

L'imagerie Confocale : un Outil Performant pour le Génie des Procédés Biologiques

Séminaire 2010 de l'école doctorale RP2E

J.N. Louvet¹, G. Attik^{1,2}, S. Hupont², D. Dumas², O. Potier¹, M.N. Pons¹

1) Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (UPR 3349 CNRS), Nancy Université. INPL, 1 rue Grandville, BP 20451 F-54001 Nancy cedex.
2) PTIBC-IBISA, FR 3209 - 7561 CNRS, Faculté de médecine, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy.



Nancy-Université
INPL

Agence Nationale de la Recherche
ANR



Les limites des mesures globales.

Les premières études portant sur la dynamique des populations microbiennes ont été consacrées principalement à des observations de cinétiques globales. On peut par exemple suivre l'évolution de la biomasse par densité optique, par la mesure des matières sèches, en mesurant la consommation d'oxygène ou la dégradation du substrat. Cependant, ces études sont parfois insuffisantes pour prévoir l'évolution d'une population microbienne du fait de l'hétérogénéité au sein même des populations.

En revanche, la microscopie permet de caractériser des sous populations qui sont importantes pour le fonctionnement des procédés. Par exemple, on peut mesurer l'abondance en bactéries filamenteuses qui peuvent perturber la décantation dans un procédé à boues activées.

L'apport de l'imagerie confocale.

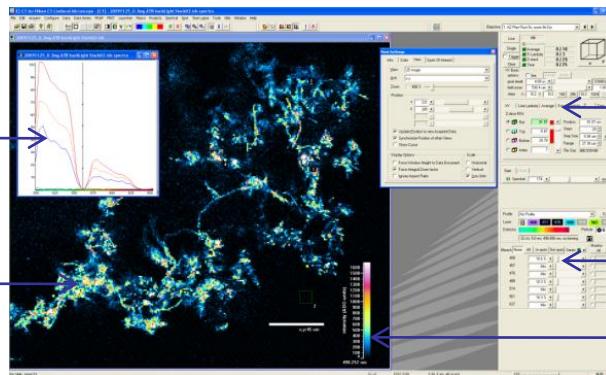
La microscopie confocale présente comme avantage par rapport à la microscopie classique de fluorescence de pouvoir imager des échantillons en trois dimensions. Il est dès lors possible de reconstruire leur volume à partir d'une série d'images (plan XY) obtenues à différentes profondeurs (axe Z). Ainsi, grâce à la microscopie confocale, il est possible d'étudier des mécanismes de diffusion et de réaction dans l'espace tridimensionnel et dans le temps.

Si l'on prend l'exemple de l'action d'un antibiotique sur les boues activées, la microscopie confocale a permis de montrer que la mortalité des bactéries est influencée par leur position à l'intérieur des flocs bactériens. Dans ce cas, l'imagerie confocale permet d'étudier une cinétique hétérogène.



Exemple d'application: mesure localisée de la viabilité par imagerie spectrale.

Spectre du Cyto® 9 et du iodure de propidium pour 4 zones d'intérêt sélectionnées sur l'image



Réglage du pas en Z, du temps et des modalités d'acquisition (simultané ou séquentiel...)

Réglage de la puissance des lasers

Échelle d'intensité du signal de fluorescence

Image spectrale en fausses couleurs de flocs bactériens de boues activées: les bactéries moribondes sont marquées par l'iodure de propidium qui fluoresce dans le rouge alors que les bactéries vivantes sont marquées par le Cyto®9 qui fluoresce dans le vert. Pour chaque pixel les spectres d'émission de fluorescence sont mesurés. Le rapport entre les deux spectres permet de déterminer le pourcentage de bactéries vivantes. Cette capture d'écran lors de l'utilisation d'un microscope confocal en mode spectral permet également de visualiser l'interface du logiciel qui pilote le microscope AZ100-C1 (Nikon France).

Remerciements:

ANR (Projet ANTIBI-EAU, ANR-07-BLAN-0195-194 02), Zone Atelier Moselle (ZAM) , ARC et Région Lorraine (CPER), Nikon Microscopes.