



HAL
open science

Application des techniques de séquençage à haut-débit dans le diagnostic d'urgence des méningites infectieuses

Quentin Kerharo

► **To cite this version:**

Quentin Kerharo. Application des techniques de séquençage à haut-débit dans le diagnostic d'urgence des méningites infectieuses. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03522971

HAL Id: dumas-03522971

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03522971>

Submitted on 12 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le vendredi 24 septembre 2021

Par M. KERHARO Quentin
Né le 31 mars 1992

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :
**Application des techniques de séquençage à haut-débit
dans le diagnostic d'urgence des méningites infectieuses.**

----oOo----

JURY :

Président : M. le Professeur Jean-Marc ROLAIN
Membres : M. le Professeur Michel DRANCOURT
M. le Professeur Pierre-Édouard FOURNIER
Mme le Professeur Laurence CAMOIN
Mme le Dr Sophie BARON

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le vendredi 24 septembre 2021

Par M. KERHARO Quentin
Né le 31 mars 1992

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :
**Application des techniques de séquençage à haut-débit
dans le diagnostic d'urgence des méningites infectieuses.**

----oOo----

JURY :

Président : M. le Professeur Jean-Marc ROLAIN
Membres : M. le Professeur Michel DRANCOURT
M. le Professeur Pierre-Édouard FOURNIER
Mme le Professeur Laurence CAMOIN
Mme le Dr Sophie BARON

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

***« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES.
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS. »***

Remerciements

Aux membres du jury,

A Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN, pour avoir accepté de me faire l'honneur de votre présence à la présidence de mon jury de thèse, et pour m'avoir transmis votre intérêt pour ce sujet.

A Monsieur le Professeur DRANCOURT pour m'avoir permis de mener à bien cette thèse et pour la confiance que vous m'avez accordé, pour votre encadrement et vos précieux conseils, et pour les précieuses rencontres que vous m'avez permis de faire.

A Madame le Docteur Sophie BARON, pour avoir accepté de m'encadrer dans ce travail, pour ton enthousiasme et ta bienveillance, et pour tous tes conseils, je souhaiterais t'exprimer ici toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Pierre-Édouard FOURNIER, pour avoir accepté de juger ce travail.

A Madame le Professeur Laurence CAMOIN, pour l'honneur que vous me faites par votre présence à mon jury de thèse.

A Madjid MORSLI, véritable compagnon dans cette aventure, et grâce à qui j'ai beaucoup appris, je souhaite t'exprimer ici mon respect et ma reconnaissance, travailler ensemble fut une expérience des plus enrichissante.

A Papa et Maman, sans qui rien n'aurait été possible,

Et pour qui les études de leur fils à parfois été un tracas,

A mon cher Père, pour m'avoir transmis des valeurs, pour les passions que tu m'as communiquées et pour m'avoir toujours poussé de l'avant.

A ma tendre Mère, Pour ta tendresse et ton amour, et pour les sacrifices que tu as pu faire pour moi, je serai toujours là pour toi.

A Maud, Sébastien, Lilly et Loïse à qui je pense fort, je vous souhaite tout le bonheur du monde.

A mes grands-parents, qui ne sont plus ici.

A mes oncles et tantes, à qui je pense toujours.

A tous ceux qui me connaissent depuis toujours :

A mon gros Bast, voilà près de 20 ans que je te connais c'est dire le nombreuses d'aventures que nous avons passées ensemble. Je voudrais te témoigner ici mon plus grand respect pour ce que tu fais.

A Berti, pour ton sens de l'initiative, ta motivation et ta bonne humeur, il faut vraiment que l'on se refasse une semaine dans les Pyrénées.

A mon Foué, parce que tu me fais toujours autant rire, prend bien soin de Juju et de la cabine.

A mon Lambert, pour ta bonne humeur et ta détermination.

A Perrat, pour m'avoir permis de connaître l'époque sacrée des mobylettes.

A Bodon, que j'ai failli oublier.

A Clem, pour nos longues conversations à refaire le monde.

A Momo, avec qui nous avons longuement zoné aux tables.

A Santa, merci de me régaler de ta personne.

A Chen,

A Memelle, pour ton sens de la famille.

A Ricco, et à tous les Mexicains.

A Narness, j'espère que tu te portes bien.

A tous les bras cassés de l'USR,

JC et Jeff, Kiki, Fanfan, Crokette, Lambeau, Clem et les Louvito. A Enzo, Big Mac et Breton.

A tous les Bretons,

A tous les gros,

A tous ceux que j'ai connu depuis,

A mes copains du Lycée,

Léopoldine, tu m'as été d'un soutien précieux lors de la première année.

A Hasna, qui m'a beaucoup trop fait rire toutes ces années.

A Alexis, qui m'a accordé son amitié.

A Tom, pour ton sens développé de la langue.

A Sophie, Mickael, Camille, Teypaz,

A mes copains de la Fac,

A Mathieu, Julie, Marion, Anthonin, Leonie, Marina, Maeva, Dalila

A Theo, pour tes précieux conseils.

A Baptise, mon coloc, pour ton soutien et ton amitié.

A Laetitia,

A mes copains de Marseille,

A Xavier, mon ami et compagnon de voyage, vivre loin de toi est une souffrance.

A Paga, que je pourrais considérer comme un mentor.

A Astrid, pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

A Polo et Segó, qui me font bien rire aussi.

A Celia, merci de ta bienveillance.

A Sam, pour ce que tu es.

A Ségo, Leo, Elsa, Clémence, Estelle, Céline, Marco, Nono,

A tous ceux qui m'ont formé,

Aux Dr. C. GROSDIDIER, Pr. V. BACCINI, Dr. P-A MOULIN,

Aux Dr. Anne-Marie LOREC-PENET, C. Gras,

Aux Dr. C. ZANDOTTI, Dr A. MOTTE, Dr S. AHERFI, Dr. L. NINOVE,

Aux Dr. J. BOUCRAUT, Dr. D. BERTIN,

Aux Dr D. BERTEI, Dr. P. PALMER, Dr. P. SAUGET,

Aux Dr. G. DUBOURG, Dr. F. GOURIET, Dr. L. LUCIANI,

Aux Dr M. IBRAHIM, Dr. P. SUCHON

Et tous les techniciens qui m'ont appris,

A mes co-internes,

A JP,

A Lucie,

A tous ceux que j'ai rencontré en route,

A ceux que j'ai oubliés,

A Laura, mon chat, toi qui partages ma vie depuis deux ans maintenant, je me réjouis chaque jour de ta présence à mes côtés, merci pour tes conseils si précieux. Je t'aime.

Table des matières

INTRODUCTION	5
LES INFECTIONS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	7
CONNAISSANCES PHYSIOPATHOLOGIQUES	7
<i>Méningite</i>	<i>7</i>
<i>Encéphalite</i>	<i>8</i>
DIAGNOSTIC CLINIQUE	8
<i>Signes clinique évocateurs</i>	<i>8</i>
<i>Signes de gravité</i>	<i>8</i>
<i>Diagnostics différentiels.....</i>	<i>9</i>
<i>Prélèvements biologiques.....</i>	<i>9</i>
<i>Aspects paracliniques.....</i>	<i>10</i>
ÉPIDEMIOLOGIE DES MENINGITES A L'INSTITUT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE MEDITERRANEE	
INFECTION DE MARSEILLE	11
STRATEGIES DIAGNOSTIC	16
LE LABORATOIRE POINT-OF-CARE.....	17
PLATEAU TECHNIQUE DE BACTERIOLOGIE	18
PLATEAU TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	20
METHODES DIAGNOSTIQUES AU LABORATOIRE	22
CYTOLOGIE ET EXAMEN DIRECT	22
ANALYSES BIOCHIMIQUES	22
CULTURE	25
TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	25
<i>PCR en temps-réel (RT-PCR).</i>	<i>25</i>
<i>PCR Multiplexe.....</i>	<i>26</i>
LES TECHNOLOGIES DE SEQUENÇAGE	27
ILLUMINA	28
LA TECHNOLOGIE OXFORD NANOPORE	29

TRAVAUX PERSONNELS	32
ARTICLE 1: <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> MENINGITIS DIRECT DIAGNOSIS BY METAGENOMIC NEXT-GENERATION SEQUENCING: A CASE REPORT.	33
ARTICLE 2: REAL-TIME WHOLE GENOME SEQUENCING DIRECT DIAGNOSIS OF <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> MENINGITIS: A CASE REPORT.....	39
AUTRES PARTICIPATIONS.....	53
DISCUSSION	55
CONCLUSION.....	57

Liste des figures

FIGURE 1 : REPARTITION DES PRELEVEMENTS DE LCR DANS LES DIFFERENTS LABORATOIRES D'ANALYSE.....	9
FIGURE 2 : ÉVOLUTION DU NOMBRE DE DEMANDES ET DE LCR AVEC UN GERME IDENTIFIE A L'IHU MEDITERRANEE INFECTION DE MARSEILLE ENTRE DECEMBRE 2014 ET SEPTEMBRE 2019.	11
FIGURE 3 : REPARTITION DES ÉTIOLOGIES DES MENINGITES COMMUNAUTAIRES A L'IHU.....	12
FIGURE 4 : REPARTITION DES ÉTIOLOGIES DES MENINGITES COMMUNAUTAIRES A L'IHU CHEZ LES PATIENTS DE MOINS DE 1 AN.	12
FIGURE 5 : REPARTITION DES ÉTIOLOGIES DES MENINGITES COMMUNAUTAIRES A L'IHU CHEZ LES PATIENTS AGES DE 1 A 18ANS.....	13
FIGURE 6 : REPARTITION DES ÉTIOLOGIES DES MENINGITES COMMUNAUTAIRES A L'IHU CHEZ LES PATIENTS DE 18 A 65 ANS.....	14
FIGURE 7 : REPARTITION DES ÉTIOLOGIES DES MENINGITES COMMUNAUTAIRES A L'IHU CHEZ LES PATIENTS DE PLUS DE 65 ANS.	14
FIGURE 8 : CIRCUIT ET ANALYSES DU LCR A L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.	16
FIGURE 9 : LE LABORATOIRE POINT-OF-CARE DE L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.	17
FIGURE 10 : LE PLATEAU TECHNIQUE DE BACTERIOLOGIE DE L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.	19
FIGURE 11 : UNE SALLE D'EXTRACTION D'ADN ET ARN DU PLATEAU TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DE L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.....	20
FIGURE 12 : LA PIECE DES PCR ET RT-PCR DU PLATEAU TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DE L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.	21
FIGURE 13 : DELAIS DE RENDU DES RESULTATS D'UN LCR A L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.	21
FIGURE 14 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE CELLULE DE SEQUENÇAGE ILLUMINA.	28
FIGURE 15 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN NANOPORE..	29
FIGURE 16 : MISE EN PLACE DU POC MINION AU LABORATOIRE POC DE L'IHU MEDITERRANEE INFECTION, MARSEILLE.....	54

Liste des tableaux

TABEAU 1 : ORIENTATION DIAGNOSTIQUE EN FONCTION DES RESULTATS PRELIMINAIRES DE L'ANALYSE DU LCR.....	24
TABEAU 2 : PRINCIPALES TECHNOLOGIES DE SEQUENÇAGE MISES SUR LE MARCHÉ DEPUIS LA TECHNIQUE SANGER.	27
TABEAU 3 : CARACTERISTIQUES, AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTES GENERATIONS DE SEQUENCEURS.	31
TABEAU 4 : COMPARAISON DES TECHNIQUES PCR MULTIPLEXE ET OXFORD NANOPORE DANS LE DIAGNOSTIC D'URGENCE DES MENINGITES INFECTIEUSES.....	57

Abréviations

AP-HM :	Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille
ARNr :	ARN ribosomique
CSF :	Cerebrospinal fluid
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
Gélose COS :	Gélose Columbia + 5% sang de mouton (bioMérieux®)
Gélose PVX :	Gélose « chocolat » + Polyvitex (bioMérieux®)
<i>H. influenzae</i> :	<i>Haemophilus influenzae</i>
HSV :	<i>Herpes simplex virus</i>
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
IHU :	Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille.
<i>L. monocytogenes</i> :	<i>Listeria monocytogenes</i>
LCR:	liquide céphalorachidien
MALDI-TOF-MS:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry
ME :	méningites et méningoencéphalites
MEI :	méningites et méningoencéphalites infectieuses
<i>N. meningitidis</i> :	<i>Neisseria meningitidis</i>
NR :	Non réalisable
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ONT :	Oxford Nanopore technologies
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PL :	Ponction lombaire
PT :	Plateau technique
<i>S. agalactiae</i> :	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. pneumoniae</i> :	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SMRT:	Single Molecule Real-Time
SPILF :	Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
<i>T. pallidum</i> :	<i>Treponema pallidum</i>
<i>T. whipplei</i> :	<i>Tropheryma whipplei</i>
TDM :	scanner tomodensitométrique

Introduction

Les infections du système nerveux central (SNC) relèvent de nombreuses étiologies pouvant, sur le plan clinique prendre plusieurs formes dont les plus fréquentes sont la méningite et l'encéphalite. D'autres présentations cliniques possibles (rhombencéphalite, abcès cérébral, encéphalomyélite, empyème sous-dural, etc...) ne seront pas abordées dans ce travail. Les méningites et méningoencéphalites (ME) sont caractérisées par une inflammation des méninges, brutale ou d'installation plus insidieuse. Leurs étiologies sont infectieuses et non infectieuses : maladies de système, méningites médicamenteuses, toxiques, néoplasiques, métaboliques ou vasculaires. Lorsque l'étiologie est infectieuse, il s'agit le plus souvent d'une affection grave et de haute morbi-mortalité (1, 2).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la méningite due à *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) présente une létalité de 50% et plus de 10% de séquelles lorsqu'elle n'est pas traitée (3). Les revues systématiques de la littérature sur la méningite aiguë purulente de l'adulte indiquent une mortalité globale de 17,6%, même si au cours de ces dernières décennies, les stratégies de prévention vaccinale, de diagnostic rapide et de thérapeutique dans les plus brefs délais ont permis une baisse de l'incidence et de la mortalité des méningites et méningoencéphalites infectieuses (MEI) dans le monde (4, 5).

Des efforts peuvent toutefois encore être fournis notamment dans le diagnostic et la compréhension épidémiologique de ces affections. En effet, même les études exhaustives n'ont permis d'identifier qu'entre 38% et 42% étiologies de ME (6, 7). Le séquençage génomique à haut débit n'est pas une technique nouvelle, cependant ses applications en médecine sont longtemps restées limitées à la recherche de mutations génétiques, et ce n'est que récemment que ces technologies sont arrivées en médecine des maladies infectieuses par une approche métagénomique (8). Devenus plus accessibles, ces techniques semblent, de nos jours, être en capacité de compléter la technique de Polymérase Chain Réaction (PCR), dans le diagnostic moléculaire des MEI. Cette technologie présente l'avantage de permettre la recherche ouverte d'un agent étiologique et de récupérer une quantité d'information bien supérieure à celle de la PCR. En effet, contrairement à la PCR qui ne délivre qu'une information binaire de type positif ou négatif, le séquençage permet de révéler les séquences codant les protéines structurales et fonctionnelles de l'agent détecté. Ces données pourraient à terme avoir un impact bénéfique sur le patient et sa prise en charge.

Le but de notre travail de Thèse était d'évaluer l'intérêt d'une de ces technologies de séquençage à haut débit, la technologie Oxford Nanopore® (ONT), ainsi que sa faisabilité, en pratique dans le diagnostic d'urgence des MEI.

Nous rappellerons dans une première partie le diagnostic clinique des MEI, puis les différentes étiologies retrouvées à l'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection de Marseille. Nous aborderons ensuite les stratégies, méthodes diagnostic actuelles ainsi que les méthodes de séquençage disponibles. Enfin, nous discuterons les progrès mis en place et l'amélioration du laboratoire de point de soins POC pour (Point-of-care), puis nous illustrerons l'apport de ces travaux publiés et soumis pour publication afin de parvenir à notre objectif.

Les infections du système nerveux central

Connaissances physiopathologiques

Méningite

On appelle méningite l'inflammation des méninges et l'augmentation de la pression intracrânienne consécutive. Les méninges sont les enveloppes recouvrant le cerveau et la cavité interne de crâne. Elles sont au nombre de trois et s'appellent, de la plus extérieure à la plus intérieure : dure-mère, arachnoïde et pie-mère. L'espace situé entre l'arachnoïde et la pie-mère forme une cavité contenant le LCR ou liquide cébrospinal (CSF). Normalement stérile, la présence d'un germe dans le LCR est pathologique.

Le diagnostic de méningite est évoqué devant un syndrome méningé fébrile. Le syndrome méningé désigne la triade classique mais inconstante de céphalées violentes et en casque, de nausées ou vomissements, et d'une raideur méningée. Le syndrome méningé peut être cliniquement confirmé par la réalisation des tests cliniques de Babinski, Brudzinski et Kernig. A cette triade peuvent s'ajouter une photophobie, une phonophobie ou encore une altération de la conscience. La prévalence de cette triade clinique typique reste faible, cependant on estime que 95 % des patients ont au moins deux des signes précédemment cités (9). Le syndrome infectieux qui se manifeste par la fièvre et le malaise général, est fréquent et doit faire rechercher un foyer infectieux.

Certains signes cliniques peuvent orienter le diagnostic étiologique, notamment en cas de purpura fulminans évocateur d'une infection à *N. meningitidis* ou plus rarement à *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*).

La présentation clinique dépend aussi du terrain du patient avec des présentations parfois atypiques. Chez le sujet âgé on pourra retrouver des signes de confusion, désorientation, agitation et délire aigu. Chez le nouveau-né et le nourrisson, l'hypotonie remplace en général la raideur de nuque. Du fait des difficultés à réaliser un interrogatoire, une attention plus particulière devra être portée à ces patients.

Encéphalite

Les encéphalites, ou méningo-encéphalites lorsque des signes de méningite sont associés à une inflammation du parenchyme cérébral, se manifestent par des troubles neurologiques : somnolence, trouble de la conscience, syndrome confusionnel, hallucinations, coma, focalisation à type de déficit moteur, paralysie, aphasie, mouvements anormaux et épilepsie. La Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) recommande d'évoquer une encéphalite devant tout symptôme ou signe de dysfonctionnement du système nerveux central associé à de la fièvre dans les jours précédents (10).

Diagnostic Clinique

Signes clinique évocateurs

Certains signes peuvent être pathognomoniques d'une ou plusieurs affections. Le purpura fulminant est retrouvé dans les méningites à *N. meningitidis*, et plus rarement dans les méningites à *S. pneumoniae*. Des hallucinations liées à une localisation temporale sont retrouvées dans l'encéphalite à *Herpes simplex virus* (HSV) (11). Les paires crâniennes peuvent être atteintes dans les méningoencéphalites tuberculeuses ou à *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). L'hydrophobie, elle, est caractéristique de la rage (12). Des éruptions cutanées autre que purpuriques peuvent être retrouvées dans la rougeole, la rubéole, la varicelle, mais aussi dans les arboviroses et infections à Cryptocoque ou Histoplasme. Des adénopathies peuvent être retrouvées au cours de l'infection par le VIH, le virus Chikungunya, le virus Zika, le trypanosome et la tuberculose. Des atteintes pulmonaires peuvent aussi être retrouvées dans les infections tuberculeuses et cryptococcique.

Les méningites et encéphalites seront pour la suite de ce travail regroupées sous le terme de méningites.

Signes de gravité

Selon la SPILF, la gravité d'une méningite est définie par : un purpura extensif, un score de Glasgow <8 (sur une échelle de 3 à 15), des signes neurologiques focaux, des signes de souffrance du tronc cérébral révélateur d'hypertension intracrânienne (bradycardie, tachycardie, irrégularité du rythme respiratoire), un état de mal convulsif et une instabilité hémodynamique (13).

Diagnostiques différentiels

Des causes non infectieuses, précédemment citées peuvent être à l'origine de méningites non infectieuses : néoplasie, métabolique, toxique et médicamenteux, vasculaire, épileptique et auto-immunes (14).

Prélèvements biologiques

L'analyse du liquide céphalorachidien prélevé par ponction lombaire (PL) est l'examen de référence permettant le diagnostic biologique de méningite (15). Cette PL doit être réalisée rapidement, et ne pas retarder l'instauration des antibiotiques dans l'heure qui suit le diagnostic clinique de méningite (16). Les rares contre-indications de ce geste sont l'hypertension intracrânienne et le risque d'engagement cérébral qui en découle, ainsi que certains troubles de l'hémostase (17).

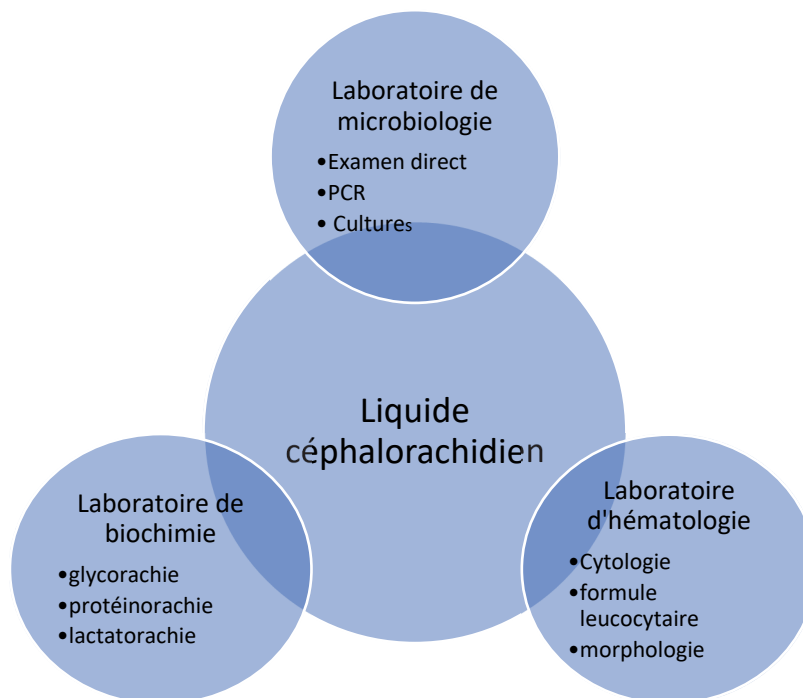


Figure 1 : Répartition des prélèvements de LCR dans les différents laboratoires d'analyse.

La ponction lombaire est effectuée sur un patient assis, courbé en avant ou en décubitus latéral (dit « chien de fusil ») et ce, pour obtenir une flexion lombaire maximale. Après une préparation de type chirurgical, un trocart est inséré dans le cul de sac dural, généralement entre les vertèbres lombaires L4 et L5 sur la ligne unissant les deux crêtes iliaques postérieures. Le LCR recueilli est réparti en 3 à 4 tubes stériles remplis avec un minimum de 0,5 mL de prélèvement qui sont ensuite adressés aux différents laboratoires (Figure 1). De façon plus fonctionnelle, un

seul tube contenant quelques millilitres peut être recueilli, adressé au laboratoire polyvalent de biologie ou bien au laboratoire de microbiologie en première ligne, qui le répartira ensuite aux laboratoires de biochimie et d'hématologie.

D'autres prélèvements peuvent être réalisés pour argumenter le diagnostic de MEI, tels que les hémocultures (positives dans 50-75% des cas des méningites purulentes) et les biopsies cutanées des lésions purpuriques (positive dans 60-80% des cas) et ont un intérêt certain quand la PL est contre indiquée (4). Des marqueurs biologiques sériques sont aussi utiles au diagnostic des MEI, la protéine C réactive (CRP) permettant d'objectiver l'inflammation et la procalcitonine permettant de différencier une étiologie virale d'une étiologie bactérienne avec une valeur prédictive positive pour la méningite bactérienne supérieur à 97% lorsque le seuil est fixé à 0,28 ng/mL (18).

Aspects paracliniques

L'imagerie arrive en second lieu dans le diagnostic des méningites, après la PL sauf en cas de suspicion d'un processus expansif intracrânien. Ce phénomène se manifeste par des signes de focalisation, des signes d'engagement cérébral, avec trouble de la vigilance (score de Glasgow < 11) ou une crise convulsive persistante (17).

La réalisation d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) ou à défaut d'un scanner tomodensitométrie (TDM) permet initialement et au besoin, de confirmer le diagnostic d'encéphalite notamment mais aussi d'exclure d'autres diagnostics tels que l'abcès ou la thrombophlébite cérébrale.

A 48-72h, son intérêt repose sur la recherche des complications (abcès, empyème, atteinte osseuse, embolies et thromboses) (17) et doit être évoqué devant la persistance d'une fièvre ou l'apparition de signes neurologiques nouveaux.

A distance, l'imagerie pourra être réalisée pour toute infection à *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) à la recherche de complications type brèche, troubles neurologiques.

Épidémiologie des méningites à l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection de Marseille

L'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection à Marseille a dès son installation, mis en place des outils et participé à des réseaux de surveillance des maladies infectieuses dans le but d'identifier de façon précoce des épidémies et des foyers de contamination.

La surveillance épidémiologique des méningites infectieuses est réalisée de façon hebdomadaire et repose sur la surveillance du nombre de cas de LCRs leucocytaires et sur les germes identifiés (Figure 2). Ainsi cet outil a permis d'identifier des demandes et des diagnostics généralement plus nombreux l'été, de juin à août. Ces pics estivaux ont été identifiés comme étant liés à Entérovirus sur cette période, avec une participation du Parechovirus en 2018.

En 2016 et 2017 les cas ont moins bien été documentés qu'au cours des années 2015, 2018 et 2019.

Enfin certains pics épidémiques restent à ce jour non élucidés comme par exemple sur la période décembre 2018 à février 2019.

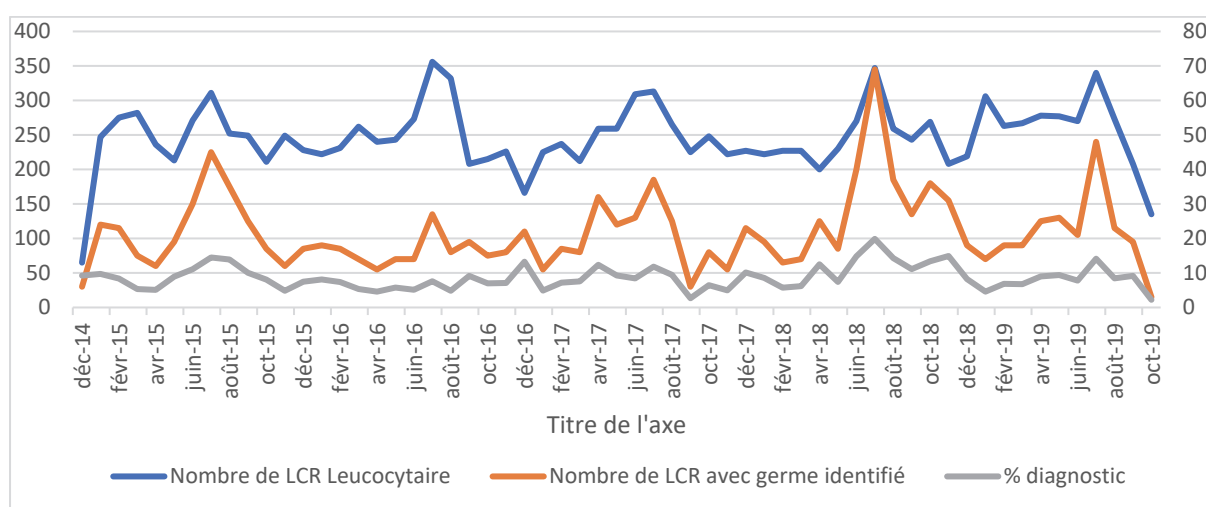
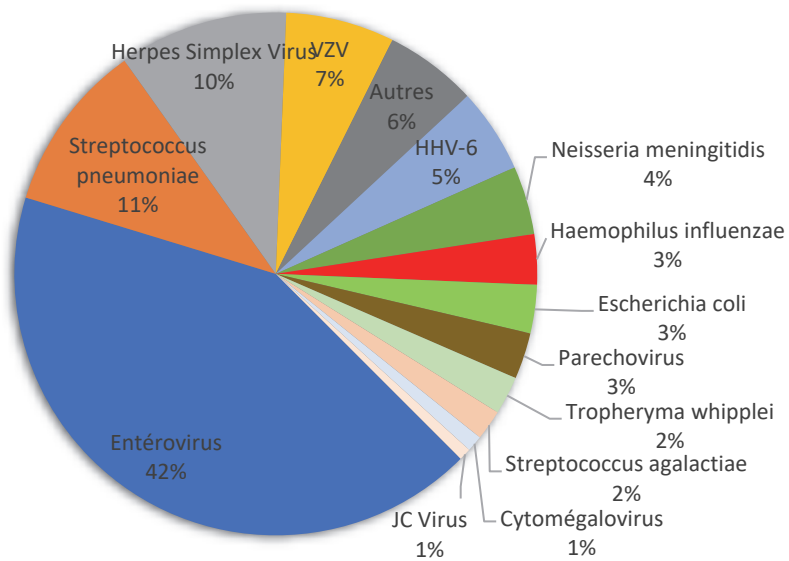


Figure 2 : Évolution du nombre de demandes et de LCR avec un germe identifié à l'IHU Méditerranée Infection de Marseille entre décembre 2014 et septembre 2019.

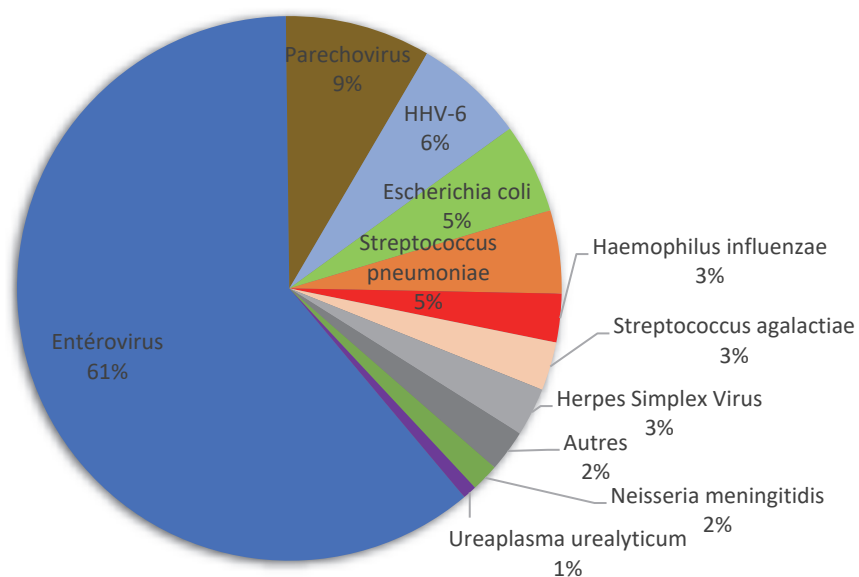
Les données issues de la surveillance nous ont aussi permis de réévaluer la part des différents agents étiologiques de méningite aigüe communautaire (Figure 3) et dans les principales populations (Figures 4 à 6).



- Autres germes (6%):**
- Borrelia burgdorferi
 - Autres Enterobactéries
 - Listeria monocytogenes
 - Mycobacterium tuberculosis
 - Pasteurella multocida
 - Pseudomonas aeruginosa
 - Staphylococcus aureus
 - Autres Staphylocoques
 - Salmonella Sp.
 - Autres Streptocoques
 - Treponema pallidum
 - Ureaplasma Urealyticum
 - BK virus
 - Dengue
 - Toscana virus
 - West Nile virus
 - Cryptococcus

Figure 3 : Répartition des Étiologies des Méningites communautaires à l'IHU.

Le germe le plus présent dans les méningites communautaires, enregistré à l'IHU de Marseille depuis 2015 est l'Entérovirus avec 42% des cas, suivi des virus du groupe Herpès avec 23% des cas suivi de *S. pneumoniae* avec 11 % des cas. Les autres étiologies bactériennes arrivant plus à distance avec 4% des cas pour *N. meningitidis*, 3% pour *H. influenzae* et *Escherichia coli* (*E. coli*), 2% pour *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) et *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*). Enfin, 3 % des cas rapportés étaient dus à Parechovirus, et 1% des cas, à JC Virus.



- Autres germes (2%):**
- Staphylocoques
 - Salmonella sp.
 - Autres Streptocoques
 - Cytomégalovirus
 - Varicelle-zona virus

Figure 4 : Répartition des Étiologies des Méningites communautaires à l'IHU chez les patients de moins de 1 an.

Chez les enfants des moins de un an (Figure 4), les deux-tiers des cas sont liés à l'Entérovirus, le Parechovirus est aussi très représenté dans cette population, tout comme *E. coli*, *H. Influenzae*, *S. agalactiae*, *N. meningitidis* et *Ureaplasma urealyticum*. Également, un cas de méningite à *Salmonella* sp. a été documenté durant cette période chez un patient de 18 jours. Les virus du groupe Herpès sont très peu représentés dans cette population.

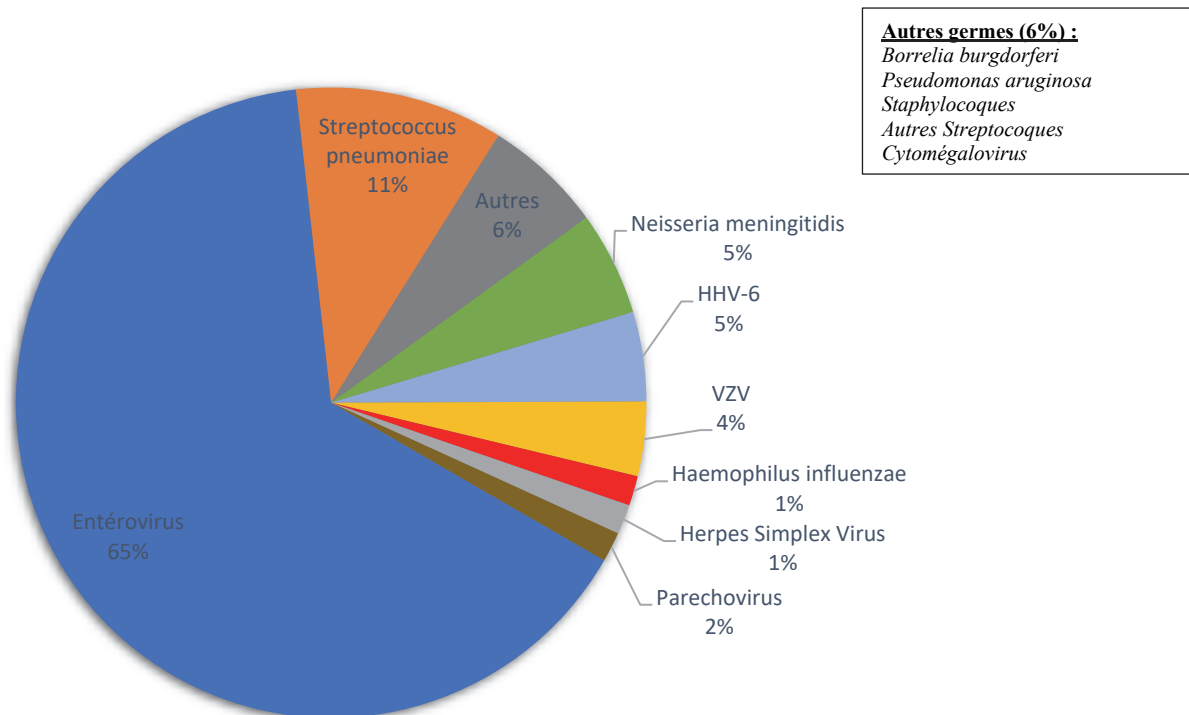
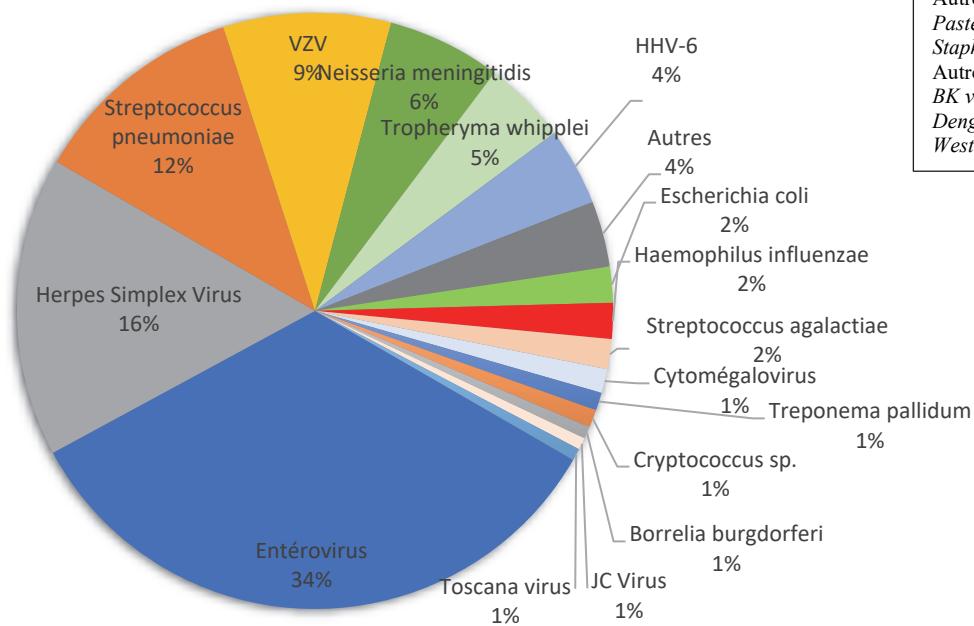


Figure 5 : Répartition des Étiologies des Méningites communautaires à l'IHU chez les patients âgés de 1 à 18ans

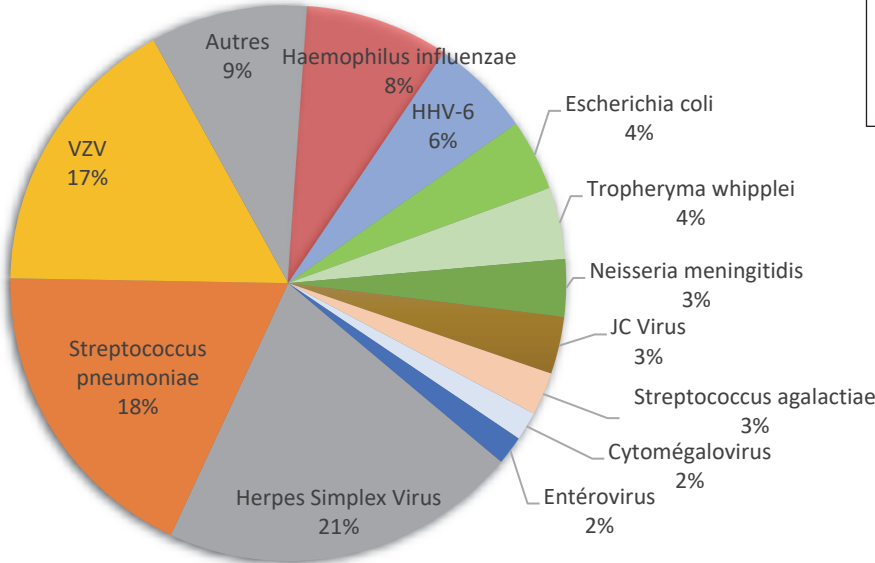
Chez les patients de 1 à 18 ans (Figure 5), les deux-tiers des cas aussi sont liés à l'Entérovirus, *S. pneumoniae* et *N. meningitidis* sont représentés avec respectivement 11 et 5% des cas. Parechovirus reste une étiologie présente mais en baisse dans cette population par rapport à la précédente. Les méningites à Herpès restent assez peu fréquentes. Un cas de méningite communautaire à *Pseudomonas aeruginosa* a été diagnostiqué chez un enfant de 1 an. Initialement admis pour gastro-entérite virale, son état neurologique s'est rapidement dégradé, et malgré une bonne identification du germe, le patient est décédé au deuxième jour.



Autres germes (4%) :
 Autres Enterobactéries
 Pasteurella multocida
 Staphylocoques
 Autres Streptocoques
 BK virus
 Dengue
 West-Nile virus

Figure 6 : Répartition des Étiologies des Méningites communautaires à l'IHU chez les patients de 18 à 65 ans.

Chez l'adulte de moins de 65 ans (Figure 6), la fréquence de cas baisse d'un tiers pour l'Entérovirus, et les étiologies varient plus. Les virus du groupe Herpès prennent une place importante avec quasiment un tiers des cas. *N. meningitidis* garde une place importante, et des étiologies liées au mode de vie et comportement individuel comme *T. whippelii*, *Borrelia burgdorferi*, les arboviroses, JC Virus, *Cryptococcus sp.*, et *Treponema pallidum* (*T. pallidum*).



Autres germes (9%) :
 Listeria monocytogenes
 Pseudomonas aeruginosa
 Staphylocoques
 Autres Streptocoques
 Toscana Virus
 Cryptococcus sp.

Figure 7 : Répartition des Étiologies des Méningites communautaires à l'IHU chez les patients de plus de 65 ans.

Chez l'adulte de plus de 65 ans (Figure 7), les cas liés à Entérovirus se limitent à 2%, les infections à Herpès représentent la moitié des cas et les étiologies bactériennes sont dominées par *S. pneumoniae* et *H. influenzae*. Enfin les cas d'encéphalite à JC Virus ont été ici plus nombreux.

Stratégies diagnostic

Au laboratoire de microbiologie de l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection à Marseille, afin de répondre aux différentes contraintes de temps et de diagnostic, le circuit du prélèvement a été revu et optimisé afin d'obtenir le circuit qui soit le plus efficace possible (Figure 8).

Une aide au diagnostic des maladies infectieuses est aussi apportée en standardisant sous forme de kits syndromiques, et en particulier le kit méningoencéphalite les prélèvements à réaliser, les méthodes ainsi que les germes à cribler, en fonction du type de prélèvement.

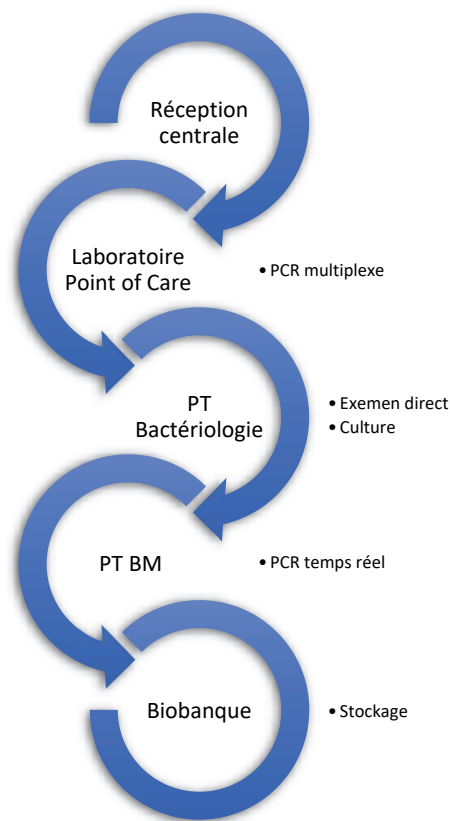


Figure 8 : Circuit et analyses du LCR à l'IHU Méditerranée Infection, Marseille.

Le LCR est un prélèvement précieux, transporté dans les plus brefs délais aux différents laboratoires en raison de la fragilité des germes et de la gravité potentielle du diagnostic. Pour les mêmes raisons, la réception, l'acheminement du prélèvement aux différents plateaux techniques (PT) et la réalisation des examens sont effectués en priorité et sans délai.

Le laboratoire Point-of-care

C'est ici qu'est acheminé le LCR en premier lieu, il s'agit de petits laboratoires d'urgences, situés sur deux sites que sont l'IHU Méditerranée Infection de Marseille ainsi que l'hôpital Nord, et à proximité d'unités de soin (Service d'Accueil des Urgences). Leur avènement a permis de réduire considérablement le délai de rendu de résultat pour un nombre réduit d'analyses.



Figure 9 : Le Laboratoire Point-of-Care de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille.

Le laboratoire POC est un espace de travail clos, de petite taille, conçu pour être fonctionnel pour un opérateur seul. Celui-ci réalise l'ensemble des étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques pour chaque prélèvement. Ce poste est actuellement tenu par l'ensemble des internes en biologie médicale de l'IHU Méditerranée Infection de Marseille qui organisent des rotations afin d'assurer 24h sur 24 la continuité des soins. Ce laboratoire est équipé, d'un poste d'enregistrement, de deux postes de sécurité microbiologique, l'un permettant la préparation de l'ensemble des échantillons, le second, munis de gants intégrés étant uniquement dédié à la préparation des échantillons de LCR (Figure 9). Cette organisation répond au besoin de manipuler les LCR dans un autre environnement que le reste des prélèvements afin de minimiser le risque de contamination lors de la préparation. Le laboratoire est de plus équipé d'un extracteur des acides nucléiques EZ1 Advanced XL® (QUIAGEN, Les Ulis, France) d'un

LightCycler® (Roche, Boulogne-Billancourt), d'un GeneExpert® (CEPHEID, Morens Scopont, France) d'un Alethia® (Meridian®, Boise, USA) et d'un FilmArray® (Torch® bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) mis en place depuis 2017 comme méthode diagnostique pour les méningites (19), ainsi que d'autre de test unitaires complémentaires.

Les tests sélectionnés pour y être réalisés, reposent sur des techniques antigéniques, immunochromatographiques et de PCRs. Sélectionnés sur des critères de rapidité d'exécution, ils permettent dans certains cas un rendu en moins de 1h. Leur choix repose de plus sur l'impact sur l'organisation des services de soin et la prise en charge des patients, en répondant aux besoins d'hospitaliser, d'isoler ou d'initier un traitement anti-infectieux (20).

Le LCR reçu au POC est traité sans attente, après enregistrement, la cassette BioFire® Filmarray® Meningitis/Encephalitis est reconstituée en trois étapes sous la hotte dédiée et inoculée avec 200 µL de LCR. Ce kit à l'avantage, d'identifier suivant une approche multiplexée les 14 des principaux agents causatifs de méningites infectieuses (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. agalactiae*, *E. coli* K1, *L. monocytogenes*, Herpes simplex virus 1 et 2, Human Herpes virus 6, Varicelle zona Virus, Cyomégalovirus, Enterovirus, Parechovirus et *Cryptococcus neoformans/gattii*) en seulement 1h et 20 minutes, et ce avec une très grande sensibilité (19). Tout résultat du FilmArray® sera confirmé par une PCR spécifique.

Plateau technique de Bactériologie

Le circuit du LCR se poursuit sur le plateau technique de Bactériologie (Figure 10). Ce plateau est chargé de réaliser l'ensemencement et la mise en culture de l'ensemble des prélèvements l'Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM). Il est équipé de nombreuses machines permettant d'automatiser certaines tâches tel que l'ensemencement, la détection de pousse des flacons d'hémocultures, la lecture automatisée des cytologies urinaires, ou la lecture des antibiogrammes permettant ainsi d'assurer un gros flux de travail tout en assurant une large gamme d'analyses. L'identification des cultures réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF® a aussi considérablement simplifié le travail d'identification tout en réduisant le temps d'exécution (21).



Figure 10 : Le Plateau technique de Bactériologie de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille.

En ce qui concerne le LCR, le plateau technique de bactériologie est chargé de la réalisation du compte cytologique en cellule de Nageotte ainsi que l'examen direct après coloration de Gram. Ces examens d'exécution rapide sont généralement rendus dans l'heure et peuvent apporter une aide au diagnostic des méningites. La mise en culture, référence dans le diagnostic des méningites est toujours aussi cruciale (4). Elle permet d'incriminer avec quasi-certitude, et hors situation particulière (trauma crânien, neurochirurgie, etc...) l'origine infectieuse de la méningite en cas de positivité. Elle permet aussi de caractériser pleinement les isolats cliniques par la réalisation de test de sérogroupage pour certains germes tels que *N. meningitidis* ou *H. influenzae* et d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques par la réalisation d'un antibiogramme en milieu solide par la méthode des disques. Caractériser la sensibilité ou la résistance de la bactérie aux antibiotiques, notamment ceux utilisés dans le traitement des méningites bactériennes tel que les pénicillines et les céphalosporines de troisième génération permet là aussi d'apporter une aide précieuse au clinicien.

Plateau technique de Biologie Moléculaire

Le LCR est dans un troisième temps orienté sur le plateau technique de biologie moléculaire. Ce plateau est réparti en trois zones de travail distinctes séparées par des sas ou des portes. Le prélèvement suit ce que l'on appelle le « sens de la marche » c'est à dire que pour ne pas se contaminer ou être contaminé, il ne revient jamais en arrière, il suit un trajet rectiligne de la pièce des extractions jusqu'à la salle des amplifications PCR en passant par la pièce des dépôts.



Figure 11 : Une salle d'extraction d'ADN et ARN du plateau technique de Biologie Moléculaire de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille.

La salle des extractions (Figure 11) est composée de hotte à flux laminaire pour la préparation des échantillons ainsi que d'extracteurs d'ADN et d'ARN EZ1 Advanced XL[®]. La pièce des dépôts est constituée d'une paillasse où les techniciens déposent manuellement à l'aide de micropipettes de précision les extraits de matériel génétique dans des puits en présence d'amorces PCR spécifiques des pathogènes à détecter, qu'ils soient bactériens, viraux ou parasitaires. La salle des PCR et RT-PCR (Figure 12) est constituée de nombreux thermocyclers (LigtCycler[®]) qui réalisent tout au long de la journée cette activité. Enfin, une autre salle est dédiée à la PCR classique à large spectre de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S.



Figure 12 : La pièce des PCR et RT-PCR du plateau technique de Biologie Moléculaire de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille.

Le prélèvement une fois extrait est rapatrié vers la biobanque, zone de stockage permettant de conserver à -80°C les prélèvements bactériologiques.

Les cas de méningites sont revus quotidiennement en staff de microbiologie en présence des Biologistes Seniors et au cours desquels de plus amples explorations telles que la réalisation de PCRs et cultures complémentaires comme la culture cellulaire sur le plateau technique de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3) peuvent être décidées.

Dans cette configuration, et après réception du LCR, le rendu des examens est réalisable en 1h pour l'examen direct, 2h pour la PCR multiplexe et 24 à 48H pour les PCRs complémentaires et de confirmation. Les géloses, incubées cinq jours pour la culture aérobie et 10 jours pour la culture anaérobie sont observées quotidiennement. En cas de positivité des cultures, une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF[®] permettant une identification en 10 minutes ainsi qu'un antibiogramme nécessitant 24h supplémentaires sont systématiquement réalisés. Le délai de rendu des résultats au clinicien est schématisé dans la Figure 13.



Figure 13 : Délais de rendu des résultats d'un LCR à l'IHU Méditerranée Infection, Marseille.

Méthodes diagnostiques au laboratoire

Cytologie et Examen direct

L'examen cytologique du LCR permet d'apprécier la cellularité du prélèvement, les leucocytes et les globules rouges sont comptés en cellule de Nageotte et rendus par millimètres cube. Une méningite étant définie par un nombre de leucocytes supérieur à $10/\text{mm}^3$, une formule leucocytaire sera réalisée dans ce cas, permettant d'orienter le diagnostic vers une étiologie virale si la formule est leucocytaire, ou bactérienne si la formule est à prédominance de polynucléaires neutrophiles (PNN). Il arrive cependant que les leucocytes soient relativement bas voire normaux dans certaines situations : population pédiatrique, infection débutante, mauvaise réponse immunitaire, mauvais pronostic. Les globules rouges témoignent quant à eux du caractère traumatique de la ponction, et/ou du caractère hémorragique du LCR. Ces situations sont plus difficiles à interpréter nécessitent de tenir compte du ratio globules rouges sur globules blancs dans le sang, qui en temps normal est approximativement de 1.000.

L'examen direct est réalisé après coloration de Gram. Il s'agit d'un examen de laboratoire simple, rapide et peu coûteux permettant de révéler de façon directe la présence de bactéries dans le LCR. Cependant, cet examen manque de sensibilité (9,22) et varie en fonction de la bactérie (4). Elle ne permet pas non plus la détection de *Cryptococcus neoformans* ni de *Mycobacterium tuberculosis* qui nécessitent des colorations spéciales ainsi que les virus. Dans une revue systématique de la littérature sur la méningite aiguë purulente de l'adulte, la coloration de Gram était positive dans 36,7% des cas et confirmée par culture (5). La prise préalable d'antibiotique a aussi un impact sur la sensibilité du test (23). Cependant, la coloration de Gram peut être utile au diagnostic dans le cas où la culture reste stérile (1,24) et se révèle parfois être le seul examen microbiologique positif (23). De ce fait, son bénéfice est toujours en faveur de son utilisation.

Analyses biochimiques

La glycorachie permet d'estimer la consommation de glucose dans le LCR, et doit toujours être interprétée en fonction de la glycémie (moins de la moitié de la glycémie) quand elle est disponible. Une hypoglycorachie franche est en faveur d'une infection bactérienne ou fongique. Dans les méningites purulentes bactériennes, on observe souvent une franche hypoglycorachie

conséquence de la consommation de glucose par les bactéries et les leucocytes recrutés sur le site de l'infection.

La protéinorachie quant à elle, est un reflet de l'inflammation locale et est moins spécifique d'un processus infectieux. Son augmentation (supérieure à 0,45 g/L) a lieu lors d'une infection, d'un processus tumoral ou dysimmunitaire. Ces paramètres peuvent être influencés par la prise d'antibiotiques pouvant amener à normaliser la glycorachie et la protéinorachie ; au contraire en cas de contamination sanguine dans certains cas de LCR hémorragiques.

D'autres paramètres peuvent également être testés, la chlorurorachie, historiquement utile au diagnostic des méningites tuberculeuses n'a plus sa place de nos jours dans le diagnostic des méningites. La lactatorachie, elle, s'est révélée être un examen utile mais n'est pas actuellement réalisée dans tous les centres, elle témoigne d'une souffrance méningée et possède une excellente valeur prédictive négative pour la MEI bactérienne (25).

Une méningite bactérienne est classiquement évoquée devant un LCR leucocytaire, hypoglycorachique, hyperprotéinorachique, hyperlactatorachique et dont la formule leucocytaire est généralement à prédominance de leucocytes polynucléaires (15). Les autres orientations étiologiques en fonction des résultats préliminaires sont résumées dans la Table 1. Le ratio glycorachie/glycémie et la lactatorachie se sont avérés être les meilleurs paramètres prédictifs d'une infection bactérienne (7). L'augmentation des cellules mononuclées dans le LCR s'est révélée être le meilleur marqueur prédictif d'une infection virale sans pour autant permettre une bonne discrimination, les cellules mononuclées augmentant aussi dans les pathologies non infectieuses (7).

	Aspect macroscopique	Glycorachie	Protéinoachie	Cytologie	Formule
LCR Normal	Clair	2/3 de la glycémie	0,15-0,45g/L	<5/ mm ³ 10- 30/mm ³ pour les nouveau-nés	NR
Hémorragie méningée et ponction traumatique	Environ 1 leucocyte pour 1000 hématies	Sang	Sang	Sang	Sang
Tuberculose	Clair	Basse	Normale à augmentée	Souvent 100-500	Lymphocytaire à panaché
Méningite bactérienne débutante, borréliose	Clair a purulent	Normale ou basse	Augmentée	>10	Lymphocytaire à panaché
Méningite bactérienne type <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>	Puriforme	Très basse	Très augmentée	Souvent > 200 (Voir > 500)	PNN
<i>Listeria monocytogenes</i>	Clair a purulent	Normale ou basse	Augmentée	> 10	Panaché à PNN Parfois Lymphocytaire
Syphilis, leptospirose, trypanosomoses, cryptococcose	Clair	Normale	Normale ou augmentée	Parfois pauvre en cas d'infection fongique (> 10) Souvent 100-500	Lymphocytaire
<i>Entérovirus</i>	Puriforme	Normale	Modérée	>10 Initialement forte	Panaché (Parfois PNN en phase initiale)
Herpesviridae (HSV, VZV, CMV), <i>Entérovirus</i> , VIH	Clair	Normale	Modérée	Souvent 100-500	Lymphocytaire

Tableau 1 : Orientation diagnostique en fonction des résultats préliminaires de l'analyse du LCR. Tableau inspiré de ECN Pilly édition 2016 et Bactériologie virologie pratique 3^{ème} édition.

Culture

La culture reste la référence du diagnostic microbiologique des méningites bactériennes (4). Le LCR estensemencé sur deux géloses Columbia +5% sang de mouton (COS), une incubée à 35°C en aérobie durant 5 jours et une seconde incubée à 35°C en anaérobie pendant 10 jours ; ainsi que sur une gélose « chocolat » au sang cuit enrichie (PVX) pour les germes exigeants, incubée à 35°C pendant 5 jours. Selon certaines études, la culture revient positive dans 38,6% des cas (5). Cependant, les performances de cette méthode sont variables suivant le germe responsable (23), la population étudiée et l'épidémiologie locale (1). De plus, elle ne s'applique pas à l'ensemble des germes, pour certains difficilement, voir non cultivables (26). Enfin, la prise d'antibiotique avant la PL diminue le succès diagnostique de cette méthode (27).

Techniques de Biologie Moléculaire

Les technologies d'amplification de l'ADN de type PCR ont démontré leur place dans le diagnostic des méningites infectieuses et tendent à devenir la référence dans l'identification étiologique. Le principe repose sur la détection, après une phase d'amplification, d'ADN ou d'ARN provenant d'un échantillon clinique. Leur réalisation est rapide, et permet de produire des résultats d'une grande sensibilité et d'une très grande spécificité en l'absence de contaminants. Il s'agit parfois du seul test positif (28).

La technique historique de PCR standard est aujourd'hui abandonnée au profit des techniques de PCRs temps-réel et PCRs multiplexes, qui combinent l'amplification et la révélation dans un seul test. La PCR standard reste utilisée pour la réalisation d'une PCR de l'ARN ribosomique 16S, PCR universelle permettant la détection des bactéries qui contiennent toutes au moins une copie du gène 16S de l'ARNr. Cette technique nécessite ensuite le séquençage de l'ADN amplifié par une méthode de séquençage de type Sanger.

PCR en temps-réel (RT-PCR).

La technique de PCR en temps réel est actuellement la technique de référence pour de nombreux diagnostics d'urgence en maladies infectieuses. Leur rapidité d'exécution associée à leur grande sensibilité ont permis d'augmenter le nombre de diagnostics et de réduire le délai de rendu de résultat. La PCR temps réel permet aussi d'assurer le suivi biologique d'un patient par la quantification de la charge microbienne au sein d'un prélèvement.

Plusieurs stratégies diagnostiques ont également été développées autour de la PCR, nous avons déjà abordé l'approche syndromique, particulièrement compatible avec cette technique de par l'universalité du support de l'information génétique mais aussi en raison de la faible quantité d'extrait nécessaire à la réalisation des PCRs : un extrait d'ADN permet de réaliser jusqu'à 18 PCRs en parallèle.

Les PCRs en systèmes clos sont maintenant le standard au laboratoire de microbiologie clinique. Sous forme de cassette assurant à la fois l'extraction et l'amplification, elles permettent de réduire temps de l'analyse tout en réduisant le risque de contamination. Enfin de nouveaux automates récemment disponibles combinent ces deux approches, on parle alors de multiplexage.

PCR Multiplexe

Il s'agit de la dernière génération de PCR dont la sensibilité a encore été accrue grâce au principe de la PCR nichée. Le système est clos et permet la détection des principaux agents étiologiques en une seule réaction. L'une des technologies utilisée actuellement est la technologie FilmArray® (Biofire bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), qui permet de détecter 14 agents étiologique de méningites infectieuses parmi les plus fréquentes en 75 minutes (29). Cette génération de PCR multiplexe permet de réaliser un diagnostic simple et rapide avec une sensibilité évalué à 94,2%, ainsi qu'une spécificité de 98,2% évaluée par nos équipes (19). Son coût élevé reste cependant un frein à sa généralisation (29) et son excès de sensibilité est parfois à l'origine de résultats faussement positif résultant d'une contamination lors de la préparation de l'échantillon.

Les technologies de séquençage

Depuis le séquençage du premier génome bactérien d'*H. influenzae* en 1995 (30), l'évolution des technologies de séquençage a permis de séquencer de nombreux génomes microbiens. En juin 2021, la base de données génomiques NCBI contenait 413.379 assemblages génomiques de 64.281 espèces différentes (archaea, virus, bactéries et eucaryotes) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/>). La majorité de ces génomes ont été déposés depuis 2008, après l'introduction commerciale du séquençage à haut débit. Les optimisations technologiques et méthodologiques ont permis une augmentation exponentielle du nombre de génomes séquencés en réduisant le coût de séquençage d'un génome de 10.000 \$/mégabase en 2001 à 0,1\$/mégabase en 2012 (31). Ainsi, le séquençage d'un génome entier de bactérie revient aujourd'hui en moyenne entre 100 et 200€ par isolat (32). Plusieurs générations de séquenceurs ont été développées au cours des 20 dernières années et sont résumés dans le Tableau 2. Les technologies de séquençage promettent une grande évolution dans le diagnostic des maladies infectieuses car elles permettent une approche ouverte pour le diagnostic étiologique, c'est-à-dire sans a priori concernant l'agent pathogène, permettant l'identification ainsi que la caractérisation dans le même temps.

	Période	Longueur des séquences	Précision/fidélité	Coût approximatif (par mégabase)
SOLiD Life Technologies	2006	85-100pb	99,9%	2400 \$
Pyroséquençage 454 GS Junior Roche	2005	400-700 pb	99,9%	10 \$
Ion Torrent Personal Genome Machine Ion Proton	2010	100- 400 pb	98%	1 \$
Illumina MiSeq HiSeq	2010	2x125pb 2x250pb	99,9%	0,05-0,15 \$
PACBIO	2011	10-60kb Moyenne 20kb	85%	0,13-0,60 \$
Oxford Nanopore MinION GridION PromethION	2015	Moyenne 2-5kb	62%	0,80 \$

Tableau 2 : Principales technologies de séquençage mises sur le marché depuis la technique Sanger.

Illumina

Les appareils MiSeq® et HiSeq® (Illumina Inc., San Diego, Californie, États-Unis) utilisent une technique de "séquençage par synthèse". La préparation de la librairie consiste à fragmenter et à réparer l'ADN, puis l'ajouter de séquences oligonucléotides aux extrémités permettant la fixation à la cellule d'écoulement. Une première étape consiste à amplifier l'ADN préparé, étape nommée « génération des cluster » (Figure 14). Le brin d'ADN préparé va s'hybrider avec une séquence oligonucléotidique fixée et le brin complémentaire va alors être synthétisé par une polymérase. Le brin est libéré alors que le brin complémentaire reste fixé. Ce dernier est alors amplifié par pontage, c'est la génération des clusters. Dans un second temps, le brin d'ADN complémentaire des séquences fixées sur le support est synthétisé à l'aide de nucléotides marqués par des fluorochromes, qui au moment de leur intégration émettent à une longueur d'onde spécifique du nucléotide marqué, cette étape constitue le séquençage à proprement parler.

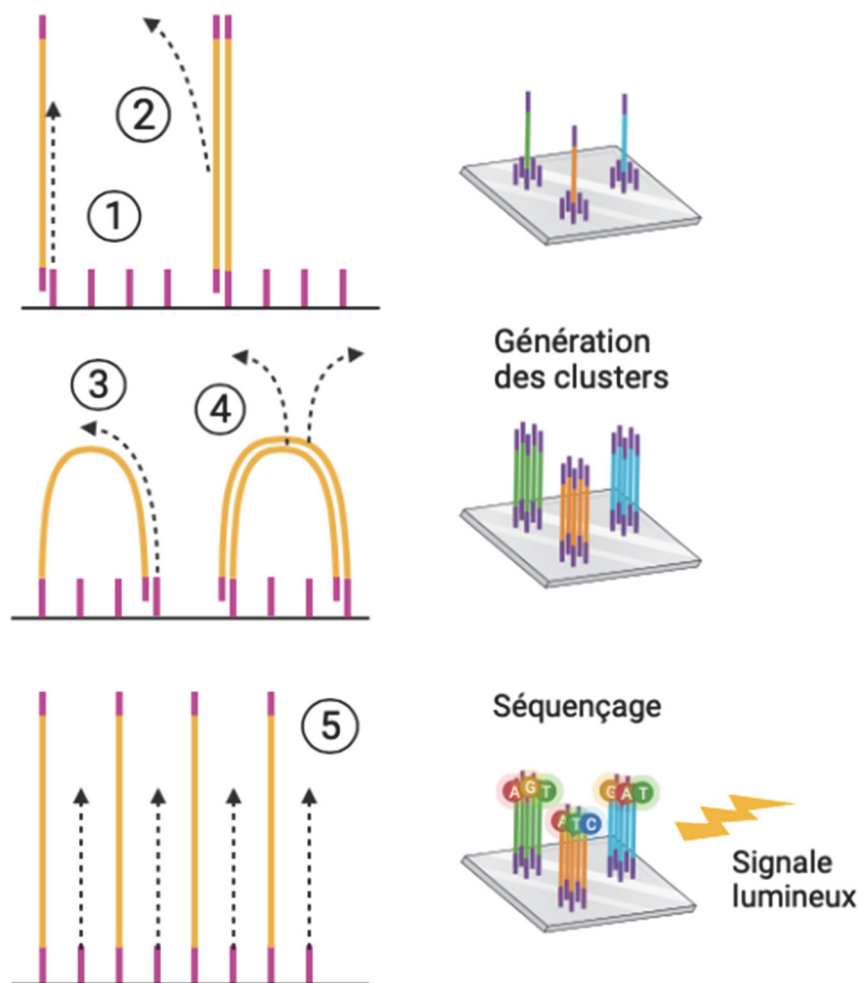


Figure 14 : Principe de fonctionnement d'une cellule de séquençage Illumina.

1) hybridation et élongation d'une séquence, 2) libération de la séquence. Génération des clusters : 3) pontage et élongation, 4) libération des brins complémentaires. 5) Séquençage. Image créée avec BioRender (BioRender.com).

Le processus qui consiste à déduire l'enchaînement des bases à partir du signal lumineux se prénomme « appel de bases ». Les lectures individuelles aussi appelées « reads » sont lues avec une grande précision du fait de la génération des clusters.

Cependant les séquences générées sont courtes, ce qui peut constituer un problème lors de l'étape d'assemblage du génome du fait des éléments répétitifs (33). En effet les séquences répétées posent un réel problème lors de l'assemblage bioinformatique des génomes et peuvent être à l'origine d'erreur lors de la génération de la séquence consensuelle.

Une estimation réalisée de cout moyen par nucléotide a montré un avantage d'utiliser le NGS comme moyen diagnostique des méningites notamment à Entérovirus qui représentent plus de 50% des cas documentés dans notre institution. Nous sommes passés de 0.3€ par nucléotide suivant le séquençage Sanger à 0.03€ par nucléotide par Illumina (34) .

La Technologie Oxford Nanopore

La troisième génération de séquençage se caractérise par deux spécificités : la capacité de générer des reads de longue taille tout comme l'analyse des données du séquençage en temps réel. Cette technologie et les séquenceurs qui la supportent, sont décrits comme des séquenceurs Single Molécule Real-Time (SMRT) ce qui signifie qu' une molécule d'ADN est détectée à la fois. Le principe de séquençage suivant la plateforme Oxford Nanopore Technologies comme le montre la Figure 15, repose sur la lecture de la séquence d'ADN simple brin sans amplification préalable par extrapolation de la variation de tension produite lorsqu'une molécule d'ADN passe au travers d'un pore protéique nanoscopique (35).

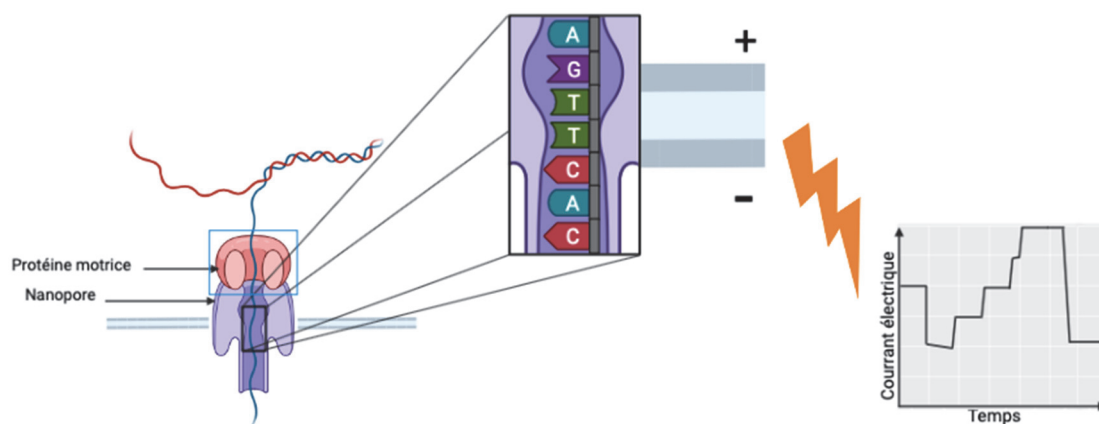


Figure 15 : Principe de fonctionnement d'un nanopore. Image créée avec BioRender (BioRender.com).

Initialement fabriqué à partir d'un pore d'alpha-hémolysine muté, le mutant du nanopore CsgG est celui utilisé de nos jours (36).

La variation de conductivité électrique produite au passage de chaque base du fragment d'ADN est spécifique pour chaque base et permet ainsi de déduire la composition de la séquence lors de l'appel de base (base calling) (36). Les nanopores sont regroupés par 4, sous forme de canaux. A un total, 512 canaux forment une cartouche jetable appelé cellule d'écoulement ou « flowcell ». Chaque canal mesure le signal de courant généré par l'un des quatre pores à la fois, ce qui permet de traiter jusqu'à 512 molécules d'ADN simultanément à une vitesse de 450 bases par secondes (36). Oxford Nanopore® commercialise sa technologie sous plusieurs formes de séquenceurs. Le MiniION est un dispositif de très petite taille (10 cm pour 90g) et facile à transporter (Figure 16), il ne peut accueillir qu'une seule flowcell (36). Le GridION est conçu comme un système extensible et pouvant accepter jusqu'à cinq flowcells à la fois. Enfin le PromethION, arrivé plus récemment sur le marché avec des cellules flow-cells assurant un séquençage intensif et profond, est constitué de 24 à 48 emplacements.

La comparaison entre les deux plateformes MinION et Illumina a montré des différences en termes de couverture génomique et de profondeur surtout ce qui concerne le mapping contre une référence (37). Le mapping est le processus permettant de générer une séquence consensus à partir de reads/lectures par rapport à un génome connu comme référence. La technologie Oxford Nanopore® permet de générer des séquences plus longues, 5.000 paires de bases en moyenne, pouvant atteindre une longueur de 250 kb selon de l'échantillon et le génome à séquencer. L'analyse des données générées en temps réel en utilisant un logiciel EPI2ME bien adapté et développé par Oxford Nanopore, donne un avantage à cette technologie par rapport à la technologie Illumina, permettant à la fois la détection de génome pathogène dans le LCR ainsi ses caractéristiques génétiques dans un temps réduit. Les autres caractéristiques des techniques de séquençage actuellement utilisées sont décrites dans le Tableau 3.

	ILLUMINA	ONT
Longueur de lecture	Courte 2x125pb 2x250pb	Longue Moyenne 2-5k
Analyses temps réel	Non	Oui
Nombre de séquences par expérience	10 ⁹	10 ⁴
Temps de préparation des librairies	8-12h	1-2h
Durée de l'expérience	4h à 8j	5min à 50h
Taux d'erreur	Inférieur à 1% Voir 0,1 %	Élevé Jusqu'à 38%
Inconvénient	Petites séquences générées Erreur avec les séquences riche en GC	Cout élevé Exactitude Moins bonne détection des mutations ponctuelles
Avantages	Faible cout Exactitude Débit Bonne détection des mutations ponctuelles	Longues séquences Vitesse Bonne couverture des régions répétitives Portabilité Cout

Tableau 3 : Caractéristiques, avantages et inconvénients des séquenceurs Illumina et Oxford Nanopore.

Inspiré des références (30,34,36-38).

Travaux personnels

L'analyse métagénomique a longtemps été réservée à la recherche mais l'évolution des technologies ces dernières années a permis d'envisager cette technologie dans le diagnostic de routine. Par sa rapidité de séquençage, sa capacité à générer des données en temps réel et sa disponibilité dans notre laboratoire, la technologie Oxford Nanopore semblait la plus adaptée pour cette étude. La capacité de la technologie Oxford Nanopore à générer des données dans un temps très court, dès les 5 premières minutes selon certaines études (38), le temps réduit de préparation de la librairie ainsi que la génération de séquence en temps réel rendent compatible son utilisation au laboratoire d'urgence POC et concurrentielle avec la PCR multiplexe.

Le but de mon travail de Thèse était de participer, en collaboration avec un étudiant doctorant de l'IHU de Marseille à évaluer l'intérêt et la faisabilité de l'utilisation de la technologie Oxford Nanopore® dans le diagnostic d'urgence des méningites communautaires au laboratoire d'urgence POC. Cette collaboration nous a permis de nous répartir les différentes tâches en fonction de nos compétences propres tout en apprenant des compétences de l'autre. J'ai donc assuré le recueil des informations cliniques et biologiques inhérent à nos travaux, identifié et recruté les spécimens sur lesquels nous allions travailler et réalisé une partie des manipulations de séquençage. L'assemblage des génomes ainsi que l'exploitation des données générées ont quant à eux été réalisés par ce binôme.

Cette mise en place a fait l'objet d'un article publié dans le journal « Pathogens » et un autre soumis à publication dans le journal « Clinical Microbiology and Infection ». Deux autres contributions sont également en cours de préparation pour la publication.

Article 1: *Haemophilus influenzae* Meningitis Direct Diagnosis by Metagenomic Next-Generation Sequencing: A Case Report.

Notre premier travail a été de vérifier la faisabilité du diagnostic d'une méningite bactérienne à *Haemophilus influenzae* par métagénomique directement à partir de LCR, avec pour objectif de moins de six heures de la réception de prélèvement à la validation du résultat. Cette étude a permis d'identifier un *H. influenzae*, non-typable appartenant au lignage *H. influenzae* 22.1-2, sensible à tous les antibiotiques par une analyse *in silico* après uniquement 4 heures de séquençage en utilisant le MinION d'Oxford Nanopore. Ce résultat a été confirmé par les analyses de routine, deux jours plus tard. D'après ce résultat motivant qui est totalement concordant avec la routine, offrant un avantage en temps et en matériels, nous avons proposé le MinION comme outil puissant pour le diagnostic des urgences vitales au laboratoire POC de l'IHU Méditerranée Infection.

Brief Report

Haemophilus influenzae Meningitis Direct Diagnosis by Metagenomic Next-Generation Sequencing: A Case Report

Madjid Morsli^{1,2}, Quentin Kerharo¹, Jeremy Delerce¹, Pierre-Hugues Roche³, Lucas Troude³
and Michel Drancourt^{1,2,*}

- ¹ IHU Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France; mor_madjid@hotmail.com (M.M.); qkerharo@gmail.com (Q.K.); jeremy.delerce@univ-amu.fr (J.D.)
² Aix-Marseille-Université, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, 13005 Marseille, France
³ Department of Neurosurgery, University Hospital of Marseille, 13015 Marseille, France; pierre-hugues.roche@ap-hm.fr (P.-H.R.); lucas.troude@ap-hm.fr (L.T.)
* Correspondence: michel.drancourt@univ-amu.fr

Abstract: Current routine real-time PCR methods used for the point-of-care diagnosis of infectious meningitis do not allow for one-shot genotyping of the pathogen, as in the case of deadly *Haemophilus influenzae* meningitis. Real-time PCR diagnosed *H. influenzae* meningitis in a 22-year-old male patient, during his hospitalisation following a more than six-metre fall. Using an Oxford Nanopore Technologies real-time sequencing run in parallel to real-time PCR, we detected the *H. influenzae* genome directly from the cerebrospinal fluid sample in six hours. Furthermore, BLAST analysis of the sequence encoding for a partial DUF417 domain-containing protein diagnosed a non-b serotype, non-typeable *H. influenzae* belonging to lineage *H. influenzae* 22.1-21. The Oxford Nanopore metagenomic next-generation sequencing approach could be considered for the point-of-care diagnosis of infectious meningitis, by direct identification of pathogenic genomes and their genotypes/serotypes.

Keywords: bacterial meningitis; point-of-care diagnostic; *Haemophilus influenzae*; Oxford Nanopore Technologies; real-time sequencing; metagenomic next-generation sequencing



Citation: Morsli, M.; Kerharo, Q.; Delerce, J.; Roche, P.-H.; Troude, L.; Drancourt, M. *Haemophilus influenzae* Meningitis Direct Diagnosis by Metagenomic Next-Generation Sequencing: A Case Report. *Pathogens* **2021**, *10*, 461. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040461>

Academic Editor: Natasha N. Gaudreault

Received: 12 March 2021
Accepted: 9 April 2021
Published: 12 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The microbiological diagnosis of bacterial meningitis presently carried out in point-of-care (POC) laboratories is based on different methods of detection of nucleotide sequences specific to the target pathogen [1,2]. More specifically, this detection is based on techniques using polymerase chain reaction (PCR) amplification by target of pathogen-specific genomic sequences, with the product of the amplification being detected by fluorescence in the so-called real-time PCR (RT-PCR) modality [2–4], permitting the detection of the presence or absence of pathogenic genomes, which is not sufficient to carry out pathogen genotyping.

Here, we report one case of *Haemophilus influenzae* meningitis that was diagnosed by metagenomics next-generation sequencing (mNGS), using the technology developed by Oxford Nanopore Technologies (Oxford Nanopore, Oxford Science Park, UK) directly from a cerebrospinal fluid (CSF) sample, identifying the pathogen genome, based on real-time sequencing by comparison to the Oxford Nanopore online database using EP2ME online software.

2. Case Report and Methods

A 22-year-old male patient presented to the emergency room of the neurosurgery department at the North Hospital of Marseille following a more than six-metre fall. The patient presented with numerous contusions and a dislocation orbito-naso-ethmoido-frontal type panfacial trauma complicated by subdural haematoma and subarachnoid haemorrhage. At his arrival in the emergency room, the patient presented a Glasgow score of 5, blood pressure of 140/70, cardiac frequency of 110 bpm and 75% saturation in ambient

air. Ten days after his admission, the patient presented with sudden onset of febrile (39 °C) meningeal syndrome. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis showed a leukocyte count of 198 cell/mm³ (37% neutrophils, 63% lymphocytes), erythrocyte count of 4200 cell/mm³, protein at 3.31 g/L and glucose at 0.33 mmol/L. Direct microscopic examination after Gram staining did not reveal the presence of any bacteria. A BioFire FilmArray[®] assay (Biofire bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), performed as previously described [1], yielded *Haemophilus influenzae* according to the meningitis encephalitis panel. The patient was treated with antibiotics for 14 days, 2 days with meropenem (4 g/day) and linezolid (1.2 g/day), 2 days with meropenem only, 2 days with cefotaxime and finally 8 days with amoxicillin at 12 g/day. A drastic decrease in the leukocyte count was observed from the second day of antibiotherapy treatment. The patient suffered cognitive, memory and consciousness disorders and left eye blindness.

In parallel to the BioFire FilmArray[®] diagnostic, total DNA was extracted from a 200 µL CSF sample after a 20-minute incubation with proteinase K at 37 °C using an EZ1 DNA Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and eluted in a 50 µL final volume. For direct microbial genome sequencing, 1 µg of DNA was incorporated into an Oxford Nanopore MinION library preparation according to the manufacturer's protocol (<https://community.nanoporetech.com/protocols/>). The library was quantified and normalized in a 47 µL volume using a Qubit[™] fluorometer using a Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Life Technology, Villebon-sur-Yvette, France). Briefly, DNA repair and end preparation were performed in a 60 µL final volume containing 47 µL of prepared DNA, 1 µL of DNA CS (DNA control), 3.5 µL of NEBNext FFPE DNA Repair buffer, 2 µL of NEBNext FFPE DNA Repair mix (New England BioLabs, Evry-Courcouronnes, France), 3.5 µL of Ultra II End-prep reaction buffer and 3 µL of Ultra II End-prep enzyme mix (New England BioLabs). The repair reaction was performed in a GeneAmp PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for 5 minutes at 20 °C followed by a 5 min incubation at 65 °C. Repaired DNA was purified using an equal volume of Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter, Villepinte, France) in the presence of 70% ethanol and then eluted in 61 µL of distilled water. The adapter ligation step was performed in a 100 µL volume containing 60 µL of purified DNA, 25 µL of ligation buffer, 10 µL of T4 DNA ligase (New England BioLabs) and 5 µL of the adapter mix and incubated for 10 minutes at room temperature. A second wash was carried out using Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter) in a ratio of 0.4. The final library was recovered in a 15 µL final volume, diluted in 75 µL of flow cell loading mix and sequenced for 4 hours on a MinION instrument (Oxford Nanopore). Real-time analysis of sequencing data was performed using EPI2ME software (version 2019.11.11-2920621). A second analysis was performed using Kraken 2 (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken2/>) and visualized by Pavian (<https://fbreitwieser.shinyapps.io/pavian/>).

3. Results and Discussion

After running for 4 h, MinION sequencing generated 202,010 reads including 1277 unclassified reads. Real-time EPI2ME data analysis yielded 192,260 human genome reads, 6598 *Escherichia coli* (control) reads, 29 *Shigella* reads, 23 *Lambdavirus* reads and 11 (0.00005%) reads corresponding to the *H. influenzae* genome. The *Shigella* and *Lambdavirus* reads come from repair and ligation enzymes used in the library preparation. Kraken online analysis and visualization by Pavian online software showed only *H. influenzae* with high stringency (Figure 1). The BLAST analysis of the longest 1298 bp sequence encoding for partial the aerobic respiration control sensor protein *ArcB* gene after specific *H. influenzae* read extraction using Kraken Tools yielded a non-b serotype, non-typeable *H. influenzae* strain P641-4342 with 97% sequence identity (GenBank accession number CP031687.1) belonging to *H. influenzae* lineage 22.1-21 (<http://www.iedb.org/sourceOrgId/374927>) [5]. This finding has been routinely validated by positive specific *H. influenzae* real-time PCR at 30 Ct using a LightCycler[®] 480 thermal-cycler (Roche, Wilmington, NC, USA) in a 20 µL final reaction volume containing 5 µL DNA and Takyon No Roxe Probe MasterMix (Eurogentec),

targeting a 167 bp fragment length of the *ompP1* gene as previously described [6]. While the patient had been vaccinated for *H. influenzae* serotype B, whole genome sequencing identified a non-typeable *H. influenzae* serotype (NTHi), against which the patient was not immunized. The in silico antibiotic susceptibility pattern derived from the whole genome by ResFinder online software (Version 4.1) predicted *H. influenzae* strain P641-4342 to be susceptible to all antibiotics, as experimentally confirmed by an in vitro antibiogram (File S1).

This new approach has been proposed for real-time pathogenic genome detection, essentially based on the time of manipulation of approximately 6 hours in total and its sensitivity to detect microbial genomes, even at low levels. As a novel approach for POC diagnosis, direct identification of the pathogenic genome by metagenomic next-generation sequencing remains a challenge for routine diagnosis. Utilization of Oxford Nanopore technology in mNGS allows real-time sequencing analysis to be performed directly from clinical samples [7]. The *H. influenzae* genome was the first whole bacterial genome to be sequenced [8]. In this case, we diagnosed *H. influenzae* directly from a CSF sample for the first time in our laboratory using Oxford Nanopore Technologies sequencing. Using metagenomics real-time sequencing allowed us to identify an *H. influenzae* non-b serotype lineage 22.1-21 sensitive to all antibiotics by online analysis using ResFinder software in less than 6 hours, which was confirmed by solid culture after three days in routine bacteriology laboratory diagnostics. As a new alternative for POC diagnostics, this strategy will be suitable for implementation in routine diagnostics of CNS infection and genomic surveillance in infectious diseases, despite the variability of genome coverage depending on the pathogenic charge in the CSF.

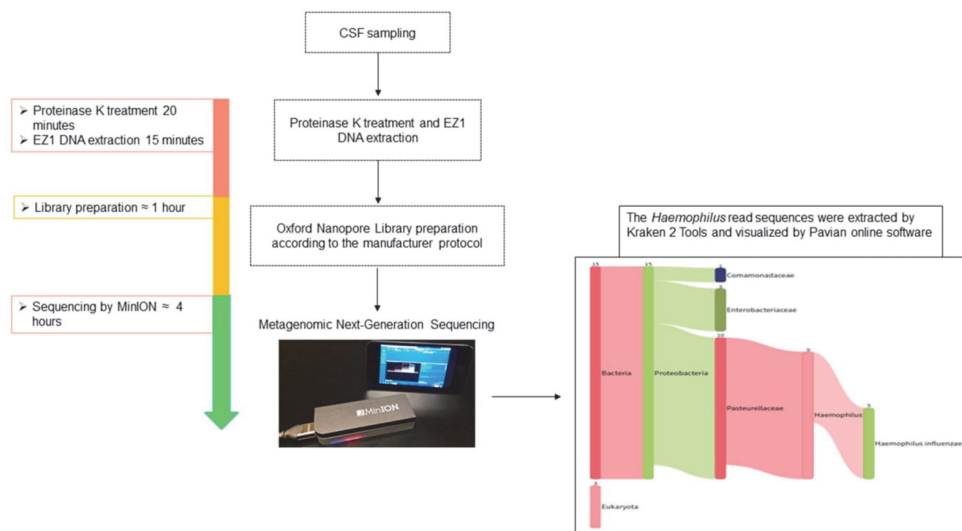


Figure 1. POC real-time sequencing diagnosis of *H. influenzae* meningitis by using Oxford Nanopore Technology. The total process duration was less than 6 h. The cerebrospinal fluid was treated with proteinase K for 20 min at 56 °C, and total DNA was eluted in a 50 µL volume. The Oxford Nanopore library was prepared according to the manufacturer’s protocol and diluted in a 75 µL final volume of flow cell loading mix. The diluted library was sequenced on a MinION instrument, and MinION sequencing data were analysed in real time using EPI2ME software. They were extracted by Kraken 2 Tools and visualized by Pavian online software.

4. Conclusions

Based on the simplicity, rapidity and sensitivity of mNGS real-time sequencing, we are now implementing Oxford Nanopore sequencing technology in the POC laboratory for the rapid diagnosis of bacterial meningitis, providing additional pieces of information over routinely used syndromic real-time PCR kits with which mNGS is competing in terms of delay and cost.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10040461/s1>, File S1: Antibigram analysis.

Author Contributions: M.M., contributed to experimental design, realisation of the work, data analysis, interpretation and writing. Q.K., collected samples, performed routine analyses, collected clinical information and writing. J.D., bioinformatics data analysis. P.-H.R. and L.T., clinical diagnostic and CSF sampling. M.D., contributed to critically reviewing the manuscript, data interpretation and coordinated and directed the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Mr. Madjid Morsli is a PhD student supported by “Fondation Méditerranée Infection”. This work (lab material and reagents) was supported by the French Government under the Investissements d’Avenir (Investments in the Future) programme managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research) [reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03]. This work was also supported by Région Le Sud (Provence Alpes-Côte d’Azur) and European funding [FEDER PA 0000320 PRIMMI].

Institutional Review Board Statement: All data were generated as part of routine work at the Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (Marseille University hospitals), and this study is the result of routine clinical management. No specific clinical sampling has been done in this study.

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Data Availability Statement: All the identified genomics sequences have been deposited and are available on the official website of IHU Méditerranée Infection via the following links. <https://www.mediterranee-infection.com/acces-ressources/donnees-pour-articles/direct-diagnosis-by-whole-genome-sequencing-of-haemophilus-influenzae-meningitis/>. GenBank accession bioproject: PRJNA702049.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

List of Abbreviations

dsDNA	double-strand desoxyribonucleic acid.
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction.
POC	point-of-care.
CSF	cerebrospinal fluid.
mNGS	metagenomic next-generation sequencing.

References

1. Vincent, J.J.; Zandotti, C.; Baron, S.; Kandil, C.; Levy, P.Y.; Drancourt, M.; Raoult, D.; Ninove, L. Point-of-care multiplexed diagnosis of meningitis using the FilmArray® ME panel technology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 1573–1580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Khumalo, J.; Nicol, M.; Hardie, D.; Muloiwa, R.; Mteshana, P.; Bamford, C. Diagnostic accuracy of two multiplex real-time polymerase chain reaction assays for the diagnosis of meningitis in children in a resource-limited setting. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Han, H.; Hu, Z.; Sun, S.; Yao, F.; Yan, X.; Zhang, X.; Wu, B. Simultaneous detection and identification of bacteria and fungi in cerebrospinal fluid by TaqMan probe-based real-time PCR. *Clin. Lab.* **2014**, *60*, 1287–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fukasawa, L.O.; Gonçalves, M.G.; Higa, F.T.; Castilho, E.A.; Ibarz-Pavó, A.B.; Sacchi, C.T. Use of cerebrospinal fluid and serum samples impregnated on FTA TM Elute filter paper for the diagnosis of infections caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Paireau, J.; Chen, A.; Broutin, H.; Grenfell, B.; Basta, N.E.; Basta, N.E. Seasonal dynamics of bacterial meningitis: A time-series analysis. *Lancet Glob. Health* **2016**, *4*, e370–e377. [CrossRef]
6. Hotomi, M.; Togawa, A.; Kono, M.; Sugita, G.; Sugita, R.; Fujimaki, Y.; Kamide, Y.; Uchizono, A.; Kanesada, K.; Sawada, S.; et al. An Application of Outer Membrane Protein P6-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Haemophilus influenzae in Middle Ear Fluids and Nasopharyngeal Secretions. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
7. Molerès, J.; Fernández-Calvet, A.; Ehrlich, R.L.; Martí, S.; Pérez-Regidor, L.; Euba, B. Antagonistic pleiotropy in the bifunctional surface protein fadl (OmpP1) during adaptation of Haemophilus influenzae to chronic lung infection associated with chronic obstructive pulmonary disease. *MBio* **2018**, *9*, e01176-18. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30254117/> (accessed on 5 April 2021). [CrossRef] [PubMed]
8. Fleischmann, R.D.; Adams, M.D.; White, O.; Clayton, R.A.; Kirkness, E.F.; Kerlavage, A.R.; Bult, C.J.; Tomb, J.F.; Dougherty, B.A.; Merrick, J.M. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae. *Science* **1995**, *269*, 496–512. [CrossRef] [PubMed]

Article 2: Real-time whole genome sequencing direct diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis: a case report.

Afin de répondre au mieux à notre problématique de rendre un résultat dans un temps compatible avec un diagnostic d'urgence, le protocole a été revu dans le but d'améliorer le rendement de séquençage. Mais nous avons aussi rapidement compris que pour avoir un intérêt réel, notre méthode devait pouvoir avoir un impact à l'avenir sur la prise en charge clinique du patient. Nous avons donc concentré nos efforts sur le rendement ainsi que l'exploitation d'informations « utiles » à des buts clinique, thérapeutique ou épidémiologique tels que la recherche de gènes codant pour une résistance à un antibiotique, un sérotype, une toxine, ou tout autre facteur de virulence. Dans cet article nous avons réduit le temps total à moins de 2 heures, de la réception du prélèvement à la validation du résultat incluant 20 minutes de séquençage. Plus de 92% de la séquence du génome de *Streptococcus pneumoniae* sérotype 10A sensible à tout le panel d'antibiotiques de routine, a été obtenue directement à partir de LCR. Cette méthode a non seulement permis d'identification le pathogène dans le LCR du patient ayant développant un syndrome méningé mais aussi de générer son sérotype ainsi que sa sensibilité aux antibiotiques dans temps comparable à celui de la PCR multiplexe.



Real-time whole genome sequencing direct diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis: a case report.

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID	CLM-21-22124
Article Type:	Letter
Date Submitted by the Author:	06-Sep-2021
Complete List of Authors:	MORSLI, MADJID; Aix-Marseille Universite, Aix-Marseille-Université, IRD, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, France. KERHARO, QUENTIN; IHU Mediterranee Infection, Maladie infectieuse Amrane, Sophie; Aix-Marseille Universit� IHU Méditerranée Infection, bouches-du -rhone Parola, Philippe; IHU M�dit�rann�e Infection, Infectious Diseases Fournier, Pierre Edouard; Faculte de Medecine, Universite de la Mediterranee, Unite des Rickettsies, CNRS UMR6236 Drancourt, Michel; Aix Marseille Universit� , URMITE
Key Words:	whole genome sequencing, cerebrospinal fluid, real-time sequencing, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , meningitis, point-of-care (POC)
Abstract:	<p>Current rapid point-of-care (POC) diagnosis of life-threatening community-acquired bacterial meningitis is based on the detection of pathogen a genome sequence in the cerebrospinal, fluid using multiplex format.</p> <p>A 69-year-old woman admitted to the emergency department for meningitis diagnosed positive for <i>Streptococcus pneumoniae</i> at the POC laboratory by direct multiplex assay. In parallel total DNA extracted from 200 μL CSF was directly sequenced on Oxford Nanopore MinION. Real-time analysis of MinION-generated sequence data was done by EPI2ME online software and CLC Genomic Workbench.</p> <p>POC real-time whole genome sequencing directly applied to the cerebrospinal fluid, diagnosed an in silico susceptible, serotype 10-A <i>Streptococcus pneumoniae</i> with 92.5% genomic coverage, using Oxford Nanopore Technology, in less than two-hour workflow including a 20-minute sequencing run. This result was confirmed by routine bacterial culture two days later.</p> <p>Based on its simplicity, rapidity and reliability, real-time metagenomics is suitable to be implemented as a routine and efficient POC diagnostic for life-threatening infections, including bacterial meningitis.</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

20 **Dear editor,**

21 Bacterial meningitis is a life-threatening invasive infection that could progress to
22 mortality within 24 hours in the absence of an appropriate treatment, causing
23 annually more than 50% deaths from all-cause meningitis and leaving one in five
24 people recovering with chronic neurological disorders (1). Current rapid point-of-care
25 (POC) diagnosis of community acquired bacterial meningitis is based on PCR-based
26 multiplex assays detecting pathogen-specific sequences in the cerebrospinal fluid
27 (CSF) (2). These assays however do not provide all the pieces of information
28 desirable for the optimal medical management of the patient clinically diagnosed with
29 community-acquired meningitis. antibiotic susceptibility to finely tune the antibiotic
30 treatment and genotyping to guide source tracing. Real-time whole genome
31 sequencing is an alternative approach recently developed for detecting and
32 genotyping pathogens directly from clinical samples, and to determine antibiotic
33 susceptibility profile, in real time (3).

34 Here, we reported a 69-year-old woman was admitted to the emergency department
35 with a 38.5°C fever which had lasted a day, repeated dizzy spells, and vomiting.
36 Clinical examination disclosed neck stiffness, headache, and photophobia, without
37 rash or purpura. Biological testing found an inflammatory syndrome with C-reactive
38 protein at 350 mg/L. CSF analyses yielded hyperproteinorrhachia at 1.16 g/L and
39 hypoglycorrachia at 0.11 mmol/L, a leukocyte count of 4 cells/mm³ and erythrocytes
40 at 50 cell/mm³. Gram staining showed Gram-positive diplococci identified as *S.*
41 *pneumoniae* using a real-time multiplex PCR assay (bioFire FilmArray®
42 Meningitis/Encephalitis panel, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) at the POC
43 laboratory (2). The cultured *S. pneumoniae* was categorized *in vitro* susceptible to
44 penicillin G, ceftriaxone, erythromycin, doxycycline, and chloramphenicol by Mueller-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

45 Hinton culture antibiogram after two days. The patient was treated with ceftriaxone, 6
46 g/day for 14 days and dexamethasone, 40 mg/day for five days. Further evaluations
47 found hyperproteinemia at 110 g/L and a plasmatic monoclonal peak of IgG kappa
48 quantified at 39 g/L (Capillarys, Sebia, Evry, France), which led to a subsequent
49 diagnosis of multiple myeloma.

50 Alongside the bioFire FilmArray® investigation, total DNA was extracted from 200 µL
51 of cerebrospinal fluid using the EZ1 DNA Kit and an EZ1 automaton (Qiagen,
52 Courtaboeuf, France) following 20-minute incubation with proteinase K at 56°C and
53 eluted in a 50-µL final volume. Next-generation sequencing was performed using a
54 MinION device (Oxford Nanopore Technology, Oxford, UK), as previously described
55 (3), using 47 µL of the extracted DNA for the MinION library preparation (Appendix
56 1). The final library was recovered in 15 µL volume and was further diluted in 75 µL of
57 flow cell loading mix and sequenced for 20 minutes on a MinION instrument.

58 Sequencing data were analysed in real-time using the EPI2ME online software
59 (version 2019.11.11-2920621). In a second analysis, we assembled and mapped the
60 generated reads using CLC Genomics Workbench software version 7.5.0 (Qiagen).
61 Furthermore, 1 ng of DNA was used for NGS sequencing using the Illumina Nextera
62 XT library preparation and the paired-end protocol (Illumina, San Diego, USA), as
63 previously described (4), on an iSeq 100 instrument (Illumina) and sequences were
64 analysed using the CLC Genomics Workbench software (Qiagen).

65 A twenty-minute MinION sequencing run generated 61,150 reads, including 11,659
66 *S. pneumoniae* reads (Figure 1). Assembly process generated 92.5% genome
67 coverage and further blast analysis yielded *S. pneumoniae* with 98.97% sequence
68 identity with the reference *S. pneumoniae* strain A6-10, a serotype 10-A (GenBank
69 accession no. CP053210.1). The clinical strain was *in silico* susceptible to all

1
2
3 70 routinely used antibiotics as determined using the ResFinder bio-tool
4
5 71 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Appendix 2) (Figure 1). MinION
6
7 72 sequencing data were confirmed by Illumina iSeq sequencing, generating 503,192
8
9 73 reads. Blast comparison of the 73,597-bp longest contig identified a best match with
10
11 74 *S. pneumoniae* strain A6-10 with 98.97% sequence similarity. A total of
12
13 75 338,879/503,192 (67.35%) reads mapped to the reference sequence, identifying 90%
14
15 76 of the *S. pneumoniae* genome. Further online analysis using Multilocus Sequence
16
17 77 Typing (MLST), revealed a perfect match with the *S. pneumoniae* reference genome,
18
19 78 sharing common characteristics with the 128 isolates disponible in the GenBank
20
21 79 database, including 104 isolates from European countries of which 58 were serotype
22
23 80 10A, all of them being susceptible to all antibiotics as confirmed by routine bacterial
24
25 81 culture (Appendix 2).
26
27
28
29
30
31 82 *S. pneumoniae* meningitis is a life-threatening invasive infection warranting its rapid
32
33 83 complete diagnosis (6-7). Diagnosis methods currently available at the POC
34
35 84 laboratory, do not provide pieces of information regarding typing and antibiotic
36
37 85 susceptibility of the detected *S. pneumoniae* (2). Here, we successfully applied direct
38
39 86 near whole genome real-time sequencing diagnosis of community-acquired
40
41 87 *Streptococcus pneumoniae* meningitis using MinION technology, providing in less
42
43 88 than two-hour workflow including only 20-minute sequencing time, the detection,
44
45 89 identification, typing and *in-silico* antibiogram; after we developed a specific
46
47 90 sequencing procedure as here reported (Figure 1). The fact that this procedure is
48
49 91 time-competitive with that of the real-time PCR multiplex assay, providing valuable
50
51 92 additional pieces of information, makes real-time whole genome sequencing a
52
53 93 suitable approach for the diagnosis of community-acquired meningitis at the POC
54
55 94 laboratory.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

95 **Acknowledgments**

96 This study was supported by Fondation Méditerranée Infection, IHU Méditerranée
97 Infection, Marseille, France. MM receives a PhD grant from the Fondation
98 Méditerranée Infection. The authors thank Olivia Ardizzoni for her help with NGS
99 library preparation and MinION sequencing.

100 **Ethical statement**

101 All data were generated as part of routine work at the Assistance Publique-Hôpitaux
102 de Marseille (Marseille University hospitals), and this study is the result of routine
103 clinical management. This study was approved by our Institute's Ethics Committee under
104 number (2021-004). No specific clinical sampling was performed in this study.

105 **Funding**

106 Madjid Morsli is a PhD student supported by the Fondation Méditerranée Infection.
107 This work was supported by the French Government under the Investissements
108 d'Avenir (Investments in the Future) programme managed by the Agence Nationale
109 de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research) [reference: Méditerranée
110 Infection 10-IAHU-03].

111 **Competing Interests**

112 The authors have no conflicts of interest to declare.

113 **Authors' contributions.**

114 MM contributed to the experimental design, carried out the work, analysed the data,
115 interpreted the data, and wrote the paper. QK collected samples, performed routine
116 analyses, collected clinical information, and wrote the paper. AS and PP carried out

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

117 clinical diagnoses and CSF sampling. PEF and MD contributed to critically reviewing
118 the manuscript, interpreting the data, and coordinated and directed the work. All
119 authors declare that they have read and approved the manuscript.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 120
- 121 1. Rodgers E, Bentley SD, Borrow R, Bratcher HB, Brisse S, Brueggemann AB,
122 et al. The global meningitis genome partnership. *J Infect.* 2020;81:510–20.
- 123 2. Vincent JJ, Zandotti C, Baron S, Kandil C, Levy PY, Drancourt M, Raoult D,
124 Ninove L. Point-of-care multiplexed diagnosis of meningitis using the
125 FilmArray® ME panel technology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;
126 39:1573-1580. doi: 10.1007/s10096-020-03859-y. Epub 2020 May 1. PMID:
127 32358740.
- 128 3. Morsli M, Kerharo Q, Delerce J, Roche PH, Troude L, Drancourt
129 M. *Haemophilus influenzae* Meningitis Direct Diagnosis by Metagenomic Next-
130 Generation Sequencing: A Case Report. *Pathogens.* 2021;10:461. doi:
131 10.3390/pathogens10040461. PMID: 33921275; PMCID: PMC8069228.
- 132 4. Morsli M, Vincent JJ, Milliere L, Colson P, Drancourt M. Direct next-generation
133 sequencing diagnosis of echovirus 9 meningitis, France. *Eur J Clin Microbiol
134 Infect Dis.* 2021 Mar 11. doi: 10.1007/s10096-021-04205-6. Epub ahead of
135 print. PMID: 33694039.
- 136 5. Grumaz C, Hoffmann A, Vainshtein Y, Kopp M, Grumaz S, Stevens P, et al.
137 Rapid Next-Generation Sequencing–Based Diagnostics of Bacteremia in
138 Septic Patients. *J Mol Diagnostics.* 2020;22:405–18.
- 139 6. Koelman DLH, Brouwer MC, van de Beek D. Resurgence of pneumococcal
140 meningitis in Europe and Northern America. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26:199-
141 204. doi: 10.1016/j.cmi.2019.04.032. Epub 2019 May 14. PMID: 31100424.
- 142 7. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

143 of nanopore sequencing to the genomics community. Genome Biol. 2016 Nov
144 25;17(1):239. doi: 10.1186/s13059-016-1103-0. Erratum in: Genome Biol.
145 2016;17 :256. PMID: 27887629; PMCID: PMC5124260.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

147 **Figure 1:** Real-time whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae* (*S.*
148 *pneumoniae*). Total handling time was less than two hours, including 35 minutes for
149 cerebrospinal fluid (CSF) processing and EZ1 DNA extraction, 60 minutes for the
150 Oxford Nanopore library preparation and 20 minutes for MinION library sequencing.
151 The MinION sequencing result was directly analysed by EP2ME software, then the
152 generated reads were mapped to the reference genome by CLC software. In this
153 case, the *S. pneumoniae* genome was detected after a 20-minute sequencing run,
154 and the full data analysis yielded 92.5% genome coverage directly recovered from
155 CSF sample.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

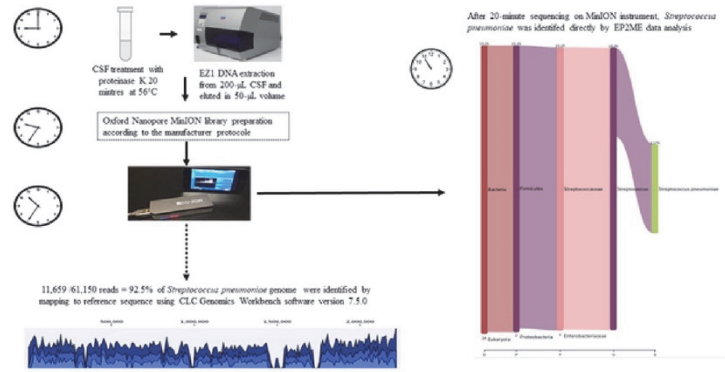


Figure 1: Real-time whole genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Total handling time was less than two hours, including 35 minutes for cerebrospinal fluid (CSF) processing and EZ1 DNA extraction, 60 minutes for the Oxford Nanopore library preparation and 20 minutes for MinION library sequencing. The MinION sequencing result was directly analysed by EP2ME software, then the generated reads were mapped to the reference genome by CLC software. In this case, the *S. pneumoniae* genome was detected after a 20-minute sequencing run, and the full data analysis yielded 92.5% genome coverage directly recovered from CSF sample.

54x30mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Appendix 1: MinION library preparation.

Briefly, DNA repair and end-preparation were performed in a 60- μ L volume containing 47 μ L DNA, 1 μ L of DNA CS (DNA control), 3.5 μ L NEBNext FFPE DNA Repair buffer, 2 μ L NEBNext FFPE DNA Repair mix (New England BioLabs, Evry-Courcouronnes, France), 3.5 μ L Ultra II End-prep reaction buffer and 3 μ L Ultra II End-prep enzyme Mix (New England Biolabs), for five minutes at 20°C, performed in a GeneAmp PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) followed by five minutes of incubation at 65°C. The repaired DNA was mixed with an equal volume of Agencourt Ampure XP beads (Beckman Coulter, Villepinte, France) and washed with 70% ethanol, then eluted in 61 μ L distilled water. Adapter ligation was performed in 100 μ L containing 60 μ L purified DNA, 25 μ L ligation buffer, 10 μ L T4 DNA ligase and 5 μ L adapter mix, incubated for 10 minutes at room temperature. After mixing with Agencourt Ampure XP beads at a ratio of 0.4, the final library was recovered in 15 μ L and was further diluted in 75 μ L of flow cell loading mix and sequenced for 20 minutes using a MinION instrument.

Appendix 2: Confirmation of the *in silico* antibiogram by a panel of routinely used antibiotics.

Antibiotic	In vitro antibiotic test	In silico antibiotic test
Fosfomycin	Susceptible <32 mg/L	Susceptible
Vancomycin	Susceptible 0.380 mg/L	Susceptible
Amoxicillin+clavulanic acid	Susceptible 0.016 mg/L	Susceptible
Ceftriaxone	Susceptible 0.016 mg/L	Susceptible
Penicillin	Susceptible 0.006 mg/L	Susceptible
Pristinamycin	Susceptible <1 mg/L	Susceptible
Clindamycin 15	Susceptible	Susceptible
Teicoplanin	Susceptible <4 mg/L	Susceptible
Gentamicin	Susceptible <128.000 mg/L	Susceptible
Rifampicin	Susceptible <0.016 mg/L	Susceptible
Erythromycin	Susceptible <0.031 mg/L	Susceptible
Doxycycline	Susceptible	Susceptible
Imipenem	Susceptible 0.003 mg/L	Susceptible

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Autres participations

Article 3 : Épidémiologie des méningites entre Marseille et Nîmes

Nous avons aussi collaboré avec le laboratoire de microbiologie et hygiène hospitalier de CHU de Nîmes dans le but de réaliser une étude comparative de l'épidémiologie des méningites en deux centres hospitaliers au sud de la France.

Article 4 : Séquençage de 50 LCR entre Marseille et Nîmes

L'objectif de ce travail était d'apprécier la robustesse de notre méthode, tout en vérifiant la faisabilité dans les temps impartis et d'observer l'impact de différents facteurs sur nos résultats. Cette série a été réalisée sur deux centres qui sont l'IHU Méditerranée Infection de Marseille et le CHU de Nîmes. A cette occasion, une paillasse a vu le jour au laboratoire POC afin de travailler en autonomie et dans des conditions réelles (Figure 17).

Nous avons participé à l'analyse métagénomique rétrospective d'une cohorte de plus de 50 échantillons cliniques de LCR de patients ayant été diagnostiqués comme étant atteints de méningite communautaire. Tous les patients sélectionnés ont été diagnostiqués par PCR multiplexe et confirmés par une autre méthode, moléculaire et/ou culture. Nous avons essayé de récupérer une gamme d'échantillons représentative en fonction de différentes situations biologiques : hémorragique, leucocytaire, bactéries et virus, en faible et forte concentration. Ce travail avait pour objectif de valider notre méthode sur un plus grand nombre de prélèvements et sur une plus grande variété de germes.

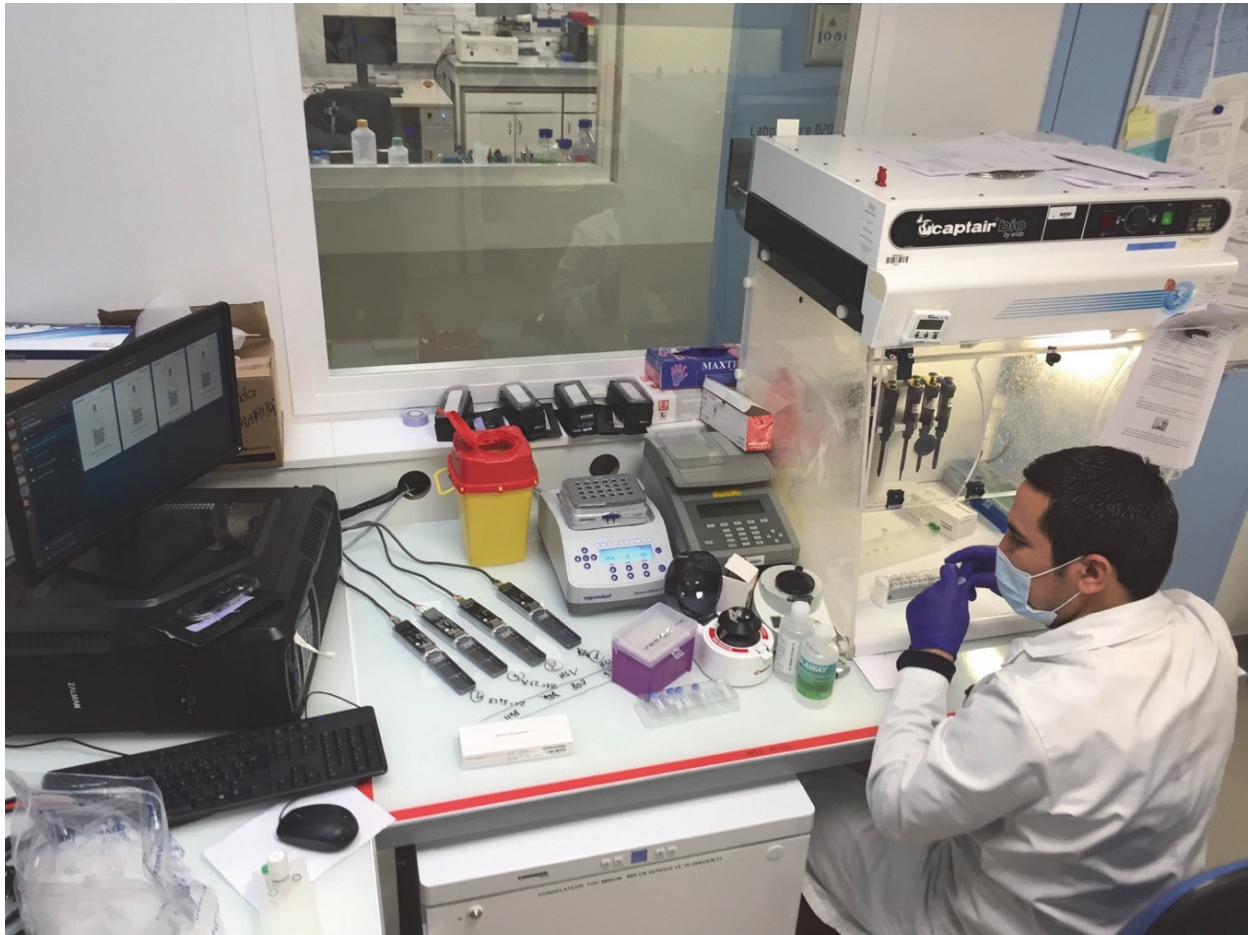


Figure 16 : Mise en place du POC MinION au laboratoire POC de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille. Validation d'un protocole standard de préparation des bibliothèques et séquençage dans un espace réduit. La paillasse a été équipée avec du matériels légers et transportables, d'une hotte biocap pour la préparation des bibliothèques et pour éviter les contaminations, de 4 MinIONs et d'un ordinateur Linux.

Discussion

Sur le plan technique, il faudra souligner que la préparation des librairies est une étape clé nécessitant un environnement de travail calme et une concentration maximale de l'opérateur. Cette préparation met en jeu de nombreuses manipulations avec une dizaine de réactifs précieux et d'enzymes sensibles, le tout sous des volumes de l'ordre du microlitre, toute erreur intervenant dans ces opérations compromettant l'ensemble de l'analyse.

La multiplication des manipulations est, en biologie moléculaire souvent source d'erreur, parmi celles-ci, la contamination de l'échantillon qui est responsable d'un résultat faussement positif. Afin de limiter cet aléa, l'utilisation à l'avenir de kit de « barcoding » ayant pour objectif de marquer les séquences de l'échantillon d'intérêt devrait pouvoir permettre de s'affranchir des contaminations lors de la préparation des librairies. Cette stratégie a de fait un second avantage, celui de réduire le coût global de l'analyse en permettant l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, réduisant ainsi à environ 200€ le coût par test d'après une estimation locale du laboratoire.

L'opérateur ne peut quitter son poste tout au long de la préparation de la librairie, les temps très courts entre les différentes étapes ne lui permettant pas de réaliser une tâche annexe en parallèle. A l'avenir, l'investissement dans des automates de préparation des librairies tel que le Voltrax[®] permettrait de libérer l'opérateur et standardiser la préparation des échantillons, pour un investissement estimé actuellement à 8.500\$ (35).

La sensibilité de la méthode peut encore être améliorée, en effet, les méthodes de séquençage ont montré un manque de sensibilité, en particulier dans les plages de concentration faible (30-35 Ct) (40). Appliquer auparavant une amplification comme par exemple la région 16S de l'ARNr peut être en partie une solution, son application a d'ailleurs montré de bons résultats (38). Cependant cette application pose deux problèmes, le premier étant que les manipulations et traitements supplémentaires rallongent la durée de l'analyse, le second est qu'en appliquant une amplification de l'ARN bactérien, les concentrations relatives en ADN des agents infectieux sont modifiées puisque par exemple les virus ne seront pas amplifiés par cette méthode.

La capacité du dispositif à assigner des séquences à un germe devra aussi être vérifiée pour l'ensemble des germes responsables de méningite, en effet des études ont montré que la plateforme de séquençage des Nanopores pouvait avoir des difficultés à détecter certaines bactéries tel que, par exemple les bactéries du genre *Corynebacterium* (41);

exceptionnellement impliquées comme étiologies des méningites bactériennes communautaires.

Enfin les Virus à ARN, tel que les Entérovirus en plus de leur fragilité posent problème à notre méthode car ils nécessitent des traitements supplémentaires qui allongent le temps de préparation des échantillons et sont à l'origine de pertes de matériel génétique. De nouveaux kits de séquençage direct de l'ARN sont cependant en train de voir le jour et pourraient permettre d'explorer un monde encore assez mal connu.

Le taux d'erreur élevé, en particulier chez Oxford Nanopore® (36) devrait s'améliorer ces prochaines années et ne constitue pas en soit réel frein à son utilisation puisque les erreurs de lecture sont corrigées par la superposition bioinformatique des séquences, appelée consensus. La comparaison de la technologie Illumina à celle d'Oxford Nanopore® a démontré que pour les variants nucléotidiques (mutation ponctuelle), la sensibilité et la précision étaient supérieures à 99% pour une couverture supérieure ou égale à 60 (42).

Si la méthode suscite de l'intérêt c'est aussi parce que les séquences générées au cours de l'expérience devraient permettre de déduire la sensibilité des germes aux anti-infectieux (43,44), ce qui aujourd'hui n'est possible, sauf rares cas, qu'en 48h. D'autres informations tels que la présence de toxine devraient pouvoir être détectée, et d'autres informations permettant le lignage tel que le sérotypage devraient permettre de participer à la veille sanitaire en identifiant des cluster ou foyers épidémiques (44).

La bioinformatique jouera un rôle important à l'avenir dans le traitement de ces données. Les compétences des Biologistes doivent évoluer dans ce domaine afin de garder un contrôle sur la qualité de l'analyse et pour interpréter les résultats.

Afin de pallier le manque de compétences bio-informatique pour le traitement de données générées par MinION pour interpréter le résultat, une base de données interne a été créée en référence au biofire et la mise à disposition du logiciel en ligne EPI2ME permettent aujourd'hui de réaliser l'identification du germe de façon très simple.

Enfin l'un des principaux enjeux de l'utilisation de technologies sera de garantir le contrôle et la sécurité des données, principalement d'origine humaine, et générées au cours de l'analyse.

Conclusion

Le diagnostic d'urgence des méningites est une priorité, et tous les moyens doivent être mis en œuvre pour que le patient reçoive un diagnostic et un traitement adéquat dans les plus brefs délais.

Bien que les technologies de séquençage permettent aujourd'hui d'obtenir des résultats intéressants et compatibles avec un flux de travail d'un laboratoire d'urgence, le manque de sensibilité et de standardisation couplé au manque de recul vis-à-vis de ces applications semblent aujourd'hui être les principaux axes d'amélioration avant son utilisation en laboratoire de routine.

A contrario, La PCR multiplexe s'est avérée depuis son arrivée dans nos laboratoires être très efficace pour le diagnostic d'urgence des méningites infectieuses. La composition de son panel, ciblé, couplé à la rapidité d'exécution ainsi que sa très grande sensibilité en ont fait un outil de première ligne dans le diagnostic d'urgence des méningites communautaires.

En conclusion de ce travail, bien que le séquençage génomique ait sa place dans le diagnostic des méningites infectieuses, l'avantage semble toutefois en faveur de la PCR multiplexe en première ligne du diagnostic d'urgence des méningites infectieuses communautaires.

Les avantages et inconvénients des PCR multiplexe et séquençage Oxford Nanopore sont résumés dans le tableau 4.

	PCR multiplexe	Oxford Nanopore
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicité : système clos - Rapidité : 1h15 - Sensible - Spécificité : 14 cibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Système ouvert : grande variabilité de germes à identifier - Analyse en temps réel - Bonne spécificité - Recueil d'information bien supérieur à la PCR - Techniquement accessible - Transportabilité du système
Inconvénient	<ul style="list-style-type: none"> - Coût relativement élevé pour une information simple - Excès de sensibilité : amplification de contaminants - Spécificité des amorces 	<ul style="list-style-type: none"> - Coût élevé - Sensibilité moindre - Spécificité variable d'un germe à l'autre - Manque de standardisation - Interférences : ADN humain

Tableau 4 : Comparaison des techniques PCR multiplexe et Oxford Nanopore dans le diagnostic d'urgence des méningites infectieuses.

Bibliographie

1. Bryan JP, de Silva HR, Tavares A, Rocha H, Scheld WM. Etiology and mortality of bacterial meningitis in northeastern Brazil. *Rev Infect Dis*. févr 1990;12(1):128-35.
2. GBD 2016 Meningitis Collaborators. Global, regional, and national burden of meningitis, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. déc 2018;17(12):1061-82.
3. OMS | Méningite. WHO. World Health Organization. Disponible sur: <http://www.who.int/topics/meningitis/fr/>
4. Brouwer MC, Tunkel AR, Beek D van de. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 1 juill 2010;23(3):467-92.
5. Arda B, Sipahi OR, Atalay S, Ulusoy S. Pooled analysis of 2,408 cases of acute adult purulent meningitis from Turkey. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent*. 2008;17(1):76-9.
6. Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, Forghani B, Honarmand S, Khetsuriani N, et al. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 mars 2003;36(6):731-42.
7. Dittrich T, Marsch S, Egli A, Rüegg S, De Marchis GM, Tschudin-Sutter S, et al. Predictors of infectious meningitis or encephalitis: the yield of cerebrospinal fluid in a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 23 avr 2020;20(1):304.
8. Simner PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 10 févr 2018;66(5):778-88.
9. Heckenberg SGB, de Gans J, Brouwer MC, Weisfelt M, Piet JR, Spanjaard L, et al. Clinical features, outcome, and meningococcal genotype in 258 adults with meningococcal meningitis: a prospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. juill 2008;87(4):185-92.
10. spilf-groupe-reco-encephalite-2017. Disponible sur: <https://www.antibioest.org/wp-content/uploads/2018/09/spilf-groupe-reco-encephalite-2017.pdf>
11. Kennedy PG, Adams JH, Graham DI, Clements GB. A clinico-pathological study of herpes simplex encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. oct 1988;14(5):395-415.
12. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management - PubMed. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23602163/>
13. Guery et al. - Société de pathologie infectieuse de langue française. Disponible sur: https://www.antibioest.org/wp-content/uploads/2018/09/Meningites_consensus-long-spilf-2008.
14. Tattevin P, Revest M, Lavoue S. Méningites et méningoencéphalites aseptiques. *Réanimation*. oct 2008;17(7):639-50.
15. van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EFM. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med*. 5 janv 2006;354(1):44-53.
16. Ettekoven CN van, Beek D van de, Brouwer MC. Update on community-acquired bacterial meningitis: guidance and challenges. *Clin Microbiol Infect*. 1 sept 2017;23(9):601-6.

17. Guery B, Bru J-P, Piroth L, Strady C, Schmit J-L. Société de Pathologie infectieuse de Langue Française (SPILF) Président : Jean-Paul Stahl Maladies infectieuses et tropicales. CHU de Grenoble. :65.
18. Velissaris D, Pinte M, Pantzaris N, Spatha E, Karamouzou V, Pierrakos C, et al. The Role of Procalcitonin in the Diagnosis of Meningitis: A Literature Review. *J Clin Med*. juin 2018;7(6):148.
19. Vincent J-J, Zandotti C, Baron S, Kandil C, Levy P-Y, Drancourt M, et al. Point-of-care multiplexed diagnosis of meningitis using the FilmArray® ME panel technology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. août 2020;39(8):1573-80.
20. Fournier P-E, Drancourt M, Raoult D. New Laboratory Tools for Emerging Bacterial Challenges. *Clin Infect Dis*. 15 août 2017;65(suppl_1):S39-49.
21. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 août 2009;49(4):543-51.
22. Brouwer MC, van de Beek D, Heckenberg SGB, Spanjaard L, de Gans J. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 nov 2006;43(10):1233-8.
23. Bohr V, Rasmussen N, Hansen B, Kjersem H, Jessen O, Johnsen N, et al. 875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and the impact of preadmission antibiotic therapy. Part III of a three-part series. *J Infect*. nov 1983;7(3):193-202.
24. Shameem S, Vinod Kumar CS, Neelagund YF. Bacterial meningitis: rapid diagnosis and microbial profile: a multicentered study. *J Commun Dis*. juin 2008;40(2):111-20.
25. Huy NT, Thao NTH, Diep DTN, Kikuchi M, Zamora J, Hirayama K. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. *Crit Care Lond Engl*. 2010;14(6):R240.
26. Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev*. janv 1996;9(1):18-33.
27. Nigrovic LE, Malley R, Macias CG, Kanegaye JT, Moro-Sutherland DM, Schremmer RD, et al. Effect of Antibiotic Pretreatment on Cerebrospinal Fluid Profiles of Children With Bacterial Meningitis. *Pediatrics*. 1 oct 2008;122(4):726-30.
28. Parent du Châtelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Nacro B, Njanpop-Lafourcade B-M, et al. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 janv 2005;40(1):17-25.
29. Liesman RM, Strasburg AP, Heitman AK, Theel ES, Patel R, Binnicker MJ. Evaluation of a Commercial Multiplex Molecular Panel for Diagnosis of Infectious Meningitis and Encephalitis. *J Clin Microbiol*;56(4). Disponible sur: <https://jcm.asm.org/content/56/4/e01927-17>
30. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 28 juill 1995;269(5223):496-512.
31. Dark MJ. Whole-genome sequencing in bacteriology: state of the art. *Infect Drug Resist*. 8 oct 2013;6:115-23.

32. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J, ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2018;24(4):355-60.
33. Alkan C, Sajjadian S, Eichler EE. Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nat Methods.* janv 2011;8(1):61-5.
34. Direct Diagnosis of Echovirus 12 Meningitis Using Metagenomic Next Generation Sequencing - PubMed . Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34067526/>
35. Leggett RM, Clark MD. A world of opportunities with nanopore sequencing. *J Exp Bot.* 28 nov 2017;68(20):5419-29.
36. Magi A, Semeraro R, Mingrino A, Giusti B, D'Aurizio R. Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Brief Bioinform.* 27 nov 2018;19(6):1256-72.
37. Kafetzopoulou LE, Efthymiadis K, Lewandowski K, Crook A, Carter D, Osborne J, et al. Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples. *Eurosurveillance.* 13 déc 2018;23(50). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6299504/>
38. Hong NTT, Nghia HDT, Thanh TT, Lan NPH, Ny NTH, Ngoc NM, et al. Cerebrospinal fluid MinION sequencing of 16S rRNA gene for rapid and accurate diagnosis of bacterial meningitis. *J Infect.* avr 2020;80(4):469-96.
39. Lewandowski K, Xu Y, Pullan ST, Lumley SF, Foster D, Sanderson N, et al. Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. *J Clin Microbiol.* 23 déc 2019;58(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6935926/>
40. Heikema AP, Horst-Kreft D, Boers SA, Jansen R, Hiltemann SD, de Koning W, et al. Comparison of Illumina versus Nanopore 16S rRNA Gene Sequencing of the Human Nasal Microbiota. *Genes.* 21 sept 2020;11(9).
41. Bull RA, Adikari TN, Ferguson JM, Hammond JM, Stevanovski I, Beukers AG, et al. Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nat Commun.* 9 déc 2020;11(1):6272.
42. Lemon JK, Khil PP, Frank KM, Dekker JP. Rapid Nanopore Sequencing of Plasmids and Resistance Gene Detection in Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* déc 2017;55(12):3530-43.
43. Břinda K, Callendrello A, Ma KC, MacFadden DR, Charalampous T, Lee RS, et al. Rapid inference of antibiotic resistance and susceptibility by genomic neighbour typing. *Nat Microbiol.* mars 2020;5(3):455-64.
44. Golparian D, Donà V, Sánchez-Busó L, Foerster S, Harris S, Endimiani A, et al. Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Sci Rep.* 4 déc 2018;8(1):17596.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.**
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.