



---

# Étude de la chimiotaxie chez la bactérie magnétotactique *Magnetospirillum gryphiswaldense*

---

Hamza BENDAHMANE

Diplôme d'ingénieur généraliste

Promotion 2024

Institut des biosciences et des biotechnologies

UMR 7265 - CEA-CNRS-Université d'Aix-Marseille

Date de stage : 4 mars 2024 – 26 juillet 2024

Responsables : D<sup>rs</sup> Damien Faivre, Mila Sirinelli-  
Kojadinovic et Émilie Gachon

# Table des matières

---

Table des illustrations	4
Liste des abréviations	5
Avant-propos	6
 I. Introduction	 7
II. L'institut des biosciences et des biotechnologies	11
III. Matériels et méthodes	13
III.1. Souches bactériennes et préservation des cultures	13
III.2. Détermination des éléments chimiques initiant un comportement chimiotactique	15
III.2.1. Détermination de sources de carbones et d'électrons constituant de potentiels attractants	15
III.2.2. Motilité d'essaimage bactérien, preuve de la chimiotaxie	16
III.3. Vers une caractérisation plus précise du comportement chimiotactique : l'étude de la rotation d'un des moteurs flagellaires	20
III.3.1. Protocole expérimental	20
III.3.2. Observation et acquisition vidéo	25
III.3.3. Analyse des vidéos	25

IV. Résultats et discussion	26
IV.1. Détermination des acides organiques testés comme source de carbone et d'électrons	26
IV.1.1. Établissement du milieu de croissance afin de pouvoir mener cette étude	26
IV.1.2. Courbes de croissance dans le FSM modifié	31
IV.2. Prouver un comportement chimiotactique : la motilité d'essaimage bactérien sur gélose molle	32
IV.3. L'étude d'un des moteurs flagellaires : vers une caractérisation plus précise de la chimiotaxie	33
V. Conclusion	38
Références	39
Annexes	41
Résumés	44

# Table des illustrations

---

Figure 1 : <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> [...]	8
Figure 2A : Représentation schématique de la modulation des fréquences d'arrêt [...]	10
Figure 2B : Représentation des sens de rotation horaire (CW) et antihoraire (CCW) [...]	10
Figure 3 : Organigramme du BIAM.	12
Figure 4A : Intérieur du spectrophotomètre magnétique [...]	14
Figure 4B : Allure des densités optiques mesurées.	14
Figure 5 : Dispositif d'établissement des conditions anaérobique et micro-aérobiques.	18
Figure 6 : Montage permettant l'observation de la motilité d'essaimage bactérien.	19
Figure 7 : Structure générale d'un flagelle bactérien [...]	21
Figure 8 : Dispositif expérimental permettant l'étude de la rotation du corps bactérien [...]	22
Figure 9 : Initiation d'un dispositif permettant l'établissement d'un gradient chimique [...]	24
Figure 10 : Plate-forme de microscopie optique inversée avec montage de bobines [...]	25
Figure 11 : Détermination du FSM modifié.	30
Figure 12 : Suivi temporel de la croissance bactérienne en présence d'acides organiques [...]	31
Figure 13 : Diamètres des cercles décrits par la motilité bactérienne [...]	32
Figure 14 : Pourcentage temporel du sens de rotation des corps bactériens [...]	35
Figure 15 : Distribution des fréquences d'arrêt d'un des moteurs flagellaires de MSR-1 [...]	36
Figure 16 : Vitesses de rotation d'un des moteurs flagellaires de MSR-1 [...]	37
Figure A1 : Composition du FSM standard.	41
Figure A2 : Implémentation du filtre de Kalman en Python [...]	43

# Liste des abréviations

---

MEM : Équipe Microbiologie Environnementale et Moléculaire

BIAM : l'Institut des biosciences et des biotechnologies de l'Université d'Aix-Marseille

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

MTB : Bactéries magnétotactiques (Magnetotactic Bacteria)

MSR-1 : *Magnetospirillum gryphiswaldense*

DO : Densité Optique

FSM : *Flask standard medium*

EIQ : Écart Interquartile

# Avant-propos

---

Je remercie tout d'abord l'ensemble de l'équipe Microbiologie Environnementale et Moléculaire (MEM) de l'Institut des biosciences et des biotechnologies de l'Université d'Aix-Marseille (BIAM) pour son accueil chaleureux et son aide précieuse. Je souhaite évidemment citer particulièrement mes encadrants : Damien Faivre, Mila Sirinelli-Kojadinovic et Émilie Gachon. Leur bienveillance, leur disponibilité et leur pédagogie m'ont permis de progresser tout au long de mon stage. Je remercie Sandrine Grosse pour son aide durant les manipulations entreprises, Sandy Payan pour les souches bactériennes fournies, et Antoine Sirinelli pour la conception et l'impression de la cellule microfluidique.

Devenir ingénieur est un rêve, un rêve d'ascension intellectuelle et sociale qui m'anime depuis mon plus jeune âge. Je souhaite ainsi remercier et dédier ces travaux à l'ensemble de mes proches des deux côtés de la Méditerranée, qui m'ont toujours accompagné dans cette quête.

Cette importante finalité, conjuguée aux difficultés ressenties, a entraîné ma fébrilité. Bien que celle-ci se soit atténuée au cours des mois, je tiens à exprimer ma frustration : je pense que je pouvais et devais faire mieux. Je me suis néanmoins battu, avec mes armes, afin de donner le meilleur de moi-même. Ces difficultés ont été pour moi une source de motivation car, comme le dit si bien le dicton, *à vaincre sans péril, on triomphe sans gloire*<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> *Le Cid* de Pierre Corneille, 1637.

# I. Introduction

---

Composante du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives à Cadarache (CEA), l'Institut des biosciences et des biotechnologies de l'Université d'Aix-Marseille a été le théâtre de mon projet de fin d'études. Ce dernier s'inscrit dans le cadre d'un projet porté par la fondation A\*Midex de l'Université d'Aix-Marseille. Ce programme de recherche international, intitulé *Tactic Behaviors of Magnetotactic Microorganisms*, étalé sur les cinq prochaines années, est coordonné par Damien Faivre et porte sur les réponses chimiotactiques chez les microorganismes magnétotactiques. Le projet implique ainsi les Universités de Lettonie à Riga, de La Sapienza à Rome, de Bayreuth en Allemagne et de La Laguna en Espagne.

Mon étude avait pour but d'initier l'un des principaux axes du projet, à savoir l'étude de la chimiotaxie chez des bactéries magnétotactiques (MTB). Vivant en milieu aquatique, elles sont caractérisées par leur habilité à s'aligner passivement avec des lignes de champ magnétique, en raison de la synthèse d'organites ferrimagnétiques, appelés magnétosomes (Figure 1). Constitués de cristaux de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou de greigite ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ), ces derniers forment une chaîne dans le cytoplasme cellulaire et sont à l'origine d'un moment magnétique faisant de la bactérie un dipôle magnétique permanent [1].

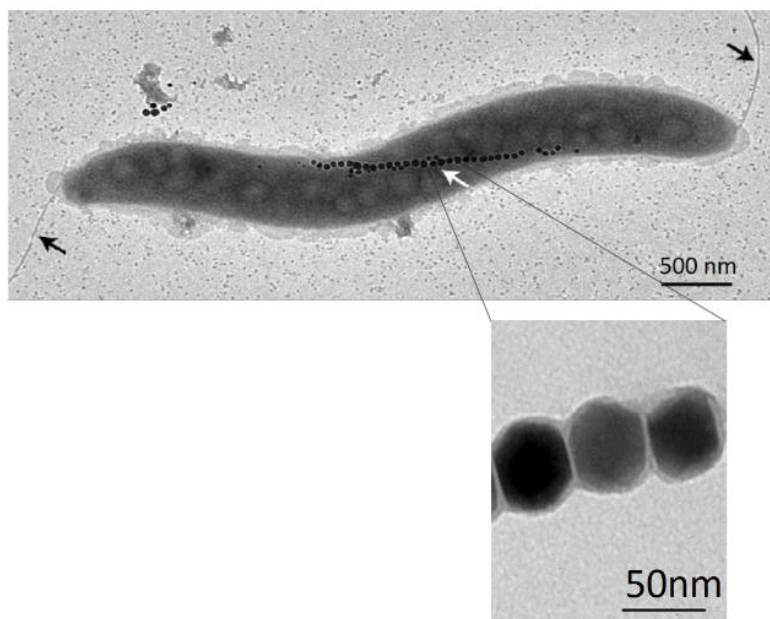


Figure 1: *Magnetospirillum gryphiswaldense*, espèce de bactérie magnétotactique. Image obtenue par microscopie électronique en transmission. Les flèches noires indiquent les flagelles, celle en blanc la chaîne de magnétosomes. D'après Strauß *et al.*, Biomimetics and Bionic Applications with Clinical Applications, 2021.

Cette faculté, forçant un mouvement unidimensionnel, facilite la recherche d'une condition micro aérobie, préférentielle pour leur développement [2]. Cette sensibilité au taux de dioxygène, induisant le déplacement de la bactérie, appelée aérotaxie, est une forme de chimiotaxie, définie comme le mouvement d'un microorganisme en réponse à un stimulus chimique. Ces éléments chimiques sont soit des attractants, soit des répulsifs [3]. À ce jour, l'étude de la chimiotaxie chez les MTB est limitée, avec pour seule avancée significative la découverte de quatre opérons chimiotactiques chez *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, dont l'un est lié à l'aérotaxie [4]. Le rôle des trois autres opérons chimiotactiques reste encore aujourd'hui une interrogation. Ainsi, à travers ce modèle bactérien, les objectifs étaient la détermination d'espèces chimiques engendrant une réponse chimiotactique, puis la caractérisation de cette dernière. Ce fut la première fois qu'une telle étude était menée au sein du laboratoire, l'état de l'existant se limitant ainsi à l'aspect théorique.

Afin d'atteindre les objectifs exposés ci-dessus, l'étude s'est concentrée sur la famille chimique des acides organiques, qui constituait *a priori* une source de carbone et d'électrons consommée par MSR-1 pour croître, et donc un attractant potentiel. La première tâche a ainsi été de vérifier si cette famille chimique constituait bien une source de carbone et d'électrons afin de pouvoir continuer l'étude le cas échéant. Cela a été fait



par le suivi de la croissance bactérienne, en s'assurant que, si une croissance avait lieu, celle-ci était alors imputable exclusivement à l'acide organique testé, faisant ainsi de lui une source de carbone et d'électrons. Pour cela, un ensemble de tests de croissance ont été menés en amont, en soustrayant les différents constituants du milieu de culture standard hormis le lactate, seule source de carbone et d'électrons restante. Une fois les sources de carbone discriminées, la réponse chimiotactique de la population bactérienne vis-à-vis de ces dernières a été démontrée à travers la motilité d'essaimage bactérien sur gélose molle. Enfin, une caractérisation individuelle préliminaire de cette réponse a été fournie à travers l'étude d'un des moteurs flagellaires de MSR-1, ces derniers étant à l'origine du mouvement de la bactérie. Il a été démontré chez *Escherichia coli* que le mouvement de la bactérie est régi par le sens de rotation et la fréquence d'arrêt des moteurs flagellaires [5].

En présence d'éléments chimiques attractants, les bactéries poursuivent une phase de nage continue, caractérisée par un sens de rotation unique du moteur flagellaire. Quand le milieu n'est plus favorable, c'est-à-dire en cas de baisse de concentration d'attractants ou en présence d'éléments répulsifs, les bactéries arrêtent la rotation de leurs moteurs flagellaires, subissant une marche aléatoire induite par le bruit environnant. Cette marche aléatoire prend fin si un attractant ou un répulsif est détecté, conduisant à une nouvelle phase de nage continue, avec un sens de rotation opposé entre ces deux cas (horaire ou antihoraire). En définitive, la bactérie se déplace vers l'attractant en modulant sa fréquence d'arrêt (Figure 2A). Il a ainsi été convenu de caractériser les réponses chimiotactiques à travers l'étude du sens de rotation du moteur flagellaire ainsi que de sa fréquence d'arrêt (Figure 2B).

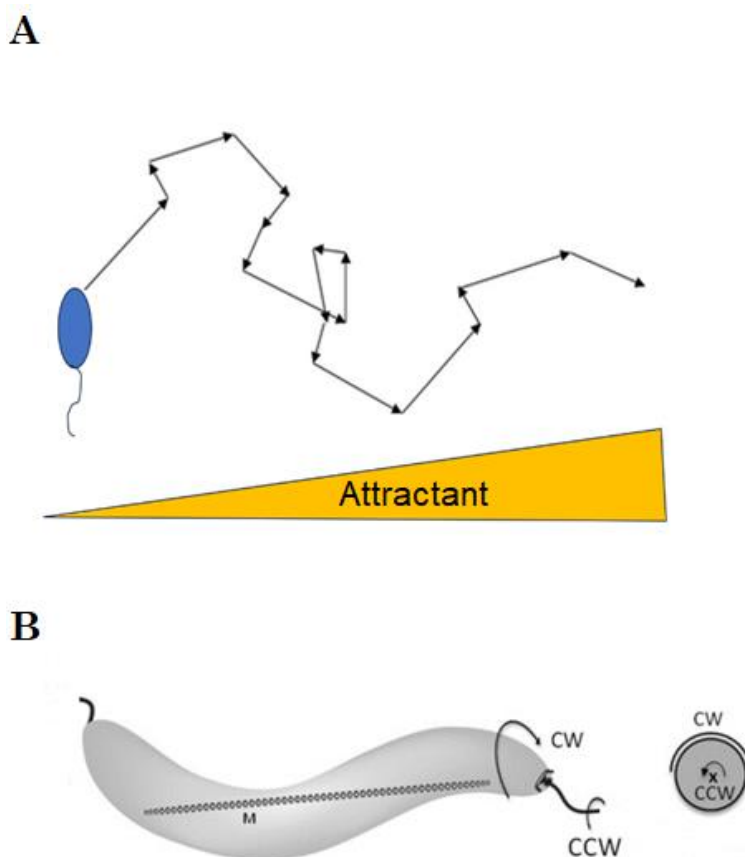


Figure 2 : (A) Représentation schématique de la modulation des fréquences d'arrêt d'une bactérie quelconque en présence d'un gradient d'attractant. (B) Représentation des sens de rotation horaire (CW) et antihoraire (CCW) du moteur flagellaire chez *Magnetospirillum gryphiswaldense*. La vue de face, située à droite de la figure, met en perspective l'opposition entre le sens de rotation du flagelle et celui du corps de la bactérie. D'après [6].

L'état basal du moteur flagellaire, *i.e.* en l'absence d'éléments chimiotactiques, a tout d'abord été caractérisé. Cela a permis l'obtention d'une référence afin de pouvoir la comparer, au travers des deux critères évoqués précédemment, avec les réponses du moteur flagellaire en présence des gradients d'attractants. Malgré de nombreuses tentatives, ces derniers n'ont pu être obtenus en raison de contraintes techniques<sup>2</sup>.

Après présentation de la structure du BIAM, le matériel utilisé et les méthodes suivies seront exposés. L'étude critique des résultats obtenus clôturera ce rapport.

<sup>2</sup> Abordées dans la suite du rapport.

## II. L'Institut des biosciences et des biotechnologies

---

Le BIAM est une Unité Mixte de Recherche multi-tutelles (UMR 7265) entre le CEA, le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et l'Université d'Aix-Marseille. Il est implanté sur deux sites géographiques stratégiques : la faculté des sciences de Luminy à Marseille et le centre du CEA Cadarache à Saint-Paul-lez-Durance. C'est sur ce dernier site que s'est déroulé ce stage.

Le CEA est un établissement public à caractère scientifique, technique et industriel, qui est l'un des acteurs les plus influents dans le domaine de la recherche et du développement technologique en France. Le secteur d'activité du BIAM se concentre principalement sur les biosciences et les biotechnologies, avec pour objectif de répondre aux enjeux du développement durable. Par exemple, des recherches innovantes y sont menées pour le développement de bioénergies à partir de microalgues, ou encore pour la phytoremédiation, qui vise à dépolluer les sols grâce aux plantes. L'histoire du CEA, créé en 1945, est marquée par des avancées scientifiques significatives, notamment dans le domaine de l'énergie nucléaire. Au fil des décennies, le CEA a su diversifier ses activités pour inclure des recherches sur les énergies renouvelables, la biologie et les biotechnologies.

Fondé en 2004, le BIAM s'est rapidement imposé comme un centre de référence dans ces domaines, notamment en participant à des projets européens tels que le programme Horizon 2020, où il a collaboré sur des projets de bioénergies et de biotechnologies environnementales. L'institut compte 180 personnes, incluant des chercheurs, des ingénieurs, des techniciens, ainsi que des doctorants et post-doctorants. L'organisation du BIAM est structurée en plusieurs équipes de recherche spécialisées, chacune dirigée par des chercheurs principaux (Figure 3). À ce titre, le stage a été réalisé au sein de l'équipe MEM (Microbiologie Environnementale et Moléculaire), dirigée conjointement par Pascal Arnoux, Laurence Blanchard et Damien Faivre. Cette équipe se concentre sur l'étude des micro-organismes et de leurs interactions avec l'environnement, avec des applications potentielles en dépollution et en biotechnologie. Par exemple, l'une des thématiques de

recherche porte sur les bactéries magnétotactiques, qui peuvent être utilisées pour la récupération de métaux précieux ou la dépollution des sols.

Le budget du BIAM est principalement issu de financements publics tels que ceux accordés par l'Agence nationale de la recherche (ANR), ainsi que de partenariats avec l'industrie, notamment avec des entreprises du secteur de l'énergie et de l'agro-industrie. Le laboratoire a, par exemple, collaboré avec des entreprises comme TotalEnergies® sur des projets de développement de biocarburants, ce qui a contribué à diversifier ses sources de financement. Ce budget permet de soutenir les activités de recherche, d'acquérir des équipements de pointe et de financer des projets collaboratifs à l'échelle nationale et internationale. Les clients et partenaires du BIAM sont variés et incluent des institutions académiques, des entreprises du secteur privé, ainsi que des organismes gouvernementaux. Par exemple, le BIAM collabore étroitement avec l'Institut de biologie moléculaire des plantes à Strasbourg pour des recherches sur les mécanismes de défense des plantes. Les fournisseurs, quant à eux, sont principalement des entreprises spécialisées dans les équipements de laboratoire, comme Thermo Fisher Scientific®, et dans les réactifs chimiques nécessaires aux recherches en biotechnologie.

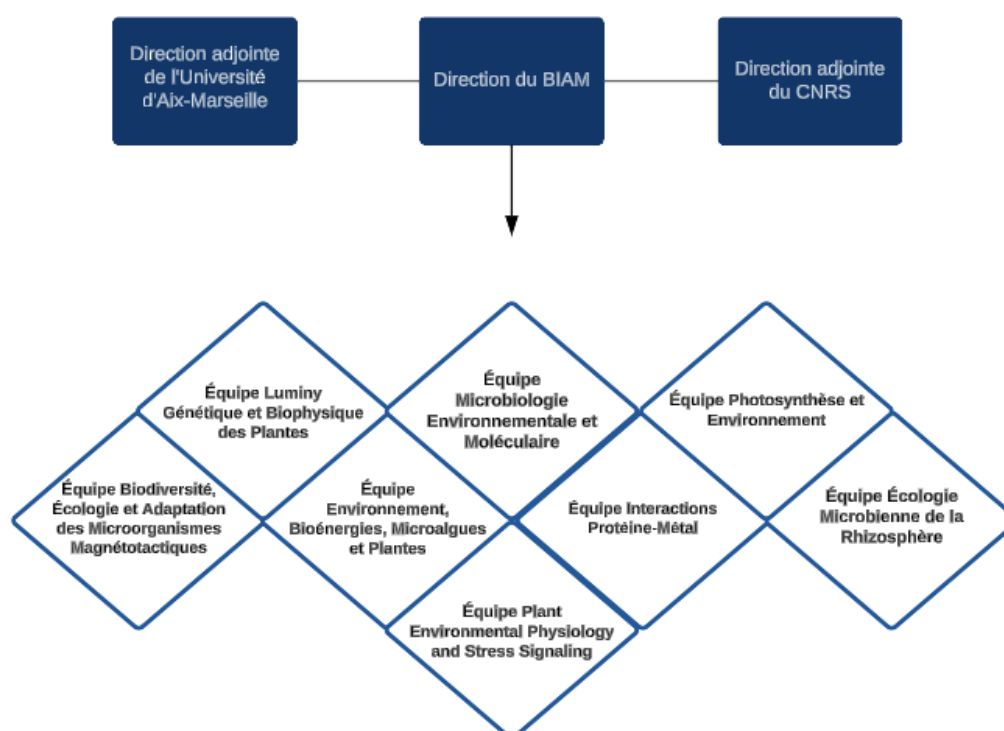


Figure 3 : Organigramme du BIAM.

# III. Matériels et méthodes

---

L'objectif était d'étudier les réponses chimiotactiques chez les bactéries magnétotactiques à travers le modèle *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Les buts étaient (i) l'identification des molécules pouvant provoquer une réponse chimiotactique et (ii) la caractérisation de cette réponse, le cas échéant. Inédite, cette étude avait ainsi pour vocation l'accroissement de la compréhension de la chimiotaxie chez MSR-1, et par extension chez les MTB, ouvrant la voie à des applications thérapeutiques<sup>3</sup>.

## III.1. Souches bactériennes et préservation des cultures

L'étude a été menée sur *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (DSM 6361 ; Schleifer *et al.*, 1991 ; Schuler et Kühler, 1992). Les bactéries ont été cultivées dans le Flask Standard Medium (FSM) [7] (Annexe A1) dans des tubes Falcon™ de 15 mL placés dans un incubateur Jouan® à 28 °C. Les cultures sont préservées en inoculant stérilement sous une hotte à flux laminaire 300 µL de préculture de MSR-1 en phase stationnaire dans 15 mL de milieu FSM. Ce dernier est un milieu de croissance riche dans lequel le lactate (concentration finale de 30 mM) est utilisé comme principale source de carbone et d'électrons.

Afin de vérifier la motilité des bactéries et la non-contamination de la culture utilisée par d'autres espèces microbiennes, un échantillon de 5 µL de la culture est tout d'abord observé au microscope (Nikon® Eclipse Si, objectif : 40x/0.65 - Ph2 DL ∞/0.17 WD 0.65) pour vérifier la motilité des bactéries et la non-contamination de la culture par d'autres espèces microbiennes. Le comportement magnétique des bactéries est ensuite testé par l'intermédiaire du spectrophotomètre magnétique Agilent Technologies® Cary 60 UV-Vis (Figure 4A). Plus précisément, un indice semi-quantitatif du magnétisme cellulaire, appelé  $C_{mag}$  (*cellular magnetism*), est calculé. Trois valeurs différentes de la Densité Optique (DO) à 600 nm<sup>4</sup> sont tout d'abord mesurées : en l'absence de champ (noté x), en

---

<sup>3</sup> Application possible sur le long terme, voir conclusion.

<sup>4</sup> La densité optique est également mesurée afin de déterminer la croissance bactérienne (relation de proportionnalité). La longueur d'onde à 600 nm ne présente aucun danger pour la culture.

présence d'un champ parallèle au chemin optique (y) et en présence d'un champ perpendiculaire au chemin optique (z) (Figure 4B).

Le calcul suivant est effectué :

$$C_{mag} = \frac{y - z}{x}$$

Par convention, les données de DO sont lues cinq secondes après l'application de chaque champ, ce qui laisse suffisamment de temps aux bactéries pour réagir.

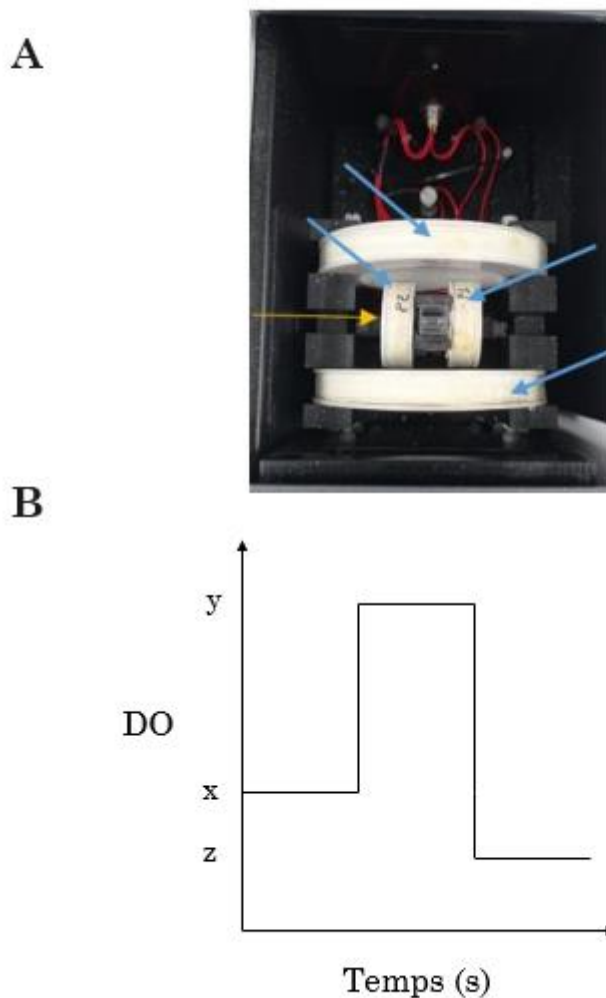


Figure 4 : (A) Intérieur du spectrophotomètre magnétique, les flèches bleues désignent les bobines de Helmholtz, celle en jaune indique le trajet du rayon lumineux incident. (B) Allure des densités optiques mesurées.

## **III.2. Détermination des éléments chimiques initiant un comportement chimiotactique**

### **III.2.1. Détermination de sources de carbones et d'électrons constituant de potentiels attractants**

La focalisation porte, *a priori*, sur la famille chimique des acides organiques constituant des potentielles sources de carbone et d'électrons. Ces sources étant essentielles au développement des bactéries, il est envisagé que les bactéries pourraient être attirées par ces dernières.

Le premier objectif est donc de déterminer si les acides organiques disponibles dans notre laboratoire, *i.e.* acétate, formate, fumarate, malate, propionate, pyruvate, et succinate (Sigma-Aldrich®, concentration de 1M), constituent bien des sources de carbone et d'électrons pour MSR-1. Pour cela, la croissance bactérienne doit être suivie en présence de chacun de ces acides organiques, en s'assurant que toute croissance observée soit exclusivement expliquée par la présence de l'acide organique testé, faisant ainsi de celui-ci une source de carbone et d'électrons. Il est nécessaire d'identifier, par soustraction progressive des composants du FSM, les éléments essentiels à la croissance bactérienne avec le lactate comme source de carbone d'électrons. Une fois ce milieu établi (appelé FSM modifié), la croissance bactérienne pourra être suivie pour chaque potentielle source de carbone et d'électrons.

Ces dernières sont ajoutées à ce FSM modifié pour atteindre une concentration finale de 30 mM. Le pH a été réajusté à 7 (comme dans le milieu FSM standard) à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 M. Les cultures ont été inoculées avec des pré-cultures de MSR-1 réalisées dans du FSM standard, lavées trois fois dans du FSM modifié par trois cycles de centrifugation (5000 g, 10 minutes) et remises en suspension dans du FSM modifié. Les cultures ont été inoculées de manière à obtenir une densité optique initiale (600 nm) de 0,01. Selon les expériences, les cultures ont été suivies en trois répliques dans : (i) des tubes Eppendorf™ stériles de 1,5 ml contenant 1,450 mL de culture, incubés dans un incubateur Jouan® à 28 °C, ou (ii) des microplaques de 96 puits contenant 200 µL de culture par puits.

Dans le premier cas, la densité optique a été mesurée manuellement à l'aide du spectrophotomètre présenté précédemment (Figure 4A). Dans le second cas, la microplaque a été placée dans un lecteur de microplaques TECAN® (modèle Infini M200),

à 28 °C, et la densité optique dans chaque puits a été contrôlée automatiquement toutes les 30 minutes, à l'aide du logiciel Magellan©. Dans les deux conditions de culture (tubes ou microplaques), les contenants de culture étaient scellés avec un film adhésif stérile, imperméable aux gaz, et remplis en liquide à plus de 80 % afin de reproduire les conditions de vie micro-aérobies des bactéries.

### **III.2.2. Motilité d'essaimage bactérien, preuve de la chimiotaxie**

Une fois les sources de carbone et d'électrons identifiées, l'étape suivante consiste à déterminer si celles-ci induisent un comportement chimiotactique. Pour rappel, l'hypothèse émise précédemment est que ces sources pourraient constituer des attractants pour MSR-1. À l'instar de l'étude menée par Popp *et al.* sur l'aérotaxie [4], un ensemble d'expériences de motilité d'essaimage bactérien sur gélose molle a été réalisé. Des boîtes de Petri ont été utilisées, chacune contenant un milieu sous forme de gélose constituée d'agar, de FSM modifié et d'une des sources de carbone et d'électrons testées au préalable, introduite à une concentration limitante (ici, 1 mM, soit 30 fois inférieure à celle utilisée pour la croissance bactérienne).

5 µL d'une culture bactérienne en phase stationnaire a été prélevés pour inoculer les géloses en leur centre. L'agar permet de suivre la nage des bactéries par la formation de cercles. Si ces cercles sont observés, ils peuvent être expliqués par (i) la consommation des constituants du milieu, (ii) la création d'un gradient de concentration chimique au sein de la gélose pour les éléments limitants (généralement la source de carbone et d'électrons dont la concentration est limitante), et (iii) la perception de ces gradients par les bactéries, conduisant à leur déplacement plus loin dans la gélose, ce qui explique la formation des cercles.

Mais comment alors être sûr que ce gradient perçu est bien lié aux sources de carbones testées ?

Comme évoqué précédemment, le premier élément à prendre en compte est la quantité de source de carbone ajoutée, qui est trente fois inférieure à celle nécessaire au développement de MSR-1. Les bactéries sont ainsi incitées à se déplacer, et leur mouvement confirme leur réponse à un gradient de source de carbone créé par leur consommation progressive du milieu. De plus, l'aérotaxie, le mouvement de la bactérie en réponse à un gradient de dioxygène, constitue actuellement la seule forme de chimiotaxie démontrée chez MSR-1 [4]. Afin d'éliminer ce biais, chaque source de carbone est testée



sous trois régimes d'oxygène différents : anaérobie, micro-aérobie (2 % de dioxygène) et aérobie (21 % de dioxygène). Pour une source de carbone donnée, une nage identique dans au moins deux conditions indiquerait l'exclusion de ce biais.

D'autre part, il n'est pas exclu qu'un des composants du mélange entre l'agar et le FSM modifié soit à l'origine d'un comportement chimiotactique. Il est donc nécessaire de prévoir un contrôle négatif pour chaque condition de concentration en dioxygène.

Pour chaque condition de dioxygène, cinq tubes de 50 mL Falcon™ sont étiquetés différemment selon les sources de carbone et la condition en dioxygène. Ces tubes, ainsi que six boîtes de Petri, sont placés sous une hotte stérile à flux laminaire. Les boîtes, encore fermées, sont étiquetées de la même manière, avec l'ajout d'une boîte servant de contrôle négatif. La bouteille contenant le mélange d'agar et de FSM modifié est chauffée dans un four à micro-ondes pendant 30 secondes pour faire fondre l'agar, en dévissant légèrement le bouchon pour éviter la surpression. À la fin de ces 30 secondes, la bouteille est fermée et légèrement agitée pour homogénéiser le contenu. Ces phases de chauffage et d'homogénéisation sont répétées jusqu'à ce que le mélange soit totalement homogène et que l'agar soit complètement fondu. La bouteille est ensuite placée sous la hotte stérile.

Les sources de carbone, stockées dans des tubes Falcon™ de 15 mL, sont sorties du réfrigérateur, et leur pH est ajusté à 7 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 M. 25 mL du mélange FSM modifié et agar fondu sont ajoutés dans chacun des tubes étiquetés avec les noms des sources de carbone. 25 µL de chaque source de carbone (1 M) sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 1 mM. Les tubes sont fermés et homogénéisés à l'aide d'un vortex. Le contenu de chaque tube est ensuite versé dans les boîtes appropriées, qui sont laissées à sécher pendant une demi-heure. Pendant ce temps, la culture bactérienne, inoculée la veille, est vérifiée et, après validation, 5 µL de culture sont déposés au centre de chaque boîte. Le contenu du tube de culture a été préalablement homogénéisé manuellement. Les boîtes sont laissées à sécher quelques minutes avant d'être fermées.

Pour les conditions anaérobie et micro-aérobie, les boîtes fermées sont placées dans une jarre étanche équipée d'un manomètre, d'une entrée et d'une sortie d'air (Figure 5). Les jarres sont remplies et équilibrées pendant 20 minutes avec le mélange de gaz souhaité à l'aide d'un mélangeur de gaz : 2 % de dioxygène pour les conditions micro-aérobies et 100 % de diazote pour les conditions anaérobies.



Figure 5 : Dispositif d'établissement des conditions anaérobie et micro-aérobie. Le cercle jaune indique l'arrivée d'air, remplissant la jarre étanche identifiée par une flèche de la même couleur. Le mélangeur de gaz est distingué par une flèche rouge.

Les jarres et les boîtes en condition aérobie sont placées dans l'incubateur Jouan® à 28 °C. Un délai de 72 heures est laissé entre l'incubation et la visualisation des résultats.

Ces boîtes sont observées à l'aide d'un dispositif monté manuellement, constitué de deux lampes éclairant deux extrémités opposées de la boîte, qui est surélevée à l'aide d'un portoir. Cela permet d'observer aisément les cercles formés, leur structure dimensionnelle et les motifs éventuellement présents (Figure 6).

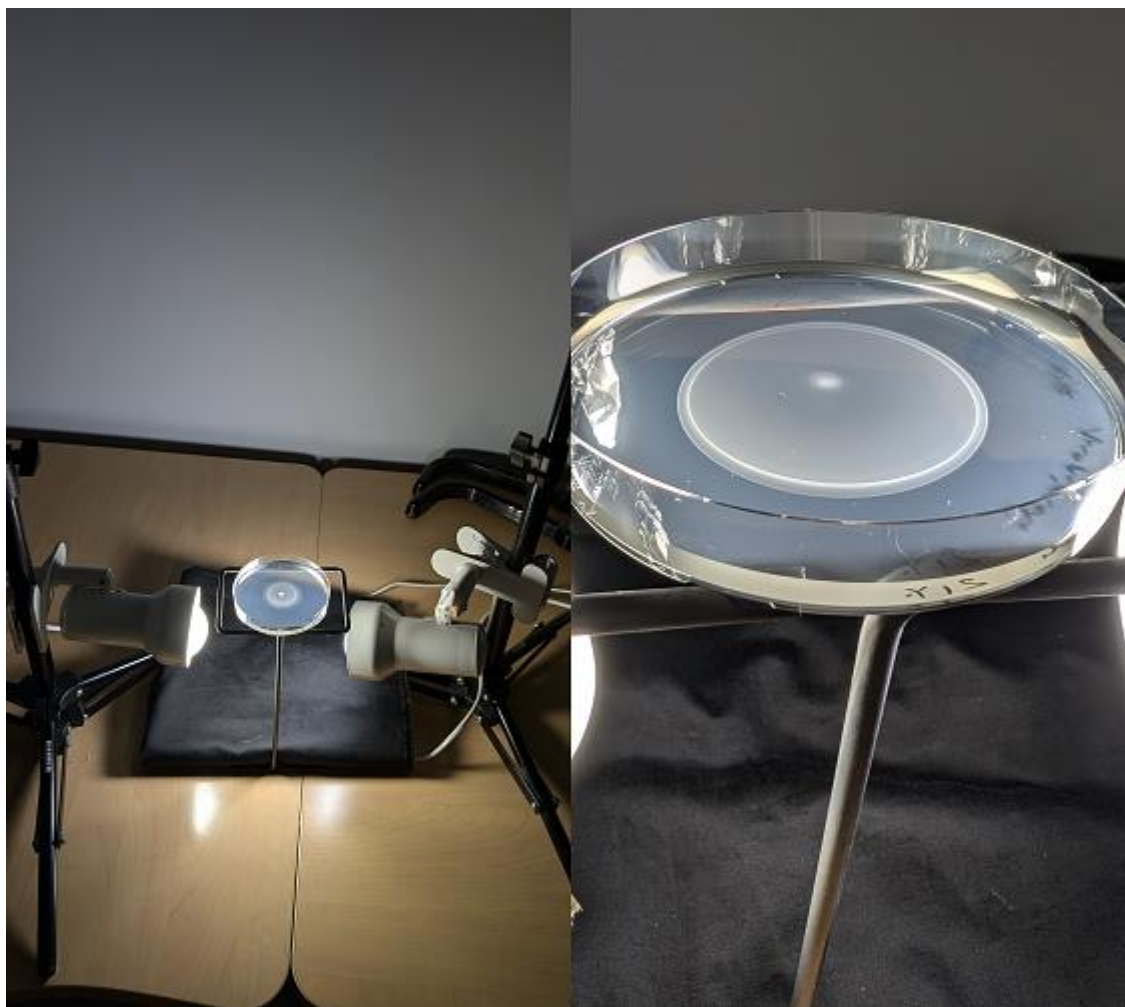


Figure 6 : Montage permettant l'observation de la motilité d'essaimage bactérien (à gauche). À droite, observation d'un échantillon (propionate avec 21 % de dioxygène).

### **III.3. Vers une caractérisation plus précise du comportement chimiotactique : l'étude de la rotation d'un des moteurs flagellaires**

#### **III.3.1. Protocole expérimental**

L'expérience précédente permet de déterminer si chaque source de carbone et d'électrons étudiée provoque une réponse chimiotactique et d'en évaluer l'intensité. Cependant, les résultats obtenus sur boîte résultent d'une combinaison du métabolisme bactérien (génération d'un gradient sur gélose) et du chimiotactisme (déplacement bactérien en réponse à la perception d'un gradient chimique). Afin d'étudier de façon détaillée les réponses chimiotactiques à chacune des sources de carbone testées, il est important d'utiliser une technique permettant d'analyser les réponses chimiotactiques uniquement, en s'affranchissant de la métabolisation de ces sources par les bactéries.

Comme expliqué en introduction, pour répondre à cette question, l'origine du mouvement bactérien, c'est-à-dire le moteur flagellaire (Figure 7), doit être examinée. Plus précisément, les modulations des fréquences d'arrêts de ce dernier ainsi que son sens et sa vitesse de rotation au cours du temps doivent être étudiées afin de caractériser la réponse chimiotactique.

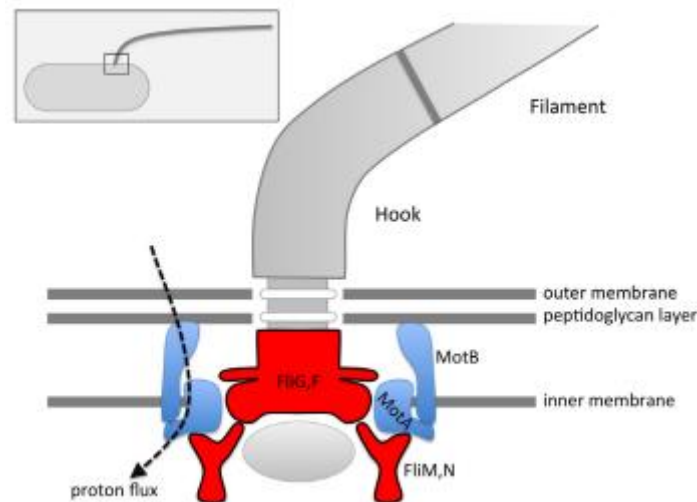


Figure 7 : Structure générale d'un flagelle bactérien : le stator est constitué des protéines MotA et MotB (bleu) qui forment un anneau autour de l'unité centrale du rotor, constituée des protéines FliG et FliF (rouge), composée des protéines FliG et FliF (rouge). Un flux de protons à travers le stator entraîne la rotation du rotor et, avec lui, celle du crochet et du filament flagellaire. La structure est simplifiée et toutes les protéines ne sont pas indiquées. D'après [8].

L'étude de la rotation du moteur flagellaire, en fonction du milieu de nage des bactéries, est réalisée par l'intermédiaire d'un dispositif analogue à celui de Kojadinovic *et al.* [9], appelé *tethered cell assay*. La rotation du moteur flagellaire est observée par la rotation du corps de la bactérie, cette dernière étant attachée par un de ses flagelles sur une lame. Une chambre est ensuite construite en fixant cette lame sur une cellule microfluidique, où les milieux chimiques étudiés sont injectés.

Pour attacher les bactéries par un seul de leurs flagelles, 1 mL de la culture sélectionnée est prélevé à l'aide d'une seringue de 1 mL (Terumo®). Une aiguille 23G (Agan®) est placée en sortie de cette seringue et connectée à un tube de 10 cm de long et d'un diamètre inférieur à 1 mm. L'autre extrémité de ce tube est connectée au même dispositif vide. Les bactéries sont ensuite déplacées d'une seringue à l'autre vingt-huit fois pour raccourcir leurs flagelles par contraintes de cisaillement à l'intérieur du tube. 0,5 mL de ces bactéries aux flagelles tronquées est ajouté à 1,5 mL d'une solution tampon d'HEPES (concentrée à 10 mM) dans un Eppendorf™. Après centrifugation (5000 g pendant 10 minutes), le culot est remis en suspension dans 2 mL d'HEPES à la même concentration.

Une lame microscopique est placée dans une chambre humide, constituée d'une boîte de Petri contenant, de part et d'autre de la lame, deux tissus imbibés d'eau pour éviter

l'évaporation de l'échantillon. 50  $\mu\text{L}$  de Poly-L-lysine, diluée deux fois dans de l'eau distillée, sont utilisés pour recouvrir la lame. Après cinq minutes, la lame est rincée : la solution de Poly-L-lysine est aspirée à l'aide d'une micropipette, 50  $\mu\text{L}$  d'eau distillée sont ajoutés puis aspirés pour retirer tout excès de Poly-L-lysine. Une suspension contenant 10  $\mu\text{L}$  de bactéries aux flagelles tronquées est préparée, lavée, puis mélangée avec 2  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-flagelline dilués au centième. Cette suspension est ensuite déposée sur la lame et incubée pendant 15 minutes dans la chambre humide.

Le centre de la lame est positionné perpendiculairement au-dessus d'un aimant (avec le pôle Sud orienté vers la suspension bactérienne), permettant aux bactéries de se fixer par un seul de leurs flagelles tronqués sur la lame via l'anticorps anti-flagelline et de s'orienter vers l'observateur, permettant ainsi l'observation de leurs rotations. La lame est fixée sur un dispositif microfluidique conçu et imprimé par Antoine Sirinelli [9] à l'aide du logiciel FreeCAD®. De la graisse (« high vacuum grease » de Dow Corning®) est utilisée pour sceller la chambre, et une autre lame immaculée est fixée à l'opposé pour créer une « chambre fermée » (Figure 8).

Différentes approches<sup>5</sup> ont été testées afin de parvenir à ce protocole, qui est pour l'instant le plus optimal.

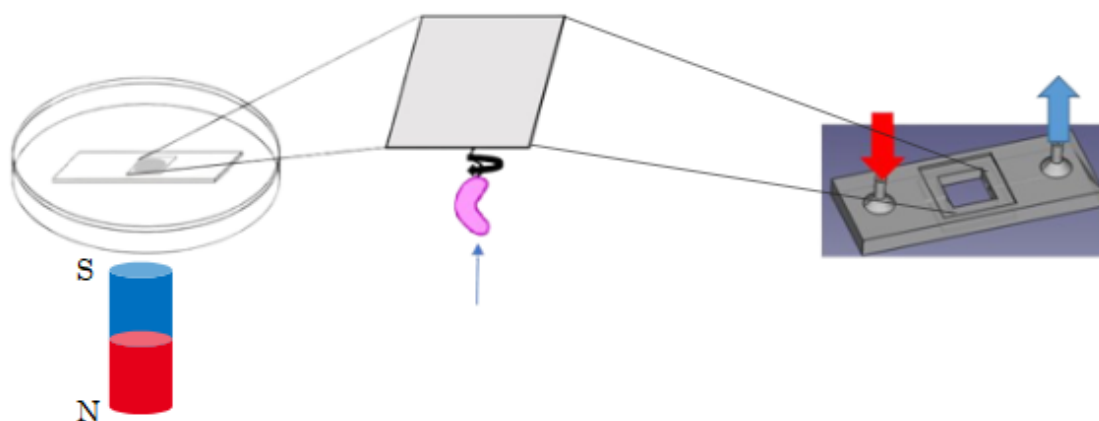


Figure 8 : Dispositif expérimental permettant l'étude de la rotation du corps bactérien induite par la rotation d'un des moteurs flagellaires. La fine flèche bleue au centre représente l'axe d'observation de cette rotation.

<sup>5</sup> Changement des concentrations de Poly-L-lysine et d'anticorps.

Avant d'étudier les attractants, le comportement basal du moteur flagellaire doit être examiné dans un milieu chimiquement homogène, sans gradient chimique, afin de pouvoir disposer d'une référence permettant de comparer l'activité du moteur en présence de chimiotaxie. Pour cela, une solution d'HEPES à 10 mM est choisie, constituant la base des solutions d'attractants à tester. L'HEPES, en tant que solution tampon du FSM modifié, maintient le pH à 7. Cette solution est injectée manuellement à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (des modèles précédemment mentionnés), par l'une des entrées du dispositif microfluidique, jusqu'à remplir entièrement la chambre.

Un premier montage permettant la création d'un gradient chimique<sup>6</sup> dans la cellule microfluidique a été initié mais n'a pas été mené à terme en raison de problèmes d'étanchéité de la cellule et de reproductibilité. Les différents milieux injectés dans la cellule microfluidique doivent l'être à un débit constant (mesuré à la sortie) afin de ne considérer que l'impact des sources de carbone sur le comportement chimiotactique des bactéries. Cela permet également de minimiser leur comportement aérotactique en maintenant une teneur en oxygène constante dans l'ensemble du dispositif. De plus, un débit faible (de l'ordre de 0,1 mL par minute [9]) est nécessaire pour éviter les mouvements parasites et le décrochage des bactéries. L'attractant traversant la cellule est stocké dans une seringue ouverte de 6 mL (Terumo®) fixée à un support, avec une extrémité reliée à l'entrée du dispositif microfluidique par un tube sur lequel un clamp est fixé (Figure 9).

---

<sup>6</sup> Pour rappel, la chimiotaxie est la réponse d'un organisme à un gradient chimique perçue.

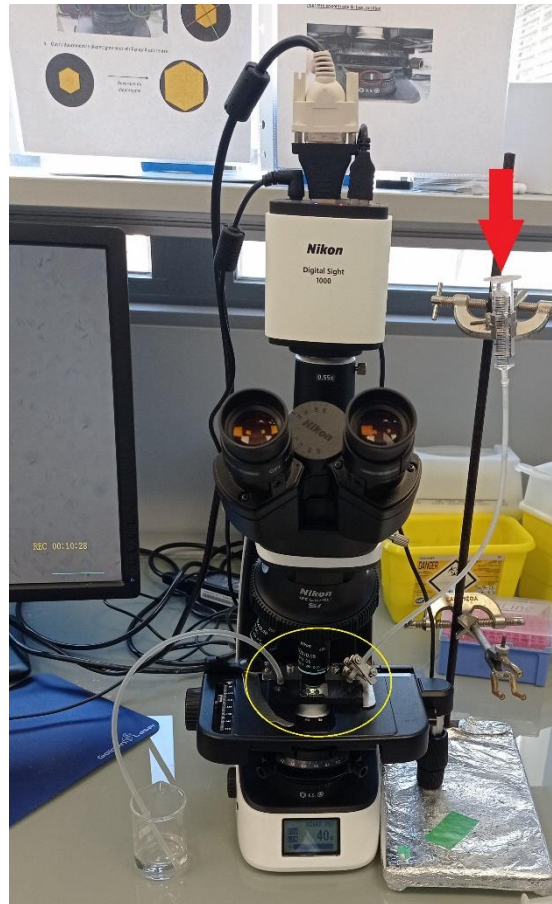


Figure 9 : Initiation d'un dispositif permettant l'établissement d'un gradient chimique à l'intérieur de la cellule microfluidique, entourée ci-dessus par un cercle jaune. L'entrée est signalée par la flèche rouge.

L'écoulement dans la cellule est amorcé à l'aide d'une seringue vide (même modèle et contenance que précédemment) reliée à la sortie par un tube. Cette phase d'amorçage commence lorsque la chambre est remplie à au moins trois quarts de sa capacité, assurant que le liquide atteint l'extrémité de la chambre connectée à la sortie. À ce stade, une partie du liquide est aspirée par la seringue. Le tube de sortie est ensuite fermé à l'aide d'un clamp et détaché de la seringue. Le débit de sortie est régulé à l'aide de ce clamp, tout en s'assurant que l'autre clamp sur le tube d'entrée maintient un environnement sans pression.



### III.3.2. Observation et acquisition vidéo

La chambre microfluidique est observée à l'aide d'un microscope magnétique à lumière fluorescente, spécialement conçu au sein du BIAM [10] (Figure 10). Le microscope utilise un objectif Nikon® x60 S Plan Fluor, et une caméra Andor Zyla 5.5 HF enregistre à 150 images par seconde. Ce microscope a été conçu pour permettre l'observation des cellules sous des champs magnétiques contrôlés, générés par trois bobines de Helmholtz et régulés par un ordinateur *via* le logiciel C-SpinCoil-XYZ de Micro Magnetics Inc®. Cependant, aucun champ magnétique n'est appliqué pour cette étude, qui se concentre uniquement sur la chimiotaxie. Des vidéos de deux minutes sont enregistrées à l'aide du logiciel Andor iQ3©, en format *.tiff*, en noir et blanc (8 bits).

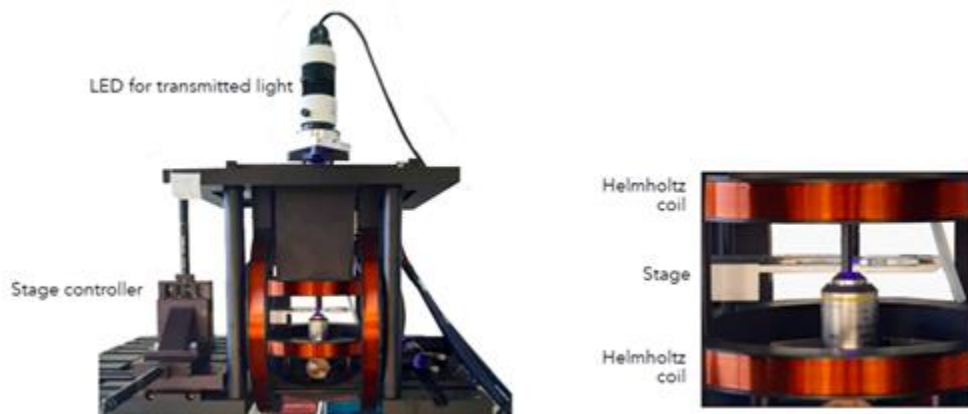


Figure 10 : Plate-forme de microscopie optique inversée avec montage de bobines de Helmholtz en 3 dimensions, conçue au BIAM. La platine du microscope et l'objectif sont placés entre trois paires de bobines de Helmholtz (en orange) chaque paire est placée dans une direction. L'orientation des cellules peut être contrôlée en fonction du champ externe appliqué.

### III.3.3. Analyse des vidéos

Les vidéos sont analysées à l'aide du logiciel Bacteria Rotation Analysis Software©, version 1.0 (BRAS) [9] après conversion des vidéos sous format *.avi*. Ce logiciel suit la rotation du centre de masse de la bactérie sélectionnée au cours du temps. Un fichier sous format *.h5* est fourni en sortie, lequel comporte l'ensemble des coordonnées suivies par ce centre de masse. Par la suite un programme Python a été implémenté afin d'extraire de ce fichier :

1. La fréquence d'arrêt du moteur flagellaire.
2. La vitesse de rotation moyenne dans chacun de ces sens de rotation.

Un arrêt du moteur flagellaire est défini arbitrairement comme une phase où la vitesse de rotation est inférieure à 0,001 Hz. Un sens de rotation horaire est caractérisé par une vitesse de rotation négative. À l'inverse, une vitesse de rotation positive indique une rotation antihoraire. Une vitesse sera considérée dans l'un ou l'autre sens de rotation si elle dépasse, en valeur absolue, le seuil de 0,001 Hz.

BRAS suivant la bactérie quand celle-ci est suffisamment discernable (blanche sur un fond noir), une inversion noire et blanche de la vidéo d'origine peut être nécessaire. À cet effet, un code a été implémenté. Le logiciel génère également un panneau de sortie affichant la vitesse de rotation au cours du temps ainsi que la trajectoire du centre de masse. Ces éléments permettent de réaliser un tri préliminaire entre les vidéos exploitables (fichiers *.h5* retenus pour analyse) et les vidéos non exploitables (fichiers *.h5* non retenus pour analyse).

Une vidéo est jugée exploitable si l'un des critères suivants est satisfait :

1. Une trajectoire circulaire du centre de masse.
2. Une trajectoire très centrée autour d'un point ajouté à une vitesse de rotation suivant le motif observé dans la littérature [4][8]. Cela est lié à la morphologie en spirale de la bactérie qui voit son corps suivre une rotation très centrée en présence d'une vitesse de rotation suffisamment élevée.

Les données fournies par le fichier étant bruitées, un filtrage a été appliqué aux coordonnées spatiales du centre de masse de la bactérie. Après avoir testé différents filtres, le filtre de Kalman [11] a été retenu. Ce choix est justifié par la nécessité de traiter des données bruitées tout en préservant la précision des estimations de vitesse, qui sont essentielles pour comprendre le comportement dynamique de la bactérie (voir Figure 11A). Le filtre de Kalman est un outil mathématique utilisé pour estimer la valeur réelle d'une grandeur (ici, la vitesse de la bactérie) à partir de mesures bruitées. Il combine les données observées avec un modèle préétabli du comportement du système afin d'obtenir une estimation optimisée, en tenant compte du bruit et des incertitudes. Le filtre estime deux paramètres : la vitesse de la bactérie et l'accélération. L'état du système est ainsi représenté par un vecteur à deux composantes : la vitesse et l'accélération.

La matrice de transition  $F$  prédit l'état du système à l'instant suivant, la vitesse suivante dépend de l'ancienne plus une contribution de l'accélération. La matrice d'observation  $H$  relie les observations directes (ici, les vitesses mesurées) à l'état estimé. Elle indique que la mesure disponible est directement la vitesse, et non l'accélération.

La matrice de covariance  $P$ , initialisée avec la valeur 0,1, représente l'incertitude sur les valeurs initiales de la vitesse et de l'accélération. Cette valeur a été ajustée empiriquement et reflète une bonne confiance dans les estimations initiales. Le paramètre  $R$ , ajusté également empiriquement à 100, représente la variance du bruit dans les mesures de vitesse. Cette valeur élevée signifie que les mesures directes sont très bruitées, donc le filtre se fie moins aux mesures et davantage au modèle de prédiction. La matrice de covariance du bruit  $Q$ , modélise l'incertitude dans l'évolution du système (bruit de processus). Sa valeur initiale a été ajustée empiriquement et indique une certaine flexibilité accorder au modèle pour s'adapter aux changements, mais sans devenir trop sensible aux fluctuations aléatoires.

Au niveau de la méthodologie suivie, le filtre utilise la matrice  $F$  pour prédire la vitesse et l'accélération à l'instant suivant, en se basant sur l'état précédent. Il compare ensuite cette prédiction à la mesure réelle de la vitesse (qui est bruitée) et ajuste l'estimation en fonction de la confiance qu'il accorde aux mesures *via*  $R$  et au modèle *via*  $Q$ . Si la mesure diffère de la prédiction, le filtre ajuste son estimation pour réduire cette différence. La nouvelle estimation devient plus précise à chaque itération. Le filtre de Kalman agit ici comme un "moyenneur intelligent" : il prend les mesures de vitesse, les compare à ce que le modèle de mouvement prédit, et ajuste les estimations de manière à obtenir la meilleure approximation possible de la vitesse réelle de la bactérie, en minimisant l'impact du bruit et des incertitudes. Une explication plus détaillée (Information supplémentaire I1), accompagnée de l'implémentation du filtre sur Python (Figure A2) sont proposées en annexe.

La distribution des fréquences d'arrêts du moteur flagellaire au sein de l'échantillon est étudiée à l'aide d'un histogramme, en appliquant la méthode de Freedman-Diaconis [12]. Étant donné que les valeurs sont très faibles et dispersées sur une gamme étroite autour de zéro, une méthode robuste est nécessaire pour déterminer le nombre optimal d'intervalles dans l'histogramme afin de représenter fidèlement la distribution des données. La méthode de Freedman-Diaconis est conçue pour s'adapter aux caractéristiques de dispersion des données. Elle utilise l'écart interquartile (EIQ), soit la différence entre le premier et le troisième quartile de la distribution, pour estimer la largeur des intervalles. Contrairement à des méthodes plus simples comme la règle de Sturges, la méthode de Freedman-Diaconis est moins sensible aux asymétries dans la distribution des données, assurant ainsi une représentation plus fidèle des données centrales sans diluer les informations pertinentes dans un grand nombre d'intervalles

inutiles. Les fréquences d'arrêt étant faibles, les variations subtiles peuvent être d'une grande importance biologique. Par exemple, des changements minimes dans la fréquence d'arrêt peuvent refléter des altérations dans les conditions environnementales ou dans l'état physiologique des cellules. La méthode de Freedman-Diaconis permet de déterminer un nombre d'intervalles qui est suffisamment fin pour capturer ces variations sans introduire un bruit excessif ou une sur-division des données.

L'équation permettant cette détermination est la suivante :

$$L_i = 2 \frac{EIQ}{\sqrt[3]{n}}$$
 , ou  $L_i$  est la largeur d'un intervalle de l'histogramme,  $EIQ$  l'écart interquartile, et  $n$  le nombre d'échantillons.

## IV. Résultats et discussion

---

### IV.1. Détermination des acides organiques testés comme source de carbone et d'électrons

#### IV.1.1. Etablissement du milieu de croissance afin de pouvoir mener cette étude

Afin qu'un acide organique soit qualifié de source de carbone et d'électrons, et donc de potentiel attractant comme expliqué précédemment, une étude de la croissance bactérienne en présence de cet acide doit être réalisée. Cependant, le milieu de croissance doit être conçu de manière à ce que toute croissance observée soit exclusivement attribuable à l'acide organique étudié, faisant de ce dernier une source de carbone et d'électrons. La première étape consiste donc à déterminer ce milieu, en utilisant le lactate, un acide organique reconnu comme source de carbone et d'électrons. En suivant la méthode décrite dans la partie précédente, un FSM modifié est obtenu, correspondant au FSM standard sans lactate et sans extrait de levure. La croissance n'est pas observée lorsque le lactate est ajouté au FSM standard dépourvu de peptone et d'extrait de levure (Figure 11A). En revanche, une croissance bactérienne est observée uniquement lorsque la peptone est ajoutée au lactate (Figure 11B).

Il est alors légitime de se demander si ce n'est pas la peptone elle-même qui jouerait ce rôle de source de carbone, ce qui mettrait alors en péril notre quête d'un tel élément parmi les acides organiques étudiés. Cela est réfuté par la croissance bactérienne en présence de peptone uniquement (Figure 11B, en rouge), qui est très faible comparée à celle observée en présence de lactate et de peptone (Figure 11B, en orange). La très faible croissance en l'absence de lactate (Figure 11B, en vert) confirme d'ailleurs la nécessité de cet acide organique dans le développement de MSR-1, en tant que source de carbone et d'électrons.

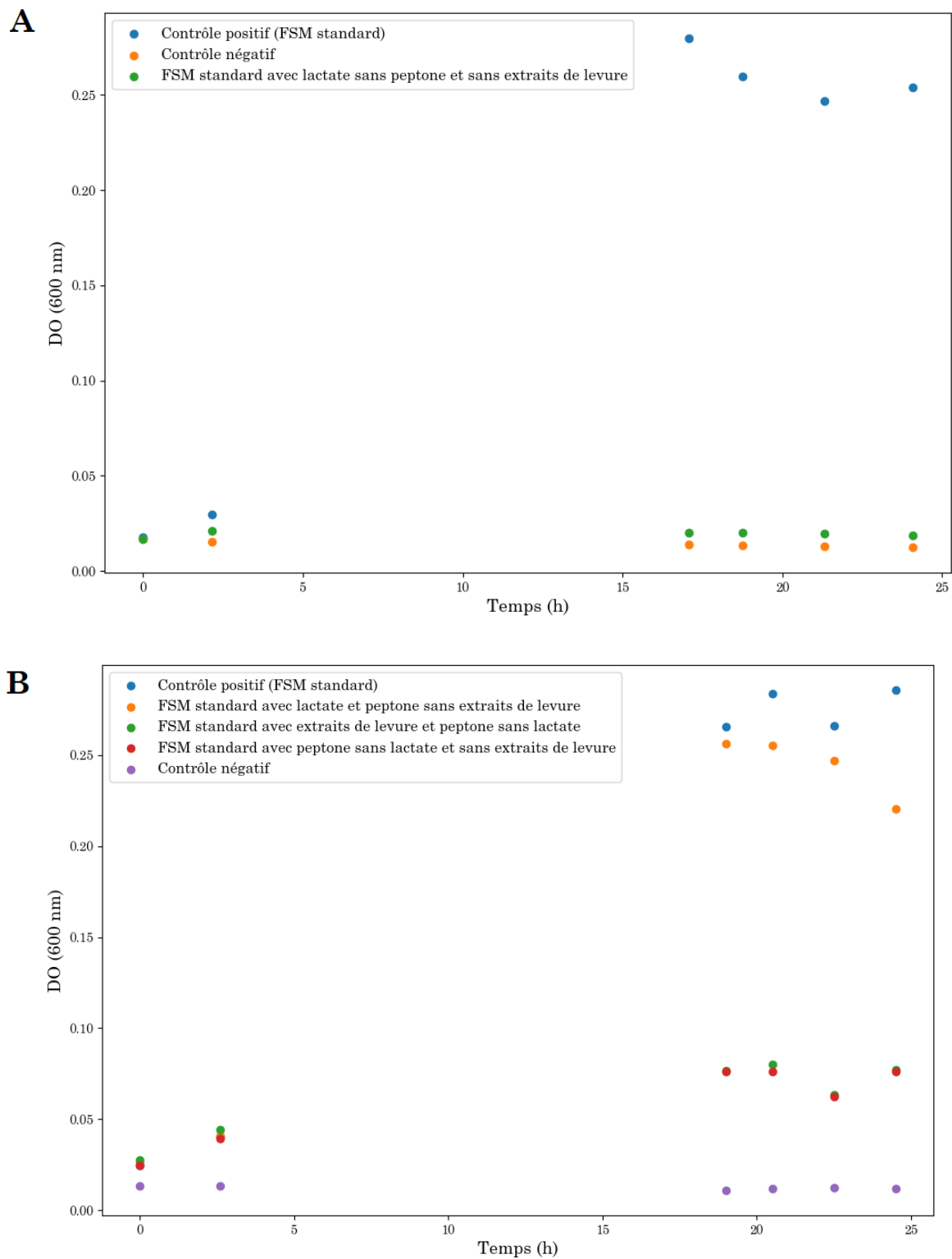


Figure 11 : Détermination du FSM modifié. (A) Croissance bactérienne étudiée en l'absence de peptone et d'extraits de levure. (B) Croissance bactérienne étudiée en l'absence : d'extrait de levure uniquement, de lactate uniquement, de lactate et d'extrait de levure. Les contrôles négatifs ne comportent pas de lactate, de peptone et d'extraits de levure.

### IV.1.2. Courbes de croissance dans le FSM modifié

Les courbes de croissances obtenues en présence des différents acides organiques testés sont présentées ci-dessous.

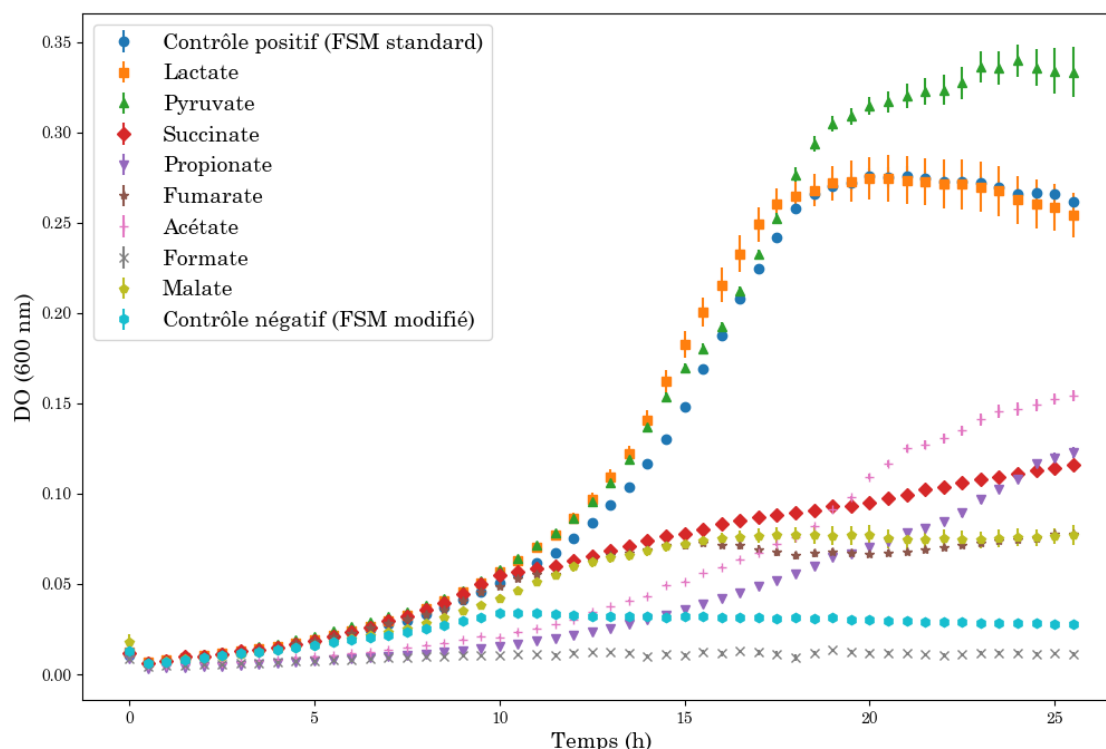


Figure 12 : Suivi temporel de la croissance bactérienne en présence d'acides organiques dans le FSM modifié.

Une croissance pour l'ensemble des acides organiques est observée (très bonne croissance pour pyruvate et lactate, et moyenne pour les autres sources) excepté pour le formate. Dans ce dernier cas, nous observons une décroissance de la population bactérienne, plaçant ainsi la courbe en dessous du contrôle négatif et faisant du formate un potentiel répulsif. L'ensemble des autres acides organiques constituent ainsi des sources de carbones et d'électrons faisant donc de ces derniers des potentiels attractants. Les espèces chimiques qui présentent les croissances les plus importantes *i.e.* pyruvate, lactate, acétate, propionate et succinate sont retenues pour la suite de l'étude : sources de carbones et d'électrons permettant le développement de MSR-1 certes, mais sont-ils pour autant à l'origine de chimiotaxie ?

## IV.2. Prouver un comportement chimiotactique : la motilité d'essaimage bactérien sur gélose molle

Deux problématiques techniques ont dû être résolues pour mener à bien cette expérience, après plusieurs tentatives. Tout d'abord, la quantité d'agar ajoutée. En effet, une proportion d'agar supérieure à 0,2% g/L dans le FSM modifié a conduit à l'absence de déplacement de la population bactérienne. Cette situation est expliquée par le fait que le milieu devient trop rigide pour permettre la motilité des bactéries. En outre, l'homogénéisation du mélange entre les composants du FSM modifié et l'agar s'est révélée difficile. Plutôt que de préparer la quantité totale de mélange dans un seul bécher, puis de la transvaser dans une unique bouteille, la solution adoptée a été de diviser la préparation entre plusieurs béchers homogénéisés simultanément, avec une quantité d'agar réduite.

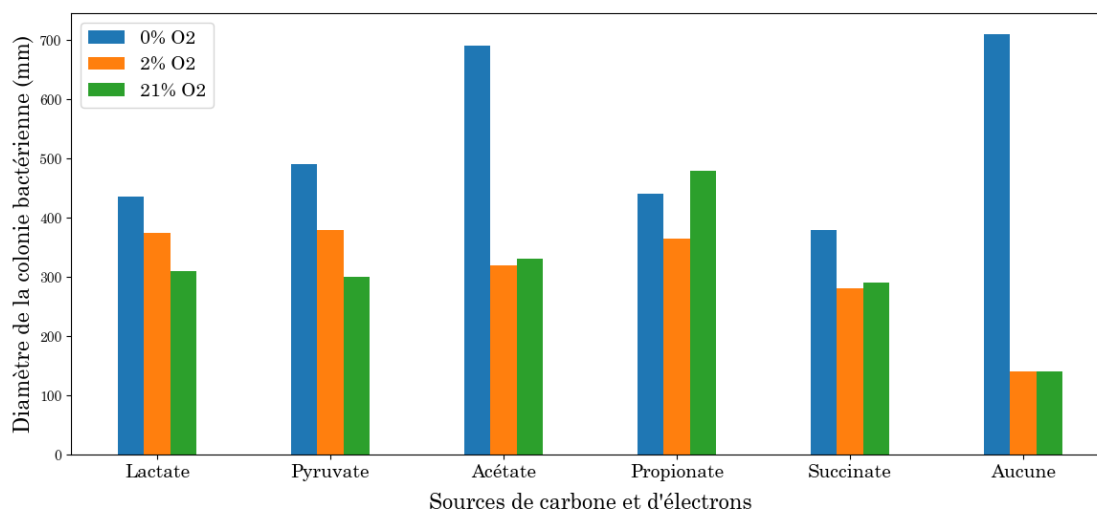


Figure 13 : Diamètres des cercles décrits par la motilité bactérienne en fonction du pourcentage d'oxygène et des sources de carbones et d'électrons testées.

Pour un pourcentage d'oxygène donné, une différence de motilité entre les contrôles négatifs et les milieux contenant des sources de carbone a été observée. Cela suggère la présence d'un comportement chimiotactique en réponse au gradient de sources de carbone créé par la bactérie par consommation du milieu. D'autre part, les diamètres de motilité des contrôles négatifs à 2 % et à 21 % d'oxygène indiquent que ces taux d'oxygène ne sont pas exclusivement impliqués dans la migration bactérienne. Il est également noté que les diamètres de motilité à 2 % et à 21 % d'oxygène avec différentes sources de carbone sont similaires, ce qui suggère fortement que le signal chimiotactique perçu en réponse au gradient chimique de source de carbone est prédominant par rapport au signal aéro-tactique.



En anaérobiose, le diamètre de motilité du contrôle négatif est important et supérieur à celui observé dans les conditions avec oxygène. Il semble donc qu'un gradient ait été généré au sein de la gélose « contrôle négatif », et que ce gradient soit perçu par les bactéries. Le signal pourrait être lié à la création d'un gradient en concentration de nitrate, qui, en anaérobiose, est l'accepteur final d'électrons. De manière intéressante, les diamètres de motilité en anaérobiose et en présence de sources de carbone et d'électrons sont inférieurs à celui du contrôle négatif, suggérant que ces sources modifient l'état métabolique des bactéries et/ou « compensent » le signal chimiotactique perçu dans le contrôle négatif.

Les résultats obtenus seront complétés dans le futur par la répétition des expériences en triplicat et par l'élargissement de l'étude à des concentrations plus ou moins importantes de certains composants, tels que le nitrate en anaérobiose. De plus, des courbes de croissance seront réalisées en anaérobiose et à 21 % d'oxygène afin d'établir le rôle des différentes sources de carbone et d'électrons à ces concentrations d'oxygène.

### **IV.3. L'étude d'un des moteurs flagellaires : vers une caractérisation plus précise de la chimiotaxie**

Sur une centaine de mouvements de bactéries acquis en présence d'HEPES, 45 ont été retenus pour analyse<sup>7</sup>. Les figures ci-dessous présentent une caractérisation de l'état basal d'un des moteurs flagellaires de MSR-1. Bien que ce dernier tourne préférentiellement dans le sens anti-horaire<sup>8</sup>(Figure 14), les vitesses dans chacun des sens de rotations sont équivalentes (Figure 15). La fréquence d'arrêt du moteur flagellaire est quant à elle très faible, avec des valeurs très proches de 0 (Figure 16).

Au-delà du fait que 28 corps de bactéries ont un sens de rotation préférentiel pour le sens horaire *i.e.* un pourcentage temporel supérieur, c'est surtout la valeur de ce pourcentage temporel qui démontre cette préférence. En effet, comme illustré ci-dessous (Figure 14), quand le sens de rotation anti-horaire est préféré, celui-ci l'emporte d'un court avantage face au sens de rotation horaire (regroupement autour des 50%, ligne rouge sur la Figure 13). Cependant l'écart se creuse quand c'est le sens horaire qui est privilégié avec un étalement des valeurs plus éloignés des 50%. Pour rappel, le sens de rotation du moteur

---

<sup>7</sup> Voir III.3.3.

<sup>8</sup> Pour rappel, le sens de rotation du corps bactérien (suivi ici) est opposé à celui du moteur flagellaire. Voir introduction.

flagellaire est inverse par rapport à celui de la bactérie, le moteur tourne donc préférentiellement dans le sens antihoraire.

À l'échelle moléculaire, une asymétrie dans la structure du moteur pourrait expliquer une rotation préférentielle dans un sens donné. De plus, les interactions entre les protéines FliG, FliM et FliN (Figure 7) pourraient induire une légère préférence pour la rotation anti-horaire, en fonction de l'état énergétique de la cellule. La prochaine étape du projet, visant à mener la même caractérisation mais en présence des attractants déterminés, permettra ainsi de fournir des éléments de réponse.

À l'instar d'une hélice de navire, dont le sens de rotation détermine les marches avant et arrière [13], ces résultats suggèrent que la bactérie adoptera préférentiellement un sens de nage, ce sens étant inversé lorsque le sens de rotation du moteur flagellaire est inversé. Cependant, cette hypothèse doit être nuancée par le fait que la bactérie évolue dans un environnement microscopique à faible nombre de Reynolds, où la propulsion est possible uniquement si le mouvement est asymétrique, conformément au *scallop theorem* [14]. Cette asymétrie est assurée chez MSR-1 par la forme hélicoïdale des flagelles [7], ce qui nécessite une étude plus approfondie du lien entre le sens de rotation d'un flagelle et le mouvement du fluide environnant qu'il induit. De plus, il convient de rappeler que MSR-1 possède deux flagelles, et donc deux moteurs flagellaires...

À ce jour, aucune étude n'a démontré de lien entre la motilité et le sens de rotation des moteurs flagellaires chez MSR-1. Cependant, les travaux réalisés sur *Escherichia coli* [15] soutiennent l'hypothèse formulée précédemment. En effet, les flagelles de cette espèce bactérienne s'unissent en tournant dans le sens antihoraire lors des phases de nage (*run*). En revanche, la bactérie est arrêtée et réorientée par le bruit environnant après un *tumble*, une chute provoquée par la rotation des flagelles dans l'autre sens.

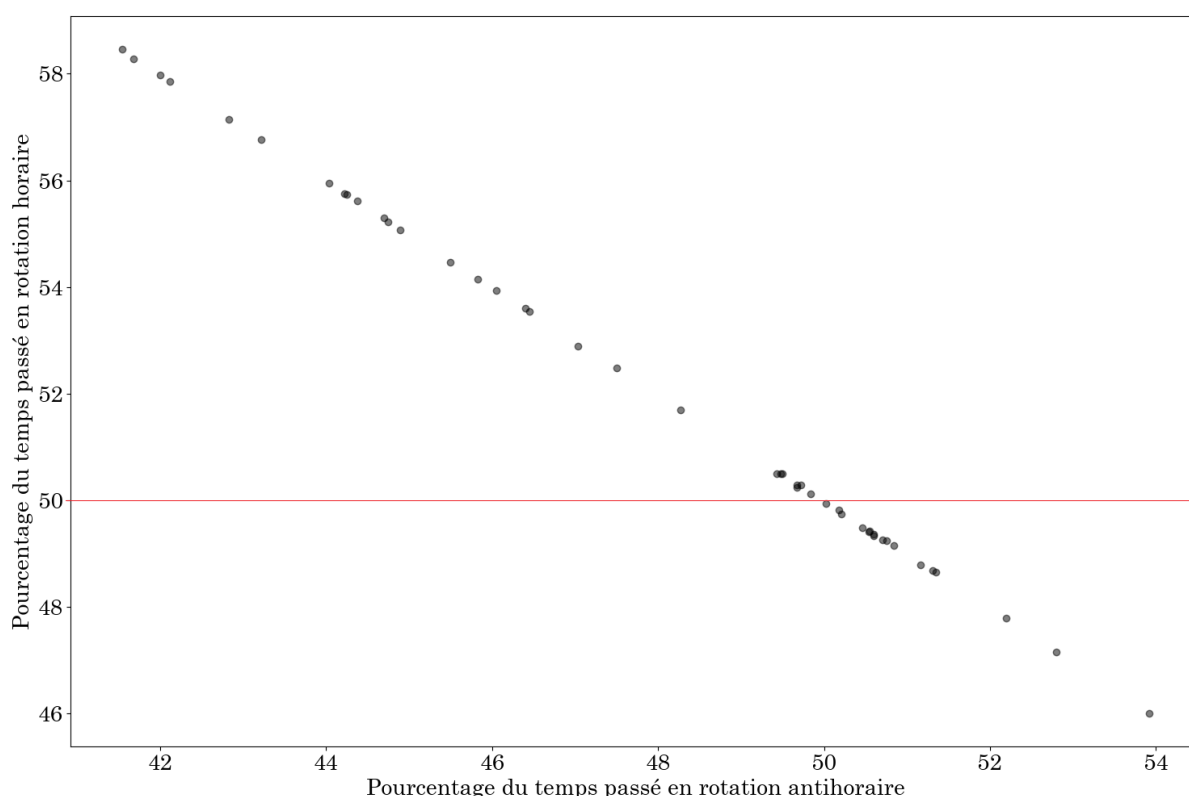


Figure 14 : Pourcentage temporel du sens de rotation des corps bactériens en milieu homogène (10 mM d'HEPES). Chaque point représente les données d'une bactérie. La ligne rouge met en évidence l'égalité entre les deux sens de rotation.

La faible fréquence d'arrêt d'un des moteurs flagellaires en présence d'un milieu homogène (Figure 15), caractérisant donc son état basal, est cohérente avec sa motilité spécifique en *run and reverse* décrite dans la littérature [3]. En effet, avec les conclusions établies à partir de la Figure 14, la présence des deux sens de rotations suggèrent que la bactérie change bien de sens mais sans pour autant arrêter son moteur. Le temps durant lequel cette dernière est réorientée par le bruit environnant<sup>9</sup> est donc très réduit, ce qui, ajouté à la magnétotaxie, la pousse donc à suivre une trajectoire unidirectionnelle : elle nage dans un sens (*run*), puis elle change de sens mais pas de direction (*reverse*).

<sup>9</sup> Voir introduction.

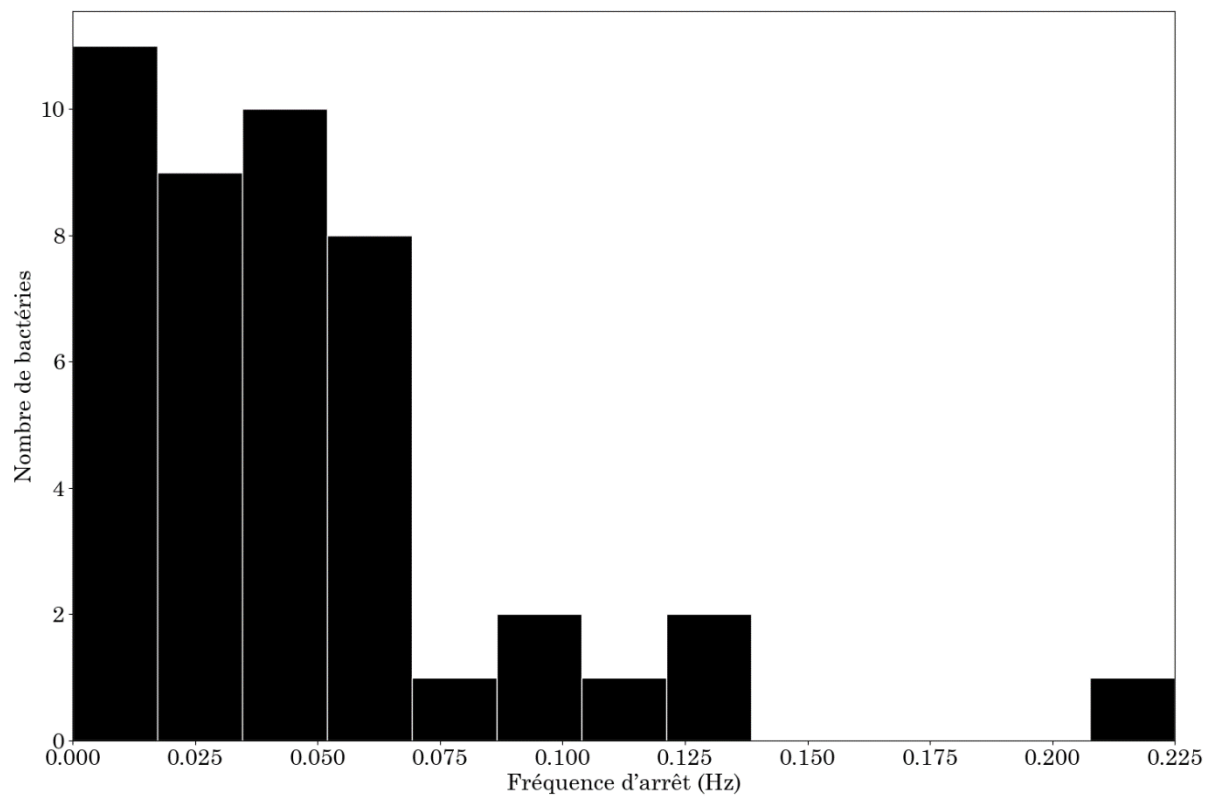


Figure 15 : Distribution des fréquences d'arrêt d'un des moteurs flagellaires de MSR-1 en présence d'une concentration homogène d'HEPES.

L'implémentation du code est à améliorer, afin d'affiner les fréquences calculées. En effet, afin d'assurer la robustesse de cette implémentation, plusieurs fréquences ont été déterminées manuellement, par l'intermédiaire de la courbe de vitesse fournie par le logiciel BRAS<sup>10</sup>. Ces dernières étaient légèrement inférieures à celles calculées par le code. L'amélioration du filtrage, au travers des valeurs des paramètres initiaux empiriques, est une piste à explorer.

<sup>10</sup> Vérification également faites avec les vitesses (Figures 14 et 16), avec succès.

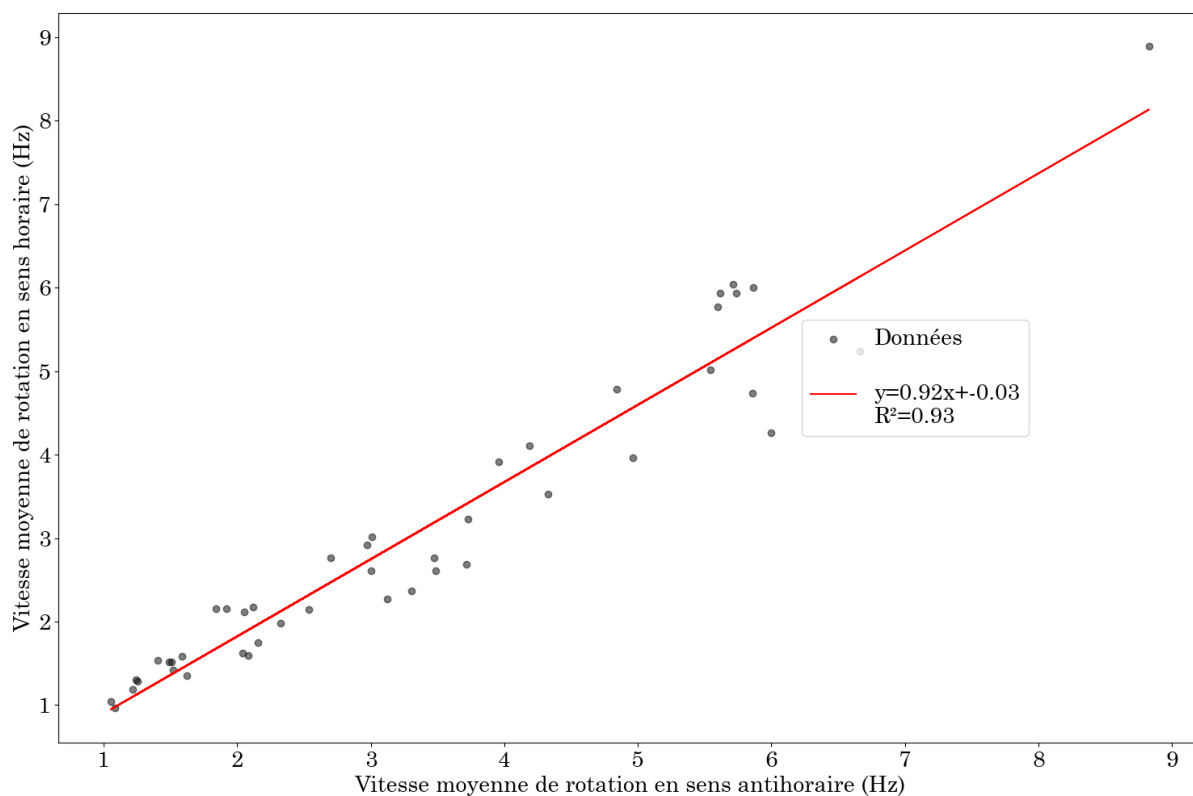


Figure 16 : Vitesses de rotation d'un des moteurs flagellaires de MSR-1 en sens antihoraire en fonction de la vitesse de celui-ci dans le sens horaire. Chaque point représente les données d'une bactérie. La droite rouge est la régression linéaire, très proche de la première bissectrice (coefficient de régression linéaire présenté, proche de 1).

Cette symétrie entre sens de rotation horaires et antihoraire semble cohérente au vu de l'expérience menée, sans attractant. En suivant l'hypothèse formulée précédemment, la bactérie n'a en effet aucune raison d'augmenter sa consommation énergétique afin d'aller dans un sens ou dans l'autre puisque que le milieu est homogène.

Enfin, les éventuelles conséquences du polymorphisme de l'échantillon sur l'ensemble des données, expliquées par l'absence d'une homogénéité sur la taille des flagelles tronqués, constituent une limite, et devront être étudiées.

## V. Conclusion

---

La détermination de molécules à l'origine d'une réponse chimiotactique chez *Magnetospirillum gryphiswaldense* et la caractérisation de cette réponse, ont constitué les objectifs de cette étude. Cette réponse chimiotactique a été démontrée en présence de lactate, pyruvate, acétate, succinate et propionate, ces molécules étant identifiées comme des attractants. La caractérisation de cette réponse à l'échelle d'un des moteurs flagellaires des bactéries a été initiée par l'étude de l'état basal de ce dernier, en l'absence de gradients d'attractants. Dans ce contexte, une rotation préférentielle du moteur flagellaire dans le sens antihoraire, une très faible fréquence d'arrêt centrée autour de 0,01 Hz, ainsi qu'une symétrie entre les vitesses atteintes par le moteur dans les deux sens de rotation ont été démontrées.

La prochaine étape consiste à mener la même caractérisation en présence de gradients des attractants mentionnés ci-dessus. Un montage et un protocole ont été établis à cet effet.

À plus long terme, une étude génétique, utilisant des mutants portant des mutations au niveau des opérons chimiotactiques<sup>11</sup>, permettrait de mieux comprendre le phénomène à un niveau moléculaire, c'est-à-dire en identifiant les protéines impliquées. Enfin, l'interaction entre chimiotaxie et magnétotaxie mérite également d'être explorée, ce qui pourrait, à plus long terme, conduire à l'utilisation de ces bactéries comme microrobots thérapeutiques [16][17].

---

<sup>11</sup> Voir introduction.

# Références

---

- [1] Faivre, D., & Schüler, D. (2008). Magnetotactic bacteria and magnetosomes. *Chemical Reviews*, 108(11), 4875-4898. <https://doi.org/10.1021/cr078258w>
- [2] Bazylinski, D. A., & Frankel, R. B. (2004). Magnetosome formation in prokaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (3), 217-230. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1068>
- [3] Klumpp, S., & Faivre, D. (2016). Magnetotactic bacteria. *European Physical Journal Special Topics*, 225, 2173–2188. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60055-y>
- [4] Popp, F., Armitage, J., & Schüler, D. (2014). Polarity of bacterial magnetotaxis is controlled by aerotaxis through a common sensory pathway. *Nature Communications*, 5, 5398. <https://doi.org/10.1038/ncomms6398>
- [5] Berg, H. C. (1993). *Random walks in biology*. Princeton University Press.
- [6] Murat, D., Hérisse, M., Espinosa, L., Bossa, A., Alberto, F., & Wu, L. (2015). Opposite and coordinated rotation of amphitrichous flagella governs oriented swimming and reversals in a magnetotactic spirillum. *Journal of Bacteriology*, 197(8), 1276-1283. <https://doi.org/10.1128/jb.00172-15>
- [7] Heyen, U., & Schüler, D. (2003). Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61 (5), 536–544. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1219-x>
- [8] Klumpp, S., Lefèvre, C. T., Bennet, M., & Faivre, D. (2019). Swimming with magnets: From biological organisms to synthetic devices. *Physics Reports*, 789, 1-54. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2018.10.003>
- [9] Kojadinovic, M., Sirinelli, A., Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2011). New motion analysis system for characterization of the chemosensory response kinetics of Rhodobacter sphaeroides under different growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (11), 4082–4088. <https://doi.org/10.1128/AEM.00341-11>
- [10] Bennet, M., *et al.* (2015). Biologically controlled synthesis and assembly of magnetite nanoparticles. *Faraday Discussions*, 181, 71–83. <https://doi.org/10.1039/c4fd00240g>
- [11] Zarchan, P., & Musoff, H. (2000). *Fundamentals of Kalman filtering: A practical approach*. American Institute of Aeronautics and Astronautics, Incorporated. ISBN 978-1-56347-455-2.
- [12] Freedman, D., & Diaconis, P. (1981). On the histogram as a density estimator: L2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und Verwandte Gebiete*, 57(4), 453–476. <https://doi.org/10.1007/BF01025868>

- [13] Carlton, J. S. (2007). Propeller design. In J. S. Carlton (Ed.), *Marine propellers and propulsion* (2nd ed., pp. 436-463). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-075068150-6/50024-3>
- [14] Purcell, E. M. (1977). Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics*, 45 (1), 3-11. <https://doi.org/10.1119/1.10903>
- [15] Berg, H. C., & Brown, D. A. (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analyzed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239(5374), 500-504. <https://doi.org/10.1038/239500a0>
- [16] Mirkhani, N., Christiansen, M. G., Gwisai, T., et al. (2024). Spatially selective delivery of living magnetic microrobots through torque-focusing. *Nature Communications*, 15, 2160. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46407-4>
- [17] Zhang, L., Abbott, J. J., Dong, L., Kratochvil, B. E., Bell, D., & Nelson, B. J. (2009). Artificial bacterial flagella: Fabrication and magnetic control. *Applied Physics Letters*, 94 (6), 064107. <https://doi.org/10.1063/1.3079655>



# Annexes

**Composition du milieu FSM pour MSR-1.**  
pH 7 avec de l'hydroxyde de sodium à 10 M avant d'être autoclavé.

Composé	Numéro CAS	Emplacement	Quantité pour 1 L
Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) 1M	7365-45-9	Cold room	10ml
Lactate (60 %)	72-17-3	F1-G43	2,5 mL
Peptone de soja	91079-46-8	M6	3 g
Extrait de levure	8013-01-2	M2	0,1 g
Nitrate de sodium (NaNO <sub>3</sub> ) 1M	7631-99-4	Cold room	4 ml
Phosphate de potassium monobasique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 100g/l	7778-77-0	Cold room	1ml
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O) 0,1M	10034-99-8	Cold room	6 mL
Citrate de fer(III) (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> ) 10mM	3522-50-7	Cold room	5 ml (=50μM)
Éléments traces (milieu AMB1)	-	Cold room	1 mL

*Attention pour la préparation du citrate de fer : chauffer pour dissoudre*

Figure A1 : Composition du FSM standard

## Information supplémentaire I1

Le filtre de Kalman fonctionne en deux phases principales à chaque instant  $t$  : la prédiction et la correction. Voici une explication détaillée de ces étapes dans le contexte de l'estimation de la vitesse de rotation du corps d'une bactérie :

Tout d'abord, le filtre de Kalman utilise le modèle dynamique du système pour prédire l'état futur du système, basé sur l'état actuel. L'état du système ici comprend la vitesse et l'accélération de la bactérie.

La matrice  $F$  est utilisée pour calculer l'état à l'instant  $t + 1$  en fonction de l'état à l'instant  $t$ . Concrètement, cette matrice applique l'équation suivante :

$\widehat{x}_{t+1} = F \cdot x_t$ , où  $x_t$  est l'état du système (vecteur à une colonne et deux lignes, avec sur la première ligne la vitesse et sur la second l'accélération).  $\widehat{x}_{t+1}$  est l'état suivant estimé.

La matrice de covariance de l'erreur  $P$ , qui représente l'incertitude sur les estimations, est également mise à jour :

$$P_{t+1} = F \cdot P_t \cdot F^T + Q$$

Cette étape ajuste la confiance dans la prédiction en tenant compte de l'incertitude du modèle (via la matrice  $Q$ )).

Après avoir fait la prédiction, le filtre reçoit une nouvelle mesure réelle de la vitesse. Cette mesure est bruitée, c'est-à-dire qu'elle contient des erreurs dues aux limitations de l'instrument de mesure ou à d'autres facteurs extérieurs.

Le filtre compare la vitesse prédite  $x_{t+1}$  avec la mesure réelle  $z_{t+1}$ .

La différence entre la mesure réelle et la prédiction est appelée innovation ou erreur de mesure :

$y_{t+1} = z_{t+1} - H \cdot \widehat{x}_{t+1}$  où  $H$  est la matrice de mesure qui relie l'état à la mesure, ici la valeur de  $H$  (voir Figure A2) signifie que la vitesse est directement mesurée.

Le filtre calcule ensuite le gain de Kalman  $K_{t+1}$ , qui détermine dans quelle mesure la prédiction doit être ajustée en fonction de cette nouvelle mesure :

$$K_{t+1} = P_{t+1} \cdot H^T \cdot (H \cdot P_{t+1} \cdot H^T + R)^{-1}$$

Le gain de Kalman est un facteur qui dépend de la confiance que le filtre accorde aux mesures (représentée par  $R$ ) par rapport à sa confiance dans les prédictions (représentée par  $P$  et  $Q$ ).

Le filtre ajuste l'estimation de la vitesse et de l'accélération en fonction de l'erreur de mesure  $y_{t+1}$  et du gain de Kalman  $K_{t+1}$  :

$$x_{t+1} = \widehat{x}_{t+1} + K_{t+1} \cdot y_{t+1}$$

Cela permet de corriger la prédiction initiale pour qu'elle soit plus proche de la réalité observée.

Enfin, la matrice de covariance de l'erreur  $P$  est également ajustée pour refléter la nouvelle incertitude après correction :

$$P_{t+1} = (I - K_{t+1} \cdot H) \cdot P_{t+1}$$

Cette mise à jour réduit généralement l'incertitude, car l'estimation corrigée est plus précise.

```
def filtrage(vitesses, R=100, Q=10, P_val=0.1):
    kf = KalmanFilter(dim_x=2, dim_z=1)
    kf.x = np.array([0., 0.]) # état initial (vitesse et dérivée de la vitesse)
    kf.F = np.array([[1., 1.], [0., 1.]]) # matrice de transition d'état
    kf.H = np.array([[1., 0.]]) # matrice de mesure, mesure directe de la vitesse
    kf.P = np.eye(2) * P_val # incertitude initiale de covariance
    kf.R = R # variance de mesure (bruit de mesure)
    kf.Q = np.array([[Q, 0], [0, Q]]) # matrice de covariance de bruit de processus
    vitesses_filtrees = []
    for mesure in vitesses:
        kf.predict()
        kf.update(mesure)
        vitesses_filtrees.append(kf.x[0]) # x[0] est la vitesse estimée
    return np.array(vitesses_filtrees)
```

Figure A2 : Implémentation du filtre de Kalman en Python afin d'atténuer le bruit présent dans les vitesses calculées.

# Résumés

---

## Étude de la chimiotaxie chez la bactérie magnétotactique *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Les bactéries magnétotactiques (MTB) sont un groupe diversifié de bactéries caractérisées par leur capacité à biominéraliser des nanoparticules de magnétite, appelées magnétosomes, leur permettant de s'aligner le long de lignes de champ magnétique. Dans le cadre de ce projet, la compréhension de la chimiotaxie chez les MTB a été approfondie en l'étudiant chez la bactérie modèle *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Plusieurs acides organiques ont été testés afin de déterminer leur capacité à constituer des sources de carbone et d'électrons pour MSR-1 et donc potentiellement représenter des attractants chimiotactiques. Les résultats des courbes de croissance et des motilités d'essaimage bactérien sur gélose molle ont montré que c'est le cas du lactate, de l'acétate, du propionate, du pyruvate et du succinate, qui sont à l'origine d'une réponse chimiotactique. Afin de caractériser cette dernière, l'activité d'un des moteurs flagellaires de plusieurs bactéries a été suivie en l'absence d'attractant. Cette première étape a permis de fournir une référence afin de pouvoir comparer l'activité du moteur en présence d'attractants. Les résultats font état d'une fréquence d'arrêt presque nulle, d'une symétrie entre les vitesses de rotation en sens horaire et antihoraire et enfin d'une préférence du moteur flagellaire pour le sens de rotation antihoraire. Sur le long terme, cette étude rend les MTB particulièrement intéressantes pour le développement de microrobots guidés par magnétisme, utilisés pour des applications médicales telles que la délivrance ciblée de médicaments.

## Study of chemotaxis in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*

Magnetotactic bacteria (MTB) are a diverse group of bacteria characterized by their ability to biomineralize magnetite nanoparticles called magnetosomes, which allow them to align along magnetic field lines. As part of this project, the understanding of chemotaxis in MTB was deepened by studying it in the model bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. Several organic acids were tested to determine their ability to serve as sources of carbon and electrons for MSR-1 and thus potentially represent chemotactic attractants. The results from growth curves and bacterial swarming motility

on soft agar showed that this is the case for lactate, acetate, propionate, pyruvate, and succinate, which trigger a chemotactic response. To characterize this response, the activity of one of the flagellar motors in several bacteria was monitored in the absence of attractants. This first step provided a reference to compare motor activity in the presence of attractants. The results indicate an almost zero stop frequency, symmetry between clockwise and counterclockwise rotation speeds, and a preference of the flagellar motor for counterclockwise rotation. In the long term, this study makes MTB particularly interesting for the development of magnetically guided microrobots, which could be used for medical applications such as targeted drug delivery.