

Le dénombrement bactérien *in vivo* : une méthode de quantification de bactéries dans l'intestin de drosophile

Olivia Benguettat-Magliano¹, Marie-Paule Esposito¹

Résumé. Pour étudier la réponse physiologique *in vivo* de l'intestin de drosophile à l'ingestion d'une bactérie, nous avons besoin de dénombrer les bactéries dans l'intestin qu'elles soient exogènes ou commensales. Pour cela, nous avons mis au point une méthode fondée sur des techniques de microbiologie ainsi que des techniques d'intoxication et de dissection des drosophiles. Fiable et reproductible, cette méthode a été appliquée à différentes bactéries et transposée à d'autres tissus ou insectes avec succès.

Mots clés : bactérie, dénombrement, drosophile, intestin, *Bacillus thuringiensis*

Introduction

Pour respecter le plan Ecophyto 2 qui prévoit une réduction de 50% de l'utilisation des pesticides chimiques, les bioinsecticides devront, d'ici là, remplacer au moins partiellement les insecticides chimiques. Les bioinsecticides sont produits à partir d'organismes vivants tels que les bactéries, les virus ou les plantes, ou des substances que ces organismes produisent. Parmi ces insecticides biologiques, les spores de *Bacillus thuringiensis* (Bt) voient leur utilisation augmenter depuis plusieurs années : elles représentent aujourd'hui plus de 70% des bioinsecticides vendus dans le monde. Les bioinsecticides Bt sont principalement utilisés en agriculture biologique contre les lépidoptères ravageurs et dans le secteur forestier contre la chenille processionnaire du pin ; ils sont également utilisés pour lutter contre les moustiques. Bt est une bactérie du sol appartenant au même groupe que *B. cereus* et *B. anthracis*. Au cours de la sporulation, Bt forme un corps d'inclusion cristallin contenant des toxines appelées Cry. Six souches de Bt sont actuellement commercialisées sous forme de spores produisant les toxines Cry (Pardo-Lopez et al., 2012). Leur efficacité dans l'éradication des insectes nuisibles tient à leur toxicité aiguë qui est bien caractérisée. La toxicité chronique, c'est-à-dire une exposition à de faibles doses sur le long terme, n'est toutefois pas caractérisée sur les espèces non-cibles de l'écosystème, y compris les humains. Il est donc nécessaire de mieux identifier leurs effets néfastes potentiels à long terme afin d'évaluer les risques sur la santé humaine et sur l'environnement.

Notre laboratoire Bioinsecticides, Environnement et Santé (BES) travaille sur l'identification des effets non intentionnels du bioinsecticide Bt. Nous travaillons sur la drosophile (*Drosophila melanogaster*), qui présente de nombreux avantages. C'est un insecte modèle dont le génome a été entièrement séquencé et dont l'étude de la physiologie est facilitée par l'existence de nombreux outils et mutants. De plus elle est insensible à l'action aiguë des toxines de Bt utilisées en agriculture. Nos études se concentrent sur la réponse physiologique de l'intestin *in vivo* à l'ingestion d'une bactérie exogène comme Bt. Pour cela, il est important de connaître, en amont, la quantité de bactéries ingérée ainsi que leur persistance dans l'intestin.

Cet article présente une méthode fiable de quantification de bactéries exogènes ou commensales présentes dans l'intestin de drosophile. Elle repose sur des techniques de microbiologie, de préparation d'inoculum et de dénombrement bactérien, ainsi que des techniques d'infection et de dissection de drosophiles. Les améliorations apportées par cette méthode sont de deux ordres : d'une part elles permettent une meilleure validation des effets

¹ Unité Institut Sophia Agrobiotech, INRA, Université Nice Sophia Antipolis, CNRS, 06900 Sophia Antipolis, France
olivia.magliano@inra.fr

observés suite à l'intoxication effectuée à différentes doses ; d'autre part elles permettent de déterminer avec précision les intervalles de concentration promoteurs de chaque type d'effet.

Dans une première partie sont décrits les différents aspects de cette méthode. Elle consiste tout d'abord à préparer le matériel biologique (élevage des drosophiles) puis à réaliser des courbes de croissance afin de standardiser le nombre de bactéries. Nous détaillerons ensuite la préparation de l'inoculum utilisé pour intoxiquer les drosophiles. Enfin nous montrerons comment dénombrer les colonies bactériennes après dissection et broyage des intestins.

La deuxième partie nous permettra de concrétiser l'intérêt de cette méthode à travers un exemple d'application réalisé avec une souche de Bt très utilisée en agriculture.

Méthode de quantification de bactéries exogènes dans les intestins de drosophiles

Préparation du matériel biologique

Elevage des drosophiles

Soixante individus adultes (40 femelles et 20 mâles) sont placés pour accouplement et ponte pendant 48 h dans une bouteille contenant du milieu nutritif à 22-24°C. Les larves ainsi obtenues se développent durant 9 jours jusqu'à l'émergence de nouveaux adultes. (**Figure 1**). Les femelles émergentes sont alors récupérées. Elles sont élevées à 25°C pendant 5 jours avant d'être infectées avec des bactéries, ce temps étant nécessaire à la maturation de l'intestin.

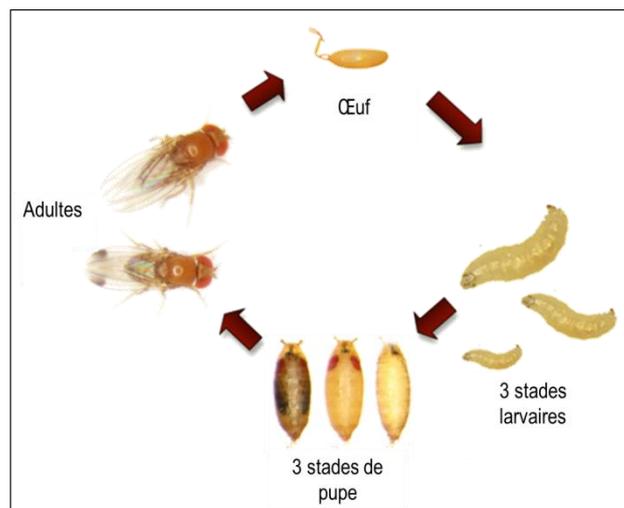


Figure 1: cycle de vie de drosophile
Modifié à partir de WSU Brand Website

Figure 1. Après la ponte qui commence au deuxième jour de vie de l'adulte, on observe quatre phases. La phase embryonnaire (œuf) qui dure 22 h, la phase larvaire qui dure 5 jours répartie en trois stades, la phase pupale qui dure 4 jours passant par trois stades et la phase adulte qui dure environ 50 jours. Les temps donnés sont pour une température de 25°C.

Culture bactérienne

Les cultures sont réalisées dans un milieu favorable à une pousse rapide, le plus utilisé étant le Lysogeny Broth (LB) contenant du NaCl, des extraits de levure et du tryptone. Un mL de milieu estensemencé avec une colonie, préalablement obtenue par isolation sur gélose, puis placé 8 h dans un incubateur-agitateur. Des cultures de 200 mL sontensemencées par la suite avec 200 µL de cette pré-culture. La culture se développe pendant 16 h. Les conditions expérimentales (milieu de culture, température, etc.) sont spécifiques à la bactérie utilisée. Par

exemple, *Escherichia coli* est cultivé dans du LB à 37°C sous agitation. Quant à *Lactobacillus plantarum*, elle poussera mieux dans un milieu tel que le MRS à 37°C sans agitation et en anoxie partielle.

Standardisation du nombre de bactéries pour les intoxications des drosophiles

Classiquement, la densité d'une culture bactérienne est estimée par sa turbidimétrie mesurée par l'absorbance d'un échantillon à 600 nm (A^{600}) à l'aide d'un spectrophotomètre. Cependant la croissance d'une bactérie comporte plusieurs phases dont seul la phase exponentielle est linéaire et permet donc d'établir un rapport de proportionnalité entre l'absorbance et le nombre réel de bactéries. Pour optimiser la fiabilité de ce rapport il est donc nécessaire de déterminer la phase exponentielle en réalisant une courbe de croissance bactérienne puis de valider ce rapport par dénombrement des bactéries après étalement de plusieurs dilutions de la culture.

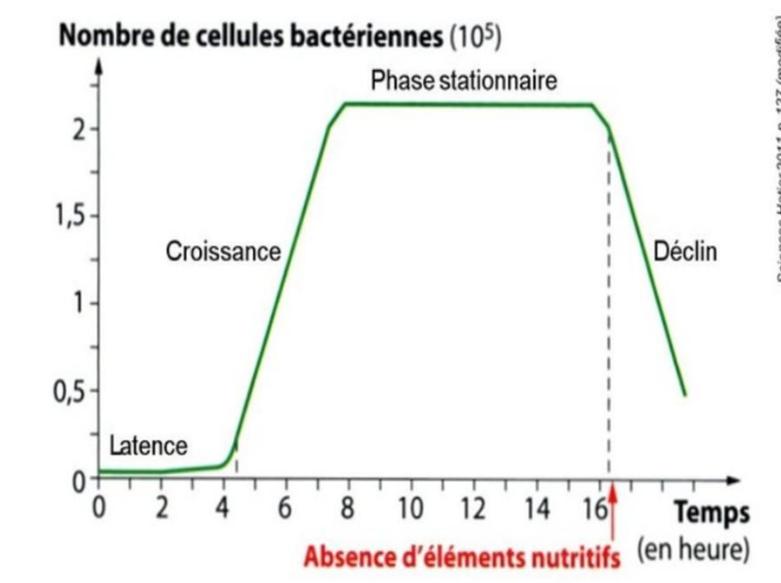


Figure 2: Courbe de croissance bactérienne
Modifié à partir de emaze.com

Figure 2. La phase de latence sépare le moment d'inoculation du moment où la croissance devient perceptible. Pendant la phase exponentielle les bactéries se multiplient et leur nombre double à intervalle de temps régulier. La phase stationnaire est atteinte quand les bactéries ne se multiplient plus ou quand il y a un équilibre entre les bactéries qui meurent et celles qui se divisent. La courbe se termine par la phase de déclin, les bactéries ne se divisent plus, elles meurent.

Courbe de croissance bactérienne

Une culture de 100 mL est réalisée à partir de 100 μ L de préculture. La phase exponentielle est déterminée à partir d'une courbe de croissance de la population obtenue en mesurant l'absorbance toutes les heures pendant 8 heures.

Dénombrement des bactéries en phase exponentielle

Une fois la phase exponentielle déterminée, on réalise trois dilutions en série au $1/10^6$ de la culture, puis on étale 100 μ L de chacune de ces dilutions à la surface de boîtes de gélose. Les boîtes sont incubées pendant 16 h. On compte les colonies et on détermine la quantité d'UFC (Unités Formant Colonie) pour une absorbance donnée. Ne sont prises en compte que les boîtes ayant entre 30 et 300 colonies afin de respecter les conditions standards en microbiologie.

Intoxication des drosophiles

Préparation de l'inoculum

Selon le nombre de conditions d'intoxication à tester nous devons déterminer le volume total de l'inoculum en sachant qu'il faut 50 μ L par condition. L'inoculum est un mélange de culture bactérienne et d'eau sucrée (5% saccharose final, poids/volume). Concrètement, une culture de volume V_i (100 mL) est initiée à partir de 100 μ L de préculture. Au bout de 16 h on en mesure l'absorbance à 600 nm, A_i . Si A_i est supérieur à l'absorbance souhaitée (A_f) la culture est diluée dans de l'eau sucrée de telle sorte que :

$$A_f \times V_f = A_i \times V_i \quad (1)$$

Si A_i est inférieur à A_f on centrifuge la culture à 2500g pendant 10 min à 22°C. Le culot obtenu est repris dans un volume final (V_f) de telle sorte que l'équation (1) soit vérifiée.

Intoxication des drosophiles

Pour une meilleure reproductibilité, nous avons standardisé la méthode d'intoxication des drosophiles. On réalise nos élevages dans des étuves à 25°C et avec une photopériode de 12 h de jour et 12 h de nuit. On fait jeûner 10 drosophiles pendant 2 h, puis on les intoxique en déposant 50 μ L d'inoculum sur du papier filtre, préalablement découpé à l'aide d'une perforatrice, dans un tube contenant du milieu nutritif. Puis on récupère les drosophiles intoxiquées à différents temps (30 min, 2 h et 4 h dans l'exemple d'application décrit plus loin).

Préparations des intestins de drosophiles

Dissection des intestins

Afin d'éviter toute contamination par des bactéries exogènes autres que celles testées, les mouches sont trempées pendant 30 s dans de l'éthanol à 70%, puis rincées à l'eau distillée. A l'aide d'une loupe binoculaire, on dissèque les intestins dans une coupelle contenant du tampon phosphate salin (PBS). Au fur et à mesure, on dépose les intestins dans un microtube de 1,5 mL contenant 500 μ L de PBS.

Broyage des intestins

Après obtention des huit intestins nécessaires pour un réplicat, on centrifuge 2 min à 2500 g pour culotter les intestins. Sous hotte bactériologique, on enlève le PBS à l'aide d'une pipette, on ajoute 200 μ L de milieu de culture de la bactérie et on broie les intestins à l'aide d'un piston stérile. Chaque expérience comporte un minimum de trois réplicats.

Dénombrement des colonies bactériennes

Le broyat est dilué dans le milieu de culture au 1/10^e en série 5 fois, puis on étale 100 μ L de chaque dilution sur gélose. Les boîtes sont incubées 16 h dans une étuve à 30°C ou 37°C. Puis nous dénombrons en surface les colonies et nous calculons ainsi le nombre de bactéries par intestin.

Application à la quantification de *Bacillus thuringiensis kurstaki* chez la drosophile

La dose recommandée pour l'utilisation du bioinsecticide *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) est de 1,25.10⁶ CFU par insecte-cible. Afin d'observer les différents effets potentiels de Btk, nous avons utilisé la dose recommandée et une dose 100 fois plus importante.

Préparation du matériel biologique

Transformation de Btk et standardisation du nombre de bactéries

Afin d'éliminer les faux-positifs susceptibles de se développer après étalement, notre équipe a transformé Btk en lui insérant un plasmide exprimant une protéine fluorescente (GFP -green fluorescent protein-) de manière constitutive (Btk-GFP). Après avoir réalisé la courbe de croissance de Btk-GFP, nous avons déterminé la quantité de bactéries pour une A^{600} donnée : pour 1 μL d'une culture à une A^{600} de 0,114 nous avons $8,3 \cdot 10^4$ CFU.

Intoxication des drosophiles

Préparation des inocula

La veille de l'expérimentation, nous avons préparé 200 mL de culture bactérienne de Btk dans du LB. Le lendemain matin on mesure l' A^{600} puis on prépare les inocula (**Tableau 1**). Dans un premier temps, nous avons préparé l'inoculum le moins concentré correspondant à une $A^{600} = 0,6$ en faisant une dilution. Puis avec le reste de la culture nous avons préparé l'inoculum à $A^{600} = 60$ en centrifugeant la culture. En reprenant le culot avec le volume trouvé par calcul on obtient une $A^{600} = 60$. Dans les préparations nous avons ajouté un volume équivalent d'eau sucrée afin de rendre appétante la préparation de bactéries.

Tableau 1: Standardisation de Btk GFP

Bactérie	A^{600} finale	Quantité à déposer	CFU par drosophile
Btk GFP	0,3	50 μL	$1,25 \cdot 10^6$
Btk GFP	30	50 μL	$1,25 \cdot 10^8$

Cinétique d'intoxication

Après les 2 h de jeûne, nous avons intoxiqué les drosophiles pendant 30 min avec 50 μL d'inoculum déposés sur un papier filtre. Puis nous avons transféré 10 drosophiles par tube de 5 cm^2 et disséqué trois séries de huit intestins soit immédiatement soit au bout de 1h30 et 3h30 ce qui correspond à 30 min, 2 h et 4 h d'intoxication. Après extraction, les intestins de chaque réplicat sont broyés dans du milieu LB.

Dénombrement de Bt

Après cinq dilutions en cascade des broyats, nous avons étalé 100 μL de chaque dilution sur milieu LB solide. Les boîtes ont été incubées 16h à 30°C. Les colonies GFP ont été comptées, puis nous avons déterminé le nombre de CFU par intestin de drosophile (**Figure 3**).

Figure 3 page suivante

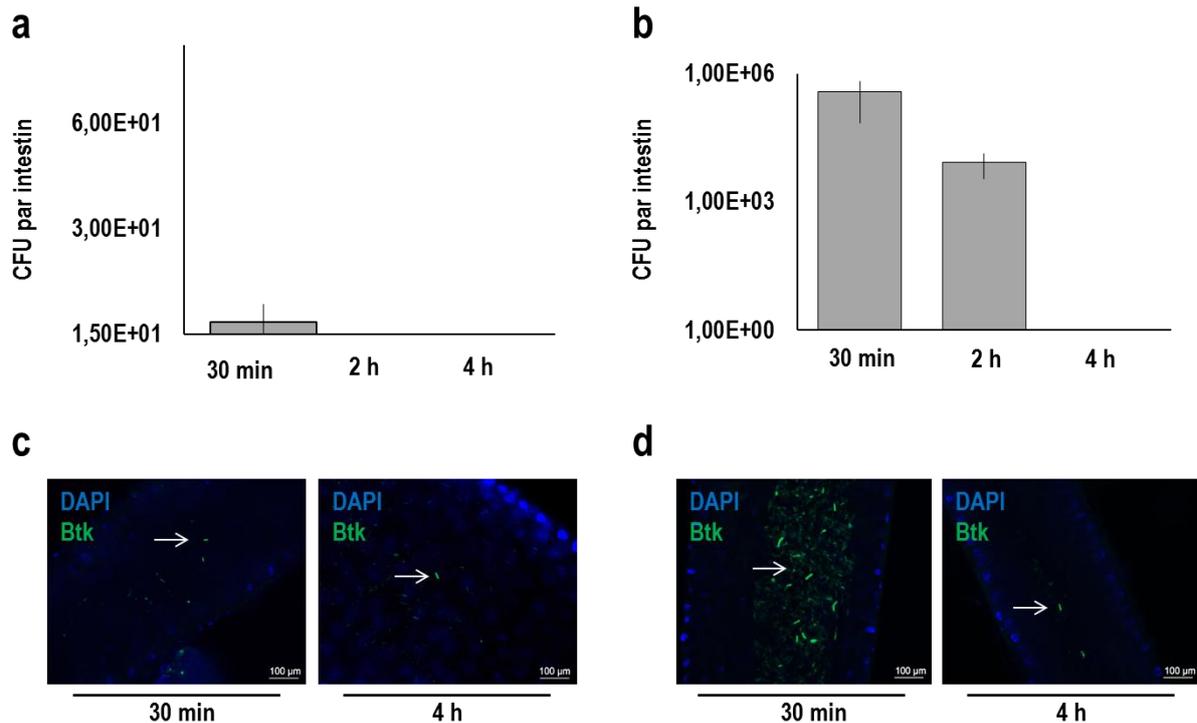


Figure 3 : Persistance de Btk-GFP dans l'intestin

Figure 3. a et b) cinétique de la quantité de CFU par intestin. **c et d)** Observation de la bactérie Btk GFP dans l'intestin de drosophile à 30 min et 4 h, par microscopie optique à épifluorescence. (Axioplan Z1, 40X). Dose fournie par drosophile : $1,25 \cdot 10^6$ CFU (**a et c**) ou $1,25 \cdot 10^8$ CFU (**b et d**). La barre d'échelle représente 100 μ m. Marquage vert, GFP-4D22. Les noyaux cellulaires sont identifiés par marquage au DAPI (bleu).

Nous constatons que 30 min après la mise en contact avec $1,25 \cdot 10^6$ de Btk-GFP nous ne retrouvons que 16 CFU par intestin. Après 2 h et 4 h nous ne retrouvons aucune bactérie par dénombrement en surface (**Figure 3 a**). Par contre 30 min après l'intoxication avec $1,25 \cdot 10^8$ de Btk-GFP nous retrouvons $3,72 \cdot 10^5$ CFU par intestin. Après 2 h, la diminution s'amorce et après 4 h les bactéries sont éliminées (**Figure 3 b**). Devant cette élimination rapide nous avons regardé par microscopie si, à 4 h post intoxication, nous pouvions retrouver quelques bactéries qui ne seraient pas quantifiables par la méthode des CFU. Nous avons réussi à localiser entre 2 et 5 bactéries par intestin (**Figure 3c et d**).

Conclusion

Notre méthode de dénombrement bactérien *in vivo* permet de quantifier les bactéries présentes dans un organe. Utilisée actuellement en routine au sein de notre laboratoire, cette méthode permet de quantifier de manière fiable les bactéries présentes dans l'intestin si la densité en surface des boîtes de comptages est suffisante pour respecter l'intervalle de confiance (30 - 300) imposé pour le comptage des CFU. La détection de faible densité de bactéries reste possible mais nécessite un nombre plus important de réplicats et donc une complexification du processus expérimental.

Cette méthode de dénombrement bactérien *in vivo* a été appliquée à d'autres bactéries exogènes comme *Erwinia carotovora* et *Pseudomonas entomophila* ou commensales comme *Lactobacillus plantarum*. Dans ce dernier cas la quantification se fait en utilisant simplement la technique de préparation des échantillons et de dénombrement des colonies car *L. plantarum* est présent naturellement dans l'intestin de drosophile.

Nous avons également appliqué cette méthode à d'autres tissus comme les corps gras ainsi qu'à d'autres insectes, comme le trichogramme. Ces expérimentations ont permis à notre équipe d'explorer des nouvelles voies de recherche sur la réponse physiologique de l'intestin à la présence de Bt (Amichot et al., 2016; Loudhaief et al., *in press*) et les mécanismes d'élimination des bactéries par l'intestin pour l'instant peu étudiés (Buchon et al., 2010).

Par ailleurs, cette méthode étant fiable en laboratoire, on peut envisager de l'utiliser pour des expérimentations réalisées sur le terrain. Il serait par exemple intéressant de récolter sur une parcelle traitée avec un bio-insecticide bactérien des insectes non cibles afin de quantifier la rémanence potentielle des bactéries présentes dans différents tissus ou organes de stockage.

Remerciements

Je remercie Elodie Naessens, Marc Magliano, Thierry Fricaux, David Pauron et Armel Gallet pour leur relecture critique et leurs remarques constructives.

Références bibliographiques

Amichot M, Curty C, Benguettat-Magliano O, Gallet A, Wajnberg E (2016) Side effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on the hymenopterous parasitic wasp *Trichogramma chilonis*. *Environ Sci Pollut Res Int* **23** : 3097-3103.

Buchon N, Broderick NA, Kuraishi T, Lemaitre B (2010) *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC biology* **8** :152.

Loudhaief R, Brun-Barale A, Benguettat O, Nawrot-Esposito M-P, Pauron D, Amichot M, Gallet A. Apoptosis restores cellular density in the *Drosophila* midgut by eliminating the excess of enterocytes physiologically or genetically induced. *Development*, *in press*.

Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* **37** : 3-22.