

# Evaluation comparative de deux méthodes NGS d'étude du résistome et du virulome de *Helicobacter pylori* à partir de biopsies gastriques

Lucie Bénéjat<sup>1</sup>, Léo Gillet<sup>1</sup>, Claudie Perreau<sup>1</sup>, Marine Jauvain<sup>1,2</sup>, Philippe Lehours<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CHU de Bordeaux, CNR des Campylobacters et des Hélicobacters, Bordeaux.

<sup>2</sup>INSERM U1312, UMR BRIC-Team 4, Bordeaux.



Société Française  
de Microbiologie

# Approches NGS disponibles en France

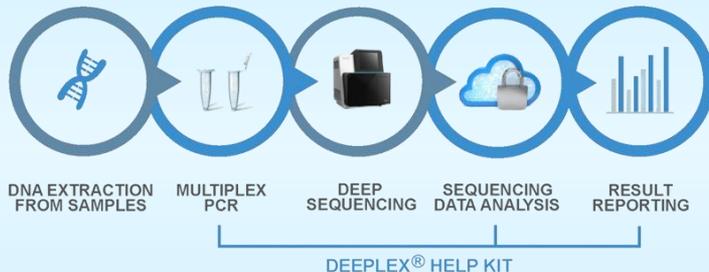
A partir de **biopsies gastriques** :

GenoScreen  
*Innovative Genomics*



Commercialisé en France  
Premier trimestre 2024

**PCR multiplex + NGS**



Nouvelle stratégie NGS développée au CNR  
(prés. RICAI 2023 & GEFH 2024)

**Capture par hybridation de sondes ARN  
+ NGS**

# Objectifs

Comparer les deux méthodes :  
workflow SureSelect CNR et GenoScreen Deeplex<sup>®</sup> HelP



# Comparatif des deux méthodes

	<b>“DNA Capture” CNR</b>	<b>Deeplex® Help</b>
<b>Quantité d’ADNg “input”</b>	10 – 200 ng	min. 10 génomes rec. 100 génomes
<b>Fragmentation</b>	15mn (enz.) ou 2-4mn Covaris (méc.)	<i>Non applicable</i>
<b>Préparation de bibliothèques</b>	Automatisable (Agilent MagnisDx)	Manuelle
<b>Compatibilité Séquençage</b>	Tout séquenceurs Illumina short-read	Tout séquenceurs Illumina short-read
<b>Temps de manip.</b>	2 jours	2 jours
<b>Bioinformatique</b>	Pipeline CNR	Pipeline GenoScreen

# Choix des cibles

*Cibles uniques à chaque kit en couleur :*

	<b>"DNA Capture" CNR</b> <i>Design V3</i>	<b>Deeplex® Help</b>
<b>Résistome</b>	23S (Clarithromycine), <b><i>gyrA</i></b> , <b><i>gyrB</i></b> (Lévofoxacine), <b><i>rpoB</i></b> (Rifampicine), 16S (Tétracycline), <b><i>pbp1</i></b> (Ampicilline), <b><i>frxA</i></b> , <b><i>rdxA</i></b> , <b><i>fdxB</i></b> (Métroimidazole)	
<b>Virulome</b>	<b><i>vacA</i></b> <b><i>cagA</i></b> <b><i>htrA</i></b>	
<b>MLST</b>	Gènes du schéma MLST* <b><i>hsp60</i></b> , <b><i>gyrB</i></b>	

\* *atpA, efp, mutY, ppa, trpC, ureI, yphC*

# Échantillons inclus dans l'étude

→ **17 biopsies gastriques (positives en PCR et en culture, avec des Ct variables)**

- › **5 hommes, 12 femmes** (moy. âge 45 ans  $\pm$  18)
- › la plupart souffrant de **gastrites** ou d'**épigastralgies**
- › **13 naïfs** de tout traitement d'éradication, 3 en **échec**, 1 sans renseignement

# Résistome : Analyse du 23S - Clarithromycine

PCR 23S CNR	"DNA Capture" CNR	Deeplex® Help
7 WT	7 WT	7 WT
1 A2142C	1 A2142C	1 A2142C
4 WT + A2142/43G	WT + A2143G (10%) <b>A2143G</b> WT + A2142G (32%) WT + A2143G (70%)	WT + A2143G (13%) WT + A2143G (82%) WT + A2142G (23%) WT + A2143G (46%)
5 A2142/43G	3 A2143G 1 A2143G 1 A2142G (85%) + A2143G (13%)	3 A2143G A2142G (30%) + A2143G (69%) A2142G (84%) + A2143G (15%)

# Résistome : Analyse de *gyrA* - Fluoroquinolones

ATB & PCR+Sanger	"DNA Capture" CNR	Deeplex® Help
10 WT	10 WT	10 WT
5 N87K	3 N87K 2 WT + N87K (25-53%)	3 N87K 2 WT + N87K (49-55%)
1 N87I	1 N87I	1 N87I
1 D91N	1 D91N	1 D91N

# Résistome : Analyse de *rpoB* - Rifampicine

ATB & PCR+Sanger	"DNA Capture" CNR	Deeplex® HELP
17 WT	17 WT	17 WT

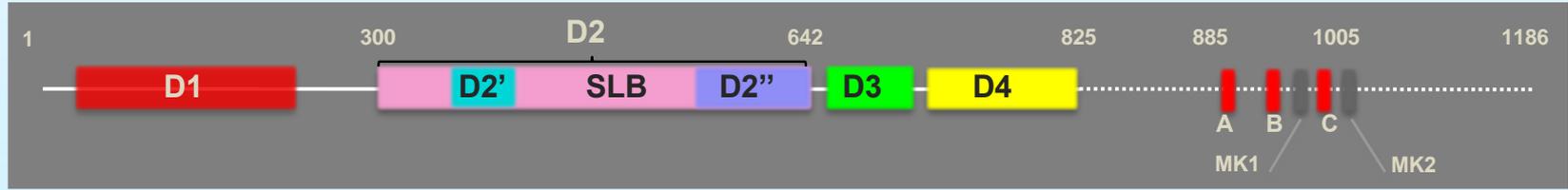
# Résistome : Analyse du 16S - Tétracycline

ATB & PCR+Sanger	"DNA Capture" CNR	Deeplex® HELP
17 WT	17 WT	14 WT 1 A926T (42%)* 2 A928G**

\* mutation associée à la résistance mais pas de double population *in vitro*

\*\* mutation non associée à la résistance : discordance d'interprétation du pipeline GenoScreen

# Virulome : Analyse de *cagA*\*

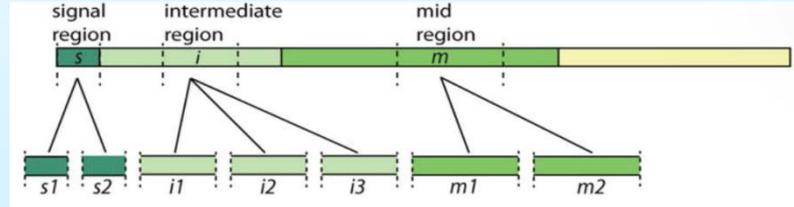


PCR point final**	"DNA Capture" CNR	Deeplex® Help
8 NEG	6 NEG 1 POS 1 NEG	6 NEG 1 POS 1 POS
9 POS	8 POS 1 NA (Ct 27,5)	8 POS 1 POS

\* pas d'analyse fine du nombre de motifs de phosphorylation EPIYA

\*\* PCR réalisées sur souches

# Virulome : Analyse de *vacA*



PCR point final*	"DNA Capture" CNR	Deeplex® Help
4 s1/i1/m1	4 s1/i1/m1	3 s1/i1/m1 1 s1/i2/m1
2 s1/i1/m2	2 s1/i1/m2	2 s1/i1/m2
1 s1/i2/m2	1 s1/i2/m2	1 s1/i2/m2
10 s2/i2/m2	8 s2/i2/m2 2 ?	8 s2/i2/m2 1 s?/i2/m2 1 s1/i2/m?

\* PCR réalisées sur souches

# Typage MLST

PCR + Sanger	"DNA Capture" CNR	Deplex® Help
11 hpEurope	11 hpEurope	7 hpEurope 1 hpWAfrica1 1 hpWAfrica1/hpSAfrica1 2 NA
4 hpAfrica	3 hpAfrica 1 hpEurope	1 hpWAfrica1 1 hpEurope/hpNEAfrica 1 hpEurope 1 hpEurope
2 hpEurope/hpAfrica	2 hpEurope/hpAfrica	1 hpEurope 1 hpWAfrica1

# Conclusions

- **Bonne performance de détection de la résistance pour les 2 kits**
  - › **Macrolides** : possibilité de détecter jusqu'à **10%** d'une population-R au sein d'un mélange
  - › **Lévofloxacine & Rifampicine** : **pas de discordance**
  
- Pipeline bioinformatique à améliorer pour **Deeplex® HELP**
  - › pour la **tétracycline**
  - › pour la **classification MLST**

# Conclusions

## → Améliorations à prévoir

- › génotypes de *vacA*
- › prédiction du nombre de motifs de phosphorylation EPIYA pour le kit Deeplex HelP

# Développements

- **Application sur biopsies FFPE de l'approche DNA Capture**
  - › oral de **Claudie Perreau**

# L'équipe du CNRCH

Directeur : Pr Philippe **Lehours-Keisler**

Biologistes : Dr Marine **Jauvain**

Ingénieurs : Lucie **Bruhl-Bénéjat** - Quentin **Jehanne** - Léo **Gillet**

Techniciennes : Astrid **Ducournau** - Johanna **Aptel** - Claudie **Perreau** - Marie **Taymont**

Adjoint administratif : Erick **Keisler**



Société Française  
de Microbiologie