

# Protocole d'étude du microbiote de la Drosophile

## Introduction

Le **microbiote** est l'ensemble des microorganismes (virus, bactéries, archées, champignons, protozoaires, nématodes, etc.) présents sur et dans le corps des organismes eucaryotes pluricellulaires. En ce qui nous concerne seuls bactéries et champignons seront étudiés.

Anciennement qualifié de **microflore**, le microbiote est l'objet de très nombreuses études récentes, avec des résultats parfois spectaculaires et de potentielles retombées médicales importantes en particulier pour le traitement des maladies métaboliques comme le diabète de type 2, les maladies cardio-vasculaires ou encore l'obésité. Ce renouveau de la microbiologie a été rendu possible par **les techniques d'amplification et de séquençage de l'ADN**, la culture des organismes le plus souvent anaérobies n'étant plus un préalable nécessaire à leur caractérisation. L'analyse à haut débit des séquences d'ADN couplées à des analyses bio-informatiques des génomes et des contenus en gènes des organismes, permet d'établir des portraits robots de chaque espèce présente, voire des populations d'espèces et mieux encore des communautés de microorganismes (métagénomique).

Cet intérêt pour le microbiote se traduit également par son entrée dans les **programmes de SVT du secondaire (cycle 4 au collège et maintenant classe de seconde au lycée)**. Afin de développer une approche expérimentale sur ce sujet, il a semblé opportun de s'intéresser à la **mouche Drosophile** une des espèces-modèle favorites des biologistes. En plus de son faible coût, la drosophile a en effet un cycle de vie court (10 jours à 29°C de l'œuf à la mouche adulte), et est facilement manipulable par les élèves, sans danger et dans des conditions de culture peu exigeantes.

## Plan du document :

### **I. Repiquage des mouches**

### **II. Préparation des milieux pour les tests physiologiques et microbiologiques**

### **III. Ecrasement des mouches et réalisation des tests physiologiques et microbiologiques**

### **IV. Résultats**

## **I. Repiquage des mouches**

### **A - Milieu de culture pour Drosophile**

De très nombreuses recettes de milieux (et des astuces d'élevage) pour cultiver les drosophiles se trouvent dans la littérature scientifique et sur internet (les mouches sont souvent utilisées comme proie vivante pour l'élevage d'autres animaux, ex reptiles et batraciens). Les fournisseurs des établissements scolaires commercialisent également des préparations prêtes à l'emploi (nous utiliserons pour sa simplicité d'utilisation celle proposée par Sordalab). Le milieu de culture de base (comportant les sources de carbone et d'azote, l'essentiel des « compléments alimentaires », vitamines, oligoéléments, etc. étant apporté par les levures dont les mouches se nourrissent). Il est par la suite nommé milieu témoin [tém].

Les milieux de culture sont rendus **sélectifs** par addition d'un **antibiotique** (des antibactériens comme la josacine [josa] et l'amoxicilline [amo] ; un antifongique, la fungizone [fun]), utilisé seul ou en combinaison. D'autres possibilités existent, différents conservateurs pouvant être utilisés (vinaigre, sorbate, benzoate, autres additifs alimentaires).

### **B - Manipulation des mouches**

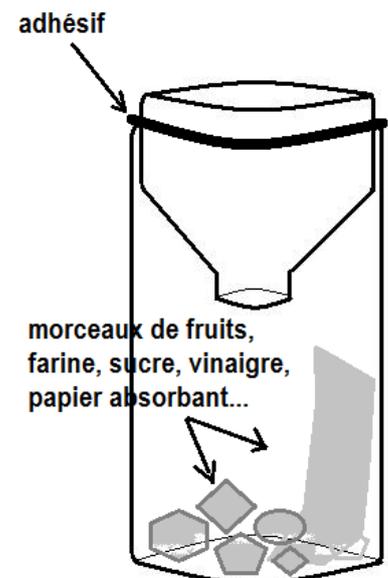
Les flacons contenant les mouches sont placés au réfrigérateur ou sur de la glace, ce qui a pour effet de faire entrer les mouches en léthargie. Une alternative est l'utilisation d'un dispositif d'éthérisation pour endormir les mouches. Son usage est délicat, il faut travailler avec des gants et sous hotte, il faut surtout bien « doser » la substance endormissante pour qu'elle agisse suffisamment rapidement, durablement mais sans toutefois endormir définitivement les mouches... Des kits commerciaux existent pour ce produit (« FlyNap ») et matériel (dans les laboratoires de recherche les mouches sont endormies avec du CO<sub>2</sub>).

Les mouches endormies peuvent alors être transférées dans un nouveau flacon de culture, être observées ou subir tout autre traitement. Les larves quant à elles du fait de leur faible mobilité peuvent être facilement manipulées et déplacées avec des pinces fines ou tout autre outil de préhension adapté à la taille et la résistance de l'animal.

### **C - Souches de Drosophile**

Différentes souches de Drosophile (souche sauvage, différents mutants), en premier lieu de l'espèce *Drosophila melanogaster*, peuvent être obtenues auprès des fournisseurs des établissements scolaires, ou auprès des laboratoires de recherche. Il s'agit le plus souvent de lignées homozygotes, plus rarement de populations génétiquement polymorphes (lesquelles ont – à la différence des lignées pures - comme intérêt de se rapprocher davantage de la situation observées dans les populations naturelles). Une autre option est de récupérer des larves qui se développeront en pupes puis en adultes, les pupes étant plus fragiles et difficiles à transférer

Des captures peuvent être effectuées dans la nature avec un dispositif de bouteille en plastique que l'on découpe au tiers supérieur : on place des morceaux de fruits, éventuellement un peu de farine, de sucre, on acidifie légèrement, on place un papier pour absorber l'excès d'humidité (afin que les mouches ne se noient pas au fond de la bouteille) et sur lequel pourront s'effectuer les pontes, les déplacements des larves ou la fixation des pupes ; on retire le bouchon et on retourne la partie découpée qui est fixée de manière étanche avec un adhésif (schéma ci-contre). Les mouches entrent dans la bouteille et, suivant les parois pour remonter, y restent piégées. La partie difficile est l'opération pour récupérer ces mouches depuis le piège pour les introduire dans un flacon de culture classique (un linge pour masquer la partie piège et un éclairage de la partie où l'on veut transférer les mouches, peut faciliter le déplacement spontané des mouches).



## **II. Préparation des milieux pour les tests physiologiques et microbiologiques**

### **A - Préparation des milieux gélosés pour les tests microbiologiques**

Il est possible d'expérimenter avec des milieux plutôt "généralistes" permettant la culture de nombreux micro-organismes (bactéries et champignons) ou avec d'autres milieux plus restrictifs que l'on qualifie classiquement de milieux sélectifs, ou encore de combiner les deux.

Dans les mêmes conditions que celles décrites ci-avant pour les milieux de culture des mouches, les milieux de culture des microorganismes sont rendus **sélectifs** par addition d'un **antibiotique** (des antibactériens comme la josacine [josa] et l'amoxicilline [amo] ; un antifongique, la fungizone [fun]). Le milieu McConkey qui sélectionne les bactéries gram- correspond à une situation intermédiaire entre un milieu généraliste et un milieu sélectif. Nous verrons également que l'utilisation de géloses relativement épaisses permet d'observer quelques microbes anaérobies qui ne se développent qu'au fond de la boîte de Petri !

### **B - Réalisation de tests physiologiques**

Les milieux gélosés peuvent être additionnés d'un **substrat** donné, ce qui permet une mesure visuelle, qualitative, **d'activités physiologiques** (amidon/amylase ; gélatine/gélatinase ; cellulose/cellulase ; lait/lactase, protéase ou lipase ; lactase encore, sur le milieu MacConkey ; DNase, sur le milieu DNase ; etc.). Ces activités physiologiques (et de fait les activités enzymatiques sous-jacentes) peuvent également être mesurées par des tests du type Biolog<sup>R</sup> ou galerie d'identification API que nous essayons de mettre en œuvre (par une approche « fait-maison »). Le principe étant d'utiliser un indicateur redox (le **tétrazolium**) dont le virage de couleur nous signale la présence dans l'extrait testé d'une activité enzymatique réagissant avec le substrat fourni (glucide, lipide, protide, acide organique...). Des enzymes comme l'invertase, la lactase ou la glucose oxydase, souvent utilisées en lycée, peuvent être utilisées comme témoin positif.

### **III. Ecrasement des mouches et réalisation des tests physiologiques et microbiologiques**

L'écrasement de mouche individuelle permet d'effectuer l'ensemble des tests (y compris l'amplification d'ADN par PCR, voir note à la fin). La mouche est placée dans un microtube d'1,5 mL. Une désinfection-stérilisation de surface (dans 50 à 100 µL d'éthanol 70%, on bouche et on retourne plusieurs fois le tube, on élimine le liquide et on rince 2 fois avec du sérum physiologique stérile) est nécessaire afin de distinguer le microbiote présent **sur le corps** de la mouche et éliminé par la stérilisation de surface, du microbiote présent **dans le corps** de la mouche. Le microbiote présent sur le corps de la mouche est déduit par différence entre le microbiote total (sans stérilisation de surface) et le microbiote endogène (obtenu après stérilisation de surface).

La mouche est écrasée manuellement dans 100 µL de sérum physiologique stérile avec un cône jaune ou un micropilon, ou à l'aide d'un micropilon mis en mouvement par un moteur (comme nous le ferons lors du stage ; **homogénéiseur pour microtube avec adaptateur pour micropilon de la Sté Deutscher, réf catalogue 947820**). Le volume est complété à 1 mL avec du sérum physiologique stérile.

Pour les étalements sur boîte, on utilise une anse d'inoculation en plastique jetable dont la boucle permet de prélever un volume fixe, 10 µL dans notre cas (il existe également un modèle d'anse avec boucle permettant de prélever seulement 1 µL). Le liquide prélevé (après homogénéisation du tube contenant l'extrait) est déposé sur un bord de la gélose et étalé par dilution en stries serrées successives sur environ ¼ à 1/5 de boîte, mouvement répété donc 4 ou 5 fois pour répartir le volume d'extrait sur la totalité de la surface de la boîte.

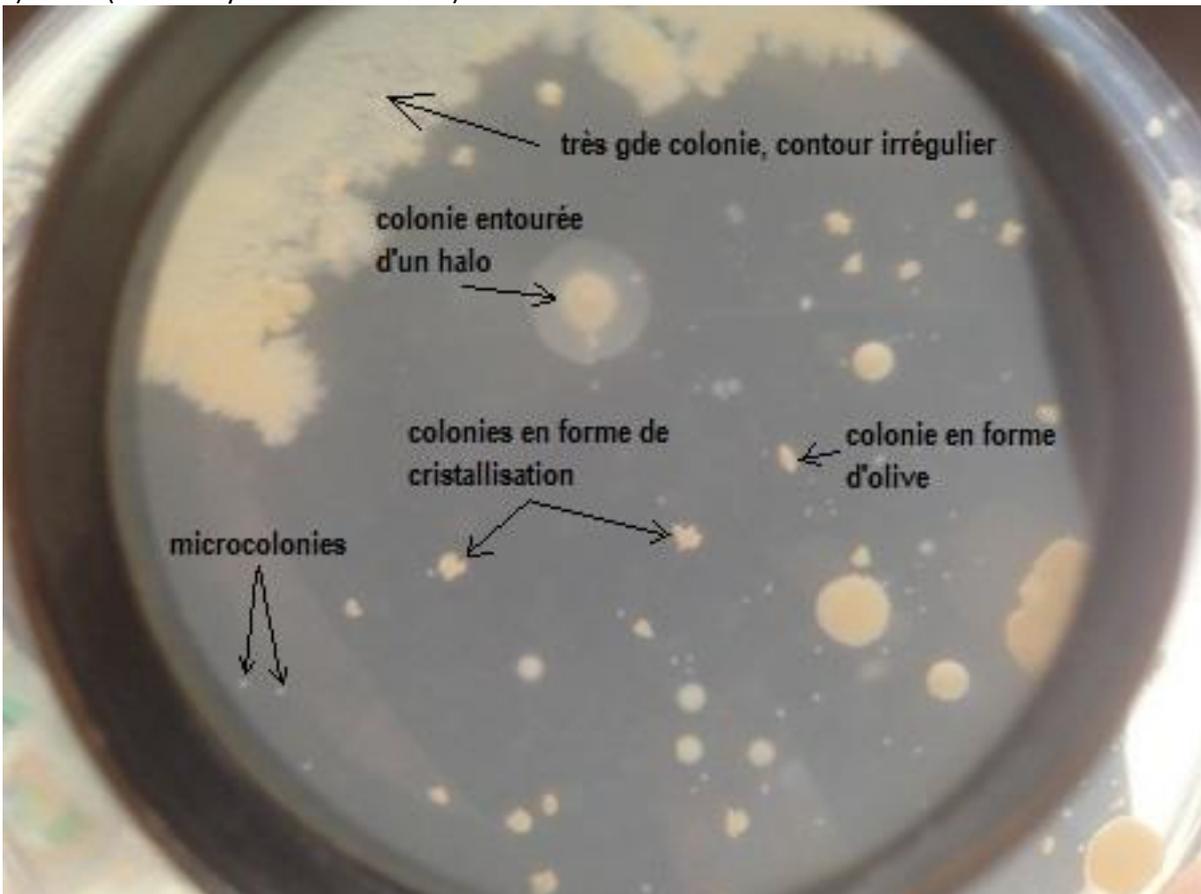
Les boîtes sont ensuite mises à incuber, à température ambiante ou dans une étuve (entre 25 et 30°C). Les lectures des boîtes peuvent se faire – en général, cela peut varier un peu selon les milieux - au bout de 24h pour les microorganismes se développant très rapidement (principalement les bactéries), il faudra quelques jours pour ceux se développant plus lentement (par ex certains champignons). Les boîtes peuvent ensuite être conservées plusieurs jours à 4°C avant observation.

#### IV. Résultats

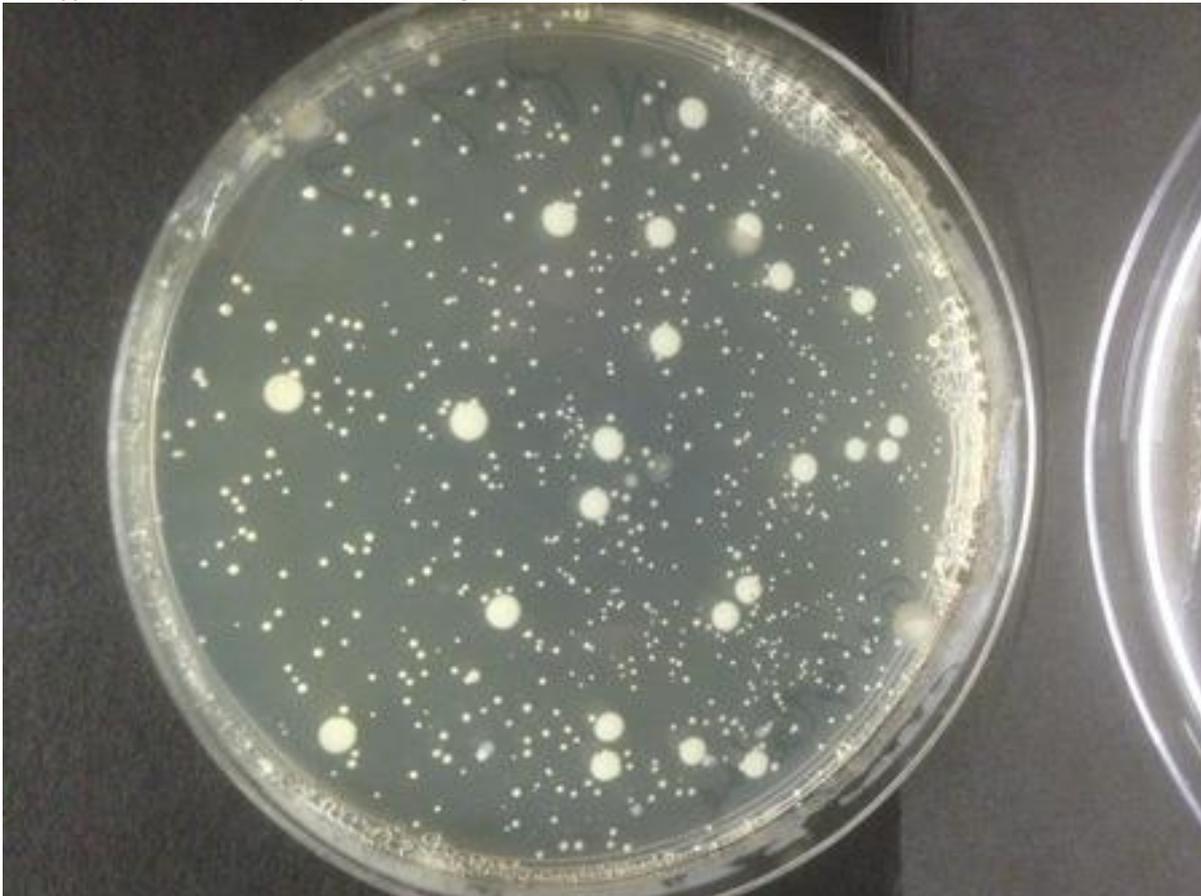
a) Diversité des colonies obtenues ex sur gélose DNase (utilisées ici comme une gélose Tryptone classique) :



b) Zoom (la boîte ayant été retournée) :

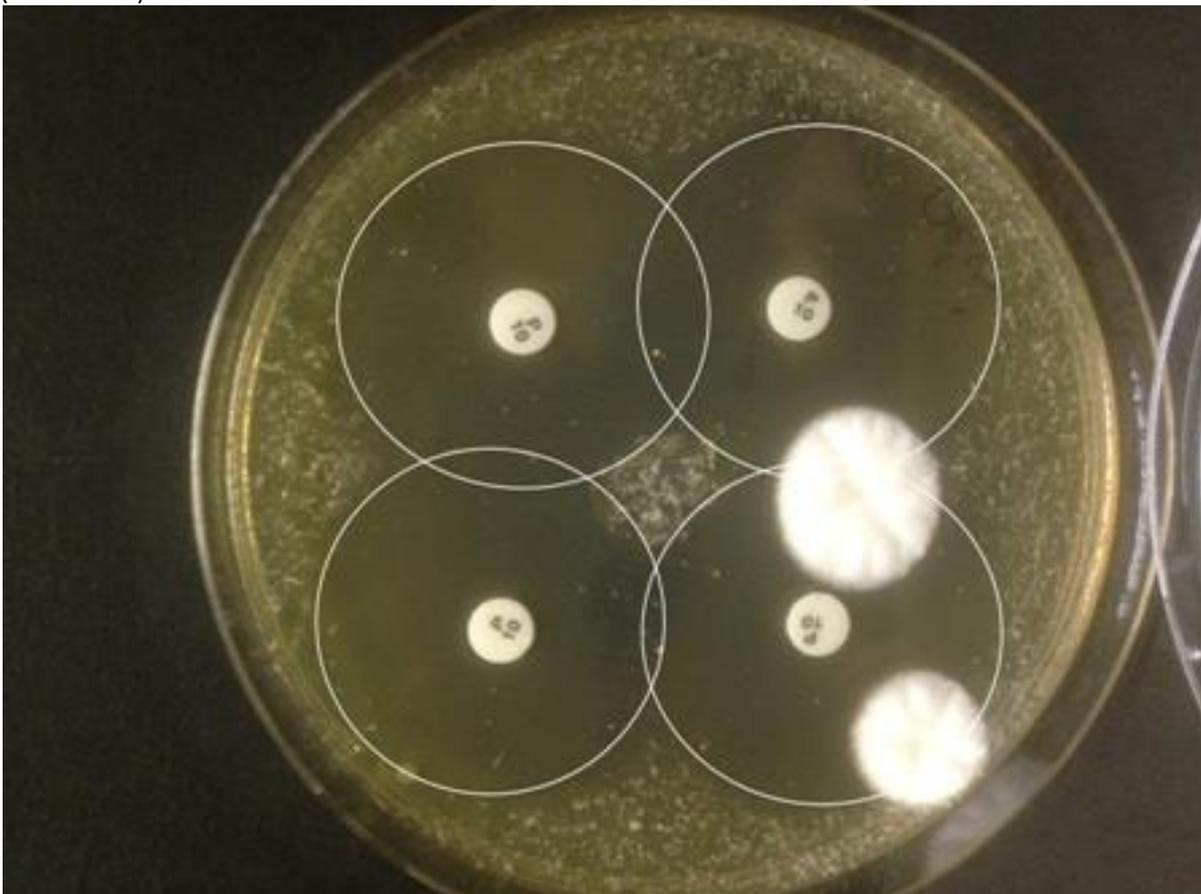


c) 2 types de colonies majoritaires sur gélose (GN) au lait :

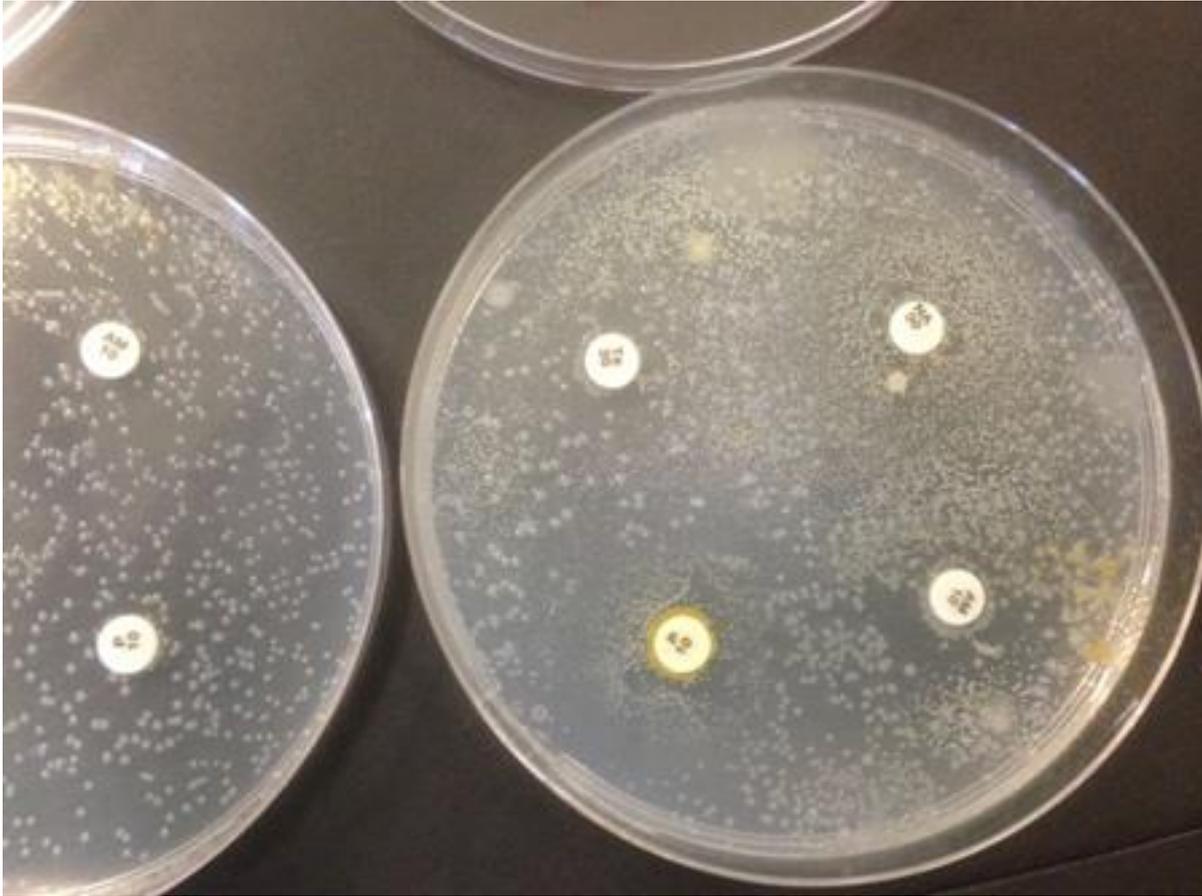


5

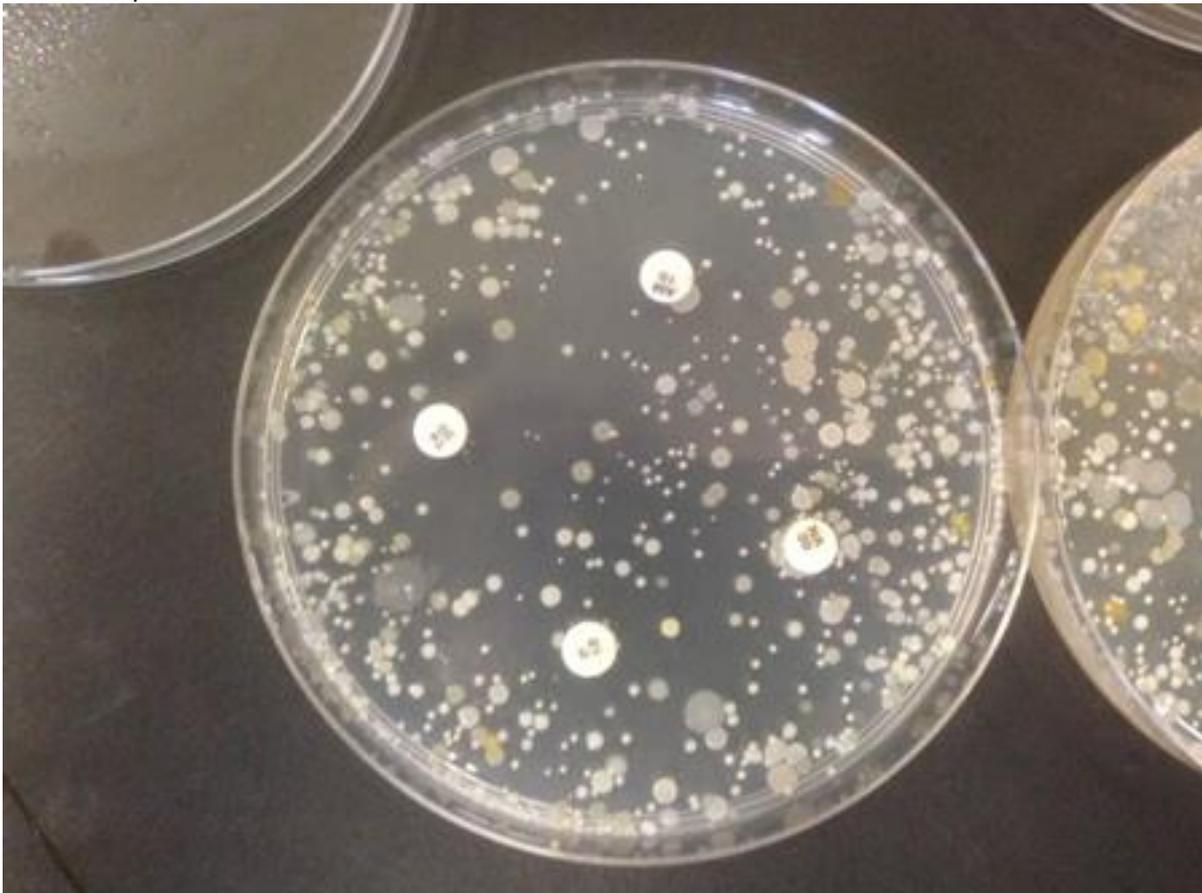
d) Traitement avec pastilles d'antibiotique (Pénicilline) : on a souligné le contour du halo d'inhibition de croissance des bactéries, inhibition à laquelle ne sont pas sensibles les 2 moisissures présentes sur la boîte (milieu YPD).



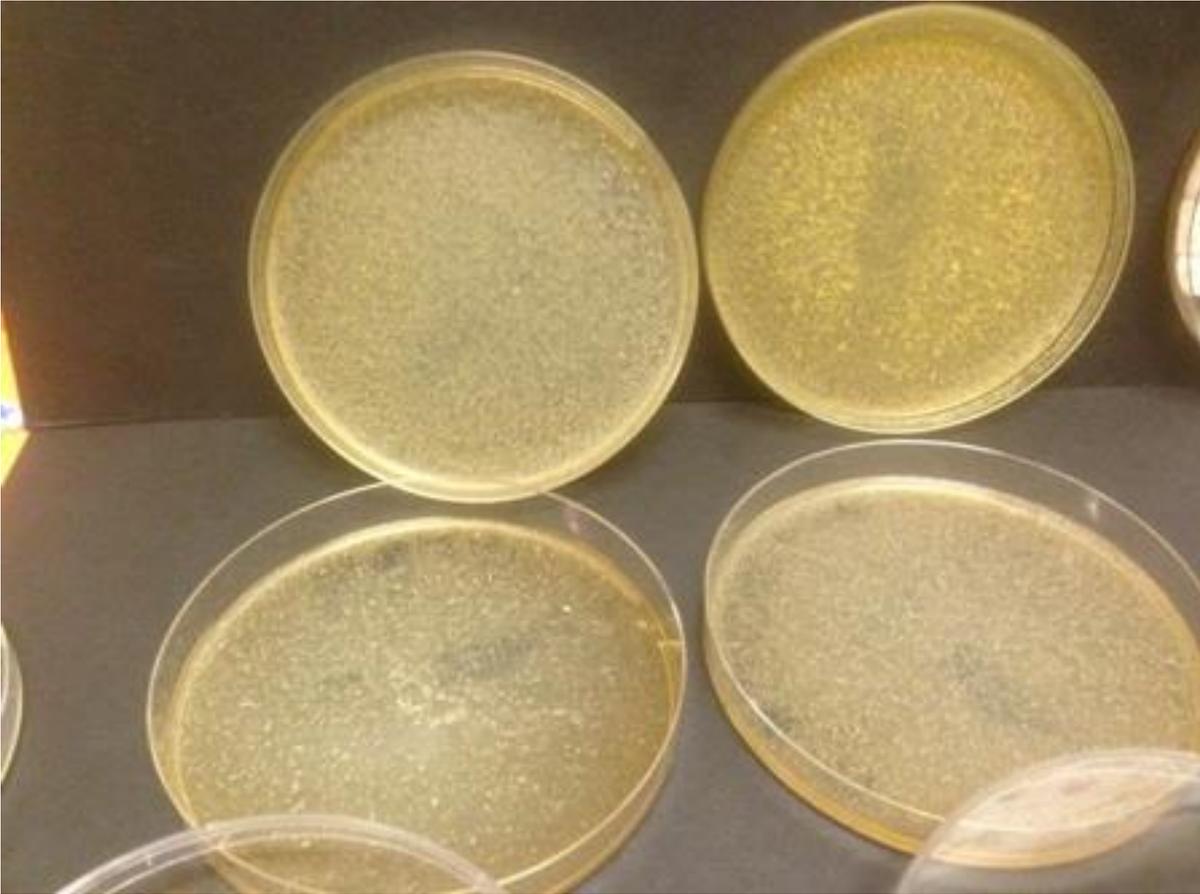
e) Extrait de mouche cultivée sur josacine déposé sur gélose (GN) contenant 4 pastilles d'antibiotiques distincts :



f) Extrait de mouche cultivée sur fungizone déposé sur gélose (GN) contenant 4 pastilles d'antibiotiques distincts:



g) Des colonies de bactéries majoritaires sur géloses (YPD) témoin ou avec antifongique :



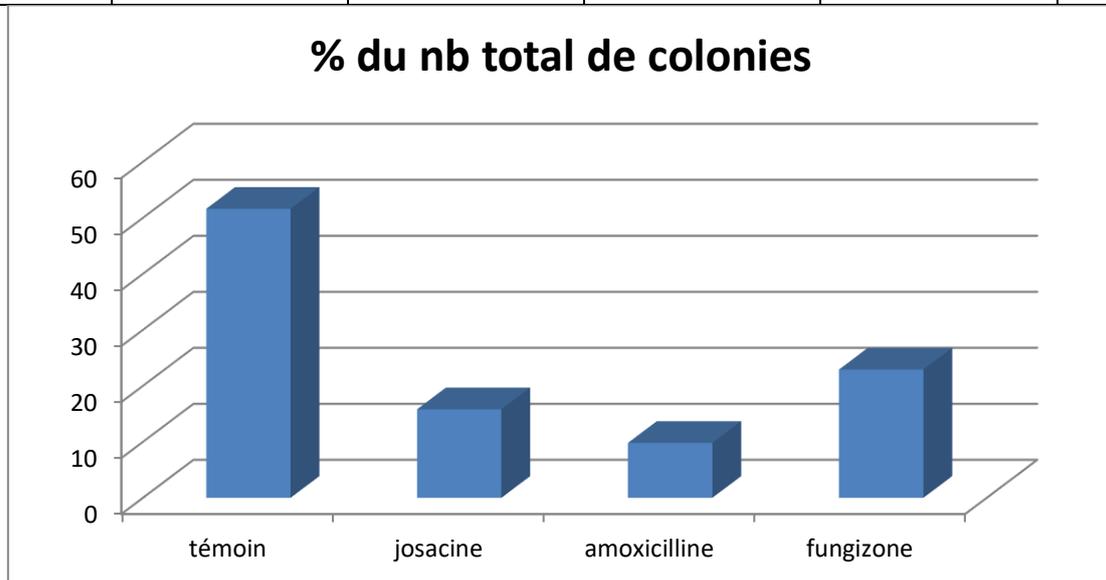
h) Des colonies de moisissures majoritaires sur géloses (YPD) avec antibactériens josacine ou amoxicilline :



## 1) Abondance des microorganismes

nb moy de colonies observées sur les boîtes de gélose (en % du nb total de colonies)

| souche               | estimation 1 | estimation 2 | estimation 3 | estimation 4 | moyenne     |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| témoin               | 56,1         | 38,3         | 34,9         | 76,9         | <b>51,6</b> |
| josacine             | 7,5          | 16,1         | 36,2         | 3,3          | <b>15,8</b> |
| amoxicilline         | 8,6          | 12           | 9,7          | 9            | <b>9,8</b>  |
| fungizone            | 27,8         | 33,6         | 19,2         | 10,8         | <b>22,9</b> |
| nb total de colonies | 478          | 342          | 610          | 3900         | -           |



Exprimés sous cette forme, les résultats sont assez clairs :

- Tous les traitements avec antibiotique conduisent à une diminution du nombre de microorganismes présents chez les mouches.
- Toutefois, dans le détail, les choses sont moins évidentes et la variabilité est grande, en particulier les résultats obtenus avec les mouches cultivées sur josacine.
- Dans certains cas, les résultats d'abondance sont supérieurs pour l'essai avec antibiotique que pour le lot témoin, ce qui pourrait suggérer que des mécanismes inhibiteurs existent chez les mouches, mécanismes tels que certaines populations de microorganismes seraient limitées dans leur développement (colonisation) par la présence d'autres microorganismes (ou du fait des mouches elles-mêmes). On a en particulier envisagé que les populations de champignons (moisissures) pouvaient être freinées dans leur développement par les bactéries (images g et h ci-avant). Un essai a été réalisé en déposant des carrés de gélose contenant des colonies de bactéries sur des boîtes ensemencées avec des extraits de mouches dans des conditions favorisant le développement des champignons. Dans ces conditions on n'a observé aucun effet, le développement des moisissures n'étant nullement gêné !

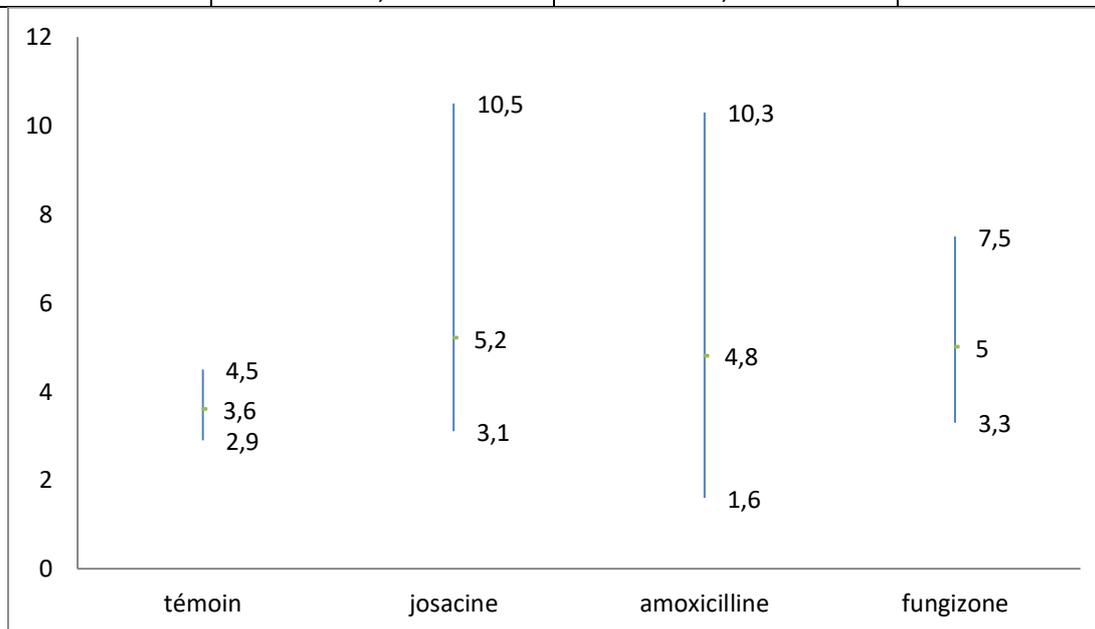
### **Rmq. Estimation de la taille du microbiote**

Nous pouvons tenter cette estimation (qui sera certainement grossière) en prenant l'effectif de colonies le plus élevé que nous ayons 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 :  $(3000 / 10 \mu\text{L}) \times 1000 \mu\text{L} = 3 \times 10^5$ . Les données de 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.

## 2) Diversité des microorganismes

La diversité des types de colonies de microorganismes observées sur boîtes est supérieure à celle des mouches témoin pour l'ensemble des 3 traitements :

| souche       | min | max  | moy        |
|--------------|-----|------|------------|
| témoin       | 2,9 | 4,5  | <b>3,6</b> |
| josacine     | 3,1 | 10,5 | <b>5,2</b> |
| amoxicilline | 1,6 | 10,3 | <b>4,8</b> |
| fungizone    | 3,3 | 7,5  | <b>5</b>   |



- La présentation sous la forme min/max/moy montre assez nettement cette relation, qui comme précédemment pour l'abondance souffre 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 ».

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

## 3) Comportement des mouches

On peut finalement corréliser 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               |

## Ccl

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

Perspectives : ***Un mot sur la PCR.***

---

10

Nos premiers essais montrent que l'amplification à partir d'un extrait issu d'une seule mouche et traité par simple ébullition est possible. Les amorces utilisées sont pour les bactéries l'ADNr 16S, pour les champignons l'ADNr 18S et l'espaceur ITS. Toutefois une double amplification est parfois nécessaire et des anomalies de taille des amplicons sont constatées. En outre un traitement des amplicons par digestion avec des endonucléases de restriction sera nécessaire pour espérer mettre en évidence des polymorphismes liés à des différences dans les populations de microorganismes. Cette partie de notre travail demande donc des mises au point complémentaires que nous n'avons pas pu faire dans le cadre de la préparation de ce stage.

## Remerciements

---

- \* **Pierre Capy**, Professeur, Université Orsay-Paris Sud
- \* **Frédéric Marion-Pol**, Professeur, AgroParisTech
- \* **Jean-Luc Da Lage**, DR CNRS
- \* **Nadège Beaudoin**, labo SVT lyc JPV Sèvres
- \* **Nathalie Davoust-Nataf et Chloé Journo**, équipe ACCES Ifé-ENS Lyon
- \* **Annick Boulanger**

Hervé Levesque, professeur de Sciences de la Vie et de la Terre  
Lycée Jean Pierre Vernant à Sèvres (92), équipe ACCES-Ifé-ENS de Lyon.

03.03.2019