

# Une approche metabarcoding pour la description du microbiote bactérien associé au moustique tigre *Aedes albopictus*.

Guillaume MINARD

Directeur : Claire VALIENTE MORO (MCU, UCBL)

Co-directeur : Patrick MAVINGUI (DR, CNRS)

UMR CNRS 5557 – Ecologie Microbienne  
« Dynamique Microbienne et Transmission Virale »

Ecole Doctorale E2M2

## Microbiote

Ensemble des microorganismes qui vivent dans un environnement donné

*Lay et al., 2009*

## Composition

Bactéries, champignons, algues, protistes, virus

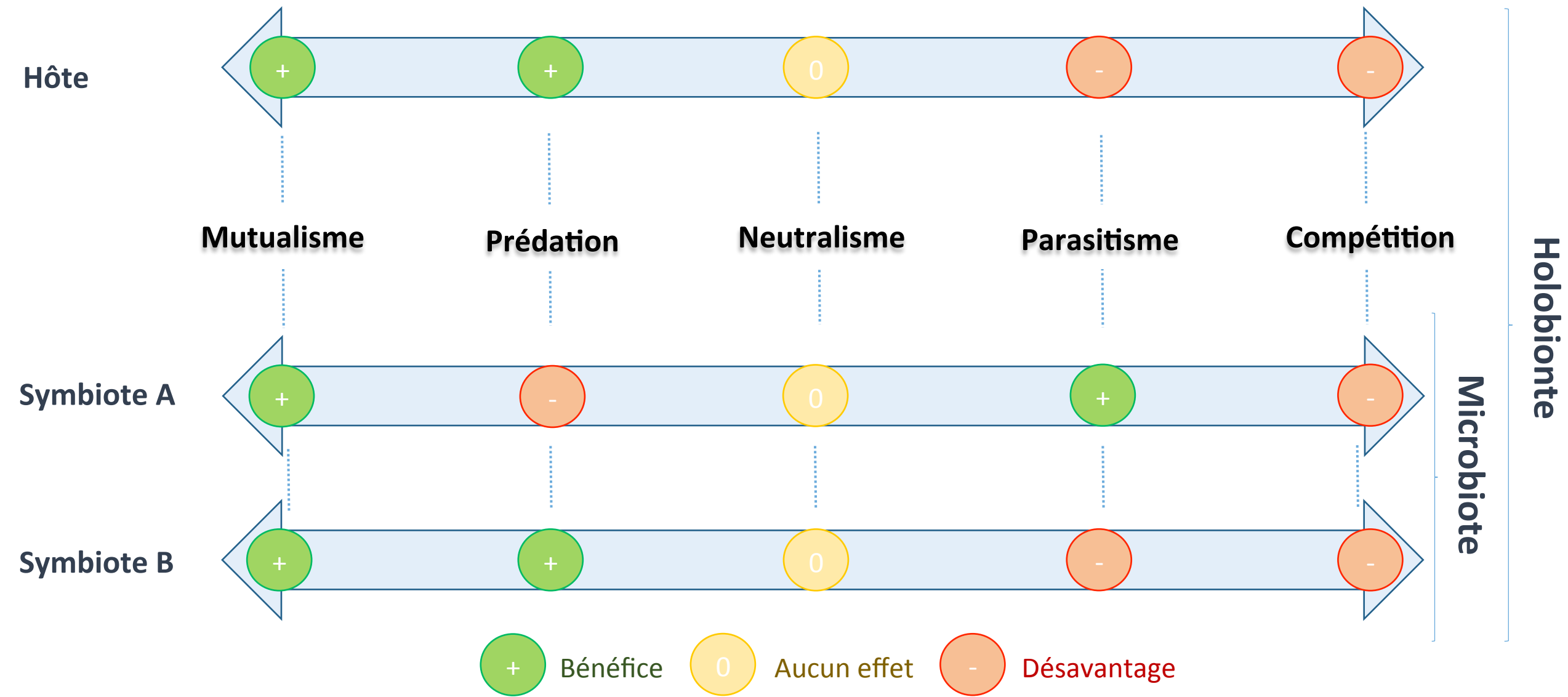
Ex. Chez homme 150 x plus de gènes que l'hôte

*Qin et al., 2010*



*Hess et al., 2011*





## La Nutrition

### Apports d'acides aminés, vitamines...

Nogge *et al.*, 1976 ; Akman Gündüz & Douglas, 2009

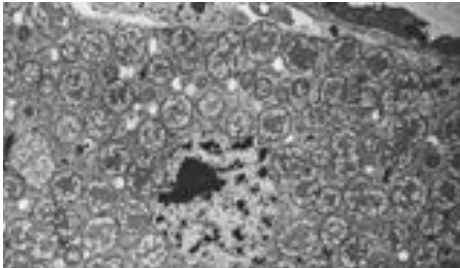
### Dégradation de polysaccharides

Warnecke *et al.*, 2007

### Détoxification

Sabree *et al.*, 2009

...



## La reproduction

### Parthénogénèse

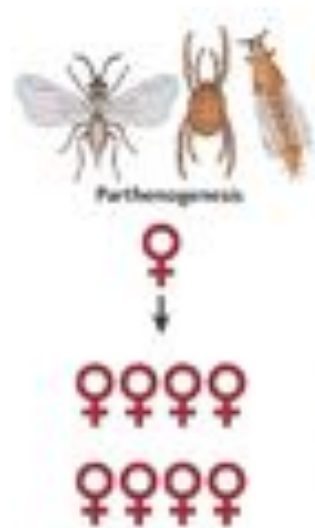
### Féminisation

Werren *et al.*, 2008

### Isolement reproductif

Brucker & Bordenstein 2013

...



## Les stress

### Stress biotiques (parasitoïdes, pathogènes...)

Hedges *et al.*, 2009

### Stress abiotiques (Température, insecticides...)

Montlor *et al.*, 2002



- **Aucun symbiote primaire référencé**
- Peu d'études globales : structure forte en fonction du stade, du sexe, du mode de nutrition
- Nombreuses perspectives d'application en **lutte antivectorielle** (e.g. *Wolbachia* wMelpop - CLA – Dengue chez *Ae. aegypti*)

Moreira *et al.*, 2009 ; Walker *et al.*, 2011

Minard *et al.* *Parasites & Vectors* 2013, **6**:146  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/146>

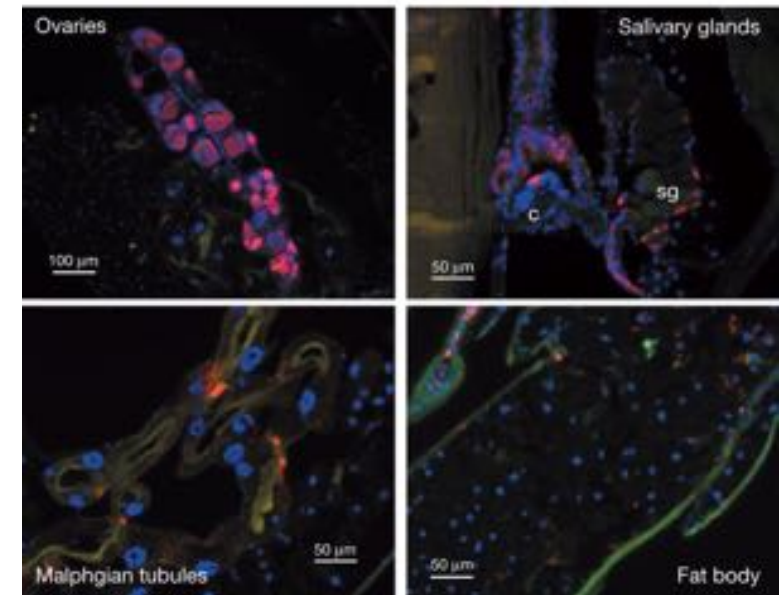


REVIEW

Open Access

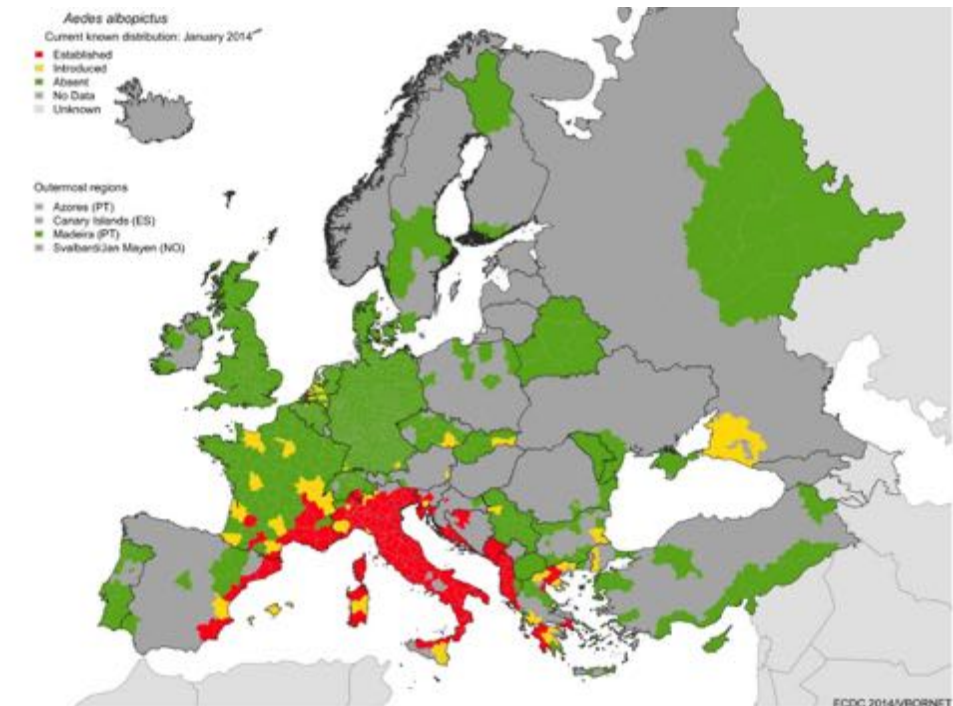
## Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont

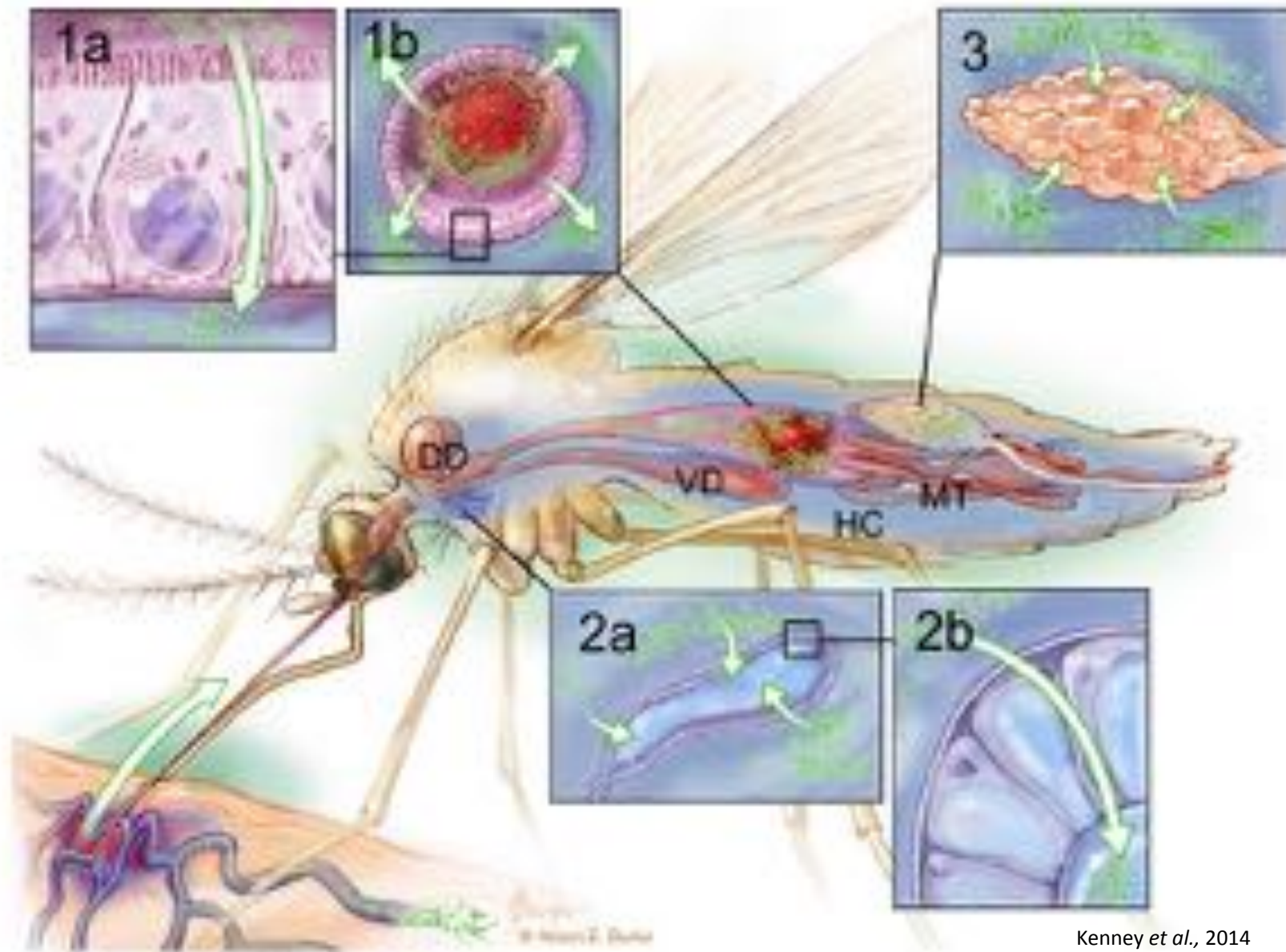
Guillaume Minard, Patrick Mavingui\* and Claire Valiente Moro\*

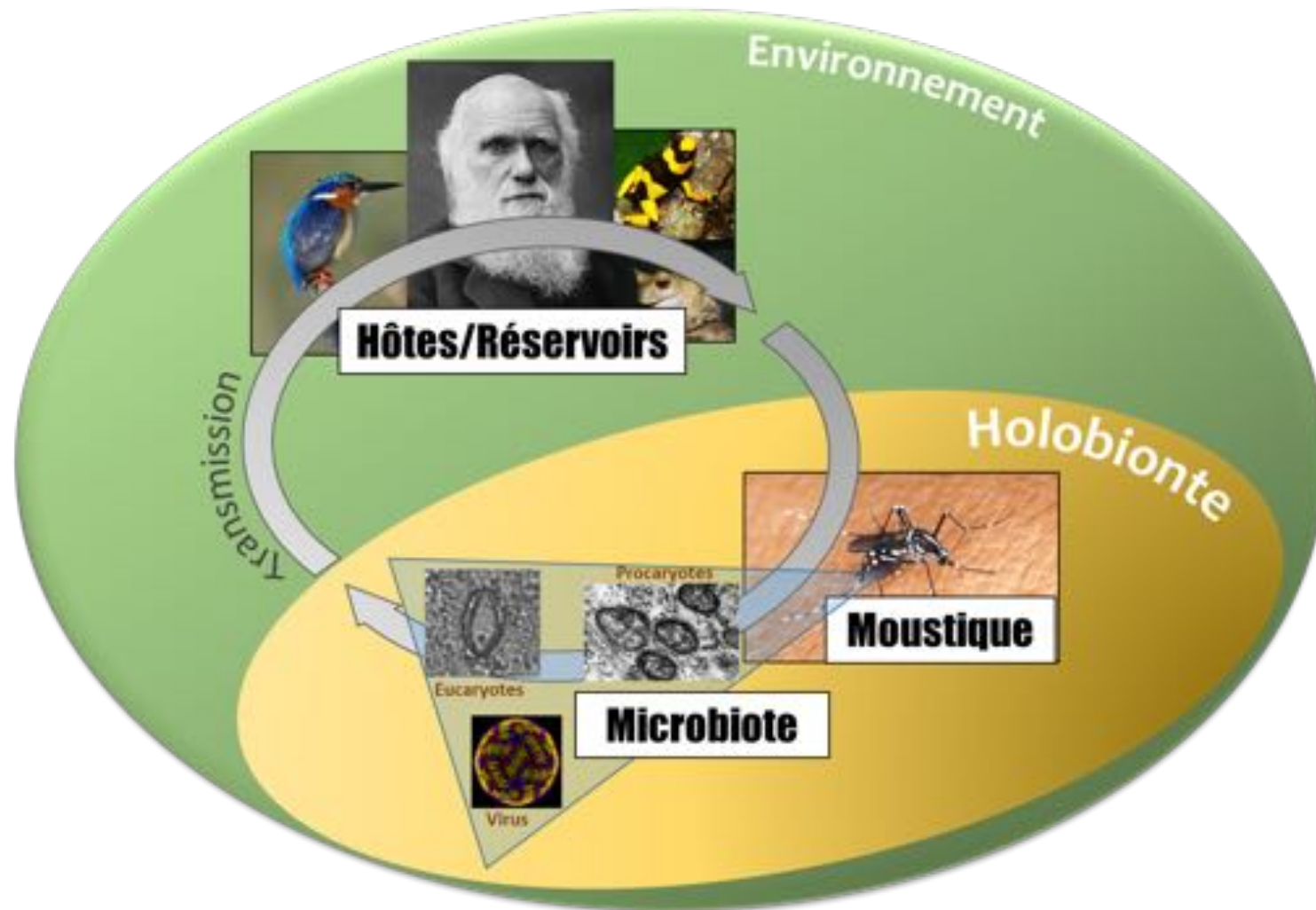


Walker *et al.*, 2011

- 4<sup>ème</sup> espèce la plus **invasive** au monde (Global Invasive Species Database)
- Moyens de **lutte** limités
- **Vecteur** d'arbovirus (CHIKV, DENV...)









- Bactérie **endosymbiotique**
- une seule espèce ***Wolbachia pipientis*** et différents clades (**wAlbA, wAlbB**)
- ~100% d'infection chez *Ae. albopictus* (Revu par Bourtzis et al., 2014)
- Manipulateur de la reproduction (**Incompatibilité Cytoplasmique**)
- Perspectives dans la **lutte antivectorielle** (Mousson *et al.*, 2012)



Photo : Vincent Raquin

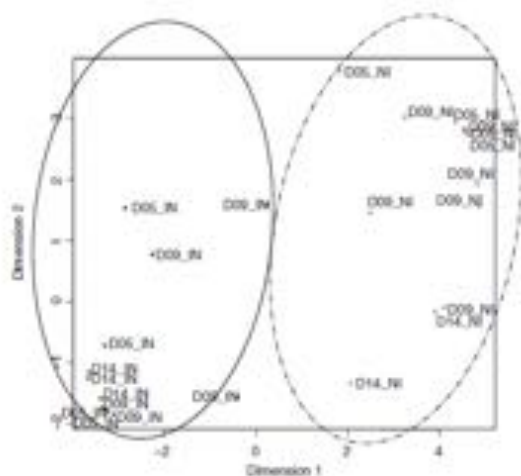
Female	Male			
	AB	A	B	O
AB	+	+	+	+
A	-	+	-	+
B	-	-	+	+
O	-	-	-	+

Dobson *et al.*, 2004

- **Nombreuses Proteobacteria** mais également Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes (Minard et al., 2013b)
- **Analyses bas débit** de la diversité (Culture, DGGE, puces taxonomiques)

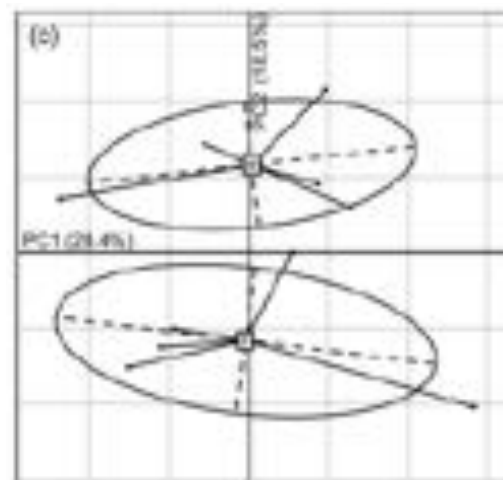
➤ Variation selon :

### a. Le statut d'infection viral



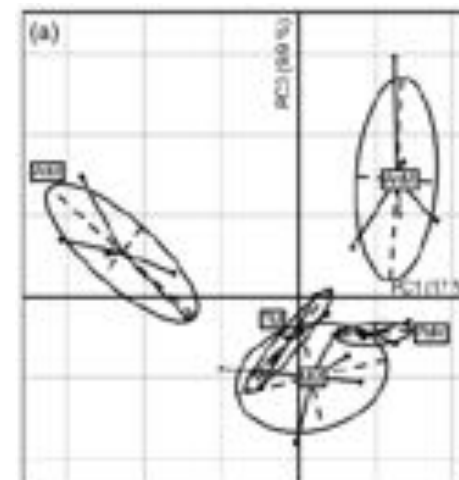
Zouache et al., 2013

### b. Le sexe



Zouache et al., 2012

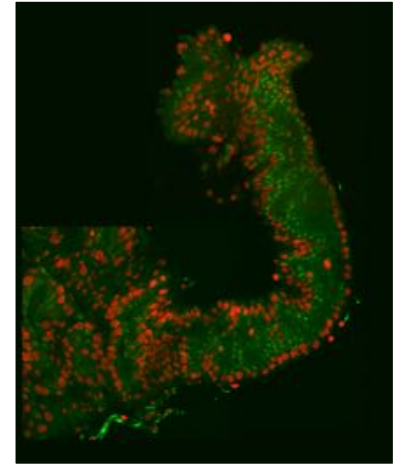
### c. Le site d'échantillonnage



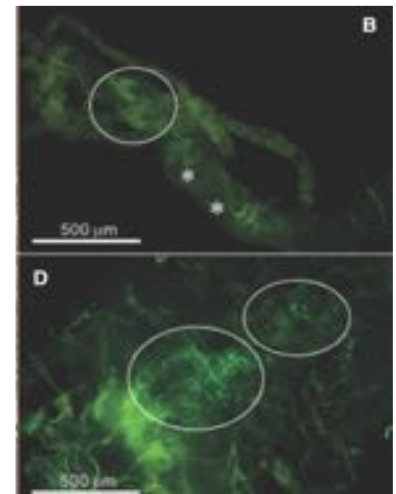
Zouache et al., 2012 ; Valiente Moro et al., 2013

- **Interférence** entre le microbiote bactérien et le virus de La Crosse (Joyce et al., 2011)

- Détectés dans les **populations naturelles** (*Asaia* sp. ; *Acinetobacter* sp. ; *Pantoea* sp.)
- **Localisation :**
  - le **tube digestif, les glandes salivaires** (*Asaia* sp. ; *Acinetobacter* sp.)
  - les **organes reproducteurs** (*Asaia* sp.)
- Symbiotes **cultivables et transformables** (*Asaia* sp. ; *Acinetobacter* sp. ; *Pantoea* sp.)



Zouache et al., 2009



Crotti et al., 2009

- Etude de la **diversité** → **présence, abondance et interactions**
- **Nouvelles technologies de séquençage** : étude exhaustive
- Séquençage haut débit de **barcodes** :
  - Quels barcodes ?
  - Quelle **profondeur** → 3200 lectures – 16000 lectures ?
  - **Diversité inter-individuelle** ? **Pools** d'échantillons ?

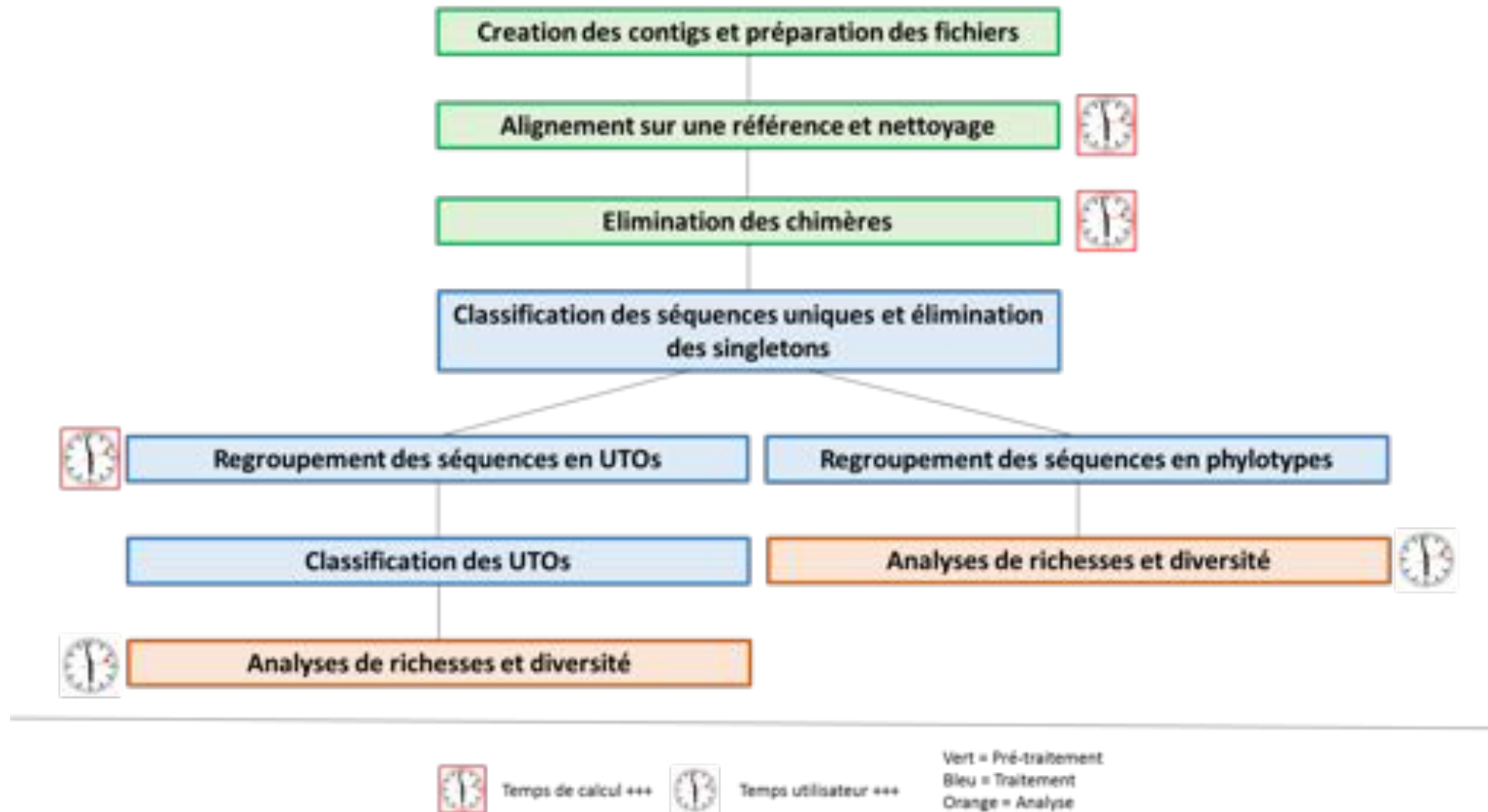


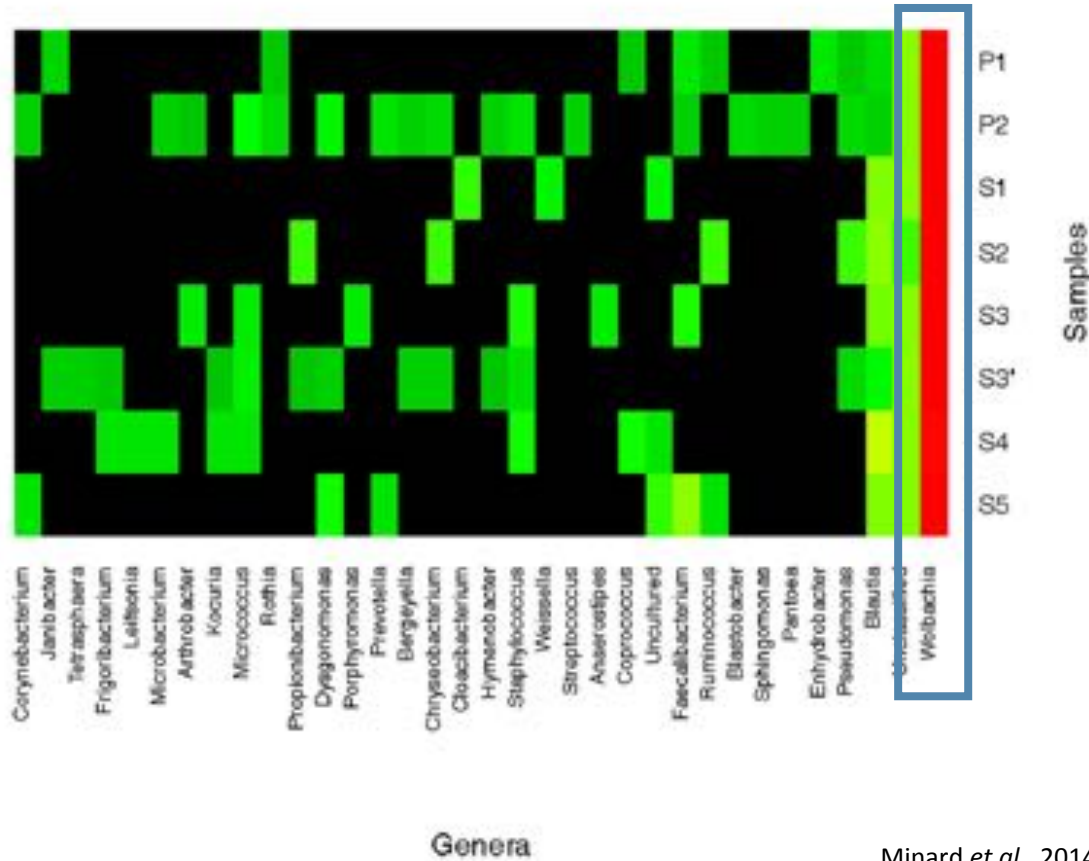
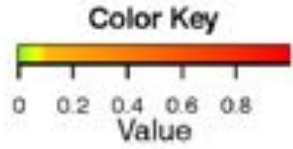
## Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study

Guillaume Minard, Florence-Hélène Tran, Audrey Dubost, Van Tran-Van, Patrick Mavingui\* and Claire Valiente Moro\*

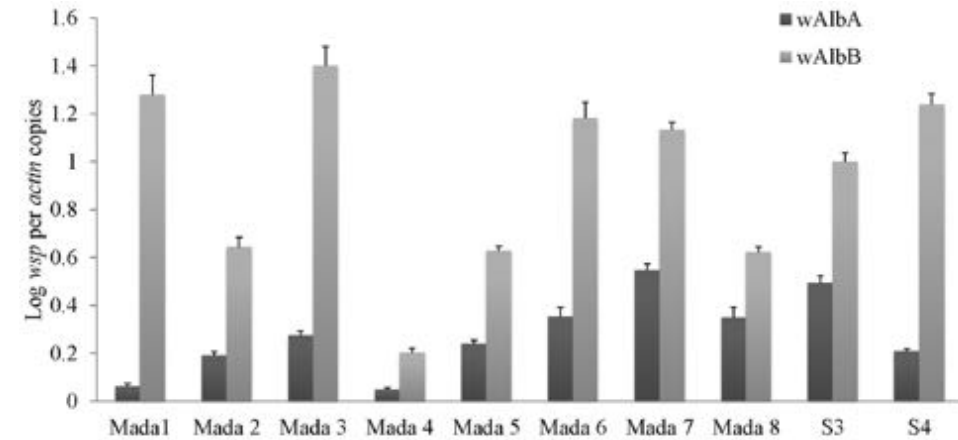


Baker et al., 2003





Minard et al., 2014

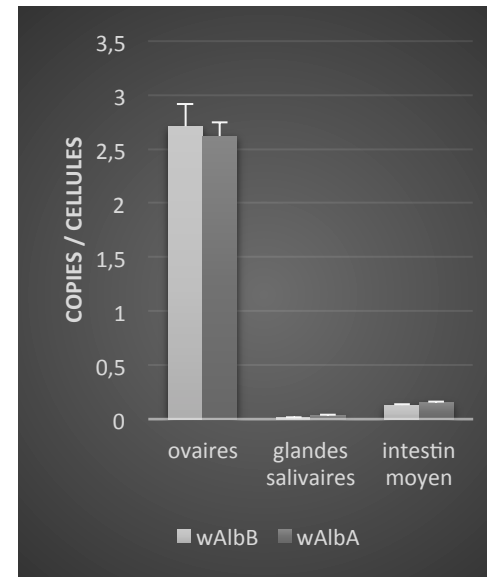
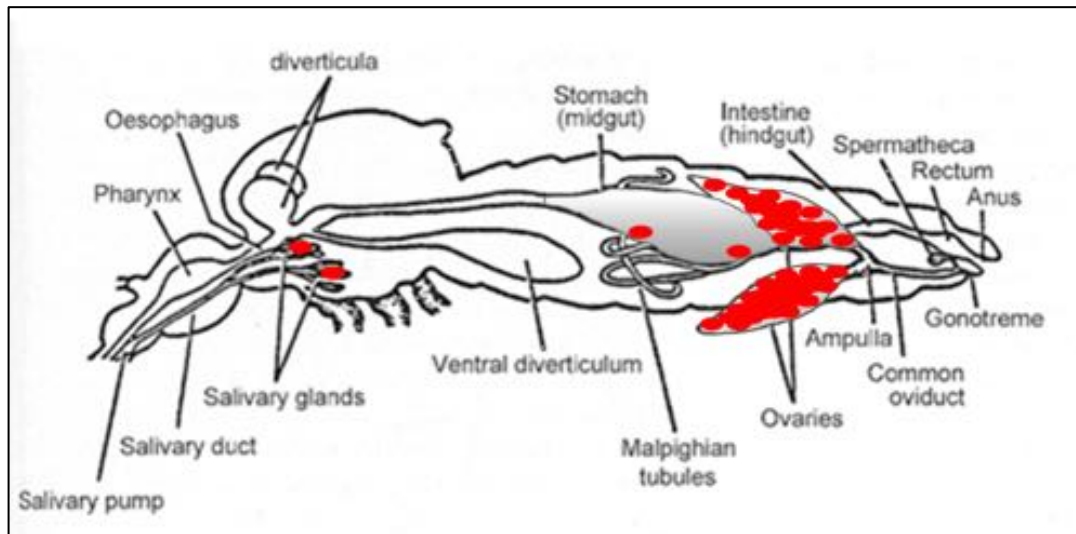


- Dominance de *Wolbachia*
- Présence des deux clades
- > 1 copie / cellule
- Biais d'estimation de la diversité

## Biais dans l'estimation des autres symbiotes

Choix d'une **alternative** :

- Alternative 1 : Blocage de l'amplification
- Alternative 2 : Etude de l'intestin moyen



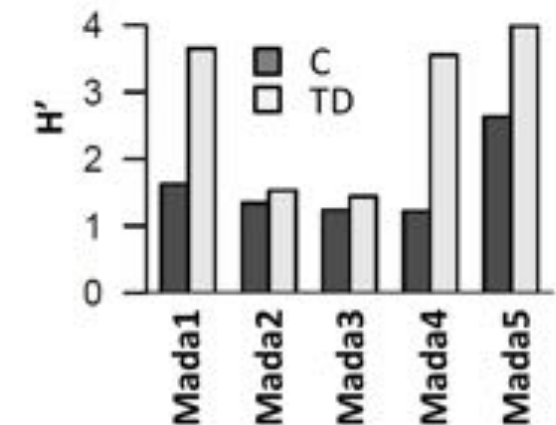
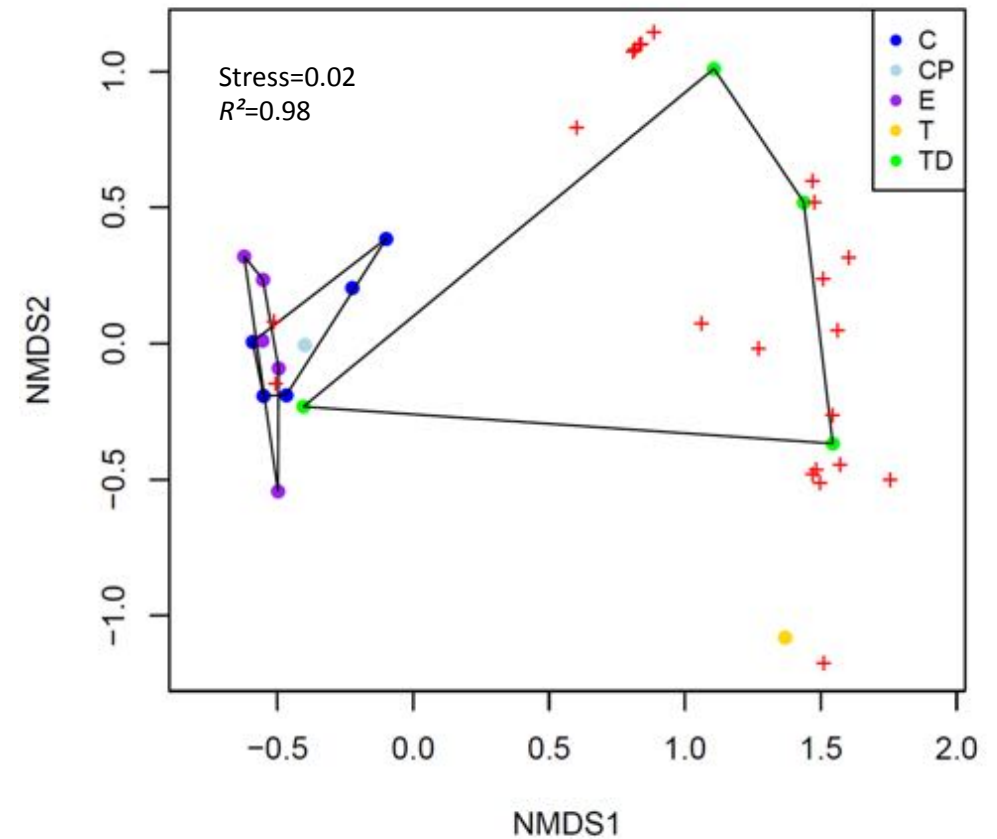
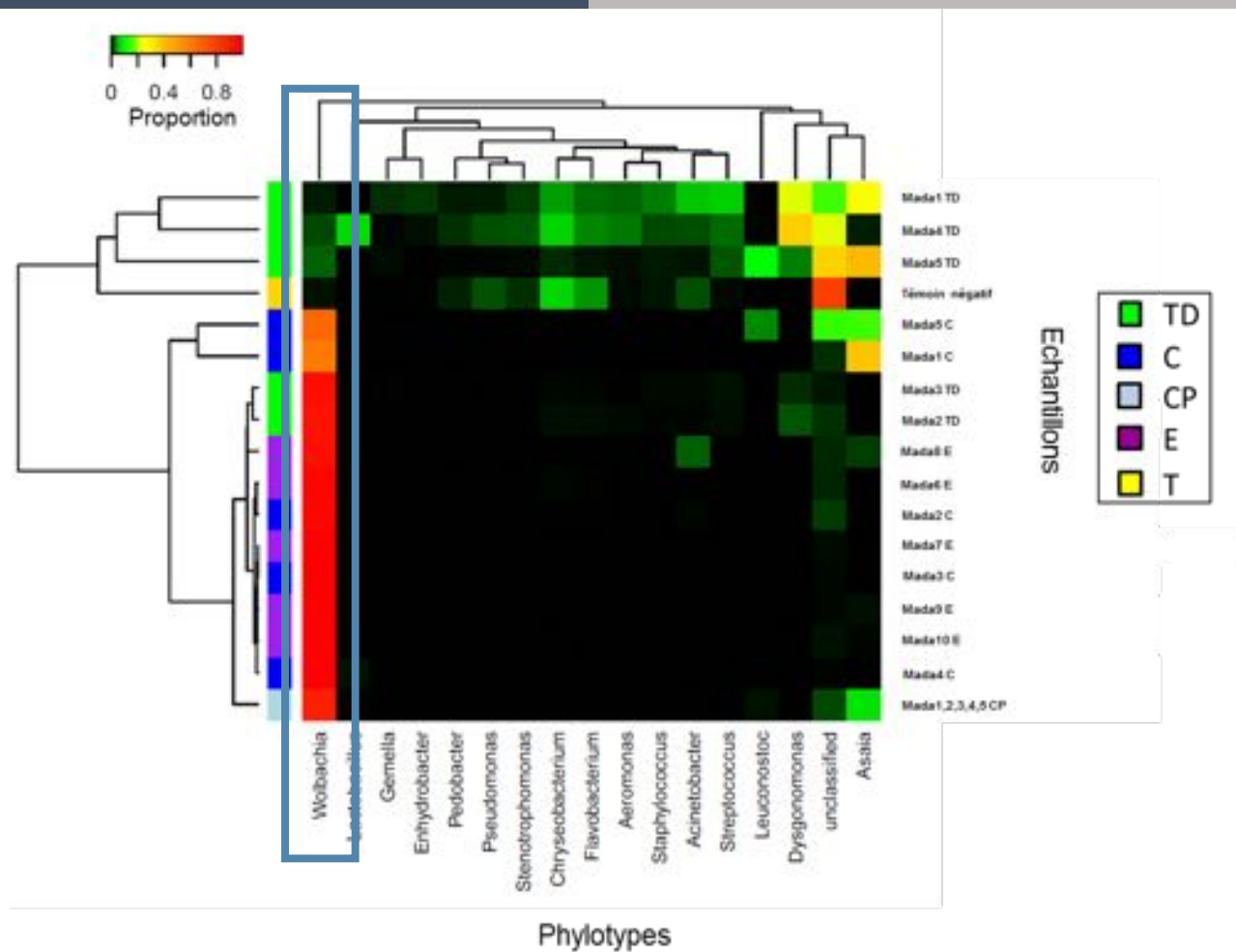
D'après Zouache et al., 2009c



MiSeq - Illumina



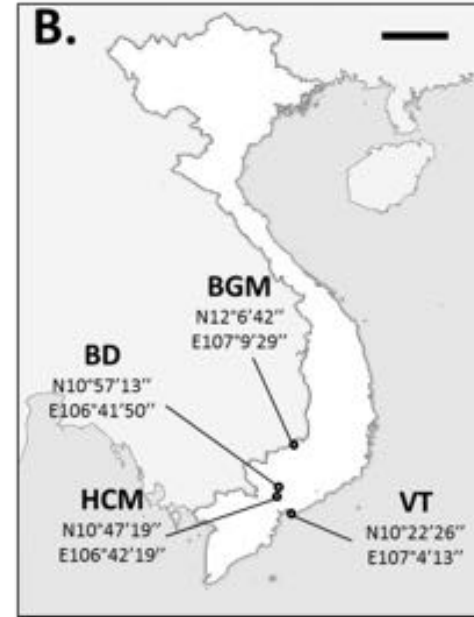
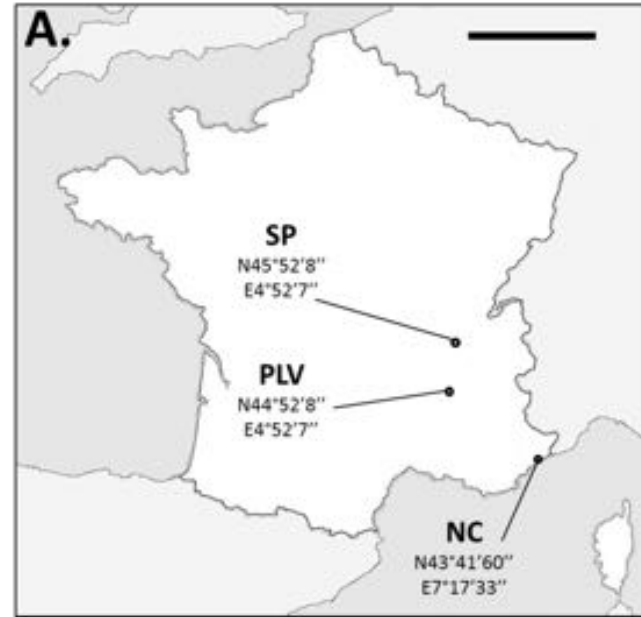
## II-Diversité du microbiote bactérien Soustraction de *Wolbachia*

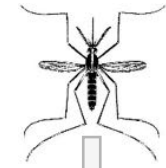


- **Abondance** relative de *Wolbachia* +/- faible dans l'intestin moyen
- Intestin + **hétérogène**
- **Carcasses** + **homogènes** (possibilité de pool)
- + **de diversité** bactérienne dans les **intestins**

- **Diversité du microbiote bactérien intestinal ?**
- **Structure génétique des populations ?**
- **Effets de l'invasion sur le microbiote et la génétique des populations ?**

**populations naturelles  
invasives (France) ou endémiques(Vietnam)**





*Aedes albopictus*  
(femelles non gorgées)  
Carcasses ou intestins moyens



Extraction d'ADN / Amplification

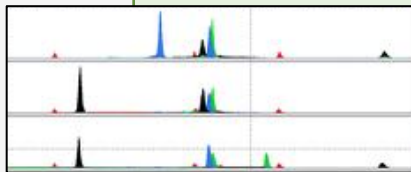
5'-----ATCATCATCATCATCATC-----3'  
3'-----TAGTAGTAGTAGTAGTAG-----5'

**Phylogeographie**

**11 Microsatellites**

n=22-30 (total = 199)

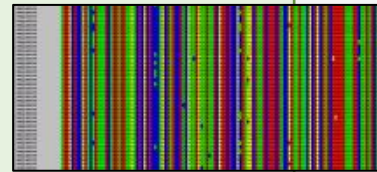
Genotype



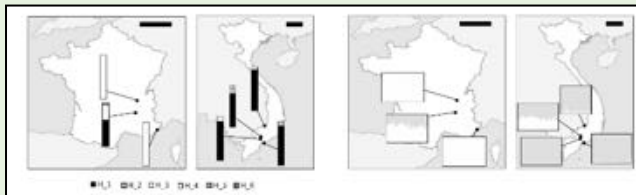
**Gène mt COI**

n=7-22 (total = 94)

Séquençage



Analyse de phylogéographie



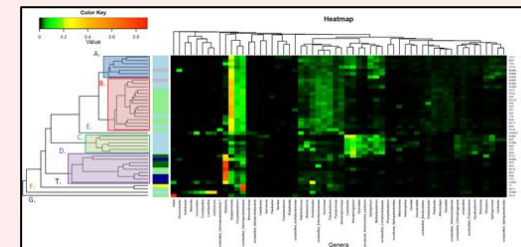
**Diversité bactérienne**

**rrs région hypervariable (V5-V6)**

Intestins moyens n=3-5 (total=38)

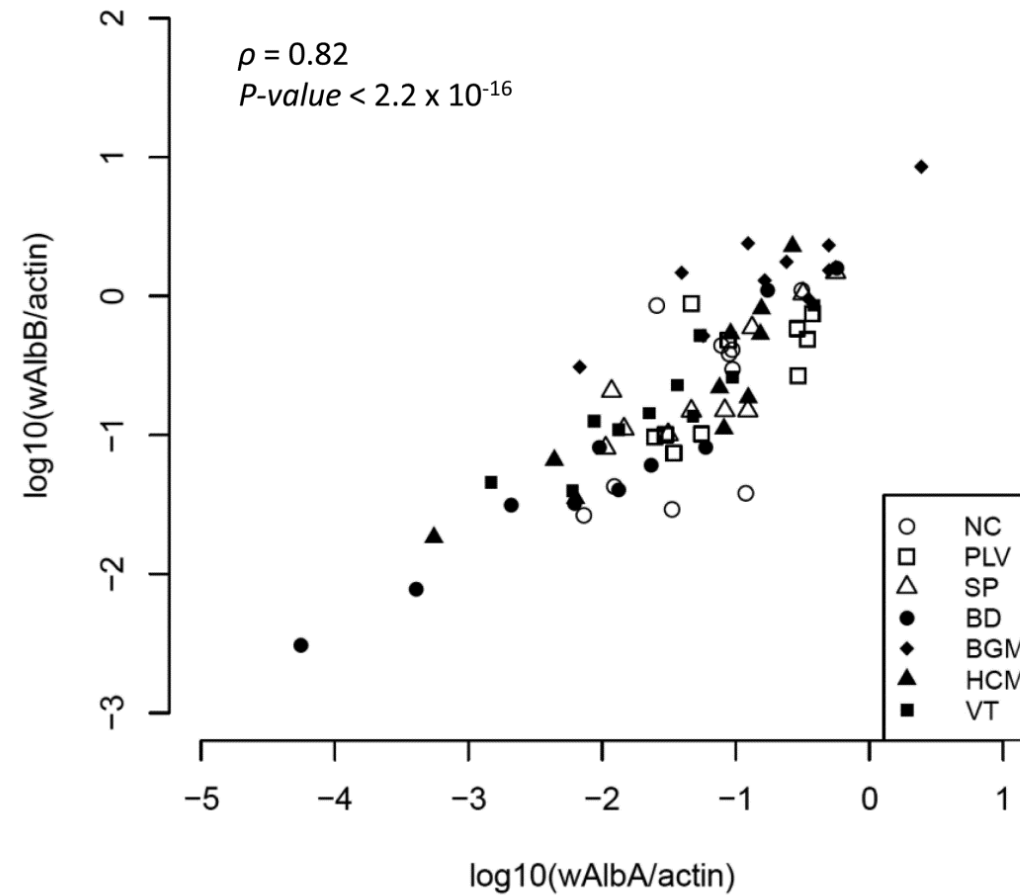
Carcasses poolées n=1 (total = 7)

Séquençage Miseq  
Analyse  
bioinformatique

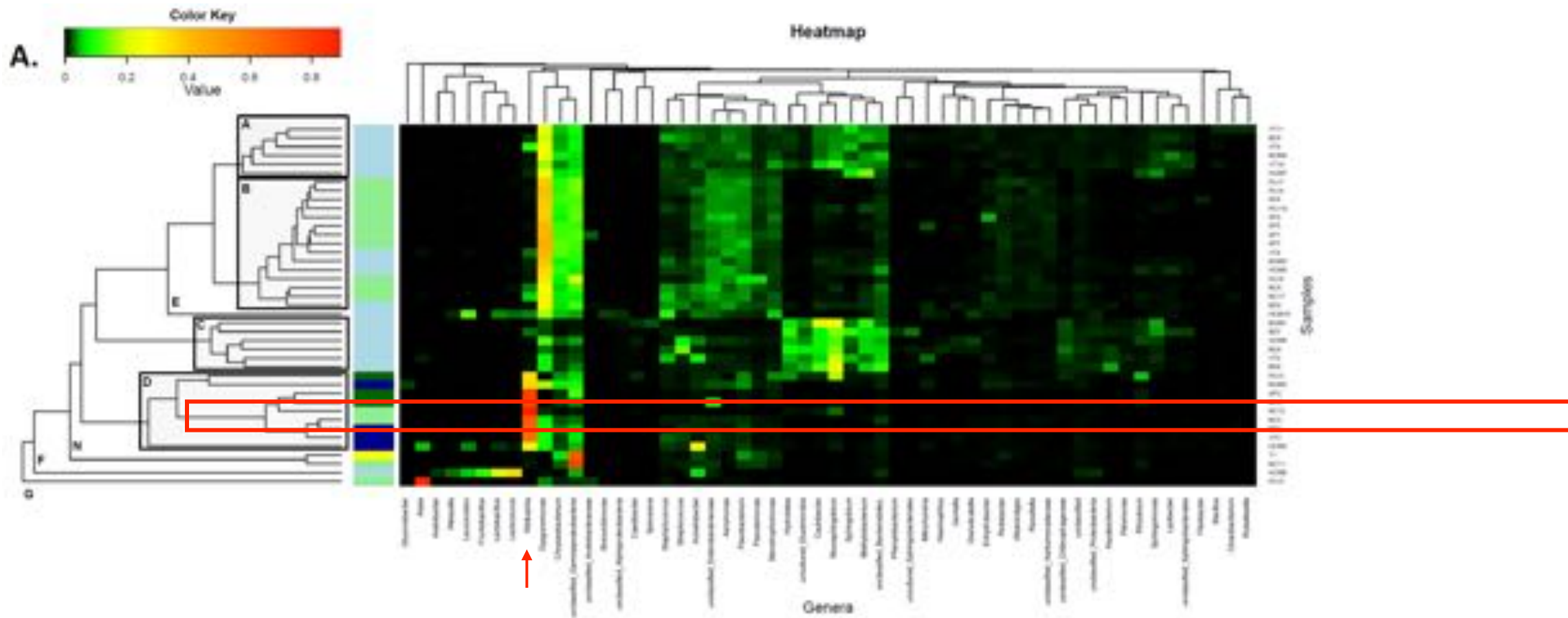






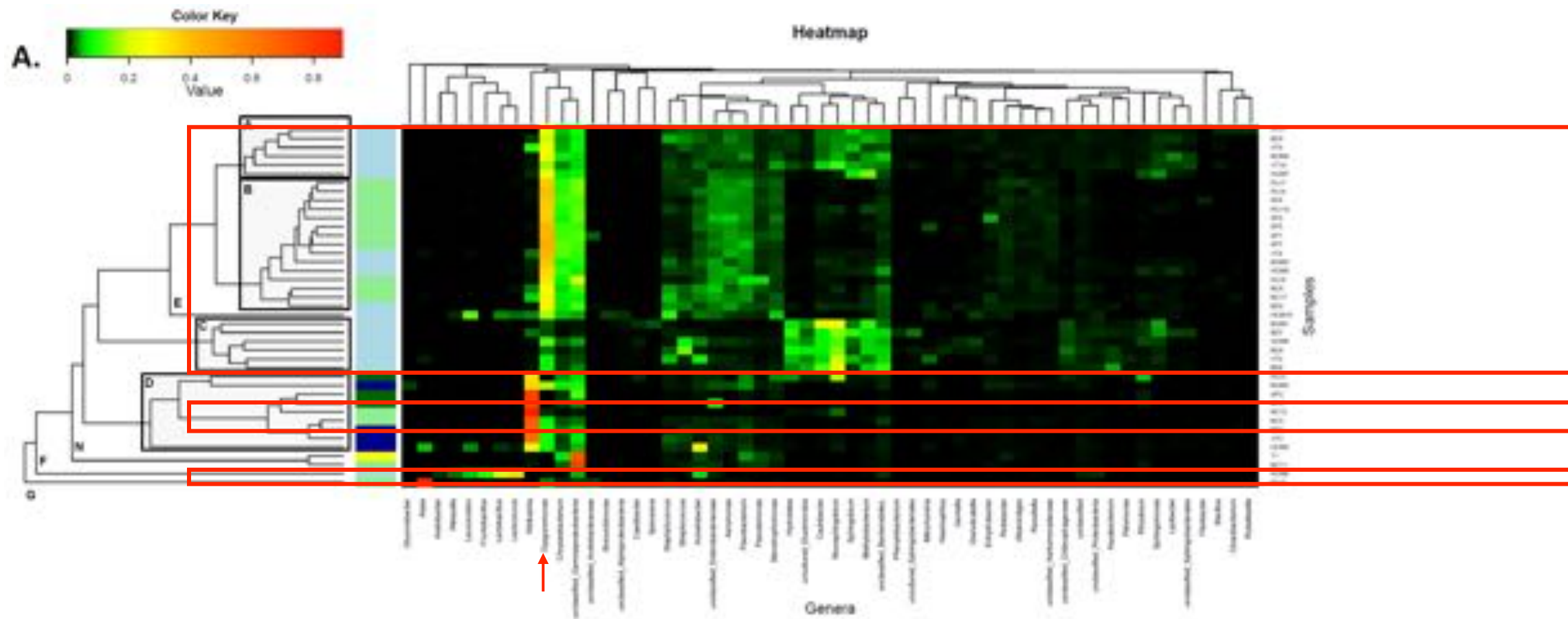


- **Densité élevée** au sein des carcasses
- **Correlation** entre les **densités des deux clades wAlbA et wAlbB**

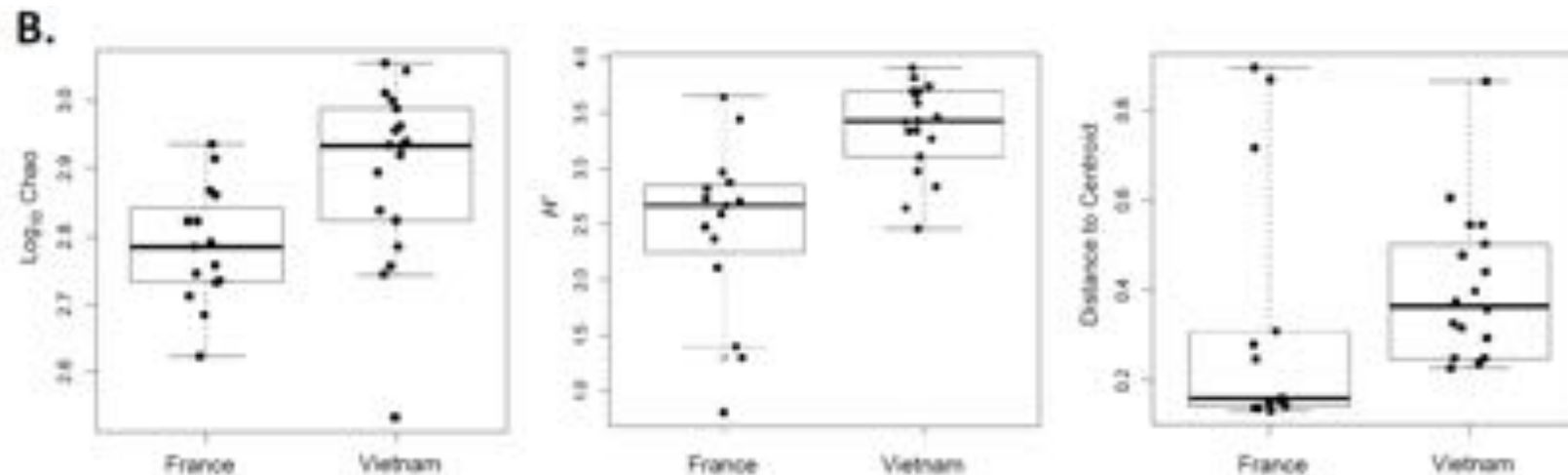


- Seulement deux échantillons d'intestin dominés par *Wolbachia*

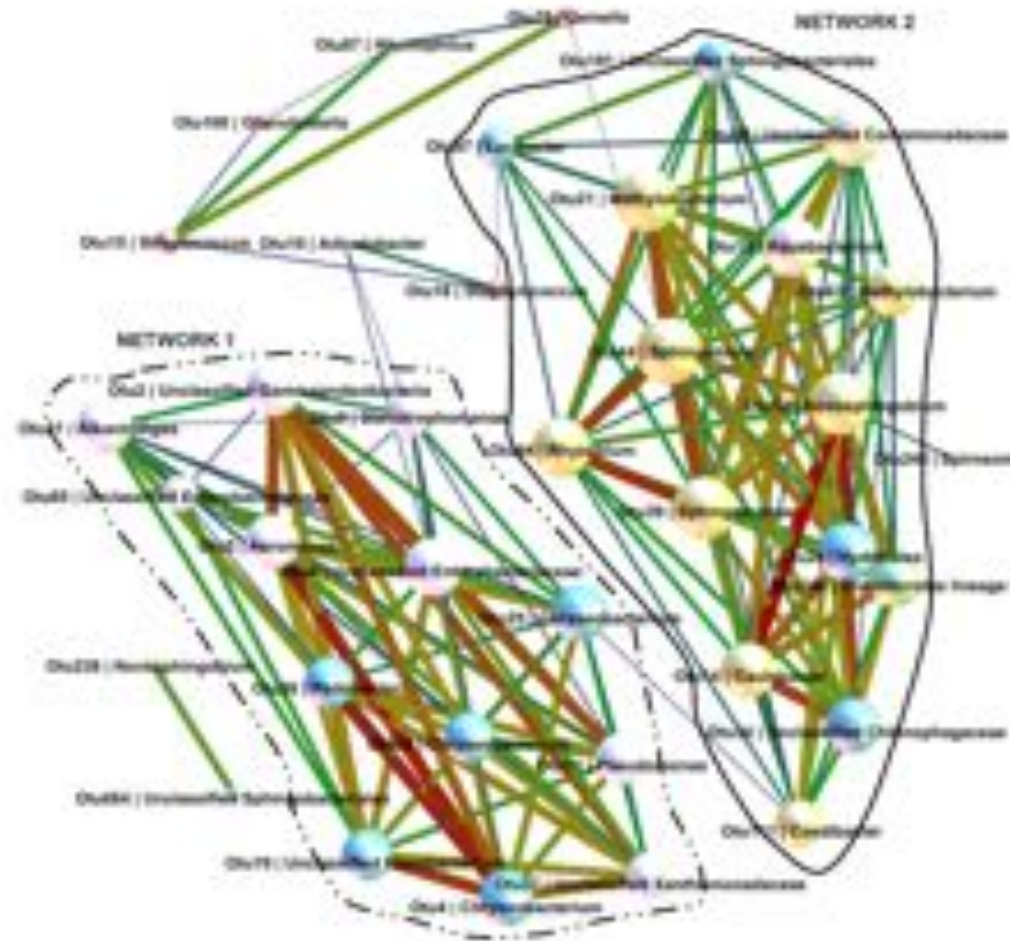




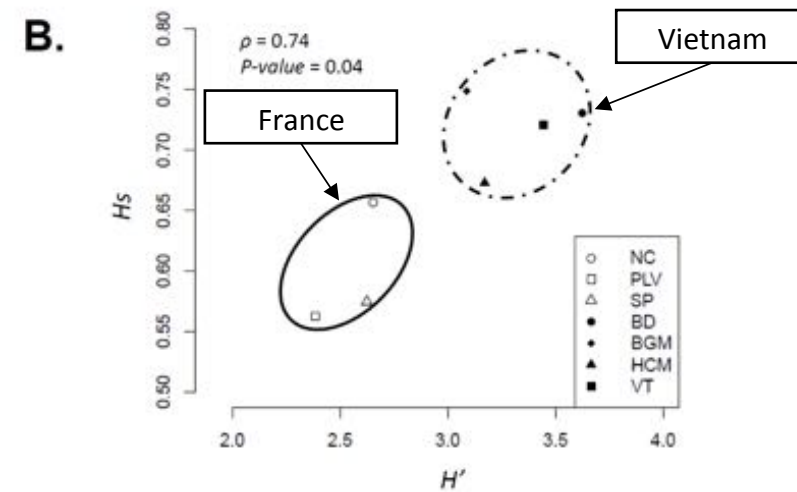
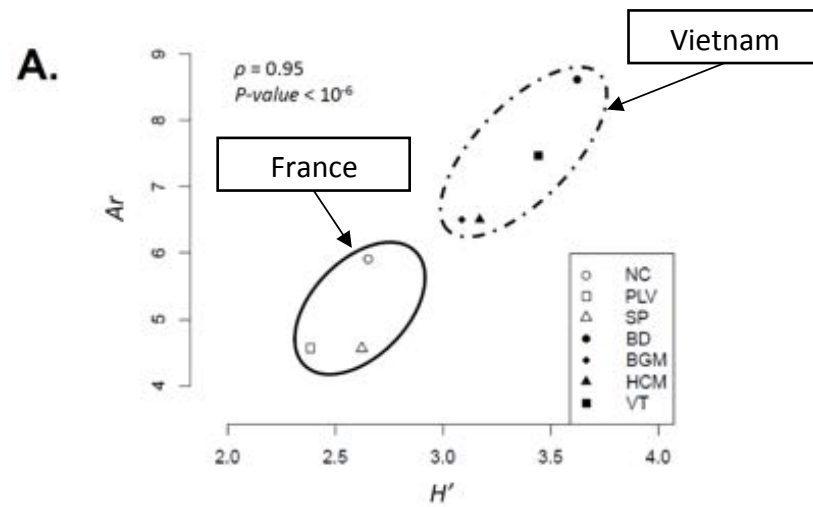
- Seulement deux échantillons d'intestin dominés par *Wolbachia*
- Dominance de *Dysgonomonas*



- Seulement deux échantillons d'intestin dominés par *Wolbachia*
- Dominance de *Dysgonomonas*
- Plus faible diversité en France - diversité plus homogène

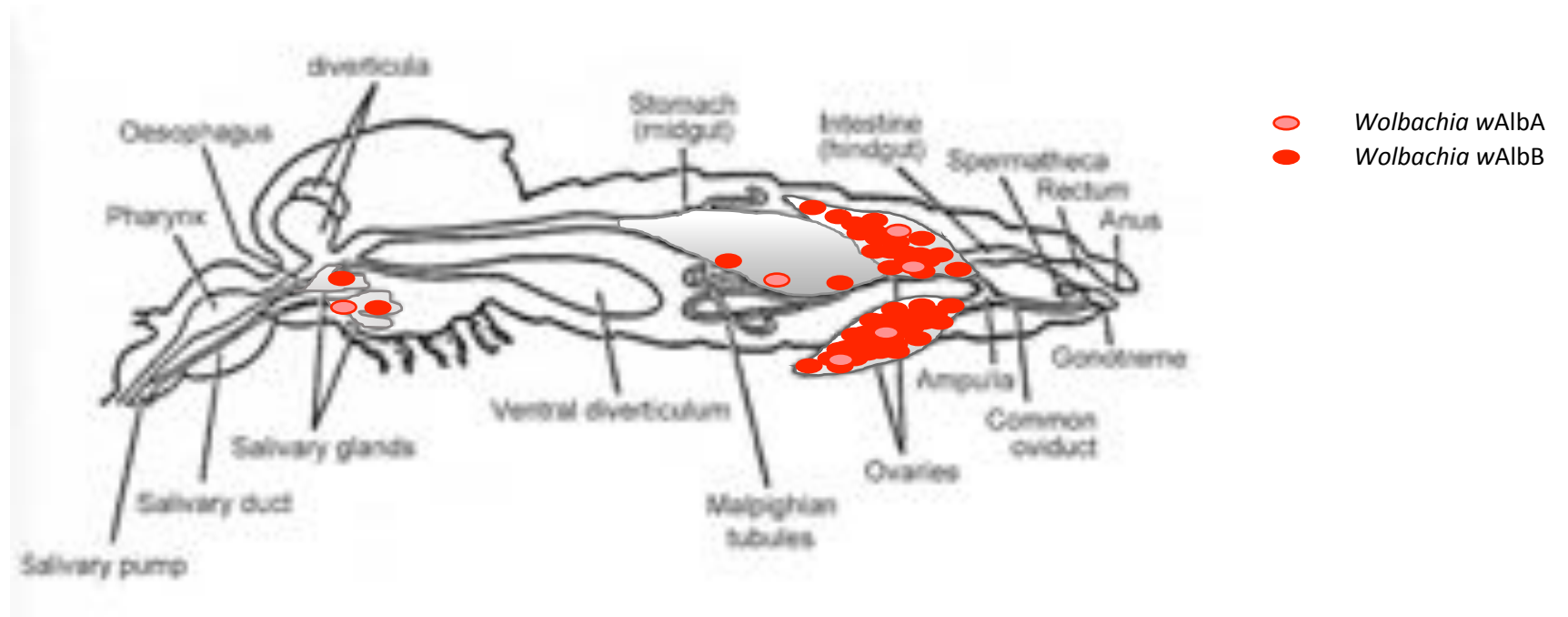


- Seulement deux échantillons d'intestin dominés par *Wolbachia*
- Dominance de *Dysgonomonas*
- Plus faible diversité en France - diversité plus homogène



- Populations **génétiquement différenciées** mais possibilité d'**Ad-mixture en France** et au Vietnam (PLV, BD)
- **Réduction de diversité génétique** et de **richesse allélique** – **corrélation** avec la **diversité microbienne**

- **Wolbachia** :
  - **Domine** le microbiote bactérien – **corrélation** entre les deux clades (régulation ?)
  - Présente dans les **organes de réplication** virale (principalement ovaires)



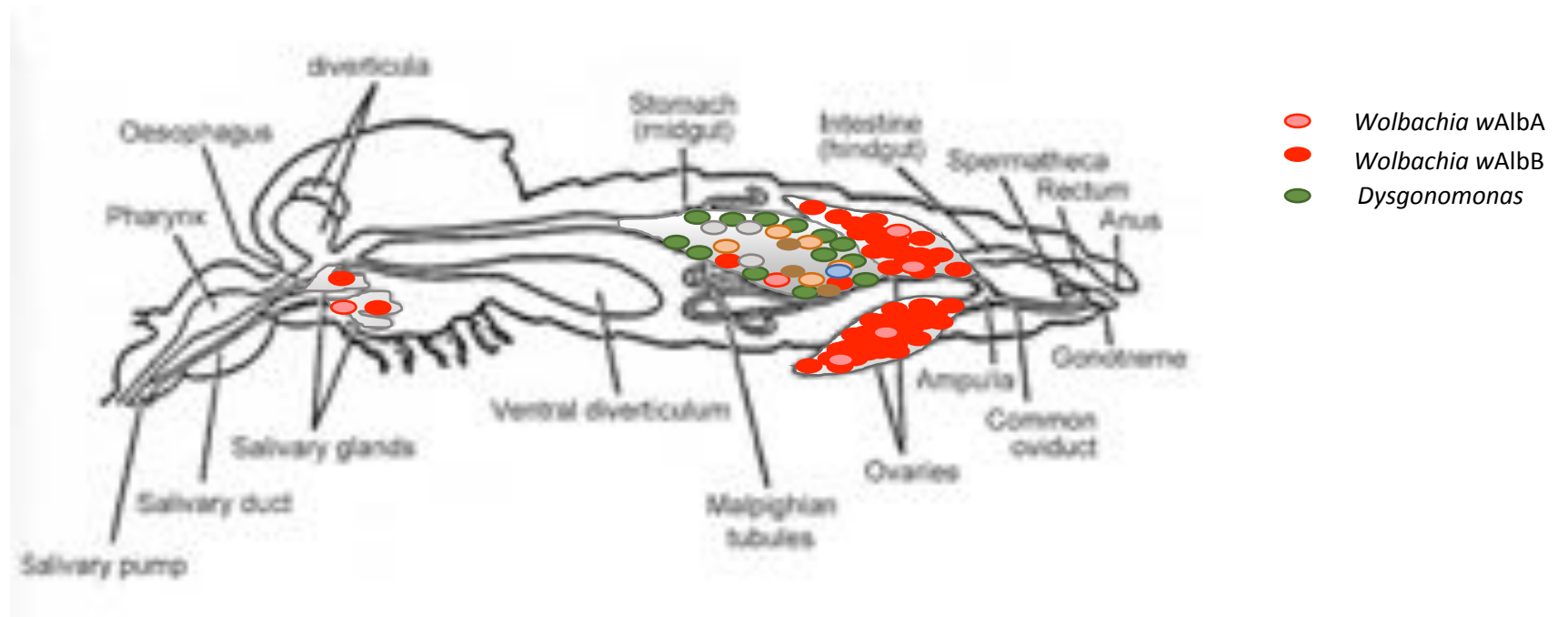
- *Wolbachia* :
  - **Domine** le microbiote bactérien – **corrélation** entre les deux clades (régulation ?)
  - Présente dans les **organes de répliation** virale (principalement ovaires)

- **Perspectives :**
  - Facteurs de régulation en **condition contrôlée**
  - **Dynamique de colonisation par organe ?**
  - **Génomique comparative** en cours (Mavingui *et al.*, 2012)

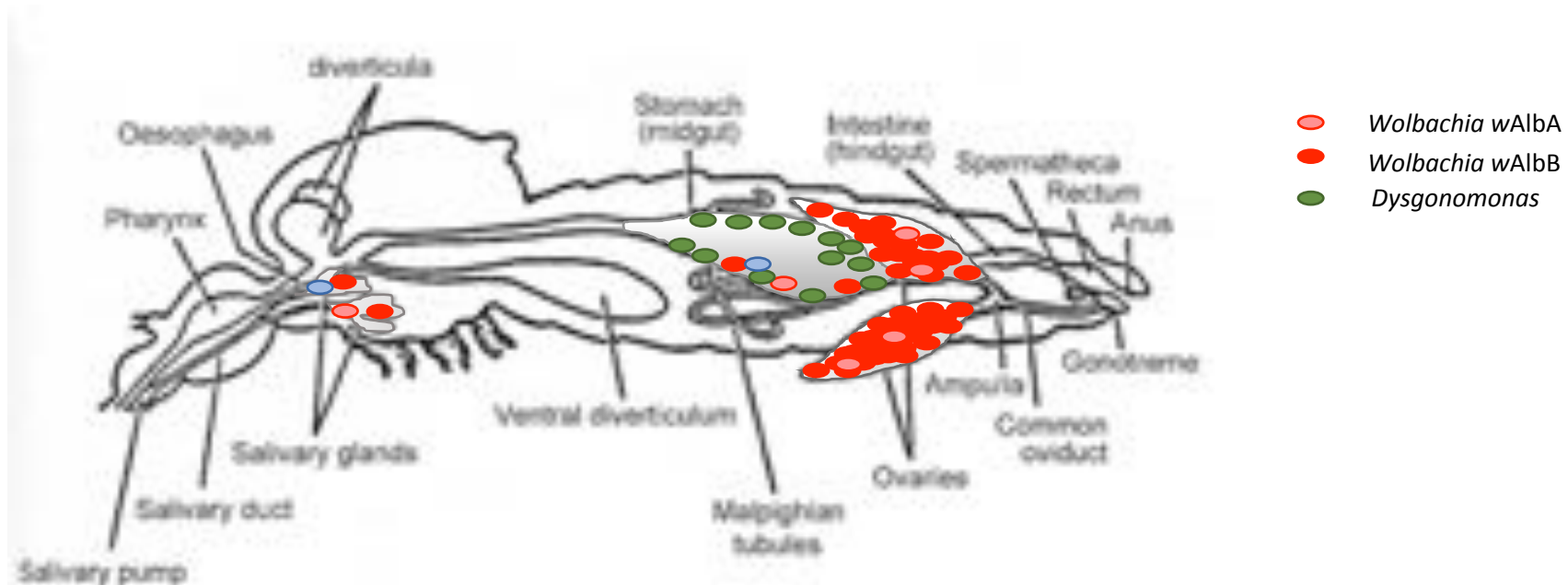


- *Dysgonomonas* :
  - Domine le microbiote bactérien intestinal

- Perspectives :
  - Isolement – séquençage
  - Fonction ? Dynamique au cours des stades.



- **Microbiote**
  - Réduit chez populations de moustiques invasifs français





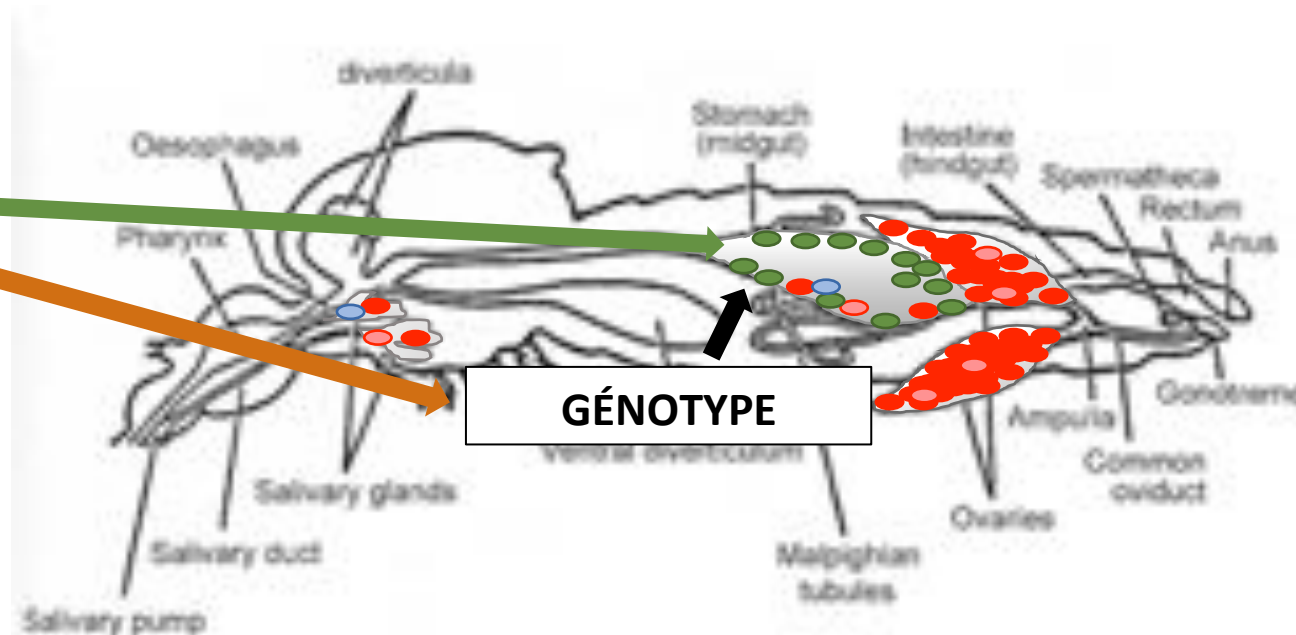
- **Microbiote**

- Réduit chez populations de moustiques invasifs français
- Génotype – Environnement ?

- **Perspectives :**

- Impact de la **diversité génétique** sur le **microbiote bactérien intestinal**, sur la **compétence**
- Impact des **facteurs abiotiques** (Température, humidité)
- **Assemblages microbiens – compétence, physiologie**

ENVIRONNEMENT



GÉNOTYPE

- *Wolbachia wAlbA*
- *Wolbachia wAlbB*
- *Dysgonomonas*



Grégory Lambert



Rémy Foussadier  
Christophe Bellet



Claire Valiente Moro  
Patrick Mavingui



Pierre Ravelonandro



Cristina Vieira  
Matthieu Boulesteix  
Clement Goubert  
Eleonore Hellard



Institut Pasteur

Khanh H.K. Ly  
Trang T.T. Huynh  
Farah N. Raharimalala

Florence-Hélène Tran  
Van Tran Van  
Guillaume Carillo  
Patrick Potier  
Catherine Legras-Lachuer  
Dimitri Lavillette  
Vincent Raquin  
Yohan Saucereau  
Karima Zouache  
Margot Enguehard  
François Chaix  
Audrey Dubost  
Maxime Bruto  
Patricia Luis  
Florian Barbi

Cette thèse a été financée par une bourse de la Région Rhône-Alpes



COMMUNAUTÉS  
DE RECHERCHE  
ACADÉMIQUE  
Rhône-Alpes



SANTÉ

Rhône-Alpes Région



Institut National de la Recherche Agronomique



VetAgro Sup



dépasser les frontières