

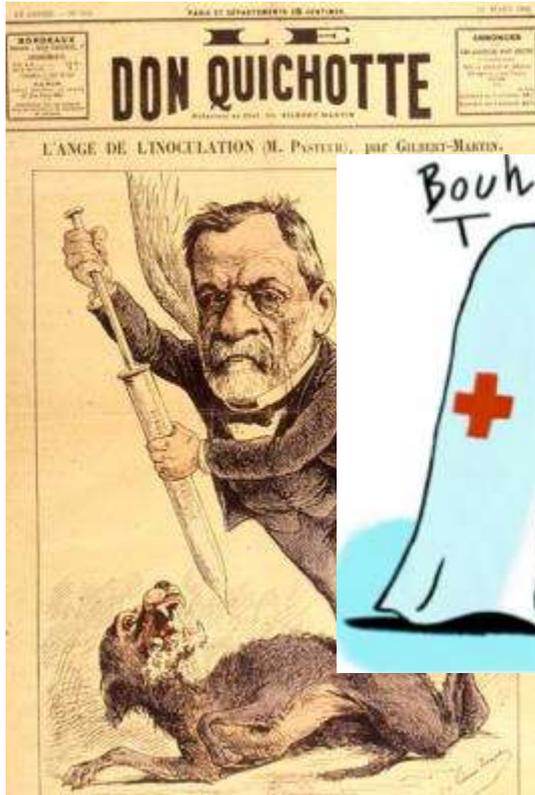
Résistome et antibiogramme génomique: Application actuelle ou vision du Futur ?

Maxime PICHON

Déclaration d'intérêts de 2014 à 2019

- Intérêts financiers : Non
- Liens durables ou permanents : Non
- Interventions ponctuelles : Non
- Intérêts indirects : Non

Louis Pasteur , Robert Koch et les Microbes ...

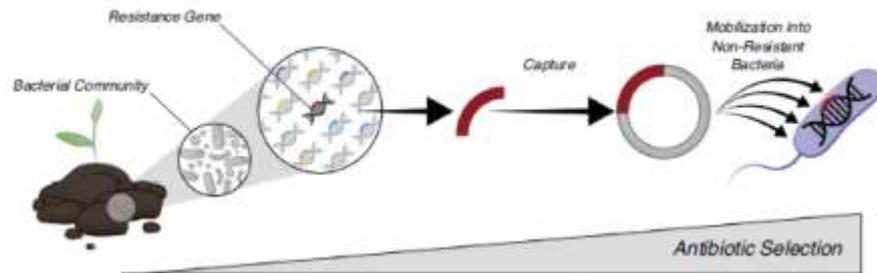


Introduction : Résistome ?

Cf. orateurs précédents...

- Collection de tous les gènes de résistance aux antibiotiques
 - Gène présents dans tout le règne bactérien (pathogène humain ou non)
 - Gene présents dans l'environnement associé ou non à l'Humain.
- Prévalence +++ des gènes de résistance chez l'Humain (0,4 copies / bactérie)
- Résistance obtenue par mutation spontanée (perte d'affinité-inactivation enzymatique) ou transfert horizontal (plasmide ou transformation)
- Réservoirs/mécanismes nombreux

Tadesse et al. 2012
Martinez et al. 2015
D'Costa et al. 2006



Introduction : Antibiogramme génomique ?

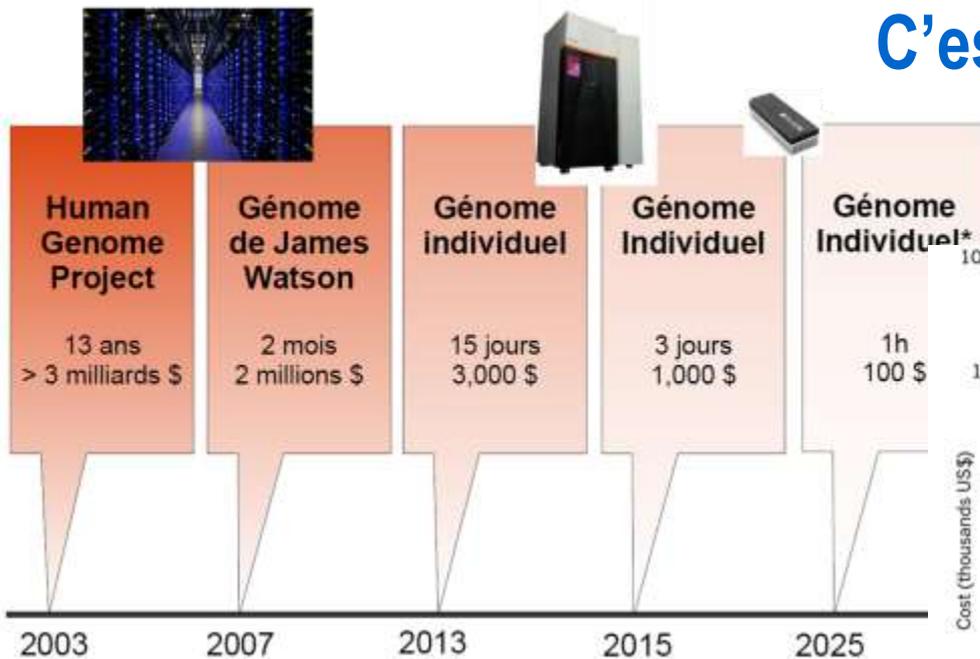
- Phénotype de résistance prédictible grâce aux annotations et aux algorithmes développés
 - *Resistance Gene Identifier, Comprehensive Antibiotic Resistance Database,...*
 - Recherche biaisée par ce qui est connu
 - « *the known know, known unknow and unknown unknows of resistance* »

Jia et al. 2017

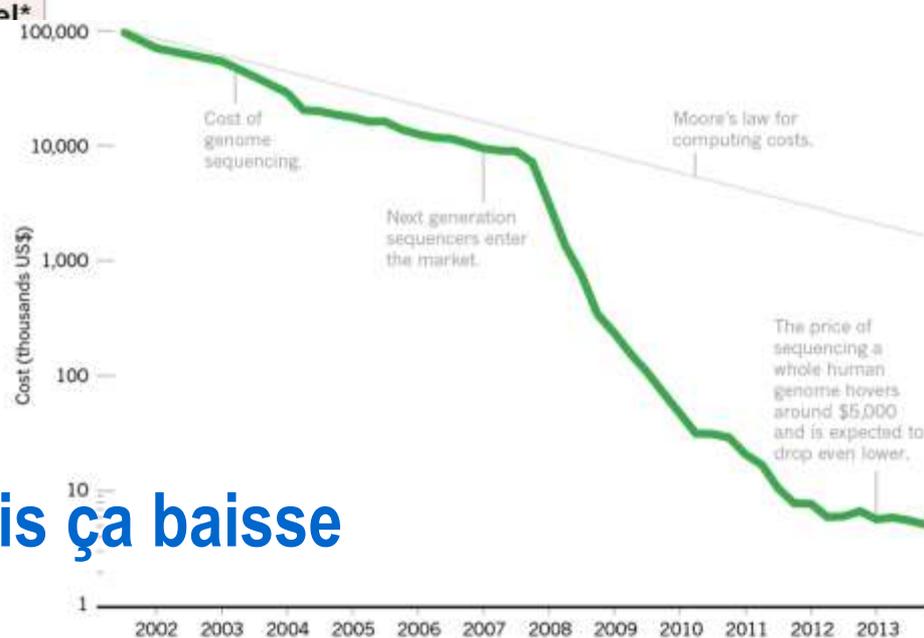
Wright et al. 2019



Pour quel coût?



C'est cher



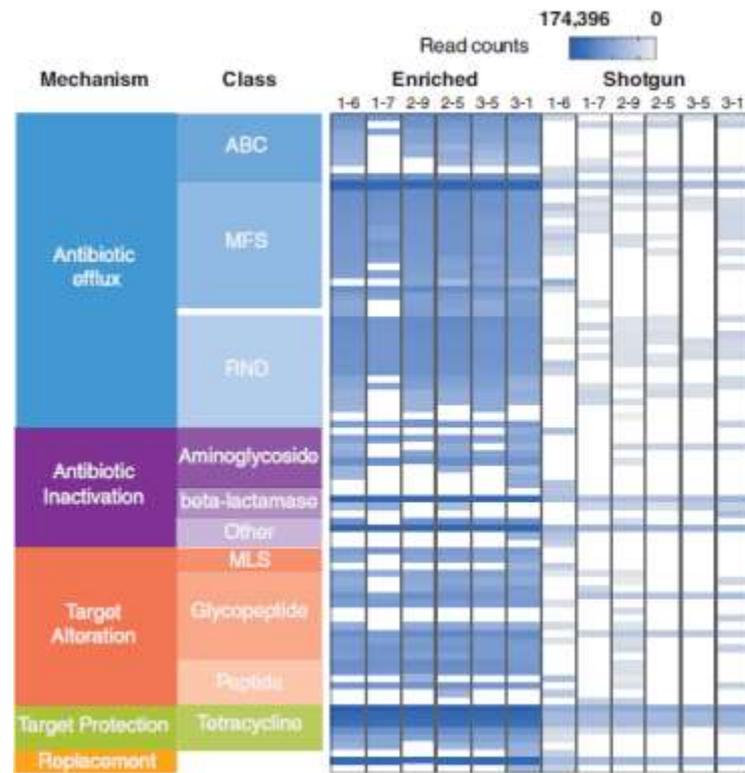
... Mais ça baisse

Standardisations ou variabilités? (1)

- **Techniques**

- Métagénomique
- Séquençage ciblé (amplicon)
- Séquençage ciblé (capture)
- ...

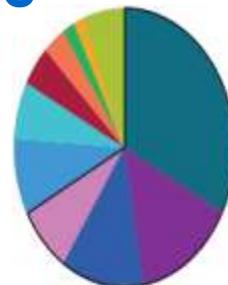
→ Variabilité inter-méthode



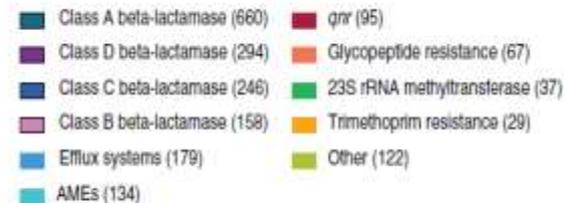
Standardisations ou variabilités?(2)

- **Cibles extrêmement nombreuses**

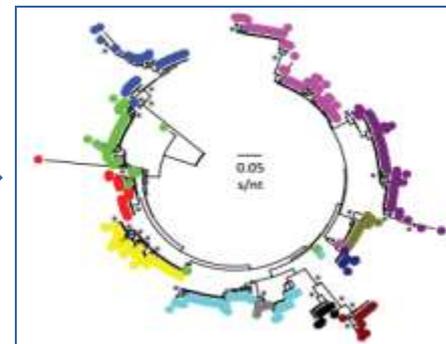
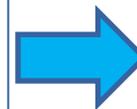
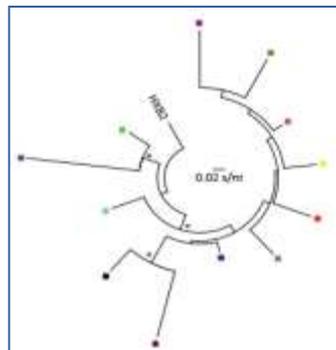
→ nécessité d'une quantité importante de données



Total = 2021

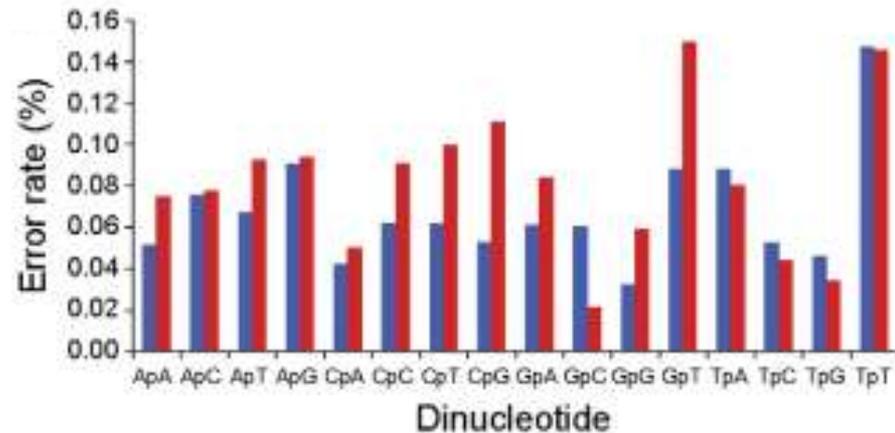
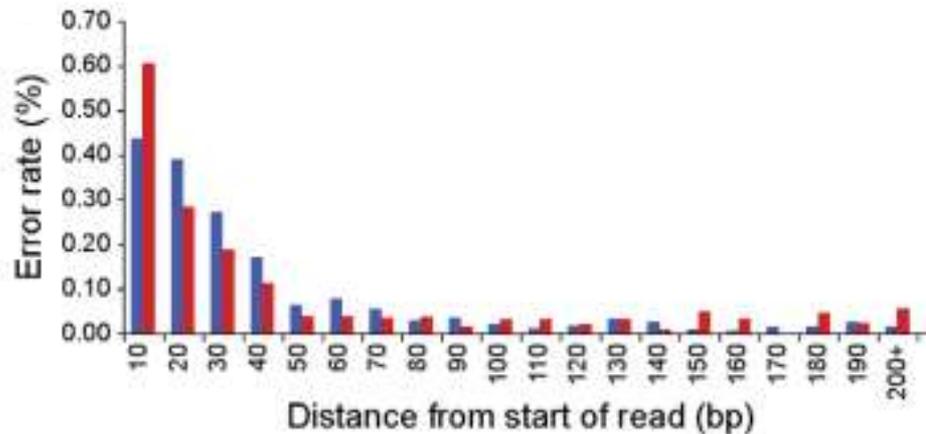


→ Nécessité de données cliniques

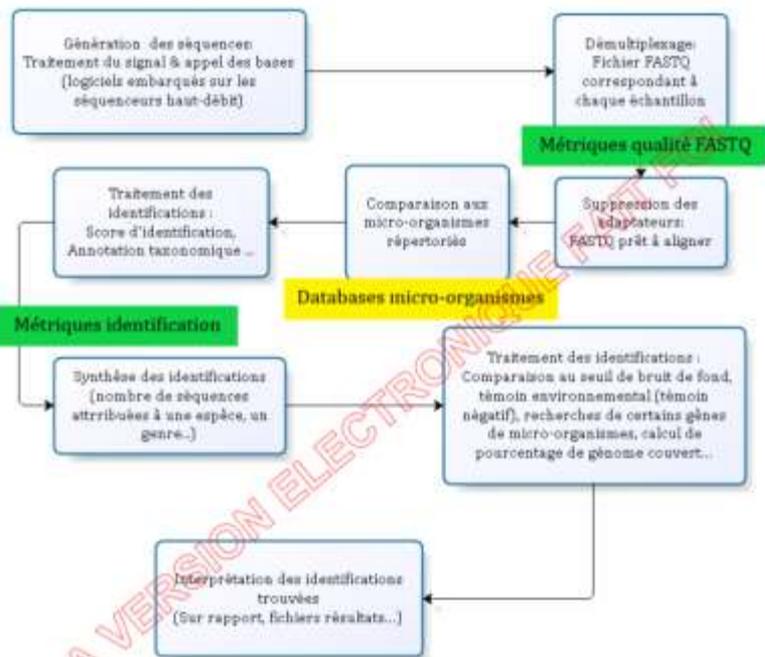


Standardisations ou variabilités?(3)

- **Qualité des résultats importante**
 - « Générer des données n'est pas un problème, les comprendre par contre ... »



Standardisations ou variabilités?(4) : accréditation ?



Logigramme n° 2 : Exemple de pipeline présentant les étapes de la génération des séquences jusqu'à l'identification de micro-organismes dans le cadre de la Métagénomique diagnostique. Ce schéma est un exemple à adapter à chaque domaine d'activité.

Pour les applications du sous-domaine de la microbiologie et plus particulièrement lorsqu'une méthode de séquençage non ciblée est utilisée sur un échantillon biologique d'origine humaine, la structure devrait :

- documenter les proportions de séquences alignées à des génomes de référence d'origine microbiologique ou humaine
- définir les seuils minimaux de séquences d'origine microbiologique et humaine permettant l'identification et la quantification d'acides nucléiques d'origine microbiologique
- documenter les interférences liées à la présence d'ADN humain dans l'échantillon, la présence de séquences de microorganismes contaminants par exemple dans les réactifs utilisés, les détections croisées de microorganismes liées à la présence de microorganismes d'intérêt ou provenant de la flore commensale de l'échantillon.

Dans le cadre de la microbiologie, en absence d'EEQ disponible pour le NGS, des EEQ visant à fournir les mêmes résultats que la technique NGS peuvent être utilisés.

- Par exemple, les EEQ « panels syndromiques » peuvent être utilisés pour la métagénomique, les EEQ de résistances prévus pour le Sanger pour la détection de variants ou des EEQ visant à comparer des souches par exemple lorsqu'ils existent.

Pour la microbiologie, les seuils de positivité doivent être clairement établis par la structure pour le rendu positif ou négatif. Par exemple, dans le cas de recherche de mutations de résistance virale, les seuils d'interprétation (% de la quasi espèce) à partir desquels le biologiste rend le résultat doivent être clairement explicités. Cela peut être aussi une quantité relative de séquences reliées à un pathogène donné dans le cas de la métagénomique ou bien un seuil habituellement observé de différences entre deux souches dans le cadre d'études épidémiques.

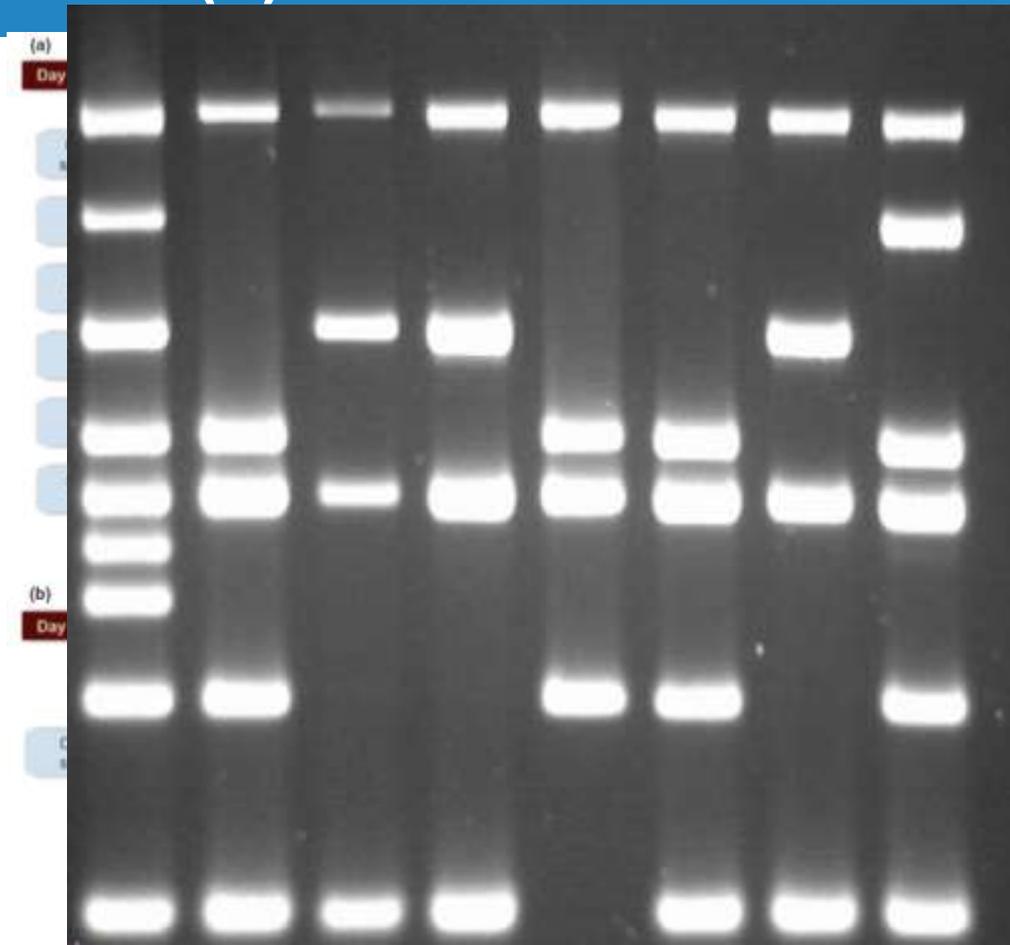
Dans le cas de l'identification de pathogènes non décrits dans la pathologie identifiée, la structure doit prévoir des dispositions pour le rendu des résultats (cf 4.7).

Dans le cadre de la microbiologie, le(s) CIQ doit/doivent être choisi(s) pour être le plus en adéquation possible avec les pathogènes recherchés. Par exemple, le CIQ peut comporter un mélange de bactéries, virus, champignons prédéterminés pour la Métagénomique pan-pathogène.

Guide technique d'accréditation de la technologie de séquençage à haut débit (NGS)

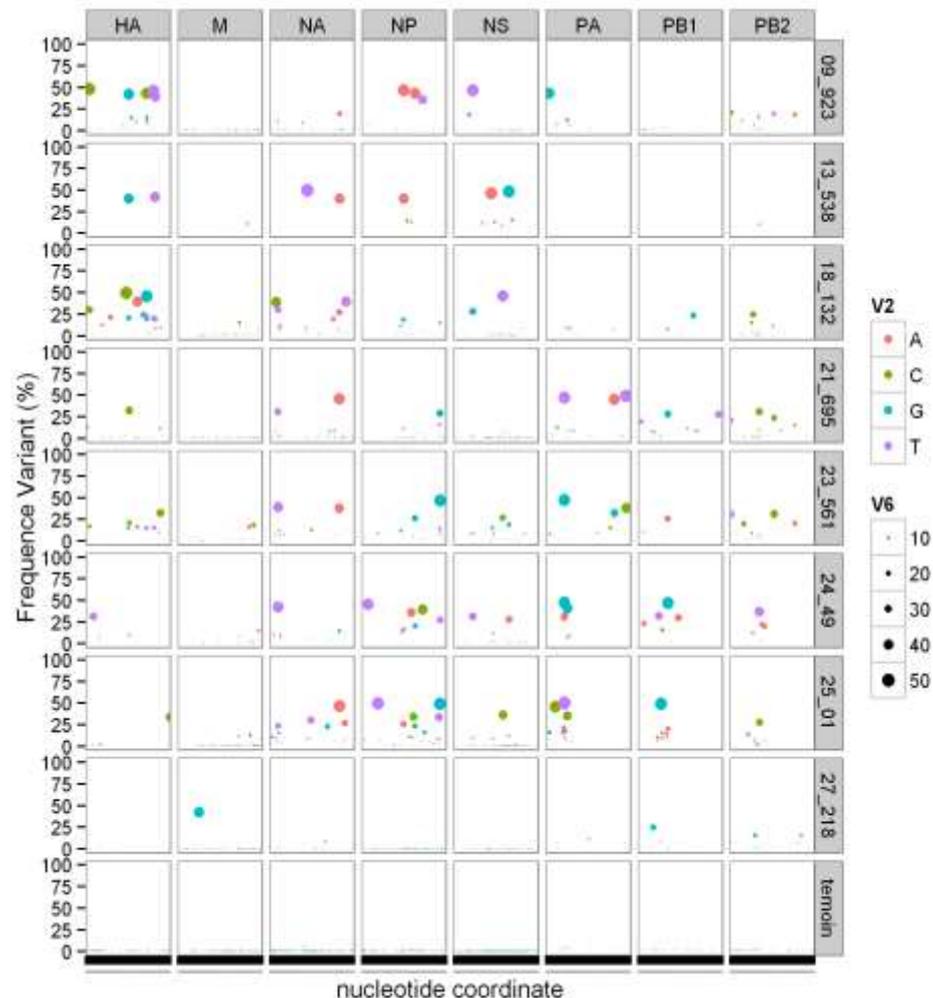
Quel(s) bénéfice(s) attendu(s) ?

- **Accélération du délai de rendu**
 - Session Thématique : Nouvelles stratégies diagnostiques : encore plus vite et mieux ?
- **Autres applications :**
Utilisation en typage des investigations épidémiologiques

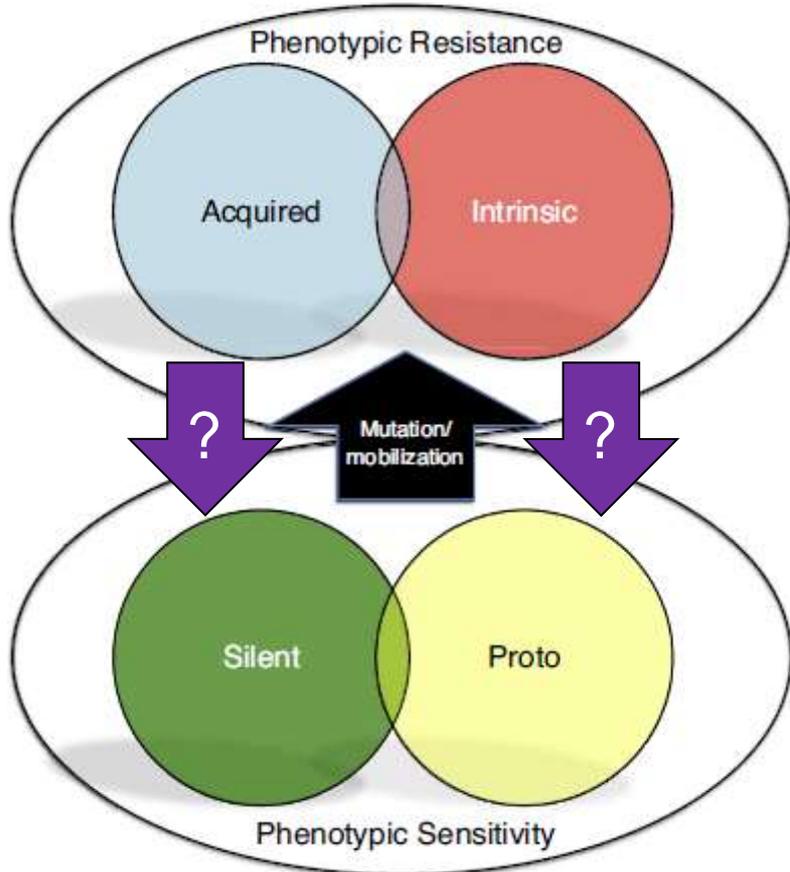


Des difficultés ? (1)

- Besoin de ressources (humaines et logistiques)
 - Identification et d'annotation compliquant la comparaison entre échantillon (Gupta et al. 2020)
 - Les 2 bases de données les plus citées partagent que ~20% de leurs séquences de références (Yang et al. 2016)
 - Interprétation **BIO**informatique



Difficultés (2) : Lien génotype et phénotype : pas si simple ! (1)

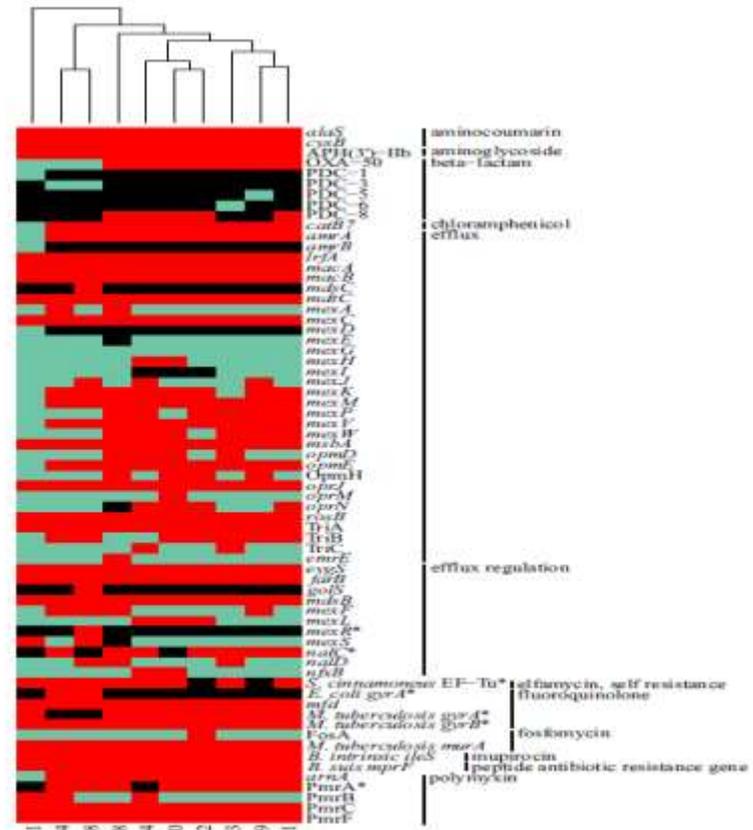


- **Résistance Innée/acquise**
- **Résistance cryptique/silencieuse :**
 - les gènes sont présent mais ne sont pas exprimés
- **Gènes de proto-résistance :**
 - faible/absence d'activité anti-antibiotique mais activité si mutation

➔ **Où mettre la limite ?**

Difficultés (2) : Lien génotype et phénotype : pas si simple ! (2)

- *P. aeruginosa* ATCC X 7
- Banque de donnée CARD
- Positif :
 - Résistance aux quinolones aisément étudiée car un seul gène principal
- Négatif :
 - Mutation associée ou non à surexpression (exemple AmpC)
 - OprD est associé à de nombreux régulateurs
 - Difficultés pour les glycopeptides car similarité de séquences +++
 - Difficultés pour les éléments mobiles



Conclusion (1) : Présent ou futur?

PRESENT :



- Des applications simples d'utilisation (voire commerciales...) commencent à se développer/démocratiser
- Gènes associés à des résistances « usuelles » sont disponibles en banque de donnée
- Des recommandations d'accréditations de laboratoire sont produites

Conclusion (2) : Présent ou futur?

FUTUR



- Nécessité d'une mutualisation des besoins/moyens en microbiologie/infectiologie
- Fort besoin de contrôle et de standardisation
- Des limites techniques et biologiques difficiles à dépasser (plasmidome, phages, ...)

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

