

# Du dénombrement à l'analyse de fonctions cellulaires

**Gérald Grégori**

Laboratoire de Microbiologie, de Géochimie et d'Ecologie Marines CNRS UMR 6117  
163 Avenue de Luminy - Case 901- Bât TPR1, 13288 Marseille cedex 9  
Tél. : (+33) 4.91.82.91.14  
Fax : (+33) 4.91.82.96.41

Contact : [gregori@com.univ-mrs.fr](mailto:gregori@com.univ-mrs.fr)

# Complexité des communautés microbiennes (I) hétérogénéité taxonomique

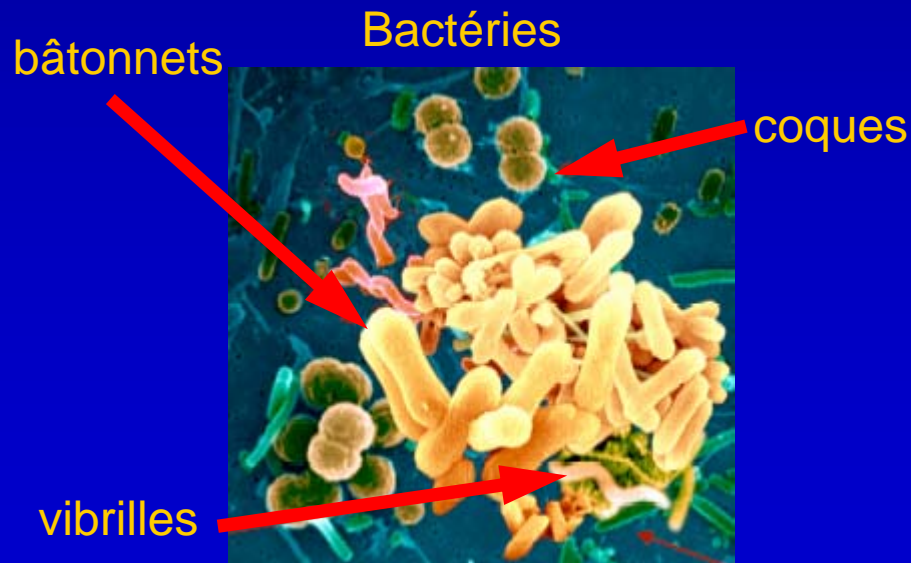
**Eucaryotes:** cellules complexes qui possèdent des structures organisées appelées organelles (noyau, mitochondries, chloroplastes).

*Ex : Protistes, Champignons, Algues.*

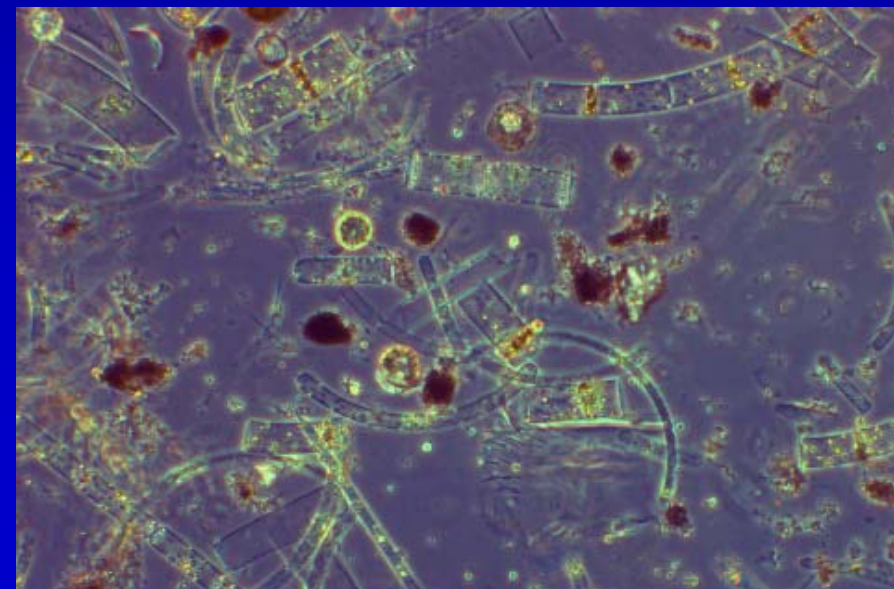
• **Procaryotes:** cellules simples, dépourvues d'organelle.

*Ex : Bacteria, Archaea*

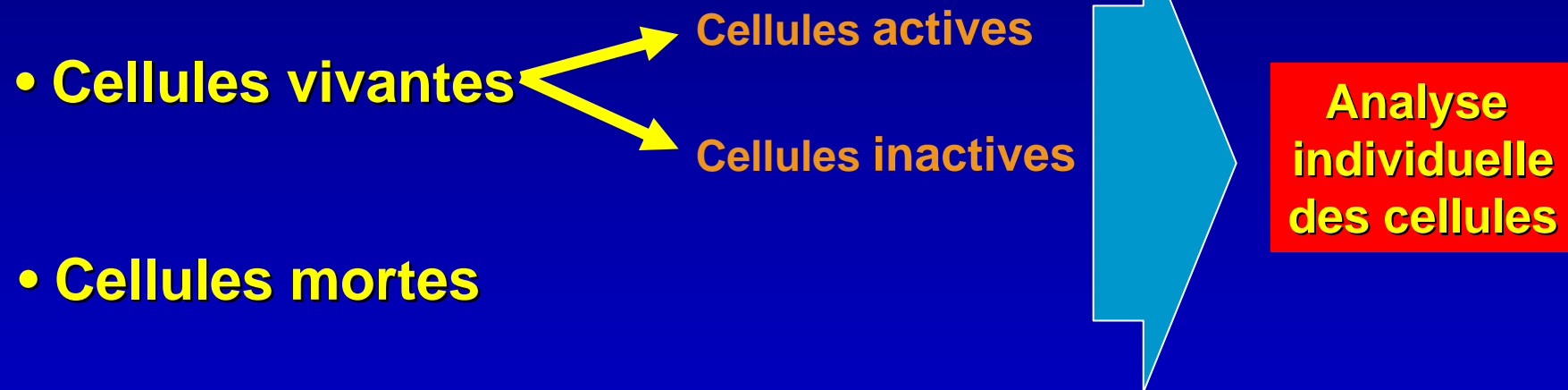
• **Autotrophes, hétérotrophes, mixotrophes**



Echantillon naturel



# Complexité des communautés microbiennes (II) hétérogénéité physiologique



# Observation directe : exemple des bactéries

- **Microscopie optique**

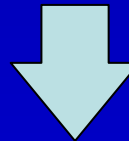
- **Limité** → difficulté à distinguer différentes sous-populations ou les bactéries d'autres particules de taille et de forme similaires.



*Streptococcus* (800x)  
(from <http://www.hardin.k12.tn.us/>)

- **Cultures en milieu sélectif**

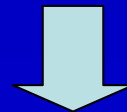
- **Plusieurs jours; opérateur(?)**
- **Efficacité** (0.1 à 1% des bactéries marines sont cultivables ; 0.1% dans les sols)



Développement de nouvelles méthodes directes basées sur les propriétés optiques plutôt que sur des cultures → **Coloration de composants cellulaires, activités enzymatiques, ou intégrité membranaire (viabilité)**

## Intérêt de ces nouvelles approches

- Pour obtenir l'abondance des bactéries dans des échantillons naturels → **Analyse individuelle des cellules**
  - Mesure immédiate
  - Pas besoin de faire des cultures (donc plus rapide)
  - Image de l'hétérogénéité des échantillons prélevés in situ
  
- Accès aux processus métaboliques de la biomasse bactérienne active:
  - Discrimination des cellules **vivantes & actives**, **vivantes & inactives** (spores, cellules stressées) et cellules **mortes**.



**Cytométrie en flux**

# Pourquoi la cytométrie en flux devient populaire chez les microbiologistes?

- **Analyses rapides** (plusieurs dizaines de milliers de cellules analysées par seconde)
  - Permet d'analyser un grand nombre de cellules
  - Résultats statistiques robustes et représentatifs
- **Analyse multiparamétrique à l'échelle individuelle**
- Données quantitatives (corrélation avec d'autres données biochimiques)
- **Mesures en temps réel**
- **Classes de taille et abondance cellulaire**
- **Marqueurs uniques:**
  - naturels (chlorophylle, autres pigments autofluorescents)
  - induits (coloration) → fluorochromes (sondes)
- **Tri** (post-analyses, cultures)

# Détermination des abondances cellulaires: Mesure du volume analysé

- I. Comptage absolu direct par le cytomètre
- II. Pesée de l'échantillon avant et après l'analyse  
→ Volume analysé
- III. Ajout d'un volume précis d'une solution de microsphères (billes) de concentration connue dans l'échantillon
- IV. Détermination de la vitesse de flux exacte du cytomètre avant l'analyse

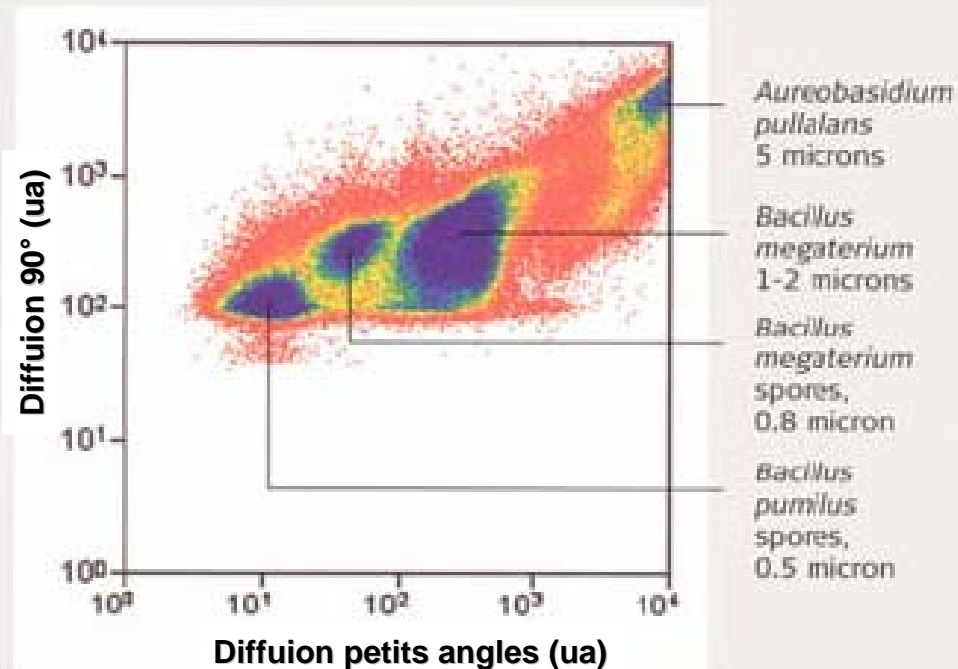
## Utilisation des propriétés de diffusion aux petits angles et à 90 degrés.

~~Pas besoin de coloration~~

- Résolution de groupes et sous-groupes différents en taille, forme, structure interne
- Informations sur la taille des cellules
- Dénombrement



# Résolution optique des bactéries à partir de la lumière diffusée par les cellules



Resolution of multiple small species by forward and side scatter.

Samples provided by Fei Chen, NASA Jet Propulsion Laboratories, Pasadena, CA.

Data courtesy of Kathy Martin, DakoCytomation.

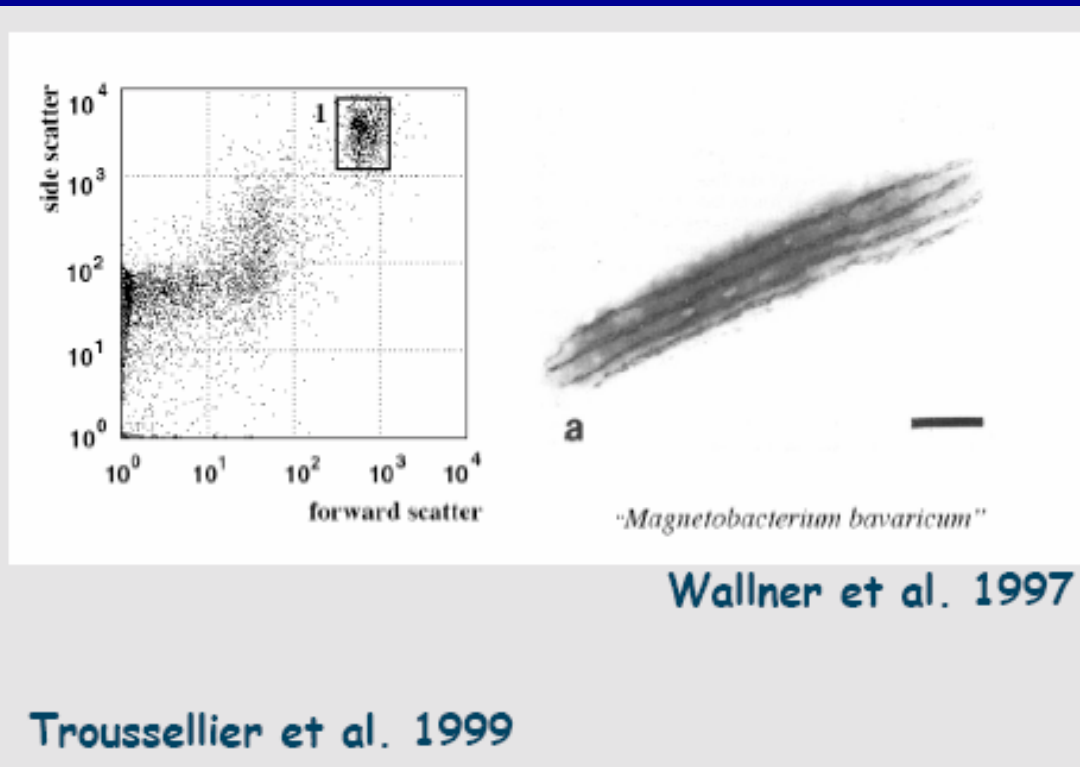
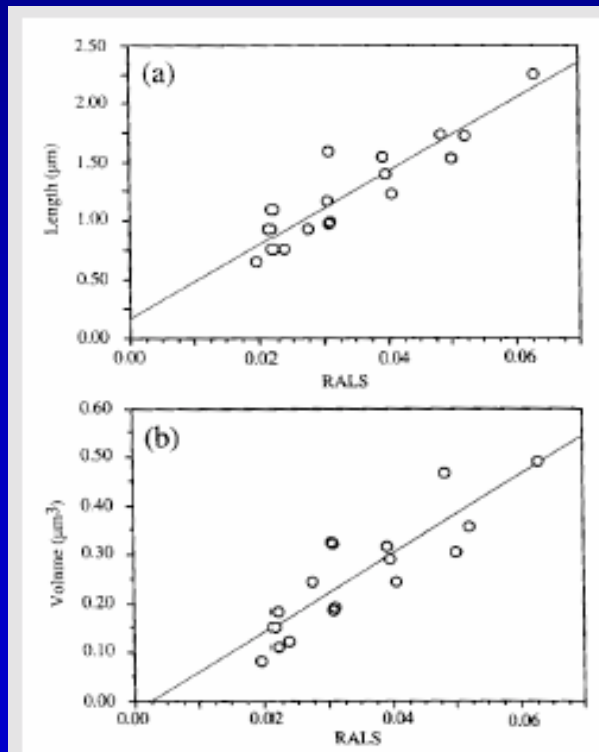
# Utilisation des propriétés de diffusion de la lumière

- Vacuoles
- Bactéries différenciées
- Taille des bactéries

Dubelaar et al. 1987

Allman et al. 1993

Troussellier et al. 1999



## Résolution des cellules photoautotrophes: Utiliser les propriétés des pigments naturels

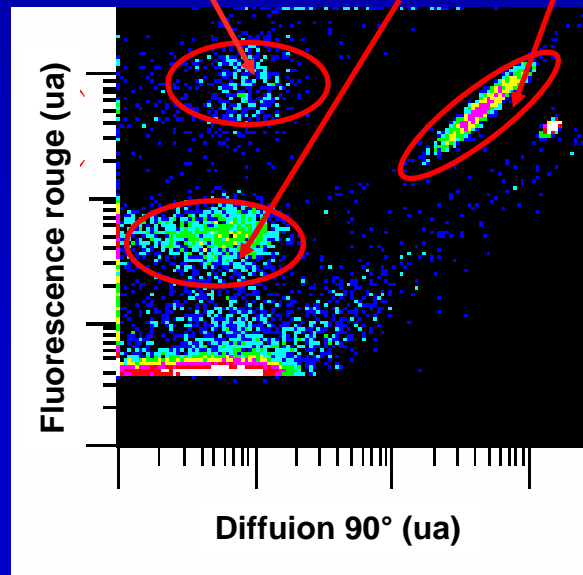
~~Pas besoin de coloration~~

- Résolution optique des micro-organismes
  - détection, identification, mise en évidence de sous-groupes
- Dénombrement

# Autofluorescence

Pigment	Laser excitation (nm)	Emission de fluorescence (nm)
<b>Chlorophylle</b>	488	>650
<b>Phycoerythrine</b>	488	575 ; 585
<b>Phycocyanine</b>	633	650 ; 660

*picoeucaryotes*  
*Prochlorococcus*  
*Synechococcus*



## Résolution des cellules hétérotrophes (pas de pigment photosynthétique)

### Besoin de coloration (fluorescence induite)

→ Voir site internet <http://www.probes.com/>  
pour liste des colorants (fluorochromes)

- Dénombrements
- Viabilité (état physiologique)
- Fonction cellulaire

# Fluorescence induite

- **Constituents Moléculaires**

- Acides nucléiques
- Proteines
- Lipides
- Carbohydrates
- Toxines

- **Organelles**

- Noyaux
- Chloroplastes
- Mitochondries
- Flagelles

# Dénombrement des bactéries par cytométrie en flux

TABLE 2. – Some technical details offered in most of the papers to date where natural planktonic bacteria have been enumerated by FC.

Reference	Instrument	Laser (power)	Flow rate $\mu\text{l min}^{-1}$	Sheath fluid	Fixative	Stain	Pretreatment
Robertson and Button 1989	Ortho Cytofluorograph IIS	UV 5W	5	dH <sub>2</sub> O	Ethanol 75%	DAPI (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Button and Robertson 1989	Ortho Cytofluorograph IIS	UV 5W	5	dH <sub>2</sub> O	Ethanol 75%	DAPI (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Monfort and Baleux 1992	ACR-1400-SP Bruker*	UV 100W	-	-	Formalin 3.7%	DAPI (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Button and Robertson 1993	Ortho Cytofluorograph IIS	UV 5W	5	dH <sub>2</sub> O	Formalin 0.5%	DAPI (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Triton X-100 (0.1%)
Troussellier <i>et al.</i> 1993	ACR-1400-SP Bruker*	UV	-	-	PFA 0.5-4%	DAPI (-)	-
Monger and Landry 1993	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	25-40	-	PFA 1%	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Heldal <i>et al.</i> 1994	Argus 100-4	UV	20	-	Glut 2%	DAPI (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Campbell <i>et al.</i> 1994	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	PFA 0.2 %	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Troussellier <i>et al.</i> 1995	ACR 1400-SP Bruker*	UV	5	-	several	DAPI (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Li <i>et al.</i> 1995	FACSort	Blue	12	-	Glut 1%, PFA 1%	TOTO (0.3-0.5 $\mu\text{M}$ )	Triton X-100 (0.1%)
						TO-PRO (3-5 $\mu\text{M}$ )	
del Giorgio <i>et al.</i> 1996	FACScan	Blue 15 mW	12	Hematail	Glut 1%, FA 3%	SYTO 13 (2.5 $\mu\text{M}$ )	-
Binder <i>et al.</i> 1996	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	Glut 0.12 %	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Landry <i>et al.</i> 1996	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	PFA 0.9%	HOECHST 33342 (0.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Button <i>et al.</i> 1996	Ortho Cytofluorograph IIS	UV 5W	5	dH <sub>2</sub> O	Formalin 0.5%	DAPI (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Triton X-100 (0.1%)
Jellett <i>et al.</i> 1996	FACSort	Blue 15 mW	12	Filt Seawater	PFA 1%	TO-PRO-1 (3 $\mu\text{M}$ )	Triton X-100 (0.1%)
Buek <i>et al.</i> 1996	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	PFA 0.2 %	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Pile <i>et al.</i> 1996	Coulter EPICS 753	UV 225 mW	-	-	-	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Campbell <i>et al.</i> 1997	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	PFA 0.2 %	HOECHST 33342 (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
del Giorgio <i>et al.</i> 1997b	FACScan	Blue 15 mW	12	Hematail	-	SYTO 13 (2.5 $\mu\text{M}$ )	-
Marie <i>et al.</i> 1997	FACSort	Blue 15 mW	-	-	Glut 0.1%	SybrGreen 1 (10 <sup>-6</sup> )	RNAse, 30 mM potassium citrate
	Coulter EPICS 541	UV 500 mW	-	-	Glut 0.1%	HOECHST 33342 (0.45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Wallner <i>et al.</i> 1997	FACStar Plus	UV 200 mW	-	-	PFA 3%	DAPI (1 $\mu\text{M}$ )	-
Guindulain <i>et al.</i> 1997	Coulter EPICS Elite	Blue 15mW	-	-	PFA 2%	SYTO 13 (2.5 $\mu\text{M}$ )	Triton X-100 (0.1%)
Pile 1997	Coulter EPICS 753	UV 225 mW	-	-	-	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Zubkov <i>et al.</i> 1998	FACSort	Blue 15mW	45	-	Glut 0.2%	TOTO (0.4 $\mu\text{M}$ )	Triton X-100 (0.1%)
Peters <i>et al.</i> 1998	FACSCalibur	Blue 15mW	19	dH <sub>2</sub> O	PFA 1% + Glut 0.05%	SYTO 13 (2.5-5 $\mu\text{M}$ )	-
Campbell <i>et al.</i> 1998	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	PFA 0.2 %	HOECHST 33342 (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
López-Amorós <i>et al.</i> 1998	Coulter XL	Blue 15mW	-	-	PFA 0.2%	SYTO 13 (0.125 $\mu\text{M}$ )	Triton X-100 (0.1%)
Jacquet <i>et al.</i> 1998b	FACSort	Blue 15mW	-	Filt Seawater	PFA 1% + Glut 0.05%	SybrGreen 1 (10 <sup>-6</sup> )	30 mM potassium citrate
Lebaron <i>et al.</i> 1998	FACSCalibur	Blue 15mW	-	-	Formalin 2%	(several)	sodium or potassium citrate
Ribes <i>et al.</i> 1998a, 1998b	Coulter EPICS 753	UV 225 mW	-	-	-	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Marie <i>et al.</i> 1999	FACSort	Blue 15mW	50	-	PFA + G / Glut 0.1-0.5%	SybrGreen 1 (10 <sup>-6</sup> )	(several)
Gasol and Morán 1999	FACSCalibur	Blue 15mW	19	dH <sub>2</sub> O	PFA 1% + Glut 0.05%	SYTO 13 (2.5-5 $\mu\text{M}$ )	-
Gasol <i>et al.</i> 1999	FACSCalibur	Blue 15mW	19	dH <sub>2</sub> O	PFA 1% + Glut 0.05%	SYTO 13 (2.5-5 $\mu\text{M}$ )	-
Sherr <i>et al.</i> 1999	FACScan	Blue 15mW	12	Hematail	-	SYTO 13 (2.5 $\mu\text{M}$ )	-
Sieracki <i>et al.</i> 1999	FACScan	Blue 15mW	20-50	-	PFA 1%	PicoGreen (10 <sup>-6</sup> )	-
Vives-Rego <i>et al.</i> 1999	Coulter XL	Blue 15mW	-	-	none	SYTO 13 (2.5 $\mu\text{M}$ )	-
Mostajir <i>et al.</i> 1999	ACR 1400-Sp Bruker*	UV 100W	-	-	Formalin 3.7%	DAPI (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Chatila <i>et al.</i> 1999	ACR 1400-Sp Bruker*	UV 100W	-	-	Formalin 3.7%	DAPI (2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Karl <i>et al.</i> 1999	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	PFA 1 %	HOECHST 33342 (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Gin <i>et al.</i> 1999	Coulter EPICS 753	UV 200 mW	-	-	Glut 0.1 %	HOECHST 33342 (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Troussellier <i>et al.</i> 1999	FACSCalibur	Blue 15mW	-	-	-	SYTO 13 (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Servais <i>et al.</i> 1999	FACSCalibur	Blue 15mW	-	-	-	SYTO 13 (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-
Lebaron <i>et al.</i> 1999	FACSCalibur	Blue 15mW	-	-	-	SYTO 13 (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-

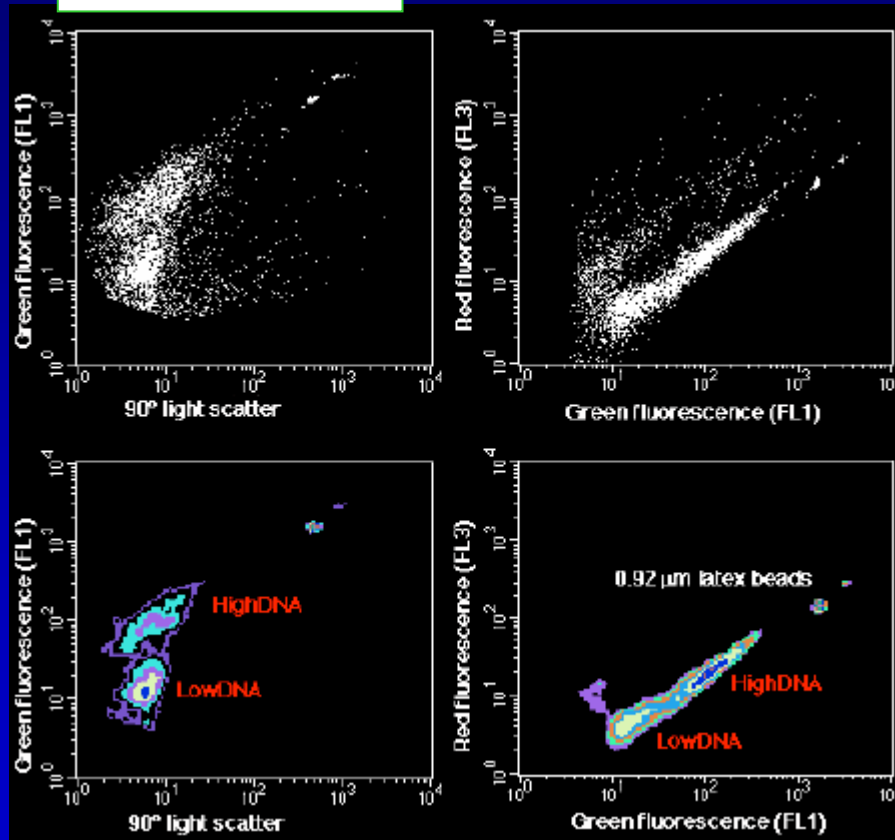
\*Arc-Lamp machines

The Argus-100 (Skatron), the BioRad Bryte and the Bruker ACR 1400-Sp are essentially the same machines.

The FACScan and FACSort evolved to the FACSCalibur, while the FACStar evolved to the FACSVantage

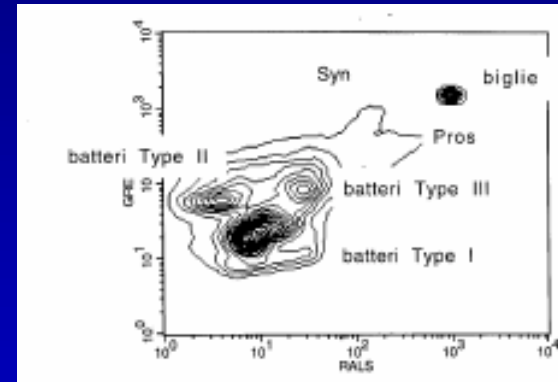
# Procaryotes hétérotrophes (exemple de coloration des acides nucléiques)

SYBR Green I

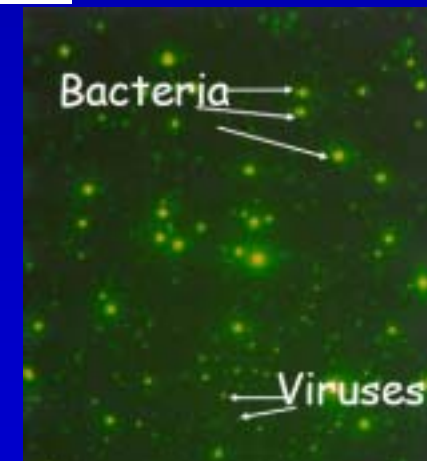


(J.Gasol)

- + Sous-groupes de bactéries
- + Dénombrement



(Casotti, 2000)



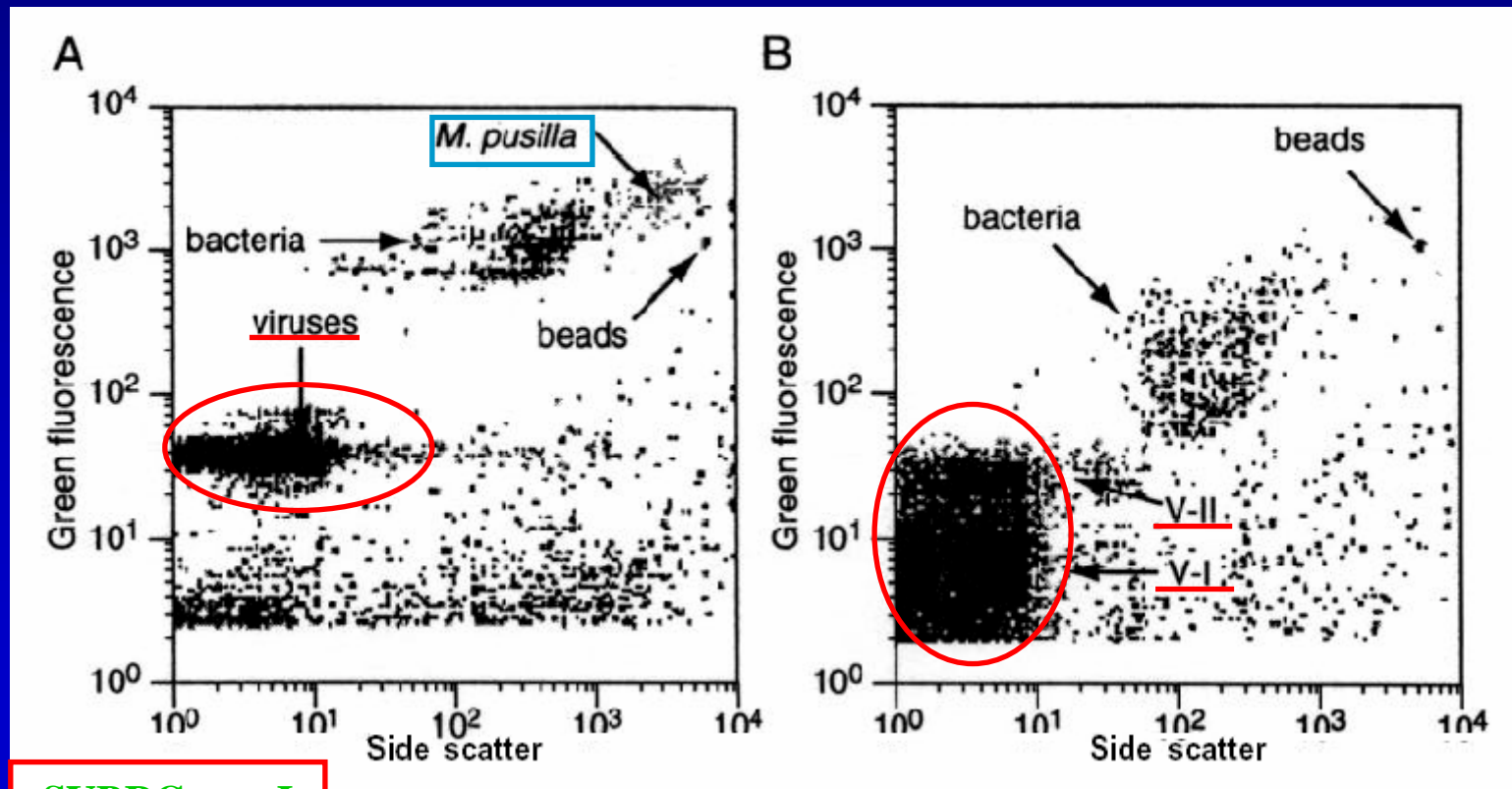
(M. Veldhuis)



# Toujours plus petit : Résolution des Virus (coloration des acides nucléiques)

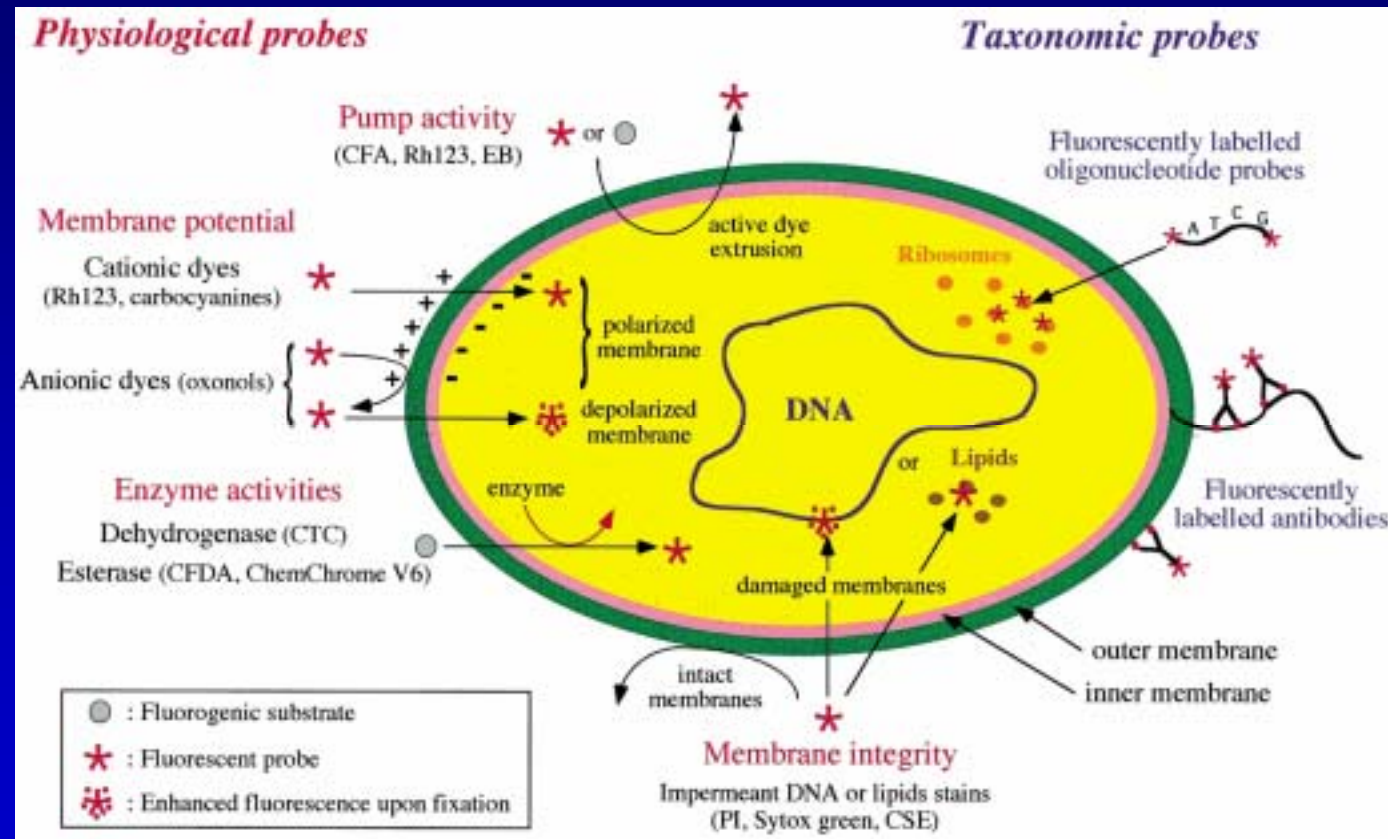
Culture de *M. pusilla*

Echantillon naturel (fjord, Norway)



**SYBRGreen I**

# Fluorochromes : l'analyse individuelle des cellules



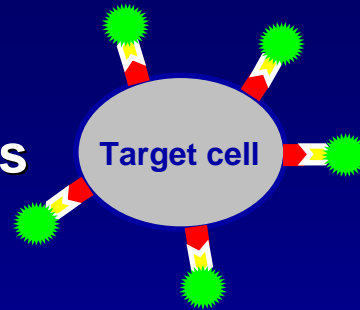
Limitation : les fluorochromes doivent pouvoir pénétrer les enveloppes cellulaires

# Sondes taxonomiques

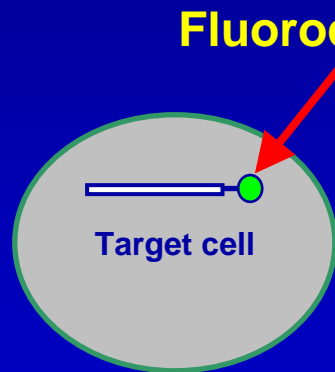
Identification de taxons  
(jusqu'au niveau de l'espèce?)

# Différentes méthodes

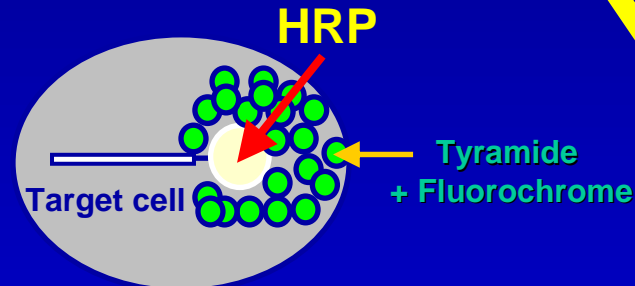
- Anticorps fluorescents



- Sondes moléculaires a acides nucléiques (ARNr 16s)



**FISH**



**TSA- FISH**

**Visualisation :**

- Microscopie  
épifluorescence  
confocale
- Cytometrie en flux

## **Caractérisation physiologique des cellules par cytométrie en flux**

→ Viabilité cellulaire

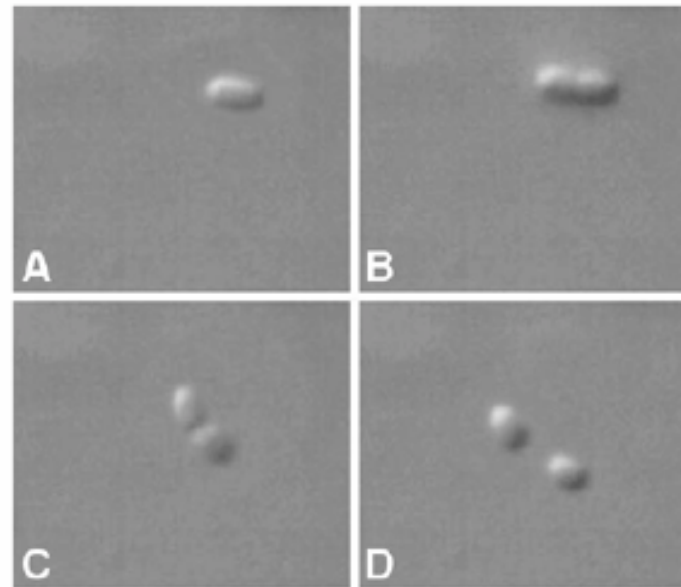
→ Cellules actives/inactives

→ Fonction cellulaire

## La viabilité cellulaire?

- Seules les cellules viables sont responsables des activités mesurées *in situ* par des méthodes globales
- Pourquoi les cellules sont viables ou mortes?  
→ Facteurs?

# Une question de vie ou de mort



**Fig. 1.** Cell division of the bacterium *Enterobacter aerogenes*. A microbiologist contemplating a single cell (A) cannot tell whether it is dead or alive. Confirmation of culturability, namely ability to yield a population discernible to the observer (B and C), is proof that the single cell in (A) was alive. The viability status of the progeny cells (D) in turn cannot be determined unless they exhibit the ability to grow and divide.

# Le concept de viabilité

FUNCTIONAL CELL STATUS	----- INTACT CELLS -----		PERMEABILISED
	METABOLICALLY ACTIVE CELLS		
TEST CRITERIA	REPRODUCTIVE CELLS	GROWING CELLS	
		CELL DIVISION	<b>METABOLIC ACTIVITY</b>
DETECTION METHOD	<i>CELL COUNTING</i>	<u>ENERGY DEPENDENT</u>	<u>ACTIVE</u> MEMBRANE
	FIXED VOLUME COUNT	<i>BIOASSAY</i>	INDISCRIMINATE UPTAKE OF CYTOPLASMIC STAINS
	TIME INTEGRATION	DNA	OF MEMBRANE
	RATIOMETRIC COUNTING	UNDETERMINED	LE DNA STAINS (PI, 7AAD)
	<i>CELL TRACKING</i>	Count, DVC)	
	COVALENT LABELLING	<i>PUMP ACTIVITY</i>	
	(INTRACELLULAR OR MEMBRANE)	pH CONTROL, DYE EFFLUX	BUT UPTAKE OF SUPRAVITAL DNA STAINS (HOECHST 33342, DAPI, SYTO 9/13 ToPro-3, EB)
		<i>MEMBRANE POTENTIAL</i>	
		ACCUMULATION OF CATIONIC DYES, DISSIPATION OF ANIONIC DYES	
		<u>ENERGY INDEPENDENT</u>	
		<i>ENZYME ACTIVITY</i>	
		SUBSTRATE CONVERSION BY ESTERASE / DEHYDROGENASE	
		----- CELLS WITH NUCLEIC ACID DAMAGE -----	

Rétention de substrat fluorescent



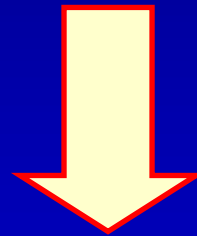
Absorption/relargage de colorant fluorescent



# Test de viabilité

Basé sur l'intégrité membranaire:

- Isole la cellule de son environnement
- Régulation des ions et des échanges de molécules
- Membranes bioénergétiques → synthèse d'ATP (énergie)



**Principe:**

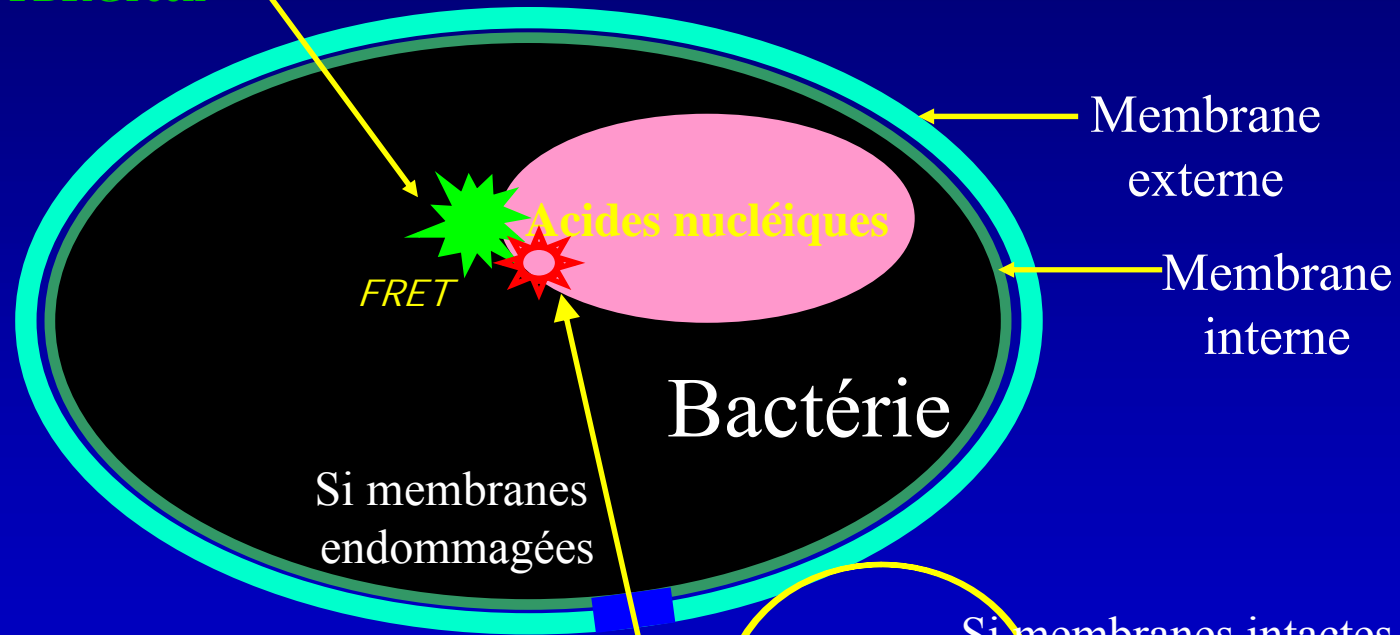
**Double marquage des acides nucléiques  
Nucleic Acid Double Staining (NADS)**

# Principe du double marquage (NADS)

**Membranes perméables  
au SYBR Green**



SYBRGreen



Membrane  
externe

Membrane  
interne

Bactérie

Si membranes  
endommagées

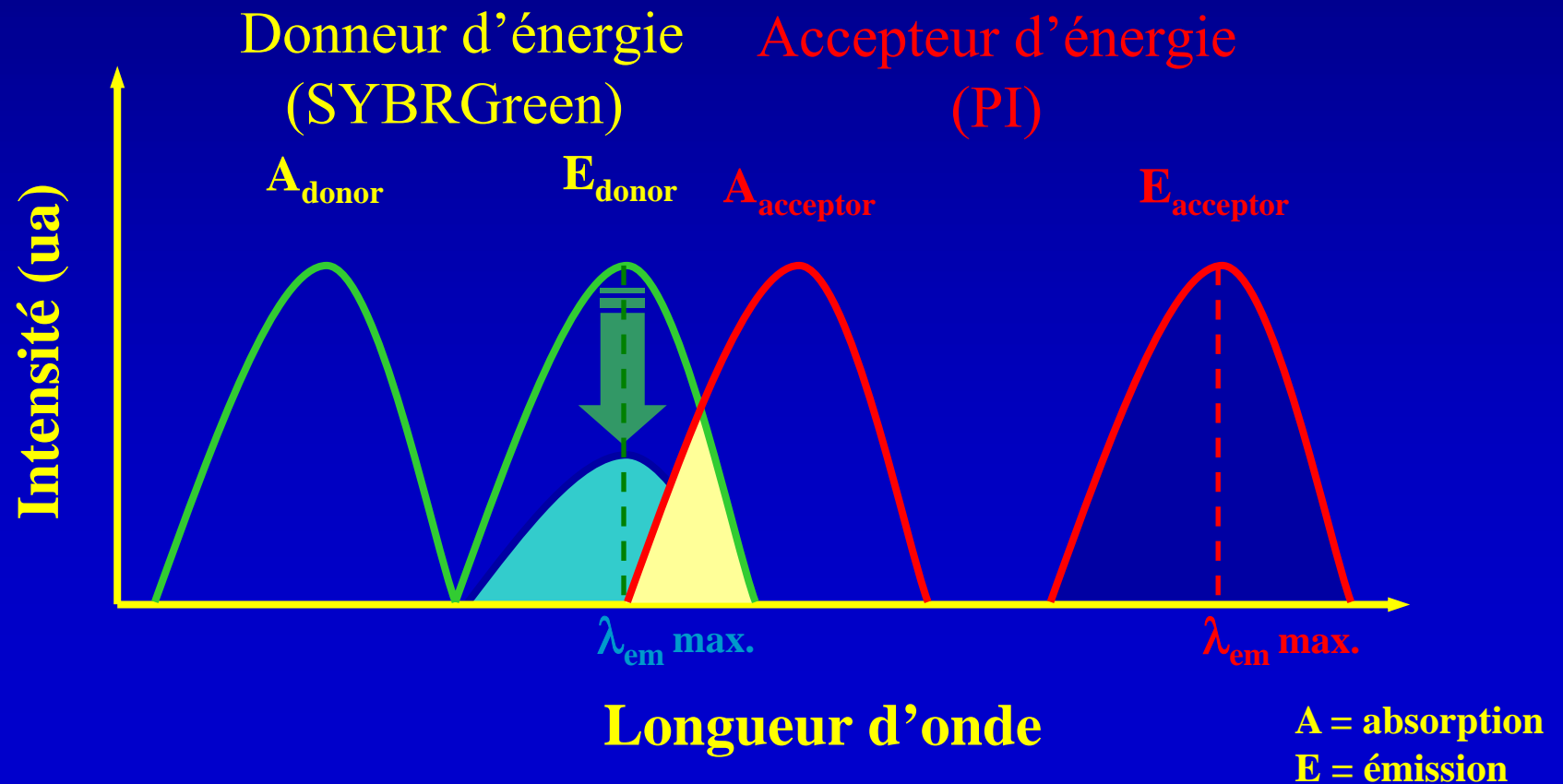
Si membranes intactes

Propidium iodide (PI)

**Membranes intactes  
non perméables au PI**

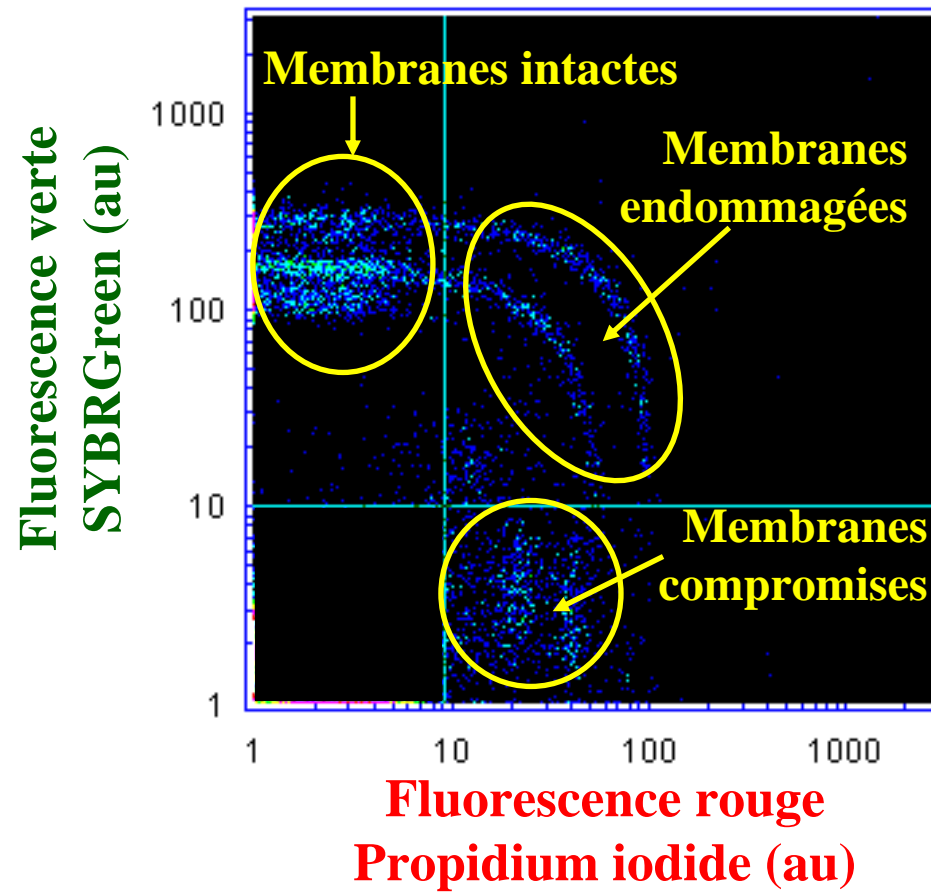
# Transfert d'énergie par résonance

distance entre les molécules < 7 nm



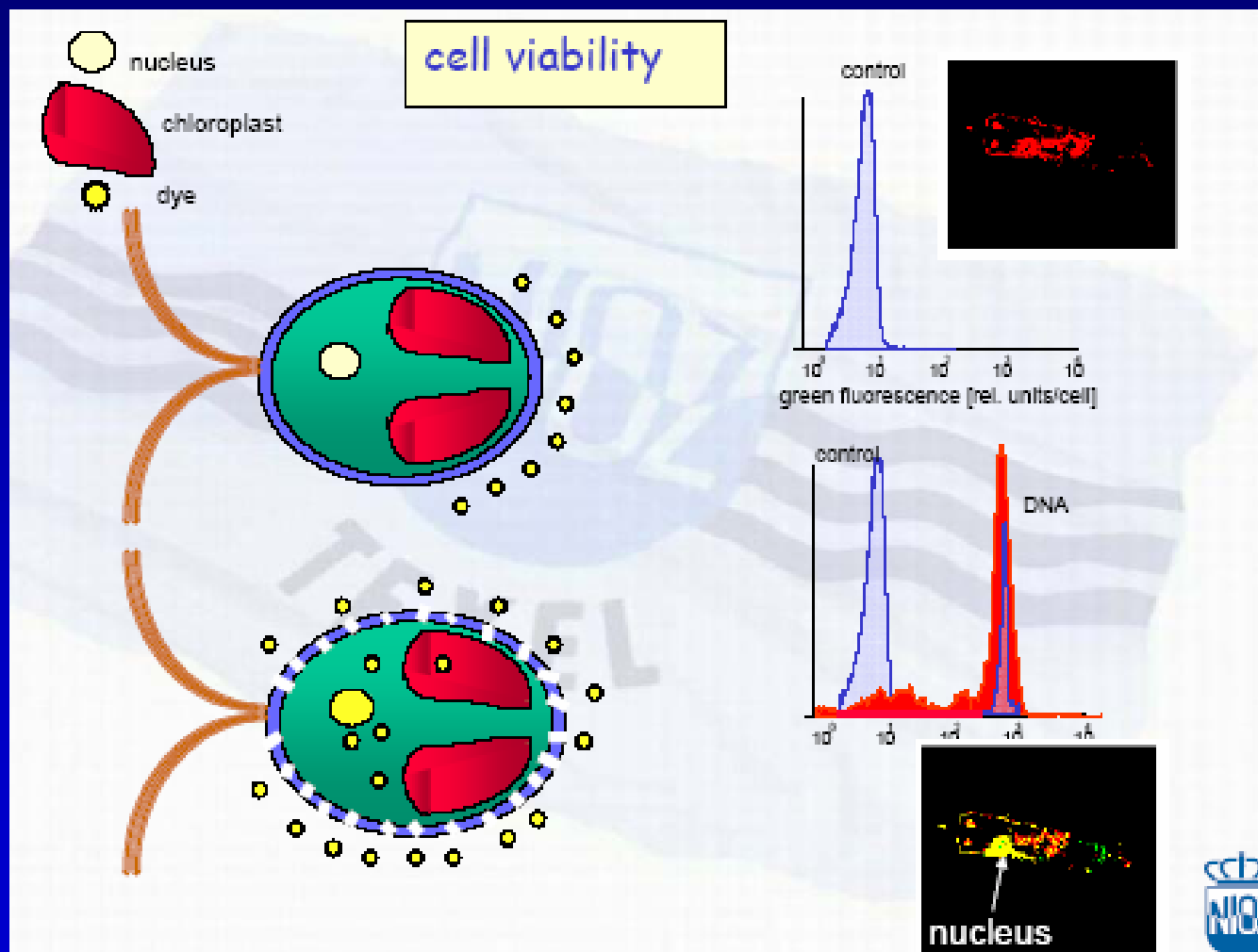
# Viabilité par cytométrie en flux

*E.coli*



# Viabilidad del fitoplancton

- El principio del test es basado en la integridad de las membranas y un colorante de ADN
- El colorante fluorescente (SYTOX green) no penetra en las membranas intactas



(M. Veldhuis)

## Cellules viables actives/inactives

→ Cycle cellulaire (division)

→ Détection d'activités enzymatiques

Estérases, Phosphatases, Protéases, Peroxidases

→ Détection/quantification d'activité métabolique

Pompes ioniques (Ca),

Energie (potentiel transmembranaire et mitochondrial)

Respiration

## Discrimination des bactéries basée sur l'activité métabolique

- Deux types de méthodes pour détecter les cellules métaboliquement actives:
  - Basées sur des processus énergie-dépendent (biosynthèses, potentiel de membrane, transport de molécules à travers les membranes, etc.)
  - Basées sur des processus énergie-indépendent (activité enzymatique)

# Exemple de méthode basées sur des processus énergie-dépendent

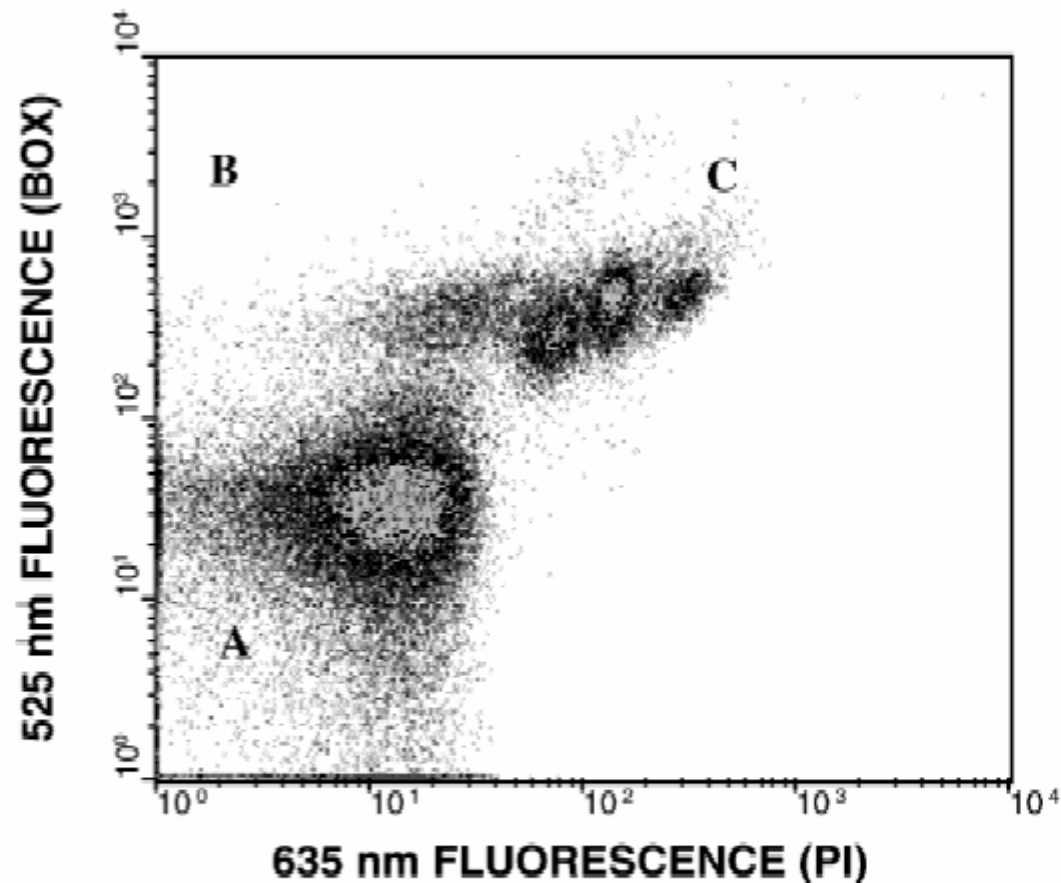
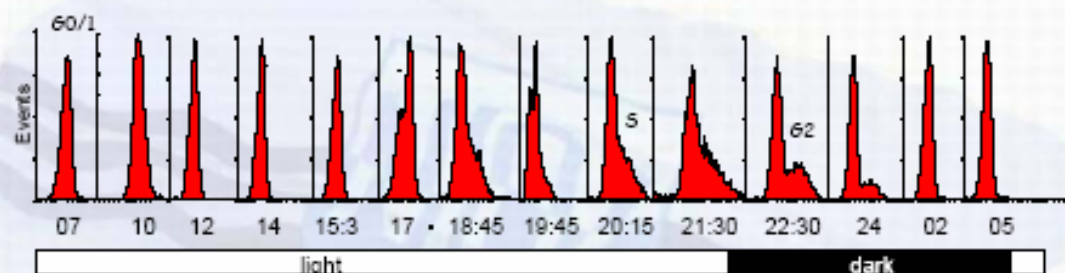


Fig. 9. Cell sample taken after 36 h during a high cell density fed-batch fermentation with *E. coli* W3110 stained with propidium iodide and bis-oxonol. Three main sub-populations of cells can be distinguished, corresponding to healthy cells (A), no staining, cells with no membrane potential (B), stained with bis-oxonol; and cells with permeabilised membranes (C), stained with both propidium iodide and bis-oxonol (after Hewitt et al. (1999a); Hewitt et al. (1999b)).

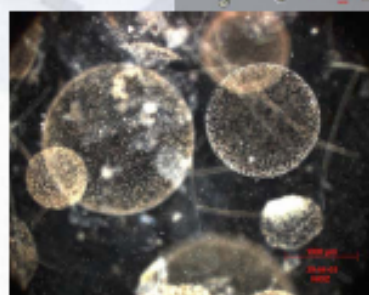


# Cycle cellulaire

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



$$\mu_{DN} = \frac{1}{S+G} \int_0^{24} \ln[1+fS+G(t)] \text{ (day}^{-1}\text{)}$$



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>



Limitations:

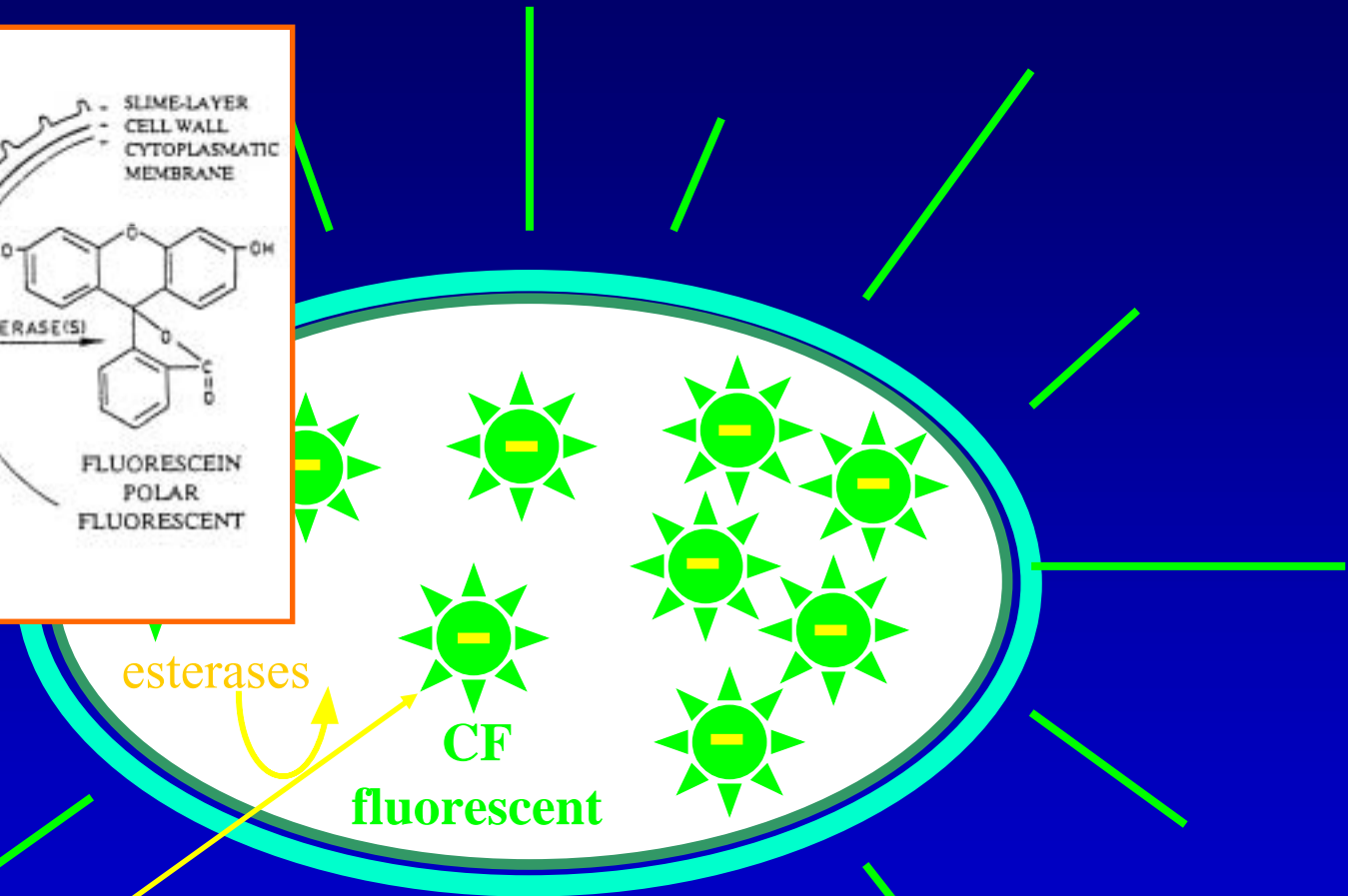
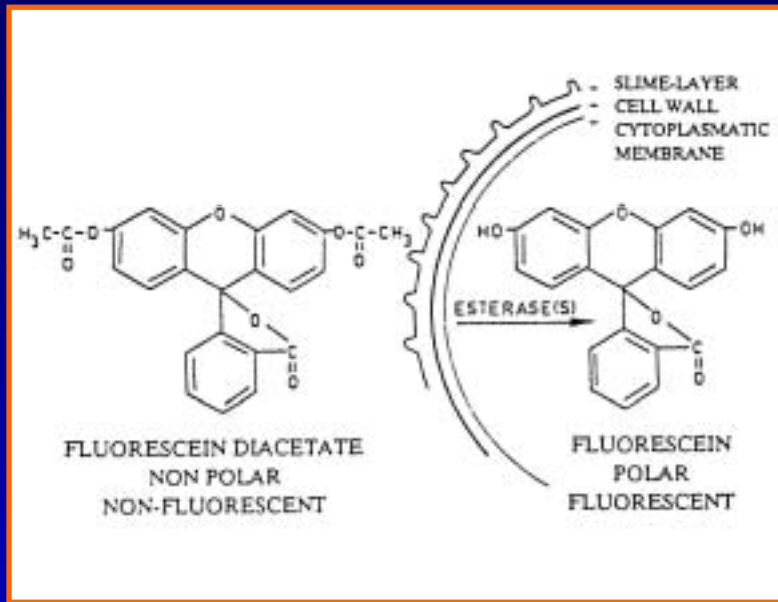
- Cellules fixées
- Colorant stœchiométrique

(Courtoisie de M. Veldhuis)

## Exemple de méthode basée sur des processus énergie-indépendent

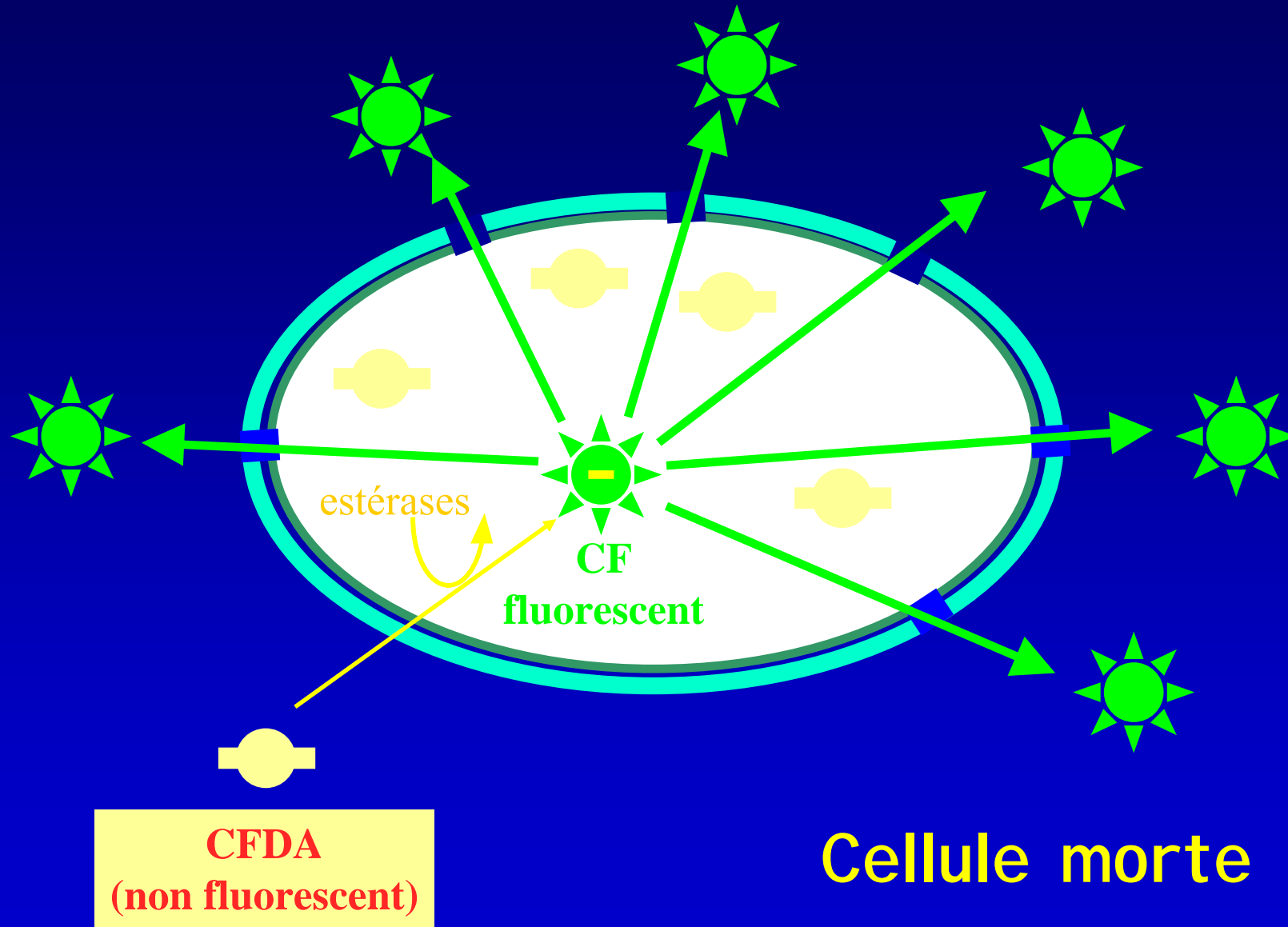
- **Activité enzymatique**
  - Activité estérase (diacetate de fluorescéine)  
(FDA, CFDA, BCECF-AM, Calcein-AM, Chemchrome B)
  - Déshydrogénase (CTC)

# Détection d'activités enzymatiques (estérases)



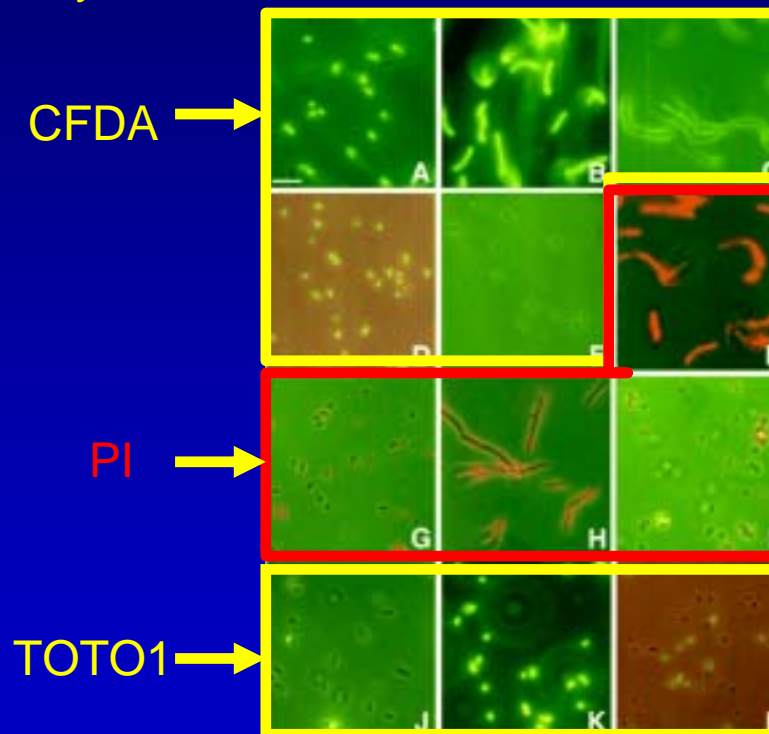
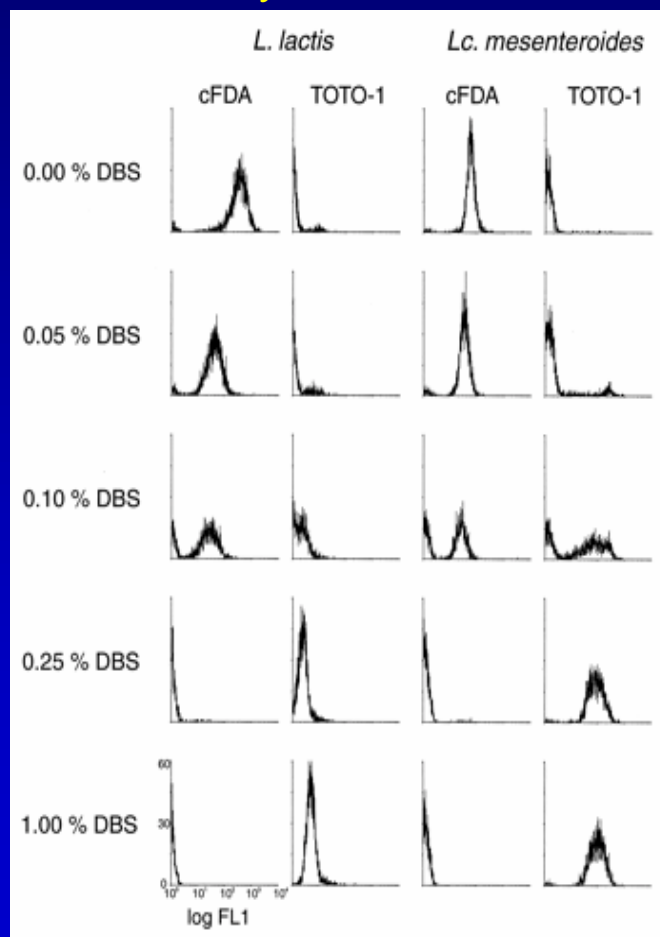
**CFDA**  
(non fluorescent)

# Principe du CFDA (suite)



# Exemple d'analyse par cytométrie en flux combinant CFDA et un autre colorant

## Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria



*Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* cell suspensions after exposure to deconjugated bile salts (DBS)

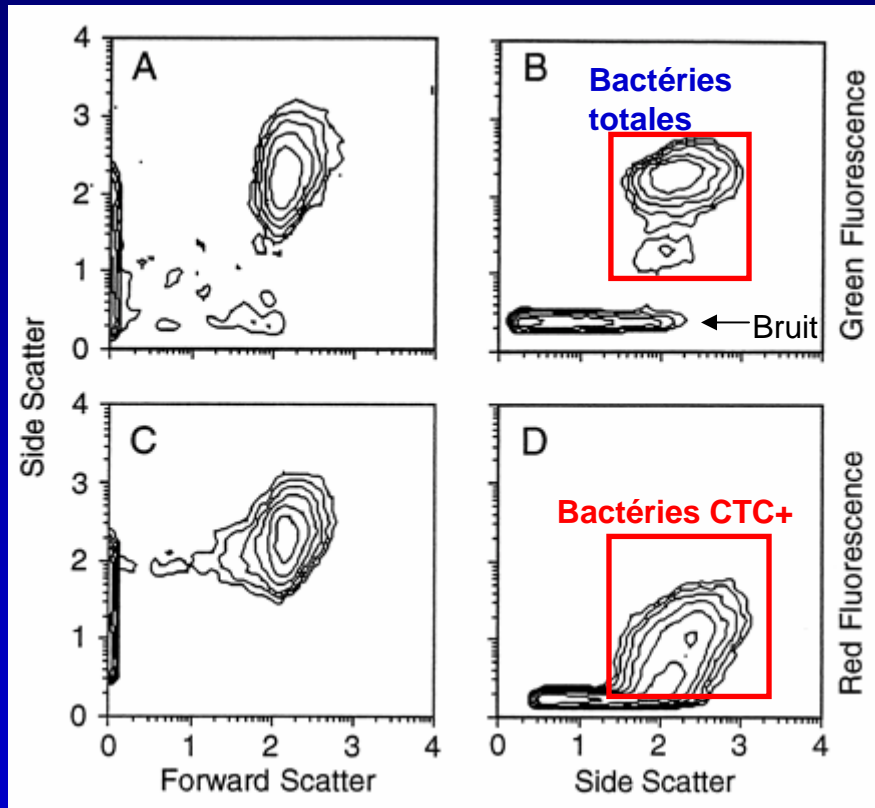
# Activité déshydrogénase (bactéries qui respirent)

## Principe du CTC:

- Le 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) est réduit par les déshydrogénases (enzymes de la chaîne respiratoire) en un précipité fluorescent rouge (**CTC-formazan**) qui peut être détecté à faible concentration dans les cellules
- Indique le fonctionnement de la chaîne respiratoire

--- Les échantillons incubés avec le CTC peuvent être fixés et conservés avant analyse ---

# Exemple d'analyse par cytométrie en flux avec le CTC



B- Dénombrement des bactéries totales (marquage des acides nucléiques au Picogreen)

D- dénombrement des bactéries CTC+cells

## Est-ce que toutes les méthodes de mesure de viabilité/activité se valent?

- Echantillon dépendant (Salinité, pH.)
  - Dépend des cellules (la sonde doit pénétrer les cellules)
- **COMBINER PLUSIEURS FLUOROCHROMES POUR APPREHENDER LA VIABILITE PAR DIFFERENTES FONCTIONS** (les spectres d'émission de fluorescence des différents colorants ne doivent se recouvrir)



# Conclusion

# Informations nécessaires sur les assemblages microbiens

- **Identification**

- 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**

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

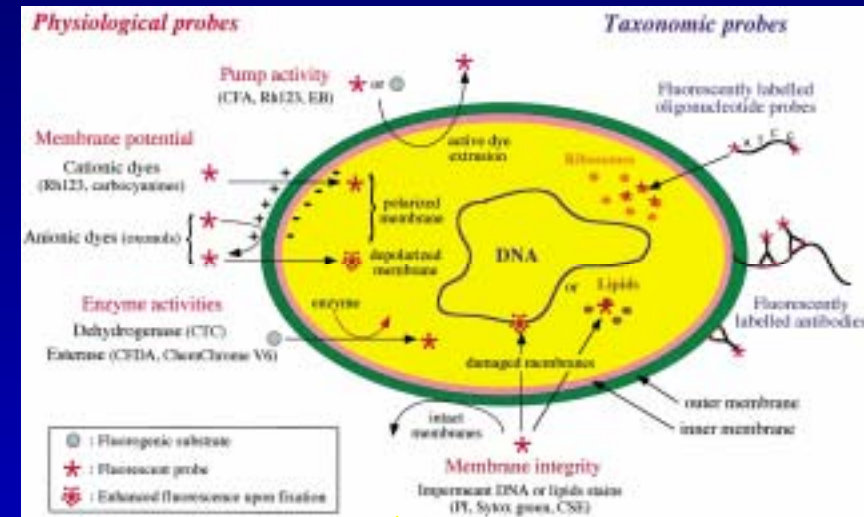
- **Fonction cellulaire**

- Sondes métaboliques pour mettre en évidence l'activité cellulaire (voies métaboliques, photosynthèse, respiration, activité phosphatase, production d'aldéhydes)
- Détection de la capacité des cellules à se diviser (crucial pour les risques sanitaires)
- Caractériser le taux de croissance spécifique par espèce (échantillonnage à haute fréquence temporelle et spatiale)

# Vers l'analyse individuelle des cellules

## Cytométrie

- En flux
- En phase solide
- Statique (microscopie)



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

A scenic sunset over a bay with silhouetted cliffs and a small boat. The sky is a vibrant orange and yellow, reflecting on the water. The foreground shows dark silhouettes of trees and a small boat on the water.

**Thank you**

**Gracias**

**Grazie**

**Merci**

**Obrigado**

**Danke**