HAL
open science

La cytométrie de flux, un outil innovant en écotoxicologie

Anne Bado-Nilles, Wilfried Sanchez

To cite this version:

Anne Bado-Nilles, Wilfried Sanchez. La cytométrie de flux, un outil innovant en écotoxicologie. Rapport Scientifique INERIS, 2011, 2010-2011, pp.66-68. ineris-01869393

HAL Id: ineris-01869393

https://ineris.hal.science/ineris-01869393

Submitted on 6 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Contributeurs

Anne Bado-Nilles

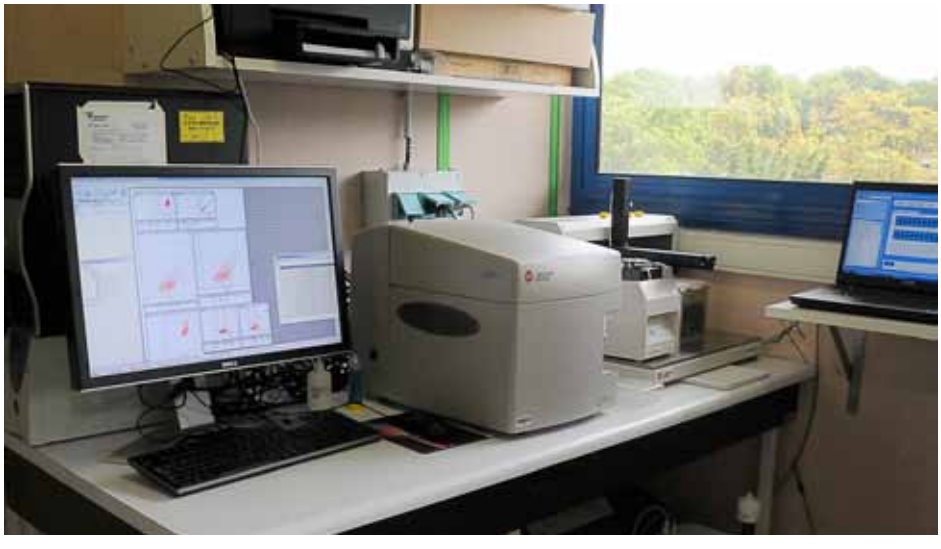
Wilfried Sanchez

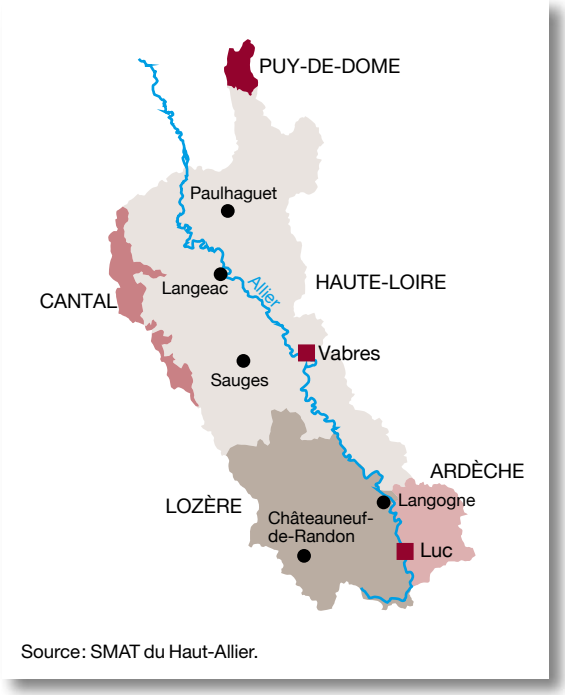
La cytométrie de flux, un outil innovant en écotoxicologie

La cytométrie de flux consiste à étudier les caractéristiques physiques et chimiques de particules, telles que les cellules, entraînées dans un flux liquide. Les cellules sont excitées par un laser et émettent en réponse un rayonnement qui permet d'obtenir des informations multiples les concernant. Ces informations sont obtenues soit directement par l'autofluorescence des cellules, soit indirectement par l'intermédiaire de fluorochromes qui sont souvent des marqueurs cellulaires. Les premiers cytomètres de flux ont été inventés dans les années 1950 pour une utilisation en biologie médicale. Depuis quelques années, les domaines d'intérêt se sont élargis à l'analyse biologique et plus spécifiquement à l'évaluation environnementale des effets des substances chimiques avec, à terme, une possible automatisation du suivi de biomarqueurs de la qualité des milieux. Ces méthodes d'analyse en cytométrie de flux sont intéressantes du fait de leur rapidité d'analyse, de l'utilisation de faibles volumes d'échantillon, de leur facilité de transposition à de nombreux modèles biologiques et de l'automatisation possible des dosages. De ce fait, certains laboratoires cherchent à développer des tests en routine pour la détermination, notamment en biosurveillance, de l'état de santé des organismes. Dans ce cadre, des méthodes de dénombrement des cellules sanguines [6], de dosage des différentes activités immunitaires cellulaires [1, 5, 7], de génotoxicité [3] ou encore d'analyse des activités algales [4] ont été développées. L'utilisation grandissante de cet outil en écotoxicologie a tout naturellement conduit l'INERIS à se munir d'une plateforme de cytométrie de flux équipé d'un Cyan™ ADP flow cytometer (Beckmann Coulter) connecté à un lecteur de microplaque, l'hypercyt®intellicyt (Beckmann Coulter) (figure 1). Ce déploiement s'est déroulé dans le cadre d'un programme de recherche appliquée *(Développement et validation de biomarqueurs chez le poisson pour une application dans le cadre de la réglementation environnementale)* coordonné par l'INERIS et associant

Figure 1

Plateforme cytométrie avec le Cyan™ ADP flow cytometer (Beckmann Coulter) connecté à son lecteur de microplaque, l'hypercyt®intellicyt (Beckmann Coulter).





Source : SMAT du Haut-Allier.

Figure 2
Localisation des sites d'échantillonnage sur le bassin du Haut-Allier.

le laboratoire d'écotoxicologie des universités de Reims et du Havre, les UMR 8187 et 6539 du CNRS ainsi que le laboratoire de radioécologie et d'écotoxicologie de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN). Il a pour principal objectif de faciliter l'utilisation en biosurveillance de biomarqueurs peu usités par le biais de l'acquisition d'un socle commun de connaissances. Dans ce contexte, la cytométrie de flux permet le développement de biomarqueurs en lien avec la fonction immunitaire des poissons et un transfert en routine des descripteurs les plus pertinents.

Application de la cytométrie de flux à l'analyse des activités immunitaires

L'utilisation de la cytométrie de flux est un atout majeur pour les études en biosurveillance car elle allie rapidité de mise en œuvre, analyse quantitative et multiparamétrique, sensibilité de détection et robustesse. De ce fait, au sein de l'INERIS, la plateforme de cytométrie est maintenant utilisée en routine, dans le cadre de différents projets de recherche en biosurveillance, pour le dosage de paramètres immunitaires tels que la distribution leucocytaire, la mortalité cellulaire (nécrose et apoptose), l'activité de phagocytose ou encore la flambée oxydative, à la fois *ex vivo*, *in vivo* et *in situ*. L'immunité est en effet une fonction clé chez les organismes aquatiques du fait de son implication dans la protection vis-à-vis des pathogènes. Aussi, des perturbations de cette fonction physiologique notamment suite à l'exposition à des polluants, peuvent avoir des conséquences écologiques importantes pour les individus et les populations.

Faisant suite à une étude initiée par la Fédération de pêche de l'Ardèche sur le bassin du Haut-Allier qui a permis d'identifier les sources de contaminants induisant un déséquilibre dans la structure démographique en population d'ombre commun *(Thymallus thymallus)*, une collaboration a été mise en place avec l'INERIS afin d'appréhender l'impact de cette contamination sur la truite fario *(Salmo trutta fario)* et le goujon *(Gobio gobio)*. En plus des biomarqueurs relatifs à la perturbation endocrinienne ou au métabolisme des polluants déjà disponibles à l'INERIS, des marqueurs de l'immunité ont été mis en œuvre sur les poissons échantillonnés sur deux stations. La station de Luc, point amont de l'Allier, est un secteur à prédominance forestière où les pressions anthropiques sont faibles ; à l'inverse, la station de Vabres, en aval, présente des pressions anthropiques intenses liées à l'agriculture, à l'élevage et aux rejets urbains et industriels (figure 2). La campagne de prélèvement réalisée a permis de mettre en exergue, sur les activités immunitaires testées, un effet amont/aval identique pour les deux espèces de poisson. Ces modifications du système immunitaire peuvent être influencées à la fois par des pathogènes [2] et par des paramètres physicochimiques (température, pH, matières en suspension, xénobiotiques…)[8]. Du fait de l'absence d'anomalies externes macroscopiques (parasites, déformations, tumeurs…) et microscopiques (protozoaires) ainsi que de la faible variation des →

Références

[1] Chilmonczyk S., Monge D., *"Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens"*, Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9(4), pp. 319-333.

[2] Ellis A. E., *"Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria"*, Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(8-9), pp. 827-839.

[3] Goanvec C., Theron M., Poirier E., Le Floch S., Laroche J., Nonnotte L., Nonnotte G., "*Evaluation of chromosomal damage by flow cytometry in turbot (Scophthalmus maximus L.) exposed to fuel oil*", Biomarkers, 2004, 9(6), pp. 435-446.

[4] Haberkorn H., Hégaret H., Marie D., Lambert C., Soudant P., "*Flow cytometric measurements of cellular responses in a toxic dinoflagellate, Alexandrium minutum, upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses*", Harmful Algae, 2011, 10(5), pp. 463-471.

[5] Harford A., J.O'Halloran K., Wright P. F. A., "*Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish*", Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4), pp. 562-573.

[6] Inoue T., Moritomo T., Tamura Y., Mamiya S., Fujino H., Nakanishi T., *"A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry"*, Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13(5), pp. 379-390.

[7] Kalgraff C. A. K., Wergeland H. I., Pettersen E. F., "*Flow cytometry assays of respiratory burst in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) leucocytes*", Fish & Shellfish Immunology, In Press.

[8] Snieszko S. F., "*The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*", Journal of Fish Biology, 1974, 6(2), pp. 197-208.

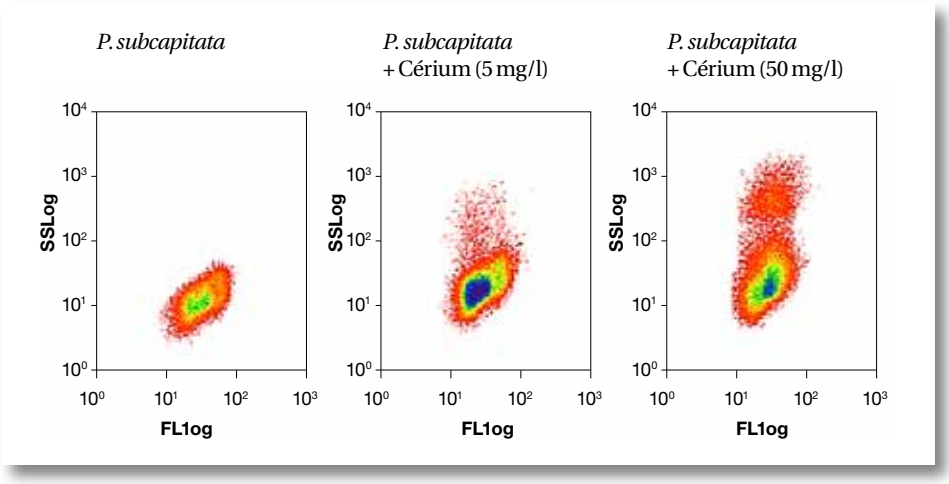


Figure 3

Analyse en cytométrie de flux de la capacité d'adsorption des nanoparticules de cérium sur la membrane des algues, *Pseudokirchneriella subcapitata*. L'axe FL1 correspond à la fluorescence verte provenant de l'autofluorescence des algues. L'axe SSLog est lié à la complexité de la cellule. Ainsi, plus l'algue possède de cérium adsorbé, plus sa complexité va augmenter. Une relation entre taux en cérium et augmentation de la complexité algale est alors clairement démontrée.

→ paramètres physicochimiques (température, oxygène dissout, turbidité), seules les différences de pressions environnementales et donc de contamination apporteraient une explication aux réponses biologiques observées. Le site de Vabres semble donc être une zone de déstabilisation des capacités de défense des organismes par rapport à la station de Luc. Or, cet affaiblissement du système immunitaire pourrait rendre les animaux plus sensibles aux pathogènes et donc provoquer, à terme, une diminution de leur survie. Les résultats de cette étude de terrain montrent clairement l'intérêt de la mise en œuvre de biomarqueurs relatifs à l'immunité dans un contexte de biosurveillance.

Ouverture de la cytométrie de flux à d'autres applications

En marge de ce programme, la plateforme de cytométrie de flux est ouverte à d'autres applications en écotoxicologie mais également dans d'autres domaines d'expertise de l'Institut. Ainsi, un test a été validé pour l'analyse de l'adsorption des nanoparticules chez différentes espèces d'algues (*cf.* : *Influence des conditions d'essais et des paramètres physico-chimiques sur l'écotoxicité des nanoparticules pour le milieu aquatique, p. 49*). Concernant ce test de toxicité algale, il a notamment été montré une relation dose dépendante entre le taux de cérium présent dans le milieu et l'adsorption de nanoparticules sur la membrane des algues (figure 3). *In fine,* cette adsorption de cérium provoquerait une réduction de la quantité d'algues dans le milieu, ce qui pourrait induire des conséquences néfastes sur l'écosystème dans son ensemble, car ces algues sont la base de la nourriture de nombreux invertébrés. De même, l'évaluation de la qualité des spermatozoïdes a été mise en place chez l'épinoche à trois épines afin d'appréhender les effets des polluants sur la reproduction des poissons. Un développement similaire est également envisageable chez les mammifères. Dans le domaine de la toxicologie, l'analyse des micronoyaux et des cassures à l'ADN est en cours de développement chez le rat. Il en est de même pour l'étude de l'internalisation des nanoparticules (dioxyde de titane; dioxyde de silicium) sur des cultures de cellules pulmonaires humaines.

Depuis la mise en place de la plateforme de cytométrie de flux, cette technologie a montré son intérêt pour la surveillance des effets induits par les polluants environnementaux sur l'immunité des poissons. Elle offre toutefois de multiples autres possibilités d'applications et devrait, à court terme, intégrer plusieurs programmes de recherche au sein de l'Institut.

ABSTRACT

Flow cytometry is a technique for counting and examining microscopic particles, such as cells, in a simultaneous multiparametric analysis of the physical and/or chemical characteristics. Currently, flow cytometry is used in the diagnosis of health disorders, but has many other applications in both research and clinical practice. In fact, some laboratories used flow cytometer for biomonitoring of organism health and risk assessment. Thus, a flow cytometry platform was purchased by the INERIS Institute to use it in several projects, such as DEVIL (Development and validation of fish biomarkers for the implementation of environmental legislation). The immune capacities were now routinely performed *ex vivo*, *in vivo* and *in situ* in the Institute. In the same way, other scopes of applications were proposed, such as genotoxicity in rats and three-spined sticklebacks; toxicity in human cultured cells and algae. All these studies enable using of flow cytometry for risk assessment by ecotoxicological, toxicological and biomonitored experiments.