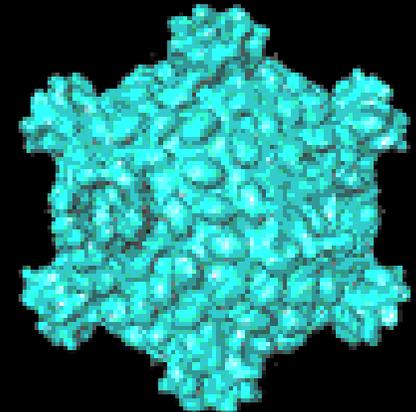


La cytométrie en flux appliquée à l'écologie virale aquatique: tentative de revue sur la question

Stéphan JACQUET

INRA, Thonon-les-Bains



CONTENU DE L'EXPOSE

Techniques d'observation et de comptage

Principes – Avantages – Inconvénients - Comparaison

La Cytométrie en flux et l'écologie des virus aquatiques

Quid de la littérature ?

Utilisation de la Cytométrie en flux

On y retourne avec des exemples précis !

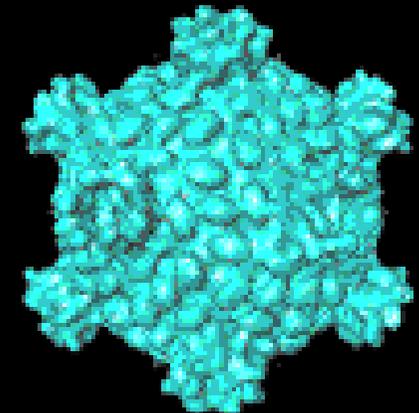
Quelques recommandations s'il en fallait

Ce qui est vrai et ce qui ne l'est pas forcément

Conclusions et Perspectives

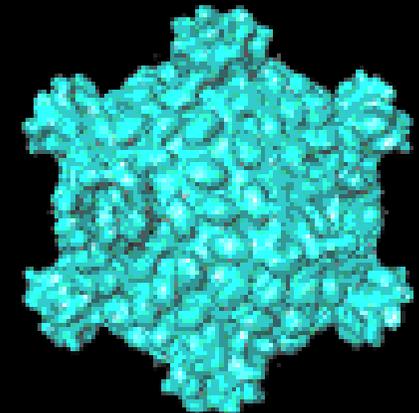
Des avancés, des problèmes et des défis

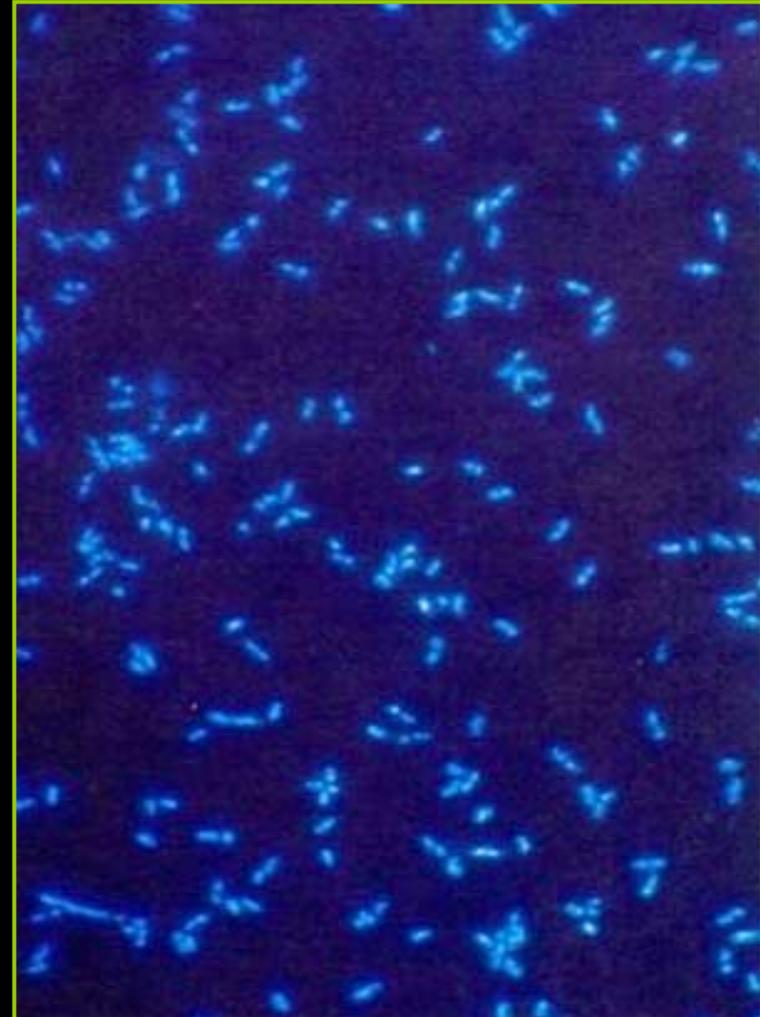
Remerciements



***“In the field of observation,
chance favors the prepared mind”***

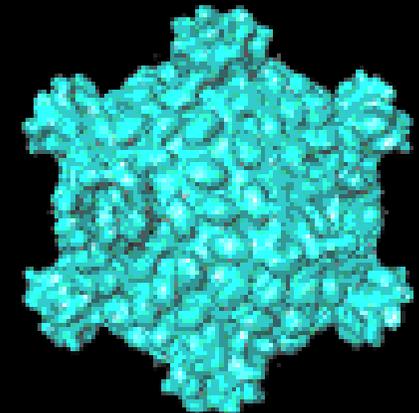
Louis Pasteur





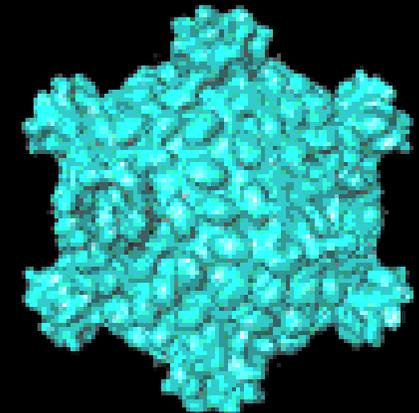
« L'essentiel est invisible pour les yeux »

Antoine de Saint-Exupéry



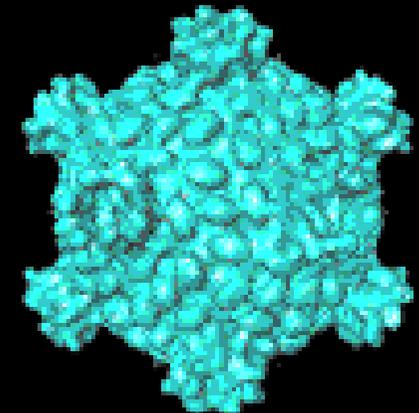
“Small is beautiful”

John Raven



“All the world is a phage”

William Shakespeare



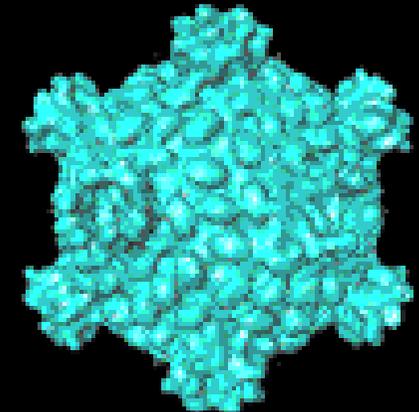


Comprendre le rôle du vivant dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques

nécessite de répondre au moins à 3 questions fondamentales :

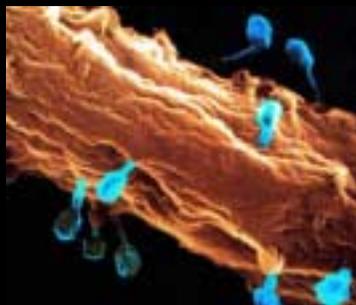
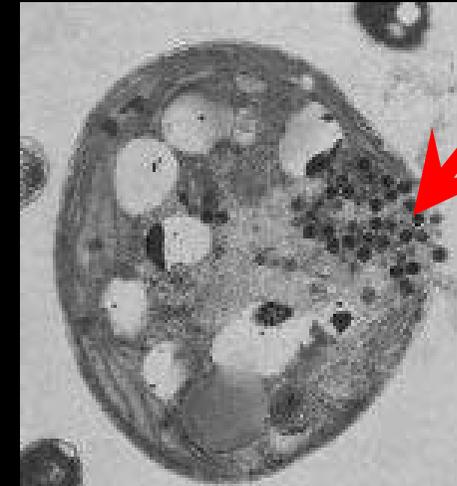
- Quels sont les organismes présents et quelle est leur abondance ?
- Quels sont leurs taux métaboliques et reproductifs ?
- Quels sont leurs rôles dans le fonctionnement de l'écosystème ?

→ **Phytoplancton, zooplancton et poissons**
→ **Peu de travaux sur le compartiment microbien**



Abondance des organismes dans 1 ml d'échantillon d'eau (lac, mer, océan)

Virus / phages	10 000 000
Bactéries hétérotrophes	1 000 000
Bactéries photosynthétiques	100 000
Protozoaires	< 10 000
Algues	< 5 000
Zooplancton	<< 1
Poissons	0



Agents de mortalité cellulaire

Agents recycleur de la MO

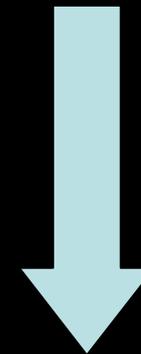
Agents de contrôle de la diversité

Agents intervenant dans les transferts et recombinaisons génétiques

Faits marquants

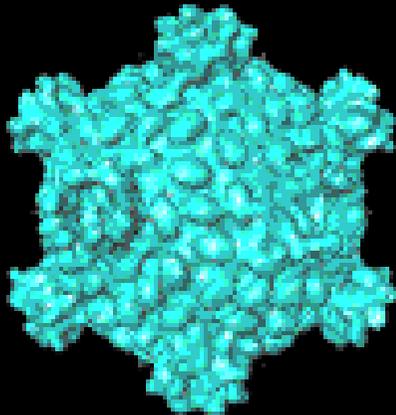
- 1974 Importance des bactéries aquatiques (10^6 ml⁻¹)
Le réseau trophique microbien (*Pomeroy*)
- 1980 Production bactérienne élevée (*Hagström*)
- 1983 La boucle microbienne (*Azam*)
- 1984 Prédation des bactéries par protozoaires (*Sherr*)
- 1989 Importance des virus (10^7 ml⁻¹ ; *Bergh*)
- 1990 Incroyable diversité bactérienne (*Giovanonni*)
- 1990 Les virus réduisent la production primaire (*Suttle*)
- 1995 Les virus responsables de 50% de la mortalité bactérienne (*Fuhrman*)
- 1996 Les virus, redistributeurs de la MOD (*Middelboe*)
- 1997 Concept du « killing the winner » (*Thingstad*)
- 1998 Les virus, agents d'échange génétique (*Paul*)
- 2004 Incroyable diversité virale (*Weinbauer*)

Age de la bactériologie



Age de la virologie

Il y a plusieurs méthodes connues pour détecter et compter les virus en milieu aquatique



➤ Morphologie – taille des particules

EFM

TEM - SEM

FCM

➤ Approches moléculaires

PCR AVS1/AVS2, DNAPol, g20, etc

PFGE – taille du génome

PCR quantitative

➤ Techniques de culture

PFU

MPN

Les méthodes traditionnelles et courantes pour compter les virus sont :

- **Plaque Assay**

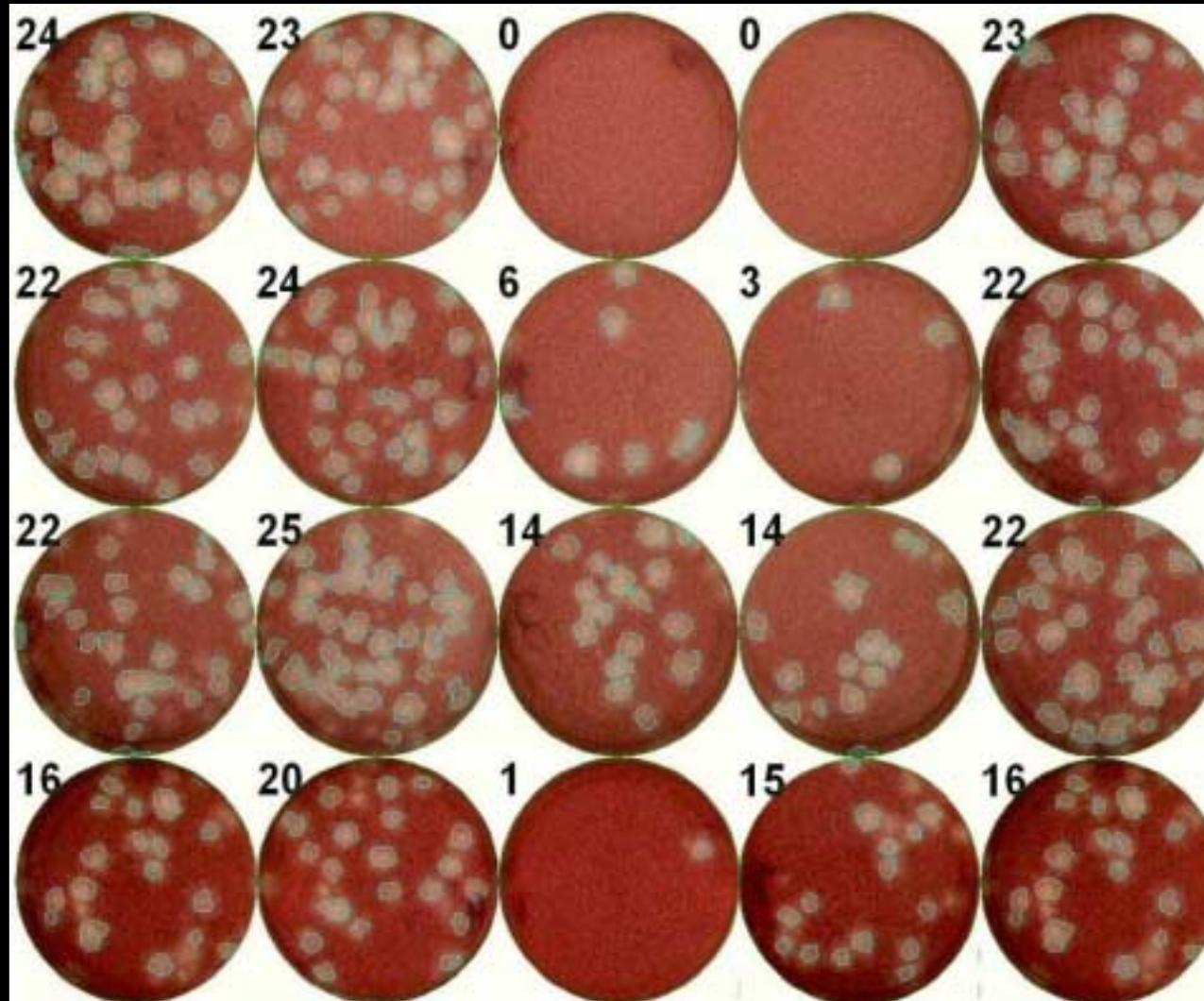
- **TEM**

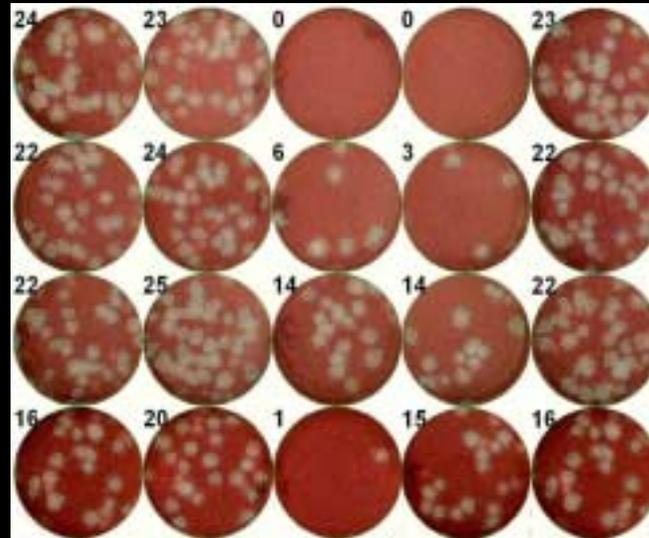
Utilisées depuis > 50 ans

- **EFM**

- **FCM**

Utilisées depuis > 10 ans
Liées au développement des marqueurs fluorescents





Type: **Plaque Assay**

Principe:

Compter des plages de lyse, correspondant à l'action d'un ou plusieurs virus infectieux.

Comptage: oeil

Avantages

On voit (on prétend!) les organismes

Méthode relativement simple

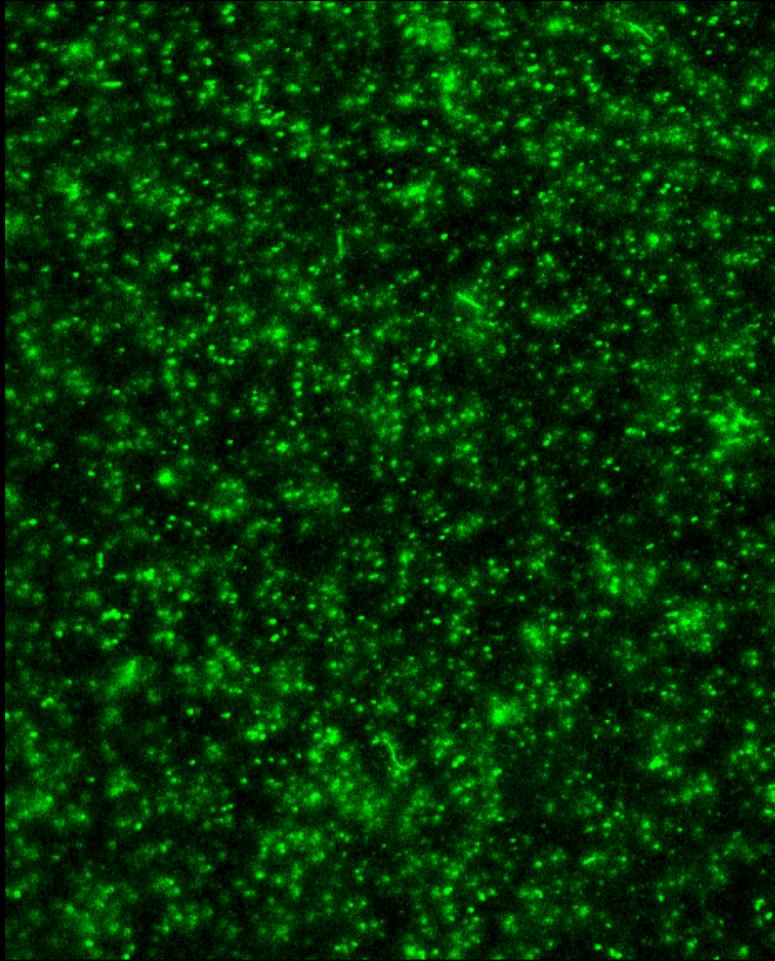
Désavantages

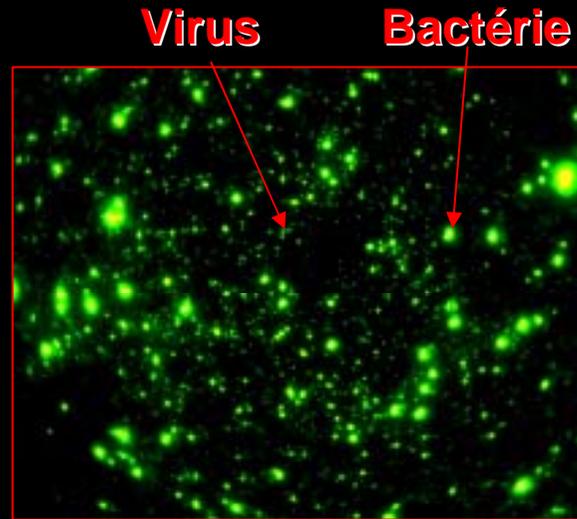
Mesure des virus « actifs » ou infectieux uniquement

Pas si évident à réaliser

Méthode lente: Jours à semaines

Applications limitées: l'Hôte doit être connu. Quid du problème de lysogénie ?





Type: EFM

Principe:

Cibler l'ADN bactérien et viral -
fluorescence après excitation
lumineuse.

Utiliser un marqueur hautement
fluorescent des acides nucléiques
(**SYBR Gold**)

Comptage: oeil

Avantages

On voit (on prétend!) les organismes
Méthode simple
Méthode relativement rapide

Désavantages

Aucune identification possible / Bactvir ?
Oeil humain (reproductibilité?)
Fluorescence des particules ("Fading")
Calcul de conversion entre comptage réel
et concentration réelle

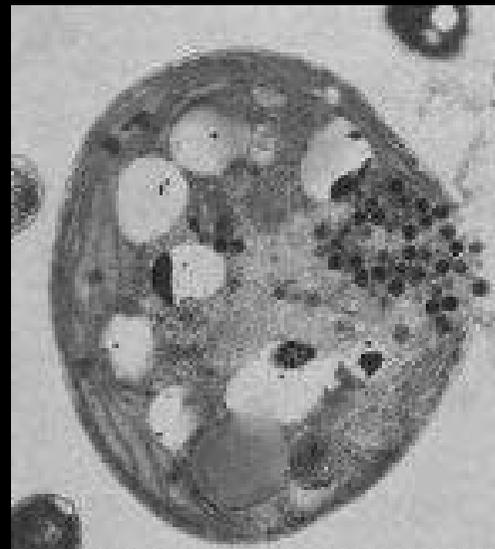
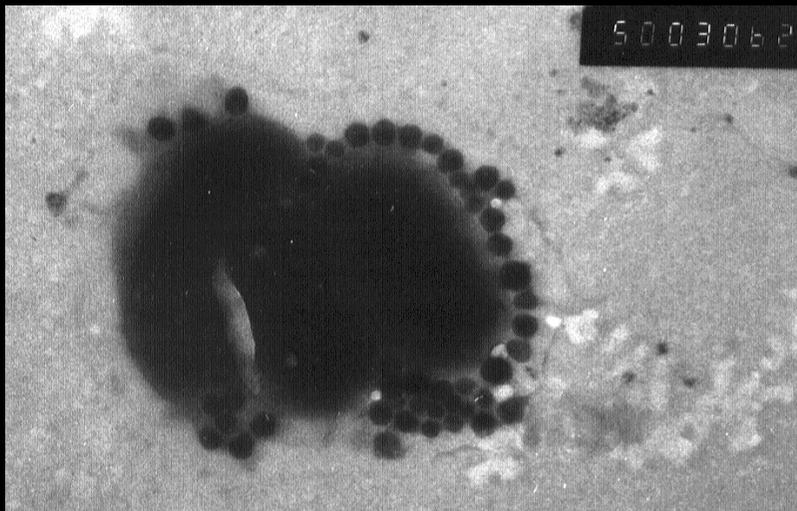
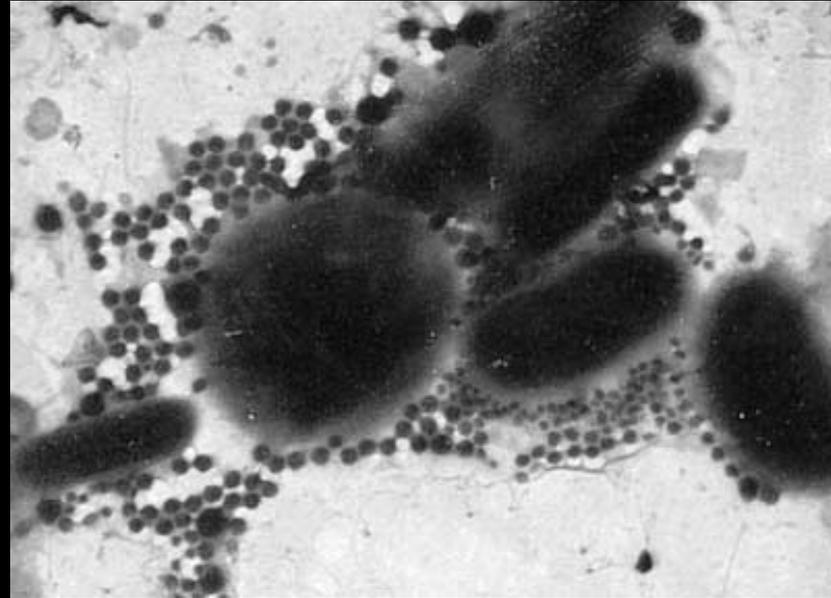
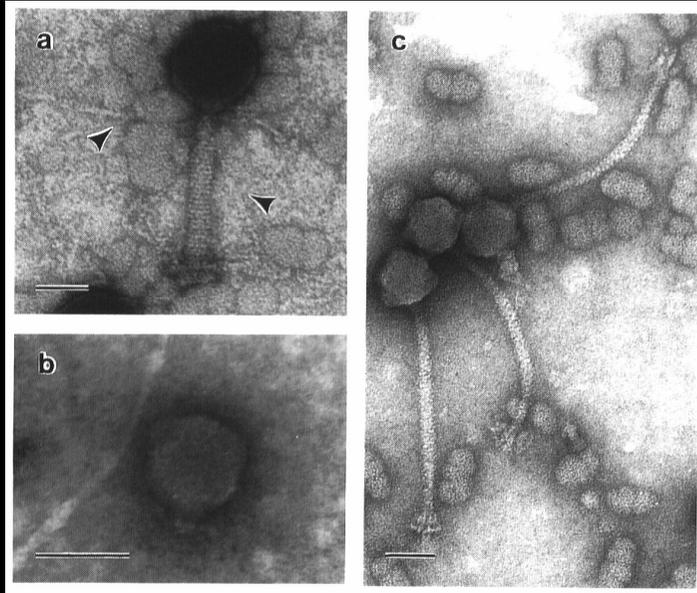
Il y a une limite de détection des particules virales

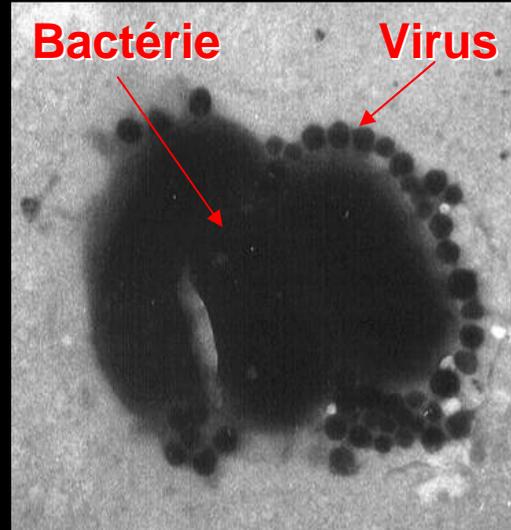
EFM / SYBR Gold

11,2 kb ssRNA

$\varnothing = 32 \text{ nm}$

RSRNAV (Nagaski et al. 2004)





Type: TEM

Principe:

Diffraction d'un flux d'électrons par des composés colorés des bactéries et des virus

Comptage: oeil

Avantages

On voit (reconnait ?) les organismes

Accès à de nombreux paramètres ou événements : Comptage, taille, forme, lyse, etc

BS, FVIC, (FIC, VIBM)

Désavantages

Oeil (reproductibilité ?)

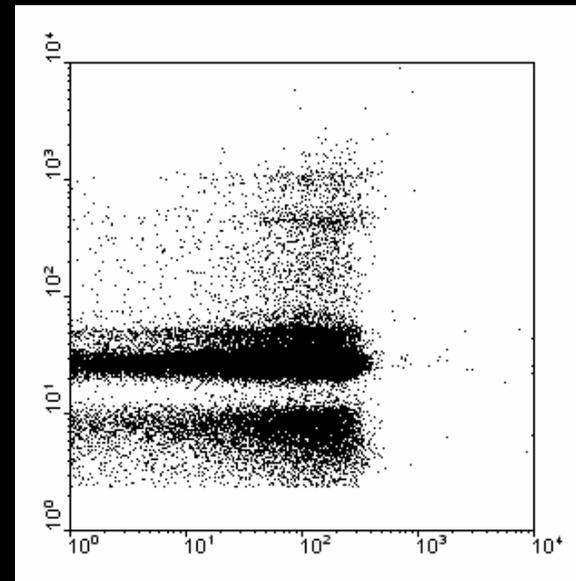
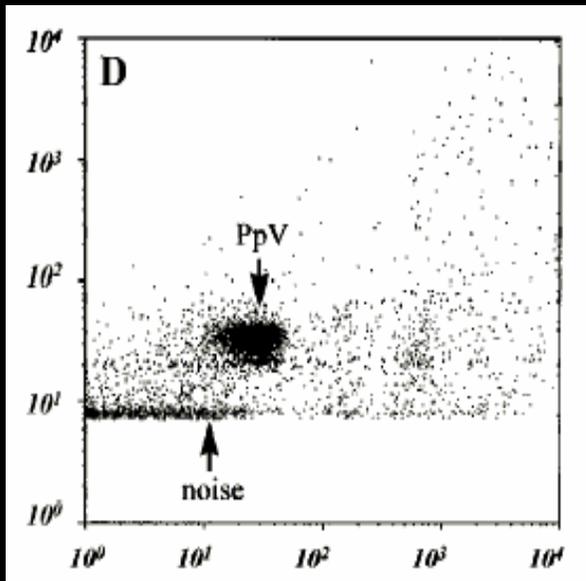
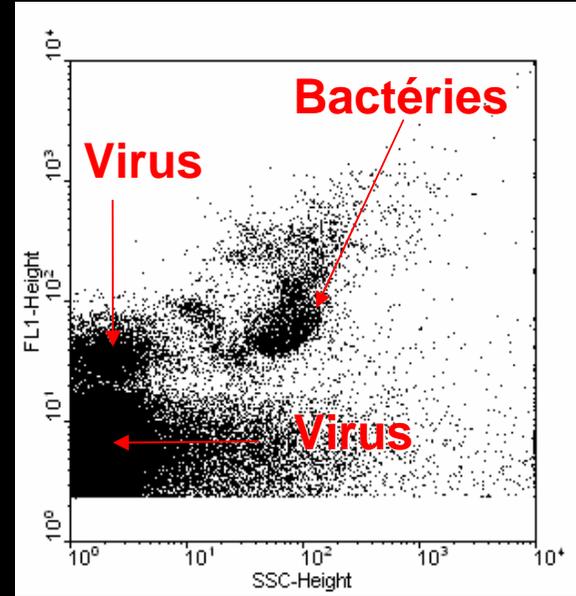
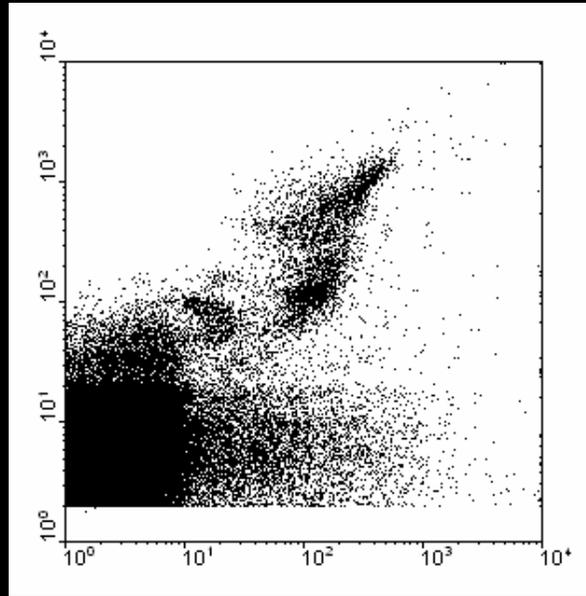
Méthode longue, non routinière

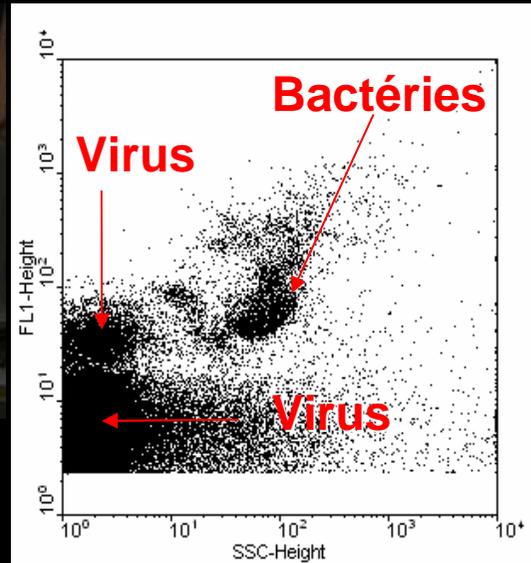
Personnel qualifié

Conversion du nombre de virus compté au nombre réel ?

Conversion BS : VIBM ?

**Il n'y a aucune limite de taille pour la détection
des particules virales en TEM**





Type: FCM

Principe:

Cibler l'ADN bactérien et viral - fluorescence après excitation lumineuse LASER.

Utiliser un marqueur hautement fluorescent des acides nucléiques (**SYBR Green I**)

Comptage: Machine

Avantages

- Méthode rapide
- Grand nombre d'échantillons
- Quantification en routine possible
- Grande reproductibilité – Erreur faible
- Discrimination des particules

Désavantages

- On voit des spots !
- Identification rarissime
- Surestimation des virus bactériophages ?
- Limite de détection

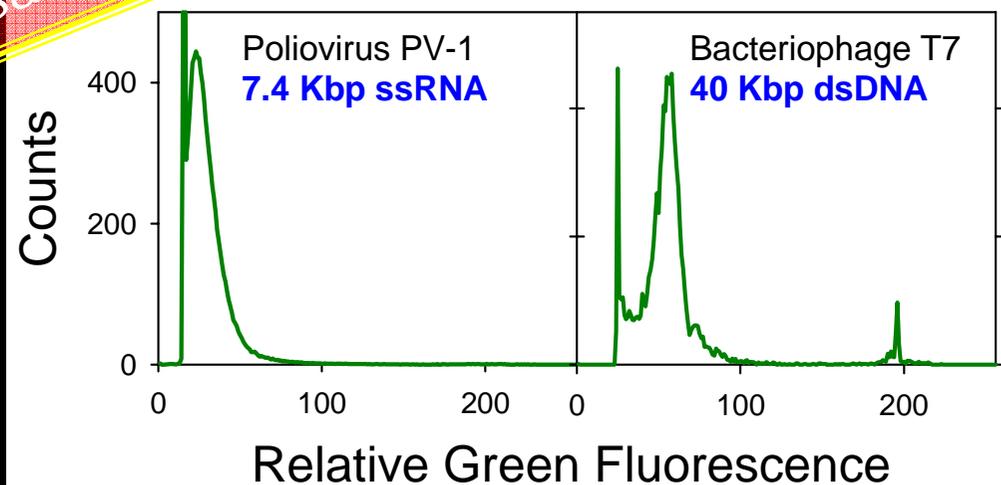
Il y a une limite de détection des particules virales

FCM / SYBR Green I

7.4kb ssRNA / $\varnothing=30\text{nm}$ (PV-1): At the limit of detection

40 kb dsDNA / $\varnothing=60\text{nm}$ (Phage T7): Detectable

(Brussaard et al. 2000)



Analytical Biochemistry **304**, 249–256 (2002)

doi:10.1006/abio.2002.5616, available online at <http://www.idealibrary.com> on **IDEAL**[®]



Quantitative Intercomparison of Transmission Electron Microscopy, Flow Cytometry, and Epifluorescence Microscopy for Nanometric Particle Analysis

Matthew M. Ferris, Carrie L. Stoffel, Thain T. Maurer, and Kathy L. Rowlen¹

Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, Colorado 80309

Received December 5, 2001; published online April 11, 2002

Coût, performances, simplicité d'utilisation, préparation des échantillons

Comptages les plus élevées : FCM > EFM > TEM

Photobleaching

Interférons

**The winner is :
Les cytomètres en flux commerciaux**

Recherche bibliographique sur Internet

Bases de données: CC, ISI, WOK, CAB, etc

All years, all languages, all document types

Flow cytometr* AND virus*	~ 6 000 Références
Flow cytometr* AND virus* AND Aquatic	~ 50 Références
Flow cytometr* AND virus* AND Marine	~ 100 Références
Flow cytometr* AND virus* AND Freshwater	2 Références

septembre 2005

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Jan. 1999, p. 45–52
0099-2240/99/\$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 65, No. 1

Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry

DOMINIQUE MARIE,^{1*} CORINA P. D. BRUSSAARD,² RUNAR THYRHAUG,²
GUNNAR BRATBAK,² AND DANIEL VAULOT¹

*Station Biologique, CNRS, INSU and Université Pierre et Marie Curie, 29682 Roscoff cedex, France,¹
and Department of Microbiology University of Bergen, N-5020 Bergen, Norway²*

Received 26 May 1998/Accepted 6 October 1998



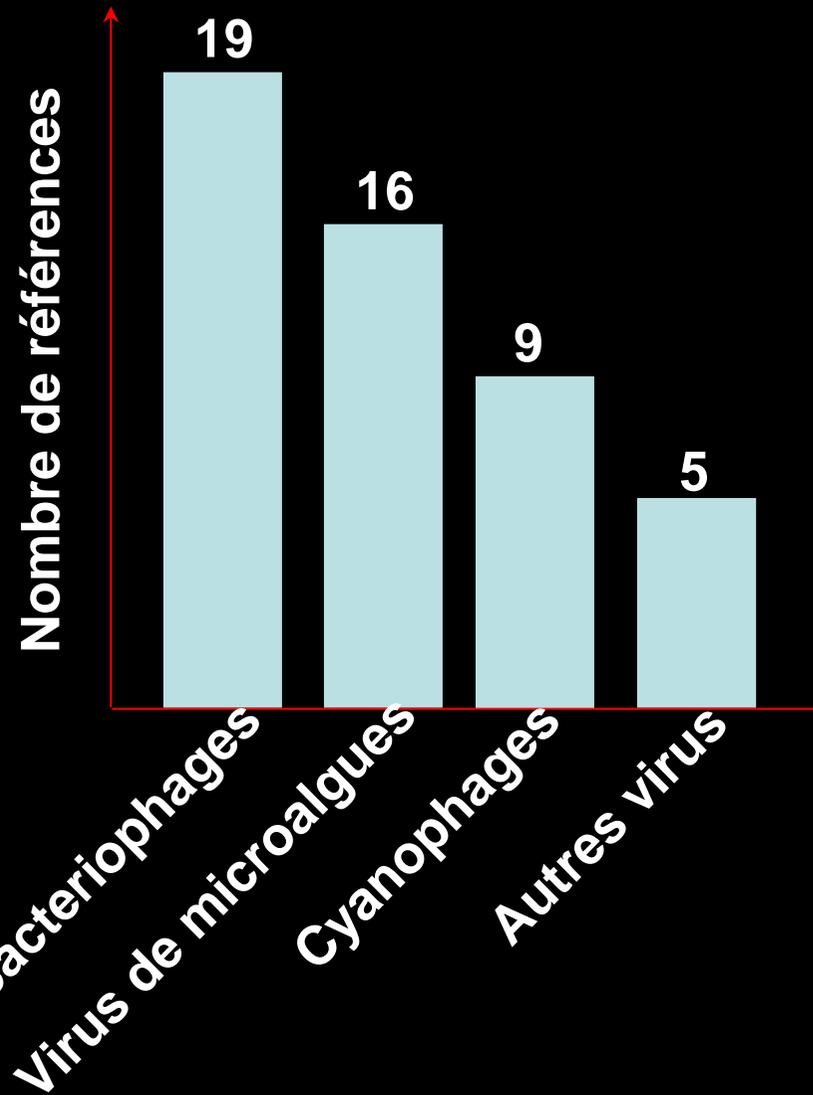
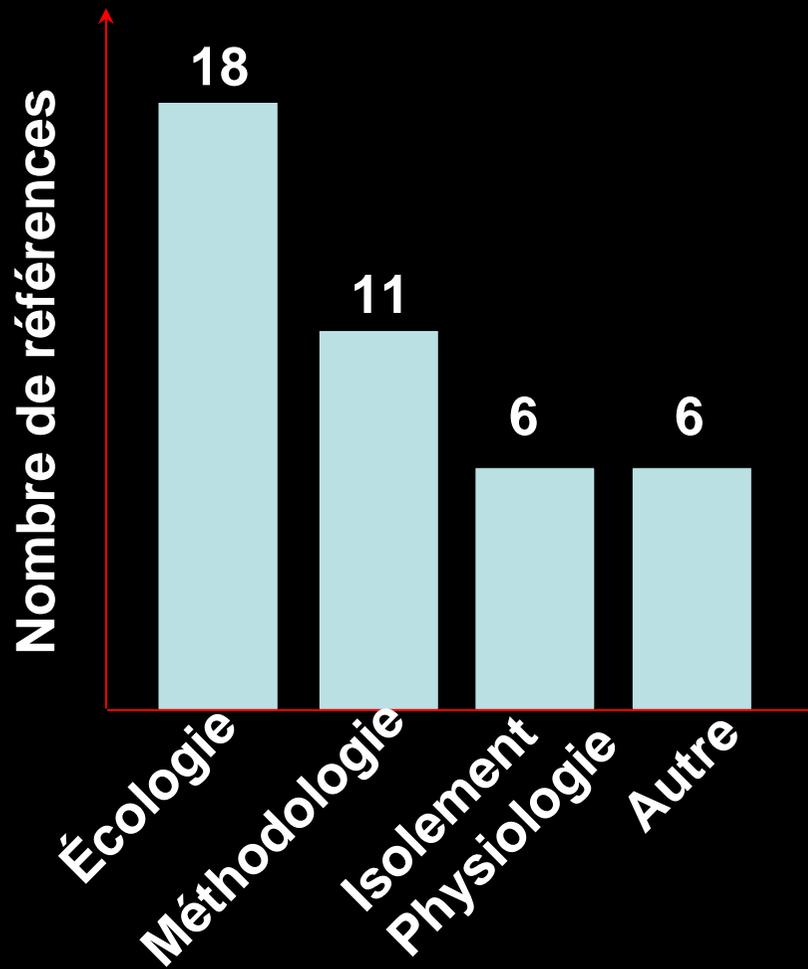
AFFINAGE

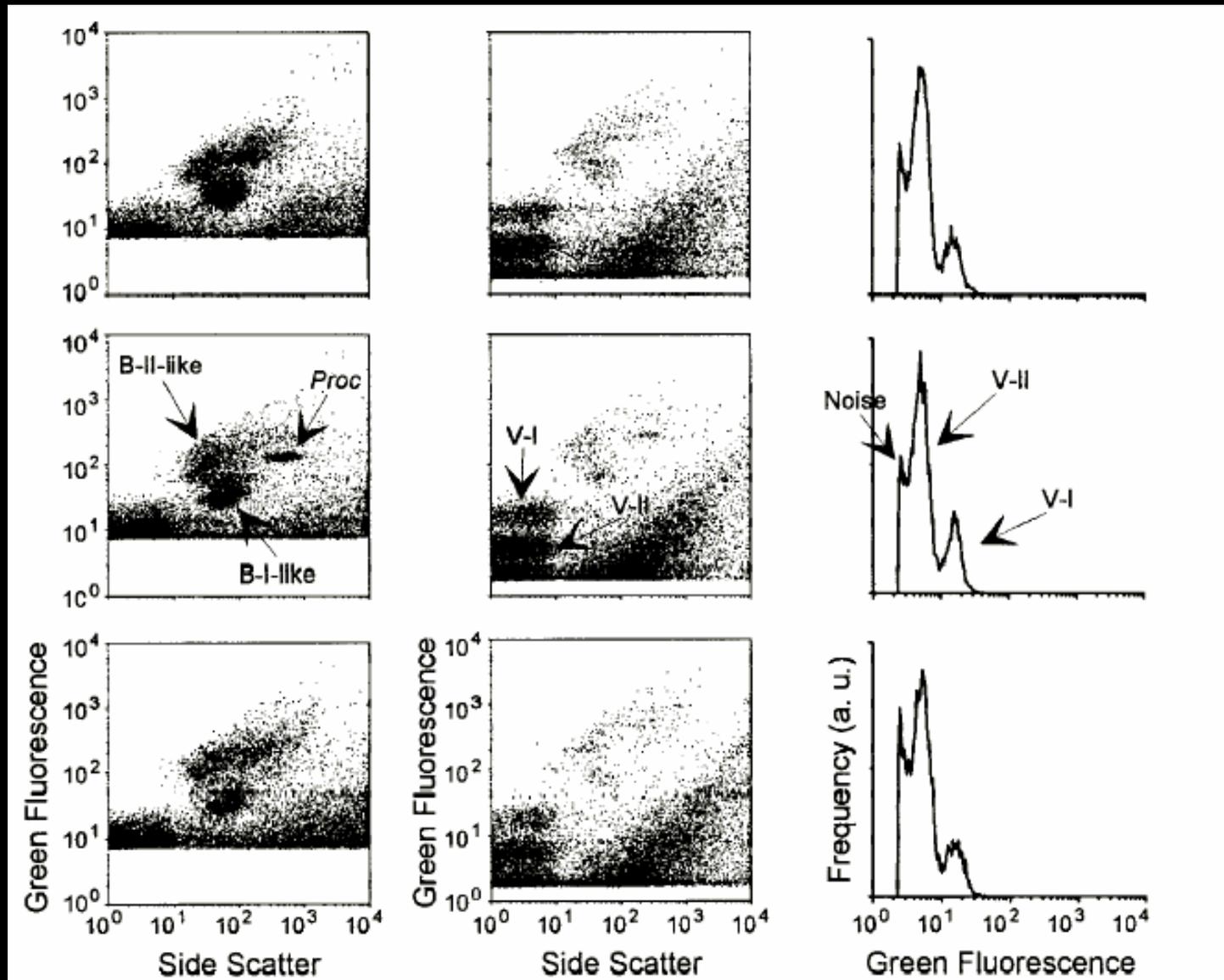
De 1999 à 2005, Toutes langues, tout type de documents :

Flow cytometr* AND virus*	1859	Références
Flow cytometr* AND virus* AND Aquatic	11	Références
Flow cytometr* AND virus* AND Marine	<u>41</u>	Références
Flow cytometr* AND virus* AND Freshwater	2	Références

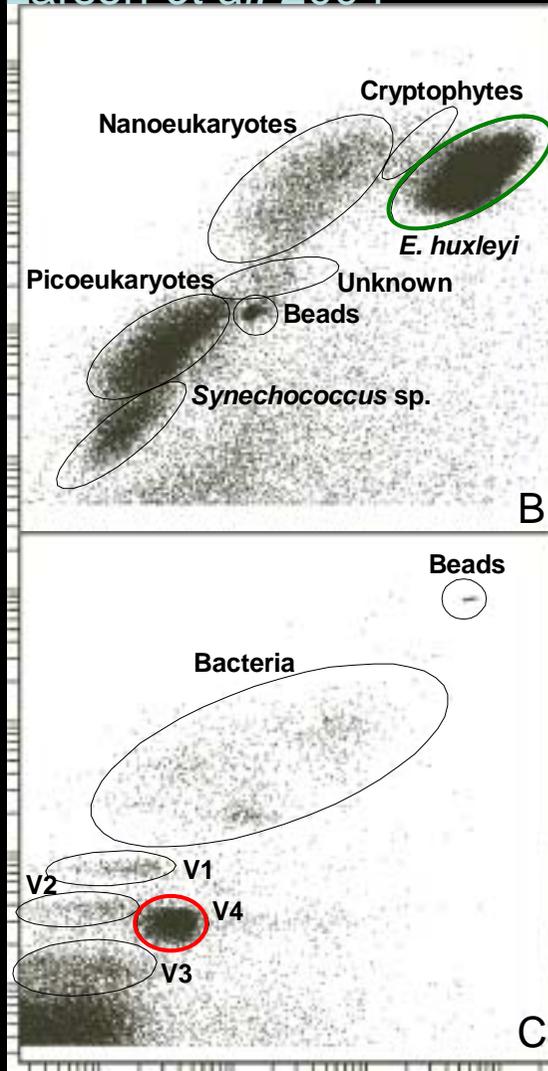
Méthodologie, Détection, Caractérisation, Écologie (dynamique de populations ou communautés, Physiologie), Autre (médical, etc)



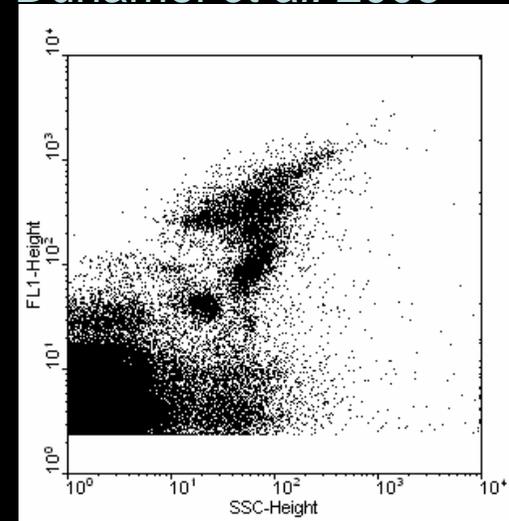




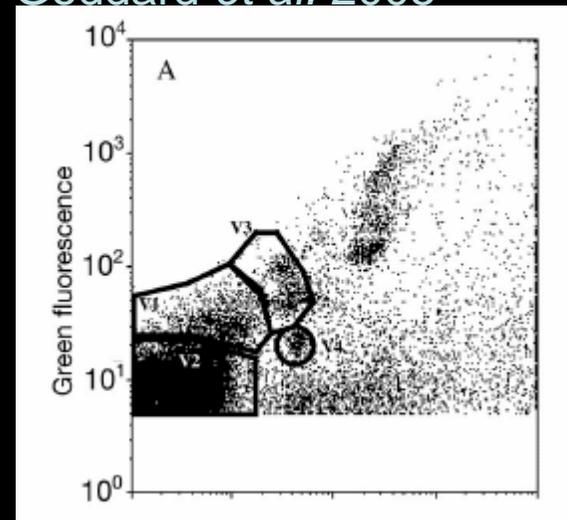
Larsen et al. 2004



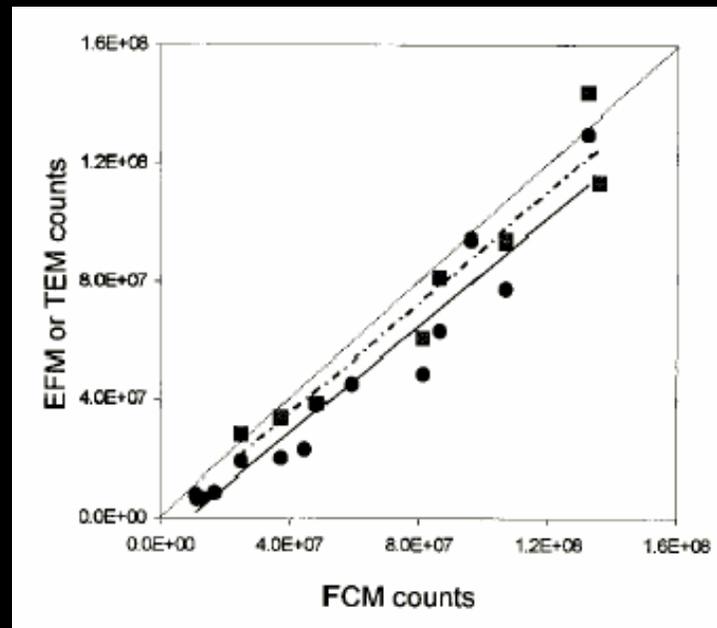
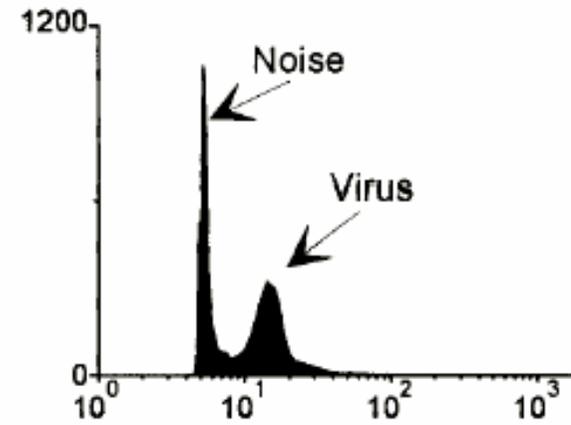
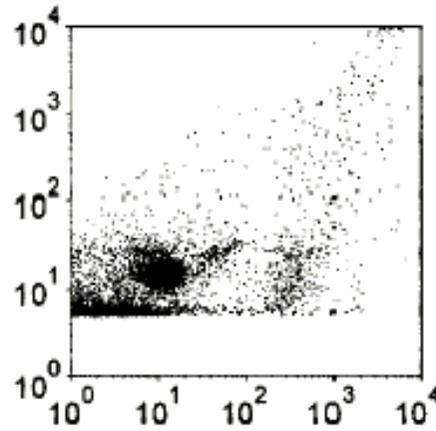
Duhamel et al. 2005

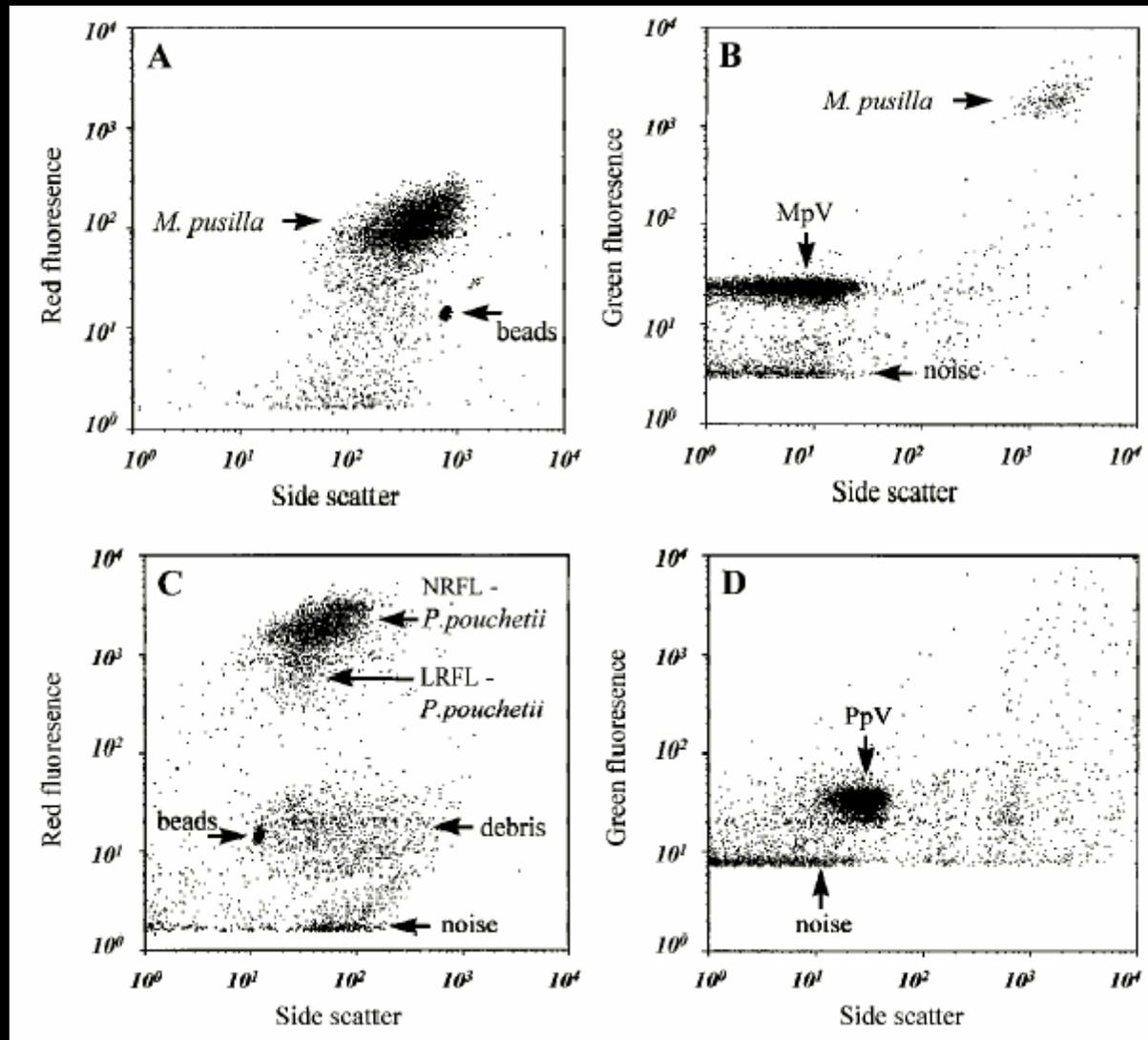


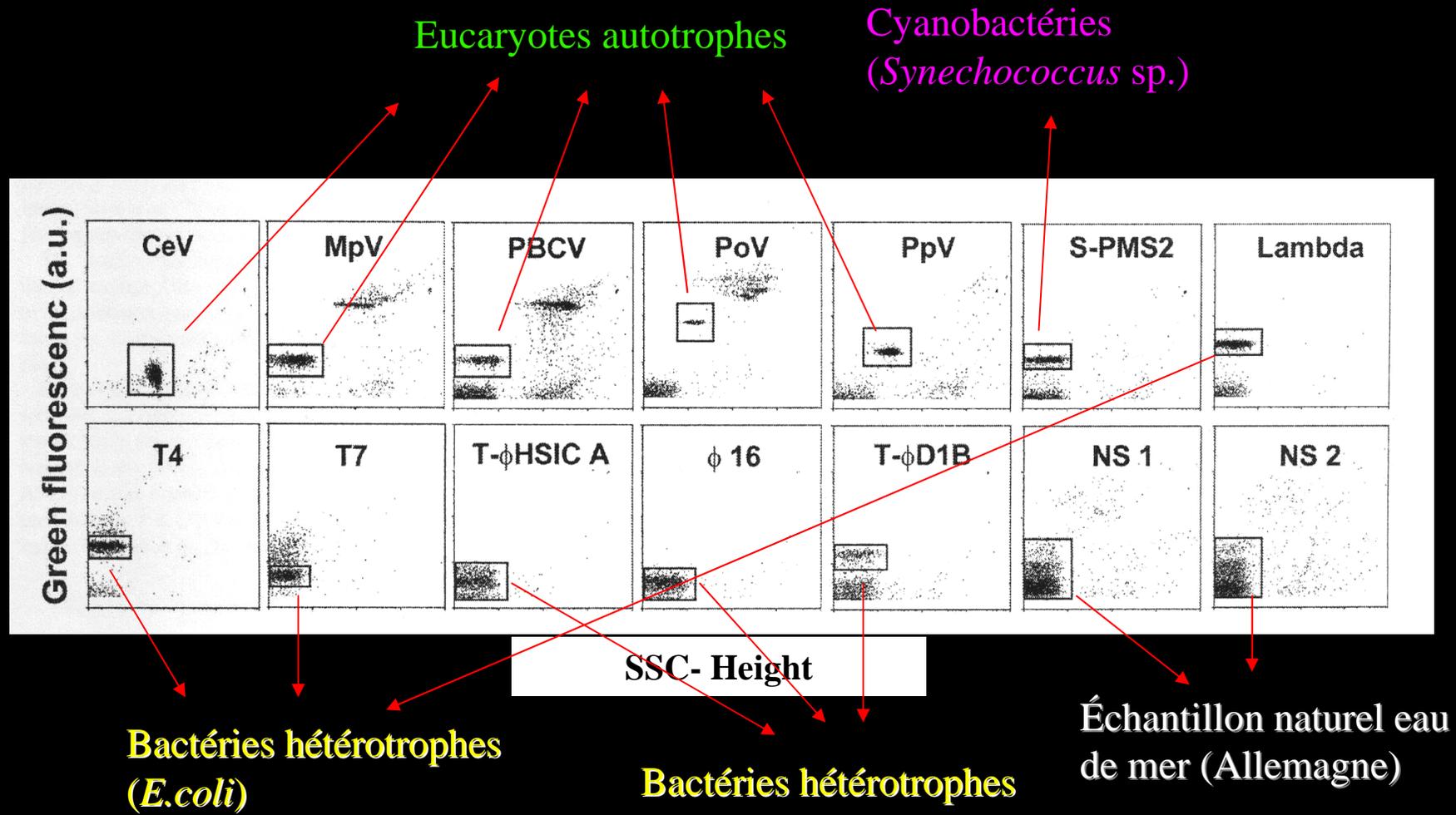
Goddard et al. 2005



Infected, Frozen
Diluted in TE







Échantillons naturels

2 à 4 groupes viraux !

Marie *et al.* 1999

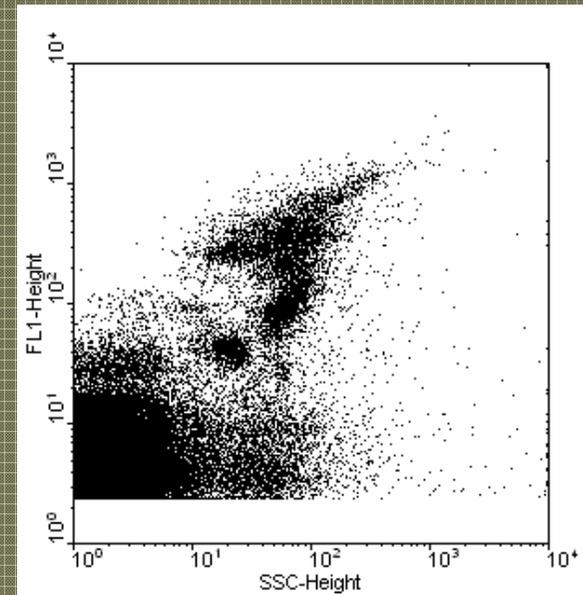
Jacquet *et al.* 2002

Larsen *et al.* 2004

Goddard *et al.* 2005

Duhamel *et al.* 2005

Personnic *et al.* en préparation



Bactériophages ? Cyanophages ?

Virus de microalgues ? Autres virus ?

ADN Libre ?

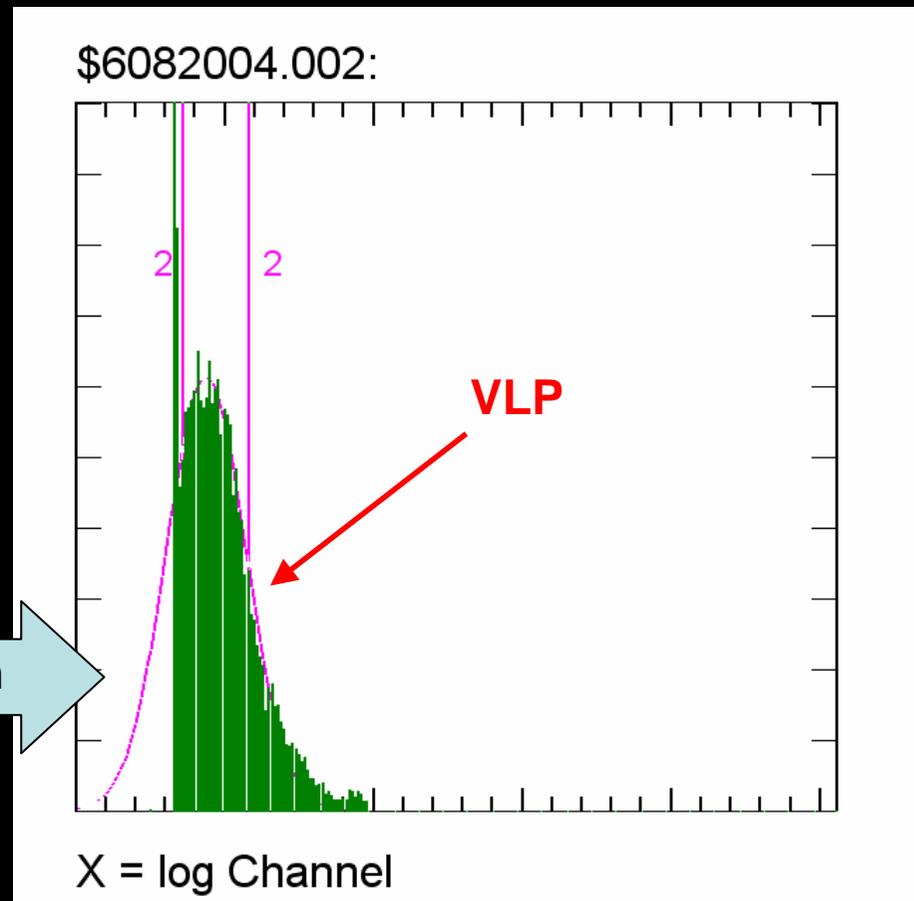
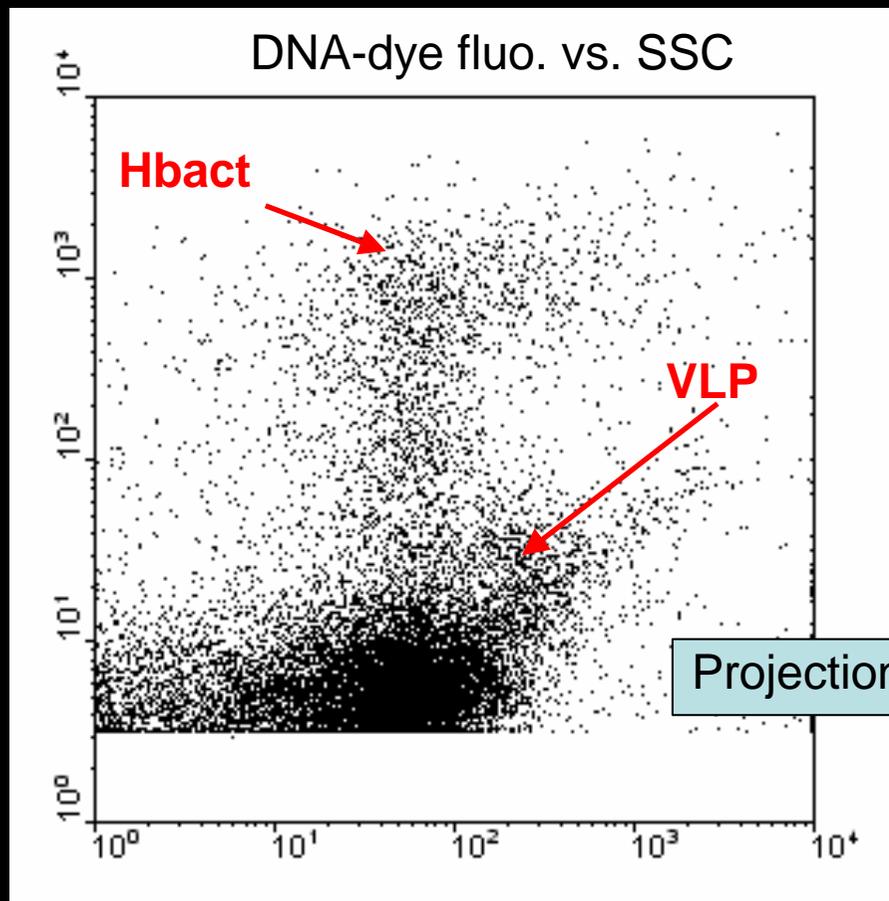
Contaminants ?

Détritus ?

 Travail à faire dans les années à venir



FCM signature et analyse

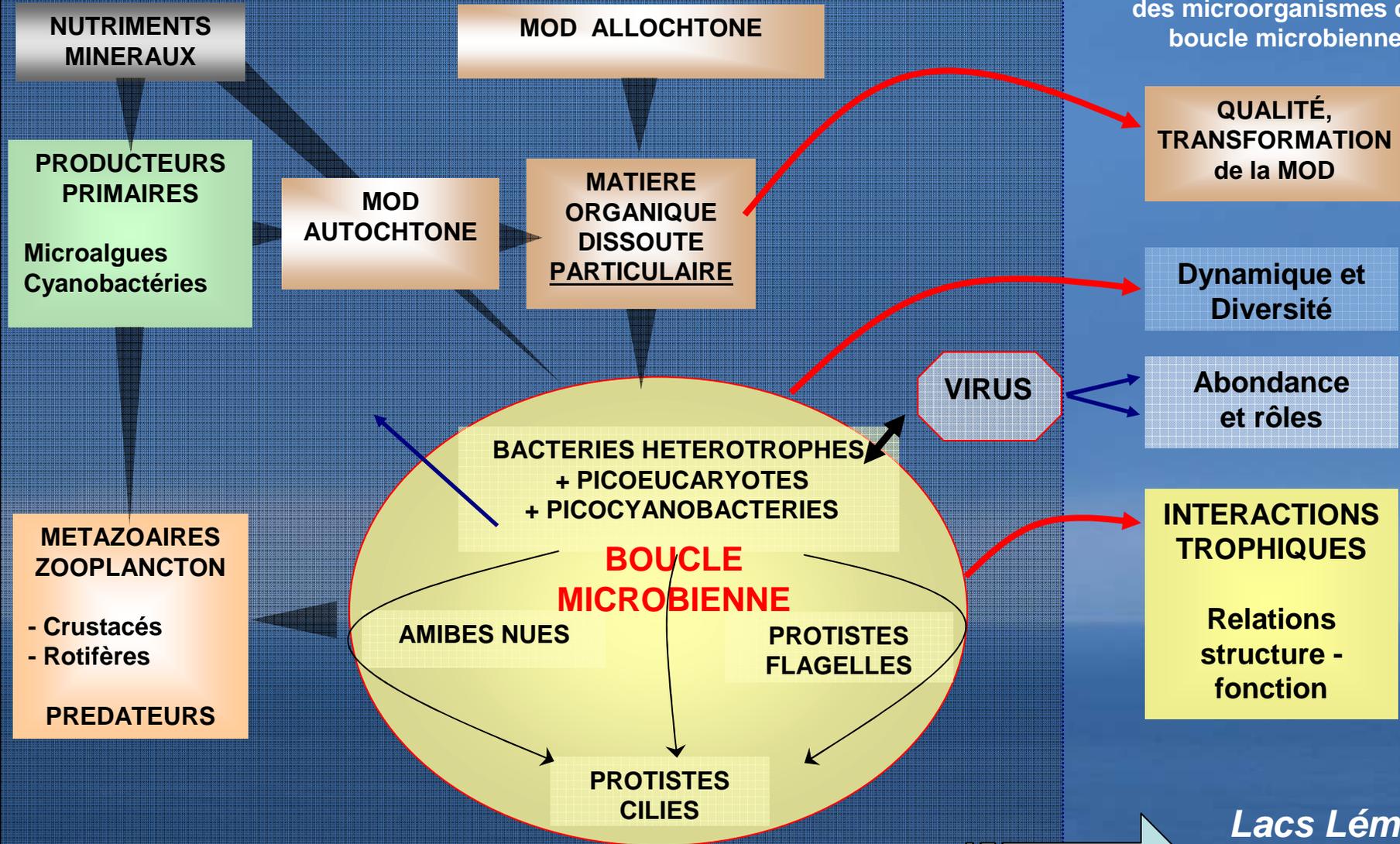


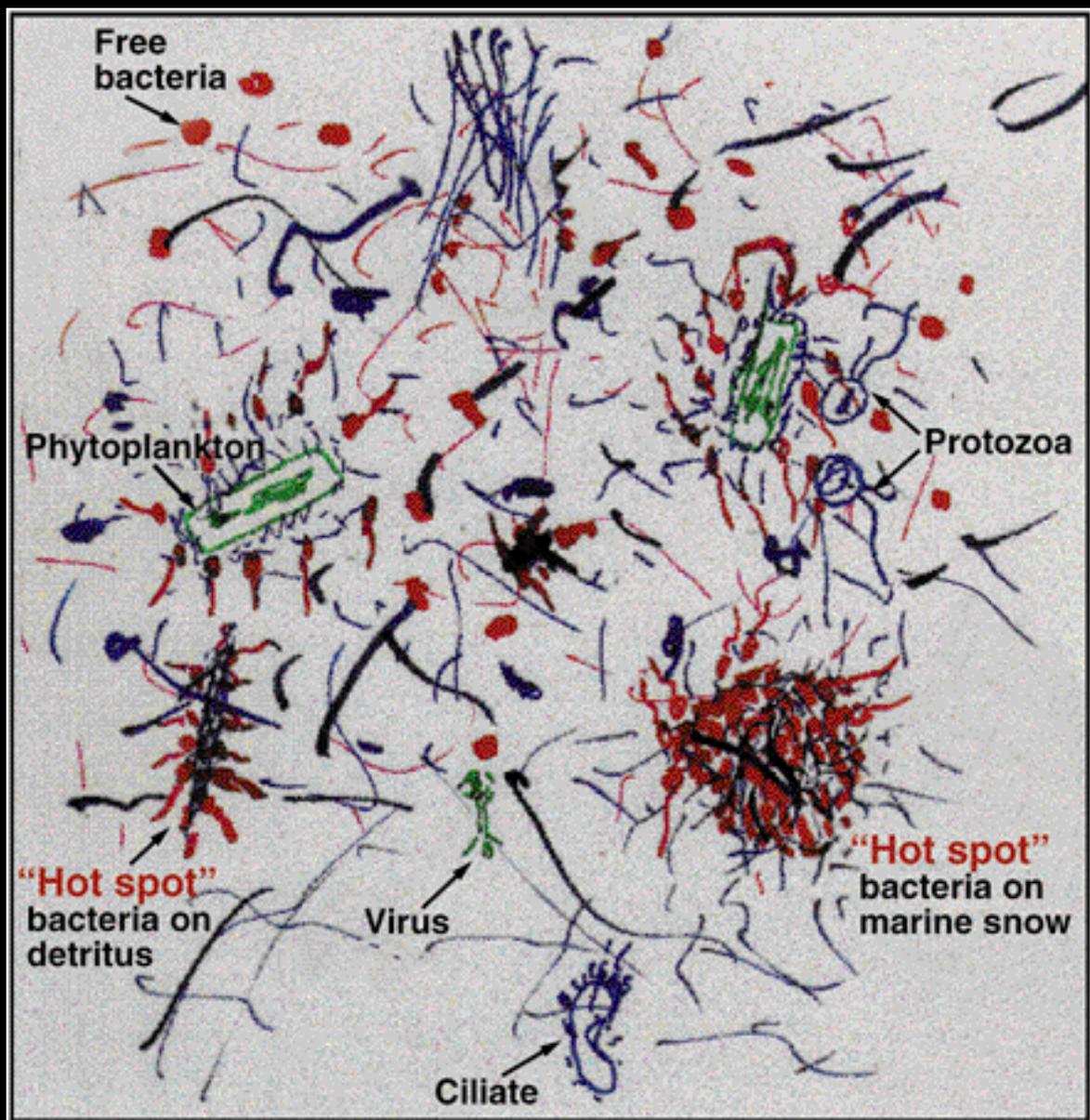
CADRE SCIENTIFIQUE GENERAL

"Réseaux trophiques microbiens en milieu pélagique lacustre"

PROCESSUS ETUDIES

"Facteurs de régulation ascendants et descendants des microorganismes de la boucle microbienne"



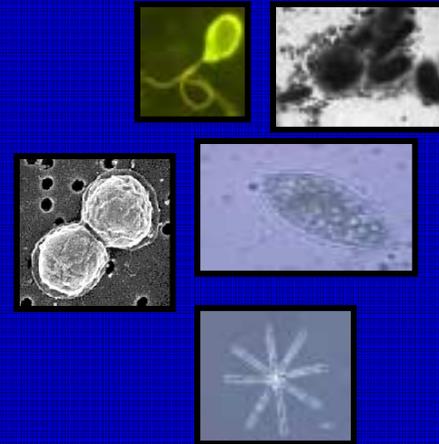


La problématique générale de l'EMA

évaluer la diversité, la dynamique et le fonctionnement
des communautés microbiennes aquatiques
des virus aux protozoaires

Stratégie

- **2 échantillonnages par mois**
- **7-8 profondeurs** entre 0 et 50 m
- **3 ans de suivi**
- **6 communautés:** picocyanobactéries, petits eucaryotes, bactéries hétérotrophes, virus, flagellés (>2004), ciliés (>2004).

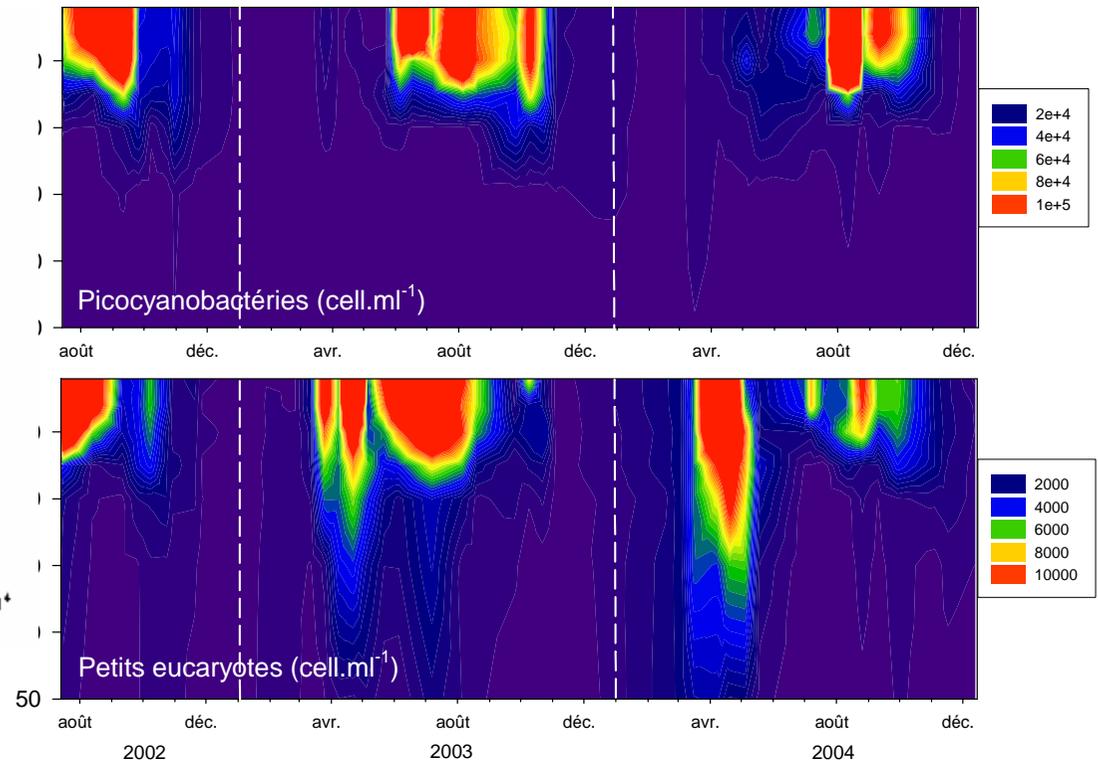
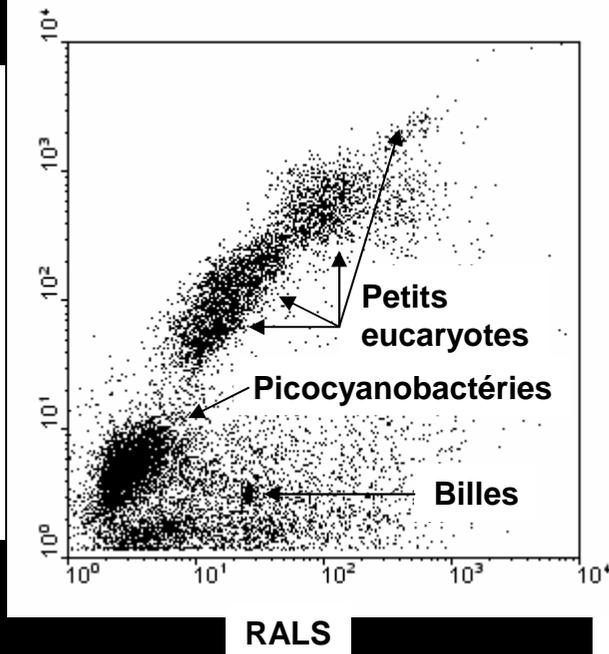


Comparaison entre les 3 lacs Léman, d'Annecy et du Bourget

Lac du Bourget



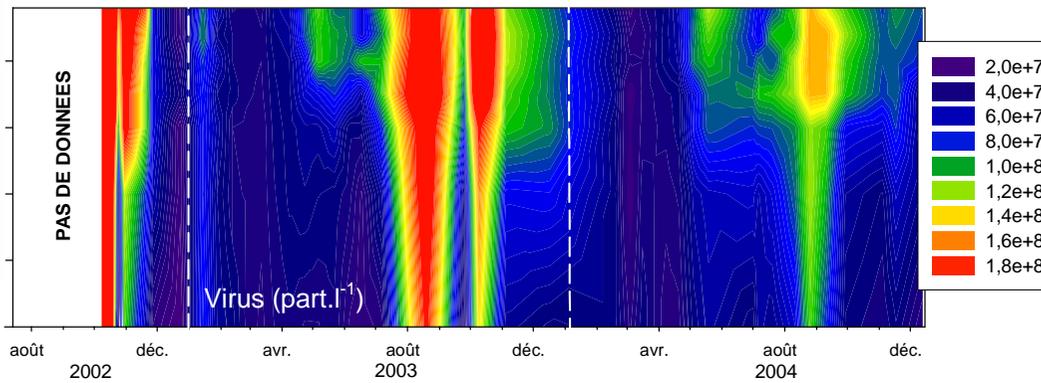
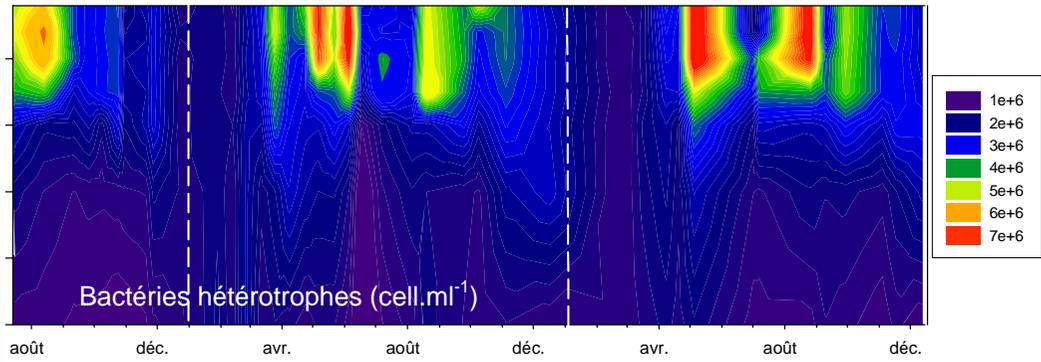
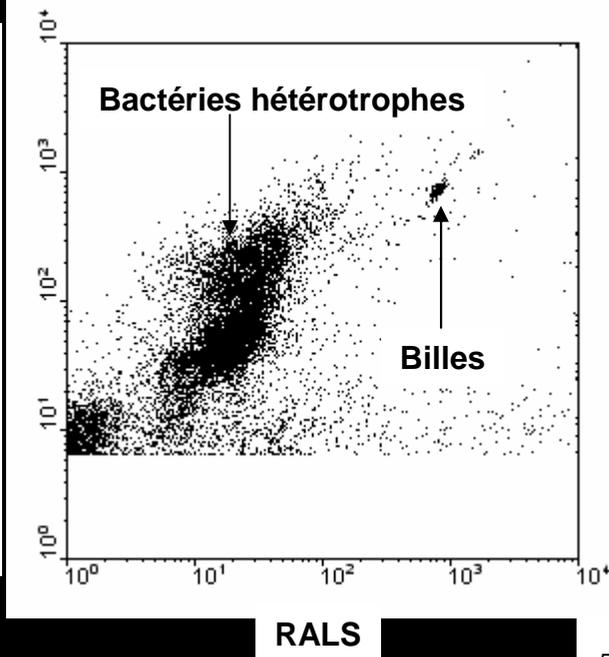
Fluorescence chlorophylle a



Lac du Bourget



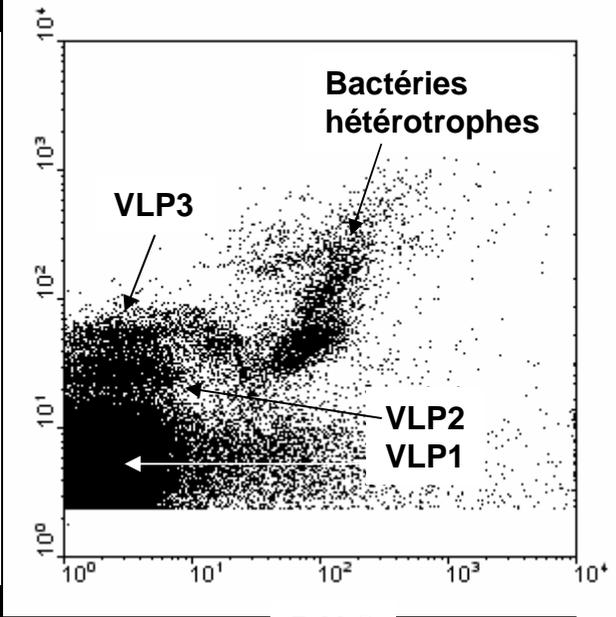
Fluorescence ADN-SYBR Green 1



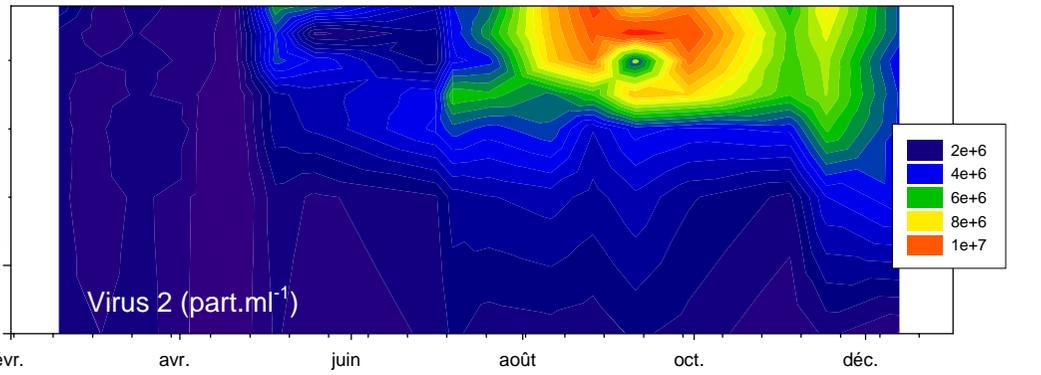
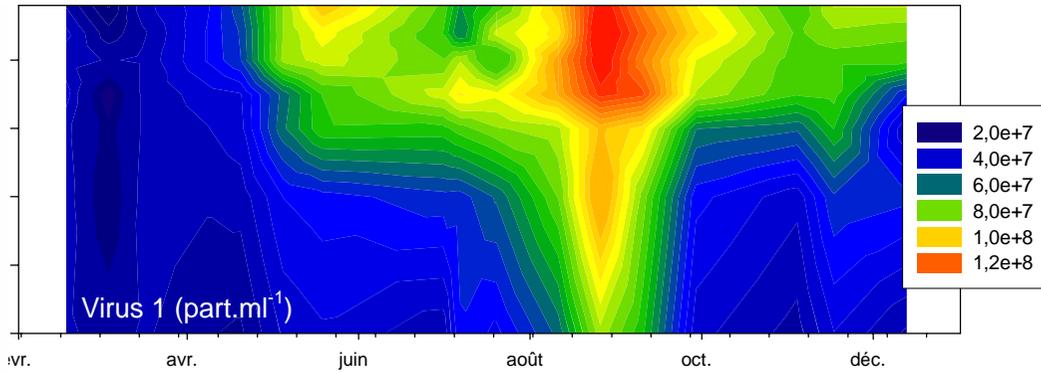
Lac du Bourget



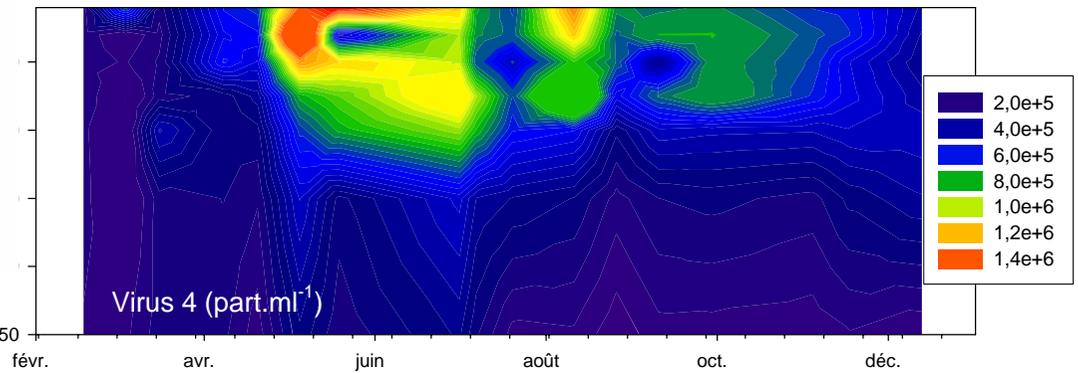
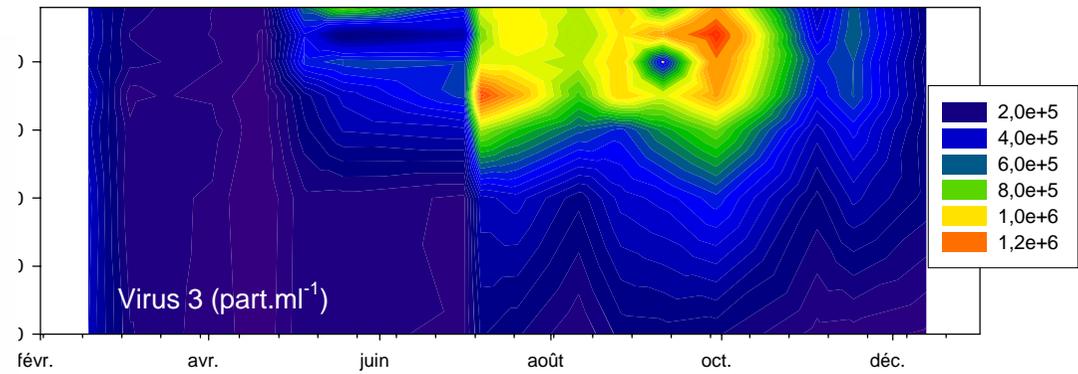
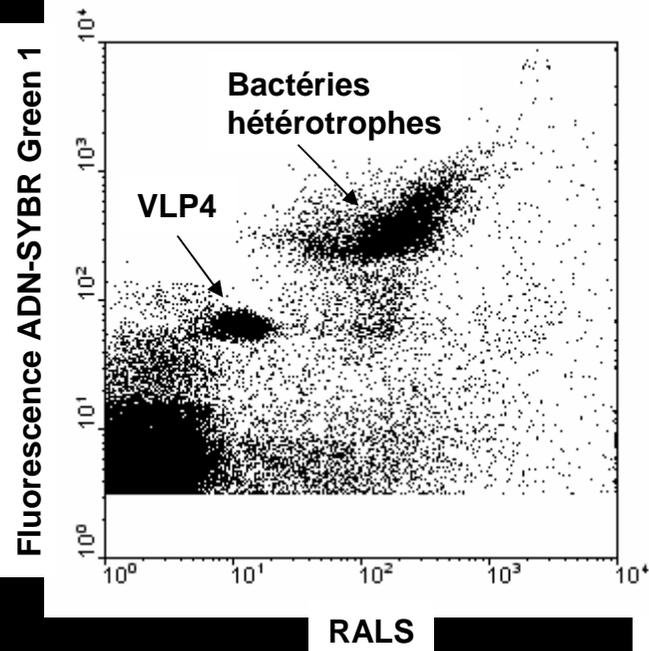
Fluorescence ADN-SYBR Green 1



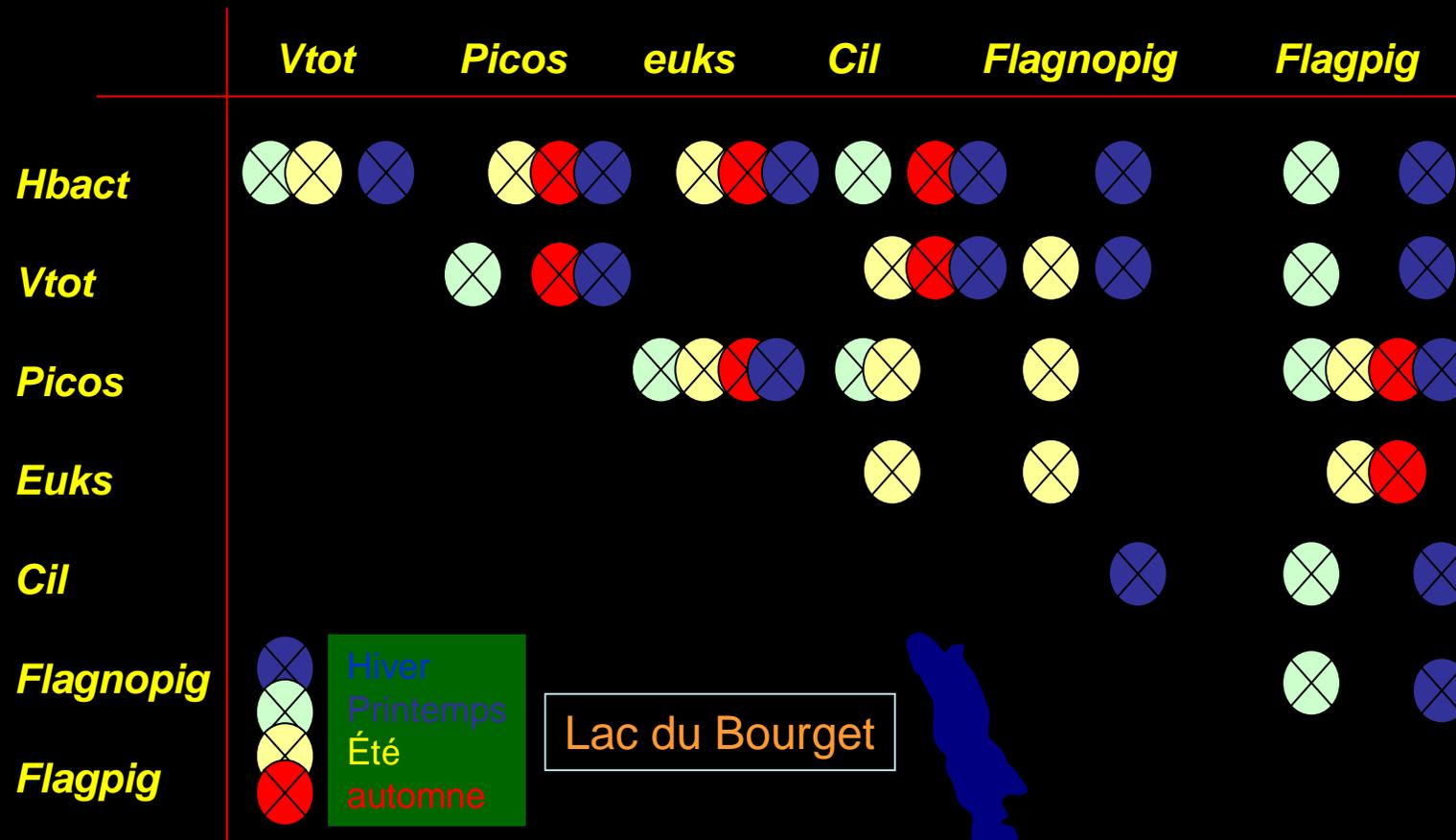
RALS



Lac du Bourget



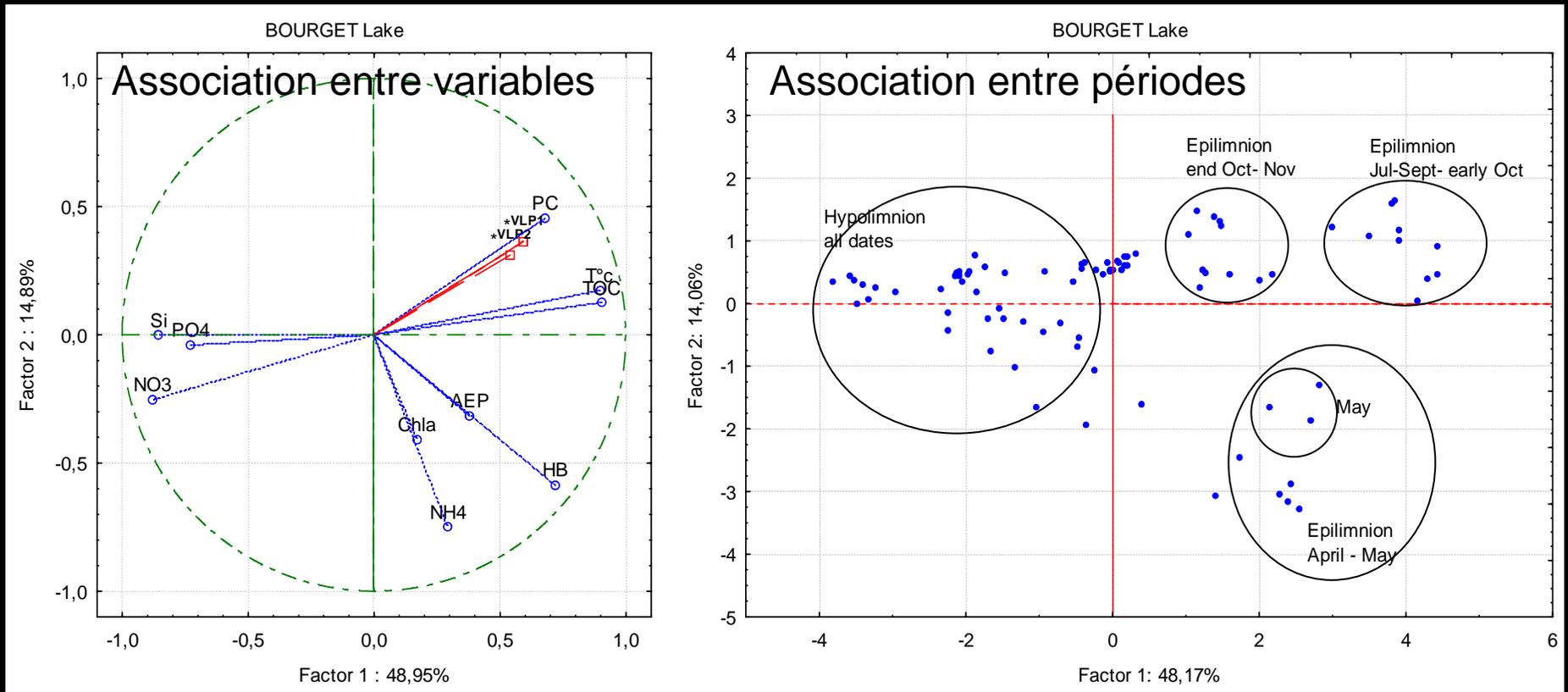
Corrélations de Pearson



Variance des données étudiée par ACP

Analyse exploratoire - Corrélations partielles

Comparaison entre lacs



Lac du Bourget



⇒ **Les virus VLP1 et les flagellés hétérotrophes ont un lien étroit avec la mortalité bactérienne au printemps, en été et en automne.**

Le bloom bactérien est suivi d'un pic de VLP1 tous les automnes - caractéristique commune aux 3 lacs - VBR

⇒ **Les picocyanobactéries sont corrélées avec les VLP2 (cyanophages ?)**

⇒ **Une forte corrélation existe entre les virus VLP4 et les petits eucaryotes photosynthétiques**

⇒ **Aucune relation entre la chla et les VLP1 mais avec VLP2**

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 2004, p. 1506–1513
0099-2240/04/\$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.70.3.1506–1513.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

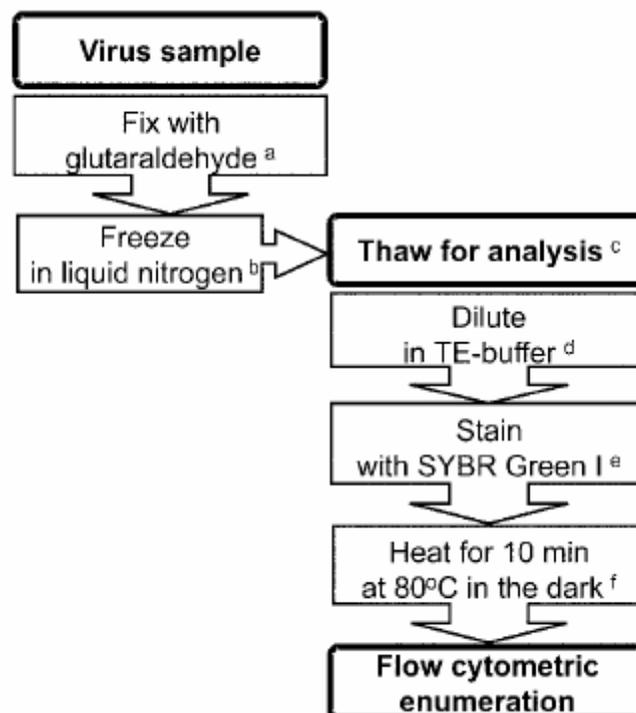
Vol. 70, No. 3

Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry

Corina P. D. Brussaard*

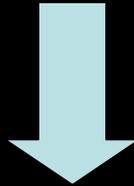
*Department of Biological Oceanography, Royal Netherlands Institute for Sea Research,
NL-1790 AB Den Burg, The Netherlands*

Received 24 March 2003/Accepted 25 November 2003

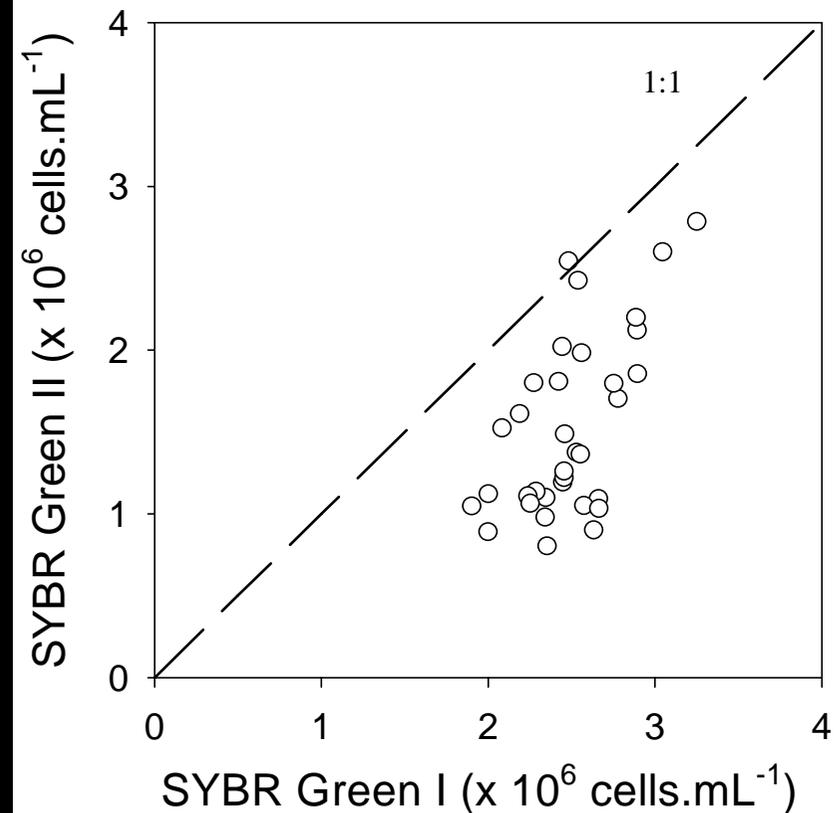


Compter et comparer

- SYBRs (I, II, Gold, Safe)
- Tampons (FW, TE, TAE, TBE, PBS)
- FCM vs EFM
- Préservation (PFA, FA, GLU)
- Congélation (4°C, 20°C)



Dorigo, U., S. Personnic, S. Jacquet
Necessary tests for counting freshwater
bacteria and viruses in alpine lakes
Water Research (accepté)



Résultats majeurs

	FCM		EFM
	Bactéries	Virus	Bactéries & Virus
Fixation	GA 2 %	Pas nécessaire	n.n.
Marquage avec	SYBR Green I (10⁻⁴)	SYBR Gold (2 x 10⁻⁵)	SYBR Gold (10 ⁻³)
Temps de marquage	15 min	15-30 min	n.t.
Solution de Dilution	TE (n.n. autoclavé)	TE (autoclavé, pH 7-8)	Pas de dilution
Incubation T (°C)	ambiante	75°C	n.t.
Analyses recommandées	T = 0 (ou après 1 j)	T = 0	T = 0-30 jours si conservation à – 20°C
Conservation	1 j à 4°C	Pas de données	1 mois à –20°C



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Microbiological Methods xx (2005) xxx – xxx

Journal
of Microbiological
Methods

www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments

Solange Duhamel, Stéphan Jacquet*

UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, 75 Avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains cx, France



Recommandations

Faire ses propres tests !

Meilleurs cytos : ceux de paillasse type FACS car ayant souvent la plus haute sensibilité : Jusqu'à maintenant, vrai

Échantillon à analyser tout de suite après chauffe (!) ou à fixer avec glutaraldéhyde et à congeler dans l'azote liquide : pas toujours vrai

Pas de différence entre Glu et formol : pas toujours vrai

SYBR 1 : marine / SYTO 9 : Freshwater (1/20 000) : pas toujours vrai

Dilution avec un tampon de type TRIS-EDTA : Vrai

Coincidence : 600 – 800 virus par seconde pour les FACS : Vrai

Pas de dilution: coïncidence

Trop grande dilution: perte dans le signal d'émission : Vrai

Résumé

FCM est une méthode de comptage des particules qui est plus rapide que la microscopie et qui minimise les erreurs associées au comptage « humain »

Parce que toutes les particules dans l'échantillon sont comptées, la significativité statistique des données est considérablement améliorée

Parce que les particules sont mesurées aveuglément, des contrôles et tests appropriés sont nécessaires de façon à s'assurer que le signal mesuré ne reflète pas la mesure de particules détritiques, d'ADN libre ou autres contaminants

FCM a encore été très peu utilisé pour l'écologie virale des eaux douces

Il n'y a encore que trop peu d'études si bien qu'il est difficile de généraliser

Ce qu'il faut : développer les possibilités de comptage spécifique ou s'assurer de l'identité des particules comptés : travail en cours un peu partout

REMERCIEMENTS

Gérald GREGORI & Philippe LEBARON
(organisation et invitation)



Membres de l'EMA & de la SHL





Merci pour votre attention