

Développement d'une approche par séquençage de nouvelle génération pour l'étude de la diversité fongique des bioaérosols

Hamza Mbareche, MSc

Rendez-vous de la science



Institut de recherche
Robert-Sauvé en santé
et en sécurité du travail

9 octobre 2018

Bioaérosols : sources naturelles ou industrielles



Les environnements touchés



Traitement des déchets

<http://www.st-hyacinthe.qc.ca/>



<https://enviromontreal.com>



<http://www.agr.gc.ca/>

Agriculture



<http://www.dairyxpo.ca/>



Crédit: Canadian Forest Products Ltd.

Transformation de bois



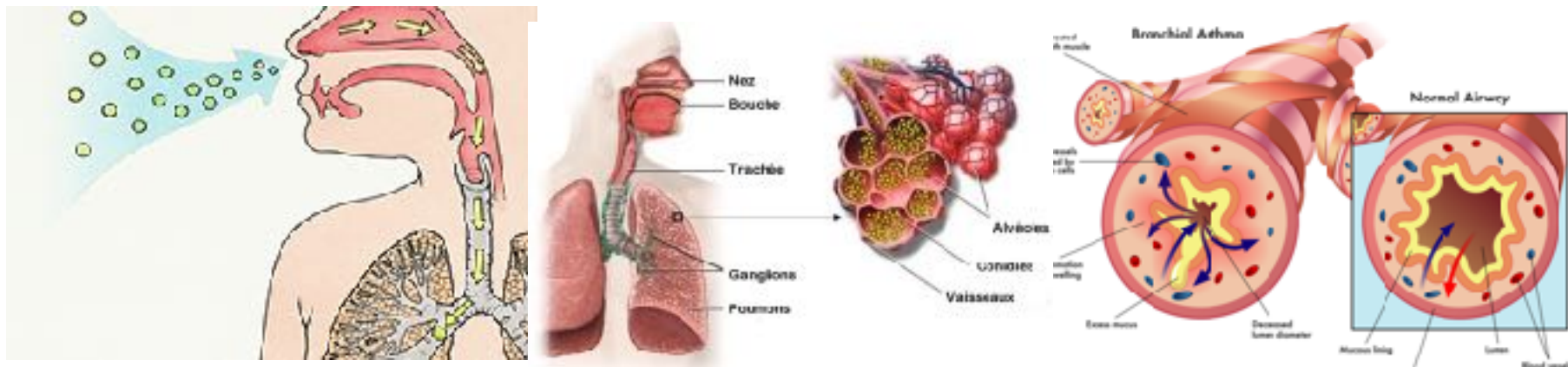
<http://benjaminwilliamson.photoshelter.com/>



Environnements intérieurs

Problèmes de santé et moisissures

➤ Les infections, l'asthme, la rhinite, la sinusite, les pneumopathies d'hypersensibilité, les mycotoxicoses, les problèmes gastro-intestinaux et dermatologiques



Problématique

Plusieurs pathologies suggérées, mais aucun lien de cause à effet direct démontré

× Pas de dose-réponse

× Absence d'agent étiologique clairement identifié

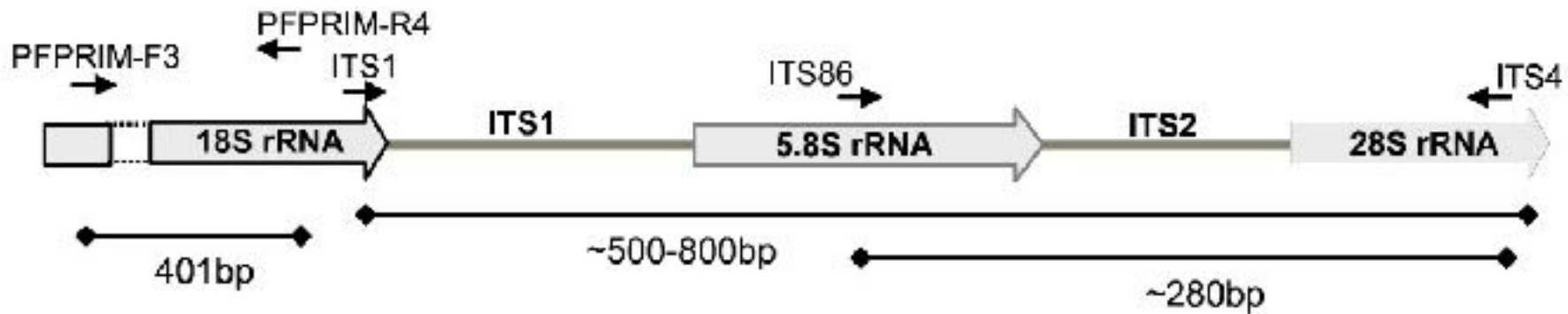
× Présence de moisissures non documentées

Études d'exposition = caractéristiques morphologiques

La plupart des espèces sont difficiles à isoler par culture

Hypothèses

- > Biais des méthodes de culture
 - > Moisissures non viables/non cultivables
 - > Milieux de culture favorisant certaines espèces



- > Limitation de la taille des amplicons par les séquenceurs
- > ITS1 ou ITS2 ?

Objectifs

- Utiliser une approche SNG pour décrire les bioaérosols fongiques
 - Comparer ITS1 vs. ITS2 dans les bioaérosols du compost
 - Appliquer la méthode aux usines de biométhanisation
 - Combiner l'approche par culture et par SNG pour étudier les fermes laitières

Méthodologie (Rapport R-1019)

Les environnements à l'étude

Compost



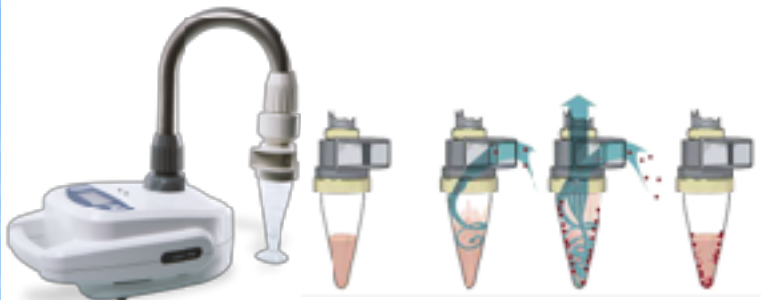
Biométhanisation



Fermes laitières



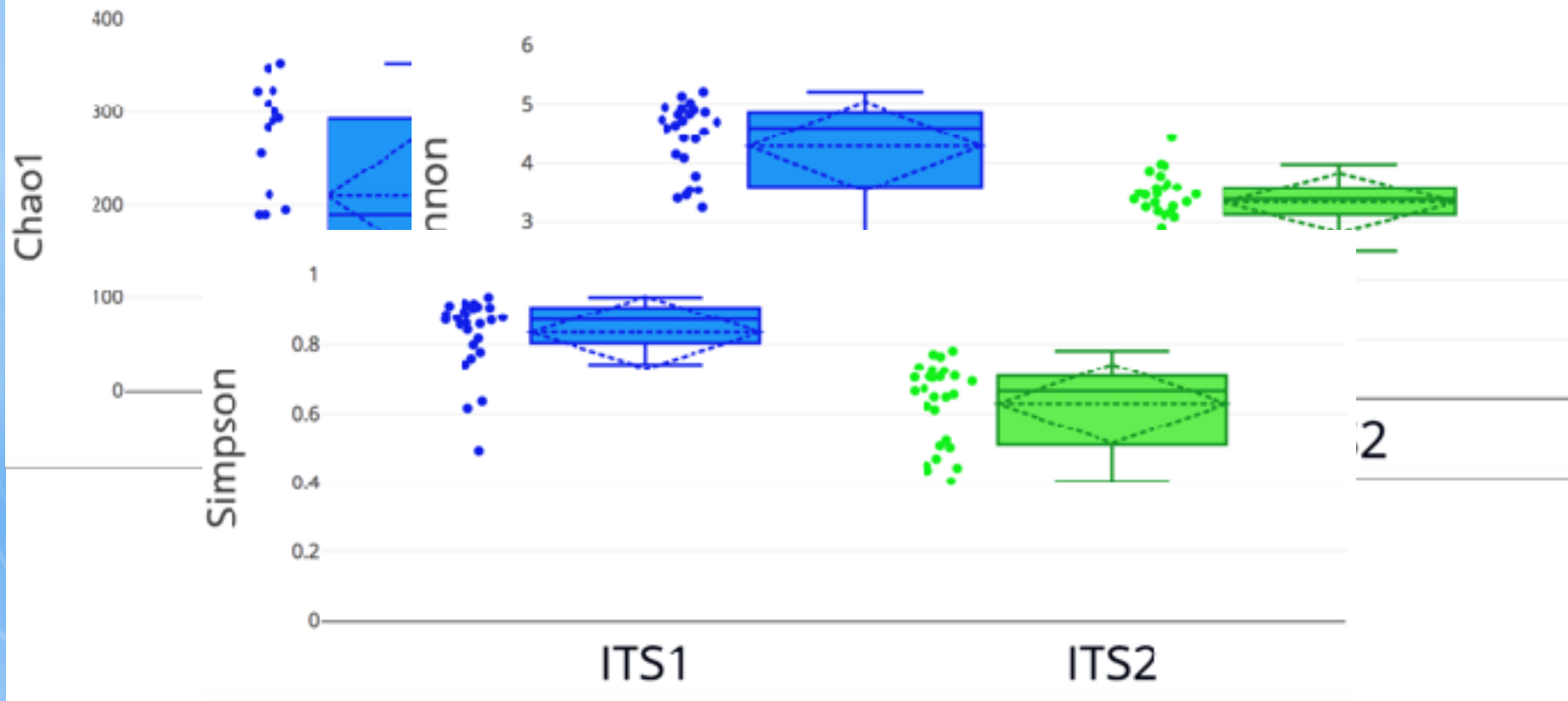
Échantillonnage de l'air (3 m³) MiSeq (Illumina®) Protocole bioinformatique (personnalisé)



Compost

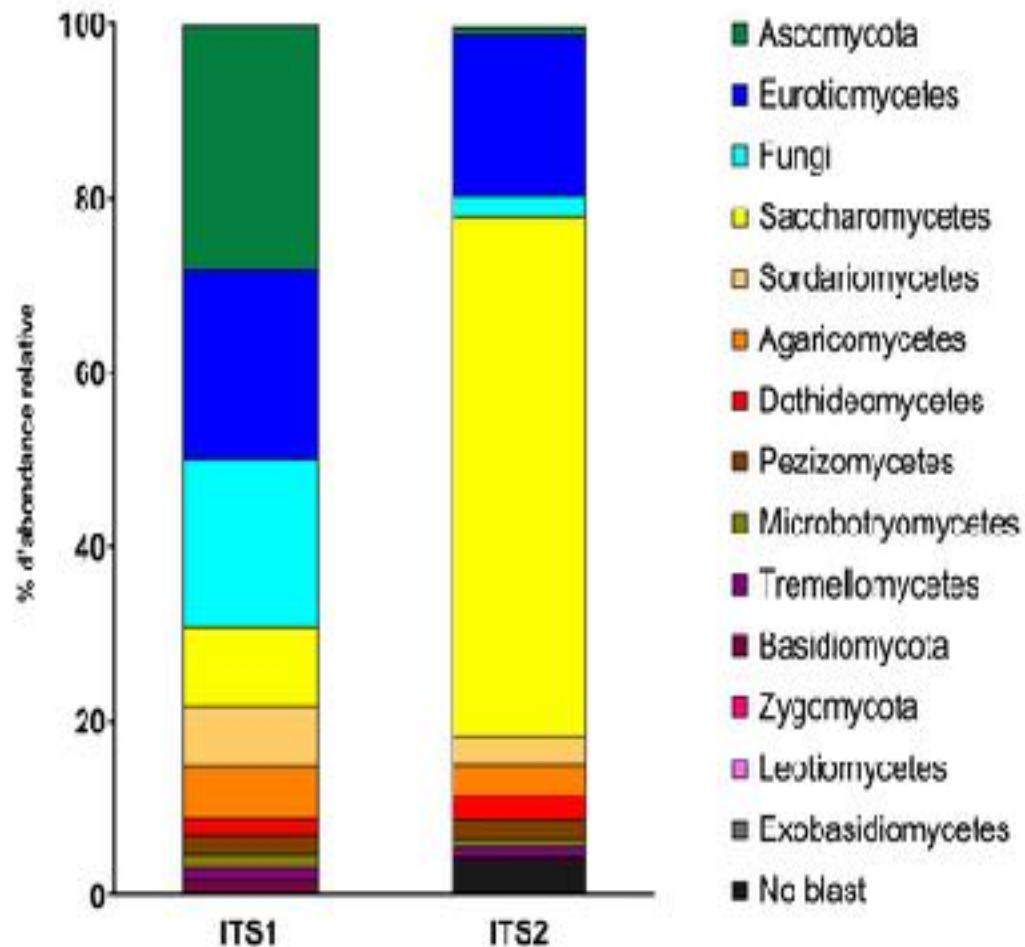


Indices de richesse et de diversité



Les indices de richesse et de diversité Chao1, Shannon et Simpson montrent des valeurs plus élevées pour ITS1 comparativement à ITS2

Analyse taxonomique (classe des moisissures)



Le profil taxonomique est plus diversifié et mieux réparti avec ITS1

Publication STOTEN



Science of The Total Environment

Volumes 601–602, 1 December 2017, Pages 1306–1314

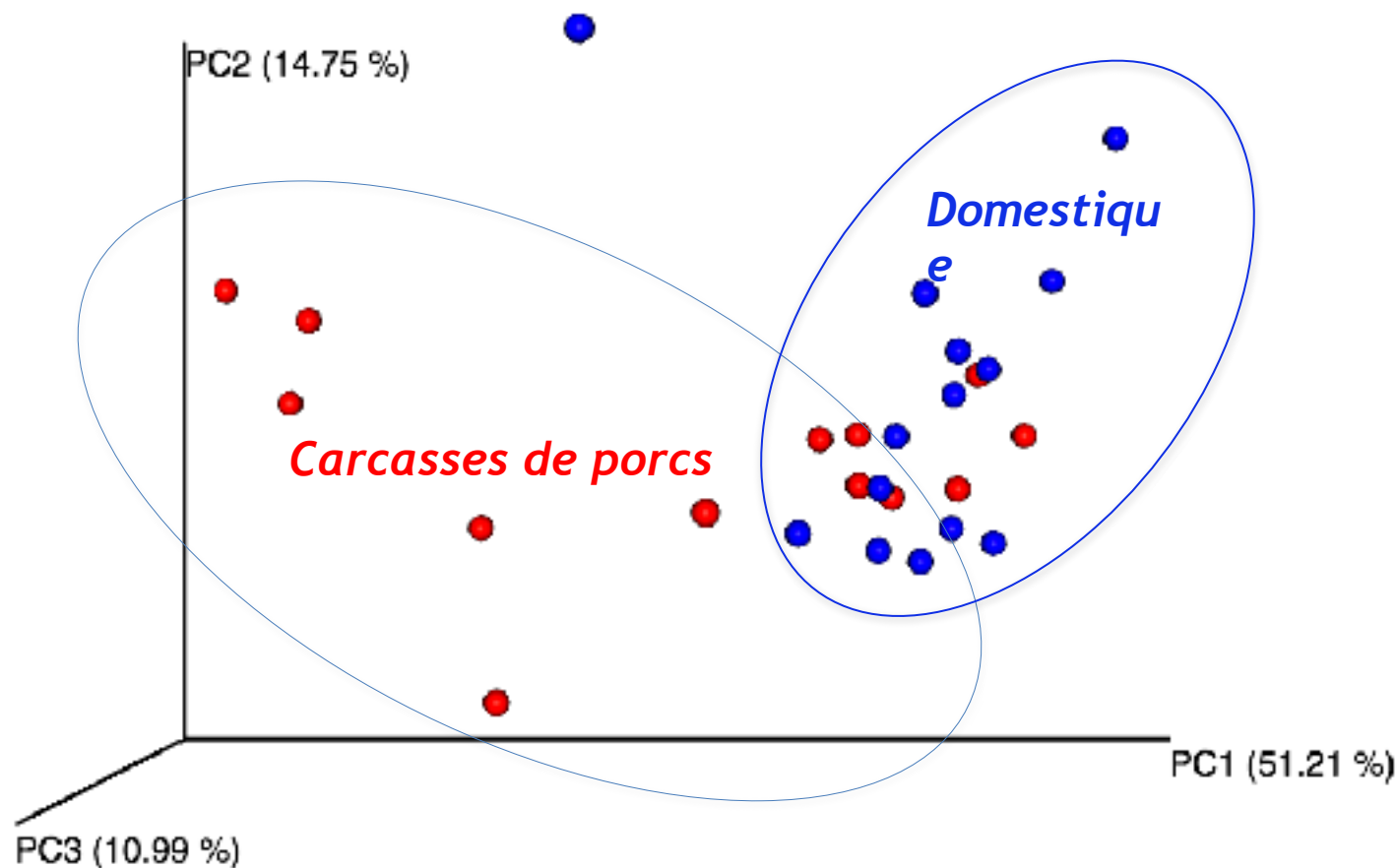


A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants

Hamza Mbareche ^{a, e}, Marc Veillette ^a, Laetitia Bonifait ^a, Marie-Eve Dubuis ^{a, e}, Yves Benard ^c,
Geneviève Marchand ^b, Guillaume J. Bilodeau ^d, Caroline Duchaine ^{a, e}  

PCoA : analyse en coordonnées principales

Matrice de distance : Bray-Curtis



*Signature fongique selon la matière première
compostée*

Biométhanisation



Publication JA & WM



Journal of the Air & Waste Management Association

ISSN: 1096-2247 (Print) 2152-2906 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/uawm20>

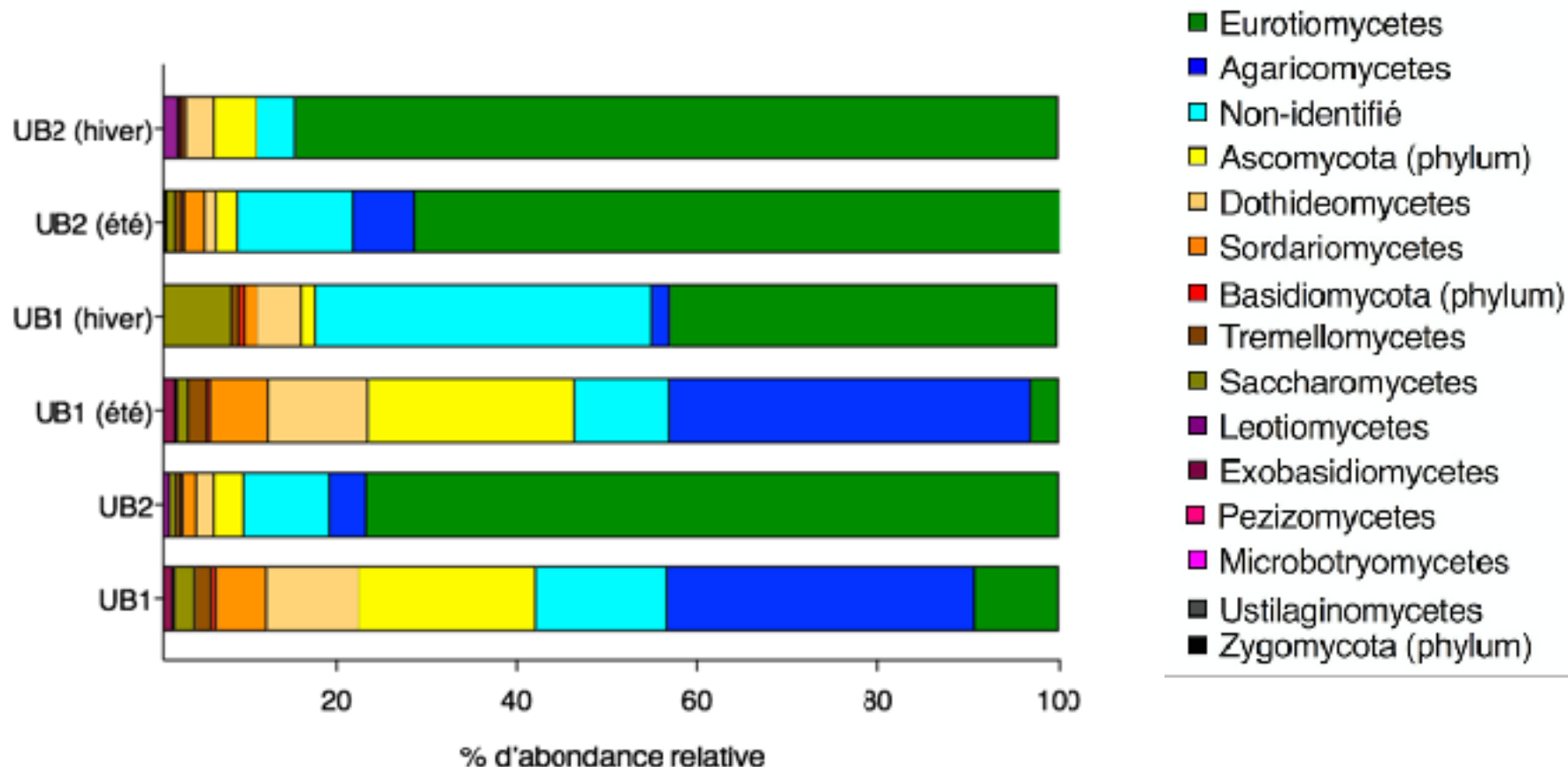
Fungal bioaerosols in biomethanization facilities

Hamza Mbareche, Marc Veillette, Marie-Ève Dubuis, Bouchra Bakhiyi, Geneviève Marchand, Joseph Zayed, Jacques Lavoie, Guillaume J. Bilodeau & Caroline Duchaine

To cite this article: Hamza Mbareche, Marc Veillette, Marie-Ève Dubuis, Bouchra Bakhiyi, Geneviève Marchand, Joseph Zayed, Jacques Lavoie, Guillaume J. Bilodeau & Caroline Duchaine (2018): Fungal bioaerosols in biomethanization facilities, Journal of the Air & Waste Management Association, DOI: [10.1080/10962247.2018.1492472](https://doi.org/10.1080/10962247.2018.1492472)

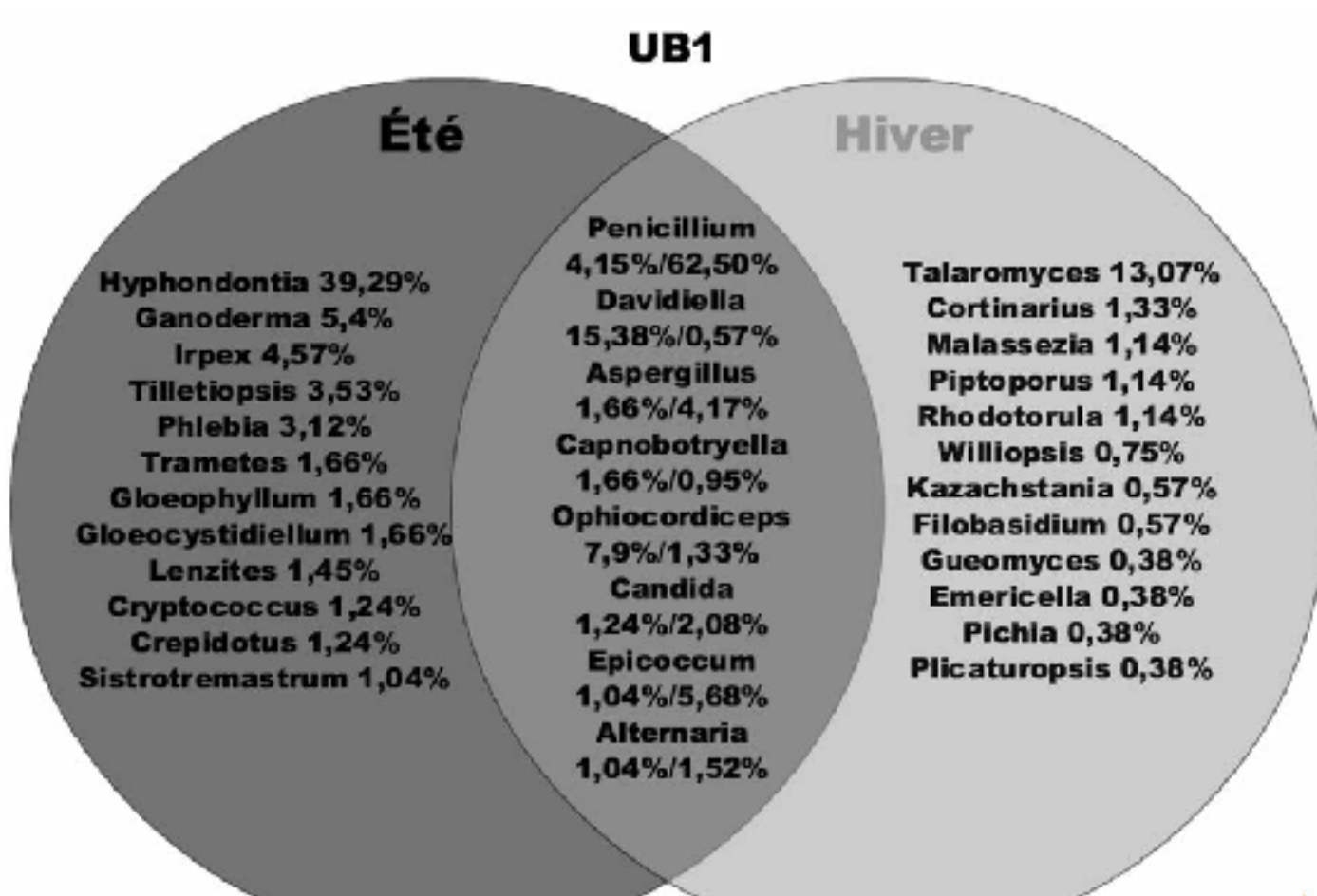
To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10962247.2018.1492472>

Classe des moisissures identifiées dans l'air des deux usines de biométhanisation



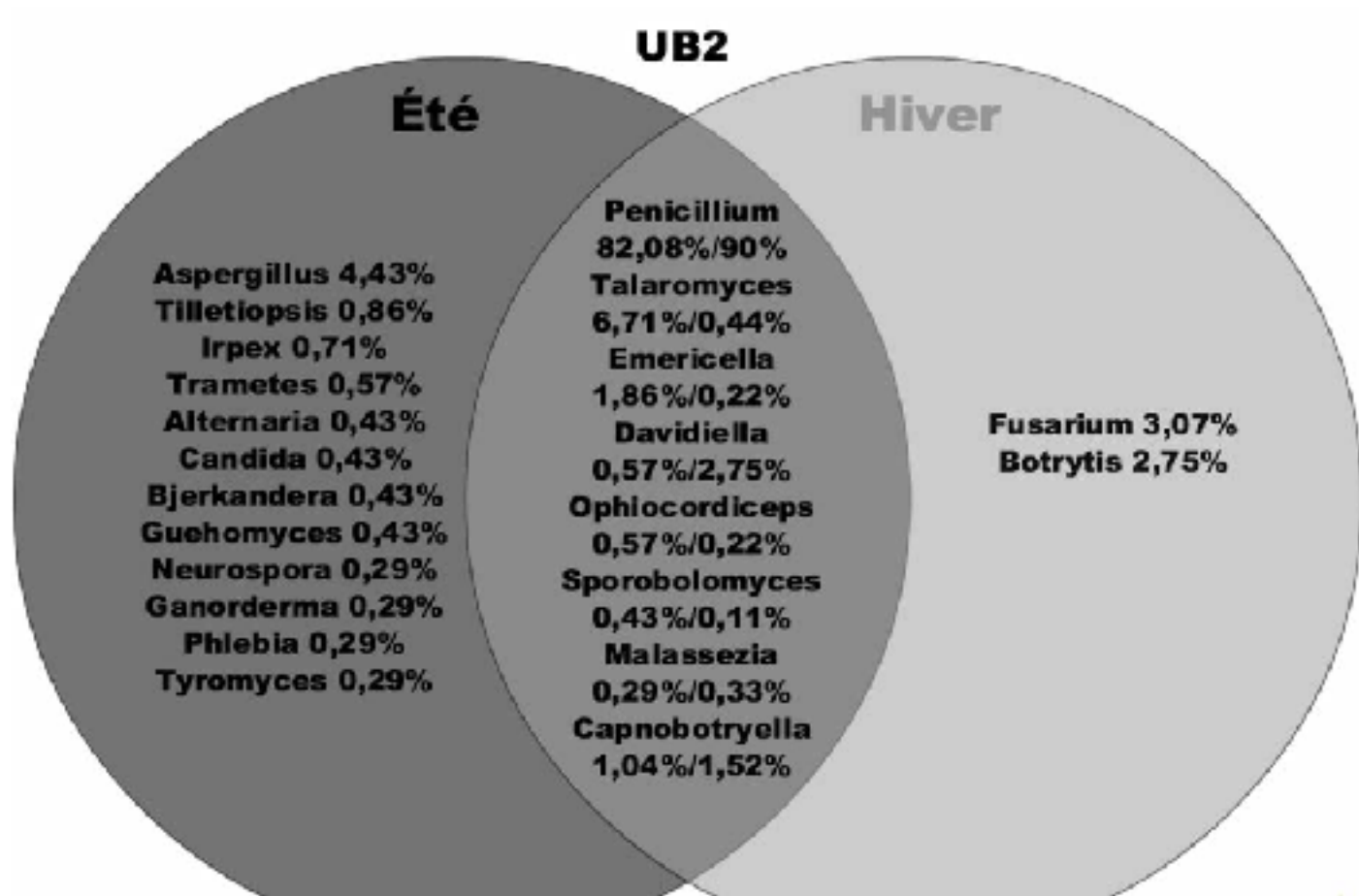
Les Eurotiomycetes sont prédominants dans l'usine UB2 (durant l'été et l'hiver) alors que l'usine UB1 présente un profil fongique plus varié. Les Agaricomycetes dominant en été et les Eurotiomycetes dominant en hiver.

20 genres de moisissures les plus abondantes dans UB1



8 genres de moisissures parmi 20 sont retrouvés dans les deux visites. *Hyphodontia* faisant partie de la classe des Agaricomycetes est la plus abondante en été. Les genres *Penicillium* et *Talaromyces* sont les plus abondants en hiver.

20 genres de moisissures les plus abondantes dans UB2



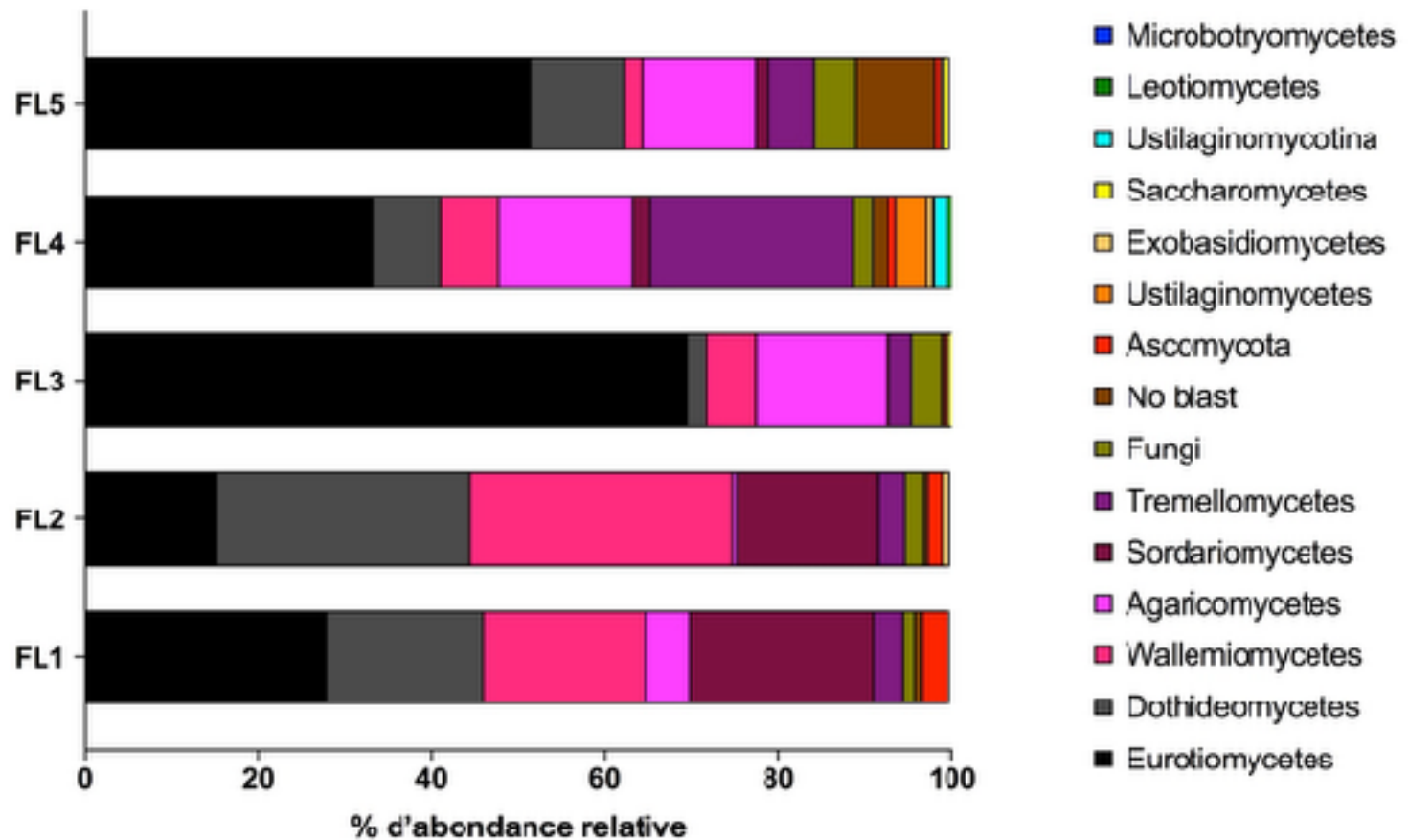
Le genre Penicillium est grandement majoritaire en été et en hiver. Les échantillons d'air récoltés en été sont plus diversifiés que ceux récoltés en hiver.

Fermes laitières



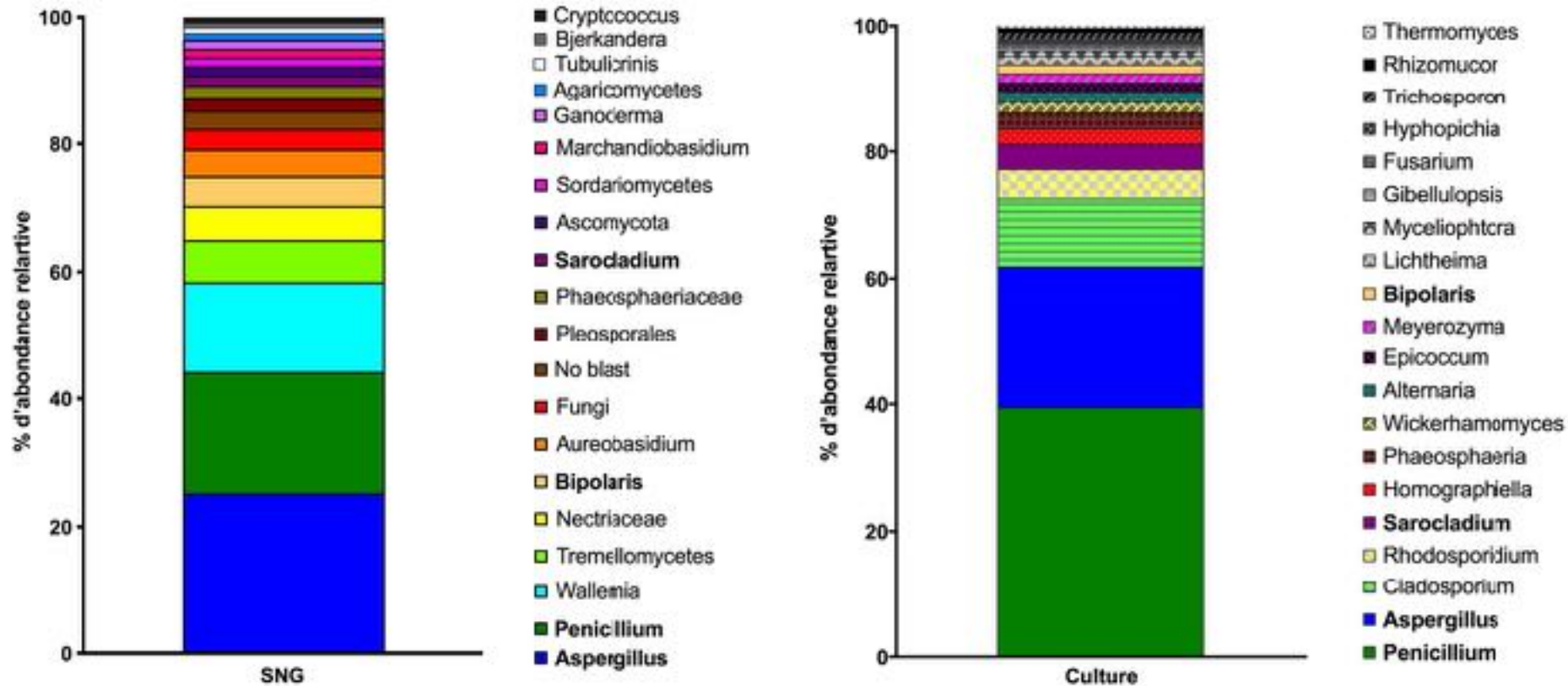
Publication STOTEN : **Hamza Mbareche**, Marc Veillette, Guillaume J. Bilodeau and Caroline Duchaine. (2018). Fungal Aerosols at Dairy Farms using a Molecular and Culture Techniques [Submitted for peer-reviewed publication]

Classes des moisissures identifiées dans l'air des fermes laitières



12 classes identifiées : 6 prédominantes. Chaque ferme présente un profil taxonomique différent

Genres de moisissures identifiés par l'approche SNG et par culture dans l'air des cinq fermes laitières



4 moisissures détectées par les deux méthodes. Parmi les 16 autres moisissures figurant dans la liste des moisissures identifiées par culture, trois n'ont pas été détectées par la méthode SNG.

La complémentarité des méthodes de séquençage et de culture

The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate

Johanna Gutleben , Maryam Chaib De Mares, Jan Dirk van Elsas, Hauke Smidt, Jörg Overmann & Detmer Sipkema 

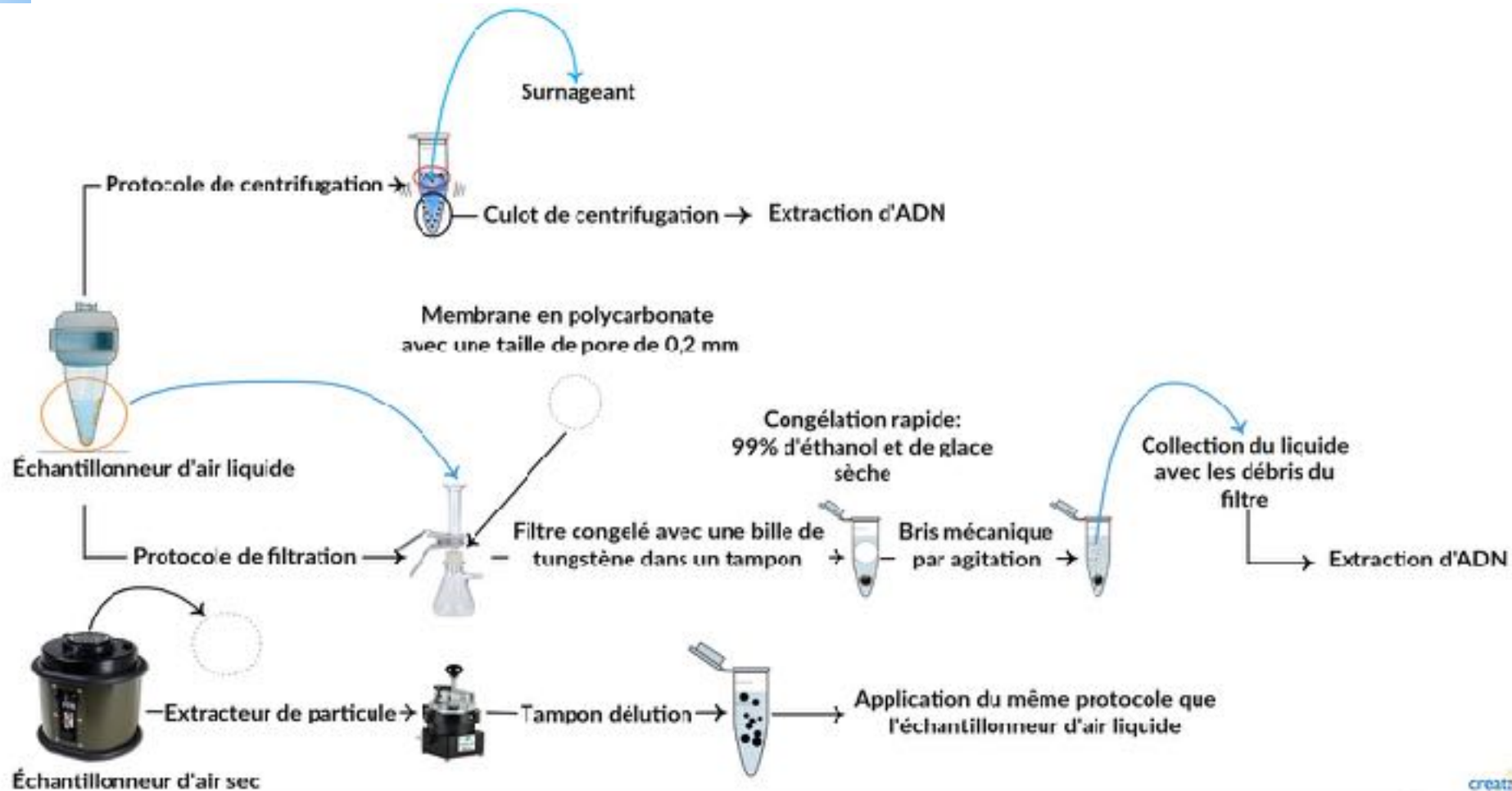
Pages 212-229 | Received 20 Jan 2017, Accepted 16 May 2017, Published online: 31 May 2017

 Download citation  <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332003>

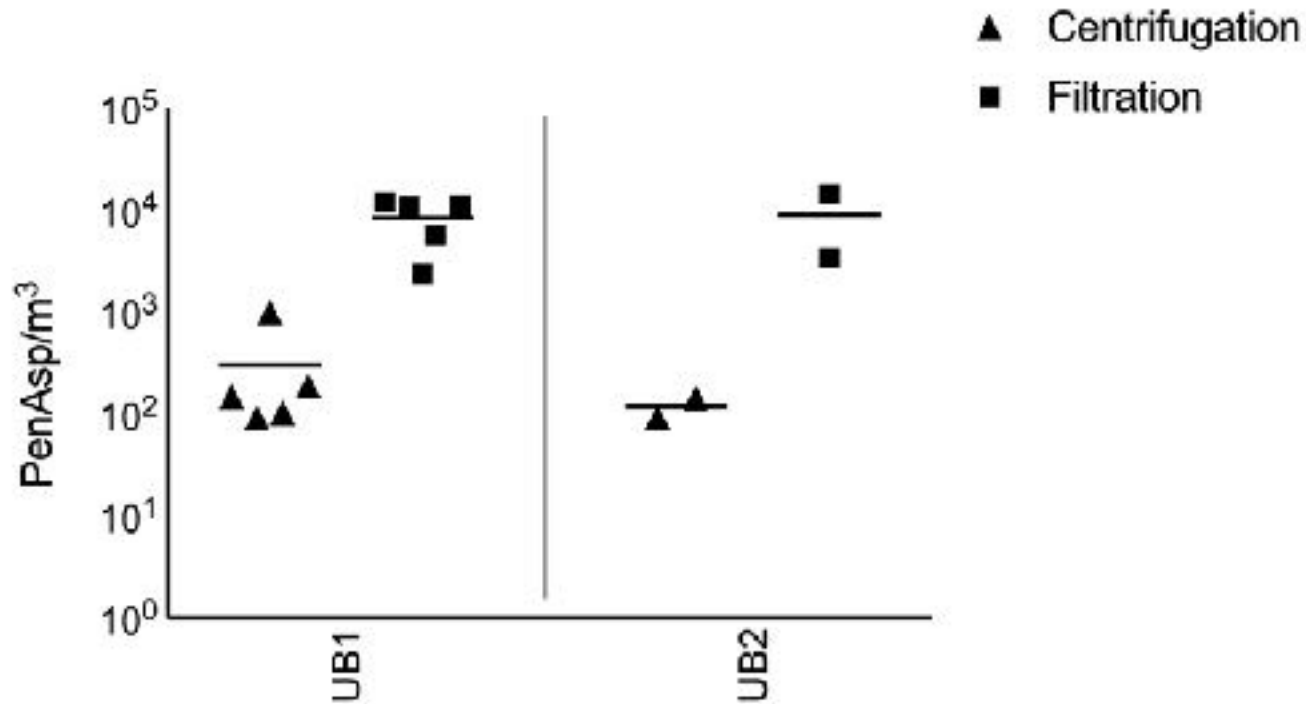


Faciliter les conditions de croissance par les informations apportées par les méthodes de séquençage sur la complexité microbienne de l'environnement

Méthode de concentration des moisissures

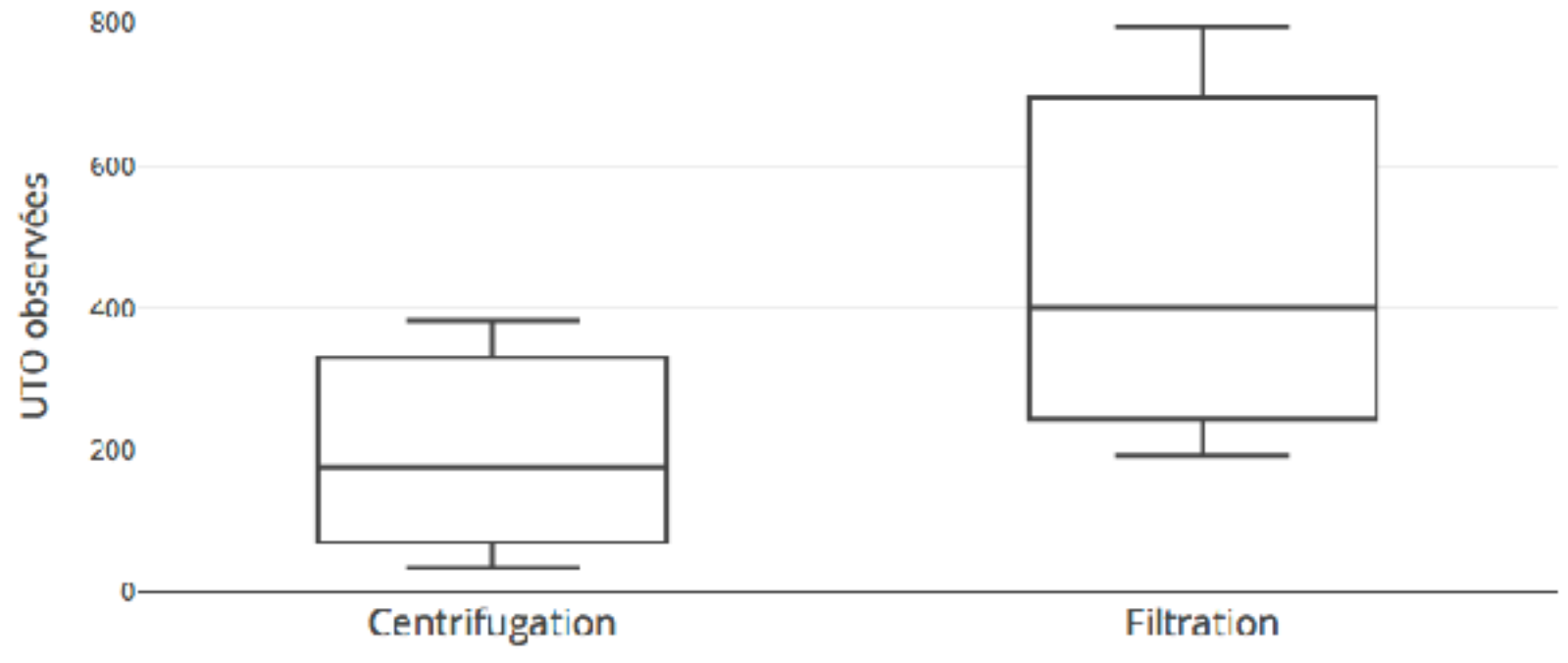


Échantillons d'air des usines de biométhanisation



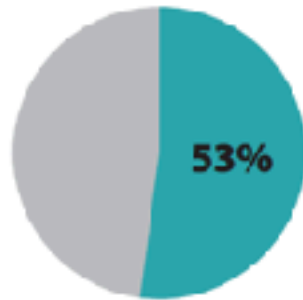
La filtration permet de récupérer 100 à 1000 fois plus de spores de Penicillium et d'Aspergillus.

Effet sur la diversité



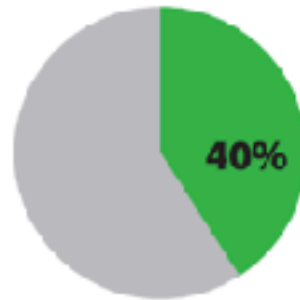
La filtration donne un plus grand nombre d'UTO observées.

Distribution taxonomique des 50 moisissures détectées dans les échantillons centrifugés. Toutes les moisissures ont été identifiées par la filtration



C. Sordariomycetes
F. Valsaceae
F. Stereaceae
Dioszegia
Sitotremastrum
Pluteus
Exidiopsis
Gloeoporus
Artomyces
Peniophora
Resinicium
Tubulicrinis
Eutypella
Bjerkandera
Rhodoturula
Sphaerulina
Hydnopolyporus

(17)



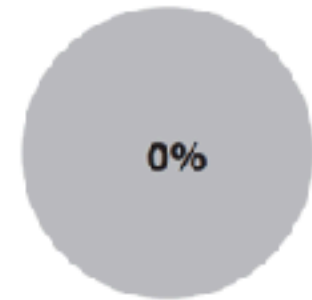
O. Russulales
O. Cantharellales
Bullera
Ganoderma
Antrodia
Phanerochaete
Lentinus
Hyphoderma
Udeniomyces
Itersonilia
Slerotagonospora
Guehomyces
Rhodotorula
Neurospora
Coprinopsis
Lenzites
Psathyrella
Scopuloidea

(18)



O. Cystofilobasidiales
O. Agaricales
O. Eurotiales
F. Microascaceae
Sporobolomyces
Trametes

(6)



F. Pleosporaceae
O. Pleosporales
Epicocum
Davidiella
Alternaria
Botrytis
Fusarium
Cryptococcus
Capnobotryella

(9)

Principaux messages à retenir

- > Perte des moisissures par la méthode de centrifugation
- > Impact sur la concentration et la diversité des échantillons d'air
 - > 50 taxons particulièrement touchés par la perte
- > Nouveau protocole de filtration pour une meilleure récupération de cellules fongiques
 - > Une meilleure évaluation de l'exposition aux moisissures dans les environnements à risque

Principaux messages à retenir

- Le choix de la région du génome influence la description du contenu fongique des échantillons
- Le profil de diversité d'ITS1
 - Plus riche, meilleure distribution et identification de plus de moisissures
- ITS2 semble favoriser la famille des *Saccharomycetales*
- Abondance différentielle entre ITS1 et ITS2
 - Biais d'amplification?

Perspectives

- Appliquer l'approche métagénomique sur les mêmes échantillons
 - Pas d'étape d'amplification
 - Plus coûteux, plus de ressources bio-informatiques
- Continuer les efforts dans la conception de nouvelles amorces spécifiques aux moisissures
- Les avancements dans les technologies de séquençage amélioreront la qualité et la longueur des séquences
 - Utilisation de la région ITS au complet

Retombées de l'étude

- L'application de la méthode d'analyse (filtration et ITS1) dans tous les environnements de travail pouvant avoir un problème de moisissures dans l'air
 - Écoles, hôpitaux, édifices gouvernementaux etc.



26 07 2018

<http://www.bioaerosols.ulaval.ca>

<https://www.facebook.com/carolineduchainebioaerosols/>