



CIRCLES

CITY TOUR - BRUXELLES

REPORT EUC255

Wellmicro Srl - Lab NGS:

Barbara Santacroce, Dr, Biologiste
Andrea Marcante, Dr, Biotechnologue
Antonella Padella, PhD, Biotechnologue
Alena Velichevskaia, Dr, Biologiste

Wellmicro Srl - Analyse NGS:

Elisa Viciani, PhD, Biologiste Moléculaire

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elisa Viciani'.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 818290.

Introduction

Les plantes, les animaux et les êtres humains vivent en symbiose avec des centaines de milliards de microbes. Cette population de micro-organismes symbiotiques composée de bactéries, de virus, de champignons, d'algues et de protistes vivant à l'intérieur et autour des êtres vivants est appelée le microbiote. Le matériel génétique présent dans toutes ces formes de micro-organismes constitue le microbiome. En d'autres termes, les microbiomes sont utilisés pour déduire la composition et la fonction du microbiote.

L'amélioration de notre compréhension du microbiome nous permettra de développer de nouveaux outils et de nouvelles applications pour des denrées alimentaires et des aliments pour animaux plus durables qui améliorent notre santé et celle de l'environnement.

Ce défi scientifique peut désormais être relevé grâce aux récentes découvertes en matière de cartographie génomique, de robotique et de chimie.

Pour faire connaître l'importance de ces écosystèmes au grand public, CIRCLES a organisé des campagnes d'échantillonnage dans plusieurs villes des pays européens impliqués dans le projet, appelées "City Tours".

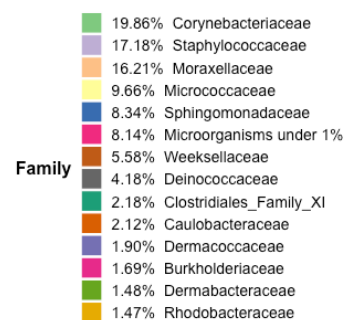
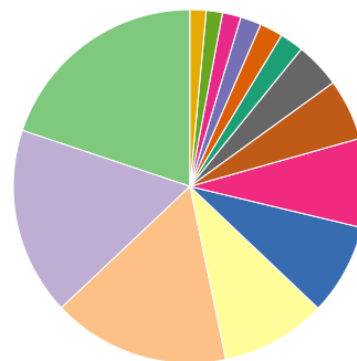
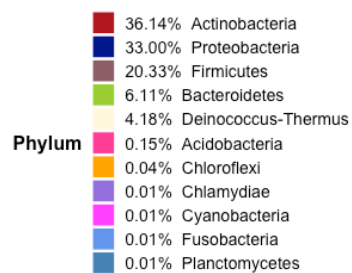
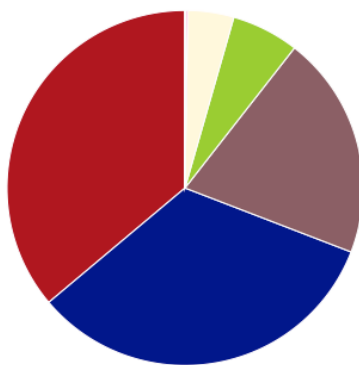
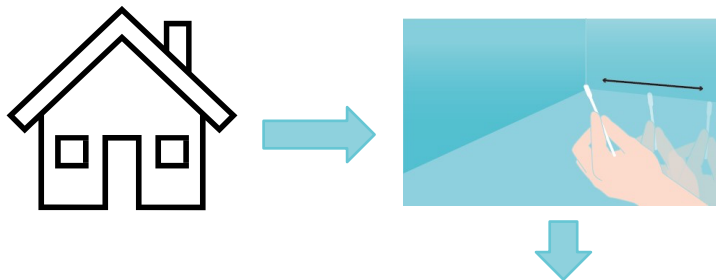
Comment lire les résultats

Ce document renvoie la composition bactérienne de l'échantillon analysé exprimée en termes d'Abondance Relative (%) aux niveaux taxonomiques de l'Embranchement et de la Famille (voir Matériels et Méthodes pour plus de détails). Le premier constitue une classification générale facilitant la lecture (moins de groupes) tandis que la famille permet une évaluation plus détaillée (plus de groupes). Les deux niveaux taxonomiques sont donc deux points d'observation différents de l'état donné.



Résultats

Les abondances relatives (%) des groupes bactériens identifiés dans l'échantillon au niveau taxonomique de l'embranchement (à gauche) et de la famille (à droite) sont présentées ci-dessous :



Conclusion

Les résultats ne sont pas destinés à la recherche de pathogènes ou de contamination microbiologique et ne font pas état d'une quelconque interprétation des données, mais sont uniquement destinés à des fins d'information et de sensibilisation.

Si vous avez reçu ce rapport, c'est que vous avez participé à nos initiatives. Nous vous en remercions vivement et vous invitons à nous suivre sur notre site web et nos canaux sociaux ! Les résultats complets du projet de cartographie des écosystèmes environnementaux de Bologne seront disponibles dans une publication scientifique (données anonymes et agrégées).

Matériel et méthodes

Séquençage NGS

L'ADN a été extrait et purifié à l'aide du kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) ; la quantification a été réalisée à l'aide de l'instrument QIAxpert System et a été suivie par la préparation de bibliothèques NGS à l'aide du jeu d'amorces S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-211 selon le protocole Illumina pour l'amplification de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S à partir du kit Nextera XT. Les bibliothèques ont été diluées à une concentration de 4 nM, dénaturées et diluées à 5 pM avant l'ajout de 20 % de PhiX et chargées sur la plateforme MiSeq pour être séquencées avec les kits Illumina MiSeq V2 2 X 250 pb (paired-end). Afin d'éliminer le risque de considérer les micro-organismes appartenant aux kits utilisés (contaminants environnementaux) dans les analyses en aval, des contrôles négatifs (aucun échantillon) ont été traités en même temps que les échantillons de l'expérience.

Analyse des données

Les séquences ont été analysées avec QIIME2 version 2020⁶. Le plugin DADA2³ (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) a été utilisé pour supprimer le bruit, les chimères et pour générer des ASV (Amplicon Sequence Variants). Le filtrage de la qualité et le regroupement ont été effectués avec VSEARCH⁴. La classification taxonomique a été effectuée sur la base de données SILVA version 132. Les analyses en aval ont été effectuées à l'aide de R version 4.0.3 et Rstudio v1.4.1103 avec les paquets R phyloseq^{5,6}, ggplot2⁷, tidyverse, tidyr, ape, ggpubr et dplyr. Les contaminants environnementaux présents dans les contrôles de processus négatifs ont été exclus à l'aide du paquet R decontam⁸.

Bibliographie

1. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1–e1 (2013).





2. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 2019 37:8 **37**, 852–857 (2019).
3. Hall, M. & Beiko, R. G. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1849 113–129 (Humana Press Inc., 2018).
4. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, e2584 (2016).
5. McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**, e61217 (2013).
6. Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Res* **5**, 1492 (2016).
7. Wickham, Hadley. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. (Springer, 2009).
8. Davis, N. M., Proctor, Di. M., Holmes, S. P., Relman, D. A. & Callahan, B. J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **6**, 226 (2018).
9. CRAN - Package vegan. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>.
10. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **12**, R60 (2011).

