

Une approche expérimentale du microbiote au lycée avec la Drosophile

Marseille, 8 octobre 2021



Etudier le microbiote de la Drosophile au lycée

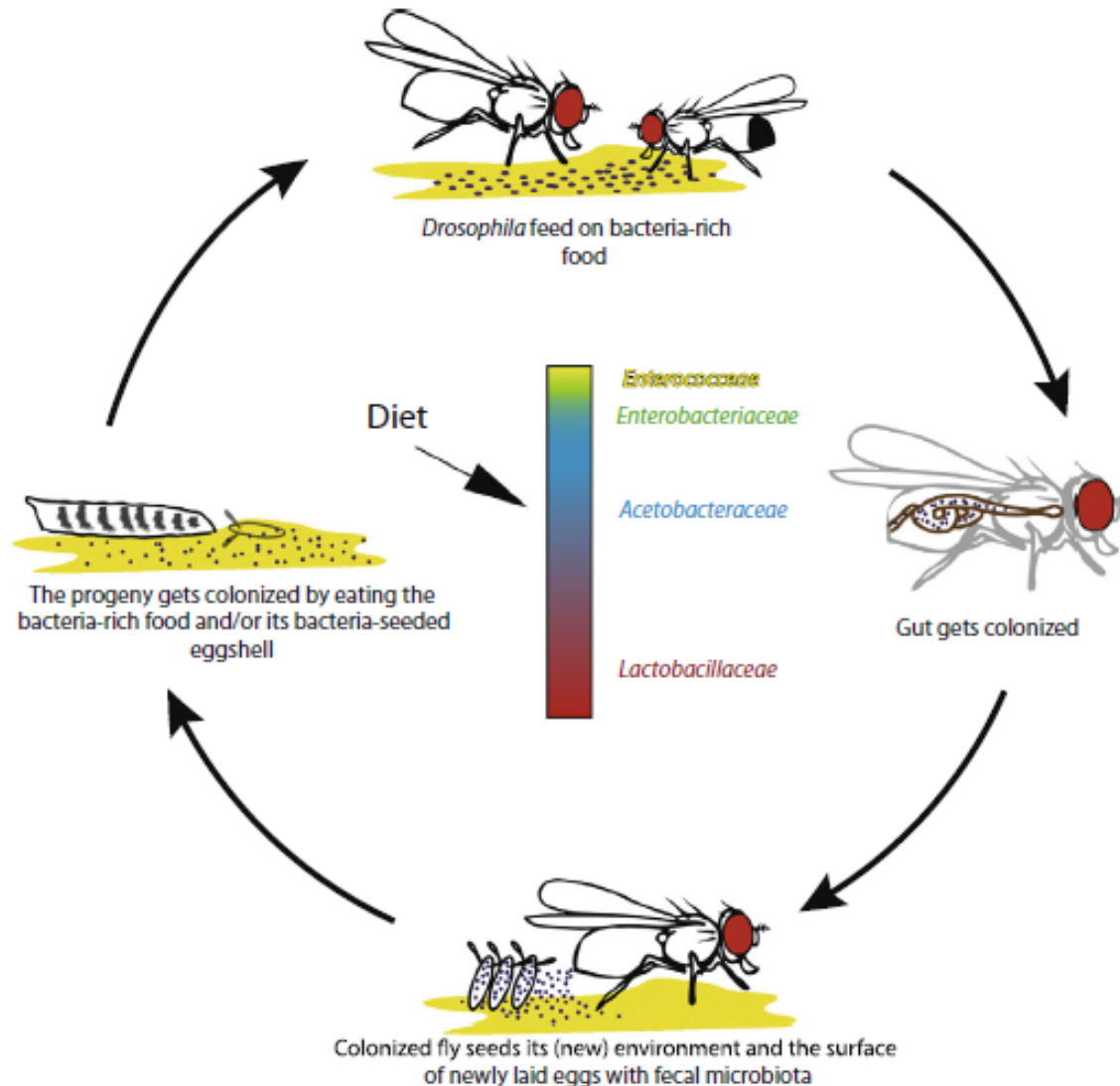
- * Objectifs :
- * Montrer que l'on peut **mettre en évidence le microbiote** de la drosophile
- * Montrer que l'on peut **modifier le microbiote** (p ex avec un traitement antibiotique)
- * Montrer que le microbiote a une **incidence sur le comportement** des mouches (p ex la capacité à se reproduire)

Etudier le microbiote de la Drosophile au lycée

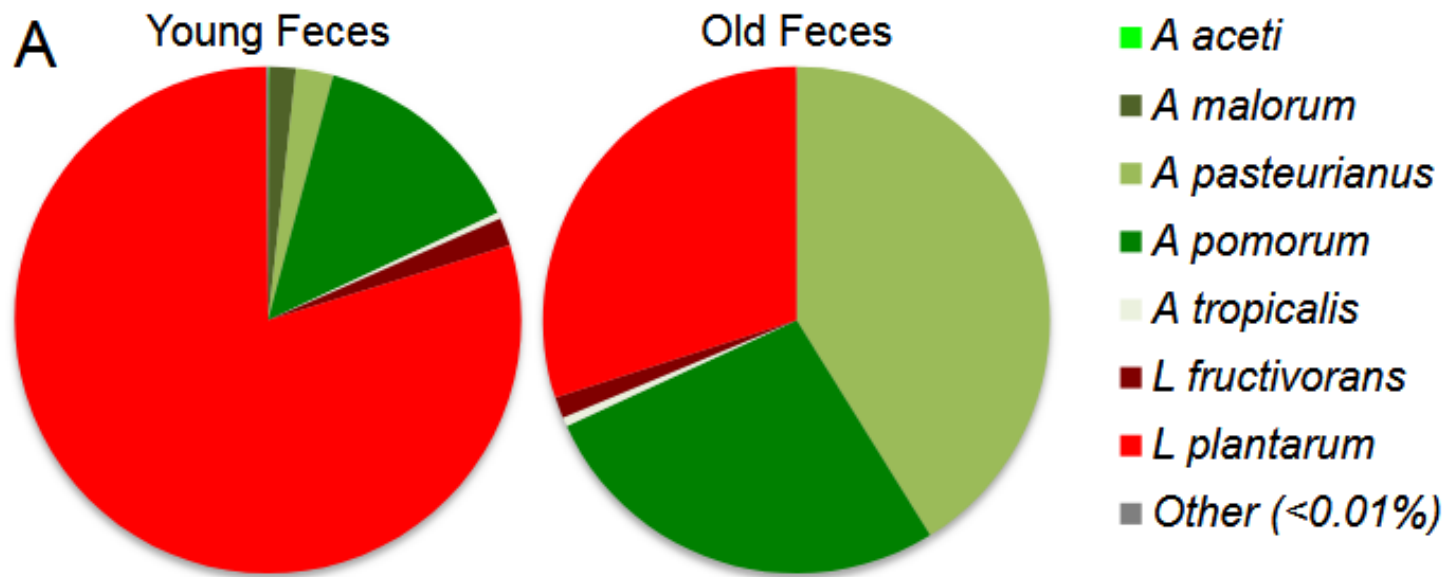
- * 1) préparation des milieux gélosés pour culture des microbes
- * 2) préparation des élevages de mouches (compter min 15 j d'élevage pour en mesurer les effets)
- * 3) écrasement des mouches et étalement des extraits sur les géloses (compter env. 3 j pour avoir les premiers résultats + env. 1 sem. pour une seconde lecture des boîtes)
- * 4) tests antibiotiques en pastilles (lecture à env. 3 et 8 j)

Pourquoi s'intéresser à la drosophile?

B. Erkosar, F. Leulier / FEBS Letters 588 (2014) 4250–4257

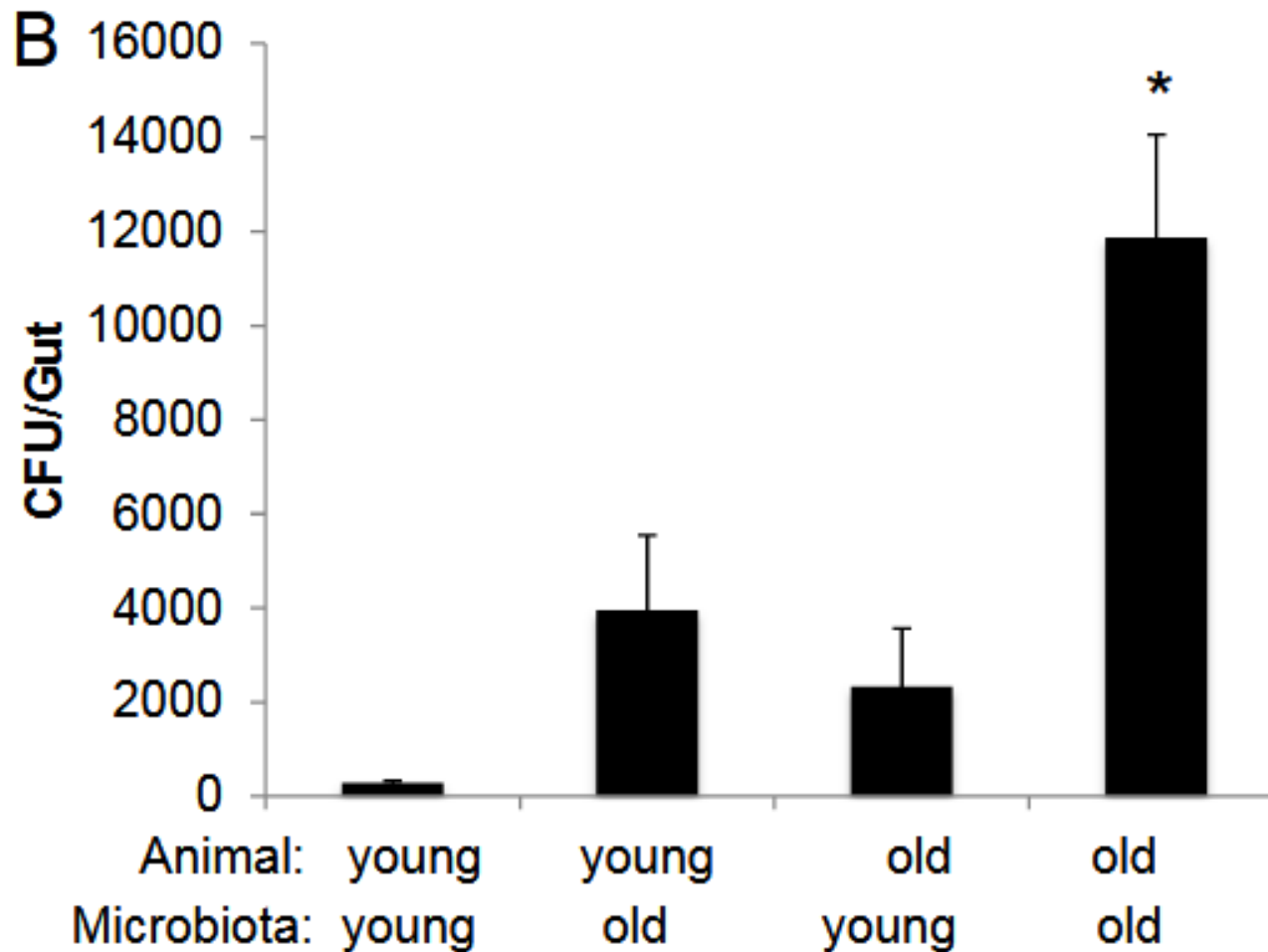


Un microbiote cultivable assez simple



A = Acetobacter (gram -)
L = Lactobacillus (gram+)

Les transferts de microbiote se font assez facilement



Le « matériel » nécessaire

Etudier le microbiote de la Drosophile au lycée





Mettre en évidence le microbiote de la drosophile

Etudier le microbiote de la Drosophile au lycée



Abondance des microorganismes



Résultats d'ensemble pour les drosophiles témoins cultivées en conditions non sélectives

	P jun 2019	P fév 2019	E fév 2019
GN	1644	198	104
MEA	1935		641
Dnase	1140		
MRS	240		
McConkey	553	119	(GN + MEA)
+ josa	806	(505)	39 + 106
+ amocla	2		255 + 190
+doxy	4		
+fun	1191	80	240 + 561

milx
assez
généralistes
lactobacilles
gram -
antibactérien
antibactérien
antibactérien
antifongique

n= 4 ; 5
 nb total

n= 4
 moy/bte

n= 2 x 2
 moy/bte

Des variations de microbiote entre populations de drosophiles

		tém	josa	amo	fun	moy
ts GN	2de13	174	15	80	203	118
ts GN	2de7	122	16(-53)	8	20	41,4(-51)
ts MEA	2de13	590	17	34	130	193
ts MEA	2de7	225	21	9	-	85*
GN, MEA	2de13	570	26	55	110	190
GN, MEA	2de7	311	36	3	28	116
moy souche	2de13	382	17	57	167	156
moy souche	2de7	173	19(-37)	7(-8)	20*	(55-84)

Des variations de microbiote entre lignées de drosophiles

n° tube	cond cult	GN	MRS	MEA	MacConke	Dnase	GN + josa	GN + amocla	GN + doxy	GN + fun	moy ts milx	bte 4 antibio
1	tém 1-1	3500	330	2400	800	>>>	?	0	16	3250	1470,9	12000
2	tém 1-2	2700	170	2100	900	1500	1300	0	1	1000	1074,6	8400
3	tém 1-3	1600	150	2800	650	2500	1900	1	2	1400	1222,6	4500
moy	tém 1	2600,0	216,7	2433,3	783,3	2000,0	1600,0	0,3	6,3	1883,3	1280,4	8300
34	tém 3-1	120	360	440	350	125	16	8	0	110	169,9	360/496/380
35	tém 3-2	300	190	500-1000	63	430	9	2	0	195	148,6	250/267/370
moy	tém	210	275	600	206,5	277,5	12,5	5	0	152,5	193,2	354
moy	tém 1+3	1644,0	240,0	1935,0	552,6	1138,8	806,3	2,2	3,8	1191,0	834,8	4327

Des variations de microbiote entre individus de drosophiles

milieu	gde bte	gde bte	gde bte r?	GN	GN + jos	GN+josa,	GN + fun	GN + ami	GN + ami	GN + ami	GN + pap	GN + pap
1 [tém]					>400, µcol?			110	660	85	20	1
2 [tém]					>400, µcol?	43	45	300	50		220	1
3 [tém]					400 à 500, µcol?	130	500	400			250	3
4 [tém]					500 à 600+, µcol?	100	220	660				
17 [tém]			150+									
18 [tém]	125	220	2250	500			550					
19 [tém]	tapis cont 3000	3000	600	3000								
20 [tém]	tapis cont	tapis continu,	hors p 120									

GN + gél	GN + lait	dnase	mcconke	MEA	MEA (2)	MEA + jos	MEA + an	MEA + fun
175	70	65	34					
80	50	80	8					
550	660	350	300					
550	200	165	135					
			87					
			400	3000	550			
		3000	1000					1100
		100				1		

Estimation de la taille du microbiote

- * Nous pouvons tenter une estimation (grossière) en prenant l'effectif de colonies le plus élevé obtenu sur boîte gélosée, soit environ 3000 colonies, pour un dépôt de 10 μL d'extrait réalisé avec une seule mouche écrasée dans un volume total de 1 mL : $(3000 / 10 \mu\text{L}) \times 1000 \mu\text{L} = 3 \times 10^5$.
- * La littérature donne 10^6 comme ordre de grandeur moyen, les valeurs pouvant varier de 10^4 à 10^8 cfu (colony-forming unit)/mouche

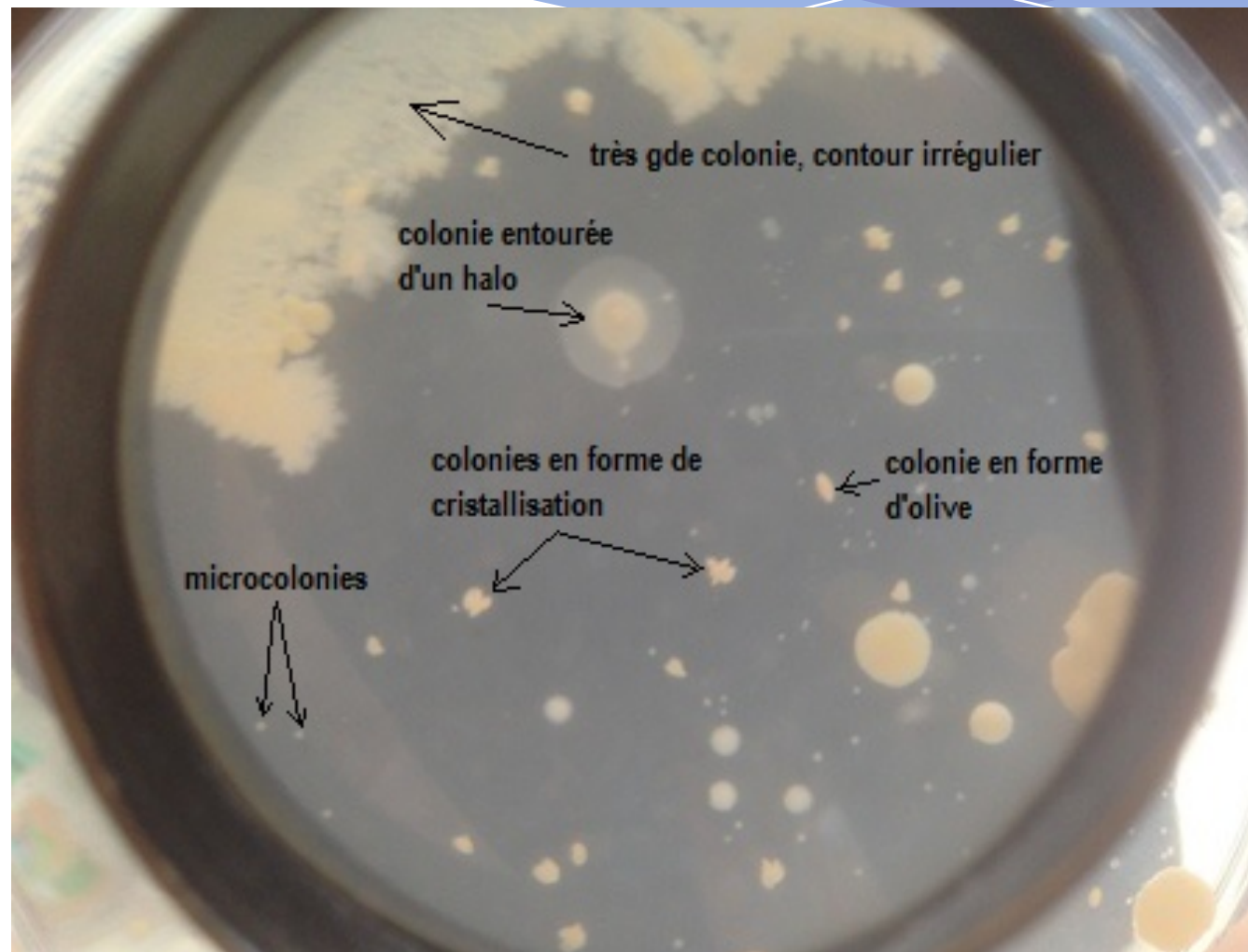
Diversité des microorganismes



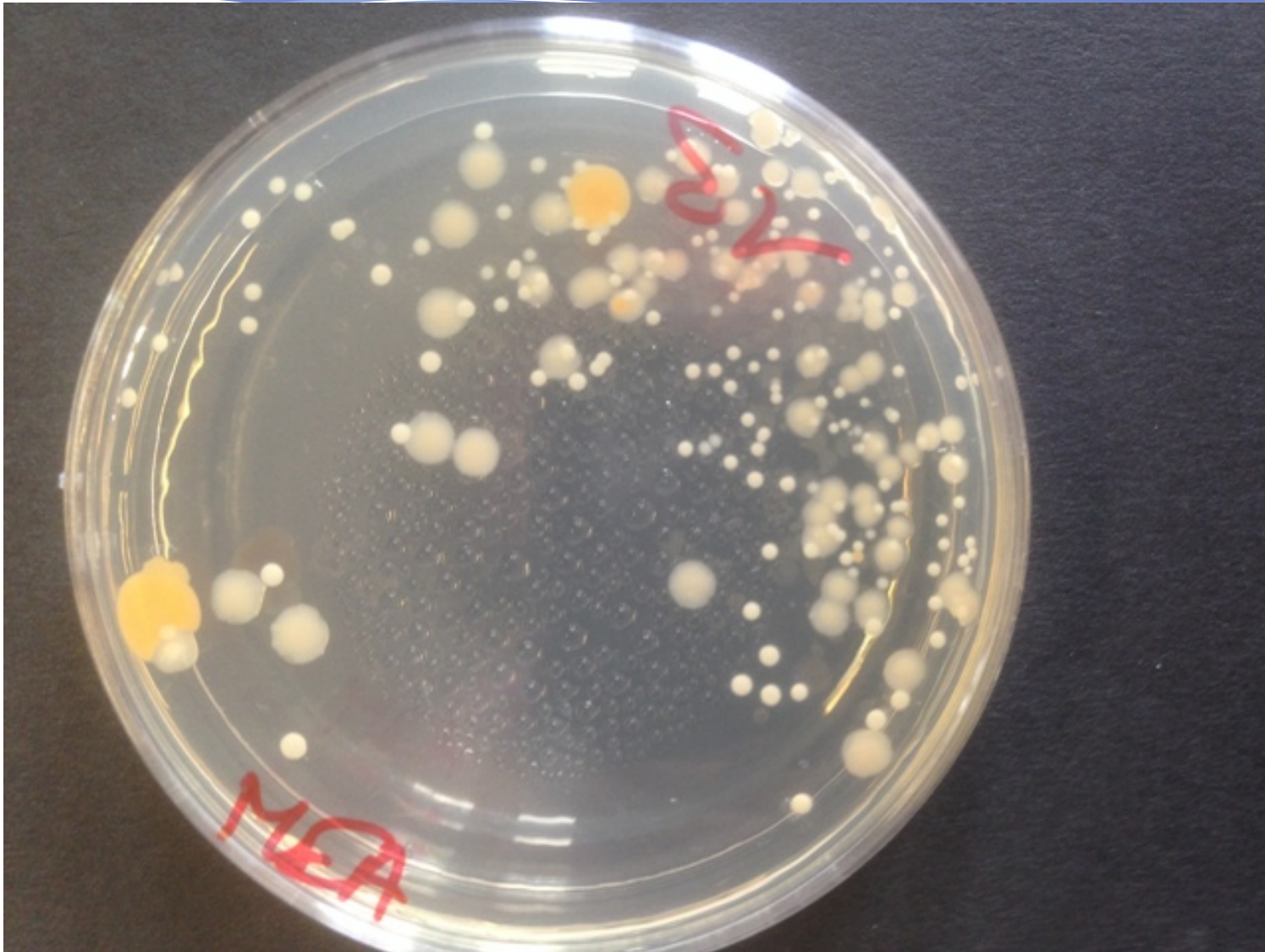
Diversité des colonies obtenues ex sur gélose dnase



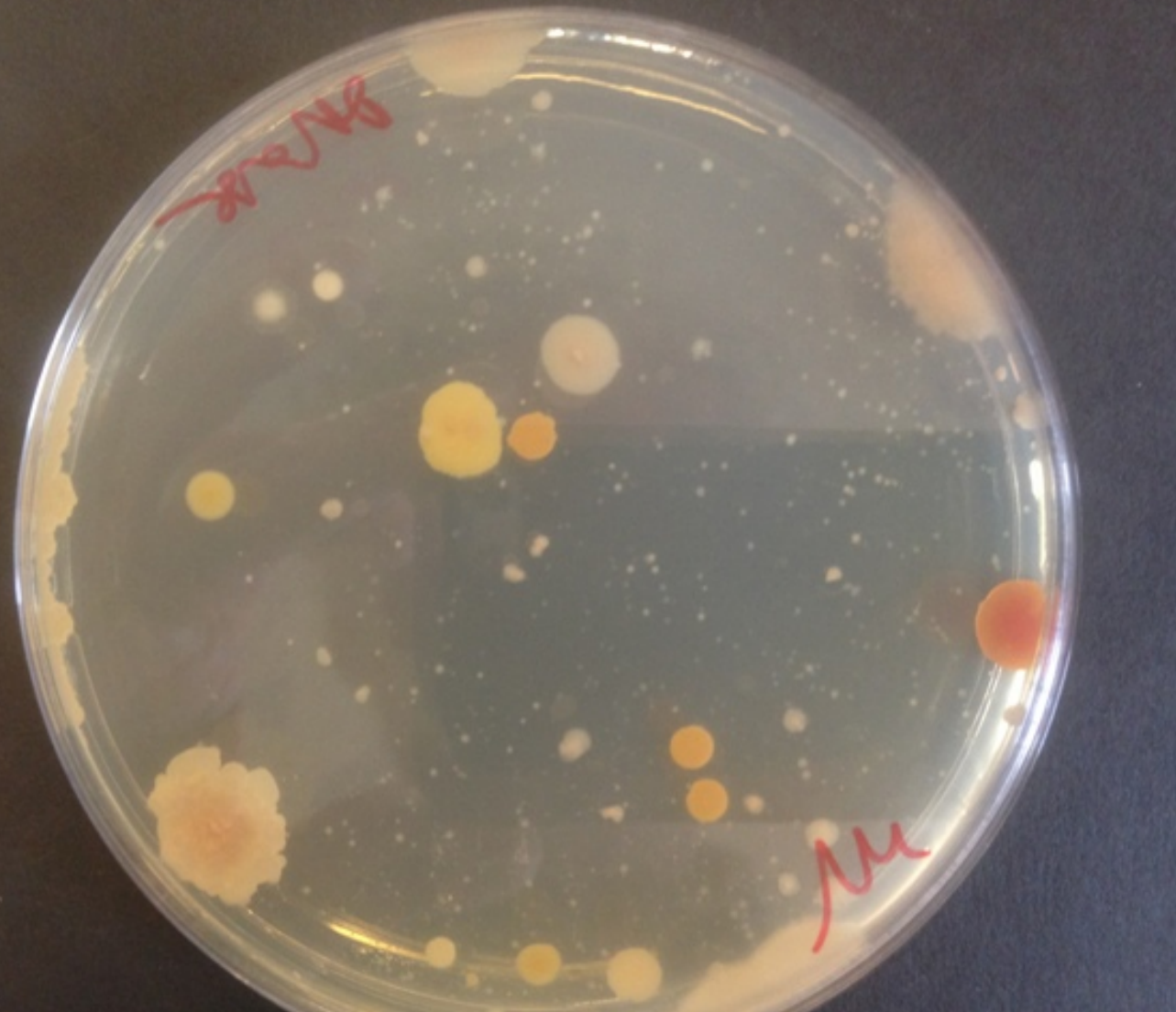
Diversité des colonies obtenues ex sur gélose dnase



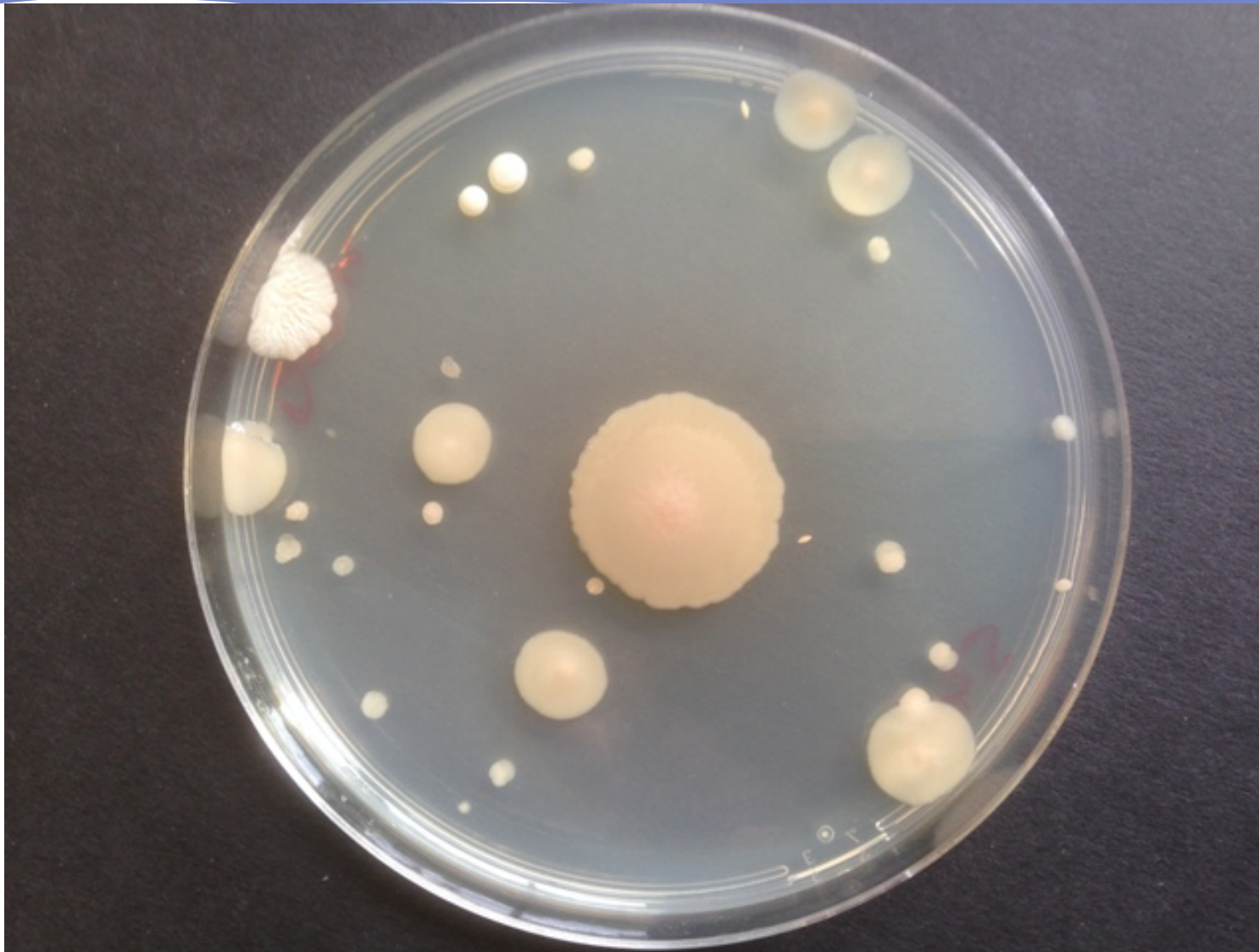
La diversité du microbiote



La diversité du microbiote



La diversité du microbiote



Analyse de la diversité du microbiote

n° tube		GN	MRS	MEA	MacConkey	Dnase	GN + josa	GN + amocla	GN + doxy	GN + fun	moy ind diff milx
1	tém 1-1	2,50	4,00	2,00	1,50	>>>>	3,00	0,00	0,00	3,50	2,06
2	tém 1-2	3,50	2,00	2,00	2,00	5,00	1,00	0,00	0,00	4,50	2,22
3	tém 1-3	3,50	5,50	4,00	1,00	3,00	2,00	1,00	0,00	3,50	2,61
moy	tém 1	3,17	3,83	2,67	1,50	4,00	2,00	0,33	0,00	3,83	2,37
34	tém 3-1	5,00	?	4,50	2,50	8,50	3,50	1,50	0,00	6,00	3,94
35	tém 3-2	3,50	2,50	3,50	1,00	10,00	3,00	2,00	0,00	4,50	3,33
moy	tém	4,25	2,50	4,00	1,75	9,25	3,25	1,75	0,00	5,25	3,56
moy	tém 1+3	3,60	3,50	3,20	1,60	6,63	2,50	0,90	0,00	4,40	2,93

	GN	GN + josac	GN + amoxi	GN + fung	MEA	MEA + josac	MEA + amox	MEA + fung	moy ts GN	moy ts MEA
2de7 biotech	2,0	3,0	2,0	3,0	2 M	3 M	2 M	3,0	2,5	2,5
2de13 biotec	3,5	1,5	3,5 M	4,5 M	2,5	2,5	3,5	3,5	3,3	3,0

Nb moyen de types différents de colonies observées sur boîte de gélose ; M = moisissure

Montrer que l'on peut **modifier le microbiote** (p ex avec un traitement antibiotique)

Etudier le microbiote de la Drosophile au lycée

Analyse de l'abondance du microbiote

Montrer que l'on peut **modifier le microbiote** (p ex avec un traitement antibiotique)

Montrer que l'on peut modifier le microbiote (p ex avec un traitement antibiotique)

	mouches						
%	2de13	2de7	4 abtq 2de7	P fév (2de13)	P juin	4 abtq P juni	moy géné
tém	61,5	52,7	76,9	38,6	48,4	55,9	55,7
josa	2,6	15,5	3,3	15,3	15*	29,3	13,2
amocla	9,2	8,4	9	12,1	0,2	0,003	6,5
fun	26,7	23,4	10,8	33,9	36,4	14,7	24,3
					* spira		

Nb moyen de colonies formées sur boîte de gélose après étalement de 10 µL d'un extrait de mouches élevées en l'absence (témoin) ou en présence d'un antibiotique (josacine, amoxicilline-acide clavulanique, fungizone)

Montrer que l'on peut modifier le microbiote (p ex avec un traitement antibiotique)

%	2de13	2de7	4 abtq 2de7	P fév (2de13)	P juin	4 abtq P juni	<i>moy géné</i>
tém	100	100	100	100	100	100	100,0
josa	4,2	29,4	4,3	39,6	31*	52,4	26,0
amocla	15	15,9	11,7	31,3	0,4	0,005	12,4
fun	43,4	44,4	14	87,8	75,2	26,3	48,5
					<i>* spira</i>		

Le même tableau que le précédent exprimé cette fois en % du témoin

Analyse de la diversité du microbiote

Montrer que l'on peut **modifier le microbiote** (p ex avec un traitement antibiotique)

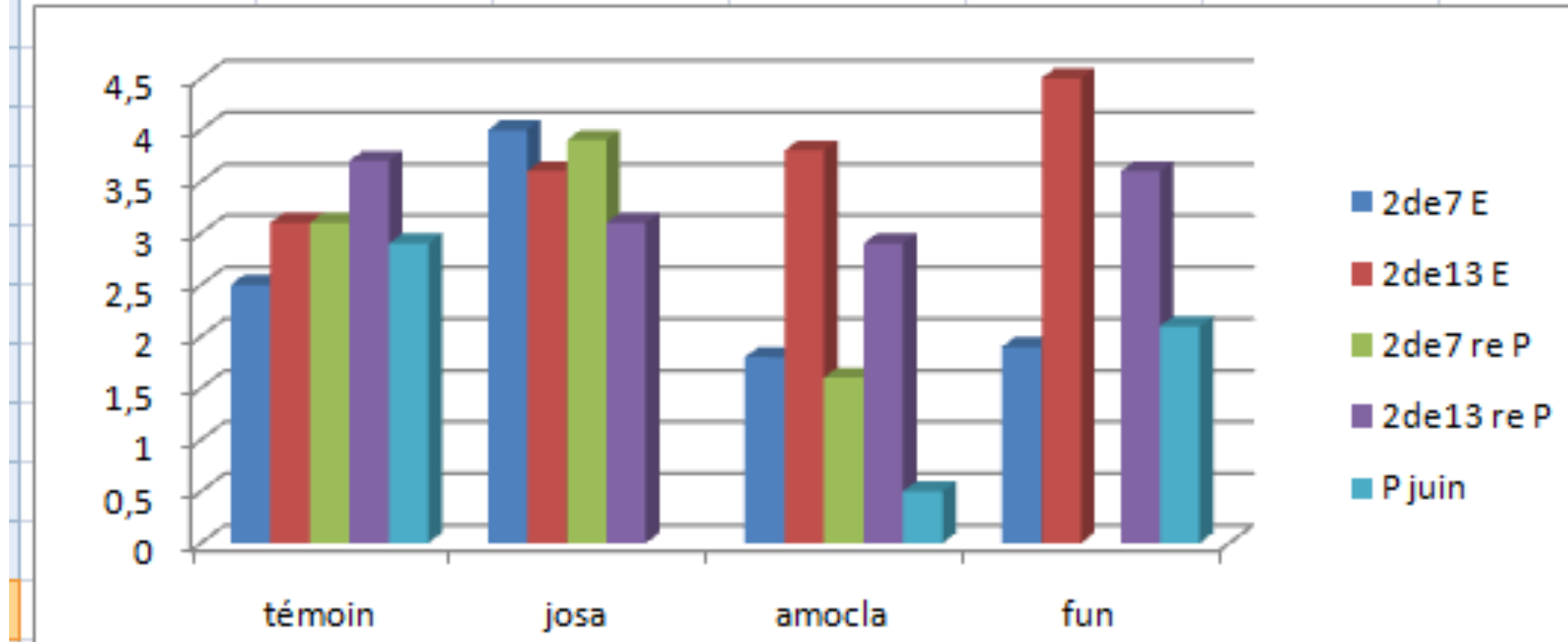


Analyse de la diversité du microbiote

n° tube		GN	MRS	MEA	MacConkey	Dnase	GN + josa	GN + amocla	GN + doxy	GN + fun	moy ind diff milx
moy	doxy 1+3	1,9	0,5	0,5	0	4	0,3	0,3	0,3	1,9	1,1
moy	amocla 1+3	0	0,3	0,3	0,3	4	0	0	0	0	0,5
moy	fun 1+3	3	3	3,1	0,7	4	0,9	1	0,4	2,5	2,1
moy	norflo 1+3	4,7	3,1	3,6	0,2	8,1	0,6	0,4	0,5	3	2,7
moy	tém 1+3	3,6	3,5	3,2	1,6	6,6	2,5	0,9	0	4,4	2,9

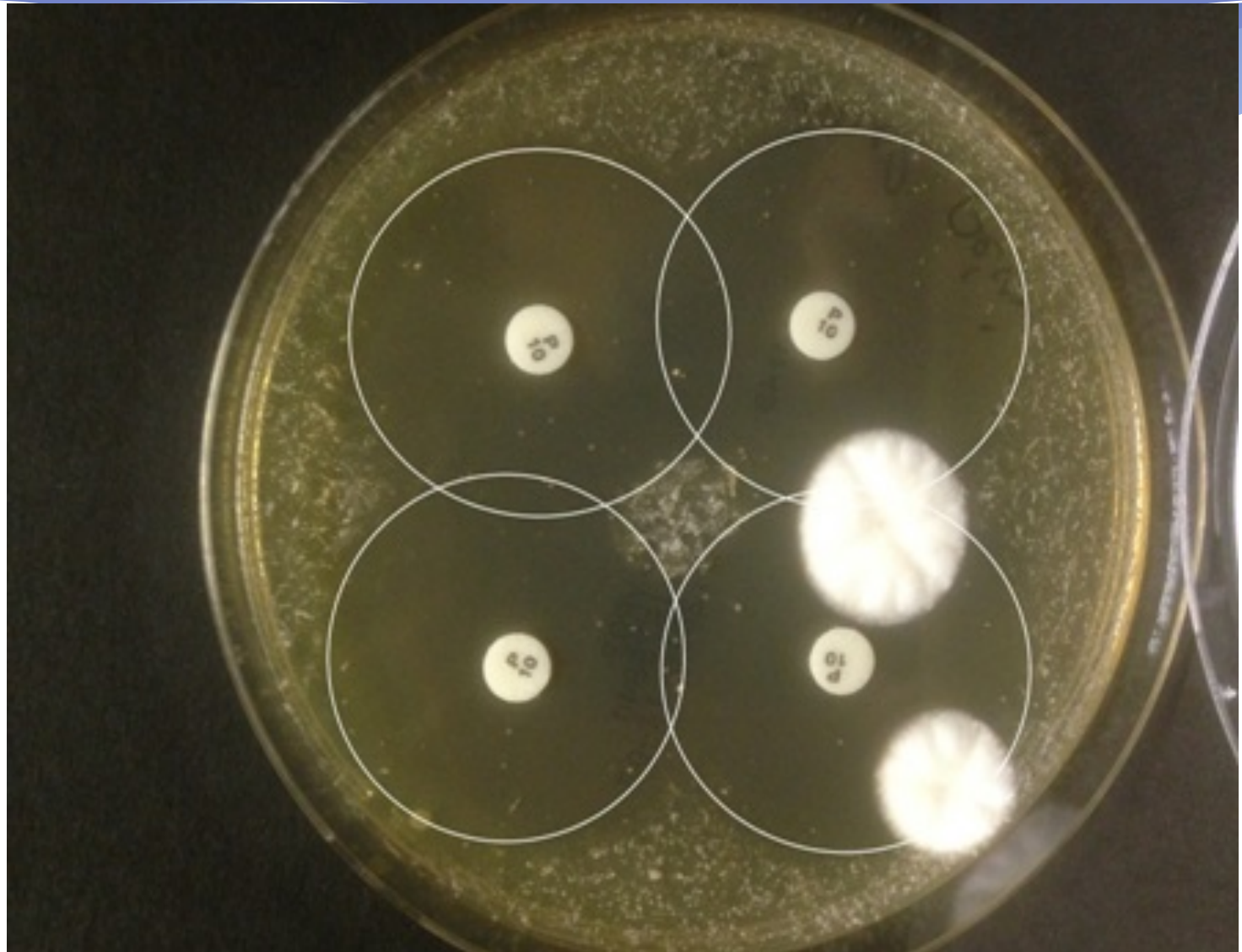
Nb moyen de types différents de colonies sur boîte de gélose pour des mouches élevées sans (témoin) ou avec antibiotique (doxycycline, amoxicilline-acide clavulanique, fungizone, norfloxacin); les entrées en colonne sont les différents milieux de culture sur boîte gélosée

cond°	2de7 E	2de13 E	2de7 re P	2de13 re P	P juin
témoin	2,5	3,1	3,1	3,7	2,9
josa	4	3,6	3,9	3,1	
(spira)					(1,5)
amocla	1,8	3,8	1,6	2,9	0,5
fun	1,9	4,5		3,6	2,1
doxy					1,1
norflo					2,7

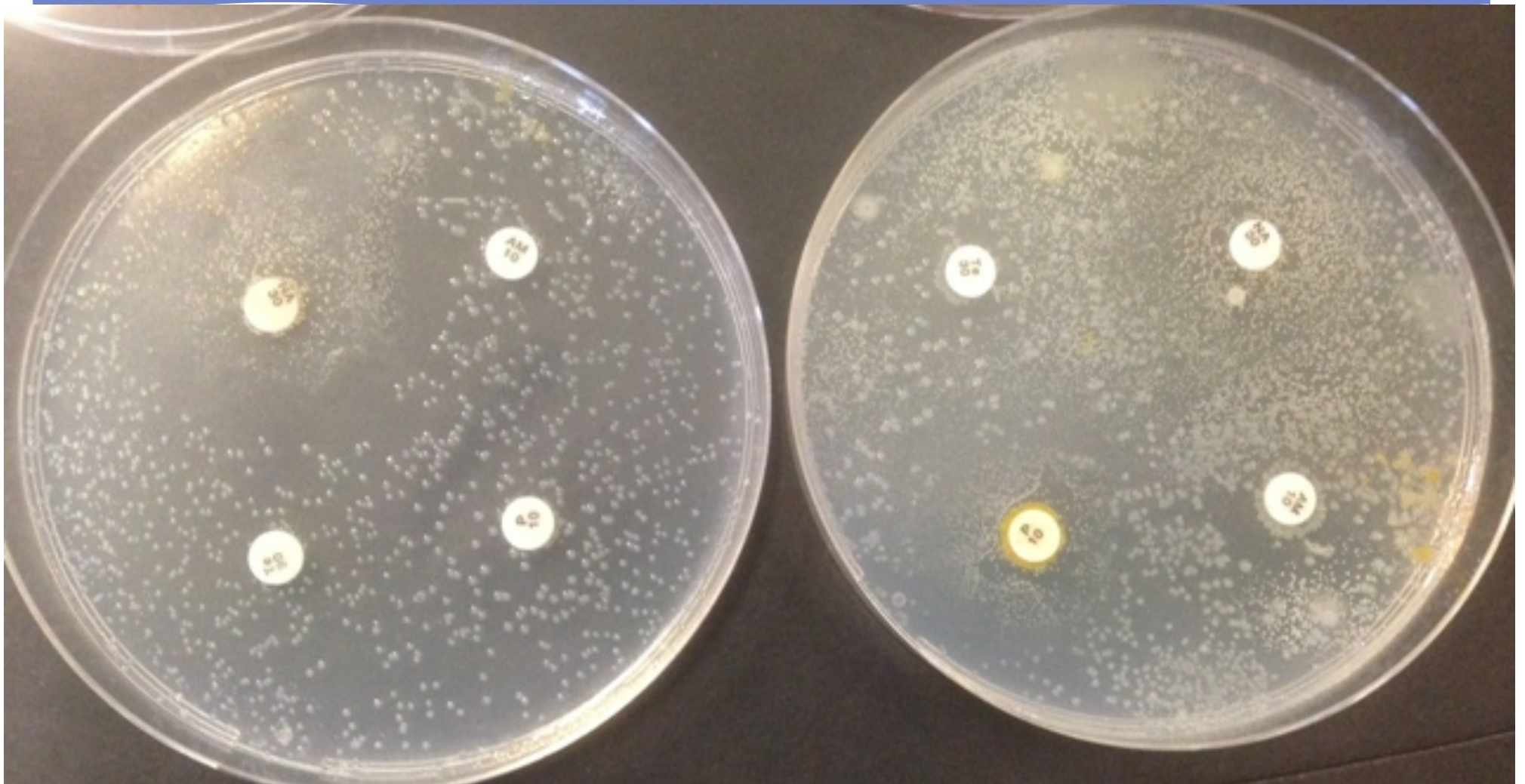


Présentation d'un des essais sous forme d'histogramme

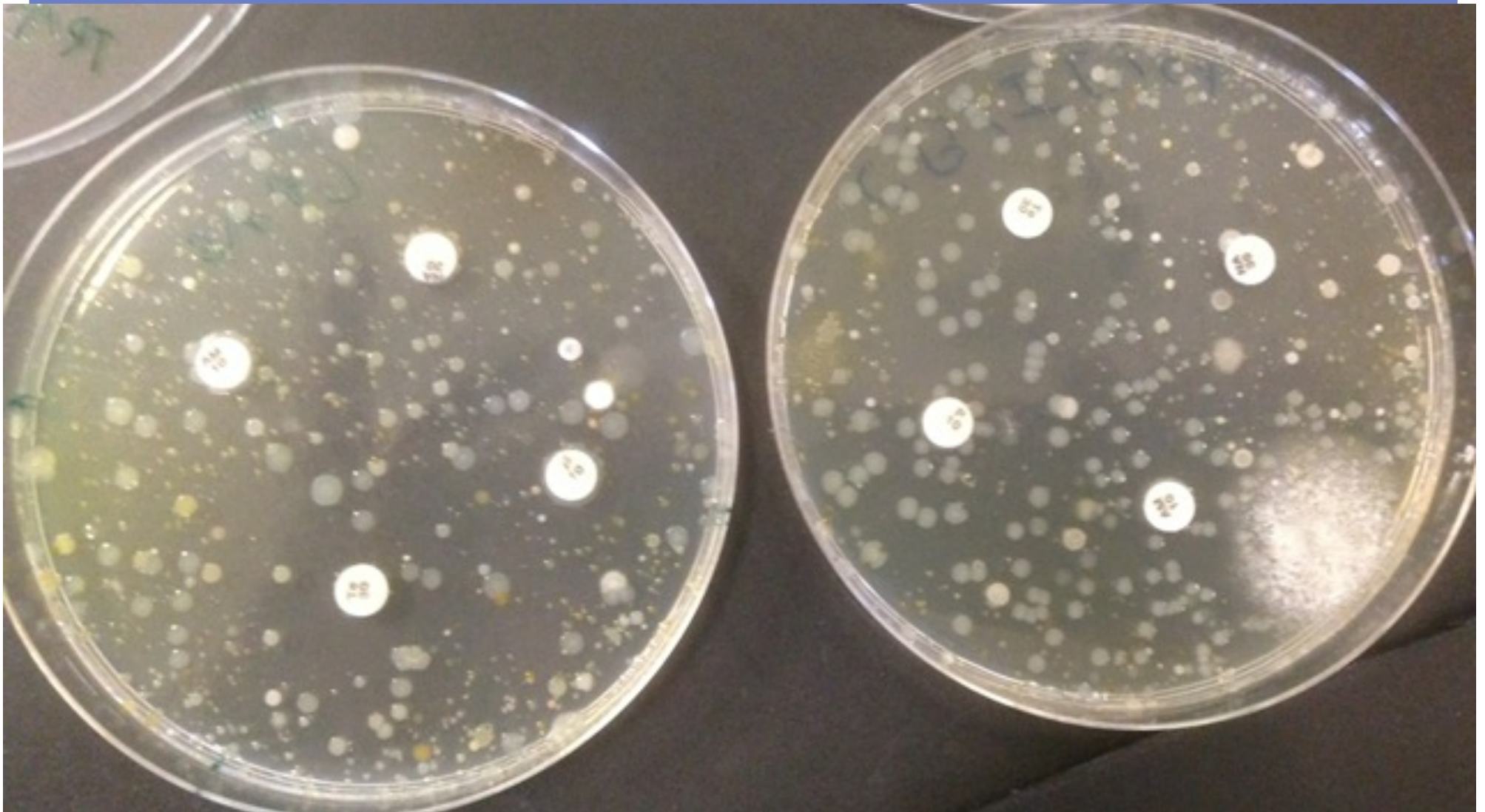
Traitement avec pastilles d'antibiotique (Pénicilline)



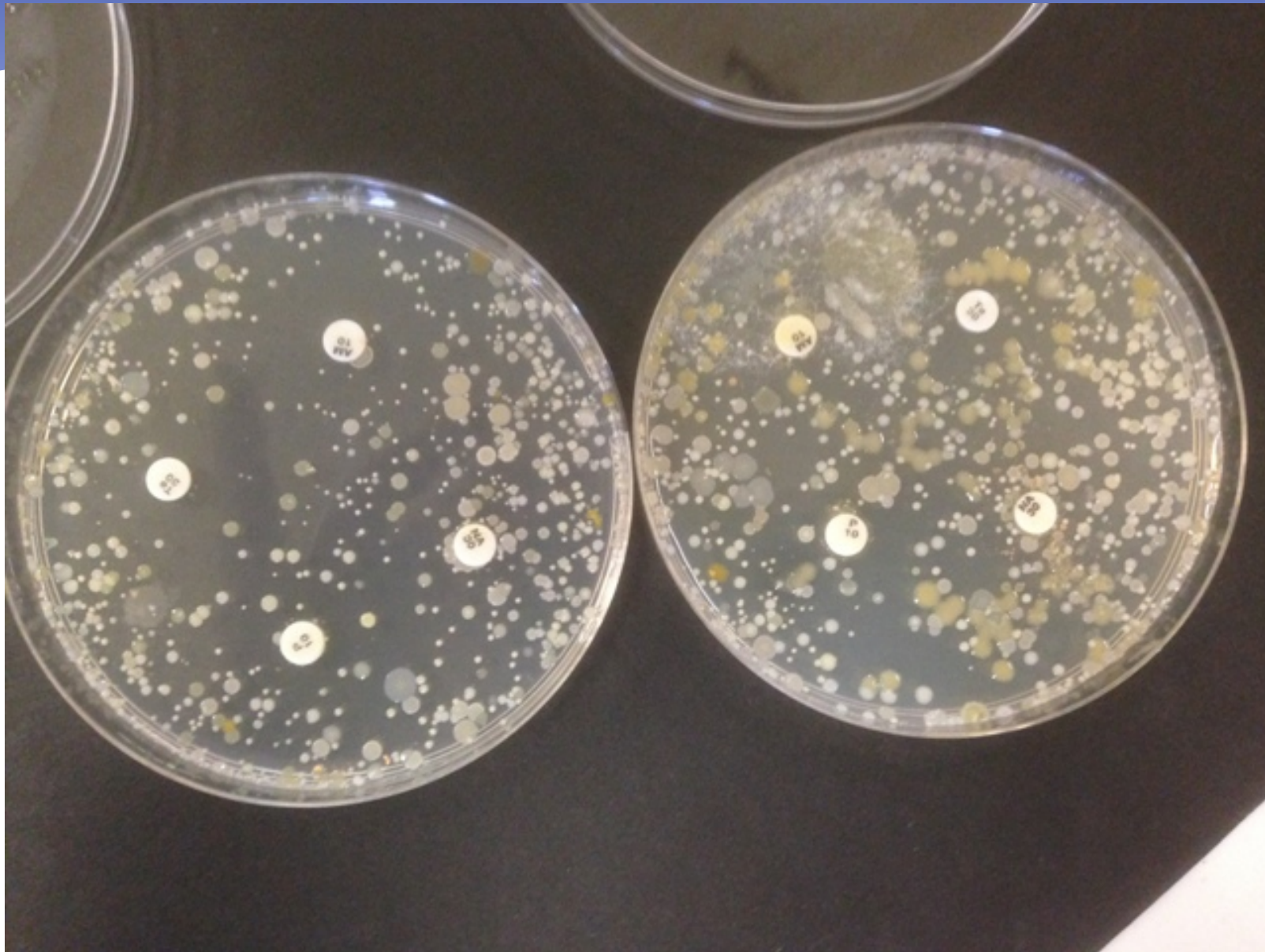
Bte 4 abtq - 2 mouches témoin



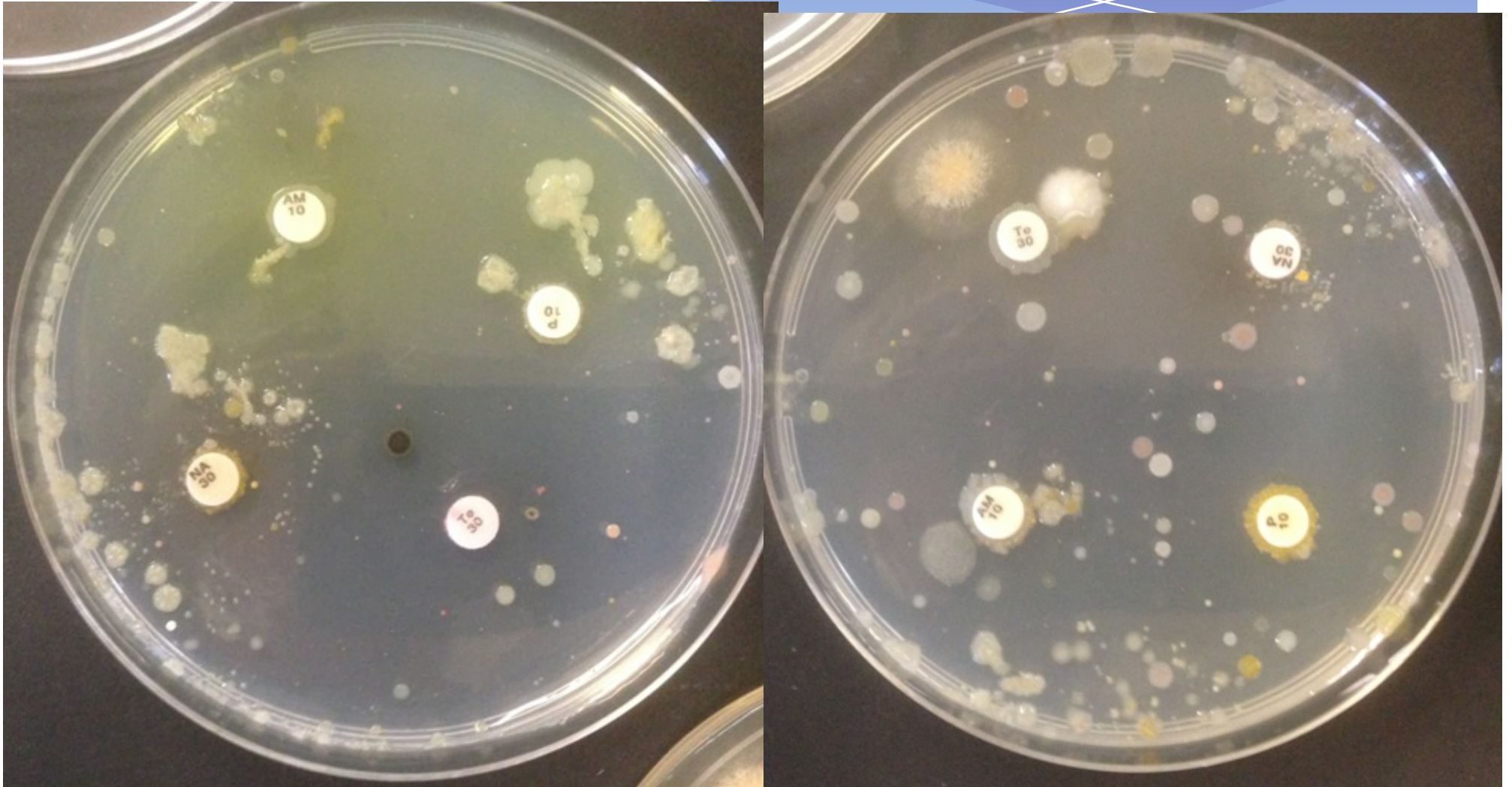
Bte 4 abtq - 2 mouches amocla



Bte 4 abtq - 2 mouches fun



Bte 4 abtq - 2 mouches josa



La diversité des types de colonies de microorganismes observées sur boîtes

- * Comme précédemment pour l'abondance, les données souffrent dans le détail d'une assez forte variabilité.
- * Toutefois d'autres données viennent conforter la conclusion que les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches : ce sont les proportions de certains types de colonies, les moisissures, les anaérobies et les « bleutés »

Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches

souche	moisissures	anaérobies	« bleutés »
témoin	9/63 (14,3%)	3/63 (4,8%)	22/63 (34,9%)
<u>josacine</u>	7/58 (12,1%)	11/58 (19%)	17/58 (29,3%)
<u>amoxicilline</u>	27/38 (71%)	7/38 (18%)	0/38 (0%)
<u>fungizone</u>	1/35 (2,9%)	9/35 (25,7%)	13/35 (37,1%)

Exprimé en nb de boîtes (sur le nb total)
où le phénotype considéré est observé

Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches

spectres d'action des antibiotiques		aérobie	aérobie	aérobie	aérobie	anaérobie	anaérobie	anaérobie	anaérobie
famille	molécule utilisée	gram +	gram +	gram -	gram -	gram +	gram +	gram -	gram -
cyclines	doxycycline								
pénicillines	amoxicilline + a. clavulanique								+
macrolides	josamycine, spiramycine			+	+				
quinolones	norfloxacin					+	+	+	+
	abondance du microbiote	en % du témoin							
	doxycycline	2,8							
	amoxicilline + a. clavulanique	0,6							
	josamycine, spiramycine	21							
	norfloxacin	31							
	<i>antifongique fungizone</i>	24,3							

La confrontation des données obtenues avec celles concernant les spectres d'action des antibiotiques paraît plutôt satisfaisante ce qui semble valider les résultats

Comportement des mouches



Montrer que le microbiote a une **incidence**
sur le comportement des mouches (p ex la
capacité à se reproduire)

Etudier le microbiote de la Drosophile au lycée

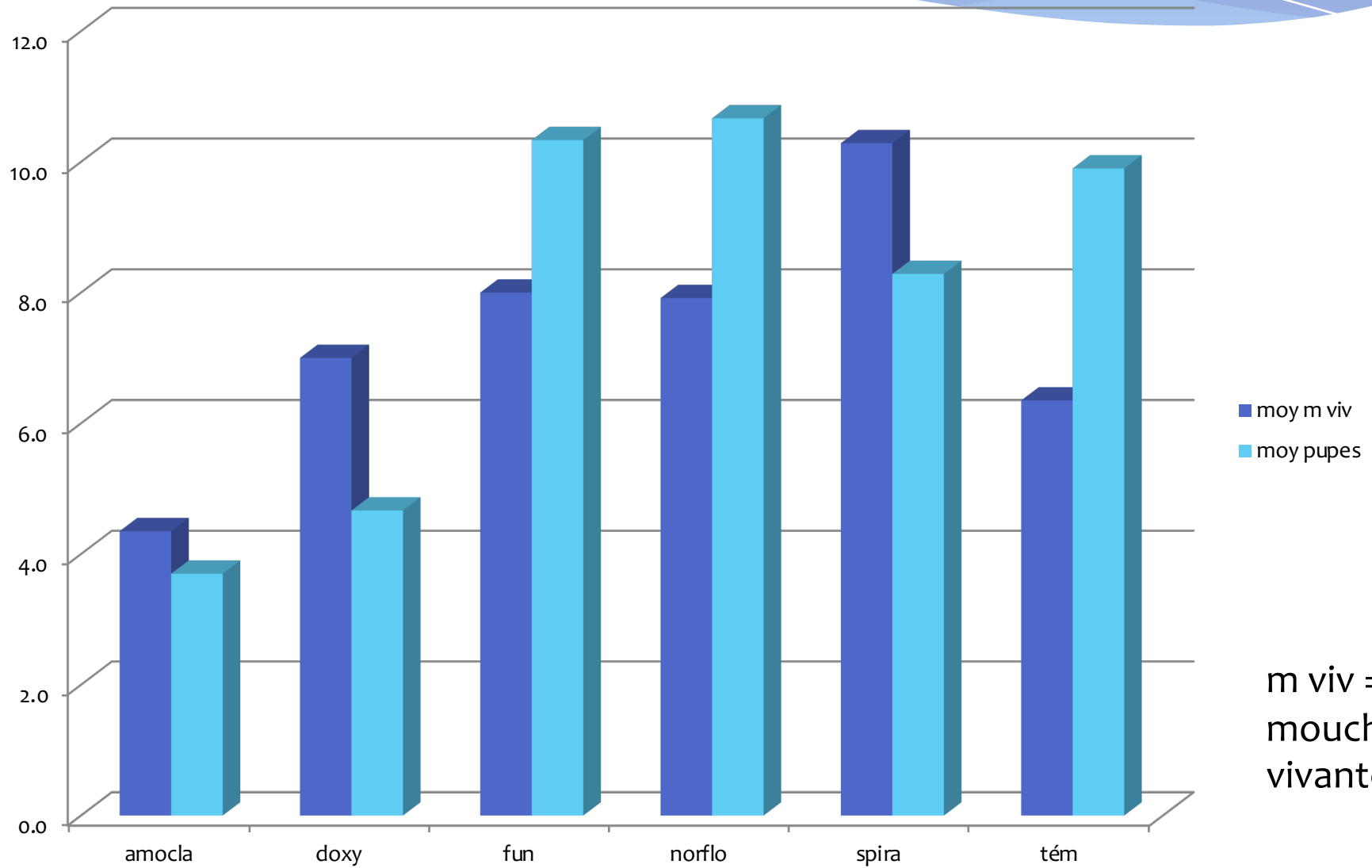
On peut finalement corrélérer les résultats précédents avec ceux concernant l'état général des mouches dans les flacons de culture

souche	nb de mouches	activité des mouches	présence de pupes
témoin	nombreuses à très nombreuses	actives	oui
josacine	rare (bcp de morts)	peu actives	non
amoxicilline	rare (bcp de morts)	peu actives	non
fungizone	peu nombreuses à nombreuses	actives	oui







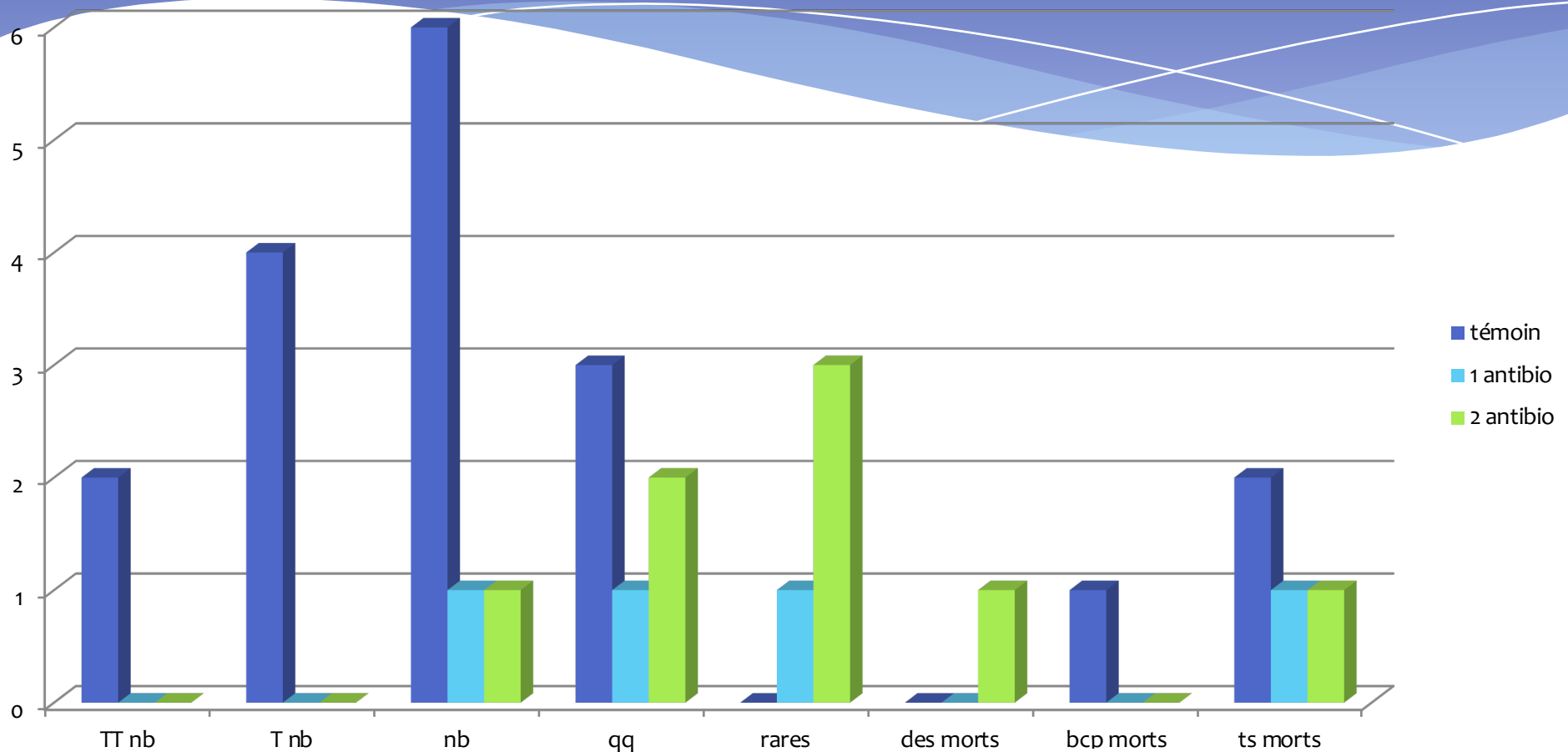


m viv =
mouches
vivantes

Suivi des flacons de culture de drosophiles

nb de mouches	très très nombreuses	très nombreuses	nombreuses	qq	rares, 3-4, etc.	des morts	bcp de morts	ts morts
tém	2	4	6	3	0		1	2
josa				1				1
amox			1		1			
josa+amox					1			1
fungi+josa				2	1			
fungi+amox			1		1	1		
1 antibiotiq			1	1	1			1
2 antibiotiq			1	2	3	1		1
ts antibiotiq			2	3	4	1		2

Suivi des flacons de culture de drosophiles

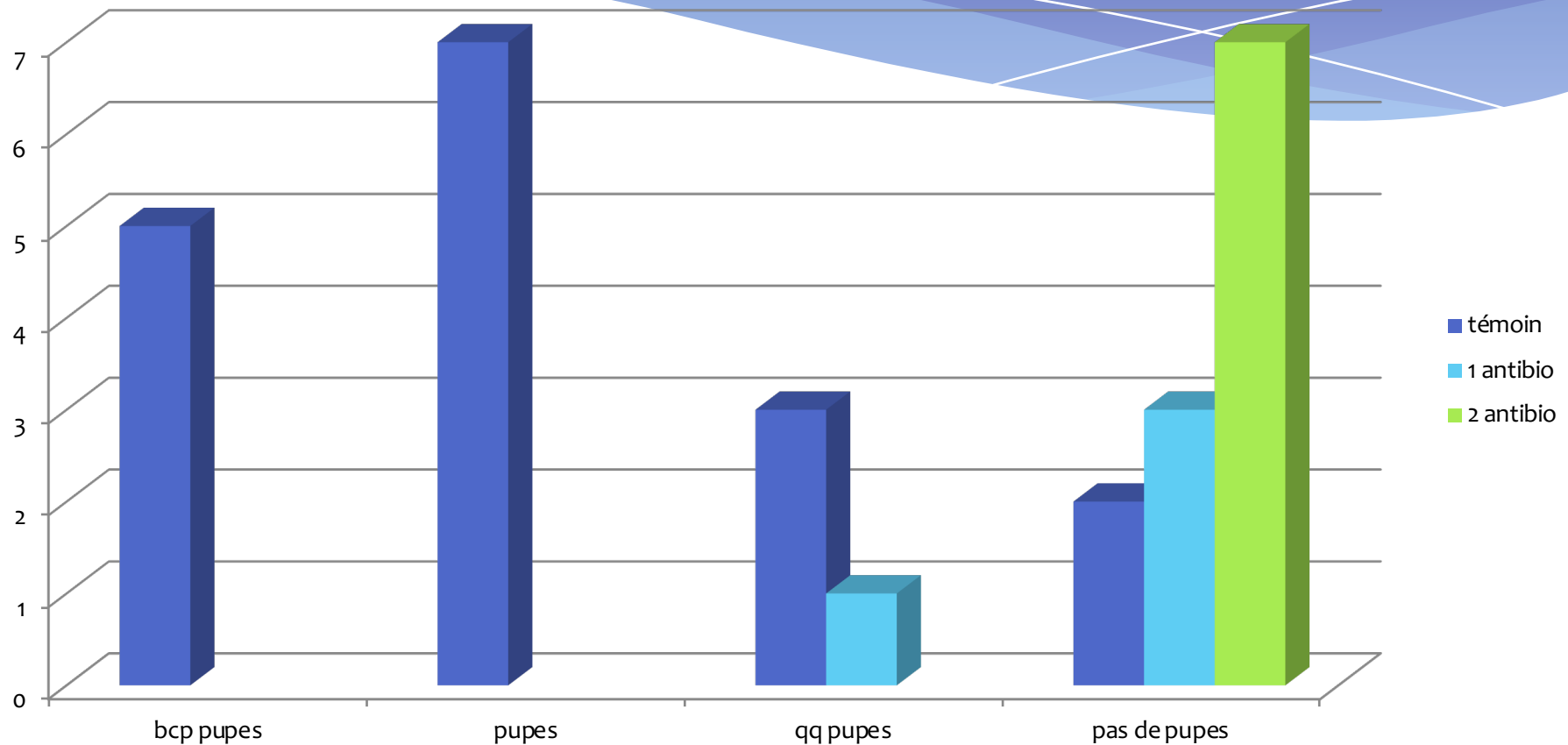


Les traitements avec un seul antibiotique et avec deux antibiotiques utilisés ensemble semblent décaler les distributions de l'histogramme de plus en plus vers la droite

Bilan pupaison

pupes	<u>bcp</u> pupes	pupes	<u>qq</u> pupes	pas de pupes
<u>tém</u>	5	7	3	2
<u>josa</u>			1	1
<u>amox</u>				2
<u>josa+amox</u>				2
<u>fungi+josa</u>				3
<u>fungi+amox</u>				2
<u>1 antibiotiq</u>			1	3
<u>2 antibiotiq</u>				7
<u>ts antibiotiq</u>			2	10

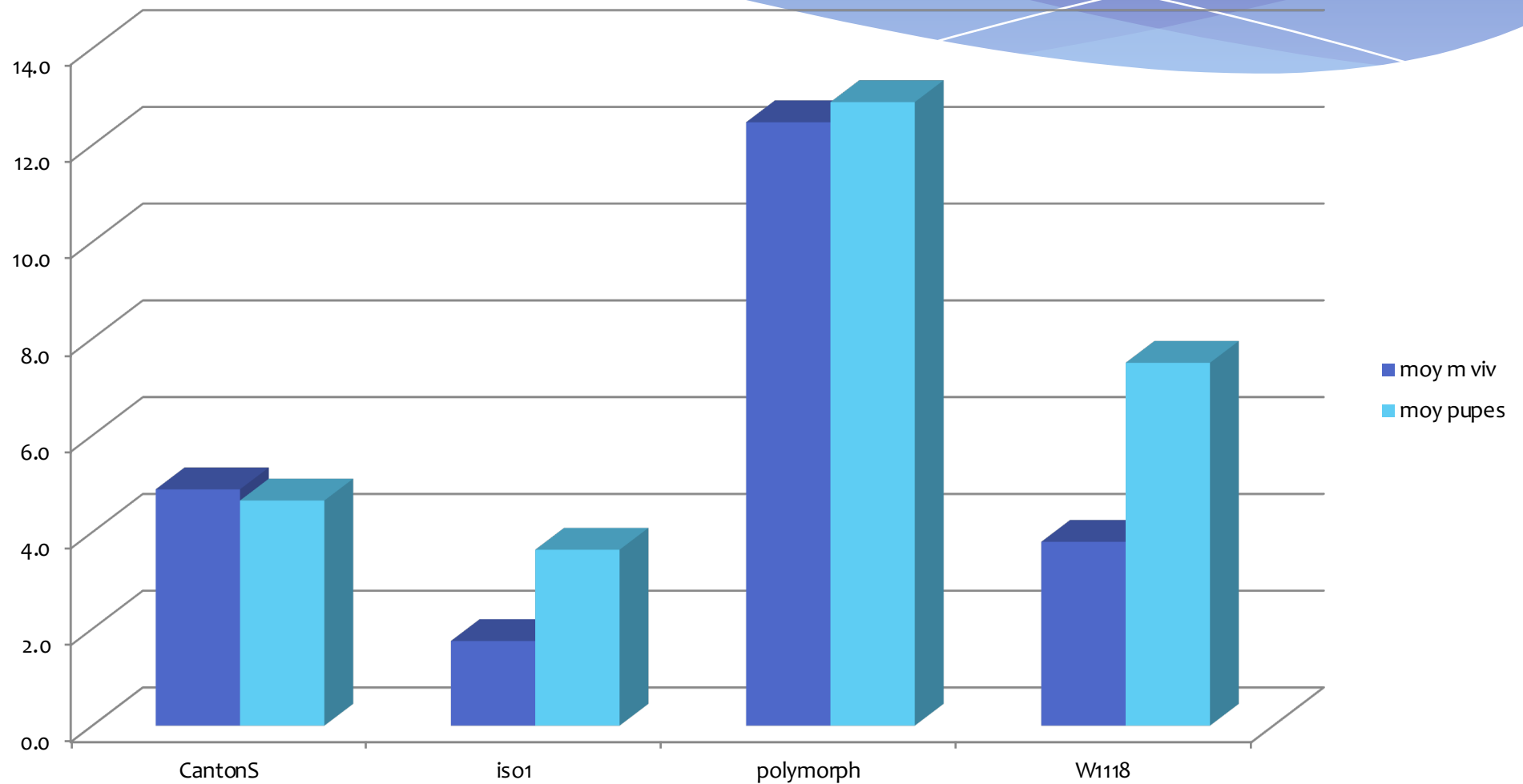
Réduction de la reproduction (pupaison) avec la pression d'antibiotiques



Conclusion

L'ensemble de ces résultats va donc dans le sens d'une modification du microbiote de la mouche drosophile provoquée par les conditions de culture et affectant l'état général de l'organisme

Des variations de capacité reproductrice suivant les souches



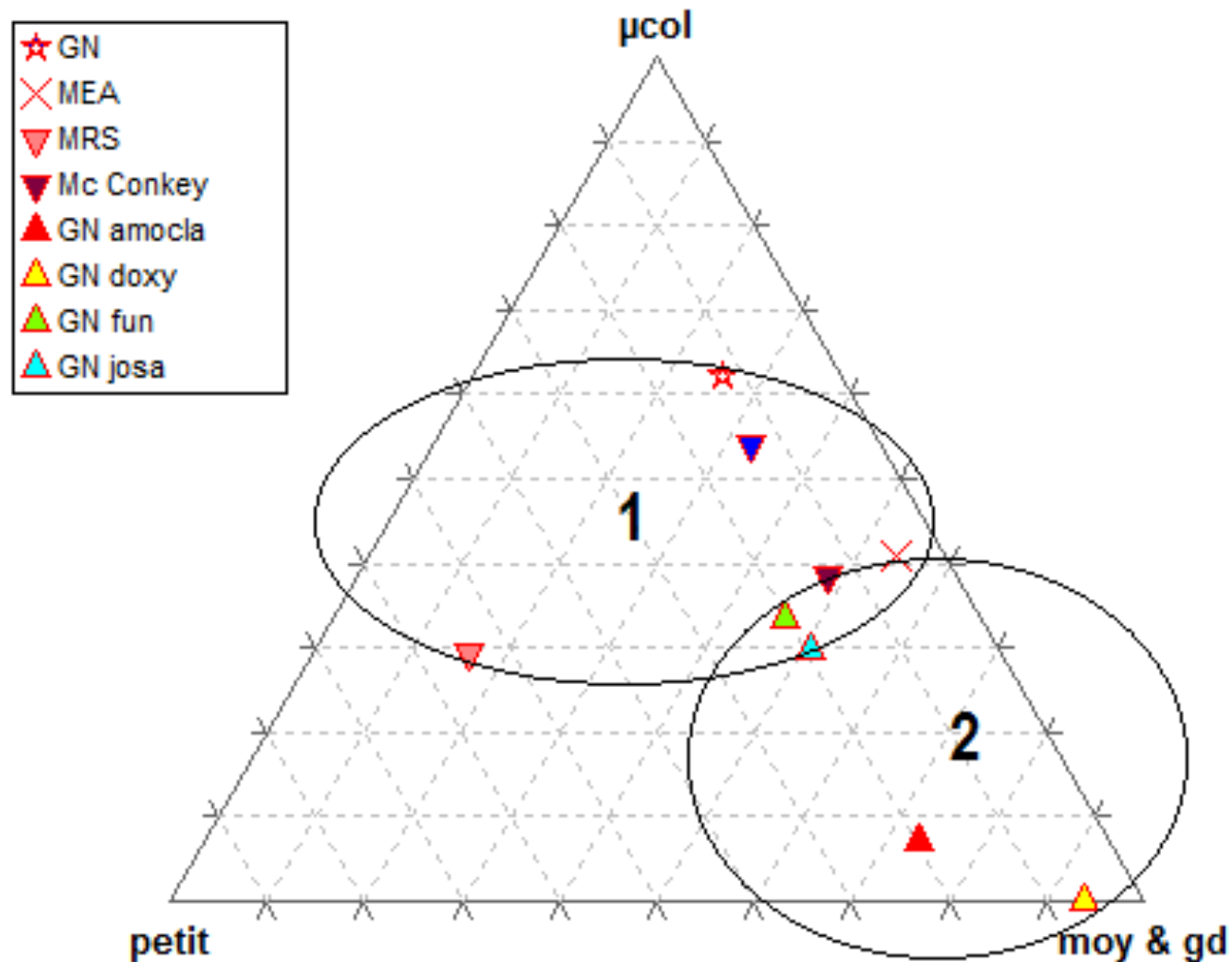
Des variations de capacité reproductrice suivant les souches

- * On montre ici que les différentes souches ou lignées de laboratoire testées présentent des capacités reproductives assez distinctes, la lignée population polymorphe (qui présente une diversité génétique assez élevée) se montrant supérieure aux trois lignées homozygotes

Les traitements antibiotiques modifient les populations
de microorganismes hébergés par les mouches

Quelques données complémentaires

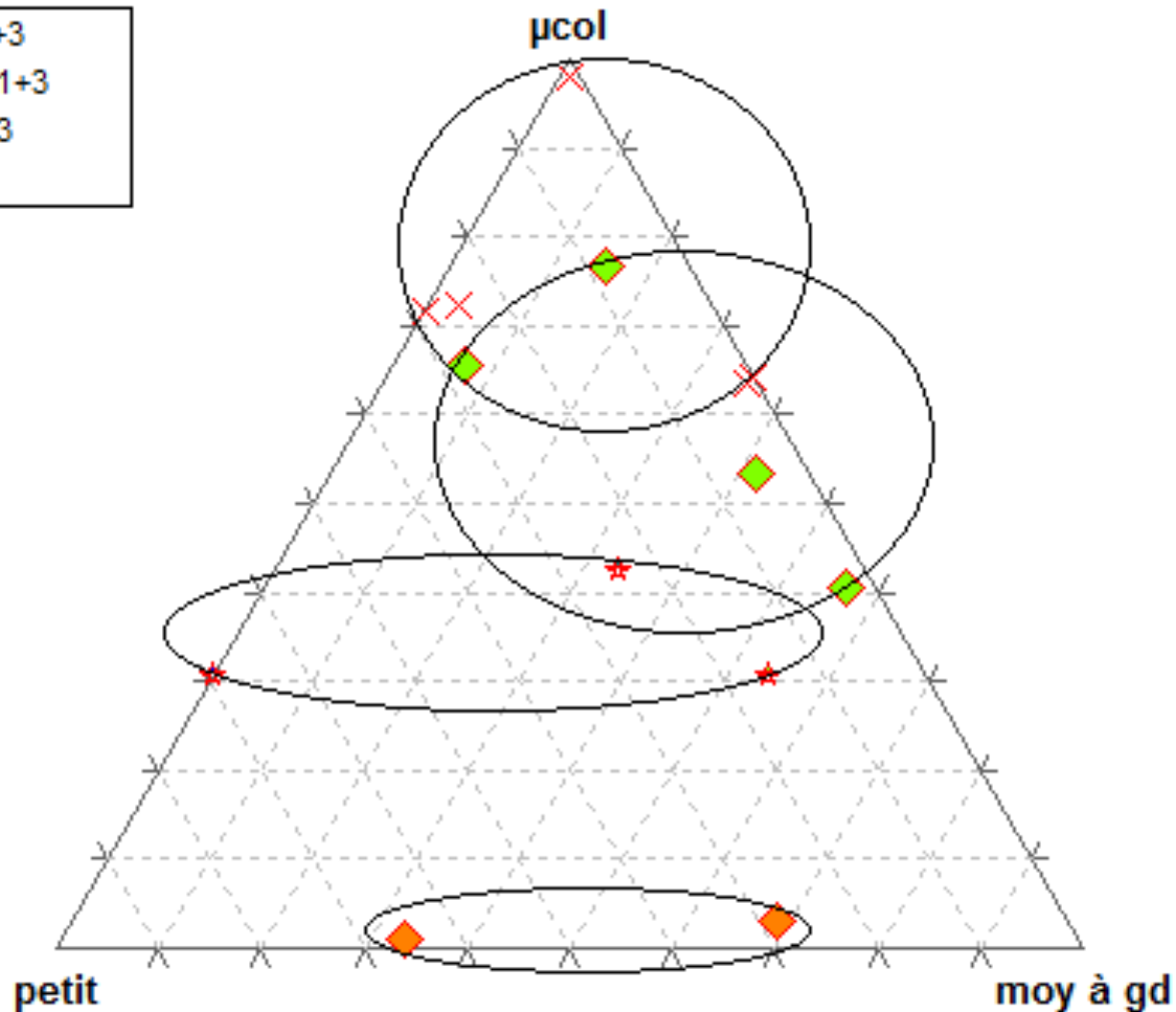
Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches



Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches

- * Les populations de microorganismes, obtenus ici en culture sur boîtes, sont différentes suivant que le milieu gélosé est additionné (2) ou non (1) d'un antibiotique
- * [ici, l'antibiotique est utilisé comme un crible sélectionnant les types de microorganismes qui vont se développer sur le milieu gélosé]

Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches



Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches

- * Les populations de microorganismes, obtenus ici en culture sur boîtes, sont différentes suivant que les mouches d'où l'on extrait ces microorganismes ont été élevées en présence ou non d'un antibiotique
- * [ici, l'antibiotique est utilisé comme un crible sélectionnant les types de microorganismes qui vont pouvoir se développer sur et dans le corps de la mouche]

Les traitements antibiotiques modifient les populations de microorganismes hébergés par les mouches

- * Un antibiotique comme la ***norfloxacin***, dans nos conditions, modifie le microbiote des mouches et favorise le développement sur milieu gélosé de ***microcolonies***
- * Au contraire, un antibiotique comme la ***spiramycine*** modifie le microbiote des mouches et favorise le développement de colonies de taille ***petites*** et ***moyennes à grandes***
- * Dans ces conditions, les mouches ***témoins*** apparaissent héberger un microbiote plus ***différencié*** avec les trois types de colonies présentes

Une approche expérimentale du
microbiote au lycée avec la
Drosophile

Marseille, 8 octobre 2021

Hervé Levesque, Lycée Jean Pierre Vernant à
Sèvres (92) et gt-microbes, immunité et
vaccination, Ifé-ENS de Lyon