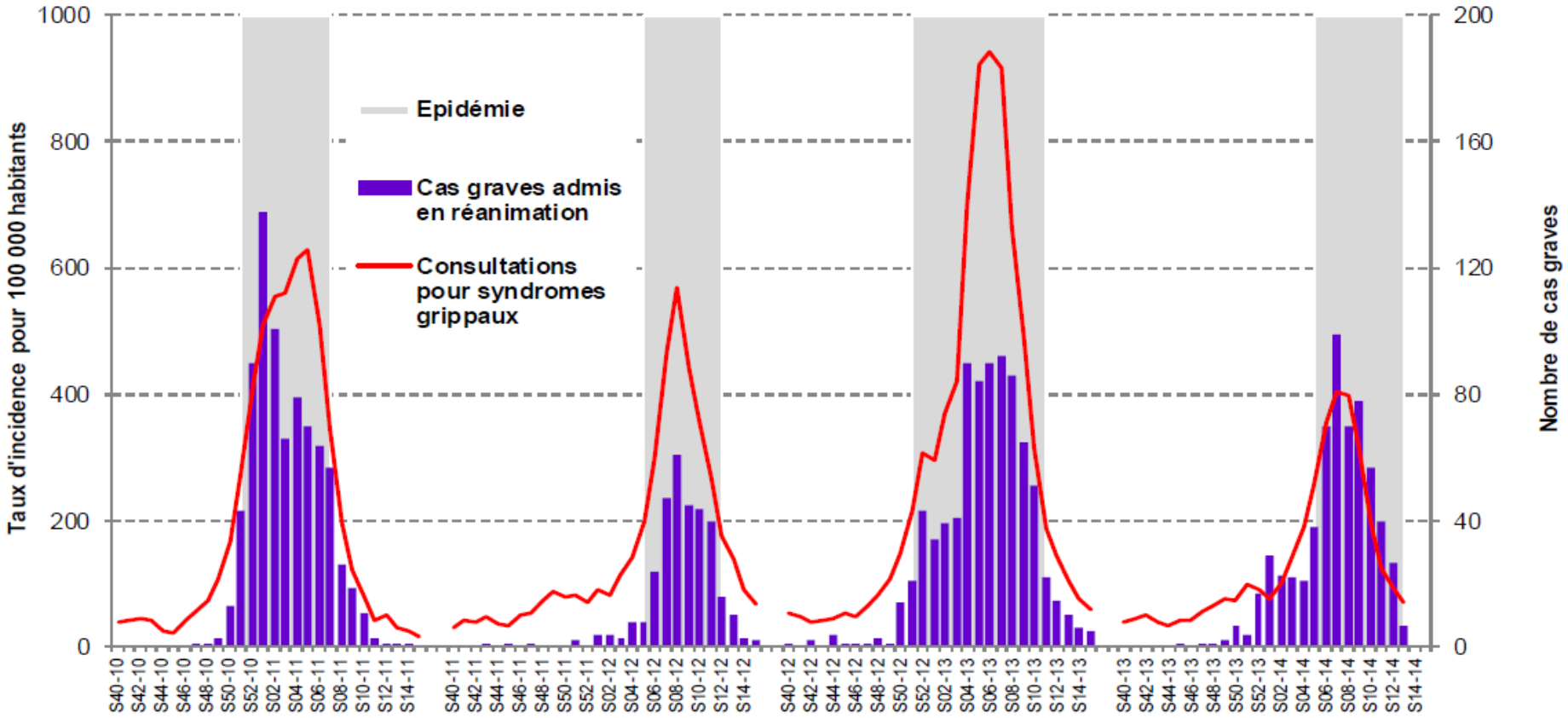
Intérêt du séquençage haut débit dans la surveillance et la prise en charge des formes graves de la grippe

Laurence Josset
Laboratoire de Virologie Est
Centre de Biologie & Pathologie Est
Hospices Civils de Lyon

Hospices Civils de Lyon

Cas graves de grippe en France



2 avril 2014

> Surveillance des cas graves de grippe admis en réanimation

En semaine 13, **33** nouveaux cas graves de grippe admis en réanimation ont été signalés à l'InVS, soit un total de **616** cas graves depuis le 1er novembre 2013. Le pic d'admission a été atteint en semaine 7 (Figure 1).

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE

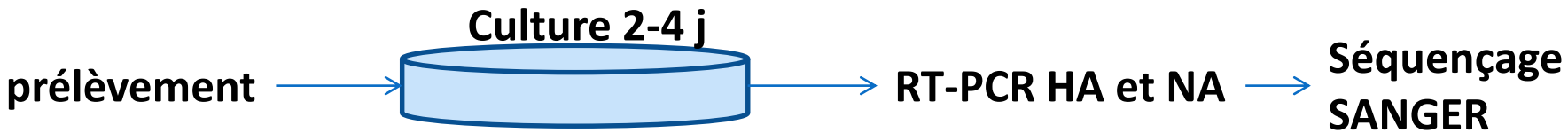
Hospices Civils de Lyon

Tableau 1 Description des cas graves de grippe admis en réanimation, France, 02/04/2014

Statut virologique	Effectifs	%
A(H3N2)*	42	7%
A(H1N1)pdm09	250	41%
A non sous-typé	293	48%
B	15	2%
Non typés	5	1%
Non confirmés	11	2%
Classes d'âge		
0-4 ans	33	5%
5-14 ans	12	2%
15-64 ans	368	60%
65 ans et plus	203	33%
Non renseigné	0	0%
Sexe		
Sexe ratio M/F - % d'hommes	1,5	59%
Facteurs de risque de complication		
Aucun	93	15%
Grossesse sans autre comorbidité	9	1%
Obésité (IMC≥30) sans autre comorbidité	45	7%
Autres cibles de la vaccination	463	75%
Non renseigné	6	1%
Statut vaccinal		
Non Vacciné	406	66%
Vacciné	92	15%
Non renseigné ou ne sait pas	118	19%
Gravité		
SDRA (Syndrome de détresse respiratoire aigu)	345	56%
Ecmo (Oxygénation par membrane extracorporelle)	52	8%
Ventilation mécanique	355	58%
Décès	78	13%
Total	**616**	**100%**

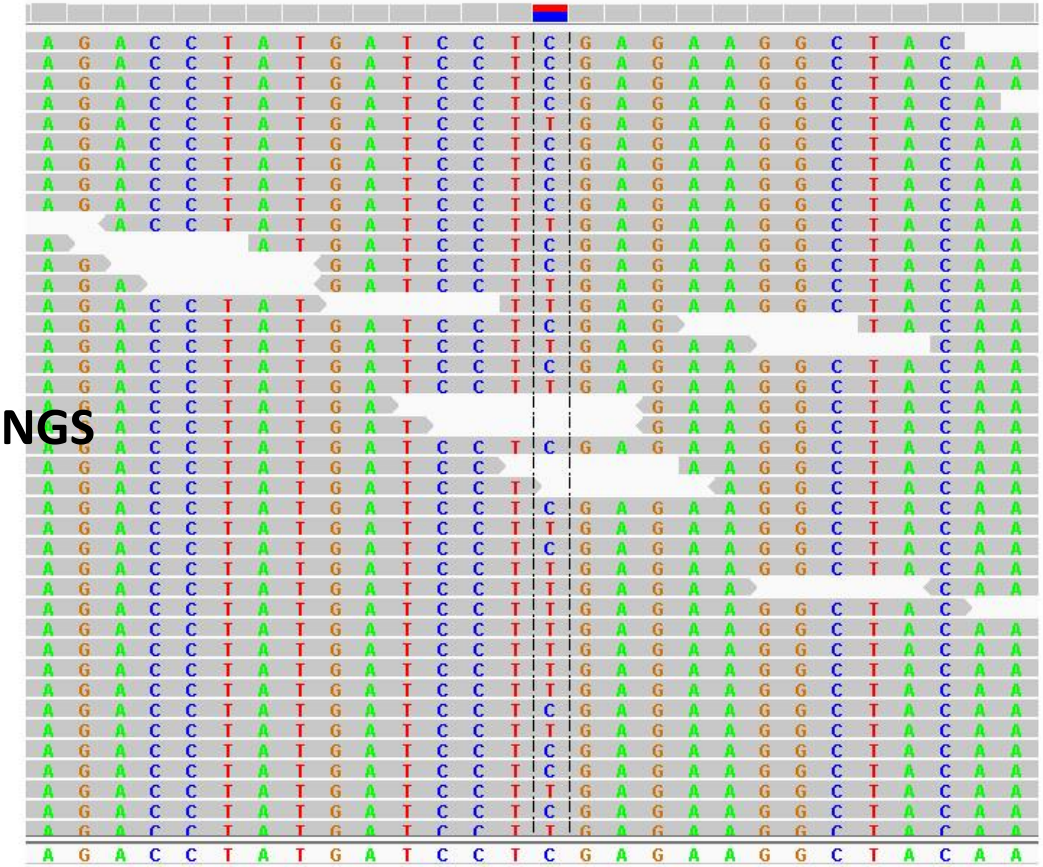
Surveillance des grippes sévères actuellement

- Techniques conventionnelles de séquençage par RT-PCR puis électrophorèse capillaire:
  - Séquençage de la séquence majoritaire
  - Nécessitent plusieurs couples de primers = données de séquences qui doivent être réactualisées si variation génétique du virus
  - long



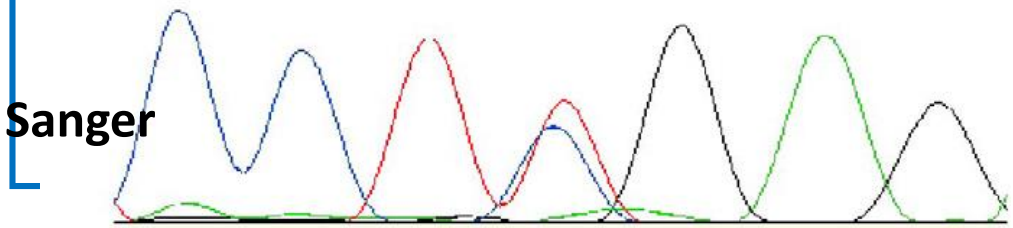
Hospices Civils de Lyon

Next Generation Sequencing (NGS)



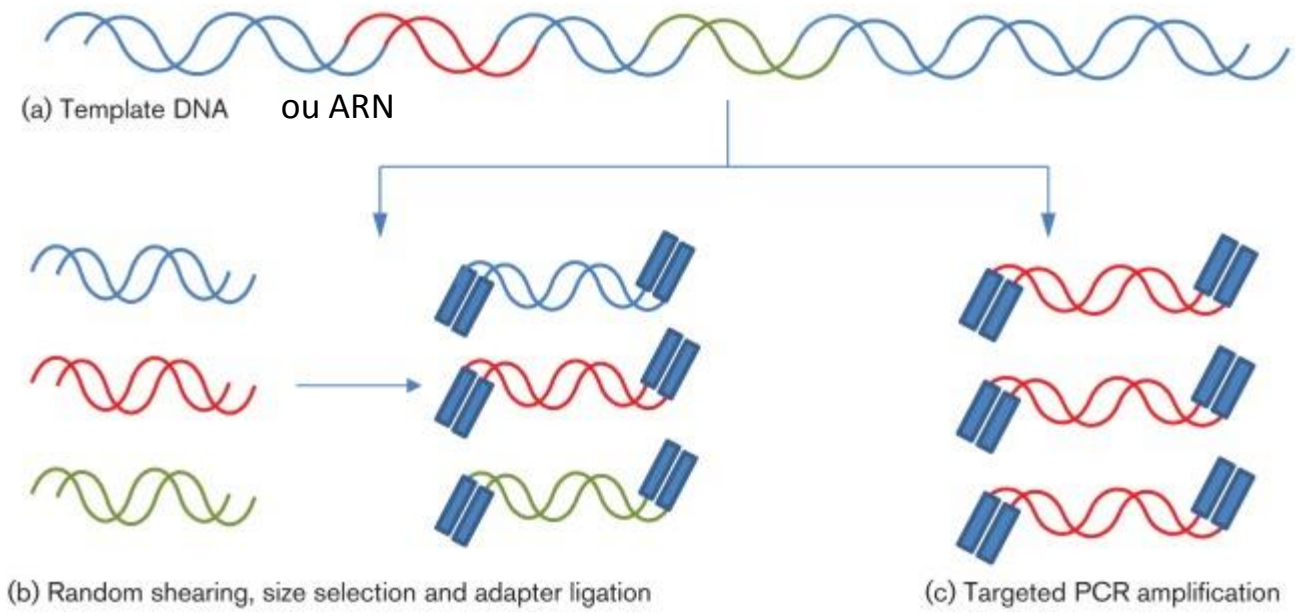
Séquençage très haut débit ou NGS :

- séquençage parallèle massif
- 1 million à 45 billions de séquences courtes (*reads*) par essai



Hospices Civils de Lyon

Le NGS permet un séquençage global ou ciblé



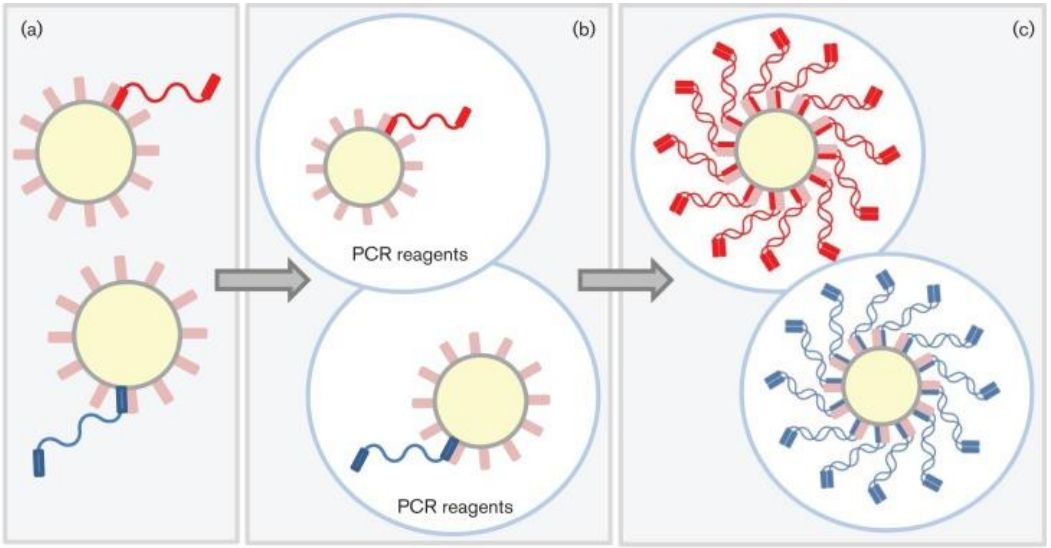
- Transcriptomique (RNA-Seq)
- Métagénomique
- …

- Séquençage ciblé du génome viral (amplicon)
- Séquençage de panel de gènes pour la recherche de SNPs
- …

Radford et al, J Gen Virol, 2012

Hospices Civils de Lyon

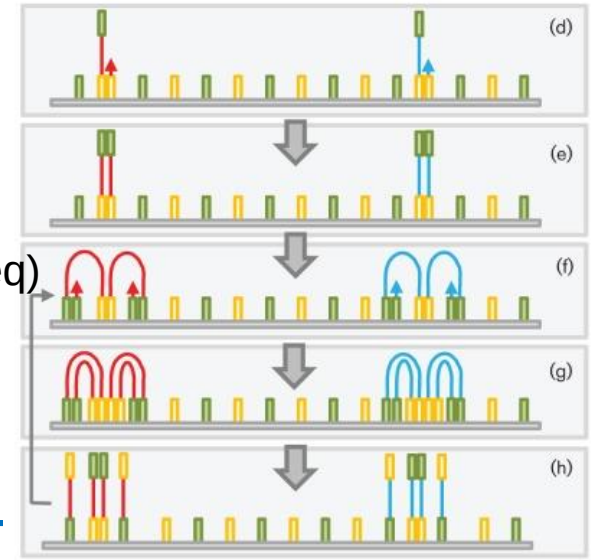
Différentes technologies

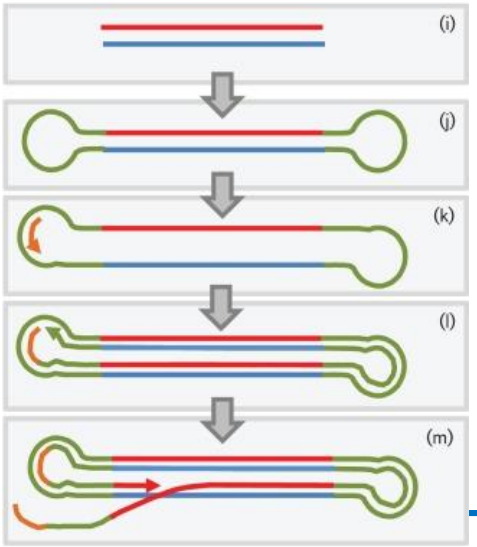


Life technologies
(Ion PGM et Ion Proton)

Roche
(454, GS Junior)

Illumina
(MiSeq, GAIIx, HiSeq)





Pacific Biosciences
(PacBio RS II)

Radford et al, J Gen Virol, 2012

Hospices Civils de Lyon

Intérêts du NGS pour le suivi des grippes graves

- Séquençage massif et rapide du génome viral complet
- Etude de l'influence du microbiome du patient sur la sévérité de l'infection
- Etude de la réponse de l'hôte à l'infection
- Analyse de la susceptibilité génétique aux grippes graves

Hospices Civils de Lyon

Applications attendues du NGS pour le suivi des grippes graves

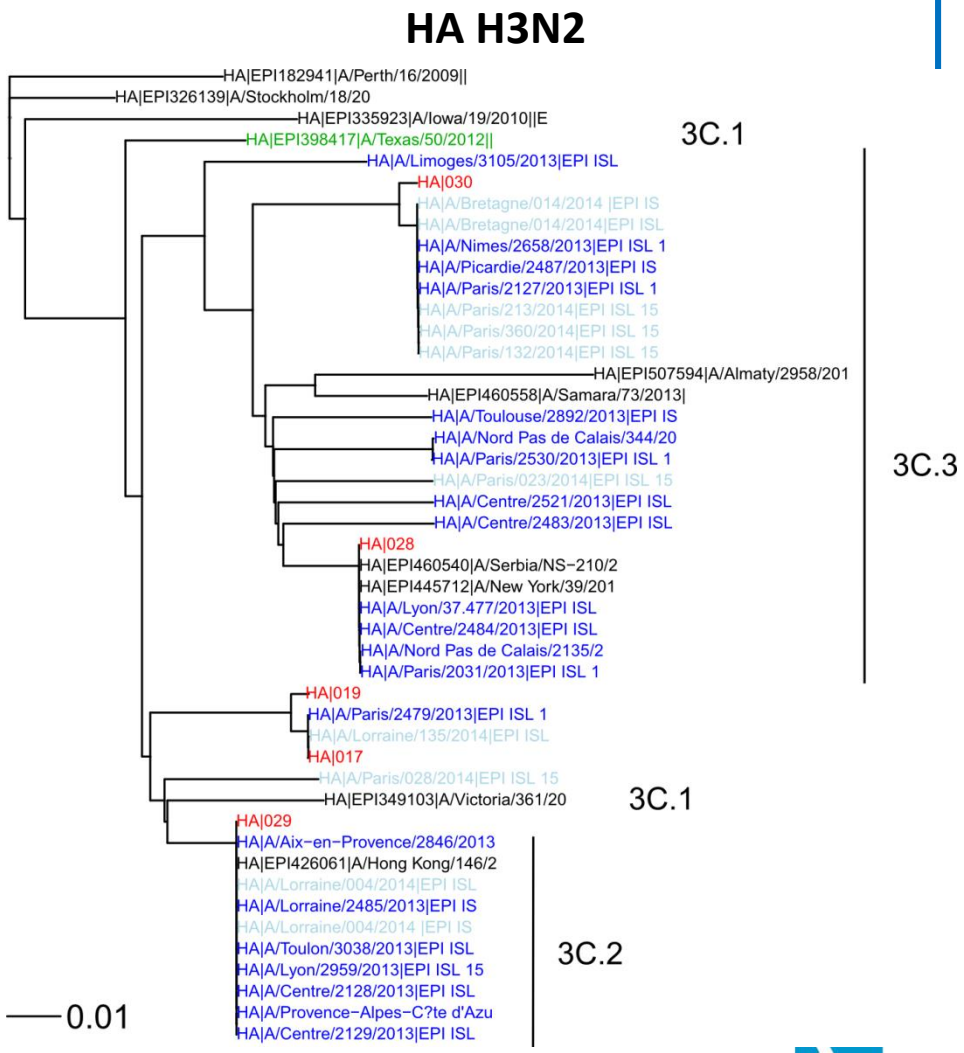
- Séquençage rapide du génome viral complet
  - détection de facteurs de virulence et mutations de résistance aux antiviraux
  - y compris pour une population virale minoritaire

Protein	Segment	Function	Pathogenicity determinant		Reference
			High	Low	
PB2	1	Polymerase cofactor, binds most mRNA caps	627K[A]	627E[B]	80
PB2	1	Polymerase cofactor, binds most mRNA caps	701N	701D	89
PB1	2	Polymerase cofactor, RNA-dependent RNA polymerase	–	–	–
PB1-F2	2	Proapoptotic	66S	66N	5
PA	3	Polymerase cofactor endonuclease activity, elongation factor?	–	–	–
HA	4	Membrane glycoprotein, binding, and fusogenic functions	Multi-basic cleavage site	Single-basic cleavage site	79
NP	5	Component of RNP, encapsidates vRNA segments	–	–	–
NA	6	Membrane glycoprotein, sialidase	274Y[C]	274H	–
M1	7	Lies under the viral envelope	–	–	–
M2	7	Membrane protein, forms ion channel	–	–	
NS1	8	Evasion of host immune response	92E	92D	102
NS1	8	Evasion of host immune response	C-terminal E-S-E-V motif	C-terminal deletion	105, 106
NEP	8	Nuclear export of vRNPs	–	–	–

Tscherne and García-Sastre, *J Clin Invest.* 2011

Grippes sévères à Lyon 2013-2014

- Sélection de 15 patients présentant un SDRA **sans facteurs de risque** sur 182 patients hospitalisés en réanimation avec grippe positive.
- Séquençage du génome viral complet sur Ion PGM



Hospices Civils de Lyon

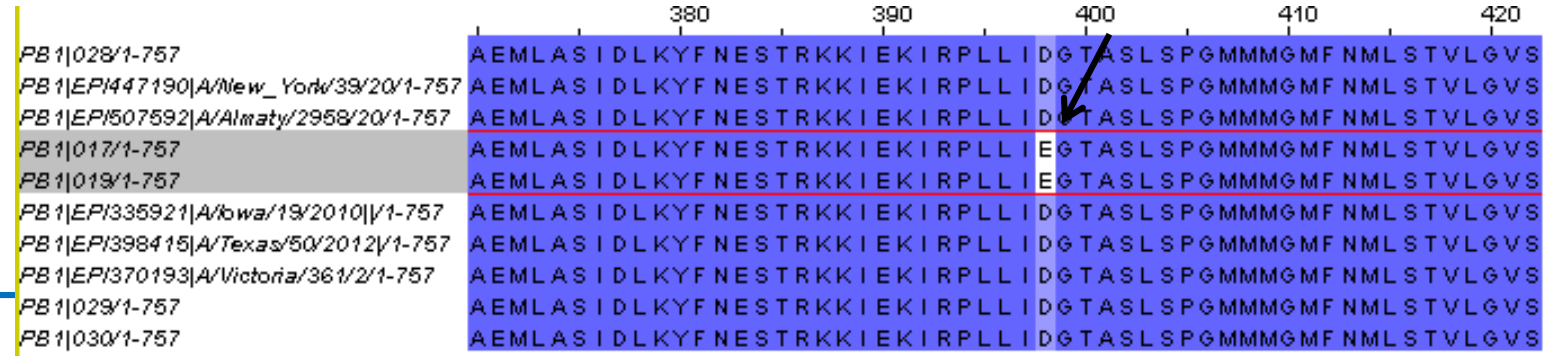
Grippes sévères à Lyon 2013-2014

Caractérisation des virus H3N2 associés à des grippes sévères :

- PB2 627K, 701D
- NS1 92D
- M2 31N (Amantadine^{R}), N2 292R (Oseltamivir^{S})

PA H3N2

PB1 H3N2

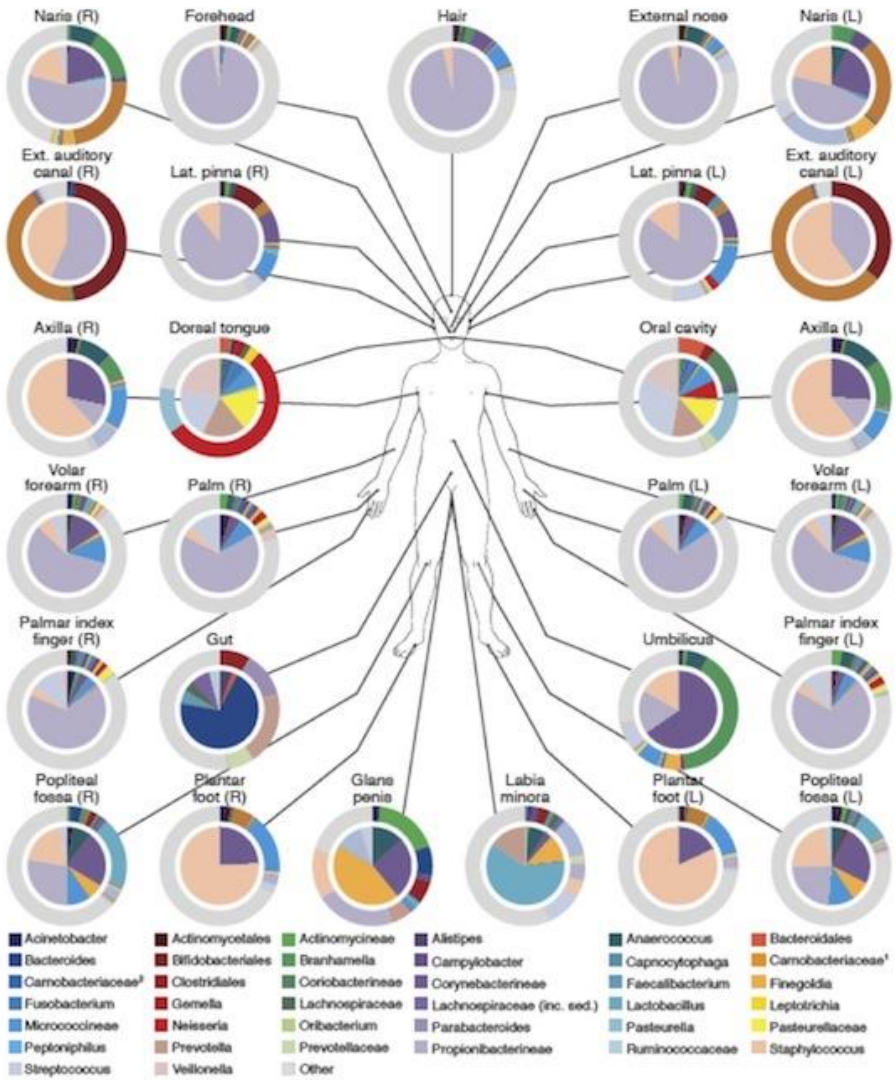


Intérêts du NGS pour le suivi des grippes graves

- Séquençage massif et rapide du génome viral complet
- Etude de l'influence du microbiome du patient sur la sévérité de l'infection
- Etude de la réponse de l'hôte à l'infection
- Analyse de la susceptibilité génétique à la grippe

Hospices Civils de Lyon

Microbiome et maladie

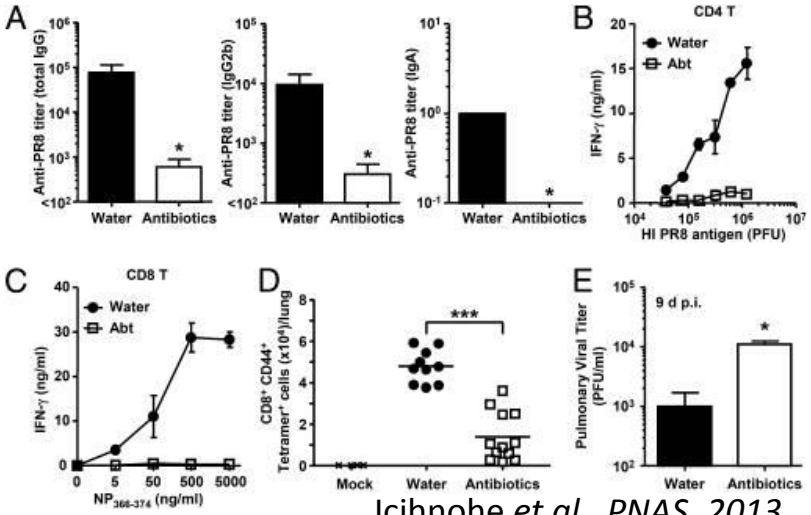


Costello *et al*, 2009

- L'altération du microbiome est impliquée dans de nombreuses maladies respiratoires:
  - BPCO
  - Asthme
  - mucoviscidose

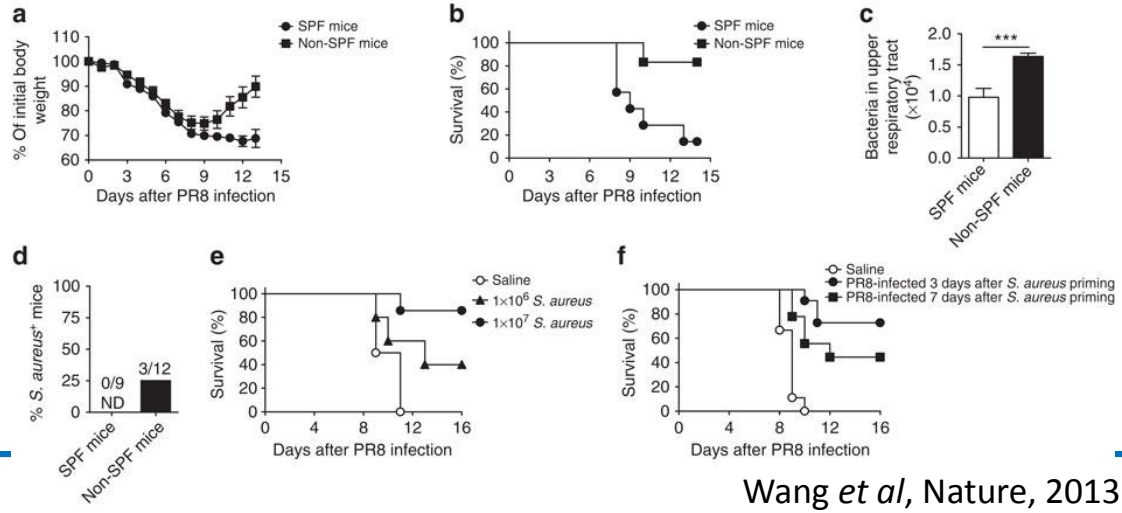
Hospices Civils de Lyon

Les bactéries commensales protègent contre la grippe



Icihnohe *et al., PNAS, 2013*

Le microbiote commensal régule la mise en place de la réponse immunitaire adaptative contre la grippe.



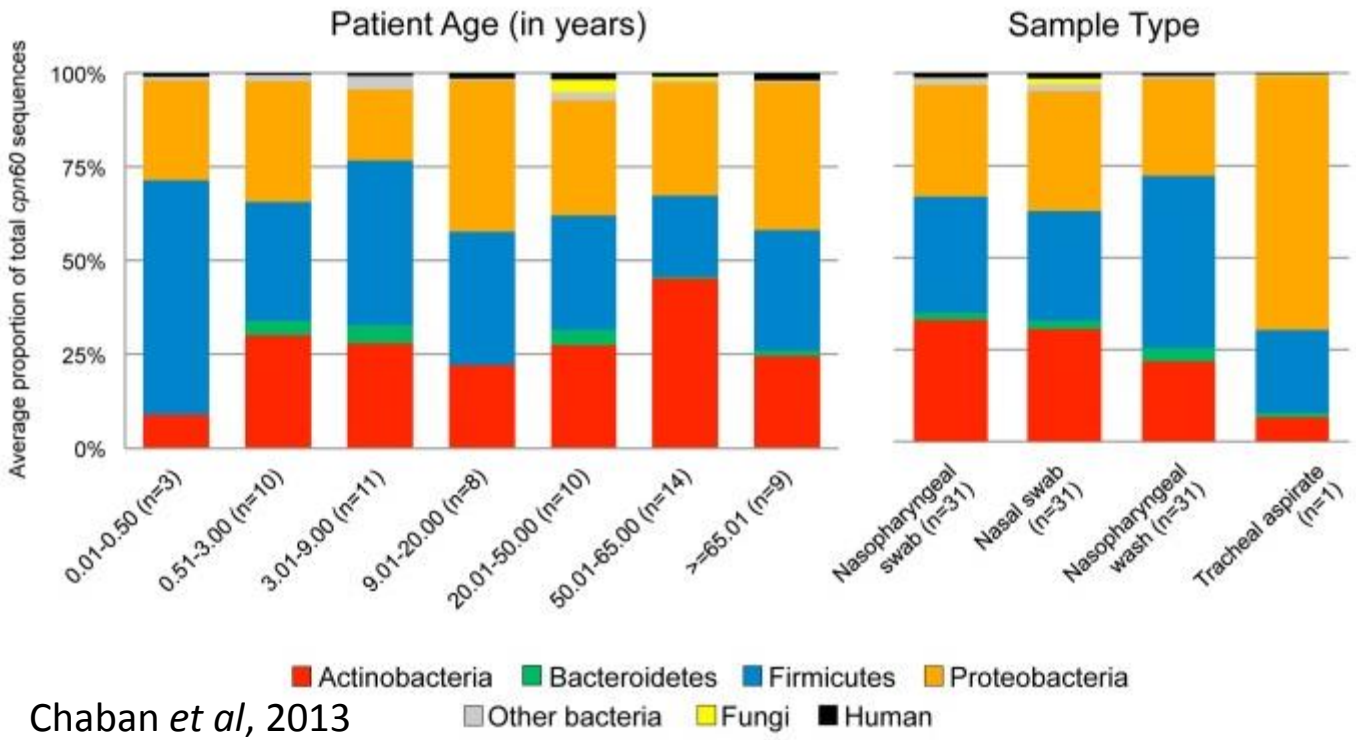
Le microbiote des voies respiratoires protège de la grippe en atténuant la réponse inflammatoire via induction de macrophage alvéolaire M2.

Wang *et al*, Nature, 2013

Hospices Civils de Lyon

Microbiome respiratoire et grippe

Le microbiome des voies aériennes supérieures chez les patients infectés par H1N1 2009 varie selon l'âge et le type de prélèvement.



Variation selon gravité?

Chaban *et al*, 2013

Hospices Civils de Lyon

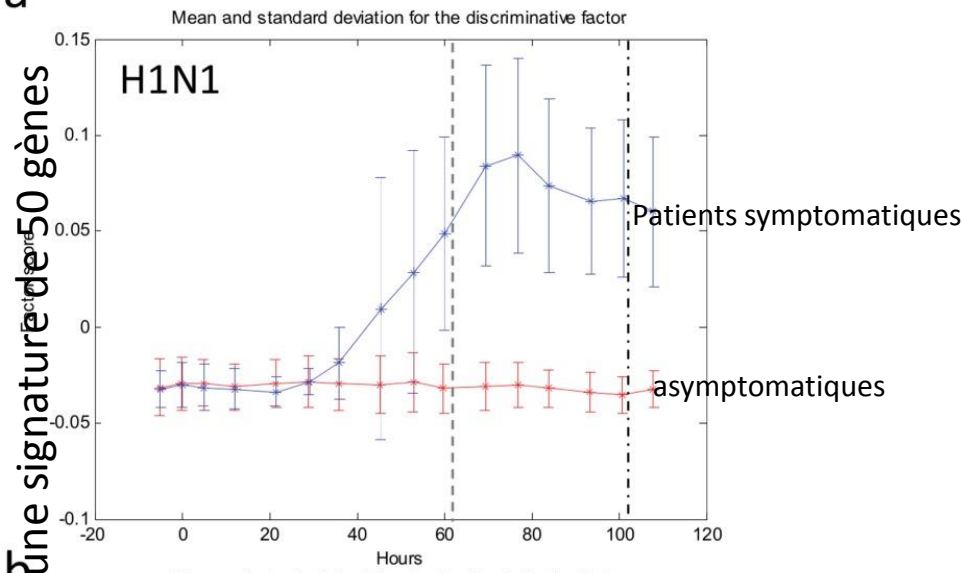
Intérêts du NGS pour le suivi des grippes graves

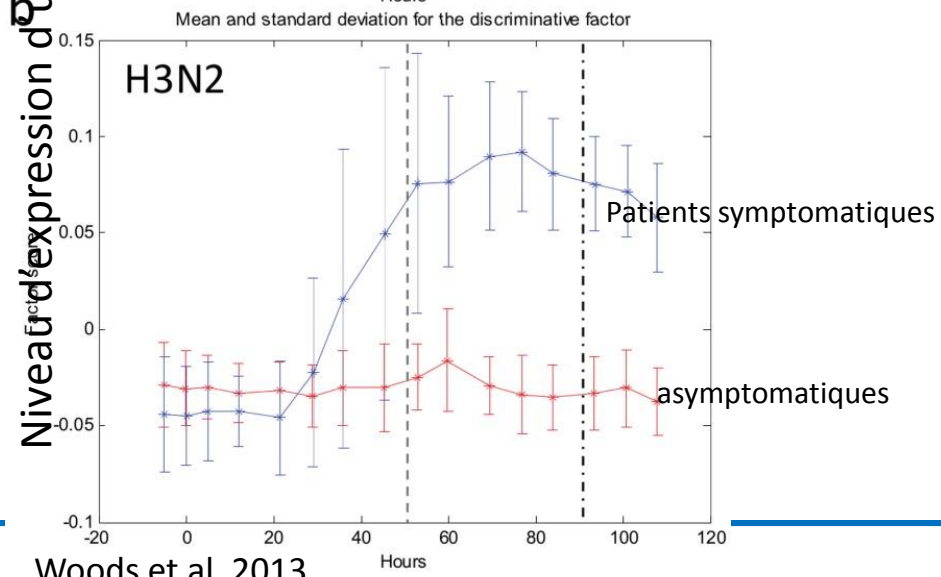
- Séquençage massif et rapide du génome viral complet
- Etude de l'influence du microbiome du patient sur la sévérité de l'infection
- Etude de la réponse de l'hôte à l'infection:
  - Transcriptomique : Recherche de biomarqueurs prédictifs de l'évolution vers des grippes graves
  - Repositionnement de médicaments
- Analyse de la susceptibilité génétique aux grippes graves

Hospices Civils de Lyon

Biomarqueurs prédisant l'évolution clinique

a





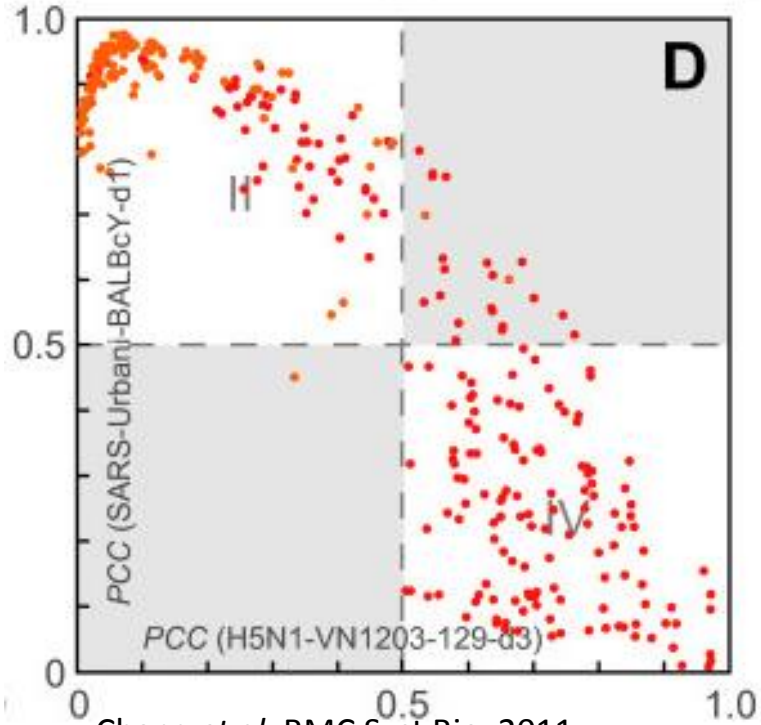
Niveau d'expression d'une signature de 50 gènes

Woods et al, 2013

Signature de 74 gènes discriminant infection par:

- High Pathogen influenza
- Low pathogen influenza

chez la souris

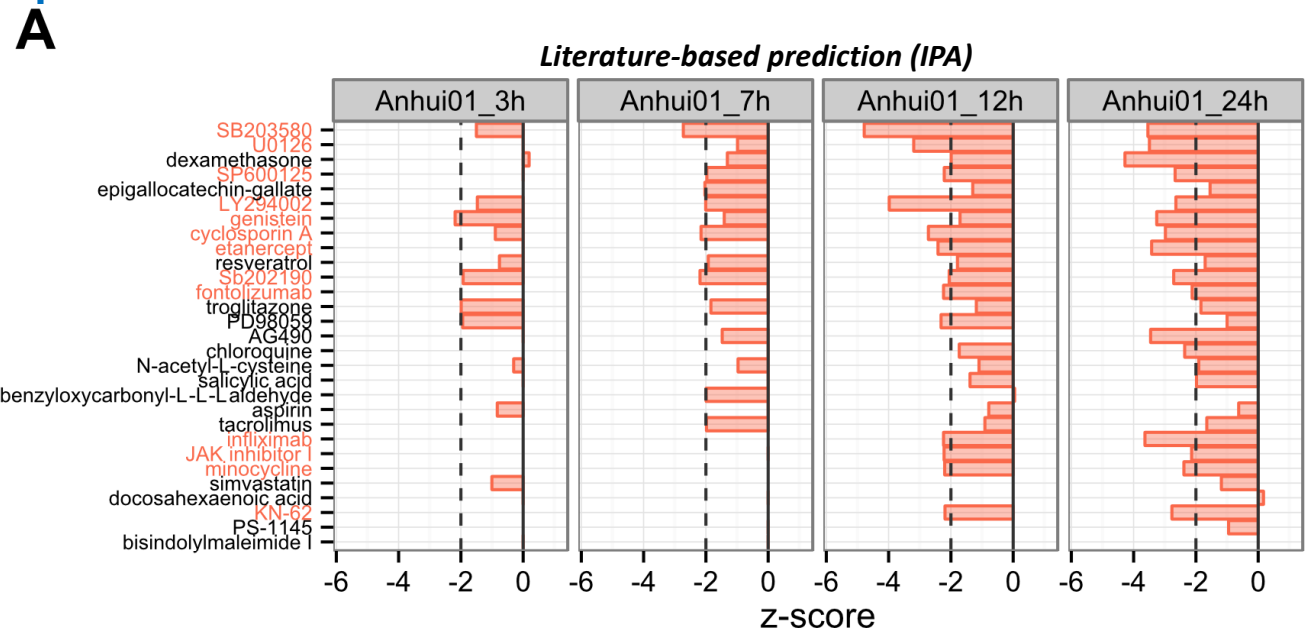


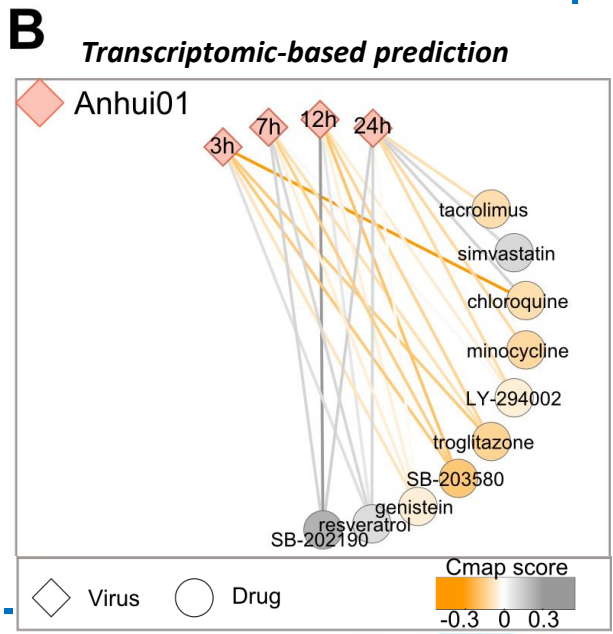
Chang *et al*, BMC Syst Bio, 2011

Hospices Civils de Lyon

L'étude de la réponse transcriptomique permet de prédire des médicaments pouvant bloquer l'infection

Hypothèse : La réponse cellulaire transcriptomique à l'infection représente un état cellulaire globalement favorable à l'infection. L'inversion de cette signature par des molécules, pourrait constituer un état cellulaire globalement défavorable au cycle viral.





Josset *et al*, 2014, mBio

Hospices Civils de Lyon

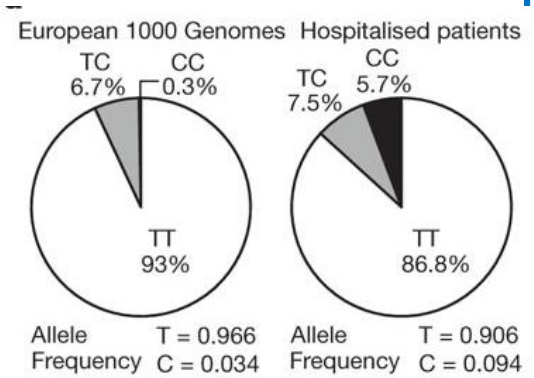
Intérêts du NGS pour le suivi des grippes graves

- Séquençage massif et rapide du génome viral complet
- Etude de l'influence du microbiome du patient sur la sévérité de l'infection
- Etude de la réponse de l'hôte à l'infection
- Analyse de la susceptibilité génétique aux grippes graves

Hospices Civils de Lyon

Susceptibilité génétique à la grippe

- Polymorphismes associés à des pneumonies sévères:
  - *CD55* (Zhou *et al*, 2012)
  - *FCGR2A,RPAIN,C1QBP* (Zúñiga 2012)
  - *IFITM3* (Everitt *et al*, 2012)
  - *TNF* (Antonopoulou *et al*, 2012)
- À des encéphalopathies aigues :
  - *TLR3* (Hidaka *et al*, 2006)
  - *CPT-II* (Chen *et al*, 2005) (Mak *et al*, 2011)



Everitt et al.,Nature, 2012

Hospices Civils de Lyon

Conclusions : Intérêts du NGS pour le suivi des grippes graves

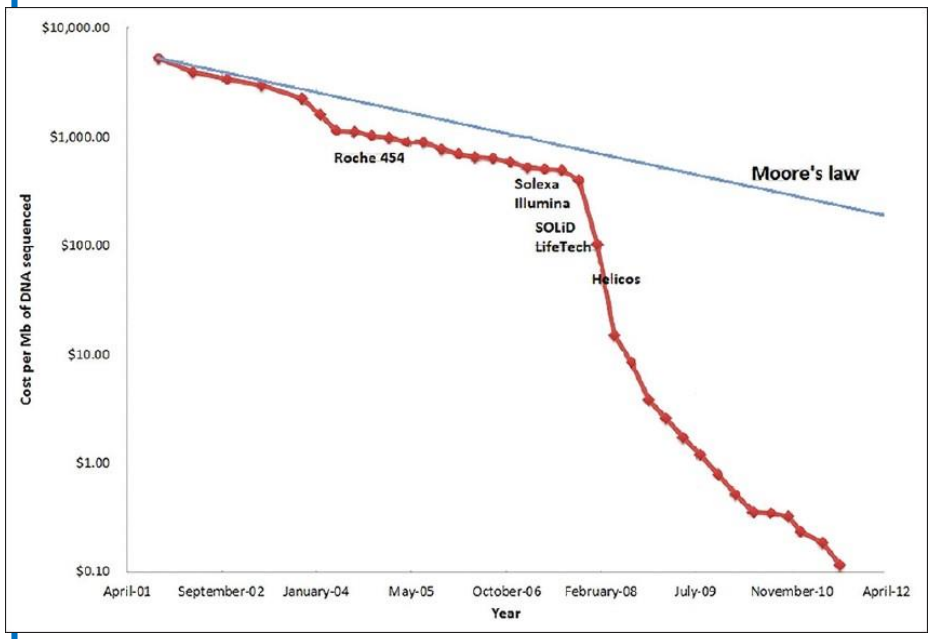
- Séquençage du génome viral complet
- Caractérisation du rôle du microbiome dans les grippes sévères

- Etude de biomarqueurs prédictifs (ARNm)
- Identification de marqueurs génétiques de prédisposition

Meilleure surveillance et annotation du génome viral
Vers une prise en charge prédictive et personnalisée des grippes sévères

Hospices Civils de Lyon

En pratique, NGS, quelle faisabilité en routine?



- Coût :
  - Séquençage génome complet par NGS : 80€
  - Sanger HA et NA : 60€
  - Métagénomique et transcriptomique : 500€
- Analyse et stockage des données :
  - Mise au point de workflow informatique standardisé
  - Base de données pour l'annotation des séquences

Hospices Civils de Lyon

Remerciements

- Laboratoire de virologie est, HCL
  - B. Lina
  - C. Picard
  - V. Escuret
  - I. Schuffenecker
  - E. Frobert
  - F. Morfin
  - Y. Mekki
  - G. Billaud
- CNR Influenza Sud
  - M. Valette
  - M. Bouscambert

Hospices Civils de Lyon