



Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 228

**Kit Etude du Microbiote de l'abeille par
électrophorèse d'ADN**

Français – p 1

Version : 2211

1 Introduction

Préoccupation environnementale majeure, l'effondrement des populations d'insectes polliniseurs et particulièrement celle des abeilles inquiète. Cette expérience montre le caractère multi-causal de ce phénomène et s'appuie sur des résultats de recherches récentes.

En réalisant et analysant cette électrophorèse, les élèves vont appréhender le rôle central du microbiote intestinal de l'abeille dans la digestion du pollen et les impacts des traitements phytosanitaires sur la symbiose hôte-microbiote.

Le principe général de l'expérience repose sur l'analyse de fragments d'ADN. Ces fragments correspondent à des gènes bactériens obtenus par amplifications par PCR. Ces bactéries sont présentes naturellement dans le microbiote intestinal de l'abeille. La présence de ces microorganismes est un des indicateurs du bon équilibre de la flore intestinal de l'abeille.

❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

Format 40 élèves :

20 tests soit 80 dépôts à analyser

1 test correspond à :

- 1 dépôt tube 1 (8 µl)
- 1 dépôt tube 2 (8 µl)
- 1 dépôt tube 3 (8 µl)
- 1 dépôt tube 4 (8 µl)

+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)

1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 15 - 20 minutes

2 Matériels et produits nécessaires

Composition du kit :

Les tubes sont les résultats d'amplification PCR

- Tube 1 intestin abeille témoin (175 µl)
- Tube 2 gènes bactériens impliqués dans la dégradation du pollen (175 µl)
- Tube 3 intestin abeille traité au glyphosate (175 µl)
- Tube 4 flore d'un extrait de pollen (175 µl)
- Marqueur de taille (90 µl)

[Volume supplémentaire « Droit à l'erreur » : 20 dépôts de 8 µl par tube = 160 µl soit 15 µl pour compenser les erreurs de pipetage]

Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose
Tampon TAE
Colorant

Réf. 107 646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini gels d'agarose pour système compact avec fluorescence
(Agarose 4 g/ TAE 10X 200mL / colorant GelGreen 30 µl)

Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

3 Principe de l'expérience

Contextualisation :

L'ADN à analyser correspondent à des résultats d'amplification par PCR. Chaque tube apporte une indication sur l'état du microbiote de l'abeille.

Tube 1 : intestin abeille témoin

On cherche à mettre en évidence la présence de 2 bactéries spécifiques du microbiote de l'abeille *Gilliamella apicola* et *Snodgrassella alvi*. *Gilliamella apicola* est caractérisée par le fragment de 210 pb. *Snodgrassella alvi* est caractérisée par le fragment de 128pb. Une abeille en bonne santé présente ces 2 amplifications témoignant de la présence des 2 bactéries dans son microbiote.

Tube 2 : gènes bactériens impliqués dans la dégradation du pollen

On s'intéresse aux fonctions spécifiques apportées par ces 2 bactéries, en particulier, la dégradation du pollen.

Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la synthèse d'enzymes permettant la dégradation du pollen (Kwong et al., 2016). Plus particulièrement les γ-protéobactéries du genre *Gilliamella apicola* et *Snodgrassella alvi* (Engel et al., 2012). En effet, ces bactéries possèdent les gènes de 2 enzymes clés du processus de dégradation du pollen, une pectate lyase et une disaccharide lyase. Ce microbiote rend service à l'abeille en produisant les enzymes qui vont lui permettre de dégrader les sucres du pollen qu'elle ingère (J. Lee et al., 2015).

Ce tube est donc le résultat PCR de l'amplification de ces gènes bactérien extrait du microbiote de l'abeille :

779 pb = gène codant pour la pectate lyase PL1

1235 pb = gène codant pour la disaccharide lyase PL9

Tube 3 : intestin abeilles traitées au glyphosate

Quel est l'impact des traitements phytosanitaire sur le microbiote des abeilles ?

On réalise de nouveau une amplification par PCR des 2 gènes qui permettent d'identifier la présence des 2 bactéries spécifiques de l'abeille, *Gilliamella apicola* et *Snodgrassella alvi*. Ici, l'abeille a subi un traitement au glyphosate pendant plusieurs jours. Sur l'abeille traitée seule *Gilliamella apicola* est détectée. *Snodgrassella alvi* n'est plus présente, des études ont montré que le glyphosate a un effet inhibiteur sur cette bactérie, qui perturbe ensuite le microbiote de l'abeille.

Tube 4 : recherche des bactéries *Gilliamella apicola* et *Snodgrassella alvi* sur du pollen

Ce tube montre que l'on a amplifié les gènes caractérisant les 2 bactéries dans des pollens prélevés dans la nature. La présence des bactéries du microbiote l'abeille dans le pollen témoigne de leur origine et de leur transmission à l'abeille.

L'abeille, à travers la pollinisation et la production de miel, met en évidence les services des écosystèmes dont l'homme peut bénéficier définis comme des services écosystémiques. La pollinisation réalisée par l'abeille n'est possible que grâce au microbiote de l'abeille indispensable à sa survie. Le pollen est donc un réservoir de bactéries. Cette association abeille-microbiote bactérien forme un holobionte. Toutes les bactéries du pollen ne sont pas retrouvées dans le microbiote intestinal des abeilles (Ambika et al., 2016).

Ce TP montre qu'il existe des liens multiples entre tous les êtres vivants, la biodiversité d'un écosystème forme un équilibre dynamique complexe et fragile.

4 Mode opératoire

4.1 Préparation des solutions

❖ Préparation du tampon TAE 1X :

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL tampon migration).
- Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.
** En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*

❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 1,7% (optimale) :

[Vous pouvez préparer un gel d'agarose de 1,7 % à 2 % (TAE), compatible avec l'utilisation de gels précoulés à 2%]

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,25 g d'agarose de type II dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).
- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.



Dispositif électrophorèse tout en un

❖ Préparation de l'ADN

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.

Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

4.2 Dépôt de l'ADN

A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µL d'ADN des 4 tubes
- 8µl pour l'échelle de poids moléculaire

Durée de migration environ 20 minutes pour les systèmes compacts

5 Résultats et exploitations



Tube 1 : Intestin abeille témoin

Gilliamella apicola à 210 pb. *Snodgrassella alvi* à 128 pb. Ces 2 amplifications sont les témoins de présence des 2 bactéries dans le microbiote.

Tube 2 : On observe dans intestin d'abeille les 2 gènes bactériens codant pour 2 enzymes impliquées dans le processus de dégradation du pollen.

779 pb = gène codant pour la pectate lyase PL1

1235 pb = gène codant pour la disaccharide lyase PL9

Tube 3 : Intestin abeille glyphosatée

On recherche les bactéries témoins (identique au tube 1).

Gilliamella apicola à 210 pb est visible mais *Snodgrassella alvi* à 128 pb n'est plus détectable. On parle de dysbiose ou de déséquilibre.

Selon R Rouzé qui a étudié les impacts des produits phytosanitaires et des insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera* : « *En tant qu'herbicide, le glyphosate semble moins un facteur à risque pour les abeilles que les insecticides. Cependant, sa cible moléculaire, l'EPSP synthase, bien qu'absente chez les insectes, est présente chez nombre de bactéries. Son impact sur le microbiote de l'abeille a donc été étudié. Cela a été démontré pour le glyphosate sur S. alvi (Motta et al., 2018 ; Blot et al., 2020) »* »

Tube 4 : Flore d'un extrait de pollen

On a recherché et mis en évidence la présence de *Gilliamella apicola* à 210 pb et *Snodgrassella alvi* à 128 pb. Ces bactéries sont naturellement présentes dans le milieu de vie de l'abeille et introduit la notion d'holobionte.

6 Bibliographie

R.Rouzé. Impacts et interactions de la microsporidie Nosema ceranae et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique *Apis mellifera*, 2020

Motta et al. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees 2018

Kwong WK, Moran NA. 2016. Gut microbial communities of social bees. Nature Reviews Microbiology. 14:374-384.

7 Assistance Technique

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique au 09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé)**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

* prix d'un appel local, non surtaxé