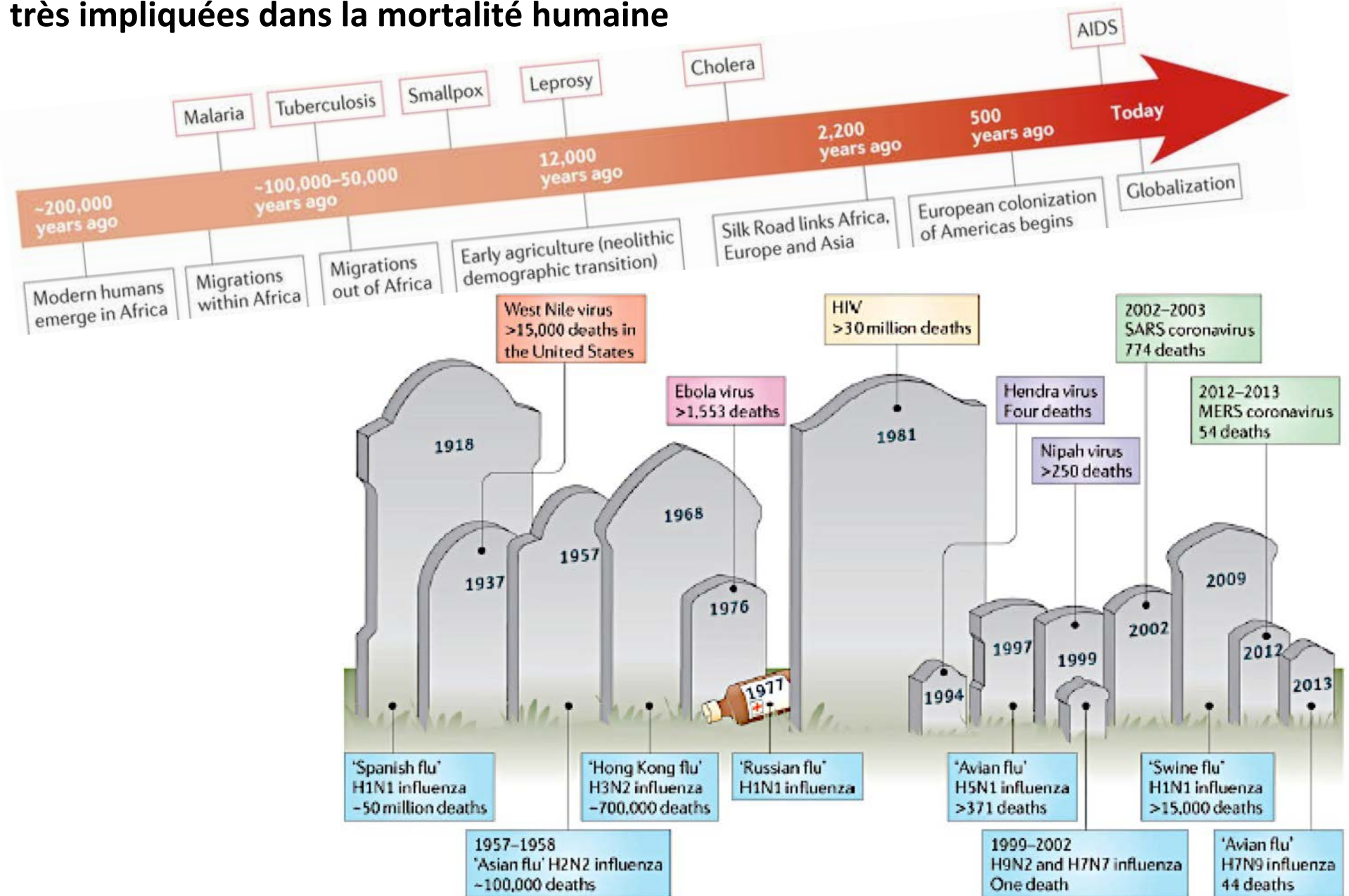


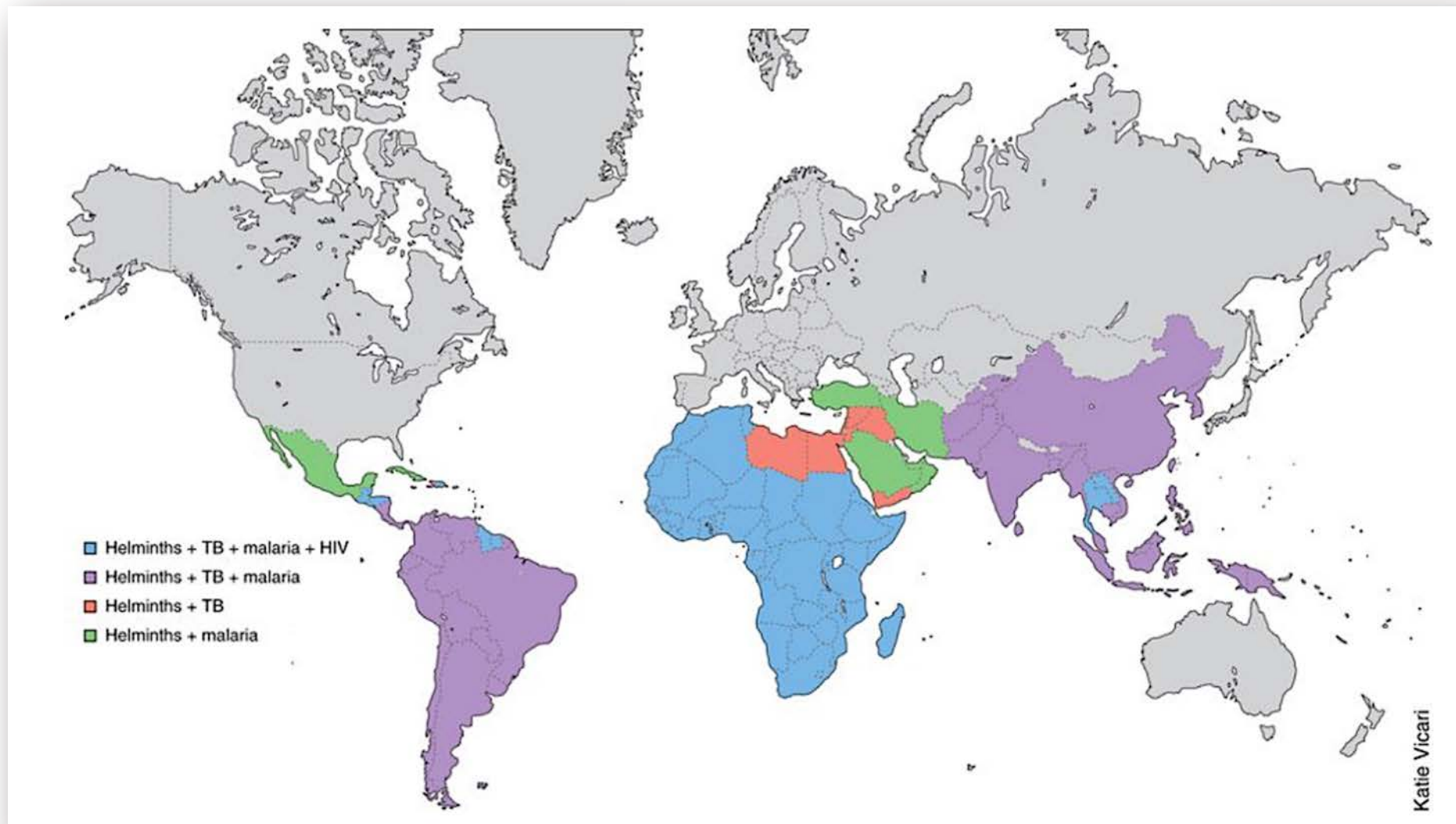
Les petits Hic

*des Avancées Méthodologiques
et Biologiques du projet
Hantagulunic*

Les maladies infectieuses ont été et sont aujourd'hui encore très impliquées dans la mortalité humaine



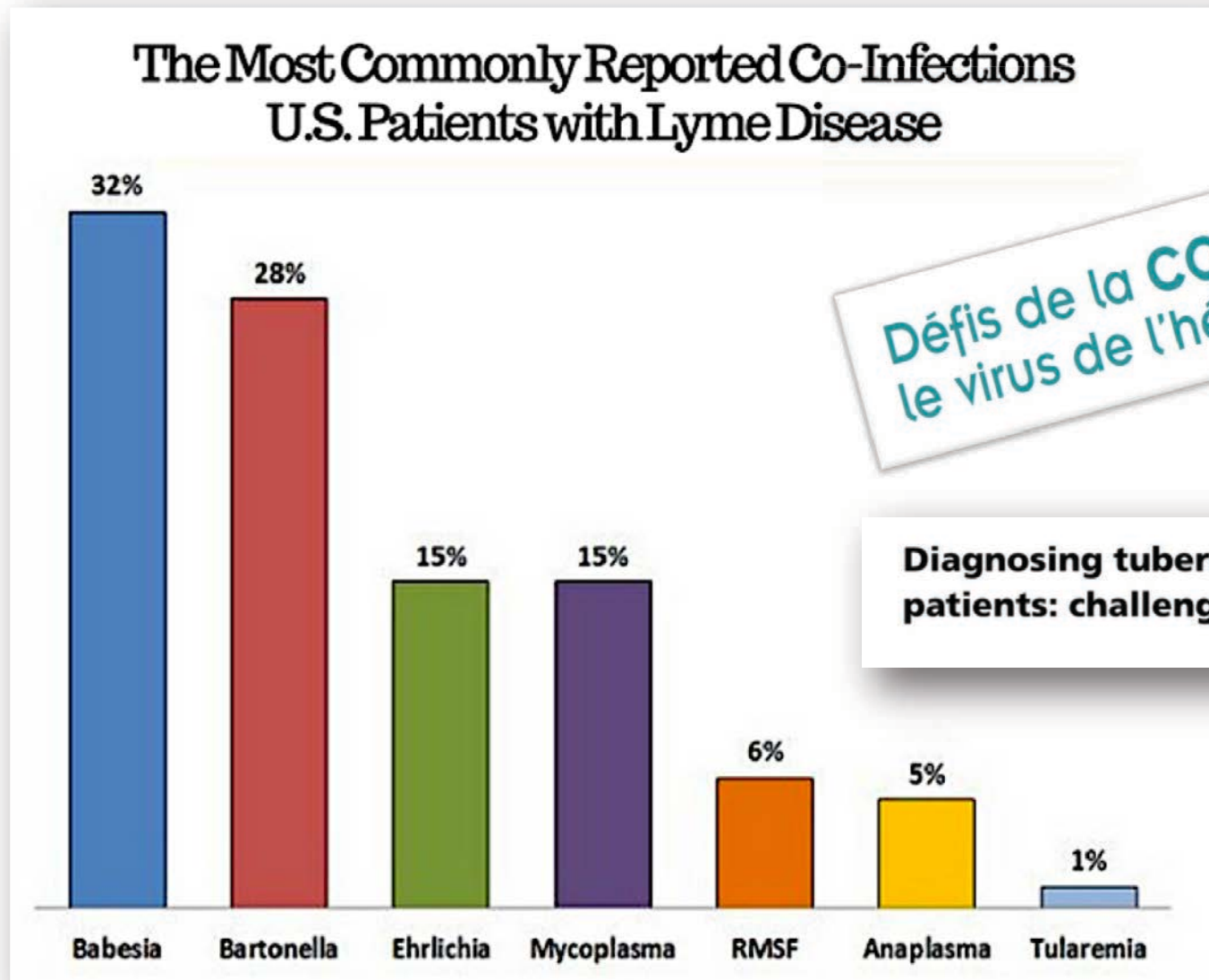
**On a longtemps considéré la relation une maladie = un agent infectieux
Mais l'exposition simultanée à de nombreux pathogènes est très fréquente**



Geographic distribution of coinfection with helminths together with tuberculosis, malaria and/or HIV infection of adults

(Salgame et al. 2013)

Importance des coinfections

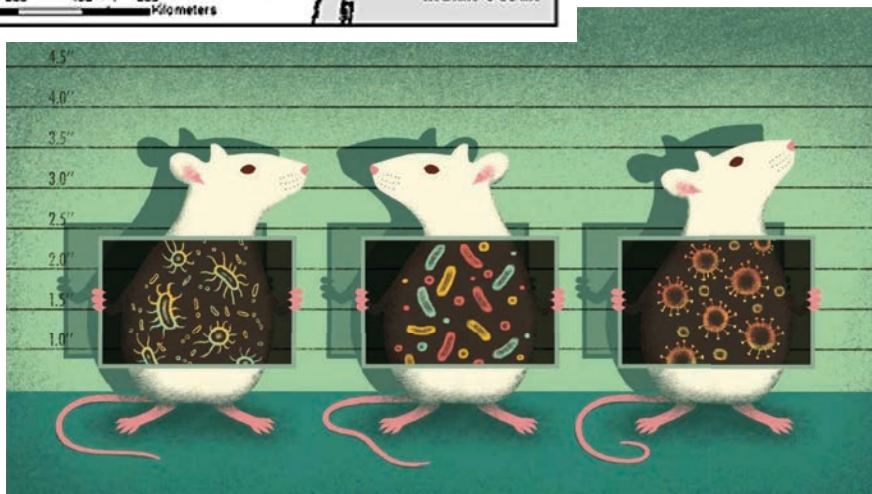
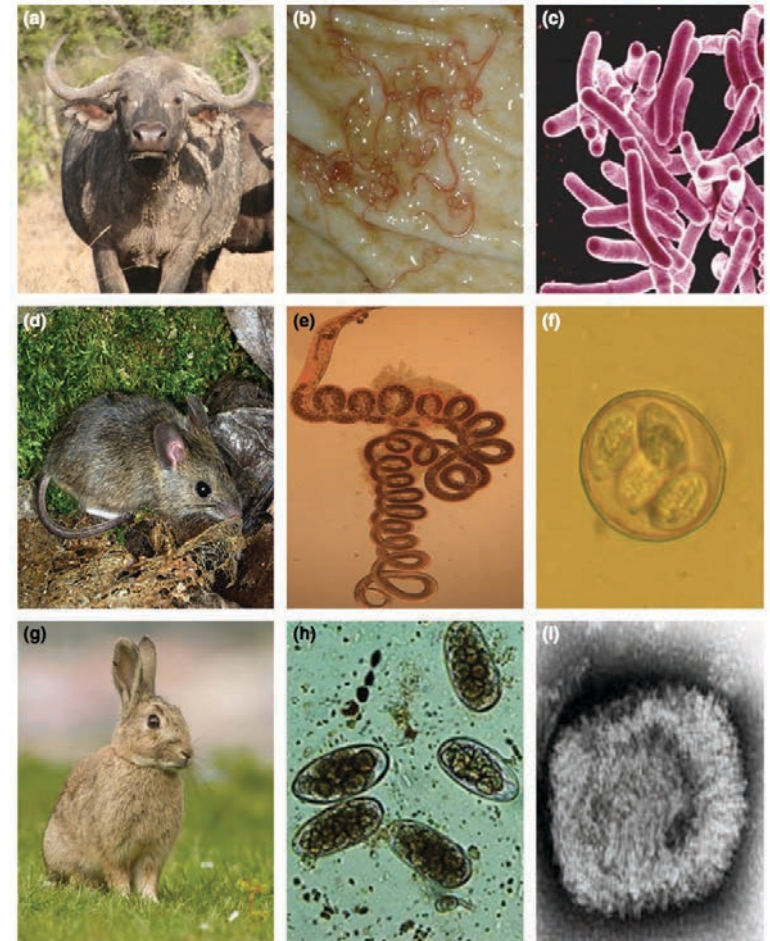
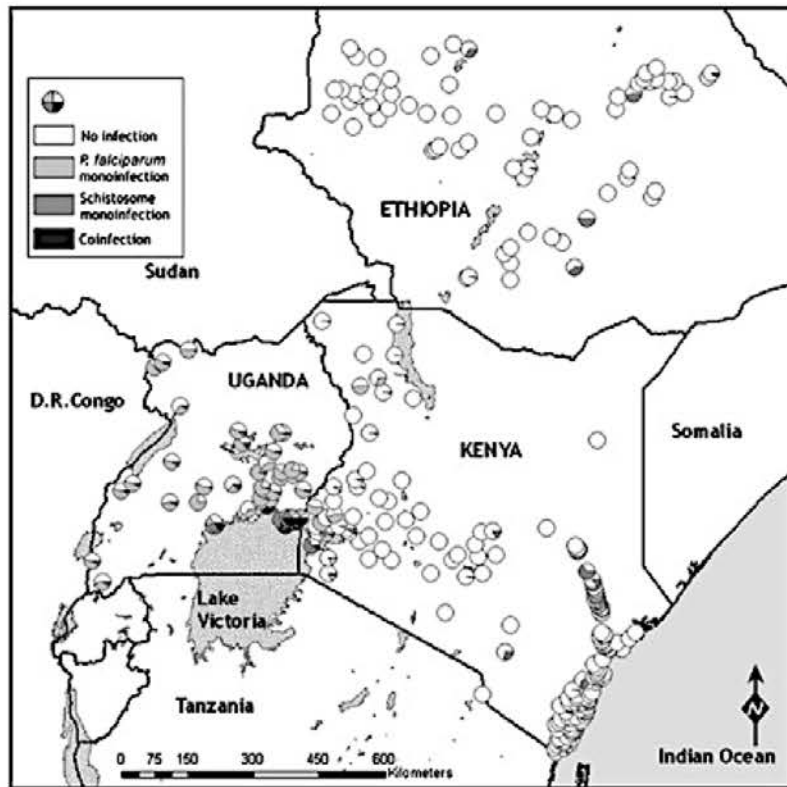


Défis de la co-infection par le virus de l'hépatite C et le VIH

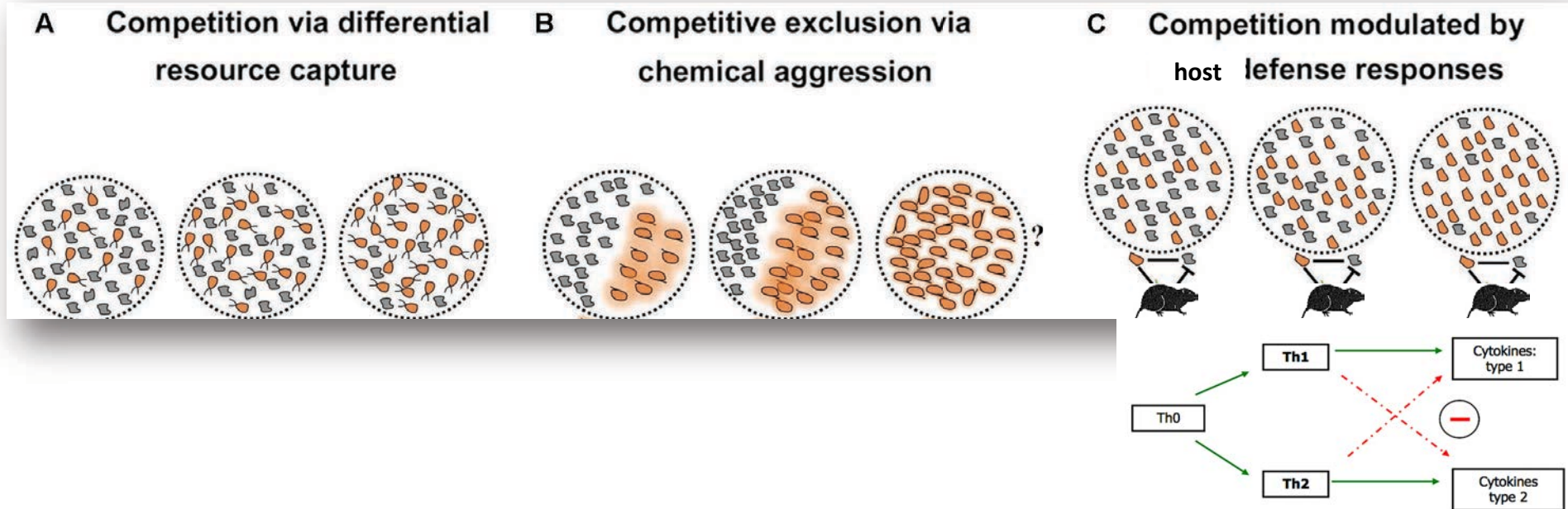
Diagnosing tuberculosis in HIV-infected patients: challenges and future prospects

Sur 3000 patients, plus de 50% ont des coinfections

Données humaines, modèles de laboratoire et faune sauvage



Fortes conséquences épidémiologiques des coinfections via les interactions Pathogènes/Pathogènes



Coinfection may increase the host susceptibility to other pathogens

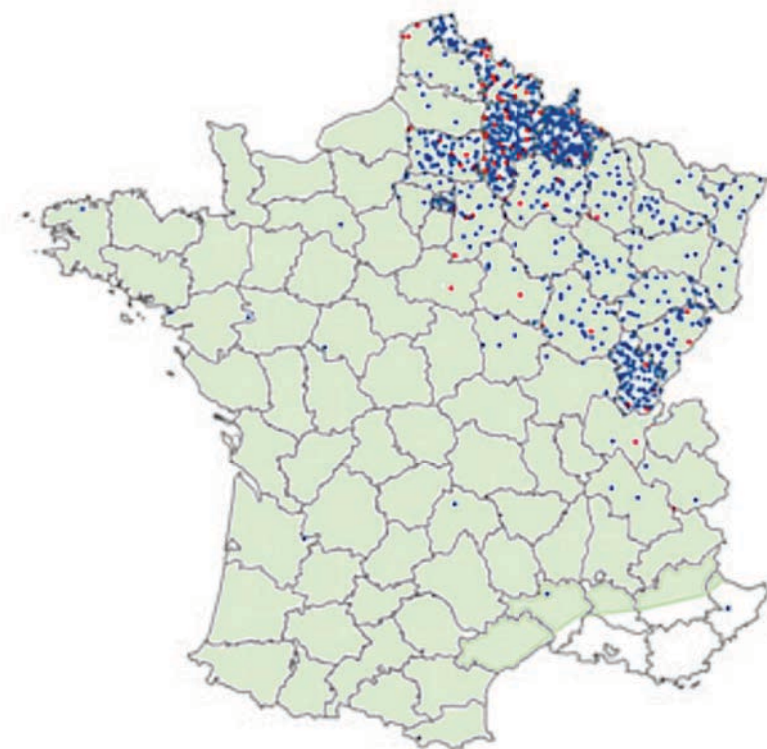
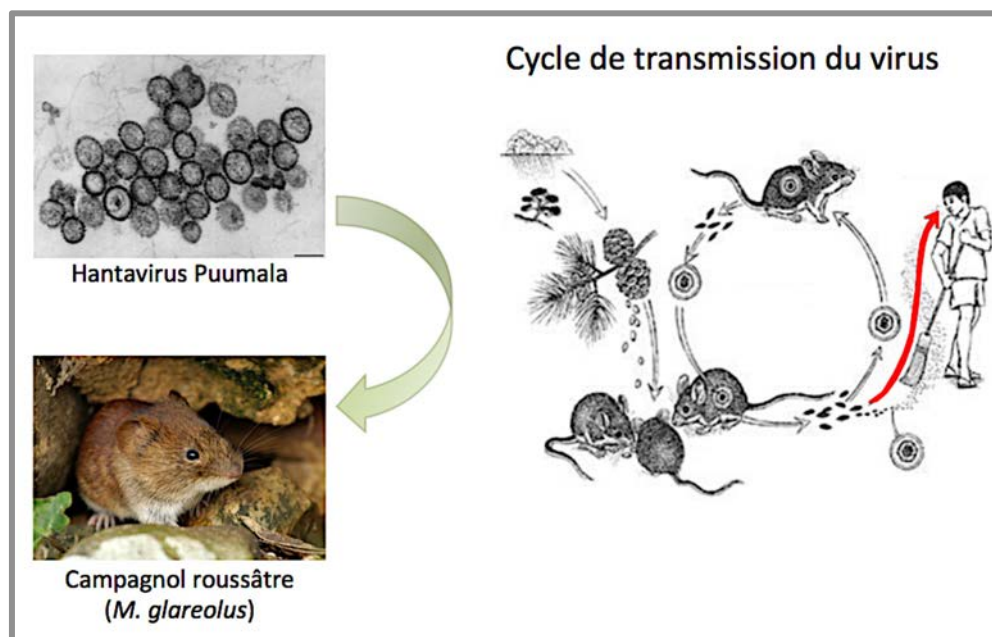
Coinfection may trigger the pathogenicity of the pathogens already present

Coinfection can promote the emergence of super-spreaders,
facilitating disease transmission and spread

Les coinfections influencent – elles le risque d'émergence des maladies infectieuses ?

Modèle d'étude :

Epidémiologie et Risque d'émergence d'une zoonose liée aux rongeurs,
la néphropathie épidémique

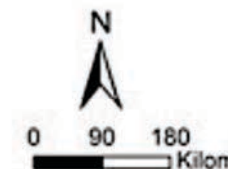


Cas d'infections à hantavirus

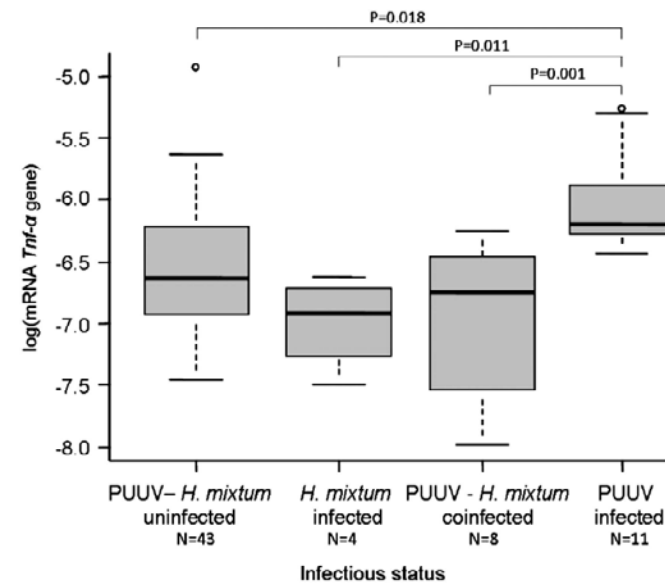
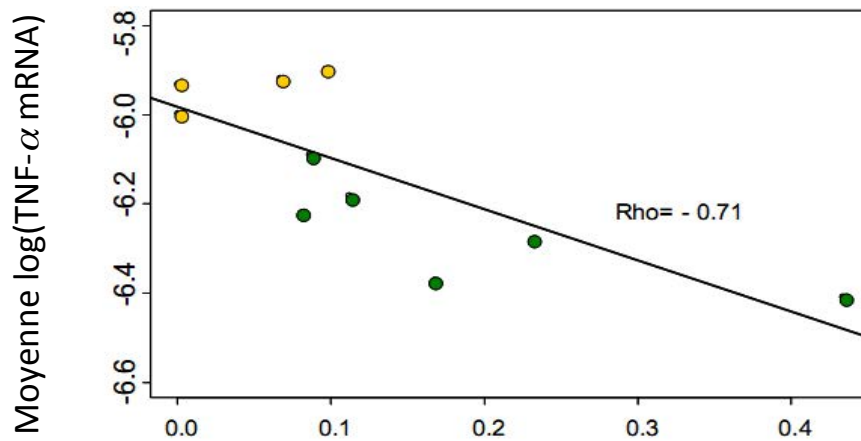
● 2005-2013

● 2014

■ Distribution de *M. glareolus*



Coinfections Helminthes / virus Puumala ...



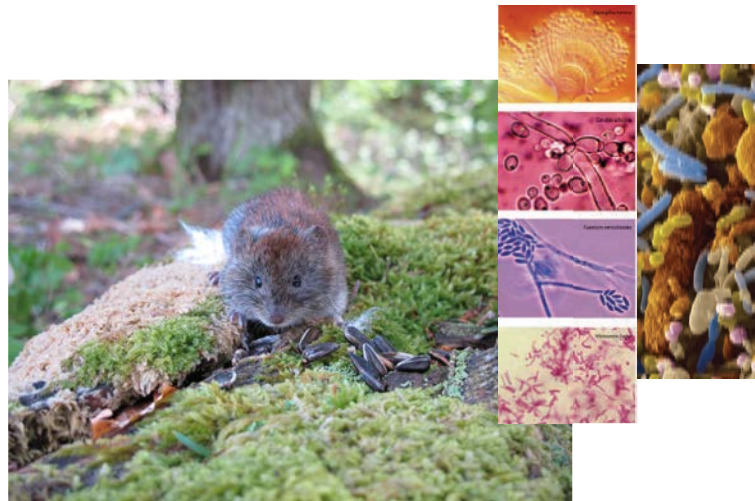
Guivier et al. 2014

Projet Hantagulmic

Spatio-temporal analyses of HANTAVirus, Gut and Lung Microbiota interactions

et Hypothèses

Les microbiomes bactériens et fongiques interagissent ils pour moduler la sensibilité aux agents de maladies infectieuses ?



Développements méthodologiques moléculaires et bioinformatiques

Analyses spatiales des interactions microbiomes / virus Puumala

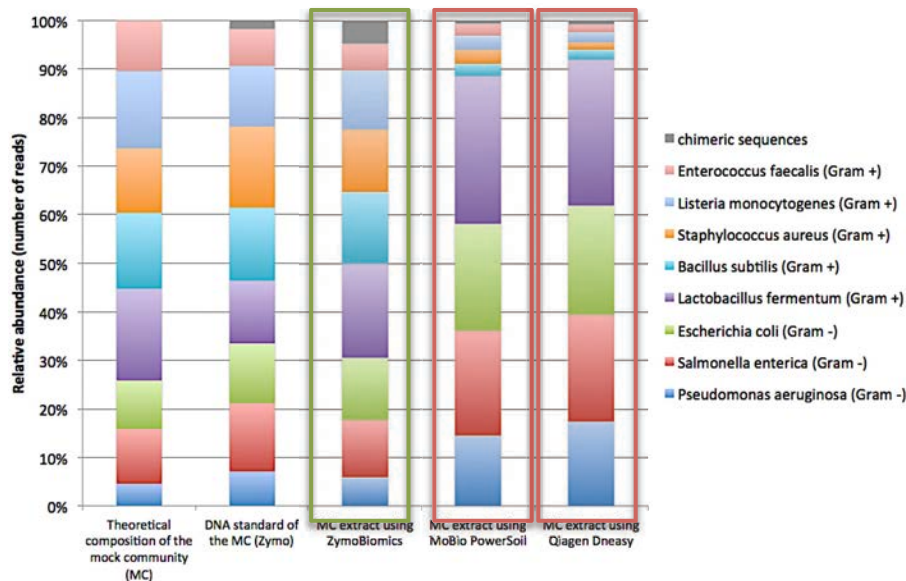
Analyses de suivis temporels des interactions

Développements méthodologiques sur l'analyse du bactériome par séquençage haut débit

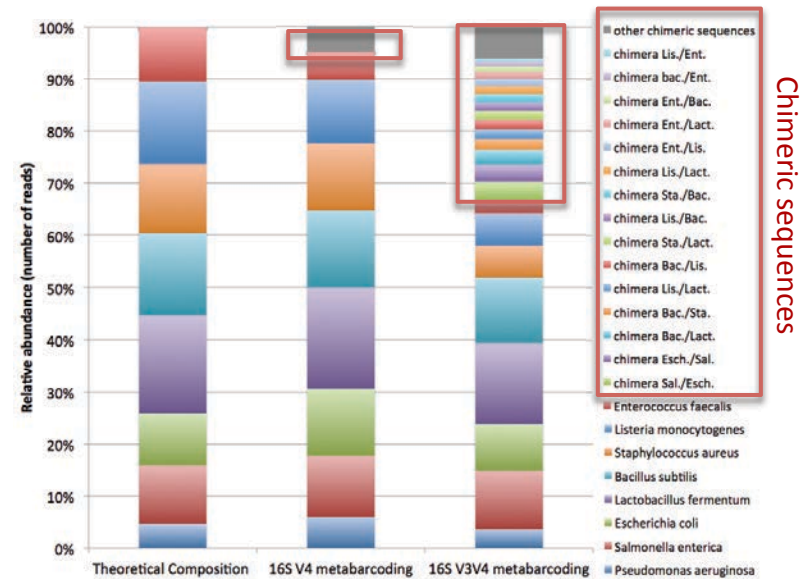
Mises au point sur des communautés artificielles

DNA extraction kits:

Comparison for the co-extraction of Gram + & Gram - bacteria

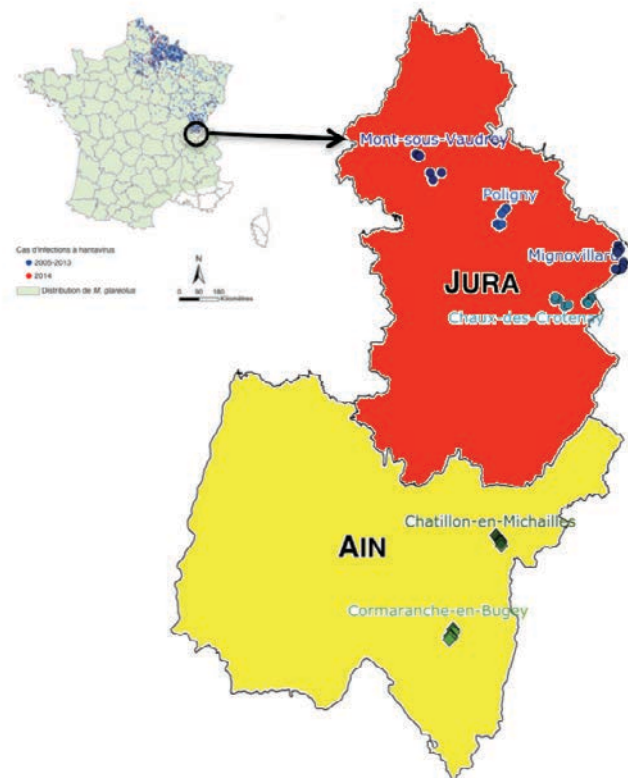


DNA barcode regions: V4 vs V3V4



V3V4* -> Numerous chimeric sequences compared to V4
 *using 2-step PCR protocol without purification between step 1 & step 2

Analyses comparatives des bactériomes de *Myodes glareolus* entre zones d'endémie et non-endémie à Puumala




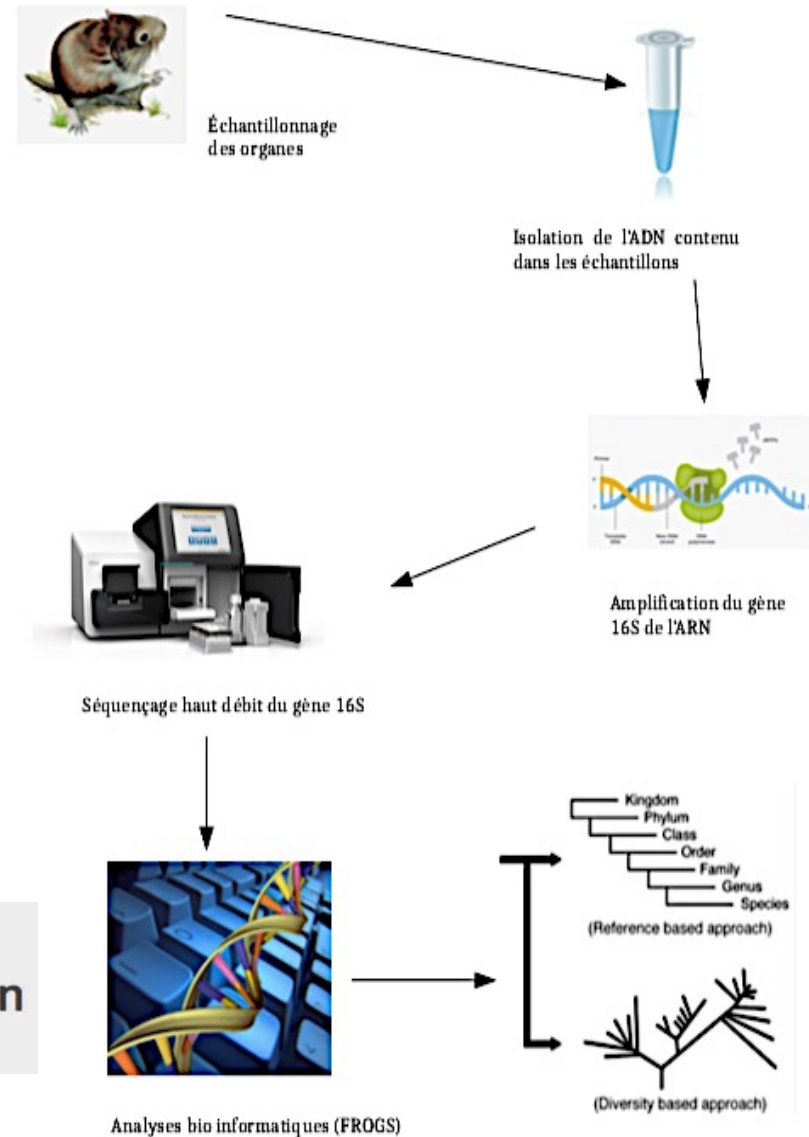
Juin 2014

4 localités et 170 individus
échantillonnés

Caecum, colon, poumon et rate
ont été récupérés

Caractéristiques individuelles
relevées + statut infectieux (*PUUV*)

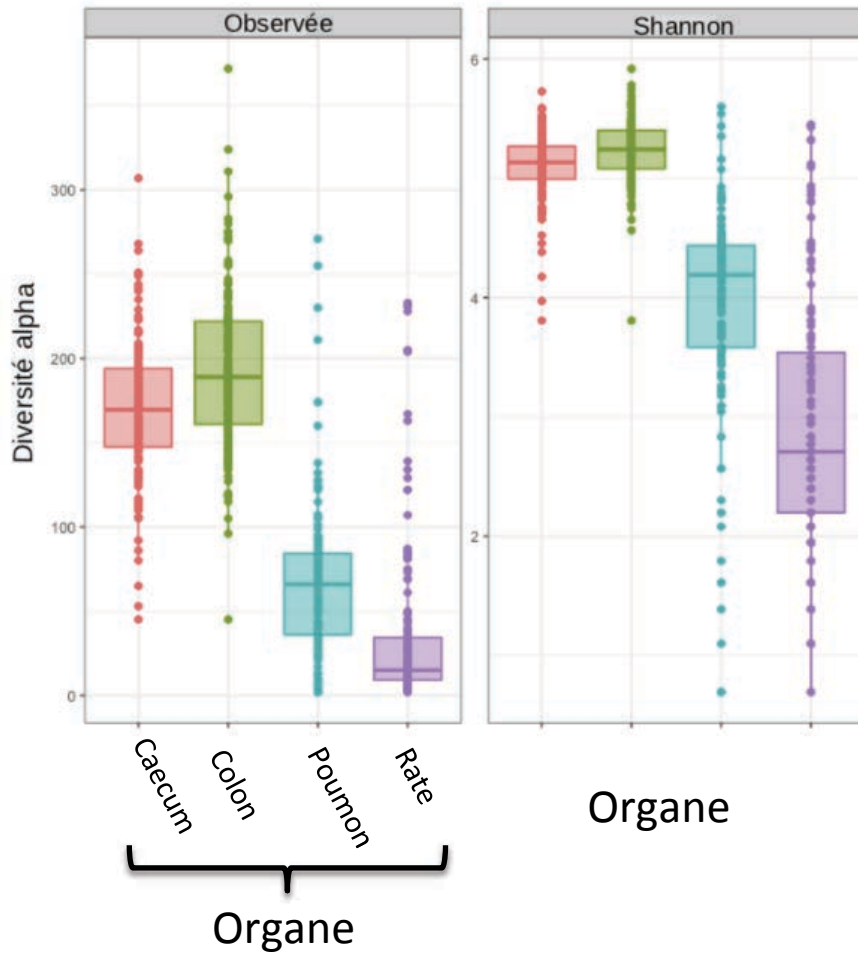
Analyses comparatives des bactériomes de *Myodes glareolus* entre zones d'endémie et non-endémie à Puumala



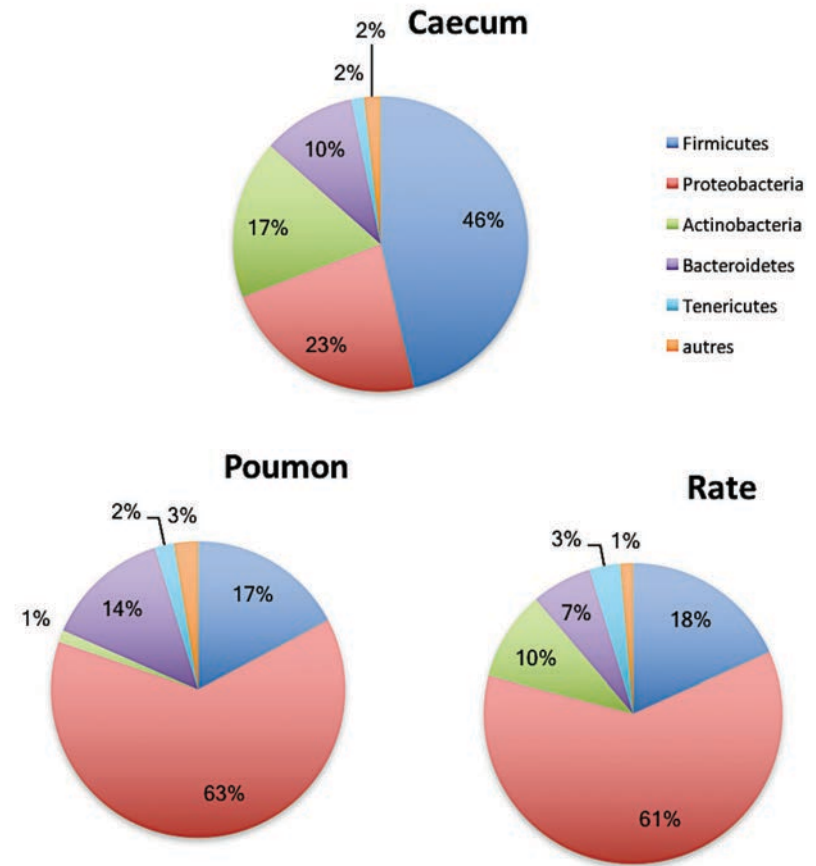
Find, Rapidly, Otus with Galaxy Solution

De forts contrastes (diversité, composition) entre organes

Comparaison de la diversité alpha entre organes

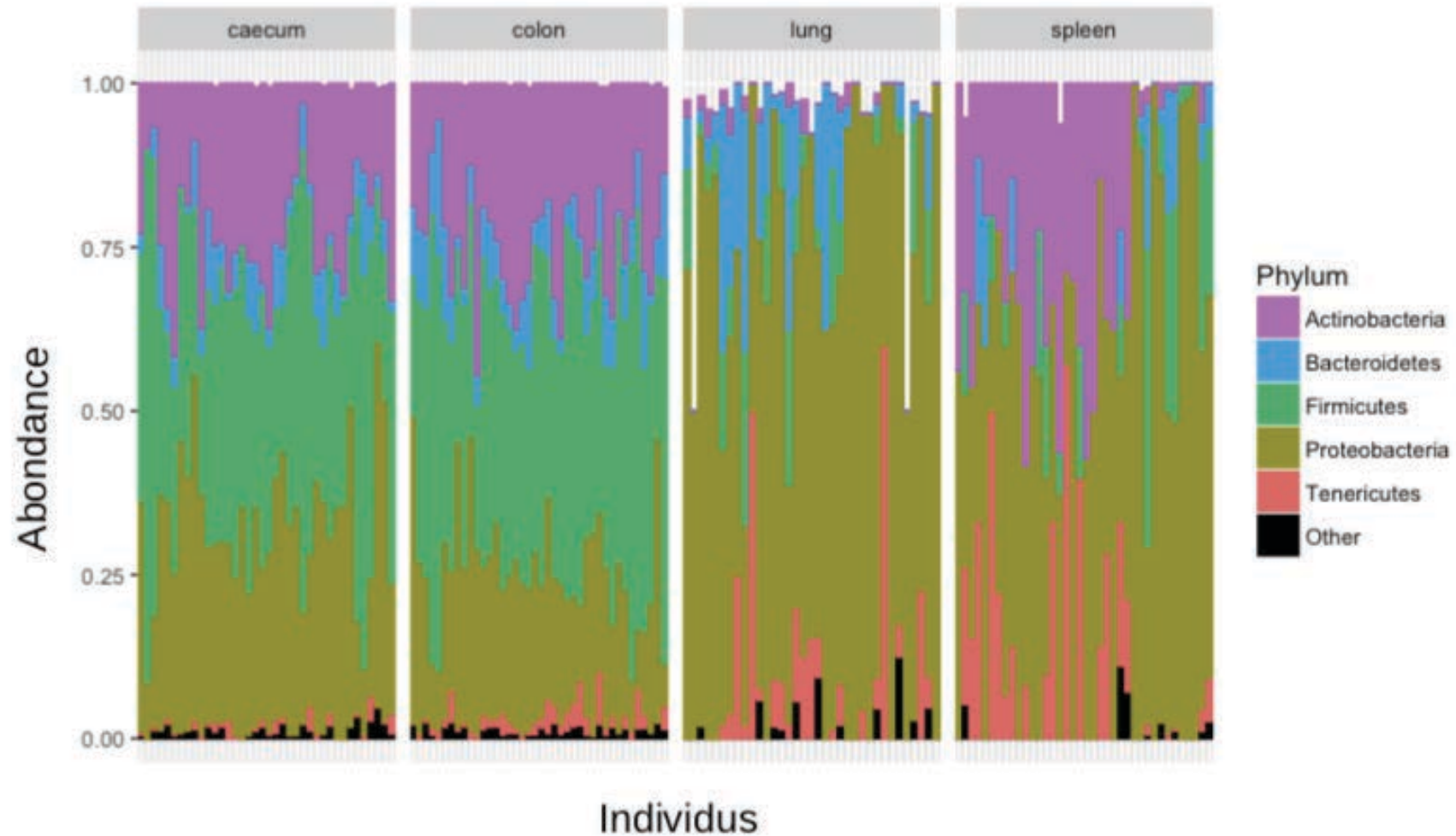


Composition des communautés bactériennes en phylums



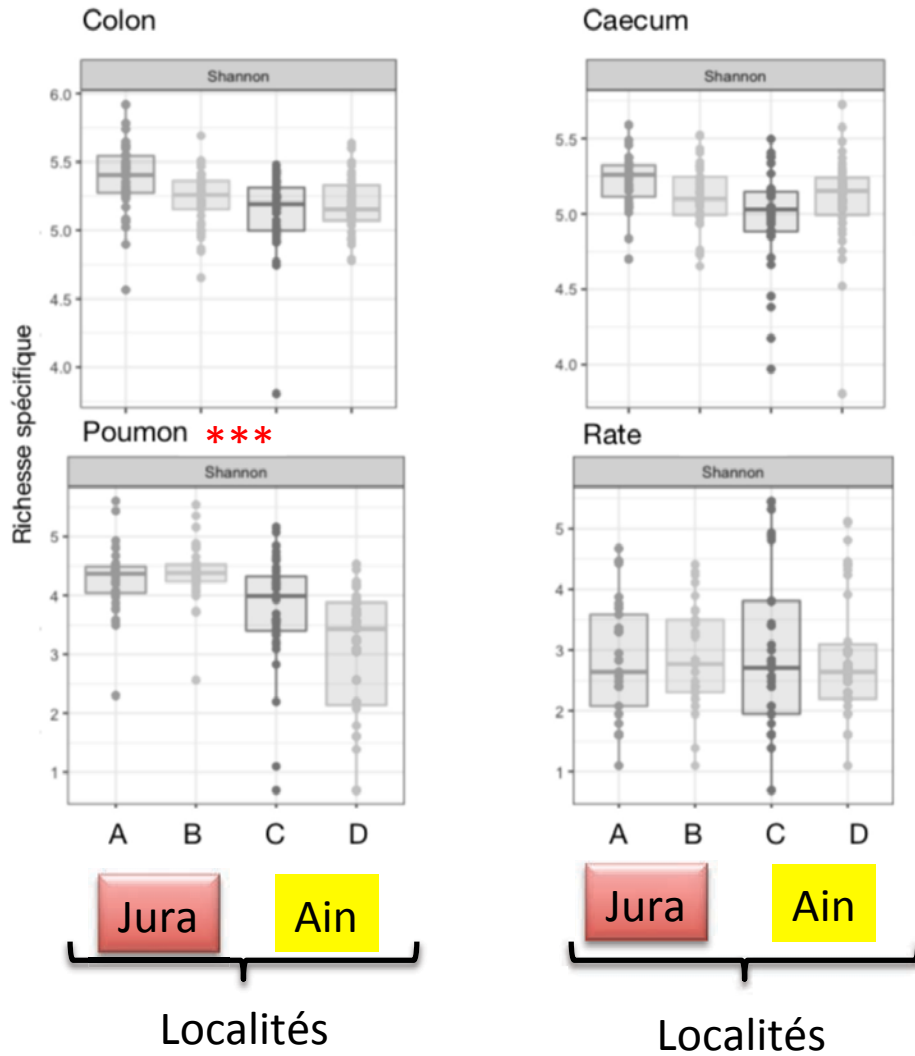
Une forte hétérogénéité entre individus (diversité, composition du bactériome)

Composition des communautés bactériennes par individu

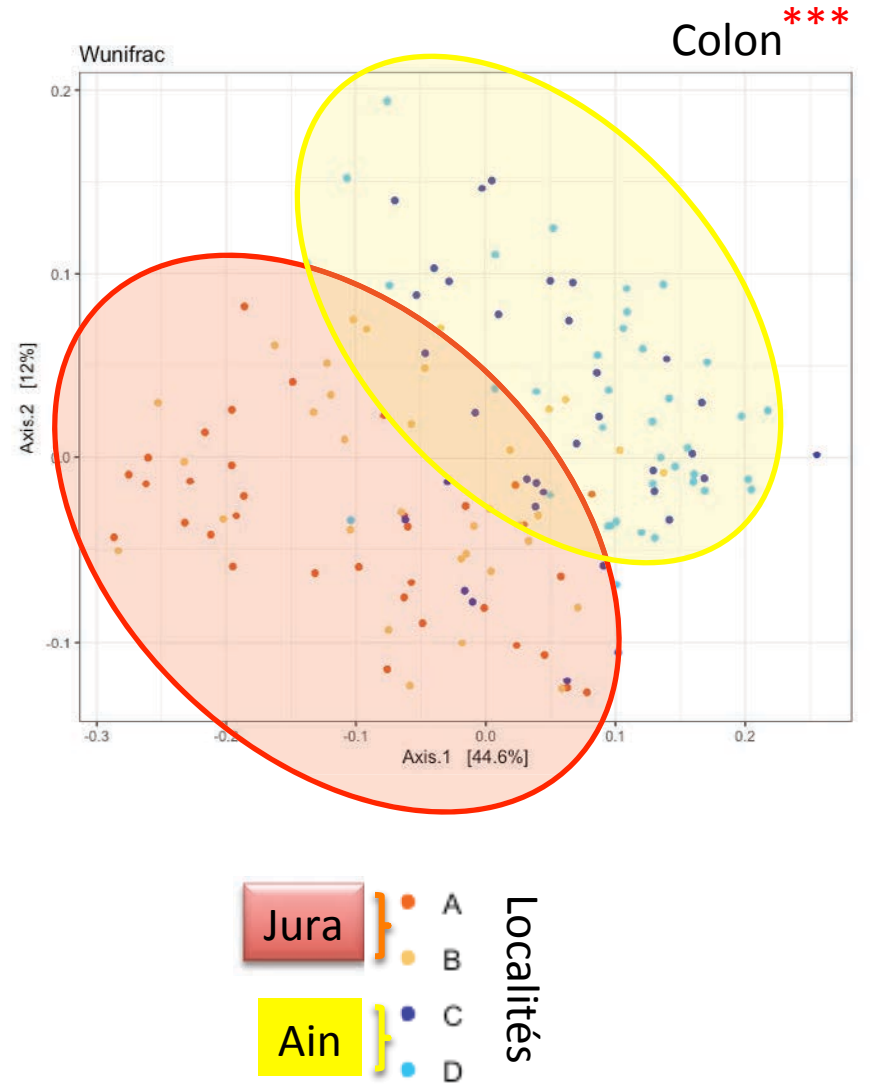


Une légère variabilité entre populations (régions ?) du bactériome

Diversité alpha



Diversité bêta



Les Hic !

Sur quel jeu de données travailler (nettoyage, présence / absence vs abondance) ?
Méthodes statistiques d'écologie des communautés et données 16S de bactéries

Interprétation des résultats en l'absence de connaissances en microbiologie !

Forte variabilité inter-individuelle et inter-populationnelle

Nécessité d'un important échantillonnage pour décrire les variations spatiales du bactériome

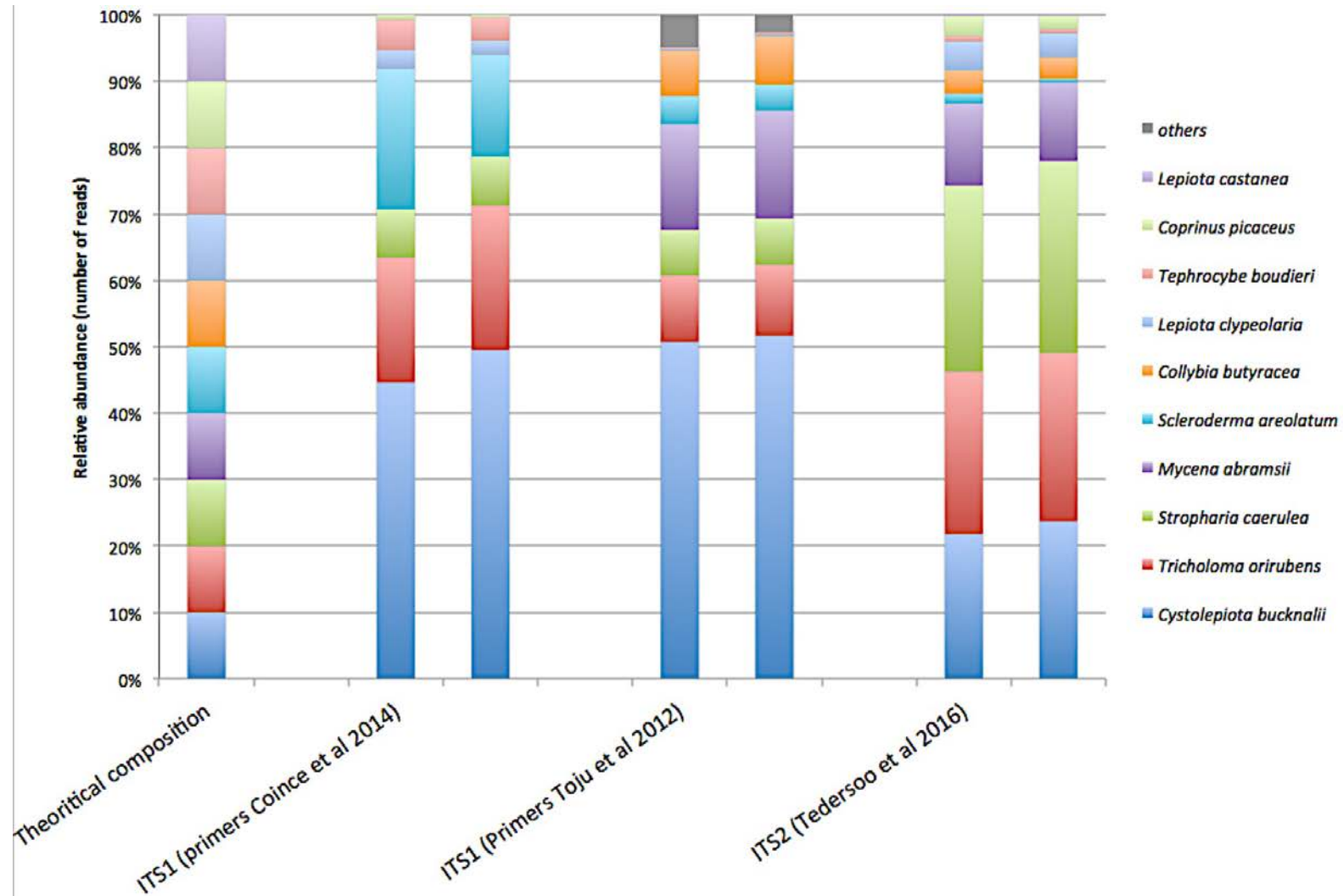
Nécessité d'un important nombre de campagnols positifs à PUUV pour tester les interactions PUUV / bactéries

Approche en populations naturelles corrélatives

Etude en cours de suivis d'infections expérimentales

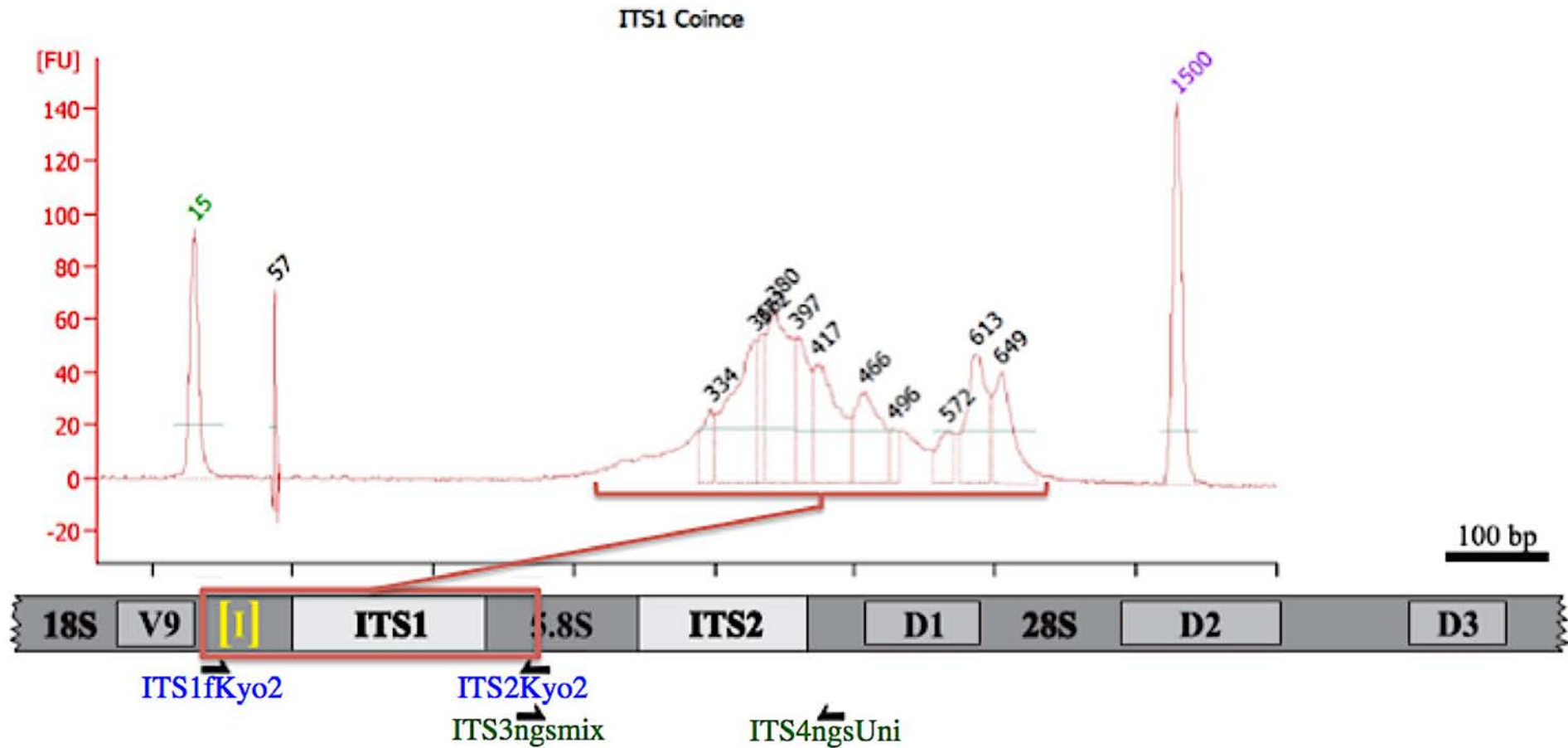
Développements méthodologiques sur l'analyse du bactériome par séquençage haut débit

Choix du barcode et des amorces : Mises au point sur des communautés artificielles



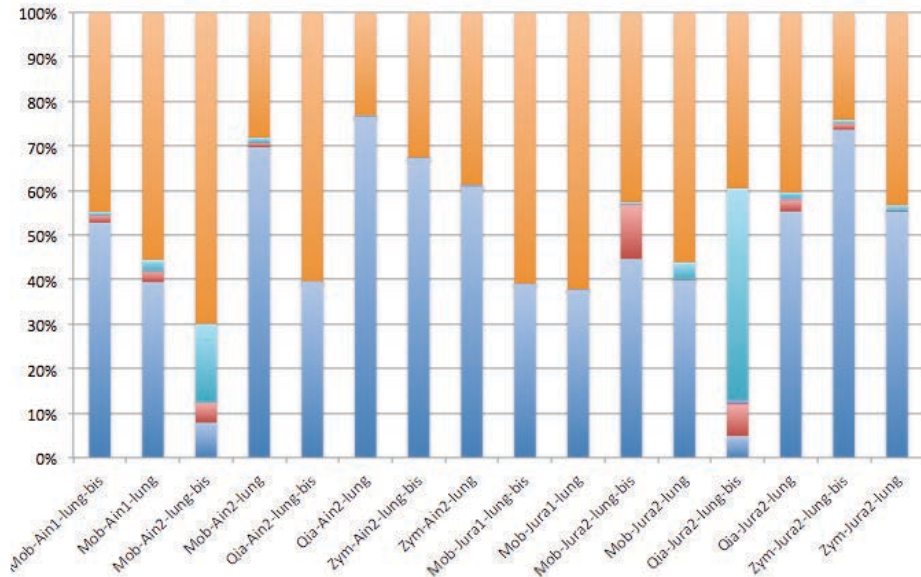
Biases between species: biases of amplification or bioinformatic problem?

Forte variabilité de longueur des ITS amplifiés et problèmes bioinformatiques

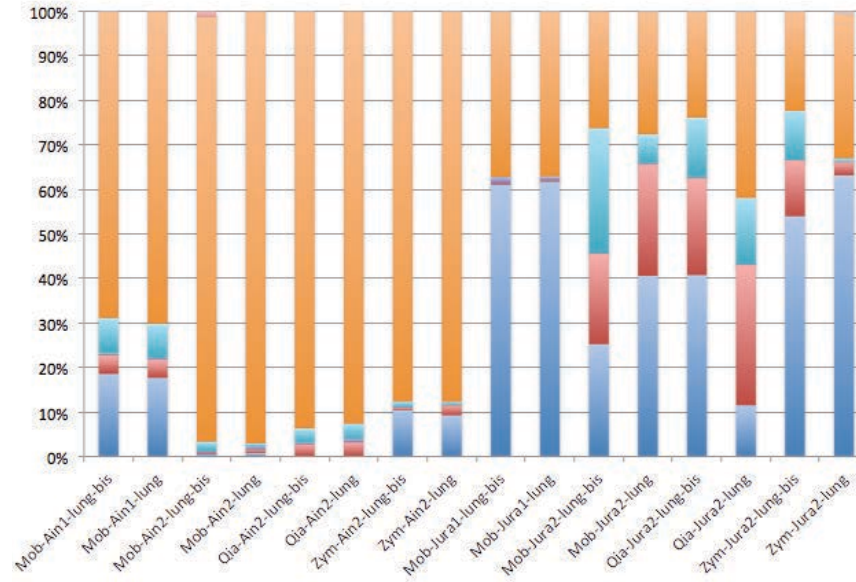


How to choose the best ITS marker ?

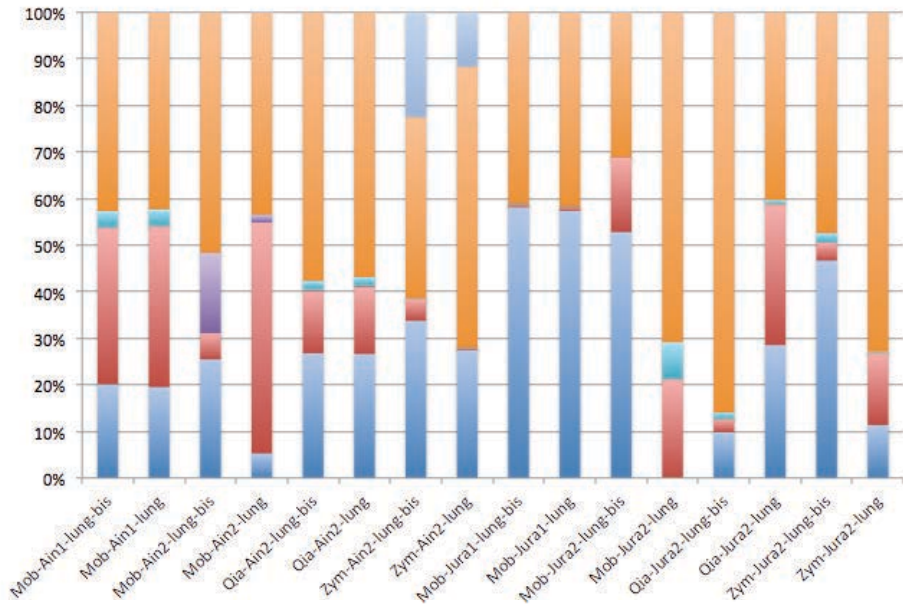
ITS1 (Coince et al 2014)



ITS1 (Tujo et al 2012)



ITS2 (Tedersoo 2016)



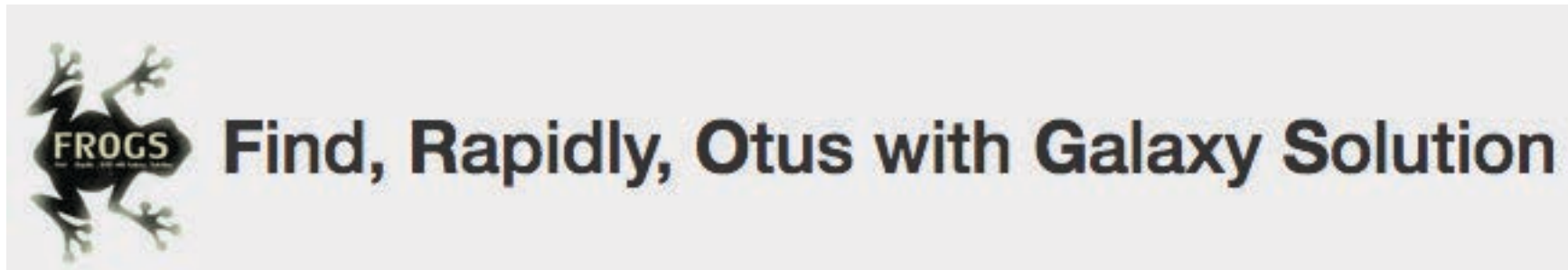
- others
- Plantae
- removed
- unclassified
- Parasite & Nematode
- Bacteria
- Rodent
- Fungi

Données obtenues sur les poumons

FROGS => FROGSFUNGI

Mise en place d'une solution bioinformatique pour le traitement des ITSs

Maria Bernard, Olivier Rué, Géraldine Pascal

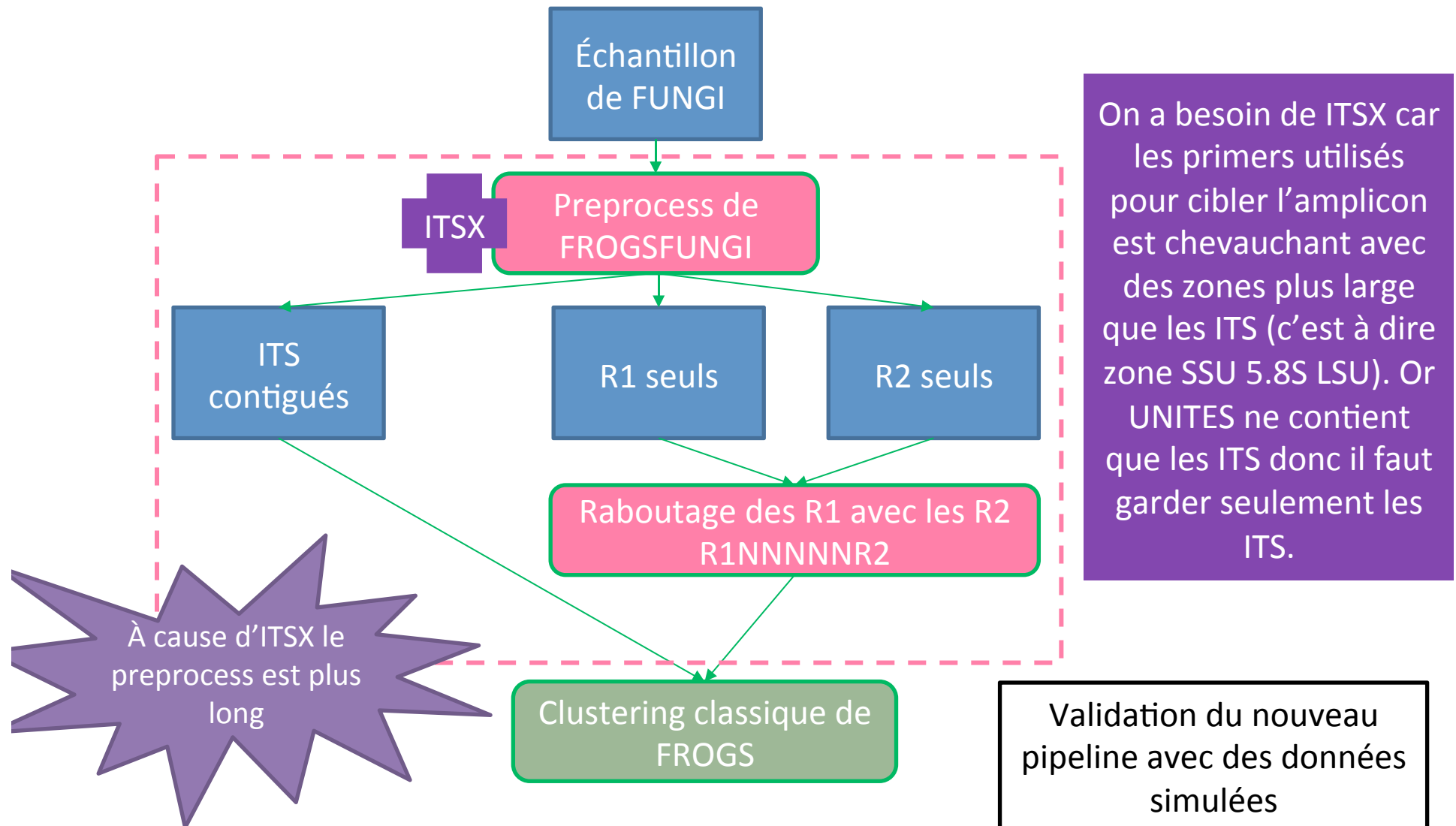


1. ITS non contigables en 2* 250 pb ou 2* 300pb, mélangés à des ITS contigués
2. Faible détection de chimères
3. Polymorphisme de taille des ITSs
4. Ajouter une base de données

FROGS => FROGSFUNGI

Mise en place d'une solution bioinformatique pour le traitement des ITSs

Maria Bernard, Olivier Rué, Géraldine Pascal



FROGSFUNGI

Sous Galaxy,

Bdd Unite

FROGS Pre-process Step 1 in metagenomics analysis: denoising and dereplication. (Galaxy Version r3.0-v2.0) Options

Sequencer
Illumina
Select the sequencing technology used to produce the sequences.

Input type
Archive
Samples files can be provided in single archive or with two files (R1 and R2) by sample.

Archive file
1: /work/frogsfungi/ToTestFungiwithFROGS/22.tar.gz
The tar file containing the sequences file(s) for each sample.

Reads already contiged ?
No
The archive contains 1 file by sample : R1 and R2 are already merged by pair.

Reads 1 size
250
The read1 size.

Reads 2 size
250
The read2 size.

Minimum amplicon size
100
The minimum size for the amplicons.

Maximum amplicon size
1000
The maximum size for the amplicons.

Is it an ITS Fungi amplicon?
Yes No
In case of ITS Fungi amplicon, an additionnal filter is applied with ITSx

Which ITS region is targeted?
 ITS1
 ITS2

Sequencing protocol
Custom protocol (Kozich et al. 2013)
The protocol used for sequencing step: standard or custom with PCR primers as sequencing primers.

Les Hic !

Probable non exhaustivité de la base de données Unite

Interprétation des résultats en l'absence de connaissances en microbiologie !

Challenges autour de l'analyse des coinfections, et des études du pathobiome

Description des communautés : Produire des séquences, identifier des taxons ✓

Filtrage et Qualité des données

Interprétation des données

Détecter des interactions : Réaliser des analyses statistiques ✓

Inférer des liens de causalité



HantaGuLuMic

Spatio-temporal analyses of Hantavirus, GUT and LUNG MICrobiota interactions

M Galan, L Crespin, M Bernard, G Pascal, B Roche, P Marianneau, P Stuart, H Leirs, A Chastagner, G Castel, N Charbonnel



Métabolisme et écosystèmes microbiens

INRA MEM METAPROGRAM – AMI 2016

Contributeurs

CBGP : M. Galan, M. Boisseau, A. Dubois, G. Castel, A. Loiseau, L. Benoit,
PT BM et Collections

Partenaires INRA

GABI (M. Bernard)

GenPhyse (G. Pascal)

EpiA (L. Crespin)

Autres

MIVEGEC (B. Roche, J. Abbate)

ANSES (P. Marianneau, S. Murri, J. Vulin)

Irlande (P. Stuart)