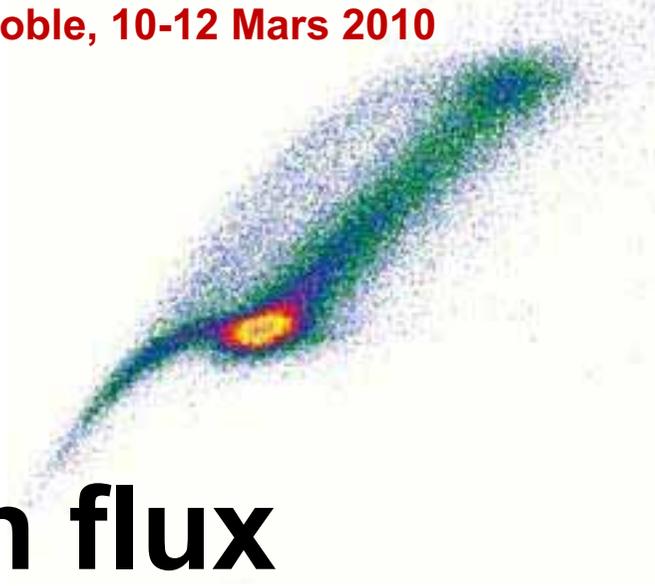


**DIU de Cytométrie en Recherche et en Clinique  
Année universitaire 2009 – 2010**

**Module 4 : Applications en biologie — Grenoble, 10-12 Mars 2010**



# **Cytométrie en flux dans les sciences végétales**

**Gérald GREGORI**

Chargé de Recherche CNRS

Université de la Méditerranée – Centre d’Océanologie de Marseille  
Laboratoire de Microbiologie Géochimie et Ecologie Marines UMR 6117

Responsable scientifique de la Plate-forme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie PRECYM

<http://precym.com.univ-mrs.fr>

# Remerciements pour le matériel et l'aide apportée par :

**Spencer BROWN et Olivier CATRICE,**

*Dynamique de la compartimentation cellulaire*, Equipe Béatrice Satiat-Jeunemaître,  
Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR2355, Gif-sur-Yvette

**Marie-Noëlle SOLER et Susanne BOLTE,**

Plate-forme d'Imagerie et Biologie Cellulaire, IFR87 " La Plante et son environnement "

**Raffaella CASOTTI,**

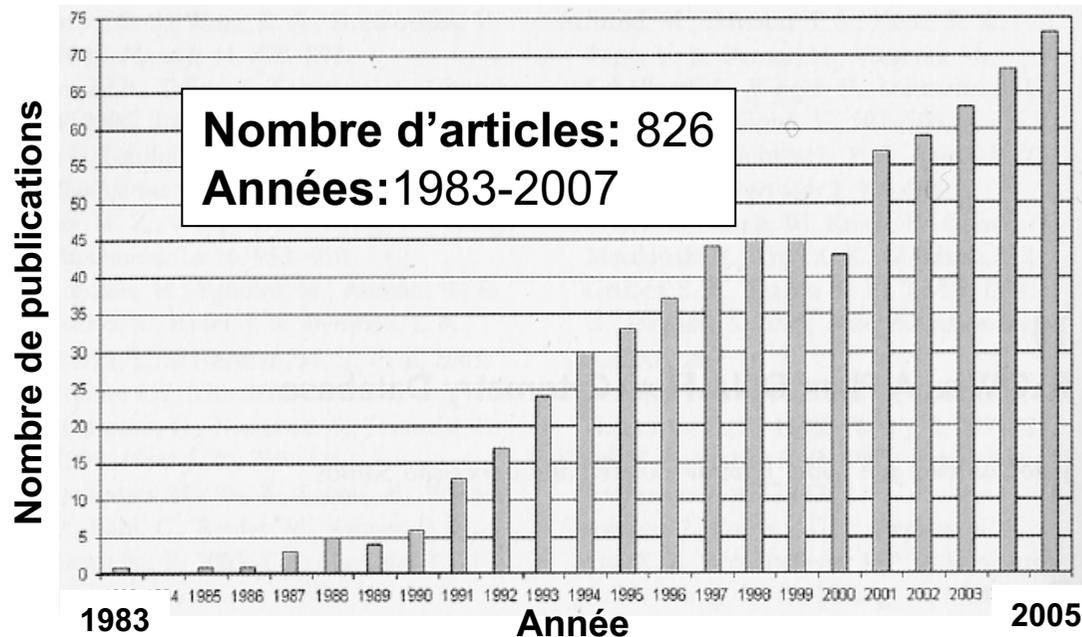
*Laboratory of Functional and Evolutionary Ecology*  
Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italie

**Charles-François BOUDOURESQUE**

*Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines UMR 6117*  
Centre d'Océanologie de Marseille, Campus de Luminy, Marseille

# Petit historique de la cytométrie en flux dans les sciences végétales

- 1960-1970 : Développement de la cytométrie en flux
  - Analyse automatique et à haut débit des cellules humaines
- 1973 : Publication pionnière en biologie végétale (Heller, 1973)
  - Contenu en ADN de *Vicia faba* (Fabacea)
- 1980s : Premières applications en biologie végétale
- Depuis 1990 : Nombreuses applications



Distribution des articles référencés dans la base de données FLOWER « Plant DNA Flow Cytometry »

# Le règne végétal (version « populaire »)

- Organismes photosynthétiques
- Paroi faite de cellulose.

Deux lignées:

- ➔ Algues (les algues forment un ensemble polyphylétique (algues vertes, brunes, etc ..)
- ➔ Plantes terrestres (comprennent notamment les bryophytes (mousses et hépatiques), fougères, gymnospermes et angiospermes)

300 000 espèces de plantes à fleurs, diversifiées depuis le Crétacé,

900 espèces de Gymnospermes (Conifères, Cycades, Gnétales), diversifiés depuis probablement la fin du Carbonifère,

20 000 espèces de fougères, diversifiées depuis le début du Carbonifère,

10 000 espèces de mousses

4 000 espèces d'hépatiques.

Rq: Les champignons ne font plus partie du règne végétal, et forment un règne identifié (Fungi).. La [botanique](#) est la discipline d'étude des plantes.

# Le règne végétal (suite)

Les classifications scientifiques classiques regroupent sous le terme **végétal** ([vezetal]/[vezeto]) **plusieurs lignées d'organismes vivants** qui, selon l'origine étymologique du terme, végètent. Contrairement à une idée largement répandue le terme végétal ne désigne pas uniquement les plantes.

---

Au début du XXe siècle, les végétaux étaient répartis en trois grandes catégories

- Les cyanobactéries ;
- Les thallophytes (les algues, les champignons et les lichens) ;
- Les « plantes à tige » ou cormophytes (anciennement végétaux supérieurs).

En 1969 Robert Whittaker proposait une classification à cinq règnes :

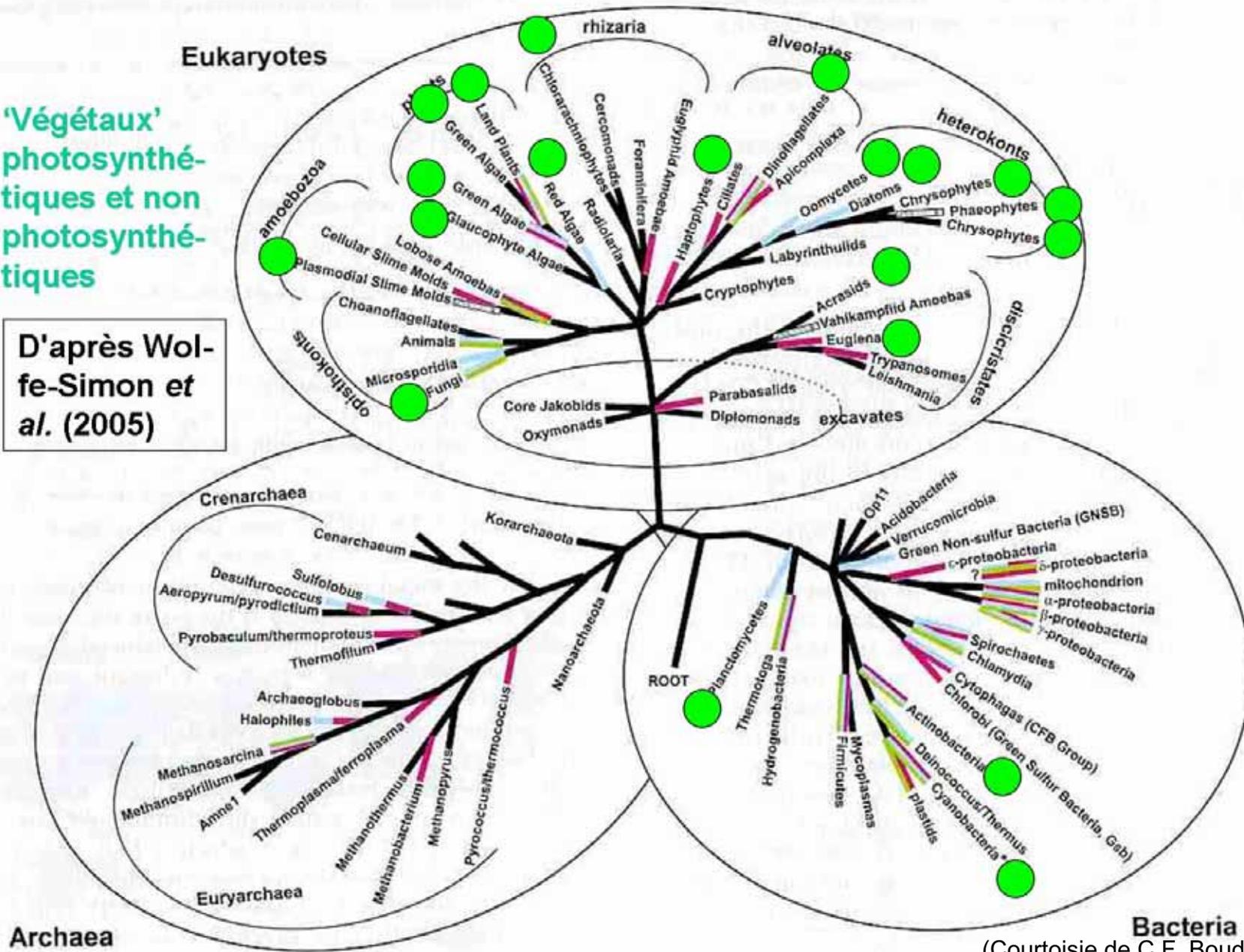
- Le règne végétal complète quatre autres règnes :
- Les protistes (unicellulaires),
- Les monères (ou procaryotes),
- Les fungi (champignons),
- Les animaux.

Cette classification est encore retenue de nos jours pour les règnes d'organismes multicellulaires (animaux, champignons, plantes).

# Le règne végétal : avec la biologie moléculaire ça se « complique »

'Végétaux'  
photosynthétiques et non  
photosynthétiques

D'après Wolfe-Simon et al. (2005)



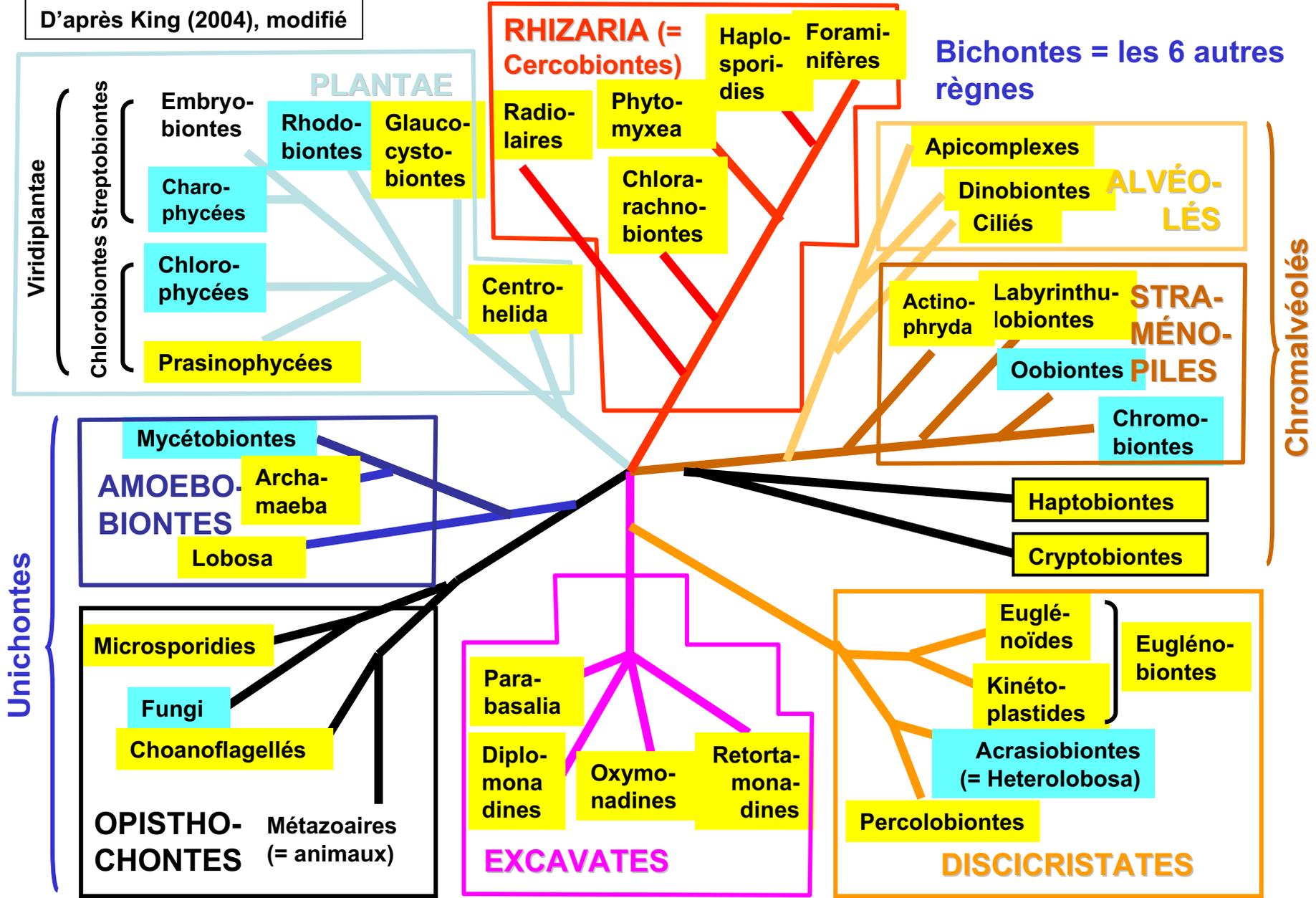
**Bacteria**  
(Courtoisie de C.F. Boudouresque)

- Unicellulaires
- Unicellulaires et pluricellulaires

# Eucaryotes

Arbre d'après Baldauf (2003), simplifié et mis à jour, et Boudouresque et al. (2006)

D'après King (2004), modifié

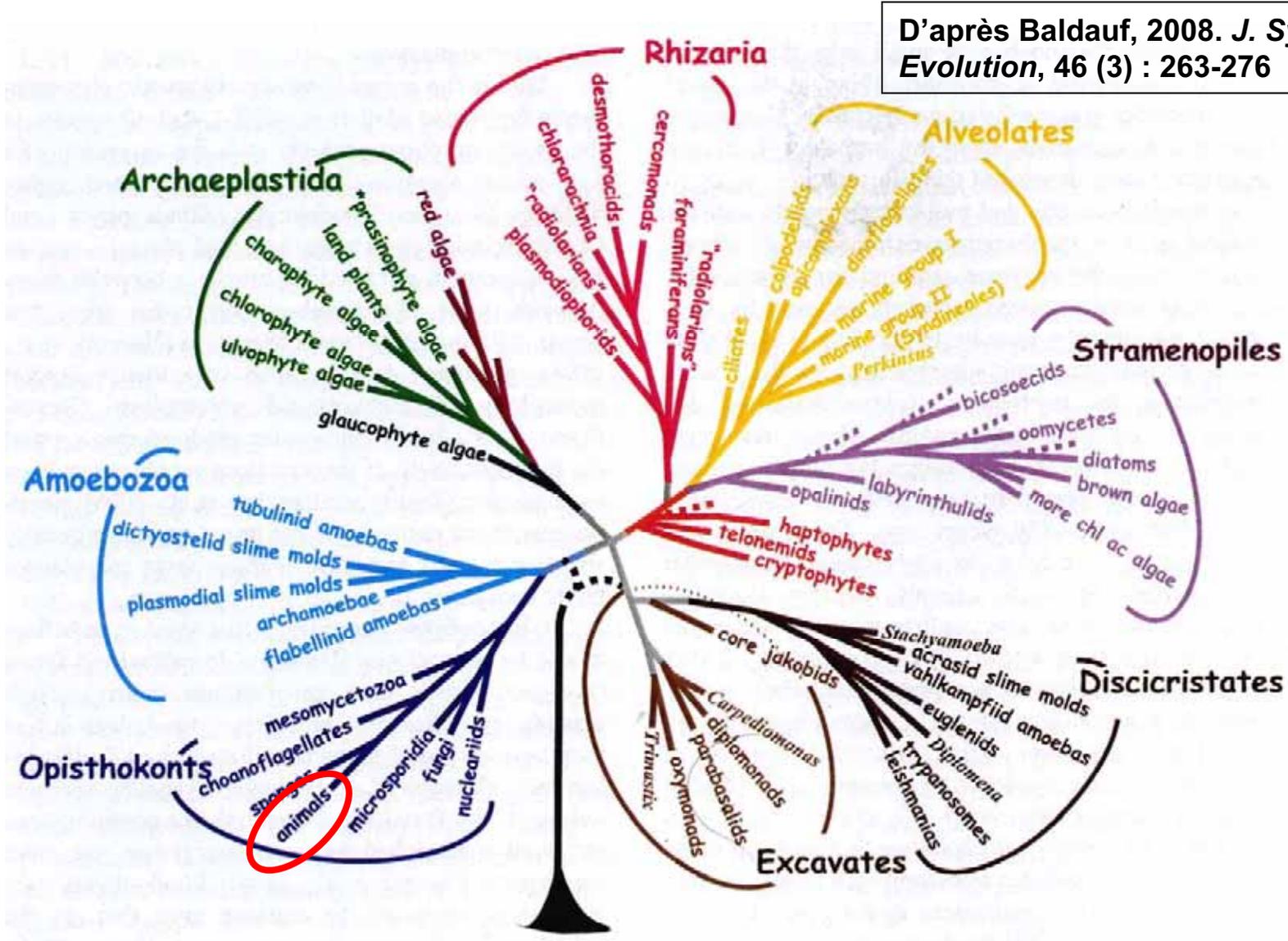


Bichontes = les 6 autres règnes

(Courtoisie de C.F. Boudouresque)

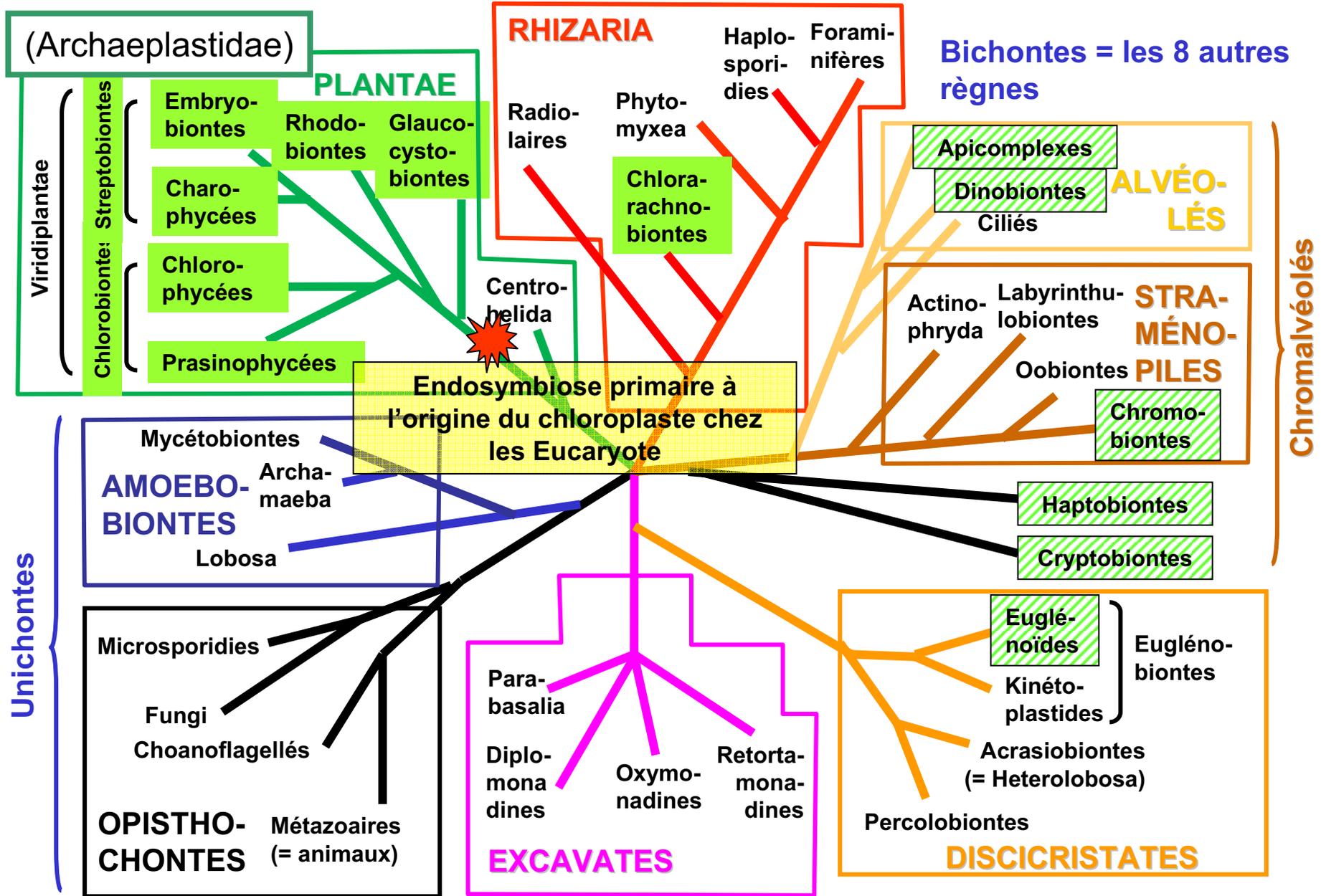
# L'arbre des eucaryotes : les 10 règnes

D'après Baldauf, 2008. *J. Systematics Evolution*, 46 (3) : 263-276



# Dispersion de la photosynthèse chez les Eucaryotes

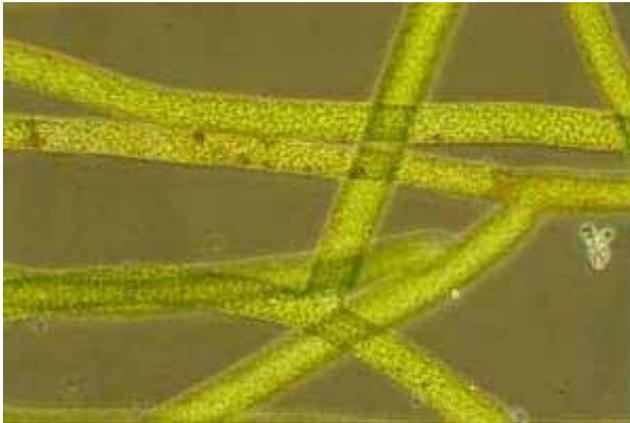
Tous (±) photosynthétiques  
 En partie photosynthétiques



(Courtoisie de C.F. Boudouresque)

# Endosymbiose en cours

Jared Worful *in* Pennisi (2006)



*Vaucheria litorea*  
(Chromo-biontes,  
Stramé-nopiles)



*Elysia chlorotica*  
(Mollusques, Métazoaires)

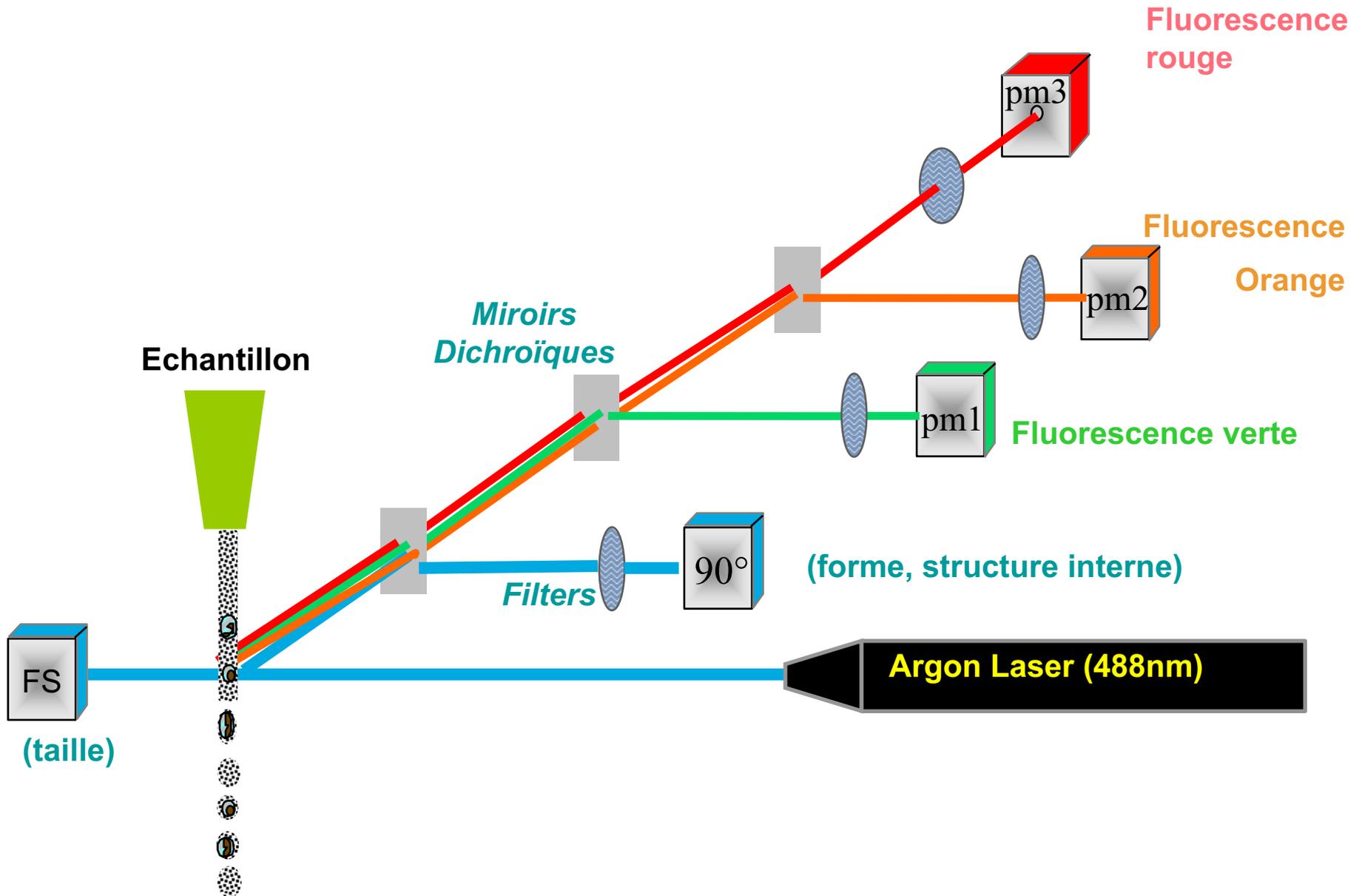
- Chloroplastes : obligatoires pour *Elysia*
- 2 gènes nucléaires de *Vaucheria* (impliqués dans la photosynthèse) sont présents dans le génome de *Elysia* (HGT)
- Mais il manque encore à *Elysia* de très nombreux gènes

(Courtoisie de C.F. Boudouresque)

# Pourquoi utiliser la cytométrie?

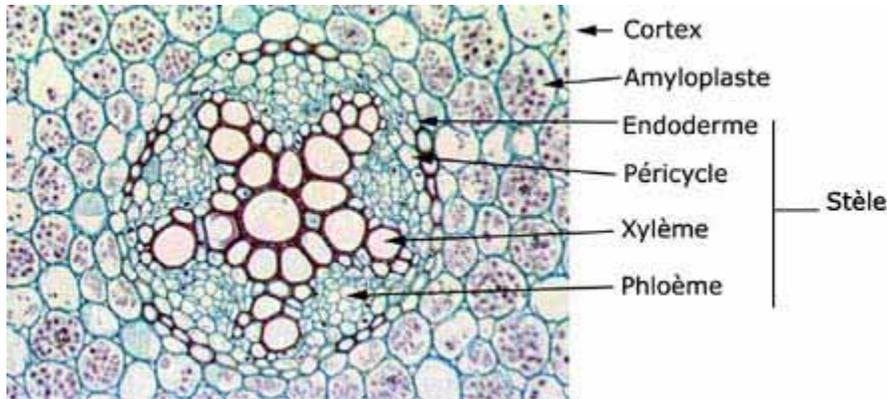
- **Analyse multiparamétrique à l'échelle individuelle**
- **Analyses rapides** (plusieurs dizaines de milliers de **particules** analysées par seconde)
  - Permet d'analyser un grand nombre de cellules
  - Résultats statistiques robustes et représentatifs
- Données **quantitatives** (corrélation avec d'autres données biochimiques)
- **Mesures en temps réel, échantillon frais ou fixé**
- **Classes de taille et abondance cellulaire**
- **Marqueurs uniques:**
  - **naturels** (chlorophylle, autres pigments autofluorescents)
  - **induits** (coloration) → fluorochromes (structure, physiologie, viabilité)
- **Tri (post-analyses, cultures)** : isolement de populations d'intérêt (non destructif ; pas d'altération des cellules).

# Principe de la cytométrie en flux

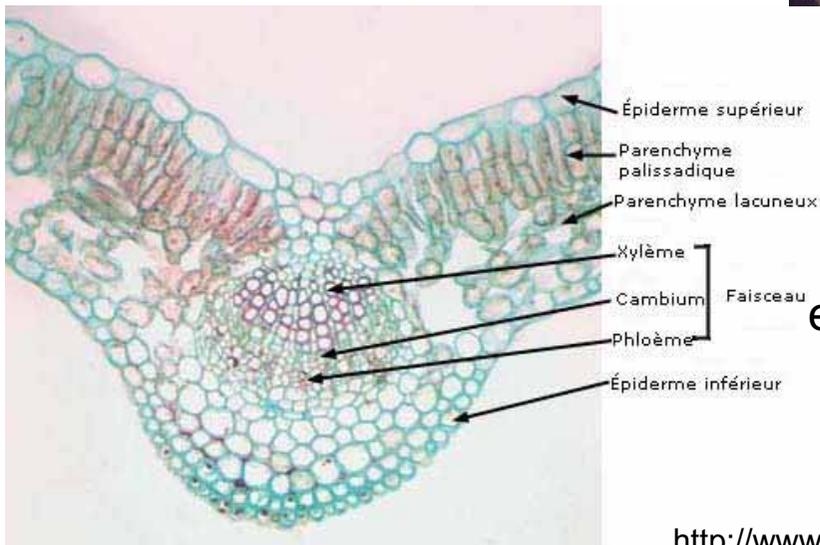
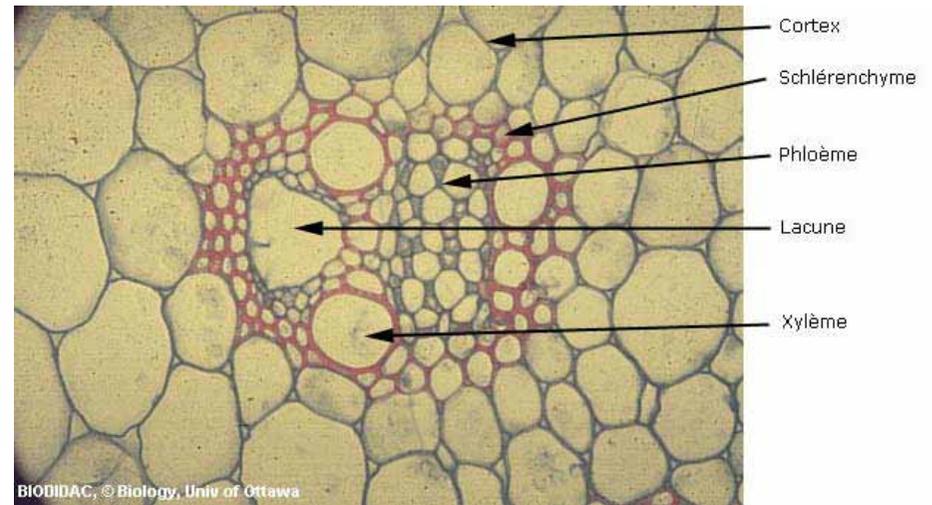


# Structure complexe des tissus végétaux

Racine de Dicotylédone en coupe transversale (100X)

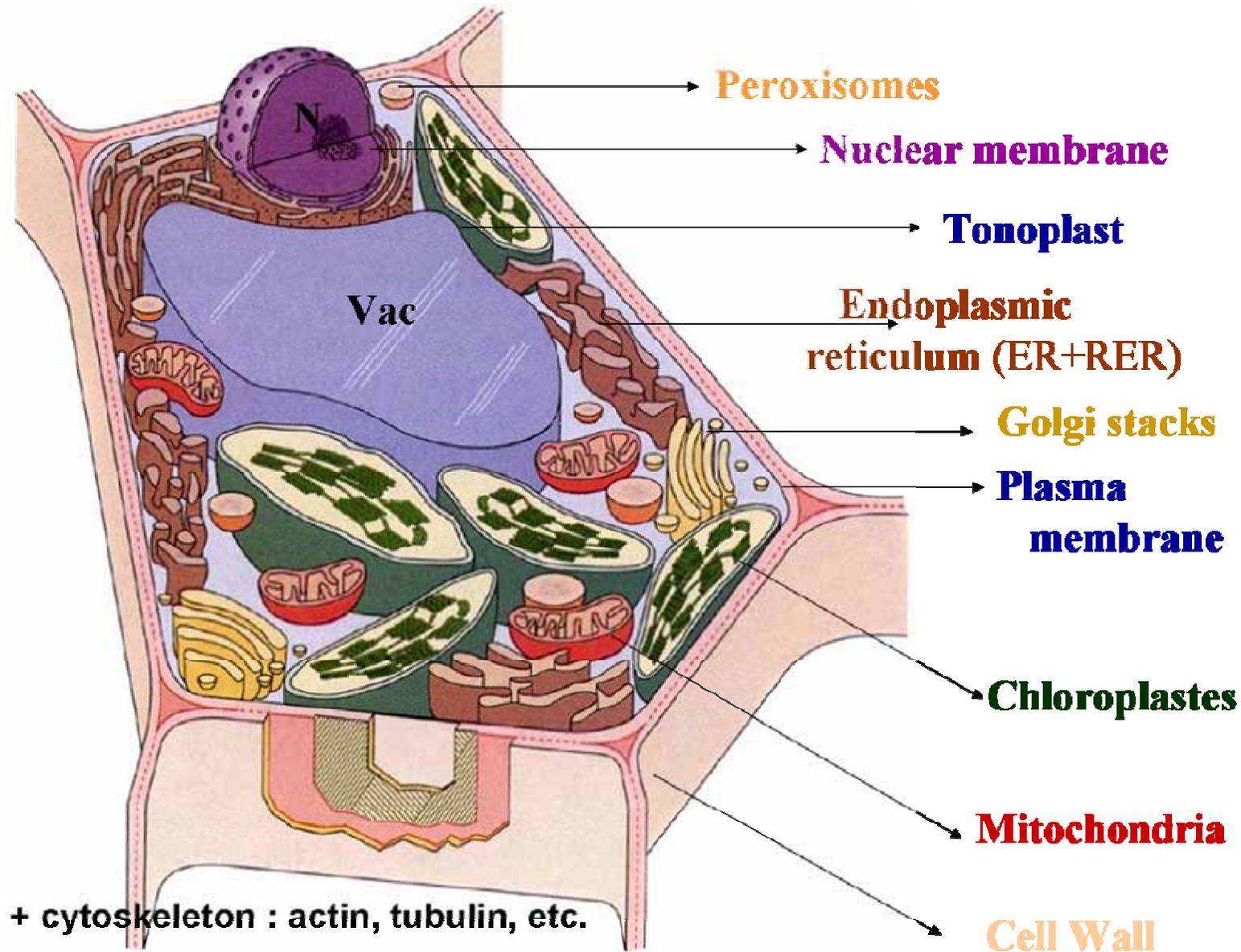


Faisceau d'une jeune tige de Dicotylédone en coupe transversale (400X)

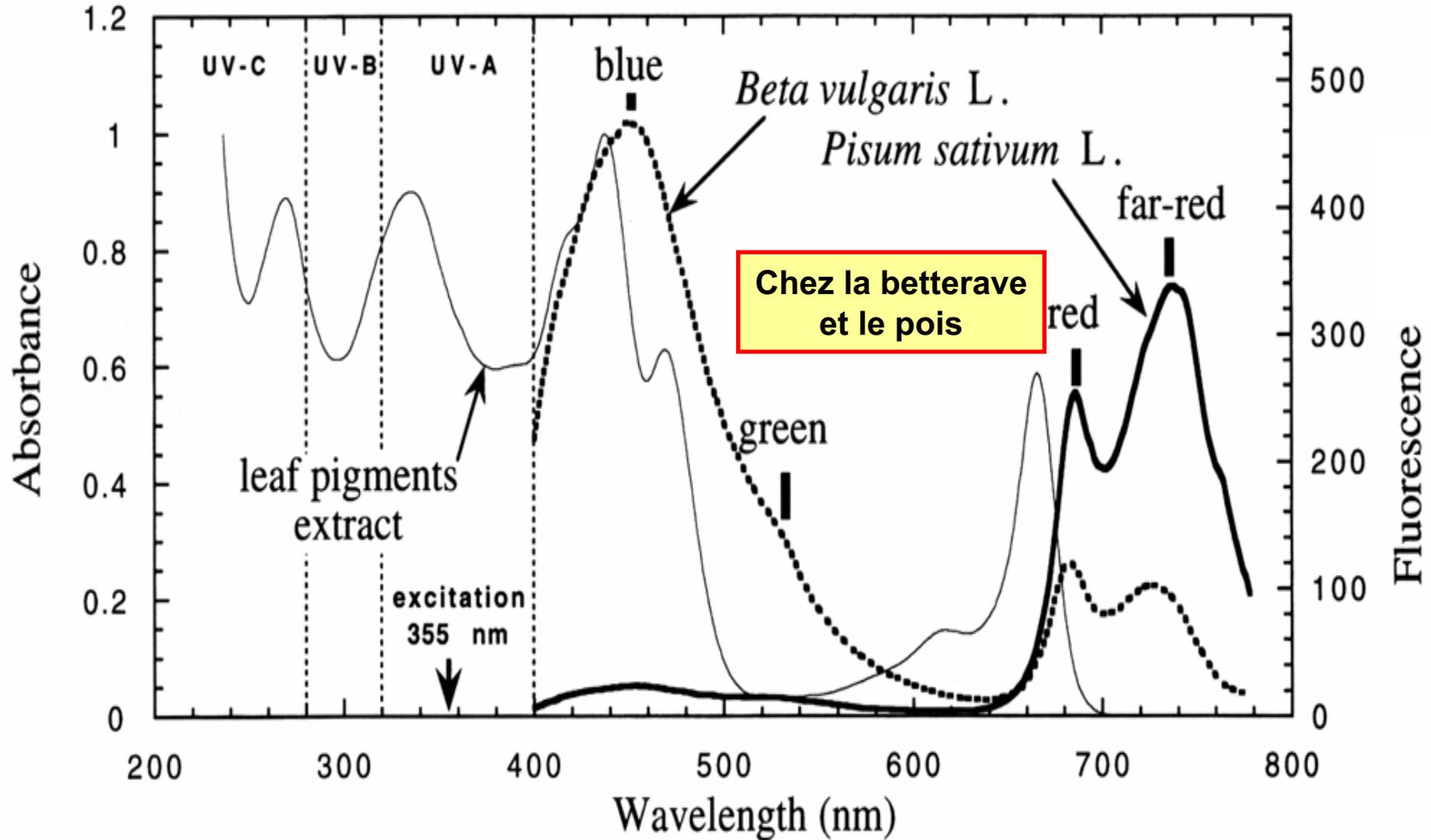


Faisceau d'une jeune tige de Monocotylédone en coupe transversale (400X)

# Complexité d'une cellule végétale (végétaux supérieurs)



# Autofluorescence des cellules



phenylalanine  
tyrosine,  
tryptophan

NAD(P)H,  
acide férulique,  
coumarines,  
alcaloïdes

flavines,  
FAD, FMN

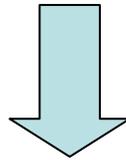
phycobiliprotéines

chlorophylles,  
porphyrines (hème),  
rhodopsine

# Particularité des cellules végétales

Les cellules végétales diffèrent des autres cellules eucaryotes par certains aspects:

- Généralement incluses dans des tissus ou des organes rigides,
  - Entourées d'une paroi pectocellulosique,
  - Présence de plastes → Contenant de l'ADN, des pigments fluorescents pour la photosynthèse,
  - Présence de cofacteurs du métabolisme et de métabolites secondaires fluorescents (Cerovic et al., 1999),
- Biaisent généralement l'étude de cycles cellulaires ou de fonctions physiologiques.



La plupart des travaux menés par cytométrie en flux sur des cellules végétales

→ **protoplastes** = cellules débarrassées de leurs parois par hydrolyse enzymatique dans un milieu hyperosmotique.  
(cf Protocole 1)

→ Une autre approche = analyse d'**organites isolés** (noyaux par exemple)  
Cette étape d'isolement préalable étant opérée généralement sur tissus frais et non sur échantillons fixés (cf Protocole 2).

# Marquage nucléaire par l'iodure de propidium.

**Cellules BY2 :**

**(a) Protoplastes entiers fixés :**

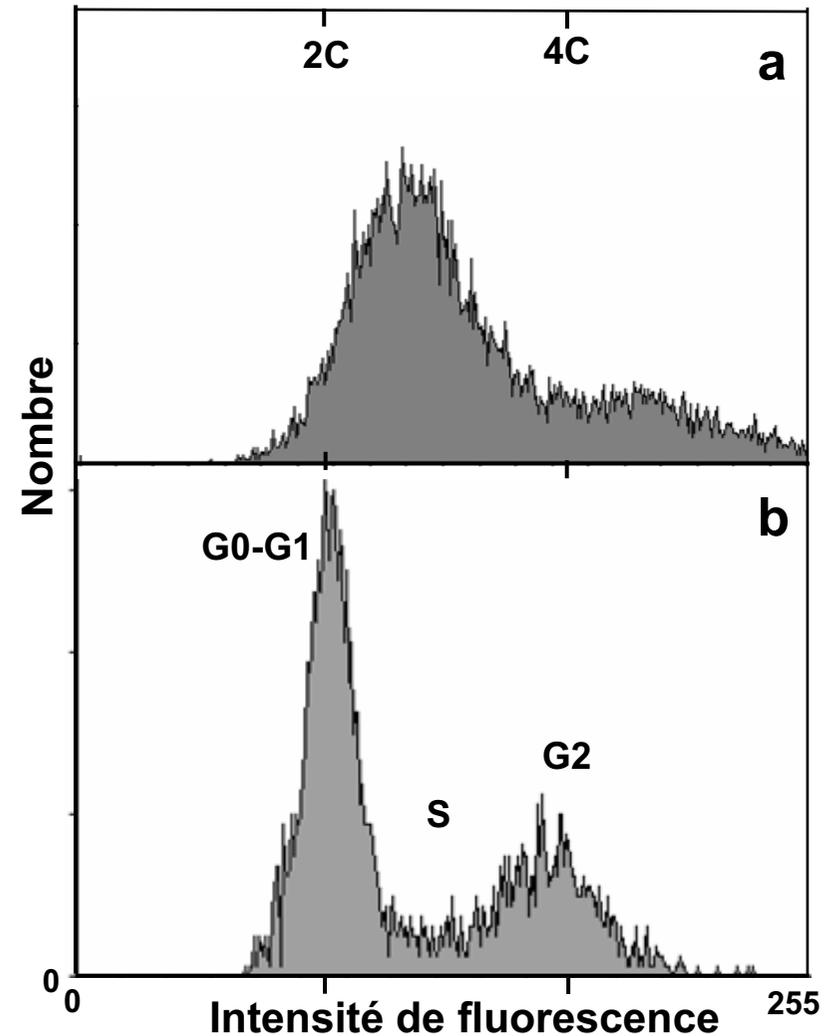
quantification décalée due à des marquages non spécifiques et à la contribution des nucléoïdes des organites (plastides, mitochondries).

Coefficient de Variation ~9%

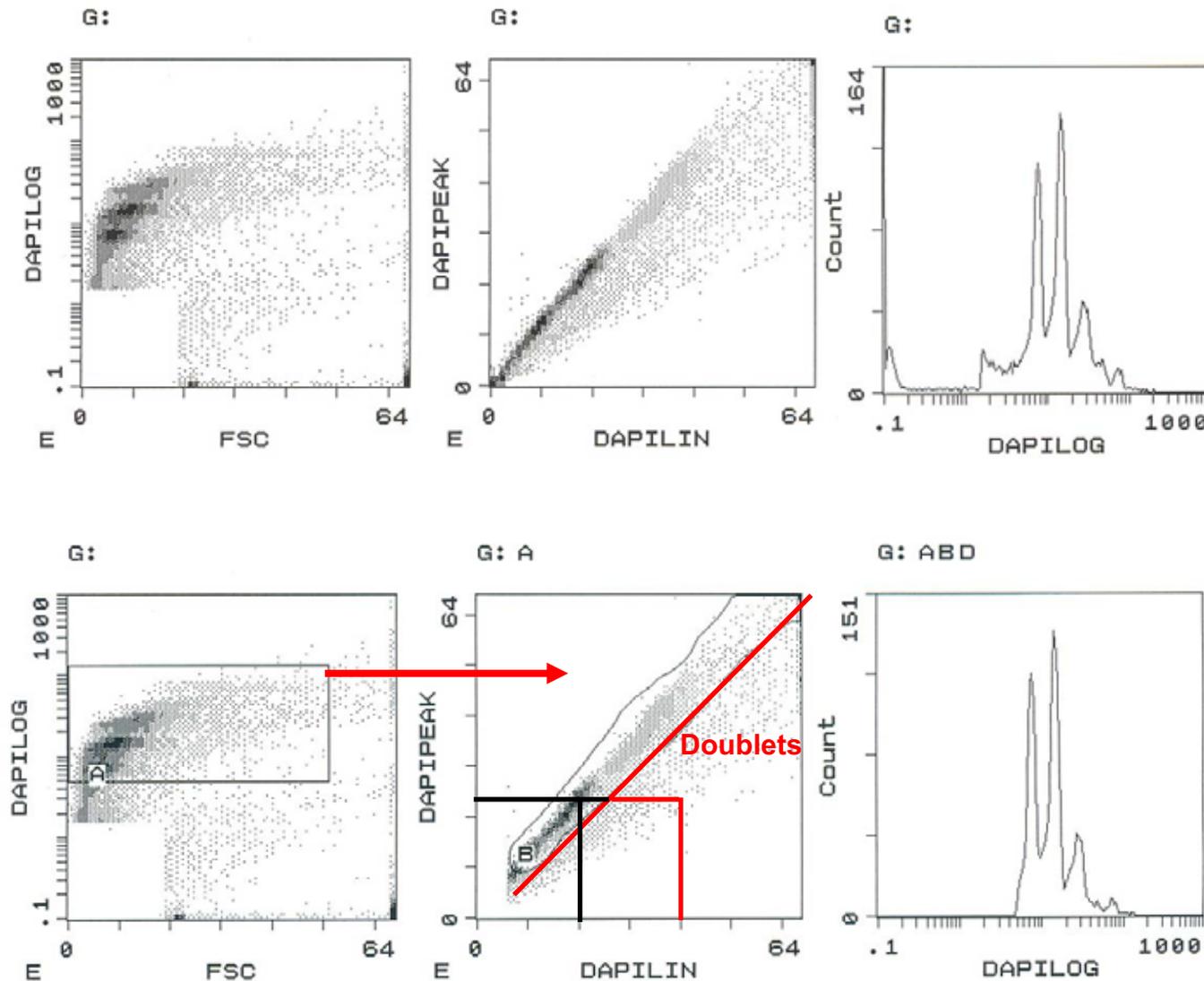
**(b) Noyaux isolés :**

CV ~4% 60% G0-G1; 15% S et 25% G2.

« **C** » est la quantité d'ADN correspondant à un complément de chromosomes (2C diploïde).



# Analyse du cycle cellulaire : attention aux doublets!



-Exemple avec noyaux isolés, filtrés, sans centrifugation

- Marquage de l'ADN par Hoechst, DAPI, PI

-Faible abondance des noyaux

-Utilisation du FALS + fluorescence du colorant  
→ Fenêtrage (gating)

- Discrimination des doublets sur le cytogramme DAPI Lin vs DAPI peak

Typiquement 10.000 noyaux analysés

- Interprétation?  
- G0+G1 / S / G2+M /  
- Endoréplication ?

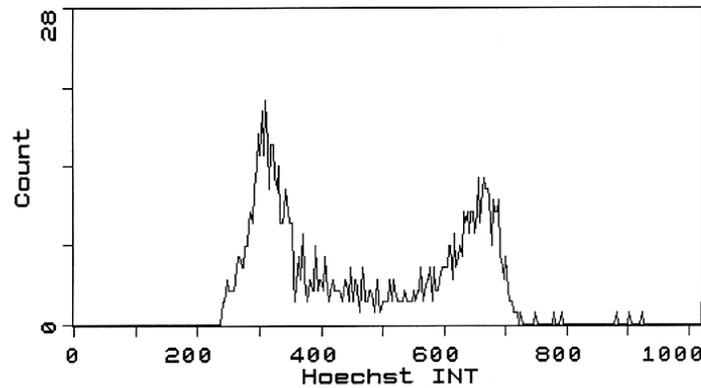
# Analyse du cycle cellulaire : L'aide des logiciels

Logiciels : Multicycle, Modfit (VSH), Verify, Flomax, Cytowin → Déconvolution des phases G0G1/S/G2M

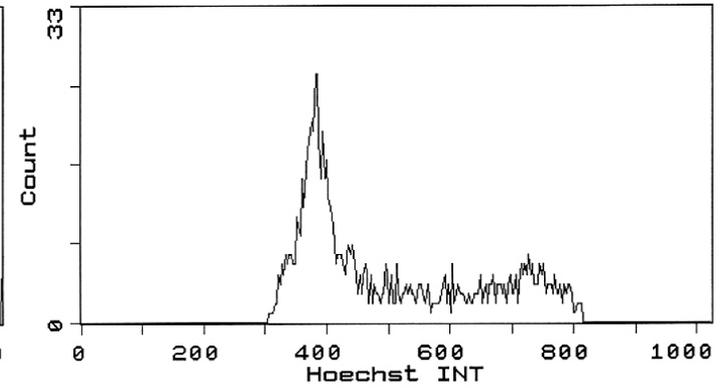
Cultures de BY2

Histogrammes brut

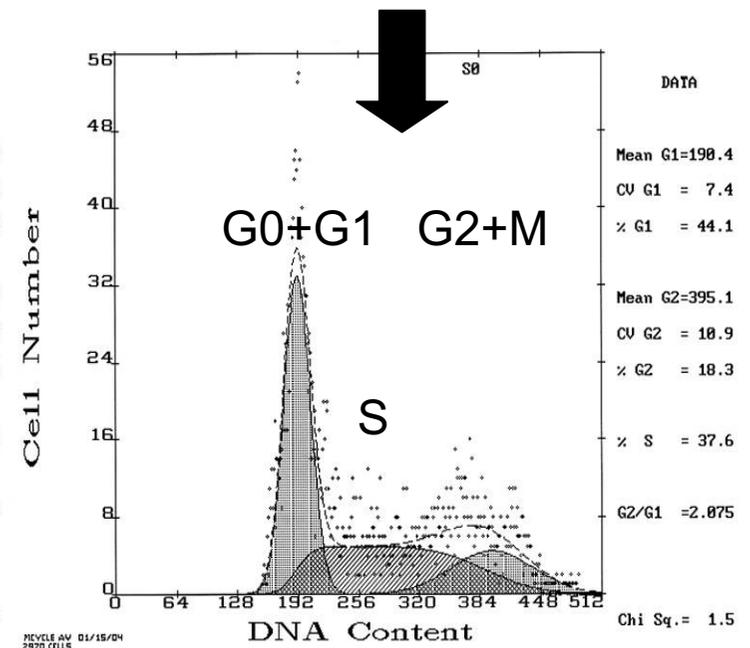
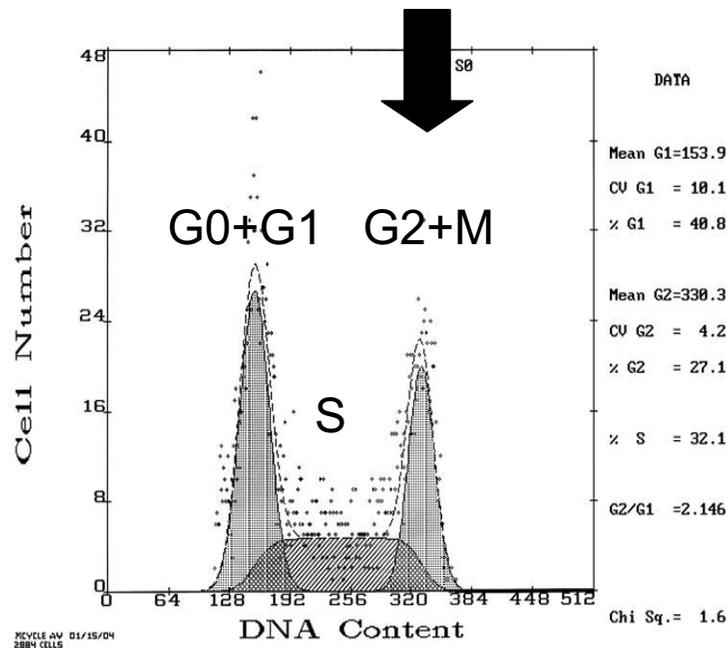
Culture contrôle



Culture synchronisée avec HydroxyUrée (HU)



Exemples de cycles cellulaires obtenus à l'aide de Multicycle



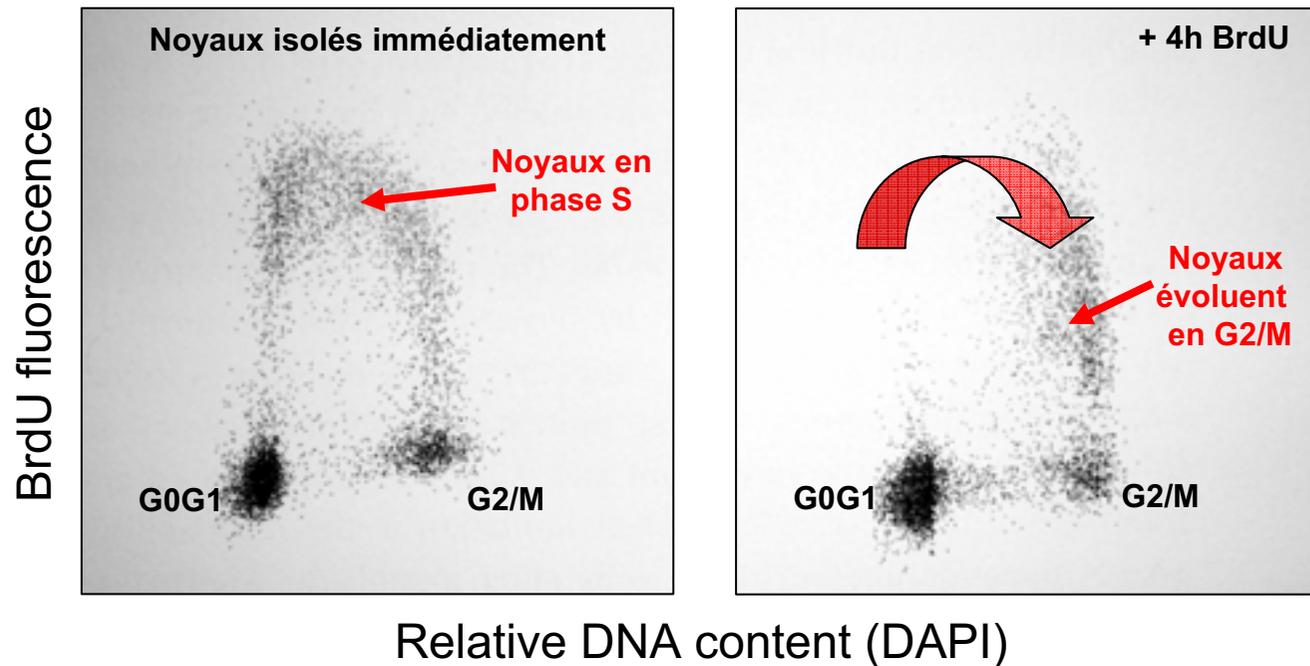
# Analyse du cycle cellulaire après ajout de BrdU

Le BrdU est un analogue de la Thymidine : 5-bromo-2-deoxyuridine

- Incorporation dans l'ADN au cours de la réplication
- Différence entre cellules quiescentes et en division
- Proportion de cellules actives

(intérêt dans bioréacteurs pour production de métabolismes secondaires)

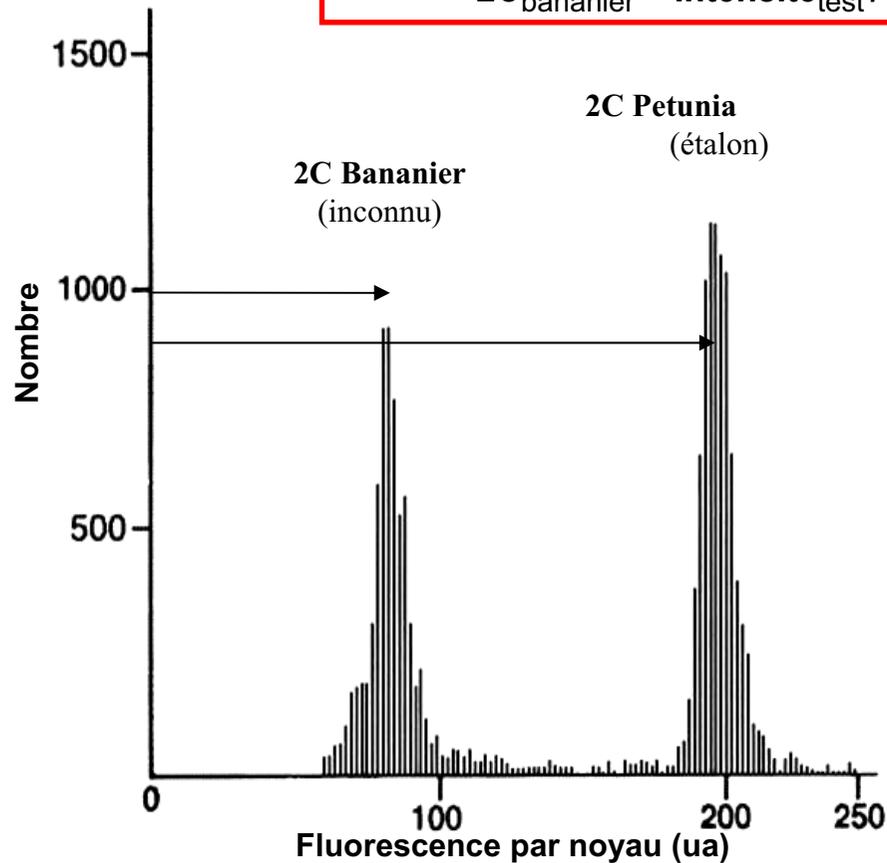
*Racines  
de Vicia faba  
(Fabacea)*



- Détection indirecte du BrdU incorporé dans les noyaux par immunofluorescence :
  - Anticorps monoclonaux fluorescents (FITC, Alexa 488, etc...)

# Quantification de l'ADN par cytométrie en flux grâce à un étalon interne

$$2C_{\text{bananier}} = \frac{\text{Intensité}_{\text{test}}}{\text{Intensité}_{\text{étalon}}} * 2C_{\text{étalon}}$$



Avec pour *Petunia hybrida*  $2C = 2,85$  pg ADN,  
le calcul de  $2C_{\text{bananier}} = 1,23$  pg

(Kamaté et al., 2001)

Le colorant de l'ADN doit être  
un intercalant stoechiométrique,  
comme iodure de propidium

1 pg ADN = 978 Mbp (Dolezel et al. 2003)

<http://www.rbgekew.org.uk/cval/exhibition/html/homepage.html>

Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens of Kew, et leur base de données de tailles de génome

## Tampon Galbraith et al. (1983).

Concentration Finale	Produit	PM	Masse/Volume Final
45 mM	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	203	9,15 g /L
30 mM	citrate.Na <sub>3</sub>	294	10,72 g /L
20 mM	MOPS acide pH 7,0	209	4,19 g/L
0,1 % (m/v )	Triton X-100	-	10 mL/L d'un stock 10 %

...souvent modifié extemporanément, par exemple:

- en poussant le Triton X-100 à 0,5% parfois à 1% même 2% pour des tissus riches en terpènes.
- 1% (m/v) polyvinyl-pyrrolidone 10.000 pour complexer des polyphénols (« anti-tanning »)
- antioxydants : 10 mM métabisulfite de sodium (S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.Na<sub>2</sub> PM 190 syn. pyrosulfite).

*Les noyaux isolés peuvent être conservés plusieurs heures à 4°C avec rajout de 1 à 2% de formaldéhyde.*

- tissus, feuilles, + étalon si nécessaire
  - rasoir ; petri ; 4°C
  - filtre 48 µm ou 75 µm
  - 1% formaldéhyde
- coloration : iodure de propidium (50-70 µg/mL), Hoechst 33342 ; DAPI (5 µg/mL)

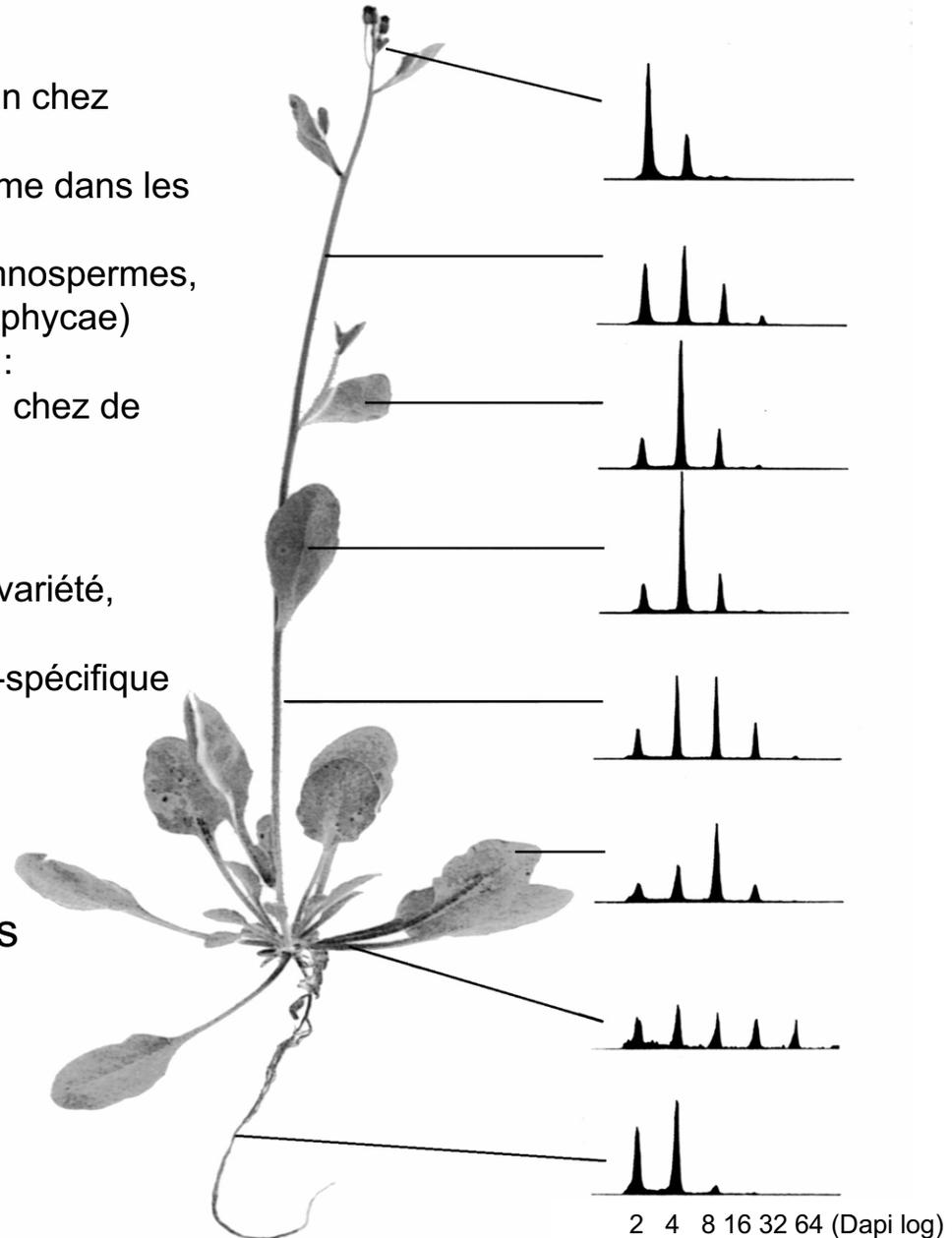
voir protocoles *Catrice et coll. (2006)*

# Endoreplication

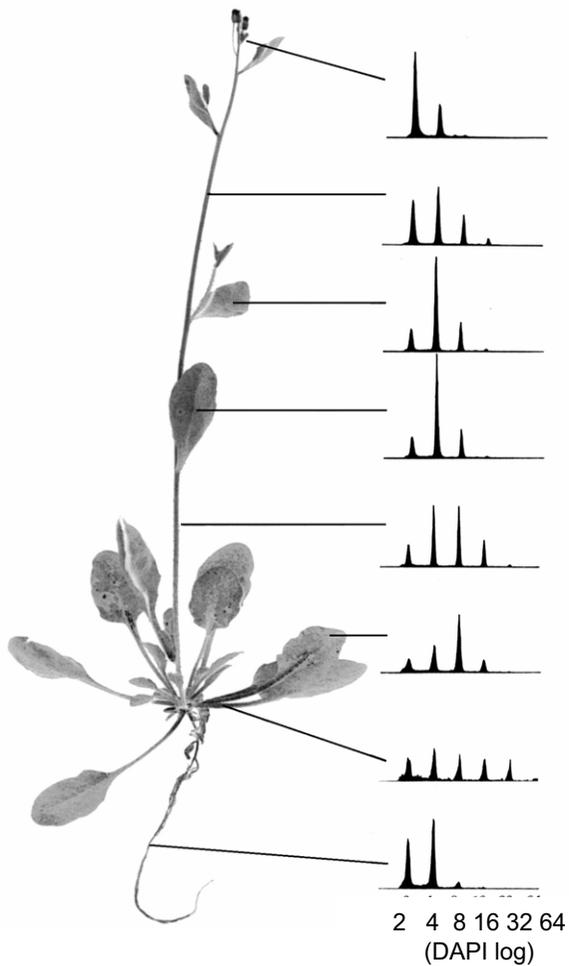
- L'endoréplication est un processus très commun chez les plantes.
- Permet la multiplication de l'ensemble du génome dans les cellules somatiques
- Abondant chez angiospermes, absent chez gymnospermes, Peu de données sur les algues (Characea, Phaeophyceae)
- Le degré d'endoréplication dépend des familles :
  - Fort chez Cucubirtaceae, Chenopodiaceae, chez de nombreuses brassicaceae ;
  - Moyen chez Solanacea, Alliacea, Fabacea
  - Faible chez Poacea
- Degré d'endopolyploïdie varie en fonction de la variété, de la stratégie de vie/adaptation écologique.
- Degré d'endopolyploïdie est en général organe-spécifique

## Endoreplication dans différentes parties d'une plante d'*Arbidopsis thaliana*

Noyaux isolés par hachage dans le tampon de Galbraith, et colorés au DAPI

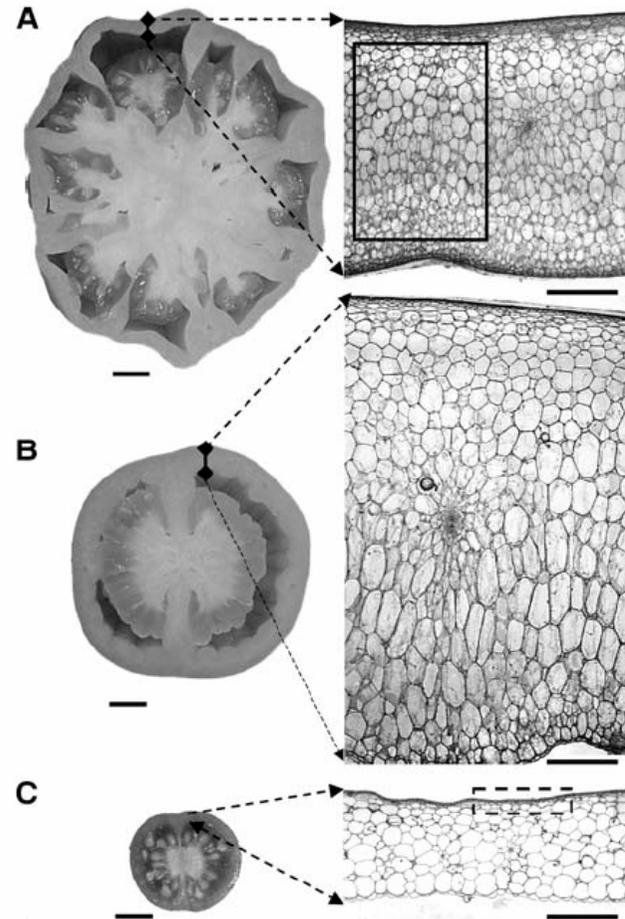


# Endoréplication: régulée au cours du développement...



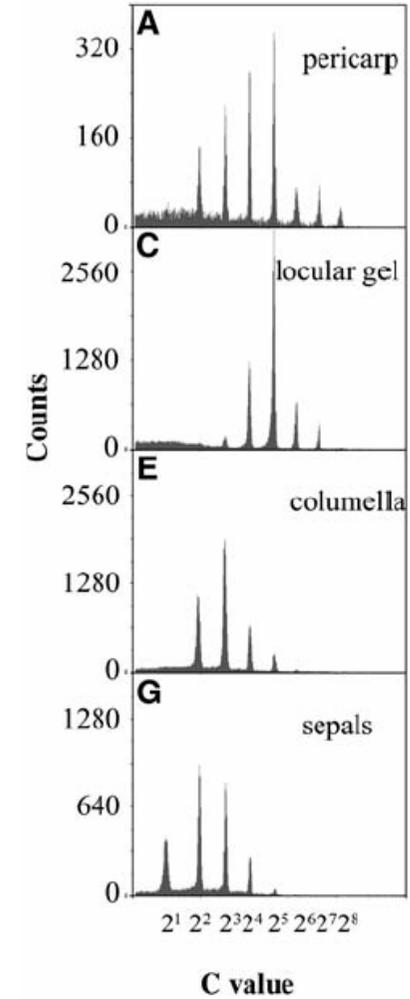
**Arabidopsis thaliana**

Noyaux isolés et marqués au DAPI  
Brown (1988)



**Tomate**

Cheniclet et al. (2005) *Plant Physiology* 139 : 1984-92



# Mesure du rapport AT/GC

$R_{IP} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'iodure de Propidium (ou bromure d'Ethidium)

$R_{HO} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'Hoechst 33342 → AT

$R_{CA} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec la Chromomycine A3 (ou la Mithramycine) → CG

$$\% \text{ AT}_{\text{test}} = \% \text{ AT}_{\text{étalon}} \times (R_{HO} / R_{IP})^{1/5} \quad \text{Equ. 2}$$

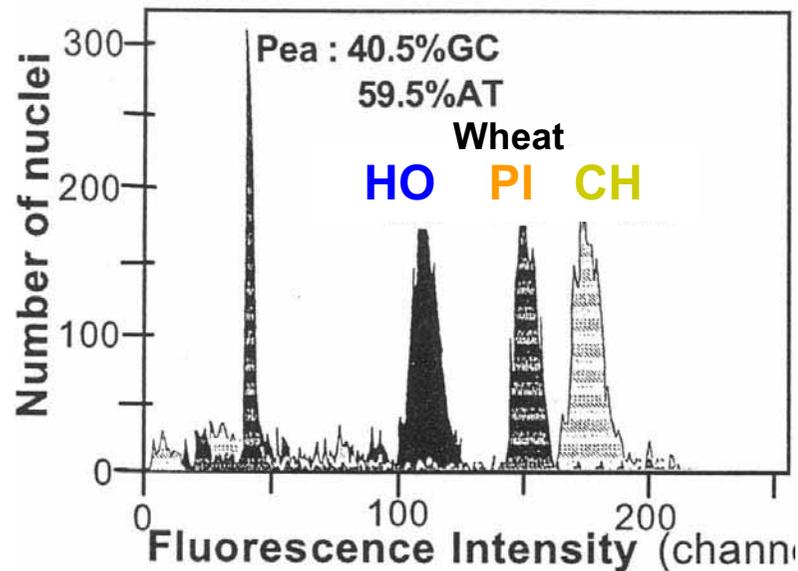
$$\% \text{ GC}_{\text{test}} = \% \text{ GC}_{\text{étalon}} \times (R_{CA} / R_{IP})^{1/3} \quad \text{Equ. 3}$$

Vérification : en principe  $\% \text{ GC}_{\text{test}} + \% \text{ AT}_{\text{test}} = 100$  (%)

**Tableau 1.** Quelques plantes supérieures utiles comme étalon pour la mesure de taille de génome.

Nom courant <sup>a</sup>	Espèce et cultivar	2C ADN (pg) <sup>b</sup>	Composition en base (GC %)
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh ecotype Bensheim	0,33	40,3
luzerne annuelle	<i>Medicago truncatula</i> Gaertn, cv R108-1	0,98	38,1
tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill, cv Roma (ou Montfavet 3/5)	1,99	40,0
pétunia	<i>Petunia hybrida</i> (Hort.) PxPc6	2,85	41,0
luzerne pérenne	<i>Medicago sativa</i> L, subsp <i>x varia</i> (Martyn) Arcangeli cv Rambler A2	3,47	38,7
petit pois	<i>Pisum sativum</i> L, cv Express Long	8,37	40,5
armoïse	<i>Artemisia arborescens</i>	11,43	-
blé	<i>Triticum aestivum</i> L, cv Chinese Spring	30,9	43,7

# Mesure du rapport AT/GC



Intercalants

*versus*

fluorochromes spécifiques de bases

## Mesure du rapport AT/GC

$R_{IP} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'iodure de Propidium (ou bromure d'Ethidium)

$R_{HO} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec l'Hoechst 33342

$R_{CA} = \text{Intensité}_{\text{test}} / \text{Intensité}_{\text{étalon}}$  mesuré avec la Chromomycine A3 (ou la Mithramycine)

$$\% \text{AT}_{\text{test}} = \% \text{AT}_{\text{étalon}} \times (R_{HO} / R_{IP})^{1/5} \quad \text{Equ. 2}$$

$$\% \text{GC}_{\text{test}} = \% \text{GC}_{\text{étalon}} \times (R_{CA} / R_{IP})^{1/3} \quad \text{Equ. 3}$$

Vérification : en principe  $\% \text{GC}_{\text{test}} + \% \text{AT}_{\text{test}} = 100$  (%)

# Mesure de pH cytoplasmique avec BCECF(-AM)

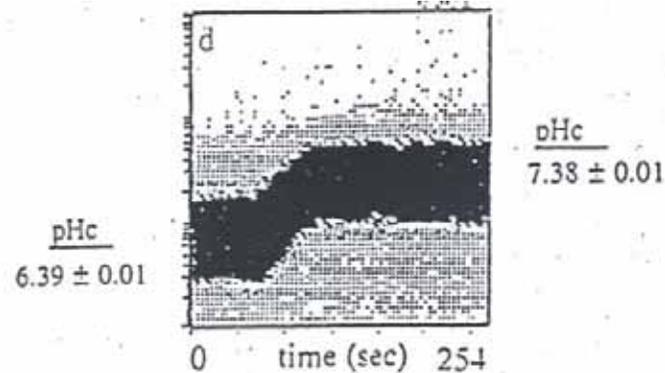


fig 2: Effet de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur le  $\text{pH}_c$  des protoplastes de mésophylle chargés par 10 nM de BCECF-AM. Le cytogramme représente en abscisse le temps et en ordonnée, sur une échelle log, la distribution de l'intensité de fluorescence des protoplastes, la fréquence est indiquée par les différents niveaux de gris. A 20 sec on ajoute 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dans le milieu. Les valeurs correspondantes du  $\text{pH}_c$  sont déduites de la courbe de calibration de la méthode du "point nul".

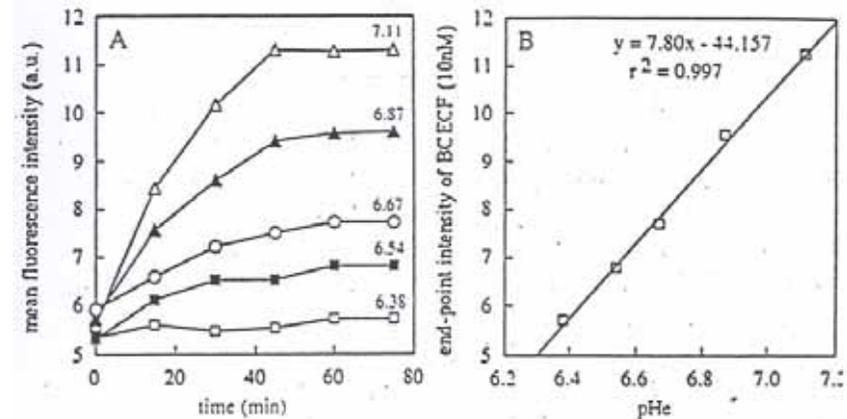
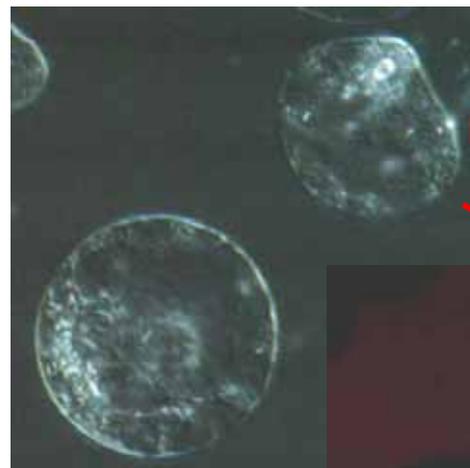


fig 1: Estimation du  $\text{pH}_c$  par la méthode du "point nul". Les protoplastes chargés par BCECF-AM (10 nM) sont lavés et resuspendus dans des tampons sorbitol 0,7 M, 100 mM phosphate de potassium, pH compris entre 6,38 et 7,11. Après l'addition de 2  $\mu\text{M}$  de nigéricine dans le milieu d'incubation, on mesure l'intensité de fluorescence de la sonde au cours du temps. Chaque point représente la moyenne de fluorescence de 15000 protoplastes au temps considéré.

# Analyse d'activités métaboliques

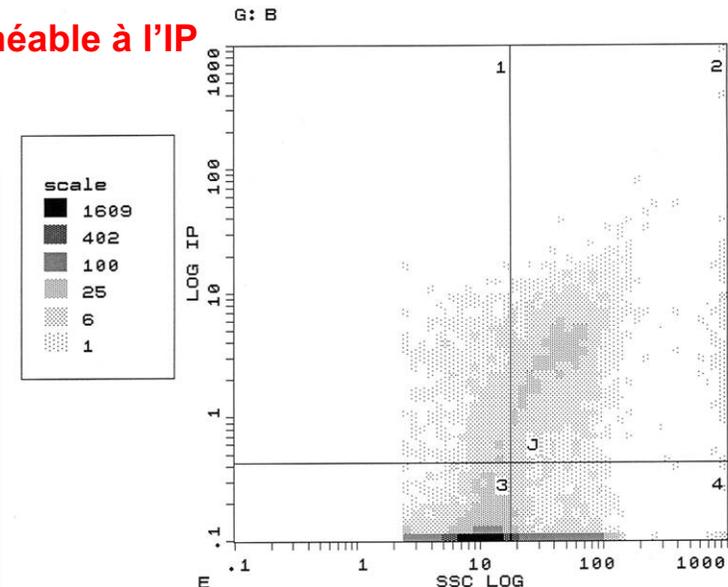
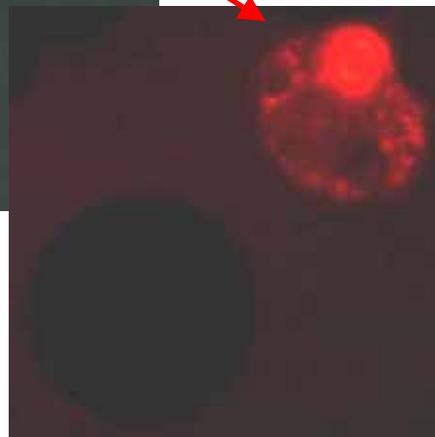
Estimation du stress des cellules :

- Activité oxydative ( $H_2DCFDA$ ),
- Potentiel de membrane (Rhodamine123, DiOC<sub>x</sub>(y), etc.)
- Concentration ionique intracellulaire : pH, calcium
- Quantification Immunologique : fixer les cellules ou les protoplastes
- Teneur en métabolites secondaires : alcaloïdes (Brown et al. 1984)
- Microviscosité membranaire (anisotropie d'émission TMA-DPH)
- Différenciation des cellules mortes et vivantes (CFDA, iodure de Propidium ...)



Protoplaste vivant, parfaitement rond  
et imperméable à l'IP

Protoplaste perméable à l'IP

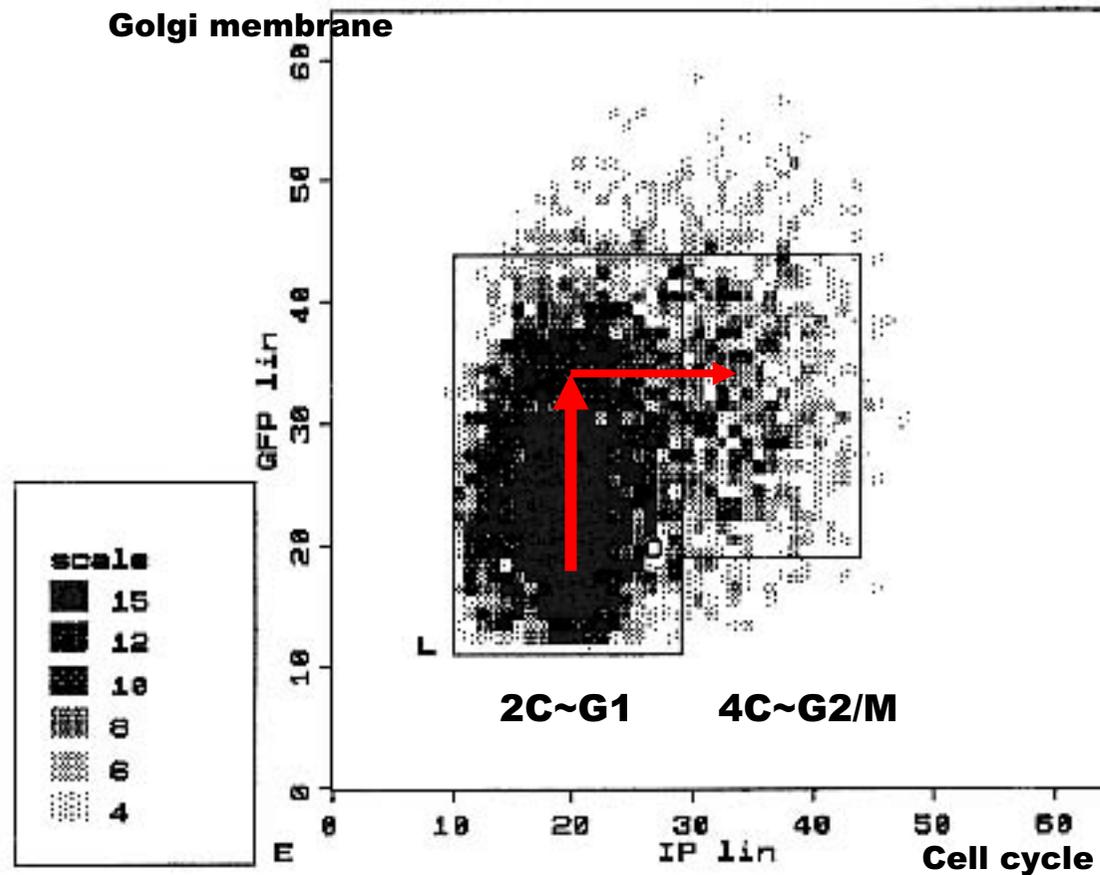


# Détection de la Green Fluorescent Protein (GFP)

## Variation de membrane golgienne au cours du cycle cellulaire

membranes golgiennes marquées avec un motif sialyl transférase::GFP, cycle cellulaire mesuré à l'IP

Protoplastes fixés avec PFA 3%, 20 min.



# Tri de protoplastes et d'organites

C. Bergounioux et coll.

Tri d'hétérofusions de protoplastes

- buse 140  $\mu\text{m}$ , 17 kHz, gaine osmotique : sorbitol

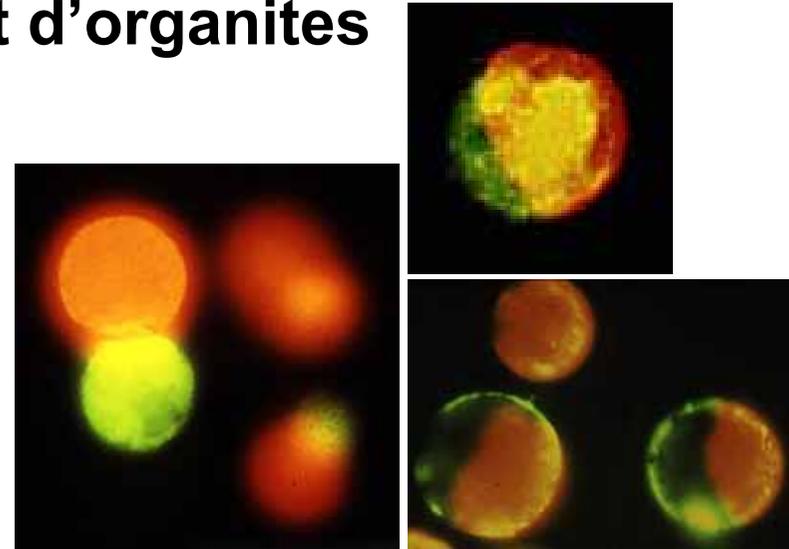
En rouge : cellules de mésophylle de *Petunia* :

**fluorescence rouge provenant des chlorophylles.**

En vert, protoplastes de tabac provenant de cals étiolés.

**Membrane plasmique marquée au FITC.**

*... et plantes régénérées !*

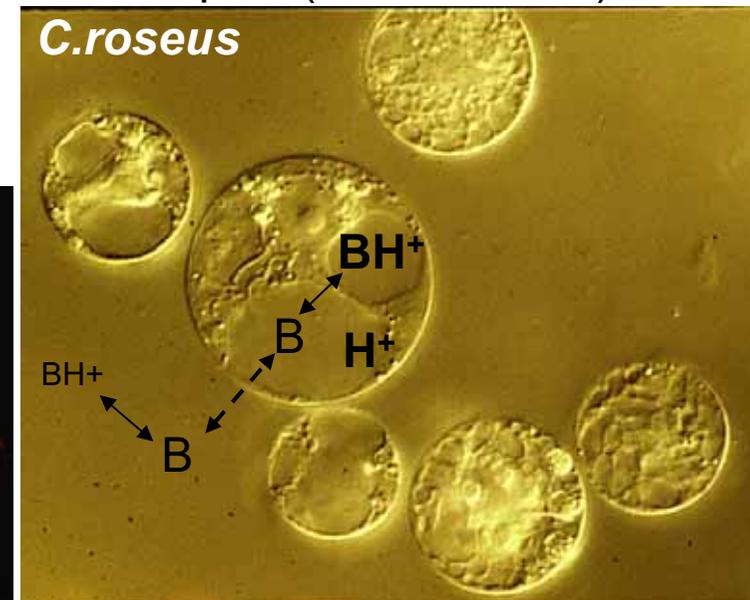
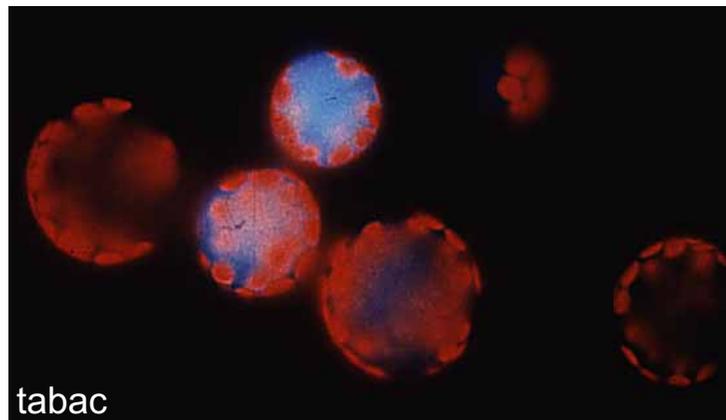


J. Guern, J-P. Renaudin (1986)

chez *Catharanthus roseus*

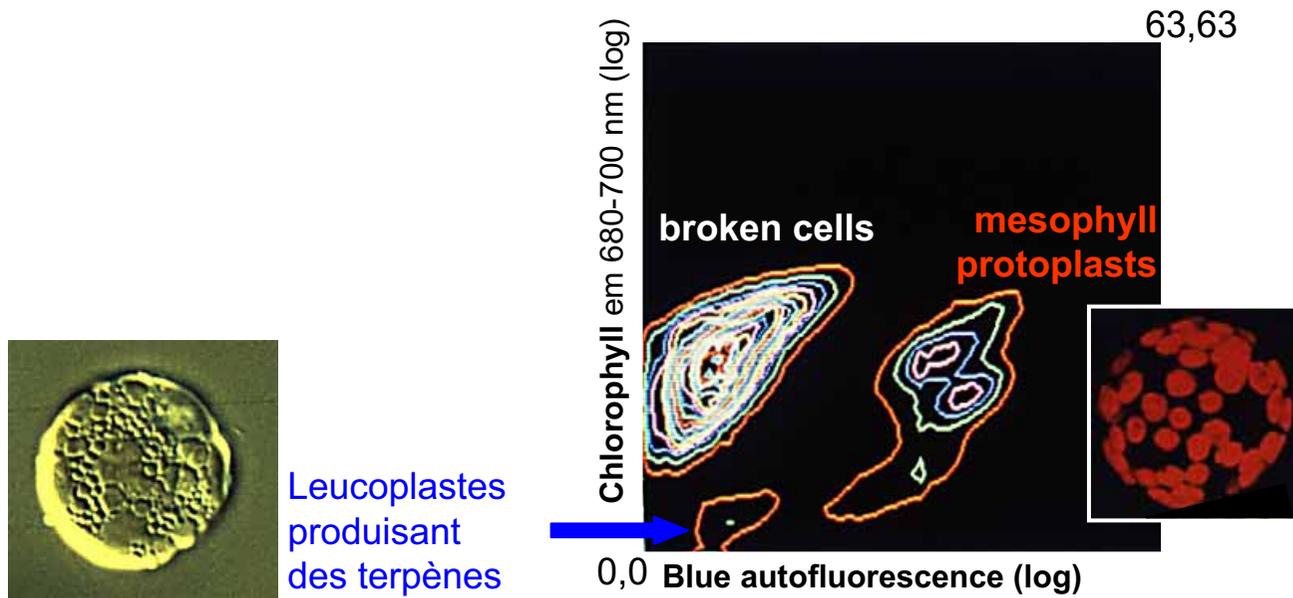
Rôle du pH vacuolaire dans l'accumulation d'alcaloïdes indoliques (bases faibles).

Etablissement de lignées cellulaires à fortes potentialités de production d'alcaloïdes.



# Tri de cellules particulières

Tri pour analyses biochimiques de cellules non-chlorophylliennes productrices de terpènes dans les poches sécrétrices de Calamondin (*Citrofortunella mitis*)



# Tri de noyaux et chromosomes de *Petunia*

a: 50.000 noyaux G1 triés sur filtre

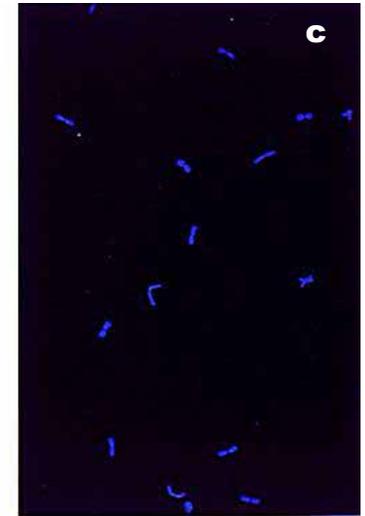
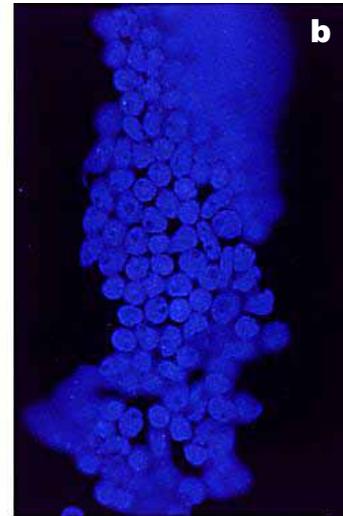
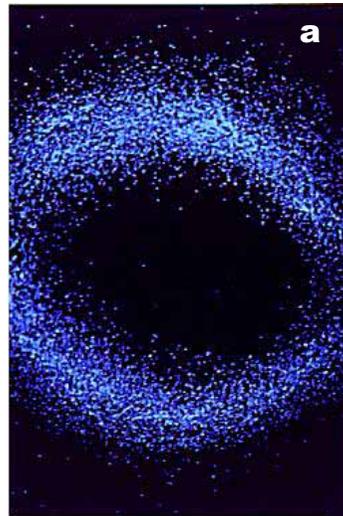
b: Zoom

c: chromosomes sur une lame

*J. Conia, C. Bergounioux et coll. (1986);*

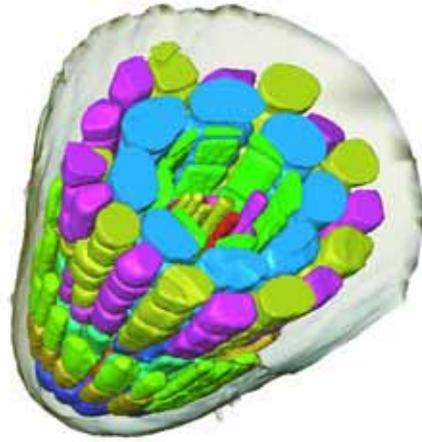
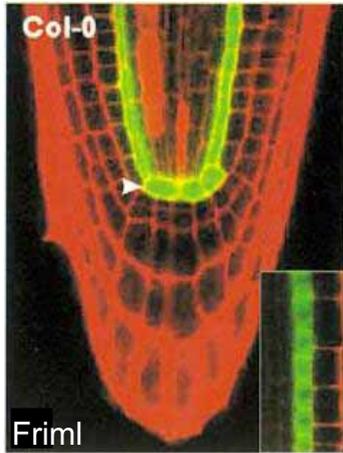
*J. Veuskens, I. Negrutiu et coll. (1991)*

*JP Accotto, B. Gronenborn et coll. (1992)*



Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN (2003).

**A gene expression map of the *Arabidopsis* root.** *Science* 302: 1956-60.

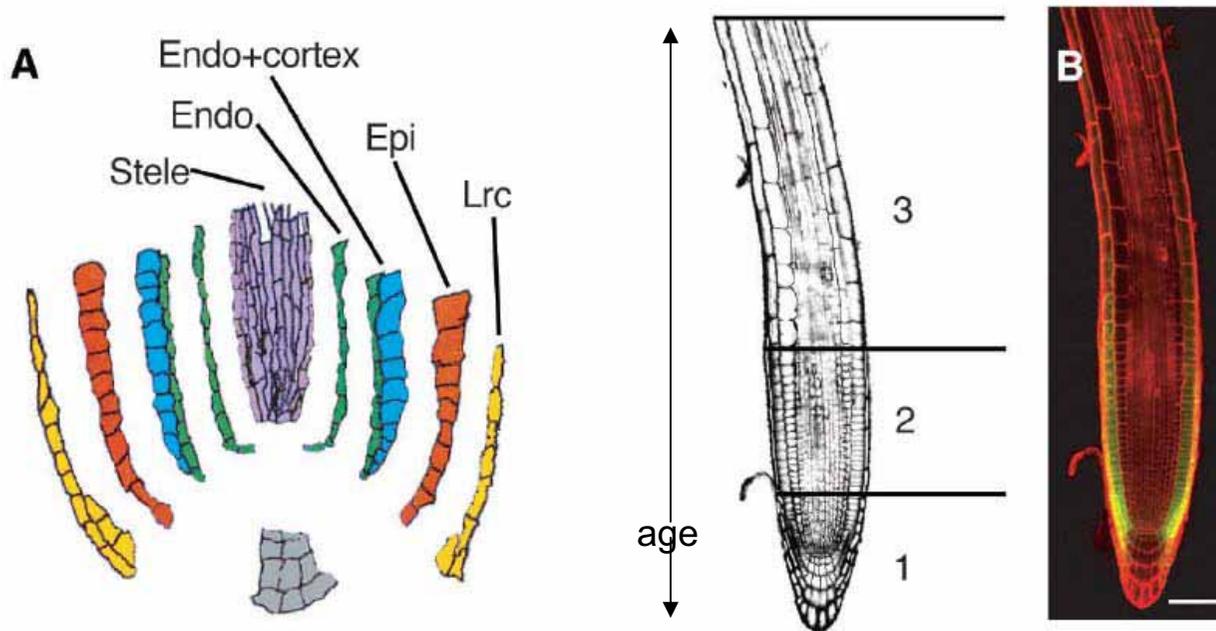


***Pour une analyse du transcriptome, comment isoler les différents types cellulaires ?***

***- laser micro-dissection ?***

***- cytométrie : preparation et tri de 10<sup>7</sup> protoplastes en 90 minutes***

Enhancer trapping GFP... racine, J.Haseloff (2003)



# **Applications de la cytométrie en flux sur le phytoplancton marin**

- **Discrimination et comptage des cellules d'après leurs propriétés optiques**
  - **Groupes cytométriques (→ phytoplancton)**
- **Contenu pigmentaire et variations**
  - **Photoacclimation**
- **Croissance**
- **Prédation sélective**
- **Cycle cellulaire**
- **Etudes sur échantillons naturels ou cultures (toxicologie, physiologie)**
  - **Viabilité, stress, respiration, ...**



# Importance du Plancton

D'après Sieburth <i>et al.</i> , 1978	Size ( $\mu\text{m}$ )	g/cell	Concentration (cell/ml)	
<b>FEMTO-plancton</b>	0.02-0.2	$10^{-15}$	$10^8-10^7$	→ virus
<b>PICO-plancton</b>	0.2-3	$10^{-12}$	$10^5-10^6$	→ bactéries, algues
<b>NANO-plancton</b>	3-20	$10^{-9}$	$10^2-10^3$	→ bactéries, algues, protistes

- Picoplancton = 50 to 90 % de la biomasse des régions pauvres en sels nutritifs (oligotrophes)

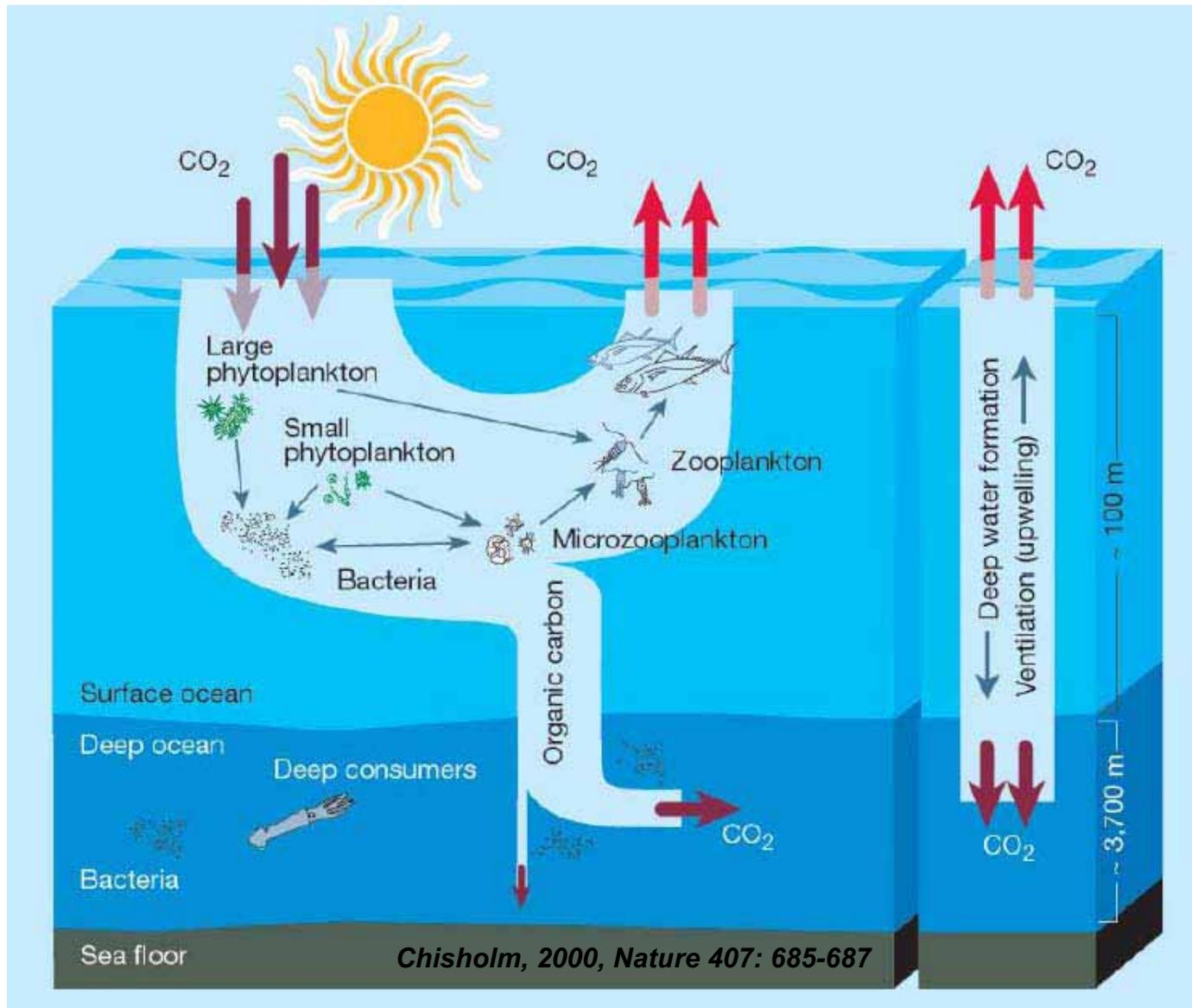
## Le saviez vous?

**Microorganismes unicellulaires aquatiques de 0,2 -100  $\mu\text{m}$   
→ 50% de la biomasse totale de la planète**

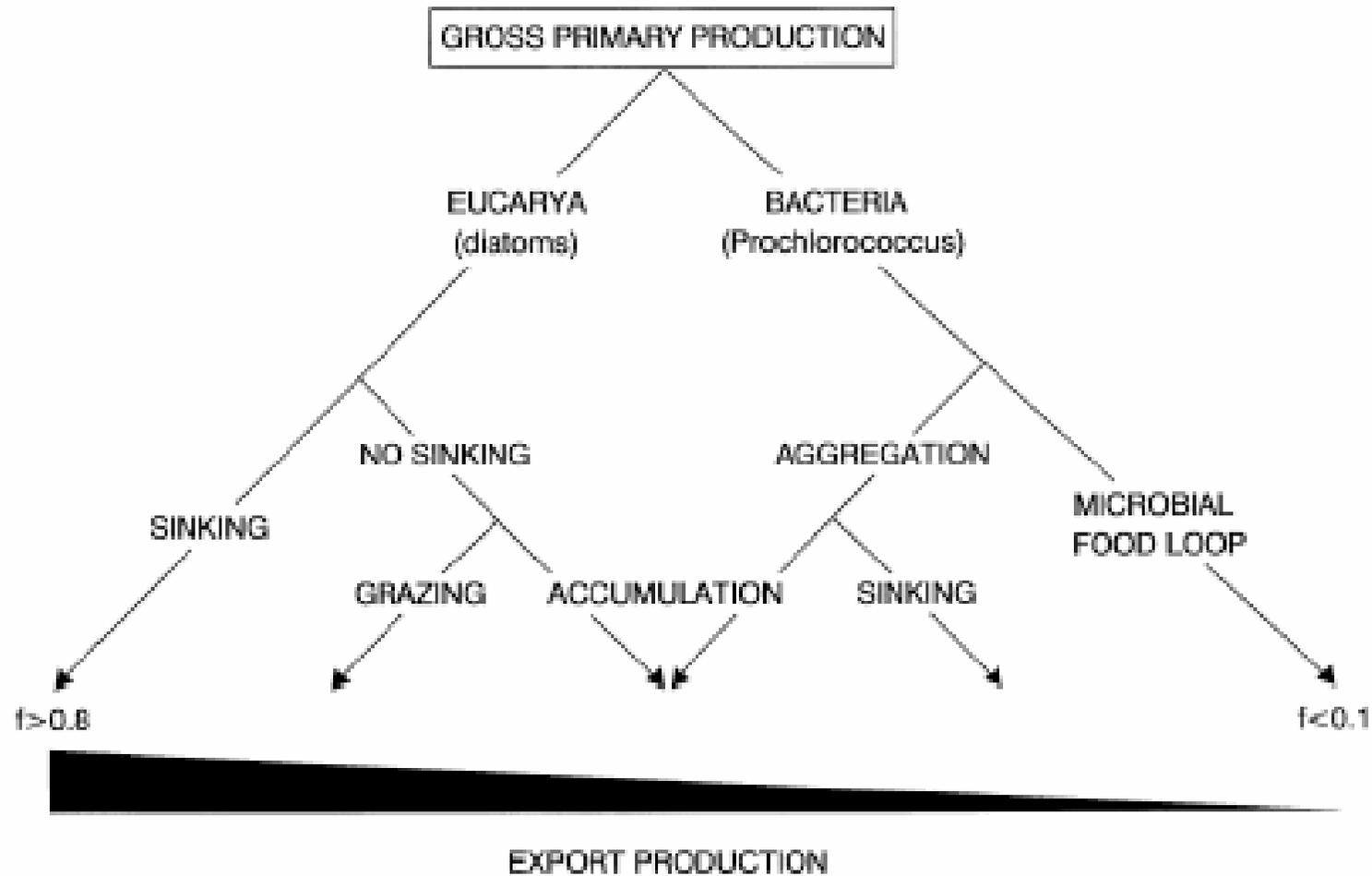
	<b>Pg Carbon (<math>10^{15}\text{g}</math>)</b>
<b>Phytoplancton</b>	<b>3 – 4</b>
<b>Bactéries</b>	<b>2.8 - 13.7</b>
<b>Virus</b>	<b>0.027 – 0.27</b>
<b>Cétacés</b>	<b>0.0041 – 0.012</b>
<b>Humains</b>	<b>0.03</b>

**“Life on Earth is microscopic!” (Sean Nee, 2004)**

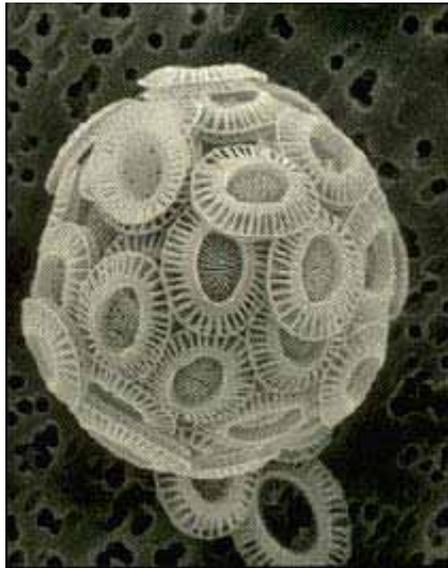
# Microorganismes et écosystème



# Flux biogéochimiques : une fonction de la structure communautaire

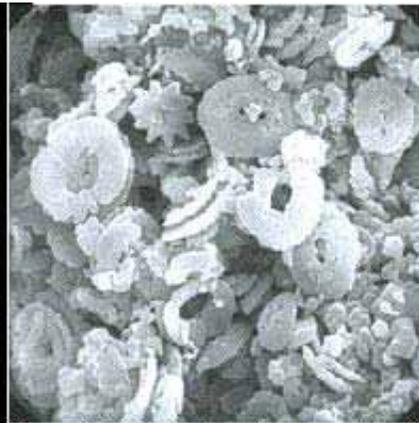


# Exemple de piégeage du C par une micro-algue



082925 8KV X8.00K 3.8um  
Dr. Jeremy R. Young, Natural History Museum (London)

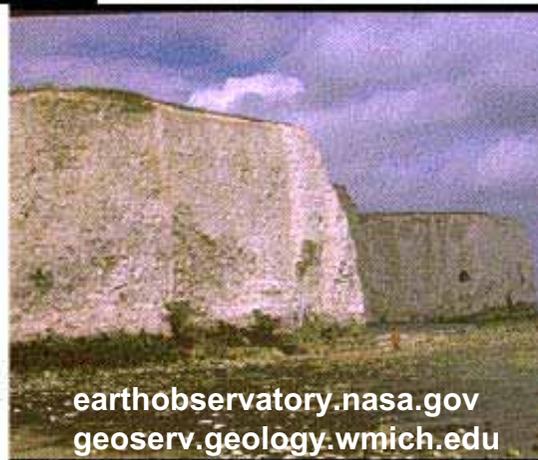
SEM photomicrograph (082925) of a coccolith -- the calcareous heterococcolith, *Emiliania huxleyi*.



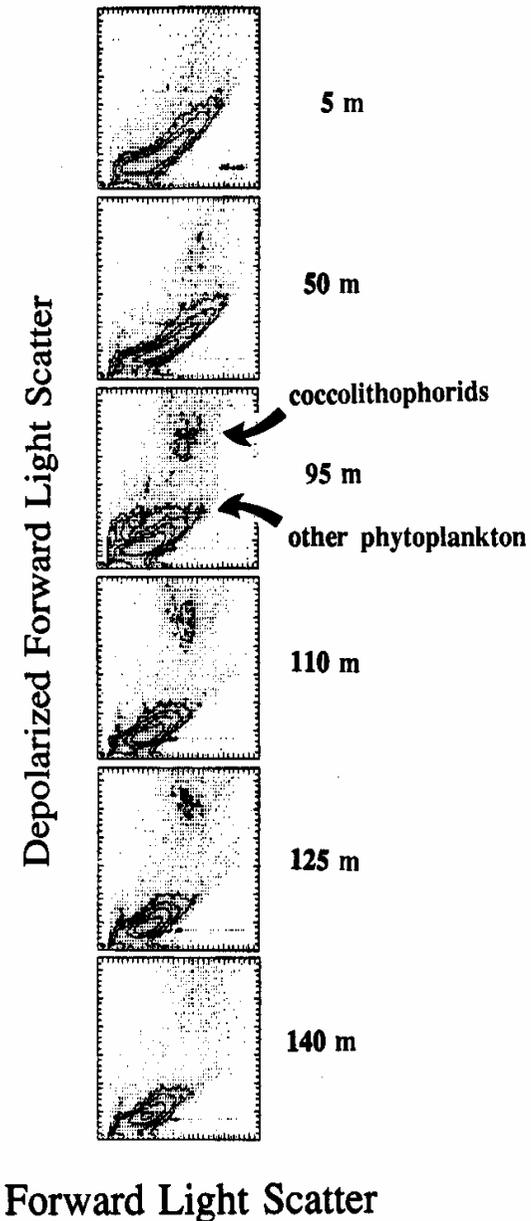
Biogenic (biological) sediment contributions: Scanning electron photomicrograph of a deep-sea nannofossil ooze. Note abundant coccolith plates and almost complete lack of cementation, common in these stable, low-Mg calcite deposits. Some traces of water-column or sea-floor dissolution are visible.

DSDP Leg 12, core 116, 422 m depth, Histon-Rockall area, North Atlantic Ocean

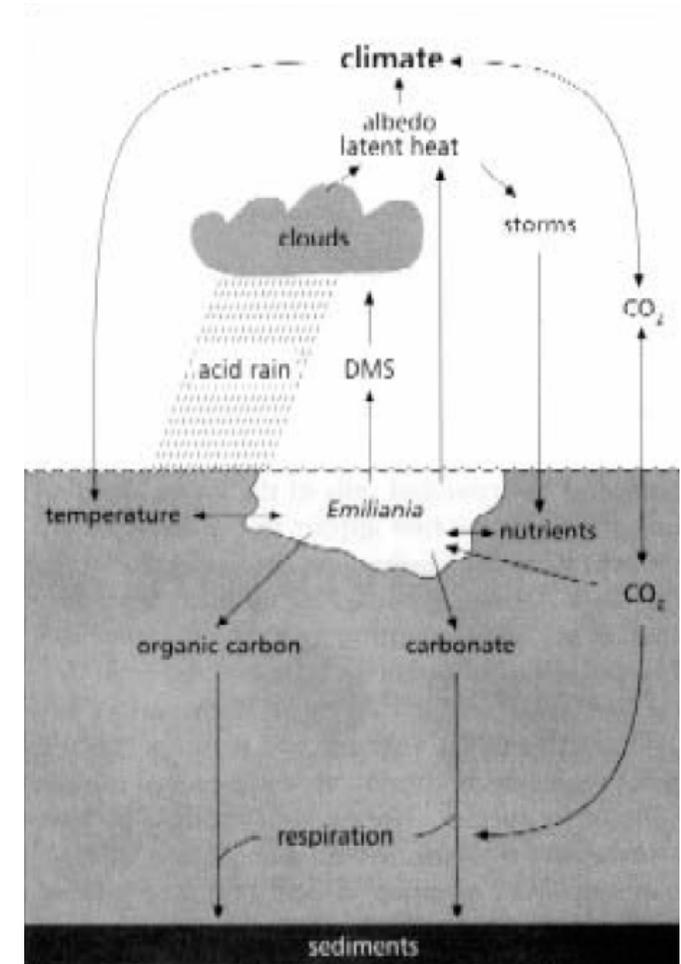
Biogenic (biological) sediment contributions: a pure **pelagic chalk** section on the British coast, the area where the term chalk was first applied. These units are approximately 99 percent **carbonate**, and consist mainly of the remains of **coccoliths** (calcareous nanoplankton) and planktic foraminifers. Because these groups of organisms are common only in Cretaceous and younger strata, the term "chalk" is strictly applicable only to Cretaceous to Recent deposits dominated by such micro- and nano-fossils. Note also the wave-cut platform.



earthobservatory.nasa.gov  
geoserv.geology.wmich.edu



# Bloom de *E. Huxleyi* et impact à l'échelle globale



[www.jochemnet.de](http://www.jochemnet.de)

# Prise de conscience du rôle majeur joué par les microorganismes

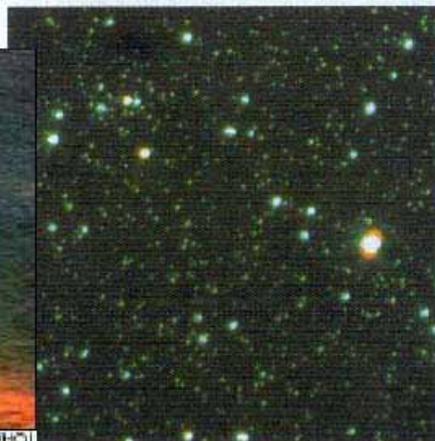
**news feature**

*Copley, Nature 2002 415: 572-574*

## All at sea

The oceans are full of microorganisms, which are thought to cycle nutrients and mediate climate on a global scale. Despite these environmental consequences, marine microbial biodiversity remains poorly understood. Jon Copley reports.

**The role that the ocean plays in structuring the Earth climate is driven by microorganisms (P. Burkill)**



Send in the marines: researchers such as Ed DeLong (pictured) are finding fresh traits among oceanic microbes (inset). Looking like stars, these organisms outnumber their stellar counterparts.

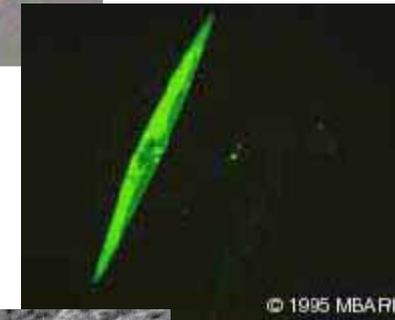
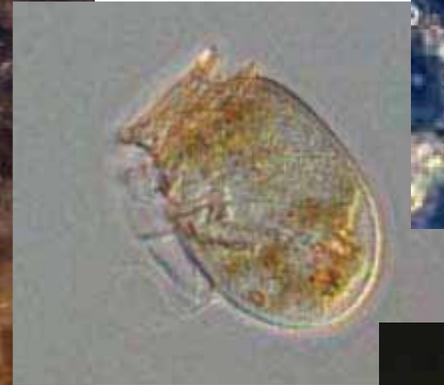
Falkowski of Rutgers University in New Brunswick, New Jersey, and his colleagues came across one of them by accident.

Falkowski's group was hunting for photosynthetic microbes called  $\alpha$ -proteobacteria in the waters around deep-sea vents, reasoning that the incredibly faint glow from the vents might just be sufficient to support photo-

Courtesy of WHOI

© 2002 NATURE PUBLISHING GROUP

# Toxicité de certaines espèces



© 1995 MBARI



© European Communities, 1995-2003



19 copyright Larry Fritz

# Méthodologie classique pour l'identification et le comptage des cellules



Echantillonnage en mer Méditerranée  
(campagne POTES Mer, 2007)

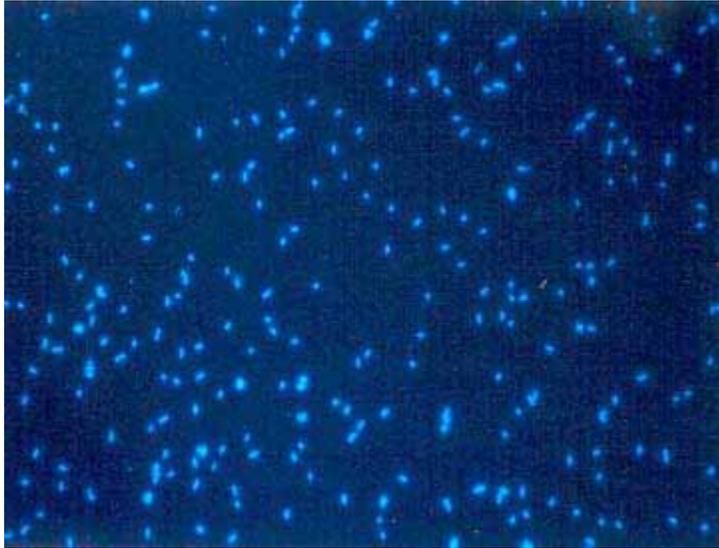


Analyse  
traditionnelle



Analyse par  
cytométrie en flux

# Microscopie à épifluorescence : la méthode standard ... jusqu'en 1995

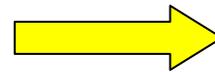


Site	Cell.ml <sup>-1</sup>	CV (%)
Réservoir eutrophique	1.68 10 <sup>7</sup>	20
Méditerranée côtière 1	3.63 10 <sup>5</sup>	15
Méditerranée côtière 2	2.56 10 <sup>5</sup>	5.3
Mésocosmes	1.03 10 <sup>6</sup>	8.2

(source: P. Gasol)

# Différents types de cytomètres en flux utilisés en écologie microbienne marine

- Cytomètres en flux (analyseurs) de paillasse



**Analyses des cellules**

- Cytomètres en flux analyseurs-trieurs



**Analyse des cellules  
+  
tri**

# Acquisition des données

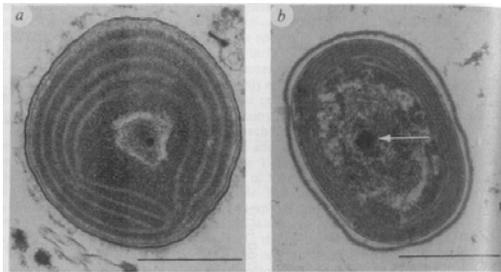
- **Plusieurs variables enregistrées :**
  - **2 diffusions :**
    - Aux petits angles (DPA) → En relation avec la **taille** des particules
    - A 90° → En relation avec la **structure interne** des particules
    - Polarisation (DPA parallèle et perpendiculaire)
  - **Plusieurs gammes de fluorescence :**
    - **Verte** (515-530 nm)
    - **Orange** (565-592 nm)
    - **Rouge** (620-650 nm)
    - **Rouge lointain** (>650 nm)
    - **Etc...**
- **Données acquises en temps réel en mode liste**

# Importantes découvertes réalisées par cytométrie en flux

- ***Prochlorococcus* (cyanobactérie)**

= le plus petit procaryote photoautotrophe et le plus abondant sur la planète

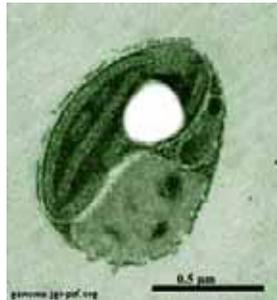
Chisholm, 1988, *Nature* 334



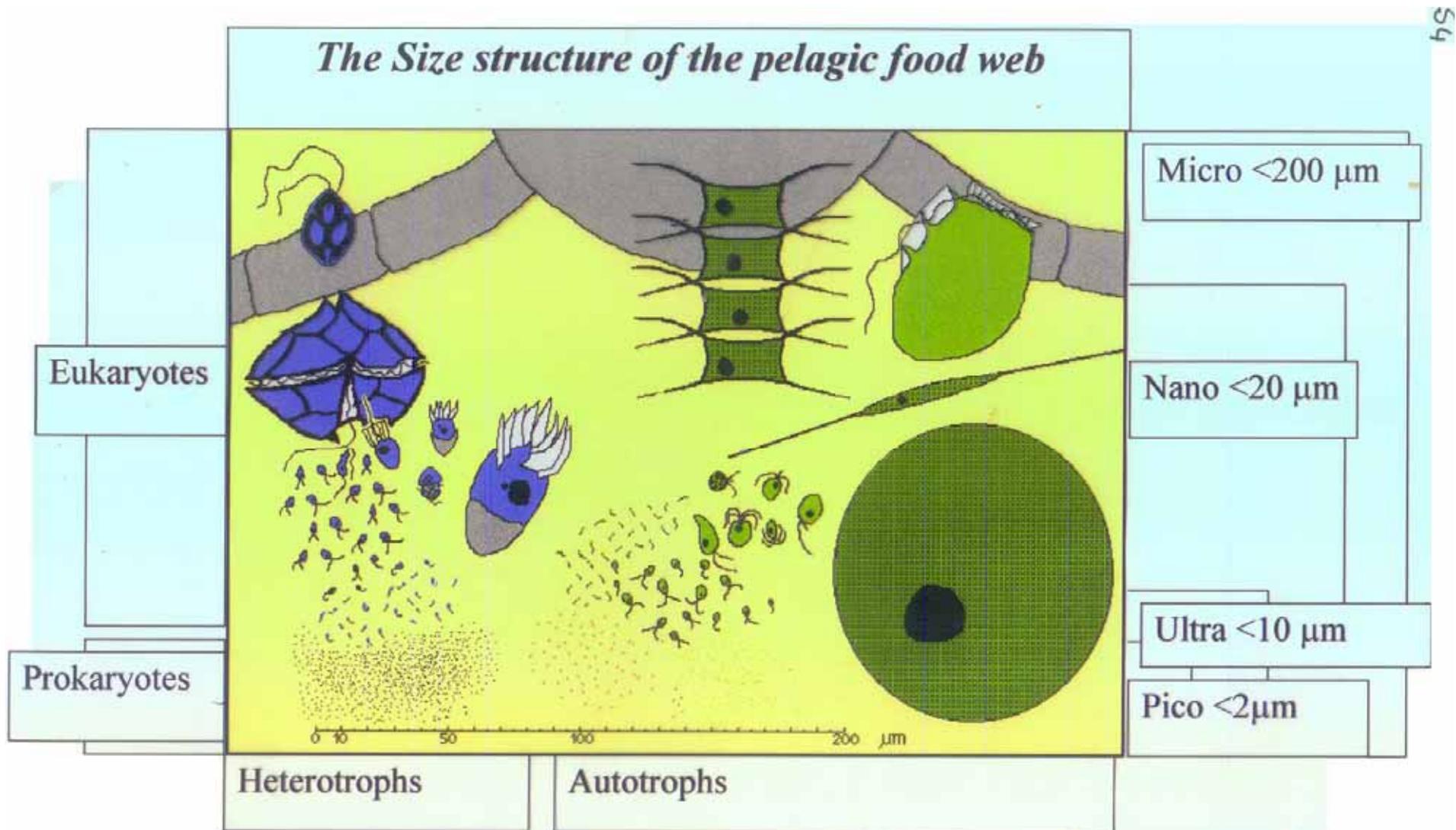
- ***Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae)**

= le plus petit eucaryote unicellulaire connu a ce jour  
(découvert dans l'étang de Thau, France)

Courties *et al*, 1998, *J Phycol* 34

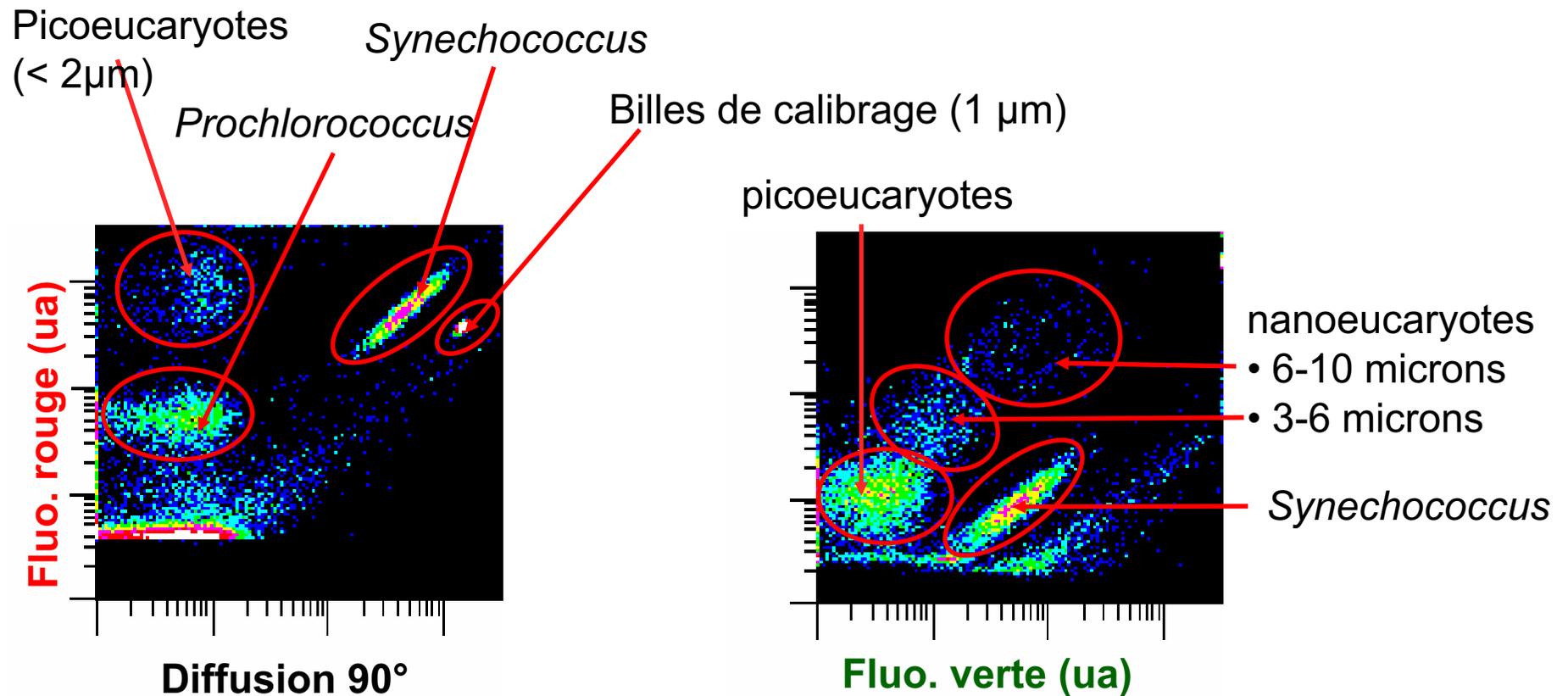


# Complexité des micro-organismes marins pélagiques: Un problème de taille!!!



# Autofluorescence du phytoplancton (taille <10 micron)

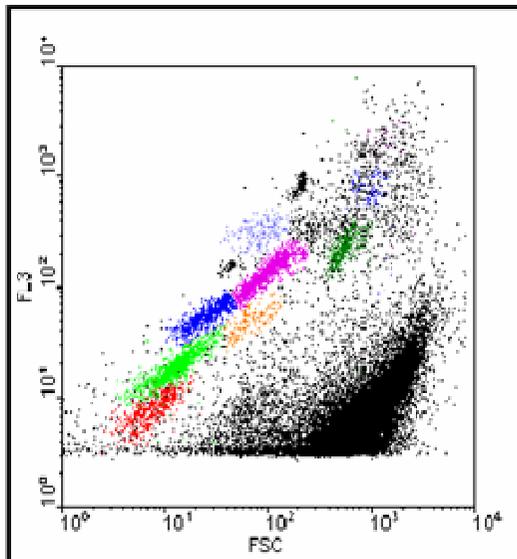
Pigment	Laser excitation (nm)	Fluorescence (nm)
Chlorophylle	488	>650
Phycoérythrine	488	575 ; 585
Phycocyanine	633	650 ; 660



# Groupes taxonomiques caractérisés par leurs propriétés de diffusion et de fluorescence

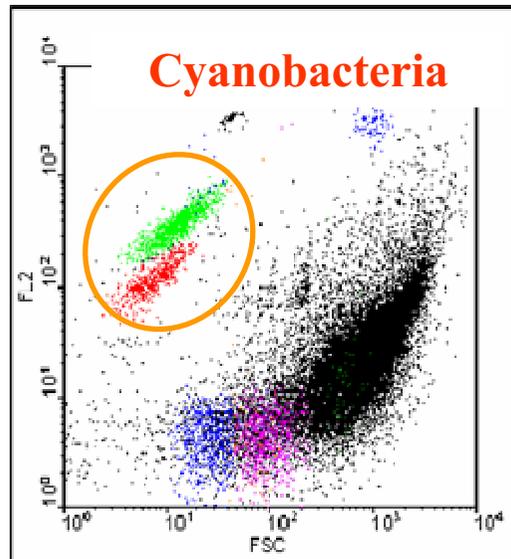
**Chlorophylle vs FS**

$\lambda_{ex}$  : 488 nm  
→ Fluo. rouge  
Pytoplancton



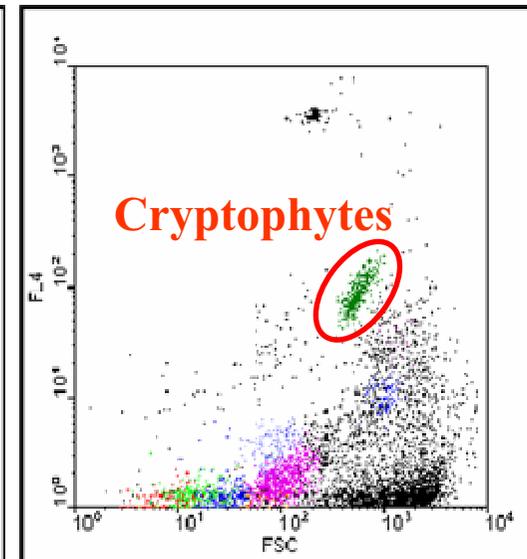
**Phycoérythrine vs FS**

$\lambda_{ex}$  : 488 nm  
→ Fluo. orange  
Cyanobacteria,

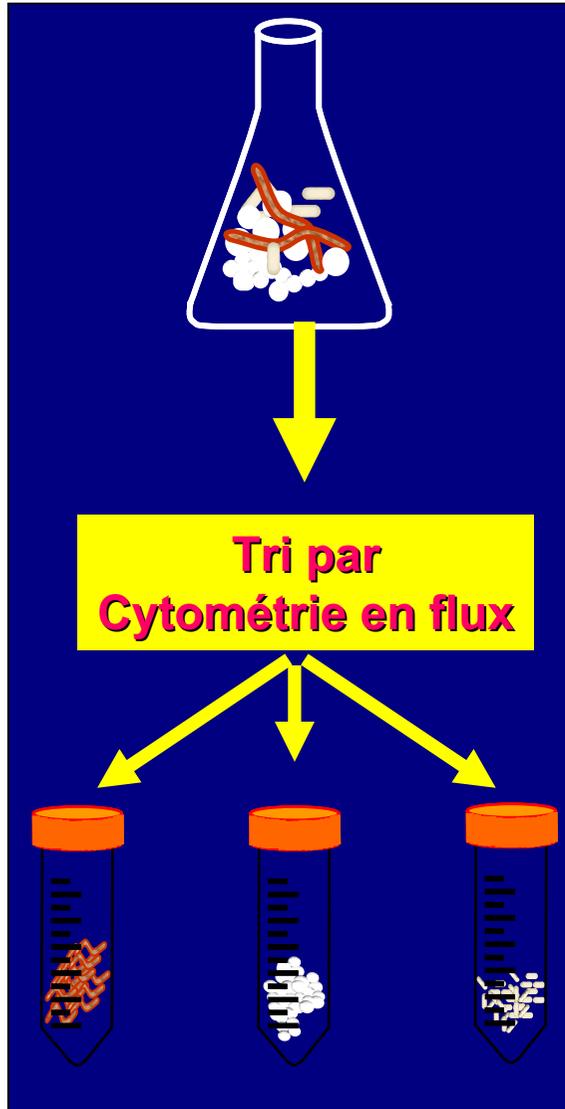


**Phycocyanine vs FS**

$\lambda_{ex}$  : 633 nm  
→ Fluo. rouge  
Cryptophytes



# Tri cellulaire par cytométrie en flux



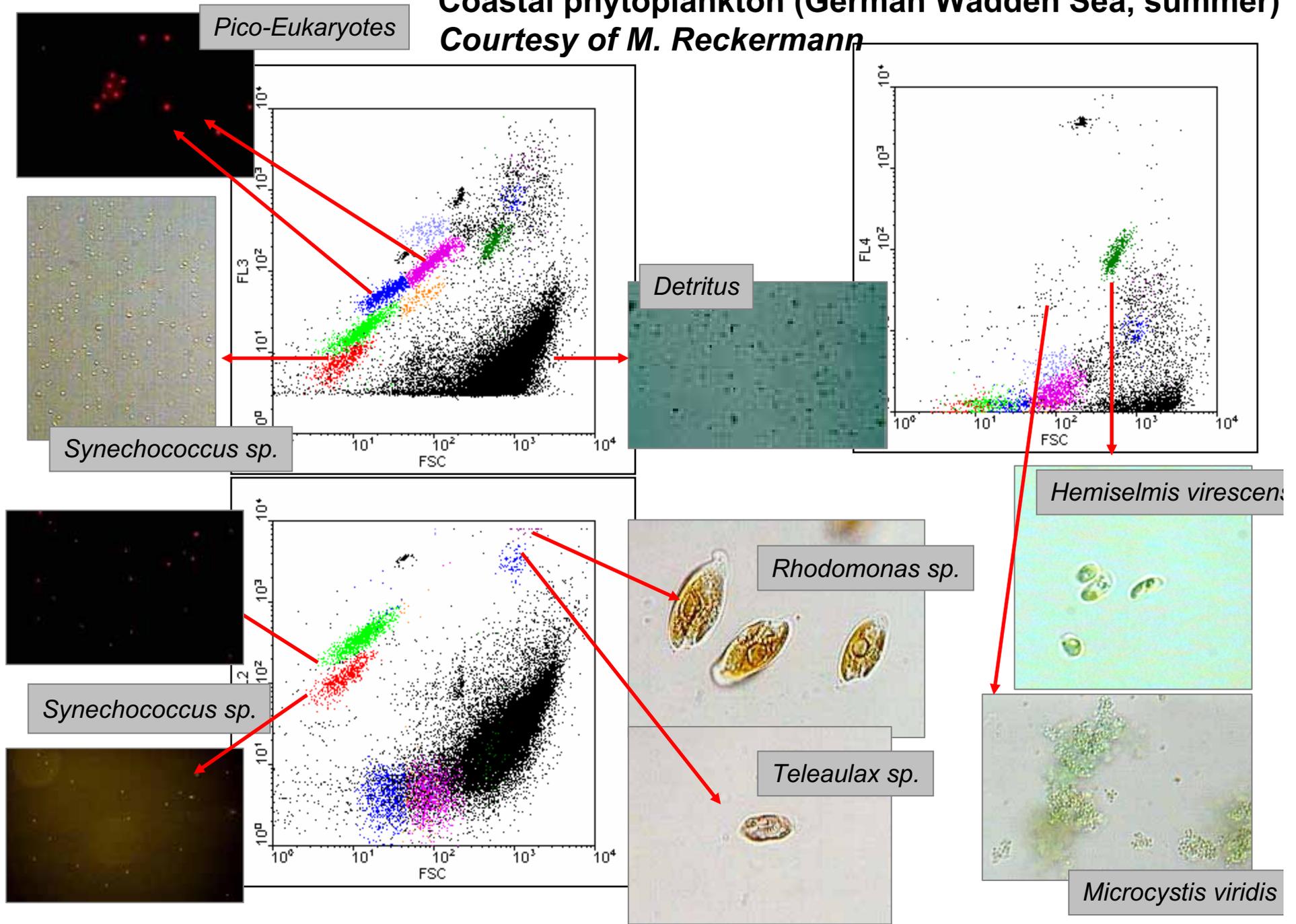
## Echantillon hétérogène

- Diversité spécifique
- Diversité physiologique (cellules vivantes / mortes)

- Séparation physique des cellules d'intérêt
- Concentration des « cellules moins abondantes »
- Maintien de la viabilité

- Analyses ultérieures  
(biologie moléculaire, protéomique)
- Mises en culture
- Observation microscopique

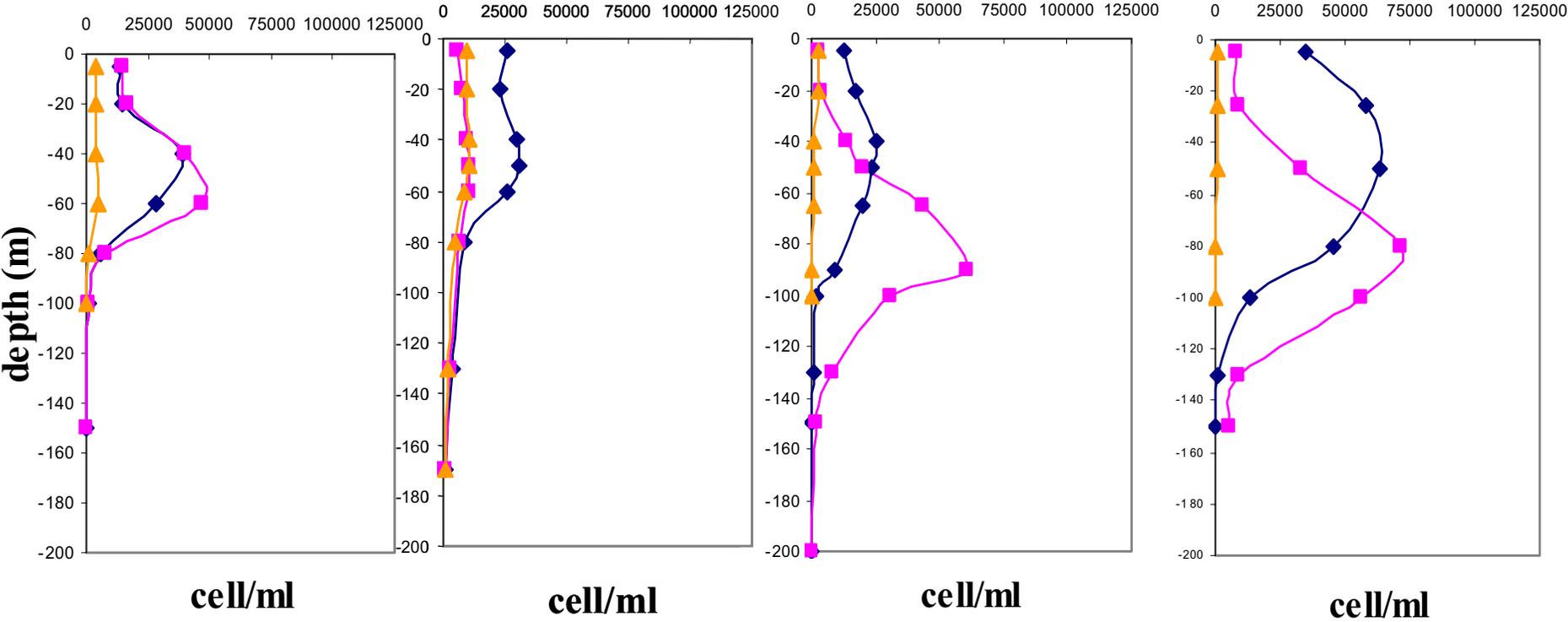
# Coastal phytoplankton (German Wadden Sea, summer) Courtesy of M. Reckermann



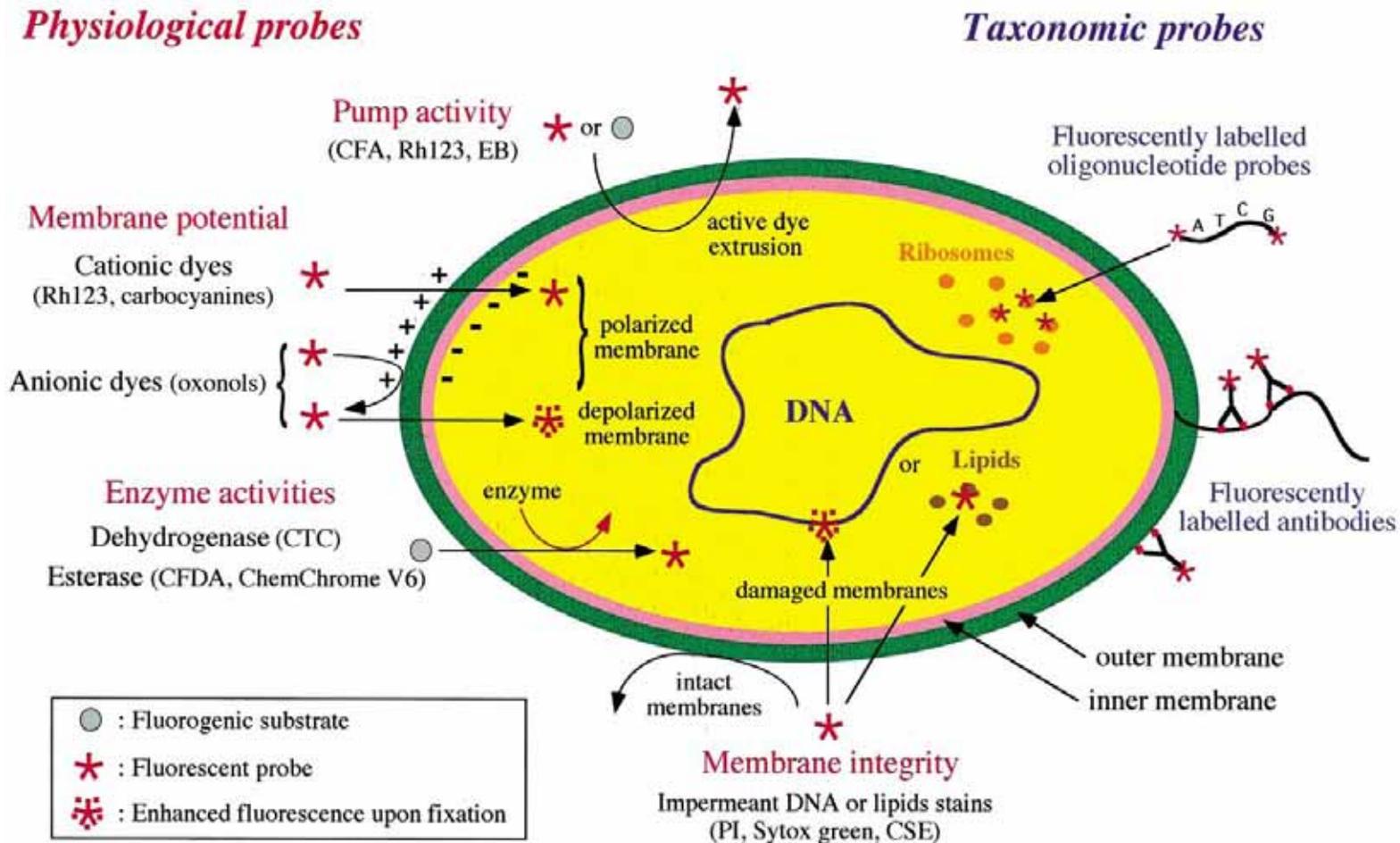
# Application *in situ* :

## Distribution spatio-temporelle du phytoplancton

◆ syn    ■ pros    ▲ euk



# Fluorochromes : Taxonomie et état physiologique des cellules

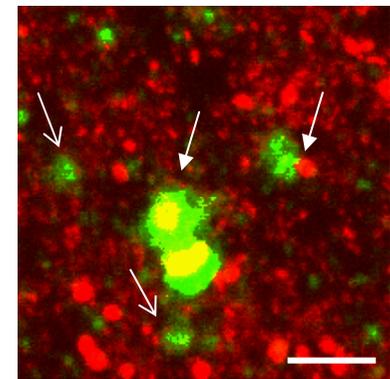
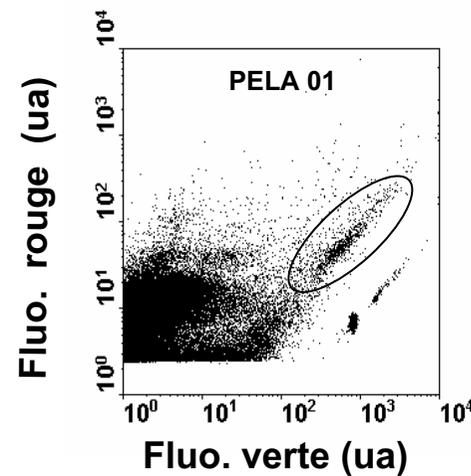
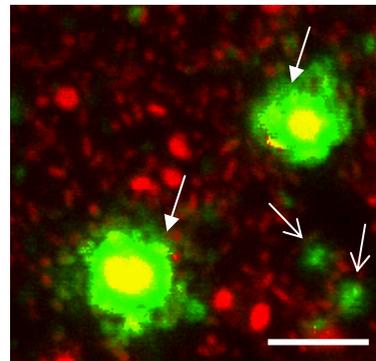
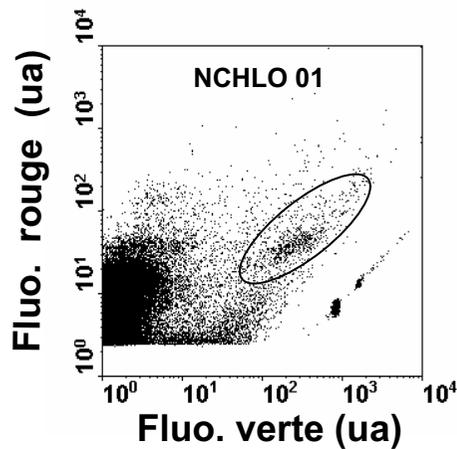


Joux *et al.*. *Microbes and Infection*, 2, 2000, 1523–1535

Limitation : les fluorochromes doivent pouvoir pénétrer les enveloppes cellulaires

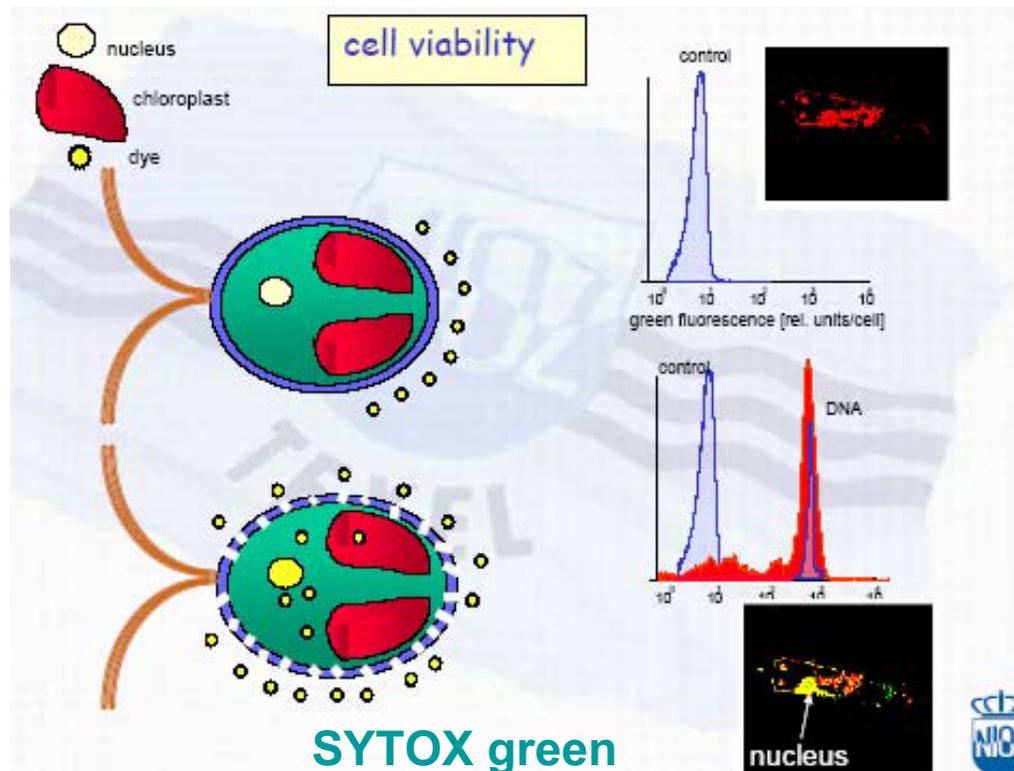
# Identification (→ Qui?)

- Développement de sondes moléculaires spécifiques pour cibler des individus (espèces?) clés (FISH)
- Suivre ces individus dans le milieu naturel (abondances)
- Evaluer comment ils sont affectés par des changements biotiques et abiotiques naturels ou anthropiques.



# Viabilité cellulaire (→ Viable? Mort?)

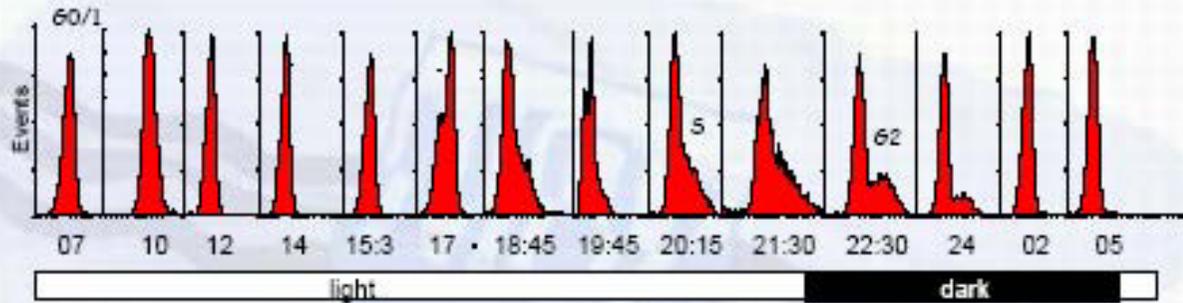
- Seules les cellules vivantes sont responsables des activités observées *in situ*
- Caractérisation des facteurs (naturels ou anthropiques) qui influencent la viabilité



Test basé  
sur l'intégrité  
des membranes

# Cycle cellulaire

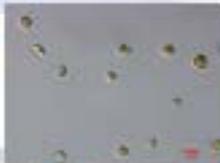
*Phaeocystis globosa*: single cells and two morphotypes of colony cells



Limitations:

- Cellules fixées
- Colorant stœchiométrique

$$\mu_{\text{GRR}} = \frac{1}{S + \Omega_0} \int_0^{24} \ln[1 + fS + \Omega(t)] \, (d\eta)^{-1}$$



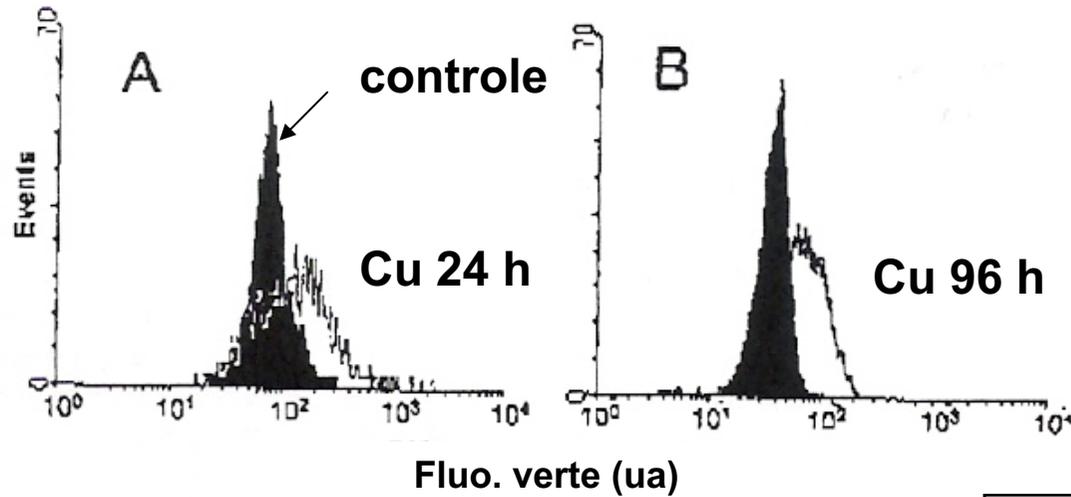
Gross growth rate (d<sup>-1</sup>) Day 4:

single cells	: 0.68 d <sup>-1</sup>
colonial cells	
high chlor fl	: 1.5 d <sup>-1</sup>
low chlor fl	: 1.25 d <sup>-1</sup>



# Viabilité et activité cellulaire

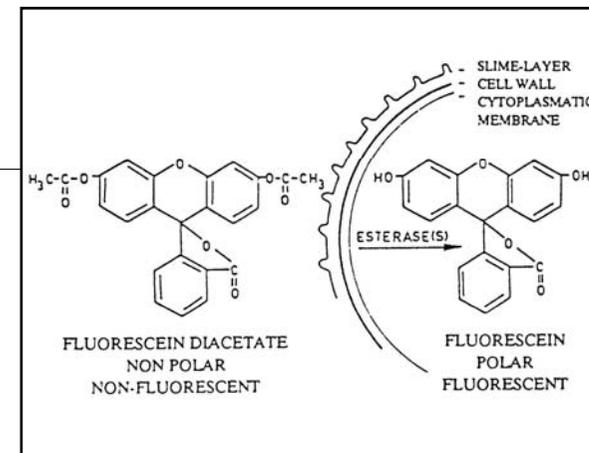
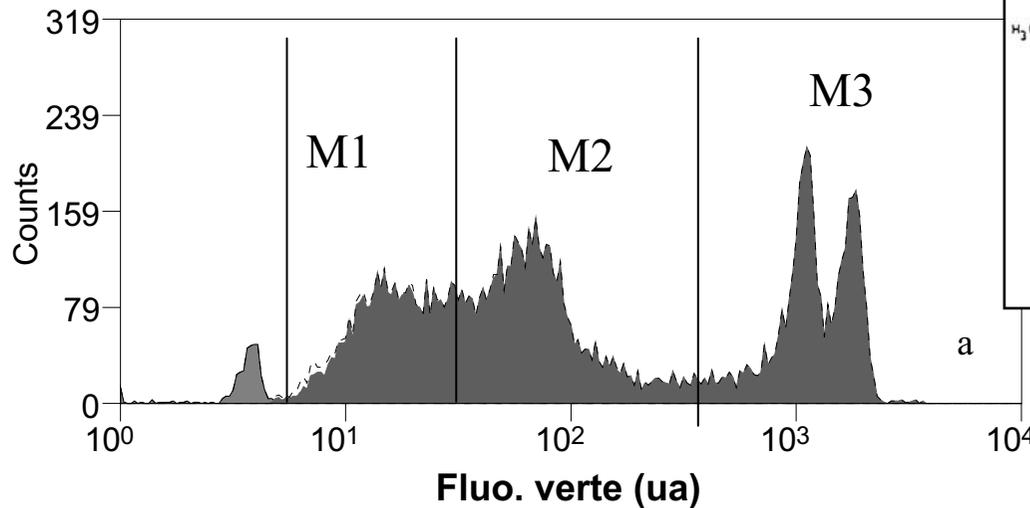
- Potentiel de membrane par le DiOC<sub>6</sub>(3)



*Phaeodactylum tricornutum*

Cid et al. 1996 Cytometry 25: 32

- Activité estérase par le CFDA

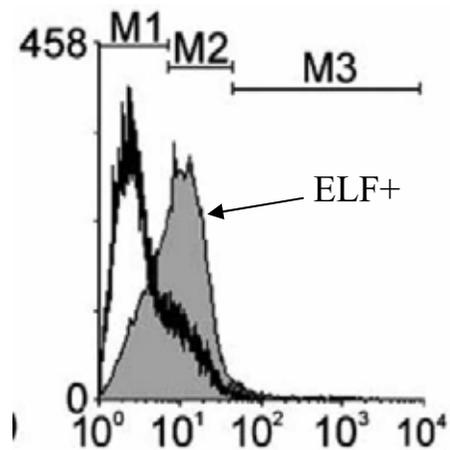
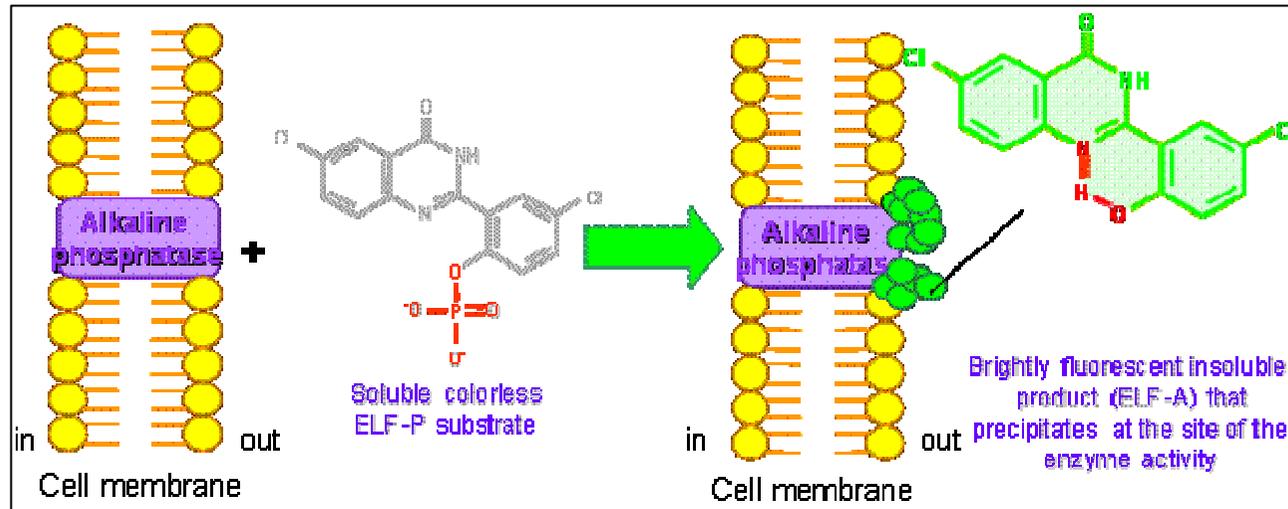


*Thalassiosira weissflogii*

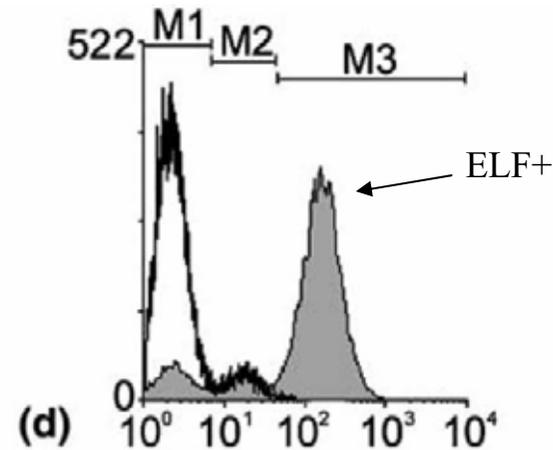
Casotti et al. 2005 JPhycol

# Activité enzymatique: Activité Phosphatase alcaline par le ELF 97

ELF = Enzyme Labeled Fluorescence



Phosphore disponible



Appauvri en Phosphore

*Synechococcus  
elongatus*

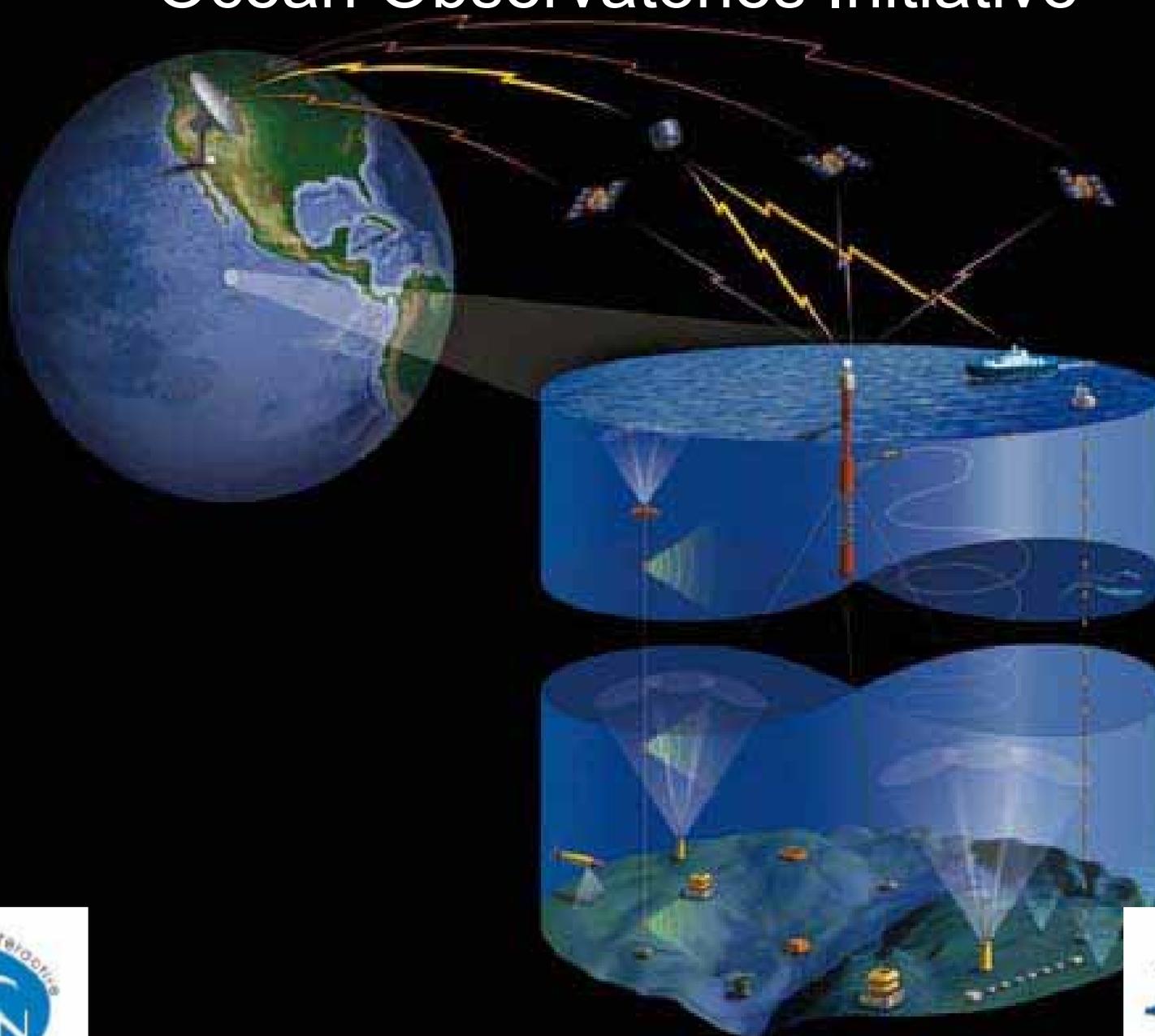


## OCEAN OBSERVATORIES INITIATIVE

Major advances in our understanding of the oceans are currently limited by our ability to make sustained observations over large areas. Continuous, long-term measurements of physical, chemical, geological, and biological variables in the oceans and the seafloor below are required to understand trends and cyclic changes and to capture episodic events such as major earthquakes and harmful algal blooms. Enhanced capabilities for making sustained measurements of the ocean will open up new research opportunities and lead to improved detection and forecasting of environmental changes and their effects on biodiversity, coastal ecosystems, and climate. These advances will provide the tools for improved management of ocean resources such as fisheries, and better-informed decisions on the use of the coastal zone for recreation, development, and commerce. The National Science Foundation's (NSF) Ocean Research Interactive Observatory Networks (ORION) Program will capitalize on new technical capabilities provided by Ocean Observatories Initiative (OOI) infrastructure to meet this recent convergence of basic research and societal needs.



# Ocean Observatories Initiative



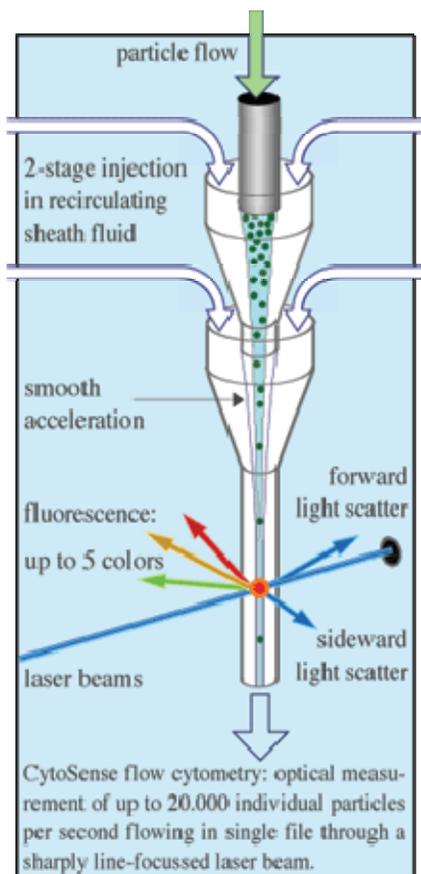
*R. Casotti -*



## Evolution pour analyser:

- **Particules (cellules) de grande taille (mm)**
- **Colonies et chaînes**
- **Faibles abondances ( $< 10^2$ - $10^3$  cell.ml<sup>-1</sup>)  
(volume analysé plus grand)**
- **Echantillonnage automatisé**
- **Analyses *in situ***
- **Prise d'images**

# Cytosub (Cytobuoy) : un cytomètre en flux dédié à l'analyse autonome et *in situ* du phytoplancton.



[www.cytobuoy.com](http://www.cytobuoy.com)

- Analyse *in situ* jusqu'à 200 m de profondeur
- Fréquence d'échantillonnage maximale toute les 10 min.
- Durée d'immersion possible de plusieurs semaines



Version immergeable  
(Cytosub)



Version bouée  
(Cytobuoy)

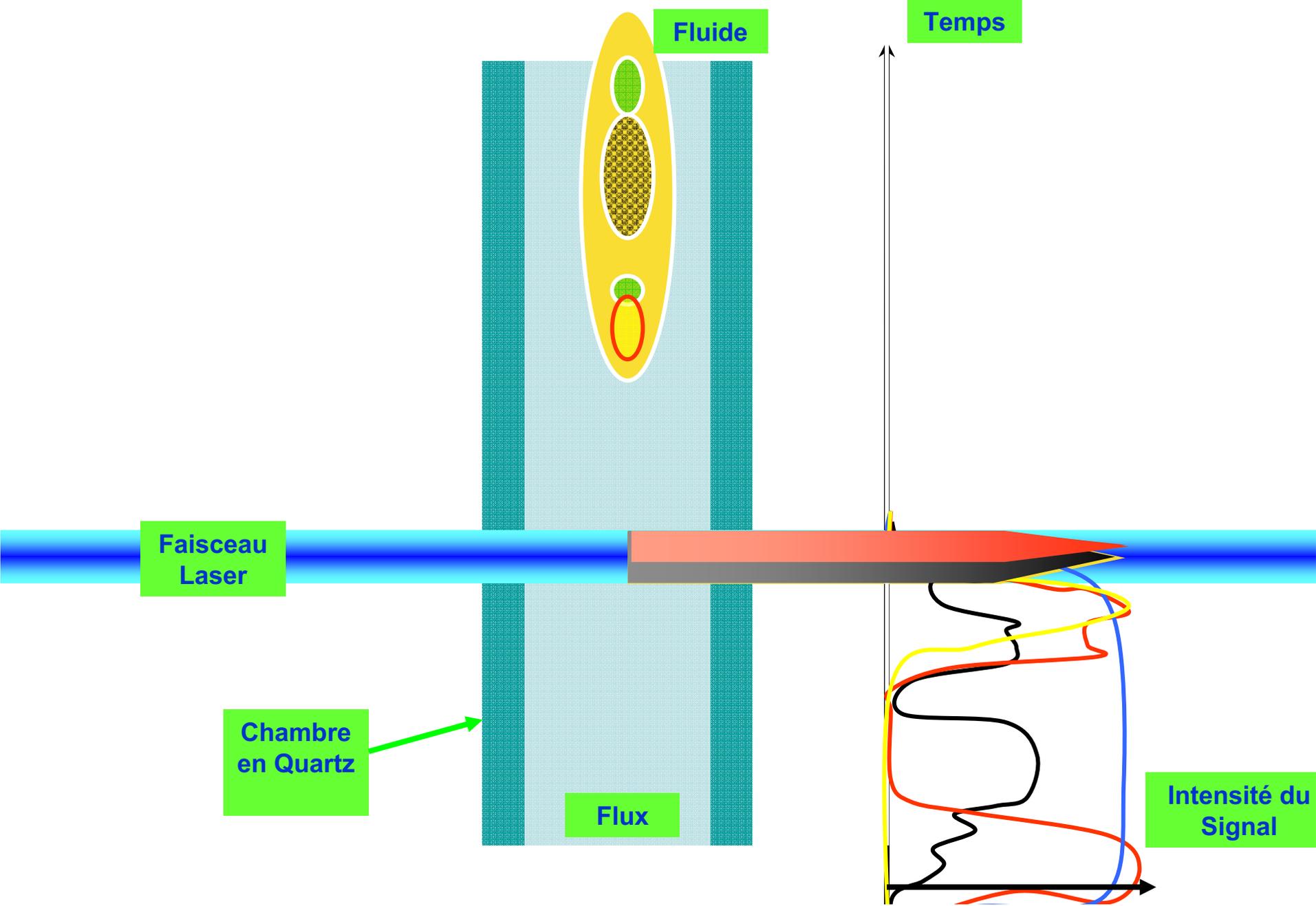


Version paille de laboratoire  
(Cytosense)

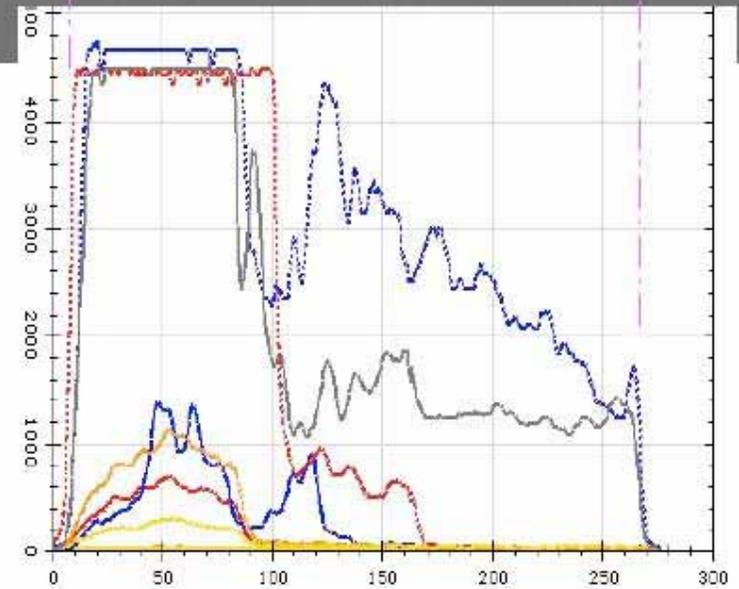
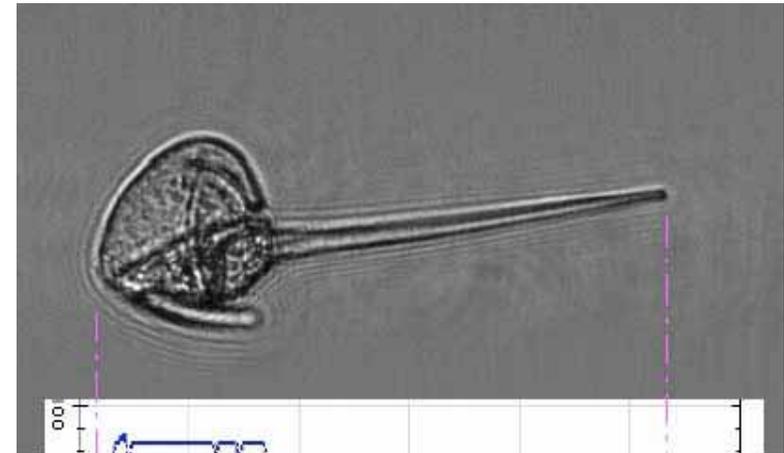
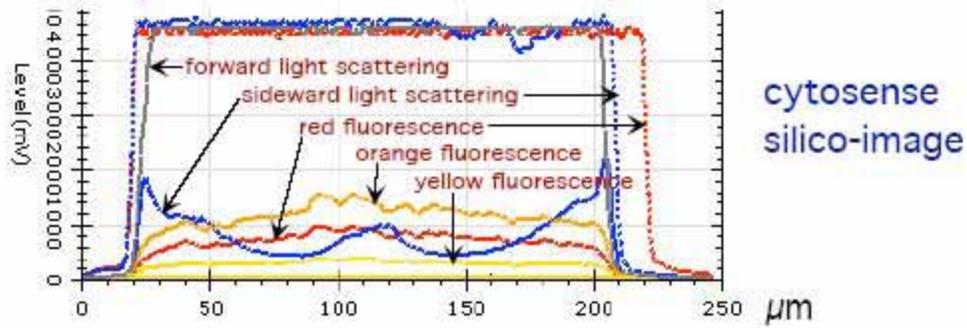
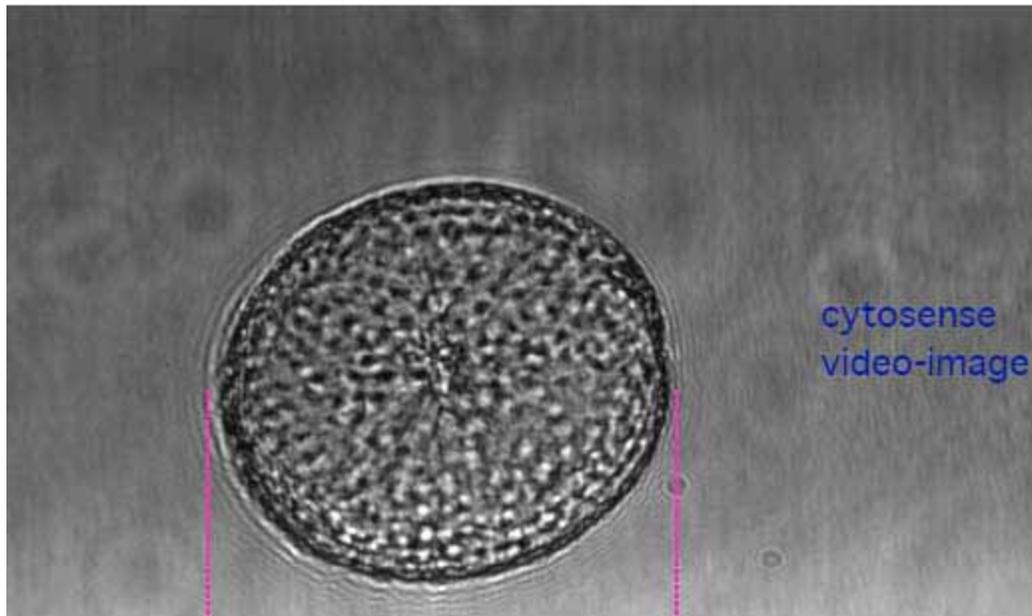
# Variables mesurées par le Cytosub

- **Deux variables dites de diffusion des photons du laser :**
  - + Aux petits angles (FWS : forward scatter) → Taille des particules.
  - + A 90° (SWS : sideward scatter) → Morphologie de la cellule (forme, granularité, paroi cellulaire, composition interne,...).
  
- **Trois variables d'émission de fluorescence (autofluorescence):**
  - + Rouge centrée sur 734-668nm → carotène et chlorophylle a.
  - + Orange centrée sur 601-668nm → phycobilines (spécifiques aux Cyanobactéries et Cryptophytes)
  - + Jaune centrée sur 536-601nm → phycoérythrine.
  
- **Profil des signaux le long des particules (signature optique du phytoplancton)**
  
- **Module de prise d'image (module Image in flow)**

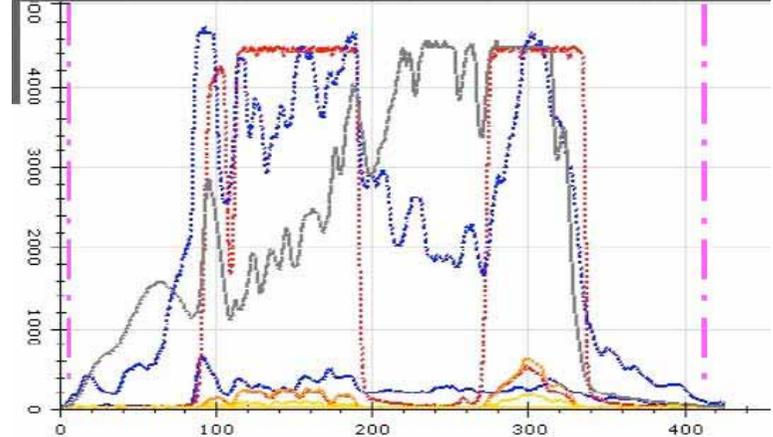
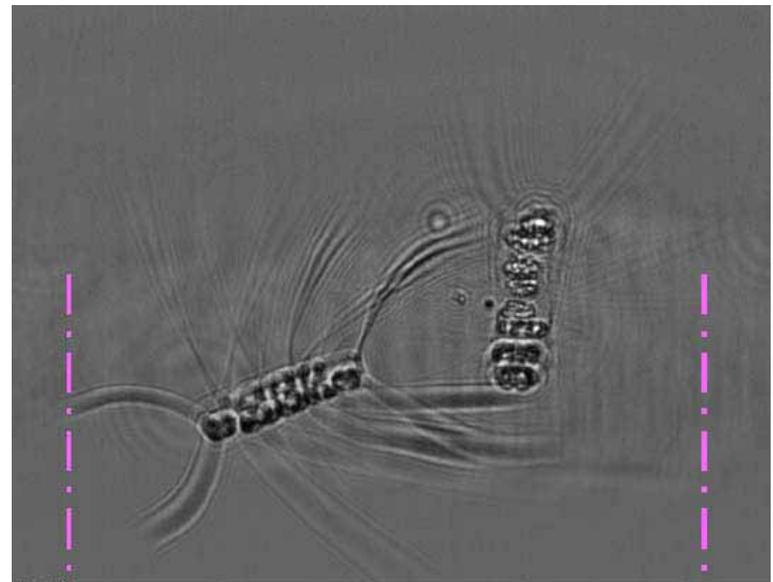
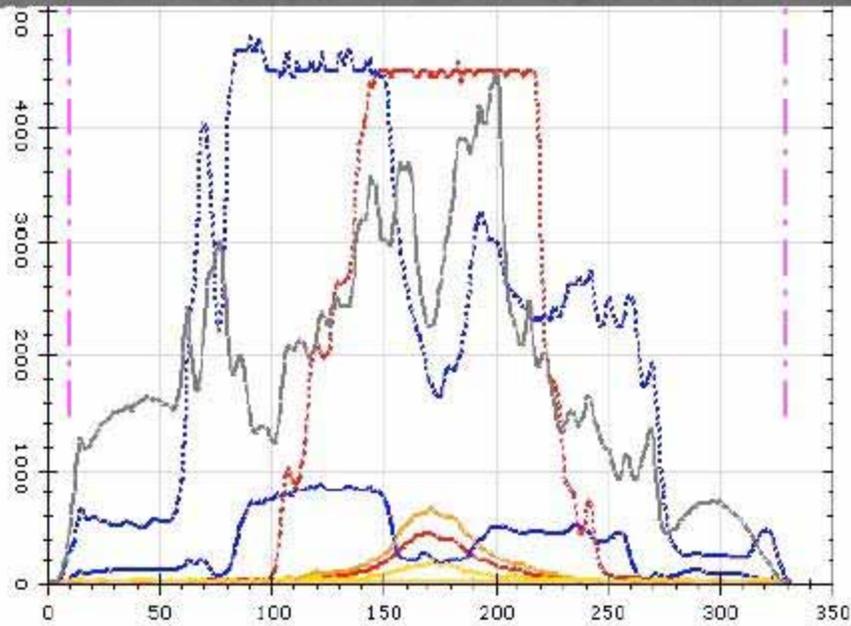
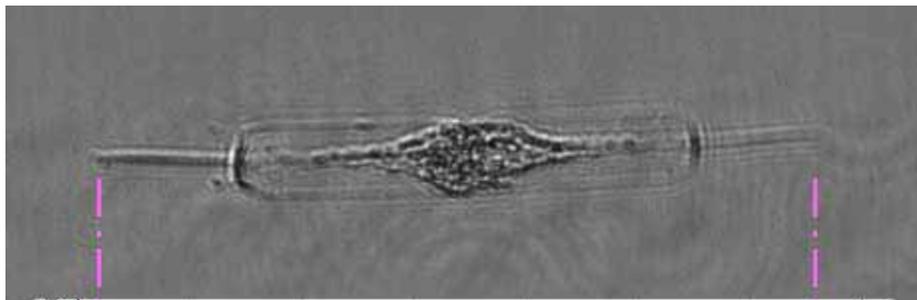
# Acquisition de données



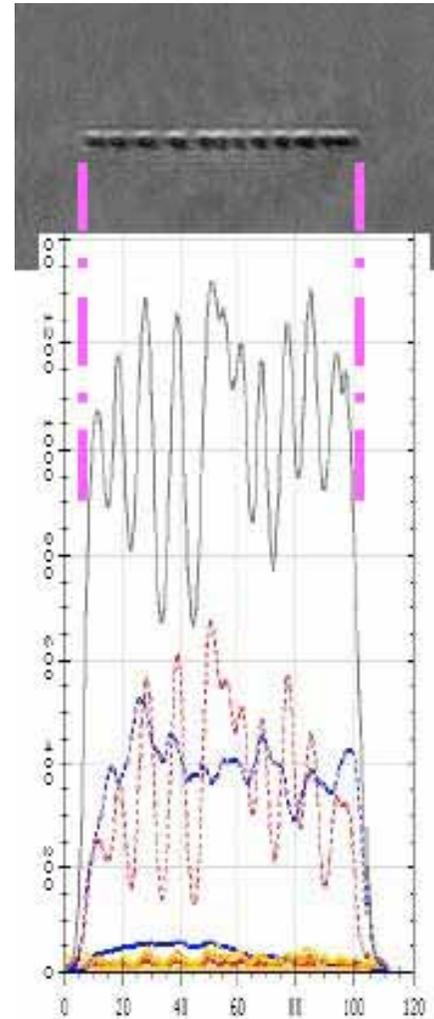
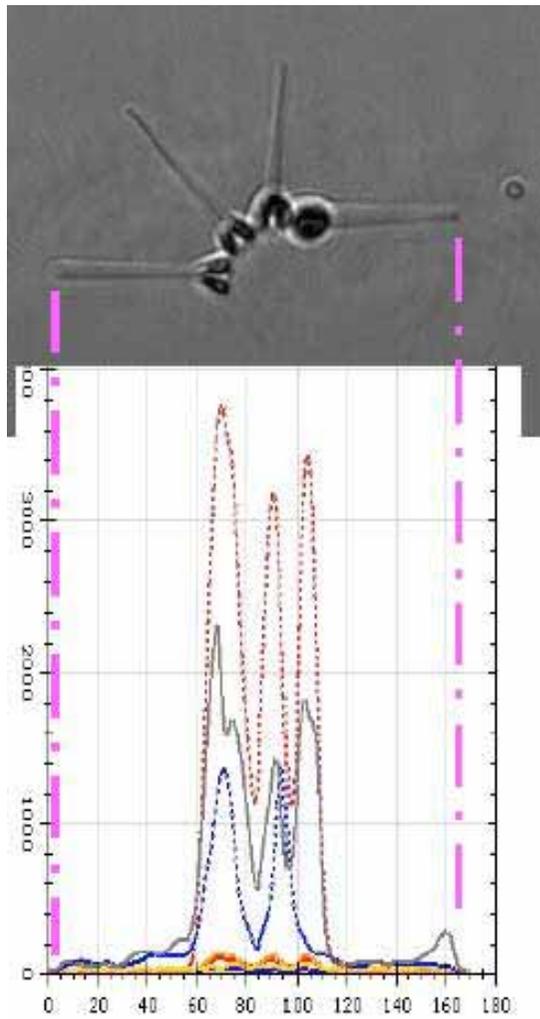
# Exemples de données



# Exemples de données

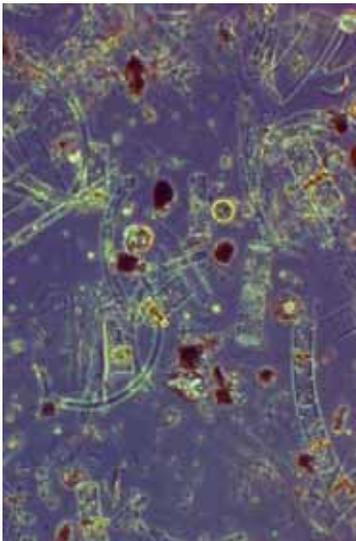


# Exemples de données sur des chaînes

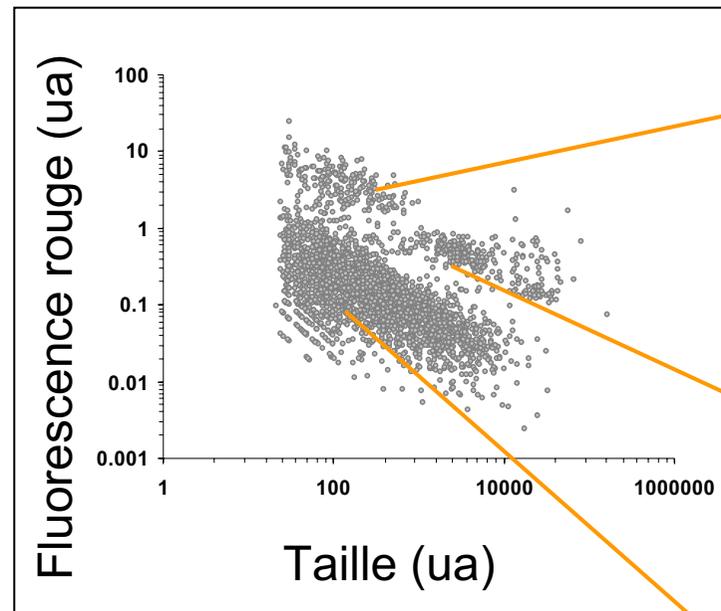


# De la particule détectée *in situ* à la cellule identifiée

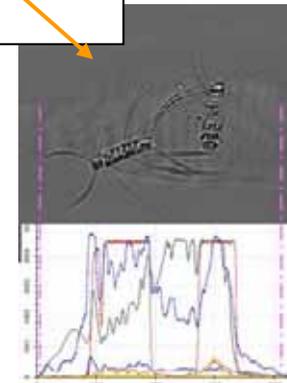
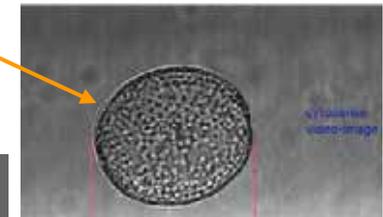
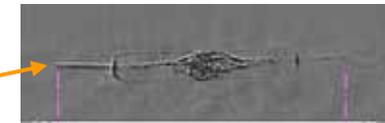
De l'échantillon naturel ...



...à la particule ...

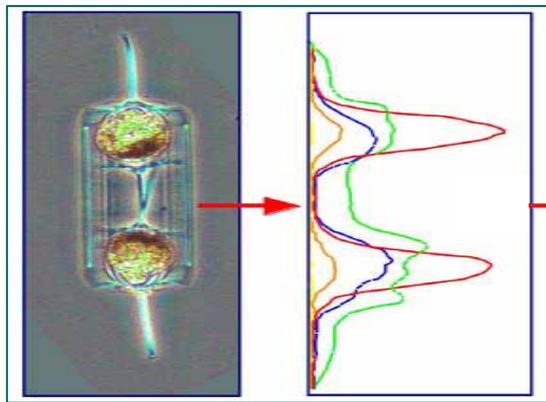


... à la cellule

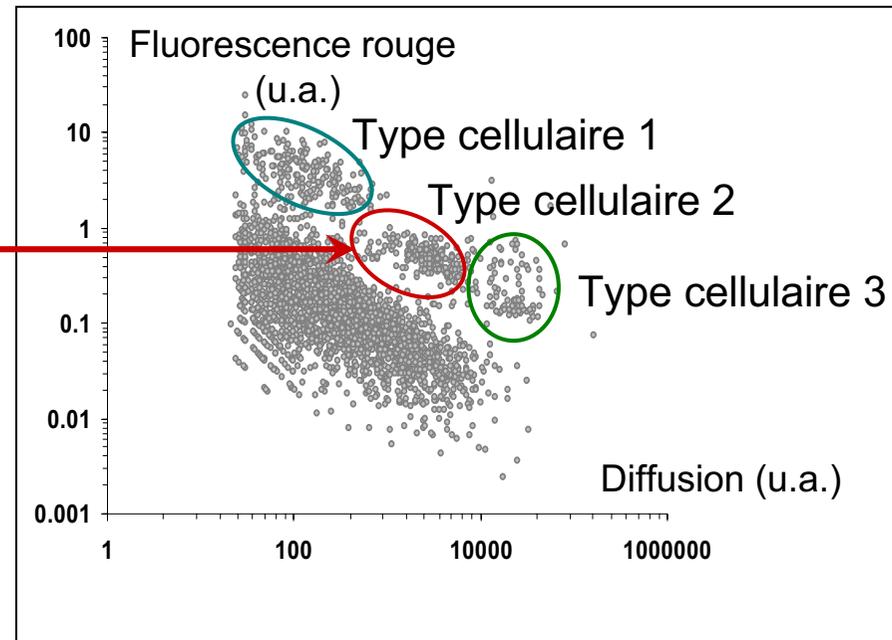


# Analyse à haute fréquence spatio-temporelle du phytoplancton grâce à la cytométrie autonome immergeable

Diversité du phytoplancton étudiée **cellule par cellule** sur la base de leurs **propriétés optiques** (diffusion, fluorescence)



Travaux de thèse de M. THYSSEN



- Analyse *in situ* = pas de modifications du système étudié
- Analyse individuelle des cellules = diversité et physiologie

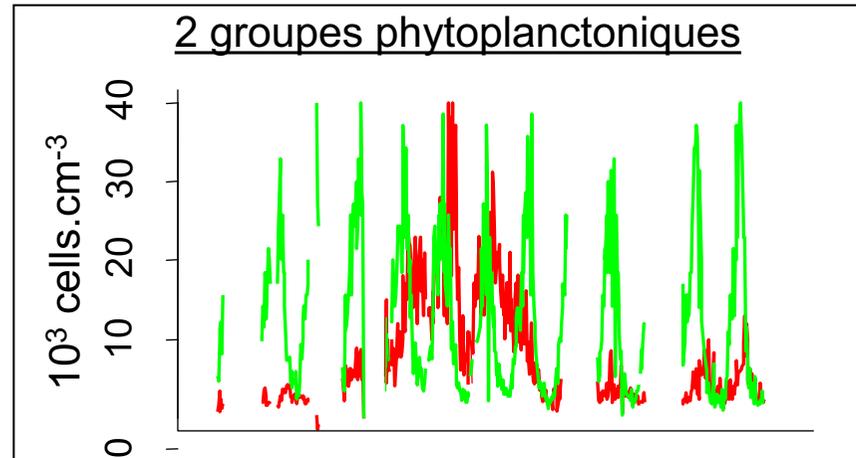
**Diversité** des types cellulaires est variable **en fonction** des conditions environnementales

→ **Notion de groupe fonctionnel de réponse**

# L'hétérogénéité temporelle



- Point fixe côtier Méditerranée.
- Fréquence d'analyse 30 min.
- Données *in situ*.

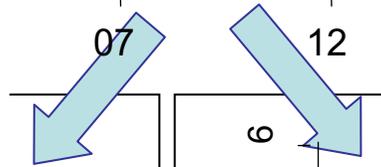
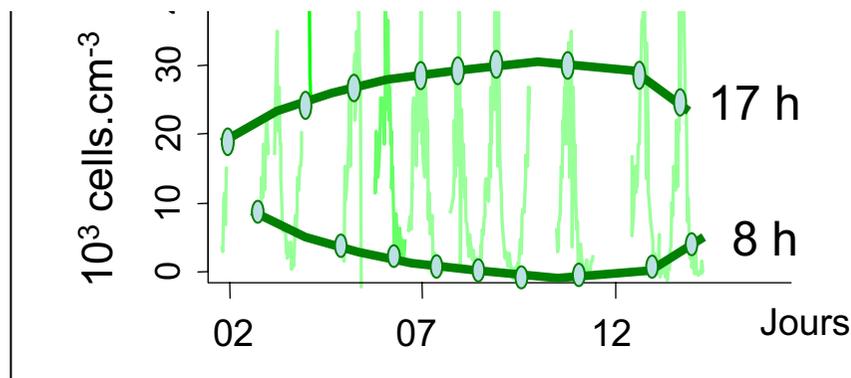


14 000 échantillons!

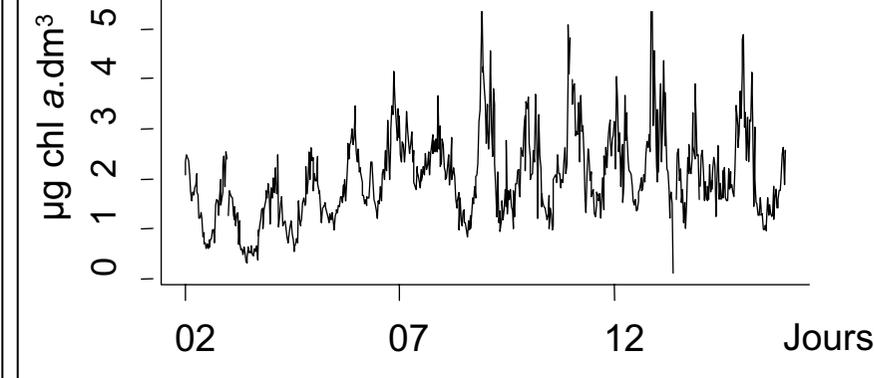
Hétérogénéité en fonction:

- du régime de vent,
- du rapport N/P

Si échantillonnage classique: sur ou sous estimation de la variation de la biomasse



Biomasse globale (fluorimétrie)  
Sur/sous estimation liées aux facteurs de conversion C/Chl

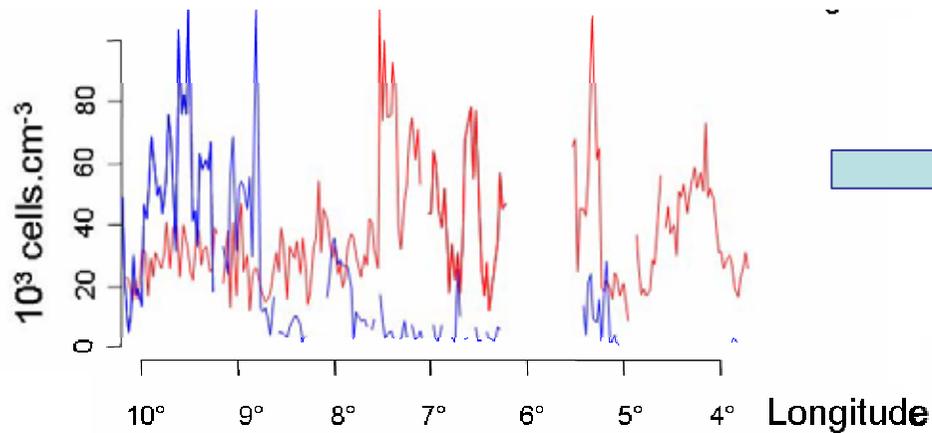


→ L'observation à haute fréquence donne une **estimation réaliste** de la variation de leur biomasse, donc des flux de matière

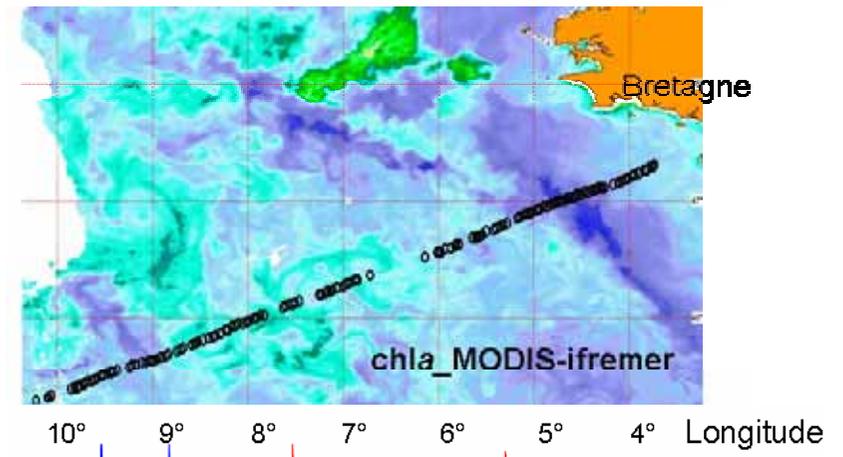
# L'hétérogénéité spatiale

Projet ACYPHAR - radiale Açores - Lorient, Atl. Nord Est. Résolution ~2 km.  
Prélèvement automatisé des eaux de surface par cytométrie en flux

Deux groupes phytoplanctoniques



Chlorophylle de surface par télédétection



→ Déconvolution entre **cause interne** (cycle cellulaire) et **externe** (hydrodynamisme) de la variation des abondances

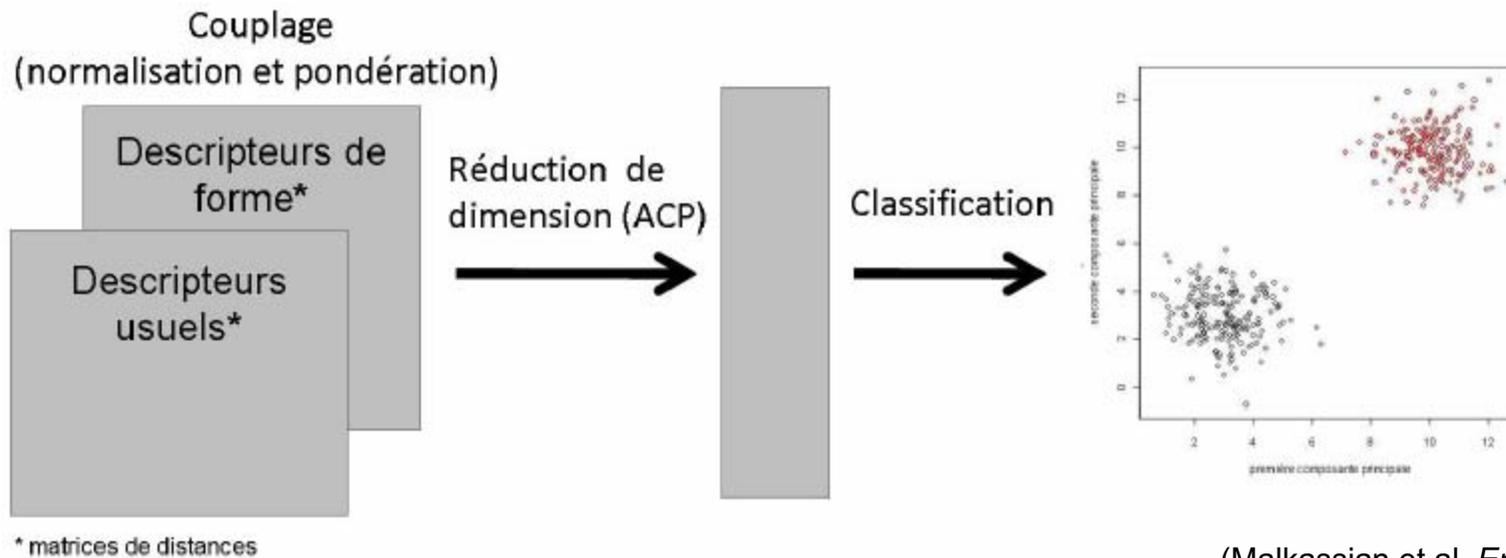
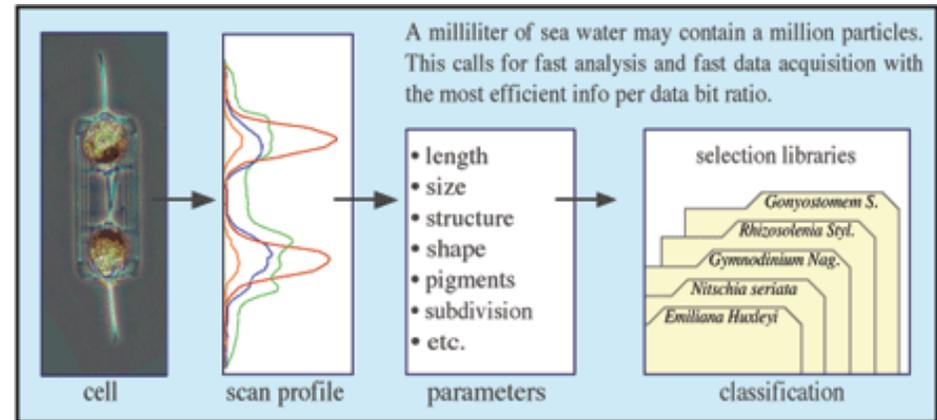
→ **ajustement des algorithmes** de calcul de la biomasse autotrophe à partir des images satellites avec des données *in situ* de même résolution (1-2 km)

*Thyssen et al. 2008, Biogeosciences*  
*Thyssen et al. 2005, J. Geophys. Res.*

*Denis & Thyssen 2007. Quand océanologie et réinsertion sociale se concertent. Journal de l'INSU*

# Automatisation du traitement des données

- **Problème** : Discriminer des groupes sur la base de leur signature optique (fenêtrage automatisé)
- **Hypothèse** : Information discriminante dans la forme que prennent les profils.
- **Solution** :

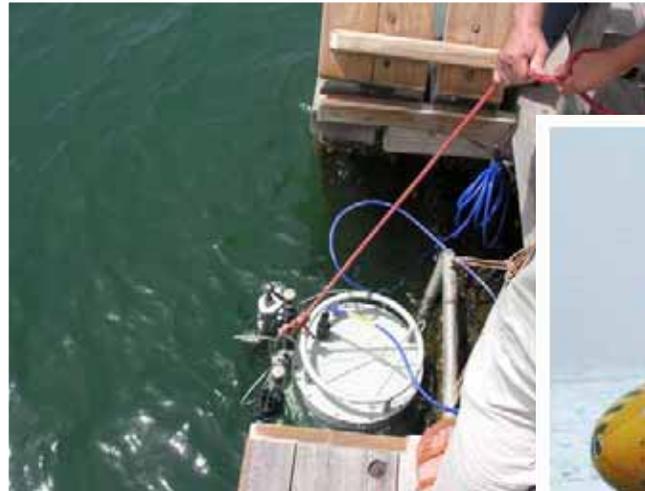


(Malkassian et al. En préparation)

# Cytométrie en mer...ou dans la mer



Elaboré en collaboration avec des microbiologistes depuis 2002



# Conclusion

## → Cytométrie en flux autonome *in situ*:

- Permettra de réaliser un suivi à haute fréquence et à l'échelle individuelle des assemblages phytoplanctoniques.
- Analyse réalisée grâce à un instrument immergé autonome permet de s'affranchir de l'opérateur et des sorties en bateau dépendantes de la météorologie
- Ce système garantit des séries de données à haute fréquence, et continues (peu ou pas de données manquantes).

## → Appréhender la dynamique de l'écosystème suite à une perturbation soudaine (fort vent, apport massif d'eau douce, rupture de la stratification haline, etc.)

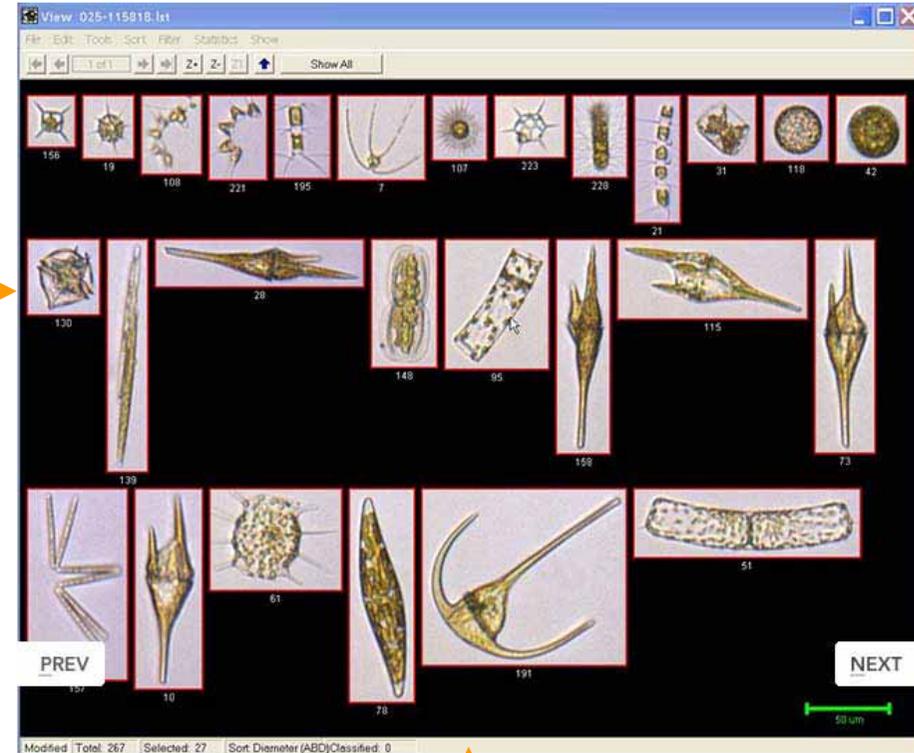
- 
- Finalité de l'approche : le domaine marin côtier et ouvert (stations fixes et navires d'opportunité (Méthaniers? Ferries? Portes-conteneurs?))

**Observation = Constitution d'une base de données unique sur le phytoplancton en Mer Méditerranée**

**Vers une analyse “visuelle”  
à haute fréquence  
et à l’échelle individuelle  
des particules**

# Le système FLOWCAM

- Au laboratoire

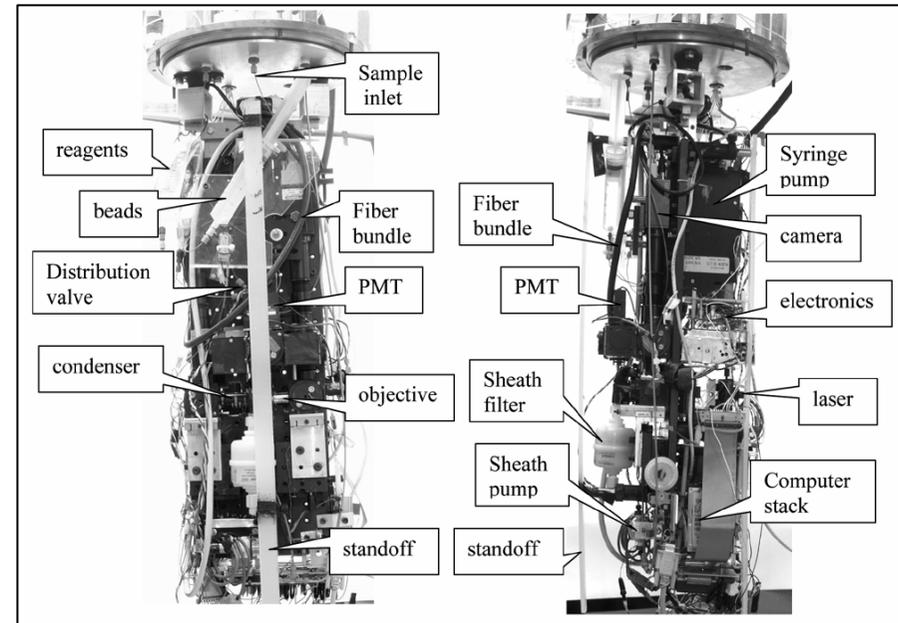


- Sur le terrain



# Le système Cytobot

Woods Hole Oceanographic Institution (Etats-Unis)



- **2 modèles:**

- un pour picoplancton
- et un pour grosses cellules phytoplanctoniques

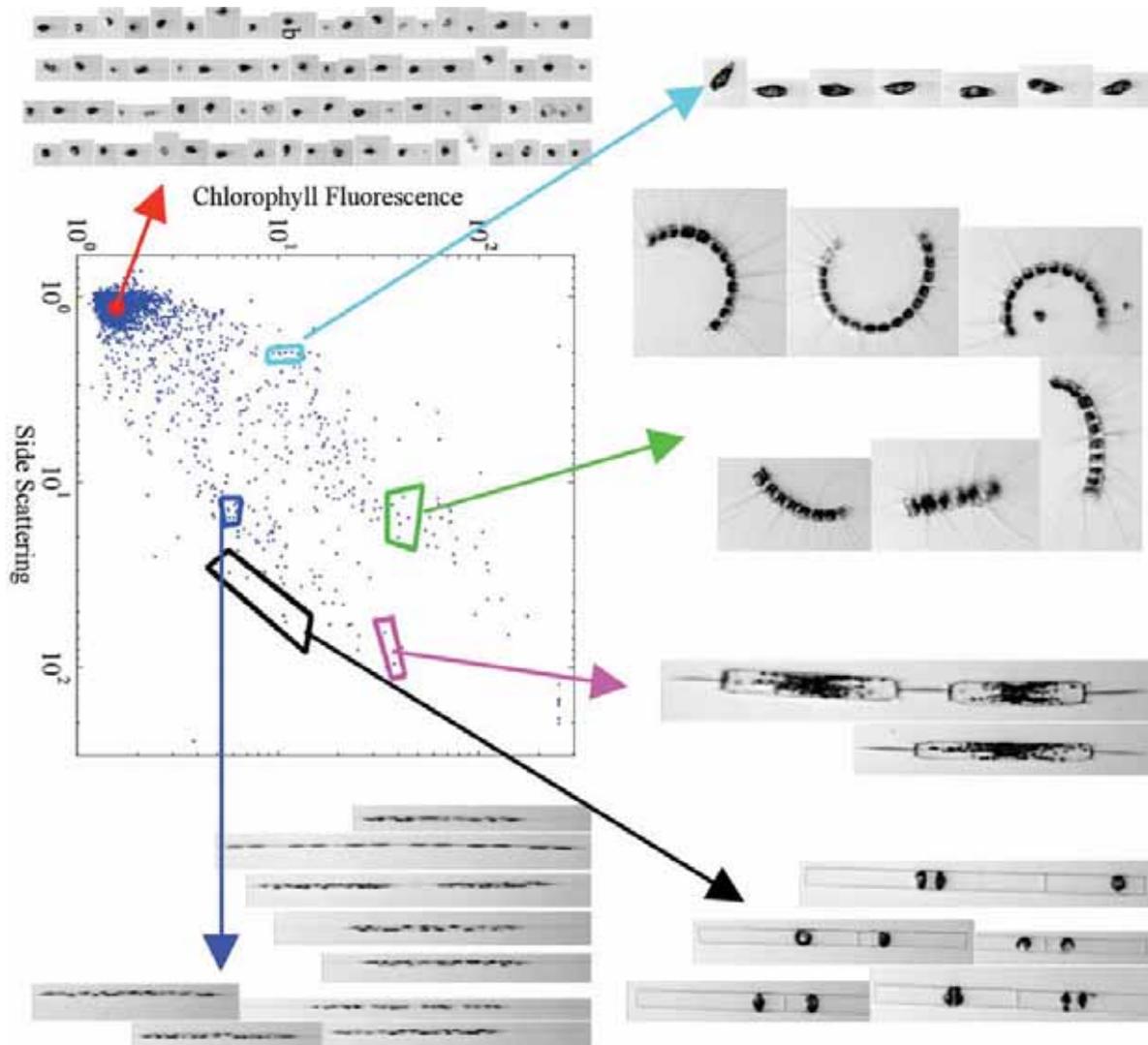
- **Autonomie de 2 mois, analyse en continue**

- **Precis et reproductible**

- **Limitation:**

- pas d'analyse des chaînes
- Temps mort élevé

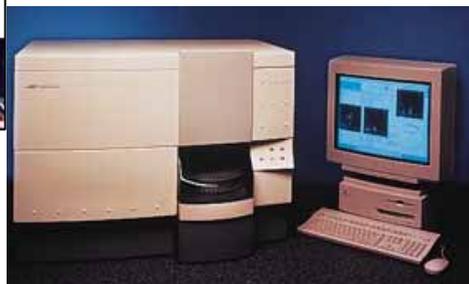
# Exemples de données



# Evolution des instruments



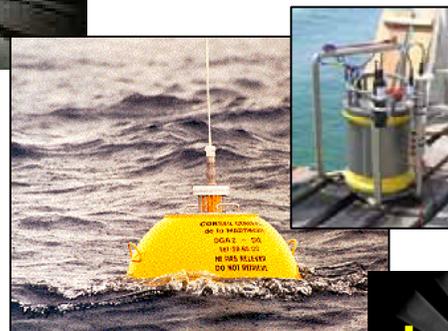
1986: Coulter EPICS V & essais en mer



1996: BD FACSort plug 'n play



2002: Trieur à haute-vitesse MoFlo (Cytomation)

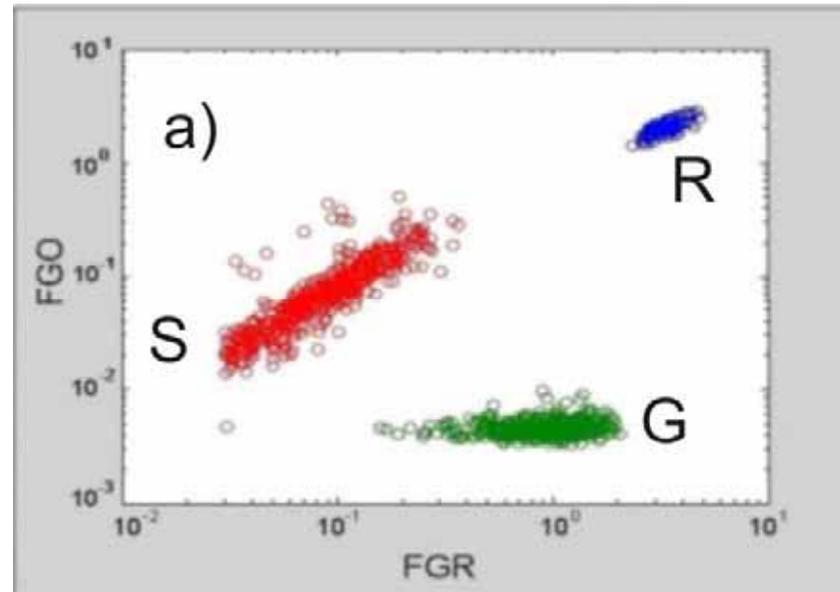
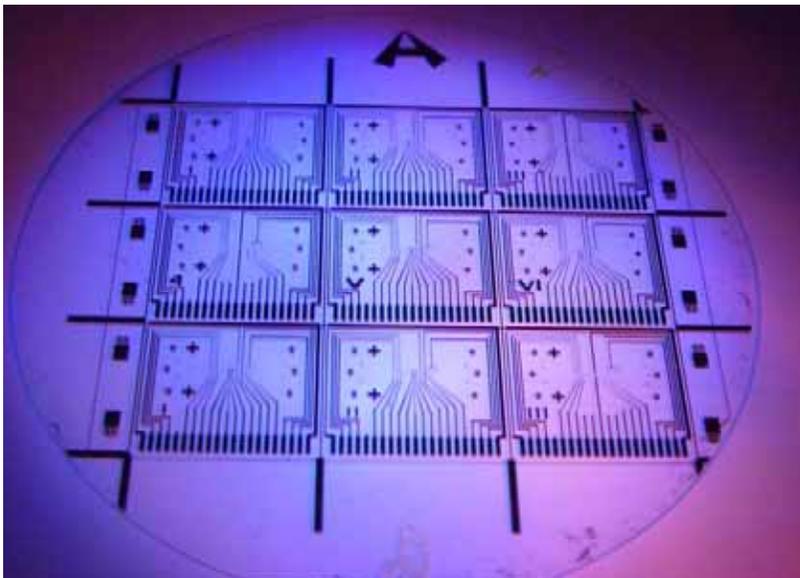
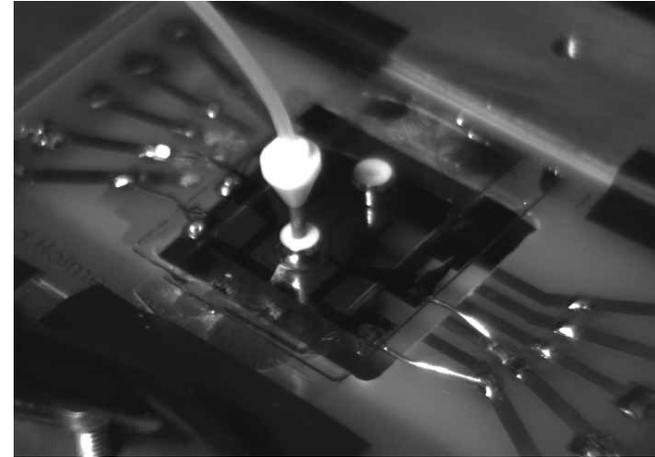
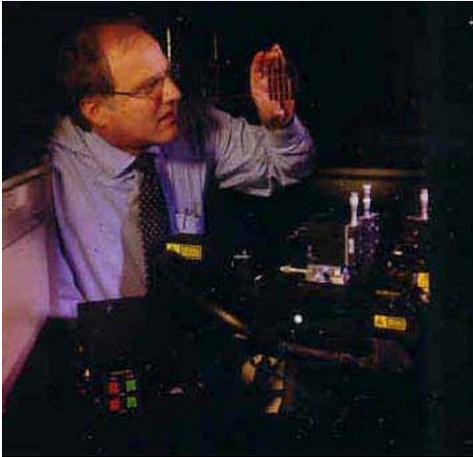


2003: Cytobuoy & Cytosub



**Le futur :  
Micro-  
fluidique**

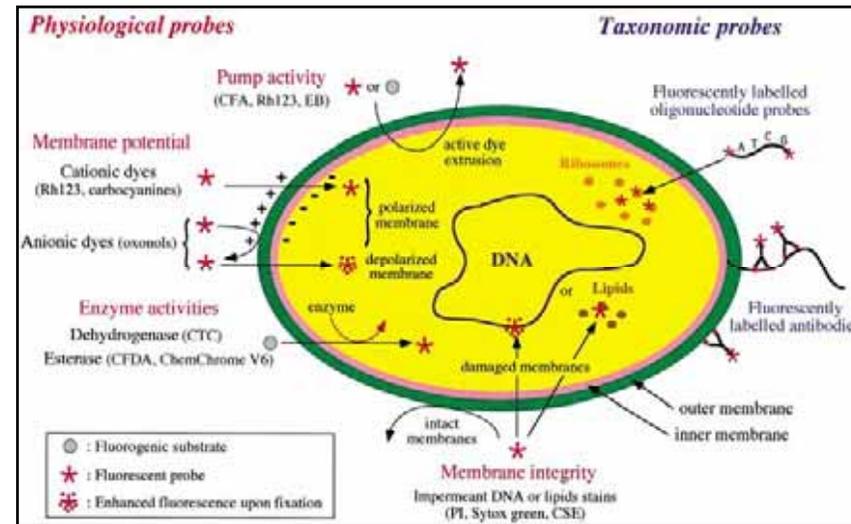
# Le futur est déjà là: cytométrie en flux & microfluidique



(Peter Burkill, Plymouth Marine Laboratory, UK)

# Conclusion

**Cytométrie en flux  
(Couplée à la microscopie)**



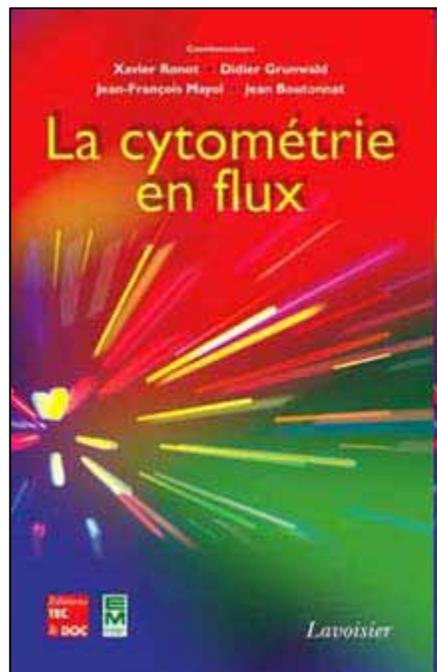
- Accumulation d'information par cellule
- Meilleure compréhension de l'ensemble de la communauté (sociologie)

**Discrimination** > **Qualification** > **Quantification**

Analyse à l'échelle individuelle des cellules

**Echelle globale  
(Tissus, organe,  
individu,  
écosystème)**

# Références bibliographiques

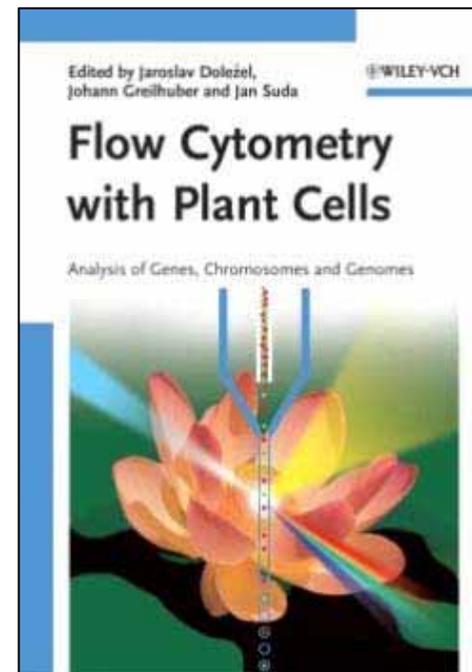


**La cytométrie en flux**

Xavier RONOT, Didier GRUNWALD, Jean-François MAYOL,  
Jean BOUTONNAT

© 2006

Éditions : Technique & Documentation - Lavoisier



**Flow Cytometry with Plant Cells**

Jaroslav DOLEZEL, Johann GREILHUBER, Jan SUDA

© 2007

Editions: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

# Protocole 1 : Les protoplastes

Pour faire des protoplastes de cultures cellulaires, les parois des cellules vivantes ou fixées sont digérées par des enzymes : 0,5% (p/v) de Cellulase RS (Yakult), 0,5% de Macerozyme R10 (Yakult) et 0,05% de Pectolyase Y23 (Sigma) en solution hypertonique (milieu de culture additionné de 0,5 M sorbitol) pendant environ trois heures sous agitation continue (30 tpm) à l'obscurité, puis rincées deux fois avec cette même solution en centrifugeant 5 minutes à 50 g.

La suspension de protoplastes est ensuite filtrée séquentiellement sur des filtres de nylon à pores calibrés de 200 puis 75  $\mu\text{m}$ . Les protoplastes issus de cellules en cultures peuvent continuer leur progression dans le cycle pendant le temps de digestion. Il est courant de trouver des protoplastes dicaryotiques qu'on élimine de la mesure par l'application de « fenêtres » contre les doublets, sur l'histogramme bivarié aire du signal contre pic du signal.

*Chapitre 12 (pp. 235-253) dans : « La cytométrie en flux » (2006) Xavier RONOT, Didier GRUNWALD, Jean-François MAYOL, Jean BOUTONNAT, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 480 pp ISBN 2-7530-0898-9*

**La cytométrie en flux pour la biologie végétale : contraintes, succès, espoirs.**

Olivier Catrice, Teodoro Coba de la Peña<sup>1</sup>, et Spencer C Brown,

# Protocole 2 : Extraction de noyaux

## 2a Par lyse de protoplastes

Les protoplastes frais sont injectés dans une solution hypotonique et vigoureusement pipetés. A la suite d'un tel traitement ils éclatent et leur contenu cellulaire, ainsi que les noyaux intacts, se retrouve en suspension dans le milieu. Une solution hypotonique adéquate est le milieu d'isolement de protoplastes diluée à volume égale avec le tampon Galbraith (ci-dessous), éventuellement avec 0,1% (m/v) Triton X100 final.

## 2b En coupant une pâte cellulaire ou de tissus frais

Il est possible d'extraire rapidement et simplement des noyaux en hachant l'échantillon avec une lame de rasoir (de type léger cassable, Gillette Blue) dans 0,5-1 mL de tampon froid dans une boîte de Petri. Ensuite, on filtre cette préparation sur un nylon à pores calibrés de 48 µm. Nos filtres (lavés et re-utilisés) sont préparés ainsi :

Découper un carré (20x20 mm) de toile à blutée en nylon (Nylon Scrynel NYHC; 30, 48, 100 ou 200 µm). Couper un cône de pipette de 1 mL en deux endroits : à 25 mm de la pointe (jeter l'extrémité) et à 6 mm du haut. En utilisant la partie haute comme collier, fixer le morceau de toile sur la partie centrale du cône.

Le tampon le plus couramment utilisé est celui de Galbraith (Galbraith et al., 1983).

Concentration Finale	Produit	PM	Masse/Volume Final
45 mM	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	203	9,15 g /L
30 mM	citrate.Na <sub>3</sub>	294	10,72 g /L
20 mM	MOPS acide pH 7,0	209	4,19 g/L
0,1 % (m/v )	Triton X-100	-	10 mL/L d'un stock 10 %

Ce tampon est souvent modifié extemporanément, par exemple en poussant le Triton X-100 à 0,5% (nécessaire pour éclater les chloroplastes ambiants), parfois à 1% même 2% pour des tissus riches en terpènes.

L'utilisation de 1% (m/v) polyvinyl-pyrrolidone 10.000 (Sigma P6755) permet de complexer des polyphénols fluorescents et empêche leur polymérisation. Un agent réducteur stabilise certains échantillons : 10 mM métabisulfite de sodium (S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.Na<sub>2</sub> PM 190 syn. pyrosulfite).

En tout cas, il est utile d'avoir toujours à disponibilité des stocks de ces suppléments : 10% Triton ; 10% (m/v) PVP 10.000 (tous deux passés à l'autoclave, stocké 4°C) ; 1 M métabisulfite de sodium (en aliquotes à -20°C).

Les noyaux isolés peuvent être conservés plusieurs heures à 4°C avec rajout de 1 à 2% de formaldéhyde.

D'autres tampons sont détaillés dans Coba de la Peña et Brown (2001). La coupe de tissus congelés, de feuilles et graines sèches (Sliwinska et al., 2005), ont aussi donnée de bons résultats, comme la fixation à l'acide citrique (2c ci-dessous).

Les noyaux sont finalement colorés et lus au cytomètre. Ces préparations seront peu concentrées, parfois <50.000 noyaux /mL, avec beaucoup de débris cellulaires. Le fenêtrage (*Gating*) est essentiel pour sélectionner les noyaux sur un cytogramme de *Forward Scatter* ou *Side Scatter* contre « Fluorescence nucléaire » (voir les illustrations pédagogiques dans Marie et Brown, 1993).

## 2c En fixant les cellules ou tissus avant d'en extraire les noyaux

Une autre manière de conserver des échantillons, ou de prélever lors d'une cinétique loin du cytomètre, est une fixation à l'acide citrique (Ulrich et Ulrich, 1991, d'après la méthode Otto).

Réactifs pour traitement :

acide citrique 0,1 M avec 0,5 % (m/v) Tween20 (autoclavé et gardé à 4°C)

phosphate di-sodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,4 M (autoclavé et gardé à température ambiante)

Un culot cellulaire (ou le tissu) est suspendu dans 100 µL du mélange citrique/Tween. Après au moins 30 minutes, les cellules sont centrifugées ; le culot est alors repris dans 200 µL du mélange citrique/Tween. Les échantillons peuvent être conservés des jours à 4°C. Pour la cytométrie, on extrait les noyaux en hachant l'échantillon (ou la pâte cellulaire) avec une lame de rasoir comme ci-dessus (Protocole 2a), puis on ajoute 1000 µL phosphate di-sodique 0,4 M pour neutraliser l'ensemble (température ambiante), avant de procéder à une filtration sur 48 µm, la coloration et l'analyse cytométrique. Une fois neutralisé les échantillons ne se conservent plus.

*Chapitre 12 (pp. 235-253) dans : « La cytométrie en flux » (2006) Xavier RONOT, Didier GRUNWALD, Jean-François MAYOL, Jean BOUTONNAT, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 480 pp ISBN 2-7530-0898-9*

**La cytométrie en flux pour la biologie végétale : contraintes, succès, espoirs.**

Olivier Catrice, Teodoro Coba de la Peña<sup>1</sup>, et Spencer C Brown,