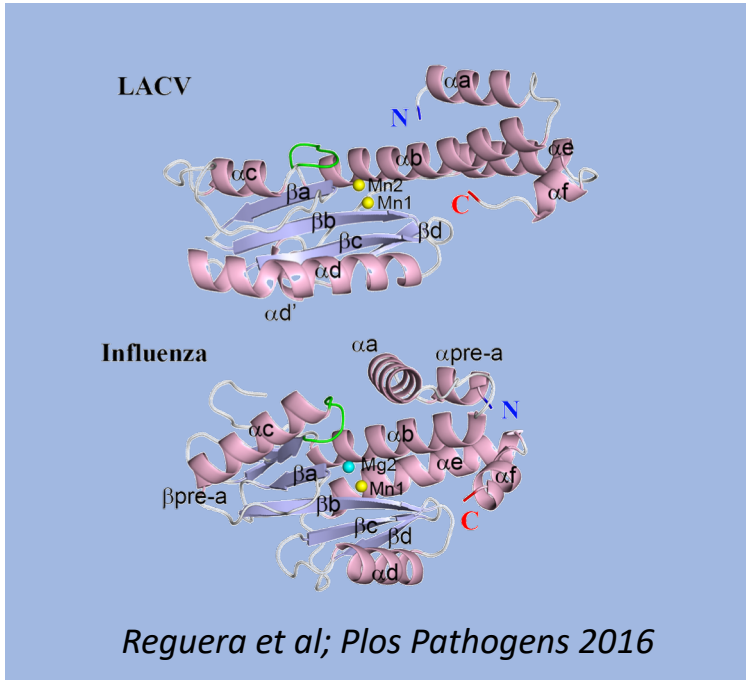


F. Weber et al.; J Virol 2002 ; Bridgen et al; PNAS 2000

La protéine L



Conserved H….PD….DxK *Orthobunyavirus* catalytic domain => Traitement possible par un inhibiteur de polymérase ?



Reguera et al; Plos Pathogens 2016

Rodriguez et al; EID 2020

Diagnostic pan-pathogène par métagénomique clinique, retour d'expérience en routine

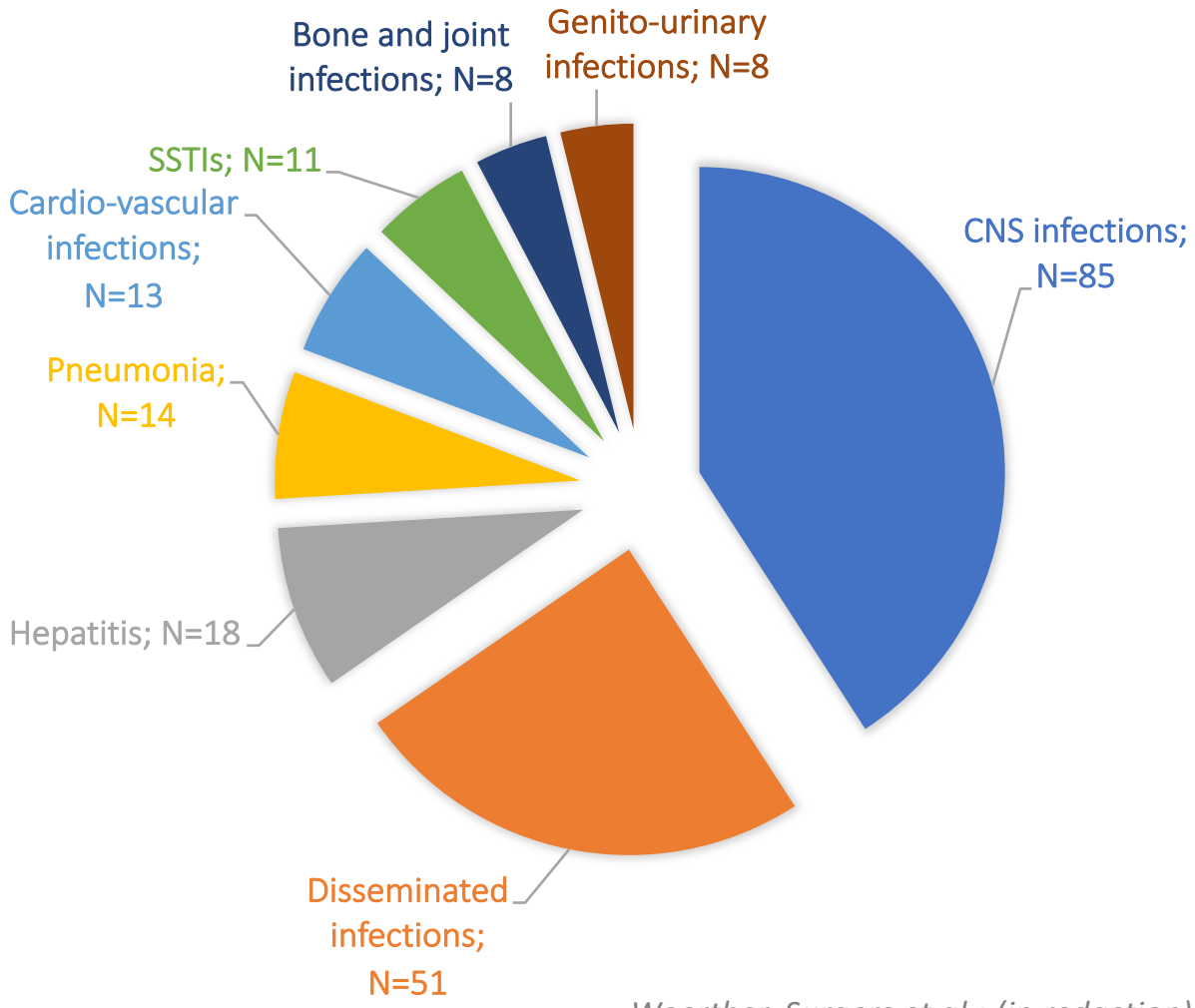
Objectif :

Analyse rétrospective de la contribution microbiologique des examens de métagénomique demandés dans le cadre d'exploration de maladies infectieuses « complexes ».

Patients :

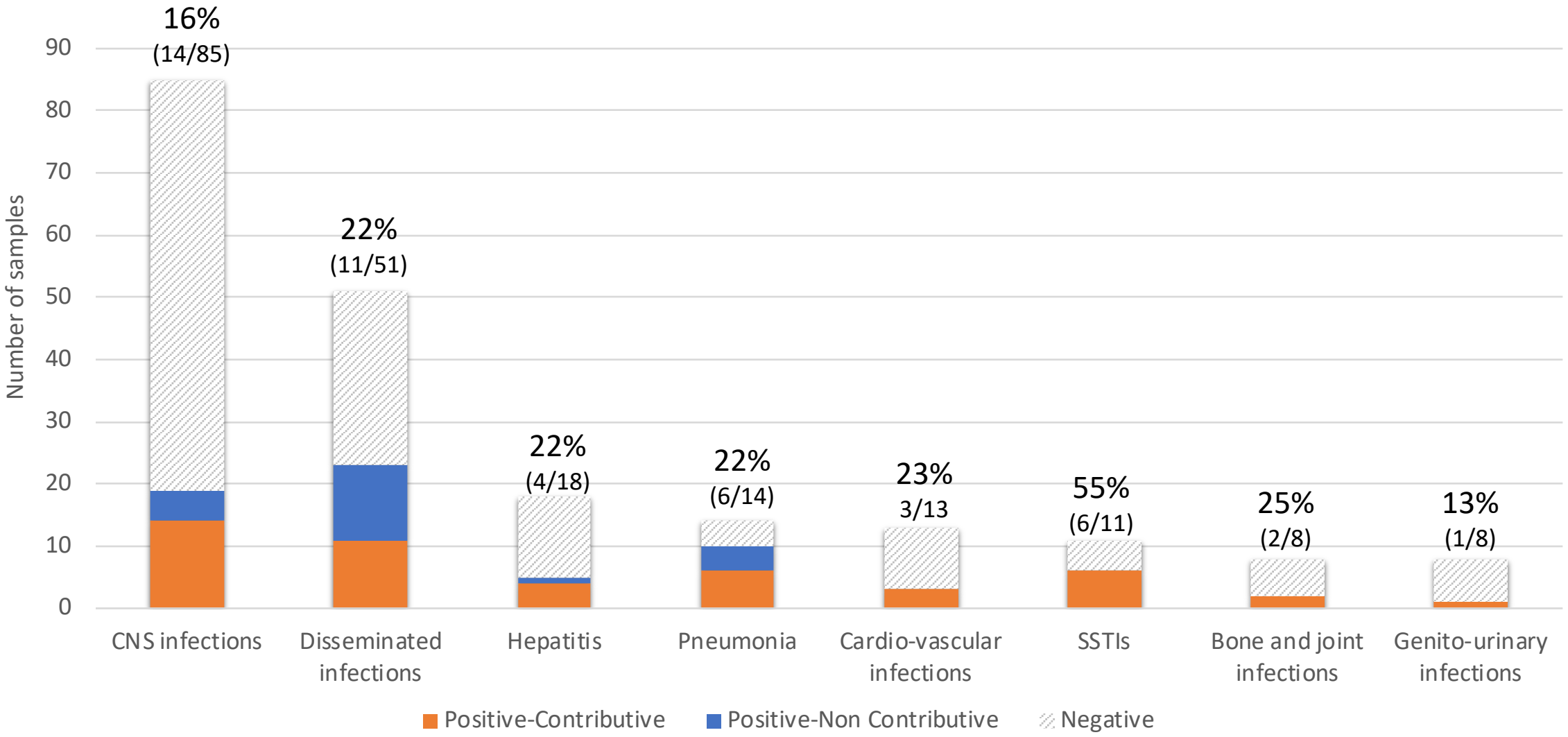
208 échantillons analysés inclus sur l'année 2019 :

- Recueil des indications
- Recueil des résultat (négatif/positif)
- Interprétation (contributif/non contributif)



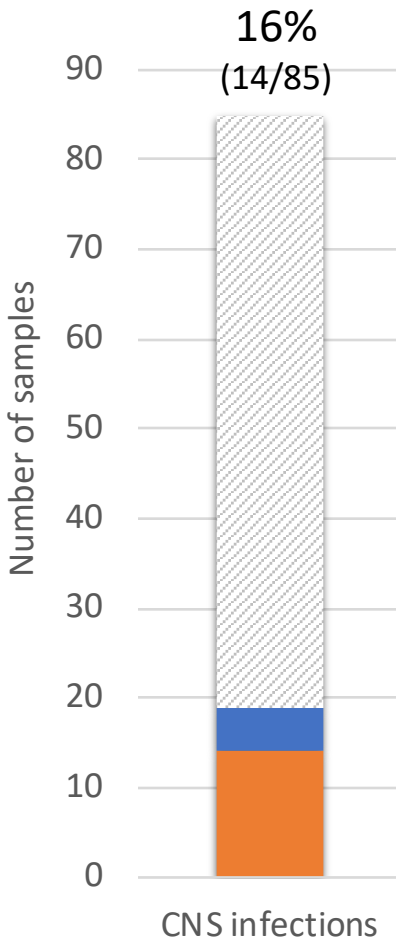
Woerther, Surgers et al.; (in redaction)

Diagnostic pan-pathogène par métagénomique clinique, retour d'expérience en routine



Woerther, Surgers et al.; (in redaction)

Diagnostic pan-pathogène par métagénomique clinique, retour d'expérience en routine



Cache de grandes disparités de pratiques:

- Méningites peu explorées
- Encéphalites explorées par LCR, contributivité ?

Positive-Contributive Positive-Non Contributive Negative

Woerther, Surgers et al.; (in redaction)

Conclusion

- La métagénomique présente un potentiel important pour une exploration plus approfondie des infections du SNC
- Elle présente un avantage décisif dans 3 situations cliniques importantes :
  - Ne pas rater l'évidence -> Exhaustivité du screening de micro-organisme
  - Trouver le mouton à 5 pattes
  - Découvrir de nouveaux pathogènes
- Elle permet des avantages organisationnels :
  - Un seul prélèvement
  - Un seul labo
- Elle permet en plus une caractérisation des pathogènes sans refaire de manipulation expérimentale
- Elle permettra dans le futur de données des caractéristiques importantes sur l'hôte pour améliorer la prise en charge

Perspectives :

nature reviews neurology

Explore our content ⌄ Journal information ⌄

nature › nature reviews neurology › review articles › article

Review Article | Published: 13 July 2020

Metagenomics for neurological infections — expanding our imagination

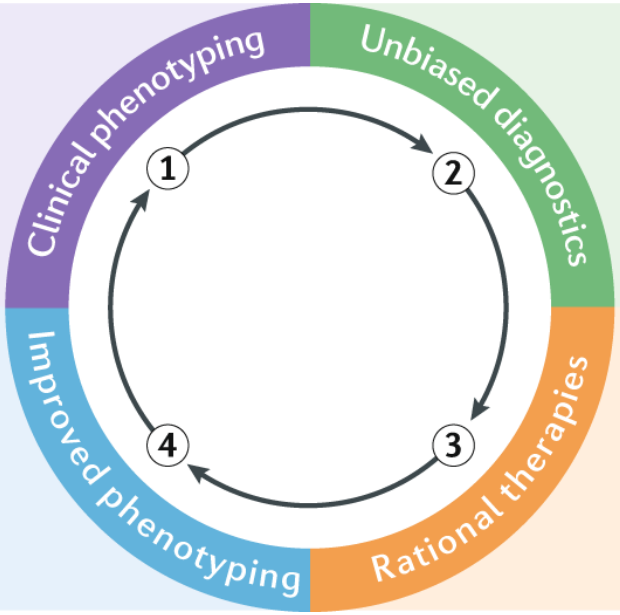
Prashanth S. Ramachandran & Michael R. Wilson ✉

Nature Reviews Neurology **16**, 547–556(2020) | Cite this article

2787 Accesses | **3** Altmetric | Metrics

Prior knowledge combined with the patient history, physical examination, neuroimaging and initial laboratory studies form the backbone for the initial differential diagnosis.

Knowledge about clinical course and response to therapy is enhanced by a better understanding of the underlying aetiology and improves future patient evaluations.



Metagenomic next-generation sequencing allows the neurologist to test for infections that are part of their differential diagnosis as well as for unanticipated infections.

A comprehensive approach to ruling in or ruling out infectious causes of meningitis and encephalitis enables more confident decisions about antimicrobial and/or anti-inflammatory therapies.

Remerciements

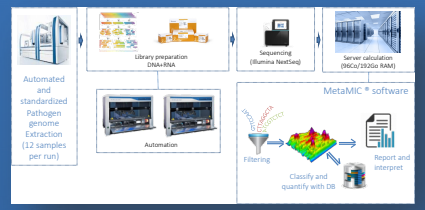
MetaMIC Project

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

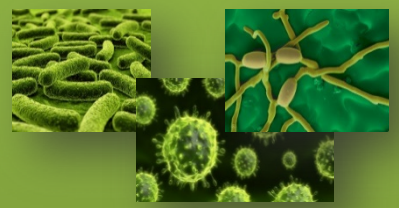
Inserm U955 Team 18

French National Reference Center for hepatitis

Microbiology Dpt of Henri Mondor Hospital, Créteil, France

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

Clinicians from Mondor, St Antoine Necker, Pitie Salpetrière, Paris France



Sponsors

INSTITUT MONDOR DE RECHERCHE BIOMÉDICALE

UPEC
UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL

Département Hospitalo-Universitaire
DHU VIC
VIRUS-IMMUNITÉ-CANCERS

anrs France REcherche Nord & sud Sida-hiv Hépatites
Agence autonome de l'Inserm

Inserm

HÔPITAUX UNIVERSITAIRES HENRI MONDOR