

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

Lucie Bénéjat¹, Léo Gillet¹, Claudie Perreau¹, Marine Jauvain^{1,2}, Philippe Lehours^{1,2}

¹CHU de Bordeaux, CNR des Campylobacters et des Hélicobacters, Bordeaux.

²INSERM U1312, UMR BRIC-Team 4, Bordeaux.



Société Française
de Microbiologie

Approches NGS disponibles en France

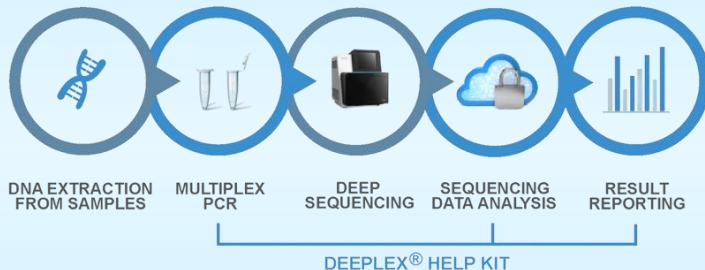
A partir de **biopsies gastriques** :

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[®] HelP



Comparatif des deux méthodes

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

Choix des cibles

Cibles uniques à chaque kit en couleur :

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

* *atpA, efp, mutY, ppa, trpC, urel, 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%) A2143G 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

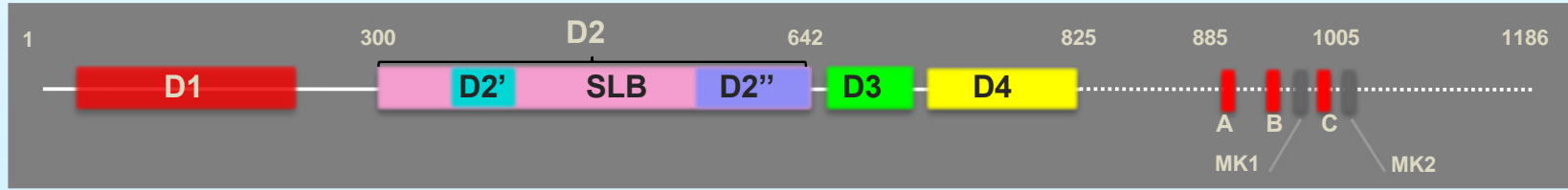
Résistome : Analyse du 16S - Tétracycline

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**

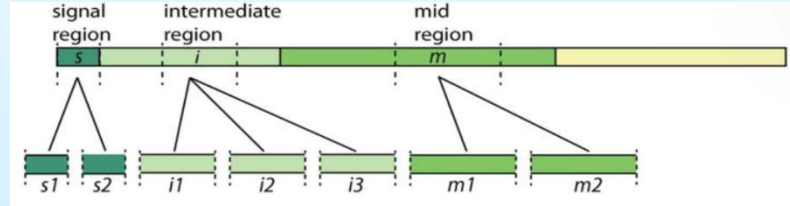


PCR point final**	"DNA Capture" CNR	Deeplex® Help
8 NEG	6 NEG 1 POS 1 NEG	6 NEG 1 POS 1 POS
9 POS	8 POS 1 NA (Ct 27,5)	8 POS 1 POS

* 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