

CORATA Belgique

5^{ème} Congrès de Biologie Clinique

Métagénomique et Diagnostic des
maladies infectieuses



Stephanie FERREIRA
Directrice du Développement
Responsable R&D, Innovation . Microbiome
stephanie.ferreira@genoscreen.fr

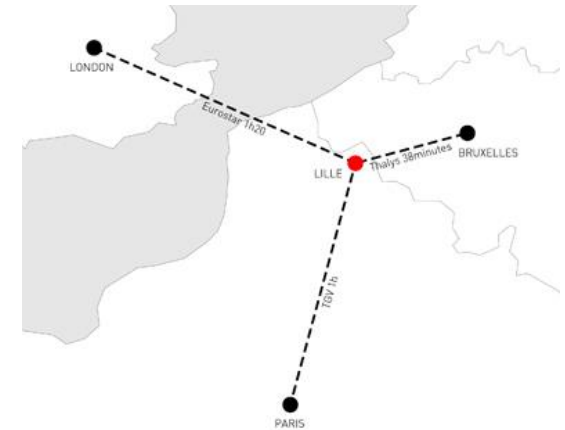
Société indépendante (Statut SAS)

Année de création : 2001

Effectif (ETP) : 30

Nbre de chercheurs (ETP) : 9

Investissement R & D - en 2015 : 600 KÖ (> 25 % du CA)



**Localisée sur le campus
de l'Institut Pasteur de Lille**



SANTÉ



- “ Détection et identification de microorganismes
- “ Détection de l'antibio-résistance
- “ Analyse des microbiomes dans le cadre de pathologies (Cancer colorectal, grippe, MICIõ)

ENVIRONNEMENT ET BIODIVERSITÉ



- “ Surveillance de la biodiversité
- “ Evaluation de traitements de biorémediation de sols
- “ Evaluation de la qualité des milieux (eau, air, sol)
- “ Identification de espèces
- “ Développement de marqueurs génétiques spécifiques de espèces

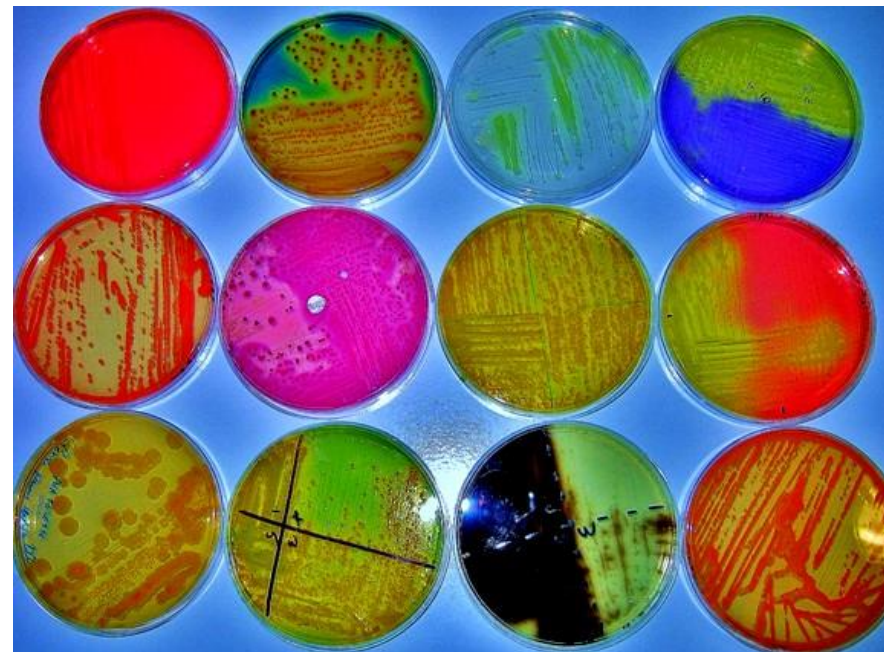
ALIMENTAIRE



- “ Valorisation de aliments & ingrédients à haute valeur ajoutée
- “ Sélection variétale
- “ Validation des procédés de décontamination et de nettoyage en industrie
- “ Identification de contaminants alimentaires
- “ Contrôle de l'origine d'un aliment

Cultures *in vitro*

- “ Dépendantes des milieux de culture utilisés
- “ Isolation/séparation nécessaire
- “ **Connus** > Inconnus Existence de **bactéries non cultivables** de façon traditionnelle au laboratoire
- “ **importants délais** (parfois plusieurs jours) imposés par la culture des microorganismes
- “ nécessité d'un **personnel spécialisé**, elles sont **difficilement automatisables**.



- La microbiologie «traditionnelle» peut être prise en défaut:
 - Culture impossible (traitement antibiotique préalable, *Treponema...*)
 - culture trop complexe (*Chlamydiae trachomatis*)
 - culture trop lente par rapport à l'urgence (*Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, ...).
 - Incontournable pour la virologie : +++
- On utilise des méthodes moléculaires et plus récemment la spectrométrie de masse.

Approches Moléculaires en Microbiologie



Applications les plus courantes: Identification

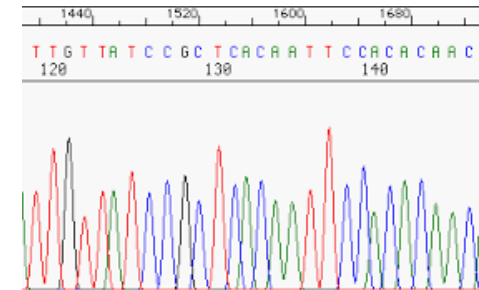


ADN



PCR

Gènes ubiquitaires/ribosomiaux (ADNr16S, 18S, ITS1-2, 23S, 28S)



Séquençage Sanger



Comparaison aux Bases de données pour identification



```
>gb|JN377670.1| Pseudomonas trivialis strain B24 16S rDNA gene, partial
sequence
Length=1446
Score = 817 bits (442), Expect = 0.0
Identities = 442/442 (100%), Gaps = 0/442 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1   GTGGTTGTTAAAGTTGATGTGAAATCCCGGGGTTGGGAACTGCATTCAAAACT   60
Sbjct 536   GCGCTTGTGTAAGTGGAGTGGAAATCCCGGGGTTGGGAACTGCATTCAAAACT   60
Query 61   GACTGACTAGACTAGTGTAGAGGGTGGCTTCCCTGTGTAGCGCTGAAATCCCTAGA 120
Sbjct 596   GACTGACTAGACTAGTGTAGAGGGTGGCTTCCCTGTGTAGCGCTGAAATCCCTAGA 120
Query 121  TATAGGAGGGAACACCAGTGGCTGGGACCCACTGGACTAATCTGACACTGAGGTGC 180
Sbjct 656   TATAGGAGGGAACACCAGTGGCTGGGACCCACTGGACTAATCTGACACTGAGGTGC 180
Query 181  GAAAGCCTGGGAGGCAACCAATTAGATACCCTGGTACTCCAGCCCTAAACCATGTCA 240
Sbjct 716   GAAAGCCTGGGAGGCAACCAATTAGATACCCTGGTACTCCAGCCCTAAACCATGTCA 240
Query 241  ACTAGCCCTGACCCCTTGGAGCTTTTATGGCCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCT 300
Sbjct 776   ACTAGCCCTGACCCCTTGGAGCTTTTATGGCCAGCTAACGCATTAAGTTGACCCGCT 300
Query 301  GGGGCTGGGCGCCAAAGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCCACAAAGCGTG 360
Sbjct 836   GGGGCTGGGCGCCAAAGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCCACAAAGCGTG 360
Query 361  GATGTGGTAAATTCGAGCAACCCGAGAACCTTACGAGGCTTGACATCCAATGA 420
Sbjct 916   GATGTGGTAAATTCGAGCAACCCGAGAACCTTACGAGGCTTGACATCCAATGA 420
Query 421  ACTTCTAGAGATAGATTGGTG 442
Sbjct 956  ACTTCTAGAGATAGATTGGTG 442
```

Pseudomonas trivialis à 100%

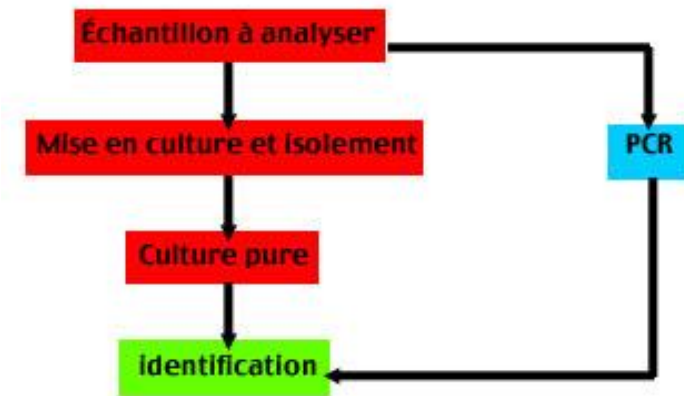
Approches Moléculaires en microbiologie

La technique de PCR est *a priori*

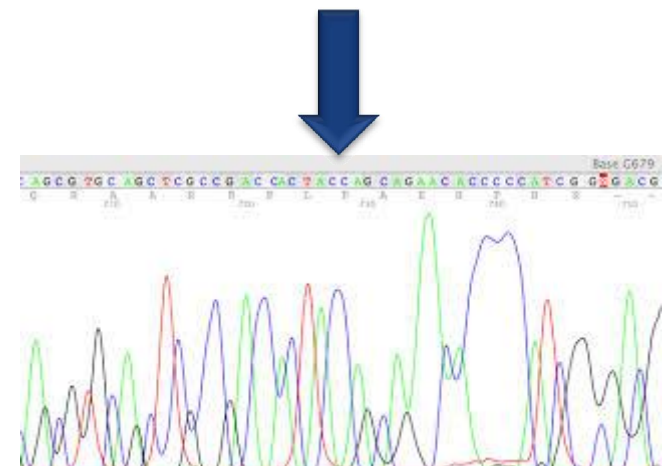
- **très sensible**; elle peut dans certains cas s'appliquer directement à l'échantillon à analyser, supprimant ainsi les délais de mise en culture et les problèmes liés aux germes non cultivables

- très **spécifique**; elle reste (et cela peut, par contre, être considéré comme inconvenient), une **démarche orientée (bactéries ou Champignons etc.)**

- **beaucoup plus rapide et automatisable.**

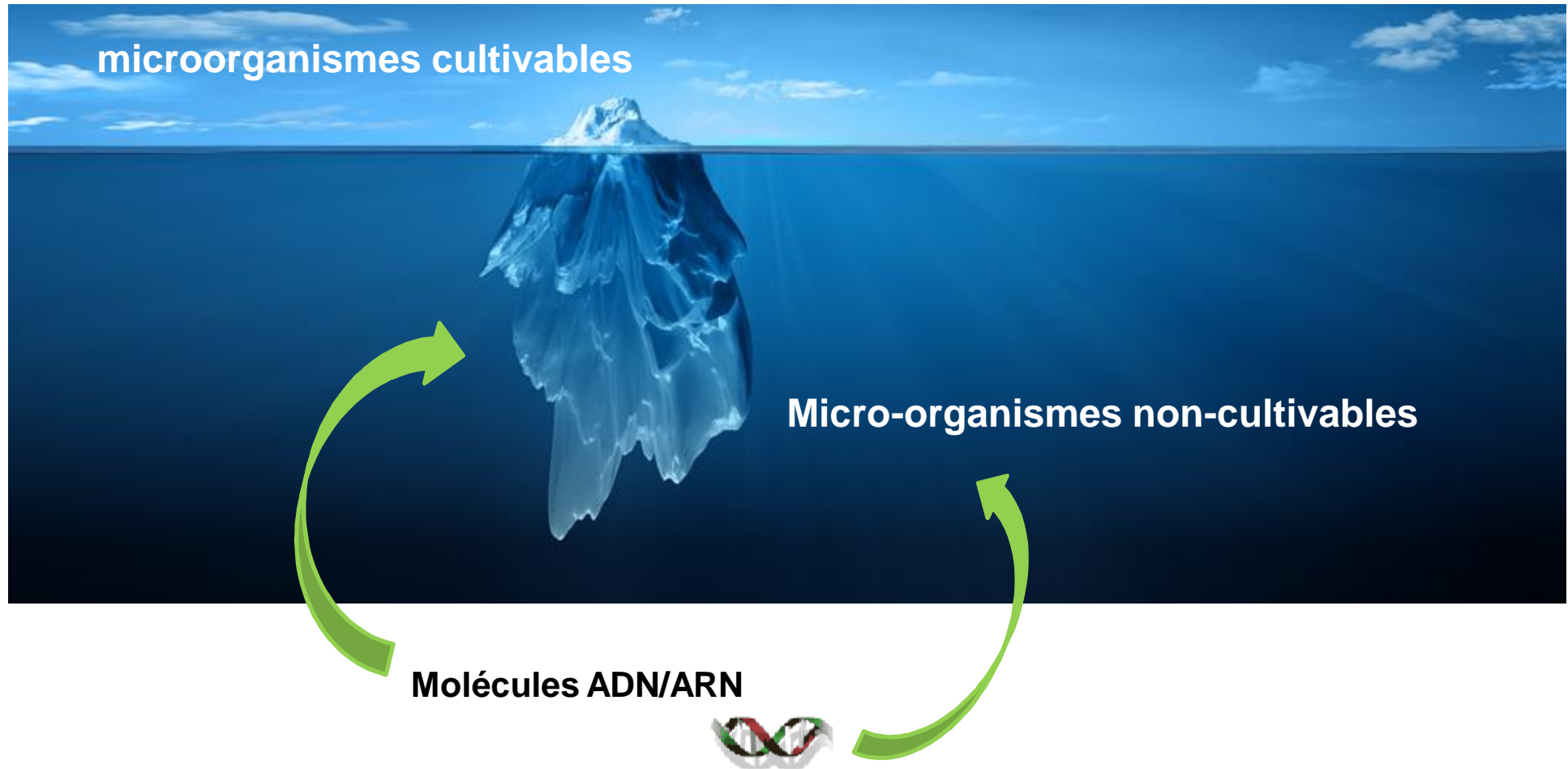


Mais si polymicrobial....



Approches Moléculaires Globales en Microbiologie





....et surtout...dans leur environnement naturel

Limites: Bactéries Mortes vs Vivantes
Pas de multiplication de la population par culture

Microbiote/Flore Microbienne ou microflore/Communauté Microbienne:

Ensemble des micro organismes (bactéries, levures, champignons, virus) vivants dans un environnement spécifique (appelé microbiome) chez un hôte (animal ou végétal)

Microbiome:

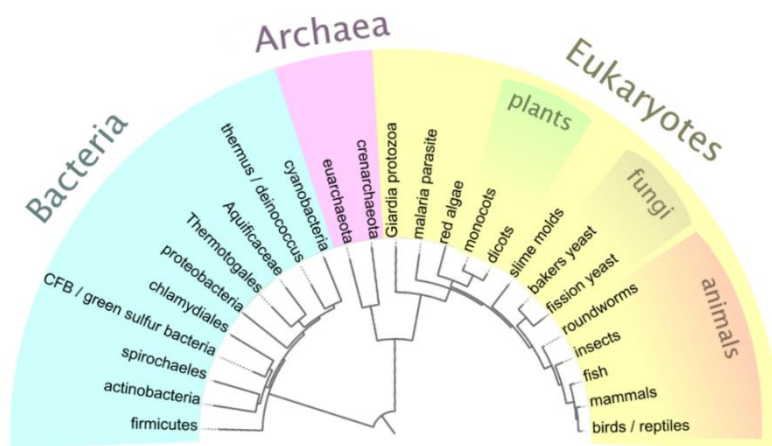
Ensemble des données génétiques ou génomes des microorganismes occupants un environnement spécifique

Métagénome:

Ensemble de génomes retrouvés dans un échantillon

La **métagénomique** est une méthode d'étude du contenu génétique d'échantillons issus d'environnements complexes (ex : intestin, océan, sols, air, etc.) prélevés dans la nature (**par opposition à des échantillons pré-cultivés en laboratoire**) désormais effectuées sur les outils NGS (Nouvelle Génération de Séquençage)

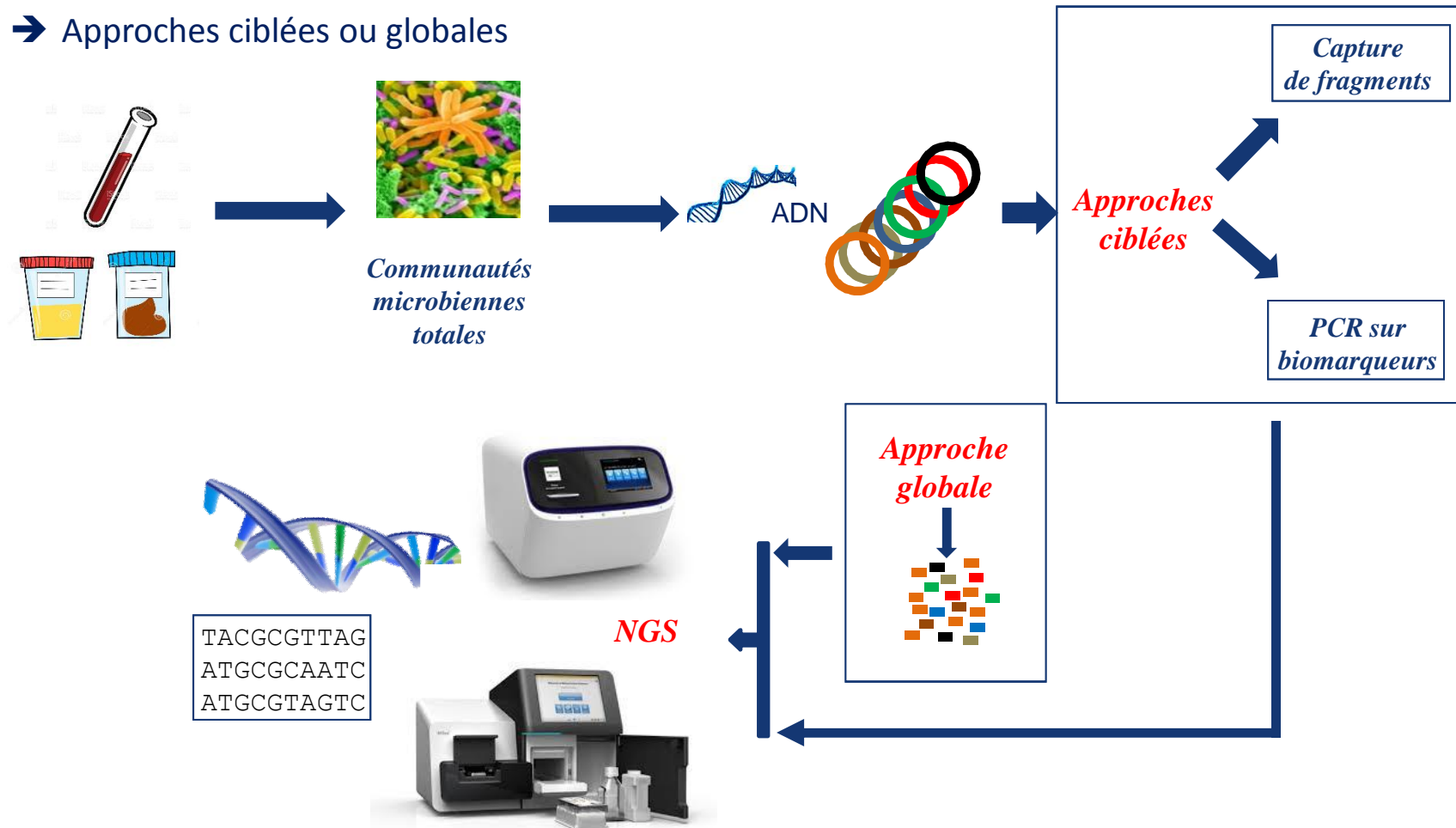
Cette méthodologie ne se base que sur l'information génétique globale (ADN/ARN) des microorganismes en communautés



Méthode révolutionnaire pour la microbiologie

Pourquoi?

→ Approches ciblées ou globales

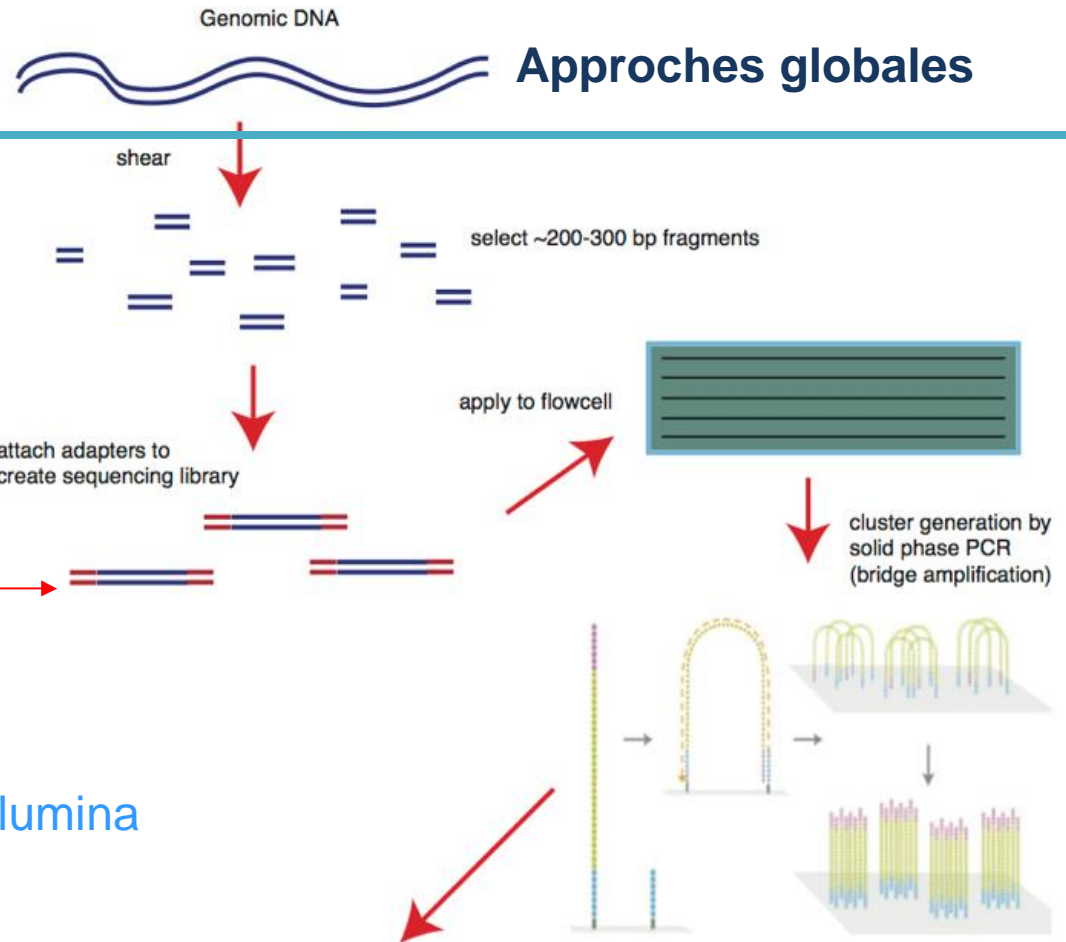


Importance des outils de séquençage à haut débit pour l'étude des micro-organismes et des communautés microbiennes complexes

IonTorrent (Applied Biosystems)

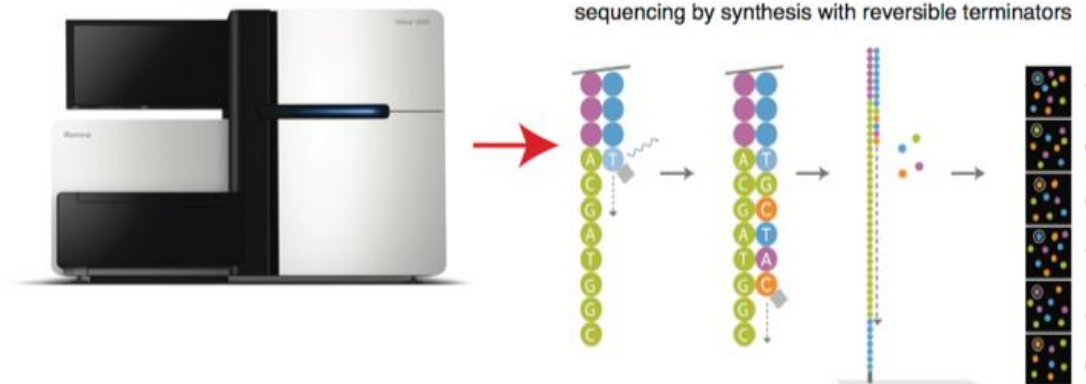


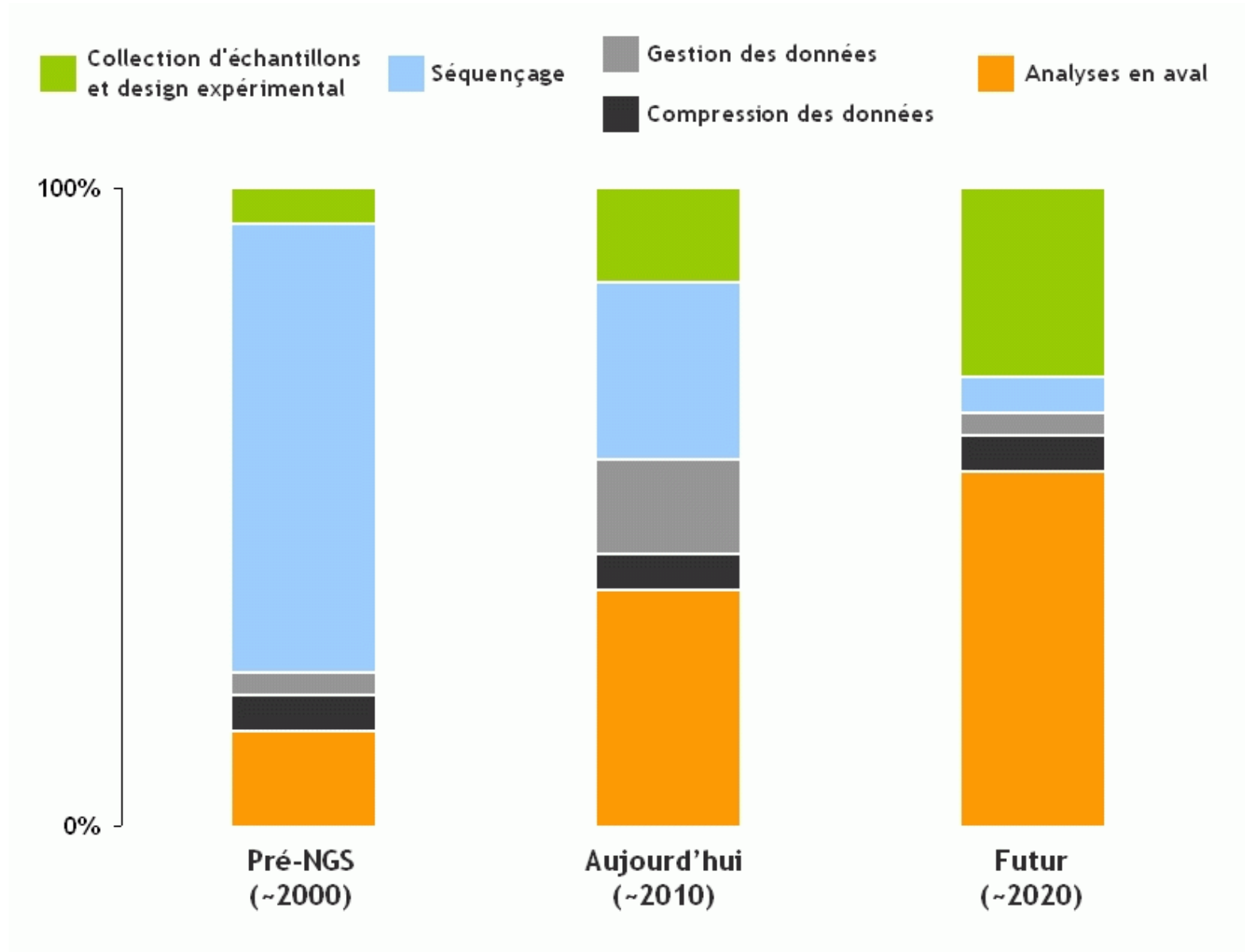
MiniSeq- MiSeq (Dx) (Illumina)



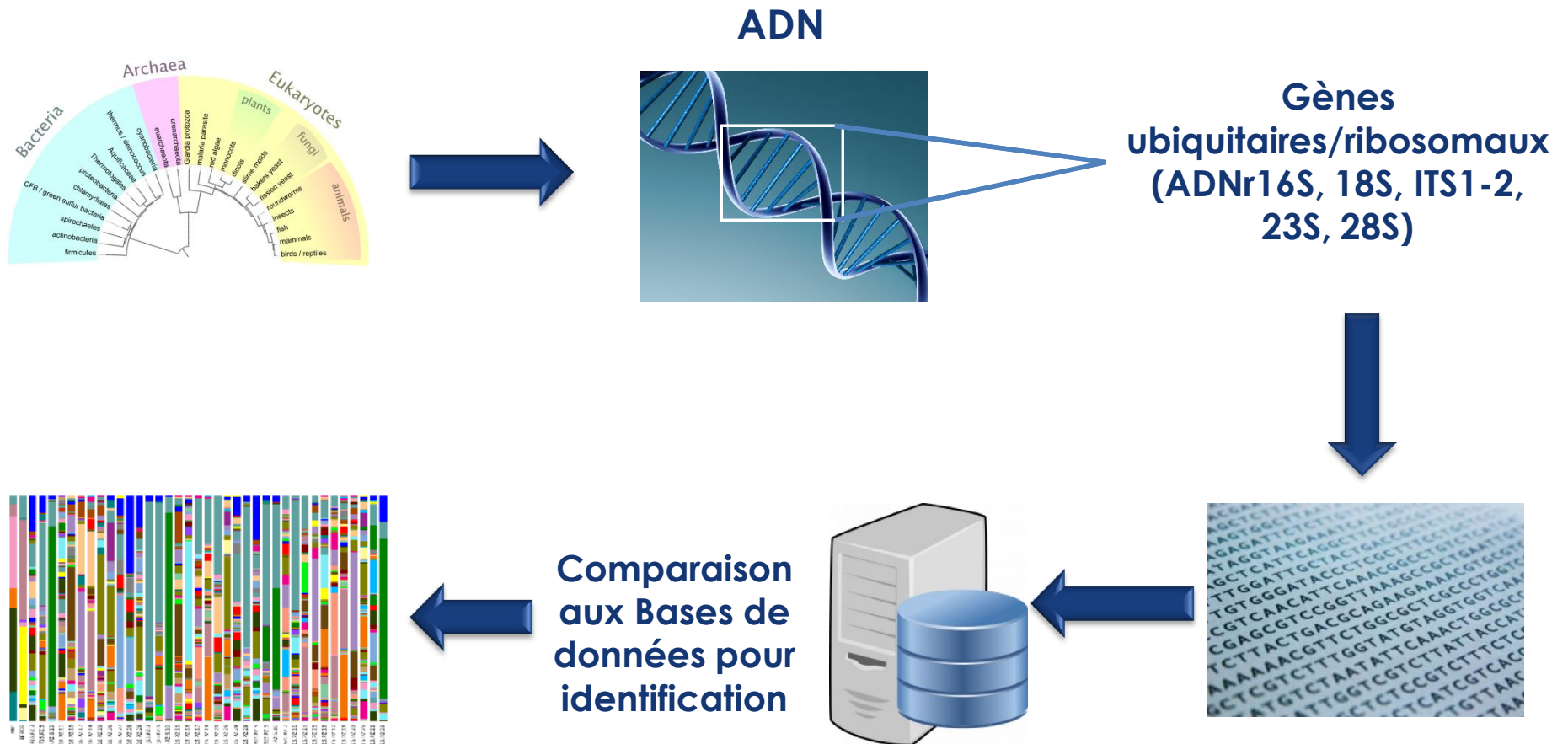
Approches ciblées

Le principe de la technologie Illumina





Comment une composition complexe de différents génomes est-elle étudiée ? Approche ciblée...

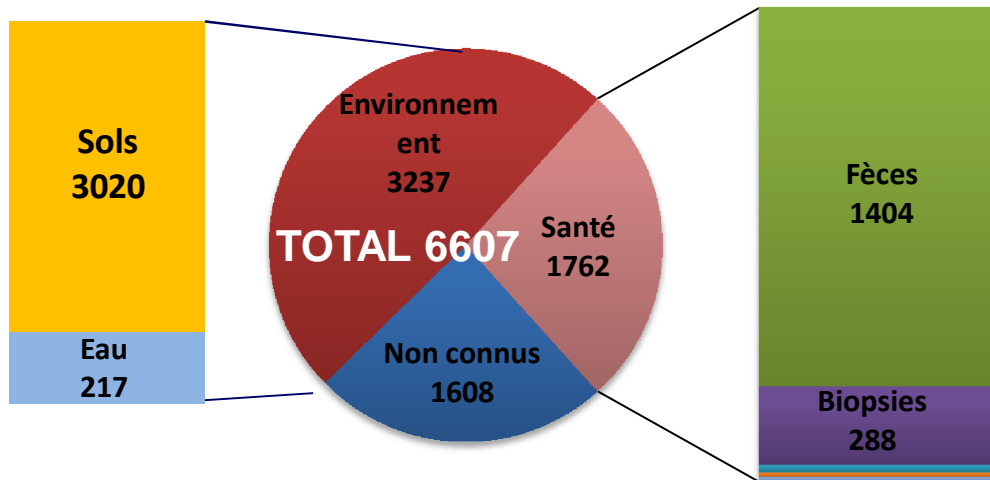


DES SUCCES:

- ✓ DES METHODES D'EXTRACTION DE L'ADN OPTIMISEES
- ✓ UN PROCEDE TECHNIQUE OPTIMISE ET STANDARDISE MetaBiote®

✓ ~6000-8000 ANALYSES DE COMMUNAUTES MICROBIENNES an

En 2016 +15%



Lancet Respir Med, 2016 Jan, 4(1): 49-58.
doi: 10.1016/S2213-2600(15)00466-X

PMCID: PMC469846:

Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study

Louise J Pankhurst, Dr, PhD, ^{a,*} Carlos del Ojo Elias, MSc, ^{a,*} Antonina A Votintseva, PhD, ^{a,*} Timothy M Walker, MRCP, ^{a,*} Kevin Cole, BSc, ^d Jim Davies, Prof, PhD, ^c Gilles M Ferment, MSc, ^b Deborah M Gascoyne-Binzi, PhD, ^f Thomas A Kohl, PhD, ^g Clare Kong, BSc, ^g Nadine Lemaitre, PhD, ^g Stefan Niemann, DSc ScD, ^{h,k} John Paul, MD, ^g Thomas R Rogers, FRCPath, ^l Emma Roycroft, MSc, ^l E Grace Smith, FRCPath, ^g Philip Supply, PhD, ^{g,p} Patrick Tan, PhD, ^l Mark H Wilcox, FRCPath, ^l Sarah Wordsworth, PhD, ^g David Wylie, FRCPath, ^{g,m} Li Xu, PhD, ^g and Derrick W Crook, FRCPath, ^g, for the COMPASS-TB Study Group¹



ORIGINAL ARTICLE
Fungal microbiota dysbiosis in IBD

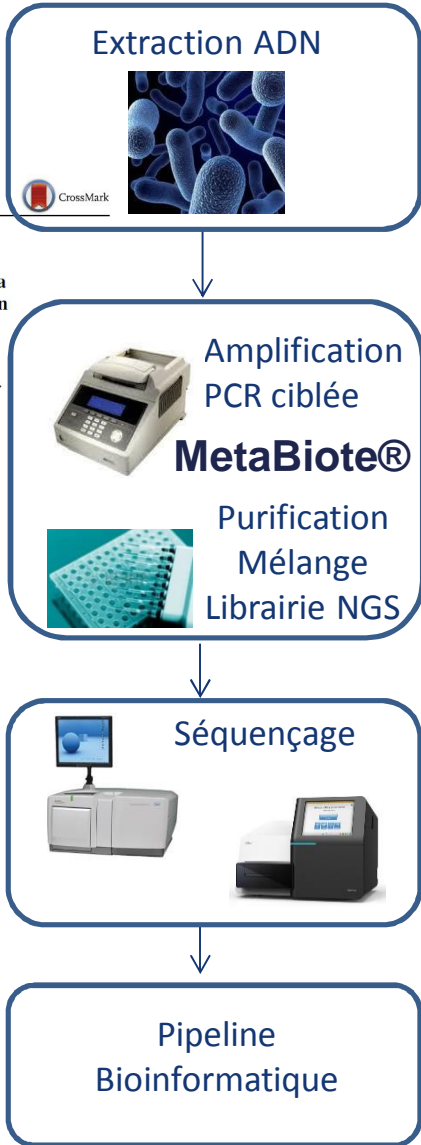
Harry Sokol, ^{1,2,3,4} Valentin Leducq, ^{1,4} Hugues Aschard, ⁵ Sarah Jegou, ^{1,4} Cecilia Landman, ^{3,4} David Cohen, ^{1,2} Gius Anne Bourrier, ^{3,4} Isabelle Nion-Larmurier, ^{3,4} Jacques Cosr Philippe Langella, ^{2,4} David Skurnik, ^{8,9} Mathias L Richard, ²

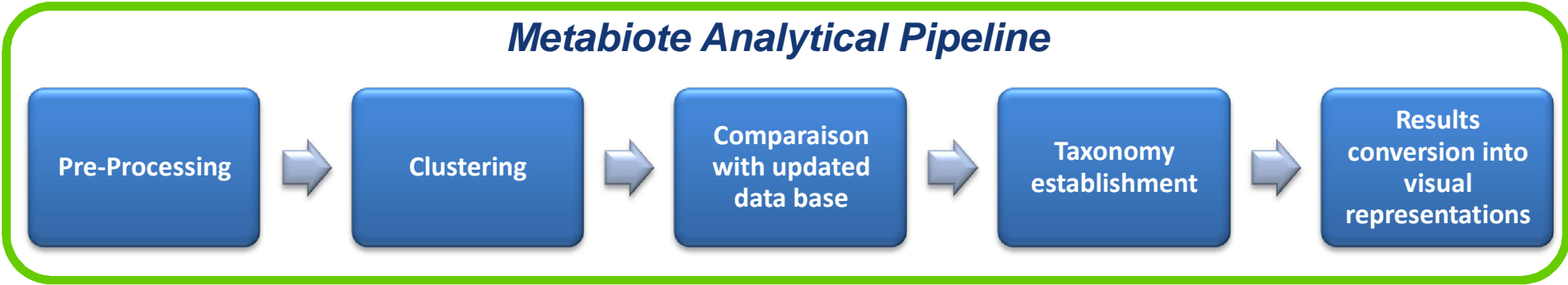
Inf Mycopathologia
DOI 10.1007/s11046-017-0185-x

Fungal and Bacterial Diversity of Airway Microbiota in Adults with Cystic Fibrosis: Concordance Between Conventional Methods and Ultra-Deep Sequencing, and Their Practical use in the Clinical Laboratory

Françoise Botterel, Cécile Angebault, Odile Cabaret, Franziska A. Stessmann, Jean-Marc Costa, Frédéric Wallet, Benoit Wallaert, Kenneth Bruce, Laurence Delbaes

Received: 16 May 2017 / Accepted: 22 July 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017





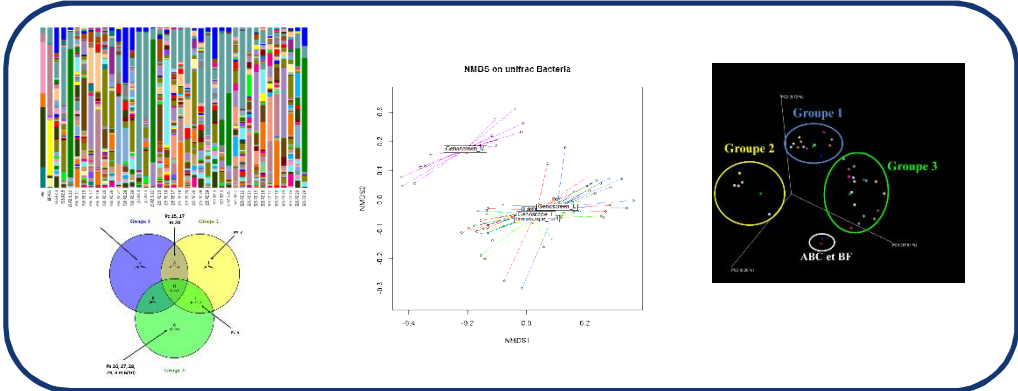
GenoScreen **MetaBiote OnLine**

Bonjour M. Antigny

- Accueil
- MetaBiote OnLine**
- Tableau de bord
- Dépôt de données
- Contrôle qualité du run
- Analyse de taxonomie
- Visualisation

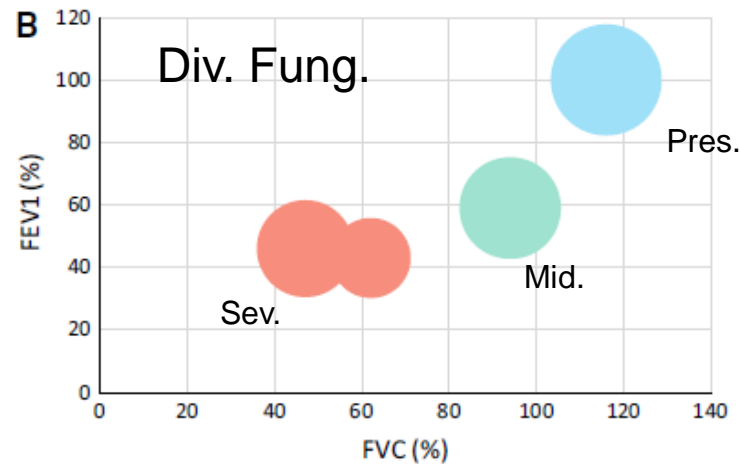
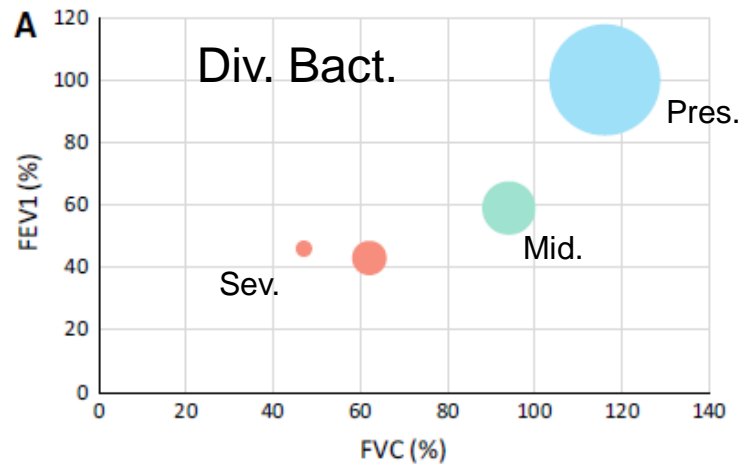
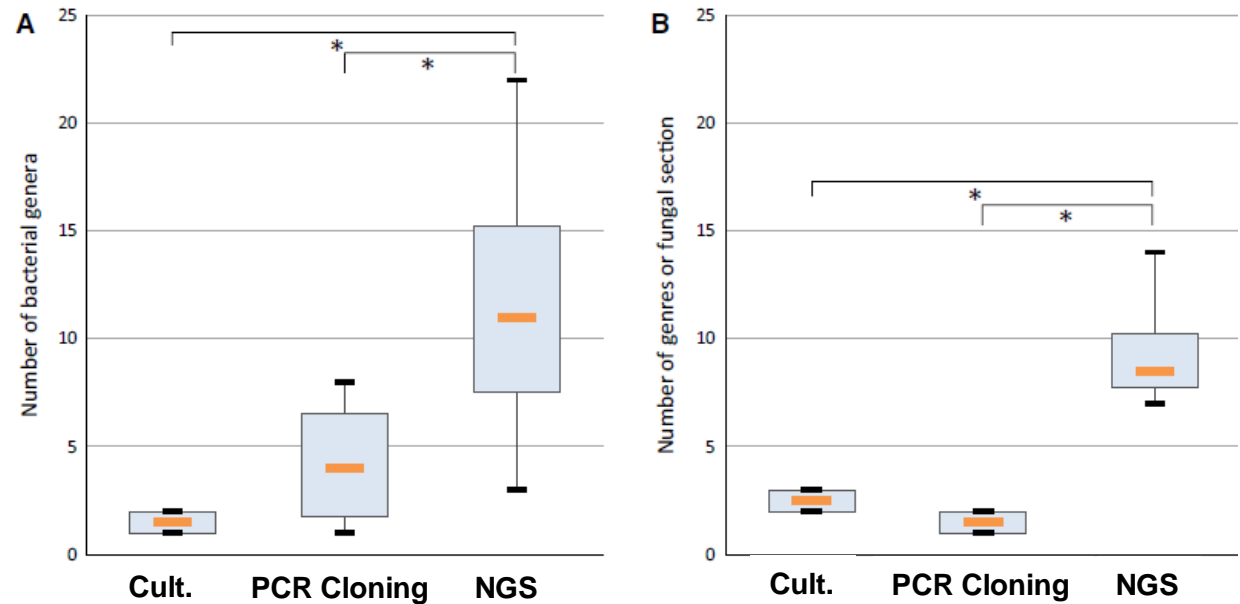
Bienvenue sur MetaBiote OnLine

- ✓ Présentation de la solution
- ✓ Manuel d'utilisation

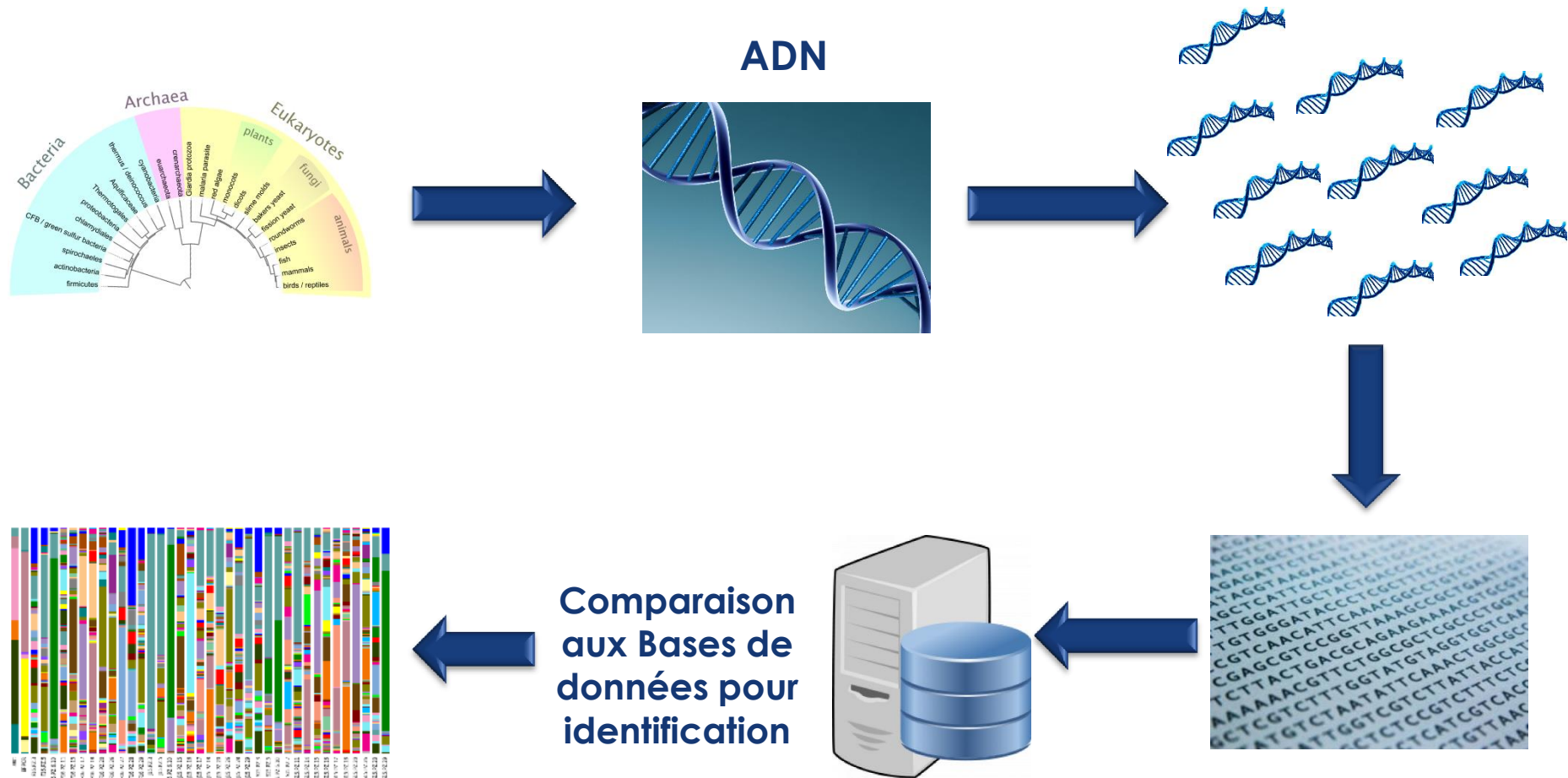


(Botterel et al. 2017)
Diversité du microbiote
pulmonaire et mucoviscidose

- Plus grand panel de bactéries et champignons détectés avec l'approche NGS
- Fonctions pulmonaires (Etat du patient) associée à une diversité bactérienne réduite.



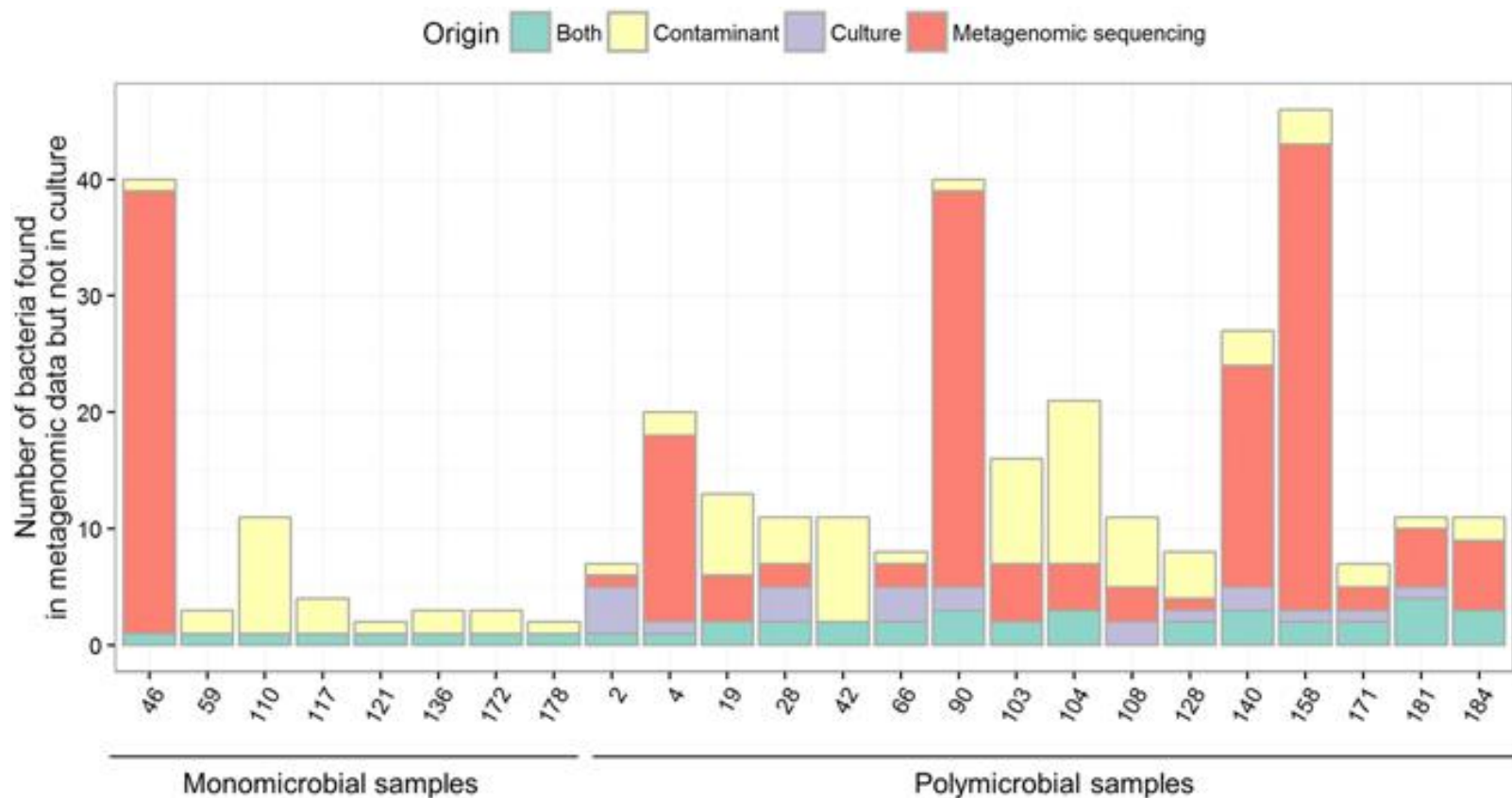
Comment une composition complexe de différents génomes est-elle étudiée ?



À .Cas d'Infections sévères osseuses et articulaires (Ruppé E et al. 2017)

- *Contexte*: manque de sensibilité des approches de culture surtout avec certains agents infectieux difficiles à cultiver

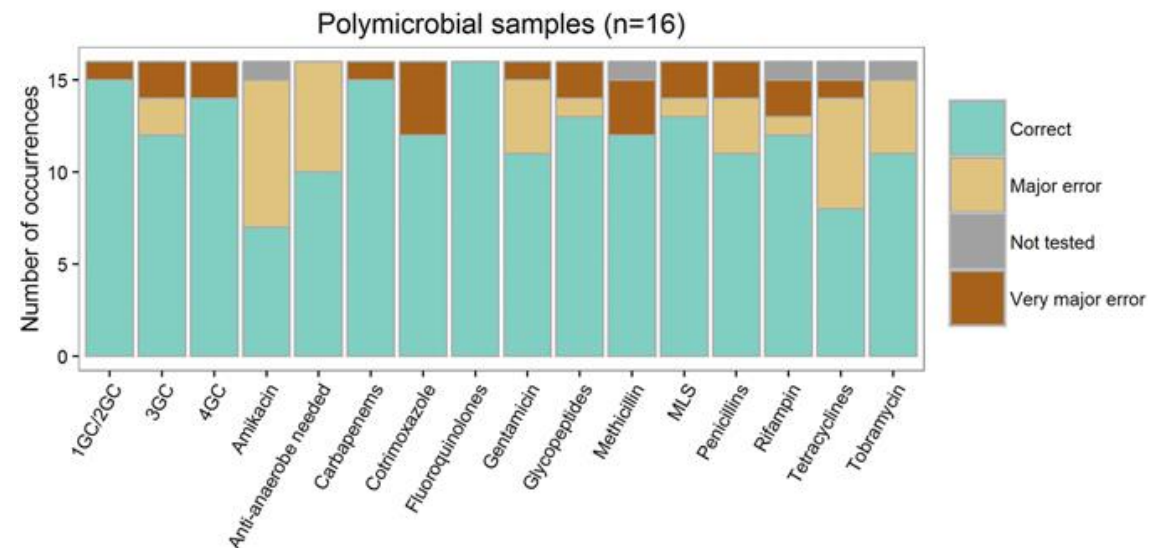
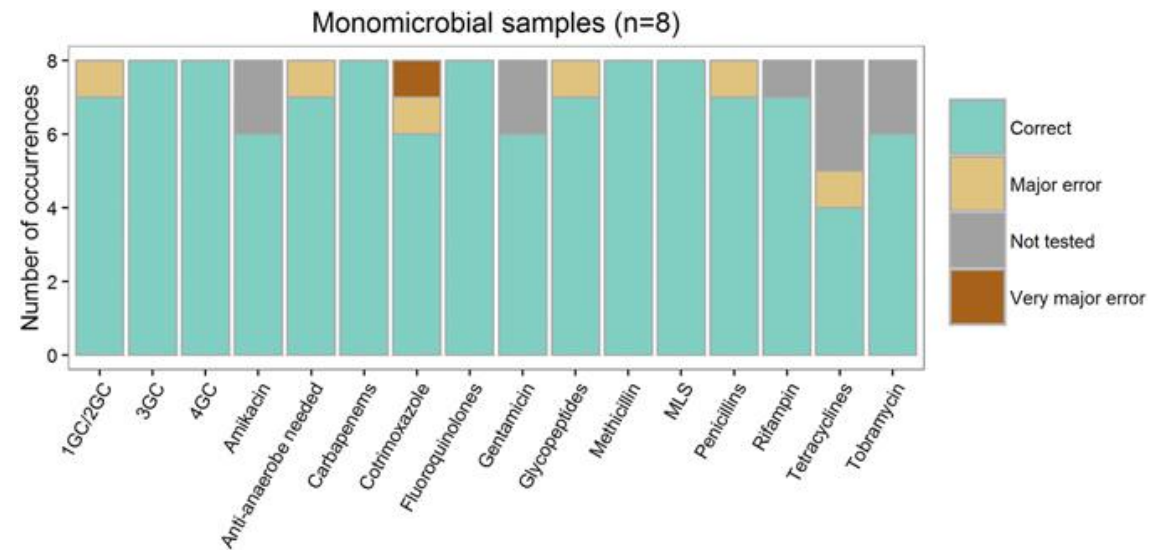
Etudes effectuées sur 24 échantillons pour identification du ou des pathogènes ainsi que prédiction de susceptibilité aux antibiotiques



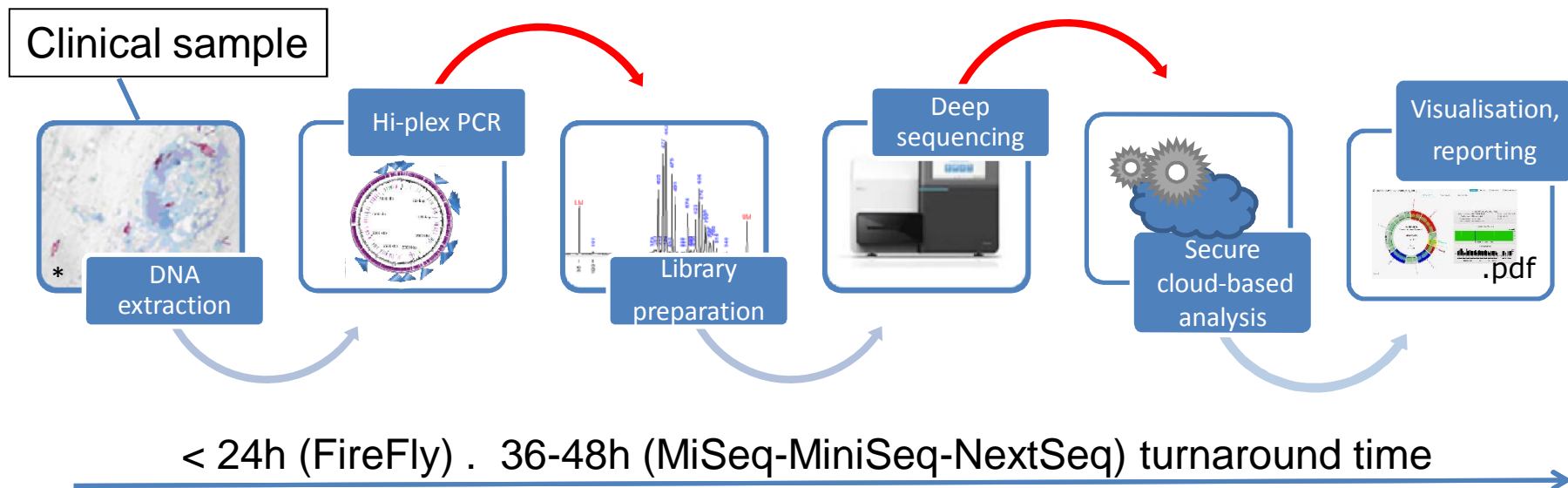
➤ Prédiction de susceptibilité aux antibiotiques

A correct antibiotic susceptibility could be inferred in 94.1% and 76.5% cases for monomicrobial and polymicrobial samples, respectively.

Altogether, we found that clinical metagenomics applied to BJI samples is a potential tool to support conventional culture.

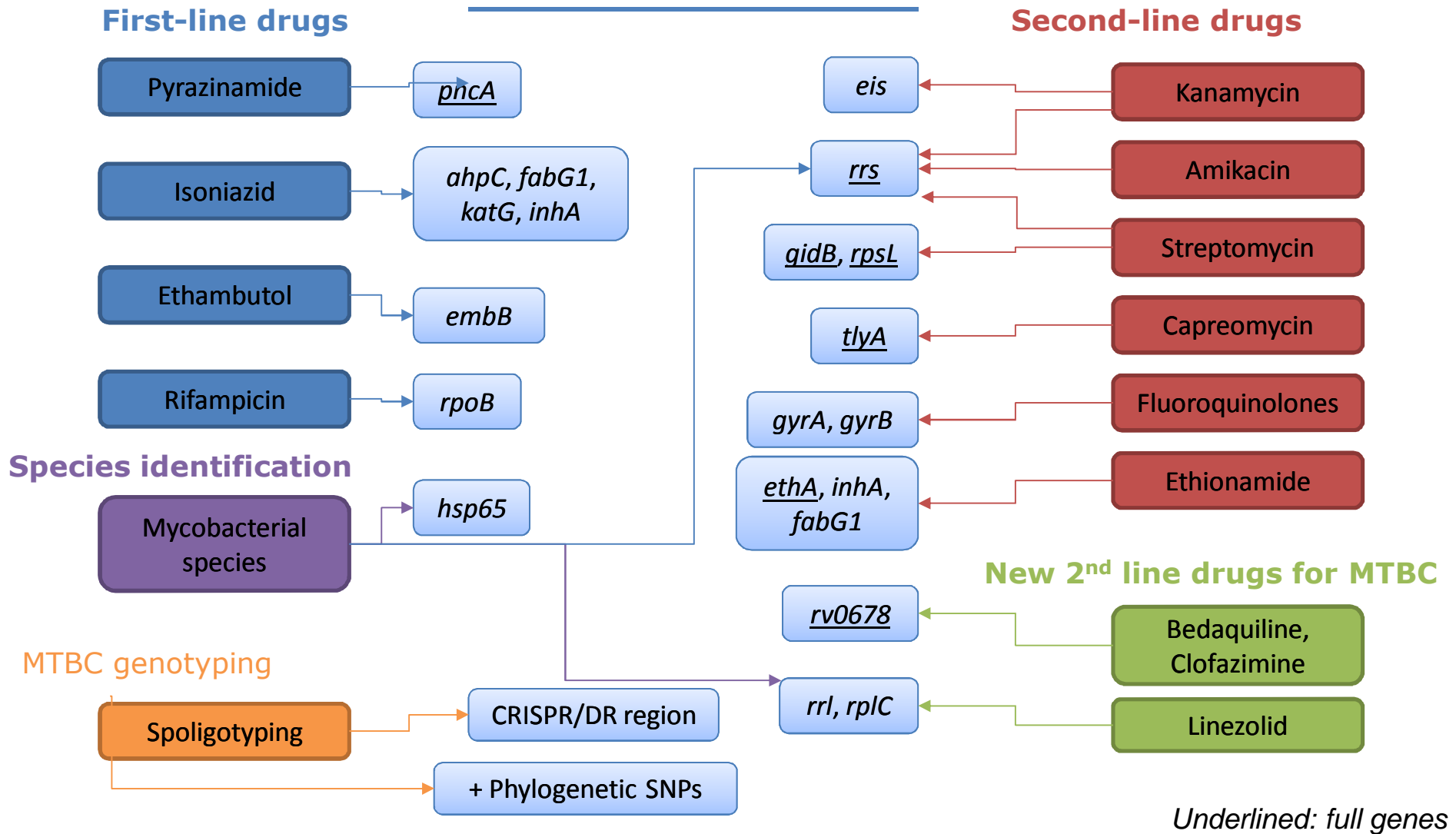


Deeplex[®]-MycTB, an all-in-one NGS-based diagnostic test for *M. tuberculosis*



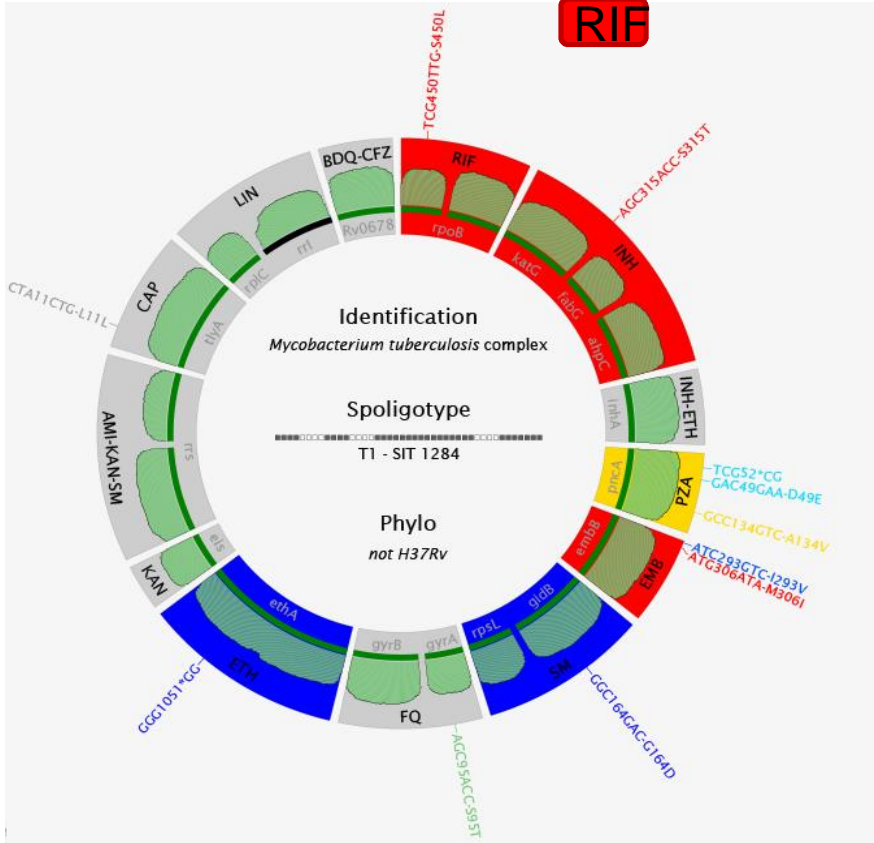
- “ Deep sequencing for sensitive detection of heteroresistance
- “ Scalable: from 1 to 8 (FireFly), to 50/90 (MiSeq/MiniSeq) and 384 samples (NextSeq)/run
- “ Automated, easy-to-use NGS data analysis and reporting on highly secure, high performance cloud

Total targets > 13,000bp





de	Analysis mode	Species Identificati...	Resistotype
F1W	DB 04-2017	Mycobacterium tub...	[Color-coded resistotype]
F1W	DB 04-2017	Mycobacterium tub...	[Color-coded resistotype]
F1W	DB 02-2017	Mycobacterium tub...	[Color-coded resistotype]
F1W	DB 12-2016	Mycobacterium tub...	[Color-coded resistotype]



- “ Key results at-a-glance
- “ Interactive, zooming tools for detailed analysis
- “ Search functions across sample sets
- “ Simple reporting e.g. on user’s smartphone
- “ On secure, private cloud, with optional regional processing

Merci pour votre attention

GenoScreen
1, rue du Professeur Calmette 59000 LILLE
Tel : +33 (0)3 20 87 71 53 - Fax : +33 (0)3 3 20 87 72 64
www.genoscreen.com – contact@genoscreen.com