




# Le dual RNA-Seq ou la transcriptomique des relations inter-organismes

Claire Hoede

# Sommaire

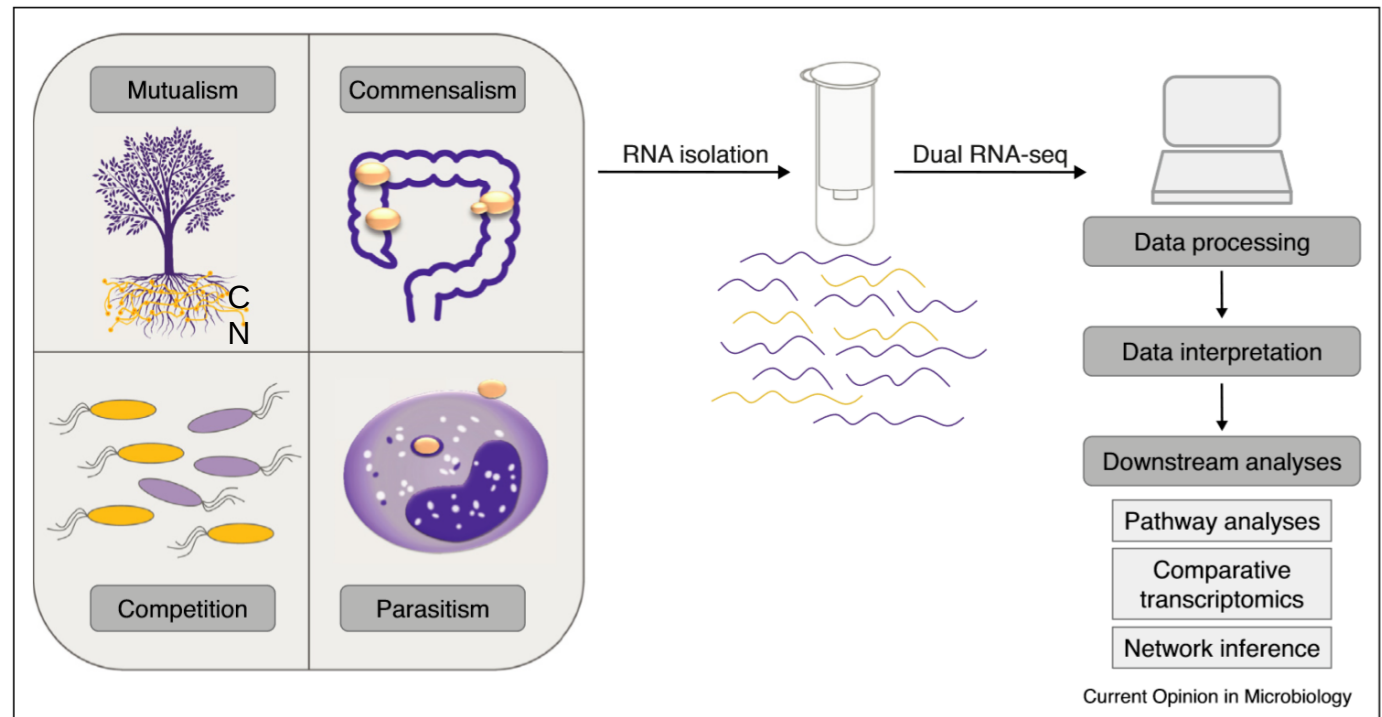
- **Qu'est-ce que le dual RNA-Seq ?**
- **A quoi ça sert ?**
- **Principales publications**
- **Workflow type**
- **Challenges et les enjeux**
- **Exemple d'un projet en cours (Salhostrop)**
  - **Projet européen coordonné par Ohad Gal-Mor (Université de Tel-Aviv)**
  - **Pour la bioinfo : Hélène Chiapello, Charles Coluzzi, Christine Gaspin, Claire Hoede, Ludovic Mallet, Annick Moisan et Thomas Schiex.**
  - **Pour le séquençage : Olivier Bouchez, Adeline Chaubet**

# Dual RNA-Seq ?

- **Séquencer l'ARN de deux organismes en même temps**
-  **étudier l'expression des gènes de deux organismes qui interagissent**
- **Aucun besoin de séparer physiquement les cellules ou les ARNs des deux organismes**
- **Nécessite des protocoles dédiés que ce soit au niveau expérimental ou bioinfo/biostat**

# Pourquoi ?

- Les organismes interagissent constamment les uns avec les autres
  - via des récepteurs
  - peut déclencher des réseaux de régulations complexes



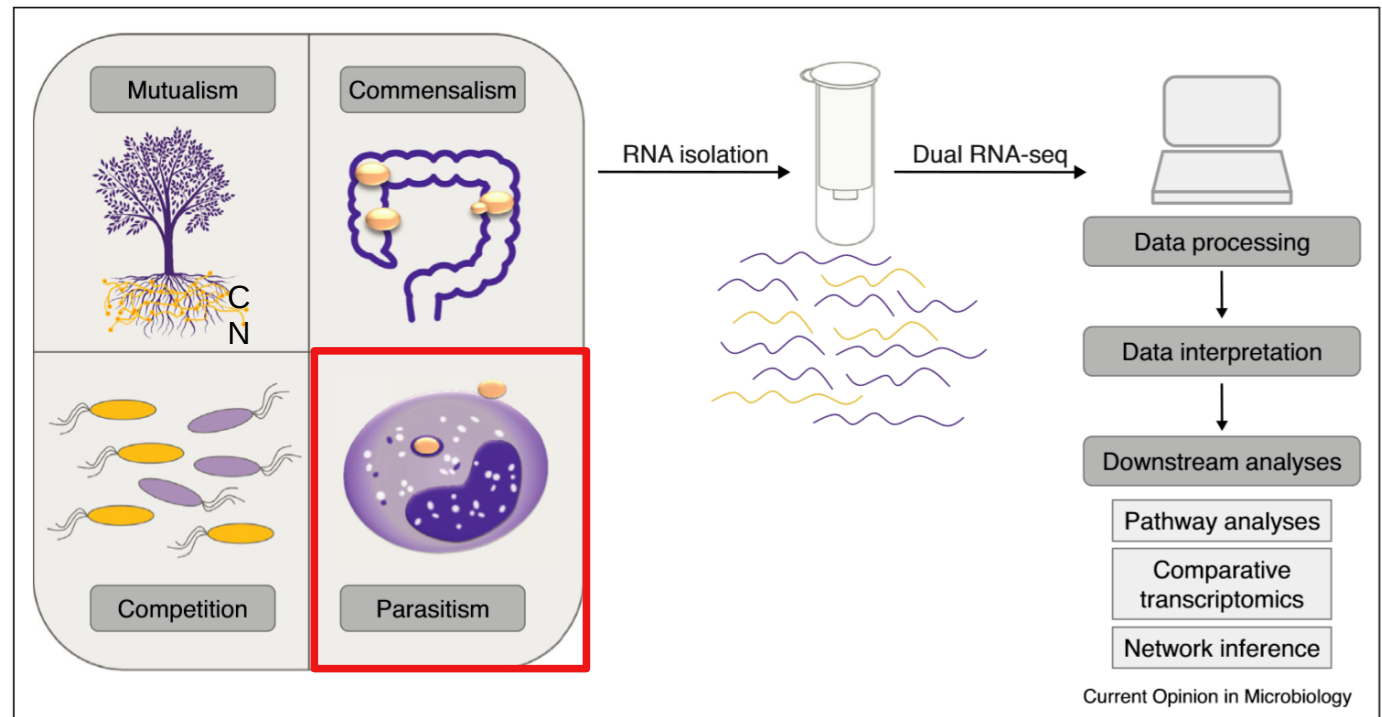
Application of dual RNA-seq for different kinds of interspecies interactions. RNA of interacting species is isolated and sequenced without physical separation. Subsequently raw reads are separated *in silico*.

Wolf et al., 2017

# Pourquoi ?

- Les organismes interagissent constamment les uns avec les autres
  - via des récepteurs
  - peut déclencher des réseaux de régulations complexes

La plupart des études s'intéressent à la pathogénicité et à la dynamique des interactions hôte – pathogènes



Application of dual RNA-seq for different kinds of interspecies interactions. RNA of interacting species is isolated and sequenced without physical separation. Subsequently raw reads are separated *in silico*.

**nature**  
REVIEWS **MICROBIOLOGY**

Review Article | Published: 14 August 2012

## Dual RNA-seq of pathogen and host

Alexander J. Westermann, Stanislaw A. Gorski & Jörg Vogel 

*Nature Reviews Microbiology* **10**, 618–630 (2012) | [Download Citation](#) ↓

**nature**  
International journal of science

Article | Published: 20 January 2016

## Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host–pathogen interactions

Alexander J. Westermann, Konrad U. Förstner, Fabian Amman, Lars Barquist, Yanjie Chao, Leon N. Schulte, Lydia Müller, Richard Reinhardt, Peter F. Stadler & Jörg Vogel 

*Nature* **529**, 496–501 (28 January 2016) | [Download Citation](#) ↓

 **PLOS** | PATHOGENS

REVIEW

## Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq

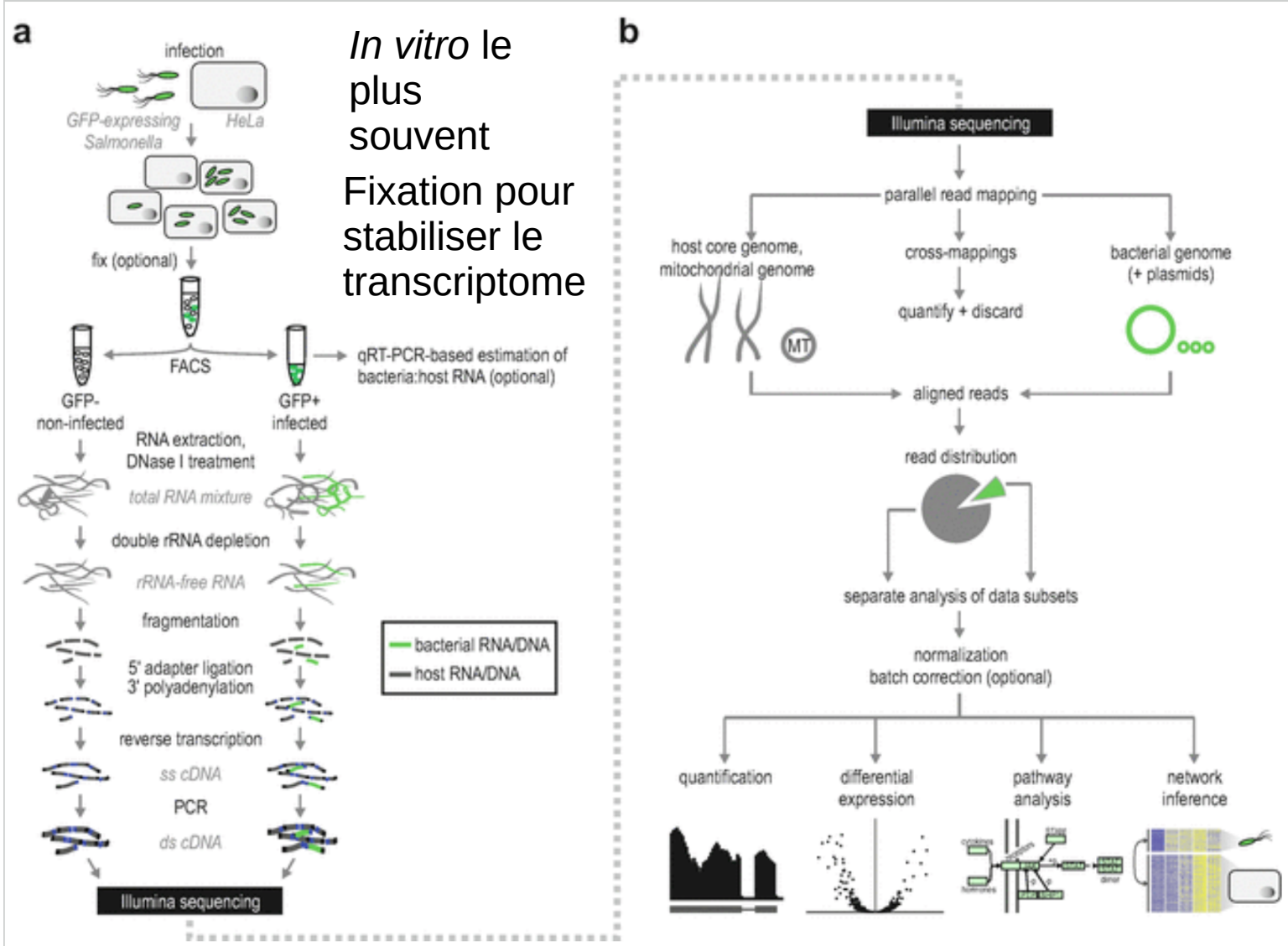
Alexander J. Westermann<sup>1</sup>\*, Lars Barquist<sup>1</sup>\*, Jörg Vogel<sup>1,2\*</sup>

**1** RNA Biology Group, Institute for Molecular Infection Biology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, **2** Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research (HIRI), Würzburg, Germany

\* These authors contributed equally to this work.  
\* joerg.vogel@uni-wuerzburg.de

# Le workflow type

Experimental workflow for the Dual RNA-seq approach here described



*In vitro* le plus souvent  
 Fixation pour stabiliser le transcriptome

Autre possibilité :  
 utiliser un génome de référence =  
 concaténation des deux génomes  
 ==> multimapping ?

(a) Data generation. (b) Data analysis.



- **Génération des données**
  - **Design expérimental** : le plus proche possible de ce qui se passe *in vivo*, mais permettre une extraction d'ARN en grande quantité avec un minimum de dégradation.
  - Isolation de l'ARN des deux organismes : les membranes cellulaires, **dégradation des ARN, quantité d'ARN** par cellules et au total par organisme (objectif : euk : 10-20 M reads sans rRNA, prok : 3-5 M reads sans rRNA)
  - **Ribodéplétion** (les ARN bactériens n'ayant normalement pas de queue polyA)





- **Analyse des données**
  - Lecture multimappées entre organismes (STAR)
  - Filtrage des rRNA (SortmeRNA ou via le mapping)
  - **Quantité de matériel** très différente entre échantillons
  - **Normalisation soignée** (spike-ins, tester les corrections des effets batchs (non-souhaités, liés à la manip, ex : RUVSeq, SVASeq) etc.)
  - Si série temporelle : en tenir compte lors de l'analyse des DEGs

# Les enjeux

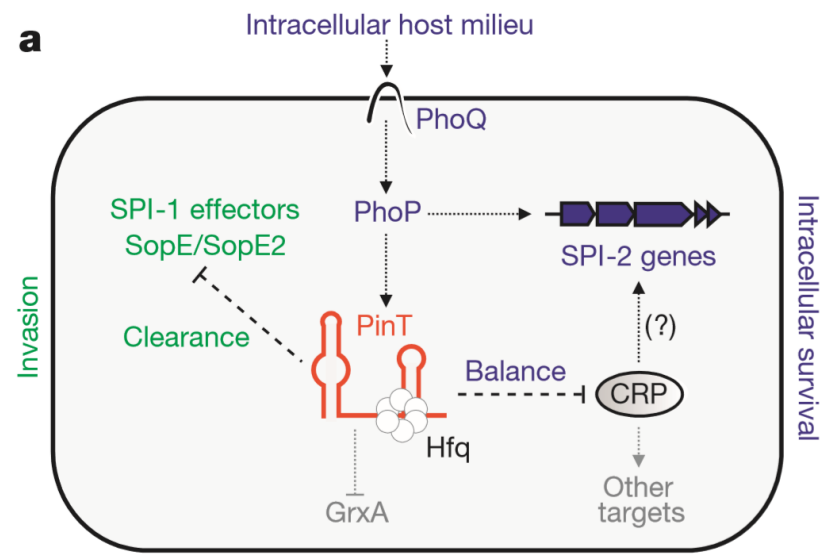


- **Donner du sens aux données**
  - Annotation fonctionnelle
  - Voies métaboliques (Kegg, metaCyc...)
  - Réseaux d'interactions (connus ou inférés à partir de la co-expression des gènes), les séries temporelles peuvent permettre de proposer des relations causales potentielles (NetGenerator, Schulze *et al* ...)
  - Analyser aussi les ARN non codants

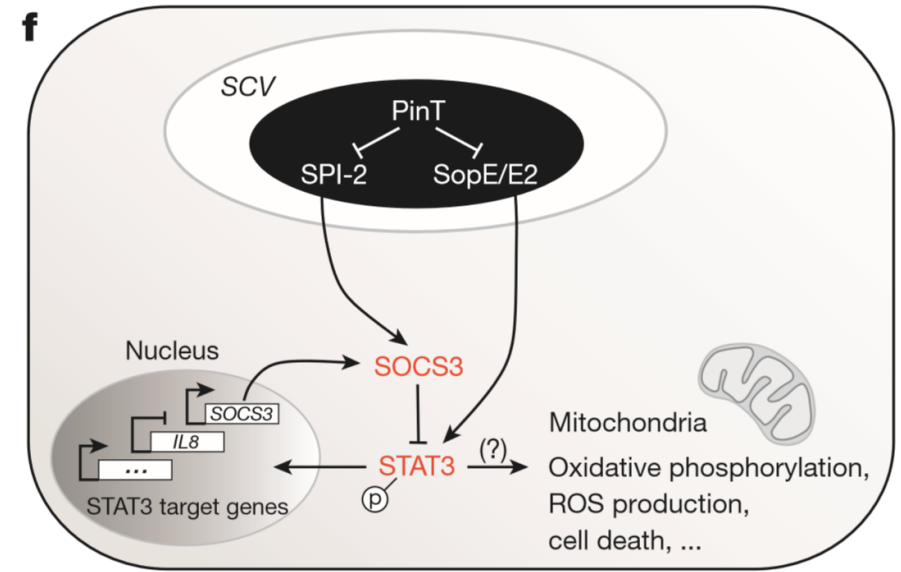
# PinT

- Westermann *et al*, Nature en 2016

- PinT ARNnc de 80 nt dépendant de PhoP/Q (régulateurs impliqués dans la virulence et la survie dans la cellule hôte)



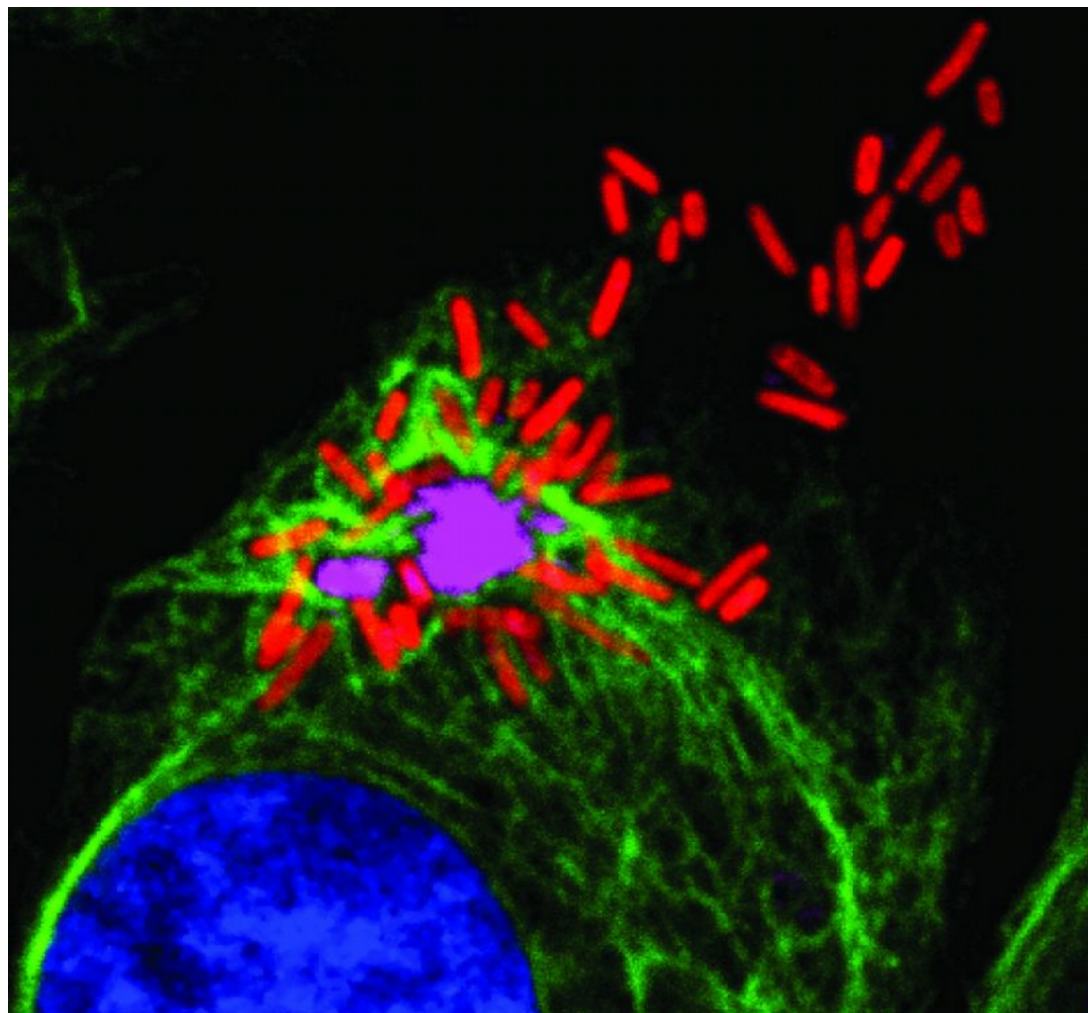
**Modèle de régulation de gènes de virulence de salmonelle par pinT**



**Modèle de l'effet de pinT sur le transcriptome de l'hôte. STAT3 clef dans la voie de signalisation JAK-STAT impliquée dans de nombreux processus cellulaires.**

- « Understanding the Human-Restricted Host Tropism of Typhoidal Salmonella »
- 2016-2019
- 6 équipes partenaires

Cell infected by *S. Typhimurium*. Salmonella bacteria in red, membrane aggregates in purple, vimentin surrounding aggresome in green, and nucleus in blue. F. García del Portillo, CNB-CSIC



# There are two types of salmonella strains: human obligatory and opportunist

S. Typhi, S. Paratyphi A, S. Paratyphi B et S. Paratyphi C

Dans les pays en développement

Infect only

Incubation > 1 s  
Symptomes long  
Inflammation systémique



All other serotypes

Infect

Incubation courte (<1j)  
Gastroentérite  
Inflammation localisée

and



SaAB

# There are two types of salmonella strains: human obligatory and opportunist

S. Typhi, S. Paratyphi

**Typhoidal strains**

S. Paratyphi C

Dans les pays en développement

Infect only

Incubation > 1 s  
Symptomes long  
Inflammation systémique



All other  
**Non-Typhoidal strains**

Infect

Incubation courte (<1j)  
Gastroentérite  
Inflammation localisée



Peu de variabilité génomique

and



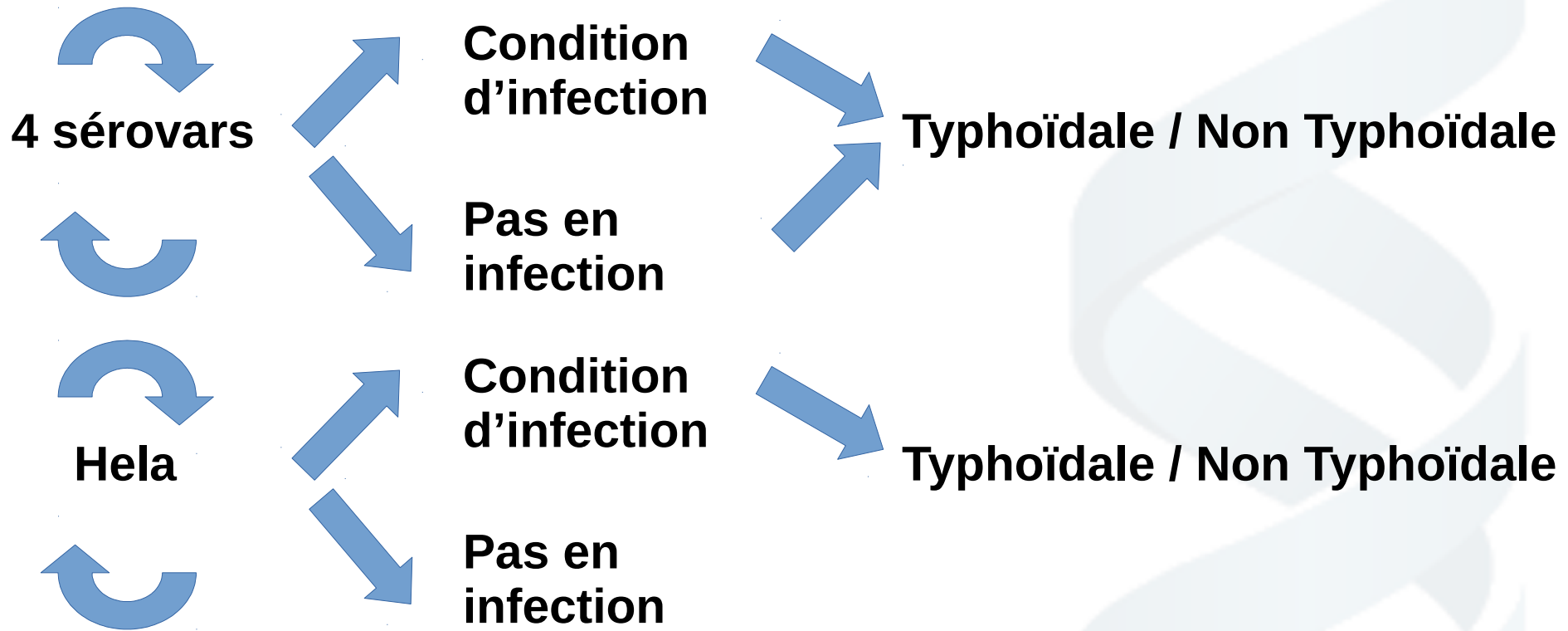
**SaAB**

# Plan d'expérience

- **1 lignée cellulaire Hela**
- **4 sérovars seuls**
  - 2 Salmonella typhoidales (S. typhi et paratyphi)
  - 2 Salmonella non typhoidales (S. enteritidis et typhimurium)
- **4 dual : Hela + bactéries**
  - Mêmes serovars que précédemment
- **3 réplicats pour chacun soit 27 échantillons**

# Questions posées

- Quels sont les gènes différentiellement exprimés entre :



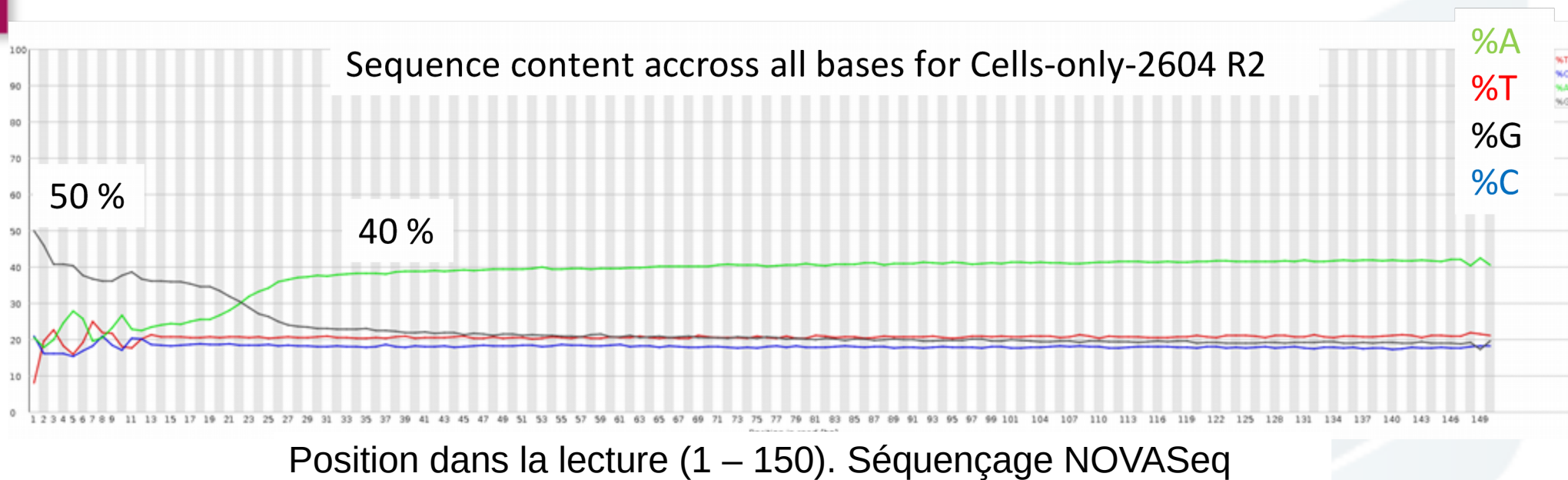


- Hétérogénéité de l'efficacité de la ribodeplétion

Sample	%rRNA
Cells-only-0905	41.6
Cells-only-2604	14.2
Enteritidis -bac-0905	4.3
Enteritidis -bac-1105	53.1
Enteritidis -bac-1805	38.8
Enteritidis -inf-Hela-0905	1.2
Enteritidis -inf-Hela-1805	65.8
Enteritidis -inf-Hela-2604	1.7
Paratyphi-bac-0905	1.9
Paratyphi-bac-1105	10.9
Paratyphi-bac-1805	80.2
Paratyphi-inf-Hela-251216-2	4.98
Paratyphi-inf-Hela-2604	25.28

Sample	%rRNA
Typhi12013019	1.0
Typhi-bac-0905	3.83
Typhi-bac-1105	8.0
Typhi-bac-2606	95.9
Typhi-inf-Hela-0905	1.8
Typhi-inf-Hela-1-1805	2.1
Typhi-inf-Hela-2-1805	70.8
Typhimurium-bac-0905	46.3
Typhimurium-bac-1105	81.5
Typhimurium-bac-1805	29.8
Typhimurium-inf-Hela-0905	2.4
Typhimurium-inf-Hela-2604	14.8
Typhimurium 14028S in human HeLa cells	0.1

# Dégradation des ARNs



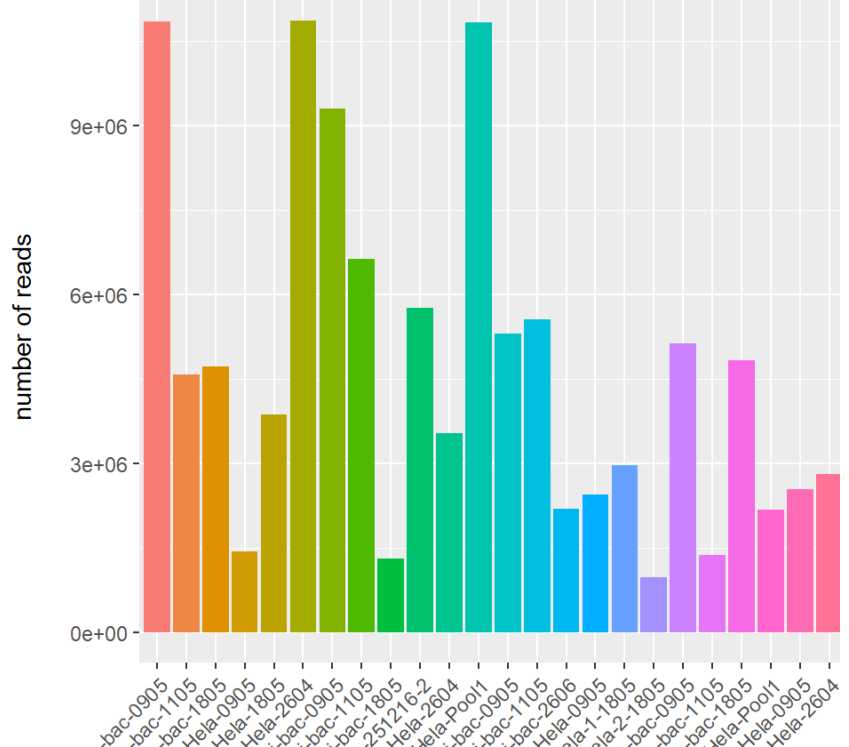
# Quantité de séquences

- **Forte hétérogénéité de la quantité de lectures bactériennes utiles (entre 0,65 % et 5,5%)**
  - **Stratégie de séquençage en 3 phases :**
    - **1 run pilote**
    - **Faire un second séquençage très peu profond (1 lane)**
    - **Filtrer les ARNr**
    - **Faire le mapping des autres ARNs**
    - **En déduire la proportion de lectures bactériennes utiles**
    - **Si besoin : faire la règle de trois pour obtenir au moins 2 M de lectures utiles**
    - **Reséquencer en fonction**

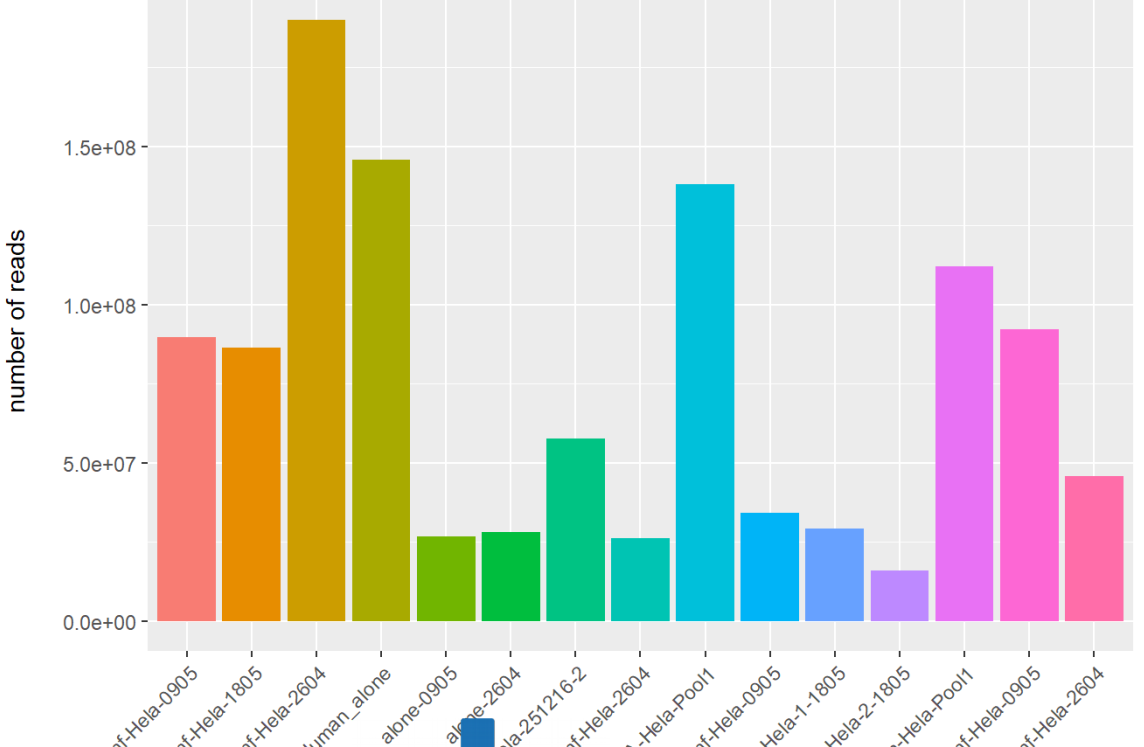
# Quantité de séquences

- Quantification des lectures utiles pour l'analyse d'expressions différentielles

lectures bactériennes assignées



lectures humaines assignées



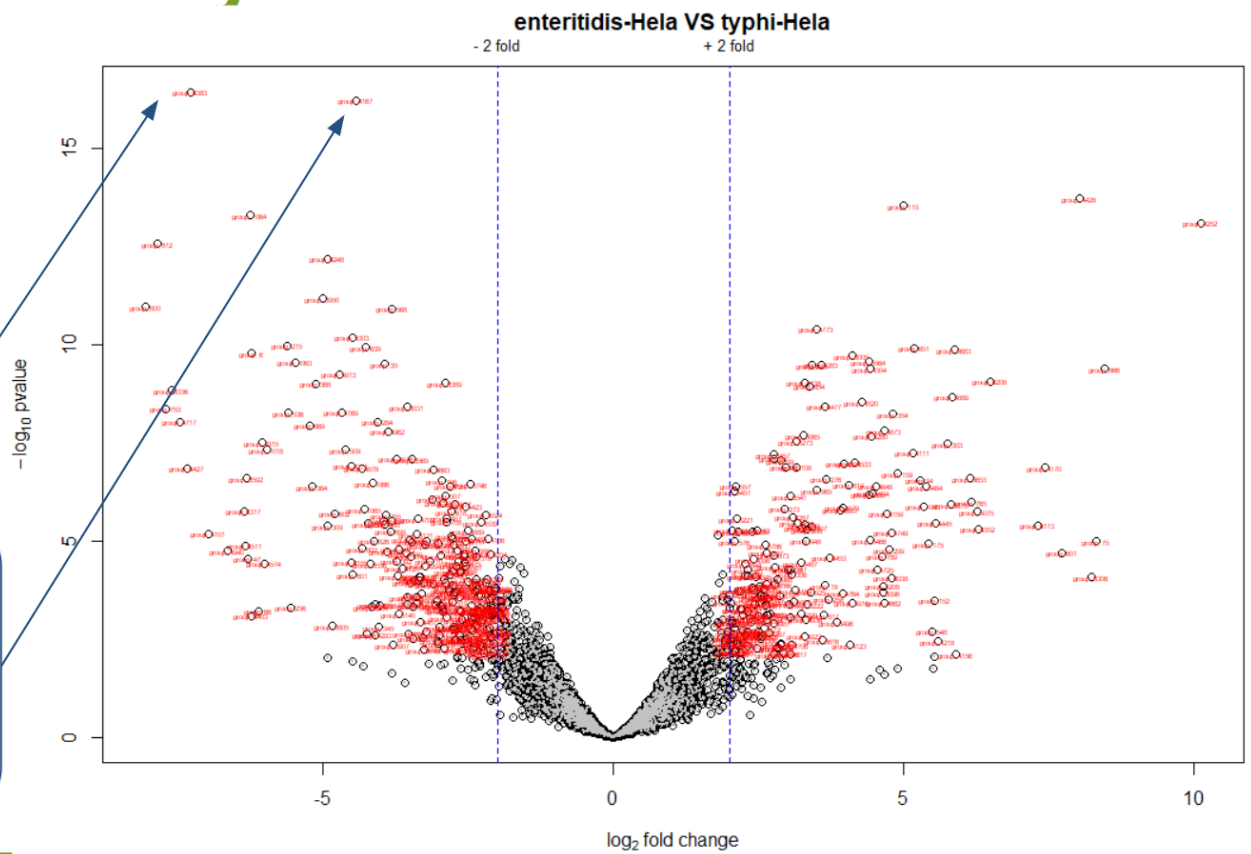
## Bactéries

430 DEGs



**group\_6383**  
 yjgh / oxydoreductase  
 log FC = -7  
 pvalue =  $10^{-13}$

**group\_4167**  
 syd / SecY interacting  
 protein Syd  
 log FC = -4,4  
 pvalue =  $10^{-13}$



# Infection / non Infection

Nom du groupe d'orthologues	Annotation
706	Type_III_ssaH: type III secretion system protein
5186	Type III secretion system outer membrane K - YscJ/FliF
5355	Region of a membrane-bound protein embedded in the membrane
6133	EspA-like secreted protein
6328	LcrH_SycD: type III secretion low calcium response chaperone

# Typhoïdales / Non Typhoïdales

Nom du groupe d'orthologues	Annotation
145	Fimbrial protein
258	similar to protein from Salmonella dublin; translocated by SPI-1; type III secretion
602	Stress-induced bacterial acidophilic repeat motif
884	Chlorhexidine efflux transporter
6374	Fimbrial protein

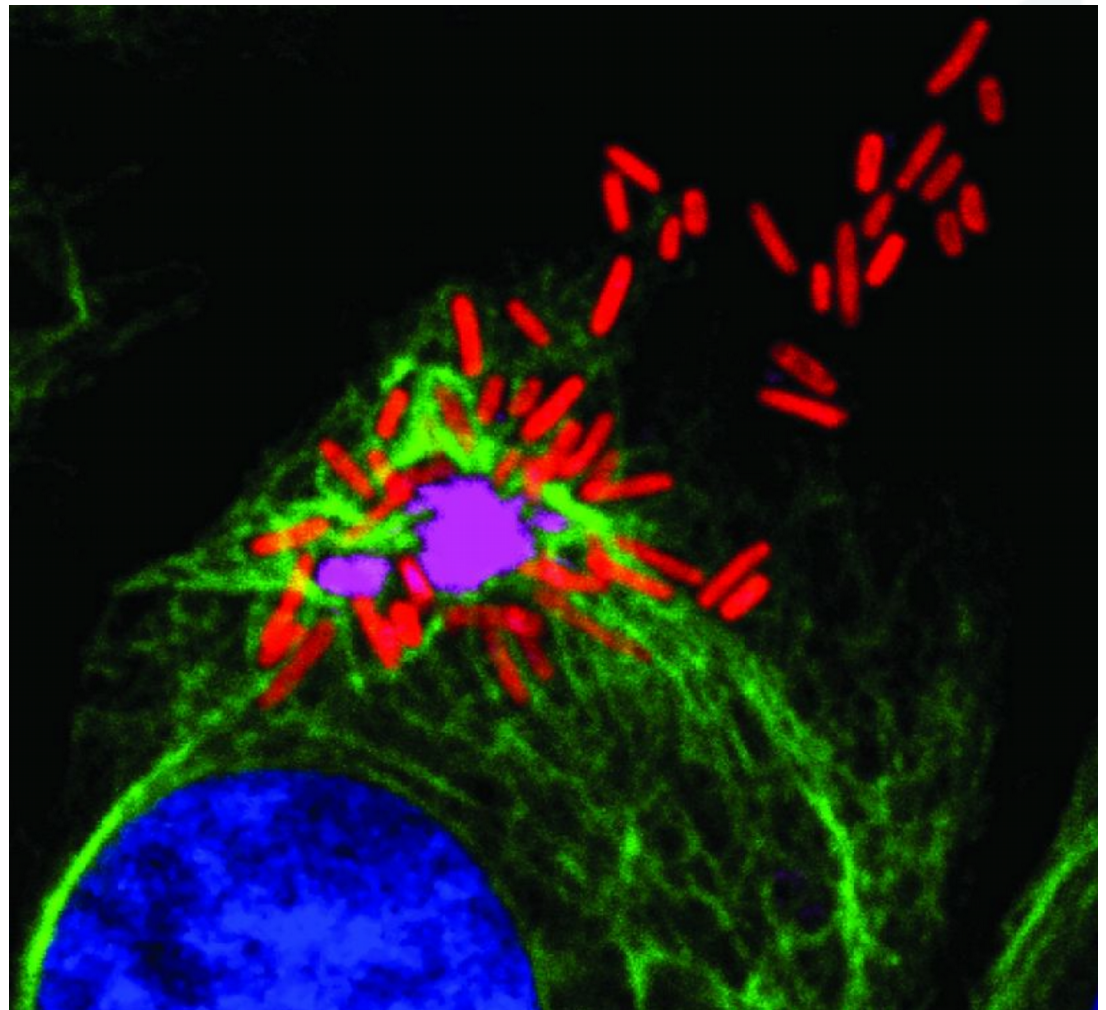
# Conclusions

- **Dual RNA-Seq s'intéresse aux interactions inter-organismes via le proxy des ARNs**
- **Manipulation et l'analyse des échantillons est complexe et nécessite d'adapter les protocoles à la fois pour la partie humide et pour la partie *in silico* ...**
- **Complexité augmente *in vivo***

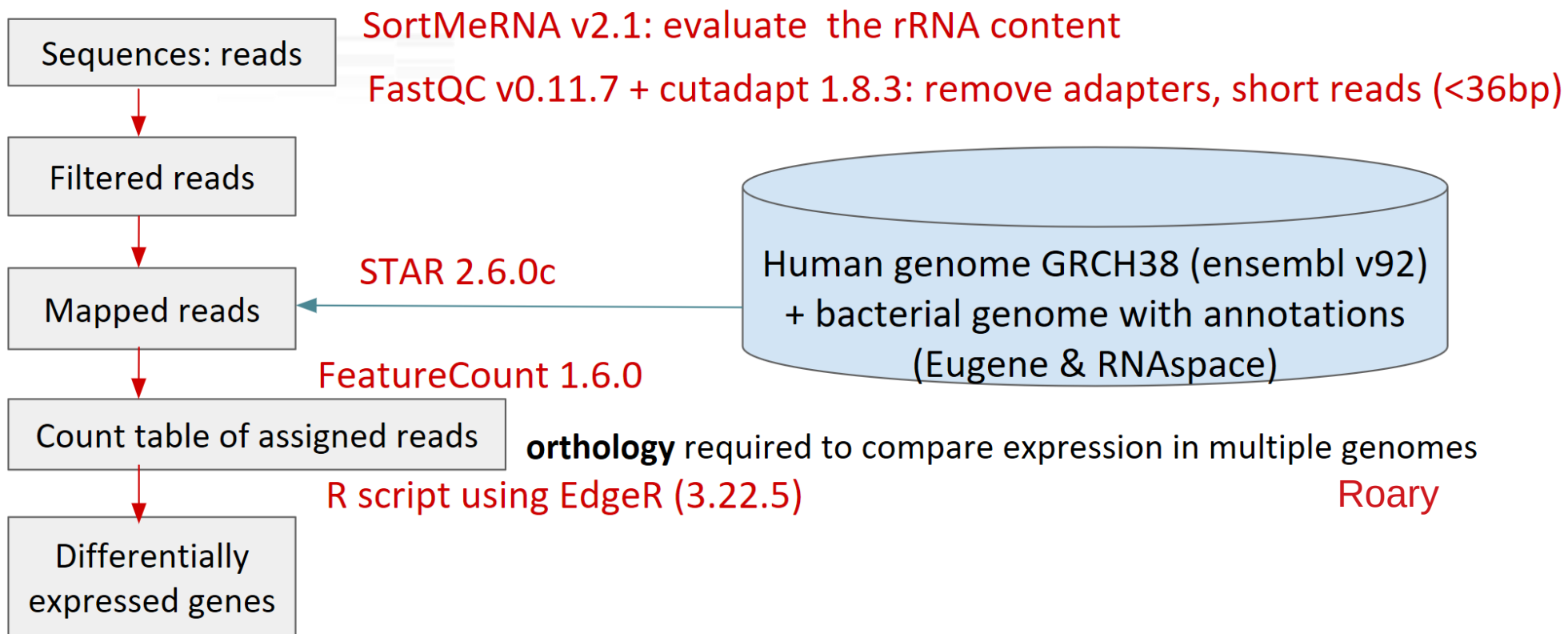


# Questions ?

- **Merci de votre attention**



# Le pipeline



frontiers in  
**MICROBIOLOGY**

**ORIGINAL RESEARCH ARTICLE**  
published: 06 February 2015  
doi: 10.3389/fmicb.2015.00065



## Computational prediction of molecular pathogen-host interactions based on dual transcriptome data

Sylvie Schulze<sup>1</sup>, Sebastian G. Henkel<sup>2</sup>, Dominik Driesch<sup>2</sup>, Reinhard Guthke<sup>1</sup> and Jörg Linde<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Systems Biology and Bioinformatics, Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knoell-Institute, Jena, Germany

<sup>2</sup> BioControl Jena GmbH, Jena, Germany

**OPEN ACCESS** Freely available online

**PLOS** | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## Dual RNA-seq of Parasite and Host Reveals Gene Expression Dynamics during Filarial Worm–Mosquito Interactions

Young-Jun Choi<sup>9a</sup>, Matthew T. Aliota<sup>9</sup>, George F. Mayhew<sup>2b</sup>, Sara M. Erickson<sup>2c</sup>, Bruce M. Christensen<sup>\*</sup>

Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, United States of America

Camilios-Neto et al. *BMC Genomics* 2014, **15**:378  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/378>



**RESEARCH ARTICLE**

**Open Access**

## Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes

Doumit Camilios-Neto<sup>1,4</sup>, Paloma Bonato<sup>1</sup>, Roseli Wassem<sup>2</sup>, Michelle Z. Tadra-Sfeir<sup>1</sup>, Liziane CC Brusamarello-Santos<sup>1</sup>, Glaucio Valdameri<sup>1</sup>, Lucélia Donatti<sup>3</sup>, Helisson Faoro<sup>1</sup>, Vinicius A. Weiss<sup>1</sup>, Leda S. Chubatsu<sup>1</sup>, Fábio O. Pedrosa<sup>1</sup> and Emanuel M. Souza<sup>1\*</sup>

Bactéries capable de fixer l'azote

Aprianto et al. *Genome Biology* (2016) 17:198  
DOI 10.1186/s13059-016-1054-5

Genome Biology

**RESEARCH**

**Open Access**

## Time-resolved dual RNA-seq reveals extensive rewiring of lung epithelial and pneumococcal transcriptomes during early infection

Rieza Aprianto<sup>1</sup>, Jelle Slager<sup>1</sup>, Siger Holsappel<sup>1</sup> and Jan-Willem Veening<sup>1,2\*</sup>



# Publications phares

NetGenerator

frontiers in MICROBIOLOGY

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE published: 06 February 2015 doi: 10.3389/fmicb.2015.00065

## Computational prediction of molecular pathogen-host interactions based on dual transcriptome data

Sylvie Schulze<sup>1</sup>, Sebastian G. Hahnke<sup>1</sup>, Dominik Driesch<sup>2</sup>, Reinhard Guthke<sup>1</sup> and Jörg Linde<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Systems Biology and Bioinformatics, Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knoell-Institute, Jena, Germany  
<sup>2</sup> BioControl Jena GmbH, Jena, Germany

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## Dual RNA-seq of Parasite and Host Reveals Gene Expression Dynamics during Filarial Worm–Mosquito Interactions

Young-Jun Choi<sup>1,2\*</sup>, Matthew T. Aliota<sup>1</sup>, George F. Mayhew<sup>1,2</sup>, Sara M. Erickson<sup>2,3</sup>, Bruce M. Christensen<sup>1\*</sup>  
Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin–Madison, Madison, Wisconsin, United States of America

Ver responsable dans le moustique de la filariose

Camilios-Neto et al. BMC Genomics 2014, 15:378  
http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/378

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

## Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Aspizium brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes

Doumit Camilios-Neto<sup>1,4</sup>, Paloma Trujillo<sup>1</sup>, Rosalva Mosem<sup>2</sup>, Michelle Z Tadra-Sfeir<sup>1</sup>, Liziane CC Brusamarello-Santos<sup>1</sup>, Glaucio Valdameri<sup>1</sup>, Lucélia Domingos Helisson<sup>1,3,5,6</sup>, Vinícius Weiss<sup>1</sup>, Leda S Chubatsu<sup>1</sup>, Fábio O Pedrosa<sup>1</sup> and Emanuel M Souza<sup>1\*</sup>

Bactéries capables de fixer l'azote

Racines du blé et bactérie fixant l'azote

Aprianto et al. Genome Biology (2016) 17:198  
DOI 10.1186/s13059-016-1054-5

Genome Biology

RESEARCH Open Access

## Time-resolved dual RNA-seq reveals extensive rewiring of lung epithelial and pneumococcal transcriptomes during early infection

Rieza Aprianto<sup>1</sup>, Jelle Slager<sup>1</sup>, Siger Holmberg<sup>1</sup> and Willem Berging<sup>1,2\*</sup>

Infection de cellules épithéliales du poulmon

# Filariasis

(*Wuchereria bancrofti*)

