

Etude du microbiome du tube digestif de *Galleria Mellonella* et rôle dans la dégradation du polyéthylène

Auteur : Latour, Samuel

Promoteur(s) : Francis, Frédéric; Delvigne, Frank

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2017-2018

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/6055>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative" (BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

ÉTUDE DU MICROBIOME DU TUBE DIGESTIF DE GALLERIA MELLONELLA ET RÔLE DANS LA DÉGRADATION DU POLYÉTHYLÈNE

SAMUEL LATOUR

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADEMIQUE 2017-2018

CO-PROMOTEURS: F. FRANCIS & F. DELVIGNE

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech

Le présent document n'engage que son auteur.

ÉTUDE DU MICROBIOME DU TUBE DIGESTIF DE GALLERIA MELLONELLA ET RÔLE DANS LA DÉGRADATION DU POLYÉTHYLÈNE

SAMUEL LATOUR

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADEMIQUE 2017-2018

CO-PROMOTEURS: F. FRANCIS & F. DELVIGNE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je remercie mes co-promoteurs M. Francis et M. Delvigne de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de fin d'études dans une problématique passionnante. Je tiens à remercier particulièrement M. Francis pour sa disponibilité et son intérêt malgré un emploi du temps chargé.

Je remercie également toutes les personnes de l'unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive pour l'ambiance et le partage qu'ils s'efforcent de faire régner. Merci à Nico de m'avoir ouvert les yeux sur les amplicons et de m'avoir apporté une aide précieuse. De même, je remercie Greg pour les nombreuses discussions, l'aide, le partage de curiosité et les relectures. Merci à Laurent pour le temps et l'énergie passés pour les analyses protéomiques.

Je voudrais adresser toutes mes reconnaissances aux personnes dévouées qui font vivre les softwares et leurs forums. Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide indéniable qu'ils apportent. Les communautés QIIME2 et R tout particulièrement.

Je remercie Abdoul pour sa participation conséquente dans les préparations de librairies.

Je pense particulièrement à Plitou sans qui toutes ces années n'auraient pas pu avoir de sens. J'espère profondément que l'avenir sera fait du meilleur .

De tout cœur, j'aimerais remercier ma famille qui m'a accompagné durant toutes ces années. Ainsi que tous les amis qui ont partagé des moments de vie à mes côtés : Gilles, les déchs et tous les autres évidemment.

RÉSUMÉ

La production actuelle de 335 mégatonnes à l'année de matière plastique nécessite une optimisation cruciale des procédés de dégradation actuellement mis en place. Dans ce contexte, l'identification de nouvelles voies de biodégradation permettrait une baisse de la pollution actuelle par les déchets plastiques. Le polyéthylène représente actuellement le principal matériau plastique utilisé dans le monde. Le microbiome présent au sein du tube digestif des insectes suscite l'intérêt pour l'identification de bactéries et d'enzymes relatives à la dégradation. Certains modèles tels que *Tenebrio molitor*, *Plodia interpunctella* ou *Galleria mellonella* ont la capacité d'ingérer du polyéthylène. Il est donc porteur d'identifier la composition et le rôle qu'assure le microbiome intestinal dans ce processus. Ce travail s'inscrit dans cette thématique en prenant *G. mellonella* pour modèle biologique. Il a été possible de mettre au point une diète comprenant du polyéthylène à destination de larves de *G. mellonella*. Ensuite, une approche métagénomique a été développée pour caractériser le microbiome du tube digestif. Les Enterococcaceae et Oxalobacteraceae ont été identifiés comme familles bactériennes majoritaires. Les genres bactériens *Citrobacter* et *Corynebacterium* ont pu être associés à une diète comprenant du polyéthylène. Une réduction significative de la diversité phylogénétique microbienne a pu être déterminée lors de la consommation de polyéthylène. Dernièrement, une analyse fonctionnelle par métaprotéomique a été amorcée sur le microbiome. Ce travail offre une meilleure connaissance du microbiome du tube digestif de *Galleria mellonella* et permet de fixer une base pour les futures études en matière de biodégradation de polyéthylène sur base de la valorisation des micro-organismes du tube digestif des insectes .

ABSTRACT

The current plastic production reaching 335 megatons implies a crucial optimization of the degradation pathways. In this way, finding some new biodegradation processes could lead to a reduction of plastic pollution throughout the world. Polyethylene is the most used plastic in the world. Gut microbiota of insects is raising interest to identify plastic degrading bacteria and associated enzymes. Some entomological models such as *Tenebrio molitor*, *Plodia interpunctella* or *Galleria mellonella* have the ability to ingest and feed on polyethylene. Then, it is promising to identify the composition and the role of the gut microbiota in this process. This work takes part in this issue by investigating *G. mellonella* as a biological model. It has been possible to set up a specific diet with polyethylene incorporated therein in order to feed *G. mellonella*. Then, a metagenomic approach was developed to characterize the gut microbiota. Enterococcaceae and Oxalobacteraceae were found to be the major bacterial families. *Citrobacter* and *Corynebacterium* geni have been associated with the specific polyethylene diet. A significant decrease in phylogenetic diversity has been observed with polymer diet. Finally, a functional analysis by a metaproteomic approach has been initiated on the microbiota. This work allows a better understanding of the gut microbiota of *G. mellonella* and provide a basis for the further biodegradation study of polyethylene based on the micro-organism valorisation from insect guts.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. CONTEXTE	1
1.2. LE POLYÉTHYLÈNE.....	2
1.2.1. <i>Contexte</i>	2
1.2.2. <i>Caractéristiques</i>	3
1.2.3. <i>Biodégradation</i>	4
1.3. GALLERIA MELLONELLA.....	9
1.3.1. <i>Œufs</i>	10
1.3.2. <i>Larves</i>	10
1.3.3. <i>Pupes</i>	13
1.3.4. <i>Imago</i>	13
1.4. MICROBIOME INTESTINAL DES INSECTES	14
1.4.1. <i>Généralités</i>	14
1.4.2. <i>Galleria mellonella</i>	15
1.4.3. <i>Microbiome et alimentation</i>	16
1.5. MÉTAGÉNOMIQUE.....	17
1.5.1. <i>Étude de communautés microbiennes</i>	17
1.5.2. <i>Séquençage du gène codant l'ARNr 16S</i>	18
1.6. MÉTAPROTÉOMIQUE	18
1.6.1. <i>Généralités</i>	18
2. OBJECTIFS DU TRAVAIL	20
3. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	21
3.1. ÉLEVAGE ET DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODOLOGIE	21
3.1.1. <i>Tests de survies et optimisation des diètes</i>	21
3.1.2. <i>Sélection des modalités</i>	23
3.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	24
3.2.1. <i>Dissections</i>	24
3.2.2. <i>Désintégration cellulaire et homogénéisation</i>	26
3.2.3. <i>Extraction d'ADN et des protéines</i>	27
3.2.4. <i>Qualité et dosage</i>	28
3.3. MÉTAGÉNOMIQUE.....	29
3.3.1. <i>Amplification</i>	30
3.3.2. <i>Purification et indexage</i>	30
3.3.3. <i>Bioinformatique</i>	31

3.3.4. Analyses statistiques	35
3.4. MÉTAPROTÉOMIQUE	36
3.4.1. Réduction, alkylation et digestion.....	36
3.4.2. Identification LC-MS/MS.....	36
3.4.3. Bioinformatique.....	37
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION	38
4.1. TESTS PRÉLIMINAIRES.....	38
4.2. MÉTAGÉNOMIQUE.....	40
4.1.1. Qualité et Quantité d'ADN.....	40
4.1.2. Traitement des séquences	42
4.1.3. Étude taxonomique des communautés microbiennes	43
4.1.4. Bactéries associées au polyéthylène	49
4.1.5. Diversité microbienne.....	51
4.3. MÉTAPROTÉOMIQUE	57
4.1.6. Migration des protéines extraites.....	57
4.1.7. Identification des protéines par LC-MS/MS.....	58
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	59
6. BIBLIOGRAPHIE	61
7. ANNEXES	68
7.1. PHOTOGRAPHIE DES CADRES D'ÉLEVAGE	68
7.2. PROTOCOLE DU KIT ALLPREP (QIAGEN).....	68
7.3. PROTOCOLE D'ÉLABORATION D'UNE LIBRAIRIE POUR SÉQUENÇAGE ILLUMINA (DNAVISION)	71
7.4. TABLEAU REPRENANT LES CRITÈRES DE DÉCISION POUR LA SÉLECTION DES ÉCHANTILLONS	78
7.5. PHOTOGRAPHIE DE LA CONSOMMATION DE POLYÉTHYLÈNE	79
7.6. ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (DISTANCE UNIFRAC UNWEIGHTED).....	79

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PRINCIPALES BACTÉRIES AYANT UN RÔLE DANS LA DÉGRADATION DU POLYÉTHYLÈNE	6
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX MYCÈTES INTERVENANT DANS LA DÉGRADATION DE POLYÉTHYLÈNE (RESTREPO- FLÓREZ ET AL., 2014)	8
TABLEAU 3 : TAUX DE MORTALITÉ ET NOMBRE DE JOURS AVANT FORMATION DU COCON DE GALLERIA MELLONELLA SELON LE TRAITEMENT (QUATRE RÉPLICATS PAR TRAITEMENT).....	38
TABLEAU 4 : DOSAGE DE L'ADN TOTAL ET DOUBLE BRIN ; RATIOS D'ABSORBANCE POUR LA DIÈTE DE CIRE (STD1 À STD8) ET LA DIÈTE MIXE CIRE/PE (PE1 À PE8).....	40
TABLEAU 5 : NOMBRE DE SÉQUENCES APRÈS LES ÉTAPES DE FILTRAGE : READS TOTAUX, READS ASSEMBLÉS PAR ÉCHANTILLONS, FILTRE DU PLUG-IN DADA2 (FILTRER LE BRUIT, ASSEMBLER PAR PAIRE ET RETIRER LES CHIMÈRES)	42
TABLEAU 6 : MOYENNE DES DIFFÉRENTS INDICES DE DIVERSITÉ ALPHA POUR LES MICROBIOMES DE TUBES DIGESTIFS DE GALLERIA MELLONELLA NOURRIS AVEC L'UNE DES DEUX DIÈTES ET TESTS STATISTIQUES ASSOCIÉS ($\alpha=0,05$), NS : NON SIGNIFICATIF	54

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DES DIFFÉRENTS PLASTIQUES (ORIGINE PÉTROCHIMIQUE) COURAMMENT EMPLOYÉS : POLYÉTHYLÈNE (PE), POLYCHLORURE DE VINYLE (PVC), POLYPROPYLÈNE (PP), POLYSTYRÈNE (PS), POLYÉTHYLÈNE TÉRÉPHTALATE (PETE) ET POLYURÉTHANE (PU) (SHAH ET AL., 2008)	3
FIGURE 2 : DIFFÉRENTS STADES DE DÉVELOPPEMENT DE GALLERIA MELLONELLA. ŒUFS (1), LARVES D'APPROXIMATIVEMENT : 10J. (2), 20J. (3), 25J. (4), 35J. (5), 40J. (6), PRÉPUPE (7), PUPE (8) ET ADULTE (9) (JORJÃO ET AL., 2017).	10
FIGURE 3 : STRUCTURE GÉNÉRALE DU TUBE DIGESTIF DES INSECTES (ADAPTÉ DE ENGEL & MORAN, 2013). .	12
FIGURE 4 : ADULTES DE GALLERIA MELLONELLA (HAUT: MÂLE, BAS: FEMELLE) (ELLIS ET AL., 2013)	13
FIGURE 5 : ABONDANCE RELATIVE DES PRINCIPAUX GENRES BACTÉRIENS AU SEIN DU MICROBIOME DU TUBE DIGESTIF DE GALLERIA MELLONELLA DURANT LES DIFFÉRENTS STADES DE MÉTAMORPHOSES (ADAPTÉ DE JOHNSTON & ROLFF, 2015).....	15
FIGURE 6 : RÉGIONS HYPERVARIABLES DE L'ARN RIBOSOMAL 16S DE E. COLI (YARZA ET AL., 2014)	18
FIGURE 7 : ÉTAPES PRINCIPALES DE L'ÉTUDE D'UN MÉTAPROTÉOME (ADAPTÉ DE XIAO ET AL., 2017).	19

FIGURE 8 : A. DIFFÉRENTES MODALITÉS DE DIÈTES ET D'INDIVIDUS TESTÉS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> (PE : POLYÉTHYLÈNE, CIRE : RAYONS DE CIRE DE RUCHE). LA PREMIÈRE LIGNE (ROUGE) CORRESPOND À LA DIÈTE. LA SECONDE LIGNE (VERT) CORRESPOND À LA QUANTITÉ D'ALIMENTS. LES DERNIÈRES LIGNES (BLEU) REPRÉSENTENT LA CATÉGORIE DE LARVES SÉLECTIONNÉES PAR LEUR MASSE EN DÉBUT DE TRAITEMENT. B. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTALE DE LA DIÈTE POLYÉTHYLÈNE. C. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL DE LA DIÈTE CIRE/POLYÉTHYLÈNE. PHOTOGRAPHIE : LATOUR 2018.....	22
FIGURE 9 : SCHÉMA DE LA MÉTHODOLOGIE UTILISÉE POUR LES DIÈTES DE CIRE OU DE CIRE ET POLYÉTHYLÈNE DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> ; LE CYLINDRE REPRÉSENTE UNE STRUCTURE EN VERRE DE 0,5L MUNIE D'UN TREILLIS. (CYCLE : 6-7 SEMAINES À 30 ± 2 °C ET $70 \pm 10\%$ HR).....	24
FIGURE 10 : TUBE DIGESTIF (BOUCHE : HAUT DROITE) DE LARVE DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> POSITIONNÉE SUR LA FACE VENTRALE, MICROSCOPE EURANEX. PHOTOGRAPHIE LATOUR 2018.....	25
FIGURE 11 SCHÉMA DE LA MÉTHODOLOGIE APPLIQUÉE POUR EXTRAIRE L'ADN ET LES PROTÉINES (ADAPTÉ DE PEÑA-LLOPIS & BRUGAROLAS, 2013).....	26
FIGURE 12 : SCHÉMA DE LA MÉTHODOLOGIE APPLIQUÉE AU TRAITEMENT DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE (QIIME2_TEAM, 2018B).....	32
FIGURE 13 : TAUX DE RÉDUCTION DE LA MASSE DE POLYÉTHYLÈNE (MOYENNE \pm ÉCART-TYPE). CIRE_PE1 : 2,8/0,1G LARVES 79 ± 26 MG, CIRE_PE2 : 4,0/0,1G LARVES 79 ± 26 MG, PE1 : 0,1G LARVES 157 ± 34 MG, PE2 : 0,1G LARVES 79 ± 26 MG.....	39
FIGURE 14 : COURBE DE RARÉFACTION REPRÉSENTANT LA RICHESSE SPÉCIFIQUE DES DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS. LA TABLE OTUS N'EST PAS FILTRÉE DES OTUS PRÉSENTS DANS UN SEUL ÉCHANTILLON. LA PROFONDEUR DE SÉQUENCES EST LIMITÉE À 6500 AFIN D'OBtenIR PLUS DE CLARTÉ.....	43
FIGURE 15 : ABONDANCE RELATIVE DES BACTÉRIES (NIVEAU PHYLUM) PRÉSENTES AU SEIN DU TUBE DIGESTIF DES ÉCHANTILLONS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> POUR LA DIÈTE DE CIRE (STD1-STD8) ET POUR LE RATIO CIRE-POLYÉTHYLÈNE (PE1-PE8).....	44
FIGURE 16 : ABONDANCE RELATIVE DES BACTÉRIES (TOP 10 DES FAMILLES) PRÉSENTES AU SEIN DU TUBE DIGESTIF DES ÉCHANTILLONS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> POUR LA DIÈTE STANDARD DE CIRE (STD1-STD8) ET POUR LE RATIO CIRE-POLYÉTHYLÈNE (PE1-PE8).....	45
FIGURE 17 : ABONDANCE RELATIVE DES BACTÉRIES (TOP 10 DES GENRES) PRÉSENTES AU SEIN DU TUBE DIGESTIF DES ÉCHANTILLONS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> POUR LA DIÈTE STANDARD DE CIRE (STD1-STD8) ET POUR LE RATIO CIRE-POLYÉTHYLÈNE (PE1-PE8).....	47

FIGURE 18 : ANALYSE DIFFÉRENTIELLE DE L'ABONDANCE (DESEQ2) DES MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS DANS LE TUBE DIGESTIF DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> ENTRE LES DIÈTES. OTUs SIGNIFICATIVEMENT ASSOCIÉ À LA DIÈTE CIRE/POLYÉTHYLÈNE (PVALEUR NON AJUSTÉE < 0,05). LE SIGNE NÉGATIF DU LOG2FOLD INDIQUE LA VARIATION LOGARITHMIQUE DE L'ABONDANCE DANS LE SENS DU TRAITEMENT CIRE/POLYÉTHYLÈNE	49
FIGURE 19 : RÉSULTATS DE L'ANALYSE DIFFÉRENTIELLE D'ABONDANCE RÉALISÉE PAR BRANDON ET COLLÈGUES (2018) SUR LE TUBE DIGESTIF DE <i>TENEBRIOS MOLITOR</i> CONSOMMANT DU POLYÉTHYLÈNE OU DU SON DE BLÉ.....	50
FIGURE 20 : COURBE DE RARÉFACTION DES OTUs OBSERVÉS DANS LES ÉCHANTILLONS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> FIGURE 17 APRÈS AVOIR FILTRÉ LES OTUs PRÉSENTS DANS UN SEUL ÉCHANTILLON (LA COURBE EST REPRÉSENTÉE JUSQUE 3000 SÉQUENCES POUR PLUS DE CLARTÉ).....	52
FIGURE 21 : ALPHA DIVERSITÉ DU MICROBIOME DE TUBES DIGESTIFS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> NOURRI AVEC LA DIÈTE À BASE DE CIRE OU DE POLYÉTHYLÈNE (A. DIVERSITÉ DE FAITH , B. INDICE D'ÉQUITABILITÉ DE PIELOU, C. INDICE DE SHANNON)	53
FIGURE 22 : POSITIONNEMENT MULTIDIMENSIONNEL NON MÉTRIQUE (NMDS) COMPARANT LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES PROVENANT D'ÉCHANTILLONS DE <i>G. MELLONELLA</i> À PARTIR DES INDICES DE BRAY-CURTIS. LES TAXA SONT FILTRÉS AFIN DE GARDER LES OTUs PRÉSENTS PLUS DE 5 FOIS DANS LA MOITIÉ DES ÉCHANTILLONS. LES ELLIPSES PRÉSENTENT UN INTERVALLE DE CONFIANCE DE 95%	55
FIGURE 23 : DIAGRAMME DE SHEPARD : DISTANCE DE L'ORDINATION EN FONCTION DE LA DISSIMILLARITÉ OBSERVÉE POUR L'ORDINATION NMDS À PARTIR DE LA MATRICE DE DISTANCE DE BRAY-CURTIS.....	56
FIGURE 24 : GEL D'ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE DES ÉCHANTILLONS DES TUBES DIGESTIFS DES LARVES DE <i>G. MELLONELLA</i> , STD = DIÈTE STANDARD (HAUT) PE : DIÈTE POLYÉTHYLÈNE (BAS).	57

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNr : acide ribonucléique ribosomique
dNTP : désoxy nucléotide triphosphates
HDPE : polyéthylène haute densité
HR : humidité relative
LC : chromatographie liquide
LDPE : polyéthylène basse densité
MS : spectrométrie de masse
NGS : séquençage de nouvelle génération
OTU : unité taxonomique opérationnelle
PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS : tampon phosphate salin
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PE : polyéthylène
PET : polyéthylène téréphthalate
pH : potentiel hydrogène
PS : polystyrène
PVC : polychlorure de vinyle
QIIME: Quantitative Insight into Microbial Ecology
SDS: sodium dodecyl sulfate
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane

1. Introduction

1.1. Contexte

La situation actuelle de pollution due à l'accumulation de déchets plastiques à travers le monde est un problème de taille. Les plastiques synthétiques sont présents au niveau de la fabrication des emballages destinés à de nombreux secteurs industriels tels que l'alimentaire, le pharmaceutique, les cosmétiques, les détergents ainsi que d'autres secteurs de la chimie (Shimao, 2001). En 2016, la production mondiale de plastique a atteint les 335 mégatonnes (PlasticsEurope, 2017). Sans conteste, les propriétés physicochimiques du plastique ont fait de ce matériau, un standard utilisé dans d'innombrables domaines. Les propriétés telles que la dureté, la résistance à l'eau et aux différentes dégradations représentent des critères d'intérêts pour les industriels. Les polymères plastiques les plus utilisés pour les divers emballages sont le polyéthylène (PE basse, moyenne ou haute densité), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS) , le polychlorure de vinyle (PVC), le polyuréthane (PUR), le polyéthylène téréphtalate (PET), le polybutylène téréphtalate (PBT) et le nylon (Shah *et al.*, 2008). Il est inhérent pour ces matières synthétiques de persister au sein des écosystèmes naturels et d'occasionner une multitude de dérèglements (Jambeck *et al.*, 2015). La pollution des milieux marins par les micros- et les macro-plastiques perturbe fortement l'équilibre des écosystèmes et entraîne des perturbations notamment lors d'ingestions par les organismes vivants (Li *et al.*, 2016). Afin de réduire cette pollution, différentes voies sont exploitées. En ce sens, de nombreux micro-organismes ont déjà été étudiés afin d'intervenir dans une dégradation biologique de polymères plastiques. Parmi ceux-ci, les rôles de différentes bactéries ont déjà été mis en avant (Tableau 1). Certains Mycètes ont également montré un potentiel de dégradation envers divers plastiques (Tableau 2). Dernièrement, la classe des insectes a été mise sous lumière pour la biodégradation de certains polymères de types polystyrène ou polyéthylène. Parmi ceux-ci, *Tenebrio molitor* (Linné, 1758), *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813), ou encore *Galleria mellonella* (Linné, 1758) ont dégradé des polymères plastiques. Le rôle prépondérant du microbiome du tube digestif de ces larves semble être une piste d'avenir pour la biodégradation du plastique. Une connaissance plus approfondie des micro-organismes et des enzymes impliqués dans cette dégradation peut ouvrir des voies de traitement de ces déchets (Riudavets *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014, 2015; Bombelli *et al.*, 2017). La larve de *G. mellonella* est un candidat de choix notamment suite aux travaux de Bombelli et collègues (2017) illustrant la dégradation du polyéthylène.

1.2. *Le polyéthylène*

1.2.1. Contexte

En 2016, la production mondiale de matière plastique a atteint les 280 millions de tonnes. L'Europe contribue à hauteur de 19% dans cette production globale (PlasticsEurope, 2017).

Les plastiques peuvent être ordonnés selon de nombreuses classes en fonction de leurs propriétés (conductivité électrique, dégradation, durabilité), leur structure chimique et leur origine (ressources non-renouvelables ou biomasse) (Shah *et al.*, 2008; Alshehrei, 2017). Cependant, deux grandes familles de plastiques sont distinguables. Premièrement, les thermoplastiques sont des polymères dont la constitution ne change pas lorsqu'ils subissent une élévation de température. Ils peuvent être fondu et resolidifiés de façon répétée sans perdre leurs propriétés. Cette classe comporte certains des plastiques les plus courants tels que le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS), le polychlorure de vinyle (PVC) ou le polyéthylène téréphthalate (PET). Ils sont assemblés suivant un schéma répétitif d'unité (monomère). La deuxième classe correspond aux plastiques thermodurcissables. Ceux-ci subissent des changements chimiques lorsque la chaleur façonne de façon irréversible le réseau tridimensionnel les constituants. Il n'est donc pas possible de les faire fondre et de reformer le plastique de départ. Les structures sont fortement réticulées comparées à la structure linéaire des thermoplastiques. Le polyuréthane (PU) ou le phénol-formaldéhyde en font partie (Alshehrei, 2017) .

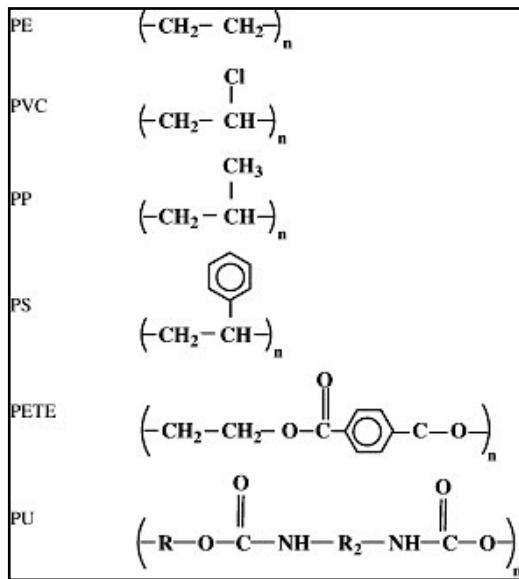


Figure 1 : Structure des différents plastiques (origine pétrochimique) couramment employés : polyéthylène (PE), polychlorure de vinyle (PVC), polypropylène (PP), polystyrène (PS), polyéthylène téréphtalate (PETE) et polyuréthane (PU) (Shah *et al.*, 2008).

Certains des polymères les plus courants, tels que le polyéthylène, ont des chaînes hydrocarbonées sans ramifications (Figure 1). D'autres plastiques tels que le polyéthylène téréphtalate (PET) sont des polymères comprenant des liaisons éster entre des téréphtalates et de l'éthylène glycol (Han *et al.*, 2017).

1.2.2. Caractéristiques

- Propriétés

Le polyéthylène est un plastique d'origine pétrochimique de formule C_nH_{2n} qui se présente sous la forme d'une chaîne linéaire d'hydrocarbure (polyoléfine). Il existe deux types de polyéthylène classés selon leur densité (faible ou haute). Ceux-ci sont largement utilisés dans l'industrie du packaging/emballage. Son efficacité, sa polyvalence, sa légèreté, son prix ainsi que sa simplicité d'utilisation dans les procédés font de ce matériau un des plus utilisés actuellement (Ojha *et al.*, 2017).

Le polyéthylène est un matériau semi-cristallin qui comprend donc des zones amorphes et cristallines (Restrepo-Flórez *et al.*, 2014). Le pourcentage de cristallinité avoisine les 25-50% pour du polyéthylène basse densité (LDPE) (Jordan *et al.*, 2016). L'hydrophobilité est caractérisée par un angle de contact supérieur à 99 °, ce qui caractérise une surface hydrophobe. La température de fusion se situe aux alentours de 110°C (Roy *et al.*, 2008). La densité du LPDE se situe entre 0,915 et 0,940 g/cm³ (Yang *et al.*, 2014). La masse moléculaire peut atteindre plusieurs dizaines de milliers (Gyung Yoon *et al.*, 2012).

- Production

Différentes voies de production sont possibles afin d'obtenir du polyéthylène. L'une des principales consiste à assembler une succession d'unités d'éthylène appelée monomère par une réaction de polymérisation. Si le polymère contient exclusivement des unités d'éthylène, il est appelé homopolymère, sinon c'est un copolymère. Le comonomère 1-hèxène est par exemple souvent employé afin de réguler la densité finale du polymère. Ces réactions peuvent s'opérer au sein de différents types de réacteurs à phases liquide ou encore gazeuse (Kong *et al.*, 2017).

- Voies de dégradations

Les plastiques ont la caractéristique d'être persistant dans l'environnement. Ceux-ci peuvent prendre plus de 1000 ans pour se dégrader selon leur masse moléculaire. La dégradation est caractérisée par tout changement physique ou chimique au sein du polymère, découlant d'un facteur environnemental (lumière, chaleur, humidité, conditions chimiques ou biologiques) (Shah *et al.*, 2008).

Différents mécanismes mènent à une dégradation du plastique. Ceux-ci sont de nature chimique, thermique, photoxidative ou biologique (Alshehrei, 2017). La dégradation implique un changement au niveau des propriétés du polymère plastique. Les fonctions de celui-ci sont affectées en raison des réactions chimiques, physiques et biologiques déclenchées. Ces réactions résultent de la cassure de liaisons, la formation de nouveaux groupes fonctionnels et des transformations chimiques résultantes (Shah *et al.*, 2008).

1.2.3. Biodégradation

Actuellement, l'élimination de polyéthylène usagé reste un problème d'ampleur vu la pollution qui en découle. Les techniques chimiques ou physiques utilisées actuellement sont non seulement coûteuses, mais également productrices de composés toxiques tels que les polluants organiques persistants (POP tels que les furanes et les dioxines). Ceux-ci ont montré un danger non seulement pour l'homme, mais plus globalement pour les différents écosystèmes de la planète (Ojha *et al.*, 2017).

Deux grandes voies sont prises en compte dans la dégradation du polyéthylène, selon leurs origines, elles sont classées en abiotique ou biotique. La première est représentée par des facteurs environnementaux

tels que les rayons UV, la température ou encore l'oxygène. La seconde est prise en charge par les micro-organismes qui entraînent une biodégradation des polymères en modifiant et/ou consommant ceux-ci. Les propriétés des polymères telles que la cristallinité, l'hydrophobicité, la topographie ou la composition chimique s'en retrouvent modifiés. Il est évident que ces deux classes de dégradation se retrouvent presque toujours simultanément lors d'une dégradation naturelle. Que ce soit l'intervention de rayons UV ou l'action d'une enzyme, une étape d'oxydation est requise pour entraîner une dégradation du polyéthylène (Restrepo-Flórez *et al.*, 2014).

Un grand nombre de micro-organismes a la capacité de s'attaquer aux polymères plastiques. Cependant, la longue durée et le faible degré de dégradation limite leur usage industriellement. Il y aurait plus de 90 genres de bactéries, de champignons et d'actinomycètes qui ont la capacité de dégrader le plastique. (Mahdiyah & Mukti, 2013). Selon le type de biodégradation, différents produits peuvent être retrouvés. Si la réaction est aérobie, du dioxyde de carbone et de l'eau seront présents. Si la dégradation est anaérobique, il y aura présence de dioxyde de carbone, d'eau et de méthane (Gu, 2003).

Différentes étapes se succèdent au niveau de la dégradation. Lorsque les enzymes sécrétées par les micro-organismes entraînent la coupure des polymères de longue chaîne en plus petites entités (en oligomères, dimères et/ou monomères), ceux-ci deviennent alors assimilables au sein d'une bactérie (membrane semi-perméable). Ils peuvent dès lors être utilisés en tant que source de carbone et d'énergie. Cette étape est la dépolymérisation. Si les produits obtenus après ces étapes sont le dioxyde de carbone, l'eau et le méthane, c'est une minéralisation (Shah *et al.*, 2008).

Il est à noter qu'une biodégradation du polyéthylène par l'intermédiaire de micro-organismes est tout de même amorcée par une photodégradation et une dégradation chimique (Shah *et al.*, 2008). Les bactéries peuvent également entamer la formation d'un biofilm afin de fragiliser le polymère (Bonhomme *et al.*, 2003). Le polyéthylène étant constitué de chaînes aliphatiques linéaires, le mécanisme d'action des familles d'enzymes suspectées de participer à sa biodégradation, telles que la laccase ou une alcane hydroxylase, résulte en une étape d'oxydation (Santo *et al.*, 2012; Restrepo-Flórez *et al.*, 2014). D'autres types d'enzymes telles les lipases, les estérases ou les cutinases ont été soulignées pour leurs rôles dans la dégradation de divers plastiques et sont également d'intérêt pour le polyéthylène (Mueller, 2006; Ojha *et al.*, 2017). Récemment, l'enzyme PETase a été découverte chez *Ideonella sakaiensis* pour sa capacité à dégrader le polyéthylène téraphthalate (Yoshida *et al.*, 2016).

- Bactérie

Une liste des principales bactéries a été mise en avant pour leur implication dans la dégradation du polyéthylène et permet de se rendre compte de la diversité (Tableau 1).

Tableau 1 : Principales bactéries ayant un rôle dans la dégradation du polyéthylène

Genre	Espèce	Référence
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aneurinibacillus</i>	<i>aneurinilyticus</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Arthrobacter</i>	<i>spp</i>	(Satlewal <i>et al.</i> , 2008; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2010)
	<i>paraffineus</i>	(Hakkarainen & Albertsson, 2004)
	<i>viscosus</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>brevies</i>	(Tomoko <i>et al.</i> , 2009)
	<i>cereus</i>	(Roy <i>et al.</i> , 2008; Satlewal <i>et al.</i> , 2008; Sudhakar <i>et al.</i> , 2008; Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>circulans</i>	(Tomoko <i>et al.</i> , 2009)
	<i>halodenitrificans</i>	(Roy <i>et al.</i> , 2008)
	<i>mycoides</i>	(Seneviratne <i>et al.</i> , 2006; Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>pumilus</i>	(Roy <i>et al.</i> , 2008; Satlewal <i>et al.</i> , 2008; Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>sphericus</i>	(Kawai, 2004; Sudhakar <i>et al.</i> , 2008)
	<i>subtilis</i>	(Harshvardhan & Jha, 2013)
	<i>thuringiensis</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>vallismortis</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2017)
	<i>sp. YP1</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Brevibacillus</i>	<i>agri</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2018)
	<i>borstelensis</i>	(Hadad <i>et al.</i> , 2005)
	<i>brevis</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>	(Koutny <i>et al.</i> , 2009)
<i>Enterobacter</i>	<i>spp</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2016)
	<i>asburiae YT1</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2014)

<i>Flavobacterium</i>	<i>spp</i>	(Koutny <i>et al.</i> , 2009)
<i>Kocuria</i>	<i>palustris</i>	(Harshvardhan & Jha, 2013)
<i>Lysinibacillus</i>	<i>xylanilyticus</i>	(Esmaeili <i>et al.</i> , 2013)
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>lylae</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
<i>Microbacterium</i>	<i>paraoxydans</i>	(Rajandas <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i>	(Bonhomme <i>et al.</i> , 2003)
<i>Paenibacillus</i>	<i>macerans</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pantoea</i>	<i>spp</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudomonas</i>	<i>spp</i>	(Balasubramanian <i>et al.</i> , 2010; Gyung Yoon <i>et al.</i> , 2012; Tribedi & Sil, 2013)
	<i>aeruginosa</i>	(Koutny <i>et al.</i> , 2009; Rajandas <i>et al.</i> , 2012)
	<i>citronellolis</i>	(Bhatia <i>et al.</i> , 2014)
	<i>fluorescens</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>protegens</i>	(Skariyachan <i>et al.</i> , 2017)
<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ralstonia</i>	<i>spp</i>	(Koutny <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rhodococcus</i>	<i>ruber</i>	(Gilan <i>et al.</i> , 2004; Santo <i>et al.</i> , 2012)
	<i>rhodochrous</i>	(Bonhomme <i>et al.</i> , 2003)
	<i>erythropolis</i>	(Koutny <i>et al.</i> , 2009)
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	(Azeko <i>et al.</i> , 2015)
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2010)
	<i>cohnii</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
	<i>xylosus</i>	(Nowak <i>et al.</i> , 2011)
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>spp</i>	(Koutny <i>et al.</i> , 2009; Skariyachan <i>et al.</i> , 2017)
<i>Streptomyces</i>	<i>badius</i>	(Pometto <i>et al.</i> , 1992)
	<i>coelicoflavus</i>	(Duddu <i>et al.</i> , 2015)
	<i>setonii</i>	(Pometto <i>et al.</i> , 1992)
	<i>viridosporus</i>	(Pometto <i>et al.</i> , 1992)

- Fungi

Il est également important de prendre en considération la contribution des champignons (Règne : Fungi) dans la dégradation du polyéthylène. Diverses souches d'intérêts pour la dégradation du polyéthylène sont présentées (Tableau 2).

Tableau 2 : Principaux Mycètes intervenant dans la dégradation de polyéthylène (Restrepo-Flórez et al., 2014)

Genre	Espèce	Référence
<i>Acremonium</i>	<i>kliense</i>	(Karlsson et al., 1988)
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	(Koutny et al., 2006; R. Pramila, 2011)
	<i>niger</i>	(Volke-Sepúlveda et al., 2002; Manzur et al., 2004)
	<i>nomius</i>	(Abraham et al., 2016)
	<i>terreus</i>	(Nowak et al., 2012)
	<i>tubingensis</i>	(Sangeetha Devi et al., 2015)
<i>Fusarium</i>	<i>versicolor</i>	(Karlsson et al., 1988; Koutny et al., 2006)
	<i>pullulans</i>	(Nowak et al., 2012)
<i>Chaetomium</i>	<i>spp</i>	(Sowmya et al., 2012)
<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	(Bonhomme et al., 2003; Koutny et al., 2006)
<i>Gliocladium</i>	<i>virens</i>	(Manzur et al., 2004)
<i>Mortierella</i>	<i>alpina</i>	(Koutny et al., 2006)
<i>Mucor</i>	<i>circinelloides</i>	(R. Pramila, 2011)
<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	(Ojha et al., 2017)
	<i>oxalicum</i>	
	<i>simplicissimum</i>	(Yamada-Onodera et al., 2001)

	<i>pinophilum</i>	(Volke-Sepúlveda <i>et al.</i> , 2002;
	<i>requentans</i>	Manzur <i>et al.</i> , 2004)
<i>Phanerochaete</i>	<i>chrysosporium</i>	(Seneviratne <i>et al.</i> , 2006)
<i>Verticillium</i>	<i>lecanii</i>	(Manzur <i>et al.</i> , 2004)
<i>Zalerion</i>	<i>maritimum</i>	(Karlsson <i>et al.</i> , 1988)
		(Paço <i>et al.</i> , 2017)

Les origines des organismes jouant un rôle dans le processus de biodégradation du polyéthylène sont diverses. En effet, certains de ces micro-organismes proviennent entre autres du sol (Koutny *et al.*, 2009; Esmaeili *et al.*, 2013), du tube digestif d'insectes (Yang *et al.*, 2014, 2015), de lombrics (Huerta Lwanga *et al.*, 2018) ou de milieux contaminés par des plastiques (Skariyachan *et al.*, 2016, 2018). Les tubes digestifs des insectes dégradant le polyéthylène, tel que *Galleria mellonella*, nécessitent de plus amples investigations afin d'identifier de nouvelles souches microbiennes d'intérêts (Bombelli *et al.*, 2017).

1.3. *Galleria mellonella*

La fausse teigne de la cire [Lepidoptera : Galleriinae, Pyralidae, *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)] est un insecte ubiquiste et nuisible pour les colonies d'abeilles européennes, *Apis mellifera* (L.). Les larves de *G. mellonella* peuvent engendrer une dégradation importante des rayons de cire constituant la ruche en se nourrissant de ceux-ci (Ellis *et al.*, 2013). Ce lépidoptère appartient au super-ordre des holométaboles et possède donc un cycle de vie segmenté en quatre stades : œuf, larve, pupe et imago (Figure 2). La durée du cycle complet varie de 8 à 12 semaines pour des conditions de température de 25 à 32°C (HR de ~70%) (Ramarao *et al.*, 2012; Ellis *et al.*, 2013). Cette durée est fortement dépendante des facteurs environnementaux ainsi que de la nourriture à disposition (Ellis *et al.*, 2013; Jorjão *et al.*, 2017; Kwadha *et al.*, 2017). De plus en plus, *G. mellonella* constitue aussi un modèle de choix pour l'étude des interactions entre hôtes et pathogènes de par son système immunitaire (Jorjão *et al.*, 2017).



Figure 2 : Différents stades de développement de *Galleria mellonella*. Œufs (1), Larves d'approximativement : 10J. (2), 20J. (3), 25J. (4), 35J. (5), 40J. (6), prépupa (7), pupe (8) et adulte (9) (Jorjão *et al.*, 2017).

1.3.1. Œufs

Les œufs sont déposés par la femelle adulte au sein des rayons de cire lors de l'oviposition. Ils se développent plus rapidement à des températures élevées (29°C-35°C). Les conditions environnementales telles que la température et l'humidité ont donc un rôle prépondérant sur le développement de l'insecte (Hanumanthaswamy, 2013). En fonction de ces différents facteurs (T°, HR), cette période peut s'étendre de 3 à 30 jours (Ellis *et al.*, 2013).

Concernant la morphologie des œufs de *G. mellonella*, la taille varie entre $0,44 \pm 0,04$ et $0,36 \pm 0,02$ mm respectivement pour la longueur et largeur. Ils sont de forme sphéroïdale avec des rayures contribuant à leur rugosité. La couleur varie du rose au blanc (Ellis *et al.*, 2013; Kwadha *et al.*, 2017).

1.3.2. Larves

- Généralité

Après l'éclosion, la larve réalise une succession de mues lors des différents stades larvaires. Le nombre de stades varie de 5 à 9 selon les conditions environnementales (Uwo *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2013). Chaque stade est accompagné d'une augmentation de taille et de poids. La durée de développement du stade larvaire est de 6 à 7 semaines entre 29°C et 32°C (Ellis *et al.*, 2013). L'humidité, la température ainsi que la nourriture à disposition peuvent fortement influencer la durée des stades ainsi que la croissance des larves (Chauvin, 1985; Jorjão *et al.*, 2017). La croissance la plus importante a lieu lors des

deux derniers stades larvaires. Durant le dernier stade, la larve a un poids d'environ 250 mg. Lors du stade prépupe, la larve arrête de se nourrir pour tisser un cocon (Ramarao *et al.*, 2012).

- Anatomie

D'un point de vue morphologique, la taille du premier stade larvaire est de 1-3 mm de long. Le diamètre est alors de 0,12 à 0,15 mm. Lorsque la taille maximale est atteinte, la larve mesure de 12-20 mm de long et 5-7mm de diamètre (Ellis *et al.*, 2013). La couleur est claire (blanc crème-gris) avec des marques plus foncées (gris-noir). La tête pointue, de couleur rouge, est marquée d'une ligne en forme de v ouvert vers l'avant de la tête. Au niveau de la tête, il est possible d'identifier 4 stermates sur chaque face. Le spiracle est entouré d'un péritrème jaunâtre d'épaisseur uniforme. Un bouclier pro thoracique de couleur brune est également présent. Lors du stade larvaire, il n'est pas possible d'identifier le sexe et donc de différencier des individus mâles et femelles. La larve est éruciforme (forme de chenille). Les six pattes sont présentes au niveau du thorax. La zone abdominale du troisième à sixième segment présente un certain nombre de fausses pattes. La tête contient trois « dents apicales ». Ces dents pourraient avoir un rôle au niveau de la destruction de matière par la larve. Il est possible de différencier *G. mellonella* de *Achroia grisella* (F.) (la petite teigne) de par la taille de leurs corps et la présence de stermates (Ellis *et al.*, 2013; Kwadha *et al.*, 2017).

Le tube digestif des *G. mellonella* est subdivisé en trois parties distinctes (Figure 3). Premièrement, la partie antérieure ou stomodéum (foregut) ayant une origine ectodermique et permettant à l'insecte de réguler et d'acheminer la nourriture vers la suite du système digestif. Ensuite, la portion moyenne ou mésentéron (midgut) dont l'origine est endodermique accueille la digestion proprement dite. Dernièrement, la partie postérieure ou proctodéum (hindgut) a également une origine ectodermique et est le lieu de l'absorption de sels et d'eau avant l'excrétion (Engel & Moran, 2013). La digestion s'opérant principalement dans le mésentéron, une grande proportion des enzymes est libérée dans ce segment (Stefanini, 2018).

L'épithélium du mésentéron subit un certain nombre de transformations. Au cours de chaque mue, cet épithélium est renouvelé (Uwo *et al.*, 2002; Johnston & Rolff, 2015). Parallèlement aux différents stades larvaires, la population bactérienne présente au niveau du tube digestif des lépidoptères peut évoluer et varier en proportion selon les stades (Chen *et al.*, 2016).

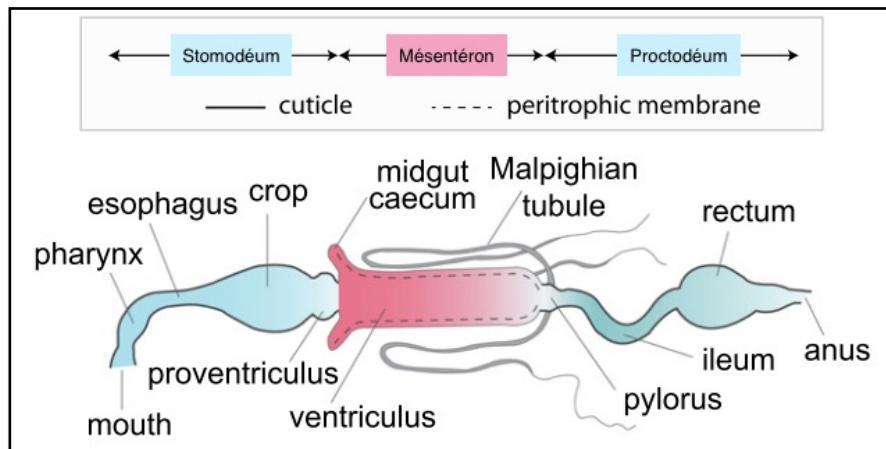


Figure 3 : Structure générale du tube digestif des insectes (adapté de Engel & Moran, 2013).

La larve de *G. mellonella* a la capacité de métaboliser la cire d'abeille. Celle-ci est composée à 85% de mono esters qui ont un poids moléculaire avoisinant les 800. Approximativement 13% de cette cire est constitué d'acide gras libre à 25-31 atomes de carbone et les derniers pourcentages sont constitués entre autres d'hydrocarbures. Les esters semblent hydrolysés au sein du tube digestif (la fonction alcool est oxydée en acide gras). Les micro-organismes du tube digestif sont suspectés de jouer un rôle prépondérant dans ce métabolisme (Young, 1961). Malgré la diversité de composition possible au niveau nutritionnel, la diète naturelle à base de cire d'abeille et les diètes artificielles apportent des résultats (nombre et poids) similaires pour les larves de *G. mellonella* (Metwally *et al.*, 2012).

- Environnement

La combinaison d'une humidité relative (HR) de 71% et d'une température de 30°C semble optimale pour le développement, la croissance ainsi que la fécondité de *G. mellonella*. Une humidité relative décroissante de 80 à 30 % augmente de plusieurs dizaines de jours le stade larvaire (Hanumanthaswamy, 2013). Une humidité trop faible peut entraîner une forte mortalité. De même, un passage de 30°C à 18°C peut engendrer une augmentation de plusieurs semaines lors d'un cycle (Cymborowski, 2000). La fausse teigne est un insecte nocturne, de ce fait, elle vit dans l'obscurité (Ellis *et al.*, 2013).

La larve mature est capable de s'attaquer au bois et de former des sillons reconnaissables dans celui-ci. Elles peuvent également venir se loger au sein de la ruche. Un cocon est alors formé de soie par la larve (Figure 2). Dès lors, elle peut démarrer la formation d'une pupe dans les rayons de cire. Le cocon est attaché à l'excavation réalisée au niveau du bois ou de la ruche (Ellis *et al.*, 2013).

1.3.3. Pupes

La taille des pupes de *G. mellonella* varie entre 12 et 20 mm de longueur et de 5 à 7 mm de largeur. La couleur de la pupe est assez sombre (rouge-brun) et insérée dans un cocon de couleur blanchâtre (Ellis *et al.*, 2013). Le stade dure de 6 à 56 jours selon les conditions environnementales. Durant cette durée, l'insecte ne se nourrit pas (Jorjão *et al.*, 2017).

1.3.4. Imago

- Généralité

Le stade adulte est marqué par la présence de sexes mâles et femelles ayant des tailles respectivement différentes. Le mâle possède une taille relativement plus petite ainsi que des couleurs plus claires que la femelle (Figure 4) (Jorjão *et al.*, 2017). La couleur de l'adulte étant cependant influencée par l'alimentation de la larve (Shimanuki, 1981). A l'instar des pupes, les individus adultes ne se nourrissent pas. La durée de vie n'est pas égale selon le sexe. En ce qui concerne les mâles, la durée de vie est d'environ 21 jours alors qu'elle est de 12 jours pour les femelles. La femelle dépose en moyenne 700 œufs durant sa vie. Elle profite des différentes cavités pour réaliser l'oviposition (Ellis *et al.*, 2013).



Figure 4 : Adultes de *Galleria mellonella* (Haut: mâle, Bas: femelle) (Ellis *et al.*, 2013).

- Anatomie

La taille des adultes mâle varie de 10 à 15 mm de longueur et autour de 20 mm pour la femelle (Ramaraao *et al.*, 2012). L'envergure de l'adulte lorsque ses ailes sont déployées, peut atteindre 31 mm. Ils sont de couleur brun-rouge avec des ailes antérieures marbrées et d'extrémité concave. Concernant les ailes postérieures, elles ont un teint plus pâle, sont formées de 4 branches et relativement frangées (Ellis *et al.*,

2013). Les palpes labiaux sont identifiables et de formes différentes pour les mâles et femelles (respectivement arrondie et pointue) (Jorjão *et al.*, 2017).

1.4. *Microbiome intestinal des insectes*

1.4.1. Généralités

Les symbiotes présents au niveau du tube digestif des insectes jouent un rôle crucial dans la capacité qu'ont ceux-ci à utiliser les ressources alimentaires disponibles. Un certain nombre de fonctions, telles que la dégradation de biomasse, l'élaboration de nutriments, la détoxicification de toxines, la dégradation de diterpènes ont été soulignées comme étant reliées au microbiome du tube digestif de différents insectes (Shi *et al.*, 2011; Berasategui *et al.*, 2017). Le rôle des enzymes sécrétées par ce microbiome est donc d'une grande importance pour l'organisme hôte. D'un point de vue taxonomique, la diversité du microbiome des insectes varie fortement selon l'espèce et le régime alimentaire (Shi *et al.*, 2011). Cette diversité varie également selon le stade (Chen *et al.*, 2016) ainsi que selon la section du tube digestif chez *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Tang *et al.*, 2012). Les différentes parties pouvant varier en pH selon leur fonction. Des différences significatives ont été relevées entre le mésentéron et le proctodéum chez le papillon de nuit *Hyles euphorbiae* (Linné, 1758) (Vilanova *et al.*, 2016).

Le genre *Enterococcus* est présent en grande proportion en compagnie de *Clostridium* au sein du tube digestif des insectes (Shao *et al.*, 2013). Il n'est également pas à oublier que des souches de champignons telles que *Fusarium culmorum* et *Penicillium crustosum* ont été identifiés au sein du coléoptère *Saperda vestita* (Delalibera *et al.*, 2005). Un certain nombre de levures ont également un rôle considérable au niveau du microbiome d'insectes en participant aux processus de digestion et d'apport de nutriments. La présence de levures au niveau du tube digestif a été mise en avant chez certaines drosophiles ou encore chez des insectes xylophages tels que les termites (Bauwens *et al.*, 2013; Stefanini, 2018). Ces isoptères ont un tube digestif colonisé par différents procaryotes et protistes flagellés (Bauwens, 2014). Concernant les lépidoptères, le nombre d'informations sur les interactions entre levures et insectes reste restreint. Cependant, plusieurs associations avec des levures du genre *Candida*, *Metschnikowia* ou encore *Meyerozyma* ont été soulignées (Stefanini, 2018).

1.4.2. *Galleria mellonella*

Le microbiome du tube digestif de *G. mellonella* en fin de stade larvaire est principalement composé de trois genres bactériens largement répandus : *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Serratia* (Figure 5). Plus spécifiquement, *Enterococcus mundtii* a montré un rôle prépondérant dans l'équilibre de la population bactérienne du tube digestif de *G. mellonella* (Johnston & Rolff, 2015). Le genre *Enterococcus* arbore 80% de similarité au niveau des séquences et 87% de l'abondance relative est attribué à la famille des Enterococcaceae ; sur base de l'étude phylogénétique du gène codant pour l'ARNr 16S. Ce genre bactérien est couramment mis en avant dans les relations insectes-symbiotes (Krams *et al.*, 2017). *Enterobacter cancerogenus* et *Enterobacter sp.* ont été également isolés à partir du tube digestif de *G. mellonella* (Chung *et al.*, 2018). La nature antibactérienne du miel ainsi que de la cire d'abeille incluse dans l'alimentation de *G. mellonella* pourrait influencer la forte dominance de certains genres bactériens tolérants au sein de leur tube digestif (Krams *et al.*, 2017).

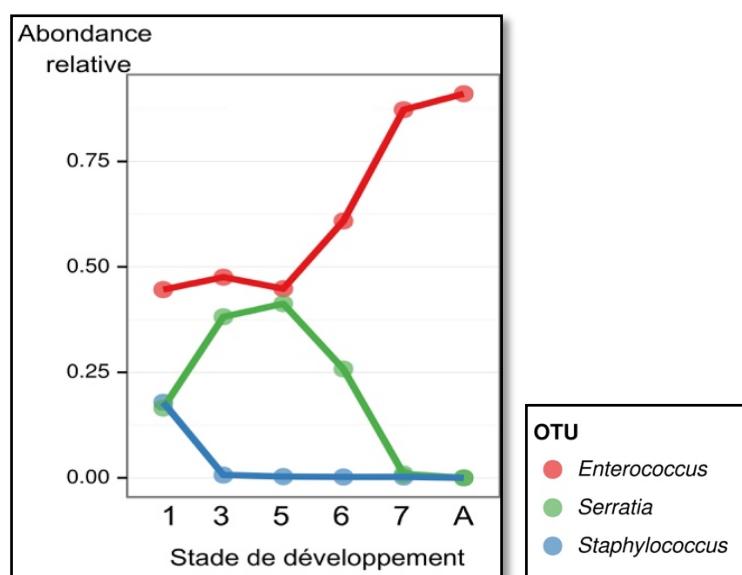


Figure 5 : Abondance relative des principaux genres bactériens au sein du microbiome du tube digestif de *Galleria mellonella* durant les différents stades de métamorphoses (adapté de Johnston & Rolff, 2015).

- *Enterococcus*

Enterococcus mundtii semble dominer fortement la population bactérienne du tube digestif de *G. mellonella*. Les Enterococci jouent un rôle de défense de l'hôte contre les pathogènes. Des mécanismes d'exclusion compétitive, d'antagonisme ou d'éliciteur immunitaire de l'hôte sont mis en avant dans la protection contre *Bacillus thuringiensis* (produisant des δ-endotoxines) (Fedhila *et al.*, 2010; Johnston &

Rolff, 2015). Une certaine synergie entre les lysozymes produits par l'insectes et les bactériocines à large spectre de la bactéries permet une telle dominance de *E. mundtii* (Johnston & Rolff, 2015). Cette bactéries possède une forte tolérance au stress et a la capacité de métaboliser plus de 48 sources de carbones différentes (Li *et al.*, 2017). *E. mundtii* présente la capacité de produire de l'acide lactique et de résister à des pH élevés (souche isolée depuis le tube digestif de *Bombyx mori*). Ceci explique sa forte présence au niveau du tube digestif de certains lépidoptères, ceux-ci ayant un pH fortement basique (10,5 pour *Bombyx*) (Liang *et al.*, 2018). Il semble donc jouer un rôle important dans la défense de *G. mellonella* face aux pathogènes (Fei *et al.*, 2006). Le phénomène de mue joue un rôle dans la diversité du microbiome des stades larvaires successifs (Chen *et al.*, 2016). La capacité de *E. mundtii* à perdurer, malgré le détachement de l'épithélium du tube digestif lors de la mue, conforte sa dominance dans le tube digestif de *G. mellonella*. Un transfert vertical (acquisition par les parents) ainsi qu'horizontal (entre deux organismes d'une même génération) est supposé afin d'expliquer la diversité maintenue au fur et à mesure des cycles (Johnston & Rolff, 2015).

1.4.3. Microbiome et alimentation

Les micro-organismes présents au niveau du tube digestif ont la capacité de s'adapter au changement de diètes en induisant des changements enzymatiques. Des changements de populations au sein de la communauté microbienne sont observables lors de changements de régime alimentaire (Berasategui *et al.*, 2017). De plus, les micro-organismes possèdent des propriétés métaboliques absentes au niveau des insectes et jouent donc un rôle complémentaire important (Dillon & Dillon, 2004).

La relation largement étudiée entre *Buchnera aphidicola* et *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) rend compte également de l'importance des relations symbiotiques dans l'utilisation d'une diète particulière par l'hôte (Akman Gunduz & Douglas, 2009). Aussi, différentes diètes ont engendré des variations au sein de populations bactériennes du proctodéum de criquets ainsi que l'induction de production d'enzymes et molécules diverses (ex. acéate) (Domingo, 1998). Le microbiome peut également être impliqué dans la libération de métabolites ayant un rôle dans les interactions trophiques. Ceci est illustré par le rôle du microbiome de *S. littoralis* dans la biosynthèse d'acide N-acylamine (Spiteller *et al.*, 2000).

Au sein de différents microbiomes intestinaux, résident des bactéries ayant un rôle potentiel dans la dégradation des polymères plastique. C'est le cas de *Bacillus sp. souche YP1* et *E. asburiae* souche YT1 découverts après isolation depuis le tube digestif de larves de *Plodia interpunctella* ayant ingéré du

polyéthylène (Yang *et al.*, 2014). *Exiguobacterium sp.* souche *YT2* extraite depuis le tube digestif de larves de *Tenebrio molitor* a été cité pour sa dégradation du polystyrène (Yang *et al.*, 2015). L'étude du microbiome de tube digestif de *Tenebrio molitor* a mis en évidence l'émergence de *Citrobacter sp.* et *Kosakonia sp* lors d'une alimentation contenant du PE ou du PS (Brandon *et al.*, 2018).

1.5. Métagénomique

1.5.1. Étude de communautés microbiennes

La métagénomique permet l'étude approfondie du contenu génétique d'échantillons provenant de milieux complexes. Cette approche permet l'identification de bactéries non cultivables qui représentent une très grande fraction des milieux naturels (99,8% pour certains environnements). Grâce aux progrès réalisés dans les séquençages NGS, l'entièreté d'un microbiome peut être séquencée et identifiée en un temps raisonnable (Shah *et al.*, 2011). Deux grandes approches sont possibles en métagénomique. La métagénomique basée sur la séquence ou celle basée sur la fonction. L'approche basée sur la séquence implique un séquençage ainsi qu'un traitement sous-jacent des données. Pour ce qui est de la métagénomique basée sur la fonction, il est nécessaire de faire un screening de librairie/banque d'ADN afin d'identifier des gènes d'intérêt (Shi *et al.*, 2010).

Les deux voies mènent à une connaissance plus profonde de la structure des communautés, de la diversité au sein des espèces et de la composition phylogénétique d'un ensemble d'échantillons. Différentes approches au sein des séquençages existent également. D'une part, le séquençage « shotgun » ou « whole genome shotgun » consiste à séquencer la globalité des acides nucléiques d'un échantillon (Shah *et al.*, 2011). D'autre part le séquençage d'un gène de référence qui permet une discrimination des individus au sein d'un échantillon (*i.e.* 16s, 5s, 23s, etc.) (Carpi *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2011). Cependant, l'identification précise d'espèces (*i.e.* *Bacillus sp.*) peut nécessiter l'usage d'autres marqueurs génétiques tels que *gyrA* ou *gyrB* (Wang *et al.*, 2007).

1.5.2. Séquençage du gène codant l'ARNr 16S

L'une des techniques les plus couramment employées pour les études d'identification, phylogénétiques et de diversité des communautés bactériennes est le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16s (ADNr 16S). Diverses raisons sont mises en avant pour justifier les avantages du gène ARNr 16S. Parmi celles-ci, la présence du gène chez toutes les bactéries où il se retrouve souvent sous la forme de famille multigènes ou d'opérons. La fonction du gène codant l'ARNr 16S n'a pas été modifiée avec le temps et est nécessaire à la machinerie ribosomale (Janda & Abbott, 2007). De plus, la présence de régions conservées et hypervariables (V1-V9) (Figure 6) permet une bonne discrimination au sein des bactéries. Dernièrement, les séquences sont accessibles et de taille compatible avec les étapes de bio-informatiques sous-jacentes (Cruaud *et al.*, 2014).

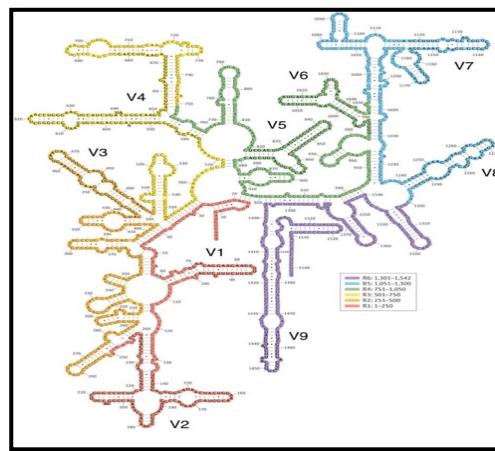


Figure 6 : Régions hypervariables de l'ARN ribosomal 16S de *E. coli* (Yarza *et al.*, 2014).

1.6. Métaprotéomique

1.6.1. Généralités

La métaprotéomique est l'analyse de la composition totale protéique d'un environnement donné à un moment spécifique (Xiao *et al.*, 2017). Cette approche est entièrement complémentaire à la métagénomique qui renseigne davantage sur la structure taxonomique. Elle permet d'obtenir des indications sur les différentes fonctions exprimées au sein d'un microbiome. De plus, des variations environnementales affectent non seulement l'abondance taxonomique, mais également les fonctions. Il

est dès lors possible d'identifier des métabolites spécifiques à certains phyla et de pouvoir corrélérer les différentes approches « omiques » (Tanca *et al.*, 2017).

Deux voies principales sont empruntables pour séparer et identifier les protéines présentes au sein d'un microbiome (Figure 7). Premièrement, l'électrophorèse sur gel (*i.e.* SDS-PAGE 1D ou 2D) permet une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire et de leur charge. Par la suite, une étape de fractionnement en peptides de plus petite taille et une identification par spectrométrie de masse (*i.e.* MALDI-TOF/TOF) suivent l'électrophorèse. Cette voie demande du temps et est plus appropriée pour des échantillons de protéines plus ciblés. Plus récemment, l'utilisation de méthode directe « gel-free » (*i.e.* Chromatographie liquide 1D ou 2D) rend possible l'étude d'un grand nombre de protéines au sein d'un échantillon sans devoir réaliser de migration sur gel. Cette méthode est basée sur la chromatographie liquide pour séparer les protéines qui ont été préalablement fragmentées. Les peptides isolés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse (généralement en tandem MS/MS). La comparaison des résultats avec les bases de données existantes (*i.e.* NCBIInr) permet d'allouer les spectres aux protéines correspondantes.

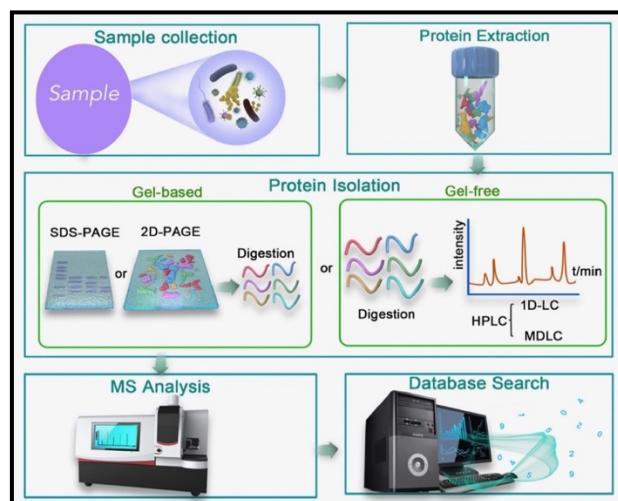


Figure 7 : Étapes principales de l'étude d'un métaprotéome (adapté de Xiao *et al.*, 2017).

2. Objectifs du travail

Face à la problématique actuelle de la pollution par les déchets plastiques, il est nécessaire de renforcer les connaissances en matière de biodégradation. Le microbiome du tube digestif des insectes représente un modèle biologique d'intérêt particulier pour l'identification de micro-organismes et d'enzymes spécifiques à cette dégradation.

Premièrement, ce travail aura pour but d'étudier le microbiome du tube digestif des larves de *Galleria mellonella*. Deuxièmement, identifier le rôle de ce microbiome dans la dégradation du polyéthylène. Pour ce faire, différents volets sont mis en place au sein de ce travail :

- Mise en place d'un système d'élevage de *Galleria mellonella* et développement d'une diète standardisée contenant du plastique.
- L'étude métagénomique de la communauté microbienne du tube digestif des larves de *G. mellonella* par séquençage du gène codant l'ARNr 16S.
- L'analyse fonctionnelle du métaprotéome de ce microbiome par LC-MS/MS.
- L'identification du rôle du microbiome dans la dégradation du polyéthylène.

Il découle de la réalisation de ces approches complémentaires, une connaissance approfondie du microbiome du tube digestif de *G. mellonella*. Celui-ci représente un modèle *in vivo* d'études microbiologiques. Les résultats de ce travail aideront à compléter les connaissances taxonomiques et fonctionnelles du microbiome. De plus, l'identification des bactéries associées à la consommation de polyéthylène permettra d'initier des études ciblées de dégradation. Dernièrement, les enzymes identifiées ainsi que leur rôle rendra possible la production de ces molécules en bioréacteurs afin d'améliorer les procédés de dégradation des matières plastiques.

3. Matériel et méthode

3.1. Élevage et développement d'une méthodologie

L'élevage a été initié à partir d'une population naturelle de *G. mellonella* collectée sur le campus de Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique). L'identification de la fausse teigne a été confirmée par les traits morphologiques observés au binoculaire (Ellis *et al.*, 2013). Les conditions de température et d'humidité sont maintenues à 30 ± 2 °C et $70 \pm 10\%$ HR dans une obscurité totale (Ellis *et al.*, 2013; Jorjão *et al.*, 2017). Une structure en verre de 80l munie d'un treillis métallique est mise en place pour l'élevage. La structure d'accueil au sein de l'enceinte en verre est composée de cadres de ruches, imitant l'environnement naturel de *G. mellonella* (Metwally *et al.*, 2012). Les cadres sont munis de rayons de cire contenant du miel afin de nourrir les larves (photographie en annexe 7.1.)

3.1.1. Tests de survies et optimisation des diètes

Afin de mettre en place une méthodologie d'étude du microbiome du tube digestif de *G. mellonella*, il est nécessaire d'analyser l'influence de la consommation de plastique sur la survie des larves. Pour ce faire, une variété de diètes a été mise en place afin d'identifier les quantités alimentaires à privilégier. Le traitement contrôle est constitué de cire d'abeille provenant de cadres de ruches.

Les structures expérimentales utilisées dans cette expérience sont composées de réservoirs en verre de 0,5l. Ceux-ci sont munis d'un couvercle et d'un treillis afin de laisser circuler assez d'air (Krams *et al.*, 2017). Chaque réplicat (4 par traitement) accueille 5 individus afin de limiter le risque de densité trop élevée (Figure 8 B et C) (Hammer *et al.*, 2015). Il est nécessaire d'obtenir des individus soumis à la diète durant une durée constante et sans changer de stade. Pour ce faire, la mesure retenue afin d'identifier la pertinence du dispositif est le nombre de jours avant la formation de cocons par 100% des individus vivants. De même que la mortalité au sein de chaque réplicat. Ces deux mesures doivent être contrôlées pour la mise en œuvre des expérimentations portant sur le microbiome. Les modalités testées sont reprises dans la Figure 8 et ont été choisies sur bases de différents travaux afin que les individus soient nourris *ad libitum* (Bombelli *et al.*, 2017; SHAIK *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Le polyéthylène faible densité est exempt de tout additif (GoodFellow ; ET 311351, film de 300x300 mm et 0,23 mm épaisseur).

La cire utilisée dans les diètes est prélevée de cadres de ruches ayant été conservés à -20°C. Toutes les pesées sont effectuées à l'aide d'une balance analytique (Qhaus Explorer).

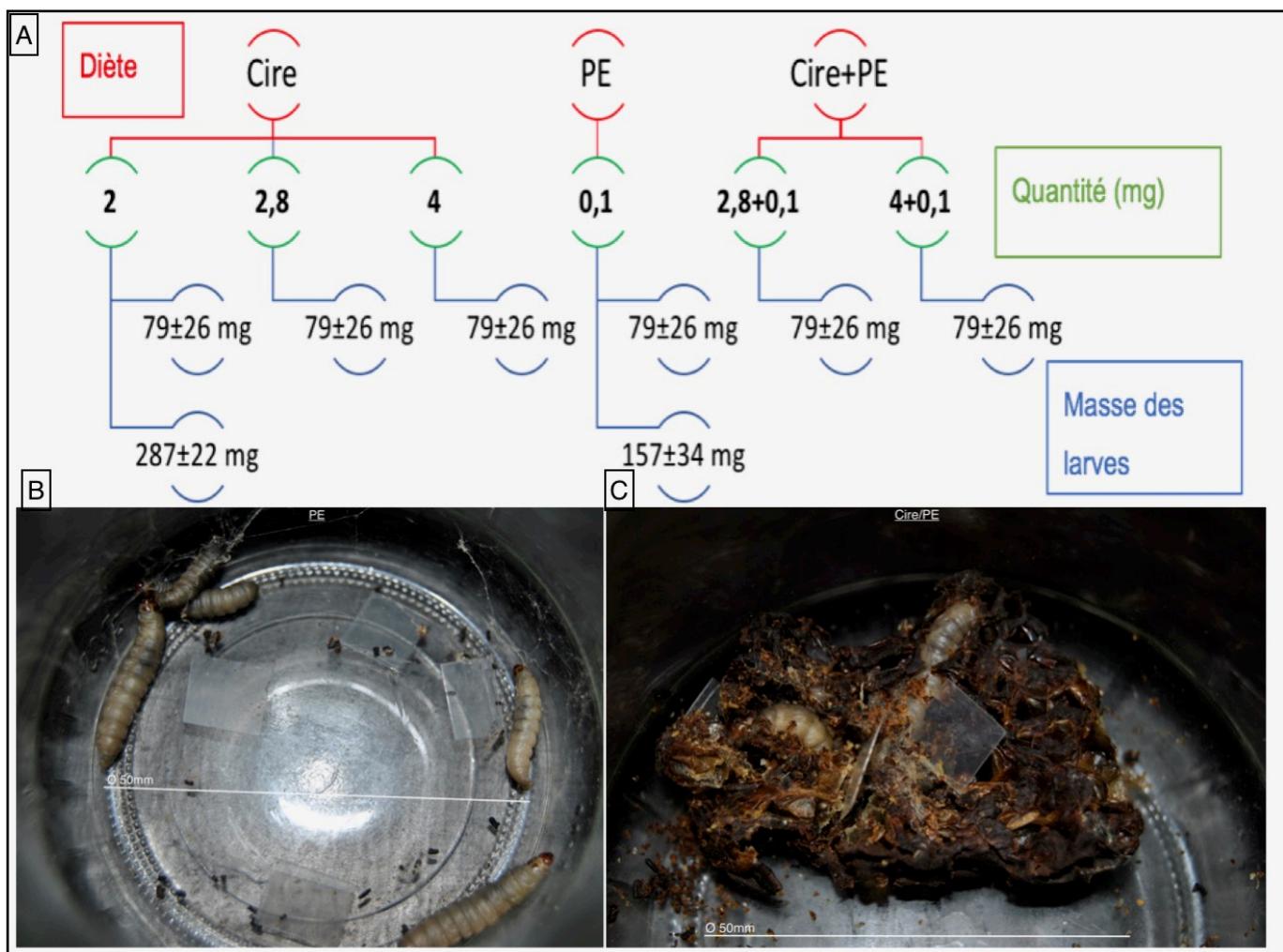


Figure 8 : A. Différentes modalités de diètes et d'individus testés de *Galleria mellonella* (PE : polyéthylène, Cire : rayons de cire de ruche). La première ligne (rouge) correspond à la diète. La seconde ligne (vert) correspond à la quantité d'aliments. Les dernières lignes (bleu) représentent la catégorie de larves sélectionnées par leur masse en début de traitement. B. Photographie du dispositif expérimental de la diète polyéthylène. C. Photographie du dispositif expérimental de la diète Cire/polyéthylène. Photographie : Latour 2018.

3.1.2. Sélection des modalités

Suite aux tests préliminaires, il s'avère que 100% des larves pesant 157 ± 34 mg se sont nymphosées après $1,5 \pm 0,5$ jours et 100% des larves de 79 ± 26 mg après $3,3 \pm 0,8$ jours lorsque la diète est composée uniquement de polyéthylène. Il en est de même pour les larves de 287 ± 22 mg qui se nymphosent en $1,4 \pm 0,5$ jours avec une diète de cire. Il semble donc que les changements d'environnements et de diètes ne permettent pas de mettre en place un traitement d'une durée prolongée (15 jours (Yang *et al.*, 2015)). La classe de larve de 79 ± 26 mg alimentée avec de la cire et du polyéthylène se développe durant 10-12 J avant de se nymphoser.

Afin de permettre un traitement d'une durée prolongée sans formation de pupes, la génération F2 (un cycle supplémentaire) provenant de l'expérience « Cire+PE » est conservée afin qu'elle soit familiarisée avec son environnement (Figure 9). Une quantité de 0,1g de PE est présente dans chaque réplicat avec une quantité de cire de 2,8g afin de permettre une croissance suffisante. Le traitement contrôle est constitué exclusivement de 2,8g de cire. Pour chacun des traitements, huit réplicats sont sélectionnés pour l'extraction d'ADN et de protéines (16 larves). Le critère d'acceptation de la larve est une masse supérieure à 80 mg et n'ayant pas formé de cocon. Les individus sont nommés de STD1 à STD8 pour le contrôle et de PE1 à PE8 pour la diète de cire et polyéthylène.

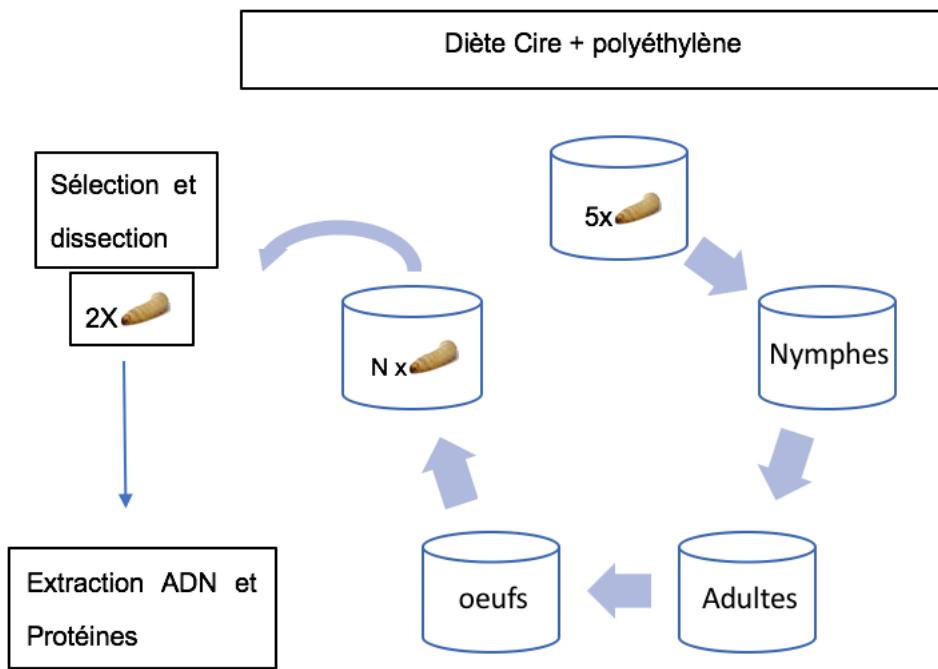


Figure 9 : Schéma de la méthodologie utilisée pour les diètes de cire ou de cire et polyéthylène de *Galleria mellonella*; le cylindre représente une structure en verre de 0,5l munie d'un treillis. (Cycle : 6-7 semaines à 30 ± 2 °C et $70 \pm 10\%$ HR).

3.2. Préparation des échantillons

3.2.1. Dissections

Le tube digestif de *G. mellonella* se divise en trois parties distinctes (Figure 10). En partant de la tête, le stomodéum, le mésentéron et le proctodéum se succèdent. Les sections retenues pour l'étude du microbiome sont le proctodéum et le mésentéron afin d'être le plus représentatif de la diversité bactérienne et d'incorporer les grands sites de digestion des aliments (Vilanova *et al.*, 2016).

La larve est soumise à un jeûne durant une heure avant la dissection afin de réduire la quantité d'aliments présents dans le tube digestif. Sous une hotte à flux laminaire, la larve est rincée une première fois dans de l'eau distillée afin d'éliminer les fragments de grosses tailles. Ensuite, la larve est rincée à l'éthanol 70% durant une minute. La dissection se réalise alors dans 15 ml de PBS stérile (tampon phosphate salin : NaCl 137 mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM et KH₂PO₄ 2mM ; pH :7,4) tel que le corps soit entièrement immergé. La larve est maintenue sur la face ventrale par une épingle. Une incision est réalisée au niveau

des derniers segments abdominaux. Le tube digestif est isolé des autres constituants à l'aide de ciseau, scalpel et pince désinfectés à l'éthanol (70%). Une attention particulière est menée pour ne pas transpercer le tube digestif ainsi qu'à l'élimination totale des fragments de cuticules. Dernièrement, le tube digestif est sectionné au niveau du proventricule (Figure 10) et immédiatement transféré dans un tube 1.5ml stérile. Celui-ci est alors immergé dans l'azote liquide afin de limiter tout processus de dégradation. Ce protocole est une adaptation de celui proposé par Shao et collègues (2013).



Figure 10 : Tube digestif (bouche : haut droite) de larve de *Galleria mellonella* positionnée sur la face ventrale, microscope euranex. Photographie Latour 2018.

Cette étude se concentre sur l'ADN et les protéines présentes au sein du microbiome du tube digestif des larves de *G. mellonella*. L'analyse des populations microbiennes grâce à l'étude de biomolécules (ADN/ARN/protéines et petites molécules) ne prend un sens complet seulement si les données sont collectées sur un même et unique échantillon. Ceci permet de relier les données entre elles ainsi qu'à l'individu approprié (Roume *et al.*, 2013). De plus, il est crucial de déterminer la quantité optimale de matériel biologique requis pour effectuer une extraction correcte d'ADN et de protéines. Cette étape, bien que trop souvent négligée, peut mener à des co-extractions d'ARN et/ou des surcharges de colonnes présentes dans les différents kits (Mathieson & Thomas, 2013).

Afin de vérifier la quantité idéale de matériel biologique, la méthodologie ci-dessus est appliquée à 4 individus provenant d'une diète standard. Les tubes digestifs ne sont cependant pas plongés dans l'azote (liquide) mais subissent une courte sonication (35 HZ, 30s Transsonic T 460/H Elma), une homogénéisation à l'aide d'une pipette (10 aller-retour) et un vortexage (10 secs. ; MERCK eurolab) avant d'être inoculé (100µl) sur milieu LB (Luria-Bertani : peptone 10g/l, extraits de levure 5g/l, NaCl 5g/l dans H₂O) incubé à 25°C durant 72 heures ; ce protocole est adapté de Berasategui et collègues (2016). Le

dénombrement bactérien des tubes digestifs de *G. mellonella* sur milieu LB est en moyenne de $1,86 \cdot 10^7$ UFC (unité formant colonie). Ceci rassure l'utilisation d'un seul individu par extraction vu le nombre important d'UFC dénombrées.

3.2.2. Désintégration cellulaire et homogénéisation

La méthodologie appliquée (Figure 11) est inspirée des instructions du fournisseur du kit Allprep (Qiagen, 2014) ainsi que des modifications apportées par Peña-Llopis & Brugarolas (2013) .

Les échantillons de tubes digestifs ne sont donc pas rassemblés après dissection pour ne pas surcharger les colonnes du kit d'extraction. Les tubes 1,5 ml sont retirés de l'azote liquide et sont maintenus sur glace afin d'empêcher le dégel. A l'aide d'un pilon stérile, l'échantillon est broyé lentement afin d'éviter tout échauffement. L'ajout du tampon RLT (tampon de lyse Qiagen) permet alors la lyse cellulaire et l'inactivation des enzymes de dégradation. A l'aide d'une pipette, l'entièreté du lysat est transférée sur une colonne Qiashredder (Qiagen) et centrifugée à 4°C afin de permettre une bonne homogénéisation.

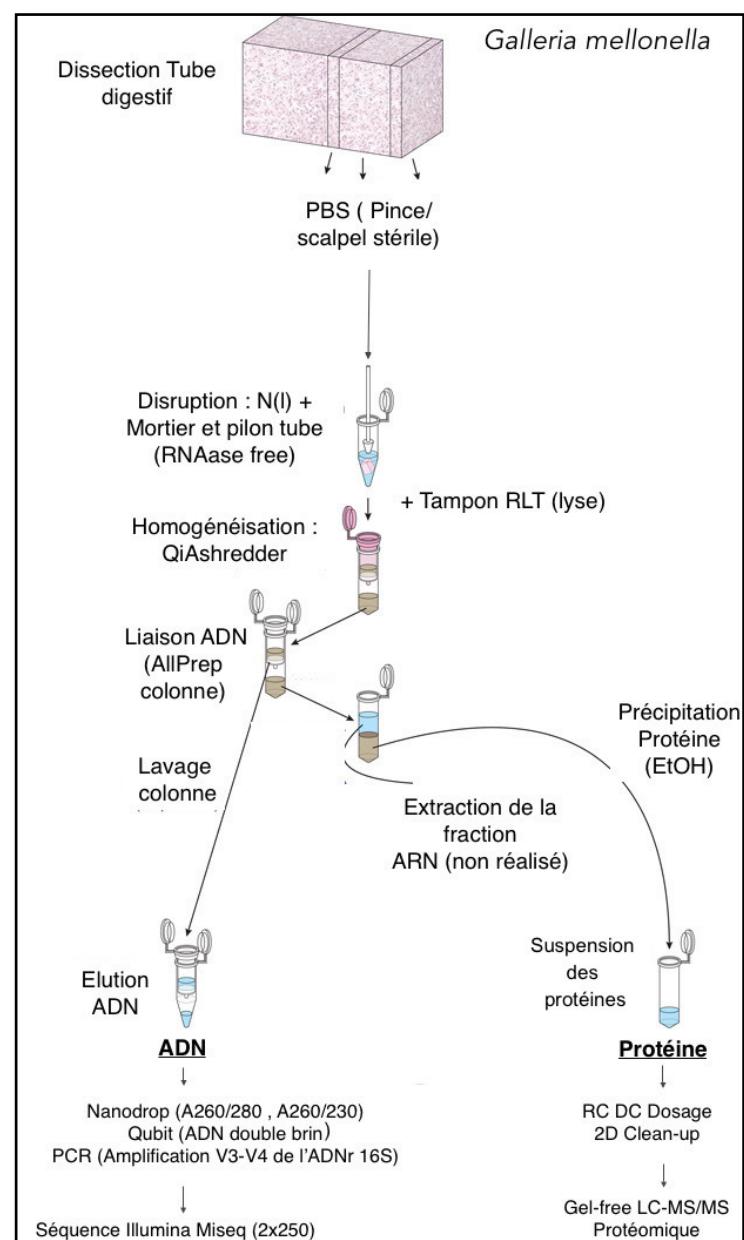


Figure 11 Schéma de la méthodologie appliquée pour extraire l'ADN et les protéines (adapté de Peña-Llopis & Brugarolas, 2013).

3.2.3. Extraction d'ADN et des protéines

Le lysat provenant du Qiashredder contient l'ADN, les protéines, l'ARN ainsi que des impuretés. Le protocole complet du kit Allprep (Qiagen) utilisé est repris à l'annexe 7.2. Les étapes principales de l'extraction d'ADN sont les suivantes :

- Le lysat est placé sur la colonne ADN Allprep et centrifugé.
- La colonne est placée sur un nouveau tube (nucléases free) et deux cycles de rinçage et de centrifugation (Sigma 2-16PK) sont réalisés avec les solutions tampons du kit (AW2 et AW1). Cette étape permet d'éliminer les impuretés.
- Dernièrement, la colonne est éluée à l'aide d'une solution préchauffée à 70°C (EB) et centrifugée. Cette étape est réalisée en deux fois pour augmenter le rendement d'élution.
- L'ADN total extrait est alors conservé à - 80 °c.

Les étapes concernant l'extraction

des protéines sont les suivantes :

- A partir du filtrat de la colonne ADN Allprep, l'échantillon est transféré sur la colonne RNeasy et centrifugé. Cette étape permet de fixer l'ARN à la colonne et de récupérer les protéines.
- Le filtrat est alors mis en contact avec de l'éthanol (100%) durant 10 min afin de précipiter les protéines.
- Le mélange est centrifugé et le surnageant contenant les impuretés est mis de côté.
- A nouveau, de l'éthanol (70%) est ajouté au culot et centrifugé afin de laver l'échantillon de protéines.
- Le surnageant est à nouveau retiré et le culot est séché à l'air libre durant 10 min.
- Dernièrement, le culot de protéines est suspendu dans 100 µl de tampon de réhydratation (7M urée, 2 M thiourée, 0.5% (m:vol) CHAPS)

L'hétérogénéité des échantillons naturels ainsi que la présence de substances interférentes peuvent enfreindre le bon déroulement des extractions. Afin d'obtenir une fraction idéale, une lyse directe est recommandée avant la purification, la quantification et l'analyse des protéines. Celle-ci a lieu directement sur l'échantillon, contrairement aux lysés indirectes qui nécessitent une extraction préalable des organismes de la matrice environnementale avant d'extraire les protéines (Maron *et al.*, 2007).

3.2.4. Qualité et dosage

- ADN

Afin de contrôler la qualité de l'ADN extrait de chacun des échantillons, une mesure optique est réalisée grâce à un spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Les ratios d'absorbances utilisés sont A260/230 nm et A260/280 nm. L'ADN absorbe la lumière à 260 nm, tandis que les acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane absorbent à 280nm vus leurs cycles aromatiques. Les composés phénoliques ont également une longueur d'onde d'absorbance qui permet de les identifier à 230nm. Le ratio A260/230 doit être compris entre 1,8 et 2 alors que le ratio A260/280 doit être compris entre 2 et 2,2 pour représenter un échantillon d'ADN sans impuretés. L'ADN total est dosé à l'aide du Nanodrop1000 de même que l'ADN double brin qui est quantifié à l'aide du Qubit 2.0 (Quantitative dsDNA HS assay Kit ; Invitrogen) (Mee *et al.*, 2011; Cruaud *et al.*, 2014).

La quantité d'ADN réellement extraite peut varier d'une matrice à l'autre. Il est également important de garder à l'esprit que la proportion d'ADN double brin est également variable au sein de l'ADN total extrait. Une proportion de 30% à 73% de l'ADN total selon la qualité du matériel de départ est obtenue pour le kit Allprep Qiagen (Mathieson & Thomas, 2013).

- Protéines

La fraction protéique est dosée par spectrophotométrie (SHIMADZU UV-1800) grâce au kit RC DC protein assay (BioRad). Les protéines sont ensuite précipitées à l'aide du kit 2D-Clean up (GE Healthcare). Celui-ci permet d'éliminer les impuretés telles que les composés phénoliques, détergents, sels, lipides ou acides nucléiques éventuellement présents dans l'échantillon. Les protéines sont conservées sous forme de culot sec à -80°C. Toutes les mesures sont effectuées en trois répétitions plus trois blancs.

Afin de contrôler la diversité des protéines extraites, une séparation électrophorétique sur gel SDS-PAGE 1D est réalisée. Pour ce faire, 20µg de culot de protéines sont suspendus dans 10µl de tampon Tris-SDS. Après avoir été chauffé durant 5min à 95°C, 10µl de cette solution et 10µl de tampon Laemmli (10% glycérol ; 63mM Tris-HCL pH 6,8 ; 2% mercaptoéthanol 0,1% et 0,0005% de bleu de bromophénol) sont chargés sur un gel de concentration (68% H₂O ; 5% acrylamide ; 13% Tris 1M pH6,8 ; 0,01% SDS 10% ; 0,01% d'ammonium persulfate 10% et 0,001% N, N, N', N'-tétraméthyle éthylène diamine (TEMED)). La

migration sur le gel de séparation (12% acrylamide ; H₂O 32% ; 26% Tris pH 8,8 1,5M ; 1% SDS 10% ; 1% persulfate d'ammonium 10% et 0,04 % TEMED) est effectuée durant 1h30 à 120V à l'aide d'un système S-lab (BioRad, USA). Le standard utilisé est PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo scientific, USA). Les bandes sont révélées à l'aide de bleu de coomasie (comprenant 2% acide phosphorique, 10% de sulfate d'ammonium ; 20% de méthanol et 0,12% de coomasie G-250) selon un protocole de laboratoire adapté (Harlow & Lane, 1988).

3.3. M^étag^énomic^{ique}

Le gène codant l'ARNr 16s contient 9 régions hypervariables nommées de V1 à V9. L'amplification d'une ou plusieurs régions est possible. Le choix des régions représente une étape cruciale. La région V2, V3 et V6 représentent le plus haut degré d'hétérogénéité. Celles-ci procurent une bonne discrimination pour étudier la diversité bactérienne (Shah *et al.*, 2011). L'utilisation d'une seule région hypervariable ne permet généralement pas une bonne discrimination entre les populations bactériennes (Craaud *et al.*, 2014). Dès lors, il est plus judicieux d'utiliser des reads (séquences) plus longs, lorsque le séquençage employé le permet (i.e. 2x250 pb pair-end pour Miseq Illumina) (Castelino *et al.*, 2017). Les différentes régions peuvent également être utilisées en fonction du type de séquençage sous-jacent. La comparaison des régions couramment employées (V3-V4 et V1-V3) ne montre pas de différence significative au niveau de la diversité microbienne au niveau d'un même échantillon. Cependant, le choix des régions V3-V4 semble optimal pour les technologies Illumina (Castelino *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Chew *et al.*, 2018).

Il est important de considérer avec attention le choix des amores d'amplification lors de l'étude de la diversité microbienne par séquençage nouvelle génération. La comparaison d'un nombre important d'entre elles a été réalisée par Klindworth et collègues (2013). Il en ressort que la paire d'amores qui obtient le meilleur taux de couverture (coverage) pour les phyla et les domaines est le duo : S-D-Bact-0341-b-S-17/ S-D-Bact-0785-a-A-21 (sens et anti-sens). Elles sont recommandées pour les régions hypervariables V3-V4. Afin de discriminer les différentes amores, la température d'hybridation, le coverage ainsi que la longueur des amplicons peuvent être comparés. La température d'hybridation ne doit être différente de plus de 5°C entre les deux amores. Le coverage total doit être supérieur à 70% (Klindworth *et al.*, 2013).

3.3.1. Amplification

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisée en suivant le protocole préconisé par DNAvision en annexe 7.3 (Belgium) pour les technologies Miseq Illumina. Celui-ci est adapté et réalisé par le laboratoire de phytopathologie de Gembloux Agro-Bio tech :

La PCR est réalisée à l'aide du kit KAPA HiFi Hotstart ReadyMix contenant la KAPA HiFi Hotstart DNA Polymérase (0,5 unité par 25 µL de réaction) dans un tampon de réaction approprié incluant les dNTPs (0,3 mM de chaque dNTP), le MgCl₂ (2,5 mM) et des stabilisants. La première étape est l'ajout de 12,5µL du réactif du kit à 5µL de l'adaptateur Illumina + amorce (1µM) (341F)

(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG + 5'-CCTACGGNGGCWGCAG-3')

Et 5µL de l'adaptateur Illumina + amorce (1µM) (785R)

(GTCTCGTGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG + 5'-GACTACHVGGTATCTAATCC-3')

Les 22,5 µL de mixe sont alors placés en plaque 96 puits avec 2,5µL d'ADN normalisé à 5ng/µL. Au sein du thermocycleur, une température de 95°C est maintenue durant 3min avant de procéder à un cycle de 25 fois 30sec à 95°C pour dénaturer l'ADN, 30 sec à 55°C et 30 sec à 72°C. Finalement, une température de 72°C est maintenue 5 min.

Une deuxième PCR est réalisée pour les échantillons nommés de STD1 à STD8 et pour les échantillons de PE1 à PE4 afin d'obtenir assez d'amplicons pour le séquençage. Les échantillons PE5 à PE8 ont nécessité une seule PCR au vu de la qualité de l'ADN extrait (résultats repris dans le Tableau 4).

3.3.2. Purification et indexage

La librairie (banque) d'ADN a été réalisée en suivant le protocole préconisé par DNAvision en annexe 7.3 (Belgium) pour la technologie Miseq Illumina. Celui-ci est adapté et réalisé par le laboratoire de phytopathologie de Gembloux Agro-Bio tech :

L'étape de purification sert à se débarrasser des amores encore présentes avec les amplicons d'ADN (ARNr 16S). Pour ce faire, des billes AmpureXP sont utilisées.

Après la purification, une PCR est à nouveau utilisée pour ajouter des index aux amplicons. Chacune des combinaisons de deux index est propre à un amplicon. On parle donc de double indexage. Cette étape

est réalisée à l'aide des amorces 1 et 2 Nextera XT et du kit KAPA HiFi HotStart ReadyMix avec l'ADN normalisé. Il est à nouveau nécessaire de purifier les produits grâce aux billes AmpureXP.

Les librairies ont été envoyées à DNAvision (Belgique) le 18/05/2018 afin de réaliser le séquençage Illumina Miseq (2x250 pb) « en paire » (paired-end). Celui-ci permet de séquencer le fragment d'ADN depuis les deux extrémités et ainsi obtenir une bonne qualité de séquence.

Afin de valider la librairie créée, la taille des amplicons est contrôlée à l'aide d'un Bioanalyser DNA 1000. La librairie est alors quantifiée, normalisée et assemblée. Le Picogreen permet une quantification par fluorométrie et la normalisation est alors basée sur le profil de taille des amplicons obtenu au Bioanalyser.

Viens alors une étape de dénaturation de la librairie avec de l'hydroxyde de sodium, dilué par du tampon d'hybridation et dénaturé par la chaleur. Il est recommandé par DNAvision que pour chaque run (un séquençage complet) il soit inclus un minimum de 5% de PhiX (25% si le run inclut une unique taille d'amplicon) afin de servir de contrôle interne dans le cas de faible diversité de librairies. Il est recommandé d'utiliser les kits V3.

Dernièrement, les échantillons sont chargés sur le système Miseq (Illumina) afin de réaliser le séquençage. Les résultats sont ensuite démultiplexés par DNAvision avant d'être reçus le 23/05/2018.

3.3.3. Bioinformatique

Les données obtenues sont traitées et visualisées à l'aide du logiciel Qiime2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology ; version 2018.4 (QIIME2_Team, 2018a)) installé dans VirtualBox (2.2.12) ainsi que le logiciel R v.3.5.0. Les résultats de Qiime2 en matière de rappel et de précision ont orienté ce choix de logiciel (Almeida *et al.*, 2018).

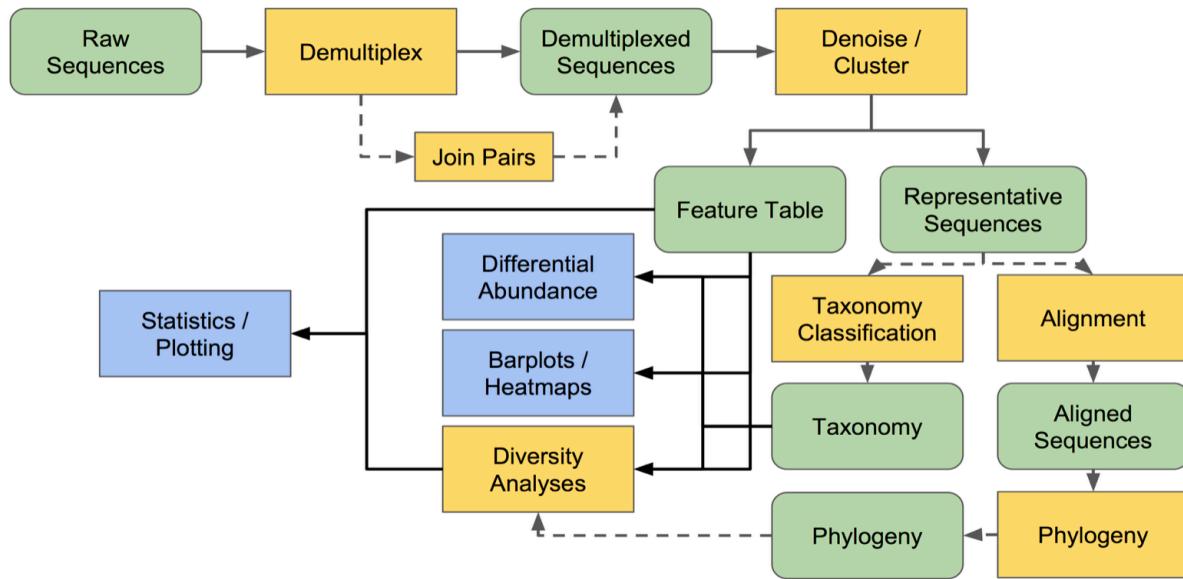


Figure 12 : Schéma de la méthodologie appliquée au traitement des données de séquençage (QIIME2_Team, 2018b).

La méthodologie suivie est représentée par le schéma de la Figure 12. Les fichiers fastq ainsi que les métadonnées sont transformés en artefact (.qza) afin d'être importés dans Qiime2. Un graphe qualité ainsi que le nombre de séquences par échantillons sont générés à l'aide de la commande « demux summarize » (QIIME2_Team, 2018c). Les scores qualité nous permettent de fixer les paramètres de trimming et de truncating (coupe des reads). Le seuil de qualité est fixé à 20 (Brandon *et al.*, 2018). Cependant, il est nécessaire d'avoir un chevauchement d'au moins 20 paires de bases plus la variation biologique dépendant de la section séquencée (Callahan *et al.*, 2016). C'est pourquoi les valeurs choisies sont de 0 et 0 pour le « taillage » et de 245 et 245 pour le « troncage » .

Le plug-in « DADA2 » (QIIME2_Team, 2018d) est utilisé pour filtrer les séquences de faibles qualités, dérépliquer, retirer les chimères et assembler les paires de reads ensemble (Callahan *et al.*, 2016). DADA2 infère une « feature table » qui contient toutes les unités d'observations comparables aux unités taxonomiques opérationnelles (OTU). Le plug-in fournit également la table des séquences. L'assignement taxonomique est réalisé à l'aide d'un algorithme de classification naïve Bayésien. Cet algorithme fonctionne en s'entraînant par rapport à une base de données de référence avant d'être utilisé pour les taxa provenant des tubes digestifs de *G. mellonella* (processus de machine learning). Le plug-in utilisé est le « feature-classifier » (Bokulich & Dillon, 2018) avec la méthode « fit-classifier-sklearn » entraîné en utilisant les amorces adéquates (341F/785R). La base de données Greengene version 13_8 (Greengenes, 2018) est utilisée avec un pourcentage d'identité de 97% comme limite d'assemblage (GG- 97% OTUs)

(Werner *et al.*, 2012). Cette étape nous permet d'obtenir une « Biom table » (similaire à une OTU table). Afin d'éliminer les chloroplastes ainsi que les mitochondries, la table des OTUs est filtrée grâce à la commande « filter-features » (QIIME2_Team, 2018e) ainsi que les séquences grâce à « filter-seqs » (QIIME2_Team, 2018f). Les OTUs sont extraits de QIIME2 afin de réaliser les analyses dans le logiciel R avec les packages RAM (Chen *et al.*, 2018), phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) et ggplot2 (Wilkinson, 2009).

Afin d'analyser la diversité microbienne, les séquences représentatives sont alignées à l'aide de la commande «MAFFT » (Katoh & Standley, 2013). Les positions de séquences comprenant un nombre élevé de gaps sont filtrées par la commande « Mask » (QIIME2_Team, 2018g). L'arbre phylogénétique est obtenu par FastTree2 par la méthode du « maximum likelihood » (Price *et al.*, 2010). Celui-ci est finalement enraciné par la commande « midpoint-root » (QIIME2_Team, 2018h). Le plug-in « diversity » (QIIME2_Team, 2018i) permet d'obtenir une courbe de raréfaction. Celle-ci représente l'augmentation du nombre d'OTUs en fonction de la profondeur de séquences. Une première courbe est produite afin d'identifier le nombre d'OTUs observés dans les différents échantillons lors de l'étude des abondances relatives. Afin de ne pas surestimer la diversité, un filtre est à nouveau appliqué à l'OTU table afin de retenir uniquement les OTUs présents au sein de minimum deux échantillons (Muturi *et al.*, 2016). Une seconde courbe de raréfaction est alors générée pour situer la profondeur de normalisation. On identifie un seuil asymptotique qui nous permet de raréfier tous les échantillons sans en exclure (seuil fixé à 1400 séquences). Le pipeline « core-metrics-phylogenetics » est utilisé pour obtenir les indices souhaités d'alpha diversité : la richesse spécifique (OTUs observés) , l'indice de Shannon et l'indice d'équitabilité de Pielou et la diversité phylogénétique de Faith (PD). Les diversités alpha sont finalement représentées graphiquement grâce au package ggplot2 (Wilkinson, 2009) dans le logiciel R .

La diversité alpha est une représentation de la diversité locale pour un habitat qui a une taille fixe (Marcon, 2017). L'indice de Shannon (H') permet d'obtenir la richesse spécifique au travers des différents OTUs rencontrés au sein de l'échantillon. Celle-ci représente le nombre d'espèces qui sont présentes au sein d'un échantillon (Marcon, 2017).
$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$
 où p_i est l'abondance proportionnelle de chaque OTU.

Il est dès lors intéressant de prendre en compte le facteur de richesse associé à un facteur d'équitabilité. En effet, une diversité de niche est engendrée par la nature ainsi que l'abondance des OTUs. Cette diversité de niche permet la colonisation propice pour des espèces spécifiques. L'indice de Pielou rend

compte de ce principe d'équitabilité afin de comprendre la répartition des abondances entre les différents OTUs. Dernièrement, la diversité phylogénétique de Faith permet d'intégrer le facteur phylogénétique au sein de la diversité en comparant la somme des longueurs de branches de l'arbre phylogénétique selon les diètes utilisées.

La diversité β représente la distance entre deux communautés. La comparaison du nombre de taxa unique à chaque écosystème permet de représenter les similarités et dissimilarités. La dissimilarité entre deux échantillons peut être représentée par l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Celui-ci compare les abondances entre chacun des échantillons et renvoie une matrice de distances (0 si les échantillons sont égaux et 1 s'ils sont totalement dissemblables) (Marcon, 2017). Les dissimilarités potentielles entre les communautés microbiennes sont également identifiées en intégrant l'aspect phylogénétique. Pour ce faire, les longueurs des branches de l'arbre phylogénétique partagées ou non entre chacune des paires d'échantillons sont comptabilisées. Le ratio est alors représenté dans une matrice de distance UniFrac (« unweighted ») (Lozupone *et al.*, 2011).

Le pipeline « core-metrics-phylogenetics » est à nouveau utilisé pour obtenir les diversités bêta. La matrice obtenue est la matrice des distances UniFrac, (unweighted) (Lozupone *et al.*, 2011). Les dissimilarités sont également étudiées à l'aide d'un positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) basé sur les distances de Bray-Curtis. Cette ordination est mise en œuvre grâce aux packages plyr (Wickham, 2011), phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) et vegan (Oksanen *et al.*, 2013) du logiciel R après avoir créé un objet phyloseq à partir des données de QIIME2. L'ordination réalisée prend en compte les classes des différents OTUs afin d'expliquer les dissimilarités entre échantillons. Afin de prendre en compte les OTUs les plus explicatifs, la fonction retient les OTUs présents plus de 5 fois dans la moitié des échantillons (McMurdie, 2018). Un diagramme de Shepard est représenté afin de vérifier la qualité de l'ordination. Le NMDS est privilégié pour l'ordination des communautés microbiennes présentes dans le tube digestif de *G. mellonella*. Le NMDS permet de ne pas devoir supposer de relation strictement linéaire entre les dissimilarités (dans l'espace initial) et les distances (dans l'espace réduit) pour les différents échantillons (contrairement à l'ACP). La façon de procédé est par itération afin d'identifier l'ordination la plus adéquate (stress minimisé). La NMDS est recommandée vu son nombre d'exigences restreint pour les études d'abondances (Salako *et al.*, 2013; Glèlè Kakaï R, Salako VK, 2016) .

3.3.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du pipeline QIIME2 ainsi que du logiciel R version 3.5.0 (2018-04-23). Les différents tests utilisés sont inspirés d'études de microbiomes réalisées à l'aide de QIIME2 (Dai *et al.*, 2018; O'Connell *et al.*, 2018)

Les diversités alpha sont comparées par le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney ou paramétrique t student selon les conditions d'applications (indépendance, normalité par test de Shapiro-Wilk et égalité des variances par test de Bartlett). Une analyse de variance par permutation (PERMANOVA, 999 permutations) (Anderson, 2001) permet une comparaison des distances UniFrac (unweighted) ainsi que des distances de Bray-Curtis.

L'étude des abondances relatives des différents taxa nécessite une certaine prudence statistique. Il est considéré que l'utilisation d'analyses univariées classiques n'est pas adaptée à l'étude des abondances d'OTUs d'un microbiome (Morton *et al.*, 2017). En effet, la dépendance des OTUs doit être prise en compte afin de contrôler le taux de fausses découvertes (FDR, « False Discovery Rate »). Pour ce faire, deux démarches sont employées dans ce travail. Premièrement, une analyse de composition de microbiome (méthode « ANCOM »). Son avantage est qu'elle ne fait aucune hypothèse à propos de l'indépendance entre les OTUs. De plus, elle fait peu d'hypothèse concernant la distribution des OTUs. Pour ce faire, ANCOM utilise les log ratio des abondances relatives pour analyser les variations d'OTUs (Mandal *et al.*, 2015) . La p-valeur ($\alpha=0,05$) est ajustée par la méthode FDR (Hochberg, 1995).

Deuxièmement, le package DESEQ2 (Love *et al.*, 2014) est employé dans le logiciel R afin d'étudier l'abondance relative des différents OTUs. Cette méthode repose sur une distribution binomiale négative et représente une des méthodes de choix dans l'étude des abondances relatives (McMurdie & Holmes, 2014). La p-valeur ($\alpha=0,05$) et corrigée par l'ajustement de Benjamini-Hochberg (BH) pour les tests multiples (Hochberg, 1995).

3.4. Métaprotéomique

Les extractions de protéines (3.2.3) ainsi que d'ADN du mésentéron et du proctodéum de *Galleria mellonella* ont été réalisées sur les mêmes échantillons afin d'obtenir une complémentarité d'informations maximum. Chaque échantillon correspond à un et unique individu. Suite au dosage et au clean-up des échantillons, ceux-ci sont transmis au GIGA Proteomic (Uliège) le 31/05/2018 afin de réaliser la suite des analyses. La digestion, l'alkylation ainsi que l'identification par LC-ESI-MS/MS sont réalisées par ce laboratoire. Les données sont ensuite obtenues et analysées par nos soins. Il a été nécessaire de sélectionner 8 échantillons parmi les 16 de départ afin de réaliser l'étude protéomique. Le choix prend en compte les critères de poids des larves, jour d'extraction, concentration protéique, qualité d'ADN extrait et aliments visibles dans le tube digestif (repris dans l'annexe 7.4). Les échantillons sélectionnés (STD1,STD2,STD5,STD6,PE1,PE2,PE7 et PE8) sont les plus représentatifs de l'ensemble des échantillons, les échantillons ayant des valeurs extrêmes ne sont donc pas présents.

3.4.1. Réduction, alkylation et digestion

Le protocole réalisé au sein du Giga Proteomic (Uliège) est une adaptation des étapes principales reprises ci-après. Une quantité de 20 µg de protéines par échantillon est remise en solution dans du bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3). Afin de réduire les cystéines, du dithiothiéitol (DTT) est ajouté à une solution de NH_4HCO_3 et chauffée. L'étape d'alkylation est réalisée dans l'obscurité et à température ambiante, à l'aide d'une solution d'iodoacétamide dans du NH_4HCO_3 . Afin de stopper l'alkylation, une étape de neutralisation de l'iodoacétamide est mise en place par addition de DTT dans une solution de NH_4HCO_3 . L'étape de digestion est réalisée durant une nuit avec une solution d'eau contenant de la trypsine. Les peptides sont alors séchés à l'aide d'une centrifugeuse à vide.

3.4.2. Identification LC-MS/MS

Le protocole réalisé au sein du Giga Proteomic (Uliège) est une adaptation des étapes principales reprises ci-après. Différentes techniques peuvent être employées afin d'identifier et de quantifier les protéines d'un échantillon complexe. Cependant, la spectrométrie de masse représente la méthode la plus utilisée dans ce domaine (Shi *et al.*, 2010). L'analyse a été réalisée à l'aide d'une chromatographie LC (Acquity M-class-Water) couplée au spectromètre de masse ESI-Q orbitrap (Q Exactive Plus – Thermo Scientific), en

mode ionisation positif. Les spectres de masse obtenus sont traités par le logiciel Data analysis version 4 (Bruker).

3.4.3. Bioinformatique

Les données ont été reçues du laboratoire GiGA Proteomic (Uliège) le 09/07/2018. Il est dès lors possible de traiter les données obtenues. Un grand nombre de banques de données sont disponibles, la base de donnée non redondante NCBIInr (National Center for Biotechnology Information non-redundant) est couramment employée dans la caractérisation de protéines de tube digestif (Xiao *et al.*, 2017). Le software Andromeda (Cox *et al.*, 2011) permet une identification protéique. Celui-ci est implémenté dans la plateforme Maxquant (version 1.6.2.3) afin de traiter les données (Cox & Mann, 2008). Il est comparable au logiciel Mascot couramment utilisé (Shevchenko *et al.*, 2005). Celles-ci sont alors intégrées dans Perseus (version 1.6.1.3) afin de pouvoir les visualiser (Tyanova *et al.*, 2016). Au vu de la durée du traitement de données par différents softwares, la totalité des analyses protéomiques n'a pas pu être terminée au moment de finaliser la rédaction de ce travail.

4. Résultats et Discussion

4.1. Tests préliminaires

Les résultats des tests préliminaires ont eu pour but de justifier une méthodologie adéquate pour étudier le microbiome du tube digestif de *G. mellonella*. Le taux de mortalité et le nombre de jours afin d'avoir 100% des larves vivantes qui nymphosent sont repris dans le Tableau 3, en fonction de la diète et de la masse des larves. Tous les résultats sont exprimés en moyennes \pm écarts-types.

*Tableau 3 : Taux de mortalité et nombre de jours avant formation du cocon de *Galleria mellonella* selon le traitement (quatre réplicats par traitement).*

Type de diète	Quantité (g)	Masse larves (mg)	Taux Mortalité (%)	Nbre de jours/100% de prépupes
Cire	2,0	287 \pm 22	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,5
	2,0	79 \pm 26	20,0 \pm 34,6	13,0 \pm 0,7
	2,8	79 \pm 26	8,0 \pm 9,8	11,4 \pm 1,4
	4,0	79 \pm 26	0,0 \pm 0,0	10,5 \pm 2,9
PE	0,1	79 \pm 26	0,0 \pm 0,0	3,3 \pm 0,8
	0,1	157 \pm 34	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,5
Cire+PE	2,8+0,1	79 \pm 26	5 \pm 8,7	11,3 \pm 0,1
	4+0,1	79 \pm 26	0,0 \pm 0,0	12,2 \pm 3,7

Le nombre de jours pour les larves consommant de la cire et pesant 79 \pm 26 mg est compris entre 10 et 13 jours en fonction des quantités de cire. Les larves ayant une diète uniquement constituée de polyéthylène ont toutes formé un cocon après 1 et 3 jours respectivement pour les larves de 157 \pm 34 et 79 \pm 26 mg. Concernant les larves alimentées par un mélange de cire et de polyéthylène, le nombre de jours est compris entre 11 et 12 en moyenne pour se nymphoser. Les larves ayant un poids élevé (287 \pm 22 mg) alimentées avec de la cire se sont également nymphosées après 1 jour. Le taux de mortalité est compris entre 0 et 20 % pour l'ensemble des tests.

Le nombre de jours pour obtenir 100% des larves vivantes qui produisent un cocon est variable selon la diète. Les larves d'une même masse et contenant la diète unique de polyéthylène se sont nymphosées en 3 jours contre 11 jours lorsque de la cire est également présente. Il n'est cependant pas à oublier que certaines larves forment un cocon plus rapidement que d'autres, cette information n'étant pas reprise dans ce travail, ce qui influence la méthodologie choisie. La taille des cocons ne paraissant pas différer entre deux expériences d'une même durée (diètes cire et cire/polyéthylène), les pupes ne sont dès lors ni pesées ni comparées.

Afin de suivre la consommation du polyéthylène par les larves de *G. mellonella*, le taux de réduction de la masse de polyéthylène est présenté (Figure 13). Une photo de polyéthylène est reprise en annexe 7.5.

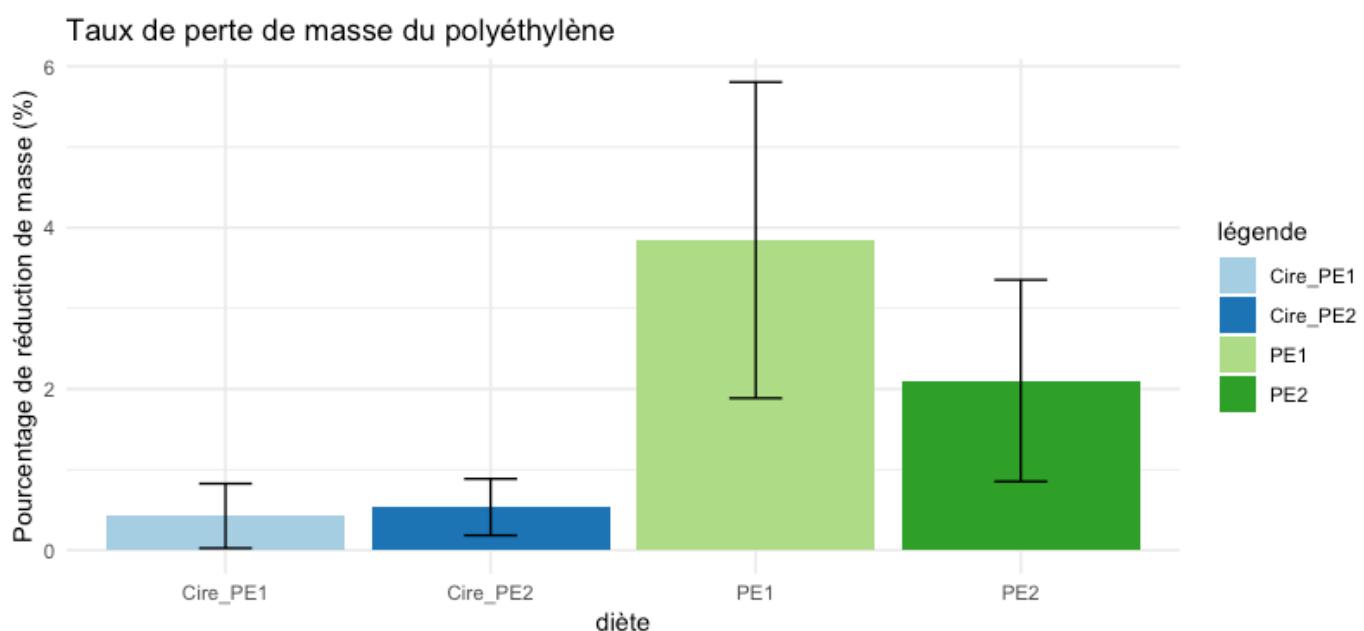


Figure 13 : Taux de réduction de la masse de polyéthylène (moyenne ± écart-type). Cire_PE1 : 2,8/0,1g larves 79 ± 26 mg, Cire_PE2 : 4,0/0,1g larves 79 ± 26 mg, PE1 : 0,1g larves 157 ± 34 mg, PE2 : 0,1g larves 79 ± 26 mg.

L'analyse de la variance est réalisée après vérification de la normalité (Shapiro-Wilk) et de l'égalité des variances (Barlett). Le taux de réduction de la masse est compris entre 0,42% et 3,84% respectivement pour les larves de 79 ± 26 mg (alimentées par un ratio de 2,8 g de cire + 0,1g de polyéthylène) et pour les larves de 157 ± 34 mg alimentées exclusivement par 0,1 g de polyéthylène. L'analyse de la variance n'a pas permis de détecter de différence significative ($p=0,185$) entre les larves pesant 79 ± 26 mg et 157 ± 34 mg lorsque la diète contient exclusivement 0,1g de polyéthylène. De même, aucune différence

significative n'a été observée ($p=0,365$) entre les différentes quantités de cires présentes au sein de la diète mixte (cire et polyéthylène), pour des valeurs de 2,8 et 4,0 g de cire. Ce résultat confirme l'utilisation de cire *ab libitum* dans les ratios de cire et de polyéthylène. De plus, le taux de réduction de la masse du polyéthylène lors d'une courte durée (1 jour avec des larves de 157 ± 34 mg) n'est pas moindre que lors d'une durée prolongée (3 jours avec des larves de 79 ± 26 mg) lorsque le polyéthylène est seul dans la diète.

La consommation de polyéthylène par les larves de *G. mellonella*, reportée par l'étude de Bombelli et collègues (2017) a été de 92 mg pour 100 larves durant une durée de 12 heures. Ces résultats sont proches de la catégorie de larves de 157 ± 34 mg qui ont consommé $3,8 \pm 1,7$ mg de polyéthylène durant 1,5 jour. De même, la consommation spécifique de polyéthylène par *T. molitor* était de 20 mg et 30 mg par jour pour 100 larves, respectivement pour le polyéthylène seul et le polyéthylène et du son de blé (Brandon *et al.*, 2018).

4.2. Métagénomique

4.1.1. Qualité et Quantité d'ADN

Le dosage de l'ADN à l'aide du Nanodrop1000 et du Qubit ainsi que la pureté de l'ADN extrait sont repris dans le Tableau 4. Chacun des échantillons est propre au tube digestif d'une et unique larve.

Tableau 4 : Dosage de l'ADN total et double brin ; ratios d'absorbance pour la diète de cire (STD1 à STD8) et la diète mixe cire/PE (PE1 à PE8).

Code identification	Dosage_Nanodrop (ng/µl)	Dosage_Qubit (ng/µl)	A260/280	A260/230
STD1	5,53	7,79	3,1	0,2
STD2	18,16	16,70	2,3	1,4
STD3	13,84	17,60	2,5	0,1
STD4	9,19	7,26	3,8	0,0
STD5	12,33	3,74	2,7	0,2
STD6	13,18	6,91	1,9	0,2
STD7	20,64	4,77	1,9	0,6
STD8	21,08	3,54	2,5	0,5

PE1	14,58	11,30	2,4	2,3
PE2	12,86	10,20	2,2	1,2
PE3	20,69	1,53	2,3	0,3
PE4	77,34	2,33	2,3	0,9
PE5	24,73	17,30	1,9	0,8
PE6	9,69	2,72	2,2	0,5
PE7	34,45	23,00	2,0	0,7
PE8	53,25	36,70	2,0	1,2

La quantité d'ADN total extrait varie de 5,53 à 21,08 ng/µl pour les échantillons de diète standard et de 9,69 à 77,34 ng/µl pour la diète de polyéthylène (selon le Nanodrop). L'ADN double brin représente de 3,54 à 17,60 ng/µl pour la diète standard et de 1,53 à 36,70 ng/µl pour la diète de polyéthylène (selon le dosage du Qubit). Les concentrations en ADN double brin sont de l'ordre de trois fois plus petites que l'ADN total pour l'ADN extrait par le kit ALLprep selon Mee et collègues (Mee *et al.*, 2011). Ceci confirme donc certaines différences fortes telles que STD7 et STD8. Cependant la concentration en ADN des échantillons PE4 et PE3 est plus de dix fois supérieure selon le Nanodrop. Il est donc crucial de prendre en compte également les ratios d'absorbance (280 et 230 nm) pour vérifier la quantité d'ADN réellement présente.

Les ratios d'absorbances mesurés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop permettent d'évaluer la qualité des échantillons d'ADN. Les valeurs doivent se situer entre 1,8 et 2,0 pour le rapport A260/280 et entre 2,0 et 2,2 pour A260/230. Les faibles concentrations en ADN peuvent cependant entraîner de rapides variations lors des mesures. La moitié des échantillons ont un ratio A260/280 acceptable. Cependant, certains ratios sont anormalement hauts (*i.e.* 3,13 et 3,77).

Le second ratio à des valeurs faibles (< 1,5) pour l'ensemble des échantillons sauf PE1. Ceci peut être expliqué par certaines contaminations telles que les phénols ou les hydrates de carbone (Wilfinger *et al.*, 1997).

Il y a tout de même lieu de réfléchir sur les différentes raisons pouvant influencer ces ratios. Le tampon EB utilisé pour l'extraction contient du Tris-HCl à pH= 8,5. Or, le pH peut influencer la valeur d'absorbance (Wilfinger *et al.*, 1997). De plus, la longueur d'onde de 260nm prend également en compte l'ARN et d'autres constituants mineurs présents. Il est donc possible que des proportions élevées d'uracile

($A^{\circ}=4.00$) plutôt que de thymine ($A^{\circ}=1,47$) influencent la moyenne totale. Le chlorure de guanidine présent dans le tampon de rinçage (AW1) absorbe à une longueur d'onde de 230nm (Nanodrop, 2018). Dernièrement, la guanidine isothiocyanate absorbe à 230 et 260nm, celle-ci étant présente dans le tampon RLT de lyse (Boesenbergs-Smith *et al.*, 2012). Considérant la composition globale des tampons commerciaux comme confidentielle, certains sels interférents pourraient également être présents. Ceci explique l'utilisation de tous les échantillons pour le séquençage malgré certains ratios anormaux.

4.1.2. Traitement des séquences

Les données obtenues en format fastq sont accompagnées d'un score qualité (« Phred Q score »). Un score égal à 30 (Q30), associé à une base, indique qu'elle a une probabilité de 1/1000 d'être incorrecte. Les échantillons ont tous plus de 94,1 % des bases qui sont insérées en ayant un score supérieur au Q30.

Tableau 5 : Nombre de séquences après les étapes de filtrage : reads totaux, reads assemblés par échantillons, filtre du plug-in dada2 (filtrer le bruit, assembler par paire et retirer les chimères)

	Reads	Input	Filtré	Assemblé	non-chimérique
Moyenne	76578	38289	35128	33247	5830
Écart-type	21867	10933	10133	9826	1641

Le nombre total de séquences est de 1 225 244 avec une moyenne de 76578 ± 21867 séquences par échantillon. Cependant, ce nombre correspond aux données brutes non assemblées. Une fois les dossiers assemblés, le nombre moyen de séquences est divisé par deux. Après filtrage par le plug-in DADA2, le nombre de séquences est de 35128 ± 10133 . Les séquences sont ensuite assemblées et les chimères sont retirées pour obtenir un nombre de séquences final de 5830 ± 1641 . Il n'a pas été possible de relier le nombre de reads obtenu au final avec les critères de qualité ou de quantité d'ADN présent initialement (Tableau 4).

Après assignation taxonomique à un seuil de similarité de 97% grâce à la base de données Greengene et l'élimination des chloroplastes et mitochondries, 1206 OTUs sont assignés pour l'ensemble des échantillons. Les séquences n'étant assignées à aucun règne représentent 0,06 % et celles non déterminées au niveau du phylum, représentent 6.9 ± 5.8 % de l'abondance totale.

La première courbe de raréfaction générée est reprise à la Figure 14. Celle-ci représente la richesse spécifique des différents échantillons exprimée en nombre d'OTUs observés.

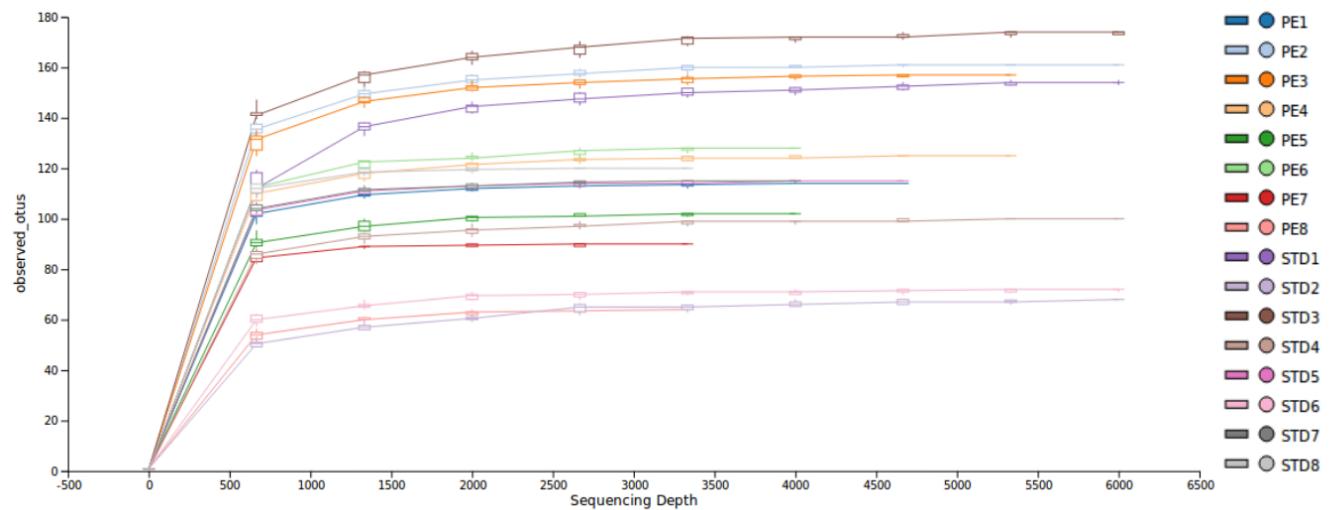


Figure 14 : Courbe de raréfaction représentant la richesse spécifique des différents échantillons. La table OTUs n'est pas filtrée des OTUs présents dans un seul échantillon. La profondeur de séquences est limitée à 6500 afin d'obtenir plus de clarté.

Premièrement, la courbe de raréfaction permet d'identifier que tous les échantillons atteignent leur maximum d'OTUs observés à partir de 1000 séquences, hormis l'échantillon STD1 (Figure 14, courbe mauve) qui continue à augmenter légèrement. L'asymptote indique que la diversité des OTUs est bien représentée lors d'une profondeur supérieure à 1500 séquences. Ensuite, les deux extrêmes sont incarnés par l'échantillon PE7 (Figure 14, courbe rouge) qui représente le plus faible nombre de séquences (3558) et l'échantillon STD1 (Figure 14, courbe violette) qui obtient un maximum de 10043 séquences. Dernièrement, le nombre d'OTUs observés varie entre 63 pour STD2 (Figure 14, courbe mauve) et 172 pour STD3 (Figure 14, courbe brune). Ceci souligne une certaine variabilité au sein de la diversité des échantillons.

4.1.3. Étude taxonomique des communautés microbiennes

Le core microbiome comprenant les OTUs présents simultanément dans 90% des échantillons est composé de 13 OTUs de la famille des Oxalobacteraceae et 2 OTUs de la famille des Comamonadaceae. Le core microbiome présent dans 80% des échantillons contient 12 OTUs appartenant au genre

Enterococcus, 14 OTUS de la famille des Oxalobacteraceae et 4 OTUs de la famille des Comamonadaceae.

- Phylum

La répartition des phyla présents au sein des échantillons soumis aux deux diètes est présentée (Figure 15). Les OTUs non assignés représentent l'abondance restante de chaque individu.

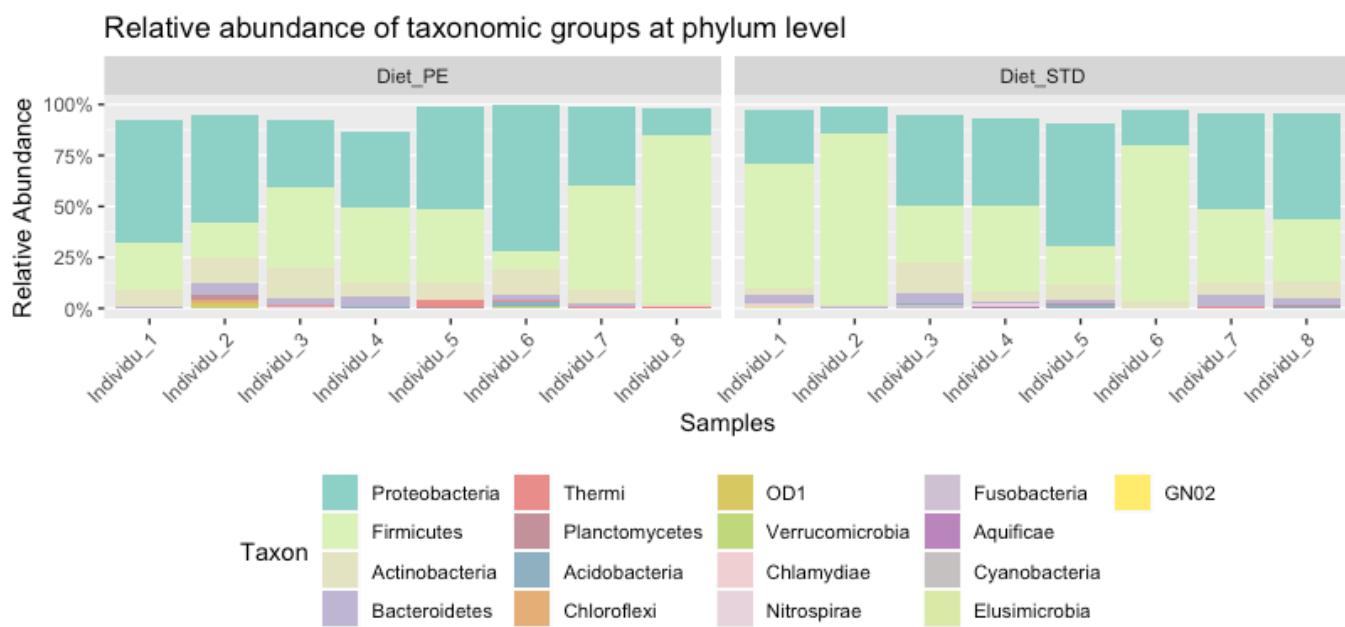


Figure 15 : Abondance relative des bactéries (niveau phylum) présentes au sein du tube digestif des échantillons de *Galleria mellonella* pour la diète de cire (STD1-STD8) et pour le ratio cire-polyéthylène (PE1-PE8).

L'étude des communautés bactériennes au sein de l'ensemble des échantillons permet de révéler les taxa majoritaires. Les Firmicutes, les Proteobacteria, et les Actinobacteria représentent les trois phyla majoritaires des échantillons. L'abondance relative est cependant différente en moyenne d'une diète à l'autre : pour les Firmicutes, l'abondance relative de la diète standard ($47,4 \pm 22,2\%$) est supérieure à l'abondance relative de la diète PE ($37,2 \pm 21,6\%$). Concernant les Proteobacteria, leur abondance relative au sein de la diète PE ($44,5 \pm 17,2\%$) est supérieure à la diète standard ($37,6 \pm 15,5\%$). Les Actinobacteria ont une abondance plus élevée pour la diète PE ($6,0 \pm 4,1\%$) que pour la diète standard ($8,8 \pm 4,0\%$).

La prédominance marquée des Firmicutes dans les échantillons STD2 et STD6 ou PE1 et PE8 corrobore avec le faible nombre d'OTUs observés au niveau de la courbe de raréfaction (Figure 14). Il est à constater que le nombre d'OTUs non assignés au niveau du phylum est inférieur à 10% en moyenne.

Afin de pouvoir comparer les communautés microbiennes présentes au sein du microbiome du tube digestif de *G. mellonella*, l'étude de Mereghetti et collègues (2017) est utilisée. Celle-ci porte sur l'étude du microbiome du tube digestif des larves de *P. interpunctella* (teigne des fruits secs) par séquençage du gène codant l'ARNr 16S. *Plodia interpunctella* appartient également à la famille des Pyralidae et prodigue une comparaison d'intérêt vu la mise en avant de son microbiome dans la dégradation de polyéthylène (Yang et al., 2014). Les trois phyla majoritaires sont en effet commun à *P. interpunctella*, les Proteobacteria cependant représentant plus de 70% dans leur cas (Mereghetti et al., 2017).

- Famille

Les dix familles majoritaires pour chacune des diètes sont présentées (Figure 16). Les OTUs non assignés au niveau de la famille sont exclus du top 10.

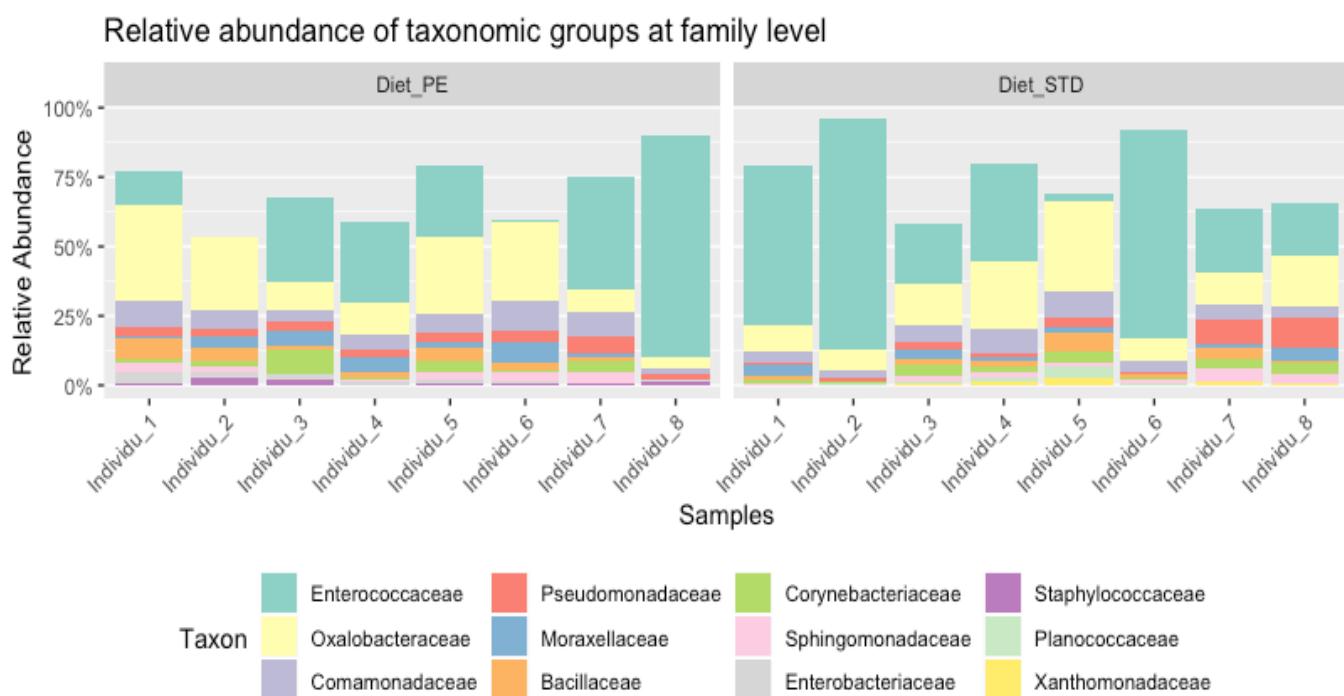


Figure 16 : Abondance relative des bactéries (Top 10 des familles) présentes au sein du tube digestif des échantillons de *Galleria mellonella* pour la diète standard de cire (STD1-STD8) et pour le ratio cire-polyéthylène (PE1-PE8).

Concernant les abondances relatives des OTUs au niveau des familles, les Enterococcaceae ($33,7 \pm 26,3\%$), les Oxalobacteraceae ($17,5 \pm 9,7\%$) et les Comamonadaceae ($6,3 \pm 2,6\%$) représentent à eux trois en moyenne plus de 50% des OTUs. Les Enterococcaceae sont en moyenne présents en plus grand nombre au niveau de la diète standard ($39,8 \pm 27,0\%$) comparée à la diète PE ($27,5 \pm 24,2\%$). La variabilité des abondances entre les différentes larves est cependant importante pour les deux diètes. Les Oxalobacteraceae et Comamonadaceae sont présents de façon légèrement plus abondante (différence $< 5\%$) pour la diète de polyéthylène. Au niveau des familles majoritaires (top 10), présentant moins de 5% de l'abondance relative totale, les Moraxellaceae, les Bacillaceae, les Corynebacteriaceae, les Enterobacteriaceae et les Staphylococaceae sont toutes en moyenne plus abondantes au niveau de la diète de polyéthylène.

L'abondance relative des Enterococcaceae des échantillons STD5, PE2 et PE6 est inférieure à 5%. Ceci représente une différence marquée avec certains des échantillons ayant plus de 75% des OTUs appartenant à cette famille (STD2, STD6 et PE8). Il n'est cependant pas possible de relier cette différence avec le nombre de reads. L'abondance relative des Enterococcaceae est inférieure en moyenne de plus de 50% à celle de l'étude de Krams et collègues (2017) portant sur *G. mellonella*. Cette diversité moindre pourrait s'expliquer par l'utilisation unique du mésentéron, d'une région hypervariable unique (v3) et du stade non renseigné.

Les Burkholderiaceae représentent la famille la plus abondante (70-75%) au niveau de *P. interpunctella* (Mereghetti *et al.*, 2017). Il est intéressant de souligner que trois familles parmi les plus présentes chez *G. mellonella* ou *P. interpunctella* appartiennent à l'ordre des Burkholderiales (Burkholderiaceae, Comamonadaceae et Oxalobacteraceae). Les Burkholderiales représentent $23,9 \pm 11,8\%$ des ordres présents chez *G. mellonella*.

En effet, les bactéries de la famille des Oxalobacteraceae (Proteobacteria) sont classées dans les bactéries copiotrophes. Ceci caractérise les bactéries qui ont tendance à vivre en présence d'une source de nutriments élevée. Le nutriment principal étant le carbone (Yin *et al.*, 2017). Il en est de même pour les Enterococcaceae (Firmicutes) qui sont largement rependu dans les microbiomes intestinaux (Lebreton *et al.*, 2014). Lorsque les quantités de carbone sont plus abondantes, les Proteobacteria (dont font partie les Oxalobacteraceae) et les Bacteriodes ont tendance à être plus abondants que les Acinetobacteria. Les Burkholderiales incluant les Oxalobacteraceae et les Comamonadaceae ont la capacité de métaboliser

une large gamme de sources de carbone. Ces familles sont de caractère versatile envers les différentes sources de nutriments (Goldfarb *et al.*, 2011) .

- Genre

Les dix genres majoritaires de chacune des diètes sont présentés à la Figure 17. Les OTUs ayant un genre non assigné ne sont pas présentés sur le graphique.

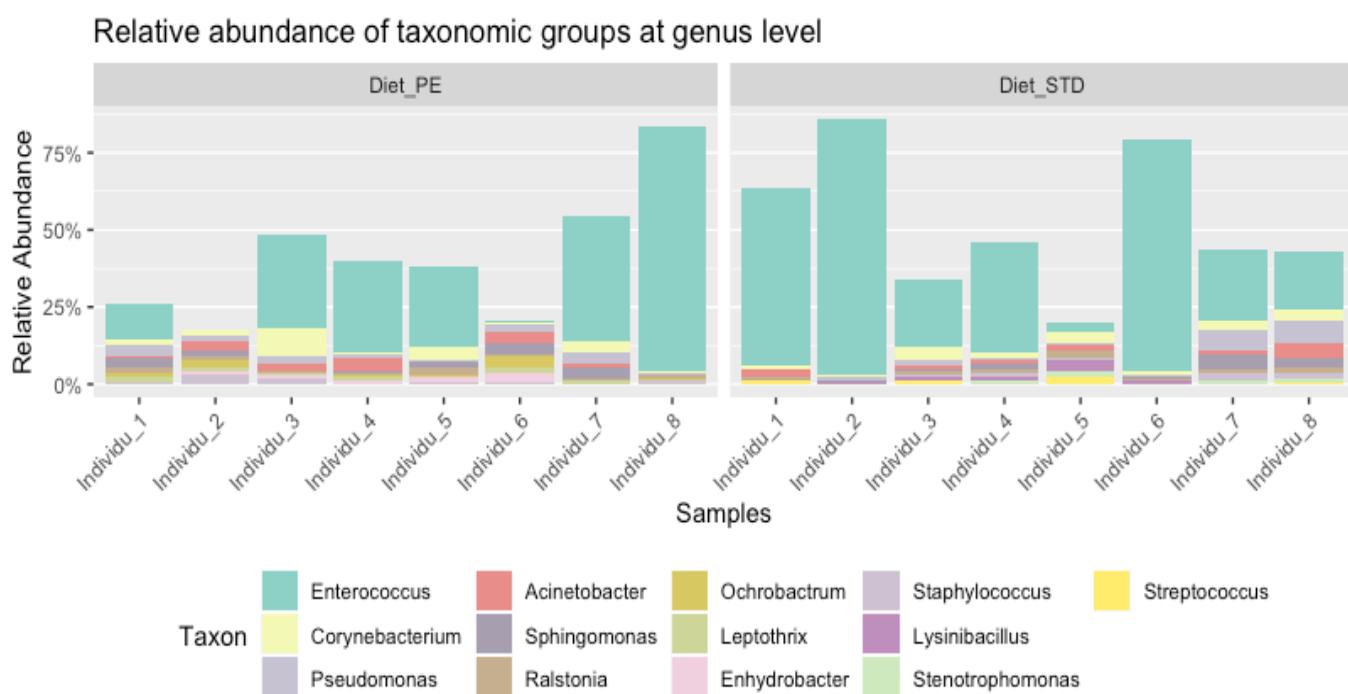


Figure 17 : Abondance relative des bactéries (Top 10 des genres) présentes au sein du tube digestif des échantillons de *Galleria mellonella* pour la diète standard de cire (STD1-STD8) et pour le ratio cire-polyéthylène (PE1-PE8).

Le genre Enterococcus (vert) est présent à une abondance relative de $33,6 \pm 26,3$ % dans l'ensemble des échantillons. Concernant la diète standard, le genre Enterococcus représente $39,8 \pm 27,0$ % des OTUs identifiés au sein du tube digestif. Ce genre est moins présent en moyenne au niveau de la diète polyéthylène ($27,5 \pm 24,2$ %). Il est important de prendre en compte que certains OTUs majoritaires n'ont pas d'assignement taxonomique au niveau du genre (Figure 17). Effectivement, les OTUs appartenant à l'ordre des Burkholderiales sont peu présents au niveau du genre, mais représentent une fraction importante du microbiome. Ceci peut également s'expliquer par un nombre élevé de genres différents au sein d'une même famille.

Hormis les Enterococci, les OTUs appartenant au top dix des genres les plus présents dans les diètes représentent moins de 5 % de l'abondance relative totale. Ils sont en moyenne tous supérieurs pour la diète polyéthylène comparée à la diète standard, sauf pour *Pseudomonas* et *Ralstonia*. Les *Enterococci* ont la capacité de coloniser les tubes digestifs de nombreux Lépidoptères (Tang *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013; Vilanova *et al.*, 2016) tels que *G. mellonella* en résistant aux phénomènes de métamorphoses. Il représente le genre dominant de *G. mellonella* (Johnston & Rolff, 2015). Les trois taxa majoritaires au sein du tube digestif de larves ayant démarré le processus de métamorphose sont *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* et *Staphylococcus* selon Johnston et Rolff (2015). Ceci peut s'expliquer par le stade avancé des larves étant déjà en métamorphose dans leur étude. La diversité chutant lorsque les larves de Lépidoptères muent à la fin du stade larvaire (Chen *et al.*, 2016). Notre étude ayant été établie sur des larves qui n'ont pas encore cessé de se nourrir pour tisser un cocon.

L'identification de bactéries cultivables à partir d'échantillons de tubes digestifs de *G. mellonella* alimentées par une diète standard a été réalisée lors d'un mémoire de fin d'études à Gembloux Agro-Bio Tech (Carlier, 2018). Cette étude est réalisée à partir de colonies isolées. A partir d'un séquençage du gène codant l'ARNr 16S isolé par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant. Les colonies correspondent à *Enterococcus (avium, casseliflavus ou gallinarium)*, *Bacillus (cereus, velezensis, subtilis, thuringiensis, wiedmanii ou amyloliquefaciens)*, *Brevibacillus (halotolerans, laterosporus ou laterosporus)* et *Micrococcus (yunnanensis, luteus ou aloeverae)*. Ces différents genres bactériens sont également présents au sein de notre étude. Ceci permet d'encourager l'utilisation complémentaire de techniques de mises en cultures en parallèle de l'approche métagénomique afin d'obtenir une connaissance approfondie d'un microbiome.

4.1.4. Bactéries associées au polyéthylène

Afin d'identifier les OTUs significativement associés à la diète contenant du polyéthylène, le résultat de l'analyse d'abondance relative (Deseq2) est présenté à la Figure 18.

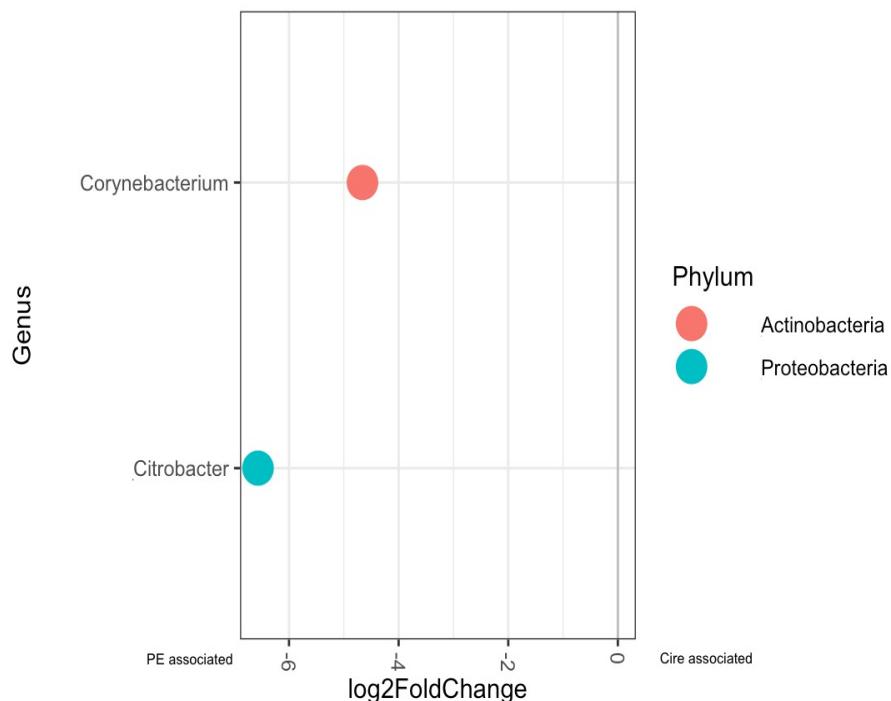


Figure 18 : Analyse différentielle de l'abondance (Deseq2) des micro-organismes présents dans le tube digestif de *Galleria mellonella* entre les diètes. OTUs significativement associé à la diète cire/polyéthylène (pvaleur non ajustée < 0,05). Le signe négatif du log2fold indique la variation logarithmique de l'abondance dans le sens du traitement cire/polyéthylène .

Il en résulte que les genres *Citrobacter* (pvaleur non ajustée = 0,027) et *Corynebacterium* (pvaleur non ajustée = 0,049) sont significativement associés à la diète polyéthylène. Le « log2fold » représente le logarithme en base deux du ratio entre les abondances des OTUs.

Après ajustement, les p-valeurs sont supérieures à 0,05. Ceci est dû au nombre élevé d'OTUs comparés qui interviennent dans les corrections de Benjamini-Hochberg (BH). Au vu des résultats similaires (Figure 19) obtenus pour *T. molitor* dégradant du polyéthylène, les genres *Citrobacter* et *Corynebacterium* sont maintenus comme pertinents (Brandon *et al.*, 2018). Le test ANCOM après correction ne prodigue également plus d'OTU significativement associé au traitement.

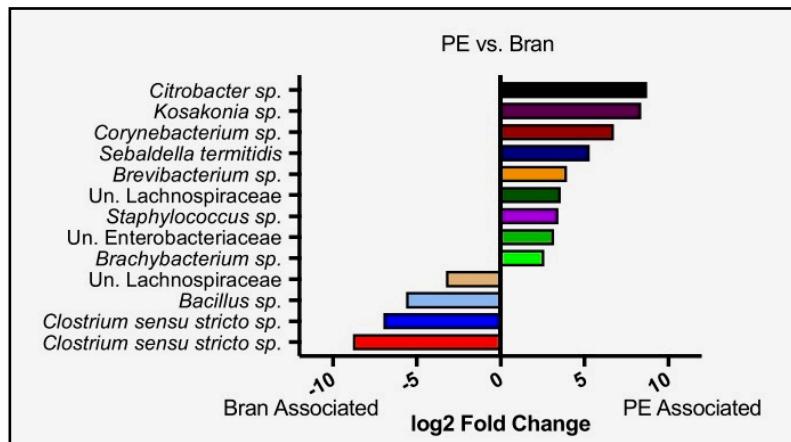


Figure 19 : Résultats de l'analyse différentielle d'abondance réalisée par Brandon et collègues (2018) sur le tube digestif de *Tenebrio molitor* consommant du polyéthylène ou du son de blé.

Le genre *Citrobacter* fait partie des bacilles gram négatifs appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et au phylum Proteobacteria. Ils sont présents à $0,2 \pm 0,3\%$ au sein des larves de la diète standard et à $0,8 \pm 0,8\%$ au sein des échantillons de la diète polyéthylène. L'étude de Brandon et collègues (2018) sur l'effet du polyéthylène sur le microbiome de *T. molitor* a également mis en avant ce genre bactérien comme significativement associé à la diète plastique (Figure 19). Le genre *Citrobacter* est également mis en avant pour sa capacité à former un biofilm sur du polystyrène et de le dégrader (Sekhar *et al.*, 2016). Cette famille de bactérie (Enterobacteriaceae) a déjà été soulignée pour la capacité de certaines souches à dégrader du polyéthylène (*i.e.* *Enterobacter absuriae* YT1 qui a pu être isolé du tube digestif des *Plodia interpunctella*) (Yang *et al.*, 2014).

Le genre *Corynebacterium* comprend des bacilles gram positifs qui appartiennent à la famille des Corynebacteriaceae et au phylum Actinobacteria. Il est couramment retrouvé dans le tube digestif de ténébrions ou de grillons (Domingo, 1998; Brandon *et al.*, 2018). Le genre *Corynebacterium* fait partie du core microbiome de *P. interpunctella* (Mereghetti *et al.*, 2017). Ce type de bactérie principalement aéro-anaérobic facultatif a la capacité de synthétiser des catalases. Concernant la biodégradation de polymères plastiques, *Corynebacterium* est repris dans les genres capables de dégrader du polyéthylène (Nowak *et al.*, 2011). De même, sa capacité à dégrader le polyuréthane a été déterminée par Akutsu et collègues (1998).

Le microbiome du tube digestif de *G. mellonella* comporte un certain nombre de bactéries ayant été associées aux polymères plastiques au préalable. Il semble donc nécessaire de s'intéresser également à certains OTUs minoritaires. *Variovorax paradoxus* appartenant à l'ordre des Burkholderiales est présent

(0,5 - 1,3 %) dans 6 échantillons. Il a été associé à diverses dégradations de polymères (Gu, 2003). *Serratia marcescens* également présent dans deux échantillons est capable de dégrader le polyéthylène (Azeko *et al.*, 2015). Sur base de leur capacité à dégrader du polyéthylène, 70% des genres de bactéries présents au sein du Tableau 1 sont également présents dans le tube digestif de *G. mellonella*. L'assignation taxonomique jusqu'à l'espèce n'étant pas facilement réalisable lors d'un séquençage du gène de l'ARNr 16S, il serait intéressant de connaître de façon plus approfondie les espèces présentes pour les différents genres d'intérêt. Parmi les OTUs exclusivement présents au sein des échantillons de diètes polyéthylène, on peut citer *Hydrogenophaga* qui a une activité hydrogène-oxydase (Willems *et al.*, 1989) et *Rubrivivax* ayant également une activité hydrogénase (Maness *et al.*, 2002). Ces deux OTUs appartiennent à la famille des Comamonadaceae (Burkholderiales). L'ordre des Burkholderiale a d'ailleurs été mis en lumière lors de la découverte de la bactérie *Ideonella sakaiensis* pour sa dégradation du polyéthylène téréphthalate (Yoshida *et al.*, 2016). Les Comamonadaceae sont dès lors suggérés pour l'étude d'enzymes dégradant le PET par Joo et collègues (2018).

4.1.5. Diversité microbienne

- Courbe de raréfaction

Afin de minimiser les surestimations de diversité, la table OTU a été filtrée de tous les OTUs minoritaires étant présents uniquement dans un seul échantillon. Ceci a pour conséquence de réduire drastiquement le nombre d'OTUs totaux, passant de 1206 à 113. Il en est de même pour la profondeur de séquences qui est également réduite au niveau des échantillons. La courbe de raréfaction produite à la Figure 20 représente le nombre d'OTUs observés en fonction du nombre de séquences pour chacun des échantillons, après avoir filtré.

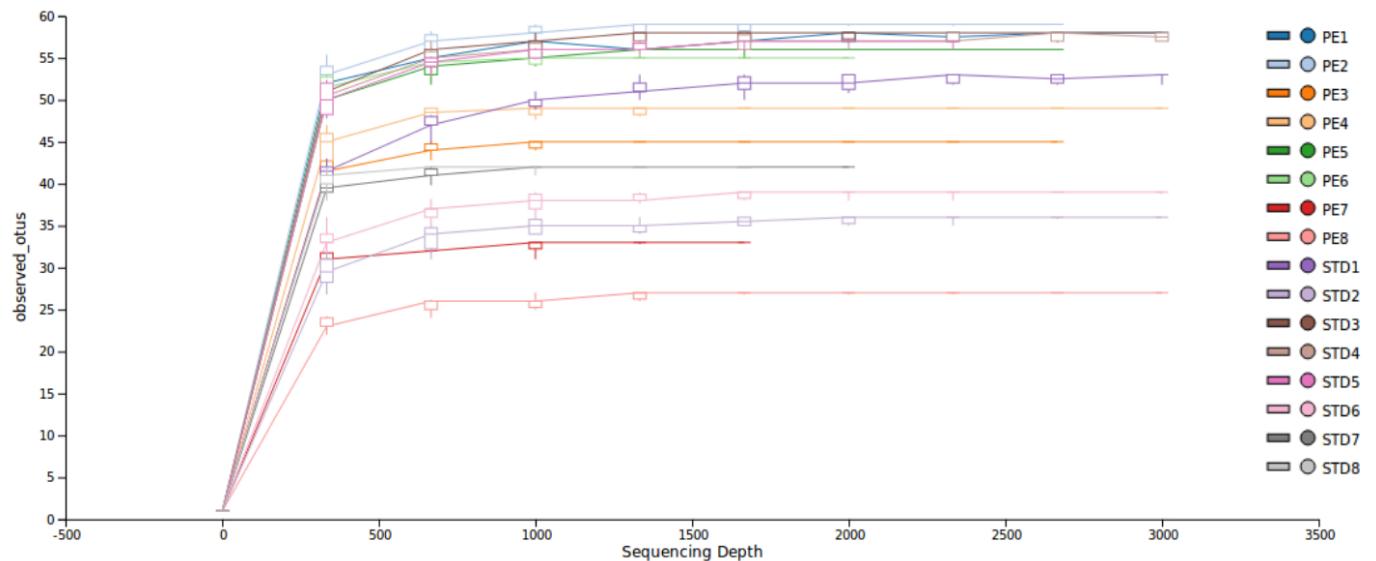


Figure 20 : Courbe de raréfaction des OTUs observés dans les échantillons de *Galleria mellonella* Figure 17 après avoir filtré les OTUs présents dans un seul échantillon (la courbe est représentée jusqu'à 3000 séquences pour plus de clarté).

A l'instar de la première courbe de raréfaction (Figure 14), les échantillons voient leur maximum d'OTUs observé à partir de 900 séquences, sauf pour l'échantillon STD1 (Figure 20, courbe mauve) qui progresse légèrement. L'asymptote des courbes justifie que la diversité des OTUs est bien représentée lors d'une profondeur supérieure à 900 séquences. L'échantillon PE7 (Figure 20, courbe rouge) représente le plus faible nombre de séquence (< 2000) et l'échantillon STD1 (Figure 20, courbe mauve) obtient un maximum 7353 séquences. Le nombre d'OTUs observés varie entre 26 pour PE8 (Figure 20, courbe saumon) et 59 pour PE2 (Figure 20, courbe bleu clair). Ceci souligne à nouveau une certaine variabilité entre les échantillons. Il est à souligner que le nombre de reads présents après les étapes de filtrage n'est pas nécessairement explicatif d'une grande diversité observée au sein de l'échantillon. Ceci s'observe par les échantillons STD2 (Figure 20, courbe mauve) et STD6 (Figure 20, courbe rose) qui ont un nombre de reads supérieur à 2500 et moins de 40 OTUs observés.

- Analyse de la diversité alpha

L'indice de Shannon, la diversité phylogénétique de Faith ainsi que l'indice de Pielou sont repris à la Figure 21 et le Tableau 6.

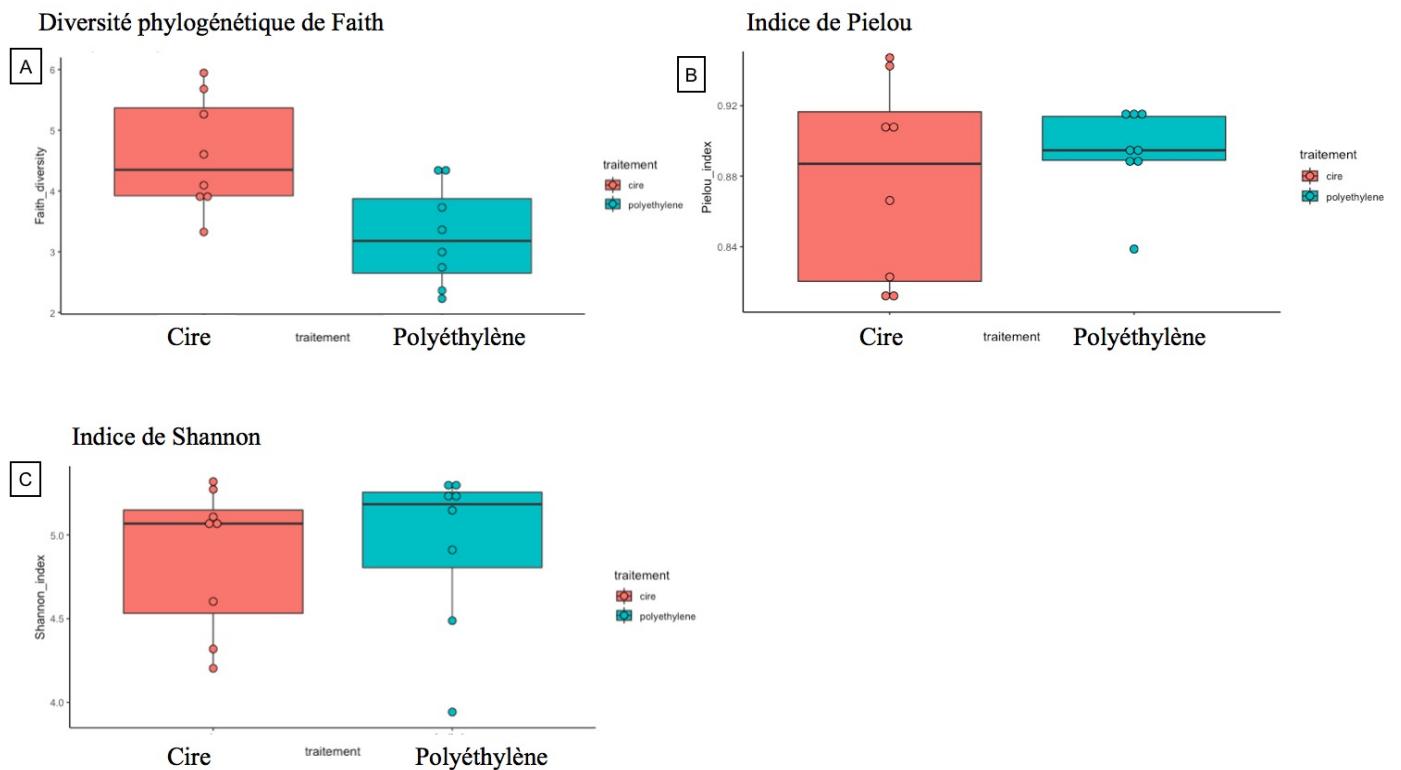


Figure 21 : alpha diversité du microbiome de tubes digestifs de *Galleria mellonella* nourri avec la diète à base de cire ou de polyéthylène (A. Diversité de Faith , B. indice d'équitableté de Pielou, C. Indice de Shannon).

L'indice de Pielou est égal à $0,88 \pm 0,05$ et $0,89 \pm 0,02$ pour la diète standard et polyéthylène. Ceci indique que la répartition des abondances est fort régulière au niveau des OTUs. Ceci bien que contradictoire de prime abord avec la répartition taxonomique majoritaire des Enterococci et de la famille Oxalobacteraceae, ce qui est en accord avec le répartition des abondances en prenant en compte l'assignation complète des OTUs après avoir filtré et normalisé la table. La distribution des indices de Pielou est tout de même plus variable au niveau de la diète standard. L'indice de Shannon est assez semblable pour l'ensemble des échantillons. Un indice de 5 et plus représente une richesse importante au sein d'une communauté (Peet, 1974). Les échantillons de diète standard ont un indice de $4,87 \pm 0,41$ alors qu'il est de $4,94 \pm 0,46$ pour le polyéthylène. L'échantillon PE8 (minimum PE) est relativement bas ($H' = 3,9$) comparé au reste des échantillons. Ceci est constaté également au niveau du nombre d'OTUs observés dans la courbe de raréfaction. La diversité phylogénétique de Faith est inférieure en moyenne pour la diète de polyéthylène ($PD=3,26 \pm 0,77$) comparé à la diète standard ($PD= 4,59 \pm 0,88$).

Les différents indices de diversité alpha sélectionnés sont repris sous forme de moyenne dans le Tableau 6. Les tests statistiques paramétriques t de student sont appliqués si les conditions d'application sont

respectées (indépendance, normalité et même variance des populations parents). Un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney est appliqué sinon.

*Tableau 6 : Moyenne des différents indices de diversité alpha pour les microbiomes de tubes digestifs de *Galleria mellonella* nourris avec l'une des deux diètes et tests statistiques associés ($\alpha=0,05$), NS : non significatif.*

	Pielou	Diversité Faith	OTU_observés	Shannon
Diète STD	$0,88 \pm 0,05$	$4,59 \pm 0,88$	48 ± 8	$4,87 \pm 0,41$
Diète PE	$0,89 \pm 0,02$	$3,26 \pm 0,77$	48 ± 11	$4,94 \pm 0,46$
t-student	/	p=0,010	NS	/
Mann-Whitney	NS	/	/	NS

La richesse du microbiome peut être représentée par le nombre d'OTUs observés. La moyenne de celui-ci est de 48 ± 8 et 48 ± 11 OTUs pour la diète standard et polyéthylène. Le nombre d'OTUs est similaire aux études portant sur le microbiome du tube digestif des larves de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Chen *et al.*, 2016) ou encore *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Li *et al.*, 2017). Il est cependant nettement inférieur à ceux de *P. interpunctella* (392) (Mereghetti *et al.*, 2017). Cette différence est sûrement accentuée par le filtre appliqué lors de la raréfaction, cette étape ayant divisé le nombre d'OTUs totaux observés par dix. Au niveau de l'indice de Shannon, il est élevé (proche de 5) ce qui est particulièrement diversifié comparé aux études portant sur le tube digestif de différentes larves de Lépidoptères (Chen *et al.*, 2016; Mereghetti *et al.*, 2017). Il n'y a pas de différence significative au niveau de l'indice de Shannon pour le test non-paramétrique. Cependant, la diversité de Faith est significativement supérieure pour la diète standard. Il y a donc une réduction de la diversité phylogénétique lors de la consommation de polyéthylène par les larves de *G. mellonella*. Cette diminution pourrait être due au polyéthylène ajouté agissant comme un filtre environnemental sur le microbiome du tube digestif de *G. mellonella*. Pour un même nombre d'OTUs, la diète de polyéthylène pourrait favoriser les bactéries phylogénétiquement proche ce qui se traduirait par une diminution de la diversité phylogénétique de Faith. Il a été montré par Muegge et collègues (2011) que la diète d'un individu peut influencer les fonctions présentes au sein du microbiome du tube digestif. Notre résultat confirme l'importance de prendre en complémentarité les diversités classiques avec celle incluant le facteur phylogénétique afin d'étudier les communautés bactériennes d'un microbiome.

- Analyse de la diversité bêta

La Figure 22 reprend l'ordination par positionnement multidimensionnel non métrique sur base de la matrice des distances de Bray-Curtis.

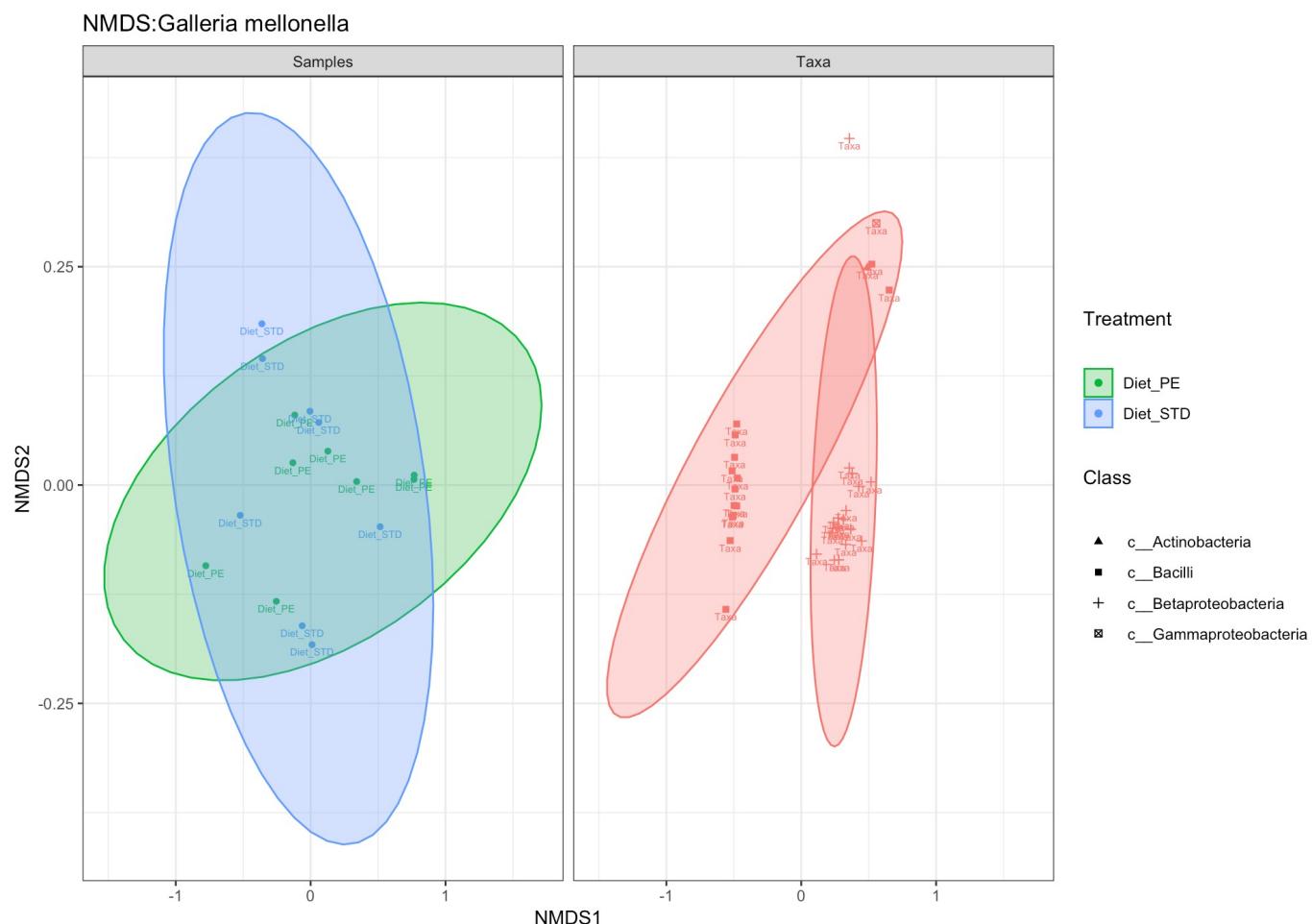


Figure 22 : Positionnement multidimensionnel non métrique (NMDS) comparant les communautés bactériennes provenant d'échantillons de *G. mellonella* à partir des indices de Bray-Curtis. Les taxa sont filtrés afin de garder les OTUs présents plus de 5 fois dans la moitié des échantillons. Les ellipses présentent un intervalle de confiance de 95%.

L'axe vertical prend une part importante dans l'explication des échantillons de la diète standard. La diète polyéthylène est plus concentrée au centre de l'ordination. Il semble que les communautés ont tendance à être moins similaires lorsque la diète est standard vu l'éloignement des points. La présence de polyéthylène dans la diète semble réduire les distances entre communautés. Ceci pourrait s'expliquer par une sélection occasionnée par le polyéthylène au sein des communautés microbiennes qui diminuerait les dissimilarités entre individus. Un cluster d'échantillons de la diète polyéthylène est visible au centre de l'ellipse verte alors que deux échantillons sont éloignés. Les Betaproteobacteria forment également un

cluster dans cette zone et pourraient prendre une part non négligeable à l'explication de la variabilité expliquée.

Afin de vérifier la fiabilité de la représentation, le diagramme de Shepard est repris à la Figure 23.

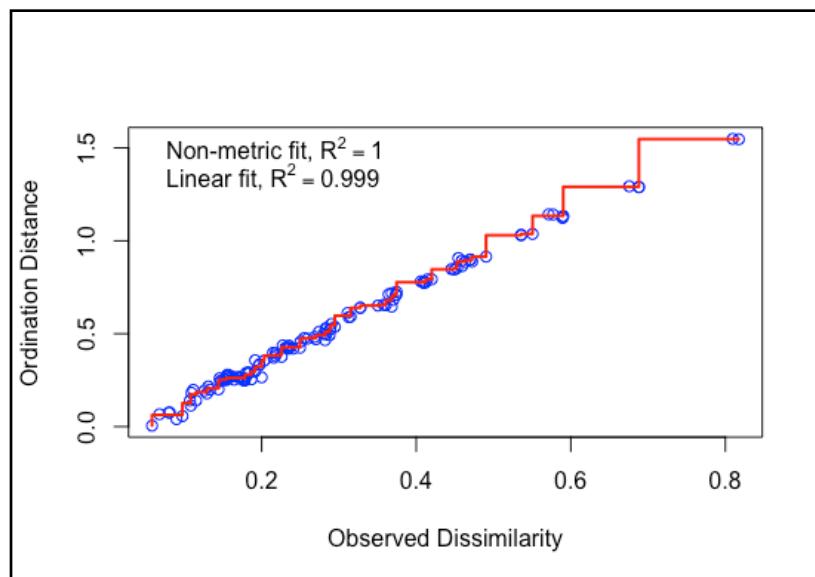


Figure 23 : Diagramme de Shepard : Distance de l'ordination en fonction de la dissimilarité observée pour l'ordination NMDS à partir de la matrice de distance de Bray-Curtis.

Les points représentés sont alignés sur une droite monotone dans le diagramme de Shepard. Ceci confirme une bonne fiabilité au niveau de la représentation en deux dimensions. De plus, le coefficient de régression (R^2) est de 1 pour la relation non métrique et de 0,999 pour la relation linéaire. Il est donc raisonnable d'utiliser les classes des différents OTUs présents au sein des communautés afin d'identifier les dissimilarités présentes.

Il n'a pas été possible de mettre en avant une différence significative (pseudo $F=0,88$, p-valeur = 0.368) entre les deux diètes lors de l'analyse par Permanova des distances de Bray-Curtis.

Au vu des différences significatives au niveau de la diversité phylogénétique de Faith, il est nécessaire de réaliser une étude de la diversité bêta en intégrant le facteur phylogénétique. La méthode des distances UniFrac (« unweighted ») permet de comparer les échantillons en prenant cette information en compte. Les dissimilarités de branches et les similarités sont comptabilisées afin d'obtenir une distance finale. L'analyse en composante principale (ACP) permettant de visualiser les distances UniFrac est reprise en Annexe 7.6. La Permanova permet de tester la distance UniFrac entre les deux traitements. Cette distance

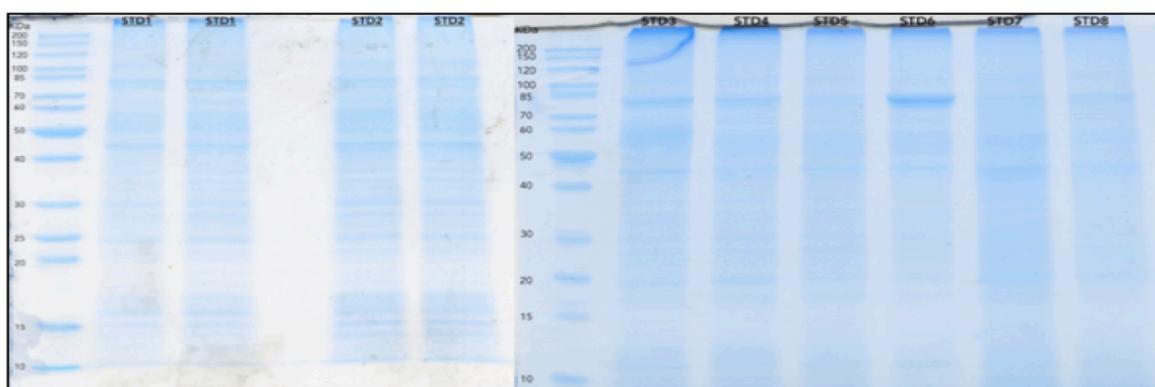
est significativement différente (pseudo $F=2.7$, p -valeur = 0.037). Ceci confirme la réduction de dissimilarité déjà visible au niveau du NMDS. Les individus de la diète polyéthylène sont plus proches entre eux qu'avec les individus de la diète standard. A nouveau, ce résultat conforte l'intégration du facteur phylogénétique dans l'étude de la diversité bêta des communautés microbiennes.

4.3. Métaprotéomique

4.1.6. Migration des protéines extraites

Afin de vérifier la diversité de protéines extraites à l'aide du kit ALLprep (Qiagen), il a été nécessaire de réaliser un SDS-PAGE (Figure 24). Ce « check-point » est utile avant l'analyse d'un échantillon par LC-MS/MS afin de vérifier qu'il n'y a pas un spot unique correspondant à une extraction trop ciblée.

STD



PE

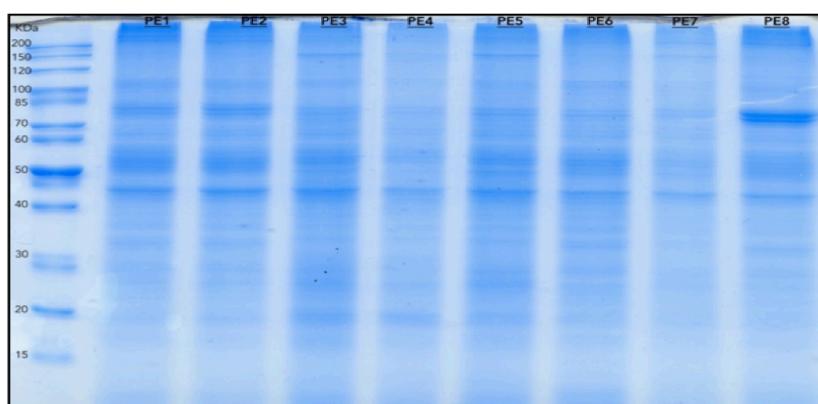


Figure 24 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des échantillons des tubes digestifs des larves de *G. mellonella*, STD = diète standard (haut) PE : diète polyéthylène (bas).

Le nombre de bandes visibles sur les gels permet de rassurer sur l'étape d'extraction des protéines. Cependant, aucune conclusion hâtive ne doit être prise concernant les différentes bandes ainsi que leur poids.

4.1.7. Identification des protéines par LC-MS/MS

Au vu du manque de temps pour traiter les données relatives à la métaprotéomique, les résultats ne sont pas disponibles à ce jour. Ceux-ci devront confirmer la variété taxonomique observée au sein du microbiome. De plus, les protéines présentent au sein de ces échantillons pourront être identifiées. De ce fait, le rôle du microbiome dans la relation symbiotique pourra être approfondi. De même, le rôle du microbiome dans la dégradation du plastique pourra être étudié.

5. Conclusions et perspectives

Le présent travail a permis de mettre au point une diète intégrant du polyéthylène à destination des larves de *G. mellonella*. De plus, l'étude de la composition du microbiome du tube digestif de *G. mellonella* a été possible par séquençage du gène codant l'ARNr 16s. Il est dès lors possible de dire que les familles des Enterococcaceae, des Oxalobacteraceae et des Comamonadaceae représentent à elles trois plus de la moitié de l'abondance des communautés microbiennes. La diversité élevée que représente le tube digestif de *G. mellonella* a été démontrée par les différents indices de diversité alpha. Ce premier volet permet de répondre au premier objectif concernant l'étude du microbiome du tube digestif de *Galleria mellonella*.

Deuxièmement, l'intégration de polyéthylène au sein de la diète spécifique mise au point permet de répondre à la question de l'effet du plastique sur ces communautés microbiennes. Les résultats montrent l'importance de prendre en compte les aspects phylogénétiques et classiques de la diversité afin d'étudier le microbiome. Il est apparu dans ce travail que la diversité phylogénétique de Faith est réduite de façon significative lors de l'incorporation de polyéthylène dans une diète standard de cire d'abeille. De même, la distance UniFrac (« unweighted ») est significativement associée à la diète. Il est donc possible que le polyéthylène ait agi en tant que filtre environnemental au sein du tube digestif en favorisant des OTUs proches d'un point de vue phylogénétique.

Ensuite, l'étude du rôle du microbiome dans la dégradation de polyéthylène a été amorcée par l'étude différentielle des abondances relatives en fonction de la diète. Celle-ci identifie les genres *Citrobacter* et *Corynebacterium* comme significativement associés à la diète contenant du polyéthylène. Cet objectif devra donc être complété par les résultats du volet protéomique qui n'a pu être finalisé endéans la durée du travail. Les résultats pourront confirmer la composition taxonomique obtenue par séquençage du gène codant l'ARNr 16s. De plus, ils permettront d'obtenir les fonctions enzymatiques présentes au sein du tube digestif de *G. mellonella*, d'identifier les potentielles enzymes impliquées dans la dégradation de polyéthylène et de leur assigner une parenté.

Il est nécessaire de prendre en compte les différents aspects optimisables de cette étude ayant fondé une base pour le futur. La diète de plastique est à améliorer afin de connaître la consommation spécifique de plastique par individu. Il serait également utile de mettre en place les unités expérimentales en

prélevant une quantité d'œufs pour synchroniser parfaitement les traitements. A l'avenir, l'étude du microbiome du tube digestif des insectes reste une source indéniable d'informations à exploiter. La mise en place de cultures bactériennes de *Citrobacter* et *Corynebacterium* permettrait d'identifier leur potentiel de dégradation. Finalement, un suivi des modifications physico-chimiques des polymères au sein des fèces pourra caractériser le degré de dégradation. L'utilisation de polyéthylène marqué au carbone 13 permettrait un suivi d'une métabolisation possible.

Pour conclure, les résultats obtenus ouvrent une large gamme de perspectives d'études afin de répondre à l'objectif global d'identifier des voies de biodégradation efficaces pour la gestion des déchets plastiques.

6. Bibliographie

- Abraham J, Ghosh E, Prantik Mukherjee, Gajendiran Anudurga (2016) Microbial Degradation of Low Density Polyethylene. *Environmental science & technology*, **33**, 482–489.
- Akman Gunduz E, Douglas A. (2009) Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 987–991.
- Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T (1998) Purification and Properties of a Polyester Polyurethane-Degrading Enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 62–67.
- Albertsson A (1980) the Shape of the Biodegradation Curve for low and high density polyethylenes in prolonged series of experiments. *Polymer*, **16**.
- Almeida A, Mitchell AL, Tarkowska A, Finn RD (2018) Benchmarking taxonomic assignments based on 16S rRNA gene profiling of the microbiota from commonly sampled environments. *GigaScience*, **7**, 1–10.
- Alshehrei F (2017) Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, **5**, 8–19.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, **26**, 32–46.
- Azeko ST, Etuk-Udo GA, Odusanya OS, Malatesta K, Anuku N, Soboyejo WO (2015) Biodegradation of Linear Low Density Polyethylene by *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* and its Cell Free Extracts. *Waste and Biomass Valorization*, **6**, 1047–1057.
- Balasubramanian V, Natarajan K, Hemambika B, Ramesh N, Sumathi CS, Kottaimuthu R, Rajesh Kannan V (2010) High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Letters in Applied Microbiology*, **51**, 205–211.
- Bauwens J (2014) Proteomics as a tool to investigate symbiotic interactions in lower termite gut. 257.
- Bauwens J, Millet C, Tarayre C et al. (2013) Symbiont diversity in *Reticulitermes santonensis* (Isoptera: Rhinotermitidae): investigation strategy through proteomics. *Environmental Entomology*, **42**, 882–887.
- Berasategui A, Axelsson K, Nordlander G et al. (2016) The gut microbiota of the pine weevil is similar across Europe and resembles that of other conifer-feeding beetles. *Molecular ecology*, **25**, 4014–4031.
- Berasategui A, Salem H, Paetz C, Santoro M, Gershenson J, Kaltenpoth M, Schmidt A (2017) Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness. *Molecular Ecology*, **26**, 4099–4110.
- Bhatia M, Girdhar A, Tiwari A, Nayarissery A (2014) Implications of a novel *Pseudomonas* species on low density polyethylene biodegradation : an in vitro to in silico approach. **3**, 1–10.
- Boesenbergs-Smith KA, Pessarakli MM, Wolk DM (2012) Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, **34**, 1–6.
- Bokulich NA, Dillon M (2018) microbiome classification and regression tools for. **5485**.
- Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F (2017) Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology*, **27**, R292–R293.
- Bonhomme S, Cuer A, Delort AM, Lemaire J, Sancelme M, Scott G (2003) Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, **81**, 441–452.
- Brandon AM, Shu-Hong G, Renmao T et al. (2018) Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, **13**, 581–583.
- Carlier L (2018) *Microbial degradation of plastic : Comparison of synthetic and natural communities*.
- Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE et al. (2011) Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS ONE*, **6**.
- Castelino M, Eyre S, Moat J et al. (2017) Optimisation of methods for bacterial skin microbiome investigation: Primer selection and comparison of the 454 versus MiSeq platform. *BMC Microbiology*, **17**, 1–12.
- Chatterjee S, Roy B, Roy D, Banerjee R (2010) Enzyme-mediated biodegradation of heat treated commercial polyethylene by Staphylococcal species. *Polymer Degradation and Stability*, **95**, 195–200.
- Chauvin G (1985) the Influence of Relative Humidity on Larval Development and Energy Content of *Galleria* (L.) (Lepidoptera : Pyralidae). **21**.
- Chen B, Teh BS, Sun C, Hu S, Lu X, Boland W, Shao Y (2016) Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across

- the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, **6**, 1–14.
- Chen W, Simpson J, Levesque CA (2018) Package 'RAM'.
- Chew YM, Lye S, Salleh M, Yahya A (2018) 16S rRNA metagenomic analysis of the symbiotic community structures of bacteria in foregut, midgut, and hindgut of the wood-feeding termite *Bulbitermes* sp. *Symbiosis*.
- Chung J, Jeong H, Ryu C (2018) crossm Complete Genome Sequences of Enterobacter cancerogenus. 1–2.
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, **26**, 1367–1372.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V, Mann M (2011) Andromeda : A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. 1794–1805.
- Cruaud P, Vigneron A, Lucchetti-Miganeh C, Ciron PE, Godfroy A, Cambon-Bonavita MA (2014) Influence of DNA extraction method, 16S rRNA targeted hypervariable regions, and sample origin on microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 4626–4639.
- Cymborowski B (2000) Temperature-dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (*Galleria mellonella*). *Acta Biochimica Polonica*, **47**, 215–221.
- Dai J, Li Y, Yang P et al. (2018) Citric acid as a functional supplement in diets for juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.: Effects on phosphorus discharge, growth performance, and intestinal health. *Aquaculture*, **495**, #pagerange#.
- Delalibera I, Handelsman J, Raffa KF (2005) Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, **34**, 541–547.
- Dillon RJ, Dillon VM (2004) THE GUT BACTERIA OF INSECTS: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, **49**, 71–92.
- Domingo J. WS (1998) Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets - SANTO DOMINGO - 1998 - Molecular Ecology - Wiley Online Library. 761–767.
- Duddu M kumar, Kalyani LT, Girijasankar G, Dandu SD (2015) Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by a new biosurfactant-producing thermophilic *Streptomyces coelicoflavus* NBRC 15399T. *African Journal of Biotechnology*, **14**, 327–340.
- Ellis JD, Graham JR, Mortensen A (2013) Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–17.
- Engel P, Moran NA (2013) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 699–735.
- Esmaeili A, Pourbabae AA, Alikhani HA, Shabani F, Esmaeili E (2013) Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *PLoS ONE*, **8**.
- Fedhila S, Buisson C, Dussurget O et al. (2010) Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, 24–29.
- Fei C, Lu X, Qian Y, Zhang H, Mahmood Q (2006) Identification of *Enterococcus* sp. from midgut of silkworm based on biochemical and 16S rDNA sequencing analysis. *Annals of Microbiology*, **56**, 201–205.
- Gilan I, Hadar Y, Sivan A (2004) Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**, 97–104.
- Glèlè Kakaï R, Salako VK PE (2016) Méthodes statistiques multivariées utilisées en écologie. *Annales des Sciences Agronomiques*, **20**, 139–157.
- Goldfarb KC, Karaoz U, Hanson CA et al. (2011) Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Frontiers in Microbiology*, **2**, 1–10.
- Greengenes DC (2018) Greengene data base, [base,ftp://greengenes.microbio.me/greengenes_release/gg_13_5/gg_13_8_ottus.tar.gz](http://greengenes.microbio.me/greengenes_release/gg_13_5/gg_13_8_ottus.tar.gz), consulté le 27/05/2018.
- Gu JD (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **52**, 69–91.
- Gyung Yoon M, Jeong Jeon H, Nam Kim M (2012) Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, **03**.
- Hadad D, Geresh S, Sivan A (2005) Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus*

- borstelensis. *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 1093–1100.
- Hakkarainen M, Albertsson A-C (2004) Environmental Degradation of Polyethylene. 177–200.
- Hammer TJ, Dickerson JC, Fierer N (2015) Evidence-based recommendations on storing and handling specimens for analyses of insect microbiota. *PeerJ*, **3**, e1190.
- Han X, Liu W, Huang JW et al. (2017) Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, **8**.
- Hanumanthaswamy B (2013) Influence of temperature and relative humidity on development of greater wax moth *Galleria mellonella* L.(Pyralidae: Lepidoptera). *Current Biotica*, **7**, 202–208.
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies a laboratory manual*, Vol. 1. 726 pp.
- Harshvardhan K, Jha B (2013) Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Marine Pollution Bulletin*, **77**, 100–106.
- Hochberg YB and Y (1995) Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple. *Journal of the Royal Statistical Society*, **57**, 289–300.
- Huerta Lwanga E, Thapa B, Yang X, Gertsen H, Salánki T, Geissen V, Garbeva P (2018) Decay of low-density polyethylene by bacteria extracted from earthworm's guts: A potential for soil restoration. *Science of the Total Environment*, **624**, 753–757.
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C et al. (2015) Plastic waste inputs from land into the ocean.
- Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 2761–2764.
- Johnston PR, Rolff J (2015) Host and Symbiont Jointly Control Gut Microbiota during Complete Metamorphosis. *PLoS Pathogens*, **11**, 1–11.
- Joo S, Cho IJ, Seo H et al. (2018) Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, **9**, 382.
- Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, Junqueira JC (2017) From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*, **5594**, 00–00.
- Karlsson S, Ljungquist O, Albertsson AC (1988) Biodegradation of polyethylene and the influence of surfactants. *Polymer Degradation and Stability*, **21**, 237–250.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772–780.
- Kawai F (2004) Comparative biodegradation of HDPE and LDPE using an indigenously developed microbial consortium. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 477–482.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, **41**, 1–11.
- Kong S, Application F, Data P (2017) United States Patent. **2**, 12–15.
- Koutny M, Lemaire J, Delort AM (2006) Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere*, **64**, 1243–1252.
- Koutny M, Amato P, Muchova M, Ruzicka J, Delort AM (2009) Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **63**, 354–357.
- Kramps IA, Kecko S, Jögers P et al. (2017) Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae. *The Journal of Experimental Biology*, *jeb.169227*.
- Kwadha CA, Ong'Amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT (2017) The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, **8**, 1–17.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS (2014) Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, 1–56.
- Li WC, Tse HF, Fok L (2016) Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, **566–567**, 333–349.
- Li W, Jin D, Shi C, Li F (2017) Midgut bacteria in deltamethrin-resistant, deltamethrin-susceptible, and field-caught populations of *Plutella xylostella*, and phenomics of the predominant midgut bacterium *Enterococcus mundtii*. *Scientific Reports*, **7**, 1–13.
- Liang X, Sun C, Chen B et al. (2018) Insect symbionts as valuable grist for the biotechnological mill : an alkaliphilic

- silkworm gut bacterium for efficient lactic acid production.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**, 1–21.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R (2011) UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal*, **5**, 169–172.
- Mahdiyah D, Mukti BH (2013) Isolation of Polyethylene Plastic Degrading Bacteria. *Biosciences International*, **2**, 29–32.
- Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD (2015) Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health & Disease*, **26**, 1–7.
- Maness PC, Smolinski S, Dillon AC, Heben MJ, Weaver PF (2002) Characterization of the oxygen tolerance of a hydrogenase linked to a carbon monoxide oxidation pathway in *Rubrivivax gelatinosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2633–2636.
- Manzur A, Limón-González M, Favela-Torres E (2004) Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, **92**, 265–271.
- Marcon E (2017) *Mesure de la biodiversité Mesures de la Biodiversité*. Master. Kourou, France.
- Maron PA, Ranjard L, Mougel C, Lemanceau P (2007) Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology. *Microbial Ecology*, **53**, 486–493.
- Mathieson W, Thomas GA (2013) Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein using kits: Is sample quantity or quality prejudiced? *Analytical Biochemistry*, **433**, 10–18.
- McMurdie PJ (2018) Tutorial_Phyloseq, https://joey711.github.io/phyloseq/plot_ordination-examples.html, consulté le 10/08/2018.
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, **8**.
- McMurdie PJ, Holmes S (2014) Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, **10**.
- Mee BC, Carroll P, Donatello S et al. (2011) Maintaining Breast Cancer Specimen Integrity and Individual or Simultaneous Extraction of Quality DNA, RNA, and Proteins from Allprotect-Stabilized and Nonstabilized Tissue Samples. *Biopreservation and Biobanking*, **9**, 389–398.
- Mereghetti V, Chouaia B, Limonta L, Locatelli DP, Montagna M (2017) Evidence for a conserved microbiota across the different developmental stages of *Plodia interpunctella*. *Insect Science*, 1–13.
- Metwally HMS, Hafez GA, Hussein MA, Hussein MA, Salem HA, Saleh MME (2012) Low Cost Artificial Diet for Rearing the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) as a Host for Entomopathogenic Nematodes. *22*, 4–9.
- Morton JT, Sanders J, Quinn RA, McDonald D, Gonzalez A, Vázquez-baeza Y, Navas-molina JA (2017) Balance Trees Reveal Microbial Niche Differentiation. *2*, 1–11.
- Muegge BD, Kuczynski J, Knights D et al. (2011) Diet Drives Convergence in Gut Microbiome Functions Across Mammalian Phylogeny and Within Humans. *Science*, **332**, 970–974.
- Mueller RJ (2006) Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, **41**, 2124–2128.
- Muturi EJ, Bara JJ, Rooney AP, Hansen AK (2016) Midgut fungal and bacterial microbiota of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* shift in response to La Crosse virus infection. *Molecular ecology*, **25**, 4075–4090.
- Nanodrop (2018) Nanodrop technical support information.
- Nowak B, Pajak J, Drozd-Bratkowicz M, Rymarz G (2011) Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **65**, 757–767.
- Nowak B, Pajak J, Karcz J (2012) Biodegradation of Pre-Aged Modified Polyethylene Films. *Scanning Electron Microscopy*, 643–670.
- O'Connell L, Gao S, McCorquodale D, Fleisher J, Lopez JV (2018) Fine grained compositional analysis of Port Everglades Inlet microbiome using high throughput DNA sequencing. *PeerJ*, **2018**, 1–21.
- Ojha N, Pradhan N, Singh S et al. (2017) Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, **7**, 1–13.
- Oksanen AJ, Blanchet FG, Kindt R et al. (2013) Package 'vegan' version 2.5-2.

- Paço A, Duarte K, da Costa JP et al. (2017) Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus Zalerion maritimum. *Science of the Total Environment*, **586**, 10–15.
- Peet RK (1974) The Measurement of Species Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **5**, 285–307.
- Peña-Llopis S, Brugarolas J (2013) Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications. *Nature Protocols*, **8**, 2240–2255.
- PlasticsEurope (2017) Plastics – the Facts 2017.
- Pometto a L, Lee BT, Johnson KE (1992) Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme (s) by Streptomyces species. *Applied and environmental microbiology*, **58**, 3–6.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, **5**.
- Qiagen (2014) For simultaneous purification of genomic DNA , Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies.
- QIIME2_Team (2018a) QIIME2 logiciel, <https://docs.qiime2.org/2018.4/>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018b) QIIME2 workflow, <https://docs.qiime2.org/2018.6/tutorials/overview/>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018c) QIIME2 demux summarize, <https://github.com/qiime2/q2-demux>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018d) QIIME2 dada2, plug-in, <http://benjjneb.github.io/dada2/>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018e) QIIME2 filter-features, <https://github.com/qiime2/q2-feature-table>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018f) QIIME2 taxa-filter, <https://github.com/qiime2/q2-taxa>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018g) QIIME2 MASK alignment, <https://github.com/qiime2/q2-alignment>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018h) QIIME2 Phylogeny, <https://github.com/qiime2/q2-phylogeny>, consulté le 27/05/2018.
- QIIME2_Team (2018i) QIIME2 diversity, <https://github.com/qiime2/q2-diversity>, consulté le 27/05/2018.
- R. Pramila (2011) Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water– a SEM analysis. *African Journal of Microbiology Research*, **5**, 131–136.
- Rajandas H, Parimannan S, Sathasivam K, Ravichandran M, Su Yin L (2012) A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing*, **31**, 1094–1099.
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D (2012) The Insect Galleria mellonella as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, 1–7.
- Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR (2014) Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **88**, 83–90.
- Riudavets J, Salas I, Pons MJ (2007) Damage characteristics produced by insect pests in packaging film. *Journal of Stored Products Research*, **43**, 564–570.
- Roume H, El Muller E, Cordes T, Renaut J, Hiller K, Wilmes P (2013) A biomolecular isolation framework for ecosystems biology. *ISME Journal*, **7**, 110–121.
- Roy PK, Titus S, Surekha P, Tulsi E, Deshmukh C, Rajagopal C (2008) Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability*, **93**, 1917–1922.
- Salako VK, Adebanji A, Kakai RLG (2013) On the empirical performance of non-metric multidimensional scaling in vegetation studies. *International Journal of Applied Mathematics and Statistics*, **36**, 54–67.
- Sangeetha Devi R, Rajesh Kannan V, Nivas D, Kannan K, Chandru S, Robert Antony A (2015) Biodegradation of HDPE by Aspergillus spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Marine Pollution Bulletin*, **96**, 32–40.
- Santo M, Weitsman R, Sivan A (2012) The role of the copper-binding enzyme - laccase - in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete Rhodococcus ruber. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **84**, 204–210.
- Satlewal A, Soni R, Zaidi M, Shouche Y, Goel R (2008) Comparative biodegradation of HDPE and LDPE using an indigenously developed microbial consortium. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 477–482.
- Sekhar VC, Nampoothiri KM, Mohan AJ, Nair NR, Bhaskar T, Pandey A (2016) Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. *Journal of Hazardous Materials*, **318**, 347–354.
- Seneviratne G, Tennakoon NS, Nandasena KA, Weerasekarak MLMAW (2006) Polyethylene biodegradation by a developed Penicillium – Bacillus biofilm. *Current Science*, **90**, 99–101.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review.

- Biotechnology Advances*, **26**, 246–265.
- Shah N, Tang H, Doak TG, Ye Y (2011) Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Pac Symp Biocomput*, 165–176.
- SHAIK HA, MISHRA A, SEHNAL F (2017) Silk recycling in larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology*, **114**, 61–65.
- Shao Y, Arias-Cordero EM, Boland W (2013) Identification of Metabolically Active Bacteria in the Gut of the Generalist *Spodoptera littoralis* via DNA Stable Isotope Probing Using ¹³C-Glucose. *Journal of Visualized Experiments*, 1–8.
- Shevchenko A, De Sousa MML, Waridel P, Bittencourt ST, De Sousa MV, Shevchenko A (2005) Sequence similarity-based proteomics in insects: Characterization of the larvae venom of the Brazilian moth *Cerodirphia speciosa*. *Journal of Proteome Research*, **4**, 862–869.
- Shi W, Syrenne R, Sun JZ, Yuan JS (2010) Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the “omics” age. *Insect Science*, **17**, 199–219.
- Shi W, Uzuner U, Huang L, Jesudhasan P (2011) Comparative analysis of insect gut symbionts for composition-function relationships and biofuel application potential. *Biofuels*.
- Shimanuki H (1981) *Controlling the GreaterWax Moth: A Pest of Honeycombs*; , 1981; Volume 2217, pp. 1–13, Vol. 2217. Science and Education Administration US: United States Department of Agriculture, Washington, DC, USA, 1-13 pp.
- Shimao M (2001) Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 242–247.
- Skariyachan S, Manjunatha V, Sultana S, Jois C, Bai V, Vasist KS (2016) Novel bacterial consortia isolated from plastic garbage processing areas demonstrated enhanced degradation for low density polyethylene. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 18307–18319.
- Skariyachan S, Setlur AS, Naik SY, Naik AA, Usharani M, Vasist KS (2017) Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, **24**, 8443–8457.
- Skariyachan S, Patil AA, Shankar A, Manjunath M, Bachappanavar N, Kiran S (2018) Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polymer Degradation and Stability*, **149**, 52–68.
- Sowmya H, Ramalingappa M, Krishnappa M (2012) Degradation of polyethylene by *Chaetomium* sp. and *Aspergillus* favus. *Interantional Journal of Recent Scientific Research*, **3**, 513–517.
- Spiteller D, Dettner K, Boland W (2000) Gut bacteria may be involved in interactions between plant, herbivores and their predators ... (1). *Biol. Chem.*, **381**, 755–762.
- Stefanini I (2018) Yeast-insect associations: it takes guts. *Yeast*.
- Sudhakar M, Doble M, Murthy PS, Venkatesan R (2008) Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *International Biodegradation and Biodegradation*, **61**, 203–213.
- Tanca A, Manghina V, Fraumene C et al. (2017) Metaproteogenomics reveals taxonomic and functional changes between cecal and fecal microbiota in mouse. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 391.
- Tang X, Freitak D, Vogel H et al. (2012) Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PLoS ONE*, **7**, 1–9.
- Tomoko W, Ohtake Y, Asabe H, Murakami N, Furukawa M (2009) Biodegradability and Degrading Microbes of Low-Density Polyethylene. *Polymers and Polymer Composites*, **21**, 449–456.
- Tribedi P, Sil AK (2013) Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**, 4146–4153.
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P et al. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (proto)omics data. *Nature Methods*, **13**, 731–740.
- Uwo MF, Ui-Tei K, Park P, Takeda M (2002) Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research*, **308**, 319–331.
- Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M (2016) The generalist inside the specialist: Gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1–8.
- Volke-Sepúlveda T, Saucedo-Castañeda G, Gutiérrez-Rojas M, Manzur A, Favela-Torres E (2002) Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *Journal of Applied*

- Polymer Science*, **83**, 305–314.
- Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kasai H (2007) Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 1846–1850.
- Werner JJ, Koren O, Hugenholtz P et al. (2012) Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. *ISME Journal*, **6**, 94–103.
- Wickham H (2011) The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, **40**.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomcynski P (1997) Effect of pH and Ionic Strength on The Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Biotechniques*, **22**, 474–481.
- Wilkinson L (2009) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis by WICKHAM, H. *Biometrics*, **67**, 678–679.
- Willems A, Busse J, Goor M et al. (1989) Hydrogenophaga, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing Bacteria That Includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (Formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (Formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (Formerly *Pseudomonas pseudoflava*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**, 319–333.
- Xiao M, Yang J, Feng Y, Zhu Y, Chai X, Wang Y (2017) Metaproteomic strategies and applications for gut microbial research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 3077–3088.
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y (2001) Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer degradation and stability*, **72**, 323–327.
- Yang J, Yang Y, Wu WM, Zhao J, Jiang L (2014) Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science and Technology*, **48**, 13776–13784.
- Yang Y, Yang J, Wu WM et al. (2015) Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. *Environmental Science and Technology*, **49**, 12087–12093.
- Yang SS, Brandon AM, Andrew Flanagan JC et al. (2018) Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere*, **191**, 979–989.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E et al. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, **12**, 635–645.
- Yin C, Mueth N, Hulbert S et al. (2017) Bacterial Communities on Wheat Grown Under Long-Term Conventional Tillage and No-Till in the Pacific Northwest of the United States. *Phytobiomes*, **1**, 83–90.
- Yoshida S, Hiraga K, Takanaha T et al. (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly(ethyleneterephthalate). *Science*, **351**, 1196–1199.
- Young RG (1961) The Effects of Dietary Beeswax and Wax Components on the Larvae of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (L.). *Annals of the Entomological Society of America*, **54**, 657–659.

7. Annexes

7.1. Photographie des cadres d'élevage



7.2. Protocole du kit Allprep (Qiagen)

Step 1. And 2. Not described.

3. Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a QIAshredder homogenizer: Immediately place the weighed tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid- nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 7). Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Proceed to step 4.

4. Centrifuge the lysate for 3 min at full speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and transfer it to an AllPrep DNA spin column placed in a 2ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 30 s at 8000 x g (10,000 rpm).

In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present after the 3-min centrifugation, making the pellet invisible.

Note: Make sure that no liquid remains on the column membrane after centrifugation. If necessary, repeat the centrifugation until all liquid has passed through the membrane.

5. Place the AllPrep DNA spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and store at room temperature (15–25°C) or at 4°C for later DNA purification in steps 21–24. Use the flow-through for RNA purification in steps 6–13.

Note: Do not store the AllPrep DNA spin column at room temperature or at 4°C for long periods. Do not freeze the column.

6. To the flow-through from step 5, add 96–100% ethanol: either 250 µl (if 350 µl Buffer RLT was used) or 430 µl (if 600 µl Buffer RLT was used). Mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 7.

If some lysate was lost during homogenization and DNA binding to the AllPrep DNA spin column, adjust the volume of ethanol accordingly.

Note: Precipitates may be visible after addition of ethanol, but this does not affect the procedure.

Tissues AllPrep

7. Transfer up to 700 µl of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ?8000 x g (?10,000 rpm). Transfer the flow-through* to a 2 ml tube (supplied) for protein purification in steps 14–20. Reuse the collection tube in step 8.

If the sample volume exceeds 700 µl, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Transfer the flow-through after each centrifugation to the 2 ml tube.

Total protein precipitation

14. Add 1 volume (usually 600 µl or 1000 µl) of Buffer APP to the flow-through from step 7. Mix vigorously and incubate at room temperature for 10 min to precipitate protein.

15. Centrifuge at full speed for 10 min, and carefully decant the supernatant. *
16. Add 500 μ l of 70% ethanol to the protein pellet. Centrifuge at full speed for 1 min, and remove the supernatant by using a pipet or by decanting as much liquid as possible.

It is not necessary to resuspend or incubate the pellet.

17. Dry the protein pellet for 5–10 min at room temperature.

Note: Incomplete drying may cause problems when loading the protein onto a gel due to residual ethanol.

18. Add up to 100 μ l Buffer ALO and mix vigorously to dissolve the protein pellet.

Note: Ensure that DTT is added to Buffer ALO before use (see “Things to do before starting”).

Genomic DNA purification

21. Add 500 μ l Buffer AW1 to the AllPrep DNA spin column from step 5. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at \approx 8000 \times g (10,000 rpm). Discard the flow- through.*

Reuse the spin column in step 22.

Note: Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer AW1 before use (see “Things to do before starting”).

22. Add 500 μ l Buffer AW2 to the AllPrep DNA spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at full speed to wash the spin column membrane.

Note: Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer AW2 before use (see “Things to do before starting”).

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during DNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the AllPrep DNA spin column from the collection tube. If the column contacts the flow-through, empty the collection tube and centrifuge the spin column again for 1 min at full speed.

23. Place the AllPrep DNA spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 100 μ l Buffer EB (preheated to 70°C) directly to the spin column membrane and close the lid. Incubate at room temperature (15–25°C) for 2 min, and then centrifuge for 1 min at \approx 8000 \times g (10,000 rpm) to elute the DNA.

24. Repeat step 23 to elute further DNA.

To prevent dilution of the first DNA eluate, use a new 1.5 ml collection tube (not supplied) to collect the second DNA eluate. To combine the first and second DNA eluates, reuse the collection tube from step 23.

Note: To achieve a higher DNA concentration, elute with 2 x 50 µl Buffer EB. The final DNA yield, however, may be reduced.

7.3. *Protocole d'élaboration d'une librairie pour séquençage Illumina (DNAvision)*

Ce protocole a été spécialement développé et optimisé pour préparer des librairies d'amplicons d'ADN 16S qui seront séquencés sur le Miseq Illumina.

MATERIEL ET REACTIFS

Equipement

- 96 puits thermocycleur (avec couvercle chauffant)
- Centrifugeuse de plaques 96 (...)
- fluoromètre pour quantifier AND double brin ()
- Truseq index plate fixture kit (Illumina, ref : FC-130-1005)
- Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, SN : DE72902871)
- Gants non-poudrés: Kimtech Satin Plus
- Tubes 1,5 ml DNA LoBind Eppendorf (VWR, n° 525-0130)
- Strips, tubes PCR et plaques
 - plaque 96 puits (ABI N801-0560)
 - strip PCR (Sarstedt 72.985.992)
 - film adhésif (Greiner 676090)
 - Strip couvercle (Sarstedt 65.989.002)
 - Tube 1.5 ml (Sarstedt 72.706.200)
- Tips filtrés (Greiner FT1000/200/20/10)
- Film aluminium adhésif (Greiner SN :676090)
- Dynal DynaMag2- support magnétique (Invitrogen p/n 123-21D)
- Speedvac (Eppendorf concentrator 5301 SN :530103715)
- Bain-marie (Gesellschaft fur labortechnik mbh SN :11274803K)
- Bloc froid (Biosmith)
- Agitateur (Vortex genie 2 Scientific industries SN :2-145953)

Réactifs

- Agencourt AMPure XP kit (Analis, p/n A63881 60 ml)
- Eau nuclease-free (non traitée DEPC) (Gibco ref :10977-035 500ml)

- 100% Ethanol (Sigma-Aldrich p/n E7023)
- KAPA Hifi Hotstart ReadyMix (2X) (Sopachem, ref : KK2602)
- Phix control V3 (Illumina ref : 15017666)
- Picogreen (...)
- Miseq reagent kit V3 (Illumina , ref:MS-102-3003)
- Nextera XT Index Kit (Illumina, ref : FC-131-1002)

METHODE

Contrôle qualité

Avant d'utiliser l'ADN génomique, il faut contrôler sa qualité et le doser en suivant les 2 MOP suivantes:

- ✓ MOP-SPE-003 : nanodrop
- ✓ MOP-SPE-005 : picogreen

Les critères d'acceptation sont les suivants :

- ✓ le ratio 260/280 : $1,7 < x < 2,1$
- ✓ quantité totale : $5\text{ng}/\mu\text{l} \rightarrow 2.5\mu\text{l}$

Préparation des amplicons

normalisation de l'ADN

Après dosage au picogreen, on normalise l'ADN à $5\text{ ng}/\mu\text{l}$:

- Soit on dilue l'Adn pour arriver à une concentration de $5\text{ ng}/\mu\text{l}$
- Soit on speedvague le volume total de l'extrait jusqu'à lyophilisation et on resuspend l'ADN dans un volume calculé pour au final arriver à $5\text{ ng}/\mu\text{l}$.

Amplification de l'ADN par PCR

Cette étape utilise le principe de la PCR pour amplifier à partir de l'ADN la région d'intérêt. Pour cela, on utilise des primers spécifiques auxquels sont « attachés » les adaptateurs.

2 régions peuvent être ciblées : V3-V4 ou V5-V6.

Voici les séquences des primers + adaptateurs :

Amplicon	PCR	primer	Fwd	V3-V4 :
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	CCTACGGNGGCWGCAG			

Amplicon	PCR	primer	Rvs	V3-V4 :
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC				
Amplicon PCR primer Fwd V5-V6 :				
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG				
Amplicon PCR primer Rvs V5-V6 :				
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG				
Amplicon PCR primer Fwd V1-V3 :				
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGAGAGTTGATCCTGGCTCAG				
Amplicon PCR primer Rvs V1-V3 :				
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATTACCGCGGCTGCTGG				

- Procédure :

Préparer le mix suivant par échantillon + Contrôle positif + blanc :

Amplicon PCR primer Fwd 1 µM	5 µl
Amplicon PCR primer Rvs 1 µM	5µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12,5 µl
Total	22,5 µl

- Distribuer 22,5 µl de ce mix dans une plaque 96
- Ajouter 2,5 µl d'ADN dilué à 5 ng/µl
- Seller la plaque avec un film alu adhésif et la placer dans le thermocycleur
- Lancer le cycle suivant :

95°C 3 min

25 x : 95°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 30 sec

72°C 5 min

4°C à l'infini

Purification des produits PCR

Cette étape utilise les billes AmpureXP pour purifier les amplicons 16S des primers résiduels.

Procédure :

- Amener les billes à température ambiante
- Centrifuger la plaque contenant les produits PCR
- Vortexer les billes environ 30 secondes pour être sûr que toutes les billes soient bien resuspendues
- Ajouter 20µl de billes à chaque puits de la plaque
- Mélanger en pipetant up and down environ 10 fois
- Incuber environ 5 minutes à température ambiante
- Placer la plaque sur un support aimanté environ 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair
- Laisser la plaque sur le support aimanté, et éliminer le surnageant ; ensuite, laver les billes avec de l'éthanol 80% fraîchement préparé :
 - Ajouter 200µl d'éthanol 80%
 - Incuber 30 secondes en laissant la plaque sur le support aimanté
 - Eliminer délicatement le surnageant
- Tout en laissant la plaque sur le support aimanté, laisser sécher les billes pendant 10 min à l'air libre
- Retirer la plaque du support aimanté et ajouter 27.5 µl de Tris HCl 10 mM pH 8.5 à chaque puits
- Mélanger en pipetant up and down environ 10 fois
- Incuber à température ambiante pendant environ 2 minutes
- Placer la plaque sur le support aimanté 2 minutes ou jusqu'à ce que le liquide soit clair
- Transférer délicatement 25µl de surnageant de la plaque des produits PCR amplifiées vers une nouvelle plaque.

Indexage

Cette étape utilise le principe de la PCR pour ajouter les index aux amplicons. Il s'agit d'un double indexage. Chaque combinaison de 2 index est propre à son amplicon.

- Indexage des amplicons :

Préparer le mix suivant par échantillon + Contrôle positif + blanc :

Nextera XT Index Primer1	5 µl
Nextera XT Index Primer2	5µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12,5 µl
Total	22,5 µl

- Distribuer 22,5 µl de ce mix dans une plaque 96
- Ajouter 2,5 µl d'ADN dilué à 5 ng/µl
- Seller la plaque avec un film alu adhésif et la placer dans le thermocycleur
- Lancer le cycle suivant :

95°C 3 min

25 x : 95°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 30 sec

Purification des produits PCR

Cette étape utilise les billes AmpureXP pour purifier les librairies finales avant quantification.

Procédure :

- Amener les billes à température ambiante
- Centrifuger la plaque contenant les produits PCR
- Vortexer les billes environ 30 secondes pour être sûr que toutes les billes soient bien resuspendues
- Ajouter 56µl de billes à chaque puits de la plaque
- Mélanger en pipetant up and down environ 10 fois
- Incuber environ 5 minutes à température ambiante
- Placer la plaque sur un support aimanté environ 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair
- Laisser la plaque sur le support aimanté, et éliminer le surnageant ; ensuite, laver les billes avec de l'éthanol 80% fraîchement préparé :
 - Ajouter 200µl d'éthanol 80%
 - Incuber 30 secondes en laissant la plaque sur le support aimanté
 - Eliminer délicatement le surnageant

- Tout en laissant la plaque sur le support aimanté, laisser sécher les billes pendant 10 min à l'air libre
- Retirer la plaque du support aimanté et ajouter 27.5 μ l de Tris HCl 10 mM pH 8.5 à chaque puits
- Mélanger en pipetant up and down environ 10 fois
- Incuber à température ambiante pendant environ 2 minutes
- Placer la plaque sur le support aimanté 2 minutes ou jusqu'à ce que le liquide soit clair
- Transférer délicatement 25 μ l de surnageant de la plaque des produits PCR amplifiées vers une nouvelle plaque.

Validation des librairies (optionnel)

Passer 1 μ l de la dilution 50x sur une puce bioanalyzer DNA 1000 pour vérifier la taille de l'amplicon.

Quantification, normalisation et assemblage des librairies

Il est recommandé de quantifier les librairies en utilisant une méthode fluorimétrique qui utilise des dyes qui se lient à l'ADN double brins (picogreen).

Calcul de la concentration en nM, basée sur la taille de l'amplicon déterminée par le profil sur bioanalyzer :

$$\text{(concentration en ng/ μ l)} \quad * 10^6 = \text{concentration en nM}$$

(660 g/mol * taille moyenne de librairie)

Diluer la librairie à la concentration finale de 4nM avec du Resuspension Buffer (RSB) ou du Tris pH 8.5 10 mM. Pooler 5 μ l de chaque librairie avec un index unique (4nM) et mélanger.

Dénaturation de la librairie et chargement sur le MiseQ

Avant séquençage, le pool de librairies est dénaturé avec du NaOH, dilué avec du buffer d'hybridation et ensuite dénaturé par la chaleur avant d'être chargé sur le Miseq. Chaque run doit inclure au moins 5% de PhiX (25% pour les runs n'incluant qu'une seule taille d'amplicon) pour servir de contrôle interne dans le cas de faible diversité de librairies. Il est recommandé d'utiliser les kits V3.

Préparation :

- Allumer le bloc chauffant à 96°C
- Sortir une cartouche de réactifs Miseq du congélateur et la laisser dégeler à température ambiante

Dénaturation de l'ADN :

- Combiner dans un tube les volumes suivants de Pools de librairies et de NaOH fraîchement dilué à 0.2N :
 - Pool de librairies à 4 nM (5µl)
 - NaOH 0.2N (5µl)
 - Garder de côté la dilution NaOH 0.2N pour préparer le contrôle PhiX dans les 12 heures à venir.
 - Vortexer le tube pool-NaOH et centrifuger la solution à 280g pendant 1 min
 - Incuber 5 minutes à température ambiante pour dénaturer l'ADN en simple brin
 - Ajouter 990µl de HT1 froid au tube contenant l'ADN dénaturé (10µl)

➔ On obtient ainsi un pool de librairie à 20pM dans du NaOH 1 mM.
 - Placer l'ADN dénaturé sur glace jusqu'à la dilution final
- Rem : Le PhiX contrôle est préparé de la même façon pour arriver à la concentration de 20 pM

Dilution de l'ADN dénaturé :

- Diluer l'ADN dénaturé à la concentration désirée en utilisant le tableau suivant :

Final	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
Concentration					
20 pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl
Pre-chilled HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl

- Inverser le tube plusieurs fois pour mélanger et centrifuger rapidement
- Placer l'ADN dénaturé et dilué sur glace

Combinaison de la librairie d'amplicons et du PhiX contrôle :

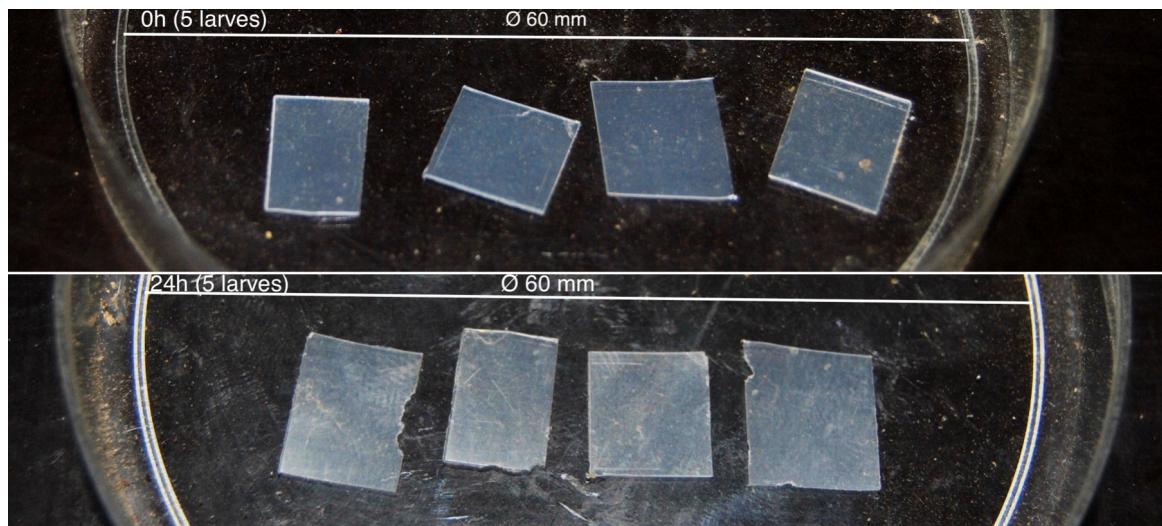
- Combiner dans un tube les volumes suivants de librairies et de PhiX 20pM :
 - PhiX 20 pM : 50µl
 - Librairies d'amplicon : 550µl
- Garder la solution sur glace jusqu'à être prêt pour chauffer le mix avant de placer la cartouche dans le Miseq
- Utiliser un bloc chauffant pour dénaturer le mix à 96° pendant 2 minutes
- Après incubation, inverser le tube 1 ou 2 fois pour mélanger et placer sur glace pendant 5 minutes

7.4. Tableau reprenant les critères de décision pour la sélection des échantillons

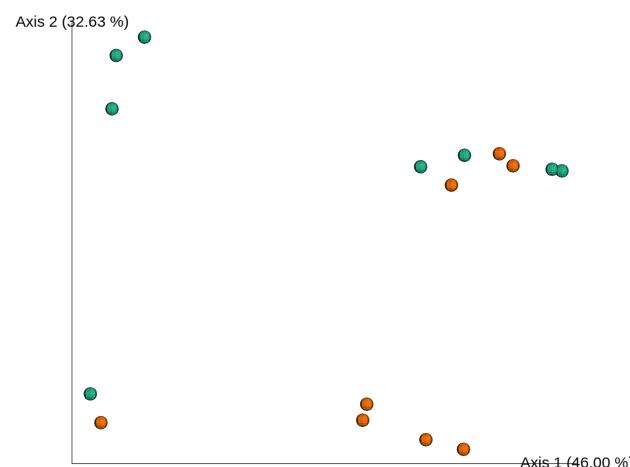
Date	N°ech	Nom_Traitement	Masse (g)	Dosage protéines (µg/µl)	Qubit dosage ADN (ng/µl)	Nanodrop dosage ADN (ng/µl)	A260/280	A260/230	Aliments_vISIBLES (?= pas info)
23/04/18	19c1	STD1	0,125	5,6	7,79	5,53	3,13	0,15 ?	
23/04/18	20c3	STD2	0,121	10,56	16,7	18,16	2,31	1,35 ?	
23/04/18	21	STD3	0,142	6,3	17,6	13,84	2,48	0,05 ?	
23/04/18	22	STD4	0,175	32,8	7,26	9,19	3,77	0,02 ?	
27/04/18	23c1	STD5	0,085	39,28	3,74	12,33	2,72	0,18 ?	
27/04/18	24c2	STD6	0,129	12,15	6,91	13,18	1,89	0,24 ?	
27/04/18	25	STD7	0,146	38,16	4,77	20,64	1,9	0,57 ?	
27/04/18	26	STD8	0,217	53,24	3,54	21,08	2,5	0,45 ?	
2/05/18	27c3	PE1	0,118	13,7	11,3	14,58	2,41	2,27 ?	
2/05/18	28c3	PE2	0,120	12,4	10,2	12,86	2,18	1,2 ?	
2/05/18	29	PE3	0,119	26,6	1,53	20,69	2,29	0,25 v	
2/05/18	30	PE4	0,197	65,76	2,33	77,34	2,29	0,93 v	
5/05/18	31	PE5	0,085	23,88	17,3	24,73	1,93	0,84 ?	
5/05/18	32	PE6	0,089	30,44	2,72	9,69	2,23	0,51 ?	
5/05/18	33c4	PE7	0,091	24,52	23	34,45	1,95	0,68 ?	
5/05/18	34c4	PE8	0,087	19,44	36,7	53,25	1,96	1,18 ?	

Les échantillons en vert (STD1,STD2, STD5,STD6,PE1,PE2,PE7 et PE8) ont été sélectionnés afin d'être représentatifs de l'ensemble des échantillons et d'être le plus homogènes possible.

7.5. Photographie de la consommation de polyéthylène



7.6. Analyse en composante principale (distance UniFrac unweighted)



Légende : diète polyéthylène en vert et diète standard en orange