



**FIRST STEERING  
COMMITTEE REPORT**  
**D-PhD06-6.1**

Responsible Partner: ANSES



## GENERAL INFORMATION

European Joint Programme full title	Promoting One Health in Europe through joint actions on foodborne zoonoses, antimicrobial resistance and emerging microbiological hazards
European Joint Programme acronym	One Health EJP
Funding	This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreement No 773830.
Grant Agreement	Grant agreement n° 773830
Start Date	01/01/2018
Duration	60 Months

## DOCUMENT MANAGEMENT

Project deliverable	D-PhD06-6.1
Project Acronym	PEMbo
Author	Ciriac CHARLES and Maria-Laura BOSCHIROLI
Other contributors	
Due month of the report	M33
Actual submission month	M35
Type <i>R: Document, report DEC: Websites, patent filings, videos, etc.; OTHER</i>	R, DEC, other <b>Save date:</b> 3-Dec-20
Dissemination level <i>PU: Public (default) CO: confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)</i>	PU
Dissemination <i>Author's suggestion to inform the following possible interested parties.</i>	<p>OHEJP WP 1 <input type="checkbox"/>      OHEJP WP 2 <input type="checkbox"/>      OHEJP WP 3 <input type="checkbox"/></p> <p>OHEJP WP 4 <input type="checkbox"/>      OHEJP WP 5 <input type="checkbox"/>      OHEJP WP 6 <input type="checkbox"/></p> <p>OHEJP WP 7 <input checked="" type="checkbox"/>      Project Management Team <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Communication Team <input type="checkbox"/>      Scientific Steering Board <input type="checkbox"/></p> <p>National Stakeholders/Program Owners Committee <input type="checkbox"/></p> <p>EFSA <input type="checkbox"/>    ECDC <input type="checkbox"/>    EEA <input type="checkbox"/>    EMA <input type="checkbox"/>    FAO <input type="checkbox"/>    WHO-EU <input type="checkbox"/>    OIE <input type="checkbox"/></p> <p>Other international stakeholder(s): .....</p> <p>Social Media: .....</p> <p><b>Other recipient(s):</b> .....</p>



# FIRST STEERING COMMITTEE REPORT

## ENGLISH VERSION

Name and surname of the student: Ciriac CHARLES

Date of committee meeting: 14/09/2020

Committee composition (present or video conferencing) : BOSCHIROLI Maria-Laura (present), BIET Franck (video conferencing), MICHELET Lorraine (present), DELANNOY Sabine (present), MOULIN Laurent (present) et SOUGAKOFF Wladimir (present).

ABIES referent member : CAIGNARD Gregory (present).

### **Status of progress (appropriation of the subject (in the first year), main results, respect of the provisional schedule) (1/2 page maximum)**

The appropriation of the subject is good. The doctoral student gave a presentation on bovine tuberculosis in France, the situation and evolution over time of *Mycobacterium bovis*. A focus was made on the presence of persistent genotypes and the interest of being able to discriminate in detail and better understand the transmission links of *Mycobacterium bovis* between the various components of the multi-host system domestic fauna-wild fauna-environment where the disease is still present.

The doctoral student then presented the three main points of his thesis. The first major point aims to obtain new reference genomes, the second point aims to compare the new reference genomes in order to highlight genomic specific events of the different clonal groups and then to compare these genomes with the 87 already available genomes. The last point will focus on the analysis of phenotypic profiles. This part will follow the results obtained in the last point. A targeted genomic study to search for candidate proteins playing a role in the biosynthesis of the envelope and the excreted antigens may be considered. Ciriac spoke more specifically about each part of his project, starting with the part concerning obtaining new reference genomes.

Ten strains were selected in order to obtain a reference strain for each clonal group identified in France. These reference strains are representative of the French strains' genetic diversity in the ten last years. These strains were already available in the NRL collection. The strains were cloned and growth to obtain a good DNA concentration of one genotype for each culture. The DNA extraction for long read sequencing has been problematic and is still being improved to have sufficient DNA of good quality. The current protocol using mechanical lysis with glass beads and enzymatic lysis with lysozyme and proteinase K (with phenol chloroform extraction) had been carried out. A good quantity of DNA had been obtained (between 9 and 19 µg of 'DNA). Unfortunately, the quality was not good enough because the DNA was degraded. The student wants to try this protocol without the mechanical lysis in the next few weeks.

The pipeline that will be used once sequencing has been presented.

The comparison of the reference genomes can only be done after obtaining the sequencing data. However, Ciriac includes genomes from 87 strains of *M.bovis* representative of French genetic diversity and has carried out a study on the presence and distribution of the insertion sequence 6110 (IS6110). This sequence is a highly evolutionary marker with a probable important role in the genetic plasticity of mycobacteria. It is accepted that *M. bovis* has one or few copies of this sequence, but some evidence showed that strains could have multiple numbers of IS6110.

More than a third of the 87 genomes are multi-copy, including 22 with more than 3 copies and 6 with more than 10. It was highlighted that the most multi-copy strains were responsible for the greatest



number of outbreaks in France. These groups are SB0120 Dordogne Haute Vienne, SB0120 Côte d'Or and members of the F4 family.

Another study was focused on strains of the SB0120 type from Côte d'Or and SB0120 from Dordogne Haute Vienne (which have high concentration of IS6110) to see if the number of IS6110 copies and their locations over time. The analysis of 158 SB0120 genomes from Côte d'Or and 310 genomes from Dordogne-Haute Vienne has shown that the number of copies of IS6110 is stable over time and that certain locations in the genome are constant for each genotype. The student then focused on a group of *M. bovis* called the F9 family which has the particularity of having a truncated IS6110. This result was found with *in silico* analyses and then confirmed by Sanger sequencing.

The perspective of these first results are to finish the DNA extraction, to do the sequencing and assembly of the reference genomes. A focus will also be made to study IS6110 in members of the F4 family like the previous work on the SB0120 Côte d'Or genomes and SB0120 Dordogne Haute Vienne genomes. Confirmation of the disruption or possibly overexpressed genes will also be carried out with a comparison of literature knowledge on insertion sequence in *M. bovis* and in *Mycobacterium tuberculosis*.

The first axis of this project has been delayed due to the protocol and due to containment. It is estimated that this delay could be made up because results from the second axis are already obtained and an appropriation of bioinformatics tools (at least for Illumina sequencing) has already started. The Thesis is therefore ahead in this axis.

In terms of training, the student has already completed a large part of the hours requested by his doctoral school. There would be only 41.5 hours (out of the 160 requested) after the ABIES doctoral day has been completed. The thesis is therefore also well advanced on this point although care must be taken to carry out the ethics training.

For the dissemination of results, the student presented his thesis subject and his first results to his unit (UZB Bacterial Zoonoses Unit) last March. He also participated in a congress organized by the OHEJP where he participated in a competition to present his thesis subject in English and in less than 3 minutes (3MT). The student presented also a poster "Occurrence of variable insertion sites and copy numbers of IS6110 in genomes of *Mycobacterium bovis* field strains reveal high disparity among different genetic families".

The student was also selected to present a poster at another congress named "Mbovis" but which had to be postponed until next year due to Covid-19 lock down.

The student also started to organise his first results on the IS6110 study for publishing his first scientific article on the subject.

### **Valorisation of results (articles, participation in conferences) (a few lines):**

- Presentation to the UZB of his thesis subject and these first results
- 3MT challenge at the OHEJPASM2020 conference
- Poster at the OHEJPASM2020
- Poster at the Mbovis confress (selected but the congress move to 2021)

### **Doctoral student's professional project (a few lines)**

Currently, Ciriac's professional plan would be to obtain a position as a research engineer or as a project manager. He would like to be able to create and carry out projects and continue working in the world of research. He is also not against the idea of working in a start-up company. Although his preference for the location of his next position is in France, he does not rule out being able to spend a few years in



another country. His professional project therefore needs to be matured, which he will do during his thesis.

## **Has the doctoral student received training in ethics and scientific integrity?**

No

### **Opinions and recommendations:**

+ The external members of the thesis committee give an opinion (favorable / unfavorable \*) to the re-registration for the thesis.

→ Favorable

+ They make the following recommendations for the rest of the thesis:

-Test the CTAB or magnetic beads extraction if the extraction protocol does not yield sufficient amounts of DNA.

-Do not hesitate to assess the quality of the DNA at IdentityPath (Anses) before sending the DNA for sequencing.

-Do not forget to follow ethics training. Ask if the communication training in French or English can be taken into account during the training "ADOC - Building and activating your network" already carried out.

-Test other assembly tools.

- Practice assembling PacBio sequencing with the data already available.

+ The thesis committee notes specific points of vigilance on the rest of the thesis (Yes / No)

Be careful to keep the main objectives of the thesis and not to give too much importance to the part "IS6110".



Names, surnames, signatures of external members of the thesis committee and of the ABIES referent

DELANNOY Sabine :

MOULIN Laurent :

L. MOULIN -

SOUGAKOFF Wladimir :

W. Sougakoff

CAIGNARD Gregory :

\* Keep only the useful mention



# RAPPORT DE COMITE DE SUIVI INDIVIDUEL

## ECOLE DOCTORALE ABIES

### VERSION FRANÇAISE

Nom et prénom du doctorant : CHARLES Ciriac

Date de la réunion du comité : 14/09/2020

Composition du comité (préciser si les membres étaient effectivement présents) : BOSCHIROLI Maria-Laura (présente), BIET Franck (en visio), MICHELET Lorraine (présente), DELANNOY Sabine (présente), MOULIN Laurent (présent) et SOUGAKOFF Wladimir (présent).

Référent ABIES : CAIGNARD Gregory (présent).

#### **Etat d'avancement (appropriation du sujet (en première année), principaux résultats, respect du calendrier prévisionnel) (1/2 page maximum)**

L'appropriation du sujet est bonne. Le doctorant a fait une présentation sur la situation de la tuberculose bovine en France et son évolution au cours du temps ainsi que de son agent pathogène, *Mycobacterium bovis*. Un focus a été fait sur la présence des génotypes persistants et de l'intérêt de pouvoir discriminer de façon détaillée pour mieux comprendre les liens de transmission de *Mycobacterium bovis* entre les divers composants du système multi hôte faune domestique-faune sauvage-environnement où la maladie sévit à l'heure actuelle.

Le doctorant a ensuite présenté les trois grands axes de sa thèse. Le premier grand axe a pour but d'obtenir de nouveaux génomes de références, le deuxième a pour but de rechercher de comparer les nouveaux génomes de référence afin de mettre en évidence des événements génomiques spécifiques aux différents groupes clonaux puis de comparer ces génomes aux 87 génomes déjà disponibles. Le dernier axe s'intéressera à l'analyse des profils phénotypiques. Cette partie découlera des résultats obtenus dans le deuxième axe. Une étude génomique ciblée pour rechercher des protéines candidates jouant un rôle dans la biosynthèse de l'enveloppe et des antigènes excrétés pourra être envisagée. Ciriac a parlé plus précisément de chaque partie de son projet en commençant par celle concernant le séquençage de nouveaux génomes de référence.

Dix souches ont été sélectionnées afin d'obtenir une souche de référence pour chaque groupe clonal identifié en France et notamment des souches de référence représentatives des souches responsables des foyers de tuberculose de ces dernières années. Ces souches étaient déjà disponibles dans la collection du LNR, elles ont été remises en culture, clonées puis cultivées. L'extraction d'ADN pour le séquençage « long read » a posé des problèmes et elle est toujours en voie d'amélioration pour avoir une quantité d'ADN suffisante de bonne qualité. Le protocole actuel utilisant une lyse mécanique avec des billes de verres et une lyse enzymatique avec du lysozyme et de la protéinase K (avec une extraction phenol chloroforme) avait été réalisé et une bonne quantité d'ADN avait été obtenu (entre 9 et 19µg d'ADN). Malheureusement, la qualité n'a pas été assez bonne car l'ADN était dégradé. L'étudiant veut essayer dans les prochaines semaines de refaire ce protocole sans la lyse mécanique. Le pipeline qui sera utilisé une fois le séquençage fait a ensuite été présenté.

La comparaison des génomes de référence ne pourra se faire qu'à l'obtention des données de séquençage. Cependant, Ciriac dispose des génomes de 87 souches de *M. bovis* représentatifs de la diversité génotypique française sur lesquelles il a réalisé une étude sur la présence et distribution de la séquence d'insertion 6110 (IS6110). Cette séquence est un marqueur hautement évolutif et a un rôle important dans la plasticité génétique de la mycobactérie. Il est admis que *M. bovis* a une copie ou peu



de copie de cette séquence mais certaines pistes montraient que des souches pourraient avoir un nombre multiple d'IS6110.

Plus d'un tiers des 87 génomes sont multi copies dont 22 avec plus de 3 copies et 6 avec plus de 10. Il a été souligné que les souches les plus multi copies étaient celles responsables du plus grand nombre de foyers en France. Ces groupes se nomment : SB0120 Dordogne Haute Vienne, SB0120 Côte d'Or et les membres de la famille F4.

Il a ensuite été faite une autre étude, se focalisant sur SB0120 de Côte d'Or et SB0120 de Dordogne Haute Vienne (qui ont de forte concentration en IS6110) pour voir si le nombre de copies d'IS6110 et leurs localisations variaient dans le temps. L'analyse de 158 génomes de SB0120 de Côte d'Or et de 310 génomes de Dordogne-Haute Vienne a permis de montre que le nombre de copies d'IS6110 est stable dans le temps et que certaines localisations dans le génome sont constantes pour chaque génotype.

L'étudiant a ensuite fait un focus sur un groupe de *M bovis* appelé famille F9 qui a la particularité d'avoir son IS6110 tronqué. Ce résultat a été trouvé *in silico* puis confirmé par séquençage Sanger.

Les perspectives à partir de ces premiers résultats sont de finir l'extraction d'ADN, de faire le séquençage et l'assemblage des génomes de référence. Un focus sera aussi réalisé pour étudier les IS6110 dans les membres de la famille F4 comme il a pu être fait pour les génomes SB0120 de Côte d'Or et SB0120 de Dordogne Haute Vienne. Une confirmation des gènes coupés ou possiblement surexprimés sera également réalisée avec une comparaison de ce qui est déjà connu dans la littérature afin d'évaluer la connaissance des insertions trouvées par rapport à celle déjà décrite chez *M. bovis* et *Mycobacterium tuberculosis*.

Le premier grand axe de ce projet a pris du retard, dû au problème d'obtention de quantité suffisante d'ADN et dû également au confinement. Il est estimé que ce retard pourra néanmoins être rattrapé car des résultats du deuxième axe sont déjà obtenus et qu'une appropriation des outils bio-informatiques (au moins pour le séquençage Illumina) a déjà commencé. La thèse est donc en avance sur cet axe.

Au niveau des formations, l'étudiant a déjà effectué une grande partie des heures qu'il doit à son école doctorale. Il resterait seulement 41,5 heures (sur les 160 demandées) après que la journée doctorale d'ABIES sera réalisée. La thèse est donc en avance également sur ce point-là même s'il faudra faire attention de réaliser la formation d'éthique.

Au niveau de la dissémination des résultats, l'étudiant a présenté son sujet de thèse et ses premiers résultats à son unité (UZB Unité des Zoonoses Bactériennes) en mars dernier. Il a également participé à un congrès organisé par l'OHEJP où il a participé à un concours pour but de présenter son sujet de thèse en anglais et en moins de 3 minutes (3 minutes thesis) et présenté un poster « Occurrence of variable insertion sites and copy numbers of IS6110 in genomes of *Mycobacterium bovis* field strains reveal high disparity among different genetic families ».

L'étudiant a également été sélectionné pour présenter un poster à un autre congrès « *Mbovis* » mais qui a dû être reporté à l'année prochaine, dû au confinement.

L'étudiant a également commencé à réfléchir comment ces premiers résultats sur les IS6110 pourraient être valorisés avec l'écriture d'un article.

### **Valorisation (articles, participations à des congrès) (quelques lignes) :**

- Présentation à l'UZB de son sujet de thèse et ces premiers résultats
- 3MT challenge à la conférence OHEJPASM2020
- Poster à OHEJPASM2020
- Poster *Mbovis* (sélectionné mais congrès déplacé à 2021)

### **Projet professionnel du doctorant (quelques lignes)**





A l'heure actuelle le projet professionnel de Ciriac serait d'obtenir un poste en tant qu'ingénieur de recherche ou en tant que chargé de projet. Il voudrait pouvoir créer et porter des projets et continuer de travailler dans le monde de la recherche. L'idée de travailler dans une start up le tente également. Même si sa préférence au niveau de la localisation de son prochain poste se porte vers la France, il n'exclut pas le fait de pouvoir passer quelques années dans un autre pays. Son projet professionnel demande donc à être mûré ce qu'il fera durant sa thèse.

## **Le doctorant a-t-il suivi une formation à l'éthique et à l'intégrité scientifique ?**

Non

### **Avis et recommandations :**

+ Les membres extérieurs du comité de thèse donnent un avis (favorable/défavorable\*) à la réinscription en thèse.

→Favorable

+ Ils formulent les recommandations suivantes pour la suite de la thèse :

-Tester l'extraction CTAB ou billes magnétiques si le protocole d'extraction ne donne pas des quantités d'ADN suffisantes.

-Ne pas hésiter à évaluer la qualité de l'ADN à IdentityPath avant l'envoi des ADN.

-Ne pas oublier la formation d'éthique. Demander si la formation de communication en français ou anglais peut être prise en compte lors de la formation « ADOC - Construire et activer son réseau » déjà effectué.

-Tester d'autres outils d'assemblage.

-S'exercer à assembler les séquençage PacBio avec les données déjà disponibles.

+ Le comité de thèse note des points de vigilance particuliers sur la suite de la thèse (Oui / Non)

Attention à garder les objectifs principaux de la thèse et de ne pas prêter une trop grande importance à la partie « IS6110 ».



Noms, prénoms, signatures des membres extérieurs du comité de thèse et du référent ABIES

DELANNOY Sabine :

MOULIN Laurent :

L. MOULIN -

SOUGAKOFF Wladimir :

CAIGNARD Gregory :

\* Ne conserver que la mention utile