



PLATE-FORME REGIONALE DE CYTOMETRIE POUR LA MICROBIOLOGIE

A l'attention UITZ Julia, CLAUSTRE Hervé et PETIT Favien

OBOO – site BOUSSOLE
Villefranche sur Mer
Devis N6777 – 1er envoi

Les acquisitions d'échantillons ont été réalisées sur le cytomètre analyseur Cytotflex (Beckman Coulter) équipé de 3 sources d'excitation : bleu (488nm), violet (405nm) et rouge (633nm).

Les acquisitions puis analyses des données ont été réalisées avec le logiciel CytExpert.

Abondance du Pico- et Nano-phytoplancton dans des échantillons d'eau de mer prélevés au site BOUSSOLE (Villefranche sur mer), à différentes profondeurs

Préparation des échantillons :

Lors des prélèvements, les échantillons ont été fixés comme suit :

1782µL d'échantillon + 18µL de glutaraldéhyde contenant de l'acide pluronique

(soit une dilution liée à la fixation de $1800/1782 = 1,01$ prise en compte par la suite dans les calculs de concentration).

Au moment de l'analyse, les échantillons ont été décongelés à température ambiante et préparés comme suit :

900µL d'échantillon + 37.5µL TC + 15µL 2µmFB (1/10), soit un volume final d'échantillon de 952.5µL.

(soit une dilution de $952.5/900 = 1,06$ prise en compte par la suite dans les calculs de concentration).

- ➔ TC : billes de comptage TruCount™ (BDBiosciences, taille 3,2-3,4µm) - lot de 46900 billes/tubes reprises dans 0,5mL ΔH2O contenant de l'acide pluronique. Les billes TruCount permettent également de valider les volumes analysés.
- ➔ 2µm : billes de polystyrène d'un diamètre de 2µm (Fluoresbrite™, Polysciences)

Réglages de la machine :

- Débit d'injection de l'échantillon = 100µL/mn
- Protocoles utilisés : "PiNa" (setting machine ajusté pour la détection des plus grosses particules, des fluorescences les plus importantes) + "ProSyn" (setting machine ajusté pour la détection des plus petites particules, des fluorescences les moins importantes)
- Volumes d'acquisition : 1mL (PiNa) + 100 à 250µL (ProSyn)

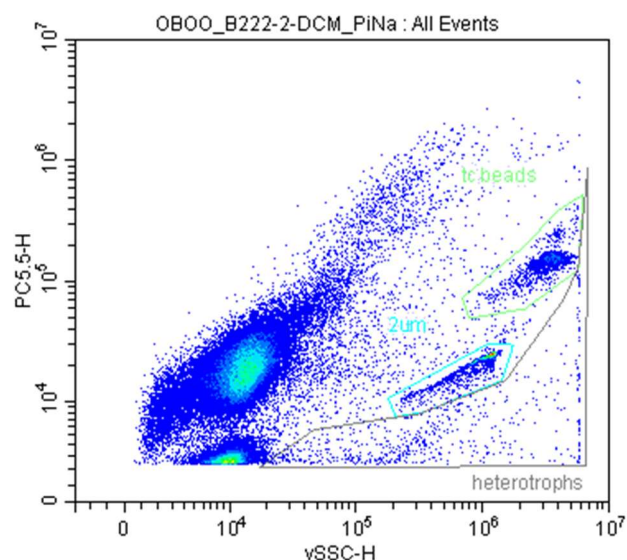
Les résultats du Pico-Phytoplancton ont été obtenus à partir des données collectées avec le setting "ProSyn"

Les résultats du Nano-Phytoplancton ont été obtenus à partir des données collectées avec le setting "PiNa"

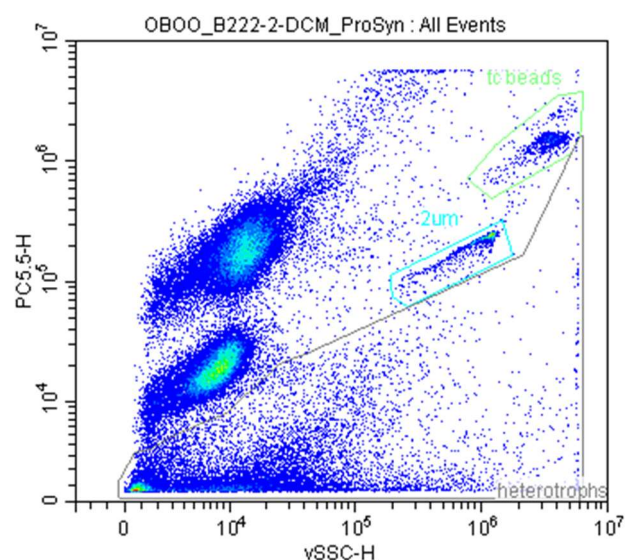
Stratégie d'analyse des résultats :

1) Elimination d'événements correspondant à des **cellules non autotrophes ou des débris autofluorescents (heterotrophs)** sur la base de la fluorescence rouge de la chlorophylle *a* (excitation 488nm, détection via un filtre PC5.5 (653-669nm)) et du signal de diffusion de la lumière aux grands angles (excitation 405nm, vSSC, en relation avec la structure/complexité des particules).

Setting PiNa

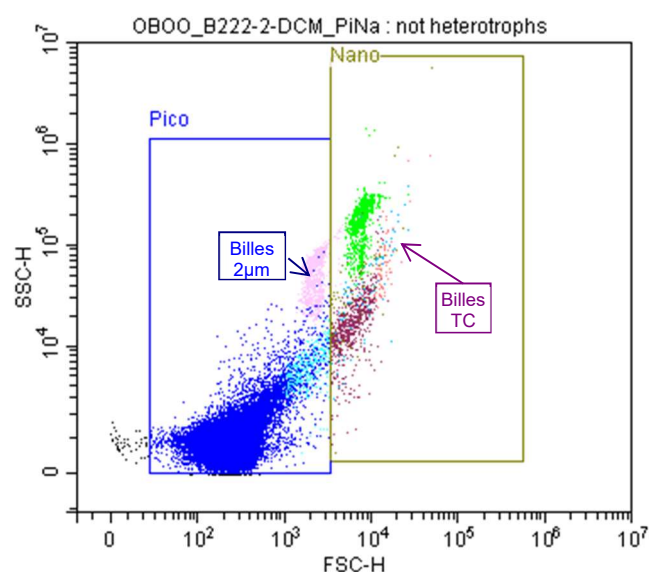


Setting ProSyn

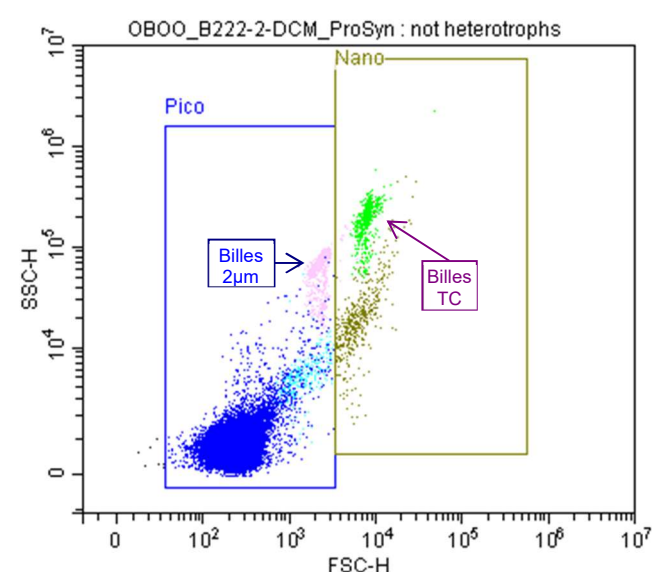


2) Discrimination du Pico- et du Nanophytoplankton sur la base du signal de diffusion de la lumière aux grands angles (excitation 488nm, SSC, en relation avec la structure/complexité des particules) et du signal de diffusion de la lumière aux petits angles (FSC, en relation avec la taille des particules). La limite entre ces deux communautés est déterminée à l'aide de billes fluorescentes de diamètre = 2 et 3µm : Picophytoplankton < 2-3µm < Nanophytoplankton.

Setting PiNa



Setting ProSyn

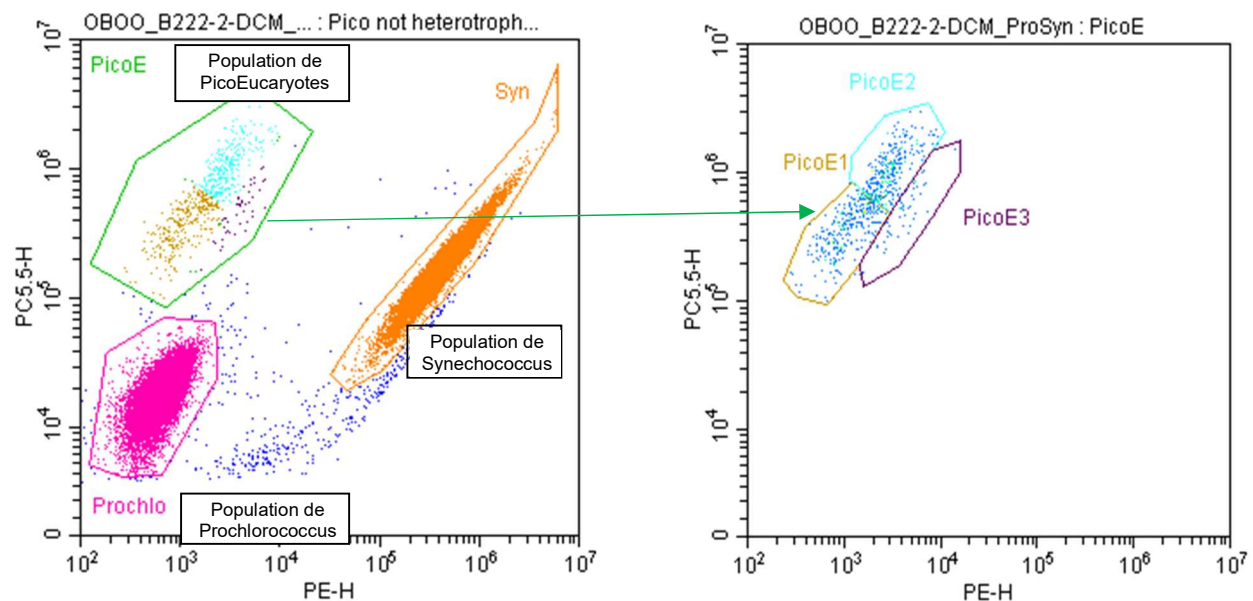


3) Au sein des 2 classes Pico- et Nano-phytoplancton, des groupes ont été déterminés sur la base de leur autofluorescence (pigments photosynthétiques) : la fluorescence rouge de la chlorophylle *a* (détection via un filtre PC5.5 (653-669nm)) et la fluorescence orange de la phycoérythrine (fluorescence orange collectée à l'aide d'un filtre PE (564-606nm))

- **Au sein du Picophytoplancton < 2-3µm (setting ProSyn)**

La fluorescence de la chlorophylle *a* (PC5.5) versus la fluorescence de la Phycoérythrine (PE) a permis de discriminer :

- une population de *Synechococcus* (Syn) contenant également de la phycoérythrine ;
- une population de *Prochlorococcus* (Prochlo), dont la fluorescence de la chloro *a* est très peu intense, difficilement distinguable du bruit sans utilisation du setting spécifique ProSyn.
- une population de picoeucaryotes (PicoE) dans laquelle il était possible de distinguer jusqu'à 3 sous-populations (PicoE1, E2, E3).



- **Au sein du Nanophytoplankton > 2-3µm (setting PiNa)**

Deux sous-populations de NanoEucaryotes (NanoE1, E2) ont pu être discriminées, en fonction de leur intensité de fluorescence, Nano2 étant la plus fluorescente.

La région «Crypto-like» pourrait correspondre à des cellules de type Cryptophycées.

