

La plateforme IdentyPath de l'Anses: une plateforme nationale d'identification et de typage des agents pathogènes basée sur le développement des approches de séquençage NGS, de qPCR haut et moyen débits

Fach Patrick (patrick.fach@anses.fr), Delannoy Sabine, Woudstra Cédric

Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Plateforme nationale IdentyPath, Maisons-Alfort, France

Résumé

La création de la plateforme IdentyPath a été décidée par l'Anses en 2010 pour répondre aux enjeux de santé publique que constituent les maladies infectieuses dans une démarche de transversalité et de mutualisation des compétences. La plateforme IdentyPath met à disposition de nouvelles méthodologies de séquençage haut débit, de PCR haut et moyen débits pour la détection qualitative et quantitative, l'identification, le typage et la caractérisation moléculaire des micro-organismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires ou impliqués en santé animale ou végétale. Elle a pour objectif d'apporter un appui aux laboratoires de l'Agence, afin de constituer une plateforme de référence dans l'analyse moléculaire haut et moyen débit.

Mots-clés

NGS, qPCR, haut-débit, agents pathogènes, plate-forme, IdentyPath

Abstract

ANSES's IdentyPath: a French platform for the identification and typing of pathogens based on Next Generation Sequencing and high- and mid-throughput qPCR

ANSES decided to create the IdentyPath platform in 2010 to meet the public health challenges raised by infectious diseases using a cross-cutting approach based on skill sharing. The IdentyPath platform offers new high-throughput sequencing methodologies, high- and mid-throughput PCR for qualitative and quantitative detection, identification, typing and molecular characterization of pathogenic microorganisms involved in foodborne disease outbreaks, or in animal and plant health issues. The main objective of IdentyPath is to provide support to the ANSES laboratories in order to develop a reference platform for high- and mid-throughput molecular analysis.

Keywords

NGS, qPCR, High throughput, Pathogens, Platform, IdentyPath

IdentyPath: une plateforme au cœur des missions de l'Anses

La création de la plateforme IdentyPath en 2010 a permis de répondre à la nécessité de développement d'outils de diagnostic et caractérisation rapides, sensibles et de large spectre pour la réalisation des missions de recherche, de référence, d'expertise et de surveillance des laboratoires de l'Agence. La plateforme contribue, à travers l'ensemble des projets dans lesquels elle est partie prenante, à relever les enjeux de santé publique dans le domaine des maladies infectieuses en couvrant les secteurs de la santé animale, de la sécurité alimentaire et de la santé du végétal. Elle a pour vocation de:

- soutenir l'effort de recherche de l'ensemble des laboratoires de l'Anses par la mise en œuvre d'outils méthodologiques puissants et innovants,
- contribuer à l'amélioration des dispositifs de surveillance, de veille, d'alerte et faciliter l'identification de dangers émergents au travers d'outils analytiques à large spectre,
- faire rayonner les activités de l'Agence par un positionnement novateur en recherche aux niveaux communautaire et international,
- appuyer la création de réseaux fédérateurs, d'échanges et de partenariats.

IdentyPath: une plateforme composée d'outils performants et innovants

Pour répondre à ces enjeux diagnostiques et analytiques, la plateforme IdentyPath dispose d'une palette d'outils s'appuyant sur des techniques de pointe en biologie moléculaire, et diversifiés de façon à s'adapter aux besoins spécifiques des différents projets. Ainsi, les technologies de PCR temps réel (qPCR) disponibles actuellement sont les suivantes: le GeneDisc® Cyclo de Pall, le LightCycler® 1536

de Roche® Diagnostics et le BioMark HD™ de Fluidigm. Ces appareils permettent d'effectuer des tests de PCR en temps réel sous différents formats permettant l'analyse de 36 à 18 432 réactions de qPCR en un seul essai. Les instruments disponibles offrent donc une gamme de puissance analytique considérable couvrant un grand nombre de besoins analytiques, allant du bas débit au très haut débit, de type exploratoire ou régulier pour la surveillance par exemple. C'est ainsi que les systèmes BioMark HD™ et LightCycler® 1536 sont des appareils de haut et très haut débits permettant la détection simultanée de plusieurs centaines de gènes, le génotypage par la détection de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et la quantification absolue par Digital PCR alors que le GeneDisc Cyclo est adapté à la détection ou l'expression d'un nombre moins important de gènes (Figure 1). Pour chacun de ces appareillages, il existe une flexibilité importante dans la conception des supports permettant d'adapter la combinaison entre le nombre de cibles ou marqueurs (gènes) à détecter en fonction du nombre d'échantillons à tester.

Les enjeux et perspectives de développement de la plateforme IdentyPath s'inscrivent dans le cadre du développement des nouvelles générations de séquençage haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) et des outils de bio-informatique associés indispensables à l'analyse des génomes. Ainsi, l'acquisition récente d'un séquenceur de paillasse à haut débit, le MiSeq® d'Illumina, vient compléter l'offre de qPCR haut et moyen débits déjà disponible sur la plateforme. Ce séquenceur de paillasse permettra de séquencer rapidement de petits génomes bactériens ou viraux, en cas de crise par exemple, ou encore de séquencer des produits d'amplification générés par exemple à partir du BioMark HD™. Il se prêterait moins au séquençage de masse qui peut être nécessaire dans le cadre des activités de surveillance. L'objectif est de poursuivre le développement de cette plateforme scientifique et technologique autour de ces méthodologies modernes qui peuvent être utilisées pour le typage et l'identification d'agents pathogènes (bactéries, virus et parasites) responsables de toxi-infections alimentaires, de maladies animales épizootiques ou de zoonoses.

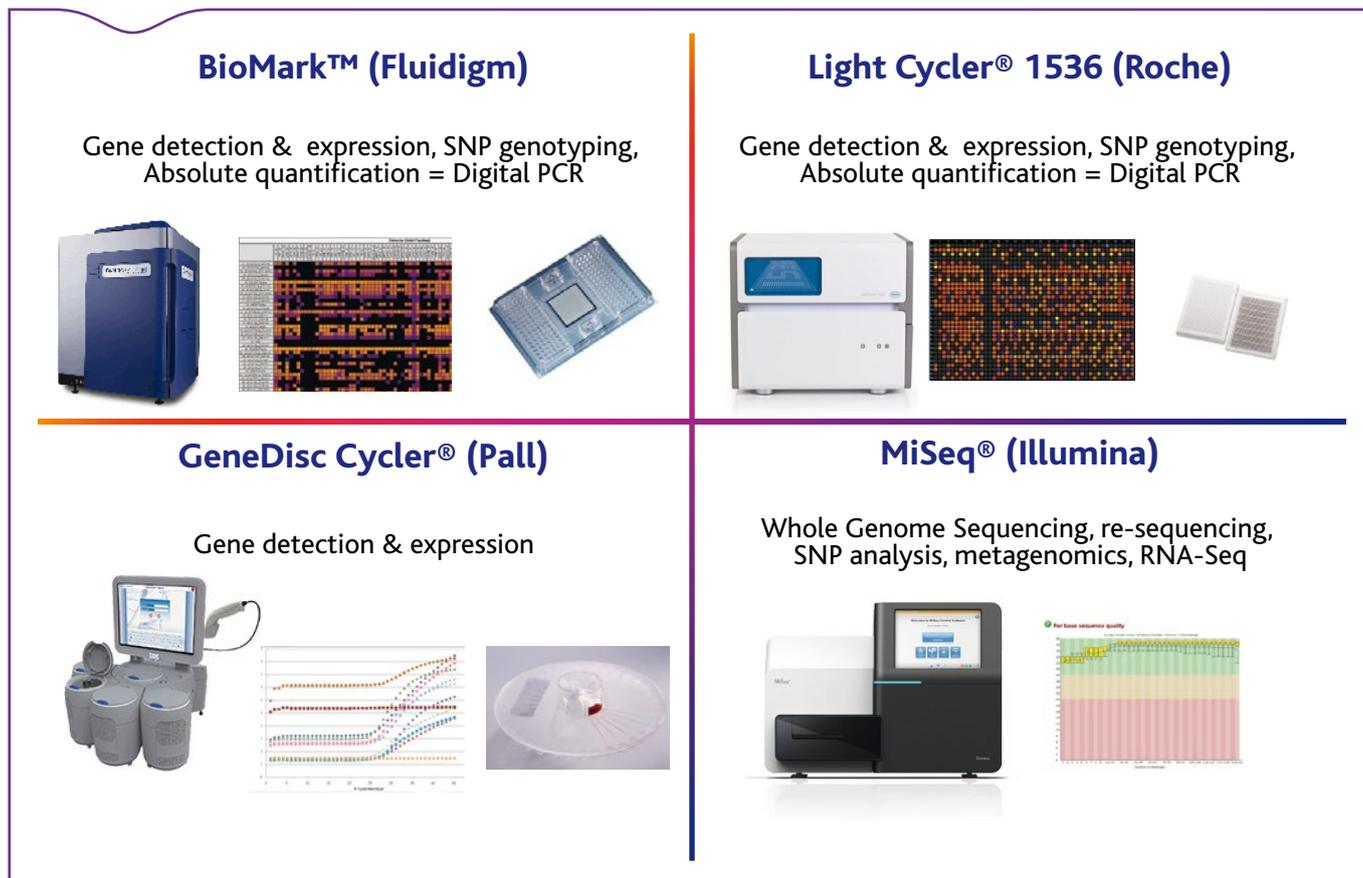


Figure 1. Les différents outils et leurs applications sur la plateforme IdentityPath

IdentityPath: une plateforme nationale pour la vigilance vis-à-vis des contaminants microbiens et des maladies infectieuses

Dans sa vocation nationale, la plateforme a pour missions de :

- réaliser une veille technologique concernant les approches innovantes pour la détection, la quantification, l'identification et la caractérisation complète et rapide des agents infectieux,
- fournir un appui scientifique et technique aux équipes porteuses de projet des laboratoires de l'Anses pour mettre au point et valider de nouvelles méthodes de détection et de typage plus performantes,
- fournir aux laboratoires de l'Anses un accès à des technologies haut débit sous la forme de collaborations.

L'objectif est de doter les laboratoires de l'Anses en charge d'activités de recherche, de surveillance, de référence ou d'expertise sur divers agents pathogènes, d'une structure capable d'apprécier avec précision l'évolution et l'émergence de souches à fort potentiel pathogène et/ou épidémique pour l'Homme, l'animal, ou les végétaux. Ceci afin de répondre rapidement et efficacement aux sollicitations des autorités sanitaires françaises et européennes en cas d'épizootie ou d'épidémie comme ce fut le cas lors de l'épidémie à *E. coli* O104:H4 en 2011.

De plus, elle mène des travaux de recherche s'attachant plus spécifiquement aux points suivants :

1. Améliorer le diagnostic botulique

- En identifiant de nouveaux marqueurs génétiques pertinents (typage génotypique) permettant de caractériser les souches de *Clostridium botulinum* tant en santé humaine qu'animale.
- En construisant les outils analytiques de la surveillance de ces agents pathogènes notamment en appui du LNR botulisme aviaire de l'Anses, pour l'investigation d'épisodes toxiques alimentaires et en soutien des dispositifs de surveillance des agents de la menace (bioterrorisme).

- En développant et en automatisant l'analyse génomique *in silico* des souches de *C. botulinum* responsables du botulisme chez l'Homme et l'animal notamment en explorant les loci CRISPRs ou les gènes associés aux antigènes flagellaires.

2. Développer des outils d'appréciation moléculaire des risques liés aux *E. coli* productrices de Shiga-toxines (STEC ou VTEC) pathogènes pour l'Homme

- En explorant les nouvelles approches de séquençage de génomes et d'analyse bio-informatique des données de séquençage pour sélectionner les marqueurs génétiques d'intérêt diagnostique en santé publique (ilots de pathogénicité, facteurs d'adhésion, effecteurs de types III, etc.). La plateforme a la capacité actuellement de rechercher plus de 200 marqueurs génétiques permettant de caractériser les différents pathotypes de *E. coli*. Elle développe par ailleurs une base de données sur les séquences CRISPR associées aux *E. coli* pathogènes responsable des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU).
- En concevant les outils qPCR haut débit utiles en épidémiologie moléculaire et contribuer à inscrire l'Anses au cœur du dispositif français d'épidémiologie des souches de STEC. La plateforme développe en particulier un vaste projet de séquençage des gènes associés à la biosynthèse des antigènes somatiques et flagellaire de *E. coli* afin de fournir une offre complète de sérotypage moléculaire des souches de *E. coli*.

IdentityPath: enjeux et perspectives de développement

La plateforme IdentityPath cherchera à mettre en place, en collaboration avec divers laboratoires européens, les conditions de 'séquençage direct' des agents microbiens dans des matrices complexes (échantillons d'environnement, aliments, prélèvements cliniques). Cette approche de type métagénomique repose sur le principe de 'séquençage *in-situ*', permet de donner une vue exhaustive de la contamination

d'un échantillon sans aucun *a priori* concernant la contamination de l'échantillon. L'intérêt de cette approche de séquençage direct est d'essayer de combiner à la fois détection, caractérisation et typage des agents directement dans l'échantillon sans qu'il soit nécessaire de les isoler. À terme, elle pourrait permettre d'identifier de nouveaux génotypes d'agents pathogènes non cultivables par les méthodes conventionnelles. Ce type d'approche en métagénomique peut, par exemple, être utilisé lors de 'challenge tests' afin d'étudier l'évolution de la flore totale d'un aliment au cours d'un processus de vieillissement ou en fonction de différentes conditions (temps, température) de stockage. C'est aussi, sur le principe, la possibilité de mettre en évidence dans un échantillon biologique de nouveaux microorganismes non cultivables (par exemple les virus) ou des bactéries stressées difficilement revivifiables avec les techniques classiques de bactériologie (milieux de culture). Cette approche, lorsqu'elle pourra être mise en place en routine, semble donc prometteuse et apportera une avancée

considérable en termes de vigilance et détection d'émergences. Il convient désormais de construire des référentiels moléculaires pour évaluer l'approche métagénomique; la qPCR haut débit semble être la solution de choix pour constituer ce référentiel. Un consortium est en passe de se constituer dans le cadre de l'appel à projet H2020 et l'apport de la plateforme dans cette perspective concerne le développement de la 'qPCR haut débit' qui peut être l'outil de choix pour valider en quelque sorte l'approche métagénomique vis-à-vis d'un standard de référence. En effet, les données obtenues par 'séquençage *in-situ*' mériteront dans un premier temps d'être confirmées, les pipelines d'analyse informatique pour l'analyse en métagénomique restent encore à construire et à être évalués. Comme toute nouvelle méthode cette approche nécessite d'être comparée à une méthode de référence. La qPCR haut débit reconnue depuis plusieurs années pour sa spécificité et sensibilité constituera ainsi une méthode de choix pour évaluer/valider l'approche métagénomique.