

## Protocole de TP

Tester l'impact du microbiote des drosophiles sur leurs comportements

### ► Matériel nécessaire :

- kit d'étude du microbiote :

Larves de drosophiles s'étant développées sur milieu avec antibiotique,

Larves de drosophiles s'étant développées sur milieu sans antibiotique,

Drosophiles s'étant développées sur milieu avec antibiotique,

Drosophiles s'étant développées sur milieu sans antibiotique,

- kit pour une coloration de Gram :

80 ml de violet de gentiane

80 ml de Liquide de Lugol stabilisé

80 ml d'éthanol

80 ml de Fuschine

4 poires compte-gouttes 5 ml

- microscope

- scalpel ou pointe fine métallique

- 2 pinces fines

- sèche-cheveux

- lames/lamelles

- étheriseur

- solution de FlyNap

- gants

- lames montées avec le microbiote de drosophiles saines/axéniques

### ► Équipements individuels de protection

Pour la coloration de Gram, s'équiper des protections individuelles suivantes :



Les manipulations doivent être réalisées sous hotte ou dans un endroit bien ventilé.

### ► Protocoles :

#### A. Réalisation des lames de tubes digestifs de larves de Drosophiles

Juste avant le TP, décongeler les larves, les égoutter et travailler immédiatement après (sinon il y a un risque de noircissement des larves).

1. Prélever à la pince fine (voire très fine si possible) la larve et appliquer l'avant portant les mandibules noires contre la lame.
2. Tirer doucement sur l'extrémité postérieure de la larve en restant parallèle à la lame de façon à appliquer et coller le tube digestif progressivement contre le verre. L'étalement du tube digestif sur toute sa longueur est alors visible, laisser en place les extrémités du corps sur la lame, elles partiront éventuellement lors de la coloration.
3. Sécher la lame à l'aide d'un sèche-cheveux ou à proximité d'un bec électrique afin de fixer la préparation sur la lame.
4. Pratiquer une coloration de Gram (gants et lunettes, hotte ou pièce aérée) :
  - Verser sur la préparation quelques gouttes de violet de gentiane. Attendre 30 secondes, puis rincer à l'eau distillée.
  - Verser sur la préparation quelques gouttes de Lugol. Attendre 30 secondes, puis rincer à l'éthanol.
  - Verser sur la préparation quelques gouttes de Fuchsine. Attendre 30 secondes, puis sécher la lame.

5. Observer au microscope (lamelle inutile) objectif  $\times 10$  puis  $\times 40$  ou  $\times 60$  (voire  $\times 100$ , huile à immersion nécessaire). Le réglage lumière à l'aide du diaphragme est déterminant.
6. Déterminer les bactéries Gram+ et Gram- mais aussi les éventuels champignons (levures de type *Saccharomyces cerevisiae*).

*Remarque* : l'observation des organes et des différentes cellules différenciées, mais aussi du microbiote vivant, est possible sans coloration. Il suffit de placer une goutte d'eau physiologique à l'étape 2, puis une lamelle pour éviter l'assèchement de la préparation.

### B. Suivi du comportement des drosophiles

1. Mettre en place la chaîne d'acquisition vidéo (un smartphone suffit)
2. Grâce aux entonnoirs fournis, transférer les mouches dans les tubes préalablement identifiés (avec ou sans antibiotique).
3. Attendre 2 minutes (**acclimatation**).
4. Taper les 2 tubes (avec ou sans antibiotique) en même temps.
5. Lancer la capture vidéo pour 1 minute.
6. L'observation simple suffit.

Utiliser ensuite un logiciel tel que Kinovea (téléchargeable gratuitement sur Internet) afin de mesurer la vitesse de déplacement des mouches. Pour cela, il est nécessaire de faire une acquisition vidéo des mouches individuellement placées dans des tubes.

